

· 菁英述评 ·

本文亮点:

- (1) 阐述了异种猪皮用于创面修复的发展概况及存在的问题。
- (2) 探讨了异种猪皮基因修饰/编辑策略及其在烧伤创面治疗中的应用。

基因工程异种猪皮的发展及其在烧伤创面治疗中的应用研究



段红杰

解放军总医院第四医学中心烧伤整形医学部研究所, 北京 100048

Email: duanhj2009@126.com

【摘要】 近年来, 异体皮来源极度匮乏, 给大面积危重烧伤患者的救治带来了极大挑战。而异种猪皮虽然结构功能与人皮肤相似, 但受免疫排斥反应、猪内源性反转录病毒感染等因素影响, 其临床应用受到限制。随着基因编辑技术的发展, 特别是成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR)/CRISPR 相关蛋白 9 系统的出现, 使一次实施多位点靶基因编辑成为可能, 为异种猪皮治疗烧伤创面带来了广阔的应用前景。该文着重对异种猪皮移植治疗临床烧伤创面的进展、存在问题、基因修饰/编辑策略及其应用研究进行讨论。

【关键词】 烧伤; 生物敷料; 移植, 异种; 基因编辑; 猪皮; 创面修复

基金项目: 军队后勤科研重大项目 (ALB19J001)

Research on the development of genetically engineered xenogenic porcine skin and its application in the treatment of burn wounds

Duan Hongjie

Burn Institute of Department of Burns and Plastic Surgery, the Fourth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Email: duanhj2009@126.com

【Abstract】 In the recent years, the shortage of allo-skin sources has resulted in great challenges for salvage of patients with large area severe burns. Although being similar to human skin in construction and function, the clinical application of xenogenic porcine skin in burn wound management is limited due to factors including immuno-rejection, porcine endogenous retroviruses infection, etc. With the development of gene editing technology, especially

the emerge of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein-9 system, multiple target genes could be possibly edited at the same time, which will bring broad prospect for the application of xenogenic porcine skin in the treatment of burn wounds. The paper mainly discusses the development, the existed barrier, the strategies of gene modification/editing, and the applications and research of xenogenic porcine skin xenografts in the clinical treatment of burn wound.

【Key words】 Burns; Biological dressings; Transplantation, heterologous; Gene editing; Porcine skin; Wound repair

Fund program: Major Program of Military Logistics Research Plan (ALB19J001)

创面是烧伤患者发生一切病理、生理变化的根本原因。烧伤引起的各种病理变化, 如感染、新陈代谢加剧、体温下降、水分和蛋白质大量丢失, 以及内分泌和免疫系统失调等均与皮肤屏障功能的破坏与丧失有关。烧伤治疗的最终目的是使创面愈合, 并尽可能减少瘢痕形成, 达到最佳的外观及功能^[1]。烧伤创面的修复方式取决于受损的面积和深度。迄今为止, 早期切削痂和自体皮移植仍是修复深度烧伤创面的最佳方法^[2]。然而, 大面积烧伤患者自体皮源严重不足, 需要异体皮或异种皮移植以临时封闭创面, 或与自体皮复合移植, 为自体皮修复创面创造条件并赢得时间。近年来, 由于多种原因, 异体皮来源极度匮乏, 临床上甚至已陷入无皮

DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20220419-00146

本文引用格式: 段红杰. 基因工程异种猪皮的发展及其在烧伤创面治疗中的应用研究[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2022, 38(9): 805-809. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20220419-00146.

Duan HJ. Research on the development of genetically engineered xenogenic porcine skin and its application in the treatment of burn wounds[J]. Chin J Burns Wounds, 2022, 38(9): 805-809. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20220419-00146.



可用的境地。由于猪皮的结构功能与人皮肤相似而被广泛用于临床烧伤创面治疗,但存在免疫排斥反应和被猪内源性反转录病毒(porcine endogenous retroviruses, PERV)感染的可能,因而猪皮移植难以满足临床创面治疗的需求。此外,烧伤创面存在的缺血缺氧、炎症、感染、氧化应激等也会对猪皮成活和创面组织再生修复产生影响。近年来,随着基因编辑技术的发展,采用对猪的基因进行修饰/编辑的方法可以减轻免疫排斥反应、改善创面愈合环境,为异种猪皮治疗深度烧伤创面带来新的希望。

1 异种皮治疗烧伤创面的发展概况

17世纪以来,多种来源的异种皮,如猪皮、牛皮、青蛙皮、鸡皮、蜥蜴皮等,都曾被尝试用作临床创面生物敷料^[2]。其中,猪皮由于组织学结构和功能,如黏附性、通气性、胶原结构及含量等方面与人皮肤相似,且易于获取、价格低廉,成为最主要的异种皮来源,被广泛用于临床烧伤创面治疗^[2-4]。异种皮对烧伤创面的作用主要包括以下6个方面^[3,5-6]:(1)提供干净的肉芽组织创面,为自体皮移植创造良好条件;(2)封闭创面,防止水分和蛋白质丢失;(3)作为皮肤屏障,降低创面感染率;(4)保护创面组织中的血管、神经、肌腱等活性组织;(5)减轻疼痛,利于早期康复锻炼;(6)促进创面再上皮化,提高创面愈合率。

然而,猪皮距离理想的功能性生物敷料尚有较大差距。其障碍之一是存在被PERV感染的可能性,但过去数十年来,无论是猪皮的临床应用还是将其应用于非人的灵长类动物实验,均未观察到被PERV感染的发生^[7-8]。因此,创面被PERV感染的风险并不大。还有学者通过基因编辑技术敲除猪PERV基因以期进一步降低被PERV感染的可能,但该技术同时也增加了靶基因突变的可能性^[8-9]。另一个障碍,也是最重要的问题,为免疫排斥反应。以往曾通过脱细胞技术或采用戊二醛处理去除猪皮免疫原性^[10],本研究所之前也曾通过脱细胞技术在保留猪表皮的情况下对其真皮进行选择性脱细胞处理,以期达到既去除猪皮免疫原性又保留其表皮屏障功能的目的^[11]。然而这些处理都会导致猪皮失去活力,使其屏障功能受损且不具备皮肤的免疫、分泌、代谢调节等功能。猪皮移植后出现的凝血功能障碍和受体对移植物的系统性炎症反应也会对猪皮成活时间和功能的发挥产生影响。此外,

猪皮制备技术的规范及质控、可能存在的细菌性感染、医学伦理等因素限制了其应用。近年来,随着基因编辑技术的发展,通过基因修饰/编辑使得去除猪皮免疫原性、调控炎症反应和凝血功能,甚至改善创面微环境并促进创面愈合成为可能。因而,基因编辑技术为异种猪皮应用研究带来了广阔前景。

2 异种皮移植免疫排斥反应

皮肤作为人体最大的器官,包含淋巴细胞、树突状细胞、肥大细胞、巨噬细胞等多种免疫细胞,具有高度免疫原性。树突状细胞是最主要的免疫细胞,而朗格罕细胞是最主要的树突状细胞^[12]。人体免疫系统具有良好防御机制,异种皮被移植到人体后,随着异种皮与创基血运的建立,异种抗原亦逐渐暴露于机体,引起机体中细胞和体液的免疫排斥反应:(1)细胞免疫反应,包含先天性免疫反应和适应性免疫反应,常见免疫细胞有自然杀伤细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、T细胞和B细胞等。异种器官移植后,创面可见自然杀伤细胞和巨噬细胞浸润,自然杀伤细胞可释放溶质颗粒引起内皮细胞损伤;巨噬细胞可由异种T细胞激活,也可通过异种内皮细胞抗原和巨噬细胞表面受体相互作用而激活,释放大炎症介质,引起组织损伤^[13]。移植体表皮中,朗格罕细胞可随受体淋巴管迁入淋巴结。有研究将猪白细胞II型抗原直接或间接递呈给人体T细胞,使CD4⁺T细胞和B细胞均被激活,从而产生免疫排斥反应^[14]。(2)超急性排斥反应,主要由 α -1,3半乳糖基转移酶1(GGTA1)的产物——半乳糖- α -1,3半乳糖引起,可在移植后数分钟至数小时内发生。异种活性抗体与受体 α -半乳糖结合后,补体介导的血管内皮细胞溶解或微血管损伤过程被启动,导致移植体缺血或被排斥,移植物的组织学表现为血管完整性被破坏、水肿、出血、血栓形成,以及广泛抗体和补体终末产物血管沉积^[15-16]。(3)急性排斥反应或延迟排斥反应,主要由胞苷单磷酸-N-乙酰神经氨酸羟化酶的产物——N-乙酰神经氨酸抗原和 β 1,4-N-乙酰半乳糖氨基转移酶产物——Sda抗原引起,发生于移植后1周至数月。机体表现为局部发热、肿痛和移植体功能障碍;局部组织学表现为间质出血、血栓形成、大量IgG和IgM、补体和血小板沉积,以及组织缺血坏死且多形浸润小管缺失^[16-17]。(4)慢性排斥反应,通常发生于移植后数月至数年,且一旦发生,无理想的解决方法。可见,要让猪皮在人

体创面较长时间存活以达到功能性覆盖的目的,就必须解决免疫排斥反应,尤其是超急性和急性排斥反应的问题。

3 基因修饰/编辑技术的发展及应用策略

自从首个克隆羊——多莉诞生以来,大型哺乳动物基因工程技术得到了迅速发展。最早的基因编辑技术是通过微注射方式将转移基因注入受精卵而将目标基因随机插入,即微注射转基因随机整合技术。21世纪初,同源重组和体细胞核转移技术的发展使目标基因插入的随机性降低,但体细胞基因重组效率仍然很低,限制了该2项技术的广泛应用。此后,锌指核酸酶和转录激活因子样效应物核酸酶的出现极大提高了基因重组效率,但过程冗长,资源消耗大,难以普及。2014年,成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR相关蛋白9(Cas9)系统的出现使基因编辑技术出现了革命性变化,该系统在编辑特定靶向DNA时只需要1个短小的单链引导RNA,并允许多个位点被一次有效编辑,实现了高效和高保真基因编辑^[2]。最近的FokI-死亡Cas9(dCas9)技术在dCas9蛋白上附着FokI酶,采用2个dCas9可以实现基因的定位而不剪切,而FokI酶可以行使剪切功能。FokI-dCas9双锚定功能会大大降低CRISPR/Cas9系统的脱靶效应,进而提升靶基因特异性^[18]。而且,基因编辑技术并未改变PERV-A、PERV-B、PERV-C的基因表达水平,因而不会对PERV感染产生影响^[19]。上述基因编辑技术的发展使猪的多基因编辑成为现实,除可进一步降低猪皮异种移植后免疫排斥反应、炎症反应,还可整合组织再生修复调节功能,为猪皮移植修复深度烧伤创面创造良好条件。

为降低异种器官移植后免疫排斥反应,常用的基因修饰/编辑策略包括2个大类:一是敲除、敲低负责表达异种抗原的基因,如 α -半乳糖、N-羟乙酰神经氨酸、Sda、猪白细胞抗原基因或产生这些抗原的酶的基因,使移植物不表达或低表达异种抗原,从而降低受体的免疫排斥反应;二是向供体转入受体的某些基因,如CD46、CD47、CD55、CD59、血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白C受体、血红素加氧酶1等,减轻受体补体激活、凝血和炎症反应^[5,15]。然而,目前猪的多基因编辑仍未成熟,不能完全满足猪器官异种移植的临床需求。此前曾有学者成功地对猪的9个基因进行了编辑,延长了移植器官在受体存

活的时间^[9];最近美国马里兰大学将编辑10个基因的猪心脏移植到人体,患者存活了2个月,成为异种器官移植领域的里程碑^[20]。然而,多位点基因编辑也可能导致移植器官功能不全的现象,如肾脏分泌肾素不足^[21]、移植物抗感染能力下降和非靶基因突变概率增加等^[2,22]。因此,有必要探讨更适合烧伤创面修复的异种猪基因编辑方案,在减轻免疫排斥反应和补体激活的同时,改善创面微环境,调控创面组织再生修复。

4 基因工程异种猪皮的应用研究

4.1 去除猪皮中的异种抗原

由于受体体内存在针对异种抗原 α -半乳糖、N-羟乙酰神经氨酸、Sda的抗体,这些抗体不仅可以激活补体,而且可以促进和增强T细胞活化、效应T细胞反应,从而导致异种免疫排斥反应。 α -半乳糖抗原被认为是引起超急性免疫排斥反应最重要的异种抗原,由GGTA1合成。因此,通过敲除GGTA1基因进而降低 α -半乳糖抗原在猪细胞表面表达是一种有效的方法。Weiner等^[22]和Albritton等^[23]通过体细胞核转移技术对猪GGTA1基因进行了敲除,并将基因编辑的猪皮移植于狒狒全层皮肤缺损创面,猪皮存活了7~13d,而且移植猪皮与狒狒异体皮在外观和功能(水分丢失、感染率等)上并无显著区别^[24]。最近Holzer等^[25]观察到,无病原菌条件可使GGTA1基因敲除猪皮在猴全层皮肤缺损创面中存活21d才开始出现免疫排斥反应,至移植后30d仍未完全排斥。但这种无病原菌条件显然不适合严重烧伤患者,而且仅为个案报道,不具有统计学意义。

N-乙酰氨基葡萄糖转移酶Ⅲ(GnT-Ⅲ)可分解N-链低聚糖的分支,从而产生N-乙酰葡萄糖残基——N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc),而GlcNAc可抑制其他糖基转移酶,如GnT-Ⅳ和GnT-Ⅴ的蛋白修饰作用,进而导致细胞表面抗原的整体表达下调。有学者将GnT-Ⅲ基因转入猪体内,延长了猪皮在食蟹猴全层皮肤缺损创面中的存活时间,移植9d以后创面才出现中性淋巴细胞和嗜酸性粒细胞浸润,且进一步使用免疫抑制剂可延长猪皮存活时间达31d,提示GnT-Ⅲ过表达可降低异种抗原表达,进而减轻免疫排斥反应^[26-27]。

单独敲除 α -半乳糖基因或转入GnT-Ⅲ基因虽可显著减轻超急性排斥反应,但对急性或延迟排斥

反应作用不大,猪皮在创面存活时间仍较短。而且使用免疫抑制剂对免疫功能本就受损的严重烧伤患者而言无疑是雪上加霜,因而无法满足深度烧伤创面临床治疗需求。有必要探讨对多个异种抗原基因进行编辑,以进一步降低免疫排斥反应,延长猪皮在创面的存活时间。

4.2 减轻补体及其他因素介导的免疫损伤

除了去除异种抗原之外,还可通过基因修饰减轻补体介导的免疫损伤。有学者将人补体调节蛋白 *CD55* 基因单独或联合 *GnT-III* 基因转入猪体内,观察到野生型猪皮仅可在食蟹猴全层皮肤缺损创面上存活 3 d,而转基因猪皮可存活 9 d 以上,提示转基因显著减轻了超急性期和急性期的免疫排斥及补体介导的组织损伤^[27]。细胞表面蛋白 *CD47* 与巨噬细胞信号调节蛋白 α 受体的结合可抑制巨噬细胞吞噬功能。为了对抗巨噬细胞吞噬移植的异种皮肤细胞,有研究者将人 *CD47* 基因转入猪体内,或将转入人 *CD47* 基因的猪外周血单核细胞注入狒狒体内形成短暂的异种外周血嵌合体,然后将转基因猪皮移植到狒狒全层皮肤缺损创面以减少皮肤朗格罕细胞迁移入淋巴结,从而延长猪皮在狒狒创面存活时间,结果显示猪皮存活时间最长达 53 d^[28]。此外,血管内皮细胞受补体沉积或抗体作用,会出现血栓性凝血,导致移植物损害和受体凝血因子消耗。因此,有研究者将人血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白 C 受体、组织因子通路抑制剂、*CD39* 等基因转入猪体内,并将转基因猪的器官用于人体心脏或肾脏等器官移植,以期减轻移植物凝血功能障碍,但部分受体会产生针对移植物的系统性炎症反应^[2]。以上结果提示,通过基因修饰减轻猪皮移植后补体激活、凝血障碍、炎症反应等介导的组织损伤,可在一定程度上延长猪皮在创面中的存活时间,但猪基因编辑技术仍未成熟。

4.3 改善创面微环境,促进创面组织再生修复

微环境控制是实现创面完美修复的必由之路^[29]。多基因编辑技术的发展也使将人趋化因子、生长因子等转入异种猪皮,进而改善临床创面局部微环境,促进创面组织再生修复成为可能。基质细胞衍生因子-1(SDF-1)是一种强有力的趋化因子,在皮肤 Fb、内皮细胞中均有表达,可与趋化因子 CXC 受体 4 和 CXC 受体 7 相互作用,在机体的免疫、炎症、胚胎发育、器官发生、肿瘤、获得性免疫缺陷综合征等中发挥重要作用。脂肪间充质干细胞可通

过转基因技术过表达 SDF-1 以促进单核细胞、皮肤干细胞、内皮祖细胞迁移至创面,提高脂肪间充质干细胞再生修复创面的能力^[30]。血小板衍生生长因子(PDGF)有 AA、AB、BB 3 种生理活性形式,其中的 BB 型促进创面组织再生修复能力较强。通过 *PDGF-BB* 基因编辑的小鼠 Fb 不仅可以促进 Fb、内皮细胞、间充质干细胞迁移,还可促进 Fb、表皮细胞、KC 等增殖,以及新生血管形成^[31]。生长因子受限于半衰期短,其临床治疗效果受到影响,通过基因编辑的猪皮可使生长因子在创面局部持续表达,当创面愈合后猪皮脱落,生长因子则停止表达,不会产生瘢痕增生、成瘤等不良反应,因而猪皮基因编辑是一种很有前景的创面修复策略。

5 展望

近年来,基因工程异种猪皮在创面中的应用研究已取得了很大的发展。美国马萨诸塞州总医院已于 2019 年获美国食品药品监督管理局批准,开展基因编辑猪皮用于治疗烧伤创面 I 期临床试验^[32],提示该技术已进入转化应用阶段,具有广阔的前景。然而,猪皮的基因编辑策略和技术尚未成熟,与烧伤创面临床治疗需求还有不小差距。从现有研究报道来看,对猪皮的基因编辑多为单基因或双基因编辑,即敲除或抑制 1 个或 2 个异种抗原基因或转入 1 个或 2 个人补体调节蛋白基因。在不使用免疫抑制剂或其他条件预处理时,基因修饰/编辑猪皮在受体创面存活时间均 ≤ 2 周,其作为创面临时覆盖物尚可接受,但是距离用于大面积烧伤患者较长时间封闭创面,为自体皮源准备和微粒皮等小皮片扩展修复创面争取时间,乃至改善创面愈合微环境、促进组织再生修复的要求还有差距。因此,有必要进一步优化猪的基因编辑方案,除了敲除引起超急性排斥反应和急性排斥反应的异种抗原外,还应兼顾移植后受体补体激活、炎症反应以及创面组织细胞再生修复和微环境调控,以期达到有效封闭创面,促进创面高质量愈合的目的。

利益冲突 作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 柴家科,段红杰,尹会男.烧伤创面愈合[M]//柴家科.实用烧伤外科学.北京:人民军医出版社,2014:197-217.
- [2] Kalsi R, Messner F, Brandacher G. Skin xenotransplantation: technological advances and future directions[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2020,25(5):464-476. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000798.
- [3] Chiu T, Burd A. "Xenograft" dressing in the treatment of burns

- [J]. *Clin Dermatol*, 2005, 23(4): 419-423. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2004.07.027.
- [4] Debeer S, Le Luduec JB, Kaiserlian D, et al. Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin[J]. *Eur J Dermatol*, 2013, 23(4): 456-466. DOI: 10.1684/ejd.2013.2060.
- [5] Yamamoto T, Iwase H, King TW, et al. Skin xenotransplantation: historical review and clinical potential[J]. *Burns*, 2018, 44(7): 1738-1749. DOI: 10.1016/j.burns.2018.02.029.
- [6] Kitala D, Klama-Baryła A, Łabuś W, et al. Porcine transgenic, acellular material as an alternative for human skin[J]. *Transplant Proc*, 2020, 52(7):2218-2222. DOI: 10.1016/j.transproceed.2020.01.125.
- [7] Fishman JA. Infectious disease risks in xenotransplantation[J]. *Am J Transplant*, 2018, 18(8): 1857-1864. DOI: 10.1111/ajt.14725.
- [8] Fishman JA. Prevention of infection in xenotransplantation: designated pathogen-free swine in the safety equation[J]. *Xenotransplantation*, 2020, 27(3): e12595. DOI: 10.1111/xen.12595.
- [9] Cooper D, Hara H, Iwase H, et al. Justification of specific genetic modifications in pigs for clinical organ xenotransplantation[J]. *Xenotransplantation*, 2019, 26(4):e12516. DOI: 10.1111/xen.12516.
- [10] Hermans MH. Porcine xenografts vs. (cryopreserved) allografts in the management of partial thickness burns: is there a clinical difference? [J]. *Burns*, 2014, 40(3): 408-415. DOI: 10.1016/j.burns.2013.08.020.
- [11] Sun T, Han Y, Chai J, et al. Transplantation of microskin autografts with overlaid selectively decellularized split-thickness porcine skin in the repair of deep burn wounds[J]. *J Burn Care Res*, 2011, 32(3): e67-e73. DOI: 10.1097/BCR.0b013e318217f8e2.
- [12] Guttman-Yassky E, Zhou L, Krueger JG. The skin as an immune organ: tolerance versus effector responses and applications to food allergy and hypersensitivity reactions[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 144(2): 362-374. DOI: 10.1016/j.jaci.2019.03.021.
- [13] Matter-Reissmann UB, Forte P, Schneider MK, et al. Xenogeneic human NK cytotoxicity against porcine endothelial cells is perforin/granzyme B dependent and not inhibited by Bcl-2 overexpression[J]. *Xenotransplantation*, 2002, 9(5): 325-337. DOI: 10.1034/j.1399-3089.2002.01074.x.
- [14] 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. DOI: 10.1111/imm.12107.
- [15] Cooper DK, Ezzelarab MB, Hara H, et al. The pathobiology of pig-to-primate xenotransplantation: a historical review[J]. *Xenotransplantation*, 2016, 23(2):83-105. DOI: 10.1111/xen.12219.
- [16] Niu D, Ma X, Yuan T, et al. Porcine genome engineering for xenotransplantation[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 168:229-245. DOI: 10.1016/j.addr.2020.04.001.
- [17] Lu T, Yang B, Wang R, et al. Xenotransplantation: current status in preclinical research[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:3060. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03060.
- [18] Wright AV, Nuñez JK, Doudna JA. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing Nature's toolbox for genome engineering[J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 29-44. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.035.
- [19] Kimsa-Dudek M, Strzalka-Mrozik B, Kimsa MW, et al. Screening pigs for xenotransplantation: expression of porcine endogenous retroviruses in transgenic pig skin[J]. *Transgenic Res*, 2015, 24(3):529-536. DOI: 10.1007/s11248-015-9871-y.
- [20] Deborah Kotz. University of Maryland school of medicine faculty scientists and clinicians perform historic first successful transplant of porcine heart into adult human with end-stage heart disease[EB/OL]. (2022-01-10) [2022-04-19]. <https://www.medschool.umaryland.edu/news/2022/University-of-Maryland-School-of-Medicine-Faculty-Scientists-and-Clinicians-Perform-Historic-First-Successful-Transplant-of-Porcine-Heart-into-Adult-Human-with-End-Stage-Heart-Disease.html>.
- [21] Iwase H, Klein EC, Cooper DK. Physiologic aspects of pig kidney transplantation in nonhuman primates[J]. *Comp Med*, 2018, 68(5):332-340. DOI: 10.30802/AALAS-CM-17-000117.
- [22] Weiner J, Yamada K, Ishikawa Y, et al. Prolonged survival of GalT-KO swine skin on baboons[J]. *Xenotransplantation*, 2010, 17(2):147-152. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2010.00576.x.
- [23] Albritton A, Leonard DA, Leto Barone A, et al. Lack of cross-sensitization between α -1,3-galactosyltransferase knockout porcine and allogeneic skin grafts permits serial grafting[J]. *Transplantation*, 2014, 97(12):1209-1215. DOI: 10.1097/TP.000000000000093.
- [24] Leonard DA, Mallard C, Albritton A, et al. Skin grafts from genetically modified α -1, 3-galactosyltransferase knockout miniature swine: a functional equivalent to allografts[J]. *Burns*, 2017, 43(8):1717-1724. DOI: 10.1016/j.burns.2017.04.026.
- [25] Holzer P, Adkins J, Moulton K, et al. Vital, porcine, gal-knockout skin transplants provide efficacious temporary closure of full-thickness wounds: good laboratory practice-compliant studies in nonhuman primates[J]. *J Burn Care Res*, 2020, 41(2):229-240. DOI: 10.1093/jbcr/irz124.
- [26] Fujita T, Machida K, Matsumoto Y, et al. Cynomolgus monkey did not hyperacutely reject skin xenograft of N-acetylglucosaminyltransferase III gene transgenic pig[J]. *Transplant Proc*, 2003, 35(1):518. DOI: 10.1016/s0041-1345(02)03823-x.
- [27] Fujita T, Miyagawa S, Ezoe K, et al. Skin graft of double transgenic pigs of N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) and DAF (CD55) genes survived in cynomolgus monkey for 31 days[J]. *Transpl Immunol*, 2004, 13(4):259-264. DOI: 10.1016/j.trim.2004.08.001.
- [28] Tena AA, Sachs DH, Mallard C, et al. Prolonged survival of pig skin on baboons after administration of pig cells expressing human CD47[J]. *Transplantation*, 2017, 101(2): 316-321. DOI: 10.1097/TP.0000000000001267.
- [29] 程颺, 付小兵. 微环境控制是实现创面完美修复的必由之路[J]. *中华烧伤杂志*, 2020, 36(11):1003-1008. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20201009-00429.
- [30] Kato T, Khanh VC, Sato K, et al. SDF-1 improves wound healing ability of glucocorticoid-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(2):1010-1017. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.100.
- [31] Barker JC, Barker AD, Bills J, et al. Genome editing of mouse fibroblasts by homologous recombination for sustained secretion of PDGF-B and augmentation of wound healing[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2014, 134(3):389e-401e. DOI: 10.1097/PRS.0000000000000427.
- [32] Massachusetts General Hospital. First application of genetically modified, live-cell, pig skin to a human wound[EB/OL]. (2019-10-11) [2022-04-19]. <https://medicalxpress.com/news/2019-10-application-genetically-live-cell-pig-skin.html>.