二甲肼诱发大鼠大肠癌超微结构的观察

柳凤轩 阎晓初 于冬梅 贺光友 王忠前 （第三军医大学西南医院病理科）630038
陈希炜 曾范利 殷均装 （第三军医大学基础部电镜室）630038

提 要 本实验以二甲肼〔1,2-Dimethylhydrazine,DMH〕为致癌剂诱发大鼠大肠癌。电镜观察 24 只大鼠在 DMH 作用下，不同时相点，大肠粘膜显示不同程度的病变。实验 10～15 周主要表现为粘膜不典型增生，超微结构改变主要显示细胞膜不规则或皱褶，核增大、微绒毛不规则。第 16～32 周以后肿瘤形成，胞核显著增大，异染色质增多，胞质内分泌颗粒减少，游离核蛋白体增多、细胞膜表面微绒毛不规则，细胞膜之间的桥粒减少，此种改变为大肠癌的超微结构特征。

关键词 二甲肼*；肠肿瘤/超微结构；大鼠
分类号 R735.34

大肠癌实验动物模型的建立，为本病的基础与临床研究提供了新的途径。国内近年来，应用 DMH 诱发动物大肠癌的临床研究有一些报告[1]，但在基础研究，超微结构改变的观察，尚未见报告。国外有少数报告[2,3]。为了从生物学角度证明实验性大肠癌的癌细胞超微结构改变与人类大肠癌的癌细胞之间相互关联。本实验以 DMH 为致癌剂诱发大鼠大肠癌，并对大肠癌发生，发展过程的超微结构变化进行了动态观察。

1 材料与方法

1.1 致癌剂

DMH(1,2-dimethylhydrazine，美国 Sigma 公司产品)，溶剂制备：DMH 用生理盐水稀释 0.5%的溶液，再用 0.1mol/L NaOH 调至 pH8.5。

1.2 实验动物

采用 Wistar 大白鼠(由本校实验动物中心提供)，8周龄、体重为165～250g，共60只。随机分成2组，用药实验组40只，对照组20只，每组雌雄各半，实验组以20mg/kg，每周臂部皮下注射一次；对照组以 0.9% NaCl 等量每周注射一次，两组同时进行持续20周。各组动物均于室温20±3℃，湿度40%±5%的环境下分笼饲养，饲以标准固体饲料，任意饮水。

1.3 标本采取

自实验开始于第8、10、12、15、18、20、22、23、24、25、26、28、29、31周分别处死实验组大鼠2只，对照组1只，其余大鼠于32周全部处死。在每个时相点处死的动物，均立即解剖取出全部大肠，纵行剪开，肉眼观察，取肿瘤发生部位及距离癌1cm 癌旁粘膜组织，无肿瘤的大肠粘膜于不同部位随意取材。对照组大肠粘膜无病变发生，随意取粘膜组织。实验组在8～18周处死的5个时相点各取1只，20～31周的9个时相点各取2只，32周全部处死取3只，共取26只。对照组取6只。各采取约1mm×1mm×1mm 的组织3块，分别用3%戊二醛磷酸缓冲液固定后，再经1%锇酸液固定，环氧树脂618包埋，而后用 LKB8800型超薄切片机切片(50～60nm)、醋酸铀枸橼酸铅双重染色。用日本 JEM2000型透射电镜观察。其余组织均用10%福尔马林固定后，进行石蜡包埋切片，HE 染色，光镜观察。

2 结果

本组大肠癌的组织学类型参照《全国大肠癌统一规范》[4]，进行观察分类。管状腺瘤2只，绒毛状腺瘤3只；大肠腺癌20只(高分化管状腺癌9只，中分化管状腺癌3只、低分化腺癌5只，粘液腺癌1只、印戒状细胞癌2只)。对照组组织学均无改变。

2.1 电镜观察

对照组大肠粘膜表面由单层高柱状吸收细胞及少数杯状细胞构成，上皮细胞排列整齐。大肠腺的腺隐窝由未分化细胞，吸收细胞、杯状细胞构成。未分化细胞位于肠腺隐窝底部。隐窝表面为成熟的吸收细胞和杯状细胞。吸收细胞显示胞膜腔面有排列整齐的圆柱形微绒毛，表面为致密的双重膜，中轴含有许多纵行的微丝，由微绒毛顶端向下延伸与根部胞

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

体内微丝相连续。细胞近腔面为连接复合体和桥粒连接，深部为相嵌连接。胞质内有一些大小相似的线粒体，在核周围有高尔基复合体，丰富的粗面内质网和分泌空泡。胞核多为常染色质，少数异染色质分布于核膜内面。杯状细胞呈高脚杯状，表面一般无微绒毛，细胞顶部有大量的粘液颗粒，密度较一致，有的粘液颗粒相融合，核位于基底部，核周有少量粗面内质网，线粒体和高尔基复合体。见有少数未分化细胞、核稍大，核膜常有凹陷，胞质较少，其内有少数粗面内质网和线粒体(图1)。

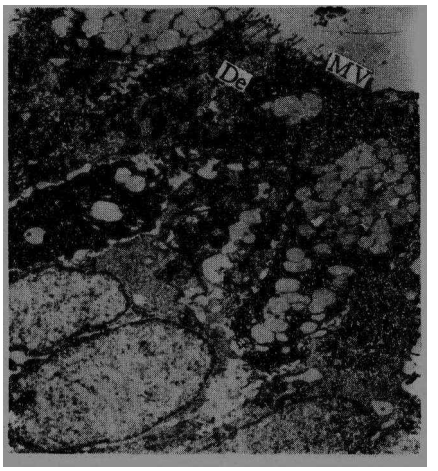


图1 正常大肠粘膜上皮显微绒毛(MV)规则，细胞间有丰富桥粒(De) TEM×3 000

Fig 1 Epithelia of normal colorectum show regular micorvillus (MV) on surface, rich desmosomes (De) between cell membranes. TEM×3 000

2.2 实验组

在注射 DMH 后观察，大致有3个阶段的改变。8～15周肠粘膜显示有的略增厚或改变不明显。于增厚区域取材，肠粘膜上皮细胞和腺隐窝上皮细胞与对照组肠粘膜上皮细胞相比，胞核略增大，有的核不规则，核仁稍增大，胞质减少，其中少数胞膜不规则明显，胞核增大、核不规则、核仁增大，细胞质减少，微绒毛不规则，长短不一，疏密不均匀。胞质分泌颗粒减少，见有少数暗细胞(图2)。18～32周部分大肠粘膜发生腺瘤，腺瘤细胞呈高柱状，细胞大小不一，细胞膜不规则，多数区域胞膜之间紧密相连，桥粒连接与增厚区域不典型增生粘膜比较减少。胞核呈杆状排列、多呈复层，增大，核仁增大，胞质中粘液颗粒及线粒体均减少。微绒毛长短不一，排列疏密不均匀，不规则。在20周以后大部分动物大肠粘膜出现癌。癌细胞显示两型细胞，明细胞型和暗细胞型，以明细胞为主。癌细胞形态随组织学类型不同可有所改变，但其基本特征是，癌细胞大小，形态各异，排列紊乱。胞核不规则，核显著增大，异染色质增多呈块状，核仁明显增大，胞质显著减少，游离核蛋白体增多，胞膜不规则，微绒毛极不规则，排列紊乱，长短不一。桥粒连接减少。高分化管状腺癌的癌细胞，胞核呈椭圆形，核仁增大，胞质内有稀少的线粒体和粗面内质网，有丰富的高尔基复合体，桥粒连接易见(图3)。低分化管状腺癌的癌细胞胞核大，不规则、核仁大，胞质内有较多游离核蛋白体。常见胞质内微囊。可见有由2～4个细胞构成的原始腺腔(图4)。印戒细胞癌显示癌细胞呈散在分布，细胞连接不发达，胞质内充满电子密度不等的粘液颗粒，有的粘液颗粒相融合，核不规则，多偏向一侧，胞质可见少数粗面内质网和肿胀的线粒体(图5)。癌细胞间为粘液物质及增生的胶原纤维。癌旁粘膜的吸收细胞微绒毛较密集、较长。细胞侧缘有较丰富的桥粒连接。胞质内有一些粗面内质网和线粒体，胞核呈椭圆或杆状形，异染色质较增多，核仁明显增大。在癌旁粘膜中，未分化细胞出现较多(图6)，与癌前不典形增生的粘膜上皮细胞有些相似。

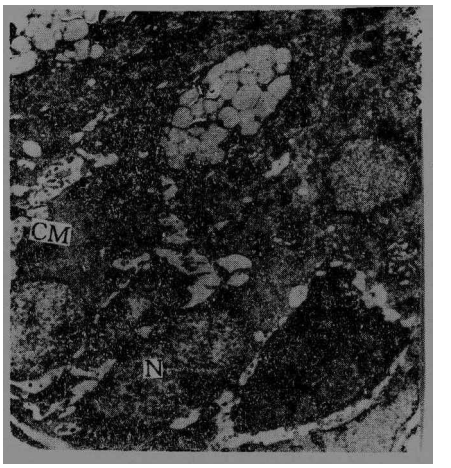


图2 实验组8周，粘膜上皮细胞膜不规则(CM)，核增大(N) TEM×3 000

Fig 2 Experiment at 8th week, irregular membranes (CM), and enlarged nucleus (N) of epithelial cells. TEM×3000

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

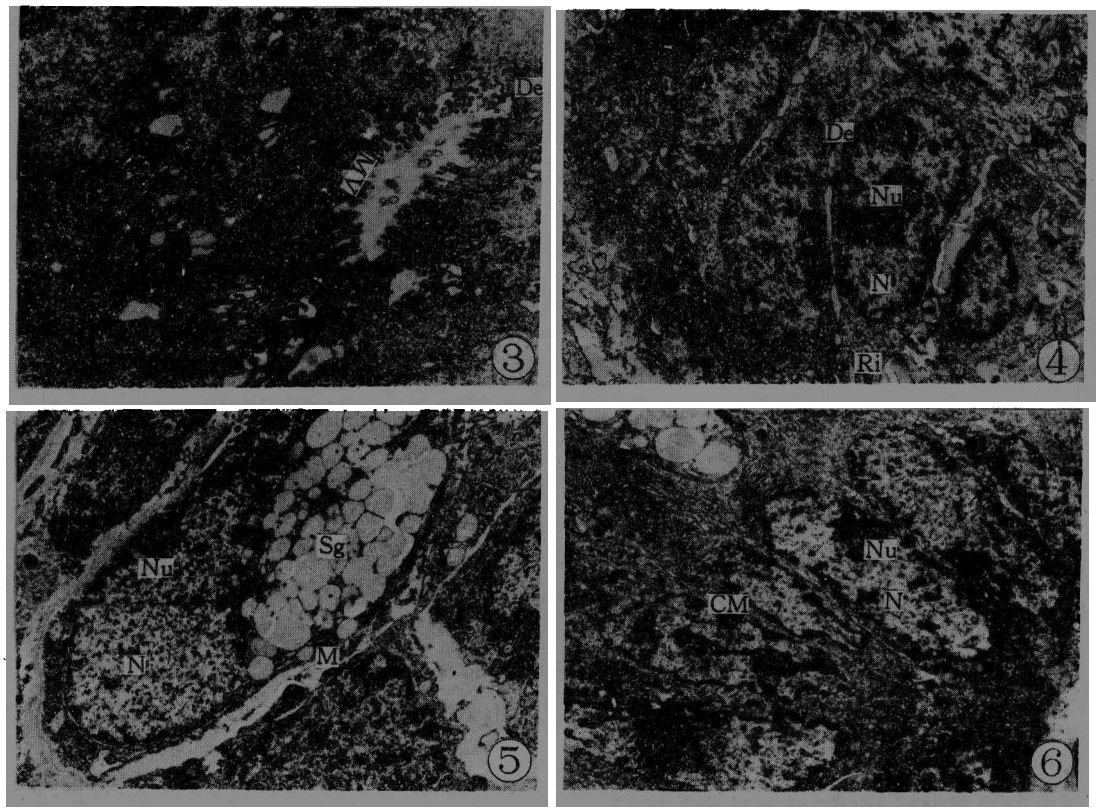


图3 实验组23周，大肠高分化腺癌，微绒毛不规则(MV)，桥粒连接丰富(De) TEM×6 000

Fig 3 Experiment at 23th week, well-differentiated adenocarcinoma of colorectum show irregular microvillus (MV) on surface, rich desmosomes (De) between cell membranes. TEM×6 000

图4 实验组25周，大肠低分化腺癌，核大(N)、核仁突出(Nu)、胞质游离核蛋白体丰富(Ri) TEM×5 000

Fig 4 Experiment at 25th week, poor-differentiated adenocarcinoma of colorectum show enlarged nucleus (N), marked nucleolus (Nu) and rich ribosomes (Ri) in cytoplasm. TEM×5 000

图5 实验组27周，大肠印戒细胞癌，核不规则(N)，胞浆丰富粘液颗粒(Sg) TEM×6 000

Fig 5 Experiment at 27th week, singet-ring cell carcinoma of colorectum show irregular mucleus (N), differ in size, and rich nucous granules (Sg) in cytoplasm. TEM×6 000

图6 实验组25周，大肠癌旁粘膜上皮细胞核大(N)、核仁增大(Nu)，胞膜不规则(CM) TEM×4 000

Fig 6 Experiment at 25th week, epithelia of adjacent to colorectal carcinoma show enlarged nucleus (N) and nucleolus (Nu), irregular cell membranes (CM). TEM×4 000

3 讨论

本组 DMH 诱发大鼠大肠癌观察结果表明，肿瘤的发生、发展经历了从单纯性增生→良性管状腺瘤或乳头状腺瘤→非浸润性癌→浸润性癌，这样一个典型的病理过程(另文报

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

告)。对于此种过程中的细胞超微结构亦发生相应的改变。实验组在用药开始的第8周,大肠粘膜上皮细胞与对照组相比,胞膜不规则或皱褶,微绒毛排列不整齐,胞核略增大,部分出现核仁增大,胞核多数位于细胞的基底部,部分位于细胞之中,胞质较丰富。这是呈现增生的细胞超微结构改变。在用药后第20周的大肠粘膜上皮细胞显示腺瘤改变,瘤细胞核增大,核仁增大,异染色质增多,胞质中粘液颗粒减少,微绒毛长短不一,排列疏密不均,胞膜不规则,桥粒连接较增生减少。大肠癌多发生于用药第25周以后,癌细胞的超微结构特征改变与人体大肠癌细胞的超微结构改变相似[5,6],且各种类型的癌细胞,其改变与文献报道相似[2,3,6,7]。在癌细胞中有两型细胞,明细胞与暗细胞,而以明细胞为主,对于暗细胞的改变,Rerr[8]认为这种细胞是坏死前的浓缩细胞,而称"皱缩坏死"。我们在实验研究中,观察到癌细胞中的暗细胞胞质的线粒体肿胀,部分结构模糊等改变,这些变化符合细胞坏死前的改变。

癌细胞的连接失常,在高分化管状腺癌与低分化腺癌相比较,低分化腺癌改变更为突出,低分化腺癌细胞膜与细胞之间多为平滑相连接,指状突起较简单,而又稀少,相互连接疏松,癌细胞桥粒连接减少,并有桥粒分离现象,故在癌细胞分化低者连接松弛,粘着力显著降低,致使癌细胞有利于扩散和转移。本实验组作电镜观察中,4只诱发大肠低分化腺癌,均有扩散或腹腔内转移。Weinstein[9]研究膀胱癌时发现,癌细胞的桥粒数目与侵袭程度成反比,桥粒减少,侵袭力强。这些改变,对于临床判断预后有参考意义。

参考文献

1. 汪建平 王吉甫 王成恩。二甲肼诱发结肠癌手术后大肠癌的实验研究。中华肿瘤杂志,1987;9(3):193
2. Barkla DH, Tutton PJM. Ultrastructure of 1,2-Dimethylhydrazine induced adenocarcinomas in rat colon. Journal of the national cancer institute,1976;61(5):1291
3. Fisher ER, Raulson JD, Mccoy MM. Genesis of 1,2-dimethylhydrasine induced colon cancer. A light and electron microsocopic study. Arch Pathol Lab Med,1981;105:29
4. 全国大肠癌病理协作组。全国大肠癌病理研究统一规范。中华肿瘤杂志,1986;8:156
5. 郭山春 柳凤轩 陈意生。大肠癌旁移行粘膜的病理研究及临床意义。第三军医大学学报,1991;3:235
6. Hickey WF, Seiler MW. Ultrastructural markers of colonic adeno carcinoma. Cancer,1981;47:140
7. Autru PH, Williams GM. Experimental colon carcinogenesis. Bbca Raton Florida CRC PRESS,1983:112~113
8. Rerr JF. Shrinkage necrosis: A distinct mode of cell death. J Pathol,1971;105:13
9. Weinstein RS. The structure and function of intercellular junction in cancer. Ad Cancer Res, 1976;23:23

(收稿:1993-01-08;修回:1993-09-14)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

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

Liu Fengxuan, Yan Xiaochu, Yu Dongmei, He Guangyou, Wang Zhongqian (Department of Clinical Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)
Chen Xiwei, Zeng Fanli, Yin Junpei (Department of Electron Microscope, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The ultrastructure of the 1,2-dimethylhydrazine (1,2-DMH) induced colorectal carcinoma was studied in rats. The ultrastructural changes varied with the elapse of time. In the 10th to 15th week after 1,2-DMH injection, the cell membrane of the epithelial cells of the colorectal mucosa was irregular or rugous, their nuclei enlarged and the microvilli irregular. In the 16th to 32nd week, the carcinoma was well-formed. The nuclei of the cells of the adenocarcinoma were markedly enlarged with increased amount of heterochromatin; in the cytoplasm, there was a decrease of mucinous granules and an increase of ribosomes; and on the surface of the cells, the microvilli were irregular and the desmosomes between cells were decreased in number. These were the ultrastructural characteristics in the carcinogenesis of colorectal carcinomas.

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

从一患者尿道同时分离出淋病奈瑟氏菌及卡他布兰汉氏菌

薛 强 方庆蓉* (第三军医大学西南医院检验科) 630038

我科1992年从一例男性患者尿道分泌物中同时分离培养出淋病奈瑟氏菌及卡他布兰汉氏菌。现报道如下：

病例：患者男，32岁，某单位采购员。本次就诊前两周，尿道口红肿，并有分泌物流出，经自己服用SMZ，症状减轻，但未痊愈。现仍有尿道口不适感，早晨可见少量分泌物。因其有过不洁性交史，本次就诊要求做淋球菌培养及药敏。取患者分泌物做涂片镜检，发现有革兰氏阴性双球菌。继而将分泌物接种于巧克力培养基上，置于36℃ CO_2环境中，培养48 h后发现培养基表面生长出两种不完全相同的菌落，涂片染色均为革兰氏阴性球菌，多数成双排列，呈咖啡豆状。经进一步鉴定结果如下：一种细菌氧化酶为阳性，发酵葡萄糖，不发酵乳糖，麦芽糖，果糖，蔗糖；由此判为淋病奈瑟氏菌[1]。另一种细菌氧化酶也为阳性，但不发酵以上各种糖。在普通血琼脂平板上培养48 h后，形成灰白色，圆形，光滑凸起，边缘整齐，干燥较硬不溶血的菌落。根据涂片染色结果，菌落特点及生化特性判为卡他兰汉氏菌[2]。

关键词 淋病奈瑟氏菌；卡他布兰汉氏菌*
分类号 R378.16

参考文献

1. 叶应妩 李健斋 王玉琛 主编。临床实验诊断学（下册）。北京：人民卫生出版社，1989：1991
2. 叶应妩 王毓三 主编。全国临床检验操作规程。江苏：东南大学出版社，1991：411

（收稿：1993-05-18；修回：1993-10-26）

* 重庆市第八人民医院检验科

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net