

异种肾移植的亚临床研究进展

陈羽翔 李卓骋 李涛 马晓杰 王毅 蒋鸿涛

【摘要】 异种移植是目前解决临床器官来源短缺的有效途径之一。随着基因编辑技术及免疫抑制方案不断发展,猪-非人灵长类动物异种肾移植相关研究取得了显著进展,为开启异种肾移植临床应用创造了良好条件。鉴于人与非人灵长类动物实质性差异,同时为了满足现阶段的伦理学要求,猪-人异种肾移植的亚临床研究非常必要。近年来,已有关于基因修饰猪-脑死亡受者异种肾移植的亚临床研究,表明异种肾移植已经进入向临床发展的过渡阶段。然而,供受体选择及免疫抑制应用方案尚未统一,亟需在亚临床研究中进一步明确。本文就异种肾移植亚临床研究中供受体选择、免疫抑制方案、移植术后监测管理等方面的现状和当前面临的主要问题进行了综述,以期推动异种肾移植向临床转化。

【关键词】 异种肾移植; 基因修饰猪; 非人灵长类动物; 免疫抑制药; 排斥反应; 炎症反应; 凝血; 病毒感染

【中图分类号】 R617, Q78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2024) 01-0002-09

Progress in subclinical research of kidney xenotransplantation Chen Yuxiang*, Li Zhuocheng, Li Tao, Ma Xiaojie, Wang Yi, Jiang Hongtao. *Department of Transplantation, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570100, China

Corresponding author: Jiang Hongtao, Email: jht20032003@163.com

【Abstract】 Xenotransplantation is an efficient pathway to solve the problem of transplant organ source deficiency in clinical settings. With the increasing progress of gene editing technique and immune suppression regimen, important development has been achieved on researches regarding pig to non-human primate kidney xenotransplantation, which provides a good condition for the introduction of the technique in the clinical application. In view of the substantial difference between human and non-human primate, and to meet the needs of current ethic requirements, it is necessary to perform subclinical studies for pig to human kidney xenotransplantation. In recent years, such subclinical studies with regard to the genetically modified pig to brain death recipient kidney xenotransplantation had been performed, indicating that kidney xenotransplantation gradually began to transit to the clinical development stage. However, donor/recipient selection and immune suppression regimen has not reached a consensus yet, and has to be clarified in subclinical studies. In this article, the current status and confronted problems of donor/recipient selection, immune suppression regimen and post transplantation management in the subclinical studies of kidney xenotransplantation were reviewed, aiming to promote the clinical transformation of kidney xenotransplantation to the clinical application.

【Key words】 Kidney xenotransplantation; Genetically modified pig; Non-human primate; Immunosuppressant; Rejection; Inflammation; Coagulation; Virus infection

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023256

基金项目: 国家自然科学基金(82260154); 海南省重大科技项目(ZDKJ2019009); 海南省自然科学基金(820RC766、821QN413、821QN409); 海南省临床医学中心建设项目; 海南省研究生创新科研课题(Qhys2022-227); 海南医学院研究生创新科研A类课题(HYYB2022A07)

作者单位: 570100 海口, 海南医学院第二附属医院移植科(陈羽翔、李卓骋、李涛、王毅、蒋鸿涛), 康复科(马晓杰)

作者简介: 陈羽翔(ORCID 0000-0002-7273-4658), 硕士研究生, 研究方向为肾移植, Email: chen4xi0402@126.com

通信作者: 蒋鸿涛(ORCID 0000-0001-9716-3233), Email: jht20032003@163.com



作者简介: 蒋鸿涛, 主任医师, 硕士研究生导师。现任海南医学院第二附属医院肾移植科副主任。兼任海南省肾脏移植质量控制中心主任、中国生物医学工程学会透析移植分会常务委员兼秘书长、中华医学会器官移植学分会青年委员、海南省医学会器官移植学分会青年委员会副主任委员、海南省医学会器官移植学分会常务委员等。兼任《器官移植》《中华器官移植杂志》等杂志编委。发表中文核心及 SCI 论文 20 余篇, 参编各类专著 6 部。作为负责人或主要参与者获得国家 and 海南省级课题十余项, 获得海南省科技进步一等奖 1 项、自然科学奖二等奖 1 项、科学技术成果鉴定先进奖 1 项。主要从事肾移植相关的临床和科研工作, 同时具备肝移植、肾移植、肺移植资质, 擅长各类肾移植和移植术后患者监护室的全流域综合管理工作。

肾移植是治疗终末期肾病的最有效途径, 同种异体肾移植虽然取得了一定成功, 但肾脏来源短缺仍是限制临床肾移植的主要障碍^[1]。目前, 我国为扩大移植器官来源, 除脑死亡或心脏死亡器官捐献的供者及亲属活体供者外, 还纳入边缘供者、ABO 血型不相容肾移植等^[2]。尽管如此, 仍然不能从根本上缓解肾源压力。因此, 增加肾源已成为一个亟需解决的问题。异种移植是解决器官来源短缺的根本途径之一。随着基因修饰工程和包括单克隆抗体在内的免疫抑制方案的发展, 异种肾移植研究取得了重大的进展, 猪-非人灵长类动物 (non-human primate, NHP) 的肾移植日趋成熟, 受体猴最长存活时间已达 758 d^[3]。然而 NHP 与人类存在较大差异, 在获得临床试验的经验之前, 猪-人异种肾移植的收益和风险是不明确的, 并且因为生物安全和社会伦理等问题, 现有条件不允许进行大规模猪-人异种肾移植。亚临床研究是桥接基础和临床研究的过渡性阶段, 可以在更接近临床的试验环境中验证既往结论, 并发现、明确新的问题。自 2021 年起公开报道的多例猪-脑死亡受者肾移植表明异种肾移植已经进入了亚临床研究阶段^[4-5], 因此有必要就目前异种肾移植亚临床研究的进展以及所面临的重点问题进行综述, 以期对异种肾移植发展提供方向。

1 异种肾移植供体

1.1 供体猪的基因修饰

开展异种肾移植临床研究前必须做好针对供体动物的选择与设计, 并在异种移植模型中进行研究, 以评估其安全性和有效性。尽管 NHP 与人的血缘关系最近, 但通常携带人类易感的病毒, 不适合作为异种肾移植的供体。猪肾的大小、重量、解剖结构、生理指标与人类接近, 繁殖快, 且易进行基因修饰, 是理想的供体来源^[6]。但由于人和猪之间巨大的种间差

异, 直接进行猪到人肾移植会产生强烈的排斥反应, 造成移植失败。因此, 需要对供体猪进行基因修饰, 随着 CRISPR/Cas9 技术的发展, 这一问题得到了部分解决。例如, 敲除猪 α -1,3-半乳糖基转移酶 (α -1,3-galactosyltransferase, GGTA1) 基因可消除主要异种抗原 α -1,3-半乳糖 (α -1,3-galactose, α Gal) 引起的超急性排斥反应^[7], 敲除猪编码聚多糖 SDa 的 β -1,4-N-乙酰半乳糖转移酶 (β -1,4-N-acetyl galactosaminyltransferase, β 4GalNT2) 基因和编码 N-羟乙酰神经氨酸 (N-acetylneuraminic acid, Neu5Gc) 的单磷酸胞嘧啶-N-乙酰神经氨酸羟化酶 (cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, CMAH) 基因, 可减少非 α Gal 抗原介导的急性血管性排斥反应^[8], 这种 3 基因编辑猪在异种肾移植研究中使用广泛。除此以外, 还可转入人补体调节蛋白 hCD46、hCD55 等, 抑制人的补体系统对移植物的杀伤作用^[9]; 转入人血栓调节蛋白 (human thrombomodulin, hTBM) 及内皮蛋白 C 受体 (human endothelial protein C receptor, hEPCR), 抑制微血管血栓形成, 改善凝血情况^[10-11]; 转入人整合素相关蛋白 hCD47 以避免巨噬细胞的吞噬作用^[12]; 转入人血红素加氧酶 (human hemeoxygenase, hHO) -1 用于调节免疫和抵抗炎症^[13]。包含上述 9 种基因编辑的供体猪曾被认为临床试验的最佳选择。

1.2 亚临床研究的供体猪

上述这些基因的作用在大量异种移植实验中已经得到证实, 并将在猪-脑死亡受者的异种肾移植研究中逐步明确。美国阿拉巴马大学使用了 10 基因编辑猪, 包括 2 个人补体抑制基因 (hCD55、hCD46)、2 个人抗凝血基因 (hTBM、hEPCR) 和 2 个免疫调节基因 (hCD47、hHO-1) 靶向插入, 以及 3 个猪糖基抗原和 1 个猪生长激素受体基因敲除^[5]。敲除生长激素受体基因可能是因为猪异种器官的内在生长潜力

会损害其原位移植后的长期功能^[14]。除此以外目前仍然存在许多未知的异种抗原等待我们去探寻和识别。来自美国 eGenesis 公司的 Wenning Qin 和 Michele E. Youd 团队对尤卡坦半岛小型猪供体进行 69 次基因编辑, 以实现 3 种糖基抗原的消除、猪内源性逆转录病毒 (porcine endogenous retrovirus, PERV) 失活和 7 个人类转基因过表达, 将该供体猪的肾脏移植到 NHP 体内并与临床相关免疫抑制方案结合, 受体存活达 758 d, 这一研究成果使基因工程猪-人肾移植的临床试验更近了一步^[3,15-16]。

基因编辑并非越多越好, 重要的是明确每种基因的具体作用。深入探究基因的功能和编辑后的影响, 有助于更精确地调控供体猪的基因组, 以实现更安全有效的异种肾移植。猪或许是异种肾脏最合适的来源, 供体猪基因编辑取得了令人振奋的进展, 未来的研究应从临床需求入手, 探究未知抗原的同时明确相关基因的作用机制, 为异种肾移植的进一步发展提供科学依据。

2 异种肾移植受体

2.1 受体选择

2.1.1 临床前研究的受体 自 1906 年开始, 人们尝试将不同动物的器官移植到人身上, 但均以失败告终^[17]。随着外科技术发展, 考虑到小型动物之间更大的遗传差异 (小鼠-大鼠核苷酸差异 33.4%, 而猕猴-狒狒核苷酸差异 2.6%) 以及更低的实验花费, 研究者们逐步使用啮齿类动物揭示异种移植的机制, 包括小鼠-大鼠、仓鼠-大鼠等。尽管用啮齿类动物实验数据指导异种移植存在很大的局限性, 但这些异种肾移植模型在阐明体液和细胞因子的机制方面作出了巨大贡献。2012 年以前约 95% 有关异种移植的研究都基于啮齿类动物模型。此后 NHP 受到研究者青睐, 因为新的基因编辑方案使 NHP 受体存活时间大大延长^[3]。但即使 NHP 与人类相似, 仍有一定局限性, 猪-NHP 移植模型仅限于对免疫抑制方案、急性排斥反应等问题进行初步探究, 无法清楚地反映猪-人异种肾移植中的真实情况。

2.1.2 亚临床研究的受体 猪-脑死亡受者是一种桥接动物实验和临床研究的较好选择, 虽然目前接受猪肾的脑死亡受者生存时间较短, 无法进一步暴露更多诸如病毒感染、猪肾快速生长等问题^[18], 但在猪-人异种移植的科学技术、社会伦理问题没有解决时, 猪-

脑死亡受者模型仍是目前最直观反映临床问题的研究模型。对于基因修饰猪-人异种肾移植受者的选择, 目前仍未达成共识, 有观点认为, 受者至少要发生某一器官衰竭, 且现有的手段无法有效干预^[19]。此外, 受者对同种异体抗原的敏感性是肾移植中的难题, 例如群体反应性抗体 (panel reactive antibody, PRA) 水平较高的患者, 接受肾移植的机会小, 且移植的预后较差, 这类患者经过严格配型、评估后可以作为异种肾移植的潜在受者^[20]。但对于早期临床研究, 在异种肾移植技术成熟以前选择这种高致敏患者接受猪肾移植是不合适的, 可能达不到预期的研究目的, 因为研究发现猪白细胞抗原 (swine leukocyte antigen, SLA) 和人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 存在交叉位点^[21], 因此, 高 PRA 的受体中存在的抗 HLA 抗体可能会与 SLA 结合, 形成抗原抗体复合物, 激活补体系统, 对移植肾造成损伤。在安全性和有效性方面, 异种肾移植临床研究应该更多地与长期透析治疗相比, 而非与同种异体肾移植相比, 因此因血型、地域等原因, 接受同种异体移植希望不大或等待时间较长的患者, 可以考虑异种移植。除上述患者外, 自愿参与研究的终末期肾病患者是否可以作为受者? 将异种肾移植作为过渡治疗是否合适? 这些问题有待更多亚临床研究来明确。

受研究条件、供受体选择、社会伦理等问题的限制, 现阶段异种肾移植的亚临床研究数量还很少, 笔者未发现关于脑死亡受者术前准备的研究报道。回顾已经报道的异种肾移植, 术前详细的评估、合适的免疫诱导方案有助于维持移植肾功能和受体存活。从同种异体移植中取得的成果来看, 围手术期进行康复干预等措施在将来猪-人异种肾移植中或许是有效的, 但目前没有关于异种移植康复方面的文献, 因此这一猜想还需要更多研究来证明。迄今为止, 已报道进行了 2 例异种心脏移植。相较于异种肾移植, 严重心脏衰竭患者缺乏有效的替代治疗、供心数量少, 迫使临床不得不尝试异种心脏移植, 或许是异种心脏移植更早进入临床的原因。而终末期肾病患者基础条件比心脏、肺脏、肝脏衰竭的患者更好, 且当移植肾发生感染、排斥反应、功能障碍时可以通过透析等方法维持直至移植肾功能完全丧失, 在移植肾切除后也有可用的替代治疗方案——已有研究表明在配型合适、免疫抑制方案合理时, 异种肾移植对后续的同种异体肾移植可能没有明确的危害^[22], 这可能为将来临床研究提

供更多机会。肾脏功能复杂,猪肾生理功能能否满足人的需求尚无定论,因此还需要在亚临床研究中进一步明确。

2.2 免疫抑制药的使用

除对供体猪进行基因编辑外,免疫抑制药的使用也是异种移植肾存活所必须的。但异种移植中哪种免疫方案效果更好、对受体负担更小,未来的免疫抑制药还需要关注哪些方面,仍有待在亚临床研究中进一步探究。目前异种肾移植中常用的免疫抑制药包括他克莫司、环孢素、霉酚酸酯 (mycophenolic acid, MPA)、西罗莫司和糖皮质激素等。为了获得更好的疗效,一些新型的免疫抑制药逐渐问世。

2.2.1 阻断共刺激通路 CD40/CD154 是促进 T 细胞活化的一种重要的共刺激通路。2016 年 Mohiuddin 等^[23]报道了使用抗 CD40 抗体的方案,基因编辑猪的心脏在狒狒体内最长存活了 945 d。后续研究证明阻断 CD40/CD154 轴可促进猪心脏、肾脏和胰岛的长期生存,且抗 CD154 效果可能比抗 CD40 效果更好^[24]。

2.2.2 抑制补体系统 补体系统通过经典途径、替代途径、凝集素途径以及缺血-再灌注损伤参与先天免疫和适应性免疫,可以促进巨噬细胞破坏、诱发凝血,进一步导致超急性排斥反应和血栓形成,引起移植肾广泛缺血坏死,是异种移植中重要的识别和效应机制。虽然供体猪转入了人补体调节蛋白如 hCD46、hCD55 等,但在异种移植过程中仍然有补体系统的激活,因此需要针对性的抑制方案^[25]。

C1 抑制剂对抗体介导的排斥反应 (antibody-mediated rejection, AMR) 的治疗作用在多项实验均有探究,包括降低 AMR 发生和减轻慢性 AMR 损伤,且有一定安全性^[26],但因为研究结果不一致、药物方案和样本量不同等原因尚未真正进入临床。苏替利单抗 (sutimlimab) 是一种抗 C1 单抗,通过抑制补体经典激活途径用于治疗冷凝血素病^[27]。一项关于 sutimlimab 的 I 期临床试验,观察到 AMR 和补体经典通路仍有激活,但 10 例肾移植受者 C4d 沉积水平均有不同程度降低,肾功能和供者特异性抗体 (donor specific antibody, DSA) 未见明显变化^[28],表明 sutimlimab 有一定应用前景。

抗 C5 抗体特度鲁单抗 (tesidolumab) 也可以减轻 AMR。Adams 等^[29]在猪-恒河猴肾移植研究中发现,抗 CD154、T 细胞耗竭、使用 MPA 和糖皮质激素的免疫抑制基础上,每周使用 tesidolumab 减少了

早期 IgM 介导的 AMR,且实验中的恒河猴大多存活 300 d 以上。

2.2.3 其他免疫抑制药 其他正在进行异种移植研究的药物包括抗 CD38 抗体达雷木单抗 (daratumumab) 和贝利木单抗 (belimumab)^[30]。另一种新药 imlifidase 能迅速清除循环 IgG^[31],有一定的应用前景。初步研究表明,在高致敏 NHP 中,使用 imlifidase 后预存抗猪抗体水平降低^[32],但具体的结论仍需要更详细的实验。

2.2.4 亚临床研究的方案 美国阿拉巴马大学的猪-脑死亡受者的异种肾移植使用糖皮质激素、抗胸腺细胞球蛋白、利妥昔单抗用于免疫诱导,后续使用 MPA 类药物、甲泼尼龙以及他克莫司用于免疫维持,直到试验终止未观察到超急性排斥反应,也没有细胞排斥反应、抗体或补体蛋白沉积的表现^[5]。美国纽约大学的 2 例猪-脑死亡受者肾移植使用糖皮质激素和 MPA 进行免疫维持,并且在 6、24、48、54 h 进行活组织检查,未发现超急性排斥反应或 AMR 迹象^[4]。3 例异种肾移植均未使用抗 CD40 单抗,表明猪-脑死亡受者移植后并非需要很复杂的免疫抑制方案,也可能因为受者生存时间太短,部分排斥反应还没有发生。因此今后亚临床研究中,在条件允许的情况下可以适当延长受者观察期,使之暴露更多潜在的问题。

2.3 术后监测和管理

与同种异体肾移植不同,异种移植肾来源是基因修饰猪,这可能需要一些新的检测方案来明确异种移植围手术期的各种问题。基因修饰猪作为供肾来源意味着许多指标的检测可以在移植开始前进行,包括移植相关抗原和抗体的检测以及细胞毒性实验。除此以外,移植肾功能也需要更全面的监测方式,除同种异体移植术后常规监测的血液生化指标外,与排斥反应相关的 DSA、非 HLA 抗体、补体水平等都需要检测。另外,根据猪-NHP 肾移植研究,巨噬细胞在异种移植排斥反应中发挥重要作用,因此移植术后病理活组织检查也需要注意巨噬细胞浸润、吞噬、极化以及细胞因子表达的情况。猪肾的生理功能也值得关注,促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO)、肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)、酸碱平衡等指标同样需要纳入术后监测范围^[33]。已有研究显示猪肾素可以用人酶联免疫吸附试验试剂盒进行检测^[34],但猪 EPO 还没有明

确的检测方法。猪来源的病毒感染是影响移植物存活的原因之一，因此除上述指标以外，还需要对 PERV、猪巨细胞病毒/猪玫瑰状病毒（porcine cytomegalovirus/porcine roseolovirus, PCMV/PRV）进行检测，以保证移植物和受体的安全。总的说来，探究未来异种肾移植需要更新哪些技术手段、纳入哪些新的指标、如何评价受体状态等问题，对异种肾移植的成功有重大意义，而这些问题有望通过亚临床研究初步明确。

3 异种肾移植面临的问题

尽管异种肾移植取得了一些进展，但仍面临众多挑战，如排斥反应、炎症反应、凝血功能障碍、移植肾生理功能维持、病毒感染以及异种肾移植相关的社会和伦理问题等。

3.1 排斥反应、炎症反应与凝血功能紊乱

由于供体猪和受体存在分子差异，异种肾移植往往面临严重的排斥反应，且目前虽然通过基因编辑、免疫抑制等手段克服了超急性排斥反应，但急性排斥反应仍无法避免。一方面，由于已报道的猪-脑死亡受体异种肾移植观察时间短，未观察到明显的排斥反应和炎症反应^[4-5]；但另一方面，根据 1 051 例 NHP 同种和异种肾移植的结果来看，异种肾移植中急性排斥反应很难避免（48.6%），且以 AMR 为主（45.5%）^[35]。慢性排斥反应也影响异种移植肾的存活，Kim 等^[36]通过耗竭 CD4⁺T 细胞将猪-恒河猴移植肾存活时间延长至 499 d，证明 CD4⁺T 细胞是慢性排斥反应的原因之一，但具体机制仍然所知甚少。另外，在异种移植中，转入 hCD55 或 hCD46 后依然观察到补体激活，如何克服也有待进一步研究^[25]。因此，开发更有针对性的免疫抑制药以及具有免疫耐受特征的基因修饰猪仍是未来异种移植中排斥反应研究的目标。当移植肾功能障碍时，血小板数量往往降低，移植肾表现出微血栓形成和肾间质出血。且部分凝血异常与急性排斥反应损伤血管内皮细胞相关^[37]，因此减少排斥反应造成的损伤，或许能够抑制受体凝血功能紊乱。持续存在的炎症反应是移植失败的重要原因之一，炎症反应与上述的凝血功能紊乱、排斥反应有一定关联。

细胞外组蛋白在异种肾移植中的作用及其机制也需要关注。细胞外组蛋白是一种由损伤和活化的细胞释放到胞外的正电荷蛋白质，介导组织、细胞损伤，并作为损伤相关分子模式介导炎症、凝血障碍、免疫

反应和细胞毒性。笔者团队前期研究也发现猪-NHP 肾移植后血清中细胞外组蛋白水平升高，用白细胞介素-6 受体阻断剂治疗后可降低细胞外组蛋白和 C-反应蛋白水平^[38]。

采取针对炎症发生发展的措施、使用相应炎症介质的阻断剂、阻断共刺激通路可以抑制炎症反应，同时应当关注细胞外组蛋白在异种移植中的作用，这些措施有助于延长异种移植肾存活时间^[39]。

3.2 肾脏生理功能

在异种肾移植研究中，研究者们普遍认为猪肾的生理功能将对受者长期预后产生重要影响，但具体的生理功能，例如 EPO 生成、RAAS 调节以及钙磷代谢平衡等对移植肾存活及患者预后的影响还不清楚^[40]。从目前研究结果来看，猪肾生成的 EPO 能否对 NHP 起效仍未明确^[41]；猪来源的肾素虽然通过受体的 RAAS 发挥生理功能，但效果明显受损——血管生成素（angiopoietin, Ang）II 和醛固酮水平降低，血钾升高，尿液渗透性和钠离子浓度也有不同程度降低，说明猪肾对尿液的浓缩能力下降^[34]。

尽管异种移植后大多数电解质都维持在正常范围内，但仍然面临高血钙、低血磷的问题^[33,37]，目前还没有研究探索猪与人或 NHP 之间钙磷调节机制的差异。除此以外，笔者团队前期研究观察到接受猪肾移植的猕猴出现血液碳酸氢根升高，但因为受体猕猴存活时间短，高碳酸氢根是否影响移植物存活、受体长时间存活时碳酸氢根浓度能否恢复正常等问题暂时无法回答^[42]。上述结果提示，猪肾移植到 NHP 后，其生理功能或许没有达到预期。近期报道的多例猪-人异种肾移植也因为观察期太短，无法明确脑死亡受者是否存在上述内分泌和代谢问题。但即使这些问题可用人源化基因修饰猪、调控受体饮食或者外源性导入人 EPO 等方法解决，在亚临床研究中还是不能忽视对异种肾移植生理学的探究，包括具体机制、早期识别以及针对性的管理方案等。

3.3 病毒感染

PERV 整合在基因组中，是异种跨物种传播的逆转录病毒，基因修饰猪有传播 PERV 的可能性。根据目前研究，隔离传染源、使用抗病毒药物治疗、接种疫苗等常规手段很难减少 PERV 传播，甚至在已感染的受体细胞中，PERV 传播能力会进一步增强^[43]。在免疫抑制不可避免、PERV 无法根除的情况下，PERV 感染风险意味着移植前后应该对供体和受体进

行更加严格的安全检测,包括但不限于聚合酶链反应、Southern 印迹、荧光原位杂交、基因测序等手段^[44-45]。通过 CRISPR/Cas9 技术敲除已知的 PERV 相关基因是否真正可行,面对未知的 PERV 相关基因能否利用 PERV 的共性使用特定手段进行沉默,亚临床研究有望发现并明确 PERV 新的解决办法。

PCMV/PRV 与人疱疹病毒 6A、6B、77 密切相关,在世界各地的猪群中广泛分布^[46]。美国马里兰大学进行的猪-人心脏移植中,观察到这种病毒可由猪传播给患者^[47]。感染 PCMV/PRV 会导致受体血小板减少、纤维蛋白原水平下降和无法控制的出血,大大影响移植存活和受体预后^[48],因此如何检测、清除这类病毒是异种移植需要克服的困难之一。Halecker 等^[49]报道,通过逆转录聚合酶链反应及免疫学方法可以检测并清除 PCMV/PRV,虽然效率很低,但这也为后续 PCMV/PRV 的研究提供了一种思路。

因此,在未来猪-脑死亡受者肾移植中,需要格外注意 PERV 和 PCMV/PRV 感染的问题,这种亚临床研究相较于过去的各种动物模型,更接近于真实的临床情境,因此有助于揭示 PERV 和 PCMV/PRV 感染与传播的关键。在亚临床研究中深入挖掘 PERV 和 PCMV/PRV 感染机制,并试验相应的预防措施,有助于提高异种肾移植的临床安全性,推动其早日走入临床。

3.4 社会和伦理问题

只有在社会和伦理问题得到有效解决,异种移植才能真正应用于临床。异种肾移植中,不光受者需要重点关注,参与其中的动物权利、福祉以及社会公众的态度也需要关注。美国食品与药品监督管理局 2022 年批准了 1 例猪-人的异种心脏移植^[50],这是异种移植伦理、法规的一项突破。近日国际移植协会发表的一篇特刊文章总结了 30 条移植相关的基本伦理原则^[51],表明异种移植相关的法律、伦理原则正在不断完善和适应未来发展趋势。这也表明在正确的监管和决策评估下进行异种移植是符合伦理要求的。国外一些研究显示,公众对于异种器官移植的接受度为 10%~90%,考虑到地区、宗教、被调查者身体状况等问题,一些数据或许无法反映异种移植所面临的真实社会态度。笔者团队也进行了一项研究,纳入终末期肾病等待移植的患者、肾移植术后患者、患者家属以及医学生 4 个群体进行调查,约 53.2% 的受访者明确表示“在异种肾移植与同种异体肾移植有着相同结

果及风险时”能接受异种肾移植;而 46.8% 的受访者态度不确定,主要原因是目前异种移植的风险尚不明确、担心受到歧视;态度不确定的受访者中,21%~35% 在面临无法进行同种异体肾移植或接受异种肾移植更有优势时,态度发生了转变^[52]。提示当前面临的社会问题有望通过推进研究、科普宣传逐渐解决。

4 小 结

异种肾移植在基础研究中展现出巨大的应用潜力,但这些成果难以直接应用于临床。因此,亚临床研究作为一个过渡性阶段就显得尤为重要,不仅可以验证实验室内的研究成果,确保其在更接近真实世界的环境中的有效性,同时在实验成果向临床转化的过程中也会暴露一些实验室难以发现的问题,这些问题既反映了临床的需求,同时给实验室内的研究提供方向。目前看来,亚临床研究中使用“9 基因猪”或“10 基因猪”可能是比较合适的,但还要进一步明确具体的作用机制,同时也需要积极探究新的异种抗原。现阶段基因修饰猪的培育周期还很长,未来如何提高产量也是值得考虑的问题。虽然将终末期肾病的志愿者或不能接受同种异体肾移植的患者作为临床研究受者还存在争议,但在当前亚临床研究中脑死亡患者可能是一种较好的选择。现有的免疫抑制方案还不完善,未来还需要更多有效的免疫抑制药。尽管取得了突破性的进展,但是异种肾移植供肾基因型和受体选择尚未统一,围手术期监测、管理方案还不明确,同时仍然面临排斥反应、持续的炎症反应、凝血功能紊乱、肾脏生理功能的维持以及病毒感染等问题,未来的亚临床研究应该积极寻找可能的解决办法,推动异种肾移植从实验室走入临床。

参考文献:

- [1] ZHOU Q, LI T, WANG K, et al. Current status of xenotransplantation research and the strategies for preventing xenograft rejection[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 928173. DOI: 10.3389/fimmu.2022.928173.
- [2] 徐小松. ABO 血型不相容肾移植治疗终末期肾病的关键临床问题探讨[J]. *重庆医学*, 2023, 52(18): 2721-2725,2740. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2023.18.001. XU XS. The key clinical issues of ABO blood group system incompatible kidney transplantation in the treatment of end stage renal disease[J]. *Chongqing Med*, 2023, 52(18): 2721-2725,2740. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2023.18.001.

- [3] ANAND RP, LAYER JV, HEJA D, et al. Design and testing of a humanized porcine donor for xenotransplantation[J]. *Nature*, 2023, 622(7982): 393-401. DOI: 10.1038/s41586-023-06594-4.
- [4] MONTGOMERY RA, STERN JM, LONZE BE, et al. Results of two cases of pig-to-human kidney xenotransplantation[J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(20): 1889-1898. DOI: 10.1056/NEJMoa2120238.
- [5] PORRETT PM, ORANDI BJ, KUMAR V, et al. First clinical-grade porcine kidney xenotransplant using a human decedent model[J]. *Am J Transplant*, 2022, 22(4): 1037-1053. DOI: 10.1111/ajt.16930.
- [6] 高菲, 王煜, 杜嘉祥, 等. 遗传修饰猪模型在生物医学及农业领域研究进展及应用[J]. *遗传*, 2023, 45(1): 6-28. DOI: 10.16288/j.ycz.22-313.
- GAO F, WANG Y, DU JX, et al. Advances and applications of genetically modified pig models in biomedical and agricultural field[J]. *Hereditas*, 2023, 45(1): 6-28. DOI: 10.16288/j.ycz.22-313.
- [7] 周小青, 刘玉, 唐成程, 等. 敲除 GGTA1 同时表达人白细胞抗原 G5 的基因修饰猪的构建[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(3): 1096-1111. DOI: 10.13345/j.cjb.210655.
- ZHOU XQ, LIU Y, TANG CC, et al. Generation of genetically modified pigs devoid of GGTA1 and expressing the human leukocyte antigen-G5[J]. *Chin J Biotechnol*, 2022, 38(3): 1096-1111. DOI: 10.13345/j.cjb.210655.
- [8] TECTOR AJ, MOSSER M, TECTOR M, et al. The possible role of anti-Neu5Gc as an obstacle in xenotransplantation[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 622. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00622.
- [9] COOPER DKC, HARA H, IWASE H, et al. Justification of specific genetic modifications in pigs for clinical organ xenotransplantation[J]. *Xenotransplantation*, 2019, 26(4): e12516. DOI: 10.1111/xen.12516.
- [10] NAGANO F, MIZUNO T, MIZUMOTO S, et al. Chondroitin sulfate protects vascular endothelial cells from toxicities of extracellular histones[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 826: 48-55. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.02.043.
- [11] ZHANG G, HARA H, YAMAMOTO T, et al. Serum amyloid a as an indicator of impending xenograft failure: experimental studies[J]. *Int J Surg*, 2018, 60: 283-290. DOI: 10.1016/j.ijssu.2018.11.027.
- [12] WATANABE H, ARIYOSHI Y, POMPOSELLI T, et al. Intra-bone bone marrow transplantation from hCD47 transgenic pigs to baboons prolongs chimerism to >60 days and promotes increased porcine lung transplant survival[J]. *Xenotransplantation*, 2020, 27(1): e12552. DOI: 10.1111/xen.12552.
- [13] CIMENO A, KURAVI K, SORRELLS L, et al. hEPCR. hTBM. hCD47. hHO-1 with donor clodronate and DDAVP treatment improves perfusion and function of GalTKO. hCD46 porcine livers perfused with human blood[J]. *Xenotransplantation*, 2022, 29(2): e12731. DOI: 10.1111/xen.12731.
- [14] HINRICHS A, RIEDEL EO, KLYMIUK N, et al. Growth hormone receptor knockout to reduce the size of donor pigs for preclinical xenotransplantation studies[J]. *Xenotransplantation*, 2021, 28(2): e12664. DOI: 10.1111/xen.12664.
- [15] MOHIUDDIN MM. Pig-to-primate organ transplants require genetic modifications of donor[J]. *Nature*, 2023, 622(7982): 244-245. DOI: 10.1038/d41586-023-02817-w.
- [16] KOZLOV M. Monkey survives for two years after gene-edited pig-kidney transplant[J]. *Nature*, 2023, 622(7983): 437-438. DOI: 10.1038/d41586-023-03176-2.
- [17] SIEMS C, HUDDLESTON S, JOHN R. A brief history of xenotransplantation[J]. *Ann Thorac Surg*, 2022, 113(3): 706-710. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2022.01.005.
- [18] GANCHIKU Y, RIELLA LV. Pig-to-human kidney transplantation using brain-dead donors as recipients: one giant leap, or only one small step for transplantkind?[J]. *Xenotransplantation*, 2022, 29(3): e12748. DOI: 10.1111/xen.12748.
- [19] 中华医学会器官移植学分会异种移植学组. 异种移植临床研究指导意见(2018 建议版)[J]. *器官移植*, 2018, 9(6): 405-408. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.06.001.
- Xenotransplantation Group of Organ Transplantation Credit Association of Chinese Medical Association. Guidelines for clinical research of xenotransplantation (2018 recommended version) [J]. *Organ Transplant*, 2018, 9(6): 405-408. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.06.001.
- [20] YU XH, DENG WY, JIANG HT, et al. Kidney xenotransplantation: recent progress in preclinical research[J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 514: 15-23. DOI: 10.1016/j.cca.2020.11.028.
- [21] LADOWSKI JM, HARA H, COOPER DKC. The role of SLAs in xenotransplantation[J]. *Transplantation*, 2021, 105(2): 300-307. DOI: 10.1097/TP.0000000000003303.
- [22] HARA H, NGUYEN H, WANG ZY, et al. Evidence that sensitization to triple-knockout pig cells will not be detrimental to subsequent allotransplantation[J]. *Xenotransplantation*, 2021, 28(4): e12701. DOI: 10.

- 1111/xen.12701.
- [23] MOHIUDDIN MM, SINGH AK, CORCORAN PC, et al. Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO. hCD46. hTBM pig-to-primate cardiac xenograft[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11138. DOI: 10.1038/ncomms11138.
- [24] ADAMS AB, KIM SC, MARTENS GR, et al. Xenoantigen deletion and chemical immunosuppression can prolong renal xenograft survival[J]. *Ann Surg*, 2018, 268(4): 564-573. DOI: 10.1097/SLA.0000000000002977.
- [25] ANWAR IJ, DELAURA I, LADOWSKI J, et al. Complement-targeted therapies in kidney transplantation-insights from preclinical studies[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 984090. DOI: 10.3389/fimmu.2022.984090.
- [26] VIGLIETTI D, GOSSET C, LOUPY A, et al. C1 inhibitor in acute antibody-mediated rejection nonresponsive to conventional therapy in kidney transplant recipients: a pilot study[J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(5): 1596-1603. DOI: 10.1111/ajt.13663.
- [27] RÖTH A, BARCELLINI W, D'SA S, et al. Sutimlimab in cold agglutinin disease[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(14): 1323-1334. DOI: 10.1056/NEJMoa2027760.
- [28] ESKANDARY F, JILMA B, MÜHLBACHER J, et al. Anti-C1s monoclonal antibody BIVV009 in late antibody-mediated kidney allograft rejection-results from a first-in-patient phase 1 trial[J]. *Am J Transplant*, 2018, 18(4): 916-926. DOI: 10.1111/ajt.14528.
- [29] ADAMS AB, LOVASIK BP, FABER DA, et al. Anti-C5 antibody tesidolumab reduces early antibody-mediated rejection and prolongs survival in renal xenotransplantation[J]. *Ann Surg*, 2021, 274(3): 473-480. DOI: 10.1097/SLA.0000000000004996.
- [30] GAO Y, SHAN W, GU T, et al. Daratumumab prevents experimental xenogeneic graft-versus-host disease by skewing proportions of T cell functional subsets and inhibiting T cell activation and migration[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 785774. DOI: 10.3389/fimmu.2021.785774.
- [31] BOCKERMANN R, JÄRNUM S, RUNSTRÖM A, et al. Imlifidase-generated single-cleaved IgG: implications for transplantation[J]. *Transplantation*, 2022, 106(7): 1485-1496. DOI: 10.1097/TP.0000000000004031.
- [32] DELAURA I, ZIKOS J, ANWAR IJ, et al. The impact of IdeS (imlifidase) on allo-specific, xeno-reactive, and protective antibodies in a sensitized rhesus macaque model[J]. *Xenotransplantation*, 2023, DOI: 10.1111/xen.12833[Epub ahead of print].
- [33] HANSEN-ESTRUCH C, COOPER DKC, JUDD E. Physiological aspects of pig kidney xenotransplantation and implications for management following transplant[J]. *Xenotransplantation*, 2022, 29(3): e12743. DOI: 10.1111/xen.12743.
- [34] HANSEN-ESTRUCH C, BIKHET MH, JAVED M, et al. Renin-angiotensin-aldosterone system function in the pig-to-baboon kidney xenotransplantation model[J]. *Am J Transplant*, 2023, 23(3): 353-365. DOI: 10.1016/j.ajt.2022.11.022.
- [35] FIRL DJ, MARKMANN JF. Measuring success in pig to non-human-primate renal xenotransplantation: systematic review and comparative outcomes analysis of 1051 life-sustaining NHP renal allo- and xenotransplants[J]. *Am J Transplant*, 2022, 22(6): 1527-1536. DOI: 10.1111/ajt.16994.
- [36] KIM SC, MATHEWS DV, BREEDEN CP, et al. Long-term survival of pig-to-rhesus macaque renal xenografts is dependent on CD4 T cell depletion[J]. *Am J Transplant*, 2019, 19(8): 2174-2185. DOI: 10.1111/ajt.15329.
- [37] IWASE H, HARA H, EZZELARAB M, et al. Immunological and physiological observations in baboons with life-supporting genetically engineered pig kidney grafts[J]. *Xenotransplantation*, 2017, 24(2): e12293. DOI: 10.1111/xen.12293.
- [38] LI T, JIANG H, LIU H, et al. Extracellular histones and xenotransplantation[J]. *Xenotransplantation*, 2020, 27(5): e12618. DOI: 10.1111/xen.12618.
- [39] LU T, YANG B, WANG R, et al. Xenotransplantation: current status in preclinical research[J]. *Front Immunol*, 2020, 10: 3060. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03060.
- [40] 宋佳华, 余一凡, 邓文艺, 等. 异种肾移植: 生理学研究的现状及发展趋势[J]. *器官移植*, 2023, 14(6): 898-904. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023148.
- SONG JH, YU YF, DENG WY, et al. Kidney xenotransplantation: the present situation and development trend of physiological research[J]. *Organ Transplant*, 2023, 14(6): 898-904. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023148.
- [41] BOSE S, VOLPATTI LR, THIONO D, et al. A retrievable implant for the long-term encapsulation and survival of therapeutic xenogeneic cells[J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(8): 814-826. DOI: 10.1038/s41551-020-0538-5.
- [42] 蒋鸿涛, 李涛, 何松哲, 等. 基因修饰猪-非人灵长类动物异种肾移植面临的问题及挑战[J]. *器官移植*, 2022,

- 13(6): 810-817. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2022.06.018.
- JIANG HT, LI T, HE SZ, et al. Problems and challenges of genetically modified pig-non-human primate xenotransplantation[J]. *Organ Transplant*, 2022, 13(6): 810-817. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2022.06.018.
- [43] DENNER J. Porcine endogenous retroviruses and xenotransplantation, 2021[J]. *Viruses*, 2021, 13(11): 2156. DOI: 10.3390/v13112156.
- [44] 曾嘉庆, 高岩, 仇相书, 等. 猪逆转录病毒 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(1): 26-30. DOI: 10.13350/j.cjpb.220107.
- ZENG JQ, GAO Y, QIU XS, et al. Establishment and application of fluorescence quantitative PCR for detection of porcine retrovirus SYBR Green I [J]. *Chin J Pathog Biolo*, 2022, 17(1): 26-30. DOI: 10.13350/j.cjpb.220107.
- [45] PISANO MP, GRANDI N, TRAMONTANO E. High-throughput sequencing is a crucial tool to investigate the contribution of human endogenous retroviruses (HERVs) to human biology and development[J]. *Viruses*, 2020, 12(6): 633. DOI: 10.3390/v12060633.
- [46] GU W, ZENG N, ZHOU L, et al. Genomic organization and molecular characterization of porcine cytomegalovirus[J]. *Virology*, 2014, 460/461: 165-172. DOI: 10.1016/j.virol.2014.05.014.
- [47] GRIFFITH BP, GOERLICH CE, SINGH AK, et al. Genetically modified porcine-to-human cardiac xenotransplantation[J]. *N Engl J Med*, 2022, 387(1): 35-44. DOI: 10.1056/NEJMoa2201422.
- [48] DENNER J, LÄNGIN M, REICHART B, et al. Impact of porcine cytomegalovirus on long-term orthotopic cardiac xenotransplant survival[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 17531. DOI: 10.1038/s41598-020-73150-9.
- [49] HALECKER S, HANSEN S, KRABBEN L, et al. How, where and when to screen for porcine cytomegalovirus (PCMV) in donor pigs for xenotransplantation[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 21545. DOI: 10.1038/s41598-022-25624-1.
- [50] SINGH AK, GRIFFITH BP, GOERLICH CE, et al. The road to the first FDA-approved genetically engineered pig heart transplantation into human[J]. *Xenotransplantation*, 2022, 29(5): e12776. DOI: 10.1111/xen.12776.
- [51] GARDINER D, MCGEE A, SIMPSON C, et al. Baseline ethical principles and a framework for evaluation of policies: recommendations from an international consensus forum[J]. *Transplant Direct*, 2023, 9(5): e1471. DOI: 10.1097/TXD.0000000000001471.
- [52] 徐莹, 陈佳弘, 何松哲, 等. 移植相关人群对异种肾移植的态度及影响因素[J]. *器官移植*, 2023, 14(5): 683-690. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023118.
- XU Y, CHEN JH, HE SZ, et al. Attitude and influencing factors of transplant-related population towards kidney xenotransplantation[J]. *Organ Transplant*, 2023, 14(5): 683-690. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023118.

(收稿日期: 2023-11-20)

(本文编辑: 方引超 邬加佳)