

孙振宇,武鸿彪,刘宁,等. 小鼠原发性肝癌模型的建立与优化 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 22-27.
Sun ZY, Wu HB, Liu N, et al. Establishment and optimization of a mouse model of primary liver cancer [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 22-27.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 004

小鼠原发性肝癌模型的建立与优化

孙振宇^{1,2}, 武鸿彪¹, 刘 宁³, 徐胤淇², 周 健², 陈雪健², 王 伟²,
徐力善², 袁旦平^{1*}

(1.宁波市第一医院,浙江 宁波 315000; 2.哈尔滨医科大学附属第四医院,哈尔滨 150001; 3.军事科学院军事医学研究院生物工程研究所,北京 100850)

【摘要】 目的 使用三种造模方法以建立小鼠的原发性肝癌模型,并比较各自的优缺点。**方法** 将 80 只 14~16 日龄的 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 4 组(低剂量 DEN 组、高剂量 DEN 组、DEN+CCl₄ 组、对照组);低剂量 DEN 组小鼠腹腔注射浓度为 25 mg/kg 的二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)染毒;高剂量 DEN 组小鼠腹腔注射浓度为 40 mg/kg 的 DEN 染毒;DEN+CCl₄ 组小鼠腹腔注射 2 mg/kg 的 DEN 染毒,两周后按 20% 浓度的四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)按 5 mL/kg 剂量腹腔注射小鼠,每周给药 2 次共 16 周;对照组不予任何处理。统计各组小鼠的生存情况,各组小鼠在造模的第 24 周集中麻醉断颈处死后剖取肝,比较各组间肝的外观、肿瘤的数目及肿瘤的发生率,并检测血清中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、高尔基体跨膜糖蛋白 73(Golgi protein 73, GP73)以及甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)的水平。**结果** 与对照组相比,三个实验组的 ALT($P<0.001$)、AST($P<0.001$)、GP73($P<0.001$)、AFP($P<0.01$)、肿瘤发生率($P<0.001$)和肿瘤数目显著增加($P<0.001$)。截止造模后的 24 周,低剂量 DEN 组小鼠死亡率为 15%,肝癌发生率为 35%;高剂量 DEN 组小鼠死亡率为 30%,肝癌发生率为 86%;DEN+CCl₄ 组小鼠死亡率为 20%,肝癌发生率为 56%;对照组小鼠全部存活且肝未发现异常。**结论** 各实验组的造模方法均可以成功进行小鼠肝癌造模,但高剂量 DEN 组表现出了明显的优势,它可以在短时间内成功的建立起高发生率且稳定的小鼠原发性肝癌模型,为小鼠肝癌造模提供了新的途径。

【关键词】 原发性肝癌;小鼠模型;二乙基亚硝胺;四氯化碳;化学诱导法
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0022-06

Establishment and optimization of a mouse model of primary liver cancer

SUN Zhenyu^{1,2}, WU Hongbiao¹, LIU Ning³, XU Yinqi², ZHOU Jian², CHEN Xuejian², WANG Wei²,
XU Lishan², YUAN Danping^{1*}

(1. Ningbo First Hospital, Ningbo 315000, China. 2. The Fourth Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Harbin 150001. 3. Institute of Bioengineering, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850)

【Abstract】 Objective To establish a model of primary liver cancer in mice using three method, and to compare their advantages and disadvantages. **Methods** Eighty male C57BL/6 mice aged 14 - 16 days were randomly divided into four groups: control, low-dose diethylnitrosamine (DEN), high-dose DEN, and DEN + carbon tetrachloride (CCl₄). Mice

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31670761)。
[作者简介] 孙振宇(1993—),男,医学硕士,住院医师。E-mail: 1105519047@qq.com
[通信作者] 袁旦平(1964—),男,教授,主任医师。E-mail: yuandanping1964@163.com

in the DEN+CCl₄ group were intraperitoneally injected with 2 mg/kg DEN, and then two weeks later CCl₄ (5 mL/kg, 20%) was intraperitoneally injected twice a week for 16 weeks. The control group was not administered any treatment. Mice in the low-dose DEN group were injected intraperitoneally with 25 mg/kg DEN, while mice in the high-dose DEN group were intraperitoneally injected with 40 mg/kg DEN. Survival curves were generated for mice in each group. Twenty-four weeks after establishing the model, mice in each group were anesthetized and sacrificed, and the liver was dissected. The appearance of liver, incidence of tumors, number of tumors, and serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), Golgi protein 73 (GP73), alpha fetoprotein (AFP) were measured. **Results** Compared with the control group, ALT ($P < 0.001$), AST ($P < 0.001$), GP73 ($P < 0.001$), AFP ($P < 0.01$), tumor incidence ($P < 0.001$), and tumor number in the three groups were significantly increased ($P < 0.001$). By 24 weeks after modeling, three mice in the low-dose DEN group had died, while six out of the 17 surviving mice developed liver cancer, **Results** ing in an incidence of 35%. In the high-dose DEN group, six mice died and 12 out of the 14 surviving mice developed liver cancer, **Results** ing in an incidence rate of 86%. In the DEN+CCl₄ group, four mice died and 9 out of the 16 surviving mice developed liver cancer, **Results** ing in an incidence rate of 56%. All mice in the control group survived and no liver abnormalities were observed. **Conclusions** The liver cancer mouse model was successfully established in all experimental groups, but the high-dose DEN group exhibited obvious advantages with regard to successful establishment of a primary liver cancer model with high incidence and stability in a short period of time. Our result provide a new method for the establishment of a liver cancer model in mice.

【Keywords】 primary liver cancer; mouse model; diethylnitrosamine; carbon tetrachloride; chemical induction

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 为肝的原发恶性肿瘤, 每年全世界上有超过 50 多万人被诊断为 HCC^[1-2], HCC 是由一系列相关病毒感染以及其他相关因素, 诸如高度酒精、糖尿病及其并发症和黄曲霉毒素暴露等引起的慢性疾病进展而来^[3-4]。HCC 的发生与发展是一个多步骤多因素的过程, 其中涉及到多种基因蛋白, 这些基因蛋白包括 p53 和 b-连环蛋白等等^[5], 它们与细胞的增殖、细胞周期的进程, 以及细胞的凋亡与侵袭有着极其密切的相关性。受到生长因子调节的信号通路^[6], 细胞分化相关通路和血管生成诱导的信号通路也可以促进 HCC 的发生与发展。另外, 相关基因的改变也可以导致 HCC 的发生。二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 是一种具备高度遗传毒性的致癌物质, 研究人员通过比较基因组学分析之后得知 DEN 所诱导的肝癌模型中的基因表达与人类肝细胞癌的患者肝组织类似^[7]。研究表明 DEN 在小鼠的体内最终可以转化成为烷基化代谢物, 此代谢物可以导致 DNA 加合物的形成, 随后转化成中间体, 促使了甲基化, DEN 的成瘤过程中最关键的是由于 DNA 中的 O6 与 N-7 甲基鸟嘌呤的形成, 使得遗传信息的改变, 形成启动致癌的细胞^[8]。合理有效的建立原发性肝癌动物模型是研究肝细胞癌发生发展及致病机制的重中之重, 目前常用的肝癌动物模型通常选用小鼠 (BALB/c、C57BL/6、ICR), 目前诱导小鼠肝癌常用化学诱导法, 采用 DEN 溶液或

DEN 与 CCl₄ 联用对小鼠腹腔注射进行肝癌建模, 此方法经济节约, 操作简便, 稳定性高, 可以避免因小鼠个体差异带来的误差, 较好的模拟了肝癌在人体中自然形成过程。而目前腹腔注射法存在诱癌时间较长的缺点。本文旨在较短的时间内, 成功建立小鼠肝癌模型, 在此基础上衡量各自的优缺点, 克服难点, 更精准更合理的进行小鼠肝癌造模, 为研究肝癌的发生与发展奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 80 只, 14~16 日龄, 体重约为 4 g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2016-0011]。饲养于军事科学院军事医学研究院生物工程研究所实验动物中心 [SYXK (军) 2016-0010], 恒温恒湿, 湿度 (60±5)%, 温度 24℃, 光照遵循昼夜节律, 每笼饲养 5 只 C57BL/6 小鼠。本实验通过哈尔滨医科大学实验动物中心和实验动物伦理委员会批准 (110052018016), 并且严格按照实验动物使用的 3R 原则给予人道主义的关怀照顾。

1.2 主要试剂与仪器

二乙基亚硝胺 (DEN, Sigma 公司); 四氯化碳 (CCl₄, Sigma 公司); 甲胎蛋白 (AFP) 与高尔基体蛋白 73 (GP73) ELISA 试剂盒 (北京热景生物技术股份有限公司)。全自动生化分析仪 (美国贝克曼库尔特公司); -80℃ 冰箱 (海尔公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验小鼠的分组及造模

将实验小鼠随机分为 4 组,每组 20 只,分别命名为低剂量 DEN 组、高剂量 DEN 组、DEN+CCl₄ 组、对照组,随后分笼饲养。低剂量 DEN 组腹腔注射 DEN(25 mg/kg)。高剂量 DEN 组腹腔注射 DEN(40 mg/kg)。DEN+CCl₄ 组腹腔注射 DEN(2 mg/kg),两周后腹腔注射 CCl₄(5 mL/kg,20%),每周给药 2 次共 16 周。对照组不予染毒处理,饲养环境及饮食饮水与实验组保持一致。在造模的第 24 周集中麻醉断颈法处死各组小鼠,剖开腹腔,取得肝样本拍照,将部分肝组织冻存于-80℃ 冰箱中备用,比较各组间肝的外观,肿瘤的发生率,及肿瘤的大小与面积占比。

1.3.2 各组实验小鼠的存活状态及存活时间的观察

各组小鼠造模后观察小鼠的存活情况,如有小鼠死亡,则详细记录死亡时间,绘制存活曲线,比较各组差异。

1.3.3 小鼠血清 ALT 和 AST 的检测

在造模的第 24 周集中麻醉断颈法处死各组小鼠,收集血液标本并置于 37℃ 温箱放置 30 min。随后将收集的小鼠血液 2000 r/min 离心 10 min 以收集足量的血清,分别取 100 μL 小鼠血清放入 EP 管中注明各组组别并送至北京武警总医院生化分析室,使用全自动生化分析仪检测。

1.3.4 小鼠血清 GP73、AFP 的检测

按照 1.3.3 方法取得足量小鼠血清,使用鼠源 GP73、AFP 的 ELISA 试剂盒,体外定量检测鼠血清中 GP73、AFP 的表达水平(酶联免疫吸附技术)。具体的操作方法严格遵循试剂盒说明书进行操作。

1.4 统计学方法

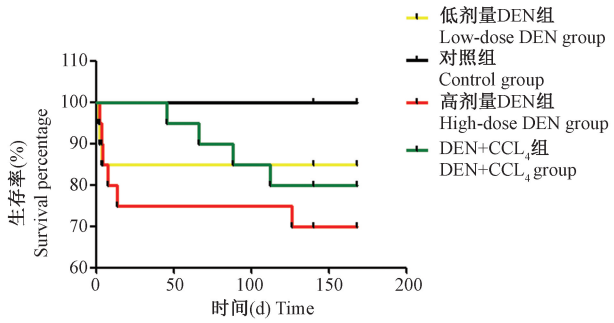
实验室数据均采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,其中生存曲线使用 Log-rank 检验进行分析;计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均使用 *t* 检验进行分析;计数资料均使用卡方检验进行分析。以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠的生存曲线统计与分析

生存曲线的统计时间为 24 周,从造模开始直至第 24 周造模结束。由图 1 可知低剂量 DEN 组与高剂量 DEN 组小鼠 DEN 染毒后造模开始的 1 周内死

亡率较高,第 2 周直至第 24 周两组小鼠几乎无死亡,而 DEN+CCl₄ 组小鼠在造模初期无死亡,直至造模第 4 周后开始呈现出较高的死亡率(*P*<0.001)。



注:各组小鼠的存活曲线比较。

图 1 各组小鼠的存活曲线

Note. Comparison of survival curves of mice in each group.

Figure 1 Survival curves of mice in each group

2.2 各组小鼠肝样本肉眼观察

在造模过程中,低剂量 DEN 组、高剂量 DEN 组、DEN+CCl₄ 组小鼠均出现食欲不振、体重下降、精神萎靡、退毛等非正常现象,而对照组的小鼠精神状态良好,毛发光亮,食欲佳。在造模的第 24 周集中麻醉断颈处死小鼠,取得肝样本并拍照,由图 2 所示,高浓度 DEN 组小鼠的肝整体可见大面积坏死,水肿,肉眼可见大量的癌结节。低浓度 DEN 组与 DEN+CCl₄ 组小鼠肝的表面较为光滑,癌结节的数量少于高剂量 DEN 组。

2.3 各组小鼠的肿瘤数目及肿瘤发生率的比较

取得各组小鼠肝样本后对肝的肿瘤数目及发生率进行分析,如图 3 所示,对照组小鼠肝无肿瘤生长,肝癌发生率为 0%,低剂量 DEN 组小鼠肝肉眼可见 9 处肿瘤,肝癌发生率为 35%,高剂量 DEN 组小鼠肝肉眼可见 9 处肿瘤,肝癌发生率为 86%,DEN+CCl₄ 组小鼠肝肉眼可见 20 处肿瘤,肝癌发生率为 56%。

2.4 各组小鼠血清 ALT、AST、AFP、GP73 的表达水平

在造模的第 24 周处死各组小鼠取得血清标本后分别对小鼠血清 ALT、AST、AFP、GP73 的表达水平进行检测。如表 1 所示,低剂量 DEN 组、高剂量 DEN 组、DEN+CCl₄ 组小鼠的血清 ALT、AST、AFP、GP73 表达水平显著高于对照组(*P*<0.001)。ALT 与 AST 可以反映出肝的炎性损伤程度,AFP 与 GP73 是肝癌的肿瘤标记物,其数值明显高于对照组均可反映出肝癌造模成功。值得注意的是 GP73 在高剂量 DEN 组小鼠的血清表达水平升高得更为明显。

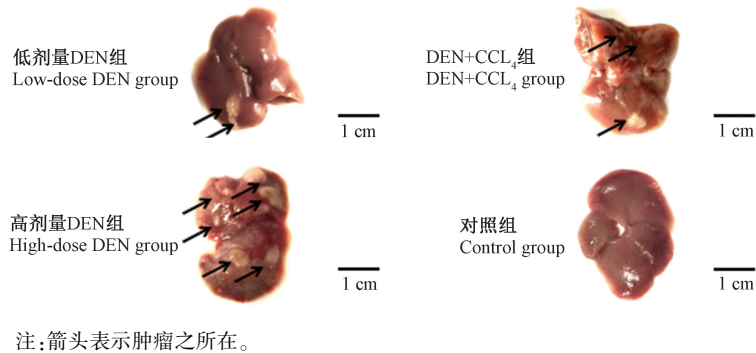
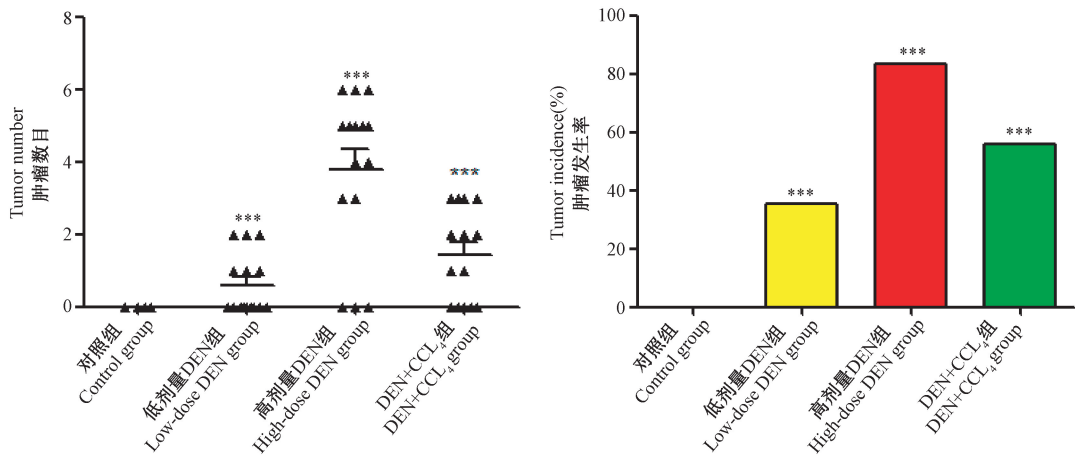


图 2 各组小鼠造模后 24 周的肝样本肉眼观察

Note. Arrows indicate the location of the tumor.

Figure 2 Visual observation of liver specimens of the mice in each group at 24 weeks after modeling



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 3 各组小鼠肿瘤数目及肿瘤发生率

Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Number of tumors and tumor incidence in each group of mice

表 1 各组小鼠血清中 ALT、AST、AFP、GP73 的表达水平($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Table 1 Serum expression levels of ALT, AST, AFP, and GP73 in each group of mice

组别 Groups	ALT (U/L)	AST (U/L)	AFP (ng/mL)	GP73 (ng/ml)
对照组 Control group	11. 32±1.92	7. 15±2.30	0. 72±0. 20	4. 10±1.06
低剂量 DEN 组 Low-dose DEN group	43. 30±1.61 ***	44. 42±2.01 ***	6. 04±0. 53 **	137. 30±14.64 ***
高剂量 DEN 组 High-dose DEN group	60. 06±5.25 ***	71. 64±6.20 ***	6. 61±0. 44 **	205. 52±9.71 ***
DEN + CCl ₄ 组 DEN + CCl ₄ group	39. 63±5.94 ***	43. 55±1.67 ***	4. 52±0. 49 **	103. 51±15.07 ***

注:与对照组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3 讨论

肝细胞癌的发生与发展是一个多步骤、多因素

的进程^[9]。在肝细胞癌中,可以观察到急、慢性肝损伤,肝的炎性病变,肝细胞的变性、再生、坏死等等与小细胞形态学相关的肿瘤癌前病变^[10]。肝细胞癌的发病率往往表现出与区域性和种族相关的

差异^[11]。一些 DNA 损伤性化学物质与细胞毒性物质被认为是肝细胞癌发生的根本原因,诸如二乙基亚硝胺(DEN),四氯化碳(CCl_4),全氟化学品,全氟辛酸,苯并芘,丙烯酰胺,膳食污染物等等^[12-14]。进行肝细胞癌的研究,建立稳定有效的动物模型是必不可少的,也是肝癌的发生发展研究的基本必要条件之一。

目前建立小鼠的肝癌模型以化学诱导法多见,其中又以二乙基亚硝胺(DEN)与四氯化碳(CCl_4)为主要的诱癌剂。使用化学诱导法造模大多选择用两周龄小鼠^[15-16],有研究指出,幼鼠的肝组织极易发生癌变,而且酶的活性会随着小鼠年龄增长,大概在 1~2 周时达峰值^[17]。由于化学诱导法建立小鼠原发性肝癌模型的时间多为 24~48 周^[18-19],故选用建模后第 24 周集中处死各组小鼠。本实验选用两种不同浓度的 DEN(25 mg/kg, 40 mg/kg)以及 DEN 与 CCl_4 联合应用进行小鼠原发性肝癌造模。DEN 与 CCl_4 联合应用的方法需每间隔一段时间进行 CCl_4 的注射,这使得造模过程过于繁琐,每一次对实验动物的注射无法保证绝对相同的剂量和与上次注射相近的实验环境。此法最终虽可成功建立小鼠原发性肝癌模型,但是肝细胞癌的形成是一个动态且持续的过程,不断的施加干扰措施会影响到小鼠肝细胞癌形成过程中的诸多指标,尤其对需要持续的进行称重、监测生存曲线、检测血清各项生化指标的动态变化实验尤为不利,加大了不稳定因素的干扰,往往使实验结果不够理想。

单独使用 DEN 建模可成功的建立肝癌模型,但是在剂量上始终没有明确的统一规定^[20],通过本实验结果可知高剂量 DEN 组(40 mg/kg)于 24 周时成瘤率可达 86%,而低剂量 DEN 组与 DEN+ CCl_4 组于 24 周的成瘤率分别为 35%与 56%,结果表明高剂量的 DEN(40 mg/kg)可以更快速稳定的建立小鼠原发性肝癌的模型。前文数据可知本次实验高剂量 DEN 组小鼠死亡率达 30%,由于 DEN 本身的急性肝毒性较大,对于幼鼠在造模的早期易使其夭折并可致更高的死亡率,故采取本法需要准备足量的小鼠进行造模,最大限度的减少由于造模初期存在的高死亡率所造成的实验误差。单独使用 DEN 并在 25 mg/kg 的基础上增加剂量到 40 mg/kg 建立小鼠肝癌模型,此法虽有不足之处,但是其优势较低剂量 DEN(25 mg/kg)与 DEN+ CCl_4 联合使用更加突出,主要在于更快速的建立小鼠原发性肝癌模型,

大幅度的缩短了实验时间,一次注射之后避免了后续的再次注射染毒操作,使得实验难度降低的同时也使得模型建立的过程比较平稳,无过多的外界干扰因素,尤其是对于需要进行在造模过程中动态监测小鼠血清生化指标的实验极具优势,可以最大限度的避免实验误差,使得实验结果更为理想。有研究认为 GP73 是肝癌最有价值的标志之一,并通过多种途径参与肝癌的发展^[21]。GP73 也在胆囊癌,胰腺癌,肺癌,膀胱癌和其他癌症中高表达,GP73 的高表达和预后不良与种种恶性生物学行为(如肿瘤大小、侵袭、迁移)密切相关^[22-24]。由此可知 GP73 相对于 AFP 具有更高的敏感性,对于肝癌手术的预后的评估,GP73 也表达出更精准的可靠性^[25]。因此,本实验检测了小鼠血清 GP73 的表达水平,值得注意的是,高剂量(40 mg/kg)DEN 组的小鼠血清 GP73 的升高水平尤为明显,这也间接的反映出了高剂量(40 mg/kg)DEN 建立的小鼠原发性肝癌模型更具说服力。

综上,高剂量(40 mg/kg)DEN 建立小鼠原发性肝癌模型简单易行,造模时间短,肿瘤发生率及肝癌的严重程度更高,这为进一步研究肝癌的发生与发展提供了更为合理有效的动物模型。

参考文献:

- [1] Akira A, Yusuke T, Hideko O, et al. Host antitumor resistance improved by the macrophage polarization in a chimera model of patients with HCC [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(4): e1299301.
- [2] Demetrios M, Amir A R, Zhang XF, et al. Program death-1 immune checkpoint and tumor microenvironment in malignant liver tumors [J]. *Surg Oncol*, 2017, 26(4): 423-430.
- [3] Wang S, Zhang HJ, Wang H, et al. A novel multidimensional signature predicts prognosis in hepatocellular carcinoma patients [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11610-11619.
- [4] Lee MS, Haeyong K, Yun MJ, et al. Cancer metabolism as a mechanism of treatment resistance and potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma [J]. *Yonsei Med J*, 2018, 59(10): 1143-1149.
- [5] Barbara S, Deike S, Miriam S, et al. Improvement of clinical management and outcome in hepatocellular carcinoma nowadays compared with historical cohorts [J]. *Eur J Gastroen Hepat*, 2018, 30(12): 1422-1427.
- [6] Wu DD, Liu SY, Gao YR, et al. Tumour necrosis factor- α -induced protein 8-like 2 is a novel regulator of proliferation migration and invasion in human rectal adenocarcinoma cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(3): 1698-1713.
- [7] Zhao Z, Zhong L, He K, et al. Cholesterol attenuated the

- progression of DEN-induced hepatocellular carcinoma via inhibiting SCAP mediated fatty acid de novo synthesis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 509(4): 855-861.
- [8] Sharma V, Janmeda P, Paliwal R, et al. Antihepatotoxic activity of *Euphorbia nerifolia* extract against *N*-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in mice [J]. J Chin Integr Med, 2012, 10(11): 1303-1309.
- [9] Berasain C. Hepatocellular carcinoma and sorafenib: too many resistance mechanisms [J]. Gut, 2013, 62(12): 1674-1675.
- [10] Fabio B, Gaya S, Matthew M, et al. Surgical management of intrahepatic cholangiocarcinoma in patients with cirrhosis: Impact of lymphadenectomy on Peri-operative outcomes [J]. World J Surg, 2018, 42(8): 2551-2560.
- [11] Castera L. Liver stiffness and hepatocellular carcinoma: liaisons dangereuses? [J]. Hepatology, 2009, 49(6): 1793-1794.
- [12] Zhao L, Zhang YJ, Zhang YB, et al. Long noncoding RNA CASC2 regulates hepatocellular carcinoma cell oncogenesis through miR-362-5p/Nf- κ B axis [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(10): 6661-6670.
- [13] Scott MT, Matthew RC, Danielle E, et al. Heat stress-induced PI3K/mTORC2-dependent AKT signaling is a central mediator of hepatocellular carcinoma survival to thermal ablation induced heat stress [J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162634.
- [14] Jang JW, Song Y, Kim KM, et al. Hepatocellular carcinoma-targeted drug discovery through image-based phenotypic screening in co-cultures of HCC cells with hepatocytes [J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 810.
- [15] Hsu SH, Wang B, Kutay H, et al. Hepatic loss of miR-122 predisposes mice to hepatobiliary cyst and hepatocellular carcinoma upon diethylnitrosamine exposure [J]. Am J Pathol, 2013, 183(6): 1719-1730.
- [16] Uehara T, Pogribny IP, Rusyn I. The DEN and CCl₄-induced mouse model of fibrosis and inflammation-associated hepatocellular carcinoma [J]. Pharmacology, 2014, 66: 14.30.1-10.
- [17] 何晓东, 邹一贺, 黎冰林, 等. 不同配方饲料对 DEN 诱导小鼠肝癌模型建立的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(3): 306-310.
- [18] Yang N, Fu Y, Zhang HB, et al. LincRNA-p21 activates endoplasmic reticulum stress and inhibits hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2015, 6(29): 28151-28163.
- [19] Wu C, Chen WY, Fang M, et al. Compound Astragalus and Salvia miltiorrhiza extract inhibits hepatocellular carcinoma progression via miR-145/miR-21 mediated Smad3 phosphorylation [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 231: 98-112.
- [20] 赵彤, 李柏. 二乙基亚硝胺在小鼠诱发性肝癌模型中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(1): 76-80.
- [21] Yang X, Wei C, Liu N, et al. GP73, a novel TGF- β target gene, provides selective regulation on Smad and non-Smad signaling pathways [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019, 1866(4): 588-597.
- [22] Jiang K, Shang S, Li W, et al. Multiple lectin assays for detecting glyco-alteration of serum GP73 in liver diseases [J]. Glycoconj J, 2015, 32(9): 657-664.
- [23] Li B, Li BA, Guo TS, et al. The clinical values of serum markers in the early prediction of hepatocellular carcinoma [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 5358615.
- [24] Cao Z, Li Z, Wang Y, et al. Assessment of serum Golgi protein 73 as a biomarker for the diagnosis of significant fibrosis in patients with chronic HBV infection [J]. J Viral Hepatitis, 2017, 24(Suppl 1): 57-65.
- [25] Wu Y, Ma J, Wang YP, et al. Development of an alpha-fetoprotein and Golgi protein 73 multiplex detection assay using xMAP technology [J]. Clin Chem, 2018, 482: 209-214.

[收稿日期] 2019-04-13