技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)12-1843-04

间断给药 DEN 诱导大鼠肝癌模型建立及病理研究

朱艳志[1],孔宪炳[1],颜 朗[2]
(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立间断给药二乙基亚硝胺(Diethylmitrosamine,DEN)诱导 SD 大鼠肝癌模型,探讨与人类肝细胞癌相似的动物肝癌模型病理形态变化。方法:取体重为 170~210 g 雄性 SD 大鼠 63 只,随机分为实验组(48 只)和对照组(15 只),实验组采用 0.01%DEN 溶液间断喂养 SD 大鼠诱发肝癌,对照组自由喂养,常规病理 HE 染色并动态观察肝癌发生的不同时相。结果:设立间断 DEN 给药诱导 SD 大鼠肝癌,病理证实大鼠肝癌为肝细胞癌,诱癌率 88.9%(32/36),其末期成功率高,在整个诱癌过程中经历了肝细胞损伤再生→增生-硬化→癌变 3 个阶段。结论:该造模方法容易、诱癌成功率高、大鼠存活率高。同时,该肝癌模型可以作为研究人类肝癌发生、发展变化病理形态的一种理想动物模型。

【关键词】二乙基亚硝胺;肝癌;动物模型;病理改变
【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-28

Establishment of hepatocarcinoma rat modelinduced by diethylmitrosamine discontinuously and pathological study

ZHU Yan-zhi, et al
(*Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish hepatocarcinomas rat model by DEN-induced and investigate the pathologic and morphologic changes during hepatocarcinogenesis, and this model was similar to the development of human hepatocellular carcinomas. *Methods*: sixty-three male spraque-dawley(SD)rats, weighing 170 to 200g were randomly devided into experimental group(48)and control group(15).The intermission in 0.01% DEN was adminstrated to

作者介绍:朱艳志(1981-),男,硕士,
研究方向:肝癌综合治疗与肝移植。
通讯作者:孔宪炳,男,副教授,E-mail:qj900313@Yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市卫生局 2008 年度医学科研项目计划(编号:08-02-40)。

可能。

通过上面的试验我们发现,nHA/聚氨基酸复合生物材料与细胞相容性良好,无全身急性毒性、无致溶血性、无致热源、无微核试验遗传毒性。符合医疗器械评价标准要求。因此,nHA/聚氨基酸复合生物材料有望成为骨科新型内固定材料得到广泛应用。

参 考 文 献

[1] Guo H, Su J C, Wei J.Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering[J].Acta Biomaterialia, 2009, 5(1): 268-278.

[2] Peng L, Gao Y, Xue Y N.Cytotoxicity and in vivo tissue compatibility of poly (amidoamine) with pendantaminobutyl group as a gene delivery vector[J].Biomaterials, 2010, 31(16): 4467-4476.

[3] Eng D, Caplan M, Preul M. Hyaluronan scaffolds: A balance between backbone functionalization and bioactivity[J].Acta Biomater, 2010, 6(7): 2407-2414.

[4] 郝和平,奚廷斐,卜长生.医疗器械监督管理和评价第二章医疗器械安全性评价[M].北京:中国医药科技出版社,2000.74-190.

[5] Sandeman S R, Jeffery H, Howell C A.The in vitro corneal biocompatibility of hydroxyapatite-coated carbon mesh[J].Biomaterials, 2009, 30(18): 3143-3149.

[6] 许 勇,朱立新,田 京.纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合材料与兔骨髓间充质干细胞的生物相容性[J].中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(8): 1423-1426.

[7] 孙立魁,施燕平,黄经春.用微核试验评价生物羊膜遗传毒性的研究[J].中国医疗器械信息, 2008, 14(11): 31-33.

[8] Becker S T, Douglas T, Acil Y. Biocompatibility of individually designed scaffolds with human periosteum for use in tissue engineering[J].J Mater Sci Mater Med, 2010, 21(4): 1255-1262.

[9] 孟纯阳,安 洪,蒋电明.新型纳米骨重建和修复材料羟基磷灰石/聚酰胺体内植入的生物相容性及安全性[J].中国临床康复, 2004, 8(29): 6330-6333.

[10] Douglas T, Liu Q, Humpe A.Novel ceramic bone replacement material CeraBall seeded with human mesenchymal stem cells[J].Clin Oral Implants Res, 2010, 21(3): 262-267.

[11] Teixeira S, Fernandes H, Leusink A. In vivo evaluation of highly macroporous ceramic scaffolds for bone tissue engineering[J].J Biomed Mater Res A, 2010, 93(2): 567-575.

(责任编辑:冉明会)

rats and a series histopathology research was employed the hepatic lesions in induced hepatocarcinomas model model. *Results*: 36 rat hepatocellular carcinomas models were successfully induced by the intermisson in DEN through morphologic investigation. The procession of hepatocarcinogenesis in this model included three stages: hepatic toxic lesion, hepatic proliferation/cirrhosis and hepatic carcinogenesis. *Conclusion*: This improved model was successful and easy, the rate of induced hepatocarcinoma was high and the mortality was low.the hepatocarcinoma model may be an ideal experimental animal model for the clinical medicine study of human hepatocarcinoma.

【Key words】Diethylmitrosamine; Hepatocarcinoma; Animal model; Pathological change

肝癌是我国最常见的一种消化道恶性肿瘤，具有发病隐匿、病程短、死亡率高等特点[1]。到目前为止，其发生、发展变化机制仍不明确。采用间断给药二乙基亚硝胺(Diethylmitrosamine，DEN)诱导 SD 大鼠肝癌，其癌变过程经历了肝脏细胞中毒损害→肝小叶增生－硬化－假小叶形成→癌变期等 3 个阶段，其各个阶段病变类型非常明显，接近于人类肝癌的发病三部曲过程(肝炎→肝硬化→肝癌)，为进行肝癌的基础和临床研究，提供充足的标本，为人类探讨肝癌发生、发展变化提供坚实的理论基础。本研究采用 DEN 间断喂养，诱导SD 大鼠肝癌，探讨在肝癌发生过程中大鼠肝脏形态学演变过程，以进一步建立理想的实验肝癌模型。

1 材料与方法

1.1 动物肝癌模型建立

雄性 SD 大鼠 63 只(购于重庆医科大学实验动物中心)，体重 170~210 g 左右，采用分笼饲养，标准饲料喂养，定期更换垫料，自由喂养 1 周后，从第 2 周开始，采用完全随机分实验组(48 只)和对照组(15 只)，实验组用蒸馏水配制成 0.01%DEN(Sigma 公司产品，其纯度为 99.9%)溶液，0.01% DEN 自由饮用 8 周，停药 2 周，设立间断期，而后改为普通喂养，再继续给药喂养 5 周停药；对照组，常规自由饮水。每天观察动物的精神、饮食、粪便、毛色及活动等一般情况。如动物出现精神萎靡，活动减少，饮食减少等情况，应考虑暂缓给药，病情严重可单笼喂养，分别在 4、8、10、12、15 周处死实验组大鼠 2~3 只，处死对照组大鼠 2~3 只，18 周后处死所有大鼠。

1.2 标本的收集和处理

实验动物在处死之前均给予 3.5%水合氯醛(用 0.9%生理盐水配制)10 ml/kg 腹腔注射麻醉，待麻醉成功后，打开腹腔用一次性 5 ml 注射器从下腔静脉抽血后保存，迅速取肝脏称重，观察肝脏大小、颜色、质地及有无癌结节形成。取典型的病变组织放入 4%甲醛溶液固定，时间为 24~48 h，然后转入 70%酒精保存，进行常规的 HE 染色并观察并拍照，如果动物出现自然死亡，处理方法同上。

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件进行处理，计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用两个因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 总体情况

对照组 SD 大鼠各期生长均正常，无自然死亡，大鼠肝脏也无明显的病理学改变，但肝脏重量较同期增长均有所增加。实验组在诱癌之前，无任何病理学改变，在诱癌后第 4 周，由于致癌药物的毒性作用，大部分动物出现不同程度的竖毛、精神萎靡、活动减少、食欲不振等表现。在诱癌后第 8 周动物症状加重，表现为精神极度不振、食欲减少、目光呆滞、鼠毛粗糙，失去光泽等特点，此时停药 2 周，改为普通喂养，上述现象可逐渐消失。在 12 周时，实验组大鼠肝表面开始变得粗糙伴有结节形成，大小不等，为数不多，肝脏重量有所在增加，并出现 1 只大鼠死亡，病理诊断为肝硬化，死前无异常表现。在 15~17 周死亡 6 只，病理诊断为肝癌，死前无特异性表现，死后解剖发现有 3 只腹腔出血、2 只腹腔大量腹水，1 只出现胃肠胀气。在 18 周后处死所有大鼠，致癌组大鼠 30 只，全部诱癌成功，成功率 100%。在整个实验过程中，对照组大鼠(15 只)生长良好，未见明显的病态表现。实验组大鼠过程中，自然死亡 1 只，死亡率为 2.08%(1/48)。

2.2 不同诱癌时期大鼠肝功能变化

实验组大鼠在诱癌 8 周后 ALT、AST 急剧上升与正常组比较显著差异有统计学意义($P<0.01$)，经过间歇期后 AST、AST 明显下降，此后一直居较高水平。对照组、实验组大鼠肝功能变化(详见表 1)。

2.3 不同组大鼠肝脏质量与体质量百分比变化

实验组大鼠肝质量占体质量百分比明显高于对照组大鼠肝质量占体质量百分比，差异有显著统计学意义($P<0.01$)。而不同时期 2 组的肝质量占体质量百分比变化示(图 1)：实验组变化趋势明显，呈逐渐上升趋势；对照组近乎呈一条水平线，变化趋势不明显。

2.4 病理学改变

2.4.1 对照组大鼠 肝脏红润，表面光滑无结节，肝小叶结构完整，肝细胞索排列整齐，细胞大小一致，以中央静脉为中心呈放射状，肝窦无狭窄，小叶及汇管区无炎性细胞浸润，细胞核清晰(图 2)。

2.4.2 不同时期实验组大鼠变化

2.4.2.1 肝细胞损伤期 在诱癌 3~4 周，肝窦扩张充血，肝细胞变性、肿胀，伴有不同程度的脂肪变性，肝小叶可见灶状坏死伴有炎性细胞浸润，并出现纤维组织增生和肝细胞再生

表 1 对照组及实验组不同诱癌时期大鼠肝功能的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	只数(n)	AST(μmol/L)	ALT(μmol/L)	GGT(U/L)	ALP(U/L)
对照组	12	148.2 ± 19.4※	49.8 ± 12.4※	12.7 ± 3.5	148.3 ± 21.2※
实验组 4 周	5	543.2 ± 27.6※	137.4 ± 21.3※	29.4 ± 2.6	221.4 ± 14.2※
8 周	5	365.2 ± 27.6	182.2 ± 14.7	38.1 ± 1.2	251.2 ± 21.3
10 周	5	245.2 ± 19.4△	103.4 ± 15.9△	22.7 ± 3.4	198.2 ± 19.7△
12 周	5	254.7 ± 27.3△	146.3 ± 21.5△	26.3 ± 1.9	231.2 ± 14.8△
15 周	5	295.4 ± 25.4△	170.3 ± 19.4	76.2 ± 1.6	298.7 ± 12.5
18 周	21	313.9 ± 19.7△	152.7 ± 15.3	97.2 ± 4.4	302.4 ± 14.3

注:实验组与对照组比较,※:$P<0.01$;实验组不同周相互比较,△:$P<0.01$

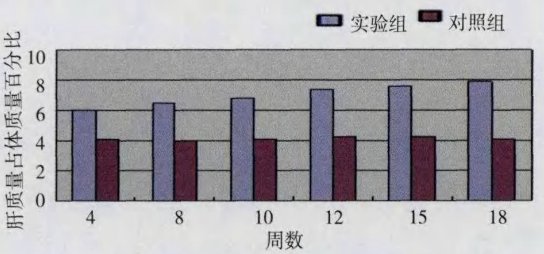
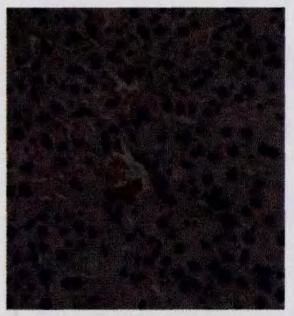


图 1 大鼠肝质量占体质量百分比随时间周变化关系图

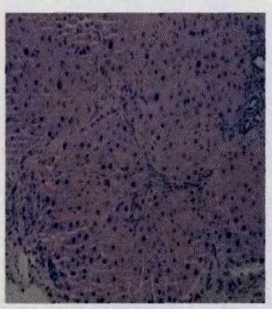


肝小叶结构尚完整,细胞脂肪变性,小叶内可见灶状坏死伴有炎性细胞浸润,细胞水肿(HE × 200)

图 3 肝细胞损伤期(1~7 周)

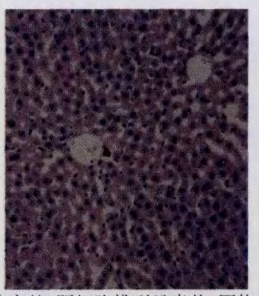
(图 3)。

2.4.2.2 增生 - 硬化期 在诱癌 9~10 周,肝小叶结构被破坏,肝板中出现散在的嗜酸性肝细胞分布,偶有嗜碱性细胞增生灶,逐渐形成肝细胞增生结节,增生的纤维组织将肝小叶分割包绕成大小不等的肝细胞团,可见典型的假小叶结构(图 4),假小叶内肝细胞索排列紊乱,小叶中央静脉缺如。



正常肝小叶结构被破坏,由增生的纤维组织将其分割包绕成大小不等的肝细胞团,可见典型的假小叶结构,假小叶内肝细胞索排列紊乱,小叶中央静脉缺如形成(HE × 100)

图 4 增生 - 硬化期(8~12 周)



肝小叶结构完整,肝细胞排列呈索状,围绕小叶中央静脉呈放射状排列,细胞核清晰

图 2 对照组正常 SD 大鼠肝脏组织(HE × 200)

2.4.2.3 癌变期 在诱癌 13~18 周,出现肝癌,癌细胞呈现多形性,异型性明显,胞核增大,胞质减少,可见多畸形的单核、多核巨细胞和核分裂相,也可见少数静脉癌栓。组织学表现为肝细胞癌(图 5),胆管细胞癌少见。根据 Edmondson 肿瘤分型与分级法[2],Ⅰ级癌细胞轻度异形,排列紊乱,细胞内可见空泡。Ⅱ级癌细胞中度异性,排列呈实团状,细胞质可见少量空泡。Ⅲ级癌细胞明显异性,细胞核明显增大,核仁突出,呈弥漫性分布。在 32 例肝细胞癌中,Ⅰ~Ⅱ级多为诱癌 13~15 周,肝癌有 13 例(40.6%),Ⅱ~Ⅲ级多为诱癌 15~16 周,肝癌有 8 例(25.0%),Ⅲ级多为 16~18 周,肝癌有 11 例(34.4%)(表 2)。

3 讨 论

肝癌动物模型建立是进行肝癌实验研究的重要环节。



表现为腺癌,癌细胞呈多边形,异型性明显,胞核增大,胞质少,嗜碱性(HE × 200)

图 5 癌变期(13~18 周)

表 2 DEN 诱导 SD 大鼠肝癌各阶段病变类型及发病率

分期	病理学类型	例数(n)	发生率(%)
损伤期(n=48)	正常	0	0
	变性坏死	48	100
增生－硬化期(n=36)	增生灶	24	66.7
	增生结节	48	44.4
	界性结节	4	11.1
	肝硬化	12	33.3
癌变期(n=32)	肝细胞性肝癌	28	87.5
	混合细胞肝癌	3	9.4
	肝硬化合并肝癌	10	31.3
	增生结节合并肝癌	12	37.5
	非典型增生伴肝癌	4	12.5
	肺转移	2	6.3
	肝外肿瘤	3	9.4

DEN 是一种非常普通的诱导动物肝癌模型的药物，它对肝癌的发生具有启动和促进作用，采用 DEN 诱导 SD 大鼠肝癌，具有起病隐匿、病程较长、致癌专一等特点[3,4]，与人类肝细胞发生发展极为相似[5]。在实验中，我们认为：①动物分组要合理，每笼动物 2~4 只，定期更换敷料，保持相对清洁。②动物食槽宽大，饲料充足，能够保证每只动物同时进食。③DEN 配制浓度为 0.01%，用双蒸水配制，给药时采用自由喂养，④如出现大鼠精神萎靡、竖毛、活动明显减少、食欲不振、消化不良、体重明显减轻、呼吸困难者，应暂缓给药，必要时给予单笼喂养，待症状好转后继续给药。

病理研究显示：在诱癌早期，DEN 可使肝细胞发生变性、坏死等毒性改变、在诱癌中期，伴有嗜酸性细胞增生和纤维组织增生，表现为肝细胞结节增生，并且随着时间的推移，结节数目增多，体积增大，表现为不同程度的肝硬化；晚期进而形成肝癌，表现为肝细胞癌或者混合细胞癌，在整个诱癌过程中经历了肝细胞损伤再生→增生－硬化→癌变 3 个阶段。而人类肝癌的发生也经历多阶段的过程，乙肝病毒的感染导致慢性肝炎、肝硬化的形成，再生结节以及假小叶的形成及最终结局肝癌，即通常所说肝癌发生发展的三部曲肝炎→肝硬化→肝癌。

而本实验采用间断给药 DEN 喂养 SD 大鼠肝癌，其显著优点表现为：第一、采用间断给药可以使药物毒性损害严重的肝细胞得到缓解，减少 DEN 连续对大赛肝脏的损伤，选择第 8 周停药，因为此时大鼠肝脏细胞中毒严重，肝细胞发生严重脂肪变性，肝功能严重失代偿，如果此时不停药，大鼠死亡率将明显增加[6]，增加间断期相当于给大鼠肝脏一定时间的休息和代偿，对大鼠后期体质的增强和提高有促进作用。第二、操作简单方便，0.01%DEN 自由喂养，与传统灌胃相比较[7]，操作方法非常简便；周期较短，传统的诱癌时间 4~5 个月，有的甚至需要 1 年[8]，经过改良后间断给药方法只需 18 周，时间大大缩短，诱癌率较高为 88.9.%，并且有明显肝硬化发生的过程，癌前期发生率高，肝癌合并肝硬化 31.3%；第三，致癌性专一，肝细胞癌所占比例较大 87.5%（32 例诱癌成功，有 28 例为肝细胞癌，3 例为混合细胞癌）。总之，采用改良型给药诱导 SD 大鼠肝癌的发生，操作方法容易，诱癌成功率高，与人类肝癌发病特点过程相似，从而弥补了临床标本的不足，是一种非常理想的研究人类肝癌发生发展机制的动物模型。

参 考 文 献

[1] 程延安，袁利超，党双锁，等.间断小剂量 DEN 诱发大鼠肝癌模型研究[J].肿瘤防治杂志，2005，12(11)：806-808.

[2] Edmondson H A，Steiner P E.Primary carcinoma of the liver：a study of 100 cases among 48900 necropsies[J].Cancer，1954，7(3)：462-503.

[3] Okubo 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] Fukumasu H，Avanzo J L，Heidor R，et al.Protective effects of guarana (Paullinia cupana Mart.var.Sorbilis) agains DEN-induced DNA damage on mouse liver[J].Food Chemical Toxicol，2006，44(6)：862-867.

[5] 姜幼纯，董奇男，肖邦良，等.非坏死剂量二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌模型的研究[J].华西医科大学学报，2001，32(4)：555-558.

[6] 杨福春，郑树森，蒋天安.改良法大鼠原发性肝癌模型的建立[J].中华医学杂志，2004，84(23)：2018-2019.

[7] Takeuchi Y，Sugimoto M，Ochiai K，et al.Expression of glycoprot-ein in rat hepatocarcinogenesis by diethylnitrosamine and the modulation by anticancer drug[J].Hetatol Res，2002，22(2)：107-118.

[8] 彭宇飞，主编.肝癌中西医综合治疗[M].北京：人民卫生出版社，2002.485.

（责任编辑：关蕴良）