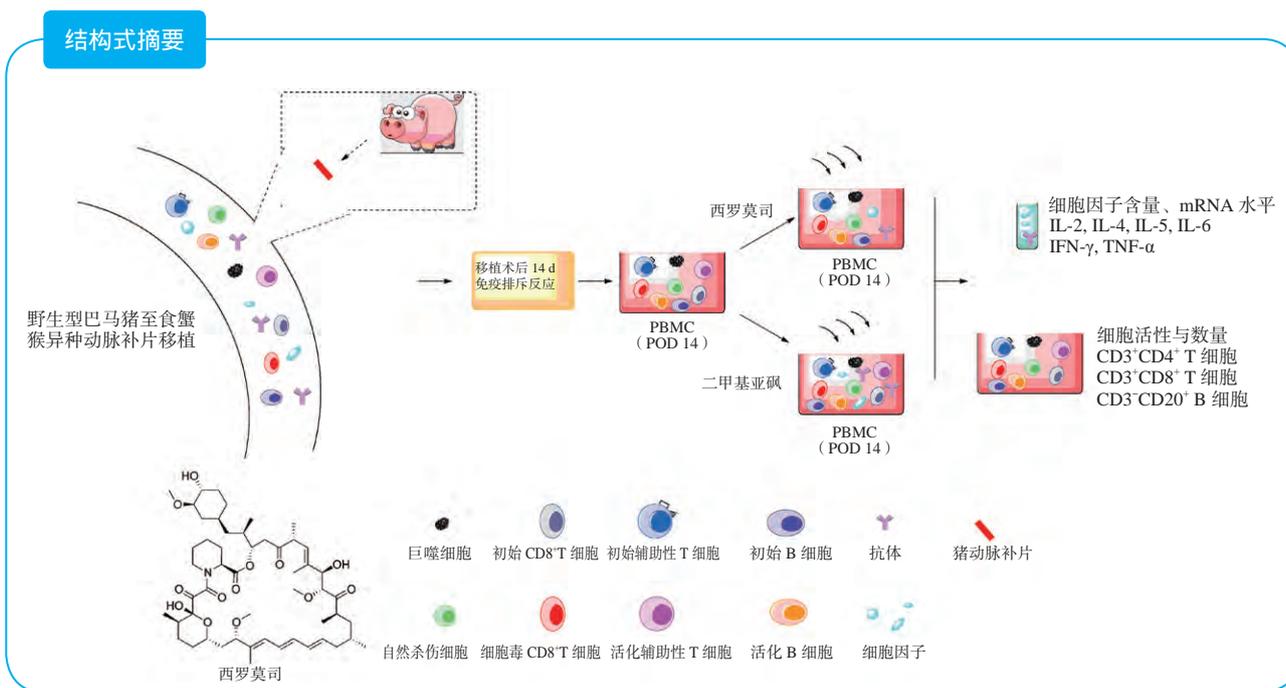


· 实验研究 ·

西罗莫司对异种动脉补片移植后的免疫调节作用研究

张青 周翠冰 王城军 蔡志明 牟丽莎



【摘要】 **目的** 探讨西罗莫司在异种动脉补片移植中的免疫调节作用。**方法** 选择野生型巴马猪至食蟹猴异种动脉补片移植手术后 14 d 受体猴的外周血单核细胞 (POD14) 为研究对象。设置二甲基亚砷 (DMSO) 对照组 (体积比为 1 : 1 000) 和西罗莫司实验组 (终浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$)，分别培养 1.0 d 和 5.5 d，检测 POD14 细胞活性；设置 DMSO 对照组和西罗莫司实验组 (终浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$)，培养 5.5 d，检测 POD14 细胞中 T、B 细胞的数量并检测细胞因子含量和信使核糖核酸 (mRNA) 表达水平。**结果** 与 DMSO 对照组比较，终浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的西罗莫司处理 1.0 d 后，POD14 细胞活性降低 ($P < 0.01 \sim 0.001$)；终浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的西罗莫司处理 POD14 细胞 5.5 d 后，POD14 细胞活性均明显降低 (均为 $P < 0.001$)。与 DMSO 对照组比较，西罗莫司 (终浓度 0.1 $\mu\text{mol/L}$) 降低 POD14 细胞中 CD3⁺CD4⁺ T 细胞和 CD3⁺CD8⁺ T 细胞的数量 ($P < 0.05 \sim 0.01$)，而 CD3⁺CD20⁺B 细胞数量略有升高 ($P < 0.01$)。与 DMSO 对照组比较，西罗莫司实验组的细

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.03.003

基金项目：深圳市医疗卫生三名工程 (SZSM201412020)；深圳市科创委学科布局项目 (JCYJ20160229204849975)；深圳市高水平医学学科建设专项基金 (2016031638)；深圳市科技研发资金基础研究 - 自由探索 (JCYJ20160425104534335)；深圳市科创委企业工程中心项目 (GCZJ2015043017281705)

作者单位：510275 广州，中山大学 (张青、牟丽莎)；深圳市第二人民医院 深圳大学第一附属医院 (张青、周翠冰、王城军、蔡志明、牟丽莎)

作者简介：张青，女，1987 年生，博士，博士后，研究方向为免疫抑制剂，Email: zhangqing7864@163.com

通讯作者：牟丽莎，女，1983 年生，博士，副研究员，研究方向为异种器官移植，Email: molly_molly@163.com

胞因子干扰素 (IFN)- γ 、白细胞介素 (IL)-2、IL-4、IL-5 和 IL-6 含量均明显降低 ($P<0.05\sim 0.001$)；西罗莫司降低细胞因子 IFN- γ 、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、IL-2、IL-4、IL-5 和 IL-6 的 mRNA 表达水平 ($P<0.05\sim 0.001$)。

结论 西罗莫司抑制异种动脉补片移植术后受体猴 POD14 细胞的增殖，主要机制是降低 T 细胞数量和抑制免疫排斥相关细胞因子的表达和分泌。

【关键词】 西罗莫司；异种动脉补片移植；细胞活性；细胞增殖；T 细胞；B 细胞；细胞因子

【中图分类号】 R617, R392.4 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2018) 03-0003-07

Study of immunoregulatory effect of sirolimus on xenotransplantation with arterial patch Zhang Qing*, Zhou Cuibing, Wang Chengjun, Cai Zhiming, Mou Lisha. *Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Corresponding author: Mou Lisha, Email: molly__molly@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the immunoregulatory effect of sirolimus on the xenotransplantation with arterial patch. **Methods** The xenotransplantation of arterial grafts was taken from the wild-type Bama pigs to cynomolgus monkeys. The peripheral blood mononuclear cells of recipient monkeys at 14 days after xenotransplantation (POD14) were selected as subjects. Dimethyl sulphoxide (DMSO) was used in the control group (volume ratio of 1 : 1 000) and sirolimus was administered in the sirolimus experimental group (final concentration of 0.1 $\mu\text{mol/L}$ and 0.5 $\mu\text{mol/L}$). The cells were cultured for 1.0 and 5.5 d, respectively. The activity of POD14 cells was evaluated. The DMSO control and sirolimus experimental groups (final concentration of 0.1 $\mu\text{mol/L}$) were established and cultured for 5.5 d. The quantity of T and B cells in POD14 cells was counted and the expression levels of cytokines and messenger RNA (mRNA) were quantitatively measured. **Results** Compared with the DMSO control group, the activity of POD14 cells was significantly decreased after sirolimus treatment at a final concentration of 0.1 and 0.5 $\mu\text{mol/L}$ for 1.0 d ($P<0.01\sim 0.001$). After sirolimus treatment at a final concentration of 0.1 and 0.5 $\mu\text{mol/L}$ for 5.5 d, the activity of POD14 cells was significantly decreased (both $P<0.001$). Compared with the DMSO control group, the quantity of CD3⁺CD4⁺T cells and CD3⁺CD8⁺T cells in POD14 cells was significantly reduced after sirolimus treatment at a final concentration 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.05\sim 0.01$), whereas the quantity of CD3⁻CD20⁺B cells was considerably elevated ($P<0.01$). Compared with DMSO control group, the levels of interferon(IFN)- γ , interleukin(IL)-2, IL-4, IL-5 and IL-6 in the sirolimus experimental group were significantly down-regulated ($P<0.05\sim 0.001$). The expression levels of IFN- γ , tumor necrosis factor(TNF)- α , IL-2, IL-4, IL-5 and IL-6 mRNA were significantly down-regulated ($P<0.05\sim 0.001$). **Conclusions** Sirolimus inhibits the proliferation of POD14 cells in the recipient monkeys after xenotransplantation with arterial patch. The underlying mechanism is that the sirolimus can reduce the quantity of T cells and suppress the expression and secretion of immune rejection-related cytokines.

【Key words】 Sirolimus; Xenograft arterial patch transplantation; Cell activity; Cell proliferation; T cell; B cell; Cytokine

器官移植是器官衰竭的有效治疗手段，其成功与否受移植器官匹配情况、移植手术和术后免疫排斥反应等的制约^[1]。异种器官移植为解决器官移植中供体器官严重短缺这一障碍提供了解决途径，但免疫排斥制约着异种器官移植患者的长期生存时间和生活质量。西罗莫司（雷帕霉素）是临床上广泛使用的新型大环内酯类免疫抑制剂，主要用于器官移植后的抗免疫排斥反应和自身免疫性疾病的治疗^[2-3]。本研究旨在探讨西罗莫司在异种动脉补片移植模型中对免疫反应的

调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

野生型巴马小型猪 3 只，雌性，2~4 个月龄，体质量 5~10 kg，动脉补片移植手术供体，购自深圳市华大基因公司。食蟹猴 3 只，动脉补片移植手术受体，购买并饲养于广东蓝岛生物技术公司，其中受体 M15001，雄性，2007 年出生，9 岁，体质量 7.5 kg；

受体 M15003, 雄性, 2007 年出生, 9 岁, 体质量 9.0 kg; 受体 M16003, 雌性, 2002 年出生, 14 岁, 体质量 4.0 kg。

西罗莫司购自美国 Selleck 公司。复方氯胺酮注射液购自沈阳市兽药厂。Ficoll-Paque PLUS 购自德国 GE Healthcare 公司。细胞计数试剂盒 (cell counting kit, CCK)-8 购自日本 Dojindo 实验室。植物血凝素 (phytohemagglutinin, PHA) 购自瑞士 Roche 公司。BD™ 细胞计数珠阵列 NHP 辅助性 T 细胞 (helper T cell, Th) 1/Th2 细胞因子试剂盒、藻红蛋白 (PE)-青色素 (cyanine, Cy) 7 标记的抗人 CD4 抗体, PE 标记的抗人 CD8 抗体, 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗人 CD3ε 抗体, 别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 标记的 CD20 均购自美国 BD pharmingen 公司。CellTrace™ CFSE 细胞增殖试剂盒、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 × RPMI-1640 培养基、青霉素-链霉素-谷氨酰胺 (penicillin-streptomycin-glutamine, P/S)、RPMI-1640 培养基均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 野生巴马猪至食蟹猴动脉补片移植手术

复方氯胺酮麻醉野生型巴马猪, 暴露一侧颈动脉, 阻断血流, 取颈动脉约 3 cm, 修剪成约 2.5 cm × 1.0 cm 大小的梭形补片备用。食蟹猴采用氯胺酮全身麻醉, 开腹暴露腹主动脉, 阻断血流, 沿血管方向切开 2 cm 左右的切口, 将取材的猪颈动脉补片连续缝合于食蟹猴腹主动脉切口处, 关腹缝合^[4]。移植术后常规给予抗生素预防感染, 未给予免疫抑制剂。

1.3 外周血单核细胞分离

根据前期研究, 受体猴血清中的 IgG 和 IgM 水平在动脉补片移植术后 14~42 d 明显升高^[4], 因此选择术后 14 d, 从动脉补片移植术后食蟹猴收集的外周血为研究对象, 用传统分离外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 的 Ficoll-Paque PLUS 试剂分离得到移植术后 14 d 的 PBMC (POD14 细胞), 重悬于 RPMI-1640 培养基 (含 10% FBS, 1% P/S) 中。用 RPMI-1640 培养基调整 POD14 细胞为 10⁶/mL, 用 PHA (终浓度为 5 μg/mL) 刺激 POD14 细胞。

1.4 分组

将 POD14 细胞分为二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 对照组 (体积比为 1 : 1 000) 和西罗莫司实验组 (终浓度为 0.1 μmol/L 和 0.5 μmol/L),

37℃、5% CO₂ 培养箱中分别培养 1.0 d 和 5.5 d, 检测 POD14 细胞活性, 每组重复 3 次; 将 POD14 细胞分为 DMSO 对照组 (体积比为 1 : 1 000) 和西罗莫司实验组 (终浓度为 0.1 μmol/L), 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 5.5 d, 检测 POD14 细胞中 T、B 细胞的数量并检测细胞因子含量和信使核糖核酸 (mRNA) 表达水平, 每组重复 3 次。

1.5 细胞活性检测

每孔加入 10 μL CCK-8 检测试剂, 混匀, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h, 测 450 nm 处的吸光度值。每个样品设 3 个重复孔。细胞活性根据如下公式计算: 细胞活性 (%) = (吸光度值_{西罗莫司实验组} - 吸光度值_{背景值}) / (吸光度值_{DMSO 对照组} - 吸光度值_{背景值}) × 100%。

1.6 T 细胞和 B 细胞计数实验

收集 POD14 细胞, PBS 清洗 2 次, 加入 PE-Cy7 抗人 CD4 抗体, PE 抗人 CD8 抗体, FITC 抗人 CD3ε 抗体和 APC 抗人 CD20 抗体, 4℃避光孵育 30 min, FACS 缓冲液清洗。流式细胞仪分析 T、B 细胞的数量。

1.7 细胞因子含量与 mRNA 表达水平检测

收集细胞上清液, 按照 BD™ 细胞计数珠阵列 NHP Th1/Th2 细胞因子试剂盒操作说明准备细胞因子检测样品, 流式细胞仪分析细胞因子干扰素 (IFN)-γ、肿瘤坏死因子 (TNF)-α、白细胞介素 (IL)-2、IL-4、IL-5、IL-6 的平均荧光强度。

收集细胞沉淀, 按照 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒操作说明提取 RNA, PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 操作说明逆转录成互补脱氧核糖核酸 (cDNA), 按照 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒操作说明进行荧光定量聚合酶链反应 (PCR)。mRNA 表达水平以磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参, 按照公式 2^{-ΔΔCT} 计算。PCR 引物序列如下: IFN-γ 正向引物为 5'-TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA-3', 反向引物为 5'-TCCTTTTTTCGCTTCCCTGTTTT-3'; TNF-α 正向引物为 5'-CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT-3', 反向引物为 5'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA-3'; IL-2 正向引物为 5'-AACTCCTGTCTTGCAATTGCAC-3', 反向引物为 5'-GCTCCAGTTGTAGCTGTGTTTT-3'; IL-4 正向引物为 5'-CCAACTGCTTCCCCCTCTG-3', 反向引物为 5'-TCTGTTACGGTCAACTCGGTG-3'; IL-5 正向引物为 5'-TGTCTGGCTGTGCCTATTTCT-3', 反向引物为

5'-GTGTGCCTTGCAACCTTGAG-3'; IL-6 正向引物为 5'-GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA-3', 反向引物为 5'-CTGCAGCCACTGGTTCTGT-3'; GAPDH 正向引物为 5'-GAGTCAACGGATTGGTCGT-3', 反向引物为 5'-TGGAAGATGGTGATGGGATT-3'。

1.8 统计学方法

采用 Graphpad 软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差表示, 比较采用独立样本 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 西罗莫司抑制 POD14 细胞的增殖

西罗莫司 (终浓度 0.1 μmol/L 和 0.5 μmol/L) 孵育 POD14 细胞 1.0 d 和 5.5 d 的细胞活性比较见图 1。结果显示, 与 DMSO 对照组比较, 终浓度为 0.1 μmol/L 和 0.5 μmol/L 的西罗莫司处理 1.0 d 后, POD14 细胞活性降低 (*P*<0.01 ~ 0.001), 说明西罗莫司对 POD14 细胞具有一定的细胞毒性, 但细胞毒

性不强。终浓度为 0.1 μmol/L 和 0.5 μmol/L 的西罗莫司处理 POD14 细胞 5.5 d 后, POD14 细胞活性均明显降低 (均为 *P*<0.001), 提示西罗莫司主要抑制 POD14 细胞的增殖。

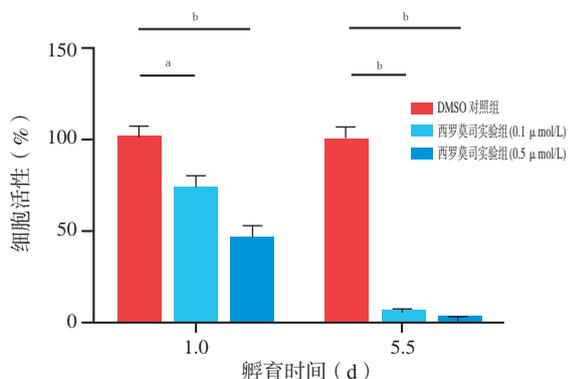
2.2 西罗莫司降低 T 细胞和 B 细胞数量

采用细胞计数实验检测西罗莫司 (终浓度 0.1 μmol/L) 对 POD14 细胞中 T 细胞和 B 细胞数量的影响。通过荧光标记的抗体对 POD14 细胞表面的分子标志物进行免疫标记, 经流式细胞术分析发现, 与 DMSO 对照组比较, 西罗莫司 (终浓度 0.1 μmol/L) 降低 POD14 细胞中 CD3⁺CD4⁺ T 细胞和 CD3⁺CD8⁺ T 细胞的数量 (*P*<0.05 ~ 0.01), 而 CD3⁺CD20⁺ B 细胞数量略有升高 (*P*<0.01), 如图 2 所示。西罗莫司对 T 细胞亚群的影响比 B 细胞更为显著, 说明西罗莫司 (终浓度 0.1 μmol/L) 主要抑制 T 细胞介导的免疫排斥反应。

2.3 西罗莫司对细胞因子含量和 mRNA 表达水平的影响

细胞计数珠阵列用于检测分泌在 POD14 细胞上清液中的细胞因子含量, 结果显示与 DMSO 对照组比较, 西罗莫司实验组的细胞因子 IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-5 和 IL-6 含量均明显降低 (*P*<0.05 ~ 0.001), 其中 IFN-γ、IL-2 和 IL-6 含量降低尤为明显 (图 3A、B)。

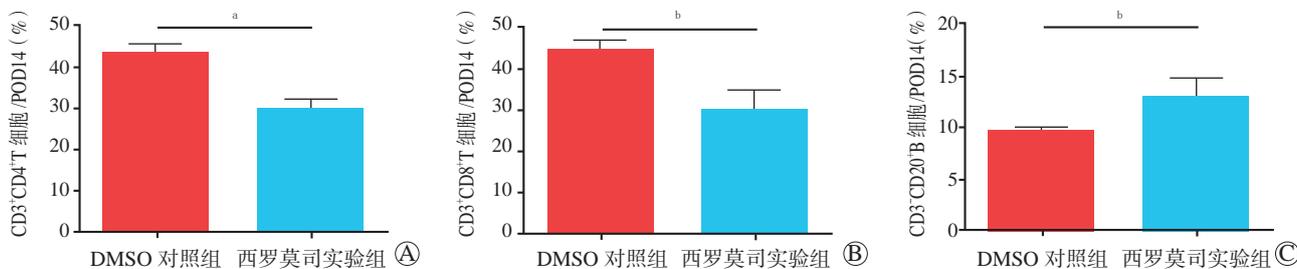
细胞因子 IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-4、IL-5 和 IL-6 的 mRNA 表达水平如图 3C 所示, 西罗莫司均明显降低上述细胞因子的 mRNA 表达水平, 其中细胞因子 IFN-γ、IL-2 和 IL-6 mRNA 表达水平的降低尤其明显 (*P*<0.05 ~ 0.001)。由此说明, 西罗莫司通过调控细胞因子的分泌来调节免疫反应, 西罗莫司对免疫排斥相关细胞因子的影响更为显著。



与 DMSO 对照组比较, ^a*P*<0.01, ^b*P*<0.001

图 1 西罗莫司对 POD14 细胞活性的影响

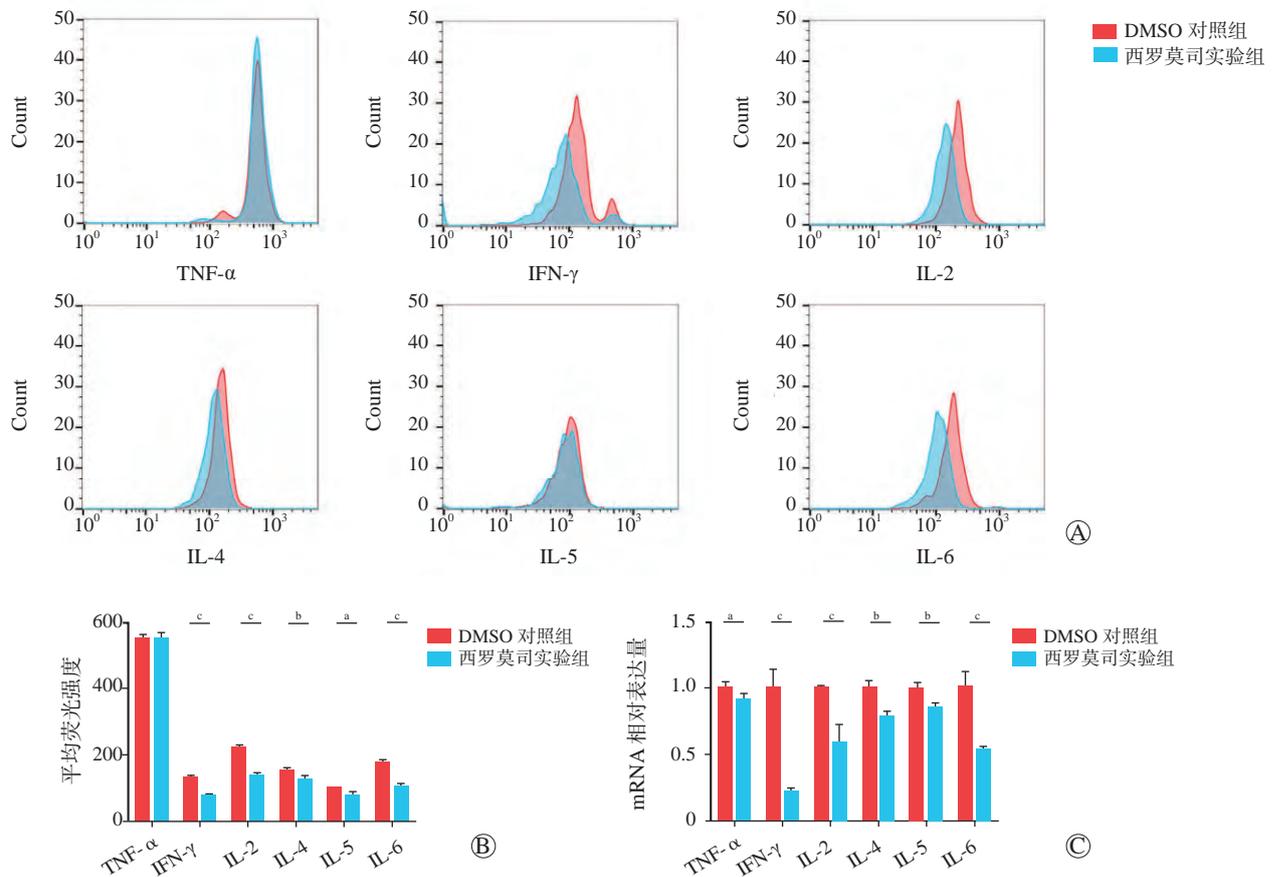
Figure 1 The influence of sirolimus on the cell viability of POD14 cells



与 DMSO 对照组比较, ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01

图 2 西罗莫司对 POD14 细胞中 T 细胞和 B 细胞数量的影响

Figure 2 The influence of sirolimus on the counts of T cells and B cells in POD14 cells



A 图为两组 POD14 细胞因子平均荧光强度的流式细胞图; B 图为两组 POD14 细胞因子含量的比较, 与 DMSO 对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$; C 图为两组 POD14 细胞因子 mRNA 表达水平的比较, 与 DMSO 对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$

图 3 西罗莫司对 POD14 细胞因子的影响

Figure 3 The influence of sirolimus on cytokines in POD 14 cells

3 讨论

异种器官移植的发展为解决供体器官短缺提供了有效的解决思路, 但是异种器官移植成功的关键在于解决移植受体对供体器官的排斥(主要是物种差异)^[5]。基因编辑技术为解决异种器官移植供体和受体物种差异提供了系列解决途径, 如 α -1,3-半乳糖基转移酶基因敲除 (α -1,3-galactosyltransferase gene-knockout, GTKO) 猪^[6]、胞苷单磷酸-N-乙酰神经氨酸羟化酶 (cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, CMAH) 基因敲除猪^[7]、猪内源性逆转录病毒 (porcine endogenous retrovirus, PERVs) 基因敲除猪^[8-9]、GTKO/CD46 双基因修饰猪^[10]、GTKO/CD46/NeuGcKO 基因修饰猪、CMAHKO/GTKO/shTNFR1-Fc/HO-1 基因修饰猪等^[11]。

器官移植术后, 免疫抑制剂仍是抗免疫排斥维持治疗的关键药物^[12]。传统的免疫抑制剂往往面临免疫抑制效果差、感染风险高、易罹患恶性肿瘤、肾毒性、肝毒性等不良反应^[13]。西罗莫司是目前临床上常用的免疫抑制剂, 疗效好、不良反应少、肾毒性小, 是治疗器官移植免疫排斥反应、维持移植器官(尤其是移植肾)功能的常用药物, 其在异种移植中的应用和机制研究鲜有报道。猪至猴异种动脉补片是一种操作简便、易于重复的异种移植动物模型, 不给予免疫抑制剂的情况下, 动脉补片移植受体可保持良好生理状态, 而移植的动脉补片可有效地激活受体的免疫系统, 诱导体液免疫和细胞免疫排斥反应^[14]。异种动脉补片为体内诱导异种免疫排斥反应和活体外筛选免疫抑制剂提供便捷的实验平台。本研究发现西罗莫司可能通过调节 T、B 细胞和细胞因子来发挥抗异种移

植免疫排斥的作用。

前期研究发现,野生巴马猪至食蟹猴的动脉补片移植手术后,受体猴 PBMC 的 IgG 和 IgM 水平在术后 14~42 d 明显升高^[4]。西罗莫司(终浓度为 0.1 μmol/L 和 0.5 μmol/L)显著抑制 POD14 细胞的细胞活性,细胞毒性不明显,提示工作浓度下的西罗莫司在器官移植受体中优于传统免疫抑制剂,严重不良反应少。T 细胞介导的免疫排斥反应和抗体介导的排斥反应是移植物长期生存的主要障碍。本研究中 T 细胞和 B 细胞计数分析表明,西罗莫司在体外降低 CD3⁺CD4⁺ T 细胞和 CD3⁺CD8⁺ T 细胞,提示西罗莫司主要抑制 T 细胞介导的免疫排斥反应。

细胞因子是免疫平衡的关键调节因子,其表达和分泌受到严格的时空和信号调控。器官移植术后细胞因子被认为是强大的调节因子和潜在的免疫应答(免疫排斥和免疫耐受)分子标志物。IL-2、IFN-γ 和 TNF-α 是典型的 Th1 型细胞因子,主要参与免疫排斥反应^[15-16]。据报道,IL-6 参与许多免疫性疾病(如炎症和自身免疫性疾病),并成为有效的治疗靶点^[17-20],且 Th17 细胞和 IL-6 被认为参与器官移植术后免疫排斥反应^[21-23]。在本研究中,西罗莫司降低细胞因子 IFN-γ、IL-2 和 IL-6 的 mRNA 表达水平。尽管西罗莫司不同程度地降低上述细胞因子的 mRNA 水平,分泌到细胞上清液中的细胞因子变化与 mRNA 变化有差异,尤其是 TNF-α,说明西罗莫司不仅影响上述细胞因子的 mRNA 表达水平,同时对其分泌具有一定作用。然而,细胞因子 IL-2、IL-6 和 IFN-γ 的分泌受复杂的免疫调控网络调节,提示除了直接影响细胞因子的分泌,西罗莫司可能对旁路途径中其他调节因子发挥作用。

综上所述,本研究发现西罗莫司具有通过调控 T 细胞和细胞因子发挥免疫抑制的潜力,同时对 PBMC 的细胞毒性微弱。西罗莫司可用于异种器官移植术后抗免疫排斥反应的维持治疗,本实验说明其在异种器官移植的临床应用中具有广阔的前景。

参考文献:

- [1] MARTINS PN, TULLIUS SG, MARKMANN JF. Immunosenescence and immune response in organ transplantation[J]. *Int Rev Immunol*, 2014, 33(3): 162-173. DOI: 10.3109/08830185.2013.829469.
- [2] DE FIJTER JW. Cancer and mTOR inhibitors in transplant recipients[J]. *Transplantation*, 2017, 101(1): 45-55. DOI: 10.1097/TP.0000000000001447.
- [3] LIM WH, ERIS J, KANELIS J, et al. A systematic review of conversion from calcineurin inhibitor to mammalian target of rapamycin inhibitors for maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients[J]. *Am J Transplant*, 2014, 14(9): 2106-2119. DOI: 10.1111/ajt.12795.
- [4] 赵成江, 叶学军, 陈姣, 等. 食蟹猴腹主动脉补片缝合术后的免疫排斥反应监测 [J]. *器官移植*, 2017, 8(2): 127-131. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.02.007.
- [5] ZHAO CJ, YE XJ, CHEN J, et al. Monitoring of immune rejection after abdominal aortic patch suture in cynomolgus monkeys[J]. *Organ Transplant*, 2017, 8(2): 127-131. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.02.007.
- [6] COOPER DKC, PIERSON RN 3RD, HERING BJ, et al. Regulation of clinical xenotransplantation-time for a reappraisal[J]. *Transplantation*, 2017, 101(8): 1766-1769. DOI: 10.1097/TP.0000000000001683.
- [7] PHELPS CJ, KOIKE C, VAUGHT TD, et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs[J]. *Science*, 2003, 299(5605): 411-414.
- [8] KWON DN, LEE K, KANG MJ, et al. Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1981. DOI: 10.1038/srep01981.
- [9] NIU D, WEI HJ, LIN L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2017, 357(6357): 1303-1307. DOI: 10.1126/science.aan4187.
- [10] SCOBIE L, DENNER J, SCHURMAN HJ. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9, editorial commentary[J]. *Xenotransplantation*, 2017, 24(6). DOI: 10.1111/xen.12363.
- [11] COOPER DK, HARA H, EZZELARAB M, et al. The potential of genetically-engineered pigs in providing an alternative source of organs and cells for transplantation[J]. *J Biomed Res*, 2013, 27(4): 249-253. DOI: 10.7555/JBR.27.20130063.
- [12] KIM GA, LEE EM, JIN JX, et al. Generation of CMAHKO/GTKO/shTNFR1-Fc/HO-1 quadruple gene modified pigs[J]. *Transgenic Res*, 2017, 26(4): 435-445. DOI: 10.1007/s11248-017-0021-6.
- [13] HOLT CD. Overview of immunosuppressive therapy in solid organ transplantation[J]. *Anesthesiol Clin*, 2017, 35(3): 365-380. DOI: 10.1016/j.anclin.2017.04.001.
- [14] ILYAS M, COLEGIO OR, KAPLAN B, et al. Cutaneous toxicities from transplantation-related medications[J]. *Am J Transplant*, 2017, 17(11): 2782-2789. DOI: 10.1111/

- ajt.14337.
- [14] EZZELARAB MB, EKSER B, ECHEVERRI G, et al. Costimulation blockade in pig artery patch xenotransplantation - a simple model to monitor the adaptive immune response in nonhuman primates[J]. *Xenotransplantation*, 2012, 19(4): 221-232. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2012.00711.x.
- [15] DALLMAN MJ. Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult[J]. *Curr Opin Immunol*, 1995, 7(5): 632-638.
- [16] NICKERSON P, STEURER W, STEIGER J, et al. Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation[J]. *Curr Opin Immunol*, 1994, 6(5): 757-764.
- [17] ROSSI JF, LU ZY, JOURDAN M, et al. Interleukin-6 as a therapeutic target[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(6): 1248-1257. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2291.
- [18] ZHANG W, HE J. Interleukin-6 is a key factor for immunoglobulin-like transcript-4-mediated immune injury in sepsis[J]. *J Intensive Care*, 2018, 6:22. DOI: 10.1186/s40560-018-0294-8.
- [19] CHAE MS, MOON KU, CHUNG HS, et al. Serum interleukin-6 and tumor necrosis factor- α are associated with early graft regeneration after living donor liver transplantation[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195262. DOI: 10.1371/journal.pone.0195262.
- [20] VALPIONE S, PASQUALI S, CAMPANA LG, et al. Sex and interleukin-6 are prognostic factors for autoimmune toxicity following treatment with anti-CTLA4 blockade[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 94. DOI: 10.1186/s12967-018-1467-x.
- [21] GOMEZ-RODRIGUEZ J, WOHLFERT EA, HANDON R, et al. Itk-mediated integration of T cell receptor and cytokine signaling regulates the balance between Th17 and regulatory T cells[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(3): 529-543. DOI: 10.1084/jem.20131459.
- [22] NAKAGIRI T, INOUE M, MINAMI M, et al. Immunology mini-review: the basics of T(H)17 and interleukin-6 in transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2012, 44(4): 1035-1040. DOI: 10.1016/j.transproceed.2011.12.032.
- [23] 秦建杰, 吕凌. 白细胞介素 17 在器官移植排斥中的作用及机制 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2012, 28(11): 812-814.
- QIN JJ, LYU L. The role and molecular mechanism of interleukin-17 in organ transplant rejection[J]. *J Clin Hepatol*, 2012,28(11): 812-814.

(收稿日期: 2018-02-10)

(本文编辑: 邬加佳 吴秋玲)