维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)03-0369-03

胸腺移植诱导猪源性异种移植物免疫耐受的研究进展

张银甫 综述；朱有华 审校

（1. 第三军医大学附属新桥医院泌尿外科 重庆 400038；2..第二军医大学附属长征医院泌尿外科 上海 200003）

【中国图书分类法分类号】R392.4 【文献标识码】B 【收稿日期】2000-08-08

临床器官移植中，同种器官供体来源的严重不足，使异种器官移植成为解决这一问题的可能途径。猪成为异种器官移植的理想供体[1]。目前，在攻克猪→人异种器官移植的第一道障碍——超急性排斥反应方面已经取得了突破性进展[2,3]。但异种移植后以细胞免疫为主的排斥反应较同种移植中除抗体介导的血管性排斥（DXR）外的另一主要障碍，目前的免疫抑制治疗尚难解决这一问题。而通过诱导人免疫活性细胞（主要是T细胞）对异种移植物的耐受则可消除或减轻急、慢行排斥反应，还可以免除或减少免疫抑制剂的使用，避免或减轻其毒副作用，是临床异种器官移植的理想状态。以美国哈佛大学医学院为主的研究人员从20世纪90年代初开始用猪胸腺移植的方法诱导受体对猪异种移植物的耐受，经过多年的努力，已经取得了令人鼓舞的成果。现就这方面的研究作一综述。

1 经胸腺途径诱导异种移植免疫耐受的不同方法

经胸腺途径诱导免疫耐受已进行了多年的研究，其主要的机制是通过胸腺的选择，使自身、同种或异种反应性T细胞发生克隆清除或无能（Anergy），从而诱导对移植物的耐受[4,5]。因为克隆清除的发生消除了异种反应性T细胞，所以经这一途径诱导的耐受比较可靠。但其要求胸腺具有足够多的正常组织使由造血干细胞分化而来的T细胞前体可在其中经过阳性及阴性选择发育成对异种移植物耐受的T细胞[6]。在用胸腺诱导异种移植耐受的研究中，根据胸腺来源可将诱导方法分为两种：一种是在受体胸腺中注射异种抗原（如脾细胞），要求受体胸腺具有正常的结构及功能。临床上，由于年龄的影响，受者胸腺多已萎缩[7]，不能有效地使造血干细胞在其中发育成为有免疫活性的T细胞。另外，有资料表明：在受体胸腺内注射异种抗原并不能有效地诱导受体对异种移植物的耐受[8]。因此，采用这一方法并不适用于临床诱导免疫耐受；另一种方法是采用异种供体胸腺移植，使受体T细胞在其中经过选择产生对异种移植物的耐受。由于结构及功能正常的胎猪或新生猪的胸腺很容易得到，因此后一种用于诱导人对猪异种移植物的耐受更为可行。

2 用猪胸腺移植诱导异种受体对猪源性移植物的研究

采用这一方法，目前在多种品系的小鼠中移植猪源性有功能的胸腺，以使在其中发育成熟的鼠源性T细胞对供体猪抗原或皮肤移植物产生耐受[1,9~11]。最近，又成功地诱导了人T细胞对猪源性异种抗原的耐受[12]。这一成果为在以猪为供体的临床异种器官移植中诱导免疫耐受奠定了基础。

2.1 用于猪异种胸腺移植研究的动物受体

作为异种移植物，猪的胸腺移植不能在有正常免疫力的动物中直接进行，否则异种胸腺移植物会遭到强烈的排斥而不能存活。目前用于猪胸腺移植的动物有普通小鼠[9,10]、缺乏T细胞的无胸腺裸鼠[11]以及T、B细胞均缺乏的SCID小鼠[1,12]。由于胸腺移植一般以组织移植的方式进行，受超急性排斥的影响较小。引起排斥反应的主要因素是T细胞及NK细胞。如以普通小鼠作为受体，一般需在移植前切除胸腺并清除其体内的T细胞及NK细胞；裸鼠及SCID鼠也需在移植前清除其体内的NK细胞。

2.2 胸腺移植物的来源

由于要求胸腺移植物具有正常的结构及功能，猪胸腺移植中多数采用胎猪胸腺[1,9]。但其存在明显的缺点：①胎猪胸腺较小，难以满足大动物如灵长类动物对猪胸腺移植物的要求；②无法使被摘除胸腺的胎猪继续存活，因此无法用其器官（如心、肾）验证其胸腺所诱导的异种移植物耐受。对此，Khan等[11]用新生猪胸腺进行了移植，观察其对T淋巴细胞发育的影响。结果表明：新生猪胸腺同样能够使小鼠T淋巴细胞发育成熟，使其具有对与供体SLA相配的猪源性皮肤移植物耐受以及对同种鼠源性皮肤移植物的排斥反应，但生成的T细胞数量及功能均不如胎猪胸腺中发育成熟者。因此，如能解决以上问题，新生猪胸腺作为异种胸腺移植物的来源是可行的。

2.3 用普通小鼠及裸鼠作为受体的猪胸腺移植

用普通小鼠作为受体类似于在心、肝、肾衰竭的患者中进行的胸腺移植。而用裸鼠作为受体类似于在先天性胸腺发育不全的患者中进行胸腺移植。90年代初，Lee等[9,13]将胎猪

作者介绍：张银甫（1954- ），男，副主任医师，硕士。
主要研究方向：肾脏移植。

维普资讯 http://www.cqvip.com

胸腺在切除了胸腺的B10小鼠肾包膜下，于5～6周后剖腹检查发现在移植的胸腺组织内有大量鼠源性T细胞存在，其数量达到6×10^7，9%～15%为CD_4^+ T细胞，1%～6%为CD_8^+ T细胞。另外，有少量猪源性T细胞共存于胸腺移植物中。移植后7～10周，外周血中可检测到鼠源性CD_4^+ T细胞（>90%）及CD_8^+ T细胞（<10%）存在，但未测到抗猪IgG抗体。胸腺移植物中的T细胞对同种抗原显示正常MLR，而对与其SLA匹配的猪抗原刺激无反应，表明经猪胸腺发育的鼠源性T细胞不仅具有免疫力，而且对猪抗原产生了特异性耐受。以后，Khan等[11]用裸鼠作为受体，将新生猪的胸腺移植在裸鼠肾包膜下，移植后13～14周，外周血中检测到5%的鼠源性CD_4^+ T细胞，个别受体中CD_4^+ T细胞可达20%。皮肤移植结果表明：胸腺移植的小鼠对与供猪SLA匹配的异种皮肤移植物不产生排斥反应，而排斥与供猪SLA不配的异种皮肤移植物并对同种皮肤移植物发生排斥，表明小鼠对猪异种皮肤移植物产生了免疫耐受。以上研究结果证明了用异种胸腺移植诱导受体免疫活性细胞对异种移植物产生耐受的可行性。

2.4 用SCID鼠作为受体的猪胸腺移植

SCID小鼠是一种由于基因缺陷而造成T、B细胞均缺乏的实验动物[14]，是在活体中研究异种或同种移植物相互作用的良好载体。Gritsch 等[11]用SCID鼠作为猪胸腺移植的受体第一次证明了猪的造血干细胞可通过SCID鼠这一载体在猪胸腺移植物内得到良好发育。90年代末，Nikolic等[12]在前述工作的基础上创造性地将胎猪胸腺及人胎肝（作为造血干细胞的来源）同时移植在SCID鼠肾包膜下，13周后发现移植的胸腺由0.5mm × 0.5mm × 1mm增长成25mm × 15mm × 10mm。移植物中大部分细胞（90%）为人源性胸腺细胞，整个猪胸腺移植物内人胸腺细胞数量达2.9×10^8。移植后10周，SCID鼠外周血中出现人源性单阳性T细胞，T细胞亚群CD_4：CD_8为2～4:1，与正常人相似。同时发现有少量猪源性单阳性T细胞与人T细胞共存于外周血中。通过RT-PCR检测猪胸腺中发育的T细胞Vβ链表明TCR是多克隆的，与正常人相同。通过丝裂原刺激及MLR试验检测了在猪胸腺中发育的人T细胞的功能，结果这些T细胞对丝裂原刺激呈现正常反应；对同种抗原呈现正常的MLR；对与胸腺供体MHC相配的异种抗原刺激无反应，而对与胸腺供体MHC不配的异种抗原呈正常的MLR。表明猪胸腺移植诱导了人T细胞对胸腺供体猪抗原的耐受。另外，外源性人RⅡ-2的加入并未逆转这一耐受，表明耐受发生的机制主要是T细胞克隆清除而非无能。

2.5 不同受体中生成免疫活性细胞的差别

在SCID鼠模型中，需同时移植异种胸腺和造血干细胞（与胸腺为同一来源或不同来源）才能使后者在胸腺中分化、发育成为T细胞[1,12]。而在裸鼠或普通小鼠移植模型中胸腺移植可单独进行，也可与造血干细胞同时移植，在这种模型中，经猪胸腺发育的淋巴细胞主要为鼠源性CD_4^+ T细胞。而CD_8^+ T细胞可在胸腺移植物中发育成熟，但很少出现在外周血或淋巴组织中，其原因尚不清楚[15]。

2.6 受体抗感染能力

正常机体中，T细胞的免疫反应包括抗感染的特异性是受机体MHC分子的同源性限制的[16]。而T细胞的MHC限制性由胸腺的MHC决定。据理论上推测，在猪胸腺内发育成熟的异种T细胞应表现出猪源性MHC限制性。在机体本身组织受到病原体感染时，T细胞可因MHC与受感染细胞不同而失去抗感染能力，导致难以控制的致命感染。但实验研究表明：切除胸腺并清除了T细胞的小鼠如接受胎猪胸腺移植，其恢复的小鼠T细胞可表现出良好的小鼠MHC限制性的免疫反应，包括清除肺孢子虫感染的能力[17]。在临床上，对先天性胸腺发育不全的患者施行同种异体胸腺移植，尽管二者MHC存在很大差异，但移植以后随着T细胞功能的恢复，患者复发性感染得到有效控制[18]，说明MHC限制性对同种或异种胸腺移植后T细胞的抗感染能力影响不大。

3 存在的问题及展望

3.1 自身免疫性疾病

有研究表明，异种胸腺移植后，受体在产生对异种供体耐受的同时还可以产生对自体某些器官或组织的自身免疫性反应[19,20]。可能是受体T细胞在异种胸腺发育成具有自身免疫活性细胞，从而导致某些器官或组织的炎症。这些炎症主要发生在甲状腺、泪腺、颌下腺、腮腺及胃。种属差异越大的异种移植所发生的炎症反应越重。

3.2 受体接受异种胸腺移植前免疫抑制的程度

在动物中进行异种胸腺移植前需要用抗体及大剂量全身照射得方法清除受体体内T细胞及NK细胞，容易导致严重的骨髓抑制，因此该方法应用于临床难以被接受。近年在非骨髓抑制的条件下已诱导出同种移植耐受[21]。异种移植中受体免疫抑制预处理更应采取较为安全的方法才能为临床应用所接受。总之，这一研究表明：通过猪胸腺移植，人类造血干细胞可诱导成耐受猪源性异种移植物的临床应用提供了一条可能的途径。这一方法还可用于AIDS及其他先天性免疫缺陷性疾病的治疗。另外，这一在SCID鼠中建立的人与猪细胞共存的模型为研究猪所携带的内源性逆转录病毒及其他病原体是否会传给人体提供了一个较好的体内实验模型。目前，该研究主要在小鼠中进行，不一定能代表临床免疫耐受诱导的情况，今后应在大动物如灵长类动物中进行临床前期研究，进一步了解其临床应用的可行性。

参 考 文 献

[1] Gritsh H A, Glaser R M, Emery D W , et al. The importance of nonimmuce factors in reconstitution by discordant xenogenic hematopoietic cells[J]. Transplantation, 1994;57(6):906-917.

[2] Kroshus T J, Bolman R M Ⅲ , Dalmasso A P, et al.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Expression of human CD59 in transgenic pig organs enhances organ survival in an ex vivo xenogeneic perfudion model[J]. Transplantation, 1996;61(10):1513-1521.

[3] Byrne G W, McCurry K R, Martin M J, et al.Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damager[J]. Transplantation,1997;63(1):149-155.

[4] Gillanders W E, Arima T, Tu F, et al. Evidence for clonal deletion and clonal anergy after intrathymic antigen injection in a transplantation model[J]. Transjplantation, 1997;64(8):1159-1166.

[5] Bercovici N, Delon J, Cambouris C, et al. Chronic intravenous injections of antigen induce and maintain tolerance in T cell receptor-transgenic mice[J]. Eur J Immunol, 1999;29(1):345-354.

[6] Yamada K, Gianello P R, Ierino F L, et al. Role of the thymus in transplantation tolerance in miniature swine. I. Requirement of the thymus for rapid and stable induction of tolerance to class I-mismatched renal allografts[J]. J Exp Med, 1997;186(4):497-506.

[7] Flores K G, Li J, Sempowski G D, et al. Analysis of the human thymus perivascular space during aging[J].J Clin Invest, 1999;104(8):1031-1039.

[8] Tran H M, Patel A , Allen R D, et al. Intrathymic inoculation of donor antigen: An ineffective atrategy for prolonging xenograft survival[J].Xenotransplantation, 1999;6(2):147-154.

[9] Lee L A, Gritsch H A, Sergio J J, et al. Specific tolerance across a discordant xenogenic transplantation barrier[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994;91(23):10864-10867.

[10]Zhao Y, Swenson K, Sergio J J,et al. Skin graft tolerance across a discordant xenogeneic barrier[J]. Nat Med, 1996;2(11):1211-1216.

[11]Khan A ,Sergio J J, Zhao Y, et al. Discordant xenogeneic neonatal thymic transplantation can induce donor-specific tolerance[J] .Transplantation ,1997;63(1):124-131.

[12]Nikolic B, Gardner J P, Scadden D T,et al. Normal development in porcine thymus grafts and specific tolerance of human T cells to porcine donor MHC[J]. J Immunol .1999;162(6):3402-3407.

[13]Lee L A, Gritsch H A ,Arn J S, et al. Induction of tolerance to pig antigens in mice grafted with fetal pig thymus/liver grafts [J]. Transplant Proc,1994;26(3):1300-1301.

[14]Schuler W, Weiler I J,Schuler A, et al. Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency[J]. Cell, 1986;46(7):963-972.

[15]Zhan Y, Barth R N, Swenson K, et al. Functionally and phenothpically mature mouse CD8+ T cells develop in porcine thymus grafts in mice[J]. Xenotransplantation, 1998;5(1):99-104.

[16]Von Boehmer H. Positive selection of lymphocytes[J]. Cell, 1994;76(2):219-239.

[17]Zhao Y, Fishman J A, Sergio J J, et al. Immune restoration by fetal pig thymus grafts in T cell-depleted, thymectomized mice[J]. J Immunol, 1997;158(4):1641-1649.

[18]Markert M L, Kostyu D D, Ward F E, et al. Successful formation of a chimeric human thymus allograft following transplantation of cultured postnatal human thymus[J]. J Immunol , 1997;158(2):998-1005.

[19]Nishigaki-Maki K, Takahashi T, Ohno K, et al. Autoimmune diseases developed in athymic nude mice grafted with embryonic thymus of xenogeneic origin[J]. Eur J Immunol, 1999;29(10):3350-3359.

[20]Ichikawa T, Taguchi O, Takahashi T, et al. Spontaneous development of autoimmune uveoretinitis in nude mice following reconstitution with emvryonic rat thymus[J]. Clin Exp Immunol, 1991;86(1):112-117.

[21]Huang C A, Fuchimoto Y, Scherier-Dolberg R, et al. Stable mixed chimerism and tolerance using a nonmyeloablative preparative regimen in a large-animal mode[J]. J Clin Invest, 2000;105(2):173-181.