DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.06.004

二甲肼诱发大鼠大肠癌的粘液组织化学研究

阎晓初 柳凤轩 贺光友 于冬梅 王宗前 (第三军医大学西南医院病理科) 630038

提 要 应用粘液组化方法对二甲肼(1,2-dimethylhydrazine,DMH)诱发大鼠大肠癌过程的粘液分泌进行了研究。结果显示40只实验大鼠,经DMH注射后,大肠粘膜呈现不同程度的病变及粘液分泌改变。增生区粘膜主要分泌硫酸粘液,与20只对照大鼠大肠粘液分泌相似;不典型增生粘膜和腺瘤随异型度增加,粘液分泌量减少,呈唾液酸粘液为主;大肠癌多数无粘液分泌或呈唾液酸硫酸混合粘液。提示大肠粘膜或腺瘤不典型增生的唾液酸粘液增多或粘液分泌缺乏可能代表其恶性倾向,亦证实大肠癌的发生系经腺瘤癌变或扁平粘膜不典型增生直接发生。

关键词 二甲肼*;肠肿瘤;粘液组织化学*;大鼠

分类号 R735.34

近年来不少学者对胃肠道上皮的主要产物——粘液,研究得较多,并认为粘液的合成和分泌随着细胞的分化而改变,特别是粘膜上皮发生恶性转化时,其粘液的数量和性质均较正常有明显不同[1~3]。本文通过动态观察DMH诱发大鼠大肠癌过程的粘液分泌改变,进一步探讨大肠癌的组织发生及其癌前病变的粘液变化,为大肠癌的早期诊断提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar大鼠60只,雌雄各半(本校动物中心提供),开始实验时平均体重约205g,随机分为实验组40只,对照组20只(每组雌雄各半),饲以标准固体饲料,任意饮水。

1.2 致癌剂

DMH((1,2-dimethylhydrazine,美国Sigma公司产品),用生理盐水溶解后,实验组大鼠以20mg/kg/week剂量,臀部皮下注射,对照组以生理盐水1ml/week相同部位注射,两组同时注射20周,自开始分别于第8、10、12、15、18、20、22、23、24、25、26、28、29、31周各处死实验组大鼠2只,对照组1只,其余大鼠于32周全部处死。

1.3 取材

大鼠处死后,取出并剖开大肠,观察粘膜变化,以10%福尔马林固定24~48 h,采用"卷席法"对全部大肠及其肿瘤取材,石蜡包埋,连续切片,行HE染色和粘液组化染色。AB/PAS染色:酸性粘液显兰色,中性粘液显红色。KOH/AB 1.0/PAPS染色:硫酸粘液着蓝色,唾液酸粘液着红色。

2 结果

2.1 粘液分泌数量的变化

2.1.1 对照组:20只大鼠大肠粘膜组织学观察,腺体排列规则,富于杯状细胞,分泌丰富粘液。

2.1.2 实验组:DMH注射后,动态观察大肠粘膜的组织学改变,呈增生→不典型增生(或腺瘤)→原位癌→浸润性癌的发展过程。其粘液分泌数量亦显示不同程度的变化(见表1)。在大肠粘膜增生区,腺体富含杯状细胞,分泌丰富的粘液,而不典型增生区和大肠腺瘤,随着异型程度的增加,杯状细胞逐渐减少,粘液分泌量亦明显减少,个别Ⅲ级不典型增生,腺体不分泌粘液;本组原位癌和浸润性癌中,16个癌灶(4个低分化腺癌,8个印戒细胞癌,4个粘液腺癌)分泌较丰富的粘液,其余29个癌灶显示粘液分泌量不同程度的减少,其中21个癌灶(18个高分化腺癌,3个中分化腺癌)无粘液分泌。

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

表 1 大鼠大肠病变的粘液分泌量变化

Tab 1 The changes of mucin quantity in lesions of rat large intestine

Mucin quantity	Hyperplastic mucosa	Dysplastic mucosa & (adenoma)			CIS	IVC
		I	I	I		
Abundant	37	…	…	…	1	10
Mild reduced	…	14(2)	1(1)	…	1	4
Moderate reduced	…	2	3(4)	…	2	1
Severe reduced	…	…	2(1)	2(3)	…	5
Mucous absence	…	…	…	4(3)	6	15
Total	37	16(2)	6(6)	6(6)	10	35

CIS: Carcinoma in situ; IVC: Invasive carcinoma

2.2 粘液性质的变化

2.2.1 对照组：大肠粘膜形态结构无明显异常，其腺体分泌粘液类型与大肠节段有关。远端结肠腺体主要分泌酸性粘液，其中以硫酸粘液占优势，唾液酸粘液和中性粘液分泌较少，仅分布于腺体上 1/3 段和表面上皮(图 1)。近端结肠以酸性粘液为主，但中性粘液分泌逐渐增多，同时唾液酸粘液分泌亦增多，呈硫酸唾液酸混合粘液。

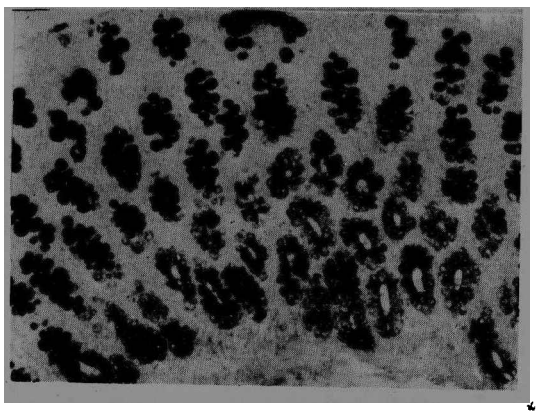


图 1 正常大肠分泌丰富的硫酸粘液(兰色)。KOH/AB 1.0/PAPS×100

Fig 1 Normal colorectal mucin secretion with sulphomucins(blue) prodominance. KOH/AB 1.0/PAPS×100

2.2.2 实验组：40 只大鼠经 DMH 注射后，大肠粘膜显示不同程度的病变，其分泌粘液的性质亦随之变化(见表 2)。其中 AB/PAS 染色，多数病灶仍显示酸性粘液占优势，达 60.48%，中性粘液为主者仅占 3.23%，显示两种粘液成份混合存在者为 13.71%。KOH/AB 1.0/PAPS 染色，动态观察大肠粘膜病变及其粘液分泌改变(见图 2)，实验第 8 周，大肠粘膜显增生改变，增生区腺体多分泌硫酸粘液为主(图 3)；第 10～15 周常显示不典型增生改变，其腺体分泌粘液的性质发生改变，多数病灶(8/9)表现为唾液酸粘液占优势(图 4)，仅 1/9 个病灶呈唾液酸硫酸粘液混合存在；第 18～32 周，大肠肿瘤逐渐形成，随着实验的进程，诱发肿瘤数亦随之增多。本组诱发的 14 个腺瘤中，除 3 个重度不典型增生腺瘤不分泌粘液外，4 个呈唾液酸粘液为主型，6 个呈唾液酸硫酸粘液混合型，仅 1 个显示硫酸粘液为主型。原位癌和浸润性癌中，21 个高、中分化腺癌无粘液分泌；8 个癌灶(高、低分化腺癌)仅显示少量的粘液，其中唾液酸粘液型 3 个，硫酸粘液型 1 个，混合型 4 个；16 个癌灶显示丰富的粘液，硫酸粘液型 2 个，唾液酸粘液型 4 个(2 个为近端结肠癌)，混合型 10 个(7 个为近端结肠癌(图 5)。

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

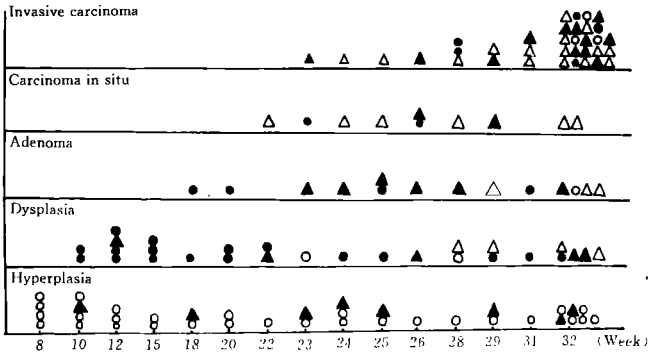


图 2 大鼠大肠粘膜病变分泌粘液类型的动态观察

○硫酸粘液型 ●唾液酸粘液型 ▲混合型粘液 △ 不分泌粘液

Fig 2 Dynamical changes of mucous secretion in the lesions of rat large intestine

Each symbol one focal lesion, sulphomucin (○), sialmucin (●), both sulpho- & siaolomucin (▲), mucous secretion absence (△).

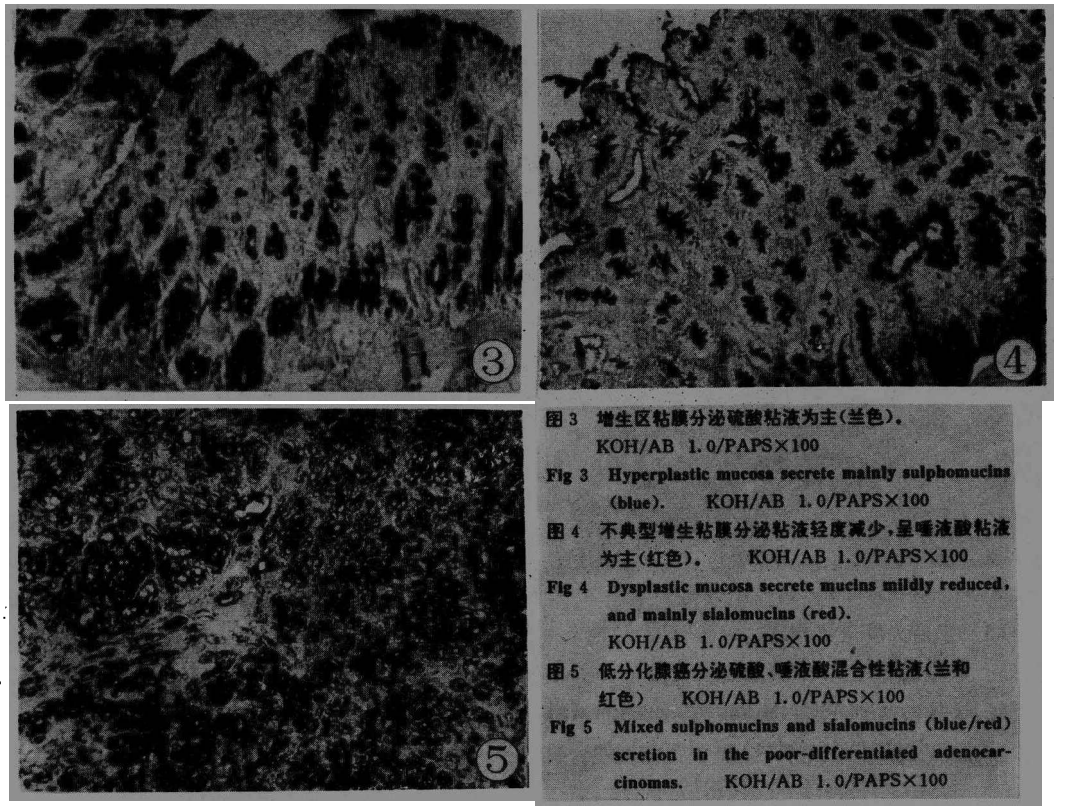


图 3 增生区粘膜分泌硫酸粘液为主(兰色)。KOH/AB 1.0/PAPS×100

Fig 3 Hyperplastic mucosa secrete mainly sulphomucins (blue). KOH/AB 1.0/PAPS×100

图 4 不典型增生粘膜分泌粘液轻度减少,呈唾液酸粘液为主(红色)。KOH/AB 1.0/PAPS×100

Fig 4 Dysplastic mucosa secrete mucins mildly reduced, and mainly sialomucins (red). KOH/AB 1.0/PAPS×100

图 5 低分化腺癌分泌硫酸、唾液酸混合性粘液(兰和红色) KOH/AB 1.0/PAPS×100

Fig 5 Mixed sulphomucins and sialomucins (blue/red) scretion in the poor-differentiated adenocarcinomas. KOH/AB 1.0/PAPS×100

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

表 2 大鼠大肠各种病变分泌粘液类型

Tab 2 The mucin type in various lesions of rat large intestine

Histologic type	No. of lesions	AB/PAS				KOH/AB 1.0/PAS			
		Acid	Neutral	Mixed	Absence	Sulpho-	Sialo-	Mixed	Absence
HM	37	32	1	4	…	29	…	8	…
DM	28	21	…	3	4	2	17	5	4
Adenoma	14	8	1	2	3	1	4	6	3
CIS	10	3	…	1	6	…	2	2	6
IVC	35	11	2	7	15	3	5	12	15
Total	124	75	4	17	28	35	28	33	28

HM: Hyperplastic mucosa; DM: Dysplastic mucosa; CIS: Carcinoma in situ; IVC: Invasive carcinoma

3 讨论

Pozharisski[4] 和 Maskins[5] 曾对 DMH 诱发的大鼠大肠癌和人类大肠癌比较研究发现，两者之间的形态学改变非常相似，并提出 DMH 诱发大鼠大肠癌是研究人类大肠癌最合适的动物模型。为此，本实验应用 DMH 诱发大鼠大肠癌，并结合粘液组化染色，动态观察癌发生过程中，大肠腺体粘液分泌改变，以进一步探讨大肠癌的组织发生及其癌前病变分泌粘液变化，为大肠癌的早期诊断提供参考。

业已证明，正常状态下，大肠腺体分泌粘液丰富，常示硫酸粘液为主，而唾液酸粘液分泌较少[6]。但在大肠上皮发生恶性转化时，其腺体分泌粘液的数量和性质均发生相应的改变[1~3]。

我们先前对人体大肠腺瘤的粘液组化研究发现，大肠腺瘤随其不典型增生程度加重，粘液分泌量逐渐减少，通常在腺瘤重度不典型增生和癌变时，已不分泌粘液，提示大肠腺瘤的粘液分泌缺乏可能是向恶性转化的标志[3]。本实验 40 只大鼠经 DMH 注射后，大肠粘膜呈现不同程度的病变，粘液组化染色显示大肠粘膜不典型增生和大肠腺瘤，随其异型增生加重，粘液分泌数量趋向减少，而重度不典型增生、原位癌、浸润性管状腺癌中，多数病灶无粘液分泌。仅在印戒细胞癌、粘液腺癌和部分低分化腺癌中检测到粘液分泌。由此，提示大肠粘膜腺体异型增生程度加重，常与其粘液分泌量减少相伴随，而粘液分泌缺乏，可能反映其向恶性转化的趋势。

Filipe[7] 对人类大肠癌旁粘膜研究发现，癌旁粘膜的组织学形态虽与正常粘膜极其相似，但其分泌粘液的性质却明显不同，它显示唾液酸粘液异常增多，硫酸粘液减少或缺乏，并首先将其命名为“移行粘膜”，并进一步研究证实其系大肠癌的癌前病变。Allen 亦对大肠腺瘤及其瘤旁粘膜研究发现，随腺瘤不典型增生程度增加，分泌唾液酸粘液也逐渐增多，硫酸粘液趋向减少[8]。还有的作者对溃疡性结肠炎研究显示，溃疡性结肠炎不典型增生时常呈现与移行粘膜一样的粘液分泌改变[9]。这种唾液酸粘液的增多，是代表细胞的不成熟，还是致癌物影响糖蛋白合成的结果，至今尚不清楚。本组动态观察大肠腺体的粘液分泌改变显示，在 DMH 作用第 8 周，大肠粘膜呈增生改变，其腺体分泌硫酸粘液为主，仍与正常大肠相似。第 10～15 周，大肠粘膜多呈不典型增生，其腺体分泌的粘液却呈现唾液酸粘液占优势，硫酸粘液明显减少。提示它与大肠移行粘膜有相似的粘液分泌特征。本组实验第 18 周以后，显示大肠肿瘤逐渐形成，其分泌粘液的性质也有所不同，腺瘤中主要显示唾液酸粘液为主和唾液酸硫酸粘液混合存在，而原位癌和浸润性癌中，高、中分化

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

腺癌常显示粘液分泌显著减少或缺乏，只在印戒细胞癌、粘液腺癌和少数低分化腺癌有中等量粘液分泌，大部分癌组织中产生的粘液为硫酸唾液酸粘液混合存在，但癌旁粘膜腺体却主要呈唾液酸粘液为主型。由此，提示大肠癌发生过程中，其粘液分泌的动态变化系一种由硫酸粘液为主到唾液酸粘液增多，而最后硫酸粘液再次出现形成唾液酸硫酸粘液混合存在的过程。这与 Allen 的研究结果相吻合[8]。因此，我们认为唾液酸粘液增多的大肠不典型增生粘膜和腺瘤是大肠癌癌前病变，亦证实大肠癌是在粘膜不典型增生或腺瘤基础上发生。

参考文献

1. Arends JW, Wiggers T, Vertijnen C, et al. Prognostic significance of mucin type determination in large bowel cancer. J Pathol, 1986; 149: 212
2. Culling CFA, Reid PE, Worth AJ, et al. A new histochemical technique of use in the interpretation and diagnosis of adenocarcinoma and villous lesions in the large intestine. J Clin Pathol, 1977; 30: 1056
3. 阎晓初 柳凤轩 陈意生，等。大肠息肉的癌变倾向——附 255 例的粘液组化研究。肿瘤防治研究，1992; 19(4): 240
4. Pozharisski KM, Likhachev AJ, Klimashevski VF, et al. Experimental intestinal cancer research with special reference to human pathology. Adv Cancer Res, 1979; 30: 165
5. Maskins AP, Dujardin LRM. Experimental adenomas and carcinomas of the large intestine behave as distinct entities. Cancer, 1981; 47: 81
6. Filipe MI. Mucin in the human gastrointestinal epithelium, a review. Invest Cell Pathol, 1979; 2: 195
7. Filipe MI, Branfoot AC. Abnormal pattern of mucous secretion in apparently normal mucosa of large intestine with carcinoma. Cancer, 1974; 34: 282
8. Allen DC, Connolly NS, Biggart JD. High-iron diamine alcian blue mucin profiles in benign, premalignant and malignant colorectal disease. Histopathology, 1988; 13: 399
9. Ehsanullah M, Naunton MM, Filipe MI, et al. Sialomucins in the assessment of dysplasia and cancer-risk patients with ulcerative colitis threated with colotomy and ileo-rectal anastomosis. Histopathology, 1985; 9: 223

(收稿：1993-03-13；修回：1993-09-13)

Mucohistochemical study of 1, 2-DMH induced colorectal carcinoma in rats

Yan Xiaochu, Liu Fengxuan, He Guangyou, Yu Dongmei, Wang Zongqian (Department of Clinical Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The changes of mucous secretion in the 1,2-dimethylhydrazine (1,2-DMH) induced colorectal carcinogenesis were studied with mucohistochemistry in rats. It was found that the colorectal mucosa of the 40 rats under study showed various lesions and changes of mucous secretion. The mucosa of the hyperplastic region, similar to the normal mucosa of the control group, secreted predominantly sulphomucin. The dysplastic flat mucosa and adenomas secreted predominantly sialomucin and the amount of mucous secretion decreased along with intensification of the deformity of the atypical proliferative mucosa and adenomas. Most of the induced colorectal carcinomas secreted no mucin or mixed mucin (sulphomucin and sialomucin). These findings support the concept that the increase of sialolmucin secretion or the decrease of mucous secretion in the dysplastic flat mucosa or adenomas indicates the tendency of malignancy and also confirms that the histogenesis of colorectal carcinoma undergoes through the malignant change of an adenoma or from the atypical proliferation of the flat mucosa directly.

Key words 1,2-dimethylhydrazine*; intestinal neoplasms; mucohistochemistry*; rat

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