

遗传修饰方法在克服 Gal 表位介导的异种移植排斥反应中的应用

马映华 郭礼和

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 上海 200031)

器官供体不足是目前移植手术受到限制的一个重要因素,作为解决这一问题的潜在途径,异种器官移植日益受到重视。由于猪的妊娠周期短和产仔率高——更重要的是器官和血管在结构(vasculature)、大小和生理功能等方面与人相近等原因,它被认为是首选器官供体^[1]。然而,带血管的猪器官移植到人体后会迅速被补体介导的损伤(complement-mediated injury)所排斥,这一发生在器官移植后数分钟至数小时的过程称为超急排斥反应(hyperacute rejection/HAR)。HAR的病理变化包括组织间的水肿、出血、弥散性血栓形成和组织缺血性坏死,移植植物最终被排除^[2]。HAR主要由两个因素所致:(1)人血浆中的异种反应性天然抗体(xenoreactive natural antibodies, XNAs)或异种抗体(xenoantibodies)与猪器官血管内皮细胞表面的糖基结构表位结合引发人补体系统的激活;(2)由于补体成分具有种属特异性,猪器官血管内皮细胞表面的补体调节因子(complement regulatory factors, CRFs)不能有效抑制人补体系统的活化^[1-3]。现在已清楚这种糖基结构为半乳糖 $\alpha(1,3)$ 半乳糖,也称 Cal 表位(Gal epitope),XNAs与它特异性的结合是 HAR 的启动因素^[3]。下面简要介绍 Gal 表位遗传修饰策略在异种移植中的应用及其存在的问题。

一、Gal 表位与异种排斥

1. Gal 表位和 XNAs

Gal 表位[Gal $\alpha(1,3)$ Gal]是 XNAs 识别的主要靶抗原,由 $\alpha(1,3)$ 半乳糖基转移酶[Gal $\beta(1,4)$ GlcNAc $\alpha(1,3)$ -galactosyltransferase, $\alpha(1,3)$ GT]在高尔基体内将 UDP-半乳糖的糖基以 $\alpha(1,3)$ 键连接到脂类或蛋白质上的 N-乙酰基乳糖胺的末端而形成^[2]。Gal 表位存在于很多种类的细菌、病毒和寄生虫以及大多数哺乳动物细胞表面,但在人、猿和旧世界猴(Old World monkey)中,由于 $\alpha(1,3)$ GT 基因发生无义突变或移码突变失活而不表达这种糖基结

构^[1,2,4]。作为对携带 Gal $\alpha(1,3)$ Gal 糖基结构的胃肠道菌群和其他致病原的免疫应答结果,人、猿和旧世界猴的新生儿体内就产生了抗-Gal 表位的抗体(XNAs),为这些灵长类预防疾病设置了第一道天然屏障,但对异种移植却造成巨大麻烦。据统计,抗-Gal 表位的抗体约占人-鼠 XNAs 总量的 60% - 70%,而在人-猪 XNAs 中,抗-Gal 抗体则占 80% - 90%^[1,5]。

2. XNAs 在异种排斥中的作用

人血清中的 XNAs 约占 Ig 总量的 1%,达 50 - 100 $\mu\text{g/ml}$ ^[6],包括 IgG、IgM 和 IgA^[2]。其中,抗-Gal 表位的 IgM 被认为是启动 HAR 的关键因素。IgM 与移植植物细胞表面的 Gal 表位结合,引发补体系统的激活,在移植植物内皮细胞膜上形成膜攻击复合物(membrane-attack complex, MAC)导致细胞解体^[7]。除参与 HAR 外,抗-Gal 表位的 XNAs 在非补体依赖性的延缓型异种移植排斥 [delayed xenograft rejection, DXR, 或称急性血管性排斥 (acute vascular rejection, AVR)]中也具有重要作用^[3,7]。IgG 类 XNA 结合移植植物细胞膜表面 Gal 表位后,其 Fc 可作为配体吸引具有 Fc 受体的单核细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞(NK cell)等效应细胞迁移到靶部位,通过称之为抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)途径裂解靶细胞^[7]。另外,XNAs 还可以通过激活内皮细胞或干扰内皮细胞功能等其他途径启动 DXR^[3]。

3. Gal 表位和 XNAs 在异种排斥中重要性的证明

Gal 表位在异种排斥中的重要作用最初为糖类竞争实验所证实,在这一实验中,只有含末端 α -半乳糖残基的糖类能够抑制人 XNAs 对猪内皮细胞的结合^[1,4]。Vaughan 等^[8]用 $\alpha(1,3)$ GT cDNA 转染 COS 细胞(源于旧世界猴,因此不含 Gal 表位)可使其被人血清介导的细胞毒作用裂解;而且,经 $\alpha(1,$

3)GT cDNA 转染的 COS 细胞吸收过的人血清不再具有结合猪内皮细胞的能力。 $\alpha(1,3)$ GT 基因敲除 (Gal knockout, Gal KO) 小鼠的组织 and 细胞显著降低了与人 XNAs 的结合并部分抑制了人补体系统的激活。在离体 (*ex vivo*) 人血清 (6%) 心脏灌注实验中, Gal KO 心脏跳动在灌注 25 ± 4 分钟后降至最大跳动值 (即灌注初始时刻的跳动次数) 的 20%, 但实验全程 (40 分钟) 未低于最大值的 20%; 野生型心脏则在灌注 16 ± 2 分钟后即降到最大值的 20% 以下。这表明 Gal 表位的 KO 心脏部分地克服了 HAR。这一系列实验明确显示了抗-Gal 表位的 XNAs 在 HAR 中的作用。

清除血清中的 XNAs 可阻止急性血管性排斥, 提示 DXR 的发生依赖于 XNAs 的存在。另外, Pearse 等^[4]把野生型小鼠心脏异位移植到含高滴度抗-Gal 表位的 XNAs 的 Gal KO 小鼠 (与人相似——不表达 Gal 表位就会产生抗-Gal 表位的 XNAs) 后 8 - 13 天即被排斥掉, 组织学检查表明被排斥的心脏内有大量淋巴细胞浸润——包括巨噬细胞 (80% - 90%)、NK 细胞 (5% - 10%) 和 T 细胞 (1% - 5%), 这一现象具有 DXR 反应的特征。说明抗-Gal 表位的 XNAs 对克服 HAR 之后的 DXR 的发生也起着重要作用。移植到含低滴度抗-Gal 表位的 XNAs Gal KO 小鼠的野生型心脏存活时间超过 90 天, 提示 DXR 反应强度与抗-Gal 表位的 XNAs 的滴度密切相关。

二、Gal 表位的遗传修饰

1. 背景和现状

克服 HAR 是异种移植成功的关键步骤, 实现这一目标主要是干扰移植受体和供者的排斥功能而实现。基于受者的策略主要抑制 HAR 发生的方法包括: (1) 选择性或非选择性清除 XNAs; (2) 静脉寡糖灌注; (3) 使用可溶性补体抑制因子或抗补体成分抗体; (4) 使用免疫抑制剂如环孢霉素 A、环磷酰胺等。最近, Bracy 等^[9]显示了分子嵌合体 (molecular chimerism) 诱导受体 B 细胞免疫耐受的方法。他们利用逆转录病毒将 $\alpha(1,3)$ GT cDNA 导入 $\alpha(1,3)$ GT 基因敲除小鼠 (与人相似——不表达 Gal 表位但产生抗-Gal 表位的 XNAs) 的骨髓。这样, 表达于髓源细胞表面的 Gal 表位可诱导负责产生抗-Gal 表位的 XNAs 的 B 细胞耐受, 最终停止产生抗-Gal 表位的 XNAs。但这些基于受者的策略所采用的办法却加重了受者的治疗负担 (therapeutic burden), 导

致受体免疫力低下或是使受体失去天然的免疫屏障保护作用 (XNAs), 使其容易被感染。因此, 目前的研究更多的是关注于移植供者的策略。

移植受体移植后, 受者的补体过度激活是导致 HAR 的一个因素, 针对这一方面目前已构建含人补体调节因子 (CRFs)——包括衰变加速因子 (decay accelerating factor, DAF, CD55)、膜辅助因子蛋白 (membrane cofactor protein, MCP, CD46) 和 CD59 的转基因猪^[10,11]。CD46 和 CD55 可加速 C3/C5 转换酶的衰变, CD59 可阻止膜攻击复合体 (C5b-9) 的形成。猪-狒狒异种移植表明, 移植受体表达 CRFs 在很大程度上 (但不完全) 克服了 HAR^[7]。上述实验均旨在用 Gal 表位的遗传修饰, 降低移植受体上的 Gal 表位的表达, 或抑制受体补体的过度激活都可降低 HAR 反应, 这是一个研究热点。

2. $\alpha(1,3)$ GT 基因敲除

上文提到抗-Gal 表位的抗体占人-猪 XNAs 总量的 80% - 90%, 因此消除 Gal 表位是克服异种排斥最直接的办法。合成 Gal 表位的 $\alpha(1,3)$ GT (见 1.1) 属 II 型膜蛋白, 具有一个疏水跨膜锚定序列 (anchor sequence), 锚定序列通过一个柔性躯干区 (stem region) 连接较大的 C-端催化结构域。 $\alpha(1,3)$ GT 在染色体上有一个基因位点, 含 9 个外显子。前 3 个外显子编码 mRNA 5'-端非翻译区 (UTR), 后 6 个外显子为编码区, 其中第 9 个外显子编码酶的催化活性域。外显子 5 和 6 通过选择性剪接 (alternative splicing) 产生 4 种同工型 (isoform) 转录本, 具有不同长度的躯干区, 但都有酶活性^[12]。

Tearle 等^[1]针对外显子 8 和 9 通过同源重组建立了 $\alpha(1,3)$ GT 基因敲除 (Gal KO) 小鼠。Gal KO 小鼠不表达 Gal 表位, 体外 (*in vitro*) 实验证实, 和野生型对照相比, 与 Gal KO 小鼠脾细胞结合的人 XNAs 减少约 60%, 补体活化 (以 C3c 沉积计) 降低 30% - 50%。在离体 (*ex vivo*) 人血清心脏灌注实验中, Gal KO 小鼠心脏也比野生型心脏存活时间长 (见 1.3)。上述结果表明了 Gal 表位在异种排斥中的重要性, 但同时也提示消除 Gal 表位并不能完全克服异种排斥反应。据认为这主要是人血浆中存在抗非-Gal 表位的 XNAs, 这些非抗-Gal 表位的 XNAs 在人-鼠总 XNAs 中占 30% - 40%^[5]。

3. 转基因的方法和问题

(1) Gal 表位合成的酶学竞争抑制 一些糖基转移酶和 $\alpha(1,3)$ GT 具有共同的糖基接受底物——N-乙酰基乳糖胺 (N-lac), 它们可以和 $\alpha(1,3)$

GT相互竞争底物从而抑制Gal表位的合成。这些糖基转移酶包括 $\alpha(2,3)$ -唾液酸基转移酶[$\alpha(2,3)$ -sialyltransferase, $\alpha(2,3)$ ST]、N-乙酰葡萄糖胺基转移酶(N-acetylglucosaminyltransferase III, GnT III)和 $\alpha(1,2)$ 岩藻糖基转移酶[$\alpha(1,2)$ fucosyltransferase, $\alpha(1,2)$ FT]等等。其中对 $\alpha(1,2)$ FT的研究最多,目前已建立了 $\alpha(1,2)$ FT转基因鼠和转基因猪^[13]。 $\alpha(1,2)$ FT把岩藻糖加到它与 $\alpha(1,3)$ GT的共同底物N-lac末端形成H抗原[Fuca(1,2)Gal β]——即人类ABO血型系统的前体分子。 $\alpha(1,2)$ FT转基因鼠Gal表位下降约90%,源自这种动物的组织或细胞的人-鼠异种反应性显著降低,其心脏在人血清离体灌注实验中存活的时间接近Gal KO小鼠心脏^[4,13,14]。

(2) Gal表位的酶学裂解除除 α -半乳糖苷酶(α -galactosidase)可裂解Gal $\alpha(1,3)$ Gal连接寡糖和末端半乳糖基的 α 键。体外实验和转基因动物实验证实,表达 α -半乳糖苷酶的细胞或组织可降低与人血清的反应性,但效果不如表达 $\alpha(1,2)$ FT和 $\alpha(1,3)$ GT基因敲除明显^[14]。共同表达 α -半乳糖苷酶和 $\alpha(1,2)$ FT则可进一步抑制Gal表位的表达。

(3) $\alpha(1,3)$ GT的反义基因抑制 我们实验室通过显微注射把置于CMV启动子下的猪 $\alpha(1,3)$ GT反义cDNA导入小鼠受精卵建立了转基因鼠。与野生型对照相比,转基因鼠多种组织的分离细胞与人血清XNAs的结合降低30%–40%,与补体的结合(以C3c沉积计)降低了30%–50%^[15],表明利用反义基因抑制 $\alpha(1,3)$ GT的表达也是有效降低Gal表位介导的异种反应性的途径之一。

(4) 转基因方法存在的问题 上述各种通过表达转基因消除Gal表位的方法都有其局限性,主要存在下述问题:1)细胞表面糖基化模式改变导致隐蔽抗原(crypt antigen)暴露,这些抗原可能会成为异种排斥的新生诱因。例如,表达 $\alpha(1,2)$ FT使在正常情况下隐含的Tn和Forssman抗原暴露并使另一个新抗原——Lewis^x的表达上调^[16]。表达 α -半乳糖苷酶和反义 $\alpha(1,3)$ GT则暴露了N-lac——这也是导致新XNAs生成的潜在因素^[14][这个问题也存在于 $\alpha(1,3)$ GT基因敲除的动物]。2)上述各种方法都只能部分地消除Gal表位。鉴于抗-Gal表位的XNAs在DXR中的重要作用(见1.2和1.3),移植物即使克服了HAR,但是残留的Gal表位的抗-Gal表位的XNAs仍有可能引发DXR,导致移植物在数天内被摧毁^[4,7]。而且,在移植物Gal表位的

刺激下,受者动物体内抗-Gal表位的XNAs表达量会剧烈增加并产生高亲合力的XNAs(尤其是IgG)——据认为这是慢性异种移植排斥(chronic xenograft rejection)的一个诱因^[7,17]。

4. 组合法

$\alpha(1,3)$ GT基因敲除或表达 $\alpha(1,2)$ FT等转基因方法可以全部或部分地消除Gal表位这一主要靶抗原,但是抗非-Gal表位的XNAs存在使得这些方法并不能完全克服异种排斥反应。表达补体调节因子(CRFs)可以部分地抑制HAR,但不能抑制非补体依赖性DXR的发生。目前许多研究者把上述两种方法结合起来——即同时抑制供者器官Gal表位的表达和受者补体系统的激活^[5,10]。Cowan等^[10]采用离体人血清心脏灌注实验发现,野生型心脏在灌注15分钟后停止跳动;共表达CD55/CD59的心脏灌注60分钟后仍保持有最大活力的10%;共表达CD55/CD59/ $\alpha(1,2)$ FT的心脏以及表达CD55/CD59的Gal KO小鼠心脏则灌注全程都保持在最大活力的20%–30%以上,组织学检查显示沉积于这两种小鼠心脏内皮细胞表面的IgM、C3c和C9显著降低。作者认为这种组合法对心脏的保护作用是因为Gal表位表达下降导致XNAs对血管内皮细胞的结合减少,使随后的补体激活降低到能够被CRFs有效调控的水平。

三、问题和展望

随着对异种排斥机理认识的深入,人们有可能应用遗传工程的办法克服不同阶段的排斥反应并最终实现异种移植,这将不仅能够解决器官供体不足的危机,而且在移植治疗领域具有广泛的应用前景。但是对于异种移植中某些潜在的问题仍需认真评估,例如,存在于猪基因组的内源性逆转录病毒(pig endogenous retroviruses, PERV)是否会伴随移植物传给受者^[2,18]? 另外,通过遗传修饰抑制供者动物Gal表位表达的同时,是否会导致产生不含这种糖基结构的病毒或其他病原体? 这种病原体可逾越人类在进化中获得的天然免疫屏障——抗-Gal表位的XNAs,在理论上更容易对人类造成威胁^[19]。此外,在解决Gal表位所引起的异种排斥反应之后,还必须解决供者血管内皮细胞激活和细胞介导的免疫排斥反应。这些问题得到解决,异种移植才能成为临床应用的现实。

摘 要

本文介绍了Gal表位和异种天然抗体在异种移

植排斥中的作用,综述了目前针对 Gal 表位遗传修饰在异种移植中的研究进展,并分析了这一策略存在的问题及其可能的解决途径。

参 考 文 献

- [1] Tearle RG. , et al. , 1996, *Transplantation* , **61**: 13 - 19.
 [2] Joziassse DH. , et al. , 1999, *Biochem. Biophys. Acta* , **1455**: 403 - 418.
 [3] Platt JL. , et al. , 1999, *Transplant. Proc.* , **31**: 1488 - 1490.
 [4] Pearse MJ. , et al. , 1998, *Transplantation* , **66**: 748 - 754.
 [5] VanDern BJ. , et al. , 1997, *Transplantation* , **64**: 882 - 888.
 [6] Galili U. , et al. , 1984, *J. Exp. Med.* , **160**: 1519 - 1531.
 [7] Galili U. , et al. , 1999, *Transplant. Proc.* , **31**: 940 - 941.
 [8] Vaughan HA. , et al. , 1994, *Transplantation* ; **58**: 879 - 882.
 [9] Bracy JL. , et al. , 1998, *Science* , **281**: 1845 - 1847.
 [10] Cowan PJ. , et al. , 1998, *Transplantation* , **65**: 1599 - 1604.
 [11] Rosengard AM. , et al. , 1995, *Transplantation* , **59**: 1325 - 1333.
 [12] Vanhove B. , et al. , 1997, *Biochem. Biophys. Acta* , **1356**: 1 - 11.
 [13] Sharma A. , et al. , 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **93**: 7190 - 7195.
 [14] Osman N. , et al. , 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **94**: 14677 - 14682.
 [15] Ma YH. , et al. , 2001, *Acta Pharmacol. Sin.* , **22**: 231 - 238.
 [16] Sepp A. , et al. , 1997, *J. Biol. Chem.* **272**: 23104 - 23110.
 [17] Galili U. , et al. , 1997, *Xenotransplantation* , **4**: 127 - 131.
 [18] Rother RP. , et al. , 1996, *Cell* , **86**: 185 - 188.
 [19] Patience C. , et al. , 1997, *Nat. Med.* , **3**: 282 - 286.

T 细胞表位的确定

周 洪

(上海第二医科大学 上海市免疫研究所 上海 200025)

表位(epitope)又称抗原决定簇,是指免疫应答中被特异的效应分子或 T、B 淋巴细胞识别的抗原分子上的特定结构位点。根据识别主体的不同,表位可以分为 B 细胞表位和 T 细胞表位两种。B 细胞表位指免疫球蛋白识别的特定部位;由于抗体所结合的常常是一段具有空间构象的蛋白质结构,B 细胞表位具有一定的空间结构依赖,因此常被称为构象表位(conformation epitope)。T 细胞表位则是指在特异性免疫应答中,抗原经抗原递呈细胞处理后,由 MHC 分子向 T 细胞表面抗原受体(TCR)递呈的线性肽段。T 淋巴细胞识别抗原递呈细胞递呈的抗原肽分子后,在特异性免疫应答的启动和调节中发挥重要的作用。在传染性疾病、自身免疫性疾病、过敏性疾病和肿瘤的免疫治疗中,准确定位抗原肽序列中的 T 细胞表位,将其进行修饰后用于调节人体免疫应答,能够对疾病进行有效的特异性治疗。因此,了解 T 淋巴细胞在免疫应答过程中对抗原特定表位的识别就显得非常必要,本文将就此做一综述。

一、CD4⁺T 细胞表位和 CD8⁺T 细胞表位

T 细胞对抗原的识别主要由 TCR 和 MHC-肽

之间的相互作用来完成^[1], TCR 所识别的是抗原递呈细胞表面的 MHC 分子及其递呈的线状短肽组成的复合物。其中 MHC 分子可以为 MHC I 类或 MHC II 类分子,虽然它们在结构上有诸多类似之处,但在免疫识别过程中所起的作用却是不同的^[2]: MHC I 类分子主要提呈衍生于抗原提呈细胞内部的抗原肽,这些 I 类分子和抗原肽的复合物主要提呈给细胞毒性 T 细胞,在细胞表面的 CD8⁺分子的协同之下被识别;而 MHC II 类分子主要递呈从胞外环境中摄取的抗原,在 CD4⁺分子的协同之下被 Th 识别。因而 Tc 作为杀伤细胞主要识别 I 类分子和抗原肽的复合物,而 Th 则识别 II 类分子和抗原肽的复合物,主要辅助体液免疫应答、Th1 介导的细胞免疫应答和其他效应细胞的作用的发挥。

CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞在功能上存在着差异,它们所识别的表位在结构特性上也有所不同^[2]。MHC I 类分子向 CD8⁺细胞所递呈的抗原肽存在于 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域所形成的沟槽里面,通常为 8-10 肽,最常见为 9 肽(与 MHC 分子结合最为稳定)其抗原结合槽的两端呈封闭状态,N 端和 C 端分别与抗原肽的锚着位点相结合;而 MHC II 类分子抗原结合槽的两端呈开放形式,与 MHC II 类