

# 二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌过程 中的病理形态观察

中国医学科学院分院

一室病理组

三室肿瘤生化组

恶性肿瘤的病因和细胞癌变的规律至今尚不完全清楚。我们以往曾对肝癌和皮肤癌进行过初步的实验研究<sup>(1,2)</sup>，认为癌变的发生可能与细胞的增生与分化间的平衡失常有关。为了进一步研究癌变的原理，本实验进行了二乙基亚硝胺(DENA)诱发大鼠肝癌过程中肝脏病理形态观察和生化改变的研究。

DENA 在自然界比较广泛地存在于食物中，可诱发多种动物肿瘤。在大白鼠所诱发的肿瘤多为肝细胞癌，和人肝细胞癌比较相似，而且肝脏也易于采取组织进行病理形态观察和生化分析，所以选用了 DENA 诱发大鼠肝癌做为动物模型。在 DENA 引癌过程中的不同时期分别作肝脏的病理形态观察和胺基甲醯磷酸合成酶(GPSI)，鸟氨酸氨基甲醯转移酶(OCT)和天门冬氨酸氨基甲醯转移酶(ACT)的测定。本文只报告病理形态观察的结果，至于生化测定结果，将另文报告<sup>(3)</sup>。

## 材料及方法

于魏氏(wistar)大白鼠(雄性，体重 70~100 克)灌喂 DENA 水溶液(5 毫克/公斤体重/日，每周喂 6 天)，另以大白鼠灌水做正常对照。在喂 DENA 过程中不同时间分别处死实验动物及对照动物，采取小块肝组织以 Bouin 氏液固定，石腊切片 5 微米厚，

苏木素-伊红染色，进行病理形态变化的观察。

## 结 果

对照动物的肝脏正常，无可记述。实验动物的结果如下：

从喂 DENA 第 2 周到第 30 周实验动物肝脏陆续出现的病理改变表现为两个方面：一是肝细胞损伤和肝组织破坏；二是肝细胞、胆管和窦内皮细胞增生以及肿瘤的发生。

一、肝细胞损伤在第 2 周即开始出现，表现为肝小叶中央的肝细胞混浊肿胀及嗜酸性变等退行性变，偶可见圆形的嗜酸性体。部分动物偶可见小灶性坏死或小叶中央坏死。在灶性坏死地区的窦内皮细胞增生与少数单核细胞和淋巴细胞浸润(图 1)。肝细胞的退行性变与坏死在 2~30 周的全过程中都可看到。

肝组织的破坏是由于长期肝细胞损伤坏死和纤维组织增生所引起。纤维组织增生最早在汇管区及中央静脉周围出现，以后汇管区的纤维组织向小叶内伸展，并逐渐分隔肝小叶，最后形成结节性肝硬变。根据纤维组织增生的过程，形态上分肝纤维化与结节性肝硬变两种。在喂 DENA 第八周开始出现早期肝纤维化，第 18 周开始出现结节性肝

硬变(表1)。

二、肝细胞增生到形成肝细胞癌从形态上可以分成三个阶段。1. 肝细胞单纯性增生；2. 肝细胞异型性增生；3. 肝细胞癌。

1. 肝细胞单纯性增生：肝细胞单纯性增生的轻重程度相差甚大。最轻时只有散在的肝细胞呈轻度增生现象，较重时则增生的肝细胞形成结节状集团。根据增生的程度分成三级。

I 级肝细胞单纯性增生：肝细胞核正常或轻度增大，双核肝细胞增多；核仁或略有增大；胞浆丰富，透明或红染；肝细胞索无变形但排列较紧；多为散在的肝细胞呈增生现象(图1)。

II 级肝细胞单纯性增生：肝细胞核大小正常或轻度增大；核仁增大；异染色质增粗；胞浆丰富略呈嗜碱性；肝细胞索仍为单行肝细胞组成，但排列紧密，多呈灶性分布(图2)。

III 级肝细胞单纯性增生：肝细胞大小不一；核增大；核仁增大增多且可红染；胞浆丰富呈嗜碱性或红染如毛玻璃样；肝细胞索排列紧密互相拥挤而扭曲形成结节状(图3)。

在同一肝组织中，不同部位肝细胞单纯性增生的程度可不相同。在观察中以较重的级别为准。在实验过程中第2周肝细胞出现损伤的同时，即出现I级单纯性增生；第4周出现II级单纯性增生；第14周开始出现III级单纯性增生(表1)。

2. 肝细胞异型性增生：这种增生细胞的形态、排列和性质与一般肝细胞有明显不同。根据异型性的程度和性质可以分为两级。

肝细胞异型性增生I级，细胞核特别增大；核仁明显增大红染；染色质粗糙如凝块状；胞浆丰富红染；这些异型性细胞以1~2排细胞组成“索”状结构，这些索与原来的

肝细胞索不相连续而形成明显的结节状团块(图4)，如瘤性结节<sup>(4)</sup>。从形态上这种病变可考虑为癌前病变。

肝细胞异型性增生II级：有两种细胞形态：a. 形态上与I级异型性增生的细胞相似，但核更大，且形状不整呈扭曲、折叠、分叶或伪足样突起；核仁增大增多、红染，有时如玻璃样颗粒；染质粗糙如凝块状；胞浆丰富红染或着色不匀。b. 细胞核与胞浆体积虽无明显增大，但核内染色质粗糙，核仁明显，胞浆高度嗜碱性。这两种异型性增生的细胞排列都很紧密形成团块或索状。这样的团块和索与原来的肝细胞索不相连续且与之成一较大的角度或垂直，并可见推挤或开始浸润周围肝组织的现象。II级异型性增生的这两种病变已具有占位排挤或早期浸润周围组织的性质，形态上可称为癌变或早期癌。

实验动物在第12周开始出现I级异型性增生病变，第14周开始出现II级异型性增生的病灶。在14周以后到30周的实验过程中都可看到II级异型增生的病灶(表1)。

3. 肝细胞癌：肝细胞癌为多发性大小不等结节状癌巢，其直径在0.5~2.0厘米之间，呈灰红色。早期的较小的癌巢在肉眼上不能与III级单纯性增生或异型性增生的结节区别，只能在显微镜下才能辨认。23周以后肉眼即能辨认出较大的癌巢。显微镜下癌组织为索状或腺样排列的癌细胞组成。癌细胞核较一般肝细胞核为大，核仁增大，染色质粗糙、分布不匀。大多数核为椭圆形，少数核或分化不良时核特别增大且不规则。核分裂相有的地区较多，有的地区则很少。癌细胞的胞浆丰富，分化较好时粉染，分化较差时则为嗜碱性。癌细胞索多由3~5排，最多可由20排以上癌细胞组成。索之间直接与毛细血管或血窦相接。腺样结构多为1~2层癌细胞围成腺管，腺管的大小方向

不一，腺管的外侧也直接与毛细血管相接，或可见腺管伸入扩大的血窦中。癌细胞巢周围多无纤维组织增生，而直接与周围的肝组织、或汇管区、或肝硬变的纤维性分隔相接，并推挤或向这些周围组织内浸润。常可见癌细胞团侵入血窦或血管中。根据癌细胞的分化程度，将肝细胞癌分为三级。

肝细胞癌Ⅰ级：癌细胞大小较一致，核较规则，核分裂相较少，胞浆粉染，多由3~10层癌细胞组成索状（图6）或由1~2层癌细胞排成腺样结构。

肝细胞癌Ⅱ级：癌细胞大小相似或轻度不一，核体积大小相似，染色质较粗，核仁粗大，胞浆呈嗜碱性，分裂相较多，癌细胞索宽窄不一，或由10~20排癌细胞排成粗大的索或集团（图7），如为腺样结构则其腺

管多不规则，癌细胞巢内可见大小不一的坏死区。

肝细胞癌Ⅲ级：癌细胞大小极不一致，核大小不一，形状不整，不典型核分裂及瘤巨细胞甚多。癌细胞或散在或成集团，细胞极向紊乱而多无一定的排列（图8）。癌巢中常有大片坏死。常可见癌细胞散在侵入血窦或血管中。

在DEN A引起的50例肝细胞癌中多为Ⅰ级（21例）与Ⅱ级（26例），Ⅲ级者很少（3例）。肝细胞癌的级别与喂DEN A的时间长短无明显关系（表1）。

三、除肝细胞癌外，肝脏内还同时发生其他肿瘤，包括小胆管腺瘤、胆管腺癌、血管瘤、血管内皮肉瘤、纤维肉瘤（表1）。

小胆管腺瘤比较多见。开始时肝内小胆

表1 DEN A引起大白鼠的肝脏病变与肿瘤

喂 DEN A 周 数	动 物 数	肝 纤 维 化	肝 硬 变	肝 细 胞 增 生					肝 细 胞 癌			小胆 管 腺 瘤	胆 管 腺 癌	肝 血 管 瘤	血 管 内 皮 肉 瘤	纤 维 肉 瘤					
				单 纯 性			异 型 性		Ⅰ 级	Ⅱ 级	Ⅲ 级										
				Ⅰ 级	Ⅱ 级	Ⅲ 级	Ⅰ 级	Ⅱ 级													
2	4			2																	
4	8			7	1																
6	8			6	2																
8	12	4		11	1																
10	4	1		2	2																
12	8	5		2	6																
14	4	4		3		1		2		1						1					
16	2	1	1				2	1	1												
18	7	5	2		4		3	1	2	1	1		1	5	1	2					
19	2		2				2	1	1			2	2	2							
20	25	8	17		5		20	6	17	12	8	2	19	2	10	6	1				
21	2		2				2		2	1	1	1	1	1	1						
22	7	1	6				7		7	3	3	2	6	6	6						
23	2		2				2		2	1	1	1	2	2	1						
24	2		2			1		1		1		1	1	1	1						
25	2		2				2		2	1	3	1	1	1	1	3					
26	4		4				4		4	1	3	3	3	3							
27	1		1				1		1		1					1	1				
28	1		1				1		1		1					1	1				
30	7		7				7		7	3	4	4	6	1	1	1					
总 计	112	29	49	30	25	55	13	49	21	26	3	46	4	27	7	1					

管增生扩大，以后即形成小胆管腺瘤；小胆管腺瘤的大小相差很大，最小时只能在显微镜下看到，称之为小胆管的小错构瘤 (Cholangiolar microhamartoma)，大时如囊腺瘤 (图 9)，可分布全肝，使肝脏有如多囊肝。小胆管增生很早即可看到 (8 周)，18 周以后大多数动物陆续发生小胆管腺瘤。

胆管腺瘤在本实验中很少，只观察到 4 例，最早 1 例在第 18 周出现。

在实验的早期肝细胞坏死区中，有的地方肝窦扩大，窦内皮细胞增生，逐渐形成一片扩大的海绵窦状结构，可称之为肝海绵状血管瘤 (图 10)，也有称之为肝紫斑病 (Pelliosis hepatis) 者。这种病变在第 12 周时即有少数动物发生，18 周以后逐渐增多，且为多发性，分布于全肝，有时增生的肝细胞索或肝细胞癌与血管瘤混杂在一起，常见肝细胞索或癌细胞集团呈乳头状突入血管瘤的血窦中。

血管内皮肉瘤在本实验中共观察到 6 例。其瘤细胞分化甚差，常为大小不一的多边形细胞，异型核甚多。瘤细胞常围成不规则的腺泡状，细胞核多位于细胞的顶端。其分化最差时细胞的形态与排列极不规则，呈梭形或不规则形且无一定的排列。血管内皮肉瘤附近的肝窦或血管中常见大小不一的瘤栓。

纤维肉瘤在本实验中只观察到 1 例 (喂 DENA 20 周)。

## 讨 论

很多亚硝胺化合物是致癌物质。如二甲基亚硝胺、二乙基亚硝胺等在动物实验中可以引起肝、肺、肾、前胃、食道等多种肿瘤。二乙基亚硝胺在大鼠和小鼠引起的肝脏肿瘤多数是上皮性肿瘤，如腺瘤、腺癌或肝细胞癌；少数是肉瘤，如血管内皮肉瘤等<sup>(5)</sup>，在狗肝脏引起的肿瘤则以间叶性的肿瘤略

多，如血管瘤、血管内皮肉瘤、平滑肌瘤、平滑肉瘤、纤维瘤、纤维肉瘤等<sup>(6)</sup>。这可能是由于不同种动物的差异。在本组实验中，用二乙基亚硝胺喂饲大白鼠所引起的肿瘤也是以上皮性肿瘤为多，其中大多数是肝细胞癌。

本实验中 DENA 的用量较小，由 DENA 毒性所引起的肝细胞退行性变与坏死并不严重。但是由于长期喂 DENA 使一部分肝细胞受到损伤，另一部分肝细胞则呈代偿性增生，并引起纤维组织增生，使肝脏由纤维化逐渐加重最后形成肝硬变。在 23 周以后所有实验动物都发生结节性肝硬变。这种肝硬变的结节大小相似，直径多在 0.5 厘米以下，很少有由于大片肝组织坏死造成的大片疤痕。

从肝细胞增生性病变到发生肝细胞癌的过程可以分成三个阶段 (表 2)。第一阶段 (2~10 周) 增生的肝细胞和一般肝损伤后代偿修复时的增生相似。显然是由于 DENA 毒性作用使一部分肝细胞退行性变与坏死，而另一部分肝细胞增生以代偿损伤的肝细胞。这一阶段肝细胞的增生性病变和一般再生肝相似。第二阶段 (12~14 周) 为癌变阶段。增生的肝细胞在形态上呈现异型性，逐渐向分化较差的方向发展，细胞索的排列也逐渐由两排肝细胞 (如鱼类或两栖类动物肝组织结构) 变成多排形成走行不整排列紧密的结节状，即具有占位性的瘤性结节。以后又逐渐向周围组织浸润而呈现恶性性质。在形成瘤性结节时为癌前病变，在开始具有恶性性质时为癌变或早期癌。癌变时的异型性细胞有两种形态。一种细胞体积较大，核异型性明显，胞浆嗜酸性或异染；另一种细胞体积无明显增大，核也较规则，但核染色质粗糙，胞浆高度嗜碱性。从这两种异型性细胞都可追索出变成 I 级或 II 级肝细胞癌的过渡形态。这一阶段可能由于 DENA

作用于增生的肝细胞引起增生和组织特异代谢的平衡异常<sup>(3)</sup>，使细胞趋向低分化方向发展而逐渐恶变。第三阶段（16周以后）是肝细胞癌形成阶段。实验动物从16周以后陆续发生肝细胞癌，其中多为Ⅰ级与Ⅱ级，尚保留一部分肝脏的特异功能<sup>(3)</sup>。在第三阶段，肝内一直不断有癌变病灶发生，可能是和一直使用DEN A有关。

表 2 DEN A引起肝细胞增生到发生肝细胞癌的过程

第一阶段 (2~10周)	肝细胞呈单纯性增生，形态上与再生肝相似
第二阶段 (12~14周)	a. 异型性细胞形成瘤性结节(癌前) b. 异型性细胞结节出现早期浸润(癌变)
第三阶段 (16周以后)	陆续出现肝细胞癌，23周以后几乎所有动物都发生肝细胞癌。 肝内同时不断发生新的癌变病灶

本实验中还观察到其他肝肿瘤的发生。其中小胆管腺瘤的发生率较高，共46例；胆管腺癌很少，只有4例；间叶性肿瘤相对较少，其中多为海绵状血管瘤，共27例；而恶性的血管内皮肉瘤（7例）和纤维肉瘤（1例）较少。

## 摘要

1. 本实验用DEN A诱发大白鼠肝（细胞）癌为动物模型，探讨癌变过程中肝脏的病理形态与某些酶活性的变化，及其与肝细胞癌变的关系。本文只报告病理形态的观察结果。

2. 长期灌喂DEN A，使部分肝细胞长期受到损伤，导致另一部分肝细胞和纤维组织增生，最后形成肝硬变。

3. 从肝细胞增生到发生肝细胞癌的过程可分为三个阶段：第一阶段（喂DEN A 10

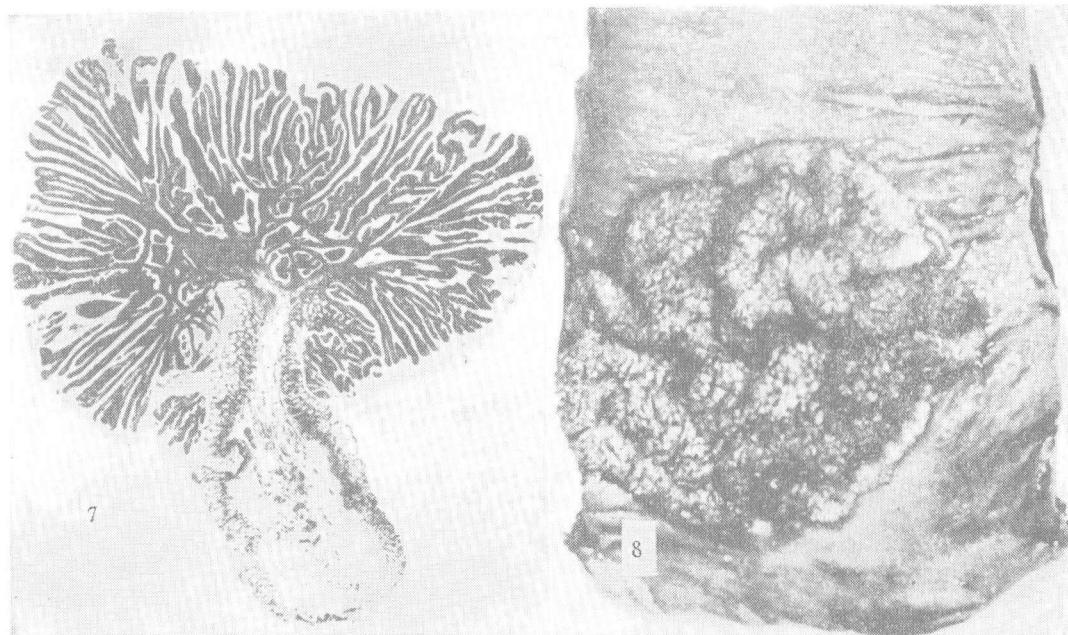
周以前）肝细胞呈单纯性增生无恶性表现，形态上和再生肝相似；第二阶段（12~14周）为癌变阶段，可能是由于DEN A作用于增生细胞，破坏了肝内增生与组织特异代谢的正常平衡，使增生的细胞呈现异型性并向低分化方向发展而癌变；第三阶段（16周以后至30周）陆续发生肝细胞癌，同时仍不断发生新的癌变病灶。本实验所引起的肝细胞癌多为分化Ⅰ级和Ⅱ级的。分化Ⅲ级的很少。

4. 肝内同时发生的小胆管肿瘤亦多，其中绝大多数为良性的小胆管腺瘤，恶性的腺癌甚少。间叶组织的肿瘤相对较少，其中多系海绵状血管瘤，恶性的血管内皮肉瘤和纤维肉瘤较少。（图见84页）

## 参考文献

1. 李士谔，于树玉，谭润生，严复：大鼠肝酶活性的影响，生物化学与生物物理学报，3:256，1963。
2. 李士谔，赵德臻，张慧影，于树玉：甲基胆蒽诱发小白鼠皮肤癌过程中某些酶活性和巯基含量的变化，生物化学与生物物理学报，2:163，1962。
3. 李士谔等：癌变原理的研究Ⅰ，二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌及发育过程中肝细胞增生和组织特异性酶活性的变化及其相互关系，生物化学与生物物理学报 9:113, 1977.
4. Meeting Report (Squire, R. A. & Levitt): Report of Workshop on Classification of Specific Hepatocellular Lesions In Rats, Cancer Res. 35:3214, 1975.
5. Takayama, S. & Oota, K.: Induction of Malignant Tumor in Various Strain of Mice by Oral Administration of n-nitrosodimethylamine & n-nitrosodiethylamine, Gann, 56: 189, 1965.
6. Kirao, K. et al: Primary Neoplasma in Dog liver Induced by diethylnitrosoamine, Cancer Res. 34:1870, 1974.

## 大肠腺瘤和息肉(附图)



- 图 1 儿童息肉：腺管排列稀疏，间质较多，有慢性炎症，左上方还有淋巴组织增生，左侧的腺管较小，细胞为柱形，含粘液；右侧的腺管扩张，细胞成扁形。
- 图 2 色斑息肉病息肉：息肉的结构与正常大肠粘膜不同，粘膜肌及长入息肉体，形成很多间隔，但细胞形态与正常大肠粘膜细胞一样，所以在病理学亦称错构瘤。
- 图 3 增生性息肉：为数很多，但远未达满布粘膜的程度，息肉的大小一致，直径约 0.5 厘米，表面无沟纹。
- 图 4 有蒂的腺瘤：瘤体直径不到 2 厘米，表面已有深沟纹，蒂粗。
- 图 5 早期的小腺瘤：腺瘤上皮细胞染色较周围大肠粘膜深很多，腺管排列较致密。
- 图 6 腺瘤的高倍镜观察：细胞细长，排列显拥挤，杯状细胞显著减少，细胞核较大，深染，且排列略不规则。
- 图 7 乳头状腺瘤：乳头状的结构清楚，细胞的细微结构虽不可见，但明显较蒂部上皮细胞染色深。
- 图 8 绒毛状腺瘤：表面扁平，有数不清的沟纹。

## 二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌过程中的病理形态观察(附图)

