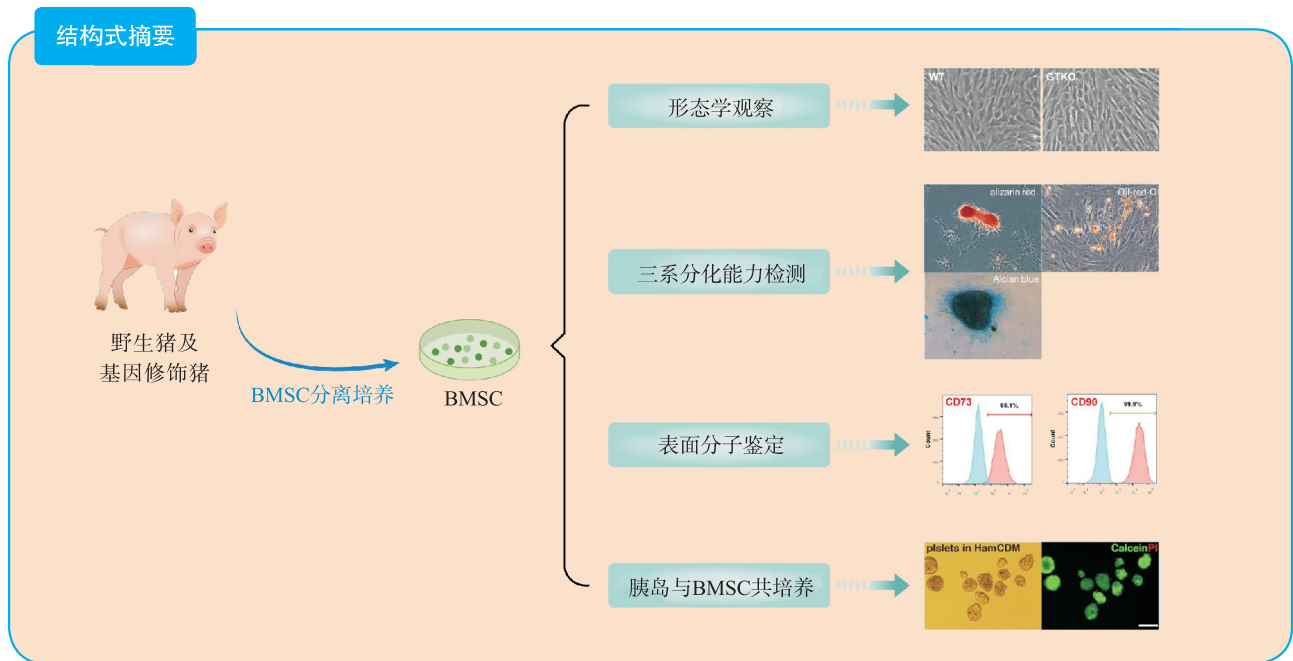


转基因猪骨髓间充质干细胞的分离及与猪胰岛的共培养研究

朱淑芳 曲泽澎 陆赢 潘登科 牟丽莎



【摘要】 **目的** 探讨 α -1, 3-半乳糖基转移酶 (GGTA1) 基因敲除 (GTKO)、GTKO/人补体调节蛋白 hCD46 插入、单磷酸胞嘧啶-N-乙酰神经氨酸羟化酶 (CMAH) /GGTA1 双基因敲除 (Neu5GC/Gal) 猪骨髓间充质干细胞 (BMSC) 的分离培养, 以及与猪胰岛共培养对胰岛的保护作用。**方法** 从不同转基因修饰 GTKO、GTKO/hCD46 及 Neu5GC/Gal 猪中提取骨髓, 采用全骨髓法分离猪 BMSC 后进行培养。对 BMSC 进行形态学观察, 并使用流式细胞术鉴定 BMSC 表面标志物。同时, 观察 BMSC 诱导的多向分化, 通过绿色荧光蛋白 (GFP) 转染标记猪 BMSC 来实现对 BMSC 的标记和示踪。将 GFP 转染标记的猪 BMSC 与猪胰岛细胞共培养, 观察猪胰岛形态变化, 与单纯猪胰岛细胞培养组进行比较。**结果** 猪来源的 BMSC 在体外培养时呈梭形, 表达标志物 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 及 CD166, 不表达 CD34、CD45, 具有向脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞分化的能力; 通过 GFP 转染标记的猪 BMSC 能够实现 BMSC 的标记和示踪, 且在细胞分裂后的子代细胞中也能稳定表达。猪 BMSC 对胰岛细胞有一定保护能力。**结论** 成功建立了 GFP 标记的 GTKO、GTKO/hCD46 及 Neu5GC/Gal 猪来源的 BMSC, 其对胰岛细胞具有一定的保护能力。

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023205

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1103704); 国家自然科学基金重大项目 (32095504); 深圳市科技计划 (GJHZ20200731095207021)
作者单位: 530200 南宁, 广西中医药大学 (朱淑芳、牟丽莎); 深圳市第二人民医院深圳转化医学研究院 (曲泽澎、陆赢、牟丽莎); 四川省医学科学院 四川省人民医院 临床免疫转化医学四川省重点实验室 (潘登科)

作者简介: 朱淑芳 (ORCID 0009-0000-0357-3558), 硕士研究生, 研究方向为胰岛移植, Email: 1905959883@qq.com

通信作者: 牟丽莎 (ORCID 0000-0001-6232-8341), 博士, 副研究员, 研究方向为胰岛移植, Email: lishamou@gmail.com

【关键词】 胰岛移植；1 型糖尿病；间充质干细胞；基因修饰猪；分离；鉴定；共培养；排斥反应
【中图分类号】 R617, Q78 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2024) 01-0008-08

Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells in transgenic pigs and co-culture with porcine islets Zhu Shufang*,
Qu Zepeng, Lu Ying, Pan Dengke, Mou Lisha. *Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China
Corresponding author: Mou Lisha, Email: lishamou@gmail.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the isolation and culture of porcine bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) with α -1, 3-galactosyltransferase (GGTA1) gene knockout (GTKO), GTKO/ human CD46 (hCD46) insertion and cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH)/GGTA1 gene knockout (Neu5GC/Gal), and the protective effect of co-culture with porcine islets on islet cells. **Methods** Bone marrow was extracted from different transgenic pigs modified with GTKO, GTKO/hCD46 and Neu5GC/Gal. Porcine BMSC were isolated by the whole bone marrow adherent method and then cultured. The morphology of BMSC was observed and the surface markers of BMSC were identified by flow cytometry. Meantime, the multi-directional differentiation induced by BMSC was observed, and the labeling and tracing of BMSC were realized by green fluorescent protein (GFP) transfection. The porcine BMSC transfected with GFP were co-cultured with porcine islet cells. Morphological changes of porcine islet cells were observed, and compared with those in the porcine islet cell alone culture group. **Results** BMSC derived from pigs were spindle-shaped *in vitro*, expressing biomarkers of CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 and CD166 rather than CD34 and CD45. These cells were able to differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. Porcine BMSC with GFP transfection could be labeled and traced, which could be stably expressed in the daughter cells after cell division. Porcine BMSC exerted certain protective effect on islet cells. **Conclusions** GFP-labeled porcine BMSC modified with GTKO, GTKO/hCD46 and Neu5GC/Gal are successfully established, which exert certain protective effect upon islet cells.

【Key words】 Islet transplantation; Type 1 diabetes mellitus; Mesenchymal stem cell; Genetically modified pig; Separation; Identification; Co-culture; Rejection

胰岛移植被认为是治疗 1 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 的一种潜在方法^[1-3]。然而, 广泛应用胰岛移植来治疗 T1DM 面临着一系列巨大挑战, 包括供器官短缺、胰岛培养过程中 β 细胞死亡、移植后即刻经血液介导的炎症反应, 以及与宿主免疫细胞攻击或免疫抑制药毒性有关的炎症相关免疫排斥反应等^[3-7]。间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 具有出色的免疫调节和血管生成等特性, 已经在异种胰岛移植中表现出令人满意的效果^[8-10]。但人类来源的 MSC 需要从有限的人体组织 (如脐带、骨髓、脂肪) 中获取, 供者相对短缺, 且 MSC 质量受供者年龄影响, 以及可能引发排斥反应^[11-13]。另外, 人类 MSC 还涉及伦理问题^[14]。猪 MSC 来源广泛, 适合大规模研究和生产, 且猪 MSC 获取和培养成本相对较低, 不涉及伦理和法律争议; 猪 MSC 具有跨物种适应性, 可在不同宿主动物中移植, 有利于跨物种研究和治疗模型的建立^[15-17]。

通过多年的研究和实验, 猪被认为是最适合作为

异种移植的供体动物^[18-20]。猪器官的构造、大小和生理特征与人类相似, 而且猪的供应充足^[21-22]。然而, 猪体内存在可引起外源性排斥反应的 α -1, 3-半乳糖 (α -1, 3-galactose, α Gal)、N-羟乙酰神经氨酸 (N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc) 和 Sd 血型抗原, 分别由 α -1, 3-半乳糖基转移酶 (α -1, 3-galactosyltransferase, GGTA1)、单磷酸胞嘧啶-N-乙酰神经氨酸羟化酶 (cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, CMAH) 和 β -1,4-N-乙酰半乳糖氨基转移酶 2 (β -1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 2, β 4GALNT2) 基因编码的酶催化生成, 在人体内能够被人类抗异种活性抗体识别^[23-25]。通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术来有针对性地敲除 GGTA1、CMAH 和 β 4GALNT2 基因, 可以最大限度地减少或完全消除异种移植引起的排斥反应, 提高异种移植的疗效^[25]。此外, 作为人体补体调节蛋白的一员, 人补体调节蛋白 hCD46 能够保护异种移植物免受系统补体激活引起的排斥反应^[26-28]。

为了评估猪 MSC 中与异种抗原相关的基因对异种移植的应用效果, 需要建立猪 MSC 的分离方法以及与猪胰岛的共培养体系。本研究通过建立绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记的 GGTA1 基因敲除 (GTKO)、GGTA1 基因敲除并 hCD46 插入 (GTKO/hCD46) 以及 CMAH 和 GGTA1 双基因敲除 (Neu5GC/Gal) 猪骨髓 MSC (bone MSC, BMSC), 进行猪 BMSC 与胰岛细胞的共培养实验, 以评估其对胰岛细胞的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

GTKO、GTKO/hCD46 以及 Neu5GC/Gal 基因修饰猪由潘登科教授团队构建。DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶以及链霉素购自美国 Gibco 公司; 多聚甲醛采购自美国 Sigma 公司, 藻红蛋白 (phycoerythrin, PE)-CD29、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)-CD44、PE-CD105、PE-CD166 和 PE-CD73 抗体购自美国 BD 公司。油红 O、茜素红以及阿利新蓝均购自美国 Sigma 公司。本研究经深圳市第二人民医院伦理委员会批准同意 (伦理编号: 2017070607)

1.2 实验方法

1.2.1 BMSC 的分离和培养 GTKO 巴马猪经麻醉后于无菌条件下穿刺猪股骨上端, 抽取骨髓液 5 mL。将骨髓液置于离心管中, 加入 15 mL 红细胞裂解液, 轻轻吹打混匀并作用 10 min, 200×g 离心 5 min, 弃去上层红色清液, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤离心去上清液, 重复 3 次。用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液重悬沉淀细胞接种于 T25 培养瓶中, 水平放入 37℃ 5% CO₂ 培养箱内静置培养。48 h 后用 MEM α +10% 胎牛血清培养液进行首次换液, 并在倒置显微镜下观察细胞形态及生长状况, 以后每隔 2 d 换液、观察。待贴壁细胞达到 80%~90% 融合或出现生长抑制细胞不再有明显扩增时, 按 1:2 进行传代, 第 3 代冻存备用。

采用同样的方法分离培养野生型外三元猪、野生型巴马猪、野生型五指山猪、野生型藏猪、GTKO/hCD46 五指山猪、GTKO 五指山猪、Neu5GC/Gal 五指山猪的 BMSC。

1.2.2 BMSC 形态学观察 于倒置生物显微镜下观察并拍照记录原代及多次传代细胞的形态、贴壁、密

度、融合度及融合时间等生长状况。

1.2.3 BMSC 表面标志物鉴定 取第 3 代 GTKO 五指山猪 BMSC, 0.25% 胰蛋白酶消化, PBS 洗涤 2 次, 4℃ 200×g 离心 5 min, 弃上清, PBS 重悬。再以 200×g 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗涤 3 次后重悬, 调整细胞浓度为 1×10⁶/mL, 以 100 μ L 分装于流式管中, 向各管中加入相应抗体, 于冰上或 4℃ 避光条件下孵育 30 min 后离心弃上清, 用 500 μ L PBS 重悬细胞后进行流式鉴定。

1.2.4 BMSC 诱导分化 当第 3 代 GTKO 五指山猪 BMSC 融合度达 80%~90% 时, 将传代培养液更换为相应 BMSC 成骨诱导分化培养基, 培养基每 3 d 更换 1 次。成骨诱导分化分别于 4、8 d 进行碱性磷酸酶染色和茜素红染色, 染色均按试剂盒说明书进行操作, 然后使用倒置显微镜观察细胞成骨分化情况。

当第 3 代 GTKO 五指山猪 BMSC 融合度达 80%~90% 时, 将传代培养液更换为相应 BMSC 成脂诱导分化培养基, 培养基每 3 d 更换 1 次。诱导 10 d 后, 按试剂盒说明书进行油红 O 染液染色, 并使用倒置显微镜观察细胞成脂分化情况。

当第 3 代 GTKO 五指山猪 BMSC 融合度达 80%~90% 时, 将传代培养液更换为相应 BMSC 成软骨诱导分化培养基, 培养基每 3 d 更换 1 次。诱导 10 d 后, 按试剂盒说明书进行阿利新蓝染色, 然后使用倒置显微镜观察细胞成软骨分化情况。

1.2.5 BMSC 标记示踪 取生长状态良好第 3 代 GTKO 五指山猪 BMSC, 0.25% 胰蛋白酶消化, 200×g 离心 5 min, 弃上清, PBS 重悬, 制成单细胞悬液, 稀释至 5×10⁴/mL 后接种于 24 孔板中, 每孔 200 μ L, 静置培养 24 h, 待细胞达到 30%~50% 融合后, 以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 50 的剂量加入携带 GFP 的慢病毒载体液。共培养 72 h 后, 用 PBS 进行冲洗 3 遍, 换为不含慢病毒的完全培养基继续培养, 此后每 3 d 换液 1 次, 并在荧光显微镜下进行观察 GFP 表达情况, 拍照记录。

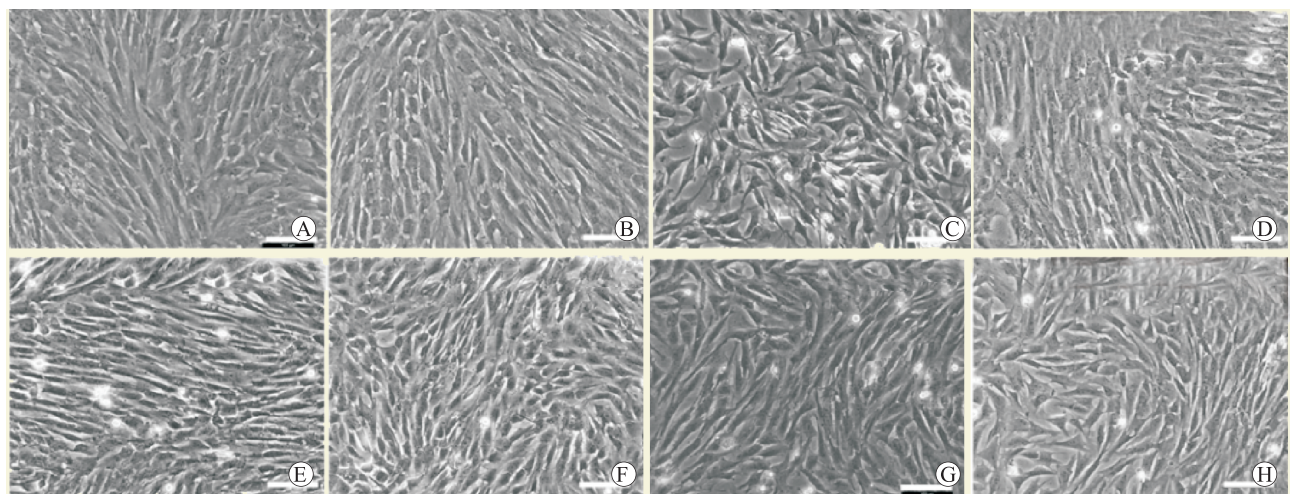
1.2.6 胰岛细胞的分离 野生型外三元猪经麻醉后开腹, 采用外科手术方法经主动脉放血至接近完全时, 经 4℃ 预冷生理盐水冲淋胰腺使其快速降温, 使用无菌手术剪剥离胰腺周围组织取出完整胰腺, 置于预冷的 Hank's 平衡盐溶液中, 应保证热缺血时间不超过 10 min 和冷缺血时间不超过 30 min。在无菌超净工作台低温条件下左手持无齿镊、右手持无菌手术剪

将胰腺表面脂肪及结缔组织等修剪干净后进行称重。将胶原酶经胰管灌注进猪胰腺直至充盈,然后将灌注充盈的猪胰腺剪成大小一致体积进行消化,消化期间间隔相同时间进行取样,双硫腙(dithizone, DTZ)染色(胰岛 β 细胞可被DTZ染为猩红色),当在显微镜下看到较为完整的猩红色胰岛 β 细胞时终止消化。使用含10%胎牛血清的1640培养基对收集的消化后组织进行洗涤,通过不连续密度梯度法纯化组织,从而得到离心管底部沉淀的胰岛细胞。将纯化得到的胰岛细胞按 1×10^4 胰岛当量(islet equivalent quantity, IEQ)/30 mL的接种密度到Ham's F10培养基进行后续培养。

1.2.7 胰岛细胞与 BMSC 共培养 取第3代GFP转染标记的GTKO五指山猪BMSC,将BMSC与胰岛进行共培养,24 h后观察胰岛形态变化。分别用MSC条件培养基(HamCDM)和非条件培养基(Ham)培养胰岛48 h,然后进行活细胞(CalceinAM)和死细胞(PI)染色。

1.3 研究内容

观察猪BMSC原代细胞及多次传代细胞的形态与生长特点,鉴定GTKO五指山猪BMSC表面标志物,分析GTKO五指山猪BMSC成骨、成脂及成软骨细胞分化效果。分析GFP转染标记GTKO五指山猪BMSC的生物学特性,观察猪胰岛与GTKO五指山猪BMSC共培养时的形态及生长特点。



注: A图为野生型外三元猪BMSC; B图为野生型巴马猪BMSC; C图为野生型五指山猪BMSC; D图为GTKO/hCD46五指山猪BMSC; E图为GTKO巴马猪BMSC; F图为GTKO五指山猪BMSC; G图为野生型藏猪BMSC; H图为Neu5GC/Gal五指山猪BMSC。

图1 猪BMSC形态学表现($\times 100$)

Figure 1 Morphological findings of BMSC of pig

2 结果

2.1 猪 BMSC 的分离、鉴定和标记

体外培养的BMSC呈梭形,在细胞生长的对数期,BMSC的倍增时间约为30 h。细胞特性稳定,扩增1代和2代后的细胞同质性均达到95%以上。BMSC连续传代培养和冷冻保存后仍能具有多向分化潜能。不同猪BMSC形态见图1。

分离培养的GTKO五指山猪BMSC具有成脂、成骨、成软骨分化能力(图2)。流式细胞术结果显示,猪BMSC表达CD29、CD44、CD73、CD90、CD105及CD166(阳性率 $>85\%$),不表达CD34、CD45(阳性率 $<15\%$)(图3)。标记示踪后的GTKO五指山猪BMSC培养36、48 h后表达特异性GFP(图4)。

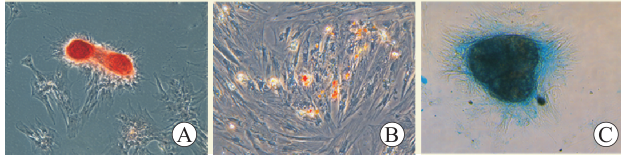
2.2 BMSC 对胰岛细胞的保护能力

胰岛细胞与GTKO五指山猪BMSC共培养3 d后,细胞生长良好,形成细胞聚集体,共培养条件下的胰岛聚集体比仅胰岛培养条件下的增大(图5)。用MSC条件培养基培养的猪胰岛细胞比非条件培养基培养的猪胰岛细胞活力更强,细胞死亡较少(图6)。

3 讨论

在异种移植中,猪具有供应充足的优势,被认为是最合适异种移植的供体动物。然而,猪细胞表面存在的 α Gal、Neu5GC和Sd血型抗原能被人抗异种活

性抗体识别, 在猪异种移植中引起排斥反应^[29-31]。通过对猪异种抗原基因进行敲除, 如使用 CRISPR/Cas9 技术产生的 GTKO 猪 BMSC, 可以减轻异种移植排斥反应, 提高猪 BMSC 在 T1DM 胰岛移植治疗中的



注: A 图为原位茜素红染色; B 图为油红-O 染色; C 图为阿利新蓝染色。

图 2 GTKO 五指山猪 BMSC 的三系分化结果 (×100)

Figure 2 The trilineage differentiation results of BMSC of GTKO Wuzhishan pig

效果^[32]。

既往研究表明, 使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术产生的 GTKO 猪 BMSC 不表达与异种移植排斥反应有关的 α Gal 抗原, 并可以表现出与野生型猪 BMSC 相似的特征^[29]。此外, hCD46 在敲除了 Gal 抗原基因 GGTA1 的猪主动脉内皮细胞上的表达可保护细胞免受排斥反应损伤^[26]。通过转基因修饰在 GTKO/hCD46 猪中继续敲除 CMAH, 可以显著减轻异种灌注猪肺中抗体介导的排斥反应^[33]。这在利用转基因猪预防排斥反应的临床应用中提供了新的启示。

本研究对 GTKO、GTKO/hCD46 和 Neu5GC/Gal 三种不同转基因修饰猪的 BMSC 进行了分离培养,

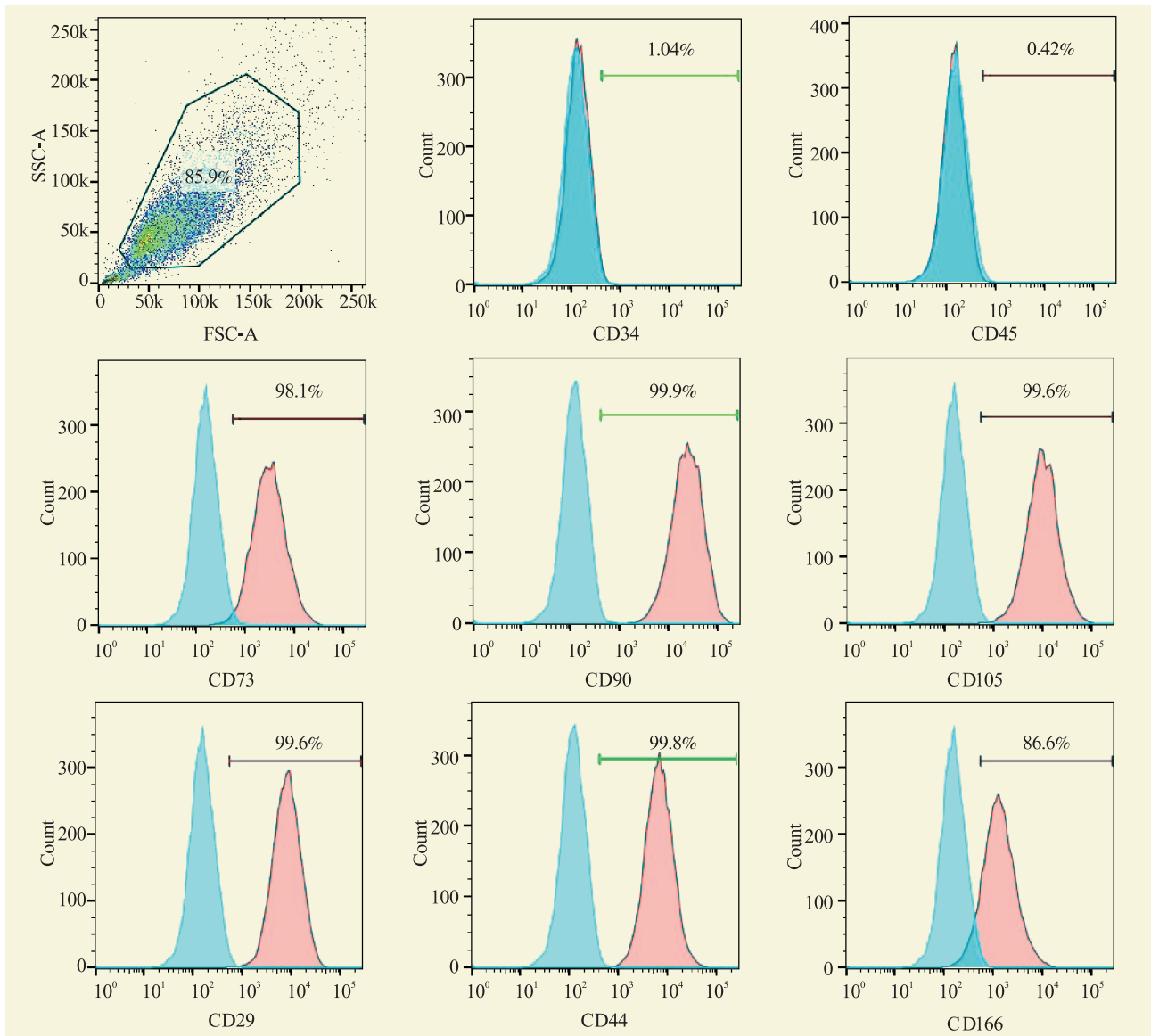
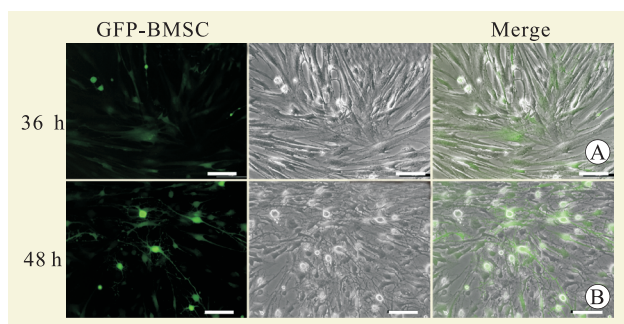


图 3 GTKO 五指山猪 BMSC 表面标志物表达情况

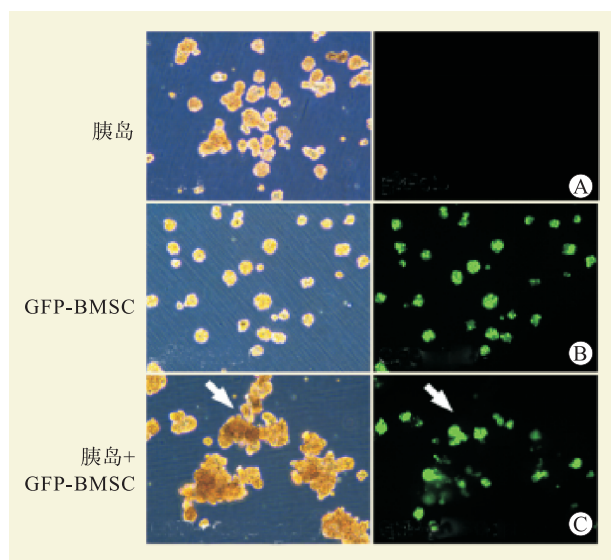
Figure 3 Expression of cell surface markers of BMSC of GTKO Wuzhishan pig



注：A 图为 BMSC 培养 36 h 后 GFP 表达情况；B 图为 BMSC 培养 48 h 后 GFP 表达情况。

图 4 GTKO 五指山猪 BMSC 标记示踪结果 (×100)

Figure 4 Labeling and tracing results of BMSC of GTKO Wuzhishan pig



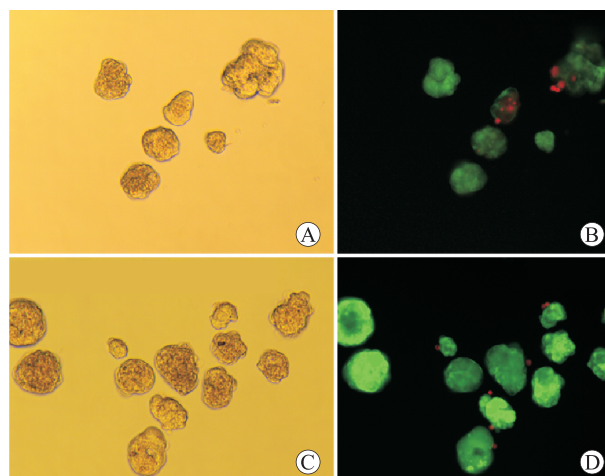
注：A 图为猪胰岛单独培养；B 图为 GFP 转染标记的 BMSC 单独培养；C 图为猪胰岛与 GFP 转染标记的 BMSC 共培养。

图 5 猪胰岛与 GTKO 五指山猪 BMSC 的共培养结果 (×100)

Figure 5 Co-culture results of porcine pancreatic islets and BMSC of GTKO Wuzhishan pig

并将 GTKO 猪 BMSC 与猪胰岛细胞共培养。结果显示这些 BMSC 在体外诱导时能够分化为脂肪细胞、骨细胞和软骨细胞。虽然在培养条件方面与之前的研究存在差异，但猪 BMSC 的生长特性仍与人 BMSC 相似，且倍增时间约为人 BMSC 的一半。

由于胰岛移植后的免疫排斥反应，胰岛移植在 T1DM 治疗中面临挑战^[34-36]。近年来，MSC 被广泛应用于自身免疫性疾病的治疗，如 T1DM^[37-38]。本研究通过对野生型外三元猪胰岛和不同转基因修饰猪



注：A 图为 Ham 培养猪胰岛细胞；B 图为 HamCDM 培养猪胰岛细胞；C 图为 Ham 培养猪胰岛细胞 48 h 后细胞染色；D 图为 HamCDM 培养猪胰岛 48 h 细胞染色（绿色为活细胞染色，红色为死细胞染色）。

图 6 不同培养条件下猪胰岛细胞活力

Figure 6 Viability of porcine pancreatic islet cells under different culture conditions

的 BMSC 共培养，评估了猪 BMSC 对胰岛的保护作用，发现共培养条件下，猪 BMSC 能够通过分泌因子保护胰岛免受炎症免疫排斥反应的损害，这对胰岛的功能和活力的保持至关重要。

综上所述，本研究建立的方法为解决胰岛短缺和猪体内抗原引起的免疫排斥反应问题具有一定参考意义，为未来基因修饰猪 BMSC 在异种胰岛移植研究中的应用提供了实验基础，也为异种胰岛移植策略在治疗 T1DM 中的应用提供了有益的启示。但本研究存在一定的局限性：（1）初步实验性质，本研究是初步实验，尚未全面探讨不同来源 MSC 的潜在差异；（2）数据量化不足，在某些实验中，未能提供足够的量化数据，仅提供了代表性图表，导致结论代表性不足；（3）资源限制，由于资源、时间和技术限制，我们未能进行更广泛的实验或考虑更多的变量，这可能会影响研究的全面性和深度。未来将进行更广泛、深入的研究，进一步探索异种胰岛移植策略在治疗 T1DM 中的应用。

参考文献:

[1] HELMAN A, MELTON DA. A stem cell approach to cure type 1 diabetes[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2021, 13(1): a035741. DOI: 10.1101/cshperspect.a035741.
 [2] NAQVI RA, NAQVI AR, SINGH A, et al. The future

- treatment for type 1 diabetes: pig islet- or stem cell-derived β cells?[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 13: 1001041. DOI: 10.3389/fendo.2022.1001041.
- [3] 罗说明, 周智广. 1 型糖尿病治疗新技术的现状与未来[J]. *中国医师杂志*, 2023, 25(3): 321-324. DOI: 10.3760/cma.j.cn431274-20230215-00159.
- LUO SM, ZHOU ZG. Current status and future of new technologies in the treatment of type 1 diabetes[J]. *J Chin Physician*, 2023, 25(3): 321-324. DOI: 10.3760/cma.j.cn431274-20230215-00159.
- [4] 杨玉伟, 张婷, 李万里, 等. 胰岛移植即刻经血液介导的炎症反应应对策略[J]. *器官移植*, 2023, 14(3): 352-357. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023.03.005.
- YANG YW, ZHANG T, LI WL, et al. Therapeutic strategy for instant blood-mediated inflammatory reaction after islet transplantation[J]. *Organ Transplant*, 2023, 14(3): 352-357. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023.03.005.
- [5] MARFIL-GARZA BA, IMES S, VERHOEFF K, et al. Pancreatic islet transplantation in type 1 diabetes: 20-year experience from a single-centre cohort in Canada[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2022, 10(7): 519-532. DOI: 10.1016/S2213-8587(22)00114-0.
- [6] WALKER S, APPARI M, FORBES S. Considerations and challenges of islet transplantation and future therapies on the horizon[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2022, 322(2): E109-E117. DOI: 10.1152/ajpendo.00310.2021.
- [7] MARFIL-GARZA BA, SHAPIRO AMJ, KIN T. Clinical islet transplantation: current progress and new frontiers[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2021, 28(3): 243-254. DOI: 10.1002/jhbp.891.
- [8] QU Z, LOU Q, COOPER DKC, et al. Potential roles of mesenchymal stromal cells in islet allo- and xenotransplantation for type 1 diabetes mellitus[J]. *Xenotransplantation*, 2021, 28(3): e12678. DOI: 10.1111/xen.12678.
- [9] NGUYEN TT, PHAM DV, PARK J, et al. Engineering of hybrid spheroids of mesenchymal stem cells and drug depots for immunomodulating effect in islet xenotransplantation[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(34): eabn8614. DOI: 10.1126/sciadv.abn8614.
- [10] KIKUCHI T, NISHIMURA M, KOMORI N, et al. Development and characterization of islet-derived mesenchymal stem cells from clinical grade neonatal porcine cryopreserved islets[J]. *Xenotransplantation*, 2023, DOI: 10.1111/xen.12831 [Epub ahead of print].
- [11] 师越, 李燕, 金慧方, 等. 人间充质干细胞质量研究及评价进展[J]. *国际生物医学工程杂志*, 2023, 46(3): 275-280. DOI: 10.3760/cma.j.cn121382-20230411-00315.
- SHI Y, LI Y, JIN HF, et al. Research progress in quality research and evaluation of human mesenchymal stem cells[J]. *Int J Biomed Eng*, 2023, 46(3): 275-280. DOI: 10.3760/cma.j.cn121382-20230411-00315.
- [12] WANG Y, FANG J, LIU B, et al. Reciprocal regulation of mesenchymal stem cells and immune responses[J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(11): 1515-1530. DOI: 10.1016/j.stem.2022.10.001.
- [13] WANG LT, LIU KJ, SYTWU HK, et al. Advances in mesenchymal stem cell therapy for immune and inflammatory diseases: use of cell-free products and human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10(9): 1288-1303. DOI: 10.1002/sctm.21-0021.
- [14] 潘兴华, 王颖翠, 张梦园, 等. 脐带间充质干细胞临床研究的伦理与安全问题[J]. *西南国防医药*, 2018, 28(1): 4-6. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0188.2018.01.002.
- PAN XH, WANG YC, ZHANG MY, et al. Ethical and safety issues in clinical research of umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. *Med J Natl Defend Forces Southwest China*, 2018, 28(1): 4-6. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0188.2018.01.002.
- [15] NISHIMURA M, NGUYEN L, WATANABE N, et al. Development and characterization of novel clinical grade neonatal porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Xenotransplantation*, 2019, 26(3): e12501. DOI: 10.1111/xen.12501.
- [16] GARCIA GA, OLIVEIRA RG, DARIOLLI R, et al. Isolation and characterization of farm pig adipose tissue-derived mesenchymal stromal/stem cells[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2022, 55: e12343. DOI: 10.1590/1414-431X2022e12343.
- [17] TERATANI T, KASAHARA N, FUJIMOTO Y, et al. Mesenchymal stem cells secretions enhanced ATP generation on isolated islets during transplantation[J]. *Islets*, 2022, 14(1): 69-81. DOI: 10.1080/19382014.2021.2022423.
- [18] 淮国丽, 杜嘉祥, 潘登科. 基因编辑猪用于急性肝衰竭治疗的路径探讨[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(10): 2214-2218. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2022.10.004.
- HUAI GL, DU JX, PAN DK. The discussion on the genetically modified pigs for the treatment of acute liver failure[J]. *J Clin Hepatol*, 2022, 38(10): 2214-2218. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2022.10.004.
- [19] SYKES M, SACHS DH. Progress in xenotransplantation: overcoming immune barriers[J].

- Nat Rev Nephrol, 2022, 18(12): 745-761. DOI: 10.1038/s41581-022-00624-6.
- [20] QI C, PANG D, YANG K, et al. Generation of PCBP1-deficient pigs using CRISPR/Cas9-mediated gene editing[J]. *iScience*, 2022, 25(10): 105268. DOI: 10.1016/j.isci.2022.105268.
- [21] PIERSON RN 3RD. Progress toward pig-to-human xenotransplantation[J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(20): 1871-1873. DOI: 10.1056/NEJMp2118019.
- [22] DOS SANTOS RMN. Kidney xenotransplantation: are we ready for prime time?[J]. *Curr Urol Rep*, 2023, 24(6): 287-297. DOI: 10.1007/s11934-023-01156-7.
- [23] BURLAK C, TAYLOR RT, WANG ZY, et al. Human anti- α -fucose antibodies are xenoreactive toward GGTA1/CMAH knockout pigs[J]. *Xenotransplantation*, 2020, 27(6): e12629. DOI: 10.1111/xen.12629.
- [24] DING F, LIN Y, LIU G, et al. Immune disguise: the mechanisms of Neu5Gc inducing autoimmune and transplant rejection[J]. *Genes Immun*, 2022, 23(6): 175-182. DOI: 10.1038/s41435-022-00182-8.
- [25] YOON S, LEE S, PARK C, et al. An efficacious transgenic strategy for triple knockout of xeno-reactive antigen genes GGTA1, CMAH, and B4GALNT2 from Jeju native pigs[J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10(9): 1503. DOI: 10.3390/vaccines10091503.
- [26] JAGDALE A, NGUYEN H, LI J, et al. Does expression of a human complement-regulatory protein on xenograft cells protect them from systemic complement activation?[J]. *Int J Surg*, 2020, 83: 184-188. DOI: 10.1016/j.ijssu.2020.09.034.
- [27] CHABAN R, MCGRATH G, HABIBABADY Z, et al. Increased human complement pathway regulatory protein gene dose is associated with increased endothelial expression and prolonged survival during ex vivo perfusion of GTKO pig lungs with human blood[J]. *Xenotransplantation*, 2023, 30(4): e12812. DOI: 10.1111/xen.12812.
- [28] BURDORF L, LAIRD CT, HARRIS DG, et al. Pig-to-baboon lung xenotransplantation: extended survival with targeted genetic modifications and pharmacologic treatments[J]. *Am J Transplant*, 2022, 22(1): 28-45. DOI: 10.1111/ajt.16809.
- [29] KIKUCHI T, NISHIMURA M, HIRATA M, et al. Development and characterization of Gal KO porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Xenotransplantation*, 2021, 28(6): e12717. DOI: 10.1111/xen.12717.
- [30] 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.
- [31] GALILI U. The alpha-gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy[J]. *Immunol Cell Biol*, 2005, 83(6): 674-686. DOI: 10.1111/j.1440-1711.2005.01366.x.
- [32] RAO JS, HOSNY N, KUMBHA R, et al. HLA-G1⁺ expression in GGTA1KO pigs suppresses human and monkey anti-pig T, B and NK cell responses[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 730545. DOI: 10.3389/fimmu.2021.730545.
- [33] CHABAN R, HABIBABADY Z, HASSANEIN W, et al. Knock-out of N-glycolylneuraminic acid attenuates antibody-mediated rejection in xenogenically perfused porcine lungs[J]. *Xenotransplantation*, 2022, 29(6): e12784. DOI: 10.1111/xen.12784.
- [34] LANDSTRA CP, NIJHOFF MF, ROELEN DL, et al. Diagnosis and treatment of allograft rejection in islet transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2023, 23(9): 1425-1433. DOI: 10.1016/j.ajt.2023.05.035.
- [35] JEYAGARAN A, LU CE, ZBINDEN A, et al. Type 1 diabetes and engineering enhanced islet transplantation[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 189: 114481. DOI: 10.1016/j.addr.2022.114481.
- [36] KABAKCHIEVA P, ASSYOV Y, GERASOUDIS S, et al. Islet transplantation-immunological challenges and current perspectives[J]. *World J Transplant*, 2023, 13(4): 107-121. DOI: 10.5500/wjt.v13.i4.107.
- [37] SONG N, SCHOLTEMEIJER M, SHAH K. Mesenchymal stem cell immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 41(9): 653-664. DOI: 10.1016/j.tips.2020.06.009.
- [38] SHEN Z, HUANG W, LIU J, et al. Effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on autoimmune diseases[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 749192. DOI: 10.3389/fimmu.2021.749192.

(收稿日期: 2023-10-09)

(本文编辑: 方引起 吴秋玲)