

• 肾移植术后感染专题 •

免疫抑制剂咪唑立宾的体外抗 BK 病毒作用研究

石业静¹ 吴楠楠¹ 戎瑞明² 朱同玉²

¹上海市公共卫生临床中心上海噬菌体与耐药研究所 201508; ²复旦大学附属中山医院上海市器官移植重点实验室, 上海 200032

通信作者: 戎瑞明, Email: rong.ruiming@zs-hospital.sh.cn

【摘要】目的 在体外水平上研究咪唑立宾的抗 BK 多瘤病毒(BKV)功能并初步分析其抑制病毒复制的阶段。**方法** 本研究采用咪唑立宾的溶剂作为阴性对照, 已知具有体外抗 BKV 活性的西罗莫司作为阳性对照。首先, 在不同细胞系中分析咪唑立宾和西罗莫司的半致死浓度。然后, 以此为依据设置药物浓度梯度处理细胞, 感染 BKV 后在不同时间点上收集细胞上清液进行荧光定量 PCR 检测 BKV 的复制曲线, 对细胞做免疫荧光检测 BKV 感染率。最后, 用 BKV 单循环假病毒感染不同药物浓度处理的 293FT 细胞, 通过流式细胞仪分析假病毒感染效率, 以此判断咪唑立宾对 BKV 感染早期的影响。**结果** 咪唑立宾与西罗莫司都具有体外抑制 BKV 感染的作用。与对照组相比, 细胞免疫荧光显示 BKV 的感染率随着咪唑立宾浓度的增加而降低, 细胞上清病毒 DNA 定量检测表明咪唑立宾处理组病毒复制曲线受到明显抑制。西罗莫司对 BKV 感染水平和复制水平的抑制作用与咪唑立宾类似, 本研究中两种药物对 BKV 感染早期都没有显著影响。**结论** 咪唑立宾在细胞水平上具有抗 BKV 活性, 且抑制作用并未发生在病毒感染早期阶段。

【关键词】 肾移植; BK 多瘤病毒; 咪唑立宾

基金项目: 国家自然科学基金(81873621); 上海市卫计委卫生行业临床研究专项青年项目(20184Y0274); 上海市公共卫生临床中心 PI 专项(2016RC2X-04); 上海申康医院发展中心(SHDC12018101)

DOI: 10.3760/cma.j.cn421203-20200113-00014

In vitro antiviral activity of Mizoribine against BK polyomavirus

Shi Yejing¹, Wu Nannan¹, Rong Ruiming², Zhu Tongyu²

¹Shanghai Institute of Phage, Shanghai Public Health Clinical Center, Shanghai 201508, China;

²Shanghai Key Laboratory of Organ Transplantation, Zhongshan Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: Rong Ruiming, Email: rong.ruiming@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】Objective To explore the in vitro antiviral activity of Mizoribine (Miz) against BK polyomavirus (BKV) and analyze preliminarily the replication stage during inhibition. **Methods** The solvent of Miz, was employed as a negative control, while Sirolimus (Sir) with in vitro anti-BKV activity was applied as a positive control. Firstly, the half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of Miz and Sir were analyzed in different cell lines. Then, prior to BKV infection, cells were treated with a gradient of drug concentrations according to the IC₅₀ results. At different timepoints post-infection, BKV replication curves were measured by quantitative detection of its DNA in supernatant while the cells were subjected to immunofluorescence for detecting the infection rate. Finally 293FT cells treated with drugs was infected by BKV single-round pseudovirus for determining the effects of Miz on the early stage of BKV infection. **Results** As compared with control group, immunofluorescence showed a lowered infection rate of BKV in a Miz dose-dependent manner, viral replication curve was significantly inhibited according to the quantitative detection of viral DNA in cell supernatant. The inhibitory effect of Sir on the level of BKV infection and replication was similar to that of Miz. However, neither Miz nor Sir exhibited a significant effect on the early stage of BKV infection. **Conclusions** Miz has anti-BKV activity at cellular level and the inhibitory effect does not appear in the early stage of viral infection.

【Key words】 Kidney transplantation; BK polyomavirus; Mizoribine

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81873621); Shanghai Municipal

Commission of Health & Family Planning (20184Y0274); Shanghai Public Health Clinical Center (Grant No. 2016RC2X-04); Hospital Development Center (SHDC12018101)
DOI: 10. 3760/cma. j. cn421203-20200113-00014

肾移植受者 BK 病毒相关肾病(BKVN)发生率约 6%,即便在干预治疗情况下,BKVN 导致的移植肾功能丧失率仍高达 16%~40%^[1]。BKVN 治疗缺乏有效的抗病毒药物,主要依赖降低免疫抑制强度,这样也增加了移植肾发生排斥反应的风险。因此筛选有效的抗病毒药物,特别是具有抗病毒活性的免疫抑制剂是重要策略之一。咪唑立宾通过抑制免疫细胞 DNA 和 RNA 的合成而发挥免疫抑制剂作用,一些单中心临床研究发现咪唑立宾对预防和治疗 BKV 活化有一定作用^[2-3],也有一些研究结果表明咪唑立宾在细胞水平上对一些病毒有抑制作用^[4-6]。因此,本研究旨在通过 BKV 天然靶细胞膀胱癌细胞系和原代肾小管上皮细胞,在体外水平探讨咪唑立宾有无抗 BKV 作用,并通过 BKV 单循环假病毒感染体系初步判断咪唑立宾对 BKV 复制周期的作用节点,以期为临床发生 BKV 活化时免疫抑制替代方案选择提供依据。

材料与方法

一、细胞与病毒

1. 细胞:原代肾小管上皮细胞 RPTEC (#4100)及其完全培养基套餐(#4101)和辅助贴壁的多聚赖氨酸(PLL,#0403)购自美国 ScienCell,培养板预处理 PLL 后铺细胞,加入预配制的完全培养基进行培养,扩增到第四代后冻存细胞。此后即可用于实验,每次实验复苏新的第四代细胞一次性使用。膀胱癌细胞系 TCCSUP(HTB-5, ATCC)使用含 10%胎牛血清(s711-001s,美国 Lonsera 公司)的 α -MEM(SH30265. 01B,美国 Hyclone 公司)完全培养基培养。肾胚细胞系 HEK 293FT(R70007,美国 Invitrogen 公司)使用含 10%胎牛血清的 DMEM(R10-013-CV,美国 Corning 公司)完全培养基培养。

2. 病毒: BKV-UT 株购自 ATCC(VR-837,经测序鉴定为 UT 株),反复冻融 6 次后感染 RPTEC 细胞进行大量扩增,感染后 3~4 周待细胞开始大量死亡时收集含病毒的上清液和细胞裂解液,通过超速离心纯化病毒。新制备病毒感染 RPTEC 后通过免疫荧光法测定病毒滴度^[7]。BKV 单循环假病毒(srBKV-GFP)使用 3 质粒共转染 293FT 制备^[8],其

中质粒 pWB2b(#32094)和 pWB3b(#32106)购自美国 Addgene 公司,报告质粒为 pEGFP-N1(PT3027-5,美国 Clontech 公司)。srBKV-GFP 滴度由流式分析其感染 293FT 细胞 48 h 后绿色荧光蛋白(GFP)阳性细胞百分比进行计算。

二、方法

1. 药物半致死浓度(IC₅₀)测定:将不同药物浓度梯度的咪唑立宾(M3047, Sigma-Aldrich)和西罗莫司(#SS9240,北京索莱宝科技有限公司)处理不同细胞,3 d 后弃上清,使用 CCK8 试剂盒(CK04,日本 DOJINDO 公司)处理细胞后在 Synergy 2 酶标仪(美国 BioTek 公司)上读取 OD 450 处的吸光度,计算 IC₅₀ 值。

2. 荧光定量 PCR: RPTEC、TCCSUP 和 Vero 细胞铺 48 孔板,感染 BKV UT 株[感染复数(MOI) = 1]后 2 h 换液并加入药物,感染后第 2~6 天每天收集 50 μ l 细胞上清液(同时用完全培养基补回原体积)。上清液加 PBS(21-040-Cva,美国 Corning 公司)至 200 μ l,使用 QIAcube HT 高通量核酸提取仪(德国 Qiagen 公司)及配套试剂(#54161 & #950067,德国 Qiagen 公司)进行 DNA 抽提。使用 Premix Ex Taq 探针法 qPCR 体系(RR390A,日本 Takara 公司)和 ViiA7 荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)对 BKV 的 DNA 进行定量检测,引物探针体系参见^[9]。

3. 免疫荧光和细胞感染率计数: RPTEC 细胞铺 48 孔板,感染 BKV UT 株(MOI = 1)后 2 h 换液并加入药物,3 d 后直接在原 48 孔板内固定细胞并做免疫荧光,DAPI(1:1 000,4083 S,美国 CST 公司)染细胞核,anti-BKV VP1(1:300, MAB3204-M02,亚诺法生技股份有限公司)标记 BKV 的外壳蛋白 VP1,二抗为 Alexa Fluor 568(1:1 000, A10037,美国 Thermo 公司)。免疫荧光拍照使用徕卡 DMi8 高内涵荧光显微镜全视野扫描,利用 LAS X 软件根据荧光信号进行细胞计数统计,药物处理组与对照组校准后进行分析。

4. 流式细胞分析: 293FT 细胞铺 24 孔板,感染单循环假病毒 srBKV-GFP(MOI = 0.5)后 2 h 换液并加入药物,2~3 d 后收集细胞,1%的多聚甲醛溶液固定后通过 Accuri C6 流式细胞仪(美国 BD

Biosciences公司)分析 GFP 阳性细胞比例。药物处理组与对照组校准后进行分析。

三、统计学处理

数据用 SPSS 13.0 软件处理,组间差异比较采用成组 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、咪唑立宾在细胞中的 IC₅₀ 测定

测定咪唑立宾在原代肾小管上皮细胞 RPTEC、膀胱癌细胞系 TCCSUP 和肾胚细胞 293FT 中的半致死浓度。结果提示:咪唑立宾对 RPTEC、TCCSUP 和 293FT 的 IC₅₀ 较高,平均值分别为 274.90 μmol/L、50.59 μmol/L 和 223.35 μmol/L,西罗莫司分别为 0.12 μmol/L、0.0047 μmol/L 和 2.231 μmol/L,RPTEC 和 293FT 组的咪唑立宾 IC₅₀ 显著高于 TCCSUP。

二、咪唑立宾减少 BKV 的复制释放

已有研究表明西罗莫司在 RPTEC 中能抑制 BKV 复制^[10],因此在本研究将其作为咪唑立宾的阳性对照。结果显示:在原代肾小管上皮细胞 RPTEC 和膀胱癌细胞 TCCSUP 中,咪唑立宾在 BKV 复制曲线的不同时间点均呈现剂量依赖性的病毒释放抑制作用,且与西罗莫司效果类似(图 1)。

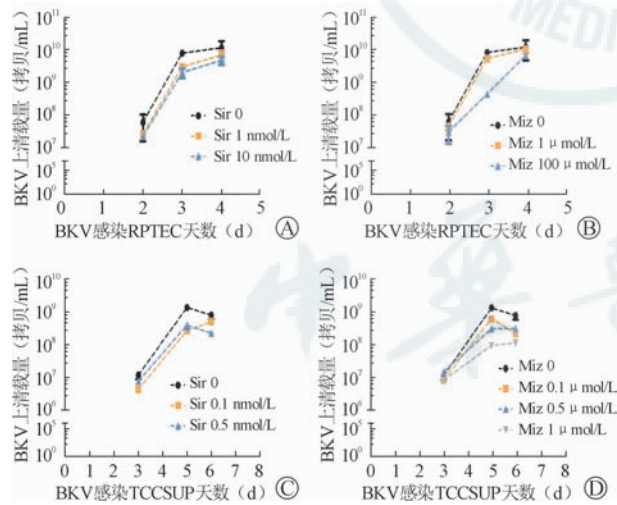
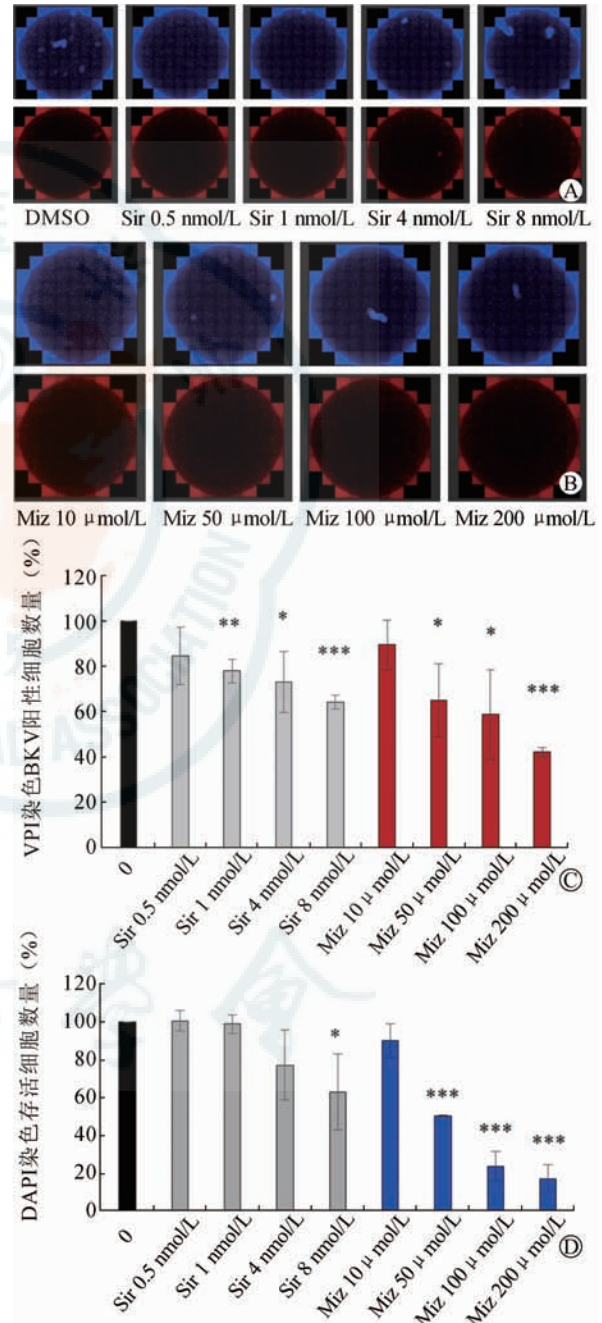


图 1 BKV 感染细胞后药物处理后上清液中病毒载量(拷贝数/ml) A. 不同浓度西罗莫司(Sir)感染原代肾小管上皮细胞 RPTEC 的时间折线图;B. 不同浓度咪唑立宾(Miz)感染原代肾小管上皮细胞 RPTEC 的时间折线图;C. 不同浓度西罗莫司(Sir)感染膀胱癌细胞 TCCSUP 的时间折线图;D. 不同浓度咪唑立宾(Miz)感染膀胱癌细胞 TCCSUP 的时间折线图

三、咪唑立宾减少 BKV 感染细胞数量

在原代肾小管上皮细胞 RPTEC 中, BKV-UT

株感染并处理药物,3d 后进行免疫荧光检测。发现咪唑立宾和西罗莫司对 BKV 感染细胞数量也呈剂量依赖性抑制作用(图 2A、2B),同时随着药物浓度的增加,细胞总数也对应降低。表明两种免疫抑制剂在减少病毒感染细胞数量的同时对细胞增殖也存在抑制作用(图 2C、2D)。



注: Sir(西罗莫司); Miz(咪唑立宾); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 2 免疫荧光检测(A. DAPI 染蓝光, 计总细胞数; B. anti-VP1 染红光, 计 BKV 感染细胞数)咪唑立宾和西罗莫司处理 RPTEC 后 BKV 的感染情况。全视野细胞荧光计数统计 BKV 感染细胞数量(C)和总细胞数量(D)(对照组作为 100% 进行校准)

四、咪唑立宾和西罗莫司不影响 BKV 感染的早期阶段

携带 GFP 报告基因的假病毒 srBKV-GFP 感染 293FT 细胞能够模拟 BKV 感染相关细胞的吸附、进入细胞直至传递病毒 DNA 入核这一早期阶段,我们发现咪唑立宾和西罗莫司并不影响 srBKV-GFP 的感染率(图 3)。因此推断咪唑立宾和西罗莫司对 BKV 的抑制作用可能发生在病毒 DNA 进入细胞核以后。

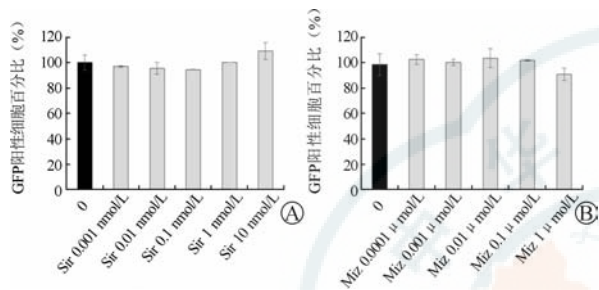


图 3 西罗莫司(A)和咪唑立宾(B)和处理 293FT 细胞后 BKV 单循环假病毒感染情况,通过流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞百分比(对照组作为 100%进行校准)

讨 论

本文在体外细胞水平对咪唑立宾的直接抗 BKV 作用进行研究,结果表明咪唑立宾对 BKV 的感染和复制水平均有剂量依赖性抑制作用,且这一作用并非发生在病毒感染早期阶段。

本研究选择 BKV 的天然靶细胞—人膀胱癌细胞系 TCCSUP 和人原代肾小管上皮细胞 RPTEC 进行药物抗病毒研究。已有研究表明西罗莫司在 RPTEC 和人肾小管上皮细胞系 HK2 中对 BKV 有直接的抗病毒作用^[10-11],因此本研究中使用西罗莫司作为咪唑立宾的阳性对照。**西罗莫司是 mTOR 抑制剂,能作用于 mTOR 通路来抑制蛋白合成和细胞增殖,也可通过 Akt-mTOR-S6 激酶通路抑制病毒蛋白合成,从而发挥抗 BKV 作用^[10]。**咪唑立宾是鸟苷酸合成抑制剂,也可能通过抑制病毒核酸的合成从而发挥抗病毒作用。

事实上,既往研究结果表明咪唑立宾在细胞水平上对巨细胞病毒(Cytomegalovirus)^[4]、手足口病毒^[5]、SARS 冠状病毒(SARS-CoV)^[6]和山羊痘病毒(Caprine herpesvirus 1)^[12]等有抑制作用。同时越来越多的研究表明选择咪唑立宾作为维持期免疫抑制剂与 BKV 的低活化率相关。多个单中心临床研究发现肾移植受者 BKV 活化时将吗替麦考

酚酯更换为咪唑立宾可有效降低血、尿中的 BKV 载量^[2-3]。但此作用是基于咪唑立宾替代吗替麦考酚酯后免疫抑制强度减弱还是咪唑立宾直接抗 BKV 作用尚未有报道。

我们的前期研究发现 BKV 感染人 RPTEC 和 TCCSUP 均能在细胞上清液中检测到较高水平的病毒释放量,非常适合作为 BKV 药物筛选模型。在本研究中,咪唑立宾和西罗莫司均能有效抑制 BKV 在这些细胞中复制,且抑制效果与药物浓度呈正相关。上清中 BKV 的释放量能反映出病毒的复制水平以及裂解性和非裂解性释放的水平,也能代表 BKV 潜在的传播和活化潜力,因此这一结果表明咪唑立宾和西罗莫司在细胞水平上均有较好的抗 BKV 效果。

免疫荧光能反映 BKV 的感染情况和细胞的存活情况。本研究前期在 BKV 感染 RPTEC 和 TCCSUP 后分别对其早期编码蛋白 LT 和晚期编码蛋白 VP1 进行免疫荧光染色,发现后者的细胞阳性率显著高于前者,且 VP1 是病毒结构蛋白,更能代表 BKV 的感染水平,因此这部分实验通过对 VP1 进行免疫荧光染色并读取阳性细胞比例来反映 BKV 的感染水平。本研究使用徕卡 DMi8 高内涵荧光显微镜对免疫荧光处理后细胞进行全视野扫描和计数,以减少随机选择视野所带来的误差。结果显示:随着药物浓度的增加,BKV 阳性细胞的数目明显减少,提示咪唑立宾具有和西罗莫司类似的抑制 BKV 感染作用。

本研究所用 BKV 单循环假病毒也称为病毒样颗粒,利用 BKV 壳蛋白包裹一个含 GFP 报告基因的质粒,能模拟 BKV 的病毒颗粒结构和其进入细胞直至 DNA 转运入细胞核的感染早期过程,且容易通过流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞,因此常被用于 BKV 感染早期的研究^[8, 10]。已有研究表明 BKV 单循环假病毒感染能激活 Akt-mTOR-S6 激酶通路^[10],但 mTOR 抑制剂西罗莫司是否通过这一通路抑制 BKV 感染早期阶段并未报道。我们发现西罗莫司和咪唑立宾处理 RPTEC 后,BKV 单循环假病毒的感染率差异没有统计学意义。表明咪唑立宾和西罗莫司对 BKV 的抑制作用并不发生在感染的早期阶段,推测可能发生在病毒 DNA 进入细胞核以后的阶段。

既往研究表明随着西罗莫司药物浓度的增加,其抗 BKV 作用也增加,但抑制细胞增殖的作用同样增加,其抗病毒作用和抑制细胞增殖作用并存可

能限制肾小管上皮的修复。本研究表明咪唑立宾同样显示出这一特征。而咪唑立宾的优势在于其使用剂量范围较宽。已有研究表明高剂量咪唑立宾(可高达 $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)^[13]不但能发挥有效的免疫抑制作用且副作用较小,还与肾移植术后较低的 CMV^[14-15]和 BKV 活化风险相关^[16]。我们在体外细胞水平上进行的半致死浓度研究表明,西罗莫司对原代肾小管上皮细胞 RPTEC 的半致死浓度在 nmol/L 级^[10],而咪唑立宾在 $50 \mu\text{mol/L}$ 的高浓度下才开始引起明显的 RPTEC 死亡,对 RPTEC 的半致死浓度(274.9 ± 70.5) $\mu\text{mol/L}$ 相较于膀胱癌细胞系 TCCSUP(50.6 ± 10.8) $\mu\text{mol/L}$ 更高。提示在临床上即使达到高浓度,咪唑立宾对肾小管上皮细胞增殖再生的抑制作用可能并不明显,同时又可以在发挥有效的免疫抑制和抗病毒作用,是肾移植术后发生 BKV 活化时的可选策略。

当然,本研究展示的是咪唑立宾的体外抗病毒作用,在人体内可能还有很多其他的参与因素影响咪唑立宾对 BKV 的抑制作用,特别是通过免疫抑制作用对 BKV 活化产生的间接影响。但在同等条件下,当高浓度咪唑立宾能达到与同类型免疫抑制剂类似的免疫抑制效果时,其本身对 BKV 的抑制活性使其在预防和治疗 BKV 活化相关疾病上占据优势。

综上,咪唑立宾是一个具有抗病毒活性的免疫抑制剂;其对 BKV 的感染、复制和释放均表现一定的抑制作用;抗病毒作用呈现浓度依赖性;作用机制可能主要发生在病毒 DNA 进入细胞核后。据此我们认为肾移植术后发生 BKV 活化时,高剂量咪唑立宾是临床可选策略。此药物是否通过抑制 BKV 核酸合成发挥抗病毒作用有待进一步的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Gonzalez S, Escobar-Serna DP, Suarez O, et al. BK virus nephropathy in kidney transplantation: an approach proposal and update on risk factors, diagnosis, and treatment [J]. *Transplant Proc*, 2015, 47 (6): 1777-1785. DOI: 10. 1016/j. transproceed. 2015. 05. 010.
- [2] Yuan X, Chen C, Zheng Y, et al. Conversion from mycophenolates to mizoribine is associated with lower BK virus load in kidney transplant recipients: a prospective study [J]. *Transplant Proc*, 2018, 50(10): 3356-3360. DOI: 10. 1016/j. transproceed. 2018. 01. 059.
- [3] Funahashi Y, Hattori R, Kinukawa T, et al. Conversion from mycophenolate mofetil to mizoribine for patients with positive polyomavirus type BK in urine [J]. *Transplant Proc*, 2008, 40 (7): 2268-2270. DOI: 10. 1016/j. transproceed. 2008. 07. 069.
- [4] Kuramoto T, Daikoku T, Yoshida Y, et al. Novel anticytomegalovirus activity of immunosuppressant mizoribine and its synergism with ganciclovir [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 333(3): 816-821. DOI: 10. 1124/jpet. 109. 160630.
- [5] Li SF, Gong MJ, Sun YF, et al. In vitro and in vivo antiviral activity of mizoribine against foot-and-mouth disease virus [J]. *Molecules*, 2019, 24 (9): E1723. DOI: 10. 3390/ molecules24091723.
- [6] Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, et al. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus [J]. *Antiviral Res*, 2005, 66 (2-3): 159-163. DOI: 10. 1016/j. antiviral. 2005. 01. 003. DOI: 10. 1016/j. antiviral. 2005. 01. 003.
- [7] Moriyama T, Sorokin A. BK virus (BKV): infection, propagation, quantitation, purification, labeling, and analysis of cell entry [J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2009, 26: Unit 26. 2. DOI: 10. 1002/0471143030. cb2602s42.
- [8] Schowalter RM, Pastrana DV, Buck CB. Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell Polyomavirus infectious entry [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(7): e1002161. DOI: 10. 1371/journal. ppat. 1002161.
- [9] Leung AY, Suen CK, Lie AK, et al. Quantification of polyoma BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation [J]. *Blood*, 2001, 98 (6): 1971-1978. DOI: 10. 1182/blood. v98. 6. 1971.
- [10] Hirsch HH, Yakhontova K, Lu M, et al. BK Polyomavirus replication in renal tubular epithelial cells is inhibited by sirolimus, but activated by tacrolimus through a pathway involving FKBP-12 [J]. *Am J Transplant*, 2016, 16 (3): 821-832. DOI: 10. 1111/ajt. 13541.
- [11] Liacini A, Seamone ME, Muruve DA, et al. Anti-BK virus mechanisms of sirolimus and leflunomide alone and in combination: toward a new therapy for BK virus infection [J]. *Transplantation*, 2010, 90 (12): 1450-1457. DOI: 10. 1097/TP. 0b013e3182007be2.
- [12] Elia G, Camero M, Decaro N, et al. In vitro inhibition of caprine herpesvirus 1 by acyclovir and mizoribine [J]. *Res Vet Sci*, 2015, 99: 208-211. DOI: 10. 1016/j. rvsc. 2015. 01. 009.
- [13] Ishida H, Takahara S, Amada N, et al. A prospective randomized, comparative trial of high-dose mizoribine versus mycophenolate mofetil in combination with tacrolimus and basiliximab for living donor renal transplant: a multicenter trial [J]. *Exp Clin Transplant*, 2016, 14 (5): 518-525. DOI: 10. 6002/ect. 2015. 0326.
- [14] Nishioka T, Yoshimura N, Ushigome H, et al. High-dose mizoribine combined with calcineurin inhibitor (cyclosporine or tacrolimus), basiliximab and corticosteroids for renal transplantation: a Japanese multicenter study [J]. *Int J Urol*, 2018, 25(2): 141-145. DOI: 10. 1111/iju. 13476.
- [15] Harada S, Nakamura T, Ushigome H, et al. Beneficial effects of high-dose mizoribine on ABO-incompatible living-related kidney transplantation: two-year results by a Japanese multicenter study [J]. *Transplant Proc*, 2017, 49(5): 967-970. DOI: 10. 1016/j. transproceed. 2017. 03. 033.
- [16] Nishimura K, Uchida K, Yuzawa K, et al. Excellent results with high-dose mizoribine combined with cyclosporine, corticosteroid, and basiliximab in renal transplant recipients: multicenter study in Japan [J]. *Transplant Proc*, 2012, 44(1): 147-149. DOI: 10. 1016/j. transproceed. 2011. 11. 015.

(收稿日期: 2020-01-13)