



二乙基亚硝胺在小鼠诱发性肝癌模型中的应用

赵彤, 李柏

(第二军医大学中医系, 上海 200433)

【摘要】 DEN 二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 对人体和动物都存在剧毒性, 即使是小剂量注射或口服给药也会造成严重的肝损伤。由于对啮齿类动物诱导肝脏病变的稳定性, DEN 常用于观察啮齿类动物肝癌形成全过程中形态学的改变以检测其癌前病变。在应用 DEN 后小鼠产生的肝损伤会引起肝硬化和肿瘤, 使其成为分析人类肝细胞癌的发病机制和过程的理想动物模型。然而, 一些研究表明, 二乙基亚硝胺的致癌作用可能与动物不同遗传背景, 性别, 年龄等其他因素相关。因此, 本文通过对相关文献进行综述, 以期建立稳定, 成功率高, 死亡率低的 DEN 模型, 并对不同目的的实验提供参考。

【关键词】 二乙基亚硝胺; 诱发性肝癌; 小鼠; 模型; 动物

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 01-0076-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2016.001.015

Application of diethylnitrosamine in induced-liver cancer mouse model

ZHAO Tong, LI Bai

(Department of TCM, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Diethylnitrosamine (DEN) is highly toxic to both human and animals, even the parenteral or oral administration of the smallest quantities results in severe liver damage. Due to the robustness of the induced hepatic alterations, the application of DEN in rodents has become an attractive experimental model for studies aimed at understanding the pathogenetic alterations underlying the formation of liver cancer. The liver injury induced by DEN in mice can cause liver cirrhosis and tumors, which makes it an ideal animal model to analyze the pathogenesis and process of human hepatocellular carcinoma. However, some studies have indicated that the carcinogenic effect of Diethylnitrosamine may be related to the different genetic background, gender, age and other factors. Therefore, this article reviews the relevant literatures, in order to establish a stable, high success rate, low mortality DEN model, and to provide references for different purposes.

【Key words】 Diethylnitrosamine; Induced liver cancer; Mice; Model; animal

肝癌是威胁人类健康的主要原因之一, 在肿瘤致死率中排名第二^[1]。原发性肝癌的发生是一个多病因、多阶段的结果, 依次经历肝炎-肝硬化-早期肝癌-进展期肝癌-肝癌转移^[2]。期间可能涉及各种致病因素^[3-4], 如病毒性肝炎, 酒精性肝硬化

等^[5-6], 从初始的病毒感染到临床检测出肝癌的平均间隔通常为 20 至 40 年^[7-8]。啮齿类动物小鼠模型是广为应用的肝癌动物模型^[8-11]。在诱发性肝癌模型中, DEN^[12-13]、二甲基亚硝胺、四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 等物质是常用致癌诱导

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81503632)。

【作者简介】 赵彤 (1989 -), 女, 硕士生, 专业: 中西医结合。E-mail: zhaotong1024@foxmail.com

【通讯作者】 李柏 (1964 -), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合防治肝癌。E-mail: libai9@126.com

剂^[14-15]。其中, DEN 是一种归属于 N-亚硝基的有机物质, 可稳定诱导多种组织肿瘤, 如肝脏, 肺脏, 胃和造血系统^[16]。DEN 造模可产生严重的肝损伤, 具有致癌性, 突变性和致畸性, 最突出的表现是中性粒细胞浸润, 广泛的小叶出血性坏死, 肝细胞异常分裂, 胆管增生, 纤维化, 和桥接坏死, 并最终导致肝癌。但是有研究显示亚硝胺对于不同遗传背景, 性别等的小鼠作用不一, 给药时间和剂量的不同也可能影响实验结果。因此本文旨在通过总结既往文献研究, 提出适用于小鼠的 DEN 使用方案, 建立高效的 DEN 小鼠肝癌模型。

1 DEN 的作用机制

DEN 作为 N-亚硝基类物质的一种, 是遗传毒性致癌物, 通过比较基因组学分析, 发现在 DEN 引起的肿瘤模型中的基因表达, 与人类肝癌患者的肝癌组织类似且预后较差^[17]。经典的 DEN 诱癌分为启动-促进-演变三个过程, 诱导脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 损伤和突变以及肝细胞死亡。由于其急性肝毒性和致癌性, 少量的 DEN 即可对小鼠产生不可逆的致癌作用。1963 年的研究发现, 从服用 DEN 的大鼠肝脏中提取核酸, 发现其 N7 原子鸟嘌呤乙基化, 这一发现在解释 DEN 诱癌的分子机制研究上是一重大进展^[18]。随后的研究发现 DEN 最终在小鼠体内转化为可以导致 DNA 加合物形成的烷基化代谢物, 形成活性中间体, 这会导致甲基化大分子的形成。其中最关键的是 DNA 中 N-7 甲基鸟嘌呤和 O6-甲基鸟嘌呤的形成, 改变了遗传信息, 从而形成启动细胞, 在致癌过程中起到了启动作用。这一转化过程是通过与细胞色素 P450 酶类 (包括细胞色素 P4502E1) 相关通路实现的^[19], 其主要靶器官是肝脏, 在小叶中心肝细胞活性最高, 且这一途径与人类代谢途径相似。

DEN 模型通常被认为是化学性诱导的肝癌模型, 也有证据表明和炎症反应相关。DEN 造成的肝细胞损伤激活肝巨噬细胞枯否细胞, 产生肝有丝分裂原, 如白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6), 这会刺激残存的肝细胞代偿性增生^[20]。DEN 诱导的肝癌发生被认为是受炎症信号的影响, 肝细胞 I κ B 激酶 β (inhibitor kappa B kinase β , IKK β) 损失, 阻止核转录因子 (nuclear transcription factor kappa B, NF- κ B) 的活化, 增加 DEN 诱发的细胞死亡, 从而增强致癌效果^[21]。DEN 也与肝细胞的活性氧 (reactive

oxygen species, ROS) 的积累相关^[22-23], ROS 是细胞有氧代谢的结果, 正常情况下, 细胞可以保持 ROS 和抗氧化剂如过氧化氢酶, 超氧化物歧化酶和多种过氧化物酶等之间的平衡。受 DEN 的影响, 微环境破坏, ROS 增多, 产生紧张状态, 造成如脂质, 蛋白质和核酸等大分子的直接损害, 可能会导致 DNA 和其他亲核物质氧化损伤, 这种机制会进一步加强 DEN 诱导的肝癌形成^[24]。除干扰 ROS 和抗氧化剂之间的平衡外^[25], DEN 还可通过影响细胞线粒体代谢, 引起氧化应激和 DNA 损伤, 从而导致癌变。DEN 诱导的肝癌使肝巨噬细胞和 CD8⁺ T 细胞增加, 且与肿瘤相关的巨噬细胞与肝癌的侵袭相关^[26]。

单次使用亚硝胺激活 *Ha-ras* 原癌基因的突变, 但在后续给予慢性促进剂引发的肝肿瘤, 后续其基因改变取决于促进剂的使用, 如肿瘤强促进剂戊巴比妥钠会引起 *Cttnb1* 基因的突变, 编码 wnt/ β -catenin 通路, 使谷氨酰胺合成酶过表达, 导致肝细胞氧化应激增加, 由此产生肝细胞变性和结构变化。CCl₄ 的使用则会增加内毒素水平, 模拟更接近于临床大多数肝癌发生过程的微环境。且在 DEN 改变遗传信息, 形成启动细胞后, 如果中断干预, 可能会导致肿瘤消退, 无法形成癌性结节, 因此在促进阶段是可逆的^[27]。

2 影响 DEN 小鼠肝癌模型的因素

2.1 品系

不同品系的小鼠对肝癌的易感性不同^[28], 如 14 个月龄的 C3Hf 系雄鼠、C3H 系雄鼠和 C3He 雄鼠的发生率分别为 72%、85% 和 80%, 而 C57BL/6J 小鼠自然肝癌发病率均较低^[29]。在 DEN 诱发的肝癌模型中, C3H/HeJ 小鼠的肝癌发生率也较 C57BL/6J 小鼠高 20 ~ 50 倍^[30]。常见的用于 DEN 诱发肝癌模型的小鼠品系有 BALB/c、C57BL/6、ICR 等, 其中高敏感系小鼠包括 C3H 和 CBA。中度敏感系有 FVB、SM/J、P/J、CE/J、LP 和 AKR/J, 相对不敏感的品系有 BALB/c、C57BL/6、129 和 SWR。但在 DEN 诱发的模型中, 即使是相对不敏感品系的小鼠也会发生肝肿瘤, 只是较敏感品系小鼠, 会有 2 ~ 3 个月的延迟。

2.2 周龄

年龄对于小鼠对 DEN 的敏感性也有一定的影响。一次性低剂量 DEN 致小鼠肿瘤的研究显示, 幼

鼠肝脏易发生癌变,且酶活性(比如 DEN 脱烷基能力)会随着小鼠年龄增长,大概在 7 d 到 15 d 时达到一个峰值。后期,代谢功能会随着年龄的增加而降低,且雌性小鼠比雄性小鼠下降更快,大概在出生后 42 d 达到一个平稳期。在已有文献中,低剂量 DEN 注射的造模方式,大多选择两周龄小鼠^[31],也可见文献选用两周龄小鼠时,注射低剂量 DEN 溶液后在小鼠饮用水中加入适量 DEN 等^[32]。在选用 4-6 周龄小鼠时,大多进行多次注射/灌胃 DEN 或与 CCl₄ 等肝毒性药物合用诱癌^[33-34]。

2.3 性别

过去几十年的广泛数据显示,肝癌的发生率在人类和啮齿类动物中均呈性别依赖性,男性患病率显著较高。研究显示当小鼠多次长期接受 DEN 干预,100% 雄性小鼠发生肝癌,只有 30% 的雌性小鼠发生肝癌。在雄性小鼠 6 周龄时行睾丸切除术或使用促性腺激素化学阻断剂,降低了肝脏肿瘤的发生率、多重性和瘤块大小,而对雌性小鼠进行卵巢切除或补充睾酮则显著提高肝脏肿瘤的发生率,这可能是因为雌激素抑制肝癌发生但是雄激素刺激肝癌发生,雌性小鼠对 DEN 诱发的肝癌具有抵抗性^[35]。观察发现,雌性小鼠对其他化学毒性诱癌物引发的肝癌一般也不易发生。且有文献探讨发现,性别导致 DEN 诱发的肝癌发生率不同主要是因为不同性别在枯否细胞分泌 IL-6 上有差异,而 IL-6 的分泌是由雌激素介导的。因此,在 IL-6 基因敲除的小鼠中,并没有性别导致的 DEN 诱发的肝癌发生率的差异。

2.4 给药途径

给药方式对于小鼠肝脏肿瘤的形成时间的长短有着不一样的影响,常见的方式有腹腔注射、灌胃、综合干预、饮食饮水添加 DEN 加部分肝切除等。Rignall 等^[36]对 6 周大的 C3H/N 一次性注射 DEN (90 mg/kg),27 周后成瘤,但单纯 DEN 组小鼠成瘤率和瘤体大小均小于注射 DEN 后给予 0.05% 戊巴比妥钠组小鼠。Schneider 等^[37]对两周大 C57BL/6 小鼠一次性注射 DEN (25 mg/kg),24 周时出现癌前病变,42 周时形成肝癌。Santos NP 等^[38]对五周大的 ICR 进行浓度为 35 mg/kg 的 DEN 腹腔注射,一周一次,连续八周,在第 8 周时 80% 的小鼠出现肝组织学改变和增生性病变,如肝细胞坏死凋亡,水肿变性等,第 22 周后出现结节,第 29 周出现肝细胞腺瘤。不过在整個实验过程中都未发现肝细胞癌。

Iatropoulos MJ 等^[34]对 8 周的 C57BL/6 小鼠进行每周一次 50 μ mol/kg 的 DEN 灌胃,第一次灌胃后 10 周成瘤。Aleksic 等^[39]对 6 周大小鼠一次性注射 (90 mg/kg) DEN 并在两周后喂养含 0.05% ~ 0.07% 苯巴比妥的饲料,32 周时诱癌成功。Unterberger EB 等在实验中进行了与 Aleksic 相同的诱癌方式,在第 28 周时开始出现肝细胞癌。Thuy le TT 等^[40]对 4 周 C57BL/6 小鼠饮水中喂予含 0.05 mg/L (低剂量)或 25 mg/L (高剂量) DEN 溶液的无菌蒸馏水,高剂量组小鼠在第 25 周处死,低剂量组小鼠在第 36 周处死,高剂量组的肝细胞癌发生率为 44%,低剂量组小鼠肝组织并未发现瘤块。刘勇^[41]对 20 g 的 C57BL/6 雌性小鼠进行 300mg/kg 的 DEN 注射,一周后再连续给 3 d 二乙酰基芘 (2-Acetylfluorene, 2-AAF) 20mg/kg,然后将小鼠肝脏左叶从根部结扎并切除 (34% 肝脏切除),再连续 3 d 用 2-AAF 灌胃,3 周后处死小鼠存活率达到 64.7%,肿瘤标志物以及原癌基因表达显著升高。

3 使用注意

因二甲基亚硝胺对眼睛、皮肤的刺激作用,摄入、吸入或经皮肤吸收可能致死,接触可引起肝、肾损害,实验人员也应做好相应保护措施。含 DEN 的注射溶液的配制过程通常应在通风橱里进行,操作者需要戴两层密封的丁晴橡胶手套,防护服,呼吸防护 (P3 型口罩) 和防护眼镜,且房间内应标记以限制人员入内。丁晴手套和注射器在使用后应当丢弃到危险废物容器。也有实验步骤^[42]指出超额量的 N-亚硝基化合物可以用添加了镍铝合金的碱性溶液来销毁。此外,实验动物的排泄物应当每天或每周作为危险垃圾处理。实验动物应与其他动物分开饲养。若出现意外情况下暴露,包括皮肤接触,吸入或针刺伤,都应采集操作人员 3 mL 尿液样本并储藏在 -70℃ 的环境中用以监测亚硝胺代谢产物的情况。这可以对 DEN 的摄入量有大概的估计,并有助于进行危险分析。

4 检测指标

DEN 诱癌的发生,经过肝炎阶段、肝硬化阶段、癌前病变、癌变等病变过程,在应用 DEN 的过程中,组织学改变的特点是广泛中性粒细胞浸润,水样变性,增生,肝小叶中心广泛出血性坏死,胆管增生,纤维化,细胞核大小不均,双核细胞,假核仁,细胞

凋亡,肝局灶性坏死和有丝分裂。此外,磁共振成像可使小鼠不受损伤的进行肝脏肿瘤发生发展的检测。肝癌前病变与正常肝组织在许多分子表达上不同,但并没有明确指南指出哪一指标最为敏感,常见指标包括药毒性代谢(细胞色素 P450,环氧化物水解酶,G-谷氨酰转移酶,谷胱甘肽-S-转移酶胎盘形成),能量代谢(葡萄糖-6-磷酸酶,糖原磷酸化酶),溶酶体活性(β -葡萄糖醛酸酶),细胞间交换(间隙连接蛋白 34)铁代谢,以及细胞循环(细胞周期蛋白 D,细胞周期蛋白 E)等。

5 结语和展望

DEN 作为小鼠肝癌模型的经典诱癌药物,成功率高,靶向性好,操作方便,但是其造模时间长,小鼠的品系、小鼠的性别、用药的剂量和方式等都对模型的建立有所影响,且目前无统一的造模方式。在已有实验数据中,采用高敏感系雄性小鼠,并采取综合干预,小鼠肝细胞癌成癌率高,死亡率低,操作方便,是较为理想的造模方式。

参考文献:

- [1] Jemal Ahmedin, Bray Freddie, Center Melissa M, *et al.* Global cancer statistics [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Pitot HC, Dragan YP, Teeguarden J, *et al.* Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver[J]. Toxicologic Pathology, 1996, 24(1):119-28.
- [3] Altekruse S F, McGlynn K A, Reichman M E, *et al.* Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(9):1485-1491.
- [4] El-Serag H B, Rudolph K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. Gastroenterology, 2007, 132(7):2557-2576.
- [5] Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. [J]. World Journal of Gastroenterology, 2010, 16(4):418-424.
- [6] Kamegaya Yoshitaka, Hiasa Yoichi, Zukerberg Lawrence, *et al.* Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis [J]. Hepatology, 2005, 41(3):660-667.
- [7] Sherman M. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology, Risk Factors, and Screening[J]. Seminars in Liver Disease, 2005, 25(2):143-154.
- [8] MONTALTO GIUSEPPE, CERVELLO MELCHIORRE, GIANNITRAPANI LYDIA, *et al.* Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002, 963(1):13-20.
- [9] 张园园,方肇勤,王艳明.不同治疗方案对 H22 肝癌荷瘤小鼠的疗效比较[J]. 中国实验动物学报,2014,22(3):67-71,77.
- [10] Santos N P, Oliveira P A, Arantes-Rodrigues R, *et al.* Cytokeratin 7/19 expression in N-diethylnitrosamine-induced mouse hepatocellular lesions: implications for histogenesis [J]. International Journal of Experimental Pathology, 2014, 95(3):191-198.
- [11] Leenders M W, Nijkamp M W, Rinkes I H B. Mouse models in liver cancer research: A review of current literature[J]. World Journal of Gastroenterology, 2008, 14(45):6915-6923.
- [12] 陈华,吴小红,谢忠忱,等. C-myc, p53 基因和 AFP 在家兔诱发性肝癌及癌旁组织中的表达[J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(4):231-234.
- [13] 张斌,李琦,殷佩浩,等. 二乙基亚硝胺诱导大鼠肝癌组织 CLDN1 基因表达及其甲基化[J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(1):80-83.
- [14] Chiaverotti T A, Nkwater N R. C57BR/cdJhepatocarcinogen susceptibility genes act cell-autonomously in C57BR/cdJCS57BL/6J chimeras [J]. Cancer Research, 2003, 63(16):4914-4919.
- [15] Long W, Tang Z Y, Yan L. Experimental models of hepatocellular carcinoma: developments and evolution [J]. Journal of Cancer Research & Clinical Oncology, 2009, 135(8):969-981.
- [16] Hecht S S, Mirvish S S, Gold B, *et al.* Conference on advances in the biology and chemistry of N-nitroso and related compounds [J]. Cancer Research, 1989, 49(5):1327-1329.
- [17] Ju-Seog L, In-Sun C, Arsen M, *et al.* Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer[J]. Nature Genetics, 2004, 36(12):1306-1311.
- [18] Tolba R, Kraus T, Liedtke C, *et al.* Diethylnitrosamine (DEN) - induced carcinogenic liver injury in mice [J]. Laboratory Animals, 2015, 49(1):59-69.
- [19] Sharma V, Janmeda P, Paliwal R. Antihepatotoxic activity of Euphorbia nerifolia extract against N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in mice [J]. Journal of Chinese Integrative Medicine, 2012, 10(11):1303-9.
- [20] Naugler W E, Sakurai T, Kim S, *et al.* Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production[J]. Science, 2007, 317(121):121-124.
- [21] Shin M, Hideaki K, Jun-Li L, *et al.* IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis[J]. Cell, 2005, 121(7):977-90.
- [22] Pradeep K, Mohan C V R, Gobianand K, *et al.* Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats[J]. European Journal of Pharmacology, 2007, 560(2-3):110-116.
- [23] Santos N P, Pereira I C, Pires M J, *et al.* Histology,

- bioenergetics and oxidative stress in mouse liver exposed to N-diethylnitrosamine[J]. *Vivo*, 2012, 26(6):921-929.
- [24] Ziech D, Franco R, Georgakilas A G, *et al.* The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, 188(2):334-339.
- [25] 张学武, 孙权, 金明, 等. 珍珠梅提取物对化学致癌前病变大鼠抗氧化活力的影响[J]. *中西医结合学报*, 2003, 1(1):47-50.
- [26] Roderfeld M, Rath T, Lammert F, *et al.* Innovative immunohistochemistry identifies MMP-9 expressing macrophages at the invasive front of murine HCC [J]. *World Journal of Hepatology*, 2010, 2(5):175-9.
- [27] Hendrich S, Glauert H P, Pitot H C. The phenotypic stability of altered hepatic foci: effects of withdrawal and subsequent readministration of phenobarbital[J]. *Carcinogenesis*, 1986, 7(12):2041-2045.
- [28] 崔淑芳. 实验动物学[M]. 第二军医大学出版社, 2013, 149-150.
- [29] Maronpot R R. Biological Basis of Differential Susceptibility to Hepatocarcinogenesis among Mouse Strains [J]. *Journal of Toxicologic Pathology*, 2009, 22(1):11-33.
- [30] Drinkwater N R, Ginsler J J. Genetic control of hepatocarcinogenesis in C57BL/6J and C3H/HeJ inbred mice [J]. *Carcinogenesis*, 1986, 7(10):1701-1707.
- [31] Carlo S, Andreas T, Tetyana Y, *et al.* Adaptive immunity suppresses formation and progression of diethylnitrosamine-induced liver cancer[J]. *Gut*, 2012, 61(12):1733-1743.
- [32] 黄金伶, 尹岚. 炎症性细胞因子 IL-17A 和免疫抑制细胞在 DEN 诱导小鼠肝癌中的作用[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2014, 35(6):7-11.
- [33] Dapito D, Mencin A, Gwak G Y, *et al.* Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4 [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(4):504-516.
- [34] Iatropoulos M J, Jeffrey A M, Schlüter G, *et al.* Bioassay of mannitol and caprolactam and assessment of response to diethylnitrosamine in heterozygous p53-deficient (+/-) and wild type (+/+) mice[J]. *Archives of Toxicology*, 2001, 75(1):52-58.
- [35] Nakatani T, Roy G, Fujimoto N, *et al.* Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin[J]. *Cancer Science*, 2001, 92(3):249-256.
- [36] Rignall B, Braeuning A, Buchmann A, *et al.* Tumor formation in liver of conditional β -catenin-deficient mice exposed to a diethylnitrosamine/phenobarbital tumor promotion regimen [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(1):52-57.
- [37] Schneider C, Teufel A, Yevsa T, *et al.* Adaptive immunity suppresses formation and progression of diethylnitrosamine-induced liver cancer[J]. *Gut*, 2012, 61(12):1733-1743.
- [38] Santos N P, Colaço A, Rui M G D C, *et al.* N-diethylnitrosamine mouse hepatotoxicity: Time-related effects on histology and oxidative stress [J]. *Experimental & Toxicologic Pathology*, 2014, 66(9-10):429-436.
- [39] Kristina A, Carolin L, Geigl J B, *et al.* Evolution of genomic instability in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in mice[J]. *Hepatology*, 2011, 53(3):895-904.
- [40] Morita T, Yoshida K, Wakasa K, *et al.* Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice[J]. *The American journal of pathology*, 2011, 179(2):1050-1060.
- [41] 刘勇, 赛岩, 刘冬梅, 等. 小鼠原发性肝癌短期诱导模型的建立和评价[J]. *军事医学*, 2011, 35(3):175-179.
- [42] Lunn G, Sansone E B, Keefer L K. Reductive destruction of N-nitrosodimethylamine as an approach to hazard control in the carcinogenesis laboratory [J]. *Food & Cosmetics Toxicology*, 1981, 19(4):493-494.

[修回日期]2015-12-25