

学术讨论

异种器官移植：前景如何？

陈 秋 钱凯先*

(浙江大学(玉泉校区)生物技术系, 杭州 310027)

摘要 目前异种器官移植在进入临床的过程中存在两大难题——免疫排斥和病原微生物感染。人类为防止免疫排斥而采取的措施使超急性排斥得到了很大程度的避免, 但大大增加了器官移植受体感染病原微生物的机会。猪作为人类理想的器官供体, 却有多种内源性病毒, 其中猪内源性逆转录病毒(PERV)引起了人类较大的关注。PERV的跨种感染存在正、反两方面的证据, 使得异种器官移植的前景喜忧参半。

关键词 异种器官移植, 免疫排斥, 病毒感染, 猪内源性逆转录病毒(PERV)

学科分类号 R62, R392

随着人体器官移植的成功开展, 供体器官短缺的问题越来越突出。这种状况推动了各国对非人源器官的可移植性研究。但异种器官移植面临两大障碍。一是免疫排斥, 包括超急性排斥(hyperacute rejection, HAR)、急性血管排斥反应、细胞介导的排斥反应和慢性排斥反应; 二是病原微生物的感染, 包括病毒、朊病毒、寄生虫等。一些灵长类动物与人之间的器官移植属“协调性异种移植”, 人体内不存在针对对方组织的天然抗体(IgM类), 所以一般不会发生超急性排斥。但灵长类动物来源稀缺, 不可能作为人体器官的稳定供体。由于猪的器官大小与人相似, 加上饲养方便, 因此被认为是人类异种器官的合适来源。但猪与人之间的器官移植属“非协调性异种移植”, 所以超急性排斥便成了异种器官移植的第一道障碍。

超急性排斥反应的机理是: 供体(猪)内存在 $\alpha 1, 3$ 半乳糖基转移酶, 其组织血管内皮细胞表面存在着糖类表面抗原: Gal $\alpha 1-3$ Gal末端糖残基, 而人体血清中有2% IgM和IgG为 α Gal天然抗体(xenoreactive natural antibodies, XNA)。人-猪之间器官移植时, XNA与 α Gal发生特异性结合形成免疫复合物(immune complex, IC), IC中抗体分子的Fc段可触发补体分子的活化, 尔后经过一系列补体反应的活化阶段形成攻膜复合体(MAC), 针对异体组织发生细胞裂解作用, 诱发超急性排斥反应。

基于上述HAR原理, 目前有以下方法用于阻

断超急性排斥: a. 人体血浆通过 α -Gal免疫吸附柱除去抗 α -Gal抗体, 但抗 α -Gal抗体能很快恢复正常水平; b. 应用补体清除或抑制剂(如眼镜蛇毒因子)抑制引发补体活化; c. 转基因猪: 过量表达岩藻糖基转移酶, 竞争 $\alpha 1, 3$ 半乳糖基转移酶, 使岩藻糖基位于糖复合物末端, 它是人体器官天然抗原; d. 敲除猪编码 $\alpha 1, 3$ 半乳糖基转移酶的基因; e. 转基因猪: 表达人补体调节蛋白, 如CD55(即补体衰败加速因子DAF)、CD46、CD59。它们不能阻止抗 α -Gal抗体结合到内皮细胞, 但能抑制补体活化的下游步骤, 防止细胞裂解, 延长移植存活时间。联合表达两种或3种补体调节蛋白, 效果更佳^[1]。

运用以上方法, 超急性排斥得到了很大程度的避免, 但是所有这些措施都使器官移植受体更易遭到病原微生物的感染。

首先, 抗 α -Gal $\alpha 1-3$ Gal抗体对防止表面携带Gal $\alpha 1, 3$ Gal结构的病原体侵染有作用。这些病原体包括寄生虫如: 锥虫和利什曼原虫、细菌和病毒。抗 α -Gal抗体能激活补体, 使灵长类动物血清中的鼠源逆转录病毒溶解。如果除去抗 α -Gal抗体, 将使这种保护作用不复存在。

其次, 补体调节蛋白如CD46或CD55是麻疹病毒^[2]、echo病毒^[3]和科萨奇病毒B^[4]的天然受

* 通讯联系人。

Tel: 0571-87985047, E-mail: kaikai@mail.hz.zj.cn

收稿日期: 2000-09-18, 接受日期: 2000-11-03

体。因此, 供体猪病毒有可能进而使用这些受体, 异种移植后, 这些病毒将自由使用人类天然分子作为受体, 进而感染移植受体全身。

另外, 异种移植比同种移植要求使用更多的免疫抑制剂, 免疫抑制将增加异种感染的可能性, 提供病毒一个适应新环境的好机会。而且免疫抑制导致持续性病毒如 EBV、CMV 的活化, 使得逆转录病毒诱导的疾病进一步发展。如果这些病毒暂不发作, 则有可能与移植病人感染的人类病毒进行基因重组, 产生一种难以控制的新病毒, 这类病毒如在人类中传播, 后果将十分严重。

在所有已知的猪病毒中, 猪内源性逆转录病毒 (porcine endogenous retroviruses, PERV) ——C 型逆转录病毒家族^[5] 引起了人们最大的关注。目前发现的所有家化的猪种基因组中都含有 PERV 基因, 在其他种系中未发现完全一样的前病毒基因, 但是不论外源性还是内源性逆转录病毒都与

PERV 序列有一定程度的类似。PERV mRNA 能自发地在异种移植考虑到的所有猪组织包括肝、肾、心、肺、胸腺、造血细胞、胰和内皮细胞中表达^[6,7]。从猪肾细胞系 (PK15)^[5]、促有丝分裂原活化的猪外周血单核细胞 (PBMC)^[8]、猪主动脉内皮细胞 (PAEC)^[7] 中释放出来的 PERV 能在体外感染人体细胞^[9]。如果 PERV 在移植受体中复制可能会导致严重的免疫缺陷病^[10]。

根据 PERV env 糖蛋白在 gp70/su 区域开放读码框架的不同, 到目前为止发现了三种 PERV 亚型: PERV-A、PERV-B、PERV-C。猪体内包含 10~25 个拷贝的 PERV-A, 大约 10 个拷贝的 PERV-B。PERV-C 要么没有, 要么在不同的整合位点上有数量不等的拷贝数。PERV-A 和 B 的感染性要比 C 亚型强。PERV-B 的前病毒结构示意图见图 1^[9]。

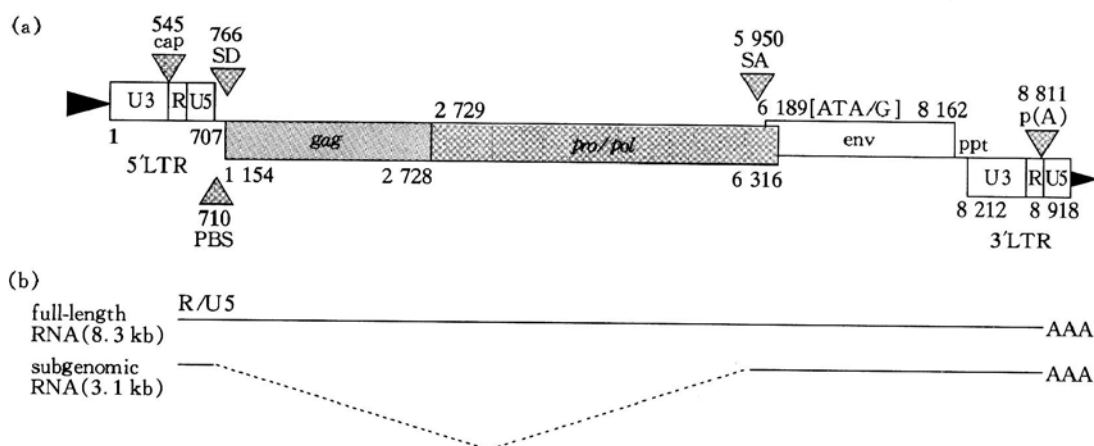


Fig. 1 Proviral organization of clone PERV-B

图 1 PERV-B 的前病毒结构示意图

(a) 前病毒全长 8 918 bp. cap: 转录起始位; PBS: 引物结合位点 ($tRNA_{Gly4}$); SD: 剪接供体; SA: 剪接受体; ppt: 多聚嘌呤序列; p(A): 多聚腺苷酸位点. (b) 从前病毒 PERV 转录出的 2 种 mRNA: 全长 8.3 kb 和 3.1 kb 病毒基因组的 env mRNA.

PERV 在体外能进入狒狒细胞^[11]、人细胞^[12], 那么在人体内, 尤其在异种移植的环境 (人细胞与猪细胞长期紧密接触和/或高免疫抑制剂和/或除去抗 α -Gal 抗体和补体) 下, 情况又如何呢? 科学家们模拟异种移植环境, 以灵长类动物为对象, 进行了许多实验:

Winkler 等^[13] 以猪-猕猴异种肾移植为模型, 移植后使用免疫抑制剂 28 d, 猪肾在受体内存在 2 周, 得出 PERV 不会通过猪肾进入猕猴的结论。

Martin 等^[14] 将猪内皮细胞移至用高剂量环磷

酰胺抑制免疫的狒狒 (*Papio hamadryas*) 中, 没有发现 PERV 转移, 并得出狒狒不适于用作 PERV 转移的近人类灵长类动物模型的结论。

Templin 等^[11] 事先将狒狒除去抗 α -Gal 抗体和补体, 高度免疫抑制后, 将猪 PBMC 细胞移至狒狒, 80 d 内未发现 PERV 的感染。

PERV 在体内没有感染灵长类动物, 但将能产生 PERV 的猪胰岛细胞移入患有非肥胖型糖尿病和严重免疫缺陷 (NOD/SCID) 的小鼠中, 发现 PERV 表达并感染了许多组织^[15]。这是 PERV 经

猪组织移植后跨种表达的第一个证据。这个结果表明对猪胰岛移入免疫抑制的病人体内会不会引起 PERV 表达的担心是合情合理的。

Khazal P 等分析了曾接受猪皮肤、胰岛细胞、体外灌注的 160 位病人, 其中 36 位使用了免疫抑制剂。有 23 位病人存在微嵌合状态 (microchimerism) 即在受体中存在供体细胞的状态, 最长时间达 8 年 6 个月。这种情况估计是因为移植物——猪细胞来自猪脾的树突细胞和干细胞, 这两种细胞表达较低水平的 Gal α 1-3Gal 异种抗原, 使得这些细胞免遭抗体介导的清除。判断是微嵌合状态还是 PERV 感染是通过计算病人体内 PERV 拷贝数 (定量 PCR) 和猪着丝粒序列 (着丝粒 PCR) 的比例, 如果是 PERV 感染, 此将超过猪的比例的平均水平。如果没有检测到猪着丝粒序列或猪线粒体序列而检测到了 PERV 序列, 则判断病人感染 PERV 无疑。分析后没有得到 PERV 感染的证据^[16]。

Schumacher 等^[17]的工作进一步点燃了异种移植的希望。Schumacher 等报道了第一例将异种神经组织移入人体试验的一年观察数据。他们将 12 个病人分成两组, 每组 6 人。一组用环孢菌素抑制免疫排斥, 一组用 MHG-I (major histocompatibility complex class I) 的单克隆抗体促进移植物的存活。将猪胚胎腹中脑组织移入帕金森病人的单侧纹状体后, 发现两种免疫抑制的方法都对猪移植物在人体内的存活有效, 有三例病人取得了明显的临床疗效, 而且一年内没有发现 PERV 或猪病原体的跨种表达。有人评价这项研究, 给异种移植替代失效多巴胺能细胞治疗帕金森疾病的可行性带来了希望。

除了已知的猪病毒外, 新的猪病毒不断被发现, 如 Menangle 病毒^[18]、猪嗜淋巴细胞疱疹病毒^[19]和 Nipah 病毒^[20]。这些病毒的威胁性如何尚无定论。

综上所述, 异种移植喜忧参半, 我们还需继续用密切观察的临床试验作为一种方法来评估在人体中使用猪细胞、组织、器官的安全性和有效性。

参 考 文 献

- Chen R H, Naficy S, Logan J S, *et al.* Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates. *Xenotransplantation*, 1999, **6** (3): 194~200
- Naniche D, Gayathri V K, Florence C, *et al.* Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol*, 1993, **67** (10): 6025~6032
- Ward T, Robert M P, Pamela A P, *et al.* Role for β 2-microglobulin in echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. *J Virol*, 1998, **72** (7): 5360~5365
- Bergelson J M, Joy G M, Richard L C, *et al.* Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol*, 1995, **69** (3): 1903~1906
- Patience C, Takeuchi Y, Weiss R A. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Med*, 1997, **3** (3): 282~286
- Akiyoshi D E, Denaro M, Zhu H, *et al.* Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virol*, 1998, **72** (5): 4503~4507
- Martin U, Kiessig V, Blusch J H, *et al.* Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet*, 1998, **352** (9129): 692~694
- Wilson C A, Wond S, Muller J, *et al.* Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cell. *J Virol*, 1998, **72** (4): 3082~3087
- Tonjes R R, Czauderna F, Fischer N, *et al.* Molecularly cloned porcine endogenous retroviruses replicate on human cells. *Transplantation Proceeding*, 2000, **32** (5): 1158~1161
- Tacke S, Specke V, Stephan O, *et al.* Porcine endogenous retroviruses: diagnostic assays and evidence for immunosuppressive properties. *Transplantation Proceeding*, 2000, **32** (5): 1166
- Templin C, Schroder C, Simon A R, *et al.* Analysis of potential porcine endogenous retrovirus transmission to baboon *in vitro* and *in vivo*. *Transplantation Proceeding*, 2000, **32** (5): 1163~1164
- Martin U, Winkler M E, Id M, *et al.* Transmission of pig endogenous retrovirus to primary human cells. *Transplantation Proceeding*, 2000, **32** (5): 1157
- Winkler M E, Martin U, Loss U, *et al.* Porcine endogenous retrovirus is not transmitted in a discordant porcine-to-cynomolgus xenokidney transplantation model with long-term survival of organ recipients. *Transplantation Proceeding*, 2000, **32** (5): 1162
- Martin U, Steinhof G, Kiessig V, *et al.* Porcine endogenous retrovirus is transmitted neither *in vivo* nor *in vitro* from porcine endothelial cells to baboons. *Transplantation Proceeding*, 1999, **31** (1~2): 913~914
- van der Laan L J W, Lockey C, Griffith B C, *et al.* Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature*, 2000, **407** (6800): 90~94
- Khazal P, Gillian L, Long Z F, *et al.* Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science*, 1999, **285** (5431): 1236~1241
- Schumacher J M, Elias S A, Palmer E P, *et al.* Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology*, 2000, **54** (5): 1042~1050
- Phibey A W, Kirkland P D, Ross A D, *et al.* An Apparently new virus (family paramyxoviridae) infectious for pigs, humans, and fruit bats. *Emerg Infect Dis*, 1998, **4** (2): 269~271
- Ehlers B, Ulrich S, Goltz M. Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses. *J Gen Virol*, 1999, **80** (4): 971~978
- Chua K B, Goh K J, Wong K T, *et al.* Fatal encephalitis due to Nipah Virus among pig farmers in Malaysia. *Lancet*, 1999, **354** (9186): 1257

How are the Prospects for Xenotransplantation ?

CHEN Qiu, QIAN Kai Xian*

(The Department of Biotechnology, Zhejiang University (Yuquan Campus), Hangzhou 310027, China)

Abstract There are two major hurdles on the way of xenotransplantation entering the clinic. The first is the technical issue of being able to overcome the human immune response that leads to rejection of transplanted organs from other species. The second concerns the potential risk of inadvertent transfer of animal viruses such as the much discussed porcine endogenous retroviruses (PERV) which might cross the species barrier and cause disease in human hosts. Many closely monitored clinical trials are needed as an approach to assess the safety and efficacy of using porcine cells, tissues, or organs therapeutically in humans.

Key words xenotransplant, immune rejection, virus infection, porcine endogenous retroviruses (PERV)

* Corresponding author. Tel: 86-571-87985047, E-mail: kaikai@mail.h2.zj.cn

Received: September 18, 2000 Accepted: November 3, 2000

欢迎订阅 欢迎投稿

《应用与环境生物学报》(双月刊)

刊号 ISSN 1006-687X 邮发代号: 62-15
CN 51-1482/Q

本刊是中国科学院主管、中国科学院成都生物研究所主办、科学出版社出版、国内外公开发行的全国性学术科技期刊(学报级),是我国应用生物学和环境生物学的核心刊物。主要报道我国应用生物学、环境生物学及相关科学领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的成果,包括研究论文、研究简报和本刊邀约的综述或述评。读者对象主要为本学科的科研人员、大专院校师生和科研管理干部。本刊获中国科学院科学出版基金资助。

《应用与环境生物学报》为双月刊(1999年由季刊改为双月刊)。双月25日出版,每期96页,2001年起改为大16开,高档铜板纸印刷。定价仍为每期11.00元,年定价66.00元。全国各地邮局(所)均可订阅。新订户可向本刊编辑部补购1995、1996、1997、1998、1999、2000年各卷(卷价分别为32.00元、44.00元、44.00元、44.00元、66.00元、66.00元和66.00元)。以及1999年增刊(环境微生物学研究),订价每册22.00元。编辑部地址:成都市人民南路4段9号,中国科学院成都生物研究所学报编辑部。邮编:610041 电话:(028) 5229903, 5237341 (联系人:刘东渝)