

李萌,平键,徐列明. Mdr2 基因敲除小鼠建立原发性肝癌模型观察 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1058-1063.

Li M, Ping J, Xu LM. Establishment of a primary liver cancer model in Mdr2 gene knockout mice; an observational study [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1058-1063.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.006

Mdr2 基因敲除小鼠建立原发性肝癌模型观察

李萌^{1,2}, 平键^{1,2,3*}, 徐列明^{1,2,3}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学肝病研究所, 上海 201203; 3. 肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海 201203)

【摘要】 目的 观察 C57BL/6 背景的 Mdr2 基因敲除小鼠自发肝肿瘤形成情况。**方法** (11.3 ± 4.2) 周龄 Mdr2 基因敲除 C57BL/6-Abcb4^{tm1} 小鼠 9 只和野生型 C57BL/6 小鼠 5 只, 连续饲养 65 周后处死小鼠, 留取血清及肝标本。检测血清 ALT、AST、AFP 水平, 肝组织石蜡切片做 HE、天狼猩红染色, 免疫组织化学检测肿瘤及肿瘤旁组织 CK-7、CK-19 表达情况。**结果** 9 只 Mdr2 基因敲除小鼠均自发形成肝肿瘤, 血清 ALT、AST、AFP 水平均显著高于野生型小鼠 ($P < 0.01$), Mdr2 基因敲除小鼠肝肿瘤 CK-7、CK-19 染色均为阴性。**结论** Mdr2 基因敲除小鼠连续饲养至 (76.3 ± 4.2) 周龄时均自发形成肝肿瘤, 其病理组织分型为肝细胞癌。

【关键词】 原发性肝癌; 小鼠模型; Mdr2; 基因敲除; 胆汁淤积

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 08-1058-06

Establishment of a primary liver cancer model in Mdr2 gene knockout mice: an observational study

LI Meng^{1,2}, PING Jian^{1,2,3*}, XU Lieming^{1,2,3}

(1. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China.

2. Institute of Hepatology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203. 3. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases, Ministry of Education, Shanghai 201203)

Corresponding author: PING Jian. E-mail: jian_ping@shutcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe spontaneous liver tumor formation in Mdr2 knockout mice with C57BL/6 background. **Methods** Five wild type C57BL/6 mice and nine Mdr2 knockout C57BL/6-Abcb4^{tm1} mice aged (11.3 ± 4.2) weeks were sacrificed after 65 weeks of continuous feeding. Serum and liver samples were collected and serum ALT, AST, and AFP levels were measured. Paraffin-embedded sections of liver tissue were stained with HE and Sirius red. CK-7 and CK-19 expression in tumor and adjacent tissues was detected by immunohistochemistry. **Results** Nine Mdr2 knockout mice formed liver tumors spontaneously. Serum ALT, AST, and AFP levels were significantly higher than those in wildtype mice ($P < 0.01$). CK-7 and CK-19 expression was negative in Mdr2 knockout mice. **Conclusions** The Mdr2 knockout mice formed liver tumors spontaneously when continuously fed to (76.3 ± 4.2) weeks of age, and their pathological classification was hepatocellular carcinoma.

【Keywords】 primary liver cancer; mouse model; Mdr2; gene knockout; cholestasis

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

[基金项目] 上海市科委项目 (15401902600), 上海中医药大学“研究生创新培养”专项科研项目 (Y2021070)。

Funded by the Shanghai Science and Technology Commission Project (15401902600), Special Scientific Research Project of “Innovation Training for Postgraduates” of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (Y2021070).

[作者简介] 李萌 (1995—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中西医结合肝病防治。Email: limeng95@shutcm.edu.cn

[通信作者] 平键 (1976—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向: 中西医结合肝病防治。Email: jian_ping@shutcm.edu.cn

原发性肝癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤之一,不仅严重威胁人民生命健康,也为医疗资源带来重大负担。据统计,肝癌在 2020 年全球新发癌症疾病谱中排名第七位,在癌症致死人数中占第三位^[1]。原发性肝癌包括两种主要的组织学类型:肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)和肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC),其中 ICC 约占原发性肝癌的 15%^[2-3]。研究肝癌发病的机制既是重点也是难点,而选择适宜的原发性肝癌动物模型则是肝癌机制研究的必要条件。

Mdr2(multidrug resistance protein2, Mdr2)基因,又名 ATP-结合盒 B 亚家族成员 4(ATP-binding cassette subfamily B member 4, Abcb4),其编码的 Mdr2 蛋白作为一种脂质转运蛋白,能够将胆汁中磷脂的主要成分——磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)从肝毛细胆管膜的内侧转移到外侧^[2]。小鼠 Mdr2 基因敲除后,PC 无法通过 Mdr2 蛋白被分泌到胆汁中,从而造成胆汁中磷脂的缺乏^[4]。磷脂缺乏时,胆盐和胆固醇无法与之形成混合胶束,造成胆盐游离,引起胆管细胞损伤并导致胆汁淤积^[4-5]。

文献报道显示,小鼠 Mdr2 基因敲除后表现为肝内外胆管的狭窄和狭窄所致的节段性扩张、“洋葱皮样”胆管周围纤维化和胆管局部性增生,并且随时间推进,逐渐发展为肝纤维化、肝硬化,甚至肝癌^[6]。因其肝形态学变化与人类原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)相似, Mdr2^{-/-}小鼠也是目前最常用的 PSC 转基因动物模型^[7]。已有学者使用 Mdr2^{-/-}小鼠进行肝癌机制研究,但不同遗传背景的 Mdr2^{-/-}小鼠肝癌发生时间存在一定差异。为此,本文观察了 C57BL/6 背景 Mdr2^{-/-}小鼠原发性肝癌的发生时间及发生率,并对其组织学类型进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

9 只 SPF 级 Mdr2 基因敲除小鼠 C57BL/6-Abcb4^{tm1},包括雌 6 只、雄 3 只,(11.3 ± 4.2)周龄,约 22 g。同周龄及体重的 SPF 级野生型小鼠 C57BL/6 野生型小鼠 5 只(雌 3 只,雄 2 只)亦购自苏州赛业实验动物技术有限公司【SCXK(苏)2018-0003】。小鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心【SYXK(沪)

2020-0009】,普通饲料饮食,自由饮水,相对湿度(55 ± 5)%,温度 25℃,光照遵循昼夜节律。本实验通过上海中医药大学实验动物中心和实验动物伦理委员会批准(PZSHUTCM190524006),并且严格遵守实验动物使用的 3R 原则。

由苏州赛业实验动物技术有限公司采用 CRISPR/Cas9 技术构建并采用 PCR 和产物测序进行鉴定。Abcb4 基因位于小鼠第 5 号染色体上(NCBI 参考序列:NM_008830),共鉴定出 28 个外显子,选择第 3 ~ 4 外显子作为目标位点,设计 gRNA(gRNA1:5'-TACCAAGGGCGGTACCTTCAAGG-3'; gRNA2:5'-GCTCCTTACCACAATGGTACTGG-3')将此段基因进行剪切(见图 1A)。产生的小鼠进行 PCR 扩增验证(引物 F2:5'-CTTTGCAGCTAAATAAAGTGGGAC-3',引物 R1:5'-TCCACCCTAGACCCTTATTGTCTC-3'),然后对 PCR 产物进行测序,分析测序结果,确认基因型(见图 1B)。通过杂合子互配进行扩增繁殖,并采用 PCR(引物 F1:5'-TGTCATCTGGCAATTTAGGCTG-3',引物 R1:5'-TCCACCCTAGACCCTTATTGTCTC-3', 612 bp;引物 F2:5'-CTTTGCAGCTAAATAAAGTGGGAC-3',引物 R1:5'-TCCACCCTAGACCCTTATTGTCTC-3', 652 bp;纯合子小鼠仅在 612 bp 处出现条带)筛选出纯合子小鼠用于实验(见图 1C),其反应条件为:94℃ 3 min,(94℃ 30 s,60℃ 35 s,72℃ 35 s)× 35 循环,72℃ 5 min。

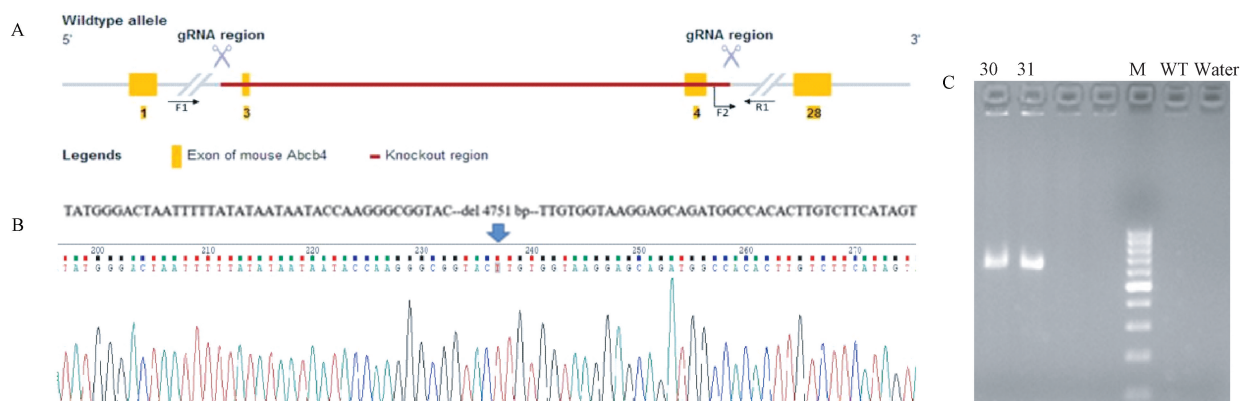
1.1.2 主要试剂与仪器

丙氨酸氨基转移酶(lanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)检测试剂盒,均为南京建成科技有限公司产品;甲胎蛋白(alpha fetal protein, AFP)检测试剂盒为酶联生物公司产品;细胞角蛋白 7(cytokeratin-7, CK-7)I 抗购自 Abcam 公司;细胞角蛋白 19(cytokeratin-19, CK-19)I 抗购自 proteintech 公司;通用二步法试剂盒、DAB 显色试剂盒,均购自中杉金桥公司;山羊血清为上海碧云天生物技术有限公司产品。LEICA ASP300 自动脱水机、LEICA EG1160 石蜡包埋机、转轮切片机 RM2035、HI1220 烤片机、均为德国 Leica 公司产品。M5 多功能酶标仪,美国 Molecular Devices 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 血清采集及肝大体观察

小鼠饲养 65 周后,以 20%乌拉坦腹腔注射麻



注:A:gRNA 将 *Mdr2* 基因第 3 ~ 4 外显子区域进行剪切;B:测序显示目的区域长 4751 bp 的序列已被敲除;C:PCR 鉴定小鼠为纯合子, 30, 31:小鼠编号, M:Marker, WT:野生型对照, Water:水对照。

图 1 *Mdr2*^{-/-} 小鼠构建原理与鉴定

Note. A. gRNA cleaves the exon 3 ~ 4 region of *Mdr2* gene. B. Sequencing showed that the 4751 bp sequence in the target region had been knocked out. C. PCR identifies mice as homozygous. 30, 31. Mouse number. M. Marker. WT. Wild type control. Water. Water control.

Figure 1 Construction principle and identification of *Mdr2*^{-/-} mice

醉,腹主动脉采血,室温静置 1 h,以 4℃、3000 r/min 离心 15 min 并收取血清。摘取肝后观察其肿瘤发生情况并拍照,留取约 0.5 × 0.5 × 0.3 cm³ 大小肝组织、肿瘤及肿瘤旁组织标本,予 10%甲醛固定。

1.2.2 血清 ALT、AST 检测

按照试剂盒说明检测血清 ALT、AST。

1.2.3 血清 AFP 检测

采用 ELISA 法检测小鼠血清 AFP。按照说明书每样本孔加入血清 50 μL,同时设标准品孔、空白孔。各孔中加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体工作液 100 μL,37℃ 孵育 60 min,弃去液体,每孔加入 350 μL 洗涤液,静置 1 min 后吸弃,重复 5 次。每孔再加入底物 A、B 液 50 μL,37℃ 避光孵育 15 min 后加入 50 μL 终止液,于 450 nm 波长处测定 OD 值并计算各样本浓度值。

1.2.4 肝组织病理学观察

将留取的肝组织标本 10% 甲醛固定 48 h 后逐级脱水、石蜡包埋,切取 4 μm 切片。石蜡切片脱蜡至水后进行苏木精-伊红(HE)染色、天狼猩红染色并在光学显微镜下观察照像。

免疫组化染色:将石蜡切片脱蜡至水后置入柠檬酸盐修复液(pH = 6.0)中煮沸 30 min 进行抗原修复,内源性过氧化物酶阻断剂孵育 10 min、10%山羊血清封闭 0.5 h。分别滴加 CK-7(1 : 8000)或 CK-19(1 : 1000)一抗过夜,洗片后,滴加山羊抗小鼠/兔二抗,孵育 0.5 h,洗片后,加入 DAB 显色液显色,以苏木素染色液复染后封片观察。

1.3 统计学分析

所有计量资料以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 26.0 软件进行统计学处理,两组比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 两组小鼠肝大体观察比较

小鼠饲养 65 周后取其肝进行观察。正常组小鼠肝形态均正常,色泽红润,质地柔软,表面光滑无肿块。9 只 *Mdr2*^{-/-} 小鼠肝表面均可见肿瘤结节,数量不等,形态不一,其余肝组织质地柔韧,各肝叶间偶有黏连(见图 2)。

2.2 两组小鼠肝组织 HE 及天狼猩红染色观察比较

肝组织 HE 染色显示:野生型小鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列,无变性坏死,肝窦未见狭窄或扩张。*Mdr2*^{-/-} 小鼠肝癌旁组织 HE 染色显示,肝小叶结构紊乱,汇管区明显扩大,可见淋巴细胞、单核细胞等炎性细胞浸润。肝肿瘤组织 HE 染色显示,肿瘤细胞大小不一,细胞形态不规则,排列结构无序,细胞核形态多样或消失(见图 3)。

天狼猩红染色观察:野生型小鼠仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维。*Mdr2*^{-/-} 小鼠肝癌旁组织内则胶原增生明显,汇管区有大量胶原纤维形成并向小叶内伸展;肝肿瘤组织天狼猩红染色显示,肝肿瘤内部无明显胶原纤维,而在肿瘤边缘有明显的胶原组织包绕(见图 3)。

2.3 两组小鼠血清 ALT、AST、AFP 水平比较

与野生型小鼠相比,Mdr2^{-/-}小鼠的血清 ALT 和 AST 活性均显著升高($P < 0.01$,见表 1)。ELISA 法检测两组小鼠血清 AFP 水平,结果显示 Mdr2^{-/-}小鼠血清 AFP 水平较野生型小鼠显著升高($P < 0.01$,见表 1)。

2.4 两组小鼠肝组织 CK-7、CK-19 染色观察比较

免疫组化结果显示正常组 CK-7、CK-19 阳性细胞多分布于汇管区,形态规则呈小管状,提示胆管

细胞排列规则,未见胆管增生或缺失。Mdr2^{-/-}小鼠肝癌旁组织 CK-7、CK-19 阳性细胞数量明显增加,且多聚集于汇管区,有大量结缔组织包绕,提示 Mdr2^{-/-}小鼠肝有明显的胆管增生。而在肿瘤组织中,多数样本中均未见 CK-7、CK-19 阳性细胞,个别样本中有散在的 CK-7、CK-19 阳性细胞单个或小管样分布,但染色面积均未达到 5%(见图 4)。结合镜下观察及免疫组化染色结果,所有样本均被判断为原发性肝细胞癌。

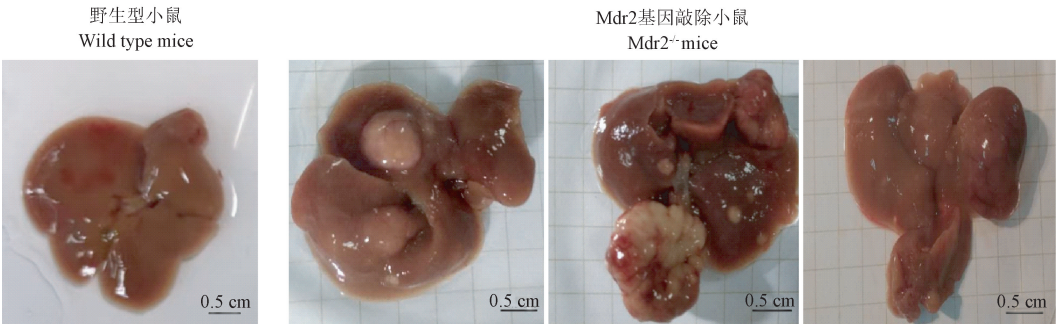


图 2 Mdr2^{-/-}小鼠肝肿瘤形态
Figure 2 Morphology of liver tumors in Mdr2^{-/-} mice

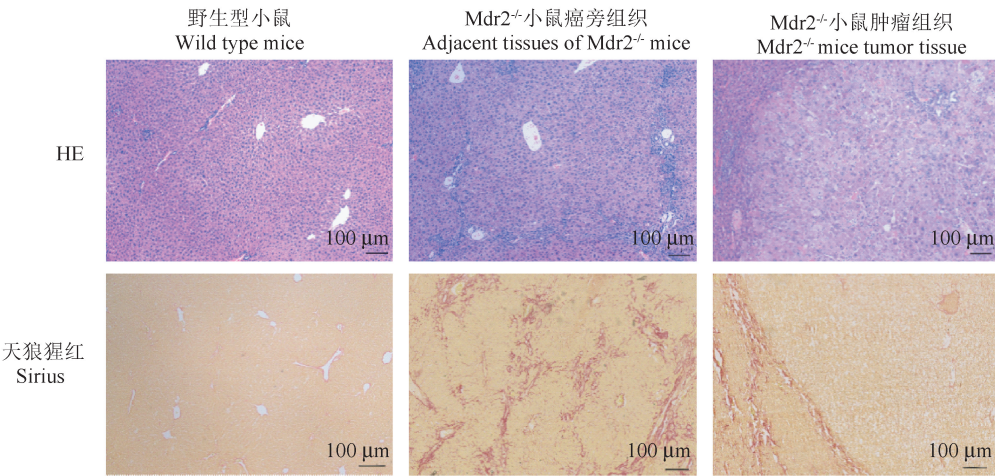


图 3 小鼠肝组织 HE 和天狼猩红染色(×100)
Figure 3 HE and Sirius red staining of mice liver tissue(×100)

表 1 两组小鼠血清 ALT、AST、AFP 水平($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Serum ALT、AST、AFP levels of two groups of mice($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	AFP(ng/mL)
野生型 Wild type mice	5	5.85 ± 3.21	4.28 ± 0.60	0.81 ± 0.10
Mdr2 ^{-/-} 小鼠 Mdr2 ^{-/-} mice	9	39.34 ± 19.04 **	20.71 ± 7.34 **	2.40 ± 0.79 **

注:与正常组比较,** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P < 0.01$.

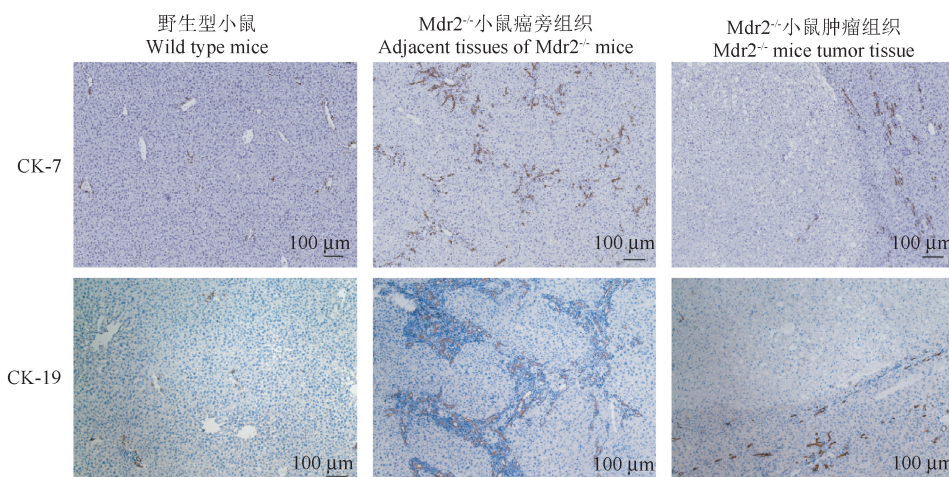


图 4 两组小鼠肝 CK-7、CK-19 染色结果对比(×100)

Figure 4 Comparison of CK-7 and CK-19 staining results in the liver of two groups of mice (×100)

3 讨论

目前常见的小鼠原发性肝癌造模方法有化学诱导法、肿瘤移植法以及采用基因修饰小鼠等。其中化学诱导法多采用硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)或二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)等化学药物长期给药,其建立小鼠原发性肝癌模型的时长多为 6 ~ 12 个月,诱发小鼠肝癌的成功率较高^[8-9]。但高剂量染毒存在动物死亡率较高的风险,故在染毒剂量、方法和时长等方面还需不断优化,尚未形成较统一的造模方案。肿瘤移植法通常将肿瘤组织或细胞株移植到裸鼠皮下或肝,使其成为荷瘤动物模型,其优点是成瘤时间快、造模周期短、易于观测。但遗憾的是其无法模拟人类肿瘤的形成过程中组织学及微环境的自然癌变特征^[10]。在本实验中,我们构建了 C57BL/6. Mdr2 基因敲除小鼠并观察其自发形成肝肿瘤情况。所观察的 9 只 Mdr2^{-/-}小鼠均自发形成肝肿瘤,观察期间未见小鼠死亡,且正常饮食无需染毒,避免了实验操作误差及接触有毒化学品的风险。并且,该小鼠肿瘤的形成机制可能与肝细胞持续存在慢性损伤和炎症相关,经过长期发展最终出现肝癌,此过程无需人为干预,与肿瘤发生的自然特征更为贴近。伴随基因编辑技术的不断进步,基于基因修饰造成肝癌的动物模型已逐渐被重视和采用。例如 Kim 等^[11]建立的 HBV 相关的转基因肝癌小鼠模型,HBx 基因转入 CD1 小鼠后,小鼠在 8 ~ 10 月龄时即出现肝肿瘤结节,并在 11 ~ 15 个月时大多数雄性小鼠将死于肝透明细胞癌。而 Engelholm 等^[12]则利用 CRISPR/

Cas9 技术发现 Dnajb1-Prkaca 基因融合足以诱导一种多发于儿童的肝癌——纤维层状肝细胞癌(fibrolamellar hepatocellular carcinoma, FL-HCC)。本实验结果显示, Mdr2^{-/-}小鼠在连续饲养 65 周后均发生了肝肿瘤,此时小鼠的平均月龄为 17.5 个月,其肿瘤表型为肝细胞癌。

细胞角蛋白(cytokeratin, CK)主要分布于上皮细胞,是角质细胞中的主要骨架蛋白。在正常肝中,胆管上皮细胞主要表达 CK-7 和 CK-19,而正常的成熟肝细胞则不表达,故而 CK-7 和 CK-19 对胆管上皮细胞和肝内胆管细胞癌具有特异性染色^[13]。本实验中小鼠肝表现出了胆管细胞增生、管腔宽大畸形等胆管病变,但并未在肿瘤样本中发现胆管细胞癌性病变,结合组织病理学观察及 CK-7 和 CK-19 免疫组化结果,判断该小鼠自发肿瘤为肝细胞癌。结果表明 Mdr2^{-/-}小鼠适宜作为肝细胞癌的研究模型。

尽管 Mdr2^{-/-}小鼠肝癌模型具有造模简便、成瘤率高及死亡率低的特点,但其缺点在于造模周期较长。据报道,基于 BALB/c 背景的 Mdr2 敲除小鼠在 7 月龄时即可观测到肝癌发生,其组织学类型为肝细胞癌^[6]。本实验构建了 C57BL/6 小鼠背景的 Mdr2 敲除小鼠,在饲养 55 周时处死的小鼠未观察到肝肿块,而在 65 周观察到本实验 9 只小鼠全部有肝肿块形成,可能与不同品系小鼠的差异有关。此外,已有研究表明, FVB 背景的 Mdr2^{-/-}雌性小鼠较雄性疾病进展更快,表现出更严重的胆汁淤积和肝纤维化症状^[14-15]。在本实验中雌性和雄性小鼠肿瘤最早发现时间均为 71 周龄,且血清 AFP 水平无

明显差异,其原因除了品系差异外,也可能与样本数量较少有关。因此进一步探究雌性小鼠是否能更快进展为肝癌,或在 Mdr2 基因敲除的基础上联用化学药物干预能否进一步缩短造模时间,这些问题均需要更多的实验证据观察验证。另外,肝癌模型制备的重要用途之一是用于抗癌药物的研发,该模型是否可用于药物疗效评估,也有待于进一步探索。

总之,本实验显示连续饲养至 (76.3 ± 4.2) 周龄的 C57BL/6. Mdr2^{-/-} 小鼠可自发形成肿瘤,其表型为肝细胞癌,该肿瘤模型的形成特征及应用前景需继续深入研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Zheng RS, Qu CF, Zhang SW, et al. Liver cancer incidence and mortality in China: Temporal trends and projections to 2030 [J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(6): 571-579.
- [3] Banales JM, Marin JGG, Lamarca A, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management [J]. Nat Rev Gastro Hepat, 2020, 17(9): 557-588.
- [4] Oude Elferink RP, Paulusma CC. Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein) [J]. Pflugers Arch, 2007, 453(5): 601-610.
- [5] 李萌, 平键, 徐列明. Mdr2 基因敲除小鼠在肝病研究中的应用 [J]. 中华肝脏病杂志, 2021, 29(6): 585-590.
Li M, Ping J, Xu LM. Application of Mdr2 gene knockout mice in the study of liver disease [J]. Chin J Hepatol, 2021, 29(6): 585-590.
- [6] Ikenaga N, Liu SB, Sverdlov DY, et al. A new Mdr2^{-/-} mouse model of sclerosing cholangitis with rapid fibrosis progression, early-onset portal hypertension, and liver cancer [J]. Am J Pathol, 2015, 185(2): 325-334.
- [7] Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, et al. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice [J]. Gastroenterology, 2004, 127(1): 261-274.
- [8] Galicia-Moreno M, Silva-Gomez JA, Lucano-Landeros S, et al. Liver cancer: therapeutic challenges and the importance of experimental models [J]. Can J Gastroenterol, 2021, 2021: 8837811.
- [9] 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.
- [10] Cho K, Ro SW, Seo SH, et al. Genetically engineered mouse models for liver cancer [J]. Cancers, 2019, 12(1): 14.
- [11] Kim C, Koike K, Saito I, et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice [J]. Nature, 1991, 351(6324): 317-320.
- [12] Engelholm LH, Riaz A, Serra D, et al. CRISPR/Cas9 engineering of adult mouse liver demonstrates that the dnajb1-prkaca gene fusion is sufficient to induce tumors resembling fibrolamellar hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 2017, 153(6): 1662-1673.
- [13] Chatzipantelis P, Lazaris A, Kafiri G, et al. Cytokeratin-7, cytokeratin-19, and c-Kit: Immunoreaction during the evolution stages of primary biliary cirrhosis [J]. Hepatol Res, 2006, 36(3): 182-187.
- [14] van Nieuwerk CM, Groen AK, Ottenhoff R, et al. The role of bile salt composition in liver pathology of mdr2 (-/-) mice: differences between males and females [J]. J Hepatol, 1997, 26(1): 138-145.
- [15] Li XY, Liu RP, Yang J, et al. The role of long noncoding RNA H19 in gender disparity of cholestatic liver injury in multidrug resistance 2 gene knockout mice [J]. Hepatology, 2017, 66(3): 869-884.

[收稿日期] 2022-04-19