

· 综述 ·

气管异种移植的现状

卢涛 刘愉

【摘要】 气管异种移植目前还处于动物实验阶段,尚不能应用于临床,主要原因是异种气管移植后的免疫排斥问题未能解决,社会伦理学方面还存有争议。移植气管的保存与再血管化也是当前所面临的主要问题。其中,能否解决移植后宿主对气管的免疫排斥是移植成败的关键。该文通过介绍异种气管移植的概况,了解其研究进展及所面临的挑战。

【关键词】 气管; 异种移植; 免疫排斥

General situation of tracheal xenotransplantation Lu Tao, Liu Yu. Department of Thoracic Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China.

Corresponding author: Liu Yu, Email: liu.yu@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】 Tracheal xenotransplantation is still in the stage of animal experiments and has not been used in clinical practice, largely because the problem of immunological rejection following xenotransplantation has not been settled and the ethical dispute is also a controversial issue. The preservation and revascularization of xenografts remain to be solved. The key to success of tracheal xenotransplantation depends on eliminating the immunological rejection. The general situation of tracheal xenotransplantation on its research progress and challenges is introduced in this paper.

【Key words】 Trachea; Xenotransplantation; Immunological rejection

异种移植是将器官、组织或细胞从一个物种的机体内取出,植入另一物种机体内的技术。但随着技术的发展,对这种传统的定义开始出现异议。美国公共卫生署(Public Health Service,PHS)将异种移植从两个方面进行定义:一、将非人动物的活细胞、组织或器官植入或灌注进人类受体;二、或者将人的体液、细胞、组织或器官在体外与活的非人动物的细胞、组织或器官进行接触。此定义包含了在异种移植的所有操作中使用的活质。异种移植指的是异种移植中使用的(人的或非人的)活细胞、组织或器官^[1]。

因为气管本身没有知名血管,气管的血供是分段供给的,血管在气管周围呈丛状分布,使得气管移植时无法通过显微外科直接进行血管吻合来完成移植物的再血管化,因此气管移植属于组织移植^[2-3]。带蒂大网膜包裹移植气管是同种气管移植再血管化的有效方法^[4],具体措施为:先期将气管移植体置于大网膜内,待大网膜的血管长入气管后,再将带蒂大

网膜气管移植到宿主体内,能明显提高移植体的再血管化,并且可以降低移植体的感染率。当前对同种气管移植的研究较异种气管移植多,但同种气管移植仍然处在动物实验阶段,鲜有成果应用于临床,阻碍同种气管移植应用于临床的主要因素在于移植气管的再血管化、有效的免疫抑制及供体气管的保存^[5-6]。Liu等^[3]在不使用免疫抑制剂的条件下可使同种气管移植后存活较长时间。异种气管移植的研究虽然已经有几十年历史,但是研究进展缓慢,相关文献较少,且一部分文献为非英文文献,异种气管移植面临的供体再血管化与免疫排斥的问题及解决方法还不明确,所获得的实验过程以及实验结果的信息也不详尽。气管的主要作用是维持气道通畅,其功能较为单一,且气管移植属于组织移植,而现在大多研究都指向异种器官移植所引起的超急性排斥反应(hyperacute rejection, HAR)和急性血管性排斥反应(acute vascular rejection, AVR)的免疫研究^[7],细胞免疫介导的异种组织移植免疫排斥还未得到深入研究,异种气管移植后引起的免疫排斥反应类型、免疫病理表现和发生机制还不清楚。异种气管移植的研究一方面可缓解当前气管移植供体不

足的问题,另一方面可探索异种组织移植的免疫机制、生理屏障以及解决策略。近 30 年来,科学家做了一些异种动物之间的气管移植实验,现对气管异种移植的相关研究进展做一综述。

一、气管异种移植的概况

1978 年, Scholzel 等^[8]把 12 只杂交狗气管部分切除后,将牛的气管移植到狗气管切除部位,移植后用电子显微镜观测 2~19 个月,随着成纤维细胞和毛细血管生成,移植体管腔内有基膜形成。4~5 个月后基膜被来自气管边缘的微绒毛细胞所覆盖。8 个月后,细胞分化成为纤毛上皮与杯状细胞。尽管管壁再生,纤毛上皮中仍有未分化细胞出现。用来修复狗气管缺陷的牛气管移植体有以下几个优点:完全再生、不萎缩、较少发生感染和可以形成纤毛上皮。1980 年, Lametschwandtner 等^[9]将 7 只 3 个月龄猪的气管部分切除,将人胎儿的气管移植到猪气管切除部位,其中 5 只猪中的移植气管存活良好,未发现喘鸣、呼吸困难、发绀等迹象。移植后 230~273 d 后,将猪全部处死并将移植气管取出,分别用肉眼、光扫描及透射电子显微镜观察,发现移植气管上皮由周围的猪气管上皮重新形成,气管软骨被较厚的结缔组织和瘢痕组织所取代。由此得出两个结论:(1)通过人气管移植来修复猪气管缺损在此类实验有一定的限制性,因新形成的结缔组织不能使气管管腔保持稳定;(2)异种气管移植的表面积在动物实验中限制在 6~7 cm²。1995 年, Fanta 等^[10]将 12 只猪的气管移植到狗身上后检测气管生物相容性。实验开始,先切除 5 cm 狗的胸段气管,在经过特殊处理消除猪气管的抗原性之后,将猪气管缝合到狗气管胸段缺损处。结果 2 只狗于术中死亡,剩余 10 只狗的气管吻合口愈合良好,并观察到气管黏膜固有层的纤维组织被肉芽组织取代。经吻合口新形成的毛细血管长入气管使气管软骨溶解,导致气管中心部分溶解和呼吸道狭窄,最终导致呼吸衰竭。其中一些部位的气管黏膜被化生的上皮所覆盖。此实验对未来研究工作中移植物的缝合有一定借鉴,并且证明新形成的毛细血管可长入移植气管中。2001 年, Kawahara 等^[11]在猪与狗之间进行气管移植,首先将猪和狗的气管冷藏保存 7~14 d,在进行移植前 7 d 将受体狗的脾脏切除。实验过程将 8 只狗的 7 个气管环切除,相应的将 5 个猪气管环移植到狗气管的切除部位,用免疫抑制剂他克莫司减少免疫排

斥反应,然后用支气管镜观察移植植物状态,8~14 d 后移植气管腔由于管壁纤维化而阻塞。但在移植气管中放置支架的对照组中,5 只狗一直保持良好呼吸状态,分别观察了 21、29、57、62 和 95 d,然后将其处死。这个实验表明,气管阻塞性疾病在猪-狗气管异种移植后发展十分迅速,在移植气管中放置支架是处理气管阻塞的可行性治疗手段。气管异种移植的研究大多是免疫机制方面,很少研究移植气管的生物力学特性。为探究猪气管移植的可行性,2009 年, Shi 等^[12]取 15 cm 猪气管后去除其周围相关组织进行研究,观察其弯曲度、支持力、径向力和残余应力。结果发现经过处理的猪气管上的残余应力保留,而当内壁压力增加时可导致猪气管黏膜破裂。因此得出结论:猪气管具有良好的弯曲度、支持力、径向力和延展性。

二、异种气管移植所面临的免疫排斥问题及解决策略

1970 年, Calne 教授将异种移植按供、受体的进化关系分为协调性异种移植和非协调性异种移植^[13]。协调性异种移植是供、受体进化关系较为接近,如非人类灵长类动物与人、大鼠与小鼠、大鼠与仓鼠,其异种移植后的排斥反应程度相对较轻,类似于第一次同种移植免疫排斥反应,其受体存活时间以天为单位进行计算。非协调性异种移植是供、受体进化关系较远,如猪与灵长类动物之间的器官、组织、细胞移植等,其移植后的排斥反应程度相对较重,易发生超急性排斥反应,类似于第二次接触抗原的同种移植免疫排斥反应,若不予免疫抑制治疗,其受体存活时间较短,以分钟或小时为单位进行计算。无论是协调性异种气管移植还是非协调性异种气管移植,都会发生免疫排斥反应,供体气管在免疫排斥的作用下,逐渐发生整个管壁内淋巴细胞浸润、上皮组织坏死脱落、黏膜下结缔组织大量增生,最终出现管腔闭塞的病理结局,即所谓的闭塞性气道疾病 (obstructive airway disease, OAD)^[14]。因此, OAD 发生的免疫机制与如何控制 OAD 的发生和发展引起了科学家研究的兴趣。

Wallgren 等^[15]报道在异种移植排斥反应中主要的浸润细胞是 CD4⁺ 巨噬细胞; Fox 等^[16]认为巨噬细胞是异种移植排斥中的直接作用因素;然而 Elbert 等^[17]研究证明 CD4⁺ T 细胞在移植后 OAD 发生的病理过程中起着主要作用。在任何可识别的

病理损伤发生之前,有不匹配的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) I 类抗原间接递呈和针对这些 MHC 抗原的抗体产生。主要组织相容性抗原和次要组织相容性抗原的不同可以导致动物模型中 OAD 的发生和发展,初步的实验结果预示多肽疫苗接种策略可能会阻止气管异位移植后的 OAD 发生。 $CD4^+$ T 细胞在气管移植失败中起着重要作用,因此诱导受体对异种移植气管的 T 细胞免疫耐受对于移植气管的长期生存可能有效^[18]。虽然目前暂无实验结果证明此方法对延长异种气管移植后的生存期是否有效,但在异种器官移植中证明,切除受体胸腺,再将供体胸腺植入受体体内,胸腺功能恢复过程中会通过阴性选择机制识别异种抗原,并将其认作自身抗原而加以耐受,从而延长异种器官的生存期。目前,以 GTKO 转基因猪为供体的胸腺移植研究正在进行,可望在非人灵长类动物中取得突破^[19]。

经过不断地探索研究,科学家发现用免疫抑制疗法可以保持异种移植气管的形态学特性,应用合适的免疫抑制手段可以延长移植气管的存活时间。Reichenspurner 等^[20]探索研究了仓鼠气管移植到大鼠后发生 OAD 的发病机制和用免疫抑制剂预防阻塞的效果。实验方法是将来自 30 只仓鼠的气管移植到未经处理的 Lewis 大鼠的大网膜上。将气管在移植后的第 1、3、7、14、21 或 28 天取出,然后染色。另外,将 25 只大鼠宿主用环孢素 A、来氟米特或者雷帕霉素处理 14 d 或 21 d,用光学手段和形态测定分析估计呼吸道阻塞的程度,以及观察被呼吸上皮或扁平立方上皮覆盖的管腔以及气管周围细胞炎症的广度和密度。结果显示,黏膜和黏膜下中性粒细胞的渗入从第 1 天直到第 14 天都可观察到,且与气管上皮完全缺失有关,移植气管内混合有浆细胞和嗜酸性粒细胞的单核细胞浸润可在第 7 天和 14 天时明显观察到,以管腔纤维化为特征的气管阻塞从第 14 天开始出现,到第 21 天到达高峰。用来氟米特和雷帕霉素可显著减轻管腔阻塞的严重性,重要的是,来氟米特还可以阻止呼吸上皮的缺失。这个实验证明免疫抑制剂在协调性异种气管移植中可起到预防气管阻塞的作用。那么,在非协调性异种气管移植中使用免疫抑制剂的效果如何呢?研究人员将冷冻保存减少移植体免疫原性与免疫抑制疗法抑制 T 细胞转化两种手段联合应用,可保证非协

调性异种气管移植体的长期可用。Hashimoto 等^[21]评估了经冷冻保存并用短效免疫抑制剂处理后的非协调性异种移植气管解决供体气管短缺的可行性。首先用 14 只豚鼠和 85 只大鼠建造两个异位移植动物模型。用于新鲜移植气管的 FK506 的最小剂量可以确定,异种移植后给予受体动物 FK506 的剂量逐渐增大(0、1.5、2.5 和 3.5 mg/kg),目的是获得异种移植气管的生存率,评估异种移植体冷冻保存的效果。形态学测定评估证明,每天超过 2.5 mg/kg 的 FK506 剂量更有效。更高的 FK506 剂量可能会延迟异种气管移植发生免疫排斥的时间,从而可以在受体大鼠上保持异种移植气管生存能力的时间少于 4 周。在另一个实验中,冷冻保存的异种移植气管比新鲜移植气管表现出较低的活性,但是表现出管腔更为通畅的优势。新鲜的异种移植气管无论使用何种免疫抑制剂,与之相比,冷冻保存的气管的通畅性都可保持更长的时间。这个实验表明,冷冻保存和充足的短效免疫抑制剂共同作用可以使移植气管保持更长时间的活性,延迟发生 OAD 的时间。王林毛等^[22]在小鼠气管异位移植模型试验中证明,环孢素 A 可延缓移植后气道上皮的脱落,可以减轻淋巴细胞的浸润和纤维组织增生,但最终并不能阻止气道阻塞的发生。但是,大量应用免疫抑制剂易导致包括严重感染在内的一系列并发症。Mun 等^[23]利用超顺磁纳米铁颗粒(superparamagnetic iron oxide, SPIO)标记巨噬细胞的归巢特性形成的 MR 图像来诊断异种移植排斥,并监测免疫抑制剂或单克隆抗体的分布以阻止由宿主细胞免疫反应引起的异种移植排斥。

Mukaiida 等^[24]研究表明,气管冷冻后可以抑制异体移植 $CD4^+$ T 淋巴细胞免疫排斥反应。张启旭等^[25]为了探究冷冻保存移植气管对异种移植存活时间的影响,将冷冻保藏的猪气管与新鲜的猪气管分别移植在 SD 小鼠颈部,结果显示冷藏保存的异种移植存活更久。冷藏保存的异种气管最长存活 14 d(平均 13.2 d),新鲜异种气管最长存活 9 d(平均 8 d)。由此推测小鼠体内发生急性免疫排斥反应,抗体 IgM、IgG 和补体 C₃ 沉积在 IFL 监测下表现较为显著, $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞在血液中显著增加。这个实验表明冷藏保存可潜在降低移植气管的抗原性,低抗原性可相对减轻免疫排斥反应,延长异种移植气管的存活时间。

近年来,在同种移植试验中,应用超低温冷冻方法虽然可降低移植物的抗原性,但不能使气管抗原完全失活,反而易使软骨细胞组织无代谢能力,软骨很快被机体吸收,管壁出现塌陷而使移植失败^[26]。Liu 等^[27]将气管表面的上皮及混合腺体去除后再移植可显著降低气管的抗原性。因此,在气管异种移植中也可尝试采用类似的手段来降低移植气管的抗原性,从而减轻宿主对异种气管的排斥反应。需要引起注意的是,异种移植可能会增加人畜共患病的风险,因此,需要伦理、安全和监控准则来控制异种移植的发展^[28]。

综上所述,异种气管移植的研究已有几十年历史,但所有的探索仅限于动物实验阶段,还没有临床应用的先例。异种气管移植虽为组织移植,但和异种器官移植一样,也面临着免疫排斥问题,同时,异种移植所带来的社会伦理问题也非常尖锐,难以解决^[29]。关于异种移植,一直存在很大争议,例如:异种移植是否会改变对人的定义?移植入人体内的异种气管在人体内环境中是否能同样发挥其功能,甚至扰乱人体正常的生理功能?这些问题困扰着异种移植研究的发展,需要在其真正应用于临床前得以解决。但是随着研究的不断深入,异种移植后免疫排斥的分子与免疫学机制将逐渐明了,这为人类异种气管移植后的长期存活提供了的可能性^[30]。

参 考 文 献

- PHS Guideline on Infectious Disease Issues in Xenotransplantation (USA) [R/OL]. [2005-01-15]. <http://www.fda.gov/cber/gdlns/xenophs0101.htm>.
- Nakanoshi R. Revascularization of trachea in lung and tracheal transplantation [J]. Clin Transplant, 2007, 21(5):668-674.
- Liu Y, Nakamura T, Shimizu Y, et al. Tracheal allotransplantation in beagle dogs without immunosuppressants [J]. Ann Thorac Surg, 2001, 72(4):1190-1194.
- 史宏灿, 徐志飞. 气管移植再血管化的研究进展[J]. 国外医学: 外科学分册, 2002, 29(2):99-101.
- 林村河, 刘琨. 气管移植的研究进展[J]. 中国胸心血管外科杂志, 2000, 7(1):51-54.
- Yokomise H, Inui K, Wada H, et al. Reliable cryopreservation of trachea for one month in a new trehalose solution [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1995, 110(2):382-385.
- Vadori M, Cozzi E. The immunological barriers to xenotransplantation [J]. Tissue Antigens, 2015, 86(4):239-253.
- Scholzel E, Petropoulos P, Spycher M, et al. Revitalization of bovine xenograft used for repair of experimental tracheal defects [J]. Thoraxchir Vask Chir, 1978, 26(3):172-176.
- Lametschwandtner A, Staindl O, Tholo S. Experimental heterograft tracheal transplants in animals. III. Light microscopic, scanning and electron microscopic findings [J]. HNO, 1980, 28(2):37-42.
- Fanta J, Pohunková H, Stol M, et al. Tracheal replacement with a swine prosthesis [J]. Rozhl Chir, 1995, 74(5):206-210.
- Kawahara K, Hiratsuka M, Mikami K, et al. Obliterative airway disease and graft stenting in pig-to-dog tracheal xenotransplantation [J]. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 49(1):53-57.
- Shi HC, Deng WJ, Pei C, et al. Biomechanical properties of adult-excised porcine trachea for tracheal xenotransplantation [J]. Xenotransplantation, 2009, 16(3):181-186.
- 窦科峰. 异种移植学[M]//窦科峰, 李俊杰. 异种移植学基本概念. 北京:人民军医出版社, 2014:17-35.
- Reichenspurner H, Girgis RE, Robbins RC, et al. Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation [J]. Ann Thorac Surg, 1995, 60(6):1845-1853.
- Wallgren AC, Karlsson-Parra A, Korsgren O. The main infiltrating cell in xenograft rejection is a CD4⁺ macrophage and not a T lymphocyte [J]. Transplantation, 1995, 60(6):594-601.
- Fox A, Mountford J, Braakhuis A, et al. Innate and adaptive immune responses to nonvascular xenografts: evidence that macrophages are direct effectors of xenograft rejection [J]. J Immunol, 2001, 166(3):2133-2140.
- Kuo E, Maruyama T, Fernandez F, et al. Molecular mechanisms of chronic rejection following transplantation [J]. Immunol Res, 2005, 32(1):179-185.
- Yamada K, Scalea J. Thymic transplantation in pig-to-nonhuman primates for the induction of tolerance across xenogeneic barriers [J]. Methods Mol Biol, 2012, 885:191-212.
- 赵勇, 孙祖玥. 异种胸腺移植: 受者细胞免疫力重建 [J]. 国外医学: 免疫学分册, 2005, 28(5):257-259.
- Reichenspurner H, Soni V, Nitschke M. Obliterative airway disease after heterotopic tracheal xenotransplantation: pathogenesis and prevention using new immunosuppressive agents [J]. Transplantation, 1997, 64(3):373-383.
- Hashimoto M, Nakanishi R. Feasibility of cryopreserved tracheal xenotransplants with the use of short-course immunosuppression [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 121(2):241-248.
- 王林毛, 吴凯, 高文, 等. 异位气管移植模型中上皮细胞的增殖与凋亡 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(18):3288-3292.

- 23 Mun HS, Kang HJ, Lim KH, et al. Graft rejection in the xenogeneic transplantation of mice: diagnosis with *in vivo* MR imaging using the homing trait of macrophages [J]. *Xenotransplantation*, 2008, 15(4):218-224.
- 24 Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, et al. Tracheal allotransplantation after varying terms of cryopreservation [J]. *Transplantation Proceeding*, 1998, 30(7):3397-3400.
- 25 张启旭, 周刚, 王春梅, 等. 非协调性异种气管移植的实验研究[J]. *中华整形外科杂志*, 2006, 22(4):309-313.
- 26 Kushibe K, Tojo T, Sakaguchi H, et al. Effects of warm ischemia and cryopreservation on cartilage viability of tracheal allografts[J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70(6):1876-1879.
- 27 Liu Y, Nakamura T, Yamamoto Y, et al. A new tracheal bioartificial organ: evolution of a tracheal allograft with minimal antigenicity after treatment by detergent[J]. *ASAIO J*, 2000, 46(5):536-539.
- 28 Fiene AE, Mollnes TE. Transplantation from animal to man [J]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 1999, 119(28):4213-4218.
- 29 何秋明, 李幼平, 李胜富. 异种移植社会伦理问题[J]. *中国修复外科学杂志*, 1998, 12(6):363-368.
- 30 Boksa M, Zeyland J, Slomski R, et al. Immune modulation in xenotransplantation [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2015, 63(3):181-192.

(修稿日期:2015-10-09)

(本文编辑:周珠凤)

卢涛, 刘愉. 气管异种移植的现状[J/CD]. *中华胸部外科电子杂志*, 2016, 3(1):51-55.

中华医学会