

异种移植中的排斥反应及其对策研究进展

解志杰 吴军

随着器官移植技术在临床的广泛应用,同种异基因器官供体远不能满足受体的需要,异种移植有可能解决这一矛盾。非灵长类动物,特别是猪,因其易于饲养,且器官大小及免疫学、生理学特性与人类有一定的相似性,作为最适的异种移植器官供体已日益引起人们的关注^[1,2]。但由于人类和猪两种源间存在巨大的抗原差异,针对异种移植物的免疫应答比对同种移植物的免疫应答更加强烈。本文对近年来有关异种移植排斥机制及其防治策略作一简要回顾。

一、异种移植排斥机制

1. 超急性排斥反应 (hyperacute rejection, HAR): HAR 以血栓形成、出血及异种移植植物破坏为特征,这一系列变化由血管吻合后数小时内出现的内皮细胞激活和损伤、补体沉积、血小板聚集及凝血瀑布反应被激活所引起。在猪-灵长类种源组合中,经典补体途径是引起 HAR 的原因。对表达于众多种属动物糖蛋白上的碳水化合物—— α -1,3-半乳糖表位,天然抗体 (natural antibody, NAb) 均可识别。在人类和旧世纪灵长类动物中,由于编码 α -1,3-半乳糖表位的 α -1,3-半乳糖苷转移酶基因存在缺陷,因此体内始终含有高滴度的抗半乳糖天然抗体^[3]。避免 HAR 的未来策略很可能包括:去除这种特异性的天然抗体,或利用基因处理方法消除供体组织中的表位。

2. 迟发型异种移植排斥反应 (delayed xenotransplantation rejection, DXR): 与 HAR 相同, DXR 也以内皮细胞活化和凝血瀑布反应被激活为特征。非特异性效应细胞,如单核细胞、粒细胞和自然杀伤细胞 (NK), 在 DXR 中起重要作用。细胞因子如 γ -干扰素 (INF- γ)、白细胞介素 (IL)-1 和肿瘤坏死因子 (TNF)- α 也参与了 DXR^[3]。表面蛋白糖基化模式上的种属差异,很可能在激活 NK 及其他参与天然免疫的细胞中起作用。现已经观察到,在条件相似的鼠模型中,宿主 NK 抵抗骨髓异种移植物的作用强于抵抗同种移植植物^[4]。IgG NAb 可通过抗体依

赖性细胞毒性淋巴细胞 (antibody-dependent cytotoxic cell, ADCC), 启动 NK 介导的排斥反应。

3. 急性及慢性异种排斥反应: 主要由 T 细胞介导。尽管早期体外研究表明, T 细胞介导的异种排斥反应与同种排斥反应相比较弱,但最近研究显示,异种排斥反应的强度取决于特定的种属组合^[5]。鼠抗人异种排斥反应减弱可能是由于异种供体和受体间的粘附分子、共受体、细胞因子及协同刺激分子存在巨大差异,致使鼠 T 细胞与人抗原递呈细胞 (APC) 相互作用较困难。但最近关于人和猪种属组合的研究显示,这些增殖性及细胞溶解性异种排斥反应强于同种排斥反应^[5]。

二、异种移植排斥的防治策略

目前的免疫抑制方案可使同种异体移植产生较满意的短期、中期结果。但由于免疫抑制剂的应用可引起诸如感染、肿瘤、器官毒性反应等严重并发症;异种移植排斥反应不易被同种移植中有效的免疫抑制剂所抑制,单纯增加免疫抑制剂的剂量不可能成功完成异种移植,因此,在异种器官移植前诱导供体特异性的耐受,以及利用基因疗法修饰供体器官以减轻其排斥倾向和(/或)增加其耐受原性,现已成为异种移植研究的重点。

1. 供体基因修饰: 在导致器官、组织移植排斥的过程中,起重要作用的是 T 细胞粘附于血管壁及随后迁移至组织中。为了阻止异种移植排斥,供体动物(如猪等)可被基因修饰:(1)表达可阻止或减轻异种排斥的分子,如 Fas 配基,或人补体调节蛋白,诸如同源限制因子 (CD59)、促衰变因子 (DAF) 等。Kroshus 等^[6]建立了转染人 CD59 基因的猪模型。这种动物的心脏、肾脏、大血管及毛细血管的内皮细胞上,都大量表达人 CD59;心脏、肾脏存活期均明显长于对照组。(2)不表达免疫刺激分子如 α -1,3-半乳糖残基、主要组织相容性复合体 (MHC)、血管细胞粘附分子-1 (VCAM-1) 等。Tearle 等^[7]利用基因敲除的方法除去小鼠 α -1,3-半乳糖苷转移酶,使 α -1,3-半乳糖不表达。将此种小鼠的细胞用人血清培养,观察到细胞表面 IgG 和 IgM 较正常小鼠减少 60% 左右,提示靶细胞缺乏 α -1,3-半乳糖表达可

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(30201497)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所、创伤烧伤复合伤国家重点实验室

降低 HAR 程度

2. 建立混合性嵌合体诱导异种移植耐受: 成功建立混合性嵌合体, 必须克服两种障碍, 即生理障碍和免疫障碍⁸。以往研究表明, 对宿主骨髓进行抑制是必要的, 以便创造外源性骨髓移植生长的“空间”。其机制可能包括, 骨髓抑制后创造了生理空间以及上调了造血干细胞因子 (Sharabi 等)⁹。通过对宿主进行条件限制, 建立了混合性嵌合体模型, 足以允许完全同种异基因骨髓移植, 并诱导稳定的混合性同种嵌合体和供体特异性移植耐受。这些条件包括: 利用单克隆抗体 (mAb) 清除受体 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞; 利用 7-Gy 骨髓照射 (thymic irradiation, TI) 清除未被单克隆抗体清除的胸腺细胞; 给予 3-Gy 全身照射 (whole-body irradiation, WBI) 创造造血“空间”。

对这一方案进行改进, 额外给予抗-NK1.1 及抗-Thy1.2 单克隆抗体, 可在协调型 (concordant) 大鼠至小鼠的异种移植中, 诱导混合性嵌合体和供体特异性移植耐受。后者已被显著延长供体特异性大鼠皮肤移植物的存活时间, 以及快速排斥第三方非供体大鼠皮肤移植物所证实。这些结果表明, 与同种骨髓移植相比, NK 和 $\alpha\beta$ TCR⁺ T 细胞在抵抗异种骨髓移植中起更重要的作用¹⁰。利用建立混合性嵌合体的诱导耐受的机制, 主要是通过胸腺内抑制机制来完成。主动抑制和外周无能抑制在维持长期耐受中不起重要作用。Yang 等¹¹的研究表明, 除了 T 细胞耐受外, 混合性造血嵌合体也可有效诱导 B 细胞耐受。

但是, 混合性嵌合体并未显示出跨越非协调型 (discordant) 异种种源障碍诱导供体产生特异性耐受。一个重要的原因是, 在非协调型种源组合中, 很难完成长期、稳定的造血嵌合体。研究显示, 宿主造血细胞强有力的生理优势是供体造血细胞重建的主要限定因素¹²。尽管给予外源性的重组猪 IL-3 或 (和) 粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 及干细胞因子 (stem cell factor, SCF), 可增强猪造血细胞在小鼠中的生长, 但需要每天注射细胞因子; 而且, 这些鼠中的嵌合体水平不能被保持, 骨髓移植 6 周后迅速下降^{12,13}。最近, Chen 等¹⁴建立了表达猪 IL-3、GM-CSF 和 SCF 的转基因小鼠。在这些小鼠中, 内源性生成的供体特异性细胞因子可在猪至小鼠的非协调型异种种源组合中完成长期的造血嵌合体。这一结果表明, 建立生成高水平猪细胞因子或表达造血细胞因子受体的转基因猪, 有望在人体中产

生持久的猪造血生成和维持耐受。

3. 异种胸腺/肝脏移植诱导耐受: 研究表明, 成年胸腺切除小鼠在植入胎猪胸腺/肝脏前接受一定条件处理 (包括 mAbs, 3-Gy WBI 和 7-Gy TI 等), 小鼠 CD4⁺ T 细胞可在胎猪胸腺移植体内正常成熟, 并重新注入外周淋巴组织^{5,15}。这些细胞显示出正常的免疫功能, 包括体内外同种异体反应性, 以及与宿主的主要组织相容复合体 (MHCs) 进行广泛的抗原反应。Zhao 等¹⁶对影响猪胸腺移植体内小鼠 T 细胞活性和阳性选择的因素进行了评价, 认为在这些移植体内猪 MHC 是唯一一对阳性选择起作用的, 被选择的细胞对小鼠 MHCs 有足够的交叉反应性, 因此具有较好的宿主 MHC-依赖的免疫反应力。

最显著的是, 这种猪胸腺/肝脏移植的方法可跨越非协调型猪-小鼠种源障碍, 诱导特异性的 T 细胞耐受。免疫组化染色证实, 移植体内存在具有树突状细胞形状的细胞, 表达高水平的猪 MHC-II 类分子, 这些细胞参与了猪反应性小鼠 T 细胞的阳性选择¹⁶。此外, 在移植体内也检测到具有相似形状的宿主 II 类细胞, 可能对所观察到的针对宿主特异性抗原的排斥耐受起作用。在这些移植体内, 猪和小鼠 APCs 可相互捕获和提呈对方抗原, 因此通过抗原递呈间接途径, 耐受识别供体和宿主抗原的 T 细胞。

三、展望

通过分析宿主抵抗异种移植物的各种因素, 有理由相信, 建立可行的造血方法跨越非协调型异种种源障碍, 诱导供体特异性的 T 细胞和 B 细胞耐受将成为可能。这种耐受不需要长期免疫抑制治疗, 即可避免 HAR 和 DXR 的发生。

参 考 文 献

1. Platt JL. Xenotransplantation: recent progress and current perspectives. *Curr Opin Immunol*, 1996, 8: 721 - 728.
2. Simon AB, Warrens AN, Sykes M. Efficacy of adhesive interactions in pig-to-human xenotransplantation. *Immunol Today*, 1999, 20: 323 - 330.
3. Sykes M. Immunobiology of transplantation. *FASEB J*, 1996, 10: 721 - 730.
4. Sykes M, Lee LA, Sachs DH. Xenograft tolerance. *Immunol Rev*, 1994, 141: 245 - 276.
5. Auchincloss HA. Why is cell-mediated xenograft rejection so strong? *Xenobiotica*, 1995, 3: 19 - 22.
6. Kostus TJ, Bolman RM, Dalmaso AP, et al. Expression of human CD59 in transgenic pig organs enhances organ survival in an ex vivo xenogenic perfusion model. *Transplantation*, 1996, 61: 1513 - 1521.
7. Tearle RG, Tange MJ, Zannettino ZL, et al. The alpha-L,3-galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation. *Transplantation*, 1996, 61: 13 - 19.
8. Sykes M, Zhao Y, Yang YG. Tolerance induction for xenotransplant-

ation. *World J Surg*, 1997, 21: 932 - 938.

9 Sharabi Y, Sachs DH. Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a non-lethal preparative regimen. *J Exp Med*, 1989, 169: 493 - 502.

10 Sharabi Y, Aksemitjevich I, Surtut TM, et al. Specific tolerance induction across a xenogeneic barrier: production of mixed rat-mouse lymphohematopoietic chimeras using a nonlethal preparative regimen. *J Exp Med*, 1990, 172: 195 - 202.

11 Yang YG, Goua E, Oudan H, et al. Tolerization of anti Gal α 1-3Gal natural antibody-forming B cells by induction of mixed chimerism. *J Exp Med*, 1998, 187: 1335 - 1342.

12 Wekerle T, Sykes M. Mixed chimerism as an approach for the induction of transplantation tolerance. *Transplantation*, 1999, 68: 459 - 467.

13 Yang YG, Sergio JJ, Sykes M. Engraftment of discordant xenogeneic swine bone marrow cells in immunodeficient mice. *Xenotransplantation*, 1997, 4: 235 - 240.

14 Chen AM, Zhou Y, Swenson K. Porcine stem cell engraftment and seeding of murine thymus with class II+ cells in mice expressing porcine cytokines: toward tolerance induction across discordant xenogeneic barriers. *Transplantation*, 2000, 69: 2484 - 2490.

15 Zhao Y, Fishman JA, Sergio JJ, et al. Immune restoration by fetal pig thymus grafts in T cell-depleted, thymectomized mice. *J Immunol*, 1997, 158: 1641 - 1649.

16 Zhao Y, Swenson K, Sergio JJ, et al. Skin graft tolerance across a discordant xenogeneic barrier. *Nat Med*, 1996, 2: 1211 - 1216.

17 Zhao Y, Rodriguez Barbosa JJ, Swenson K, et al. The induction of specific pig-skin graft tolerance by grafting with neonatal pig thymus in thymectomized mice. *Transplantation*, 2000, 69: 1447 - 1451.

18 Zhao Y, Swenson K, Sergio JJ, et al. Pig MHC mediates positive selection of mouse CD4+ T cells with a mouse MHC-restricted TCR in pig thymus grafts. *J Immunol*, 1998, 161: 1320 - 1326.

· 收稿日期: 2001-03-30;
· 本文编辑: 罗一勤 ·

· 经验交流 ·

138 例烧伤患者创面病原菌分布及耐药性调查

田宜肥 侯哲 伍新民

临床资料: 138 例烧伤患者, 其中男 92 例, 女 46 例; 成人 79 例, 儿童 59 例; 轻度烧伤 66 例, 中度烧伤 47 例, 重度烧伤 21 例, 特重度烧伤 4 例。采集住院 1 周后患者创面的分泌物, 行细菌培养, 采用药敏试剂纸条 (法国梅里埃生物试剂公司) 和 TBA 自动细菌鉴定及药敏仪进行细菌的鉴定及药敏试验。

结果: 138 例创面分泌物细菌培养中, 101 例有细菌生长, 阳性率为 73.18%, 其中金黄色葡萄球菌 37 例, 占 36.63%; 铜绿假单胞菌 16 例, 占 15.84%; 表皮葡萄球菌 11 例, 占 10.89%; 其他菌株 37 例, 占 36.64%。

细菌株药敏检测结果显示: (1) 金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌对万古霉素、替考拉宁的敏感率为 100%, 对庆大霉素、青霉素的敏感性为 0。(2) 金黄色葡萄球菌对呋喃妥因、利福平、复方新诺明的敏感率达 86.48% ~ 97.29%, 对氨苄西林 + 舒巴坦、环丙沙星、头孢噻吩、哌氟唑酸的敏感率 < 50.00%, 对氯林可霉素、苯唑西林的敏感率约为 40.00%, 对红霉素、四环素、奈替米星的敏感率 > 30.00% 以下。(3) 表皮葡萄球菌对呋喃妥因、氨苄西林 + 舒巴坦的敏感率 > 90.00%, 对头孢噻吩的敏感率 81.81%, 对利福平、复方新诺明的敏感率为 60.00%, 对氯林可霉素、苯唑西林的敏感率在 40.00% 左右, 但对环丙沙星、哌氟唑酸、红霉素、四环素、奈替米星的敏感性比金黄色葡萄球菌更低。(4) 铜绿假单胞菌对多粘菌素 B 的敏感率为 68.75%, 对妥布霉素、阿胺培南、丁胺卡那霉素、头孢他啶、环丙沙星的敏感率为 50.00% ~ 56.25%, 对哌拉西林 + 他唑巴坦、哌拉西林的敏感率为 43.75%, 对头孢噻吩、氨曲南、奈替米星的敏感率为 25.00%, 对庆大霉素、磷霉素、替卡西林 + 棒酸、替

卡西林、复方新诺明等的敏感率 > 20.00%。

讨论 烧伤后体表屏障的破坏以及烧伤毒素对机体免疫系统的损害作用, 使得细菌感染成为烧伤后的常见并发症。而细菌耐药性的产生又为抗感染治疗增加了一定困难, 特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和一些革兰阴性菌的感染, 经常导致抗感染治疗失败, 是患者死亡的主要原因^[1]。因此, 监测烧伤病区细菌株的分布及耐药性的变化, 对指导合理的抗感染治疗具有重要意义。

笔者曾对本单位近 2 年烧伤创面细菌株分布与以往的资料进行对比分析, 观察到它们有一些变化^[2], 其一是细菌培养阳性率有所下降; 其二是金黄色葡萄球菌感染上升为第 1 位, 而铜绿假单胞菌下降至第 2 位, 与文献报道^[3]基本一致, 表皮葡萄球菌仍为第 3 位。

调查结果显示, 细菌株分布发生了相对变化, 但菌株耐药性并无明显变化, 分析原因可能是: (1) 广东省烧伤医学会有效地开展烧伤治疗培训, 使省内各地区烧伤治疗水平普遍提高, 因处理不当, 发生铜绿假单胞菌感染后从外院转入的患者数量减少。(2) 注重烧伤创面的及时处理, 特别是早期的削(切)痂处理和保持创面上燥, 使创面感染机率减少。(3) 病区内阶段性地调整常用抗生素的品种, 降低了细菌产生耐药性的机率。

参 考 文 献

1 肖伟石. 烧伤感染. *中华烧伤杂志*, 2000, 16: 72 - 74.

2 田宜肥, 侯哲, 董敬梅. 107 例烧伤患者创面病原菌耐药性调查. *武警医学*, 2000, 9: 543 - 545.

3 戴宝升, 刘晓红, 唐明春. 1986 ~ 1996 年我院烧伤病原菌和耐药性变迁. *中华烧伤烧伤外科杂志*, 1999, 15: 309 - 312.

· 收稿日期: 2002-07-01;
· 本文编辑: 王旭 ·

作者单位: 510507 广州, 武警广东总队医院烧伤整形外科 (田宜肥), 检验科 (侯哲); 武警广东总队卫生处 (伍新民)