

• 实验研究 Experimental research •

二乙基亚硝胺诱导大鼠原位肝癌模型及在 TACE 中应用研究

张利捷, 操焱焱, 李卿, 张鑫, 洪伟, 郑传胜, 梁斌

【摘要】目的 评价二乙基亚硝胺(DEN)口服诱导的大鼠肝癌模型的病理学特性及其在经导管动脉化疗栓塞术(TACE)中的应用价值。**方法** 60只Sprague-Dawley(SD)大鼠口服0.01% DEN诱导原位肝癌,分为肿瘤模型组($n=40$)和TACE应用组($n=20$)。肿瘤模型组大鼠自诱导后第6周开始每周行肝脏MRI检查,肝脏出现0.2 cm、0.5 cm结节时分别随机处死5只大鼠,行肝脏大体观、苏木精-伊红(HE)及Masson染色检查;其余大鼠继续每周行肝脏MR及每2周肺部CT检查,观察肿瘤生长、转移,并记录大鼠生存时间。TACE应用组大鼠采用开腹经胃十二指肠动脉逆行插管行介入操作,记录技术成功率和死亡率;术后3 d、7 d分别处死大鼠,检测肿瘤坏死。**结果** 肿瘤模型组大鼠肿瘤结节直径达0.2 cm的中位诱导时间为8(7,10)周,肝脏体积增大,肿瘤呈灰白色微小结节;HE染色显示肝实质炎性细胞浸润,部分假小叶形成,肿瘤细胞核肥大深染;Masson染色显示少量胶原纤维。肿瘤结节直径达0.5 cm的中位诱导时间为11(10,12)周,肝脏体积缩小,表面有大量结节;HE染色可见假小叶形成;Masson染色显示胶原纤维增多。部分大鼠出现肝外转移。中位生存时间为诱导后13(8,20)周。TACE应用组大鼠经DSA证实肿瘤为富血供;TACE技术成功为11/16,手术相关死亡为3/16;术后3 d、7 d肿瘤坏死率分别为 $(48.16\pm 2.65)\%$ 、 $(50.36\pm 2.92)\%$ 。**结论** DEN诱导的大鼠原位肝癌较好地模仿了人类肝癌组织病理学特性,可用于TACE操作,是一种理想的介入治疗动物模型。

【关键词】 肝肿瘤, 实验性; 化疗栓塞, 治疗性; 模型, 动物; 二乙基亚硝胺

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2022)-07-0686-07

Diethylnitrosamine-induced rat in situ liver cancer model and its application in transarterial chemoembolization therapy ZHANG Lijie, CAO Yanyan, LI Qing, ZHANG Xin, HONG Wei, ZHENG Chuansheng, LIANG Bin. Department of Radiology, Affiliated Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province 430022, China

Corresponding author: LIANG Bin, E-mail: bliang@hust.edu.cn

【Abstract】Objective To establish a diethylnitrosamine-induced(DEN-induced) rat in situ liver cancer model, and to evaluate its pathological characteristics and its application value in transarterial chemoembolization (TACE) therapy. **Methods** A total of 60 Sprague-Dawley(SD) rats were used in this study. The DEN of 0.01% concentration was orally administered to all the experimental rats to induce in situ liver cancer. The experimental rats were divided into tumor model group($n=40$) and TACE treatment group($n=20$). For the rats of tumor model group, liver MR imaging was performed once a week, which started from the 6th week after DEN administration, and every 5 randomly selected rats were sacrificed each time when the diameter of liver nodule reached 0.2 cm and 0.5 cm large. The liver samples were macroscopically examined, and after HE and Masson staining microscopical examination was performed. The remaining rats continued to receive liver MRI weekly and lung CT examination ones every 2 weeks to check the status of tumor growth and metastasis, and the survivals of rats were recorded. For the rats of TACE treatment group, laparotomy chemoembolization through retrograde catheterization via gastroduodenal artery was performed. The technical success rate, procedure-related mortality were documented. At 3 and 7 days after treatment, the rats were sacrificed and the tumor necrosis was evaluated. **Results** In tumor model group, the median induction time of liver nodule

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2022.07.011

基金项目: 国家自然科学基金(81771950)

作者单位: 430022 武汉 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科

通信作者: 梁斌 E-mail: bliang@hust.edu.cn

diameter reaching 0.2 cm was 8 weeks(7, 10 weeks). The macroscopic examination showed that the liver volume was enlarged, the tumor lesions presented as grey-white tiny nodules. After HE staining, in the liver parenchyma the inflammatory cell infiltration, formation of false lobules, and larger, darker-stained tumor nucleus were observed. After Masson staining, small amount of collagen fibers was demonstrated. The median induction time of liver nodule diameter reaching 0.5 cm was 11 weeks(10, 12 weeks). Macroscopically, the liver volume was reduced with numerous nodules on its surface. HE staining demonstrated the formation of false lobules, and Masson staining revealed that the collagen fibres were increased. Extrahepatic metastases were detected in some rats. The median survival time was 13 weeks after induction(8, 20 weeks). In TACE treatment group, DSA confirmed that the tumors were hypervascular lesions. The technical success rate of TACE was 68.8% (11/16), the operation-related mortality was 8.8% (3/16). The postoperative 3-day and 7-day necrosis rates were (48.16±2.65)% and (50.36±2.92)% respectively. **Conclusion** DEN-induced rat in situ liver cancer model better mimics the histopathological characteristics of human liver cancer, which can be used in TACE operation, and this model is an ideal animal model for interventional research. (J Intervent Radiol, 2022, 31: 686-692)

[Key words] liver neoplasm, experimental; chemoembolization, therapeutic; model, animal; diethylnitrosamine

经导管动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)联合免疫治疗是当前肝癌治疗的热点,其具体联合作用机制尚未明确^[1-3]。我国肝癌患者大多伴随炎症-硬化-肿瘤的演变^[4]。肿瘤可发生免疫逃逸,使得机体免疫系统无法发挥监视及杀伤作用^[5],因此建立可模仿人类肝癌免疫学背景的动物模型尤为重要。TACE 治疗常用动物模型主要包括兔 VX2 移植瘤肝癌模型、肝炎病毒诱导的土拨鼠肝癌模型及二乙基亚硝酸胺(diethylnitrosamine, DEN)诱导的大鼠原位肝癌模型,各有优劣^[2]。兔 VX2 肝癌模型是由乳头瘤病毒诱导的间变性鳞癌,并不具备人类肝癌典型生物学特征^[6];土拨鼠肝癌模型适合作为免疫学研究且适合 TACE 操作,但成瘤时间往往需要数年,该类动物也较难获得^[7];DEN 诱导的大鼠原位肝癌模型不仅具备人类肝癌损伤的病理改变,成瘤时间也相对较短,是较为理想的模型^[8-9]。但目前的研究尚缺乏该模型建造的系统性变化,如长时间、连续性影像和病理评估,无法满足 TACE 治疗时机选择及疗效评价。基于以上现状,本研究采取口服 DEN 诱导大鼠原位肝癌模型,结合影像与病理检查,探索肝癌成瘤过程以及在该动物模型中进行 TACE 操作的可行性,为开展进一步 TACE 联合免疫治疗的动物实验提供有效的肝癌动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物和模型建立

取雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 60 只(华中科技大学同济医学院实验动物中心),体质量 160~180 g,分为肿瘤模型组($n=40$)和 TACE 应用组($n=20$)。采用口服 DEN 方法建立大鼠原位肝癌模型:将 0.01%浓度 DEN 加入大鼠饮水瓶,供其自由饮用^[10]。

1.2 影像学检查

实验动物均行肝脏 MRI 及肺部 CT 检查。采用 2%戊巴比妥钠腹腔注射(0.3 mL/100 g)麻醉。MRI 扫描采用大鼠专用线圈,扫描范围为膈顶至肝下缘,扫描序列及参数见表 1。肺部 CT 扫描范围从胸骨入口至肋膈角,扫描参数:80 kVp, 400 mA,层厚 0.67 mm,束宽 40 mm,螺距 1.048,旋转时间 0.4 s。

1.3 病理学检测

颈椎脱臼法处死大鼠,取肝脏组织,0.9%氯化钠溶液冲洗,滤纸吸去水分。选取肝脏肉眼变化明显的肝叶作为检测标本。标本固定于 4%多聚甲醛,乙醇脱水,制作石蜡切片。苏木精-伊红(HE)及 Masson 染色操作参照文献^[10]。采集不同倍数图片加以分析。

1.4 荷瘤动物生存

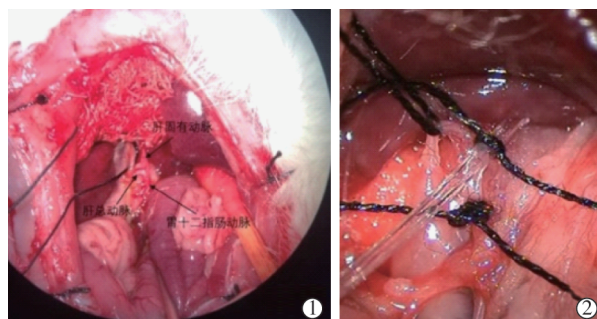
排除诱导过程中死亡及处死的实验鼠后,余荷瘤大鼠以普通饮用水饲养,记录死亡情况,观察生存时间。

表 1 MRI 序列及参数

序列	重复时间(ms)	回波时间(ms)	视野范围(mm)	层厚(mm)	扫描平面
T1 加权梯度回波(T1-GRE)	13.4	3.6	60	1.20	冠状位/横断位
T1 加权 3D 梯度回波(T1-3D-GRE)	7.3	2.5	100	1.00	冠状位/横断位
T2 加权涡轮自旋回波(T2-TSE)	4000	85	100	1.00	冠状位/横断位

1.5 介入操作及评价

当 MRI 证实大鼠肝肿瘤长径达到约 0.5 cm 后, 无菌条件下行开腹经胃十二指肠动脉逆行插管。化疗药为阿霉素(浙江海正药业公司), 剂量为 1.6 mg/只(根据大鼠与人体药量换算得出)。栓塞剂为聚乙烯醇栓塞微球(100~300 μm , 苏州恒瑞医疗器械公司), 麻醉方式同前。介入操作方法: 大鼠开腹经胃十二指肠动脉逆行插管, 以剑突为界向下 3~4 cm 行利多卡因局部麻醉, 沿腹部白线正中切口剪开, 固定十二指肠, 分离肝总动脉、肝固有动脉及胃十二指肠动脉(图 1①); 在分离后的胃十二指肠动脉远端剪一斜口并引入导管(内径 0.3 mm×外径 0.6 mm, 重庆思睿医疗仪器公司)(图 1②); 将动物转移至 DSA 台, 行经导管动脉造影, 对比剂注入量约为 0.5 mL, 流率为 0.3 mL/s, 压力为 100 psi, 总对比剂体积为 2.0 mL/kg, 图像采集速度设定为 7.5 帧/s, 持续 24 s; 全程在 DSA 监视下缓慢注入化疗药物和栓塞剂, 栓塞终点为肿瘤前向血管近乎淤滞, 复查造影示肿瘤染色消失; 栓塞后退出导管, 逐层关腹。观察大鼠肝癌模型的动脉造影改变, 记录介入技术成功率及围手术期动物死亡情况。



①血管解剖见肝固有动脉、肝总动脉及胃十二指肠动脉显示;
②导管成功插入胃十二指肠动脉

图 1 TACE 操作示意图

TACE 成功定义为导管成功插入动脉, 打入足够药量的阿霉素, 并经 DSA 造影显示肿瘤血管栓塞完全。TACE 术后 3 d、7 d 分别处死实验动物, 进行病理大体观及 HE 染色, 检测肿瘤坏死。

1.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.0 版软件进行统计学分析及绘图。数据以均值±标准差、中位数和范围、率的形式表示。

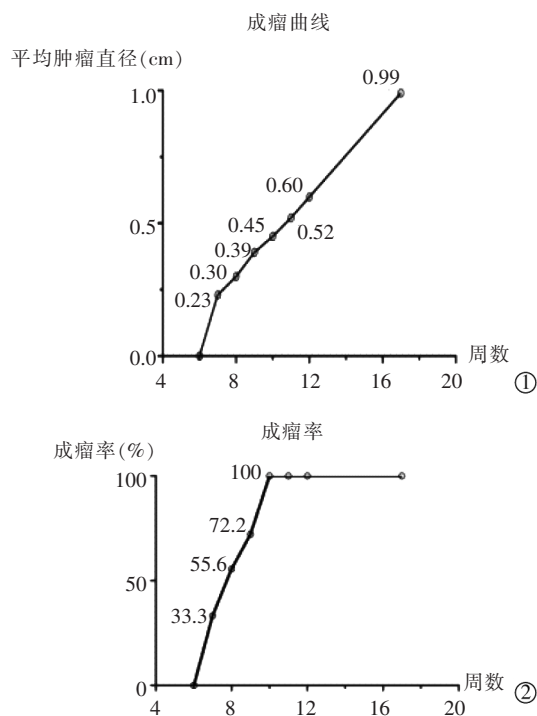
2 结果

2.1 肿瘤模型组

2.1.1 肿瘤模型影像表现 经 MRI 和病理检测确

认肿瘤造模成功后, 即停止用药。第 6 周行首次 MRI 扫描时未观察到大鼠肝脏出现 0.2 cm 结节; 第 7 周 MRI 扫描时首次观察到 12 只大鼠肝脏出现长 T1 长 T2 的结节信号影, 边缘清晰, 最长径均已达到 0.2 cm, 直径为 (0.23 ± 0.03) cm, 肿瘤个数多为 2(1,3)个, 余肝脏部分信号不均一, 呈硬化改变; 第 8 周时成瘤大鼠逐步增多, 结节个数增多、直径增大, 直径为 (0.30 ± 0.08) cm; 第 9、第 10、第 11、第 12 周时结节直径分别为 (0.39 ± 0.09) cm、 (0.45 ± 0.16) cm、 (0.52 ± 0.21) cm、 (0.60 ± 0.23) cm; 最后一次扫描时间为第 17 周, 肿瘤直径为 (0.99 ± 0.30) cm (图 2①)。

2.1.2 成瘤率 当 MRI 显示肿瘤直径达到 0.2 cm 时, 诱导过程中 4 只大鼠死亡, 余 36 只大鼠存活。相应中位时间为 8(7,10)周。成瘤率方面, 第 6 周 MRI 扫描未见明显结节信号影; 第 7 周可见部分大鼠肝脏出现 0.2 cm 肿瘤, 共计 12 只(33.3%, 12/36); 第 8 周可见大量大鼠肝脏出现结节, 共计 20 只(55.6%, 20/36); 第 9 周成瘤大鼠 26 只(72.2%, 26/36); 第 10 周所有大鼠肝脏均可见 0.2 cm 结节影(100%, 36/36)(图 2②)。



①肿瘤直径平均增长曲线;②肿瘤成瘤曲线

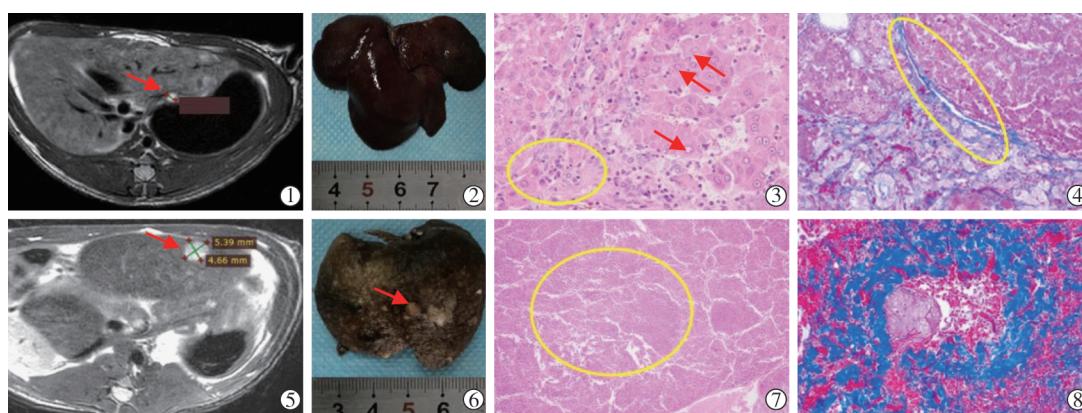
图 2 诱导成瘤图

2.1.3 肿瘤模型病理表现 MRI 显示肝肿瘤直径达 0.2 cm 时处死 5 只大鼠行病理检查, 大体观肝脏

体积略增大,表面光滑,质地柔软,可见灰白色微小结节;HE 染色显示肝细胞水肿、液滴沉积,肝小叶内可见嗜酸性小体和炎性细胞浸润,肿瘤细胞胞质清晰,细胞核肥大深染,经病理科医生确认为肝癌结节;Masson 染色结果显示深蓝色的胶原纤维增多,胶原主要沉积在肝小叶周边,提示肝脏呈纤维化改变(图 3①~④)。MRI 显示肝肿瘤直径达 0.5 cm 时另处死 5 只大鼠,大体观肝脏体积略缩小,质地较硬,表面分布大量灰白色结节;HE 染色可见假小叶形

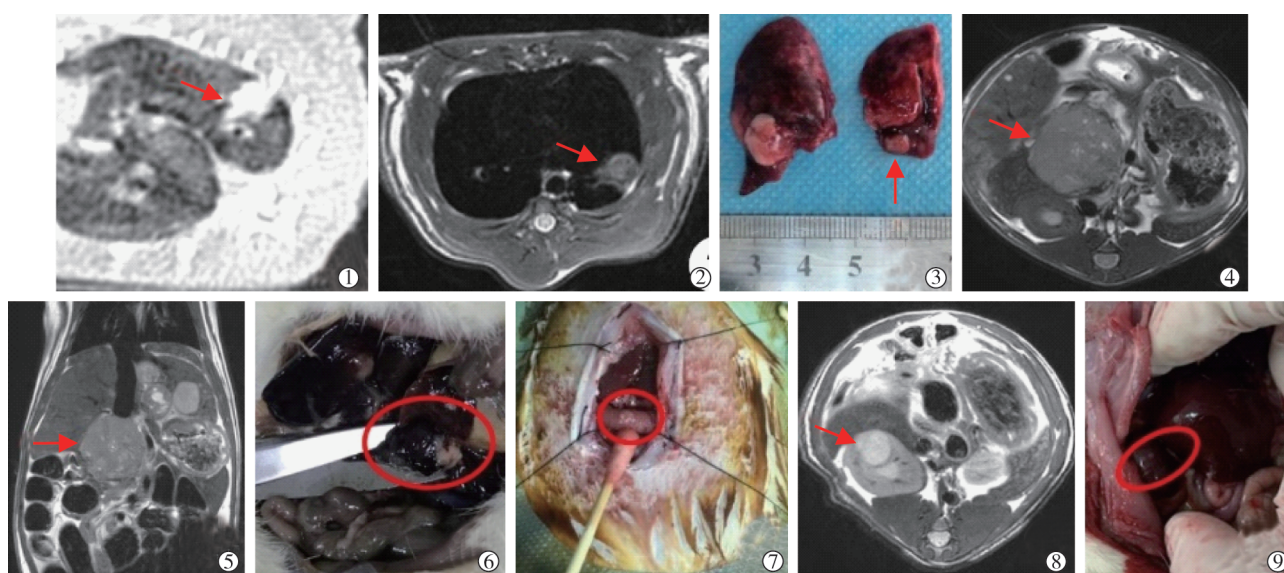
成,正常肝小叶结构消失,周围包绕的纤维间隔内可见少许炎性细胞浸润,假小叶内肝细胞走行和排列紊乱,中央静脉缺如,可见大量深染、多核的肿瘤细胞;Masson 染色显示胶原纤维染色进一步加深,肝脏纤维化程度加重,可见出血性坏死,纤维化组织周围伴随淋巴单核细胞浸润灶(图 3⑤~⑧)。

2.1.4 肝外转移情况 本批大鼠累计观察到 5 只发生肝外转移(图 4),分别为肺转移、腹腔淋巴结转移、十二指肠种植转移、肾上腺转移及肾脏转移。



▲肿瘤直径达到 0.2 cm 时:①肝脏 MRI 可见一长 T1 长 T2 信号结节影,边缘规整;肝脏整体信号不均,呈硬化改变;②肝脏大体观可见肝脏体积略增大,质地较柔软,表面光滑;③HE 检查结果可见肝细胞水肿(如箭头示),胞质染色较淡,其周可见深染的炎性细胞浸润(如圆框示,×400);④Masson 检查结果可见胶原纤维稍增多,呈深蓝色表现(如圆框示,×200) ▲肿瘤直径达到 0.5 cm 时:⑤肝脏 MRI 可见多发长 T1 长 T2 信号结节影,形态规则,肝脏呈硬化改变;⑥肝脏大体观可见肝脏体积略缩小,质地较硬,表面多发灰白色结节,较大者位于左外叶(如箭头示);⑦HE 检查结果可见正常肝小叶结构消失,假小叶形成,其周围包绕的纤维间隔可见少许炎性细胞浸润,假小叶内肝细胞走行及排列紊乱,中央静脉移位、缺如(如圆框示,×40);⑧Masson 检查结果可见深染的胶原纤维较前明显增多,肝纤维化程度进一步加重(×200)

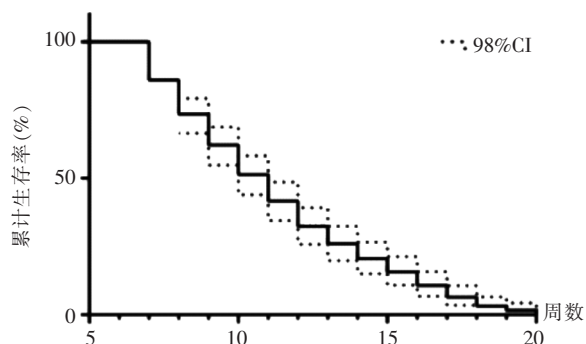
图 3 肿瘤模型表现



①肺转移 CT 影像(转移灶如箭头示);②肺转移 MRI 影像(转移灶如箭头示);③肺转移大体观(转移灶如箭头示);④⑤腹部淋巴结转移 MRI 影像(转移灶如箭头示);⑥腹部淋巴结转移大体观(转移灶如圆框示);⑦十二指肠转移大体观(转移灶如圆框示);⑧肾上腺转移 MRI 影像(转移灶如箭头示);⑨肾脏转移大体观(转移灶如圆框示)

图 4 诱导期间肝外转移

2.1.5 荷瘤大鼠生存时间观察 40 只大鼠诱导成瘤过程中死亡 4 只,另处死 10 只用于病理检测,余 26 只用于观察生存。经 MRI 及病理确定成瘤后,大鼠逐步出现死亡。第 8 周时死亡 2 只,第 9 周时死亡 2 只,第 10 周时死亡 1 只,至诱导后的第 20 周全部死亡(图 5)。



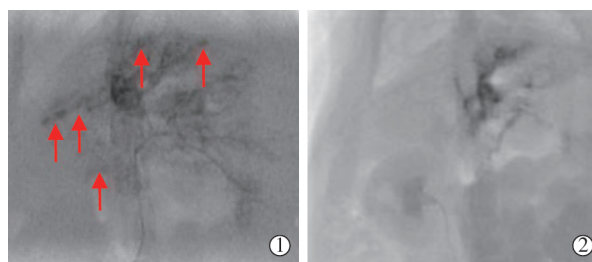
第 7 周时存活 26 只大鼠,第 20 周时全部死亡

图 5 大鼠生存曲线

2.2 TACE 应用组

2.2.1 肿瘤模型 本组 20 只实验动物在 DEN 诱导至肿瘤达 0.5 cm 过程中死亡 4 只,余下 16 只接受 TACE 治疗。

2.2.2 技术成功率、DSA 表现及死亡率 1 只大鼠经胃十二指肠动脉逆行插管失败,2 只 TACE 途中导管意外脱出且再次插入失败,1 只术中失血过量死亡,1 只因麻醉过量死亡,余 11 只大鼠成功接受经导管动脉造影及 TACE 治疗。TACE 技术成功为 11/16,从皮肤切开到闭合的手术时间为(132±10) min。DSA 证实该肝癌模型为富血供肿瘤,动脉早期可见肿瘤血管增多、紊乱,实质期可见结节状肿瘤染色,未见明显动脉-门静脉及动脉-静脉分流,栓塞后造影复查显示肿瘤供血动脉阻断,肿瘤染色消失(图 6)。TACE 术中 2 只大鼠死亡,术后观察期间 1 只死亡(解剖发现大量腹水),TACE 相关死亡为 3/16。



①栓塞前大鼠肝癌 DSA 造影实质期可见肿瘤供血动脉增多、紊乱,肝癌结节染色(如箭头示);②栓塞后造影可见肿瘤供血动脉造影明显变淡

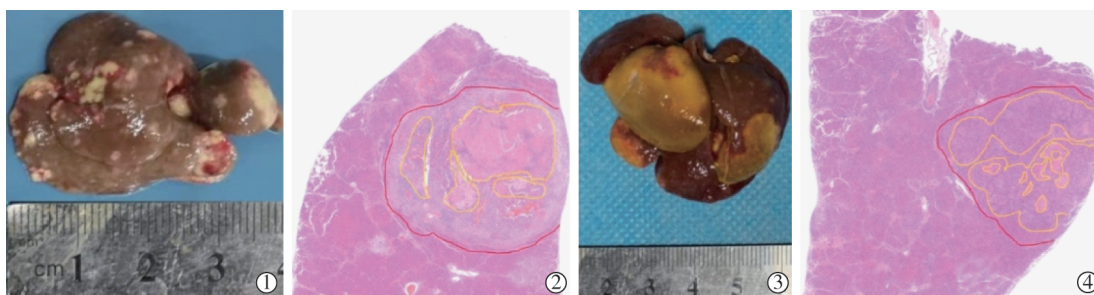
图 6 TACE 栓塞效果示意图

2.2.3 肿瘤坏死 术后 3 d 大鼠肝脏外观可见多发点状坏死,HE 染色显示肿瘤坏死率为(48.16±2.65)%;术后 7 d 可见坏死灶进一步增多,部分肝叶呈坏死改变,HE 染色显示肿瘤坏死率为(50.36±2.92)%(图 7)。

3 讨论

DEN 常被用于诱导大鼠原位肝癌模型。主要优点在于诱导作用专一,常为肝细胞癌(约 77%)^[11-12]。通过 P450 酶进行代谢催化形成 DEN-DNA 加合物,发挥致癌性^[13-14]。此外,DEN 诱导活性氧(ROS)发生氧化应激,导致肝癌^[15-16]。本研究中也体现出诱导早期肝细胞坏死、炎性细胞浸润,中期肝脏硬化以及晚期肿瘤形成的病理改变,相应的时间变化节点与既往文献报道基本一致^[11,17-18]。

本模型成瘤规律因实验设计不同略有区别。Liu 等^[19]采用浓度为 100 mg/L DEN 水溶液诱导 16 周,所有实验鼠均成功出现肝癌。Krishnan 等^[20]首周腹腔注射 2 次 DEN(200 mg/kg),后连续注射 7 d 停药,也在第 14 周均造模成功。但以上研究缺少造模过程动态监测,难以评判首次成瘤时间及不同阶段成瘤大小,无法满足介入操作要求。本研究采取连续性肝脏 MRI 扫描及病理检查,动态揭示模型成瘤全过程。在介入治疗方面,Gade 等^[10]曾采用口服 DEN 连



①栓塞后 3 d 时间点取材,可见肝脏呈非靶向性栓塞,多发散在坏死灶;②HE 染色可见形成的肿瘤结节(如红色框示)及坏死范围(如黄色框示);③栓塞后 7 d 时间点取材,可见肝脏大片坏死,部分肝叶出现完全坏死;④HE 染色可见形成的肿瘤结节(如红色框示)及坏死范围(如黄色框示)

图 7 TACE 术后肿瘤坏死图

续诱导,最大肿瘤直径发展到 0.5 cm 需至少 3 个月。本研究发现,肿瘤平均最大横径达到约 0.5 cm 时虽为 11~12 周,但此时大部分已超过 0.5 cm,仅有个别仍为 2~3 mm;推测可能与其不均匀摄药量有关^[13],这是该诱导方式不足之处。因此,为达到最优介入操作效果,应早于 12 周,最迟约在诱导后 10 周左右行大鼠肝脏 MRI 检查,以免肿瘤负荷过大,产生自发性坏死,影响操作及疗效评价。

本模型死亡率因实验设计不同也有所区别。李笑岩等^[11]采用口服 DEN 诱导,最终死亡率为 17.8% (24/135)。周陈杰等^[21]采用腹腔注射 DEN 诱导,最终死亡率为 33.0%。朱艳志等^[22]采用间断给予 DEN 方式诱导,实现了极低的死亡率(2.1%, 1/48),但首次成瘤在诱导 12 周后。本研究在诱导成瘤过程及肿瘤直径增大至 0.5 cm 时累计死亡 9 只,死亡率为 22.5% (9/40),与以上研究相当。可适当降低死亡率的方法如下:①保证大鼠饮水瓶足够洁净,减少大鼠发生感染概率。②定期更换大鼠垫料,减少氨气浓度;维持饲养房通风,保证光照。③如发现诱导期间大鼠死亡过多,可短暂停止诱导,更换普通水,给予大鼠恢复时间^[23]。本研究发现短暂(如 2 周)停止诱导,不会影响最终成瘤情况。

本类模型肝外转移的报道相对较少。Liu 等^[24]采用 1% DEN 水溶液持续灌胃,在第 20 周时观察到肺转移 1 只,腹腔转移 1 只(2/10)。朱艳志等^[22]使用 0.01% DEN 间断口服诱导,观察到 2 只肺转移(2/36),3 只肝外肿瘤(3/36),但未记录转移出现时间。本研究中观察到肺转移、十二指肠种植转移、腹部淋巴结转移、肾上腺转移和肾转移各 1 例。结合既往文献及本研究结果,发现本模型肝外转移发生率较低,且转移部位及出现时间不固定。

本模型用于 TACE 研究的优势体现在:①口服 DEN 诱导重现了人类肝细胞癌的肝细胞损伤-肝硬化恶性进展的周期改变,实验大鼠出现了类似病理损伤;②DSA 显示该模型肿瘤血管与人类肝细胞癌中所见肿瘤染色较为相似,动脉期血管增多、紊乱,实质期结节染色;③TACE 操作引起的死亡率可随着术者操作水平和熟练度提升逐步降低,提高操作大鼠的存活率,证明该模型 TACE 操作是可重复、安全的介入操作,为研究介入治疗效果动物模型的构建提供了更多选择^[25-26];④TACE 操作实现了与既往报道^[12]较为一致的肿瘤坏死率,且随着时间延长逐步提升。

本研究存在局限性,模型成瘤时间虽较早,但

满足介入治疗所要求仍需成瘤基础上等待肿瘤生长 2 周左右;肿瘤多为散发,较难实现靶向栓塞;模型受到所有啮齿动物模型所固有限制,涉及生物等效性的推断和研究结果对人类肝细胞癌的适用性,仍有待进一步研究证实。

本研究采用影像与病理相结合方式,揭示了 DEN 诱导大鼠原位肝癌模型的肿瘤形成、生长、转移规律,以及肝脏背景损伤情况和动物生存时间,同时证实了采用开腹经胃十二指肠动脉逆行插管方法进行介入治疗的可行性,为开展进一步 TACE 联合免疫治疗的动物实验提供有效的肝癌动物模型。

[参考文献]

- [1] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2018, 69: 182-236.
- [2] Greden TF, Mauda-Havakuk M, Heinrich B, et al. Combined locoregional-immunotherapy for liver cancer[J]. J Hepatol, 2019, 70: 999-1007.
- [3] Sangro B, Sarobe P, Hervas-Stubb S, et al. Advances in immunotherapy for hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18: 525-543.
- [4] Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma[J]. N Engl J Med, 2019, 380: 1450-1462.
- [5] Melero I, Berman DM, Aznar MA, et al. Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15: 457-472.
- [6] Geschwind JF, Artemov D, Abraham S, et al. Chemoembolization of liver tumor in a rabbit model: assessment of tumor cell death with diffusion-weighted MR imaging and histologic analysis[J]. J Vasc Interv Radiol, 2000, 11: 1245-1255.
- [7] Tennant BC, Toshkov IA, Peek SF, et al. Hepatocellular carcinoma in the woodchuck model of hepatitis B virus infection [J]. Gastroenterology, 2004, 127(5 Suppl 1): S283-S293.
- [8] Rajewsky MF, Dauber W, Frankenberg H. Liver carcinogenesis by diethylnitrosamine in the rat[J]. Science, 1966, 152: 83-85.
- [9] Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. Intrahepatic immunity: a tale of two sites?[J]. Trends Immunol, 2005, 26: 512-517.
- [10] Gade TP, Hunt SJ, Harrison N, et al. Segmental transarterial embolization in a translational rat model of hepatocellular carcinoma[J]. J Vasc Interv Radiol, 2015, 26: 1229-1237.
- [11] 李笑岩,白威勇,刘同慎,等.二乙基亚硝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: 401-403, 406.
- [12] Yoshiji H, Yoshii J, Ikenaka Y, et al. Inhibition of renin-angiotensin system attenuates liver enzyme-altered preneoplastic lesions and fibrosis development in rats[J]. J Hepatol, 2002, 37: 22-30.
- [13] Qi X, Yang M, Ma L, et al. Synergizing sunitinib and radiofrequency ablation to treat hepatocellular cancer by triggering the antitumor

- immune response[J]. J Immunother Cancer, 2020, 8: e001038.
- [14] Shirakami Y, Gottesman ME, Blaner WS. Diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis is suppressed in lecithin: retinol acyltransferase-deficient mice primarily through retinoid actions immediately after carcinogen administration[J]. Carcinogenesis, 2012, 33: 268-274.
- [15] Paula Santos N, Colaco A, Gil da Costa RM, et al. N-diethylnitrosamine mouse hepatotoxicity: time-related effects on histology and oxidative stress[J]. Exp Toxicol Pathol, 2014, 66: 429-436.
- [16] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39: 44-84.
- [17] Ding YF, Wu ZH, Wei YJ, et al. Hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis in the rat hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2017, 143: 821-834.
- [18] Bona S, Moreira AJ, Rodrigues GR, et al. Diethylnitrosamine-induced cirrhosis in Wistar rats: an experimental feasibility study[J]. Protoplasma, 2015, 252: 825-833.
- [19] Liu JG, Zhao HJ, Liu YJ, et al. Effect of two selenium sources on hepatocarcinogenesis and several angiogenic cytokines in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinoma rats[J]. J Trace Elem Med Biol, 2012, 26: 255-261.
- [20] Krishnan GS, Rajagopal V, Antony JS, et al. In vitro, in silico and in vivo antitumor activity of crude methanolic extract of *tetilla dactyloidea*(Carter, 1869) on DEN induced HCC in a rat model[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95: 795-807.
- [21] 周陈杰, 宫绪萌, 蔡理全, 等. 改良的从肝硬化到产生肝癌的大鼠模型[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34: 497-499.
- [22] 朱艳志, 孔宪炳, 颜朗. 间断给药 DEN 诱导大鼠肝癌模型建立及病理研究[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35: 1843-1846.
- [23] 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: 4010-4015.
- [24] Liu YF, Zha BS, Zhang HL, et al. Characteristic gene expression profiles in the progression from liver cirrhosis to carcinoma induced by diethylnitrosamine in a rat model[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28: 107.
- [25] 管阳, 刘凤永, 樊庆胜, 等. 一种改良的大鼠胃十二指肠动脉逆行给药方法[J]. 介入放射学杂志, 2018, 27: 349-352.
- [26] 管阳, 刘凤永, 付金鑫, 等. 肝癌动物模型与介入实验操作应用[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26: 1046-1051.
- (收稿日期: 2021-10-05)
(本文编辑: 边 倩)

欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎刊登广告