DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.024
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

文章编号:1000-5404(2001)06-0677-03

论著

DIPN诱发金仓鼠肝内胆管癌动物模型

梁 平,陈 海,庄大勇,王细文,李洪艳 (第三军医大学附属新桥医院肝胆外科,重庆 400037)

提 要:目的 建立肝内胆管癌(ICC)动物模型,动态观察其发生发展的病理过程。方法 6周龄雄性金仓鼠,随机分为正常对照组、单纯结扎胆总管组和DIPN组,分别在实验的5、10及15周分批处死动物,观察其形态学变化。结果 诱癌早期出现卵圆细胞增生、管状增生及小胆管的囊性增生,中期主要病变为肝内胆管上皮乳头状增生、化生、不典型增生和胆管纤维化,晚期可见肝内胆管腺瘤和腺癌。其10周和15周肝内胆管癌的发生率分别是20%(1/10)和67.0%(10/15)。结论 该动物模型能够模拟人类肝内胆管癌发生发展的过程,方法简便,可重复性好,具有良好的应用前景。肝内胆管的各种增生性病变与ICC密切相关,尤其是不典型增生和胆管腺瘤,应视为ICC的高危性癌前病变。

关键词:肝内胆管癌;金仓鼠;二异丙醇亚硝胺
中图法分类号:R-332;R735.8;R914.4 文献标识码:A

Establishment of intrahepatic cholangiocarcinoma model induced by Diisopropanolnitrosoamine in Syrian hamsters

LIANG Ping, CHEN Hai, ZHUANG Da-yong, WANG Xi-wen, LI Hong-yan (Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To establish an intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) model in Syrian hamsters by injecting diisopropanolnitrosoamine (DIPN) and dynamically observe the pathological process of its genesis and development. **Methods** A total of 60 male Syrian golden hamsters at age of six weeks were randomly divided into 3 groups: control, simple common bile duct occlusion (S-CBDO) and CBDO-DIPN groups. CBDO-DIPN group received weekly subcutaneous injection of DIPN at a dose of 500 mg/kg body weight after S-CBDO. The animals were killed at the 5th, 10th and 15th week after the initatial administration of DIPN. The behaviors of the hamsters, gross and pathological changes of their livers were observed. **Results** Oval cell, tubular and cystic hyperplasia were seen at the early stage of induction, papillary, metaplastic and atypical hyperplasia and cholangiofibrosis at the middle stage, and adenoma, cholangiocellular carcinoma in intrahepatic bile duct at the end stage. The incidences of ICC were 20% (1/10) and 67% (10/15) respectively at the 10th and 15th week in the late stage of carcinoma induction. **Conclusion** The pathological changes of this simple and repeatable animal model may simulate the process of pathogenesis of ICC seen in human. Intrahepatic bile duct hyperplasia is closely correlated with ICC, especially atypical hyperplasia and adenoma are regarded as high risks for premalignant lesions of ICC.

Key words: intrahepatic cholangiocarcinoma; Syrian hamster; diisopropanolnitroamine

实验性肿瘤的研究已被广泛认为是探讨肿瘤病因、癌变机制以及肿瘤防治等课题的重要手段之一。尤其是对一些临床上较为少见的肿瘤,由于很难观察到它们的演变过程,更有必要通过建立动物的肿瘤模型来探讨它们的病因及防治。肝内胆管癌早期诊断困难,手术切除率只有30%,5年生存率小于15%,大部分患者在术后6个月至2年时间内死亡[1,2]。到目前为止,仍缺乏一个理想的肝内胆管癌动物模型,给研究肝内胆管癌带来了一定的困难。目前对肝内胆管癌的生物学特性研究较少,本研究的目的是用二异丙醇亚硝胺(Diisopropanolnitrosoamine, DIPN)诱发金仓鼠肝内胆管癌的动物模型,探讨肝内胆管癌的演变过程。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

金仓鼠60只,全部为雄性,6周龄,体重70~90 g,购自卫生部成都生物制品研究所。由第三军医大学新桥医院动物实验室饲养,每笼5~8只,喂硬饲料,随意饮水,每天日照及夜暗时间各约为12 h。平均温度(22±4)℃,平均湿度(60±20)%。诱癌剂DIPN,为Sigma公司产品。

1.2 诱发方法及实验分组

将动物分为正常对照组(12只)和实验组(48只)。实验组:手术结扎胆总管。3%戊巴比妥钠溶液50 mg/kg腹腔注射麻醉,上腹正中切口入腹用6-0医用肠线结扎胆总管下端造成胆总管不完全性梗阻(1周后肠线吸收)。术后1周去除死亡动物,再将实验组分为:(1)胆总管单纯结扎组(S-CBDO,简称单纯结扎组):18只,喂养方法同正常对照组。(2)DIPN处理组(CBDO-DIPN,简称DIPN组):26只,皮下注射DIPN,剂量500 mg/kg,每周1次。各组按时间又分为三部分,分别在第5、10、15周时处死各组所有的动物。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670713)
作者简介:梁 平(1962-),男,四川省叙永县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事胆管癌的诊断和治疗、胰肾联合移植方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68755606
收稿日期:2001-03-05;修回日期:2001-05-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 DIPN 诱发金仓鼠肝内胆管癌的观察

(1)观察记录动物的一般行为情况改变: 二便颜色、性状、饮食、睡眠状况、毛发光泽及稀疏程度, 每周给动物称重一次。(2)大体观察: DIPN 组动物频死前称重后腹腔注射戊巴比妥钠麻醉, 剖腹观察肝脏及胆道系统大体改变。同时观察胆囊、肝外胆管、胰腺、胃、肠、肾脏、肺、脑和性腺的大体改变。(3)组织病理观察: 杀死动物后取肝脏组织置 10%福尔马林溶液中固定 16~18 h, 石蜡包埋, 连续切片, HE 染色或者 PAS 染色, 光镜观察形态学改变。研究各组动物于第 5、10、15 周时肝内胆管组织病理改变及其发生率, 肝内胆管癌的组织类型、最大直径, 每鼠平均荷瘤数目。

1.4 统计学处理

计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 各组之间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 DIPN 诱发金仓鼠肝内胆管癌的观察

2.1.1 一般情况 动物经胆总管下端结扎手术后 1 周内死亡 4 只, 手术死亡率是 8%(4/48), 这些动物不列入统计范围。手术后第 3 天开始, 动物小便颜色变深, 呈进行性加重, 大便颜色变浅但没有排陶土样便, 直至第 5 周动物小便颜色逐渐恢复正常。随着实验时间的延长, DIPN 组动物饮食减少, 毛发渐枯黄, 失去光泽, 易脱落, 活力渐差, 呈嗜睡状态直至频死, 到 15 周时全部死亡。而单纯结扎组在整个实验过程中, 只有 2 只动物出现频死状态。

2.1.2 血清总胆红素水平测定 DIPN 组及单纯结扎组动物的血清总胆红素水平在胆总管结扎后开始上升, 在第 5 周达最高值, 之后开始下降, 但仍保持较高的水平。虽然 DIPN 组血清总胆红素在各个时相段均高于单纯组, 但二者没有统计学差异($P>0.05$), 见表 1。

表 1 各组动物的血清总胆红素水平(mg/L)

Tab 1 Total serum bilirubin levels of Syrian golden hamsters (mg/L)

Group	1st week	5th week	10th week	15th week
Control	6.2±1.2	6.2±1.2	6.2±1.2	6.2±1.2
S-IBDO	6.2±1.2	97.5±17.7**	85.5±7.5**	76.4±5.1**
IBDO-DIPN	6.2±1.2	105.5±21.7**	102.3±11.8**	86.1±8.5**

**: $P<0.01$ *vs* control

2.1.3 动物体重增长情况 自第 5 周开始, DIPN 组动物体重增长缓慢, 动物的平均体重较单纯组及正常组轻($P<0.05$)而单纯组与正常组比较, 二者没有统计学差异($P>0.05$), 见表 2。

表 2 各组动物体重变化(g)

Tab 2 The changes of body weight in Syrian golden hamsters (g)

Group	1st week	5th week	10th week	15th week
Control	86±2.26(n=12)	134±2.67(n=12)	148±3.9(n=8)	159±2.5(n=4)
S-IBDO	84±3.7(n=18)	131±2.8(n=18)	144±2.7(n=14)	155±2.1(n=7)
IBDO-DIPN	84±3.8(n=26)	121±2.9(n=26)	126±7.9(n=20) **△△	130±10.1(n=15) **△△

**: $P<0.01$ *vs* control; △△: $P<0.01$ *vs* S-IBDO group

2.2 病理改变

2.2.1 大体观察 正常对照组动物肝脏呈暗红色。DIPN 组和单纯结扎组肝脏呈瘀胆表现, 胆囊及胆总管扩张。肿瘤在肝脏上呈白色或灰白色结节, 多中心发生, 最早出现在 DIPN 组第 10 周, 但大部分在第 15 周时出现, 直径 0.1~0.8 cm 大小。单纯组结扎动物肝脏上没发现有白色肿瘤结节。其它器官, 如胆囊、肝外胆管、胰腺、胃、肠、肾脏、肺、脑和性腺没有发现大体肿瘤。

2.2.2 组织改变 肝内胆管的组织病理改变主要发生在 DIPN 组。5 周前出现胆管上皮细胞脱落坏死, 炎症细胞浸润, 汇管区周围卵圆细胞增生, 该细胞体积较小, 细胞质浅染, 细胞核呈卵圆形, 成簇或散在分布, 见图 1。只有 17%的动物表现有小胆管增生, 主要是小胆管密度增加, 一些小胆管尚未形成腺腔, 胆管间纤维组织增生, 胆管内胆汁瘀积。第 10 周时小胆管增生的发生率是 60%, 并出现小胆管囊性扩张、胆管上皮杯状细胞化生和胆管上皮乳头状增生, 见图 2, 发生率分别是 20%、40%及 40%。此阶段还可见小胆管 VMC 增生, 腺瘤样增生, 胆管上皮不典型增生。

第 15 周时, 以下改变更为明显: 小胆管增生(96%)、囊性增生(80%)、胆管上皮杯状细胞化生(80%)、胆管上皮乳头状增生(96%)及腺瘤样增生或腺瘤(60%)。除此之外, 胆管上皮细胞分层增加, 细胞核呈高柱状, 细胞核及核仁增大, 不典型增生更为明显。单纯结扎组小胆管增生及乳头状增生在第 10 周时的发生率分别是 14%及 29%, 在第 15 周时的发生率分别是 29%及 29%。单纯结扎组没有发生胆管上皮杯状细胞化生, 小胆管囊性增生, 腺瘤样增生或腺瘤及腺癌, 见图 3。

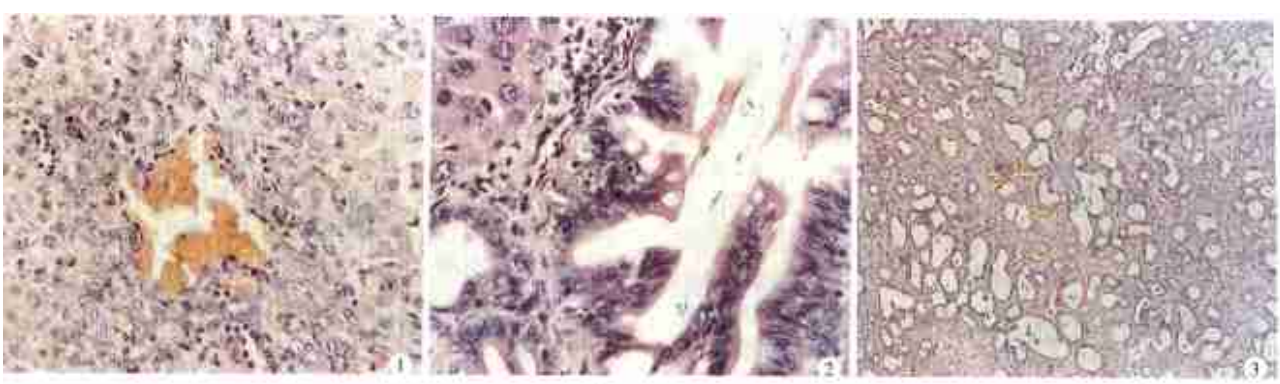


图 1 DIPN 组第 5 周, 卵圆细胞、胆管细胞增生明显, 且已形成腺腔 (HE× 200)

Fig 1 Oval, tubular and cystic cell hyperplasia were seen at the 5th week in DIPN group (HE× 200)

图 2 DIPN 组第 10 周, 胆管上皮细胞乳头状增生、杯状细胞化生和不典型增生 (HE× 200)

Fig 2 Tubular papillary, goblet cell and atypical hyperplasia were seen at the 10th week in DIPN group (HE× 200)

图 3 DIPN 组第 15 周, 肝内胆管管状腺癌, 腺腔内有灰白色物质 (HE× 100)

Fig 3 Intraphepatic chalangioadenocarcinoma were seen at the 15th week in DIPN group and there were gray substarce in the adenocavity (HE× 100)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

肝内胆管癌全部发生在 DIPN 组, 共有 11 只动物发生肝内胆管癌, 最早 1 例在第 10 周时出现, 10 例在第 15 周时出现, 发生率分别是 20%和 67%, 见表 3. 每鼠平均荷瘤数分别是 1.0±0和 4.4±2.1。共发现 45 个肿瘤, 全部为高分化腺癌, 其中管状腺癌 33 个(74.5%)、乳头状腺癌 13 个(25.5%)。肝内胆管癌有时与小胆管增生及胆管上皮不典型增生同时存在, 两者往往有混杂或移行现象。

胆囊、肝外胆管、胰腺、胃、结肠、肺的组织学检查未发现肿瘤改变。

3　讨论

3.1　致癌剂、实验动物及诱癌方法的选择

理想的诱癌剂应具备 5 个条件: ①致癌剂容易获得或合成简单; ②致癌方法简便, 诱癌时间短, 癌发率高; ③能在多种动物中致癌; ④对器官有选择性; ⑤诱发的动物癌与人体癌有相似性。

二异丙醇亚硝胺 (Diisopaopanolnitrosamine, DIPN) 又名双 2 羟丙基亚硝胺(N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine, BHP), 是二亚硝基哌嗪(DPN)的代谢产物, 具有广谱致癌作用。Kinami 等用 DIPN 诱发金仓鼠肝内胆管癌, 15 周时肝内胆管癌的发生率是 70%, 20 周时是 86%[3]。在本实验中, 15 周时肝内胆管癌的发生率是 67%, 与文献报道相似。

肝内胆管癌的动物模型多选用金仓鼠及大白鼠为实验动物。但是大白鼠自发性肿瘤的发生率是 55%, 且较为广泛, 而金仓鼠则为 30%; 更为重要的是金仓鼠的胰胆管系统的解剖结构及胆汁胰液的组成成份与人类的相似[4]。

采用皮下注射法诱发金仓鼠肝内胆管癌, 主要是容易掌握每只动物的用药剂量。DIPN 经皮肤吸收较快, 并导致肝内、外胆管肿瘤而不诱发皮肤肿瘤。Kinami[5] 用生理盐水溶解 DIPN 给金仓鼠皮下注射诱发肝内胆管癌, 剂量为 500 mg/kg, 每周一次, 大约有 12% 的动物能存活至 20 周以上。我们采用此方法虽然能够早期诱发金仓鼠肝胆管肿瘤及癌前病变, 但动物也较早出现频死现象, 集中发生在第 10 周, 第 15 周, 没有动物能活到 20 周。

3.2　金仓鼠肝内胆管癌的病理改变

用 DIPN 诱发肝内胆管癌使我们有可能观察到肝内胆管各种早期的病变, 而这些病变在人类是难以观察到的。本模型在 DIPN 加胆道梗阻的作用下, 肝内胆管病变呈多中心性, 没有局限于某一肝叶。首先是肝内胆管瘀胆、胆管上皮脱落、糜烂、胆管周围炎症细胞浸润, 呈急性炎症表现。此后汇管区周围卵圆细胞增生、胆管周围纤维化、胆管上皮增生、化生、不典型增生, 最后演变为肝内胆管癌。这一过程最短的时间为 75 d。

诱癌 5 周内肝内胆管增生不明显, DIPN 组只有 17%的动物发生肝内小胆管增生, 单纯组动物没有肝内胆管上皮增生表现, 但此时 DIPN 组可观察到汇管区周围成簇或散在的卵圆细胞增生。卵圆细胞是胚胎性多潜能分化的干细胞, 它可分化为肝细胞癌、胆管癌和混合性肝癌[6]。Ikematsu[7] 发现卵圆细胞可集合重组变成管性结构, 这些管性结构包含有杯状细胞及一些似小肠上皮的细胞, 认为卵圆细胞向肠上皮化生是一种普遍的现象。

诱癌第 10 周后卵圆细胞消失, 而此时明显出现肝内小胆管增生、小胆管囊状扩张、胆管上皮杯状细胞化生、胆管上皮乳头状增生及胆管上皮腺瘤样增生或腺瘤, 发生 1 例肝内胆管癌。第 15 周时, 胆管增生性病变更为明显, 肝内胆管癌的发生率达 67%。单纯结扎组动物在第 10 周及第 15 周也出现肝内小胆管增生及胆管上皮乳头状增生, 但没有出现小胆管囊性增生、杯状细胞化生、腺瘤样增生及肝内胆管癌。

Yamamoto[2] 认为胆小管增生是肝内胆管癌发生的重要危险因素。袁枚等[8] 研究人肝胆管结石合并肝内胆管癌标本的病理学时, 发现胆管上皮由糜烂、脱落到增生, 并出现胆管上皮化生及各种不典型增生, 增生与癌共存并有不典型增生移行为癌的现象。本实验也观察到肝内胆管癌与肝内胆管上皮增生并存, 并有肝内胆管上皮增生移行为癌的现象。肝内胆管癌大体上呈较小的白色结节, 直径大部分小于 0.5 cm; 组织类型全部为高分化腺癌, 具有腺泡或管状排列的特点, 癌细胞呈柱状或立方状, 与胆管上皮相似, 类似于人肝内胆管癌的病理改变。肝内胆管增生包括小胆管增生、肠上皮化生及腺瘤样增生是发生肝内胆管癌的危险因素。

参考文献:

[1] 韩本立. 加强胆道恶性肿瘤的基础研究　提高临床诊治水平[J]. 中华实验外科杂志, 1997, 14(2): 65－66.

[2] Yamamoto S. Experimental studies on the cause of cholangiocarcinoma with special reference to obstructive lesions of bile ducts[J]. Ochanomizu Med J, 1985, 33(3): 223－235.

[3] Kinami Y, Ashida Y, Seto K, *et al*. Influence of incomplete bile duct obstruction on the occurrence of cholangiocarcinoma induced by diisopropanolnitrosamine in hamsters[J]. Oncology, 1990, 47(2): 170－176.

[4] Elnore L, Sirica A E. "Intestinal-type" of adenocarcinoma preferentially induced in right/caudate liver lobes of rats treated with furan[J]. Cancer Res, 1993, 53(2): 254－259.

[5] Kinami Y, Miyakoshi M, Fujikawa K. Bile acid load on the DNA distribution pattern of bile ductules and cholangiocarcinoma induced by diisopropanolnitrosamine in hamsters[J]. Oncology, 1998, 55(1): 77－86.

[6] 张继增. 实验性肝癌癌组织的发生种甲胎蛋白表达[J]. 临床与实验病理学杂志, 1999, 15(3): 224－225.

[7] Ikematsu Y, Tomioka T, Tajima Y, *et al*. Cholecystokinin promotes biliary carcinogenesis in the hamster model[J]. World J Surg, 1995, 19(6): 847－851.

[8] 袁　枚, 黄志强. 肝内胆管结石与肝胆管癌的病理组织学观察[J]. 中华病理学杂志, 1982, 11(2): 95－97.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net