

张梅,洪泽宣,邹昕羽,等. 利用二乙基亚硝胺联合处理 *N*-亚硝基吗啉和 2/3 肝部分切除方法改良的大鼠中晚期肝癌模型[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 638-644.

Zhang M, Hong ZX, Zou XY, et al. A modified rat model for advanced hepatocellular carcinoma treated by *N*-diethylnitrosamine combined with *N*-nitrosomorpholine and two-thirds partial hepatectomy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 638-644.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.05.008

利用二乙基亚硝胺联合处理 *N*-亚硝基吗啉和 2/3 肝部分切除方法改良的大鼠中晚期肝癌模型

张梅¹,洪泽宣¹,邹昕羽¹,王剑¹,王自力¹,李晓清²,金美兰^{1*}

(1. 西南大学动物科技学院,重庆 400715; 2. 重庆市中医院肿瘤科,重庆 400021)

【摘要】 目的 为建立适用于癌症研究的实验周期短、死亡率低、建模成本低和可转移的中晚期肝癌模型,对现有的方法进行了改良。方法 实验开始时给所有的动物腹腔注射 200 mg/kg DEN,同时第 1 组和第 2 组动物分别用含 40、80 ppm NMOR 染毒水饲养,对应时间分别为 20 周和 10 周。第 3 组动物采用灌胃方法给药 0.8 mg/kg 的 NMOR,持续 17 周。为了增强细胞增殖活性,第 1 组和第 3 组动物在第 2 周结束时进行了 2/3 肝部分切除术。另外,NMOR 的处理结束后第 2 组和第 3 组的动物需继续饲养 7 周。结果 第 1 组在第 20 周时肝肿瘤发病率和生存率分别为 10% 和 100%。第 2 组在第 17 周时肝肿瘤发病率为 35%,生存率为 76%。第 3 组在第 24 周时肝肿瘤发病率为 100%,生存率为 55%,肺转移率为 55%。然而,第 3 组直到第 20 周为止,其生存率为 100%。结论 腹腔注射 DEN,并进行 2/3 肝部分切除术及使用 0.8 mg/kg 的 NMOR 灌胃 17 周的方法,可在 20 周内建立生存率高、发病率高、后期可出现转移灶的中晚期肝肿瘤模型。该建模方法具有肝癌发病率高、模型生存率高和后期出现转移灶的优点,可为肝癌防治及机理研究提供理想的模型。

【关键词】 中晚期肝癌;动物模型;二乙基亚硝胺;*N*-亚硝基吗啉

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 05-0638-07

A modified rat model for advanced hepatocellular carcinoma treated by *N*-diethylnitrosamine combined with *N*-nitrosomorpholine and two-thirds partial hepatectomy

ZHANG Mei¹, HONG Zexuan¹, ZOU Xinyu¹, WANG Jian¹, WANG Zili¹, LI Xiaoqing², JIN Meilan^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China.

2. Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021)

Corresponding author: JIN Meilan. E-mail: meilan0622@swu.edu.cn

【Abstract】 Objective We aimed to improve an existing modeling method to establish an experimental model suitable for cancer research with short experimental period, low mortality, and modeling cost for metastasis. **Methods** Animals were injected intraperitoneally with 200 mg/kg *N*-diethylnitrosamine (DEN) at the beginning of the experiment. All animals in the first and second groups were given 40 or 80 ppm *N*-nitrosomorpholine (NMOR) via drinking water for 20 or 10 weeks. Animals in a third group were given 0.8 mg/kg NMOR via gavage for 17 weeks. Animals in the second and

【基金项目】中央高校基本业务费(XDJK2016B019)。

Funded by Research Funds for Central Universities(XDJK2016B019)。

【作者简介】张梅(1992—),女,在读硕士研究生,研究方向:中药抗癌作用机制研究。Email: 1304549950@qq.com

【通信作者】金美兰(1976—),女,教授,研究方向:中药抗癌作用机制及毒性病理学研究。Email: meilan0622@swu.edu.cn

third groups were fed for 7 weeks following the NMOR treatment. All animals in the first and third groups were subjected to two-thirds partial hepatectomy (PH) to enhance cell proliferation activity at the end of the second week after DEN treatment. **Results** The first group had a liver tumor incidence of 10%, a survival rate of 100%, and a lung metastasis rate of 0% at 20 weeks. The second group had a liver tumor incidence of 35%, a survival rate of 76%, and lung metastasis rate of 0% at 17 weeks. The liver tumor incidence was 100% in the third group. The survival rate was 100% or 55% at 20 or 24 weeks. The lung metastasis rate was 55%. **Conclusions** Overall, these result suggest that modeling method such as intragastric administration of 0.8 mg/kg NMOR for 17 weeks after intraperitoneal injection of 200 mg/kg DEN and a two-thirds PH can effectively establish an advanced liver tumor model with a high survival rate and morbidity in 20 weeks. In addition, metastases can appear at the later stages. This modeling method has several advantages, such as high incidence of hepatocellular carcinoma, high model survival rate, and late-stage metastasis. This could be an ideal model for research on the prevention and mechanism of hepatocellular carcinoma.

【Keywords】 advanced liver tumor; animal model; *N*-diethylnitrosamine; *N*-nitrosomorpholine

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肝细胞癌(肝癌,HCC)是临床上常见的恶性肿瘤之一。根据 2018 年统计报道,肝癌的发病率为 4.7%,而死亡率为 8.25%,我国在亚洲地区肝癌的发病率高达 46.7%^[1-2],然而人类日常生活中接触的致癌剂中有 60%会导致肝癌,且发现时 60%以上的病例已进入中晚期。尽管在早期诊断和治疗肝癌方面已有一些进展,但是肝癌的死亡率还是居高不下,而且死亡原因大部分都是由于晚期肝癌的转移^[2-3]。因此,研究开发预防及治疗中晚期肝癌的有效方法迫在眉睫。然而研究抗癌药物的筛选及抗癌机制的研究离不开有效的动物模型。

建立与人类肝癌发病机制相似,并接近临床的动物模型,不但对肝癌的发病机制的研究有重要意义,而且有利于抗癌药物的开发研究。大鼠肝癌模型一般有诱导型、移植型和转基因动物肿瘤模型三种,其中诱导型肝癌模型在诱发原因、发展过程以及转移途径最接近临床^[4-5]。2004 年,Hiroko 等^[6]利用 100 mg/kg 二乙基亚硝胺(DEN)和 40、80 ppm *N*-亚硝基吗啉(NMOR)联合诱导的方法在 F344 大鼠建立了肺转移的 HCC 动物模型,但是该方法有周期较长且死亡率较高的缺点。另外,2007 年,Hokaiwado 等^[7]使用 100 mg/kg DEN 和 40 ppm NMOR 联合诱导的方法在 Tg SD 大鼠建立了中晚期肝癌,但是该方法使用了转基因动物造模成本较高,且造模时间也长,不适用于一般科研。目前国际上已有以多阶段致癌假设为基础的二乙基亚硝胺(DEN)联合肝部分切除(partial hepatectomy,PH)法,可以在短时间内建立早期肝癌模型。另外,利用大鼠建立肝癌模型,虽然不允许像小鼠模型那样进行基因操作^[8],但是在大鼠中比在小鼠中更容易执行诸科手术等特定治疗。适用于通过超声对

HCC 的发展进行无创监测。此外,HCC 大鼠模型与人类 HCC 的组织病理学进展高度相似,对于鉴定有效的抗癌治疗具有重要价值^[9]。因此为了开发实验周期较短、死亡率低、造模成本低、且适用于肝癌研究的动物模型,在现有造模方法的基础上结合 DEN + PH 法进行了优化和改进,探索了建立可转移的中晚期肝癌模型的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 周龄的 SPF 级 SD 雄性大鼠 61 只,购自重庆市中药研究所【SCXK(渝)2018-0003】,体重(100 ± 20)g。所有大鼠饲养于空调动物房【SYXK(渝)2017-0019】,昼夜明暗交替时间为 12 h/12 h,温度 22 ~ 26°C,相对湿度 40% ~ 70%,每笼饲养 2 ~ 3 只。所有操作符合西南大学实验动物伦理审查委员会(IACUC-20170206-03)的要求,所有的动物实验均严格按照实验动物 3R 原则进行。

1.1.2 主要试剂与仪器

二乙基亚硝胺(*N*-nitrosodiethylamine, DEN)和 *N*-亚硝基吗啉(*N*-nitroso-morpholine, NMOR)均购置于上海化成工业发展有限公司。伊红、苏木素、甲醛等均购置于成都市科龙化工试剂厂。切片机(Leica RM2235,德国)、展片机(Leica HI1210,德国)、烘片机(Leica HI1220,德国)、光学显微镜(Olympus BX53,日本)、组织包埋机(浙江科迪 KD-BMIII,中国)。

1.2 方法

61 只 SPF 级 SD 大鼠,经 1 周适应性喂养后随机分为三组:第 1 组,16 只;第 2 组,30 只;第 3 组,

15 只。实验第 1 天所有动物均腹腔注射 200 mg/kg 的 DEN,同时第 1 组动物自由饮用含 40 ppm NNOR 染毒水共 20 周,第 15 周随机解剖 5 只 SD 大鼠,第 20 周结束后解剖剩余的动物。在第 2 组, DEN 处理后动物自由饮用含 80 ppm NMOR 的染毒水 1 周之后停药 1 周,再给含 40 ppm NMOR 的染毒水两周,第 5 周开始恢复 80 ppm 的 NMOR 染毒水,直到第 10 周,从第 11 周开始停止给药直到 17 周结束。在第 10 周随机解剖 3 只大鼠,第 17 周结束时解剖了剩余的动物。在第 3 组, DEN 处理后动物每天灌胃给药 0.8 mg/kg NMOR 共 17 周,从第 18 周开始停止给药直到 24 周结束。为了增强细胞增殖活性在第 2 周结束时给第 1 组和第 3 组动物实施了 2/3 肝部分切除术(见图 1)。实验过程中观察记录了动物的临床状态、体重、摄水量。解剖时,动物使用 2.5% 的异氟烷深度吸入麻醉后腹主动脉放血处死,采取肝和肺称重,同时采取其余脏器拍照记录眼观变化后置于 10% 中性福尔马林溶液固定,并进行 H&E 染色和病理组织学检查。

1.3 统计学分析

所有数据均用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

对眼观变化和病理组织学检查结果使用费舍尔精确检验(fisher exact test)比较组间差异,并以 $*P < 0.05$ 表示差异具有显著性, $**P < 0.01$ 为差异极具有显著性。

2 结果

2.1 临床状态、体重及脏器重量

从第 6 周开始各组动物均开始出现脱毛现象,第 2 组、第 3 组动物脱毛较严重。第 3 组动物解剖时相对肝重量比第 1、2 组略增加(见表 1)。

2.2 生存率

实验过程中,第 1、3 组因手术处理分别死亡 1、3 只动物,第 3 组 1 只动物因实验操作不当死亡。整个实验期间第 1 组未出现药物引起的动物死亡,生存率为 100%;第 2 组因药物的急性毒性从第 3 周到第 8 周陆续出现 7 只动物死亡,死亡动物解剖可见大量腹水,第 9 周生存率 77% 直到实验结束为止;第 3 组除上述原因死亡 1 只动物外,从给药结束到第 20 周生存率为 100%,之后 21 周到 24 周的生存率依次为 91%、73%、64%、55%(见图 2),且后期动物死亡的原因均是肝癌的形成。

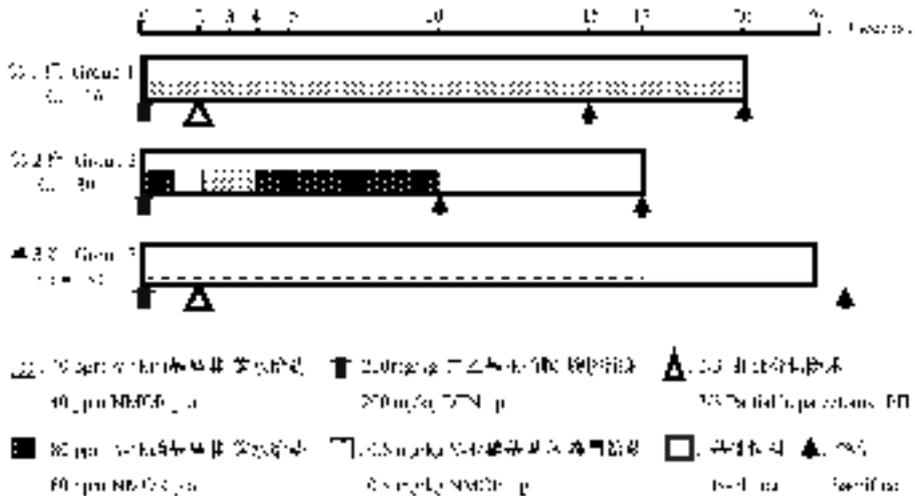


图 1 动物实验设计

Figure 1 Experimental design

表 1 最终体重和肝重量

Table 1 Body and liver weights

组别 Groups	实验周期 Weeks	动物数量 Number of animals	体重 Final body weight (g)	绝对重量 Absolute (g)		相对重量 Relative (g/100 g B.W.)	
				肝 Liver	肺 Lung	肝 Liver	肺 Lung
第 1 组 Group 1	20	10 ^a	410.80 \pm 44.50	11.70 \pm 4.40	-	2.80 \pm 0.90	-
第 2 组 Group 2	17	20	455.40 \pm 41.80	15.20 \pm 1.84	1.80 \pm 0.15	3.30 \pm 0.44	0.39 \pm 0.02
第 3 组 Group 3	24	6	479.70 \pm 39.50	23.19 \pm 11.60	2.18 \pm 0.36	4.83 \pm 2.50	0.46 \pm 0.11

注:a:最终解剖动物数。

Note. a, The final number of anatomic animals.

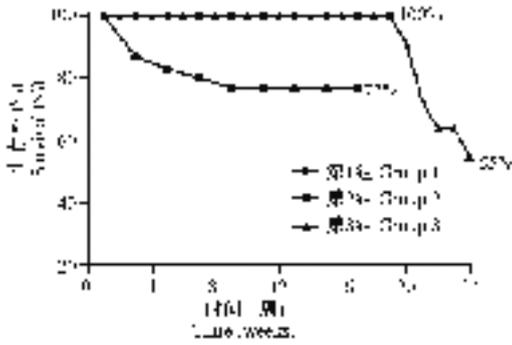


图 2 生存率曲线

Figure 2 Survival curves

2.3 眼观变化

解剖过程中可见动物肝肥大、增生性结节、质地硬化、表面凹凸不平,出血点或出血斑;肺有出血点或出血斑,结节;脾肥大等病变(见表 2)。

在第 1 组,第 15 周各脏器均无明显的病理变化(图 3A、3B),第 20 周肝肿大,表面凹凸不平,个别动物肺表面有轻微的点状出血(图 3C、3D),两只动物出现脾肿大。在第 2 组,第 10 和 17 周均可见,肝表面凹凸不平,有出血斑和大小不等的白色结节(图 3E、3G),且白色结节的发病率达到 60%与第 1 组相比有显著差异($P < 0.05$)。少数肺表面可见轻微点状出血(图 3F、3H),1 只动物可见脾肿大。在第 3 组,实验期间死亡或解剖的动物均可见肝表面凹凸不平、质地硬,有出血斑和直径约 2 ~ 3 cm 不等的灰白色结节,结节

的发病率达到 100%与第一组相比有极显著差异($P < 0.01$)。肺表面可见出血斑(图 3I、3J)发病率为 83%与第 1 组和第 2 组相比均有极显著差异($P < 0.01$),两只动物可见脾肿大。

2.4 病理组织学检查

在第 1 组,第 15 周和 20 周解剖动物的肝均出现肝细胞空泡变性、纤维结缔组织增生,而 20 周时这些变化更明显,形成假小叶,并且出现变异细胞灶发病率为 90%(图 4A),仅 1 只动物中发现肝癌发病率为 10%(表 3)。肺组织结构无明显病理变化(图 4D)。在第 2 组,第 10 周和 17 周解剖的动物的肝分别可见 67%和 65%的变异细胞灶,另外 17 周动物腺瘤的发病率为 25%(图 4B)。第 10 周解剖时有 1 只动物形成肝癌,第 17 周解剖时有两只动物形成肝癌,除前期因急性毒性而死亡的动物外,发生率分别为 33%和 10%(表 3)。肺出现少量出血,但未见转移灶(图 4E)。在第 3 组,第 24 周时肝可见变异细胞灶,腺瘤以及细胞和结构异型性强,有大量的核分裂像的肝癌(图 4C)等不同阶段的肿瘤性病变,肿瘤发生率为 100%,肝癌发病率为 91%与第 1 组和第 2 组相比有极显著差异($P < 0.01$)(表 3)。肺组织还可见肝癌的转移灶,转移率为 55%(表 3),与第 1 组和第 2 组相比有显著或极显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。此外,肺还可见出血、间质性肺炎和肺腺瘤。

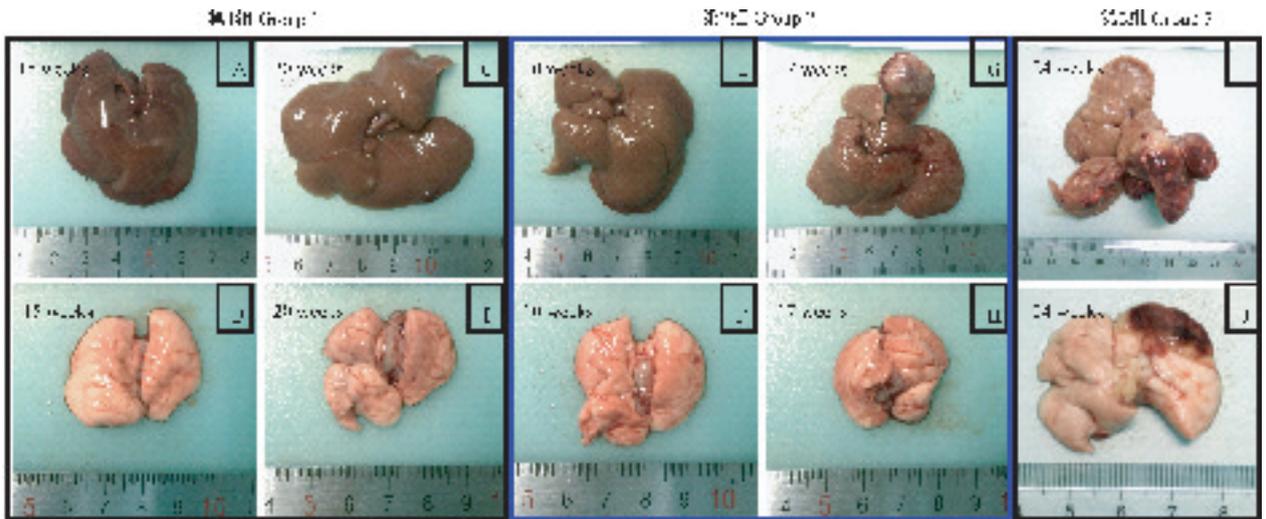
表 2 眼观变化

Table 2 Macroscopic observations

组别 Groups	实验周期 Weeks	动物数量 Number of animals	肝 Liver				肺 Lung		脾 Spleen
			肥大 Hypertrophy	表面凹凸不平 Surface roughness	出血点或出血斑 Petechia or ecchymosis	结节 Nodule	结节 Nodule	出血点或出血斑 Petechia or ecchymosis	肿大 Swelling
第 1 组 Group 1	20	10 ^a	1 ^b (10% ^c)	3(30%)	0	1(10%)	0	1(10%)	2(20%)
第 2 组 Group 2	17	20	3(15%)	15(75%)	4(20%)	12(60%)*	1(5%)	1(5%)	1(5%)
第 3 组 Group 3	24	6	1(17%)	6(100%)	3(50%)	6(100%)*	1(17%)	5(83%)* ^{##}	2(33%)

注:a:最终解剖动物数;b:发病数;c:发病率;与第 1 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与第 2 组比较,^{##} $P < 0.01$ 。

Note. a, The final number of anatomic animals. b, The number of animals. c, Incidence of lesions. Compared with the Group 1, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the Group 2, ^{##} $P < 0.01$.



注:A、B:15周时,第1组动物肝和肺,无明显病变;C、D:20周时,第1组动物肝有白色结节,肺有暗红色出血斑;E、G:10和17周时,第2组动物肝表面粗糙、质地硬,有出血点和白色结节;F、H:第10和17周时,第2组动物肺可见轻微点状出血;I、J:24周时,第3组动物肝表面凹凸不平、有出血斑和灰白色结节,肺可见大面积出血斑。

图3 眼观变化图片

Note. A, B, The liver and lung in the Group 1 showed no obvious change at 15 weeks. C, D, White nodules and Surface roughness in the liver and petechial in the lungs observed in the Group 1 at 20 weeks. E, G, The liver in the Group 2 was rough and hard at 10 and 17 weeks. In addition, there are petechia and white nodules. F, H, The lungs in the Group 2 observed slight petechia at 10 and 17 weeks. I, J, The liver in the Group 3 was rough at 24 weeks. In addition, there were petechia and gray nodules. In addition, there was observed ecchymosis in the lung.

Figure 3 Macroscopic observation photograph

表3 肝和肺的病理组织学检查

Table 3 Histopathological findings in the liver and lung tissue

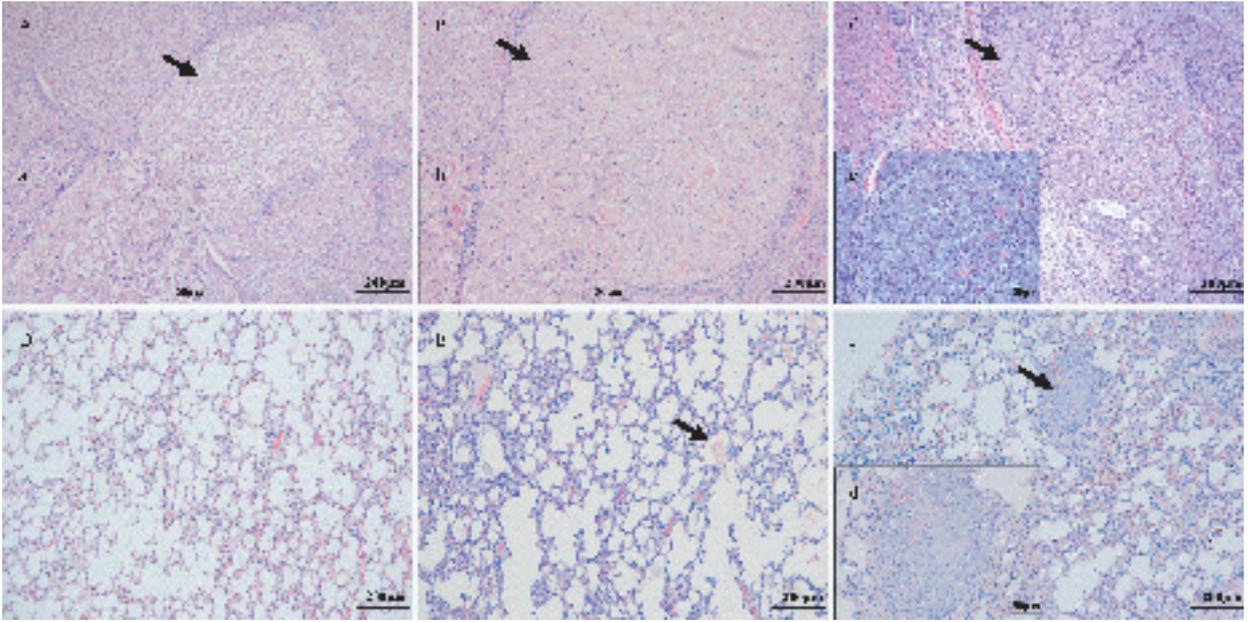
组别 Groups	实验周期 Weeks	动物数量 Number of animals	肝 Liver			肺 Lung
			变异细胞灶 Altered cell foci	腺瘤 Adenoma	癌 Carcinoma	转移灶 Metastasis
第1组 Group 1	15	5 ^a	0	0	0	0
	20	10	0	1 ^b (10% ^c)	0	0
第2组 Group 2	10	3	0	1(33%)	0	0
	17	20	5(25%)	2(10%)	0	0
第3组 Group 3	24	11	1(9%)	10(91%) ^{####}	6(55%) ^{###}	6(55%) ^{###}

注:a:表示解剖动物数;b:表示出现病变的动物数量;c:表示病变发病率;与第1组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与第2组比较,^{##} $P < 0.01$ 。
Note. a, The number of anatomic animals. b, The number of animals with histopathological lesions. c, The incidence (%) of histopathological lesions. Compared with the Group 1, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the Group 2, ^{##} $P < 0.01$.

3 讨论

之前,Hiroko等^[6]、Hokaiwado等^[7]利用遗传毒性致癌物DEN和NMOR制造过中晚期肝癌模型,但是这些方法有实验周期长,死亡率高,成本高等的缺点,不适合用于一般研究。DEN是一种N-亚硝基类化合物,是遗传毒性致癌物,因诱癌效果稳定,周期相对较短常用于诱导肝癌^[10-11]。NMOR是IARC公布的2B类致癌药物,在烟熏制食品中存在较多,会引起动物器官和组织肿瘤^[12-13]。DEN诱导肝癌模型与人类肝癌的发病经过比较相近,呈现阶段性进展、分期明显,但是其肝外转移率很低,因此

常与遗传毒性或非遗传毒性致癌物联合使用,诱导形成高转移性肝癌模型^[14-15]。PH法是Ito等^[16-18]开发的增强细胞增殖活性,加快制造肝癌时间的一种方法。因此,为了建立接近临床,符合一般研究需求的中晚期肝肿瘤模型,联合应用两阶段致癌方法及肝部分切除术法,在现有的建模方案的基础上提出了三种不同的修改方案。方案一:增加DEN的给药剂量,再加入肝部分切除术从而加快造模时间的方法。方案二:增加DEN的给药剂量的同时使用两种不同剂量NMOR的联合给药方式。方案三:增加DEN给药剂量的同时改变NMOR的给药方式,并再加入肝部分切除术的方法。



注:A/a;第1组动物肝组织的伴随这空泡变性的变异细胞灶($10\times/40\times$);B/b;第2组动物肝组织的腺瘤($10\times/40\times$);C/c;第3组动物肝组织的细胞异型性强,核分裂像多的肝细胞癌($10\times/40\times$);D;第1组动物肺组织无明显变化($10\times$);E;第2组动物肺组织少量的肺出血($10\times$);F/d;第3组动物肺组织中有明显的肝癌转移灶($10\times/40\times$)。

图4 代表性肝肿瘤性病变的病理组织学图片

Note. A/a, An altered cell foci of the liver in the Group 1 with vacuolation($10\times/40\times$). B/b, An adenoma of the liver in the Group 2($10\times/40\times$). C/c, A carcinoma of the liver in the Group 3($10\times/40\times$). D, The lung of animals in the Group 1 showed no obvious change($10\times$). E, The lung of animals in the Group 2 showed pulmonary hemorrhage($10\times$). F/d, The lung tissues of animals in the Group 3 showed metastasis foci of hepatocarcinoma($10\times/40\times$).

Figure 4 Microphotographs of representative liver tumors

结果表明,方案一:200 mg/kg 的 DEN 联合 40 ppm 的 NMOR 在 20 周内可以建立有变异细胞灶的早期肝癌模型,但不能建立有腺瘤或癌的中晚期肝癌模型,其存活率为 100%。方案二:200 mg/kg DEN 联合 40、80 ppm 的 NMOR 间断性饮水给药 10 周饲养 17 周的方法,可建立 35% 的动物形成腺瘤和癌的中晚期肝癌模型,但是给药前期会出现大量的急性毒性引起动物的死亡。方案三:200 mg/kg DEN 联合 0.8 mg/kg NMOR 连续灌胃给药 17 周饲养 24 周,并加入肝部分切除术的方法,可以建立肝腺瘤及癌发病率为 100%,最终生存率 55%,并且肺转移率 55% 的中晚期肝癌。由此可见,方案三不仅在肝癌发病率及肺转移率上显著高于前两种方案,而且到给药结束为止有稳定的生存率,适合利用与建立中晚期肝肿瘤模型。方案一:虽然生存率高,但是致癌率低,大部分的病变是早期肝癌的变异细胞灶,适用于初探药物对肝肿瘤形成初级阶段的作用效果及预防效果的研究。方案二:癌发病率较低,没有肺转移,且前期可出现急性毒性死亡动物造模方法不稳定,因此不适合应用于中晚期肝癌模型建立。另外,

方案三与 Hiroko 等^[6]利用 100 mg/kg DEN 和 80 ppm NMOR 联合给药 24 周的方法在 F344 大鼠上建立的生存率 57%,致癌率 100%,转移率 55% 的建模方法相比,虽然生存率略低,但是给药周期为 17 周较短,且给药期间除了人为的原因以外没有出现死亡动物,因肿瘤引起的死亡均在 20 周后,20 周为止的生存率为 100%。这些结果说明给药结束时大鼠肝中已形成后期可转移的腺瘤及癌,该方法不仅显著缩短了给药周期,而且显著提高了生存率。与 Hokaiwado 等^[7]的利用转基因大鼠,实验周期为 28 周的肝癌发病率 100%,转移率 60% 的方法相比,虽然肝癌发病率和转移率略低,但是本建模方法使用非转基因大鼠可大大降低造模成本,且实验周期较短。由此可见,方案三不仅实验周期短,致癌率及转移率高,建模成本低适合应用于一般的科学研究。

总之,本实验使用两阶段致癌方法及肝部分切除术法对现有的造模方法进行了改良,探索了建模时间较短,发病率和生存率高,稳定性强的中晚期肝肿瘤模型方法。实验结果显示,200 mg/kg DEN 联合 0.8 mg/kg NMOR 连续灌胃给药 17 周,并加入

PH 的方法,能在 20 周内建立肝腺瘤及癌发病率 100%,生存率 100%,后期还可出现转移的中晚期肝肿瘤模型。该方法不仅造模时间短,造模效果较稳定,且造模成本低,为肝癌防治及机理研究提供理想的模型。

参 考 文 献(References)

[1] Freddie B, Jacques F, Isabelle, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[2] 王宁,刘硕,杨雷,等. 2018 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗杂志, 2019, 5(1): 87-97.
Wang N, Liu S, Yang L, et al. Interpretation on the report of Global Cancer Statistics 2018[J]. J Mult Cancer Man, 2019, 5(1): 87-97.

[3] Lee JW, Stone ML, Porrett PM, et al. Hepatocytes direct the formation of a pro-metastatic niche in the liver [J]. Nature, 2019, 567(7747): 249-252.

[4] 杨富春,郑树森,蒋天安. 改良法大鼠原发性肝癌模型的建立[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(23): 2018-2020.
Yang FC, Zheng SS, Jiang TA. Establishment of a modified rat model of primary liver cancer[J]. Natl Med J Chin, 2004, 84(23): 2018-2020.

[5] 金星林,千昌石,杜希臣,等. 改良法建立大鼠原发性肝癌变模型与病理形态学研究[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(17): 2593-2596.
Jin XL, Qiang CS, Du XC, et al. Pathologic and morphologic study on modified DEN-induced hepatocarcinoma model in rats [J]. Chin J Mod Med, 2009, 19(27): 2593-2596.

[6] Hiroko Y, Mitsuru F, Man CY. Modification of an *in vivo* lung metastasis model of hepatocellular carcinoma by low dose n-nitrosomorpholine and diethylnitrosamine[J]. Clin Exp Metastas, 2005, 22(5): 441-447.

[7] Hokaiwado N, Asamoto M, Futakuchi M, et al. Early and late stages of hepatocarcinogenesis are enhanced in Cx32 dominant negative mutant transgenic rats with disrupted gap junctional intercellular communication[J]. J Membrane Biol, 2007, 218(1-3): 101-106.

[8] 单鹏,宁厚法. 小鼠原发性肝癌模型的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(20): 4010-4015.
Shan P, Ning HF. Research progress in mouse models of primary hepatic carcinoma[J]. Med Recapitulate, 2018, 24(20): 4010-4015.

[9] 韦武,郭红星. 大鼠肝癌模型建立的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 119-123.
Wei W, Guo HX. Research progress in establishing rat liver cancer models[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 119-123.

[10] 李笑岩,白咸勇,刘同慎,等. 二乙基亚硝酸胺诱发大鼠肝癌模型的建立及病理学改变[J]. 滨州医学院学报, 2007, 30(6): 401-403, 406.
Li XY, Bai XY, Liu TS, et al. Establishment and pathological changes of rat liver cancer model induced by diethylnitrosamine [J]. J Binzhou Med Univ, 2007, 30(6): 401-403, 406.

[11] 王诚刚. 二乙基亚硝酸胺诱导大鼠肝癌模型的建立及评价[J]. 山西职工医学院学报, 2011, 21(2): 1-2.
Wang CG. Establishment of a rat hepatocarcinoma model induced by diethylnitrosamine and its evaluation [J]. J Shanxi Med Collage Cont Edu, 2011, 21(2): 1-2.

[12] Klein RG, Spiegelhalter B, Preussmann R. Inhalation carcinogenesis of *N-nitrosomorpholine* (NMOR) in rats and hamsters[J]. Exp Pathol, 1990, 40(4): 189-284.

[13] Ashby J, Lefevre PA. The rat-liver carcinogen *N-nitrosomorpholine* initiates unscheduled DNA synthesis and induces micronuclei in the rat liver *in vivo*[J]. Mutat Res, 1989, 225(4): 143-147.

[14] 谢胜学,许戈良,荚卫东,等. DEN 联合 NMOR 诱导建立具有转移潜能的肝癌模型[J]. 中华消化外科杂志, 2008, 7(1): 46-49.
Xie SX, Xu GL, Jia WD, et al. DEN combined with NMOR induces the establishment of a liver cancer model with metastatic potential[J]. Chin J Dig Surg, 2008, 7(1): 46-49.

[15] Futakuchi M, Hirose M, Ogiso T, et al. Establishment of an *in vivo* highly metastatic rat hepatocellular carcinoma model[J]. Jpn J Cancer Res, 1999, 90(11): 1196-1202.

[16] Ito N, Imaida K, Tamano S, et al. Medium-term bioassays as alternative carcinogenicity test [J]. J Toxicol Sci, 1998, 23 Suppl 2: 103-106.

[17] Ito N, Tamano S, Shirai T. A medium-term rat liver bioassay for rapid *in vivo* detection of carcinogenic potential of chemicals[J]. Cancer Sci, 2003, 94(1): 3-8.

[18] Imaida K, Fukushima S. Initiation-promotion model for assessment of carcinogenicity; medium-term liver bioassay in rats for rapid detection of carcinogenic agents [J]. J Toxicol Sci, 1996, 21(5): 483-487.

[收稿日期] 2020-02-02