基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0545-04

对活体状态下大鼠肝癌模型早期诊断的研究

曾 承[1],王 珊[1],胡显良[2]

(1. 重庆医科大学附属儿童医院小儿肿瘤外科,重庆 400016;2. 四川成都市儿童医院小儿外科,成都 610017)

【摘 要】目的:探讨活体状态下对大鼠肝癌模型实现早期诊断的方法。方法:将 40 只幼龄雄性大鼠随机分为正常组、间断性小剂量二乙基亚硝胺(Diethylnitrosamine,DENA)诱癌组(n=20 只)。正常组自由饮用生理盐水,间断性给药组对大鼠给予 0.2% DENA 灌胃,按 10 mg/kg 给药,每周 5 次。两实验组第 15 周停药。第 20 周所有大鼠磁共振(Magnetic resonance,MRI)检查,称重,采集血液标本作甲胎蛋白(α-foetoprotein,AFP)和肝功能检测,所得数据导入非条件 Logistic 回归模型分析,取组织标本做 HE 染色病理标本。结果:实验组诱癌率为 85%,MRI 对肝癌诊断准确率为 94.1%。Logistic 回归分析显示血浆谷丙转氨酶(Alanine transarminase, ALT)与大鼠是否成癌关系最为密切。结论:间断性给药法结合大鼠血浆 ALT 值的持续监测,对 ALT 异常的大鼠进行 MRI 检查,有利于在经费和时间有限的情况下,早期诊断肝癌,避免建模中过高的死亡率和肝外转移率,为后续研究打下基础。

【关键词】肝细胞癌;大鼠 Wistar;二乙基亚硝胺 DENA

【中国图书分类法分类号】R332 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-04

The research of early diagnosis for the rat hepatom model

ZENG Cheng, et al

(*Deparment of Oncological Surgery, the Affiliated Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: to research how to implement early diagnosis for the hepatom model when the rats are alive. *Methods*: 40 young male Wistar rats(30~40 d)were randomly divided into two groups, 20 rats in each group(the control group and the interruptedly low doses experimental group). The control group was fed with physiologic saline for 20 weeks. The interruptedly low doses experimental group was fed with 0.2% diethylnitrosamine (DENA) at a dose of 10 mg/kg every week 5 times. The experimental group was induced for 15 continuous weeks. All of them were sacrificed at the 20th week when the rats were inspected by MRI and weighed. The histological changes of liver tissue were observed under microscope. The levels of liver function and α-foetoprotein(AFP)were recorded。all the factors were put into a logistic regression model for multivariate analysis. *Results*: the induction achievement ratio of hepatoma model in Wistar rats was 85%. The correct rate of MRI for hepatoma was 94.1%. With multivariate analysis, only 1 of the 7 variables in the final logistic regression model was statistically significant: alanine aminotransferase (ALT). *Conclusion*: Through giving rats low doses of DENA interruptedly and performing MRI for inspecting pathological changes of rat livers with anomaly increased levels of plasma ALT, we can implement early diagnosis for the hepatom model to decrease the rate of death and extrahepatic metastasis when fund and time is limited.

【Key words】Hepatic cellular cancer; Rats Wistar; Diethylnitrosamine

肝癌是我国常见恶性肿瘤之一,死亡率高,在恶性肿瘤死亡顺位中仅次于胃、食道而居第三位;在部份地区的农村中则占第二位,仅次于胃癌。由于其动脉血供丰富,直接手术切除难度大,往往通过术前经动脉导管化疗栓塞术(Transcatheter arterial chemoembolization,TACE)介入治疗后再手术切除。但目前肝脏肿瘤术前 TACE 对患者术后生存率的改善一直存在较大争议,许多问题有待进一步的研究,所以找到一种适合介入研究的肝癌建模方法是非常必要的。间断小剂量二乙基亚硝胺(Diethylnitrosamine,DENA)诱导大鼠肝癌模型具有诱癌成功率高,死亡率低及重复率高的优点[1]。但我们在之前的预实验中发现该诱癌法存在着肝外肺转移率较高的缺点。故本实验以此诱癌法为基础,通过研究建模成功率与核磁共振(Magnetic resonance,MRI)、大鼠生化指标的关系以期找到一种能够在活体状态下对早期肝癌模型进行诊断的综合性手段,降低肺转移率为后续介入治疗的研究打下基础。

作者介绍:曾 承(1983-),男,硕士,
研究方向:小儿实体肿瘤的诊断与治疗。

通讯作者:王 珊,女,教授,E-mail:wangshan778@163.com。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DENA,>0.99 g/ml,美国 Sigma 公司产品。自动生化分析仪(Hitachi 7600-020),肝功能检测试剂盒(购买自 Sigma 公司)。人放免法分析试剂盒(北京北方生物技术研究所)。GE Signa 1.5T 磁共振。

1.2 实验动物分组和处理

清洁级,30~40 d,150~170 g 雄性 Wistar 幼龄大鼠 40 只(购自重庆医科大学实验动物中心),所有动物分笼饲养于重庆医科大学清洁级实验动物房,适应环境 3 d。全部大鼠随机分为 2 组(对照组,间断性给药组各 20 只)[2]。

1.3 实验方法

间断给药组,给予 0.2%DENA 灌胃,按 10 mg/kg 给药,每只 1.5~2.0 ml/d,5 次/周。每周称重 1 次,根据体重调整给药剂量。每天观察动物的精神状态、饮食状况及背毛的变化等一般情况,如有异常及时停用或暂缓给予 DENA,以减少死亡率。第 15 周停药。

对照组,生理盐水自由饮用至第 20 周。

1.4 MRI 检查

第 20 周,5%水合氯醛(5 ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠后行 MRI。MRI 检查采用 3 英寸线圈。T_1 WI/SE,TR/TE 400/13.0,层厚 2.0 mm,激励次数(NEX)4.00,矩阵 256×256,视野(FOV 8×6)。T_2 WI/FSE:TR/TE 5 000/104.1,层厚 2.0 mm,激励次数(NEX)4.00,矩阵 256×256,视野(FOV8×8)。

1.5 取材及处理方法

第 20 周,MRI 检查后 40 只大鼠全部断颈处死。暴露心脏,心内取血法 2~3 ml,血液标本按 7 000 g 离心 10 min,取血浆标本储存于 4℃冰箱,迅速开腹,完整取出肝脏,观察测量肿瘤的部位、数目及大小,必要时剖开肿瘤切面;观察肺、肠系膜淋巴结、肾、脾等肝外病变情况,分别记录并按要求取材。迅速切取病变及其周边组织分别固定于 10%的中性福尔马林。石蜡包埋,5 μm 连续切片,HE 染色,光镜下观察诊断。

1.6 肝功能及甲胎蛋白(α-foetoprotein,AFP)检测

血浆标本平均分为两份,一份使用自动生化分析仪,对血浆肝功能进行检测;另一份采用人放免法分析试剂盒对 AFP 进行检测。

1.7 统计学处理

计量资料比较 正态分布数据用 $\bar{x} \pm s$(均值±标准差)表示,两均数间比较采用 t 检验。

计数资料(即样本率)比较 本实验四格表中有 3 个格子理论频数小于 5,故采用 FISHER 精确概率法。

非条件 Logistic 回归分析 自变量为 ALT,AST,TBIL,GGT,ALP,ALB 及体重,值为各因素的原始数据,应变量为肝癌(亚变量化后,是 =1,否 =0),采用 Forward Conditional 法,以便选择与肝癌患病率联系紧密的主要因素。

以上数据均采用 SPSS 13.0 软件进行分析,$P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般观察项目

实验组毛色,精神状态,饮食情况,活动性均较正常组差。实验组 20 只大鼠中消化道出血及腹水者 12 只(60%),伴肝硬化者 20 只(100%),伴肺部感染者 18 只(90%),单发性肿瘤 2 只(10%),多发性肿瘤者 15 只(75%),死亡数 3 只(15%),成癌率 17 只(85%),肺转移 11 只(55%)。正常组大鼠无死亡,最后尸检未发现异常。

2.2 肝脏大体改变

病变肝脏可看见表面有许多颗粒状结节,与正常肝脏比较,明显质地偏硬,颜色偏暗,肝叶比例明显失调,并与周围组织粘连。瘤体多发,大小外形不一,多为白色或黄色,直径 2~4 mm 不等;肿瘤较大者,压迫和浸润周围组织,且可见点状出血坏死灶等。切面观察:瘤组织呈新鲜肉瘤样外观,瘤细胞和纤维较丰富者多呈灰白色,因脂肪变或坏死可呈黄色,有出血坏死者切面多为红色。转移性病变均为肺转移,但是肉眼观未见明显异常。

正常组肝脏色淡红,表面光滑,边缘锐利,质地中等(见图 1~3)。

2.3 光镜观察

光镜下均为肝细胞肝癌,癌巢中癌细胞呈条索状、假腺管状或致密型排列,癌细胞呈多边形,异型性明显,胞核大、深染,胞质成分少,可见较多单核,多核瘤巨细胞和核分裂相。周围正常肝小叶结构被破坏,由广泛增生的纤维组织将肝小叶分割包绕成大小不等的圆形肝细胞团,可见典型的假小叶结构,假小叶内肝细胞索排列紊乱,肝细胞多呈脂肪样改变,可见肝细胞坏死,并且多数伴有炎性细胞浸润,小叶中央静脉缺如。

正常对照组肝脏肝小叶结构完整,肝细胞排列整齐,细胞肝癌肺转移可见肺部散在肝源性癌巢,周围伴有炎症细胞浸润(见图 4~5)。

2.4 影像学表现

结合病检结果 MRI 对肝癌诊断正确率高达 94.1%(17 只患肝癌大鼠中 1 只肝脏 MRI 未发现异常)。MRI 上可见病变肝脏较正常肝脏信号不均匀,肝癌在 T_1WI 上呈多个散在大小不一的类圆形低信号区,信号较均匀,在 T_2WI 中呈多个大小不一的类圆形高信号区,其间夹杂少许低信号区域(见图 6~7)。

2.5 肝功能,AFP 检测及非条件 Logistic 回归分析结果

大鼠肝功能、AFP 值,实验组与正常组比较都明显增高,并且有显著统计学意义。死前体重,实验组较之正常组明显下降,同样有显著统计学意义($P<0.05$)。

非条件 Logistic 回归分析研究肝功、AFP 及体重与肝癌患病率关系(具体详见"统计处理")。结果(详见表 2)显示,只有自变量 ALT 入选,肝癌发病原因危险模型为 Y=-20.291+0.176*ALT,方程有效分类能力为 92.5%;方程有效性经 χ^2 检验,χ^2=36.751,自由度为 1,$P<0.000\ 1$。结论为血浆 ALT 与大鼠是否患肝癌密切相关。优势比 OR=1.192 说明 ALT 为危险

因素,随着 ALT 值的升高罹患肝癌的可能性也上升。

ALT≥120 U/L 的成癌率为 94.1%,与 ALT<120 U/L 的成癌率为 33.3%,两组间成癌率差异有显著统计学意义(FISHER 精确概率法,P=0.046<0.05)(详见表 5)。

3 讨 论

大鼠肝癌模型包括自发性、诱发性和移植性肿瘤模型 3 种。由于自发性肿瘤模型诱癌率低且肿瘤发生情况参差不齐,诱癌时间较长,实验耗资较多,故较少采用。所以用于实

表 2 非条件 Logistic 回归分析最终结果

	B	SE	Wald 检验	df	Sig	OR	95%CI for OR
ALT	0.176	0.117	2.272	1	0.132	1.192	0.949~1.498
常数	-20.291	14.221	2.036	1	0.154	0.000	

注:B 偏回归系数,SE 偏回归系数标准误, Wald 回归系数 wald 卡方检验值,df 自由度,Sig 为 P 值,OR 优势比,95%CI for OR 优势比 95%可信区间

表 3 实验组(包括饮水组和灌药组)和正常组肝功能、AFP 及体重值的比较

	灌药组(n=20)	正常组(n=20)	t
ALT(U/L)	125.20 ± 6.53	39.41 ± 2.38	55.193
AST(U/L)	239.70 ± 2.89	91.43 ± 4.28	128.392
GGT(IU/L)	8.15 ± 1.05	1.27 ± 0.20	28.788
ALP(IU/L)	183.75 ± 13.96	51.90 ± 3.94	40.650
TBIL(μ mol/L)	8.49 ± 0.33	0.34 ± 0.12	104.355
ALB(g/L)	32.64 ± 0.48	33.30 ± 0.63	3.907
AFP(ng/ml)	5.448 ± 0.064	2.364 ± 0.092	122.279
体重(g)	233.80 ± 32.93	343.15 ± 47.45	-8.467

注:$t_{0.05/2,38}$=2.024

表 5 ALT≥120 U/L 和 ALT<120 U/L 2 组间成癌率比较

	未成癌	成癌	合计
ALT≥120 U/L	1 (5.9%)	16 (94.1%)	17
ALT<120 U/L	2 (66.7%)	1 (33.3%)	3
合计	3	17	20

注:四格表中除 ALT≥120 U/L 组的"成癌"方格中理论频数大于 5 以外,其他 3 个方格的理论数均小于 5,故采用 FISHER 精确概率法,P=0.046<0.05



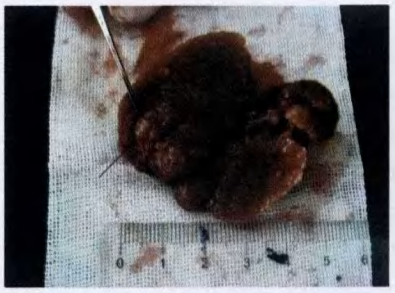
肝脏色淡红,表面光滑,边缘锐利,质地中等

图 1 正常大鼠肝脏肉眼观



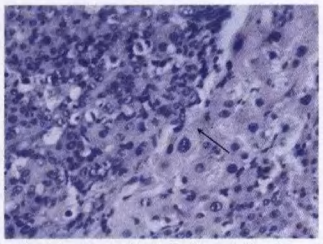
肝脏色暗,表面遍布颗粒状结节,与周围组织粘连,腹腔两侧可见腹水

图 2 肝癌肝硬化伴腹水



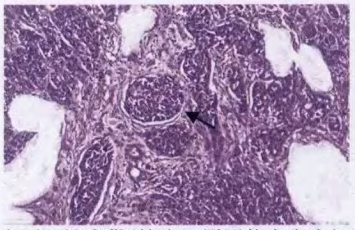
淡黄色包块为肝癌瘤体(箭头),周围肝组织肝硬化表现明显

图 3 大鼠肝癌肉眼观



肝癌癌巢(箭头),细胞排列紊乱,形状不一,核大深染

图 4 (HE ×400)大鼠肝细胞肝癌病理切片



肺部散在肝源性癌巢(箭头),周围伴有炎症细胞浸润

图 5 (HE×200)大鼠肝癌肺转移病理切片



肝脏较正常肝脏信号不均匀，肝癌呈多个散在大小不一的类圆形低信号区（箭头），信号较均匀

图 6　MRI 实验组大鼠肝癌 T_1WI 图像



肝癌呈多个大小不一的类圆形高信号区（箭头），其间夹杂少许低信号区域

图 7　MRI 实验组大鼠肝癌 T_2WI 图像

验研究的肿瘤动物模型只有药物诱发与移植性肿瘤模型。移植性肿瘤模型建模时间虽短，肿瘤的大小和位置较易控制，但肿瘤生长在正常肝组织背景下，与人肝癌多发生于肝炎、肝硬化背景下不同，且操作复杂，肝癌转移快，大鼠存活时间短[5,6]。而通过药物诱导肝癌可人为控制实验条件以及在限定时间内获得可靠的结果，同时可通过实验动物品系的选择而减少个体差异，故临床科研工作中应用较多[7]。肝癌发生一般要经过启动、促进、演进和癌变的过程，是一个涉及多因素、多步骤、多阶段的十分复杂的过程，怎样在动物身上完全模拟出肝细胞肝癌演变过程并非易事。经典致癌剂 DENA 具有很强的化学毒性，所含的亚硝酸基因具有中毒剂和诱癌剂的双重效果[3]。Tomas 等[9]的实验证实用 DENA 进行大鼠肝癌诱导具有以下特点：成功率高；周期相对较短；对肝脏的致癌性较为专一；肝细胞癌所占比例大；肝癌大鼠血清 AFP 水平多为上升型曲线；整个诱癌过程一般分为肝硬变前期、肝硬变和肝癌 3 个阶段。这与人类比较相似。许多其他研究者[4,10-12]也证实了这一结论。所以本实验中，我们采用间断小剂量 DENA 诱导大鼠肝癌模型，以期尽量模拟人肝细胞癌的演变过程。

对于进行介入研究来说，只有在活体状态下确诊肝癌模型已经建立成功后，才能有后续的治疗研究，为了减少其他因素的干扰，最好的肝癌模型不但是其诱癌过程与人类相似，较低的死亡率及肝外转移率都是必要的。然而当前许多学者都是处死动物后，通过病理学来验证是否模型成功。这显然与介入在活体状态下进行研究的要求是背道而驰的。而目前对于肝癌模型进行药物治疗的研究多是在实验开始阶段就将诱癌剂与治疗药物混在一起，按一定的规律或周期喂给动物，在实验结束阶段来观察老鼠肝脏的变化情况，从而研究药物对肝癌的治疗效果[10-12]。采用类似的方法，在肝癌模型还未诱导成功时，将超液化碘油和诱癌剂混合后通过肝动脉超选插管给药的话药物很快就会被代谢掉，按此方法进行介入治疗的研究显然也是不可取的。

所以如何在大鼠活体状态下早期确诊肝癌，避免过高死亡率和肝外转移率对于进行介入治疗的研究是很必要的。在影像学方面，根据 Jochen Trubenbach 等[8]的研究，最好的诊断方法是 MRI，因为与增强 CT 和血管造影比较，前者不但是无创的，而且对于肝癌的敏感性也优于后两者。本实验中 MRI 对于肝癌的正确诊断率高达 94.1%与以上结论相符。从理论上讲，为了早期诊断肝癌而定期对每只大鼠 MRI 检查无疑是个很好的方法。但实验过程中，研究者往往是医院完成当天工作后借用医院的设备对大鼠进行检查，故时间往往很有限。就动物实验而言，一般样本量都是几十只，有的甚至会达到上百只，这样的方法显然会耗费大量的时间和精力。在本实验中，每只老鼠只做 T_1WI 和 T_2WI，平均 45 min/ 只，显然定期对每只动物进行 MRI 检查在实际操作中很难实现。

因此我们通过 Logistic 回归模型研究大鼠肝功能、AFP及体重与肝癌患病率的关系以期从中能找到与大鼠肝癌密切相关的指标，为早期诊断提供帮助。结果显示 ALT 值的变化与肝癌的关系最为密切，患肝癌的危险度随着 ALT 值的升高而增大，而且我们发现 ALT≥120 U/L 时，成癌率比 ALT<120 U/L 组明显增高，两组间成癌率差异有显著的统计学意义（94.1% vs 33.1%，FISHER 精确概率法，P=0.046<0.05）。AFP 是人类目前最有价值的诊断标准，但本实验中显得不如 ALT，我们认为首先人类和大鼠毕竟是两种生物，彼此间存在着一些可比性，但肯定也有不同的地方。人 AFP 范围是 0~25 ng/ml，当 >300 ng/ml 时有诊断原发性肝癌的价值。但本实验中我们发现患病组 AFP 值为（5.448 ± 0.064）ng/ml，而对照组（2.364 ± 0.092）ng/ml。与人类相似的地方是大鼠患病组相对正常组 AFP 升高了，且有非常显著的统计学意义（P<0.01），这说明在统计学上我们有非常大的把握相信患病组的 AFP 较对照组升高了，但和人类不同的是大鼠患病组 AFP 升高的程度却明显不及人类罹患肝癌时的程度高。与此同时，我们注意到大鼠患病组 ALT（125.20 ± 6.53）U/L 相对于正常组（39.41 ± 2.38）U/L 升高的程度明显高于 AFP，所以这可能是在 Logistic 回归分析中通过似然比检验得出了 ALT 与成癌率相关性最高结论的原因。另外采用大鼠眼眶静脉丛采血法，体重 200~300 g 大鼠每次可采血 0.5~1.0 ml，而且可以多次采血，这也为长期对大鼠肝功能和 AFP 值监测提供了可行性。

综上，采用间断性给药法诱导大鼠肝癌模型，长期对大鼠进行肝功能及 AFP 值检测，特别关注大鼠 ALT 值的改变，针对性的给 ALT≥120 U/L 的大鼠进行 MRI 检查，可以在实验时间和经费有限的情况下，对肝癌模型实现早期诊断从而避免建模过程中过高的死亡率和肝外转移率，为之后进行介入治疗研究打下基础。

参 考 文 献

[1]　程延安，袁利超，党双锁.间断小剂量 DEN 诱发大鼠肝癌模型研

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0549-04

大蒜素及缺血预处理对大鼠肾缺血再灌注损伤的影响及机制研究

吴建伟[1],罗春丽[2],李家彬[1],何云峰[1],夏 康[1],杨 超[1],吴小候[1]
(1.重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016;2.重庆医科大学检验系实验诊断教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨缺血预处理和大蒜素注射液预处理对大鼠肾缺血再灌注损伤的影响及机制。方法:建立大鼠肾缺血再灌注损伤模型。将 75 只 SD 大鼠随机分成对照组(Control group,CON 组)、缺血再灌注组(Ischemia reperfusion,IR 组)、缺血预处理组(Ischemic preconditioning group,IPC 组)、大蒜素预处理组(Allitride preconditioning group,APC 组)、大蒜素及缺血预处理(Allitride preconditi oning and ischemic preconditioning group,AIPC 组)共 5 组,每组 15 只。各组均于术后 24 h 采集肾组织及血样标本,用 HE 法观察肾组织病理形态、测定血尿素氮 (Blood urea nitrogen,BUN)、肌酐 (Creatinine,Cr) 含量、TBA 法测定丙二醛(Malonaldehyde,MDA)含量、黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)活性;免疫组化法观察肾组织中粘附分子(Interce llular adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达。结果:IPC 或 APC 后 HE 染色坏死较 IR 组减少,BUN、Cr、MDA 含量较 IR 组下降($P<0.01$),SOD 活性较 IR 组升高($P<0.01$),肾组织 ICAM-1 表达较 IR 组下降($P<0.01$)。AIPC 处理后各项指标较 IPC 或 APC 单一处理有显著区别($P<0.01$)。结论:缺血预处理和大蒜素预处理对肾缺血再灌注有保护作用,两种处理因素对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护有协同作用,可能是通过下调 ICAM-1 的表达实现的。

【关键词】缺血预处理;肾脏缺血/再灌注;大蒜素;细胞间粘附分子 -1;丙二醛;超氧化物歧化酶
【中国图书分类法分类号】R699.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-08

Effect of allitride injection and ischemic preconditioning on renal ischemia/reperfusion injury in rats

WU Jian-wei, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of allitride injection preconditioning and ischemic preconditioning on renal ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats. *Methods*: Rat's I/R injury model was established. A total of 75 rats were randomized into five groups (n=15, in each); control group (CON), I/R control group

作者介绍:吴建伟(1977-),男,硕士
研究方向:肾脏缺血再灌注损伤的机制。
通讯作者:吴小候,男,教授,E-mail:wuxiaohou80@hotmail.com。

究[J].肿瘤防治杂志,2005,12(11):806-808.
[2] 周一平.用 Excel 软件进行药物毒理实验的随机分组[J].药学进展,2005,29(9):425-427.
[3] Okudo H,Moriyama M,Tanaka N,et al.Detection of serum and intrahepatic hepatocyte growth factor during DEN-induced carcinogenesis in the rat [J].Hepatol Res,2002,24(4):385-394.
[4] 罗 明,贺 平,吴孟超,等.苦参碱和氧化苦参碱对二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌的预防阻断作用[J].肿瘤防治杂志,2000,7(6):561-563.
[5] Futakuchi M,Hirose M,Ogiso T,et al. Establishment of an in vivo highly metastatic rat hepatocellular carcinoma model[J]. Jpn Cancer Res, 1999,90(11):1196-1202.
[6] 郝 强,田建明,曹雪涛,等.经肝动脉插管注射重组腺病毒治疗大鼠转移性肝癌的实验研究[J].中华放射学杂志,2000,34(10):666-669.
[7] Masaki T,Okada M,Tokuda M,et al.Reduced c-terminal srckinase (Csk)activities in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology,1999,29(2):379-384.
[8] Jochen Trubenbach,Florian Graepler,et al.Growth characteristics and imaging properties of the morris hepatoma 3924A in ACI Rats:A suitable model for transarterial chemoembolization[J].Cardiovasc Intervent Radiol ,2000, 23(3):211-217.
[9] Thomas P,Fugnumn R,Aranyi C,et al.The effect of dimethylnitrosamine on host resistance and immunity[J].Toxicol Appl Pharmacol, 1985,77(2):219-229.
[10] Anil K Bansal,Manju Bansal,et al Protective role of vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver[J]. Chemico-Biological Interactions,2005,156(2-3):101-111.
[11] Perumal Subramanian,Shankaran Mirunalini,Kadiyala Babu Dakshayani,et al.Prevention by melatonin of hepatocarcinogenesis in rats injected with N-nitrosodiethylamine[J].J.Pineal Res,2007,43(3):305-312.
[12] C.Thirunavukkarasu,D.Sakthisekaran.Effect of selenium on N-nitrosodiethylamine-induced multistage hepatocarcinogenesis with reference to lipid peroxidation and enzymic antioxidants[J].Cell Biochem Funct, 2001,19(1):27-35.

(责任编辑:关蕴良)