

肺腺瘤小鼠模型的建立及其血生化、血常规、尿常规、病理检测

张修彦,高亚奇,陈伟盛,梁 宁,詹纯列*

(广州军区广州总医院动物实验中心,广州 510010)

【摘要】 目的 建立小鼠肺腺瘤模型并进行血生化、血常规、尿常规、病理检测。**方法** PCR 鉴定获得 B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} 阳性鼠 7 只,4 只实验组,3 只对照组,另外设置 3 只野生型对照组,实验组和野生型对照组鼻腔滴入 Cre 腺病毒,每周一次,共 4 次。第 5 周取血、尿进行血生化、血常规检查,取肺组织进行病理学检测以及荧光定量 PCR 检测 Cre 表达。**结果** 4 只阳性鼠均产生多处肺腺瘤,平均个数 4.25 个,体积(10.81 ± 6.38) mm³,对照组均未发现肿瘤。肿瘤膨胀性生长、边界清晰,瘤细胞呈立方上皮样、排列呈不规则腺管状,未见核分裂像。肺腺瘤小鼠与对照组相比低密度脂蛋白胆固醇、平均血小板体积升高,且差异有显著性;直接胆红素与对照组相比升高、高密度脂蛋白胆固醇与对照组相比降低,且差异有显著性。**结论** 成功建立了肺腺瘤小鼠模型,并对其血生化、血常规、尿常规、病理学进行了测量。

【关键词】 肺腺瘤;小鼠;Cre 腺病毒;Kras

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0053-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.010

Establishment of a mouse model of pulmonary adenoma and its routine examination of blood and urine, blood biochemistry and pathology

ZHANG Xiuyan, GAO Yaqi, CHEN Weisheng, LIANG Ning, ZHAN Chunlie*

(Animal Experiment Center of General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of pulmonary adenoma, detect its blood biochemistry, and routinely examine its blood, urine, and pathology. **Methods** PCR confirmed seven B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J-positive} mice. Four of them were used as the experimental group, and three as the control group. Three wild-type mice were used as the control group. Cre adenovirus was applied to the nasal cavity once a week for four times in both the experimental and control groups. After 5 weeks, blood and urine were collected for biochemical examination and routine blood examination. Lung tissue was analyzed for pathology, and quantitative PCR was used to detect Cre expression. **Results** Four positive mice produced multiple lung adenomas at an average of 4.25 with a volume of 10.81 ± 6.38 mm³. No tumors were found in the control group. Multiple tumors, expansive growth, and clear borders were seen in the lung. The tumor cells were cubic epidermoid and arranged in irregular glandular tubes. No pathological mitosis was seen. Compared with the control group, low-density lipoprotein and average platelet volume were increased significantly. Direct bilirubin in the pulmonary adenoma

[基金项目] 广东省科技计划项目(2013B060300036);广东省科技计划项目(2017A030303058)。

[作者简介] 张修彦(1986—),女,主管技师,硕士,研究方向:疾病动物模型。E-mail: 449183654@qq.com

[通信作者] 詹纯列(1963—),主任医师,学士,研究方向:实验动物标准化研究与疾病动物模型。E-mail: zyh200521@qq.com

mice was higher than that in the control group, and high-density lipoprotein was lower than in the control group. These results had high statistical significance. **Conclusions** A mouse model of pulmonary adenoma is successfully established, and its routine examination of blood and urine, blood biochemistry parameters are determined, and its pathological features are characterized.

【Keywords】 pulmonary adenoma; mice; Cre adenovirus; Kras

肺癌是世界各国常见的恶性肿瘤之一,它严重威胁人类健康,近 20 年发病率逐年上升。估计到 2030 年,全球将有 830 万人死于吸烟有关的疾病,其中肺癌占 3.1%^[1]。非小细胞肺癌占肺癌的 80% 以上。在非小细胞肺癌中,RAS 是最常突变的基因,约 25% 的肿瘤可检测到^[2]。B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J}携带 KRAS^{G12D}点突变和 Loxp-Stop-Loxp 序列,KRAS^{G12D}不表达,从鼻腔滴入 Cre 腺病毒,可以启动 KRAS^{G12D}的表达,从而诱导肺癌且肺癌发生率很高^[3,4]。本研究利用此方法诱发肺腺瘤,对其进行血生化、血常规、尿液、病理检测,得到一些基础数据,供有需要的人员参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J}小鼠及 SPF 级野生型小鼠从南京模式动物中心冷冻复苏获得。体重 18~22 g,1.5 月龄,B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J}小鼠 7 只(雌 3 只,雄 4 只),野生型 3 只(雌 1 只,雄 2 只)。实验分组为 B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} Cre 处理组 4 只(2 只雌,2 只雄),B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} 对照组 3 只(1 只雌,2 只雄),野生型对照组 3 只(1 雌,2 只雄)。实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2015-0001。实验动物饲养于广州军区广州总医院动物实验中心屏障环境中,使用许可证号:SYXK(粤)2014-0100,饲喂购自广东省医学实验动物中心的无菌鼠料。饮用水为经消毒过滤的自来水,饲料和水自由摄取。每周更换两次垫料和笼具,进出屏障环境的物品进行严格消毒,严格遵守屏障系统 SOP。小鼠取材、建模在超净工作台中进行。实验过程中,根据实验动物 3R 原则,给予实验动物关怀。实验设计符合福利伦理要求,实验动物福利伦理批准号:201801203。

1.2 主要试剂与仪器

Cre 腺病毒(5×10^{10} , 100 μ L 购自百恩维生物技术有限公司)。One Step Mouse Genotyping Kit(厂商 Vazyme)、URIT 尿试纸条(桂林优利特医疗电子有限公司生产)、ALT、AST、ALP、TP、ALB、GLU、TC、

TG、HDL-C、LDL-C、BUN、CRE、T-BIL、D-BIL、CK、UA 试剂盒(上海科华生物工程股份有限公司)、Trizol(TAKARA 公司)、Bestar qPCR RT kit(DBI 公司)、Bestar qPCR MasterMix(DBI 公司)、DEPC(MACKLIN 公司)、异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司)、MEM 培养基(广州威佳科技有限公司)、石蜡(广东大川特种蜡有限公司)、环保透明剂(武汉宏兹生物技术有限公司)、曙红(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、苏木素(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、环保封片胶(武汉宏兹生物技术有限公司)。

超净工作台(苏州净化设备公司)、紫外分光光度计 UV-1206(日本 Shimadzu 公司产品)、冷冻离心机 SCR20B(日本 Hitachi 公司产品)、台式低温高速离心机 Z323K(德国 Hermle 公司产品台式)、高速离心机 TGL-16G(上海安亭科学仪器厂产品)、水平式电泳仪(北京东方仪器厂产品 GDS7600)、空气恒温振荡器(江苏大仓医疗仪器厂产品)、ABI Real time PCR 仪(ABI 公司)、Stratagene Real time PCR 仪(Agilent 公司)、PCR 扩增仪(杭州晶格科学仪器有限公司)、电子天平 BS210S(日本 Satorius 公司产品)、尿液分析仪 URIT-330(桂林优利特医疗电子有限公司)、全自动血液细胞分析仪 BC-5000(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)、全自动生化分析仪日立 7020(日本柱式会社日立高新技术)、RWD510 小动物麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)、全自动脱水机 ASP300S 型(Leica[®])、生物组织包埋机 EG1150 型(Leica[®])、轮转切片机 RM2235 型(Leica[®])、摊片机 HI1210 型(Leica[®])、烘片机 HI1220 型(Leica[®])、自动染色机 AutoStainer-XL 型(Leica[®])、Olympus[®] 生物显微镜 BX43 型、Olympus[®] 显微图像软件 CellSens Dimension。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠基因型鉴定

取 3~5 mm 小鼠尾尖,根据需要裂解样品数量配制适量 $1 \times$ 裂解液(4 μ L Proteinase K + 200 μ L $1 \times$ mouse tissue lysis buffer),在灭菌 1.5 mL

EP 管中,添加 200 μL $1\times$ 裂解液至所需裂解组织(确保组织全部浸末至裂解液中),涡旋震荡后在 55℃ 水浴中孵育 30 min,孵育完成后,将样品置于沸水浴中加热 5 min 灭活 Proteinase K,将裂解产物涡旋震荡充分混匀后,12 000 r/min 离心 5 min,将上清转移至另一灭菌 EP 管中,取适量做 PCR 扩增,剩余上清保存于 -20°C 。引物信息见表 1,PCR 反应体系见表 2,反应条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 10 min,4℃ 保存。

1.3.2 小鼠肺腺瘤动物模型的建立

用小动物气体麻醉机对小鼠进行麻醉,再以 AdCre 100 μL (1×10^9) 分别滴入 B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} Cre 组及野生型对照组两边鼻孔。AdCre 滴液构成为 2×10^9 AdCre 50 μL 加 45 μL MEM 培养基和 6 μL 2.5 mol/L 的氯化钙^[4]。每 7 d 重复一次,共四次。在第 30 天处死小鼠取肺组织进行石蜡包埋、切片、HE 染色。

1.3.3 尿常规、血常规、血生化检测

利用小鼠代谢笼采集 12 h 尿液用于尿常规检测。EDTA 采血管眼眶采血用于血常规检测。干燥管眼眶采血用于血生化检测。

1.3.4 肺腺瘤荧光定量 PCR 检测 Cre 表达

以 Cre 序列为模版设计引物 Cre F:5'-TTAA TCCATATTGGCAGAACG-3',Cre R:5'-AGACGGAA

ATCCATCGCTC-3',内参 β -actin F:5'-CATTGCT GACAGGATGCAGA-3', β -actin R:5'-CTGCTGGA AGGTGGACACTGA-3'。提取 B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} Cre 处理组、野生型对照组肺组织 RNA,拟转录 cDNA,荧光定量 PCR 检测 Cre 表达情况。

1.3.5 肺腺瘤病理学检查

肺组织标本经取材、固定、修块、流水冲洗、脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋后,石蜡切片、HE 染色、封片。显微镜观察组织结构及细胞形态。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析,数据用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间数据对比应用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 基因鉴定结果

基因鉴定结果表明 2、13、14、16、18、19、20 基因型为 Kras^{+/+},为实验所需阳性鼠。21、22、23 为野生型对照。见图 1。

2.2 肺腺瘤小鼠血生化、血常规、尿常规指标

测定结果表明:肺腺瘤小鼠与对照组相比低密度脂蛋白胆固醇、平均血小板体积升高,且差异有显著性($P<0.01$);直接胆红素与对照组相比升高、高密度脂蛋白胆固醇与对照组相比降低,且差异有显著性($P<0.05$)。见表 3~5。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物编号 Primer number	引物序列 Primer sequence	条带大小 Strip size	引物说明 Primer description
1	GTCTGACAAGCTCATGCGGG	转基因阳性鼠:~ 600 bp	野生型 Wild type
2	CGCAGACTGTAGAGCAGCG	Transgenic positive mice:~600 bp	通用型 Common type
3	CCATGGCTTGAGTAAGTCTGC	野生型小鼠:~ 507 bp Wild type mice:~507 bp	转基因型 Transgenic type

表 2 PCR 反应体系
Table 2 PCR reaction system

试剂 Reagent	体积 Volume
2 $\times$ Taq Plus MasterMix	25 μL
ddH ₂ O	15 μL
裂解产物 Pyrolysis	4 μL
引物 2 + 引物 1 或引物 2 + 引物 3 Primer 2 + Primer 1 or Primer 2 + Primer 3	各 2 μL
合计 Total	50 μL

2.3 荧光定量 PCR 结果

荧光定量 PCR 结果显示,B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} Cre 组及野生型对照组鼻腔滴入 Cre 腺病毒的小鼠,肺组织能够表达 Cre。见图 2。

肺部腺瘤:肺部见多处肿瘤、膨胀性生长、边界清晰,瘤细胞呈立方上皮样、排列呈不规则腺管状,未见核分裂像。见图 3。

2.4 肺腺瘤造模结果

解剖取材发现 4 只阳性鼠均发现肿瘤,对照组未发现肿瘤,肿瘤数量见表 6。

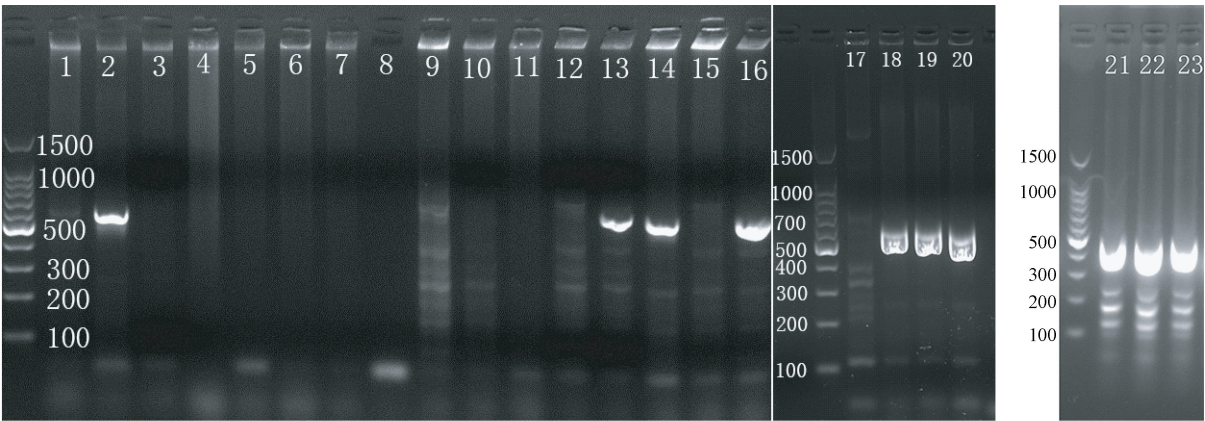


图 1 Kras 基因鉴定

Figure 1 Identification of the Kras gene

表 3 肺腺瘤小鼠血生化指标 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Blood biochemical indexes of the mouse pulmonary adenoma

测定项目 Item	肺腺瘤 Pulmonary adenoma	对照组 Control	P 值 P-value
谷丙转氨酶 Alanine aminotransferase (ALT)	26.75 ± 2.50	75.00 ± 32.79	0.13
谷草转氨酶 Aspartate aminotransferase (AST)	147.25 ± 32.90	232.00 ± 65.78	0.07
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase (ALP)	24.25 ± 16.84	24.67 ± 2.52	0.26
总蛋白 Total protein (TP)	64.50 ± 2.55	62.05 ± 1.57	0.29
白蛋白 Albumin (ALB)	33.33 ± 1.62	33.87 ± 0.55	0.57
球蛋白 Globulin (GLOB)	31.18 ± 1.56	28.63 ± 1.05	0.06
白蛋白/球蛋白 Albumin/Globulin (A/G)	1.07 ± 0.06	1.18 ± 0.03	0.04
葡萄糖 Glucose (GLU)	4.93 ± 1.90	5.27 ± 2.76	0.85
总胆固醇 Total cholesterol (TC)	1.95 ± 0.27	2.29 ± 0.18	0.10
甘油三酯 Triglycerides (TG)	1.00 ± 0.22	0.95 ± 0.11	0.76
高密度脂蛋白胆固醇 High density lipoprotein cholesterol (HDL-C)	0.97 ± 0.11	1.34 ± 0.188	0.02
低密度脂蛋白胆固醇 Low density lipoprotein cholesterol (LDL-C)	0.11 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.00
尿素氮 Urea nitrogen (BUN)	8.62 ± 0.95	9.10 ± 3.13	0.82
肌酐 Creatinine (CRE)	11.70 ± 2.62	10.70 ± 0.40	0.28
总胆红素 Total bilirubin (T-BIL)	1.38 ± 0.40	0.73 ± 0.10	0.05
直接胆红素 Direct bilirubin (D-BIL)	0.68 ± 0.15	0.37 ± 0.07	0.02
直接胆红素/总胆红素 Direct bilirubin/Total bilirubin (D/T)	0.50 ± 0.04	0.51 ± 0.06	0.81
间接胆红素 Indirect bilirubin (I-BIL)	0.70 ± 0.25	0.51 ± 0.06	0.07
肌酸激酶 Creatine kinase (CK)	1363.25 ± 711.44	1610.67 ± 499.42	0.62
尿酸 Uric acid (UA)	31.25 ± 1.26	39.00 ± 4.36	0.08

表 4 肺腺瘤血常规指标($\bar{x} \pm s$)

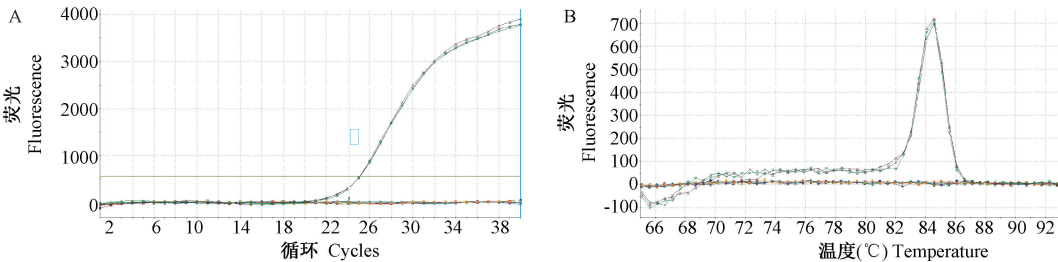
Table 4 Routine blood indexes of the mouse pulmonary adenoma

测定项目 Item	肺腺瘤 Pulmonary adenoma	对照组 Control	P 值 P-value
白细胞(10 ⁹ /L) White blood cells (WBC)	3. 48 ± 1. 28	2. 56 ± 1. 00	0. 36
中性粒细胞(10 ⁹ /L) Neutrophils (Neu)	1. 03 ± 0. 43	1. 29 ± 1. 03	0. 66
淋巴细胞(10 ⁹ /L) Lymphocytes (Lymph)	2. 43 ± 0. 89	1. 27 ± 0. 39	0. 09
单核细胞(10 ⁹ /L) Monocytes (Mon)	0. 00	0. 00	
嗜酸性粒细胞(10 ⁹ /L) Eosinophils (Eos)	0. 01 ± 0. 025	0. 00	0. 44
嗜碱性粒细胞(10 ⁹ /L) Basophils (Bas)	0. 00	0. 00	0. 44
中性粒细胞% Neutrophil% (Neu%)	29. 7 ± 4. 67	45 ± 23. 25	0. 37
淋巴细胞% Lymphocyte% (Lymph%)	69. 7 ± 4. 08	54. 83 ± 23. 29	0. 38
单核细胞% Monocyte% (Mon%)	0. 00	0. 00	
嗜酸性粒细胞% Eosinophil% (Eos%)	0. 00	0. 00	
嗜碱性粒细胞% Basophil% (Bas%)	0. 30 ± 0. 13	0. 17 ± 0. 06	0. 35
红细胞(10 ¹² /L) Red blood cells (RBC)	9. 60 ± 0. 64	9. 55 ± 0. 64	0. 86
血红蛋白(g/L) Hemoglobin (HGB)	138. 50 ± 9. 33	137. 67 ± 8. 14	0. 91
红细胞压积(%) Hematocrit (HCT)	44. 75 ± 3. 30	43. 97 ± 3. 07	0. 76
平均红细胞体积(fL) Mean corpuscular volume (MCV)	46. 40 ± 0. 81	46. 03 ± 0. 47	0. 49
平均红细胞血红蛋白量(pg) Mean corpuscular hemoglobin (MCH)	14. 40 ± 0. 18	14. 40 ± 0. 17	1. 00
平均红细胞血红蛋白浓度(g/L) Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	310. 25 ± 2. 21	313. 33 ± 2. 89	0. 17
红细胞分布宽度(%) Erythrocyte distribution width (RDW-CV)	14. 23 ± 0. 34	14. 03 ± 0. 35	0. 50
血小板(10 ⁹ /L) Platelet (PLT)	1311. 25 ± 262. 55	1049. 33 ± 59. 41	0. 16
平均血小板体积(fL) Mean platlet volume (MPV)	5. 73 ± 0. 13	5. 37 ± 0. 06	0. 01
血小板分布宽度 Platelet distribution width (PDW)	15. 10 ± 0. 06	15. 00 ± 0. 10	0. 44
血小板比容 Thrombocytocrit (PCT)	0. 75 ± 0. 15	0. 57 ± 0. 03	0. 10

表 5 肺腺癌小鼠尿常规指标($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Routine urine indexes of pulmonary adenoma mice in each mouse

测定项目 Item	肺腺瘤 Pulmonary adenoma	对照组 Control	P 值 P-value
比重 Specific gravity (SG)	1.02 ± 0.01	1.02 ± 0.01	0.52
酸碱度 pH	6.75 ± 1.19	7.5 ± 0.5	0.36
白细胞 White blood cell (WBC)	0.50 ± 0.58	0.67 ± 0.58	0.72
亚硝酸盐 Nitrite (NIT)	0.50 ± 0.58	0.67 ± 0.58	0.72
蛋白质 Protein (PRO)	0.75 ± 0.96	1.33 ± 1.53	0.56
葡萄糖 Glucose (GLU)	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.44
酮体 Ketone (KET)	1.25 ± 0.50	0.33 ± 0.58	0.07
尿胆原 Urobilinogen (URO)	0.50 ± 0.58	1.00 ± 1.00	0.44
胆红素 Bilirubin (BIL)	0.50 ± 0.58	1.00 ± 1.00	0.44
隐血 Occult blood (BLD)	0.00	0.00	



注:A:扩增曲线;B:溶解曲线。

图 2 Cre mRNA 的荧光定量 PCR 鉴定

Note. A: Amplification curve. B: Dissolution curve.

Figure 2 Quantitative PCR analysis of Cre mRNA

表 6 肺腺瘤数量($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Number of pulmonary adenomas in each mouse

小鼠序号 Serial number of mice	肿瘤数量(个) Number of tumors	肿瘤体积(mm ³) Tumor volume
1	3	7.40 ± 2.52
2	5	9.92 ± 8.27
3	5	15.07 ± 6.12
4	4	13.61 ± 5.99
平均值 Average value	4.25	10.81 ± 6.38

3 讨论

利用 B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} 小鼠鼻腔滴注 Cre 腺病毒诱导产生肺肿瘤的方式非常方便也很高效,4 只阳性鼠均产生多处肺腺瘤,平均个数 4.25 个,体

积(10.81 ± 6.38) mm³,B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} 对照组及野生型对照组均未发现肿瘤。如果延长实验周期,预计可获得肺腺癌模型。低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇负责胆固醇运输,低密度脂蛋白胆固醇负责将胆固醇转运到肝外组织细胞,高

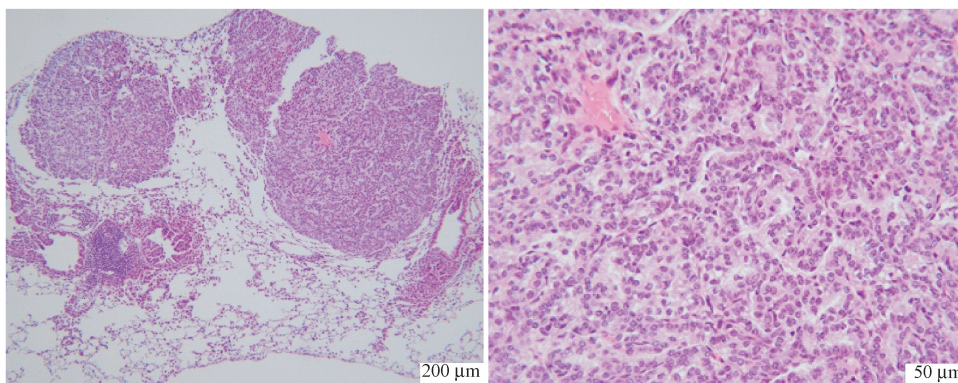


图3 肺肿瘤(HE 染色, $\times 100$ 、 $\times 400$)

Figure 3 Histology of the mouse lungs. HE staining ($\times 100$, $\times 400$)

密度脂蛋白胆固醇则相反^[5]。已经有研究报道在多个部位 HDL-C 与癌的反比例关系,其中包括肺部^[6-8]。本研究中肺腺瘤小鼠的高密度脂蛋白胆固醇比对照组低,与之前研究结果一致。Catarina Rodrigues dos Santos 等^[9]统计了 244 个乳腺癌患者,发现低密度脂蛋白胆固醇含量高的病人肿瘤更大、有更高的分化等级、更高的增生比率。本研究发现肺腺瘤小鼠低密度脂蛋白胆固醇比对照组高。胆红素主要在肝脏代谢,包括肝细胞对血液内胆红素的摄取、运载、未结合胆红素转化为结合胆红素、结合胆红素胆汁排泄等一系列相互影响的生理过程。有研究表明胆红素在肺癌中表现出抗氧化和抗肿瘤的作用^[10-11]。Song 等^[12]的研究表明低水平直接胆红素与晚期非小细胞肺癌和预后差相关,血清胆红素是非小细胞肺癌的独立预后指标。而我们的实验结果显示肺腺瘤小鼠的直接胆红素指标高于对照组,这可能是由于肺腺瘤小鼠肝脏疾病引起,具体原因有待进一步验证。

参考文献:

[1] Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, et al. The global burden of cancer: priorities for prevention [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31 (1): 100 - 110.

[2] Mitsudomi T, Viallet J, Mulshine JL, et al. Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines [J]. *Oncogene*, 1991, 6 (8): 1353 - 1362.

[3] Jackson EI, Willis N, Mercer K, et al. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras [J]. *Genes Dev*, 2001, 15 (24): 3243 - 3248.

[4] Fasbender A, Lee JH, Walters RW, et al. Incorporation of adenovirus in calcium phosphate precipitates enhances gene transfer to airway epithelia *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(1): 184 - 193.

[5] Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(2): 109 - 121.

[6] Llaverias G, Danilo C, Mercier I, et al. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(1): 402 - 412.

[7] Ahn J, Lim U, Weinstein SJ, et al. Prediagnostic total and high-density lipoprotein and risk of cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*, 2009, 18(11): 2814 - 2821.

[8] Jafri H, Alsheikh-Ali AA, Karas RH. Baseline and on-treatment high-density lipoprotein cholesterol and the risk of cancer in randomized controlled trials of lipid-altering therapy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(25): 2846 - 2854.

[9] Catarina Rodrigues dos Santos, Isabel Fonseca Sergio Dias, et al. Plasma level of LDL-cholesterol at diagnosis is a predictor factor of breast tumor progression [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 132 - 141.

[10] O'Malley SS, Wu R, Mayne ST, et al. Smoking cessation is followed by increases in serum bilirubin, an endogenous antioxidant associated with lower risk of lung cancer and cardiovascular disease [J]. *Nicotine Tob Res*, 2014, 16(8): 1145 - 1149.

[11] Temme EH, Zhang J, Schouten EG, et al. Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population [J]. *Cancer Causes Control*, 2001, 12(10): 887 - 894.

[12] Song YJ, Gao XH, Hong YQ, et al. Direct bilirubin levels are prognostic in non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(1): 892 - 900.