

甲基硝基亚硝基胍 诱发大白鼠大肠癌的实验报告

耿宝琴* 许敬尧** 陶丽娟*

大肠癌是常见肿瘤,在我国大肠癌的发病率约占所有肿瘤的第五、六位。目前早期大肠癌以外科手术治疗为主,晚期以化疗为主,化疗中又以5-氟脲嘧啶为主要,但疗效不高,单用有效率仅20%左右⁽¹⁾。因此,亟须建立与人类相似的动物大肠癌模型,籍以进一步研究其病因、发病机理、早期诊断等,以便找到更有效的治疗方法。为此,我们用甲基硝基亚硝基胍(MNNG)诱发了大白鼠大肠癌,并观察其癌变过程和肿瘤的病理学特征。

材料与方法

动物:采用年龄为18周的Wistar大白鼠(上海实验生物研究所提供,是同系同胎繁殖至16~17代大鼠)21只,其中雌鼠10只,雄鼠11只,作为诱癌用。21只大鼠中No.14在灌药几天后因肠穿孔致死,未列入结果中。另取18周的杂种雄性大鼠(本校动物室繁殖)6只作为对照。饲以动物室自制糕块,自由饮水。

药物:MNNG为淡黄色粉状结晶,不易溶于水,用33%乙醇配制成0.67%MNNG乙醇溶液备用,如再不溶解,可在水浴中微热。该溶液不稳定,临用时配制。

方法:大鼠分成给药和对照两组,采用直肠灌药法。用磨平的腰椎穿刺针头(长8厘米)由肛门插入结肠7~8厘米深(相当于结肠左曲处),给药组每鼠每次注入

0.67%MNNG乙醇溶液0.3毫升(相当2毫克),每周2次,共25次。对照组注入同容积的33%乙醇,方法及次数均与给药组同。为了提高诱癌率,在实验5个月时,给药组每鼠每次再灌肠MNNG 2毫克,每周3次,共10次。对照组以同法灌33%乙醇。给药组每鼠灌肠的MNNG总量为70毫克。

自然死亡及处死(仅No.15)的大鼠均进行全身解剖,肉眼和解剖镜观察,随即取大肠、肝、脾、肺、肾等组织放入20%福尔马林液中固定,石蜡包埋,HE染色,其中部分切片作Gomori网状纤维染色, Von-Geison胶原纤维染色及Alcian兰粘液染色,显微镜观察。

结果:用MNNG灌肠后2~3个月及8~9个月时死亡率较高,前者为5只,25%,后者为7只,35%。20只大鼠中生存最长者为370天(表1)。在灌肠2~3个月间死

表1 大白鼠致癌过程中死亡情况

死亡时间 (月)	2~3	4~5	6~7	8~9	10~11	12~13
大白鼠数 (只)	5	1	2	7	2	3

亡的大鼠,多半死前有腹泻、食欲减退、体重下降等现象,最后常因严重腹泻、衰竭致死。死后解剖,结、直肠浆膜面无明显变化,剖开肠腔,见分泌物增多,但无肿块。实验

6个月死亡的大鼠，死前均有明显腹泻、血便，少数在腹部可触及肿块。以后常因肠大出血、严重感染或肠梗阻死亡。对照组6只大鼠情况良好，体重逐月上升，实验至400多天全部处死。

肉眼检查：3个月内死亡的5只大鼠，大肠未见明显病变和肿块。4个月后死亡的

大鼠，结、直肠变粗，但浆膜面多光滑，肠腔内有大小不等，形状各异，隆起的多个肿瘤。诱癌率达93%（13只/14只，15只大鼠中No.5标本遗失未列入统计，No.13仅见腺瘤）。诱发的肿瘤最多达12个（No.6），少者仅1个。14只大鼠诱发肿瘤总数为84个，平均每鼠6个（表2）。

表2 大鼠用MNNG灌肠诱发的肿瘤数及类型

鼠 号	生存时间 (月)	肿 瘤 数	肿 瘤 材 料 数	肿 瘤 性 质 (肿瘤数)
12	4~5	1	1	腺癌(1)
5	6	1	标本遗失，未作切片	
13	6~7	1	1	腺瘤(1)
20	8	6	6	腺癌(6)
3	8	10	5	腺瘤(1)腺癌(4)
4	8	10	9	腺癌(6)腺癌合并粘液腺癌(3)
9	8	6	5	腺癌(5)
17	8	6	2	腺癌(2)
18	8	5	3	腺癌(2)粘液腺癌(1)
19	8	2	2	腺癌(1)粘液腺癌(1)
7	10	7	2	腺癌(1)粘液腺癌(1)
8	10	10	9	腺瘤(3)腺癌(3)粘液腺癌(3)
6	12~13	12	10	腺癌(1)腺癌(4)粘液腺癌(3)腺癌合并粘液腺癌(1)鳞状细胞癌(1)
15	12~13	4	4	腺癌(3)粘液腺癌(1)
16	12~13	4	4	粘液腺癌(4)
总 计		85	63	腺瘤(6)腺癌(38)粘液腺癌(14)腺癌合并粘液腺癌(4)鳞状细胞癌(1)

注：生存2~3月的鼠号是1,2,10,11,21（No.14早期肠穿孔致死未列入统计），均未发现肿瘤

肿瘤散在分布自肛门以上1厘米至10~12厘米处，其中以3~6厘米处最密集（图1）。肿瘤大小不等，除许多小肿瘤融合成大肿块外，最大者2×1×0.3厘米，最小如粟粒，一般为0.3×0.4厘米左右。大多无蒂，均为隆突型，突出于肠腔。肿瘤表面，多数光滑，呈灰白或暗红色，少数呈菜花样。

患肿瘤的大肠明显扩大，肠壁增厚，肠粘膜附有大量分泌物，部分肿瘤出血、坏死。5只大鼠在距肛门7~10厘米处肠腔异常扩

大，肠壁高度增厚，且有多数小肿瘤融合成大肿块，伴有明显出血，坏死及溃疡形成（图2）。多数大鼠的结、直肠浆膜光滑，无肿瘤，但少数有肿块向浆膜面突出。No.6大鼠肛管内有1个0.1×0.1厘米肿块，切片证实为鳞状细胞癌，且肺部有转移，其它肿瘤均未向邻近组织或远处转移。

多数癌组织均伴有不同程度的出血、坏死，特别是瘤体较大者，在瘤体中央或浅表部位，有的则形成溃疡。

56只腺癌中,部分呈息肉型,有明确的蒂,并偶见残存的腺体组织(图3)。部分为局部隆起型,全由腺癌组织构成,少数为平坦型,局部粘膜略增厚,伴腺上皮癌变直接浸润肠壁。

显微镜检查:对肉眼所见的85只肿瘤,根据肿瘤的大小,形态和分布部位的不同而选取其中63只切片观察。又根据肿瘤的组织学特点并参照 Lingemen 和 Garimer⁽²⁾ 及 Morson氏⁽³⁾ 的组织学分类法将63只肿瘤分为五类(表3)。

表3 63只肿瘤的组织学类型统计

类 型	腺瘤	腺癌	腺癌合并 粘液腺癌	粘液 腺癌	鳞癌	总 计
数 目	6	38	4	14	1	63
百分比	9.5	60.3	6.4	22.2	1.6	100%

一、腺瘤:共6只,均为小管状腺瘤(腺瘤性息肉—图4),并伴有不同程度的间变,间变Ⅰ级1只、Ⅰ~Ⅱ级3只、Ⅱ级2只。

二、腺癌:共38只,为普通的管状腺癌。癌细胞呈腺管状排列,但腺管大小不一,形态各异,即使同一个体的不同肿瘤或同一肿瘤的不同区域亦有差异。部分腺管扩张呈囊腔,囊内可见乳头状增生,有的腺体排列密集,背靠背或腺管共壁。癌细胞核大,深染,核形拉长或呈卵圆形,空泡状,呈单层或复层,排列紧密,核分裂相多见。胞浆嗜碱性或嗜酸性,其中含嗜酸性胞浆者胞浆特别丰富。部分腺腔内充满坏死物质(图5)。

三、粘液腺癌:共14只,癌细胞亦呈腺管状排列,但腺腔多扩张呈囊状,背靠背或伴有乳头状结构,腺上皮多呈立方形或扁平状,腺腔内充满大量粘液。有的腺腔内还漂浮着印戒型细胞。

四、腺癌合并粘液腺癌:共4只,即上述两种成分同时混合存在于同一瘤体内。

五、鳞状细胞癌:仅1只(发生在No.6大鼠),为分化性鳞状细胞癌,局部浸润(图6),同时并发腺癌,并有肺组织广泛转移。镜检为分化性鳞状细胞癌,伴大量角化珠形成。因MNNG为直接致癌剂,故考虑肺内鳞癌为转移性病灶。

癌组织间质稀少,但少数腺癌或大部分区域间质反应明显,似硬癌(图5)。

癌肿之基底部,特别是有蒂肿瘤(包括良性及恶性),粘膜肌层因受牵拉而上举,呈倒置之烧瓶状或U字形,个别肿瘤甚至连肠壁肌层亦向粘膜面突出。粘膜肌层平滑肌纤维增生,肥厚,可达原来的2~3倍。有的被肿瘤组织浸润而分离或破坏。粘膜下层结缔组织增生,血管壁明显增厚,伴有不等量炎症细胞浸润。

56只腺癌中,除1只为原位癌,其余均有不同程度的浸润,浸润粘膜肌层者3只;达粘膜下层者32只;达肌层者7只;达浆膜层者13只(表4)。浸润首先发生在瘤体中心部,先突破粘膜肌层,再向肠壁各层穿透,其中1只浸润至肠壁淋巴结,2只在浆膜面形成癌结节。

表4 56只大肠癌的浸润程度

类 型	浸 润 程 度					总计
	原位 无浸润	粘膜 肌层	粘膜 下层	肌层	浆膜层	
腺 癌	1	2	28	2	5	38
腺癌合并 粘液腺癌			2	1	1	4
粘液腺癌		1	2	4	7	14
总 计	1	3	32	7	13	56

癌旁粘膜多有腺体增生、腺管拉长,核深染。杯状细胞相对减少,有不同程度间变。

除上皮性肿瘤外,有2鼠结肠浆膜面可见纤维瘤,还有1鼠纤维组织高度增生富有细胞,偶见核分裂相,似为纤维肉瘤。

对照组大鼠的肠粘膜切片检查,均未见

异常。

讨 论

动物大肠癌的自然发生率很低,动物中仅田鼠较易发生大肠息肉和肿瘤,其后人们曾试用电离辐射和化学致癌药等方法诱发动物大肠癌,但直到六十年代才渐获成功。Narisawa⁽⁴⁾1971年首先用MNNG灌肠法成功地诱发了大白鼠大肠癌。此外尚有苏铁素、二甲胂、甲基氧化偶氮甲醇以及其它亚硝胺化合物等亦可诱发之^(5,6)。亚硝胺化合物中的甲基亚硝基脲和甲基硝基亚硝基胍均为强烈直接致癌剂,诱癌率高。从本实验结果来看,当每鼠直肠灌以MNNG70毫克,诱癌率达93%,实验到5~6个月时大肠粘膜肉眼即可见肿瘤,以后肿瘤数增多,瘤体增大。用MNNG诱发大肠癌的诱癌率与其灌注量有关。Reddy报道⁽⁷⁾采用1.25毫克/只/周给大鼠灌肠,共50周,诱癌率为88%;用0.31毫克/只/周,共50周,无肿瘤发生。我们曾用浸有0.2%MNNG的棉线缝入6只大白鼠结肠粘膜内,10个月后解剖均未发现肿瘤。

实验结果表明,用MNNG灌肠引起的肿瘤均分布在结肠左曲到肛门处,其它脏器均未发现原发癌肿,其分布部位与药物灌注部位密切相关,是一种直接致癌剂。文献亦报道给大鼠注射此药引起局部肉瘤,灌胃则引起前胃鳞癌和腺胃胃癌。

本实验诱发的肿瘤,除6只腺瘤外,大部为腺癌,粘液腺癌,且生长速度很慢。除1鼠肛管鳞癌发生肺转移外,余均未见远处转移。从浸润程度来看,以粘液腺癌浸润最深,说明其组织学特性及生物学行为均与人体大肠癌相似。这种模型与Narisawa报道^(4,8)的相似,是一种适于研究大肠癌的病因而、发病机理、早期诊断和寻找有效治疗方法等的较理想的模型。

实验中有5只大鼠在距肛门7~10厘米

处肠腔异常扩大,有融合性大肿瘤,这可能与实验第5个月再次用MNNG灌肠有关,因为此时局部肠粘膜(与针头接触部位)已有病变,MNNG更加重刺激和损害,以致形成较大的伴有坏死的肿瘤。

对于人类大肠癌的起源,有人认为癌肿直接起自正常粘膜,不经息肉的增长阶段⁽⁹⁾,但亦有人反对。Muto⁽¹⁰⁾主张全部大肠癌,除溃疡性结肠炎外,均来自原有的腺瘤性息肉及绒毛状息肉。Fenoglio⁽¹¹⁾等亦反对癌肿由正常Lieberkuhn氏腺窝上皮直接转化而来。

对动物大肠癌的起源亦有不同看法,Jerrold⁽¹²⁾和Masken⁽¹³⁾强调大多数结肠腺癌起源于原位。但Narisawa⁽⁴⁾实验中发现小灶性癌可存在于腺瘤性病变中。根据本实验既有肠粘膜上皮未经息肉阶段而直接转化为癌,如平坦型腺癌及癌旁粘膜局灶性癌变病灶的出现。也有部分腺癌是腺瘤性息肉间变而转化为癌的。由此可见,实验性大白鼠大肠癌,两种起源方式同时存在。

小 结

一、用0.67%MNNG乙醇溶液给20只Wistar大白鼠灌肠,当每鼠每次2毫克,每周2次,共计25次,在实验5个月时再次灌2毫克×10次,总量共70毫克。除实验2~3月间死亡的5鼠未发现肿瘤和1鼠标本遗失外,诱癌率达93%(13只/14只)。致癌的大白鼠生存期最长达370天。

二、实验4个月以后死亡的14只大白鼠共诱发84只肿瘤,分布在结肠左曲至肛门段,在其中段肿瘤最密集。肿瘤一般不向附近或远处转移,仅1鼠肛管诱发的鳞癌有肺部转移。

三、根据取材的63只肿瘤病理观察,其中腺瘤6只;腺癌38只;粘液腺癌14只;腺癌合并粘液腺癌4只;鳞状细胞癌1只。这些腺癌的组织学结构和生物(下转第73页)

组差别不大,均以青年或中年为主有关。

经手术及病理证实的胃癌20例、胃溃疡10例,其LTR均值胃溃疡组略高于胃癌组,前者为11717,后者为8096, $t=1.356$, $P>0.05$,无明显差异。SI值胃溃疡组均值67.5,胃癌组为21.6,显著低于正常值, $t=4.590$, $P<0.05$ 差别显著,说明恶性肿瘤患者体内细胞免疫功能减低。Whittaker氏等曾提出乳癌患者使PHA引起淋巴细胞转化能力降低,其血清中出现一种使淋巴细胞转化降低因子⁽⁷⁾。至于LTR与SI值这两个指标在胃癌诊断、治疗上的价值,当继续积累资料后再分析,初步看来似SI值意义较大。

白血病10例在发病期 ^3H -TdR渗入值变化很大,SI值平均为12.6,显著低于正常值,这可能由于白血病细胞在不加PHA的对照瓶内经培养后也可分裂,而使DNA组合, ^3H -TdR渗入量增加,对照瓶CPM增加而使SI值下降。LTR值因与淋巴细胞计数等有关,故其绝对值可高于正常值数倍到十数倍。有关胃癌、胃溃疡等疾病 ^3H -TdR淋转临床使用情况,另文小结。

同种异体肾移植在非排斥期其LTR与SI值均明显低于正常值,这是由于免疫抑制关系,但出现排斥现象时LTR值可明显高于正常值数倍至数十倍,我们观察肾移植1例,其出现排斥时LTR值由756上升至166215,可能由于排斥时大量致敏淋巴细胞入血液循环,而使LTR值迅速增高。已有不

(紧接第64页)学行为均与人类大肠癌相似。

四、从本实验结果说明,大肠癌的起源有二种,一是在致癌剂作用下,肠粘膜上皮不经过息肉阶段而直接转化为癌;另外则先形成腺瘤后经间变而转化为癌。(图见插图3)

(朱善济、杨叔伟两同志参加本实验的病理切片工作,特此致谢)

参 考 文 献

1. Schein P S, et al: Cancer 36: 2418, 1975.
2. Lingem C H, et al: J Natl Cancer Inst

少报道指出, ^3H -TdR渗入值可作为预测排斥免疫指标⁽⁸⁾。

小 结

本文介绍了应用 ^3H -TdR渗入法淋巴细胞转化试验操作方法,并对其某些影响因素作了讨论,初步介绍其对胃癌、白血病、肾移植等病例临床应用,由于本法采用同位素计数法,因此较涂片法观察淋转百分率为精确,只要实验方法恒定,严格控制实验条件,尤其对同一个体进行前后比较,可较客观地反映机体细胞免疫功能状态。

参 考 文 献

1. Pentycross C R: Technique for lymphocyte transformation, J Clin Path 21: 175, 1968.
2. Sutherland R M, et al: Phytohemagglutinin (PHA) induced transformation of lymphocyte from patients with cancer, Cancer 27: 574, 1971.
3. Cheems A R, et al: Patients survival after chemotherapy and its relationship to in vitro lymphocyte blastogenesis, Cancer 28: 851, 1971.
4. 中国医科院肿瘤医院免疫室: 体外淋巴细胞转化稳定性的探讨, 肿瘤防治研究 4: 512, 1977.
5. 广州市医药工业研究所: 植物血凝素用于肿瘤治疗的临床报告及有关研究资料选编, 第46页, 广州, 1977.
6. Robert-Thomson I C, et al: Ageing immune response and mortality, Lancet 17(8): 368, 1974.
7. Whittaker M G: Reduced lymphocyte transformation in breast cancer, Lancet 1(5): 892, 1971.
8. 廖履坦等: 肾移植一例临床报告, 中华医学杂志 59(4): 226, 1979.
- 48: 325, 1972.
3. Morson B C, et al: Histological Typing of Intestinal Tumors. WHO Geneva 1976.
4. Narisawa T, et al: Gann 62: 231, 1971.
5. Weisburger J H: Cancer 28: 60, 1971.
6. Burdette W J: Cancer 28: 51, 1971.
7. Reddy B S, et al: Cancer Res 35: 3421, 1975.
8. Narisawa T, et al: Cancer Res 36: 505, 1976.
9. Spratt J S, et al: JAMA 179: 125, 1962.
10. Muto T, et al: Cancer 36: 2251, 1975.
11. Fenoglio C M: Cancer 34: 819, 1974.
12. Jerrold M W, et al: J Natl Cancer Inst 51: 1029, 1973.
13. Masken A P: Cancer Res 36: 1585, 1976.

甲基硝基亚硝基脒诱发大白鼠大肠癌的实验报告

(正文见61页)

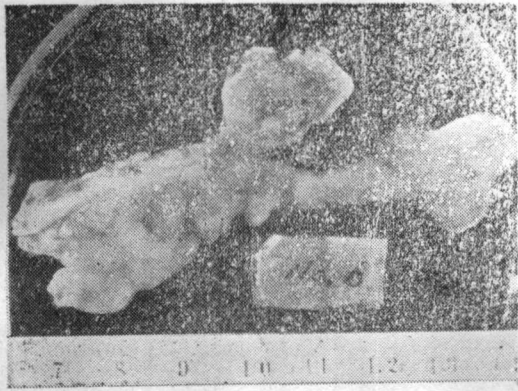


图 1 №.6 大肠粘膜上有多个隆起型肿瘤,部分有蒂,距肛门3~6厘米处肿瘤密集。

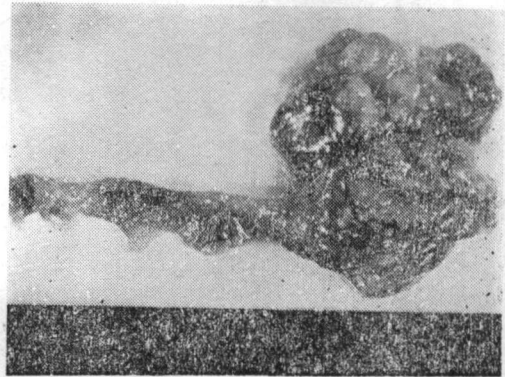


图 2 №.7 距肛门7~10厘米处,肠腔异常扩张,肠壁增厚,肠粘膜布满大小不等的肿瘤,并互相融合成巨大肿块。

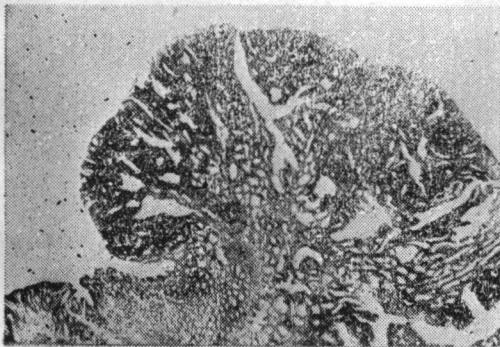


图 3 №.18 腺瘤癌变。为有蒂腺瘤,大部分腺体异常增生,癌变,并浸润至粘膜下层,但仍保留少许正常腺体 HE×15。

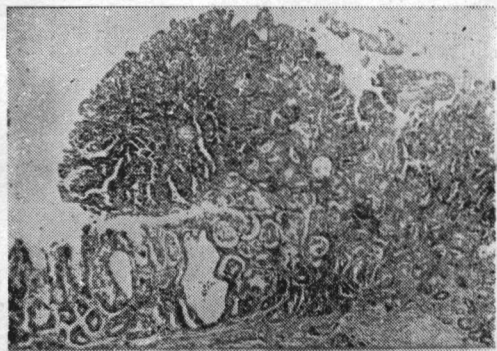


图 4 №.3 小管状腺瘤(腺瘤性息肉)。局部肠粘膜腺体增生,呈小管状,排列紊乱,突出于肠粘膜。HE×31

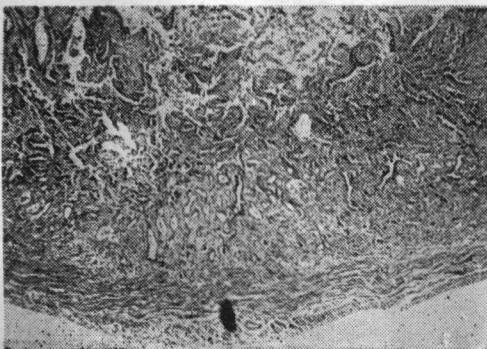


图 5 №.12 腺癌。癌细胞排列呈不规则的腺管状,且多为狭长的裂隙,浸润至粘膜下层,间质结缔组织增生明显。HE×31

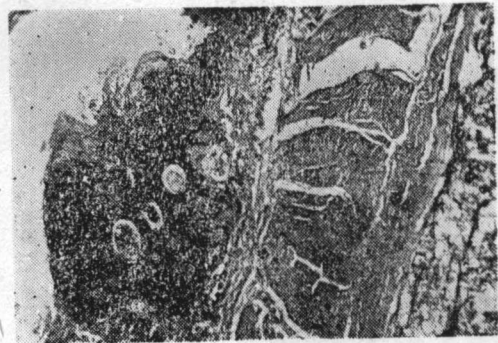


图 6 №.6 肛管鳞状细胞癌。图左侧区鳞状上皮增生癌变,呈浸润性生长,伴有角化珠形成(圆形淡染区),图左上方则为正常肛管鳞状上皮。HE×31