

α 粒子与酒精联合作用致肝细胞恶性转化的影响

刘红艳, 王婧洁, 张慧芳, 党旭红, 王 超, 张忠新, 张睿凤,
原雅艺, 任 越, 董娟聪, 柴栋良, 李幼忱*

中国辐射防护研究院, 山西 太原 030006

摘要: 研究 α 粒子和酒精联合作用对肝细胞恶性转化生物效应的影响, 为系统评价 α 粒子辐射风险提供实验依据。通过建立辐射和酒精联合作用细胞模型, 分析比较 α 粒子辐射、酒精单因素与两者复合对人正常肝细胞的细胞周期、迁移和侵袭等恶性转化生物特征及相关基因 mRNA 水平表达的影响。与对照组比较, 复合因素作用的细胞发生迁移和侵袭的细胞数量明显增多, 在 mRNA 水平抑癌相关基因 p53 和细胞粘附蛋白相关基因 cdh1 表达量明显降低, 原癌相关基因 mdm2 表达量明显升高, 复合因素作用下肝细胞发生明显的恶性转化趋势。辐射和酒精均能诱导肝细胞发生恶性转化, 肝细胞经 α 粒子辐照后再受酒精作用其发生恶性转化的风险高于单纯接受 α 粒子辐照的细胞, 酒精增加了 α 粒子辐照后肝细胞恶性转化风险, 可能与影响肝细胞表面 E 型粘连蛋白的表达有关, 导致细胞之间粘连性降低, 促进细胞发生迁移和侵袭。因此, 在评价 α 粒子内照射对健康的影响时需要考虑职业人员的饮酒习惯。

关键词: α 粒子辐射; 酒精; 联合作用; 细胞生物效应

中图分类号: R818.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-9950(2021)05-0434-07

doi: 10.7538/hhx.2021.43.05.0434

Biological Effects of Internal Exposure of α -Particle Interacted With Alcohol on Hepatocytes

LIU Hong-yan, WANG Jing-jie, ZHANG Hui-fang, DANG Xu-hong, WANG Chao,
ZHANG Zhong-xin, ZHANG Rui-feng, YUAN Ya-yi, REN Yue, DONG Juan-cong,
CHAI Dong-liang, LI You-chen*

China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China

Abstract: In order to comprehensively evaluate the risk of α -particle irradiation, the biological effects of α -particle radiation combined with alcohol on hepatocytes was studied. The testing indicators which were the cell cycle, cell migration and cell invasion, as well as the mRNA expression were compared among the α -particle exposure group, the alcohol group, and the combined factor group. Compared with the control group, the number of migrating and invading cells in the combined group significantly increases, the mRNA expression of the tumor suppressor related genes p53 and cdh1 significantly decreases, and the protooncogene mdm2 significantly increases. Hepatocytes occurs malignant transformation effected with a

certain amount of α -particle irradiation and alcohol. But the hepatocytes are more likely to malignant transformation induced by alcohol after the same dose α -particle exposure. Alcohol may play a helper role in inducing malignant transformation. It may be related to the E-cadherin on the surface of hepatocytes, the low expressions of this surface protein, which reduces the adhesion between cells, and promoting cell migration and invasion. Therefore, drinking habits of occupational personnel should be considered in evaluating the health effects of α -particle internal irradiation.

Key words: α -particle exposure; alcohol; combined effect; biological effects of cell

随着我国核技术应用产业的发展,电离辐射对人类健康的影响越来越受到重视。 α 粒子由于具有较高的传能线密度(LET),会导致较强的相对生物效应能(RBE),它对人体健康的影响一直是职业健康中关注的重点^[1-4]。超铀核素在核材料生产、MOX燃料制造、乏燃料后处理以及高放废物处理与处置中对人体健康存在潜在风险^[5-6]。超铀核素半衰期长,比活度高,人体内负荷小,主要考虑通过吸入或从皮肤进入体内后产生的 α 粒子辐射能量沉积对组织器官的影响,肝脏是其重要的靶器官^[7-8]。众所周知,肝脏是人体代谢的主要场所,且几乎是酒精代谢的唯一场所,涉核工作人员的饮酒习惯是否会增加 α 粒子内照射对人体的健康风险,目前没有足够的人群流行病学调查和实验动物、细胞水平的数据支持^[9-12]。在 α 粒子内照射氡的健康评估中,已有流行病学研究表明氡与吸烟的联合致肺癌作用存在协同效应,与部分细胞学和动物学实验研究结果一致^[13-16]。

因此本工作拟通过 α 粒子辐射体,建立体外细胞实验,开展 α 粒子辐射、酒精单独作用和两者联合作用肝细胞的实验研究,从细胞生物学、分子生物学水平探讨单因素、联合因素对人肝细胞生物学效应的影响,为系统评价 α 粒子内照射风险提供基础数据。

1 实验部分

1.1 实验细胞

LO2细胞是人正常肝上皮细胞构建成的永生化细胞系,购于中国科学院上海细胞库。

1.2 辐射源

苏州大学²⁴¹Am α 粒子辐射源装置,如图1所示, α 粒子源几何尺寸为36 mm \times 4 mm,是有效直径为20 mm的面源,其活度为 5.7×10^6 Bq,文献^[17]计算给出表面剂量率为0.138 Gy/min。面源

与盖玻片盘平行放置,两者间距离为10 mm。



图1 ²⁴¹Am α 粒子辐射源装置图

Fig. 1 ²⁴¹Am α -particle irradiation of radioactive sources

1.3 仪器和试剂

CO₂细胞培养箱、酶标仪, Thermo公司;超洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;实时荧光定量PCR扩增仪, Bio-Rad公司;倒置相差显微镜, OLYMPUS公司;流式细胞仪, Beckman公司;高速冷冻离心机, Sigma公司。

RPMI-1640培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、青霉素和链霉素,上海生工; Trizol(主要成分为苯酚,含有8-羟基喹啉、异硫氰酸胍、 β -巯基乙醇等抑制内源和外源RNA酶)、RNA反转录、荧光定量PCR试剂盒,天根公司;细胞周期试剂盒、CCK-8试剂盒,凯基生物;酒精,分析纯,南京碧云天生物工程有限公司; Transwell板、Matrigel基质胶,美国康宁公司。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 LO2人肝细胞在37℃恒温5%(体积分数)CO₂环境下的细胞培养箱中,用含10%(体积分数)胎牛血清的RPMI-1640培养基进行培养,贴壁细胞生长至培养瓶底面积的

80%~90%，经 0.25%（质量分数）胰蛋白酶消化，进行 1:3 传代，传代一次计 1 代(P1)，培养细胞瓶于倒置相差显微镜下观察细胞状态。

1.4.2 细胞生长增殖检测 细胞生长增殖采用 CCK-8 试剂盒进行检测，已广泛应用于细胞毒理试验。首先制作人肝细胞生长标准曲线，取对数生长期细胞，用血球计数板计数细胞浓度，并将肝细胞密度分别调整为每毫升 1 万个、2 万个、4 万个、8 万个、16 万个，每孔分别接种 100 μL 于 96 孔板进行培养，每组设置 5 个复孔。待接种细胞贴壁后，加入 CCK-8 试剂，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h 后，采用酶标仪于 490 nm 波长处测量吸光度(OD)值。

1.4.3 α 粒子辐照剂量筛选 在文献[18-19]调研的基础上，初步确定了 5 个剂量点对肝细胞进行 α 辐照，剂量分别为 0.05、0.10、0.25、1.00、2.00 Gy，根据辐照剂量 = 剂量率 \times 辐照时间， α 源的剂量率为 0.138 Gy/min，计算出各实验点所需辐照时间分别为 21.7、43.5、108.7、434.8、869.6 s，辐照前细胞接种于已消毒的玻璃片上，滤纸吸控细胞表面培养基，将贴有细胞的玻片面朝 α 源，置于 α 粒子辐射源装置辐照区卡槽内。辐照完成后，玻片直接放入培养基，待细胞继续生长数小时后进行消化转移至细胞培养瓶培养。对照组细胞同时置于玻片接受假辐照(0 Gy)，辐照后 48 h 进行细胞增殖活力检测，显微镜动态观察细胞形态和生长状况，筛选合适的辐照剂量进行后续 α 粒子辐照实验。

1.4.4 酒精作用浓度筛选 在文献[20-22]调研的基础上，根据中国人群饮酒习惯，计算血液和肝脏代谢酒精浓度，初步采用酒精浓度(体积百分比) 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0% 和 7.0% 的细胞培养基进行肝细胞酒精作用 24 h，结束后换成正常培养基，进行细胞增殖活力检测，显微镜动态观察细胞形态和生长状况，筛选合适的酒精浓度和作用时间进行后续酒精作用肝细胞实验。

1.4.5 联合作用方式及实验分组 根据 α 粒子辐射和酒精单因素作用模型，建立复合作用方式。实验分为 4 组：对照组(不进行任何处理)；辐射组(单纯 α 粒子辐照)；酒精组(单纯酒精处理)；复合组(辐射组 + 酒精组，即细胞先经 α 粒子辐照后再经酒精作用处理)。实验用细胞经消化后进行传代，采用相同代数的各组细胞，且均处于 40 代以内，进行细胞生物学指标检测。

1.4.6 细胞生物学效应

(1) 流式细胞术检测细胞周期

细胞周期是反映细胞生长增殖状态的重要指标之一。采用 PI 染料进行 DNA 染色，利用流式细胞术检测肝细胞周期。用 Multicycle for windows 32-bit 软件统计分析人肝细胞在 G₀/G₁、S、G₂/M 这 3 个不同时期的细胞占比。每个实验样品设 3 个平行样，收集人肝细胞约 1×10^6 个，加入无水乙醇过夜固定肝细胞，用预冷的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)清洗细胞去掉乙醇；加 PI 染料，室温避光孵育 30 min 后，用流式细胞仪进行定量检测。

(2) 细胞迁移和侵袭能力检测

细胞迁移和侵袭实验是反映细胞发生恶性转变的重要指标。采用 Transwell 实验测定细胞迁移和侵袭能力。细胞迁移检测：细胞接种于 24 孔板 8 μm 孔径滤膜的 chamber 上室，下室加入 500 μL 含胎牛血清培养基，避免起泡产生。每个实验组接种 3 个平行样，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 24 h 后终止，用 0.1%（质量分数）结晶紫染色，棉签擦去上室内膜上的细胞，将 Transwell 小室反过来底朝上，显微镜下观察小室底膜上附着细胞，随机选取 5~10 个视野，显微镜拍照，记录图像中细胞数量。检测细胞侵袭能力时，Transwell 小室底部膜需要包埋 Matrigel 基质胶，将冰上缓慢溶解的 Matrigel 基质胶与无血清培养基按体积比 1:8 稀释后，加入小室底部，室温待其凝固，再接种细胞悬液，其余步骤与细胞迁移检测一致。采用 Image J 图像处理软件进行肝细胞数量自动计数。

(3) mRNA 分子水平表达

采用实时荧光定量聚合酶链锁反应(Real-time qPCR)测定肝细胞恶性转化相关 mRNA 表达水平。在文献[23-25]调研的基础上，根据美国国家生物技术信息中心(NCBI)DNA 序列数据库 GeneBank 公布的序列，设计 Real-time qPCR 引物，结果列入表 1。实验细胞待生长至 80%~90%，用 PBS 冲洗 3 遍后，直接加入 Trizol 试剂，提取细胞总 RNA，并逆转录成 cDNA，并以此为模板进行 Real-time qPCR 检测，每个样本设置 3 个重复样，结果采用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法进行分析。

1.5 统计学分析

实验设计 3~5 个平行样本。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS22.0 软件进行统计学分析，多组间数据比较采用单因素方差分析，两两组间显

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因	序列(5'-3')	Tm	功能
p53-F	ACACGCTTCCTGGATTGG	47.5	与肿瘤相关性高的抑癌基因
p53-R	ACGGCAAGGGGGACAGAA	48.5	与肿瘤相关性高的抑癌基因
cdh1-F	TGGACCGAGAGAGTTTCCCT	48.7	编码 E-钙粘蛋白,在 EMT 过程初期下调表达,
cdh1-R	ACGACGTTAGCCTCGTTCTC	48.7	功能缺失的细胞更易发生侵袭、转移
mdm2-F	ATCTACAGGGACGCCATCGAA	49.2	原癌基因
mdm2-R	TGAAACTGAATCCTGATCCAACCA	48.7	原癌基因
gapdh-F	AGGTCGGAGTCAACGGATTT	46.6	内参基因
gapdh-R	TGACAAGCTTCCCGTTCTCA	46.6	内参基因

著性差异比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

2 结果和讨论

2.1 α 粒子辐照剂量

LO2 人正常肝细胞在含 10% 新生胎牛血清 RPMI-1640 培养基中正常生长, 于倒置显微镜下观察细胞形态, 呈上皮样、多角型, 贴壁生长状态。采用 ^{241}Am 放射源对肝细胞进行不同剂量 (0.05、0.10、0.25、1.00、2.00 Gy) α 粒子辐照, 辐照后 48 h 检测肝细胞存活分数, 结果示于图 2。由图 2 可知: 与对照组 (NC) 比较, 0.05 Gy 组细胞活力差异不显著 ($P > 0.05$); 0.10、0.25、1.00 Gy 组肝细胞的存活分数低于对照组, 差异不显著 ($P > 0.05$); 2.00 Gy 组肝细胞存活分数明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 肝细胞接受 2.00 Gy 辐照后, 连续培养 72 h, 50% 的细胞呈悬浮状态, 出现明显死亡。因此, 选择肝细胞存活分数几乎不受影响的 1.00 Gy 辐射剂量进行单因素 α 粒子辐照细胞, 记为辐射组。

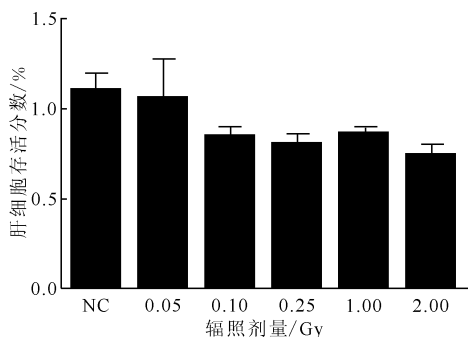


图2 不同剂量辐照 48 h 后对肝细胞存活分数的影响
Fig. 2 Hepatocyte survival at 48 h after exposure to different doses

2.2 酒精作用浓度

采用含酒精浓度 (体积百分比) 分别为 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0% 和 7.0% 的细胞培养基作用于肝细胞, 与对照组比较, 结果示于图 3。由图 3 可知: 酒精作用 24 h 后, 0.5% 和 1.0% 酒精作用组肝细胞存活分数低于对照组, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 2.0% 和 3.0% 酒精作用组肝细胞存活分数低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 在作用 5 min 后, 长梭型贴壁细胞变圆, 4 h 后形态恢复正常; 4.0% ~ 7.0% 酒精作用组肝细胞存活分数显著低于对照组。因此, 选择肝细胞存活分数几乎不受影响的 1.0% 酒精进行作用, 记作酒精组。

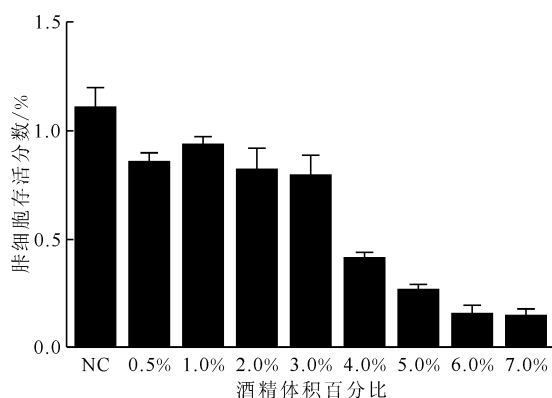


图3 不同浓度酒精处理 24 h 后对肝细胞存活分数的影响
Fig. 3 Hepatocyte survival after treatment with different concentrations of alcohol for 24 h

2.3 α 粒子与酒精联合作用人肝细胞

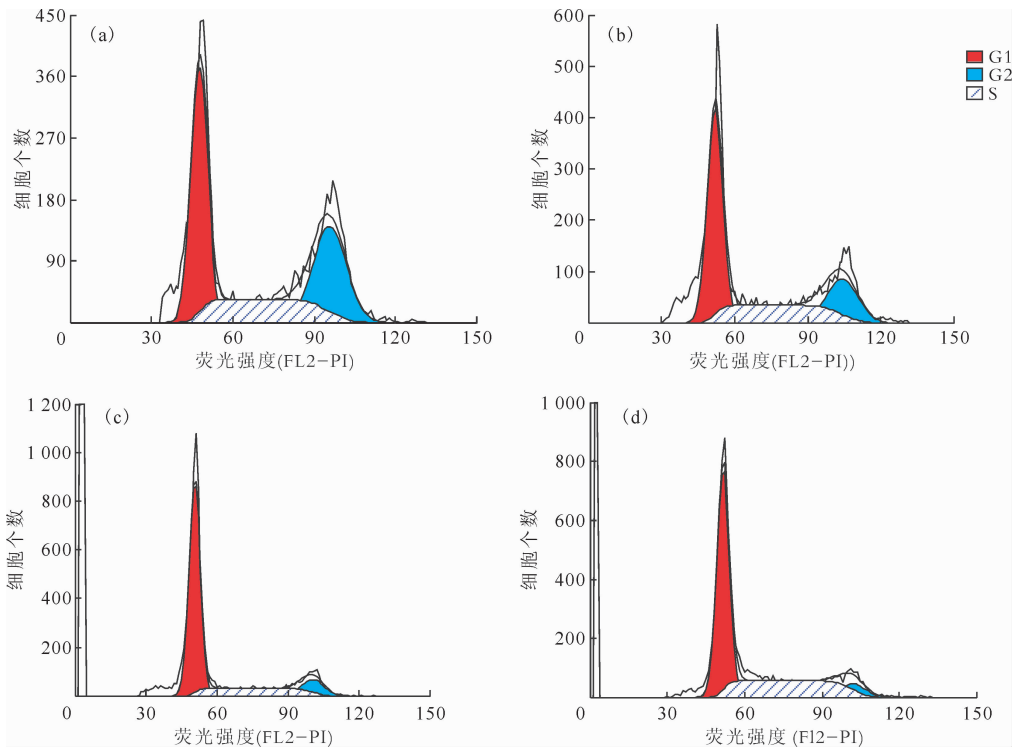
在以上筛选的单因素辐射和酒精作用肝细胞模型的基础上, 进行 α 粒子辐照和酒精联合作用, 组成了复合作用方式: 细胞先接受 α 粒子辐照后再

经酒精作用。辐照剂量为 1.00 Gy/次, 累计辐照两次后经酒精作用, 采用含 1.0% 酒精浓度的培养基培养, 每代进行一次酒精处理, 隔三天传代一次。

2.4 细胞生物学效应

2.4.1 细胞周期 流式细胞术检测各实验组肝细胞周期示于图 4。由图 4 可知: 与对照组比较, 辐射组 S 期细胞比例增加 ($P < 0.05$)、G2/M 期细胞比例减少 ($P < 0.05$), 差异具有统计学意义; 酒精组与复合组肝细胞处于 G0/G1 期的细胞比例均减少、S 期细胞比例均增加, 差异均具有统计

学意义 ($P < 0.05$)。辐射组与酒精组比较, G0/G1 期细胞比例增加、S 期和 G2/M 期细胞比例减少, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。复合组与辐射组比较, G0/G1 期细胞比例减少、S 期细胞比例增加, 且有显著性差异 ($P < 0.05$), 各组的肝细胞周期百分比结果示于图 5。由图 5 可知: 辐射组细胞出现 G0/G1 期阻滞, DNA 复制前的检查修复需要更长时间, 与辐射致 DNA 损伤有关。与单因素组相比, 复合组肝细胞 G1 期逃逸至 S 期, 细胞周期失衡。



(a)——对照组, (b)——酒精组, (c)——辐射组, (d)——复合组

图 4 各实验组肝细胞周期

Fig. 4 Cell cycle of hepatocyte in each group

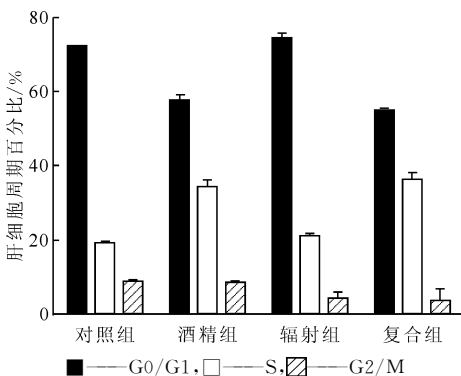
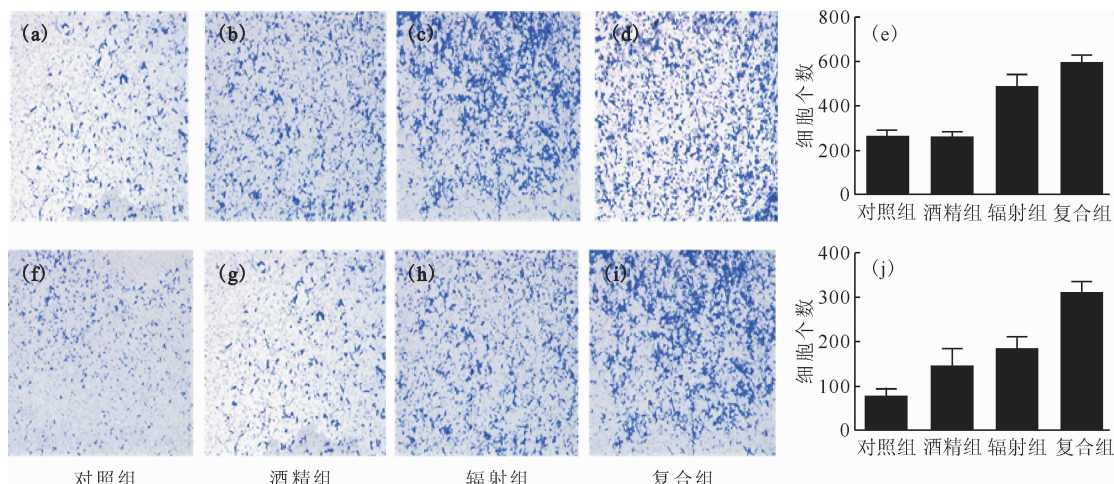


图 5 各实验组肝细胞周期百分比

Fig. 5 Percentage of hepatocyte cycle in each group

2.4.2 细胞迁移和细胞侵袭 Transwell 实验测定各实验组肝细胞发生迁移和侵袭的细胞数量示于图 6。由图 6 可知: 与对照组比较, 辐射组、复合组肝细胞均发生了细胞迁移, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与酒精组比较, 辐射组发生迁移的细胞数量增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 复合组发生迁移和侵袭的细胞数量也均增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.001$); 与辐射组比较, 复合组发生侵袭的细胞数量增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 复合组发生侵袭的细胞数量最大, 有着明显的恶性转化趋势, 提示 α 粒子辐



(a)–(d)、(f)–(i)为显微镜成像图片

图6 各组肝细胞发生迁移((a)–(e))和侵袭((f)–(j))细胞数量

Fig. 6 Number of migrated((a)–(e)) and hepatocytes((f)–(j)) in each group

照后再进行酒精处理,酒精增加了肝细胞的侵袭能力,诱导细胞发生恶性转化。

2.4.3 分子生物学效应 用实时荧光定量聚合酶链锁反应(Real-time qPCR)的方法,检测与细胞恶性转化相关的抑癌基因 p53 和原癌基因 mdm2、细胞粘附蛋白相关基因 cdh1 在 mRNA 水平的表达,结果示于图 7。由图 7 可知:与对照组比较,单因素和复合组细胞 p53 基因和 cdh1 基因在 mRNA 水平表达降低,mdm2 基因表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与酒精组比较,复合组肝细胞 p53、cdh1 和 mdm2 基因表达有显著差异($P < 0.001$);与辐射组细胞比较,复合组细胞 p53 基因和 mdm2 基因表达有显著差异($P < 0.05$),提示 α 粒子和酒精均诱导肝细胞发生恶性转化趋势,复合作用明显高于单因素作

用,即辐照后酒精的作用促进了肝细胞原癌基因 mdm2 的高表达和抑制了抑癌基因 P53 的表达,从分子水平介导肝细胞发生恶性转化。

3 结论

研究发现 α 粒子辐射和酒精均能诱导肝细胞发生恶性转化趋势,复合因素作用下肝细胞原癌基因 mdm2 高表达,抑癌基因 p53 和细胞粘附相关基因 cdh1 低表达,发生明显的恶性转化趋势。提示 α 粒子辐照后再进行酒精作用的肝细胞发生恶性转化的风险增高,可能是酒精影响了肝细胞表面 E 型粘连蛋白的表达,导致细胞之间粘连性降低,促进细胞发生迁移和侵袭。因此,在评价 α 粒子内照射对健康的影响时需要考虑职业人员的饮酒习惯。

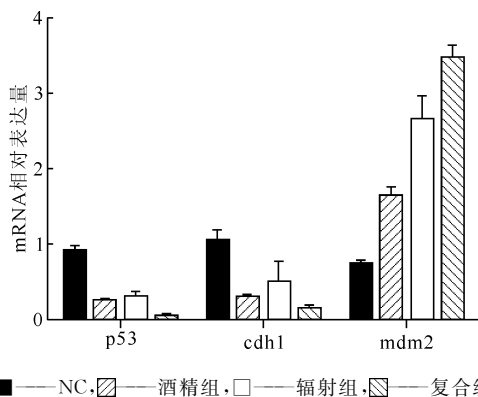


图7 各实验组 p53、cdh1、mdm2 基因 mRNA 表达水平

Fig. 7 mRNA expression levels of p53, cdh1 and mdm2 genes in each experimental group

参考文献:

[1] 朱寿彭,李章,编著.放射毒理学[M].苏州:苏州大学出版社,2004:37-39.

[2] Sun L, Pan Y, Wang X, et al. Screening for potential biomarkers in peripheral blood from miners exposed to radon radiation[J]. Dose-Response, 2020, 18(1): 1-10.

[3] Azizova T V, Batistatou E, Grigorieva E S, et al. An assessment of radiation-associated risks of mortality from circulatory disease in the cohorts of Mayak and sellafeld nuclear workers[J]. Radiat Res, 2018, 189(4): 371-388.

[4] Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A, et al. Studies of

- the mortality of atomic bomb survivors, report 14, 1950-2003: an overview of cancer and noncancer diseases[J]. *Radiat Res*, 2012, 177(3): 229-243.
- [5] Wing S, Richardson D, Wolf S, et al. Plutonium-related work and cause-specific mortality at the United States Department of Energy Hanford Site[J]. *Am J Ind Med*, 2004, 45: 153-164.
- [6] Loomis D, Guha N, Hall A L, et al. Identifying occupational carcinogens: an update from the IARC monographs[J]. *Occup Environ Med*, 2018, 75(8): 593-603.
- [7] Labutina E V, Kuznetsova I S, Hunter N, et al. Radiation risk of malignant neoplasms in organs of main deposition for plutonium in the cohort of Mayak workers with regard to histological types[J]. *Health Phys*, 2013, 105(2): 165-176.
- [8] Goerlitz D S, Blancato J, Ramesh A, et al. Somatic mutation signatures in primary liver tumors of workers exposed to ionizing radiation[J]. *Sci Repuk*, 2019, 9(1): 181-199.
- [9] Vasilev S A, Timoshevskii V A, Lebedev I N. Cytogenetic mechanisms of aneuploidy in somatic cells of chemonuclear industry professionals with incorporated plutonium-239[J]. *Russ J Genet*, 2010, 46(11): 1565-1570.
- [10] Phoenix B, Green S, Hill M A, et al. Do the various radiations present in BNCT act synergistically? cell survival experiments in mixed alpha-particle and gamma-ray fields[J]. *Appl Radiat Isot*, 2009, 67(7-8Suppl): 318-320.
- [11] Meeren A V, Angulo J F, Bohand S, et al. A quick and simple *in vitro* assay to predict bioavailability of actinides following accidental exposure[J]. *Toxicology in Vitro*, 2019, 58: 142-149.
- [12] Ayagoz B, Dmitriy K, Roza Z, et al. Study of the effect of ($U_{0.8}Pu_{0.2}$)O₂ uranium-plutonium mixed fuel fission products on a living organism[J]. *Nucl Eng Technol*, 2016, 48: 965-974.
- [13] Tomasek L. Lung cancer risk from occupational and environmental radon and role of smoking in two Czech nested case-control studies[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2013, 10(3): 963-979.
- [14] Heidenreich W F, Morlier J P, Monchaux G. Interaction of smoking and radon in rats: a biologically based mechanistic model[J]. *Radiat Environ Biophys*, 2005, 44: 1-4.
- [15] Oh S S, Koh S, Kang H, et al. Radon exposure and lung cancer: risk in nonsmokers among cohort studies[J]. *Ann Occup Environ Med*, 2016, 28: 11.
- [16] Lantz P M, Mendez D, Philbert M A. Radon, smoking, and lung cancer: the need to refocus radon control policy[J]. *Am J Public Health*, 2013, 103: 443-447.
- [17] 嵇卫星, 田文倩, 尹晓明, 等. 一种用于细胞实验的新型 α 粒子照射装置的建造和验证[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2015, 33(2): 020205.
- [18] Yin X, Tian W, Wang L, et al. Radiation quality-dependence of bystander effect in unirradiated fibroblasts is associated with TGF- β 1-Smad2 pathway and miR-21 in irradiated keratinocytes[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11373.
- [19] Tan W, Zhang Y, Li M, et al. miR-27a-containing exosomes secreted by irradiated skin keratinocytes delayed the migration of unirradiated skin fibroblasts[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(10): 2240-2255.
- [20] 史秋阳, 廉沁妹. 基于药物动力学的多次饮酒后血液中酒精浓度的模型分析[J]. *数学的实践与认识*, 2012, 42(17): 79-88.
- [21] 卓先义, 卜俊, 向平, 等. 血中酒精浓度的回推算研究[J]. *中国法医学杂志*, 2010, 25(5): 345-347.
- [22] 钟铭恩, 吴平东, 彭军强, 等. 基于血液酒精浓度和脑电特征的酒后驾车事故倾向对比研究[J]. *中国生物医学工程学报*, 2013, 32(3): 378-383.
- [23] Singh A K, Kumar R, Pandey A K. Hepatocellular carcinoma: causes, mechanism of progression and biomarkers[J]. *Current Chemical Genomics and Translational Medicine*, 2018, 12: 9-26.
- [24] Krivtsova O, Makarova A, Lazarevich N. Aberrant expression of alternative isoforms of transcription factors in hepatocellular carcinoma[J]. *World Journal of Hepatology*, 2018, 10(10): 645-661.
- [25] Loh C Y, Chai J Y, Tang T F, et al. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges[J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1-33.