

· 综述 ·

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2023.05.1594

猪-人异种器官移植研究现状

刘雪莉, 胡雪峰*

(福建师范大学生命科学学院, 福建省发育与神经生物学重点实验室, 福州 350117)

摘要 异种器官移植有望用于解决临床移植的器官供需失衡问题。猪具有的天然优势使其比非人灵长类动物更适合作为移植器官的供体。而猪器官移植后出现的一系列生物学障碍已被人们通过基因工程和药物抑制等手段克服。同时, 基因工程技术的日渐成熟显著优化了异种移植适用猪的构建方案, 推动了猪器官移植研究的发展。尽管猪器官异种移植真正进入临床实验阶段尚需时日, 但近年来在少数脑死亡或重症患者身上进行的猪器官移植实验已展现出猪器官异种移植在解决临床移植器官供需失衡问题上的巨大应用前景。

关键词 异种器官移植; 免疫排斥; 转基因猪; 基因工程技术

中图分类号 R617

A Review on Pig-to-Human Organ Transplantation

LIU Xue-Li, HU Xue-Feng*

(School of Life Sciences, Fujian Normal University, Fujian Key Laboratory of Development and Neurobiology, Fuzhou 350117, China)

Abstract Xenotransplantation holds the promise of being used to address the imbalance between organ supply and demand for clinical transplantation. Pigs have natural features that make them more suitable donors for transplant organs than non-human primates. A series of biological barriers that arise after pig organ transplantation have been overcome by genetic engineering and pharmacological suppression. Meanwhile, the gradual maturity of the genetic engineering technology has been significantly optimized for suitable pigs for xenotransplantation, and promoted the development of pig organ transplantation research. Although it will take time for pig organ xenotransplantation to enter the clinical trial stage, recent studies conducted in a few brain-dead or critically ill patients have exhibited the great potential of porcine xenotransplantation in solving the imbalance between supply and demand of organs for clinical transplantation.

Key words xenotransplantation; immunological rejection; genetically modified pigs; genetic engineering technology

器官移植是治疗终末期器官衰竭的有效方法。虽然我国每年有大量患者需要进行器官移植, 但是在传统文化、伦理道德, 以及社会心理等多重综合因素的影响下, 愿意进行遗体捐赠提供供体器官的数量十分稀少。这种器官移植供需关系的严重失衡使患者获得器官移植的机会很小, 且等待移植的时间过长, 导致许多患者至死都未能等到合适移植的器

官。而异种器官移植则有望成为解决移植供需关系严重失衡问题的有效方案。

早在二十世纪初, 就有人试图将动物作为临床移植器官供体。例如, 在 1905 年, 法国的 Princeteau 将兔肾移植到人身上, 患者在术后的第 16 d 出现排斥反应死亡^[1]。而由于非人灵长类动物 (non-human primates, NHPs) 与其他物种相比在进化上更接

收稿日期: 2022-11-14; 修回日期: 2023-02-26; 接受日期: 2023-03-03

国家自然科学基金项目 (No. 81771034) 资助

* 通讯作者 Tel: 0591-22868208; E-mail: bioxfh@fjnu.edu.cn

Received: November 14, 2022; Revised: February 26, 2023; Accepted: March 3, 2023

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81771034)

* Corresponding author Tel: +86-591-22868208; E-mail: bioxfh@fjnu.edu.cn

近人类,故在 20 世纪的 20~90 年代,科学家们进行了大量涉及 NHPs(主要是黑猩猩)的移植实验。在 20 世纪 60 年代,Reemtsma 曾尝试将黑猩猩的肾移植到患者体内;1964 年,Hardy 进行了第 1 例人类心的移植手术——将黑猩猩的心移植到人体内;1966 年,Starzl 进行了第 1 例人类肝的移植手术——将黑猩猩的肝移植到人体内^[2]。在这些实验中,NHPs 的移植患者在患者体内的存活时间非常短,最终均以失败告终。人们逐渐意识到 NHPs 作为移植器官来源存在着一系列不足:(1)NHPs 的数量相比于需要器官移植的庞大患者人群来说远远不足,且 NHPs 繁殖率低,世代周期长,一胎产仔数少;(2)饲养成本高;(3)器官尺寸与人类不匹配;(4)感染人畜共患病的风险较高;(5)NHPs 与人类亲缘关系较近会带来伦理问题。鉴于上述问题,人们开始寻找适合的非 NHPs 的供体物种。而猪凭借其种类丰富,繁殖能力出色,遗传性状稳定,与人相似的解剖学和生理学指标等先天优势,成为优质的移植器官供体。

1 猪作为移植器官供体的天然优势

接下来要学习一下解剖学和生理学

小型猪是一种优秀的实验材料,广泛应用于心

血管疾病和消化系统疾病的研究以及器官异种移植等领域^[3-6]。中国辽阔的国土面积和庞大的养猪业使得其具有丰厚的小型猪资源。此外,由于我国小型猪多产于偏远山区,当地独特的地势地貌使得小型猪具有天然的封闭群特性和高度近交等先天优势。用于移植实验的小型猪体型矮小(成年后一般为 40~80 kg),食性广泛,杂食,食量大,性格温顺,具有与人相似的解剖学和生理学指标(Table 1),体现出其他实验动物不可替代的优越性,国内目前使用的小型猪主要有五指山小型猪、巴马小型猪、陆川小型猪、贵州小型猪、版纳微型猪、藏香小型猪、蕨麻小型猪等品系,而且各种品系的小型猪种源单一,长期以高度近交的方式繁殖,遗传性状稳定,自然情况下平均寿命为 15 年左右^[7,8]。小型猪的繁殖能力出色,初配年龄早(约为 155~190 d),发情周期短(约 21 d),发情持续时间长(持续约 3 d),每窝产仔数较多(约 6~8 头)且存活率高^[9]。同时,由于猪和人在进化上的亲缘关系相距较远,受者患人畜共患病的风险较小,且与使用 NHPs 作为移植器官供体相比,使用猪引发的伦理争议较少。

Table 1 The ratio of organ weights between pigs and human^[8]

Organ	Spleen	Pancreas	Testicle	Eye	Adrenal
Pig(50 kg):Human(70 kg)	0. 16 :0. 22	0. 12 :0. 11	0. 66 :0. 47	0. 29 :0. 46	0. 07 :0. 29

2 猪器官移植的生理学障碍克服

猪器官移植入人类或 NHPs 体内后会出现一系列生物学障碍,例如免疫细胞引起的排斥反应、补体对移植物的攻击、猪异种抗原引起的排斥反应、凝血功能障碍和炎症反应等。而这些障碍目前已通过基因工程技术和药物抑制等手段得以克服。

2.1 抑制免疫细胞引起的排斥反应

问题是一次性解决还是需要后期长期吃药维护状态。

在接受猪器官移植后,受体中的免疫细胞,例如自然杀伤细胞(natural killer cell,NK cell)、巨噬细胞和 T 细胞会浸润异种移植植物,从而引发免疫排斥反应。

2.1.1 抑制 NK 细胞引起的排斥反应 NK 细胞能区分自身细胞和异体细胞,并自发溶解异体细胞(不需免疫系统的指令或其他细胞的配合),这使它们能识别猪器官移植植物并引发排斥反应。在猪器官移植入人体内时,NK 细胞通过直接接触裂解或激活猪的内皮细胞,促进促炎因子的分泌,诱导猪主动脉内皮细胞形态发生变化^[10]。此外,NK 细胞也可

通过表面的受体 FcγRIII(CD16)识别沉积在移植植物内皮上的 IgG 抗体复合物,随后释放出细胞毒性物质(穿孔素和颗粒酶),穿孔素在移植植物细胞表面形成穿孔,使颗粒酶更易进入移植植物的细胞中,诱导其凋亡^[11]。

已有报道称,在猪内皮细胞中表达人类白细胞抗原(human leukocyte antigen,HLA)-Cw4,虽然降低了 NK 细胞黏附和细胞毒性,但不足以完全克服 NK 细胞的细胞毒性^[12]。而在 α-1,3-半乳糖基转移酶(glycoprotein alpha-galactosyltransferase 1,GGTA1)基因敲除猪的细胞中表达 HLA-G1,可以有效抑制 NK 细胞的活化和增殖,减轻 NK 细胞对移植物的排斥^[13]。此外,HLA-E 与其在 NK 细胞上的主要受体 NGK2A 之间的相互作用能抑制 NK 细胞的细胞毒性和细胞因子的产生,因此,在猪心细胞中表达 HLA-E 能显著降低人血灌注过程中 NK 细胞对心肌的浸润,更好地保留心血管的功能^[14]。

2.1.2 抑制巨噬细胞引起的排斥反应 巨噬细胞是先天免疫系统的一部分,存在于许多人体器官中

(例如肺、肾、骨髓和心血管)。巨噬细胞主要通过两种机制在猪器官进入受体后引发排斥反应^[15]:一种是通过激活 T 细胞促进异种移植排斥反应的发生。经巨噬细胞处理并呈递的抗原能激活部分 T 细胞,促使 T 细胞产生能促进巨噬细胞渗透、破坏异种移植物的趋化因子或细胞因子。另一种是通过巨噬细胞自身的细胞毒性促使排斥反应的发生。巨噬细胞能通过一氧化氮以及自身分泌的细胞因子,例如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 等介导自身的细胞毒性^[16, 17]。

Kogata 等人^[18]在猪主动脉内皮细胞中表达人类 CD177,有效地抑制了 M1 巨噬细胞介导的异源性排斥反应。此外,在猪内皮细胞上表达 HLA-E 亦能使移植物免受巨噬细胞的细胞毒性^[19]。而 Sakai 等人^[20]的体外研究结果表明,在猪细胞上表达人 CD200 能抑制巨噬细胞介导的吞噬作用和细胞毒性。Toyama 等人^[21]发现,将人表面活性剂蛋白 A 在猪内皮细胞上异位表达,能有效抑制异种移植中巨噬细胞介导的排斥反应。

2.1.3 抑制 T 细胞介导的排斥反应 将猪的器官移植入 NHPs 体内后,受体体内会产生由 T 细胞介导的排斥反应,这种反应将导致移植中 T 细胞的渗透。而免疫抑制剂不能很好地抑制 T 细胞介导的排斥反应,且过度使用免疫抑制剂(例如抗人胸腺淋巴细胞球蛋白)容易增大细菌感染的风险。共刺激阻滞剂(例如抗 CD154 单克隆抗体,抗 CD40 抗体等)虽然能通过阻断 CD40-CD154 信号通路抑制 T 细胞介导的排斥反应,但是它们的使用容易增大出现并发症的风险。从起源解决问题,解决核心问题,解决诱因问题。

与使用共刺激阻滞剂相比,对猪进行基因修饰能更安全地抑制 T 细胞介导的排斥反应。通过在 GGT1 基因敲除猪的细胞中表达 HLA-G1,从而抑制 T 细胞的活化和增殖,减少移植物受到的由 T 细胞介导的排斥反应^[13]。研究证明,敲除猪的 $\beta 2 M$ 和 *CIITA* 基因会显著降低它对人 T 细胞应答的免疫原性,从而有效缓解异基因免疫应答^[22]。体内表达突变的人类 *CIITA* 基因能减少猪的血管内皮细胞上猪白细胞抗原 (swine leukocyte antigen, SLA) II 类的表达,从而抑制 T 细胞介导的排斥反应^[23]。敲除猪的主要组织相容性复合体 I (major histocompatibility complex I, MHC I) 类蛋白质也被证明能抑制 T 细胞介导的排斥反应^[24]。

2.2 抑制人类补体的激活

补体调节蛋白 (complement regulatory protein, CRP) 能保护细胞免受补体的攻击,但其具有物种特异性,故猪的 CPR 无法阻止人类补体攻击移植物。研究表明,在人体内预先存在的抗体与猪内皮细胞结合后,补体系统被激活,进而引起免疫排斥反应攻击移植物^[25]。

环孢菌素、甲基泼尼龙等药物能耗尽或抑制补体的激活,但同时会显著提高人体感染的风险^[26]。与药物相比,基因工程技术能更好地使猪器官免受补体系统的攻击——将人类 CRP 的基因引入猪体内能在很大程度上阻止灵长类(包括人类和 NHPs)补体对移植物的损害,例如,在 GGT1 基因敲除猪的主动脉内皮细胞上表达人类的 CD46,能有效抑制全身补体激活,防止补体介导的细胞裂解,保护移植物免受补体依赖的细胞毒性的影响^[27]。人类 CD55 在调节由抗原-抗体复合物通过经典途径引起的补体活化中发挥重要作用,故人类 CD55 在猪上的表达能保护移植物免受补体介导的裂解或溶血^[28, 29]。

2.3 维持凝血系统平衡

凝血功能失调是阻碍猪移植物存活的一个主要障碍,猪器官移植入受体后,抗体和补体介导内皮激活,使猪的血管内皮细胞从正常抗凝状态转变为促凝状态,导致凝血功能失调。凝血功能失调会引起血栓性微血管病,该病表现为纤维蛋白沉积和血小板聚集,移植器官的血管被血栓阻塞,最终导致组织缺血性坏死。随着凝血功能失调愈发严重,凝血因子被耗尽,可能会发生足以致命的消耗性凝血障碍^[30]。前面是根据移植后的问题预先对猪的基因进行修饰——裁剪,这里是针对相关问题进行基因补强,增加人体对猪器官的相容性。

通过对猪进行基因工程使其免受凝血功能失调的影响:将人类凝血调节蛋白质基因(例如血栓调节蛋白 (thrombomodulin, TBM)、内皮蛋白 C 受体、组织因子抑制物、CD39)导入猪体内,从而维持移植物中的促凝与抗凝系统平衡^[29, 31-33]。例如在表达人类 CD39 的猪的富血小板血浆中,由 ADP 和胶原诱导的血小板聚集显著延迟,即人类 CD39 在猪上的表达有效预防了血小板介导的血栓形成^[29]。因为猪血管性血友病因子 (von Willebrand factor, VWF) 与灵长类动物血小板糖蛋白 Ib 不相容,所以,患者移植猪器官后体内血小板活化和消耗增加,最终导致血小板减少症。据报道,人 VWF 在猪肺和肝中的表达显著抑制了血小板粘附和活化,进而减轻了血小板减少症和凝血失调的症状^[34]。

此外,古古甾酮和阿托伐他汀可以抑制血管细

胞中组织因子 (tissue factor, TF) 的表达和血栓形成, 即具有抗凝血作用^[35, 36]。Cimeno 等人^[37]将基因修饰和药物治疗结合, 将表达人类内皮细胞蛋白 C 受体、TBM、CD47、CD46、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 的基因并敲除 *GGTA1* 基因的猪, 用去氨加压素和氯膦酸盐脂质体进行预处理, 使得灌注人血的猪肝在体外能维持较长时间的生理学活性和促凝与抗凝系统的平衡, 说明该组合方案能有效保护移植入人体的猪肝移植体。

2.4 抑制炎症反应

即使是很小的猪移植体 (例如动脉补片) 也会引起受体的炎症反应, 且炎症反应被证明会增强凝血功能失调^[38]。某些药物可以减少炎症反应, 例如治疗自身免疫性疾病的药物 (甲氨蝶呤, 他克莫司等)、IL-1 受体拮抗剂 (阿那白滞素)、靶向抑制 IL-1 β 的单克隆抗体 (卡那单抗)、他汀类药物 (例如瑞舒伐他汀、西利伐他汀等)、组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (例如 ITF2357、SAHA、ITF2357 等)、抗凝剂和溶栓剂 (例如活化蛋白 C、肝素等)、补体激活抑制剂 (例如依库珠单抗、甲磺酸茚莫司他等), 但这些药物在抑制炎症反应的同时也会降低宿主抵御感染的能力^[39]。

是以降低自身免疫力为代价吧

人和猪的 TBM 之间存在分子不相容, 故在猪细胞上的表达人 TBM 对维持抗凝状态和抑制移植后的炎症有重要意义^[40]。HO-1 及其衍生物具有抗凋亡和抗炎作用。人类 TNF- α 诱导蛋白 3 (TNF alpha induced protein 3, TNFAIP3) 具有双重的细胞保护功能, 即防止 TNF 诱导的细胞凋亡和阻断 NF- κ B 活化以抑制炎症反应^[41]。故将人 *TNFAIP3* 或 *HO-1* 基因引入猪体内能保护移植体免受全身炎症反应^[42, 43]。

2.5 灭活猪内源性逆转录病毒

接受同种器官移植有较大的病毒感染风险, 例如巨细胞病毒, BK 病毒、乙肝病毒和 HIV 病毒等均可能随供体器官进入人体, 引发严重后果^[44]。而与由人类提供的同种器官相比, 专门为器官移植而准备的猪器官更加安全, 供体猪在指定的无病原体室内设施中繁殖、饲养和管理, 以确保所有已知并被认为是有害的微生物没有随器官转移。

但即便如此, 猪器官中仍可能有潜在的病毒, 例如猪内源性逆转录病毒 (porcine endogenous retroviruses, PERVs)。PERV 是一种在猪的各种组织和器官中均有表达的 RNA 病毒, 该病毒可能会导致宿主出现免疫缺陷, PERV 在体外可以感染人的某些细

胞系 (例如 T 细胞、B 细胞系等), 故人们担心 PERV 会通过猪的器官转移到人体内, 进而致人患病^[45]。虽然暂无 PERV 致人患病的报道, 但是, 目前猪器官移植的临床案例较少, 不能完全排除 PERV 在猪器官移植过程中感染人体的可能。目前已能通过基因工程灭活 PERV, 例如运用 CRISPR-Cas9 技术灭活 PERV, 用小干扰 RNA 技术抑制 PERV 的激活等^[46, 47]。

猪器官可能病毒范围可控, 可预见, 也能够进行一定程度的处理, 保障移植器官本身的安全性。

3 基因工程技术优化了异种移植适用猪的构建方案

首先通过基因修饰排除移植器官本身的免疫排斥

在过去二十年间, 基因工程技术迅速发展, 该技术是构建异种移植适用猪的优质方案, 常用于修饰异种移植供体猪的基因 (Table 2), 例如用于敲除 3 种在猪器官和组织中大量表达且引起异种移植免疫排斥的主要抗原 *GGTA1*, 胞苷单磷酸-N-乙酰神经氨酸羟化酶 (cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, CMAH) 和 β 1,4 N-乙酰半乳糖胺基转移酶 2 (β -1,4-N-acetylgalactosyltransferase 2, β 4GalNT2)。

20 世纪 90 年代初, 人们通过显微注射技术生产出一只表达人类 CD55 蛋白的猪, 这首次证明了对猪进行基因工程是克服异种移植中产生的生物学障碍的有效手段^[48]。显微注射涉及将数千个 DNA 拷贝注射到受精卵的原核中; 将受精卵转移到受体中, 并筛选后代的外源 DNA 整合和表达, 其存在低效 (只能获得 1%~4% 的转基因后代)、耗时、需要大量财力物力等缺点, 这些问题极大地阻碍了这项技术在猪基因修饰上的应用。此后, 研究人员开始使用人造核酸酶, 例如锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN), 对猪基因进行修饰, 二者都是通过蛋白质识别特定的 DNA 序列, 再用核酸酶切割该序列, 该过程利用细胞的同源重组和非同源末端连接机制, 引入或删除靶序列上的特定 DNA 片段。Hauschild 等人 and Xin 等人就曾分别通过 ZFN 和 TALEN 技术敲除了猪的 *GGTA1* 基因^[49, 50]。而 Lutz 等人更是运用 ZFN 技术实现了猪 *GGTA1* 和 *CMAH* 基因的双敲除, 与仅敲除 *GGTA1* 基因的猪外周血单个核细胞相比, 双敲除 *GGTA1* 和 *CMAH* 基因的猪外周血单个核细胞与人 IgG 的结合减少, 人血清对其的毒性降低, 说明在敲除 *GGTA1* 基因的基础上, 进一步敲除 *CMAH* 基因可以更好地抑制猪器官移植后出现的排斥反应^[51]。

Table 2 Benefits of genetic engineering techniques for xenotransplantation in pigs

Technique	The modified gene or protein	Benefits for xenotransplantation	Reference
Microinjection	CD59	Reduction of activation of serum complement on the luminal surface of the vascular endothelium	[57, 58]
	CD55	Reduction of activation of serum complement on the luminal surface of the vascular endothelium	[57]
	<i>TRAIL</i>	Controlling post-hyperacute rejection mechanisms mediated by cellular components of the immune system	[59]
ZFN	<i>GGTA1</i>	Inhibit immune rejection mediated by Gal antigen	[50, 51]
	<i>CMAH</i>	Reduces damage to cells caused by anti-Neu5Gc antibodies	[51]
TALEN	<i>GGTA1</i>	Inhibit immune rejection mediated by Gal antigen	[49]
	<i>DAF</i>	Complement inhibitors are produced to protect cells from complement attack after xenotransplantation	[60]
CRISPR/Cas	<i>VWF</i>	Reduction of formation of activated platelets	[61]
	Class I MHC	Contributes to the study of the function of porcine MHC class I	[24]
	<i>GGTA1</i>	Inhibit immune rejection mediated by Gal antigen	[54]
	<i>CMAH</i>	Reduces damage to cells caused by anti-Neu5Gc antibodies	[54]
	<i>β4GalNT2</i>	Reduction of human antibodymediated cytotoxicity	[54]

但大量活性 ZFN 的设计和组装过程复杂,工程量大,基因打靶效率相对较低;而与 ZFN 相比,TALEN 具有较为容易的构建过程和较高的基因编辑成功率,但要克隆出大且重复性高的 TALE 蛋白序列仍很困难^[52]。2013 年,Church 的研究组首次使用**成规律的间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)**技术,完成了 RNA 介导的人类基因组编辑^[53]。CRISPR 技术的出现更是为 3 基因敲除猪 (*GGTA1*, *CMAH* 和 *β4GalNT2*) 的构建提供了更加高效、安全的方案,最大限度地减少异种移植的抗体屏障^[54]。近年来,CRISPR 基因编辑技术作为一种新的基因组编辑技术,被证明能用更短的时间、更高的效率对一只猪的一个或多个基因进行修饰,以解决猪器官移植中**逆转录病毒传播、免疫排斥、凝血功能失调和炎症反应**等

问题^[55, 56]。日渐成熟的基因工程技术降低了构建异种移植适用猪的成本,使对猪基因进行的修饰更加高效和安全,显著优化了异种移植适用猪的构建方案。

4 问题与展望

综上所述,目前已能应用**基因工程和免疫抑制药物等手段,克服猪移植物进入受者体内后出现的生物学障碍,且基因工程技术的日渐完善显著优化了异种移植适用猪的构建方案**。但至今所做的异种移植实验大多是将猪器官移植到非人类灵长类动物 (例如狒狒^[57]、黑猩猩^[2]) 体内,而这些实验尚不能完美地模拟猪器官移植入人体的状况,所以人们开始尝试临床实验——将基因修饰猪的器官移植入人体 (Table 3)。在这些研究中猪器官在患者体内的存活时间显著延长,且发挥出了一定的生物学功能,

Table 3 Experiments of pig organ transplantation into the human body

Xenograft Organs	Xenograft recipients	Effect	Reference
Islets	Diabetic	The patients' glycated hemoglobin levels improved	[63]
Skin	Burn patients	Pig skin repairs burn wounds to the same effect as human skin	[64]
Kidney	The human brain- dead decedent	The transplanted pig kidney can not only filter blood and produce urine, but has not experienced hyperacute rejection	[62]
Heart	Seriously ill man	No rejection	[65]
Heart	The patient with end-stage non-ischemic cardiomyopathy	There was no early rejection, PERV was detected, and it survived for 60 days	[66]

例如 2021 年, Porrett 与其同事将转基因猪的双肾移植到脑死亡的患者身上, 在术后的 72 小时内, 右肾能产生尿液, 但肾小球滤过率很低, 且随着时间的推移尿流量减少^[62]。这次研究显示了猪器官异种移植的巨大进展, 并为猪器官移植进入临床研究提供了科学依据, 但与此同时也提出了新的问题——脑死亡患者是否可以用作人体试验的中间过渡模型, 即这类患者是否能正确反映人体正常生理指标。

最近, 在美国食品和药物管理局咨询委员会上, 大多数与会者的态度预示着基因工程猪的异种移植有望迎来临床试验阶段。但在猪器官异种移植真正进入临床实验阶段前, 尚需一些准备, 除了要继续完善科学技术以维持移植物的生理学活性和存活时间外, 还要国家制定异种移植相关的法律法规, 确保猪器官异种移植进入临床后的规范化操作, 最终实现猪器官移植到人体的临床应用, 为终末期器官衰竭患者的治疗提供有效方案。

参考文献 (References)

[1] Deschamps JY, Roux FA, Saï P, *et al.* History of xenotransplantation[J]. *Xenotransplantation*, 2005, **12**(2): 91-109

[2] Cooper DK. A brief history of cross-species organ transplantation [J]. *Proc(Bayl Univ Med Cent)*, 2012, **25**(1): 49-57

[3] Deng L, Fu D, Zhu L, *et al.* Testosterone deficiency accelerates early stage atherosclerosis in miniature pigs fed a high-fat and high-cholesterol diet; urine¹H NMR metabolomics targeted analysis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, **476**(2): 1245-1255

[4] Pan Y, Rong Y, Huang J, *et al.* Lower cardiovagal tone and baroreflex sensitivity associated with hepatic insulin resistance and promote cardiovascular disorders in Tibetan minipigs induced by a high fat and high cholesterol diet[J]. *J Diabetes Complications*, 2019, **33**(4): 278-288

[5] Liu B, Chen Y, Zhang M, *et al.* Identification and pathogenicity of hepatitis E Virus from laboratory Bama miniature pigs[J]. *BMC Vet Res*, 2022, **18**(1): 99

[6] Shim J, Ko N, Kim HJ, *et al.* Human immune reactivity of GG-TA1/CMAH/A3GALT2 triple knockout Yucatan miniature pigs[J]. *Transgenic Res*, 2021, **30**(5): 619-634

[7] 涂尾龙, 吴潇, 王洪洋. 实验用小型猪的品种资源概况及其应用研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯 (Tu WL, Wu X, Wang WY. General situation and application research progress of experimental miniature pig breed resources[J]. *Shanghai J Anim Hus Vet Med*), 2022, **2022**(4): 1-10

[8] 宋修春, 王磊, 李玉春. 小型猪种质资源引进培育及生物学特性研究进展[J]. 中国畜禽种业 (Song XC, Wang L, Li YC. Research progress on introduction, cultivation and biological characteristics of miniature pig germplasm resources [J]. *Chin Livest Poul Breed*), 2021, **17**(5): 89-90

[9] 杨李厂, 周文兵, 丁隽, 等. 三品种实验用小型猪繁殖性能测定[J]. 实验动物与比较医学 (Yang LC, Zhou WB, Ding J, *et al.* Determination of reproductive performance of three experimental miniature pigs[J]. *Lab Anim Comp Med*), 2017, **37**(1): 50-54

[10] Goodman DJ, Von Albertini M, Willson A, *et al.* Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells[J]. *Transplantation*, 1996, **61**(5): 763-771

[11] Resch T, Fabritius C, Ebner S, *et al.* The role of natural killer cells in humoral rejection[J]. *Transplantation*, 2015, **99**(7):

1335-1340

[12] Forte P, Baumann BC, Schneider MK, *et al.* HLA-Cw4 expression on porcine endothelial cells reduces cytotoxicity and adhesion mediated by CD158a+ human NK cells [J]. *Xenotransplantation*, 2009, **16**(1): 19-26

[13] 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

[14] Abicht JM, Sfriso R, Reichart B, *et al.* Multiple genetically modified GTKO/hCD46/HLA-E/hβ2- mg porcine hearts are protected from complement activation and natural killer cell infiltration during ex vivo perfusion with human blood[J]. *Xenotransplantation*, 2018, **25**(5): e12390

[15] Cadili A, Kneteman N. The role of macrophages in xenograft rejection[J]. *Transplant Proc*, 2008, **40**(10): 3289-3293

[16] El-Ouaghliidi A, Jahr H, Pfeiffer G, *et al.* Cytokine mRNA expression in peripheral blood cells of immunosuppressed human islet transplant recipients[J]. *J Mol Med (Berl)*, 1999, **77**(1): 115-117

[17] Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, *et al.* Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, **157**(1): 87-94

[18] Kogata S, Lo PC, Maeda A, *et al.* Suppression of macrophage-mediated xenogeneic rejection by the ectopic expression of human CD177[J]. *Transpl Immunol*, 2022, **74**: 101663

[19] Esquivel EL, Maeda A, Eguchi H, *et al.* Suppression of human macrophage-mediated cytotoxicity by transgenic swine endothelial cell expression of HLA-G[J]. *Transpl Immunol*, 2015, **32**(2): 109-115

[20] Sakai R, Maeda A, Choi TV, *et al.* Human CD200 suppresses macrophage-mediated xenogeneic cytotoxicity and phagocytosis [J]. *Surg Today*, 2018, **48**(1): 119-126

[21] Toyama C, Maeda A, Kogata S, *et al.* Suppression of xenogeneic innate immune response by a membrane-type human surfactant protein-A[J]. *Exp Ther Med*, 2022, **24**(3): 590

[22] Fu R, Fang M, Xu K, *et al.* Generation of GGTA1-/-β2M-/-CI-ITA-/- pigs using CRISPR/Cas9 technology to alleviate xenogeneic immune reactions [J]. *Transplantation*, 2020, **104**(8): 1566-1573

[23] Hara H, Witt W, Crossley T, *et al.* Human dominant-negative class II transactivator transgenic pigs - effect on the human anti-pig T-cell immune response and immune status[J]. *Immunology*, 2013, **140**(1): 39-46

[24] Reyes LM, Estrada JL, Wang ZY, *et al.* Creating class I MHC-null pigs using guide RNA and the Cas9 endonuclease[J]. *J Immunol*, 2014, **193**(11): 5751-5757

[25] Yang YG, Sykes M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, **7**(7): 519-531

[26] Kobayashi T, Taniguchi S, Neethling FA, *et al.* Delayed xenograft rejection of pig-to-baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy[J]. *Transplantation*, 1997, **64**(9): 1255-1261

[27] 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

[28] Martínez-Alarcón L, Liarte S, Quereda JJ, *et al.* Profiling human CD55 transgene performance assist in selecting best suited specimens and tissues for swine organ xenotransplantation [J]. *Biology (Basel)*, 2021, **10**(8): 747

[29] Ko N, Shim J, Kim HJ, *et al.* A desirable transgenic strategy using GGTA1 endogenous promoter-mediated knock-in for xenotransplantation model[J]. *Sci Rep*, 2022, **12**(1): 9611

[30] Lin CC, Ezzelarab M, Shapiro R, *et al.* Recipient tissue factor expression is associated with consumptive coagulopathy in pig-to-primate kidney xenotransplantation[J]. *Am J Transplant*, 2010, **10**(7): 1556-1568

[31] Miura S, Habibabady ZA, Pollok F, *et al.* Effects of human TF-

- PI and CD47 expression and selectin and integrin inhibition during GalTKO. hCD46 pig lung perfusion with human blood [J]. *Xenotransplantation*, 2022, **29**(2): e12725
- [32] Salvaris EJ, Moran CJ, Roussel JC, *et al.* Pig endothelial protein C receptor is functionally compatible with the human protein C pathway[J]. *Xenotransplantation*, 2020, **27**(2): e12557
- [33] Cross-Najafi AA, Lopez K, Isidan A, *et al.* Current barriers to clinical liver xenotransplantation[J]. *Front Immunol*, 2022, **13**: 827535
- [34] Connolly MR, Kuravi K, Burdorf L, *et al.* Humanized von Willebrand factor reduces platelet sequestration in ex vivo and in vivo xenotransplant models [J]. *Xenotransplantation*, 2021, **28**(6): e12712
- [35] Gebhard C, Stämpfli SF, Gebhard CE, *et al.* Guggulsterone, an anti-inflammatory phytosterol, inhibits tissue factor and arterial thrombosis[J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, **104**(3): 285-294
- [36] Lin CC, Ezzelarab M, Hara H, *et al.* Atorvastatin or transgenic expression of TFPI inhibits coagulation initiated by anti-nonGal IgG binding to porcine aortic endothelial cells [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, **8**(9): 2001-2010
- [37] 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
- [38] Ezzelarab MB, Eksler B, Azimzadeh A, *et al.* Systemic inflammation in xenograft recipients precedes activation of coagulation [J]. *Xenotransplantation*, 2015, **22**(1): 32-47
- [39] Dinarello CA. Anti-inflammatory Agents: Present and Future [J]. *Cell*, 2010, **140**(6): 935-950
- [40] Hara H, Iwase H, Nguyen H, *et al.* Stable expression of the human thrombomodulin transgene in pig endothelial cells is associated with a reduction in the inflammatory response[J]. *Cytokine*, 2021, **148**: 155580
- [41] Ferran C, Stroka DM, Badrichani AZ, *et al.* A20 inhibits NF-kappaB activation in endothelial cells without sensitizing to tumor necrosis factor-mediated apoptosis[J]. *Blood*, 1998, **91**(7): 2249-2258
- [42] Oropeza M, Petersen B, Carnwath JW, *et al.* Transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptotic and inflammatory stimuli [J]. *Xenotransplantation*, 2009, **16**(6): 522-534
- [43] Petersen B, Ramackers W, Lucas-Hahn A, *et al.* Transgenic expression of human heme oxygenase-1 in pigs confers resistance against xenograft rejection during ex vivo perfusion of porcine kidneys[J]. *Xenotransplantation*, 2011, **18**(6): 355-368
- [44] Cooper DKC, Iwase H, Wang L, *et al.* Bringing home the bacon: update on the state of kidney xenotransplantation[J]. *Blood Purif*, 2018, **45**(1-3): 254-259
- [45] Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs [J]. *Nat Med*, 1997, **3**(3): 282-286
- [46] Godehardt AW, Fischer N, Rauch P, *et al.* Characterization of porcine endogenous retrovirus particles released by the CRISPR/Cas9 inactivated cell line PK15 clone 15 [J]. *Xenotransplantation*, 2020, **27**(2): e12563
- [47] Li ZG, Liu GB, Pan MX, *et al.* Knockdown of porcine endogenous retroviruses by RNA interference in Chinese experimental miniature pig fibroblasts [J]. *Transplant Proc*, 2013, **45**(2): 748-755
- [48] White DJ, Yannoutsos N. Production of pigs transgenic for human DAF to overcome complement-mediated hyperacute xenograft rejection in man [J]. *Res Immunol*, 1996, **147**(2): 88-94
- [49] Xin J, Yang H, Fan N, *et al.* Highly efficient generation of GG-TA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(12): e84250
- [50] Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, *et al.* Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, **108**(29): 12013-12017
- [51] Lutz AJ, Li P, Estrada JL, *et al.* Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and galactose α -1,3-galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation [J]. *Xenotransplantation*, 2013, **20**(1): 27-35
- [52] Niu D, Ma X, Yuan Y, *et al.* Porcine genome engineering for xenotransplantation [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, **168**: 229-245
- [53] Mali P, Yang L, Esvelt KM, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, **339**(6121): 823-826
- [54] Estrada JL, Martens G, Li P, *et al.* Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTA1/CMAH/ β 4GalNT2 genes [J]. *Xenotransplantation*, 2015, **22**(3): 194-202
- [55] Cowan PJ, Hawthorne WJ, Nottle MB. Xenogeneic transplantation and tolerance in the era of CRISPR-Cas9 [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2019, **24**(1): 5-11
- [56] Yue Y, Xu W, Kan Y, *et al.* Extensive germline genome engineering in pigs [J]. *Nat Biomed Eng*, 2021, **5**(2): 134-143
- [57] Cowan PJ, Aminian A, Barlow H, *et al.* Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons [J]. *Transplantation*, 2000, **69**(12): 2504-2515
- [58] Diamond LE, McCurry KR, Martin MJ, *et al.* Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium [J]. *Transplantation*, 1996, **61**(8): 1241-1249
- [59] Klose R, Kemter E, Bedke T, *et al.* Expression of biologically active human TRAIL in transgenic pigs [J]. *Transplantation*, 2005, **80**(2): 222-230
- [60] Kang JT, Kwon DK, Park AR, *et al.* Production of α 1,3-galactosyltransferase targeted pigs using transcription activator-like effector nuclease-mediated genome editing technology [J]. *J Vet Sci*, 2016, **17**(1): 89-96
- [61] Hai T, Teng F, Guo R, *et al.* One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system [J]. *Cell Res*, 2014, **24**(3): 372-375
- [62] 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
- [63] Matsumoto S, Abalovich A, Wechsler C, *et al.* Clinical benefit of islet xenotransplantation for the treatment of type 1 diabetes [J]. *EBioMedicine*, 2016, **12**: 255-262
- [64] Massachusetts General Hospital. First application of genetically modified, live-cell, pig skin to a human wound [OL]. <https://medicalxpress.com/news/2019-10-application-genetically-live-cell-pig-skin.html> (2019-10-11) (2022-12-12)
- [65] Kozlov M. Clinical trials for pig-to-human organ transplants inch closer [J]. *Nature*, 2022, **607**(7918): 223-224
- [66] 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