DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.01.011

二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌的病理形态学研究

梁晓俐 钟光汉 左声鹤 （第三军医大学训练部 病理教研室） 630038

提 要 使用DEN诱发大鼠肝癌，整个诱癌过程分为非特异性药物反应、非癌性增生性改变和肝癌发生3个阶段。非癌性增生性改变表现为由各种异常肝细胞组成的增生结节和小胆管腺瘤样增生，从实验过程和形态学看，增生性改变与癌肿发生具有密切关系。依分化程度，肝癌的超微结构呈多样性改变。在1例胆管细胞癌中发现与APUDoma所见不能区别的致密核心颗粒，推测为1种特殊类型的胆管细胞癌。作者认为，DEN诱发的肝癌具有肝细胞和胆管细胞两种组织起源。

关键词 DEN；超微结构；组织发生；肝细胞癌；胆管细胞癌

使用亚硝胺类化合物诱发大鼠肝癌的形态学研究，国内外已有一些文献报道[1][2][3][4]，但电镜材料甚少，对其组织发生亦有争议。本实验旨在使用适当剂量的二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌，对肝癌发生过程中肝脏的形态学进行观察，重点研究大鼠肝癌的组织学类型和超微结构变化，并探讨其组织发生问题。

1 材 料 与 方 法

1.1 动物分组及实验方法

雄性Wistar大鼠140只，月龄3个月，体重80g～100g，随机分为给药组和对照组，分笼饲养。给药组大鼠灌喂2‰DEN生理盐水溶液，每次0.9ml，内含DEN1.8mg。自实验开始至满12周前，每周5次，13周起每周3次，18周后停药。对照组灌喂等量生理盐水。

1.2 取材方法、标本处理及观察方法

实验动物分组及活杀时间见附表。

附表 实验动物分组及活杀时间

Tab. Grouping and time of killing of the experimental animals

groups	various time intervals (weeks)and No. of the animals used									total
	1	3	6	9	12	15	18	20	25	
administered	10	10	10	10	10	10	10	11	14	95
control	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45

各取材点大鼠随机抓取，活杀前禁食16h～20h。1%戊巴比妥钠液腹腔注射麻醉后迅速开腹，在肝脏左侧叶或病变部位取材做光镜、电镜观察用。光镜材料按常规切片，HE和PAS染色。电镜材料主要取自结节部位，按常规程序制成包埋块，LKB-NOVA2188型超薄切片机切片（先半薄切片定位），醋酸铀和柠檬酸铅电子染色，DXB_2-12型和JEM-2000EX型电镜观察。

2 实 验 结 果

对照组各取材点动物肝脏肉眼及组织学观察均未见异常，PAS染色肝细胞内罕见阳性颗粒。

实验组动物肝脏见以下变化：

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne

2.1 急性非特异性变化

1周～6周时大鼠肝脏肉眼未见异常。镜检见肝小叶结构基本完整，肝实质内散在坏死小灶伴圆形细胞和中性白细胞浸润，偶见桥性坏死。汇管区除炎细胞浸润外，小胆管轻度增生。

2.2 增生性病变

12周～25周，肝脏体积逐渐增大，各叶均见散在灰白色结节，早期多数为针尖至1 mm直径大小，后发展为0.3cm～0.6cm大小，其数目随实验时间延长而不断增多。当肝癌出现时，这些结节与癌肿并存。

光镜见从9周起肝细胞坏死现象甚少，肝实质内出现由各种异常肝细胞构成的增生结节，这些异常的肝细胞的胞浆或富含糖元、或呈毛玻璃样、或明显嗜酸性、或嗜碱性，尤其是后一类细胞，呈现出不典型增生肝细胞的形态。早期出现的增生结节多由含糖元细胞或毛玻璃样细胞组成，而后出现的增生结节则多以几种异常肝细胞混合组成，以其中1种细胞为主。这些增生结节与癌结节的区别在于细胞成分无明显异型性、且不呈现柱状或腺样排列结构。在实验早期即可见到的胆小管增生，随实验时间延长日趋显著，呈腺瘤状或纤维囊腺瘤状，部分上皮复层化并显轻度异型性。

2.3 肝癌

第15周起出现肝癌，发生率分别为15周10%，18周60%，20周72.7%，25周78.6%。癌肿为多发性结节状，分布无规律，直径0.2cm～2.5cm不等。镜检见26例中23例为单纯肝细胞癌，3例为肝细胞癌和胆管细胞癌并存。

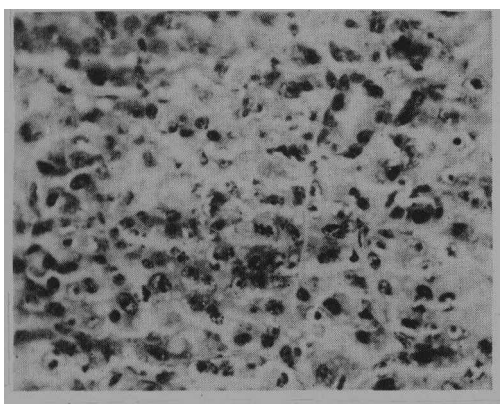


图1 柱状结构肝细胞癌 HE×450

Fig.1 Trabecular pattern of hepatocellular carcinoma (HCC)

2.3.1 肝细胞癌组织学和超微结构变化

光镜见有两种组织学类型：

（1）柱状结构肝细胞癌：由层数不等的癌细胞构成癌柱（巢），局部可坏死，形成假腺泡状结构，癌细胞有嗜碱性小癌细胞、嗜碱性大癌细胞及嗜酸性大癌细胞等几种形态。在较小癌结节由单一形态的癌细胞组成；在较大癌结节中，则常为不同形态癌细胞并存，但其各自组成相对独立的癌巢，未观察到明确的过渡关系（图1）。

（2）腺样结构肝细胞癌：癌细胞围成大小不等的腺管，有乳头突入腺腔。癌细胞多呈高柱状，嗜酸性丰富胞浆，椭圆形核多居于底部，分裂像多见，在部分癌结节内见这类癌细胞由立方状过渡而来。

电镜观察见肝细胞癌主要由两大类癌细胞组成：

（1）大癌细胞：其分化较高，多数形状较规则，细胞交界面多平直，亦可见波浪样起伏或镶嵌状交界。毛细胆管或显扩大、微绒毛发达，或管膜平直、微绒毛缺如。多数癌细胞窦面膜微绒毛十分发达。核增大兼畸形，有核内假包涵体形成，核仁明显增大，结构松散或轻度均质化。胞浆丰富，细胞器发达，但各种细胞器的数量在不同类型癌细胞中不等。光镜所见嗜酸性大癌细胞，在电镜下见胞浆内含大量线粒体，RER较发达，但游离核糖体较少，SER多呈小泡状（图2）。嗜碱性大癌细胞胞浆内则含丰富的游离核糖体，RER十分发达，膜管长短不一，或以单层板状环绕线粒体，或呈同心圆状排列结构（图3），还可见由多层膜管紧密包裹而成的包涵体样结构，线粒体和SER数目较少。

（2）小癌细胞：共同特点是体积小，核浆比值显著增大，SER稀少甚至缺如，游离核糖体十分丰富，分化程度不一致，其中分化程度较高者线粒体形状基本规则，RER和高尔基氏器尚发达，而分化低者细胞形状极不规则，排列松散，连接结构发育不良，核仁数目可多达数个，胞浆量极少，且电子密度高，在形态异常的线粒体间散布较多的RER，高尔基氏器罕见（图4）。

2.3.2 胆管细胞癌的组织学和超微结构变化

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne

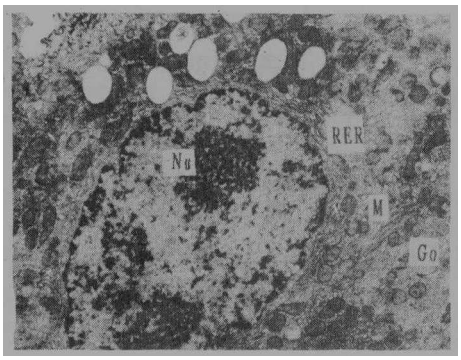


图 2　肝细胞癌（大癌细胞）：癌细胞分化较高，细胞器发育较好，线粒体（M）数目多，但游离核糖体较少。×8 000

Fig. 2　The large tumor cells in HCC are well-differentiated, with well-developed organelles and abundant mitochondria (M), while free ribosomes are rather scanty. ×8 000

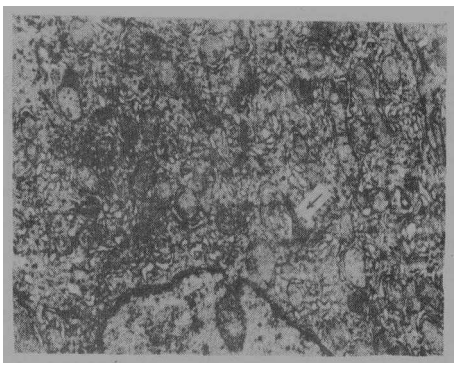


图 3　肝细胞癌（大癌细胞）：癌细胞内粗面内质网发达（⬇），可见同心圆样结构；游离核糖体丰富。×16 000

Fig. 3　The large tumor cells in HCC are endowed with well-developed RER (arrow) forming concentric lamellar structure and rich in free ribosomes. ×16 000

癌结节直径0.5cm～0.6cm，光镜见立方状或低柱状上皮性癌细胞呈单层或复层围成大小不等、形状各异的腺管，后者周围及整个结节周围均有显著的纤维结缔组织包绕，癌细胞胞浆嗜碱性，无分泌现象(图5)。

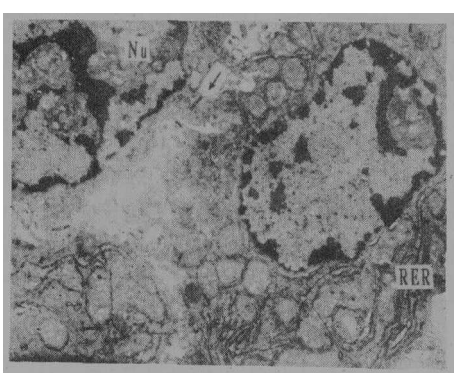


图 4　肝细胞癌（小癌细胞）：癌细胞分化低，表面见微绒毛，核浆比值显著增大，核仁显著。×16 000

Fig. 4　The small tumor cells in HCC are poorly-differentiated. The nucleo/cytoplasmic ratio is increased and nucleoli are prominent. There are microvilli in surface of the cells. ×16000

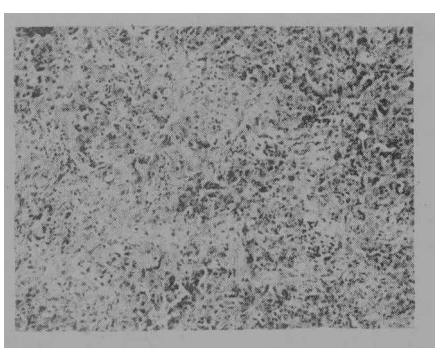


图 5　胆管细胞癌：为管状腺癌，腺管周围包绕大量纤维结缔组织。HE×200

Fig. 5　Cholangiocellular carcinoma: It is a kind of tubular adenocarcinoma. Duct-like structure of the tumor tissue are surrounded by abundant fibrous stroma. HE×200

电镜见由形状极不规则的上皮细胞围成的腺管外有不连续的基底膜及胶元原纤维束，腔面微绒毛丰富，癌细胞内细胞器不发达（图6）。有1例胆管细胞癌超微结构特异，其癌细胞呈椭圆或长梭形，排列紧密，

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.ne

细胞表面微绒毛十分发达，并可见“胞浆内微腔”（图7）。胞浆内高尔基氏器发达，游离核糖体丰富，并见成片的平行微丝束；引人注目的是，在这些癌细胞胞浆内分布有数量不等的致密核心颗粒，由密度较高的核心和单层界膜组成，两者之间可见明显空晕，颗粒大小不一，直径147nm～276nm（图8）。

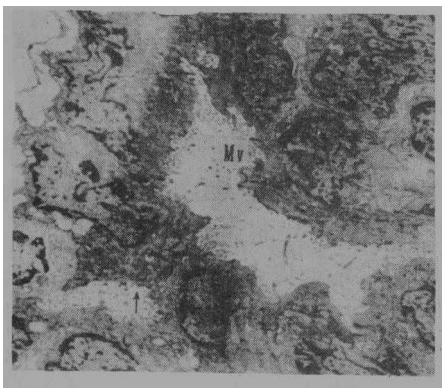


图6 胆管细胞癌：腺管结构，腔面具丰富的微绒毛（Mv），癌细胞异型性显著。×6400

Fig. 6 Cholangiocellular carcinoma: There are numerous microvilli (Mv) covering the luminal surface of the adeno-tubular structures within the tumor tissue. ×6 400

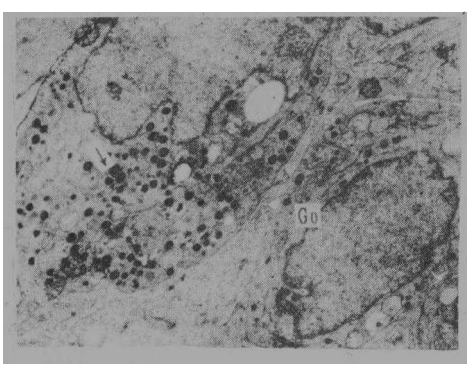


图8 癌细胞胞浆内致密核心颗粒（➧），核心与界膜间有空晕。×16 000

Fig. 8 The tumor cell showing electron-dense core granules in cytoplasm (arrow). Dense core is surrounded by a halo and a distinct limiting membrane. ×16 000



图7 癌细胞“胞浆内微腔”。×9 600

Fig. 7 The tumor cell showing intracytoplasmic lumen. ×9600

3 讨 论

3.1 本实验使用小剂量DEN长期灌喂方法诱发了大鼠肝细胞癌和胆管细胞癌。整个诱癌过程可区分为非特异性药物反应，非癌性增生性改变和肝癌发生3个阶段。在9周时开始出现由各种异常肝细胞组成的增生结节，15周起有肝癌发生。采用本实验方法建立的动物模型，实验早期肝实质坏死程度较轻，病变自然发展过程较清晰，肝癌发生率较高，且多不伴肝硬化。

3.2 本实验见每1例肝细胞癌均为多发性，癌细胞形态和分化程度，以及排列方式均呈现多样化，故我们以组织学结构为基础，将肝细胞癌分为柱状结构和腺样结构两大类型，其中柱状结构肝细胞癌又可分为嗜酸性大细胞型、嗜碱性大细胞型和嗜碱性小细胞型等3个亚型。在本实验中，各种类型癌细胞出现与实验期长短无明显关系，它们之间亦未观察到明确的过渡关系，但从整个实验所见病变发生顺序和形态学演变过程看，异常肝细胞增生结节与肝细胞癌发生具有密切关系，是由不同类型异常肝细胞各自演变为不同形态的癌细胞、还是在各种异常肝细胞和癌细胞之间存在先后序列演变关系，值得进一步探索。但异常肝细胞中的嗜碱性细胞所呈现出的不典型增生形态值得引起重视[5][6]。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne

3.3 曾有一些作者报告由DAB和Aflatoxin B1诱发的肝癌具有多种组织起源和发生方式的特点[6]，诱癌过程中增生的所谓“卵圆细胞”既可向小胆管分化，发展为胆管细胞癌，又可分化成小肝细胞，成为低分化肝细胞癌的起源。但使用DEN诱癌，观察结果不一[4][5]，对于诱癌过程中，小胆管增生的意义及与肝细胞组织起源的关系，各家认识也不一致。本实验中除有胆管细胞癌与肝细胞癌并存外，见腺样结构肝细胞癌具有胆管上皮和肝细胞的双重形态，并见由立方上皮向柱状及多角形癌细胞的过渡，且活跃增生的胆管上皮有间变现象，但未观察到“卵圆细胞”。故我们推测DEN诱发的肝癌可能具有肝细胞和胆管细胞两种起源，异常肝细胞增生结节可能演变为柱状结构肝细胞癌；而小胆管增生一方面可演变为胆管细胞癌，另一方面通过胆管上皮腺瘤样增生转化为腺样结构肝细胞癌。

3.4 Bruni等[7]曾报告DEN诱发大鼠肝细胞癌的超微结构特点。我们观察结果显示癌细胞的超微结构依分化程度不同而呈现多样化改变。光镜所见大癌细胞电镜观察分化较高，线粒体和游离核糖体的数量决定了胞浆的嗜碱性或嗜酸性。而嗜碱性小癌细胞则分化低，SER少甚至缺如，这一点符合Bruni的观察。关于化学制剂诱发大鼠胆管细胞癌的超微结构变化，文献报告较少。

3.5 在人类，肝实质内原发性APUDoma很少见，但曾有作者在胆管细胞癌中发现神经分泌颗粒[8]，晚近有报告在“层状纤维化型肝癌”中有神经内分泌颗粒存在[9]，组织起源不明，Alpert曾推测在肝内可能存在具有“多向分化潜能”的细胞[10]。目前，国内外尚未见化学制剂诱发肝脏肿瘤细胞内含神经分泌颗粒的报告，在本实验中，通过电镜观察，在1例胆管细胞癌中发现确切的致密核心颗粒，由于未见大鼠肝内胆管存在嗜银细胞的报告，故我们认为这1特殊癌肿可能起源于肝内胆管细胞，是1种特殊类型的胆管细胞癌。

参 考 文 献

1. Magee PN and Barnes JM. The preduction of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. Bri J Cancer 1965;10:114
2. Schmity-Moormann P, Gedigk P, Dharamadhach A. Early histological and histochemical changes during experimental production of liver carcinoma by diethylnitrosamine. Z Krebsforsch 1972;77:9
3. 中国医学科学院分院一室病理组、三室肿瘤生化组。二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌过程中的病理形态观察。肿瘤防治研究 1978; 1:48
4. 龚民族。二乙基亚硝胺对大鼠肝脏的影响——肝癌模型的建立及癌变过程。解剖学报 1980; 11(2):205
5. Barbason H,Smoliar V,Fridman-manduzio, et al.Effects of discontinuation of chronic feeding of diethylnitrosamine on the development of hepatomas in adult rats. Bri J Cancer 1979; 40:260
6. Farber E. The pathology of experimental liver cancer. In: liver cell cancer. Eds by Cameron HM Amsterdam,New York, Oxford. 1976:243～271
7. Bruni C. Distinctive cells similar to fetal hepatocytes associated with liver carcinogenesis by diethylnitrosamine-Electron microscopic study. JNCI 1973;50:1513
8. Christie AC. Three cases illustrating the presence of argentaffin (kultschitzky) cells in the human glalbladder. J Clin Path 1984;7:318
9. Payne CM, Nagle RB, Paplanus SH, et al. Fibrolamellar carcinoma of liver:A primary

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne

malignant oncocytic carcinoid? Ultrastructural Pathology 1986;10:539
10. Alpart LI, Zak FG, Werthamer S, et al. Cholaingocarcinoma——a clinicopathologic study of five cases with ultrastructural observations. Human Pathology 1974;3 (6) 706

(收稿：1990.02.15；修回：1990.12.26)

Pathomorphological Study on DEN-induced Hepatic Carcinomas in Rats

Liang Xiaoli, Zhong Guanghan, and Zuo Shenhe (Department of Pathology, Third Military Medical College, Chongqing 630038)

Abstract Hepatic carcinomas were induced with the administration of diethylnitrosamine (DEN) in rats. The morphological changes of the liver tissues in the course of carcinogenesis could be divided into 3 successive stages: the non-specific changes reacting to the drug toxicity, non-cancerous hyperplastic nodules of hepatocytes and ductular cystadenomatous lesions, and the lesions of genuine malignancy including hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma.

The ultrastructural alterations of hepatocellular carcinoma showed a complicate picture and were related to the differentiation of the tumor cells. In one case of cholangiocarcinoma, numerous cytoplasmic dense-core granules similar to the neurosecretary granules seen in apudoma were found in some of the tumor cells, which is postulated to be a special type of cholangiocarcinoma. On the basis of the results, the histogenesis of the neoplasms after DEN administration is considered to originate from hyperplastic nodules of hepatic cells and ductular hyperplasia.

Key words diethylnitrosamine; ultrastructure; histogenesis; hepatocellular carcinoma; cholangiocarcinoma

---

可摘式双重牙列美容法

周正贵（新桥医院 口腔科）

为解决成年人少数前牙舌向错位，其本人无条件接受正畸矫治的患者，我科针对这类情况设计制作了1种方法简便，取戴方便，舒适美观，对邻基牙均无损害的1种可摘式双重牙列美容法。经临床34例患者1年～2年的观察情况结果较为满意，特作一简要介绍。

1 适应症

凡成年人1～2个上下前牙舌向错位而无Ⅰ°以上反𬌗的病人方可采用此法。

2 设计和制作方法

(1)调𬌗及间隙预备，如有Ⅰ°或Ⅱ°反𬌗者应适当调磨对𬌗牙使其尽量减小复𬌗程度，钢丝所通过的部位应在正常咬𬌗时不与对𬌗牙接触为宜，若为正常𬌗有自然间隙者可不需磨牙。（2）按常规法取上下颌的前部份或全口印模，灌模。（3）在石膏模型上用26号（0.5mm）的不锈钢丝弯制支架，其方法是：钢丝沿错位的基牙舌面切嵴和近远中边缘嵴的内侧弯制呈“W”形（见图1），注意钢丝要与基牙贴合，U字形不宜过宽，以免影响固位，然后钢丝紧贴基牙的近远中间隙越过至唇面牙冠的中1/3处后切断并弯一小圆圈以利增加固位力，唇面部的钢丝应离开基牙少许，以不妨碍排列塑料牙面为宜。(4) 支架弯好之后在舌侧用蜡暂时固定，然后选一色泽，大小合适的成品塑料牙磨改成与邻牙协调一致，最后用白色自凝塑胶直接在石膏模型上粘结塑料牙面与钢丝支架待其塑料硬固之后取下修复体进行磨光即可试戴。 （下转41页）

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne