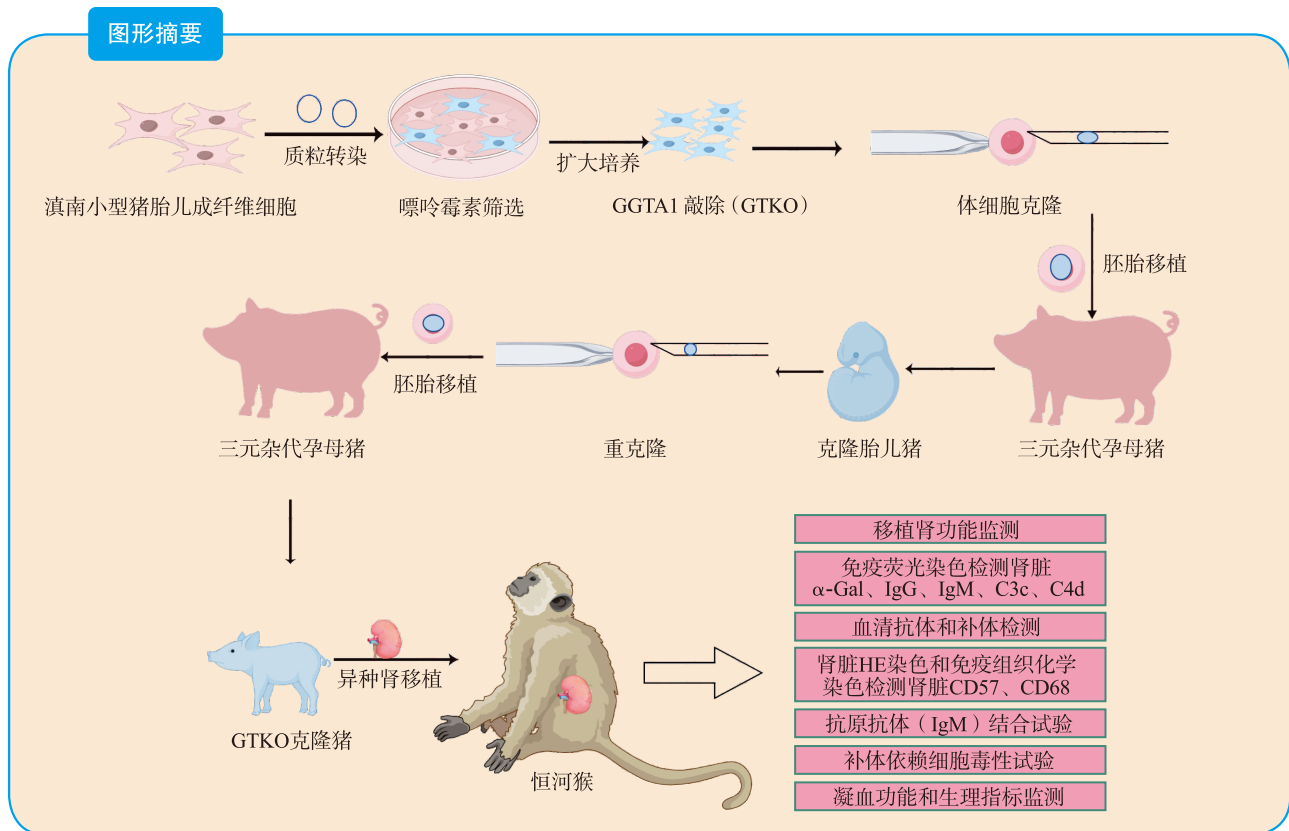


· 论著 ·

GTKO 猪的生产及猪-恒河猴肾脏异种移植

王艳 常悦 杨畅 魏太云 霍晓颖 陈博威 王娇祥 赵恒 郭建雄 赵红芳 张雄 朱飞艳 成文敏
赵红业 徐凯祥 Muhammad Ameen Jamal 王振迪 魏红江



【摘要】 目的 探讨 α -1,3 半乳糖基转移酶 (GGTA1) 基因敲除 (GTKO) 滇南小型猪的构建及猪到恒河猴的肾脏异种移植, 评估 GTKO 猪的有效性。**方法** 利用 CRISPR/Cas9 基因修饰系统和体细胞克隆技术构建 GTKO 滇南小型猪, 通过聚合酶链反应、Sanger 测序、免疫荧光染色等验证 GTKO 猪的表型。流式细胞术检测抗

DOI: 10.12464/j.issn.1674-7445.2025091

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0110700); 云南省重大科技专项 (202102AA310047); 云南省人才联合培养计划-青年科学家项目 (202303AM140030)

作者单位: 650201 昆明, 云南农业大学动物医学院 (王艳、霍晓颖、陈博威、赵恒、赵红业、徐凯祥、魏红江); 云南农业大学动物科学技术学院 (常悦、杨畅、王娇祥、朱飞艳、成文敏、魏红江); 云南省小型猪基因编辑与异种器官移植重点实验室 (魏太云、郭建雄、赵红芳、张雄、Muhammad Ameen Jamal、魏红江); 华中科技大学同济医学院附属协和医院 (王振迪)

作者简介: 王艳 (ORCID 0009-0002-4285-1551), 硕士研究生, 研究方向为基因修饰与异种器官移植, Email: 2788063601@qq.com; 常悦 (ORCID 0009-0006-6989-2731), 硕士研究生, 研究方向为分子生物学, Email: 488919001@qq.com (王艳和常悦为本文共同第一作者)

通信作者: 魏红江 (ORCID 0000-0002-5663-1093), 博士, 教授, 研究方向为动物基因修饰与体细胞克隆技术研究、异种器官移植研究, Email: hongjiangwei@126.com

原抗体 (IgM) 结合与补体依赖细胞毒性, 并进行 GTKO 猪到恒河猴的肾脏异种移植, 监测受体猴体液免疫、细胞免疫、凝血及生理指标, 利用超声检查、苏木素-伊红染色、免疫组织化学染色和免疫荧光染色等分析移植肾功能和病理学改变。结果 靶向滇南小型猪 GGTA1 基因第 4 外显子设计单向导 RNA (sgRNA), 将 pGL3-GGTA1-sgRNA1-GFP 载体转染到滇南小型猪胎儿成纤维细胞中, 经嘌呤霉素筛选后, 获得的 C59#和 C89#两个细胞克隆点均鉴定为 GGTA1 基因敲除克隆点, 经扩大培养形成细胞系后用作供体细胞进行体细胞克隆, 并将重构胚胎移植至三元杂代母猪输卵管中, 获得 13 头胎儿猪, 其中 F04 和 F11 胎儿的 GGTA1 基因发生双等位基因突变, 且 F04 核型正常, 利用此 GTKO 胎儿猪进行重克隆, 并将重构胚胎移植至三元杂代母猪输卵管中, 共获得 7 头存活仔猪, 其均不表达 α -Gal 抗原表位。20#恒河猴血清 IgM 与 GTKO 猪 PBMC 结合数量减少, 且 GTKO 猪 PBMC 在补体依赖细胞毒性实验中的存活率高于野生型猪。获取 GTKO 猪肾并进行灌注直至完全变白, 切除受体猴左肾后进行猪肾异位移植, 血管吻合完成后开放血流, 猪肾迅速变为粉红色, 未发生超急性排斥反应 (HAR), 6 min 后输尿管出现尿液, 表明肾移植术成功, 再切除受体右肾。移植术后 7 d 移植肾血流供应良好, 受体猴血清肌酐水平稳定, 血清钾和胱抑素 C 水平得到有效控制, 但在移植术后 10 d 均升高。移植术后 7 d 受体猴体内白细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞水平均升高, 血小板计数和纤维蛋白原水平均降低, 而活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间和凝血酶原时间均较为稳定, 之后呈上升趋势。受体猴存活 10 d, 尸检发现移植肾充血、肿胀和坏死, 肾组织中少量 IgG 沉积, 大量 IgM、补体 C3c 和 C4d 沉积, CD68⁺巨噬细胞浸润。结论 GTKO 滇南小型猪肾脏可在恒河猴体内维持一定时间的正常肾功能, 并有效克服 HAR, 证实 GTKO 猪用于异种移植有效。

【关键词】 GGTA1 基因敲除猪; 恒河猴; 肾脏异种移植; 基因修饰; 超急性排斥反应; 免疫抑制; 外周血单个核细胞; 体细胞核移植

【中图分类号】 R617 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2025) 04-0005-12

Production of GTKO pigs and kidney xenotransplantation from pigs to rhesus macaques Wang Yan*, Chang Yue, Yang Chang, Wei Taiyun, Huo Xiaoying, Chen Bowei, Wang Jiaoxiang, Zhao Heng, Guo Jianxiong, Zhao Hongfang, Zhang Xiong, Zhu Feiyan, Cheng Wenmin, Zhao Hongye, Xu Kaixiang, Muhammad Ameen Jamal, Wang Zhendi, Wei Hongjiang. *College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China
Corresponding author: Wei Hongjiang, Email: hongjiangwei@126.com

【Abstract】 **Objective** To explore the construction of α -1,3-galactosyltransferase (GGTA1) gene-knockout (GTKO) Diannan miniature pigs and the kidney xenotransplantation from pigs to rhesus macaques, and to assess the effectiveness of GTKO pigs. **Methods** The GTKO Diannan miniature pigs were constructed using the CRISPR/Cas9 gene-editing system and somatic cell cloning technology. The phenotype of GTKO pigs was verified through polymerase chain reaction, Sanger sequencing and immunofluorescence staining. Flow cytometry was used to detect antigen-antibody (IgM) binding and complement-dependent cytotoxicity. Kidney xenotransplantation was performed from GTKO pigs to rhesus macaques. The humoral immunity, cellular immunity, coagulation and physiological indicators of the recipient monkeys were monitored. The function and pathological changes of the transplanted kidneys were analyzed using ultrasonography, hematoxylin-eosin staining, immunohistochemical staining and immunofluorescence staining. **Results** Single-guide RNA (sgRNA) targeting exon 4 of the GGTA1 gene in Diannan miniature pigs was designed. The pGL3-GGTA1-sgRNA1-GFP vector was transfected into fetal fibroblasts of Diannan miniature pigs. After puromycin selection, two cell clones, C59# and C89#, were identified as GGTA1 gene-knockout clones. These clones were expanded to form cell lines, which were used as donor cells for somatic cell nuclear transfer. The reconstructed embryos were transferred into the oviducts of trihybrid surrogate sows, resulting in 13 fetal pigs. Among them, fetuses F04 and F11 exhibited biallelic mutations in the GGTA1 gene, and F04 had a normal karyotype. Using this GTKO fetal pig for recloning and transferring the reconstructed embryos into the oviducts of trihybrid surrogate sows, seven surviving piglets were obtained, all of which did not express α -Gal epitope. The binding of IgM from the serum of rhesus monkey 20# to GTKO pig PBMC was reduced, and the survival rate of GTKO pig PBMC in the complement-dependent cytotoxicity assay was higher than that of wild-type pig. GTKO pig kidneys were harvested and perfused until completely white. After the left kidney of the

recipient monkey was removed, the pig kidney was heterotopically transplanted. Following vascular anastomosis and blood flow restoration, the pig kidney rapidly turned pink without hyperacute rejection (HAR). Urine appeared in the ureter 6 minutes later, indicating successful kidney transplantation. The right kidney of the recipient was then removed. Seven days after transplantation, the transplanted kidney had good blood flow, the recipient monkey's serum creatinine level was stable, and serum potassium and cystatin C levels were effectively controlled, although they increased 10 days after transplantation. Seven days after transplantation, the levels of white blood cells, lymphocytes, monocytes and eosinophils in the recipient monkey increased, while platelet count and fibrinogen levels decreased. The activated partial thromboplastin time, thrombin time and prothrombin time remained relatively stable but later showed an upward trend. The recipient monkey survived for 10 days. At autopsy, the transplanted kidney was found to be congested, swollen and necrotic, with a small amount of IgG deposition in the renal tissue, and a large amount of IgM, complement C3c and C4d deposition, as well as CD68⁺ macrophage infiltration. **Conclusions** The kidneys of GTKO Diannan miniature pigs may maintain normal renal function for a certain period in rhesus macaques and effectively overcome HAR, confirming the effectiveness of GTKO pigs for xenotransplantation.

【 Key words 】 GGTA1 gene-knockout pig; Rhesus macaque; Kidney xenotransplantation; Genetic modification; Hyperacute rejection; Immunosuppression; Peripheral blood mononuclear cell; Somatic cell nuclear transfer

猪到人类的肾脏异种移植是解决全球肾源短缺问题的有效替代方法^[1]。随着基因修饰技术和免疫抑制药的快速发展,截至 2024 年美国已率先开展了 4 例基因修饰猪到人类受者的肾脏异种移植^[2-5],预示着基因修饰猪肾脏极有可能大规模进入临床,挽救终末期肾衰竭患者的生命。目前,各种各样的基因修饰猪被开发并进行了大量的临床前试验,其有效性得到相关证实^[6-8],然而目前仍未明确何种基因修饰猪肾脏更适合应用于临床治疗。

α -1,3-半乳糖 (α -Gal) 由 α -1,3 半乳糖基转移酶 (α -1,3-galactosyltransferase, GGTA1) 催化合成,在猪和新大陆猴等多数哺乳动物中高度表达,但旧大陆猴(如类人猿、狒狒)和人类除外^[9]。缺乏 α -Gal 的灵长类动物会产生针对该抗原表位的循环抗体^[10],当猪器官被移植到灵长类动物体内时,针对 α -Gal 抗原的循环抗体会在数小时内攻击移植物,最终导致移植物失功,此为超急性排斥反应(hyperacute rejection, HAR)的典型症状^[11-12]。2002 年, α -Gal 抗原缺失克隆猪诞生,为异种器官移植的临床应用带来了希望^[13-14]。在不同的免疫抑制方案下,GGTA1 基因敲除(GTKO)猪肾移植给 6 只狒狒,移植术后未发生 HAR^[15];GTKO 猪肾移植给狒狒并进行血管化胸腺移植后,术后移植物存活了 83 d^[16]。2024 年,美国纽约大学朗格尼医学中心完成了 1 例 GTKO 猪肾移植给终末期肾衰竭患者的异种移植,移植术后未发生 HAR,且猪肾脏在受者体内正常工作长达 47 d,最终因左心室辅助装置产生的血压不足以为移植肾提

供足够血流供应,导致移植肾功能丢失,该项研究成果提示 GTKO 猪肾脏在异种器官移植领域具有重要的参考价值。本研究利用 CRISPR/Cas9 基因修饰系统和体细胞核移植技术构建 GTKO 滇南小型猪,并进行猪到恒河猴肾脏异种移植,旨在评估 GTKO 供体猪的有效性。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物

本研究所用滇南小型猪通过基因修饰和体细胞克隆技术产生,用于异种肾脏移植的恒河猴购自中国医学科学院医学生物学研究所。本研究已获得云南农业大学动物伦理委员会的批准(批号:202204020)。

1.2 试剂与仪器

乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)缓冲液、抗荧光淬灭剂、4',6-二脒基-2-苯基吲哚、碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液均购自武汉塞维尔生物科技有限公司;IgG 抗体、CD57 抗体、切片剂均购自美国 ThermoFisher 公司;IgM 抗体购自美国 Southern Biotech 公司;C3c 抗体、C4d 抗体均购自福州迈新生物技术开发有限公司;CD68 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;4D-Nucleofector 电转仪购自德国 Lonza 公司;细胞融合仪、显微操作仪、四仓培养箱均购自广州华粤行仪器科技有限公司;荧光显微镜购自日本 Olympus 公司;自动组织

处理仪购自金华科迪医疗器械有限公司; 流式细胞仪购自美国 Beckman 公司。

1.3 研究内容与方法

1.3.1 GGTA1 基因载体构建 针对滇南小型猪 GGTA1 基因第 4 外显子设计 1 条单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) (序列: 5'-GCTACAGGGCCTGGTGGTACAAGG-3'), 并构建了 pGL3-GGTA1-sgRNA1-GFP 载体, 使用相关引物进行鉴定。该载体引导 Cas9 蛋白精准定位 GGTA1 基因并切割 DNA, 从而实现基因敲除。

1.3.2 成纤维细胞转染、筛选与鉴定 将滇南小型猪胎儿成纤维细胞解冻, 在含有 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) 中培养 1 d, 待细胞进入对数生长期后, 将约 4×10^5 个细胞悬浮在含有 pGL3-GGTA1-sgRNA1-GFP 载体 (1:2) 的电转染缓冲液中孵育 5 min, 使用电转仪进行电穿孔。将细胞接种到含 10% 胎牛血清的 DMEM T25 培养皿中培养 24 h。向培养基中添加 $3 \mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素和 $5 \mu\text{g/mL}$ 潮霉素培养 24~48 h, 以筛选成功转染载体的成纤维细胞。消化存活细胞, 将 100~150 个细胞接种到 100 mm 的培养皿中培养 15 d, 获得单克隆细胞。使用引物通过聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和 Sanger 测序对单细胞克隆进行基因分型鉴定, GGTA1 上游引物: 5'-GGCAACATGGCAGGAAGGAA-3', GGTA1 下游引物: 5'-AGACGGCCCTGTCAGTTCAT-3', 鉴定为 GGTA1 基因成功敲除的细胞集落用作供体细胞进行体细胞核移植和胚胎移植。

1.3.3 体细胞核移植与胚胎移植 卵母细胞采集、体外成熟、体细胞核移植和胚胎移植的操作如先前所述^[17]。用 0.1% (w/v) 透明质酸酶处理从卵丘细胞中分离培养的卵丘-卵母细胞复合体, 获得 MII 期卵母细胞。利用显微操作仪将置于 TLH-PVA 操作液中的卵母细胞用斜口吸管轻轻吸出第一极体, 完成去核操作, 同时将供体细胞注入去核卵母细胞的卵周隙中。使用细胞融合仪在融合培养基中以 200 V/mm 的单一直流脉冲处理 20 μs , 使重构胚胎发生融合, 将重构胚胎置于 PZM-3 培养基中培养 0.5~1 h, 并在激活培养基中以 150 V/mm 的单脉冲刺激 100 ms, 转移至含 $5 \mu\text{g/mL}$ 细胞松弛素 B 的 PZM-3 培养基中, 置于四仓培养箱中平衡 2 h。在上述相同培养条件下于 PZM-3 培养基中继续培养, 直至进行胚胎移植。通

过手术将重构胚胎移植到三元杂代孕母猪输卵管中, 妊娠 31 d 后通过剖腹产获得活的胎儿猪。建立胎儿猪成纤维细胞系, 通过 PCR、酶切实验和 Sanger 测序进行鉴定, 选择双等位基因敲除的胎儿猪进行重克隆, 将重构胚胎移植至三元杂代孕母猪输卵管中。妊娠到期后, 经自然分娩获得基因修饰克隆仔猪, 并进行 GTKO 猪到恒河猴的肾脏异种移植。

1.3.4 移植肾功能监测 术后超声检查移植肾血流供应情况, 监测受体猴术后血清肌酐、尿肌酐、尿量、尿微量白蛋白、血清钾及胱抑素 C 的水平变化。

1.3.5 免疫荧光染色检测肾脏 α -Gal、IgG、IgM、C3c、C4d 将石蜡包埋的组织块切成 3 μm 厚的切片, 转移到载玻片上, 用二甲苯和梯度酒精进行脱蜡处理。将切片置于微波炉中, 使用 EDTA 缓冲液在 92~98 $^{\circ}\text{C}$ 下进行抗原修复 15 min, 待室温冷却。用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤切片 3 次, 在室温黑暗条件下用自发荧光淬灭剂 A 液孵育 15 min, PBS 洗涤 3 次, 室温下用胎牛血清孵育 30 min, 晾干。用相应抗体孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, 用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚染色 3 min。PBS 洗涤 1 min 后, 加入自发荧光淬灭剂 B 液孵育 5 min, 再次洗涤 3 次。使用抗荧光淬灭剂封片, 荧光显微镜成像。

1.3.6 血清抗体和补体检测 检测受体猴血清中抗体 IgA、IgG、IgM 和补体 C3、C4 的水平。

1.3.7 肾脏 HE 染色和免疫组织化学染色检测肾脏 CD57、CD68 将组织样本置于 4% 多聚甲醛中固定 48~72 h, 使用自动组织处理仪将组织样本包埋在石蜡块中。使用切片机将石蜡块切成 5 μm 厚的切片, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下于载玻片上晾干过夜。组织切片经二甲苯脱石蜡, 并通过梯度乙醇水化。按照试剂盒说明书分别进行 HE 染色和免疫组织化学染色。

1.3.8 抗原抗体 (IgM) 结合试验 采集受体猴血液样本, 分离血清并在 56 $^{\circ}\text{C}$ 下灭活 30 min, 将灭活血清样本用染色缓冲液 (含 1% 胎牛血清的 PBS) 按 1:4 稀释。收集基因修饰猪和野生型猪的猪胎儿成纤维细胞, 洗涤 2 次, 重悬于染色缓冲液中。将 1×10^5 个细胞与 100 μL 灭活的恒河猴血清或 100 μL PBS 在室温下孵育 45 min, 用冰冷的染色缓冲液洗涤细胞以终止反应, 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用山羊抗人 IgM-异硫氰酸荧光素孵育 30 min。用冰冷的染色缓冲液洗涤细胞 2 次, 400 \times g 离心 4 min, 重悬于 200 μL PBS 中, 使用流式

细胞仪进行检测。

1.3.9 补体依赖细胞毒性试验 收集受体猴血清，56℃ 灭活 30 min，用染色缓冲液（含 1% 胎牛血清的 PBS）按 1:1 稀释。收集 GTKO 猪和野生型猪的外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell, PBMC），洗涤 2 次后重悬于染色缓冲液中。将 1×10^5 个细胞与 50 μ L 灭活的恒河猴血清或 50 μ L PBS 在室温下孵育 30 min，用冰冷的染色缓冲液洗涤细胞以终止反应，在室温下与兔补体血清（1:3 稀释）孵育 30 min，用 PI 染色液染色 2 min，使用流式细胞仪检测细胞死亡率。

1.3.10 凝血功能和生理指标监测 监测术后受体猴血小板数量、纤维蛋白原、活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间、凝血酶原时间的变化。此外，由兽医学专业人员负责受体猴术后护理，每 2 d 监测 1 次其生理指标，包括红细胞数量、血清磷、丙氨酸转氨酶等血常规和肝功能指标，以评估受体猴术后生理功能。

1.4 免疫抑制方案

猪-非人灵长类动物肾移植实验在云南省小型猪基因编辑与异种器官移植重点实验室进行，免疫抑制方案和手术流程见附件 1（扫描二维码 1 可见）。使用猪 PBMC 和恒河猴血清进行交叉配型，筛选出抗体滴度低、补体依赖细胞毒性低的恒河猴作为肾移植受体。移植术前每次免疫抑制诱导给药前，肌肉注射 0.5 mg 地塞米松和 0.3 mg 异丙嗪，以预防输液产生的不良反应。在术前 3 d、2 d 和 1 d 分别使用抗胸腺细胞球蛋白（antithymocyte globulin, ATG）、抗 CD20 单克隆抗体和抗 CD40 单克隆抗体诱导免疫抑制，采集受体猴全血进行血液学分析。移植当天，从 GTKO 猪上获取 1 个肾脏（左肾），并用威斯康星大学保存液（University of Wisconsin solution, UW 液）进行冷灌注。受体猴使用抗 CD20 单克隆抗体、他克莫司和甲泼尼龙免疫抑制后，切除左肾，将 GTKO 猪肾动脉与受体猴腹主动脉吻合，猪肾静脉与受体猴下腔静脉吻合（异位移植），血管吻合完成并开放血流后，若移植肾数分钟内产生尿液且未发生 HAR，再切除受体猴右肾。术后受体猴接受基于抗 CD40 单克隆抗体的免疫抑制方案，并辅以低分子肝素、促红细胞生成素 β 、法莫替丁、阿司匹林和头孢曲松钠或头孢哌酮钠舒巴坦钠进行治疗（扫描二维码 1 可见附件 1）。



扫描二维码 1 可见附件 1

1.5 统计学方法

使用 SPSS 22.0 和 Graphpad prism 8.0.1 软件进行统计学分析，符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示，组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

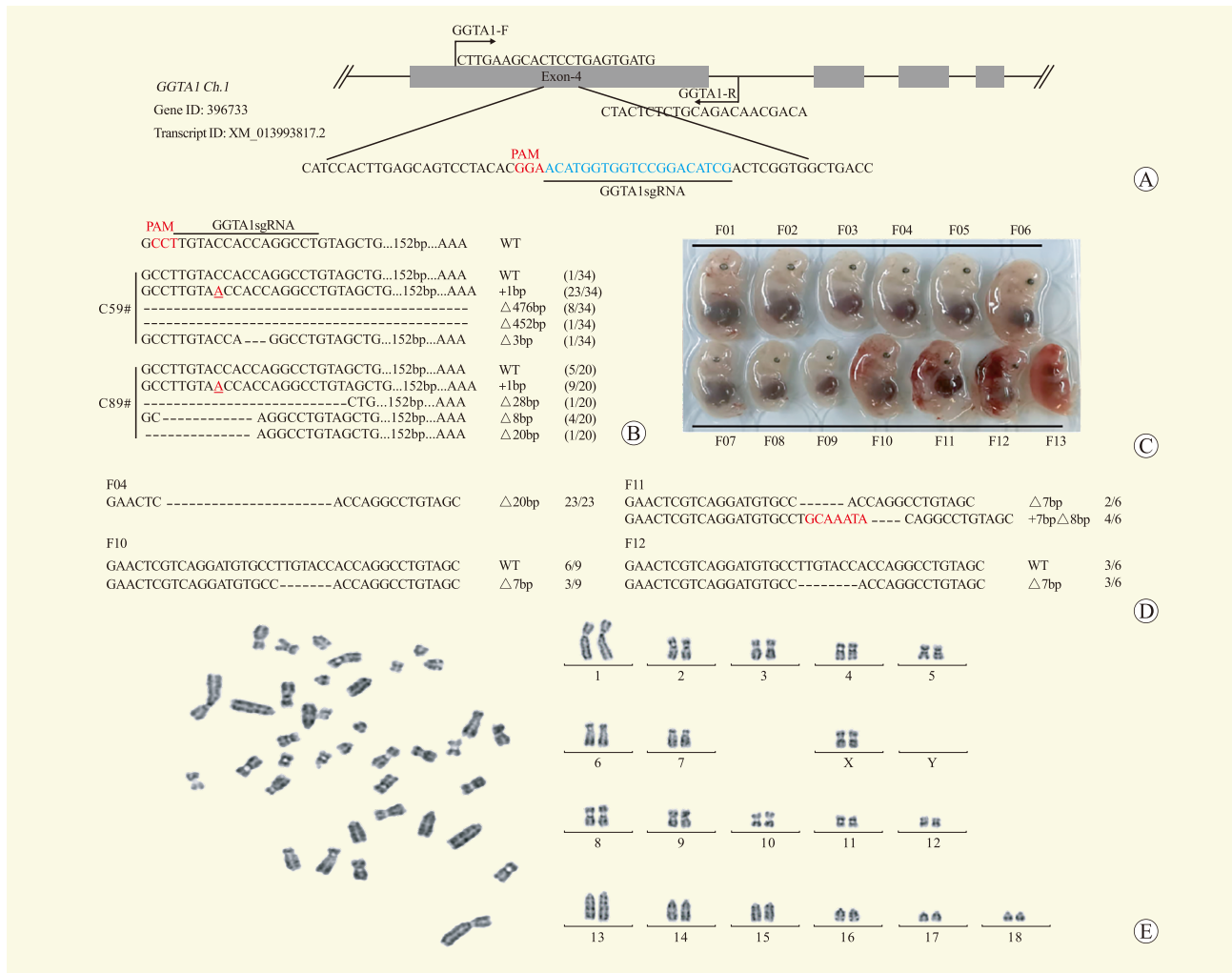
2 结果

2.1 GTKO 猪的构建及鉴定

利用 CRISPR/Cas9 基因修饰系统设计靶向滇南小型猪 GGTA1 基因第 4 外显子的 sgRNA（图 1 A）。将 Cas9/sgRNA 载体转染到滇南小型猪胎儿成纤维细胞中，经抗生素筛选后，C59#和 C89#两个细胞克隆点在 GGTA1 基因的靶区域携带插入缺失突变。C59#和 C89#两个细胞克隆点均有 5 种基因型（图 1 B），表明这两个克隆点并非来自单个细胞。将这两个克隆点作为供体细胞进行第一轮克隆，通过外科手术获得 13 头胎儿猪（图 1 C），其中 4 头胎儿猪（F04、F10、F11 和 F12）存在 GGTA1 基因突变，F04 和 F11 胎儿猪的 GGTA1 基因发生双等位基因突变（图 1 D），F04 胎儿猪具有 20 bp 缺失的纯合基因型且核型正常（图 1 D、E）。因此，将 F04 胎儿猪的成纤维细胞作为供体细胞进行第二轮克隆，共获得 7 头存活仔猪（P05、P07、P12、P14、P17、P19 和 P20），这些存活仔猪均检测到 GGTA1 基因的靶区域呈双等位基因突变（图 2 A、B）。免疫荧光染色结果显示，在 GTKO 猪肾中不表达 α -Gal 抗原表位（图 2 C）。

2.2 GTKO 猪与恒河猴的交叉配型试验及肾脏异种移植

在肾异种移植前收集 12 只恒河猴的血清，与 GTKO 猪的 PBMC 进行交叉配型实验。根据配型结果，20#恒河猴血清 IgM 与 GTKO 猪 PBMC 结合数量减少（图 3 A），且 GTKO 猪 PBMC 在补体依赖



注：A 图为猪 GGTA1 基因序列、sgRNA 序列、PAM 位点及 PCR 鉴定引物示意图，PAM 指原间隔序列邻近基序；B 图为 C59#和 C89#两个克隆点 GGTA1 靶区域的基因型；C 图为第一轮克隆获得的 13 头胎儿猪；D 图为第一轮克隆获得的存在 GGTA1 基因突变的 4 头胎儿猪及其基因敲除类型；E 图为 F04 胎儿猪的染色体核型分析。

图 1 GTKO 猪的构建

Figure 1 The construction of GTKO pigs

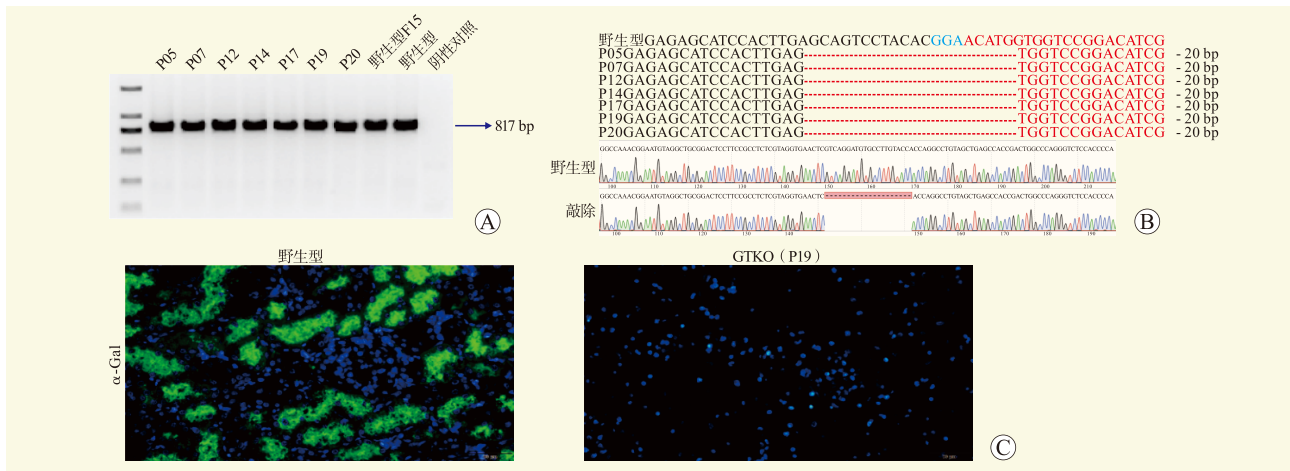
细胞毒性试验中的存活率高于野生型猪（图 3 B），表明 20#恒河猴血清补体对 GTKO 猪 PBMC 杀伤作用小，因此选择 20#恒河猴作为肾脏异种移植的受体。

在肾异种移植术前，使用 ATG 和抗 CD20 单克隆抗体对受体猴进行免疫诱导。手术当天，获取 GTKO 猪肾并进行灌注直至完全变白（图 3 C）。切除受体猴左肾后进行猪肾异位移植，血管吻合完成后开放血流，猪肾迅速变为粉红色，未发生 HAR（图 3 D），6 min 后输尿管出现尿液，表明肾移植术成功，再切除受体右肾。移植术后使用抗 CD40 单克隆抗体、他克莫司和甲泼尼龙维持受体猴的免疫抑制

状态。

2.3 受体猴移植肾功能监测及病理学改变

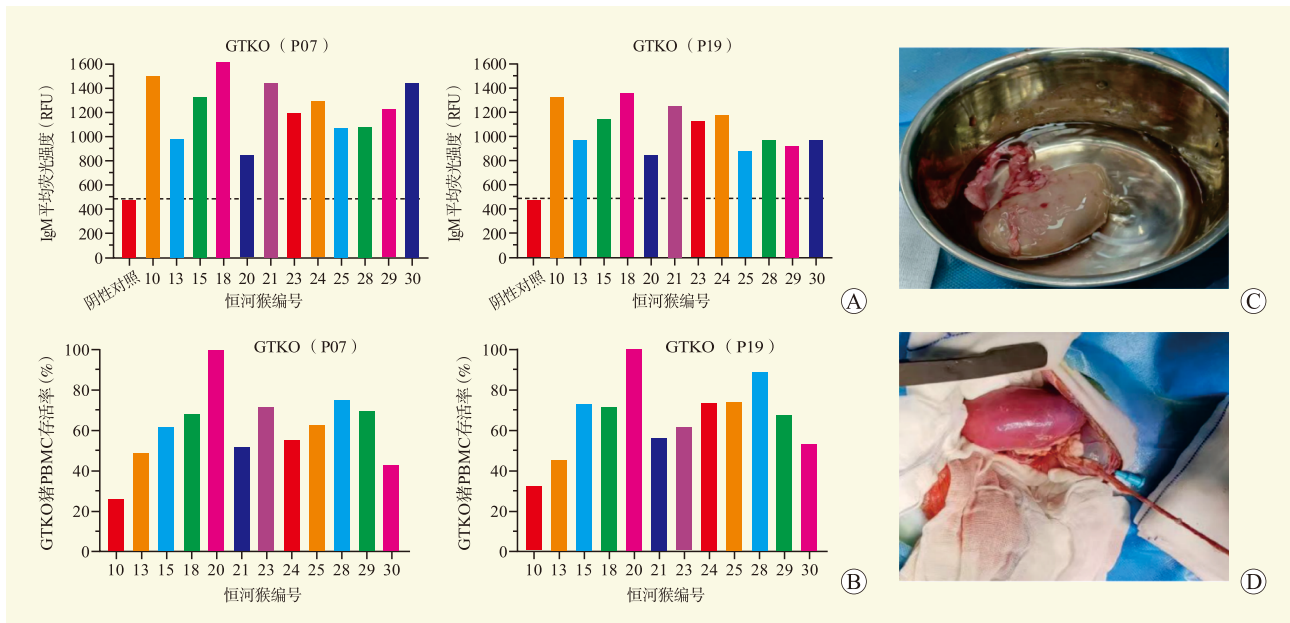
移植术后 7 d 超声检查发现，移植肾血流供应良好（图 4 A）。受体猴术后 7 d 血清肌酐水平保持稳定，在移植术后 10 d 升高，而尿肌酐水平有所波动（图 4 B）。移植术后 8 d 受体猴的尿量及尿微量白蛋白水平均保持稳定（图 4 C、D），术后 7 d 血清钾和胱抑素 C 水平得到有效控制，但在移植术后 10 d 水平均升高（图 4 E、F）。受体猴存活 10 d，尸检发现移植肾充血、肿胀和坏死（图 4 G），HE 染色结果显示，肾脏部分区域有出血和红细胞外渗，但肾小球结构相对完整（图 4 H）。



注：A 图为 GGTA1 基因靶向区域的 PCR 扩增产物；B 图为 Sanger 测序峰图，Sanger 测序显示 GGTA1 基因的基因型为双等位敲除 20 bp 碱基（上方），峰图显示目的基因为纯合敲除（下方）；C 图为不同猪肾组织中 α -Gal 免疫荧光染色结果（ $\times 400$ ）。

图 2 GTKO 猪的鉴定

Figure 2 The identification of GTKO pigs



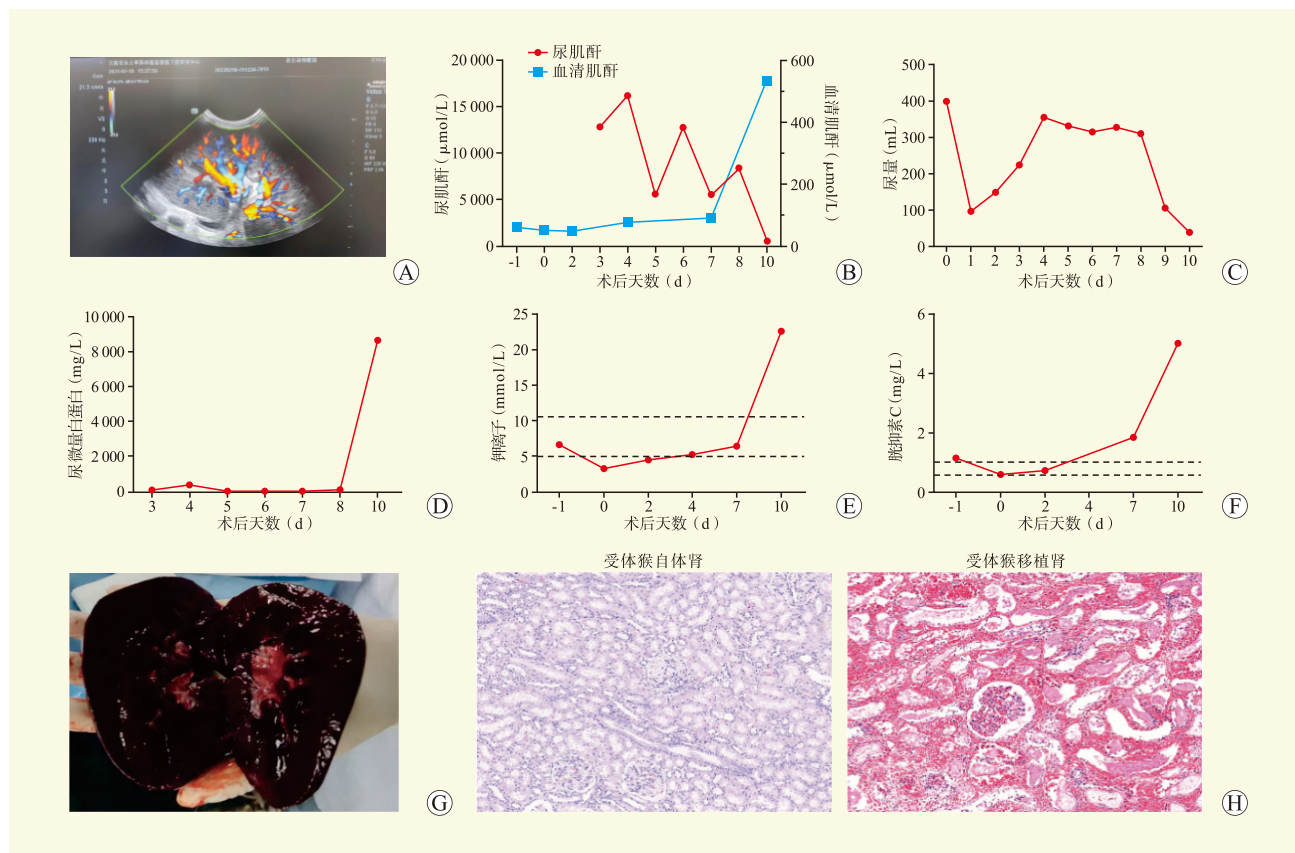
注：A 图为 GTKO 猪 PBMC 与不同恒河猴血清 IgM 抗体结合实验，20#恒河猴 IgM 抗体与猪 PBMC 结合的平均荧光强度最低；B 图为不同恒河猴血清补体依赖细胞毒性实验；C 图为供体猪肾取出并灌注至白色；D 图为供体猪肾移植至受体猴体内，颜色变红，质地变硬、有弹性，移植肾恢复血流供应，未见 HAR。

图 3 GTKO 猪-恒河猴的交叉配型试验及肾脏异种移植

Figure 3 Cross-matching experiments and kidney xenotransplantation between GTKO pigs and rhesus macaques

在体液免疫反应方面，移植术后 7 d 受体猴血清 IgG、IgM、IgA 以及补体 C3 和 C4 的水平均无显著变化（图 5 A~E）。然而，移植肾免疫荧光染色结果显示，少量 IgG 沉积和大量 IgM 沉积（图 5 F），免疫组织化学染色结果显示，肾小球和肾小管周围毛细血管中有大量补体 C3c 和 C4d 沉积（图 5 G）。

在细胞免疫反应方面，移植术后 7 d 受体猴体内嗜碱性粒细胞、中性粒细胞水平均较为稳定，而白细胞、淋巴细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞水平均升高（图 6 A~F）。尸检发现移植肾组织中未见 CD57⁺自然杀伤（natural killer, NK）细胞浸润，但有大量 CD68⁺巨噬细胞浸润（图 6 G、H）。



注：A 图为超声监测移植术后 7 d 移植肾血流供应情况；B 图为受体猴移植术后尿肌酐和血清肌酐水平变化；C 图为受体猴尿量变化；D 图为受体猴尿微量白蛋白水平变化；E 图为受体猴钾离子水平变化；F 图为受体猴胱抑素 C 水平变化；G 图为移植终点的移植肾外观；H 图为移植肾 HE 染色结果（×200）。受体猴自体肾脏的肾小球细胞结构正常，无异常变化，移植肾显示肾脏实质性出血，细胞形态和结构模糊，肾小球毛细血管腔闭塞性病变，肾小管和集合管中渗出大量胞浆成分。

图 4 受体猴移植肾功能监测及病理学改变

Figure 4 Renal function monitoring and pathological changes of the recipient monkey

在凝血功能方面，移植术后 7 d 受体猴的血小板计数和纤维蛋白原水平均降低（图 7 A、B），活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间和凝血酶原时间均较为稳定，之后呈上升趋势（图 7 C~E）。

从生理指标来看，移植术后 7 d 受体猴的红细胞数量、红细胞比容和血红蛋白水平均较为稳定，但在移植肾失功后均下降（扫描二维码 2 可见附件 2）。受体猴血清中无机磷、镁离子以及血清葡萄糖水平在术后 7 d 保持稳定，而移植肾失功后异常升高（扫描二维码 2 可见附件 2）。受体猴血清中的氯离子和钠离子水平在术后随着存活时间的延长而降低，受体猴血清中的碳酸氢盐水平在手术当天和存活末期均较低（扫描二维码 2 可见附件 2）。以上结果表明，GTKO 猪肾能够有效地支持受体猴存活至少 7 d。

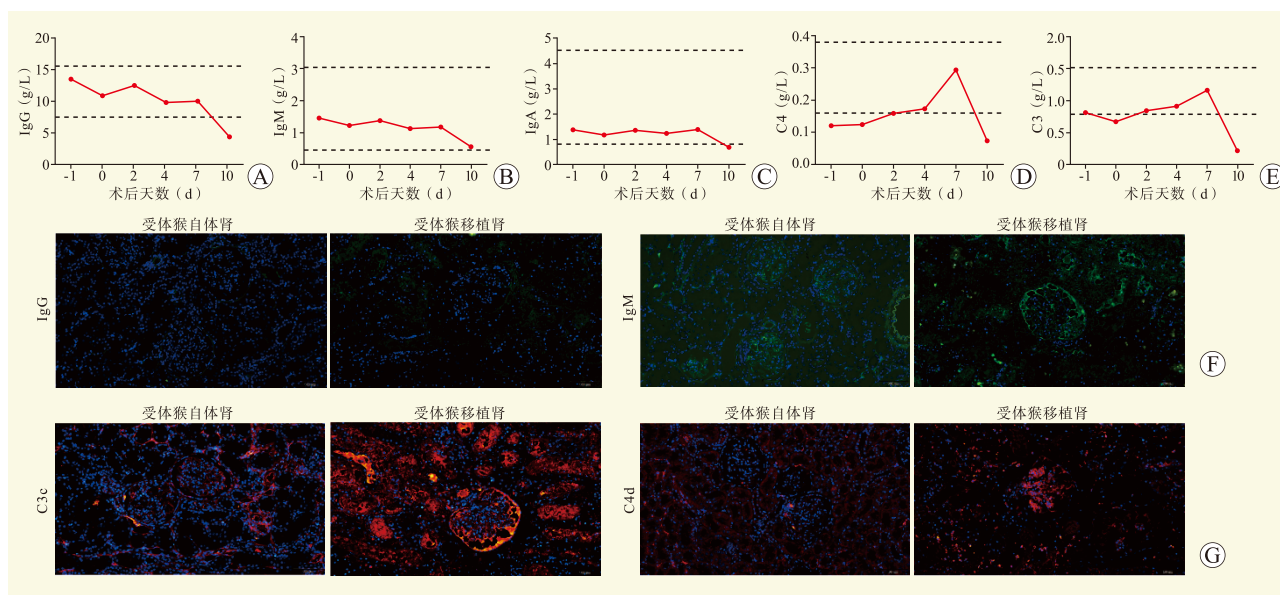
在肝功能方面，移植术后 7 d 受体猴血清丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、总胆汁酸、总胆红素和直接胆红素水平均较为稳定，但在移植肾失功后均升高。受体猴血清胆碱酯酶水平在手术当天和存活末期均较低，而血清 γ -谷氨酰转移酶水平在移植前后均较为稳定（扫描二维码 3 可见附件 3）。



扫描二维码 2 可见附件 2



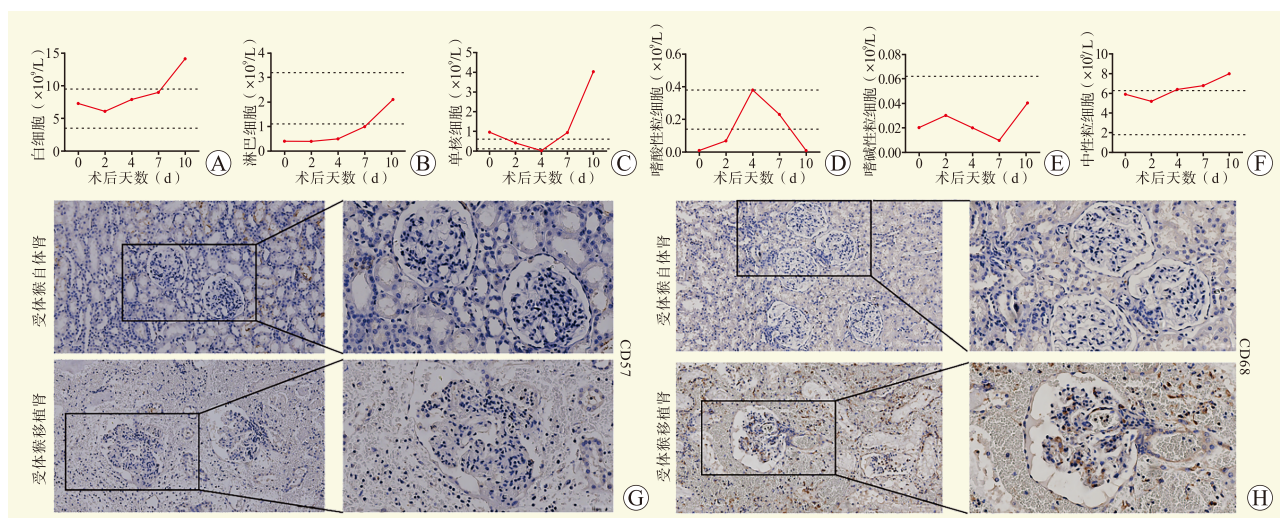
扫描二维码 3 可见附件 3



注：A 图为受体猴血清 IgG 抗体水平变化；B 图为受体猴血清 IgM 抗体水平变化；C 图为受体猴血清 IgA 抗体水平变化；D 图为受体猴血清补体 C4 水平变化；E 图为受体猴血清补体 C3 水平变化；F 图为移植终点移植肾 IgG 和 IgM 抗体的免疫荧光染色结果（×200）；G 图为移植终点移植肾补体 C3c 和 C4d 的免疫荧光染色结果（×200）。

图 5 受体猴体液免疫反应

Figure 5 Humoral immune response in the recipient monkey



注：A 图为受体猴白细胞数量变化；B 图为受体猴淋巴细胞数量变化；C 图为受体猴单核细胞数量变化；D 图为受体猴嗜酸性粒细胞数量变化；E 图为受体猴嗜碱性粒细胞数量变化；F 图为受体猴中性粒细胞数量变化；G 图为移植肾组织 CD57⁺ NK 细胞免疫组织化学染色结果（左×200、右×400）；H 图为移植肾组织 CD68⁺ 巨噬细胞免疫组织化学染色结果（左×200、右×400）。

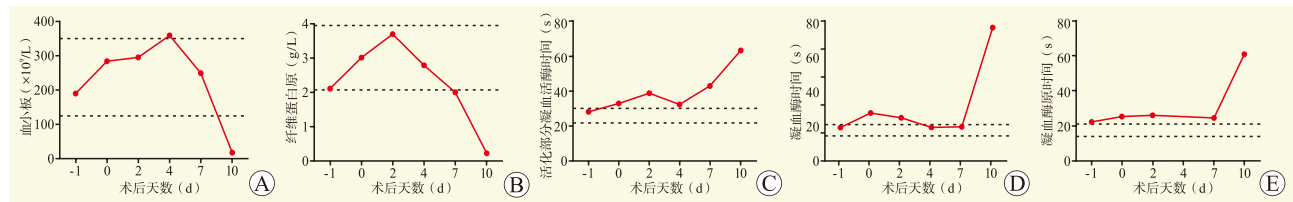
图 6 受体猴细胞免疫反应

Figure 6 Cell-mediated immune response in the recipient monkey

3 讨论

近年来，猪到人的器官移植（包括心脏、肝脏等）不断进入临床试验，并取得了里程碑式的进展。基因修饰猪肾也已成功移植到人类受者体内，并在

相当长的一段时间内发挥正常功能^[17-25]。美国食品与药品监督管理局在最近 2 年将允许基因修饰猪肾大规模进入临床，用于救治急需进行肾移植的肾衰竭患者。然而，我国目前可用的基因修饰供体猪相



注: A 图为受体猴血小板数量变化; B 图为受体猴纤维蛋白原水平变化; C 图为受体猴活化部分凝血活酶时间变化; D 图为受体猴凝血酶时间变化; E 图为受体猴凝血酶原时间变化。

图7 受体猴凝血功能监测

Figure 7 Monitoring of coagulation function in the recipient monkey

对较少,部分基因修饰供体猪选自大白猪等商业品种,其器官大小与人类相差较大。虽然通过消除生长激素受体基因表达来调整器官大小,但这种操作也会导致其他不良生物学后果^[26]。为了解决器官大小不匹配的问题,本研究选择了云南本地的滇南小型猪作为异种移植的供体^[27]。目前,笔者团队利用滇南小型猪已经开发了单基因、3基因、4基因、8基因、10基因和12基因的异种器官移植供体猪,但GGTA1基因是引起HAR的关键基因,是开发异种器官移植供体猪必须敲除的基因^[17,28-30]。

异种移植猪肾功能受到早期抗体介导的排斥反应(antibody-mediated rejection, AMR)影响,主要由IgM介导的供体特异性抗体(donor specific antibody, DSA)所致^[17]。研究表明,移植前通过交叉配型选择天然抗体效价较低的受体比天然抗体水平较高的受体移植存活时间更长^[31]。在本研究中,选择与GTKO猪PBMC的IgM抗体结合水平最低且细胞存活率较高的20#恒河猴作为受体,这在一定程度上缓解了早期AMR对猪肾异种移植物的损害。研究表明,如果肾异种移植在移植术后7d克服了IgM介导的AMR,则有可能延长存活时间^[31-33]。在本研究中,受体猴的自体肾脏中检测到IgM抗体沉积,这表明受体猴可能在术前已经产生了DSA。

尽管受体猴未遭受HAR并存活了10d,移植肾发挥正常功能也超过7d,但移植术后7d肉眼观察出现血尿并持续到术后10d,血清钾离子浓度和胱抑素C水平均异常升高,以及白细胞、淋巴细胞和单核细胞水平均升高。而且,在实验到达终点后,移植肾出现血栓形成、梗死和坏死,且发现了明显的IgM抗体、补体C3c和C4d沉积,提示受体可能遭

受了急性体液性排斥反应,该结果与我们之前的研究结果一致^[17]。此外,在移植术后7d受体猴的血小板数量急剧下降,凝血4项指标也发生了明显的变化,提示移植后期受体猴出现了较为严重的消耗性凝血病,这与之前的研究结果一致^[34]。

探索有效可行的免疫抑制方案以维持异种移植受体的长期存活是一项重要挑战^[35]。本研究中的受体猴接受了ATG和抗CD20诱导免疫抑制,以及抗CD40单克隆抗体、他克莫司和甲泼尼龙维持免疫抑制治疗。在受体存活7d后,他克莫司血药浓度逐渐升高,表明受体猴对免疫抑制药物的代谢可能出现了障碍。已有研究表明,抗CD40/CD40L单克隆抗体可以通过靶向阻断CD40-CD40L途径的T细胞杀伤作用,有效延长存活时间^[36]。在本研究中,受体猴接受了抗CD40单克隆抗体治疗,这对其10d的存活期可能起到了重要作用。

移植后的术后护理对维持受体的长期存活起着关键作用^[37]。对于猪到非人灵长类动物异种移植的术后护理,研究人员理论上遵循人体器官移植的术后护理方案^[38],但受体猴不配合且具有自然攻击性的行为,使得护理工作比理论上更具挑战性。在本研究中,人工和机器24h监测与密切关注受体猴,包括精神状态、生理指标等,对受体猴的术后护理进行了详细描述。

本研究利用CRISPR/Cas9基因修饰系统和体细胞克隆技术成功构建了GTKO滇南小型猪,进行了猪到非人灵长类动物肾脏异种移植的临床前探索,GTKO滇南小型猪肾脏可在恒河猴体内维持一定时间的正常肾功能,并有效克服HAR,证实GTKO猪用于异种移植有效。

参考文献:

- [1] DOS SANTOS R M N. Kidney xenotransplantation: are we ready for prime time?[J]. *Curr Urol Rep*, 2023, 24(6): 287-297. DOI: 10.1007/s11934-023-01156-7.
- [2] LOCKE J E, KUMAR V, ANDERSON D, et al. Normal graft function after pig-to-human kidney xenotransplant[J]. *JAMA Surg*, 2023, 158(10): 1106-1108. DOI: 10.1001/jamasurg.2023.2774.
- [3] MONTGOMERY R A, STERN J M, LONZE B E, 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.
- [4] PORRETT P M, ORANDI B J, 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.
- [5] ALI A, KEMTER E, WOLF E. Advances in organ and tissue xenotransplantation[J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2024, 12: 369-390. DOI: 10.1146/annurev-animal-021122-102606.
- [6] ANAND R P, LAYER J V, 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.
- [7] CHABAN R, ILEKA I, MCGRATH G, et al. Extended survival of 9- and 10-gene-edited pig heart xenografts with ischemia minimization and CD154 costimulation blockade-based immunosuppression[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2024, 43(12): 1932-1944. DOI: 10.1016/j.healun.2024.07.022.
- [8] MANOOK M, OLASO D, ANWAR I, et al. Prolonged xenokidney graft survival in sensitized NHP recipients by expression of multiple human transgenes in a triple knockout pig[J]. *Sci Transl Med*, 2024, 16(751): eadk6152. DOI: 10.1126/scitranslmed.adk6152.
- [9] GALILI U, SHOHET S B, KOBRIN E, et al. Man, apes, and old world monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(33): 17755-17762. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)77900-9.
- [10] MCMORROW I M, COMRACK C A, SACHS D H, et al. Heterogeneity of human anti-pig natural antibodies cross-reactive with the Gal(alpha1, 3)Galactose epitope[J]. *Transplantation*, 1997, 64(3): 501-510. DOI: 10.1097/00007890-199708150-00021.
- [11] HISADOME Y, EISENSON D L, SANTILLAN M R, et al. Pretransplant screening for prevention of hyperacute graft loss in pig-to-primate kidney xenotransplantation [J]. *Transplantation*, 2024, 108(8): 1749-1759. DOI: 10.1097/TP.0000000000004958.
- [12] DALMASSO A P, VERCELLOTTI G M, FISCHER R J, et al. Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients[J]. *Am J Pathol*, 1992, 140(5): 1157-1166.
- [13] LAI L, KOLBER-SIMONDS D, PARK K W, et al. Production of alpha-1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning[J]. *Science*, 2002, 295(5557): 1089-1092. DOI: 10.1126/science.1068228.
- [14] PHELPS C J, KOIKE C, VAUGHT T D, et al. Production of alpha 1, 3-galactosyltransferase-deficient pigs[J]. *Science*, 2003, 299(5605): 411-414. DOI: 10.1126/science.1078942.
- [15] CHEN G, QIAN H, STARZL T, et al. Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys[J]. *Nat Med*, 2005, 11(12): 1295-1298. DOI: 10.1038/nm1330.
- [16] YAMADA K, YAZAWA K, SHIMIZU A, et al. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1, 3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue[J]. *Nat Med*, 2005, 11(1): 32-34. DOI: 10.1038/nm1172.
- [17] YANG C, WEI Y, LI X, et al. Production of four-gene (GTKO/hCD55/hTBM/hCD39)-edited donor pigs and kidney xenotransplantation[J]. *Xenotransplantation*, 2024, 31(4): e12881. DOI: 10.1111/xen.12881.
- [18] GRIFFITH B P, GOERLICH C E, SINGH A K, et al. Genetically modified porcine-to-human cardiac xenotransplantation[J]. *N Engl J Med*, 2022, 387(1): 35-44. DOI: 10.1056/NEJMoa2201422.
- [19] PETERSON L, YACOUB M H, AYARES D, et al. Physiological basis for xenotransplantation from genetically modified pigs to humans[J]. *Physiol Rev*, 2024, 104(3): 1409-1459. DOI: 10.1152/physrev.00041.2023.
- [20] JOU S, MENDEZ S R, FEINMAN J, et al. Heart transplantation: advances in expanding the donor pool and xenotransplantation[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2024, 21(1): 25-36. DOI: 10.1038/s41569-023-00902-1.
- [21] MOAZAMI N, STERN J M, KHALIL K, et al. Pig-to-human heart xenotransplantation in two recently deceased human recipients[J]. *Nat Med*, 2023, 29(8): 1989-1997. DOI: 10.1038/s41591-023-02471-9.
- [22] MALLAPATY S. First pig-to-human liver transplant recipient 'doing very well' [J]. *Nature*, 2024, 630(8015): 18. DOI: 10.1038/d41586-024-01613-4.
- [23] PAN W, ZHANG W, ZHENG B, et al. Cellular dynamics in pig-to-human kidney xenotransplantation [J]. *Med*, 2024, 5(8): 1016-1029. DOI: 10.1016/j.medj.2024.05.003.
- [24] WANG Y, CHEN G, PAN D, et al. Pig-to-human kidney xenotransplants using genetically modified minipigs[J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(10): 101744. DOI: 10.1016/j.xcrm.2024.101744.
- [25] KAWAI T, WILLIAMS W W, ELIAS N, et al. Xenotransplantation of a porcine kidney for end-stage kidney disease[J]. *N Engl J Med*, 2025. DOI: 10.1056/NEJMoa2412747.
- [26] HINRICHS A, KESSLER B, KUROME M, et al. Growth hormone receptor-deficient pigs resemble the

- pathophysiology of human Laron syndrome and reveal altered activation of signaling cascades in the liver[J]. *Mol Metab*, 2018, 11: 113-128. DOI: 10.1016/j.molmet.2018.03.006.
- [27] CHEN H M, ZHAO H, ZHU Q Y, et al. Genomic consequences of intensive inbreeding in miniature inbred pigs[J]. *BMC Genomics*, 2025, 26(1): 154. DOI: 10.1186/s12864-025-11333-2.
- [28] CHENG W, ZHAO H, YU H, et al. Efficient generation of GGTA1-null Diannan miniature pigs using TALENs combined with somatic cell nuclear transfer[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2016, 14(1): 77. DOI: 10.1186/s12958-016-0212-7.
- [29] LIU F, LIU J, YUAN Z, et al. Generation of GTKO Diannan miniature pig expressing human complementary regulator proteins hCD55 and hCD59 via T2A peptide-based bicistronic vectors and SCNT[J]. *Mol Biotechnol*, 2018, 60(8): 550-562. DOI: 10.1007/s12033-018-0091-6.
- [30] ZHAO H, LI Y, WIRIYAH DAMRONG T, et al. Improved production of GTKO/hCD55/hCD59 triple-gene-modified Diannan miniature pigs for xenotransplantation by recloning[J]. *Transgenic Res*, 2020, 29(3): 369-379. DOI: 10.1007/s11248-020-00201-2.
- [31] HIGGINBOTHAM L, MATHEWS D, BREEDEN C A, et al. Pre-transplant antibody screening and anti-CD154 costimulation blockade promote long-term xenograft survival in a pig-to-primate kidney transplant model[J]. *Xenotransplantation*, 2015, 22(3): 221-230. DOI: 10.1111/xen.12166.
- [32] ADAMS A B, KIM S C, MARTENS G R, 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.
- [33] KIM S C, MATHEWS D V, BREEDEN C P, 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.
- [34] 杨树军, 卫浩, 许勇, 等. 六基因编辑猪-食蟹猴异种肾移植围手术期监测初步报道[J]. *器官移植*, 2023, 14(4): 521-528. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023.04.008.
- YANG S J, WEI H, XU Y, et al. Preliminary report of perioperative monitoring of six-gene-edited pig-to-cynomolgus monkey kidney xenotransplantation[J]. *Organ Transplant*, 2023, 14(4): 521-528. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023.04.008.
- [35] 窦科峰, 张玄. 临床异种器官移植十大问题的思考[J]. *器官移植*, 2022, 13(4): 411-416. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2022.04.001.
- DOU K F, ZHANG X. Reflection on 10 problems of clinical xenotransplantation[J]. *Organ Transplant*, 2022, 13(4): 411-416. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2022.04.001.
- [36] MOHIUDDIN M M, SINGH A K, CORCORAN P C, 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.
- [37] 朱婵, 张栋梁, 赵德莉, 等. 基因编辑猪-猴异种组织器官移植围手术期动物护理[J]. *实验动物与比较医学*, 2024, 44(5): 495-501. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.043.
- ZHU C, ZHANG D L, ZHAO D L, et al. Perioperative animal care for xenotransplantation from genetically edited pigs to monkeys[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2024, 44(5): 495-501. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.043.
- [38] MOHIUDDIN M M, SINGH A K, SCOBIE L, et al. Graft dysfunction in compassionate use of genetically engineered pig-to-human cardiac xenotransplantation: a case report[J]. *Lancet*, 2023, 402(10399): 397-410. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)00775-4.

(收稿日期: 2025-02-21)

(本文编辑: 谢诗韵 吴秋玲)