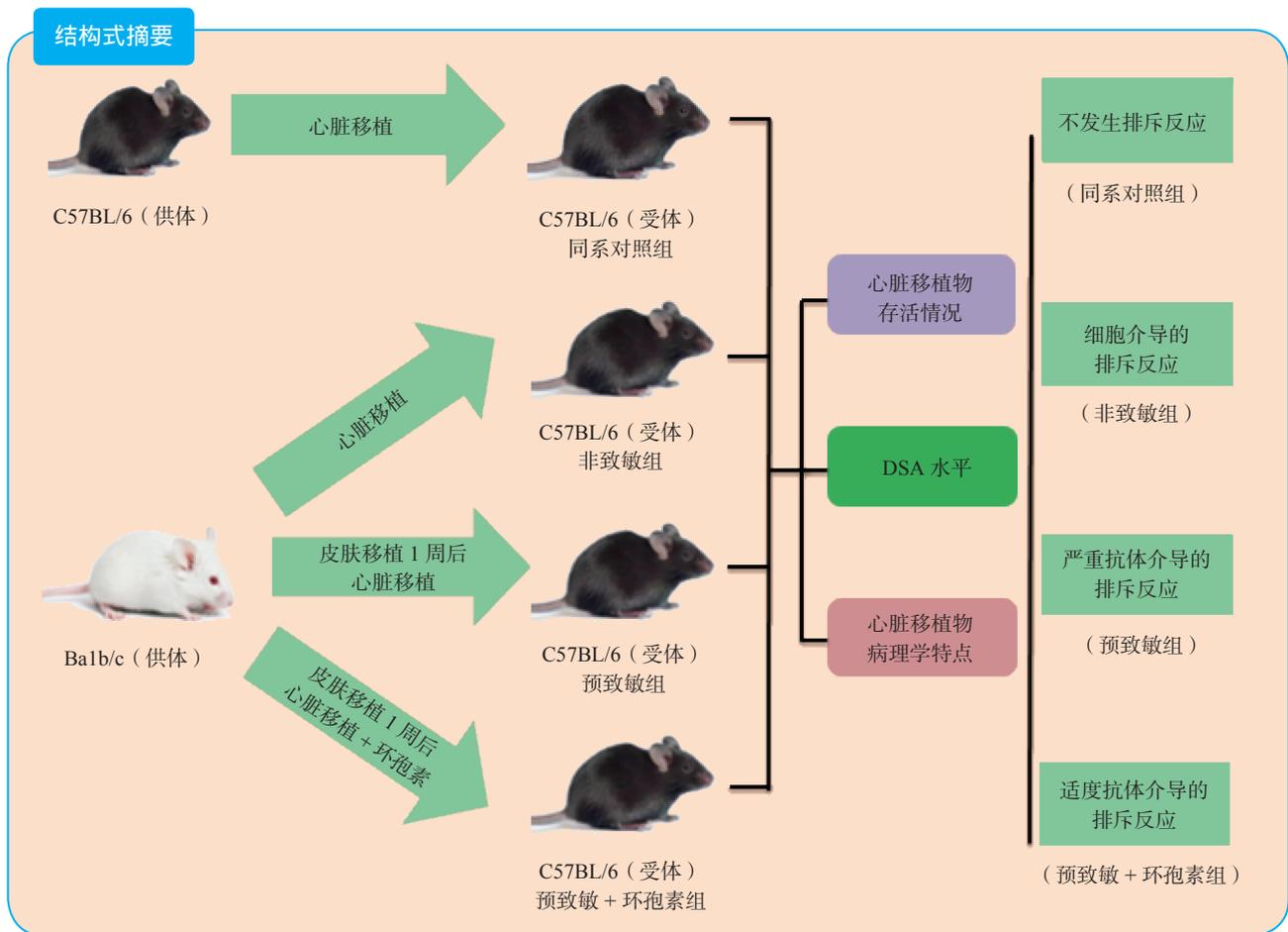


· 论著 ·

小鼠心脏移植急性抗体介导的排斥反应模型的建立和分析

廖涛 杨哲 张燕楠 韩飞 孙启全



【摘要】 目的 建立小鼠心脏移植急性抗体介导的排斥反应 (AMR) 模型并分析其特点。方法 建立小鼠皮肤移植和心脏移植模型。根据处理方法不同分为同系对照组、非致敏组、预致敏组和预致敏 + 环孢素组 (每组供、受体各 9 只)。观察各组移植存活时间、供体特异性抗体 (DSA) 水平和病理学表现, 分析其排斥反应的特点。结果 同系对照组小鼠心脏移植在 3 个月观察期内均长期存活, 非致敏组、预致敏组和预致敏 + 环孢素组心

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2020.03.007

基金项目: 国家自然科学基金 (81800663、81770753); 广东省基础与应用基础研究基金 (2019A1515011942)

作者单位: 510630 广州, 中山大学附属第三医院肾移植科

作者简介: 廖涛, 男, 1989 年生, 硕士, 住院医师, 研究方向为移植免疫, Email: liaot@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 孙启全, 男, 1973 年生, 博士, 教授, 研究方向为移植免疫, Email: sunqiq@mail.sysu.edu.cn

脏移植存活时间分别为(7.0±0.7) d、(2.6±0.5) d和(5.0±0.7) d, 组间比较差异均有统计学意义(均为 $P<0.01$)。预致敏组在心脏移植术后3 d、预致敏+环孢素组在心脏移植术后5 d DSA水平均较基础值显著升高, 差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。非致敏组病理学表现为心肌细胞破坏, 形成间质炎, C4d少量沉积, CD3细胞大量浸润; 预致敏组和预致敏+环孢素组病理学表现为心肌细胞破坏, 形成毛细血管炎, C4d大量沉积, 但是前者CD3细胞浸润多于后者。**结论** 利用不同品系间小鼠皮肤移植和心脏移植的基础上加用环孢素可成功建立实用性强的鼠心脏移植急性AMR模型, 为后续AMR的发病机制和干预研究提供基础。

【关键词】 抗体介导的排斥反应; 细胞介导的排斥反应; 心脏移植; 动物模型; 供体特异性抗体; C4d; 环孢素

【中图分类号】 R617, R392.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445(2020)03-0007-07

Establishment and analysis of mouse model of acute antibody-mediated rejection in heart transplantation Liao Tao, Yang Zhe, Zhang Yannan, Han Fei, Sun Qiquan. Department of Renal Transplantation, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author: Sun Qiquan, Email: sunqiq@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of acute antibody-mediated rejection (AMR) in heart transplantation and to analyze its characteristics. **Methods** Mouse models of heart transplantation and skin transplantation were established. According to different treatment methods, all animals were divided into the homologous control group, non-sensitized group, pre-sensitized group and pre-sensitized+ciclosporin group (9 donors and 9 recipients in each group). The graft survival time, donor-specific antibody (DSA) level and pathological manifestations of each group were observed, and the characteristics of rejection were analyzed. **Results** In the homologous control group, the cardiac grafts of the mice survived for a long period of time during the 3-month observation period. The survival time of the cardiac grafts in the non-sensitized group, pre-sensitized group and pre-sensitized+ciclosporin group was (7.0±0.7) d, (2.6±0.5) d and (5.0±0.7) d, respectively. The differences among the groups were statistically significant (all $P<0.01$). The DSA level in the pre-sensitized group was significantly elevated than the baseline level at 3 d after heart transplantation, and that in the pre-sensitized+ciclosporin group was remarkably up-regulated at 5 d after heart transplantation, the differences were statistically significant ($P<0.05$, $P<0.01$). The pathological manifestation of the non-sensitized group was the myocardial cell destruction, the formation of interstitial inflammation, mild C4d deposition and a large amount of CD3 cell infiltration. The pathological manifestations of the pre-sensitized group and the pre-sensitized+ciclosporin group showed myocardial cell destruction, capillary inflammation and a large amount of C4d deposition, whereas the amount of CD3 cell infiltration in the pre-sensitized group was more than that in the pre-sensitized+ciclosporin group. **Conclusions** The use of ciclosporin on the basis of heart transplantation and skin transplantation between different strains of mice can successfully establish a practical acute AMR model in mouse heart transplantation, which provides the basis for subsequent AMR pathogenesis and intervention research.

【Key words】 Antibody-mediated rejection; Cell-mediated rejection; Heart transplantation; Animal model; Donor specific antibody; C4d; Ciclosporin

在过去的40多年, 心脏移植在治疗终末期心脏疾病方面取得了重大的成功。然而, 移植术后排斥反应仍然是影响移植效果的主要因素^[1-2]。随着免疫抑制剂的发展, 细胞介导的排斥反应(cell-mediated rejection, CMR)已经得到很好的控制; 然而, 抗体介导的排斥反应(antibody-mediated rejection, AMR)发生率仍较高, 是目前导致移植失功的重

要因素^[3-6]。

疾病的基础研究依赖动物模型, 目前对于心脏移植排斥反应动物模型的建立方法主要为利用不同品系的小鼠进行心脏移植, 该模型在移植早期主要表现为CMR, 利用药物干预后随着存活时间的延长会出现AMR和慢性排斥反应^[7-11]。对于心脏移植急性AMR动物模型的建立研究较少, 本课题组前期的研究利

用不同品系的大鼠在皮肤移植后行心脏移植,建立了大鼠心脏移植 AMR 模型并连续分析了其特点^[12],但是小鼠心脏移植急性 AMR 的模型笔者未见报道。我们在小鼠 AMR 模型的建立方面有丰富的经验,前期利用不同品系间小鼠皮肤移植预致敏后行肾移植建立了小鼠肾移植 AMR 模型,并利用该模型进行了一系列研究^[13-15]。本研究中,我们利用不同品系间小鼠皮肤移植后行心脏移植,旨在建立小鼠心脏移植急性 AMR 模型并进行分析。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂与手术设备

雄性 Balb/c (H-2d) 小鼠 27 只, 雄性 C57BL/6 (H-2b) 小鼠 45 只, 6~8 周龄, 体质量 20~25 g, 均为无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 饲养于华南农业大学实验动物中心 SPF 级小鼠室。

主要试剂包括环孢素注射液 (瑞士诺华制药有限公司), 山羊抗小鼠 IgG 抗体、CD3 抗体 (英国 Abcam 公司), 山羊抗小鼠 IgM 抗体 (Jackson 免疫研究实验室, 115-297-020), C4d 抗体 (荷兰 Hycult Biotech 公司)。

手术设备主要包括连续变焦双面体视手术显微镜 (型号 TS-39NK, 镜头尼康 SMZ745, 北京中天光正科技有限公司)、流式细胞仪 (型号 BD FACSCalibur, 美国 Becton Dickinson 公司)、小动物气体麻醉系统 (型号 ZH-MZJ, 安徽正华生物仪器设备有限公司)、可控数显恒温手术台 (分体式定制, 深圳市帆与航电子科技有限公司) 和整套显微手术器械 (广州器化医疗设备有限公司)。

1.2 实验分组与手术方法

根据处理方法不同, 将 72 只小鼠分为 4 组 (每组供、受体各 9 只): (1) 同系对照组, 以 C57BL/6 小鼠为供、受体建立 C57BL/6 → C57BL/6 心脏移植模型; (2) 非致敏组, 以 Balb/c 小鼠为供体, C57BL/6 小鼠为受体建立 Balb/c → C57BL/6 心脏移植模型; (3) 预致敏组, 以 Balb/c 小鼠为供体, C57BL/6 小鼠为受体进行皮肤移植 1 周后行心脏移植; (4) 预致敏 + 环孢素组, 以 Balb/c 小鼠为供体, C57BL/6 小鼠为受体进行皮肤移植 1 周后行心脏移植并加用环孢素, 皮下注射环孢素注射液 20 mg/(kg·d), 从皮肤移植当日使用至移植失功

或移植物标本获取。

皮肤移植取自供体尾部, 缝合于受体背部。心脏移植手术: 供体正中腹部剪开, 暴露下腔静脉后肝素化, 剪开胸腔, 暴露心脏, 离断主动脉和肺动脉主干, 其余血管结扎, 取出供心后保存。受体小鼠腹部行正中切口, 显露并游离腹主动脉和下腔静脉后阻断, 供体主动脉与受体腹主动脉行端侧吻合, 供体肺动脉与受体下腔静脉行端侧吻合。开放血管夹后, 可见心脏立即充血后开始跳动, 手术成功。所有手术操作均在 SPF 级小动物手术室进行, 手术全程采用异氟烷诱导及维持麻醉, 手术台 36 °C 恒温, 在显微镜下采用标准显微操作技术。

1.3 心脏移植物存活情况观察

术后每日通过直视和触诊检查心脏移植物的搏动情况, 必要时可以将小鼠麻醉后切开皮肤判断心脏移植物的搏动情况, 心脏完全停止搏动为移植心脏失功, 记录移植心脏的存活时间。

1.4 供体特异性抗体水平检测

于皮肤移植或心脏移植前获取受体小鼠血标本, 作为检测供体特异性抗体 (donor specific antibody, DSA) 的基础值。同系对照组、非致敏组、预致敏组和预致敏 + 环孢素组分别在心脏移植术后 5、5、3、5 d 再次获取血标本, 获取方法为眼球取血, 离心后获取血清。DSA 检测采用流式细胞术, 取受体小鼠血清, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 稀释 10 倍后, 与供体小鼠脾细胞 37 °C 下共孵育 30 min。细胞洗涤后分别与异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体和罗丹明标记的山羊抗小鼠 IgM 抗体 4 °C 下共孵育 1 h。细胞洗涤后用 PBS 重悬细胞至 $5 \times 10^6/\text{mL}$, 然后分别使用流式细胞术分析其平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI), 了解受体小鼠循环 DSA 水平 (IgG、IgM) 水平。

1.5 心脏移植物病理学检查

同系对照组、非致敏组、预致敏组和预致敏 + 环孢素组分别在心脏移植术后 5、5、3、5 d 获取移植物标本, 经 4% 多聚甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋制片, 行苏木素 - 伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 光学显微镜 (光镜) 下观察各组移植物病理学变化。心脏移植物石蜡切片脱蜡并抗原修复后, 加入一抗 C4d (1:200) 和 CD3 (1:400) 抗体, 过夜后加入相应的二抗, 37 °C 避光孵育 30 min, 洗涤后加入显示剂

二氨基联苯胺，苏木素复染后吹干封片，光镜下观察移植体内 C4d 沉积和 CD3 浸润情况。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。对于符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差表示，组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏移植存活时间

同系对照组小鼠心脏移植在 3 个月观察期内均长期存活，非致敏组、预致敏组和预致敏 + 环孢素组心脏移植存活时间分别为 (7.0 ± 0.7) d、 (2.6 ± 0.5) d 和 (5.0 ± 0.7) d，非致敏组和预致敏组比较、预致敏组和预致敏 + 环孢素组比较，差异均有统计学意义（均为 $P < 0.01$ ）。

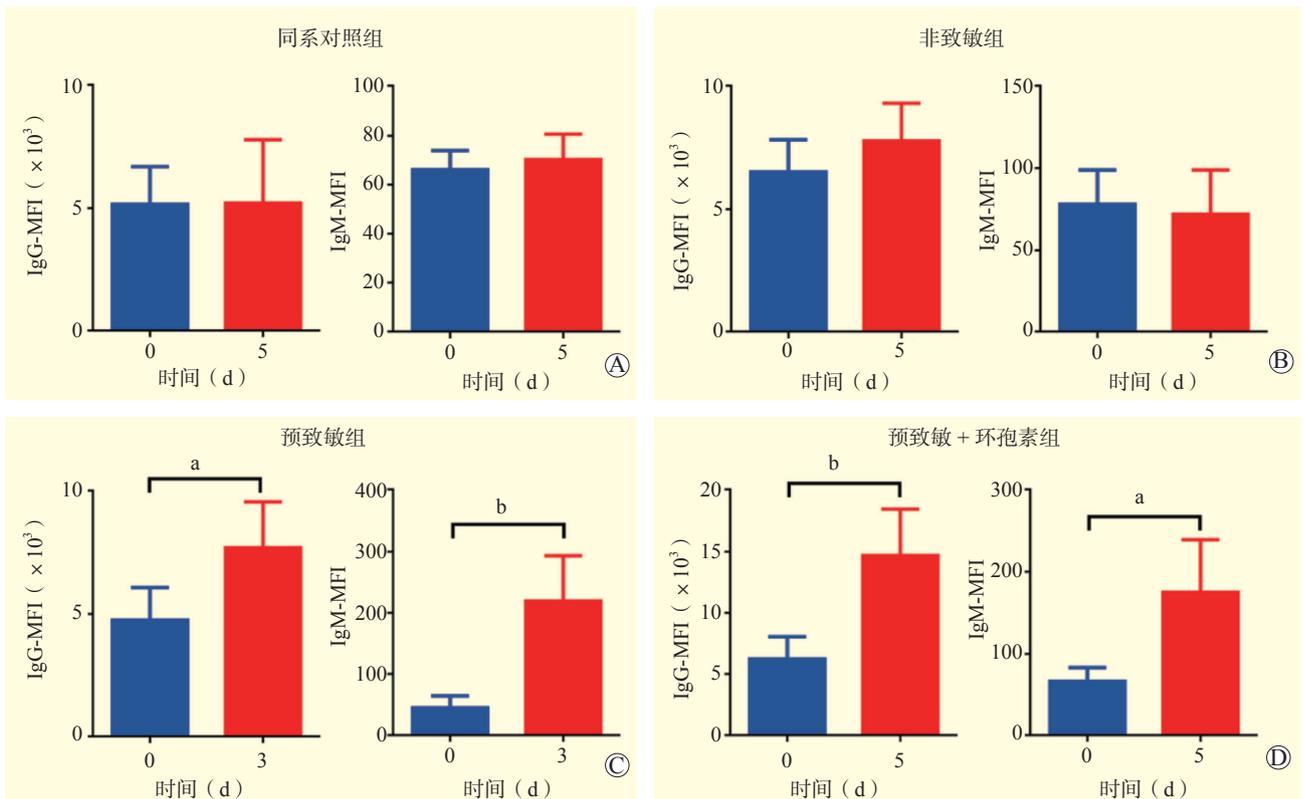
2.2 供体特异性抗体（IgG 和 IgM）水平

同系对照组和非致敏组在心脏移植术后 5 d DSA（IgG 和 IgM）水平与基础值差异无统计学意义（图 1A、B）。预致敏组在心脏移植术后 3 d DSA 水平

较基础值显著升高 [IgG-MFI 为 $(7.7 \pm 1.9) \times 10^3$ 比 $(4.8 \pm 1.3) \times 10^3$, $P < 0.05$; IgM-MFI 为 (219 ± 74) 比 (45 ± 20) , $P < 0.01$]（图 1C），预致敏 + 环孢素组在心脏移植术后 5 d DSA 水平较基础值也显著升高 [IgG-MFI 为 $(14.7 \pm 3.8) \times 10^3$ 比 $(6.2 \pm 1.8) \times 10^3$, $P < 0.01$; IgM-MFI 为 (175 ± 65) 比 (66 ± 17) , $P < 0.05$]（图 1D）。

2.3 心脏移植病理学特点

同系对照组心肌细胞结构正常，无明显炎症细胞浸润，C4d 和 CD3 染色均无明显阳性（图 2A~C）。非致敏组在心脏移植术后 5 d 病理学表现为心肌细胞坏死、结构破坏，大量炎症细胞浸润在间质内，形成间质炎，C4d 少量沉积，CD3 细胞大量浸润（图 2D~F）。预致敏组在心脏移植术后 3 d 病理学表现为心肌细胞坏死、结构破坏，毛细血管内广泛血栓形成和炎症细胞浸润，形成毛细血管炎，C4d 大量沉积，中等量 CD3 细胞浸润（图 2G~I）。预致敏 + 环孢素组在心脏移植术后 5 d 与预致敏组具有相同的病理学表现和 C4d 沉积，但 CD3 细胞浸润少于预致敏组（图 2J~L）。



注：与基础值比较，^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

图1 各组受体小鼠心脏移植术后 DSA (IgG 和 IgM) 水平

Figure 1 Donor specific antibodies (IgG and IgM) levels after heart transplantation in recipient mice of each group

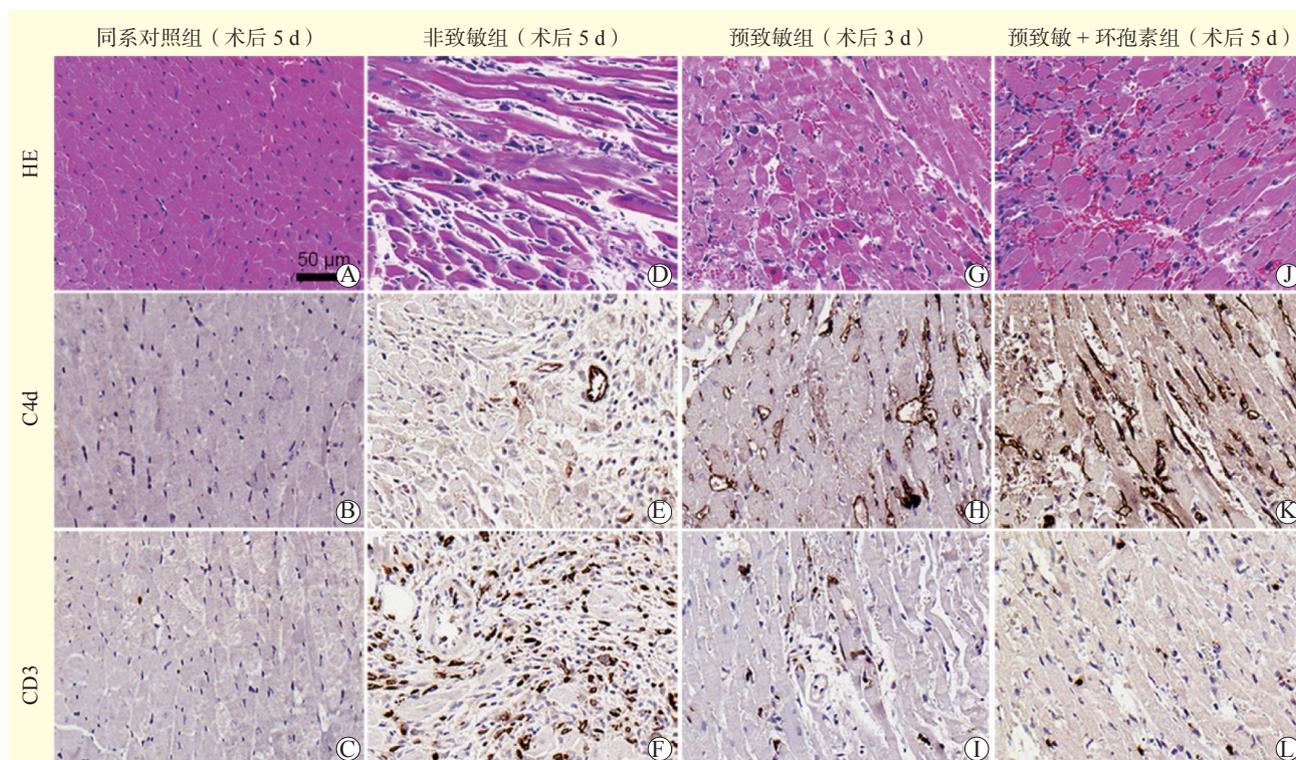


图 2 各组受体小鼠心脏移植物的病理学表现 (×400)

Figure 2 Pathological manifestations of cardiac grafts in recipient mice of each group

3 讨论

目前普遍认为, AMR 是由 DSA 引起的, DSA 与血管内皮细胞表面的抗原结合后, 通过经典途径激活补体系统, 形成膜攻击复合物, 损伤移植物。在补体激活过程中, 补体裂解产物 C4d 可以共价结合在血管内皮细胞上, 目前作为 AMR 的诊断标志物。同时, C3a、C5a 等趋化因子可以招募炎症细胞浸润到移植物毛细血管内, 形成毛细血管炎, 进一步损伤移植物^[16-19]。在 AMR 中, 还有很多具体的机制尚未阐明, 如移植物非补体损伤的机制以及毛细血管炎对 AMR 损伤的机制等。AMR 目前的治疗方法包括清除循环中 DSA、抑制 B 细胞或浆细胞活性和抑制补体等^[18,20-21], 但是总体治疗效果欠佳。所以, 还需要更多的研究来探索 AMR 的发病机制和更加有效的治疗方法。

同品系的小鼠因为具有相同的基因型, 移植后不发生排斥反应。在非致敏组中, 心脏移植术后 5 d 血清 DSA 水平不升高, 移植物病理学表现主要为心肌细胞损伤、结构破坏, 大量 CD3⁺T 细胞在间质浸润, 是典型的急性 CMR 模型; 但是仍有少量 C4d 沉积, 所以也存在少部分 AMR 成份, 可能由于少量 DSA

产生后被移植物吸收, 血清中未能检测到其水平升高, 该模型目前普遍用于研究心脏移植排斥反应^[14,22]。

在预致敏组中, 心脏移植术后 3 d, DSA 水平较基础值显著升高, 移植物病理学表现为心肌细胞破坏, 毛细血管内广泛血栓形成和炎症细胞浸润, 形成毛细血管炎, C4d 大量沉积, 符合急性 AMR 的国际诊断标准^[23]。但是, 需要指出的是皮肤移植预致敏不仅会激活 B 细胞产生抗体, 同样也会激活 T 细胞, 导致心脏移植后快速发生强烈的排斥反应, 心脏移植物存活时间仅 (2.6 ± 0.5) d, 排斥反应过重。我们也检测到该模型中有中等量的 CD3⁺T 细胞浸润, 所以该模型存在一定的 CMR 成份, 是以急性 AMR 为主的混合性排斥反应。所以该模型在对 AMR 的研究中存在一定的局限性, 比如 CMR 成份较多, 不利于 AMR 的发病机制研究; 排斥反应过强, 治疗干预窗太短, 不利于 AMR 治疗新方法的研究。

环孢素是目前临床广泛应用的钙调磷酸酶抑制剂类, 可以有效抑制 T 细胞的活化和作用^[24-25]。基于此, 我们从皮肤移植开始即利用环孢素抑制 T 细胞活化, 从而抑制该模型的 CMR 成份。使用环孢素后心脏移植物存活时间显著延长, 心脏移植术后 5 d, DSA 水

平较基础值显著升高,且移植物内 CD3⁺T 细胞浸润明显减少,因此,预致敏+环孢素组是较为完善的急性 AMR 模型,排斥反应以 AMR 为主且程度适中,治疗干预窗较长,说明该模型对急性 AMR 的发病机制和干预研究具有更强的实用性。

综上所述,我们在利用不同品系间小鼠皮肤移植和心脏移植的基础上加用环孢素,成功建立了实用性更强的小鼠心脏移植急性 AMR 模型,为后续 AMR 的发病机制和干预研究提供基础。

参考文献:

- [1] PATEL JK, KITTLESON M, KOBASHIGAWA JA. Cardiac allograft rejection[J]. *Surgeon*, 2011, 9(3):160-167. DOI: 10.1016/j.surge.2010.11.023.
- [2] COZZI E, COLPO A, DE SILVESTRO G. The mechanisms of rejection in solid organ transplantation[J]. *Transfus Apher Sci*, 2017, 56(4):498-505. DOI: 10.1016/j.transci.2017.07.005.
- [3] HUSAIN AN, MIRZA KM, FEDSON SE. Routine C4d immunohistochemistry in cardiac allografts: long-term outcomes[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2017, 36(12):1329-1335. DOI: 10.1016/j.healun.2017.09.004.
- [4] KFOURY AG, HAMMOND ME, SNOW GL, et al. Cardiovascular mortality among heart transplant recipients with asymptomatic antibody-mediated or stable mixed cellular and antibody-mediated rejection[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2009, 28(8):781-784. DOI: 10.1016/j.healun.2009.04.035.
- [5] LOUPY A, TOQUET C, ROUVIER P, et al. Late failing heart allografts: pathology of cardiac allograft vasculopathy and association with antibody-mediated rejection[J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(1):111-120. DOI: 10.1111/ajt.13529.
- [6] PEYSTER EG, MADABHUSHI A, MARGULIES KB. Advanced morphologic analysis for diagnosing allograft rejection: the case of cardiac transplant rejection[J]. *Transplantation*, 2018, 102(8):1230-1239. DOI: 10.1097/TP.0000000000002189.
- [7] BRAZA MS, VAN LEENT MMT, LAMEIJER M, et al. Inhibiting inflammation with myeloid cell-specific nanobiologics promotes organ transplant acceptance[J]. *Immunity*, 2018, 49(5):819-828. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.09.008.
- [8] MAGEE CN, MURAKAMI N, BORGES TJ, et al. Notch-1 inhibition promotes immune regulation in transplantation via regulatory T cell-dependent mechanisms[J]. *Circulation*, 2019, 140(10):846-863. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040563.
- [9] WU C, ZHAO Y, XIAO X, et al. Graft-infiltrating macrophages adopt an M2 phenotype and are inhibited by purinergic receptor P2X7 antagonist in chronic rejection[J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(9):2563-2573. DOI: 10.1111/ajt.13808.
- [10] ZHAO Y, CHEN S, LAN P, et al. Macrophage subpopulations and their impact on chronic allograft rejection versus graft acceptance in a mouse heart transplant model[J]. *Am J Transplant*, 2018, 18(3):604-616. DOI: 10.1111/ajt.14543.
- [11] ZHANG H, WU J, ZOU D, et al. Ablation of interferon regulatory factor 4 in T cells induces "memory" of transplant tolerance that is irreversible by immune checkpoint blockade[J]. *Am J Transplant*, 2019, 19(3):884-893. DOI: 10.1111/ajt.15196.
- [12] LIAO T, LIU X, REN J, et al. Noninvasive and quantitative measurement of C4d deposition for the diagnosis of antibody-mediated cardiac allograft rejection[J]. *EBioMedicine*, 2018, 37:236-245. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.10.061.
- [13] LIAO T, XUE Y, ZHAO D, et al. In vivo attenuation of antibody-mediated acute renal allograft rejection by ex vivo TGF- β -induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells[J]. *Front Immunol*, 2017, 8:1334. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01334.
- [14] ZHAO D, LI S, LIAO T, et al. Triptolide inhibits donor-specific antibody production and attenuates mixed antibody-mediated renal allograft injury[J]. *Am J Transplant*, 2018, 18(5):1083-1095. DOI: 10.1111/ajt.14602.
- [15] ZHAO D, LIAO T, LI S, et al. Mouse model established by early renal transplantation after skin allograft sensitization mimics clinical antibody-mediated rejection[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:1356. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01356.
- [16] COHEN D, COLVIN RB, DAHA MR, et al. Pros and cons for C4d as a biomarker[J]. *Kidney Int*, 2012, 81(7):628-639. DOI: 10.1038/ki.2011.497.
- [17] COLVIN RB, SMITH RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(10):807-817.
- [18] VALENZUELA NM, REED EF. Antibody-mediated rejection across solid organ transplants: manifestations, mechanisms, and therapies[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(7):2492-2504. DOI: 10.1172/JCI90597.
- [19] HAAS M. The relationship between pathologic lesions of active and chronic antibody-mediated rejection in renal allografts[J]. *Am J Transplant*, 2018, 18(12):2849-2856. DOI: 10.1111/ajt.15088.
- [20] COLVIN MM, COOK JL, CHANG P, et al. Antibody-

- mediated rejection in cardiac transplantation: emerging knowledge in diagnosis and management: a scientific statement from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2015, 131(18):1608-1639. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000093.
- [21] JORDAN SC, AMMERMAN N, CHOI J, et al. Novel therapeutic approaches to allosensitization and antibody-mediated rejection[J]. *Transplantation*, 2019, 103(2):262-272. DOI: 10.1097/TP.0000000000002462.
- [22] WU J, ZHANG H, SHI X, et al. Ablation of transcription factor IRF4 promotes transplant acceptance by driving allogeneic CD4⁺ T cell dysfunction[J]. *Immunity*, 2017, 47(6):1114-1128. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.11.003.
- [23] BERRY GJ, BURKE MM, ANDERSEN C, et al. The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2013, 32(12):1147-1162. DOI: 10.1016/j.healun.2013.08.011.
- [24] KAMAR N, ALLARD J, ADER JL, et al. Cyclosporine-A-based immunosuppression and renal functional reserve in organ-transplant patients[J]. *Transplant Proc*, 2004, 36(2 Suppl):248S-250S.
- [25] LIDDICOAT AM, LAVELLE EC. Modulation of innate immunity by cyclosporine A[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 163:472-480. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.03.022.
- (收稿日期: 2020-02-15)
(本文编辑: 王维苹 吴秋玲)

(上接 331 页 from page 331)

- [34] PINATO DJ, SHARMA R, ALLARA E, et al. The ALBI grade provides objective hepatic reserve estimation across each BCLC stage of hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(2):338-346. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.09.008.
- [35] HIRAOKA A, KUMADA T, KUDO M, et al. Albumin-Bilirubin (ALBI) grade as part of the evidence-based clinical practice guideline for HCC of the Japan society of hepatology: a comparison with the liver damage and Child-Pugh classifications[J]. *Liver Cancer*, 2017, 6(3):204-215. DOI: 10.1159/000452846.
- [36] 吴坤亮, 张英, 黄晶, 等. 终末期肝病模型评分联合吡啶菁绿清除实验预测 HBV 相关慢加急性肝衰竭预后[J]. *中山大学学报(医学版)*, 2018, 39(6):935-940.
- WU KL, ZHANG Y, HUANG J, et al. Model for end-stage liver disease combined with indocyanine green clearance test can effectively predict the prognosis of HBV-associated acute-on-chronic liver failure[J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2018, 39(6):935-940.
- [37] 吕佳昱, 韩涛. 关注重症肝病临床管理的热点问题[J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, 33(9):1617-1620. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2017.09.001.
- LYU JY, HAN T. Hotspots in clinical management of severe liver diseases[J]. *J Clin Hepatol*, 2017, 33(9):1617-1620. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2017.09.001.
- [38] JASSERON C, FRANCOZ C, ANTOINE C, et al. Impact of the new MELD-based allocation system on waiting list and post-transplant survival - a cohort analysis using the French national CRISTAL database[J]. *Transpl Int*, 2019, DOI: 10.1111/tri.13448 [Epub ahead of print].
- [39] PARIKH ND, AGOPIAN VG. Moving toward personalizing MELD exceptions in liver transplantation for hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Transplant*, 2019, 19(8):2153-2154. DOI: 10.1111/ajt.15389.
- [40] GINÈS P, FERNÁNDEZ J, DURAND F, et al. Management of critically-ill cirrhotic patients[J]. *J Hepatol*, 2012, 56 (Suppl 1):S13-S24. DOI:10.1016/S0168-8278(12)60003-8.
- (收稿日期: 2020-02-16)
(本文编辑: 邬加佳 吴秋玲)