

# 异常黑胆质型肝癌病证模型肝脏形态学研究

王延蛟<sup>1</sup>, 哈木拉提·吾甫尔<sup>2</sup>, 依马木·买买提依明<sup>1</sup>, 热斯拉特·艾力木<sup>1</sup>, 阿尤甫江·阿布都热依木<sup>2</sup>, 斯坎德尔·白克力<sup>1</sup>

1. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011

2. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011

**摘要** 为探讨异常黑胆质体液对异常黑胆质型肝癌病证模型的影响, 在异常黑胆质载体大鼠模型基础上用二乙基亚硝胺(DEN)诱导建立维吾尔医异常黑胆质型肝癌病证模型大鼠, 并对大鼠第11、15、20周时肝脏的外观、病理变化等进行动态观察。20周后, 异常黑胆质病证模型组和模型对照组均发生癌变, 前者成癌率(100%)明显高于后者(72%) ( $P < 0.01$ )。总之, 在异常黑胆质载体大鼠模型的基础上, 用DEN诱导的异常黑胆质型肝癌病证模型肝癌的发生过程中, 异常黑胆质体液具有促进和加快肝脏病变的作用。本研究成功建立了异常黑胆质并DEN诱导的肝癌病证大鼠模型。

**关键词** 维吾尔医; 异常黑胆质; 二乙基亚硝胺; 肝癌

**中图分类号** R256.4

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.14.012

## A Rat Model of Hepatocarcinoma Carrying Abnormal Savda and Its Morphological Study

WANG Yanjiao<sup>1</sup>, UPUR Halmurat<sup>2</sup>, MAMATIMIN Imam<sup>1</sup>, HELIM Resalat<sup>1</sup>, ABDURIYIM Ayupjan<sup>2</sup>, BAKRI Iskandar<sup>1</sup>

1. College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

**Abstract** The effect of abnormal savda on the initiation and development of hepatocarcinoma was studied by establishing a rat model of hepatocarcinoma carrying abnormal savda. A rat model with abnormal savda disease was first established, and diethylnitrosamine (DEN) was used to further establish a model of hepatocarcinoma carrying abnormal savda under Uighur medicine treatment. The morphology and pathological changes of the liver were observed at the 11th, 15th and 20th week. After the 20th week, cancerization was induced both in the experimental group (hepatocarcinoma with abnormal savda) and the model control group (without abnormal savda syndrome but DEN treatment), but the pathological changes of the liver surface in the experimental group appeared faster than those in the model control group, and the incidence of hepatocellular carcinoma (100%) of the former was significantly higher than that of the latter (72%) ( $P < 0.01$ ). These findings indicate that abnormal savda hilit facilitates transformation of hepatocyte to hepatocellular carcinoma.

**Keywords** Uighur medicine; abnormal savda hilit; DEN; hepatocarcinoma

收稿日期: 2013-12-16; 修回日期: 2014-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(81160545)

作者简介: 王延蛟, 副教授, 研究方向为维吾尔医异常黑胆质型肝癌发病的分子机制, 电子信箱: dss-02458@163.com; 斯坎德尔·白克力(通信作者), 教授, 研究方向为维吾尔医药对消化系统肿瘤治疗作用的机制, 电子信箱: ikdbakri@163.com, 13999837241

引用格式: 王延蛟, 哈木拉提·吾甫尔, 依马木·买买提依明, 等. 异常黑胆质型肝癌病证模型肝脏形态学研究[J]. 科技导报, 2014, 32(14): 74-78.

肝癌的发病率在全世界以东亚、东南亚和非洲最高<sup>[12]</sup>。从世界范围来看,肝癌是男性的第5大肿瘤(女性为第7),总患者数每年74.8万<sup>[1]</sup>,其中约有50%来自中国,高于世界平均发病率的2倍。在中国,肝癌的死亡率与发病率在恶性肿瘤中均排第2位<sup>[9]</sup>。一般认为,人类肝癌的发生是由肝细胞炎症坏死、增生、纤维化、肝硬化、最终发展为肝癌的过程,此过程常常能发现异型增生结节或早期肝细胞癌,提示深入认识这类病变对于提高肝癌或癌前病变的早期检出以及预测病人的预后均有重要意义。同时,肝癌和其他恶性肿瘤一样,其发生发展是多因素协同的复杂过程。寻找对肝癌发生、发展有促进的因素必然有助于研究肝癌发生及发展的机制。由于采用人体材料全面研究病变进程受到种种限制,实验性动物模型的应用成了研究者的必然选择。二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌模型能较好地模拟人肝癌的自然病理过程、制作方法相对简单、诱发成功率较高,被广泛应用于肝癌的研究。维吾尔族医学认为异常黑胆质证与肿瘤、高血压、糖尿病和哮喘等复杂性疾病的发生、发展密切相关<sup>[4]</sup>,在维吾尔族恶性肿瘤的分型中,可分为异常黑胆质型肿瘤和非异常黑胆质型肿瘤,异常黑胆质型最为常见<sup>[5]</sup>,异常黑胆质型肿瘤患者较非异常黑胆质型肿瘤患者(异常胆液质、异常黏液质和异常血液质型)严重。本研究以维吾尔族医学理论为指导,在建立大鼠异常黑胆质证载体动物模型的基础上用DEN诱导20周,进一步建立异常黑胆质型肝癌病证模型,采用苏木素-伊红(HE)染色光学显微镜、电镜等方法观察,探讨异常黑胆质体液对异常黑胆质型肝癌病证模型肝脏形态学改变的影响,从而为异常黑胆质型肝癌的预防、治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

Wistar大鼠135只,清洁级,雄性,体重(150±30)g,由新疆医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(新)20032001。

### 1.2 仪器设备

RQH-350型人工气候箱,JXDT-1型小鼠跳台仪器(上海精宏实验设备有限公司),BS-110型电子天平(北京赛多科斯

天平有限公司),低温超速离心机(美国Beckman公司)。JEM100CX II透射电子显微镜(德国LEIKA公司)。

### 1.3 动物分组

稳定饲养3 d后,分为实验组和对照组。

1) 实验组。按照文献[5],将实验动物置于适宜的喂养环境。采用干寒饲养环境(温度(6±1)℃,相对湿度25%~32.8%)、干寒属性饲料、间断足底电刺激(第1周,30 min/次,35 V,1次/d;第2周,35 min/次,40 V,1次/d;第3周,45 min/次,45 V,1次/d)、制动(第1周,45 min/次,1次/d;第2周,60 min/次,1次/d;第3周,90 min/次,1次/d)、强迫游泳(水温(20±5)℃,1次/d,5 min/次)等多因素复合作用3周,建立维吾尔族医学异常黑胆质证载体大鼠模型,进一步建立异常黑胆质型肝癌病证模型组(45只,即病证模型组)。用灭菌食用水配制浓度0.1 mg/mL的DEN溶液,自由饮用,每天更换1次,连续饮用20周停药。

2) 对照组。在室温(25±3℃)及相对湿度60%~80%条件下用普通饲料饲养,随机饮食水,未受任何刺激。再分为:(1) 正常对照组(45只),整个实验过程中均饮用灭菌食用水。(2) 模型对照组(45只),用灭菌食用水配制浓度0.1 mg/mL的DEN溶液,自由饮用,每天更换1次,连续饮用20周停药。

### 1.4 样品制备

各组动物分别于11、15、20周后,在麻醉状态下颈椎脱臼处死(每个时间点处死45只),迅速取出肝脏组织固定于10%的甲醛溶液中,经5 d固定后取材、石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察。另取1 cm<sup>3</sup>大小肝组织块,以3%戊二醛固定,待做电镜观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 肝脏大体观察结果

第20周时,模型对照组的肝脏瘤结节呈球形或分叶状,灰白色质较软,切面无出血、坏死,与周围组织界限清楚,不合并或合并轻度肝硬化;异常黑胆质病证模型组肝脏细胞高度水肿,瘤结节向表面隆起导致肝细胞表面凹凸不平,正常大鼠肝脏柔软、红润,被膜光滑(图1)。



(a) 模型对照组

(b) 异常黑胆质病证模型组

(c) 正常对照组

图1 DEN诱导第20周时肝脏观察

Fig. 1 Liver surface treated by DEN at the 20th week

## 2.2 肝脏病理观察结果

第20周时,模型对照组的肝细胞不典型增生明显,肝癌细胞排列成条索状或团块状,并向周围正常肝细胞浸润生长,部分肝癌结节可见出血坏死及炎细胞浸润,组织学类型为肝细胞癌。异常黑胆质病证模型组可见癌细胞异型性明

显,胞核增大,胞质少,可见较多畸形的单核、多核瘤巨细胞和核分裂相,组织学类型为肝细胞癌或混合性肝癌(图2)。

正常组大鼠的肝组织结构完整、清晰,肝小叶结构正常,肝组织小叶结构正常,肝血窦呈条索状排列,未见水肿、纤维间隔、坏死肝细胞。

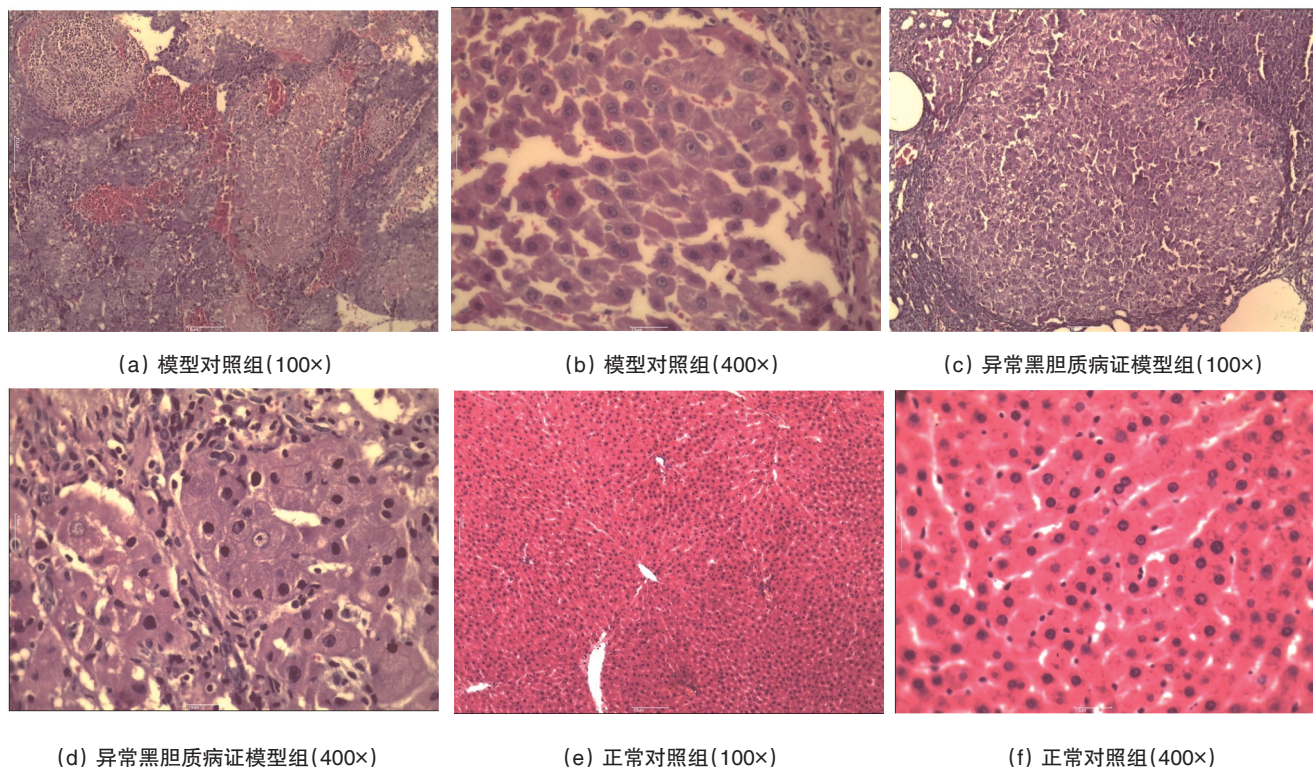


图2 DEN诱导第20周时肝脏病理变化

Fig. 2 Pathological changes of the liver treated by DEN at the 20th week

## 2.3 肝脏电镜观察结果

在DEN诱导的第20周末,异常黑胆质病证模型组:细胞形态不规则,连接紧密,具细胞吞噬现象,间歇不清,核浆比例大,线粒体、内质网丰富,细胞核核膜完整,核仁大或数目多,可见核仁边集、核畸变或核内假包涵体形成。模型对照

组:细胞接触松弛,胞质空虚,线粒体肿胀或空泡化,粗面型内质网丰富,核浆比例大,染色质增多,可见核浓缩、碎裂或溶解,核仁缩小或消失(图3)。

正常对照组:线粒体和内质网结构基本正常,毛细血管扩张正常,肝血窦内皮细胞正常,肝细胞矢状面微绒毛丰富。

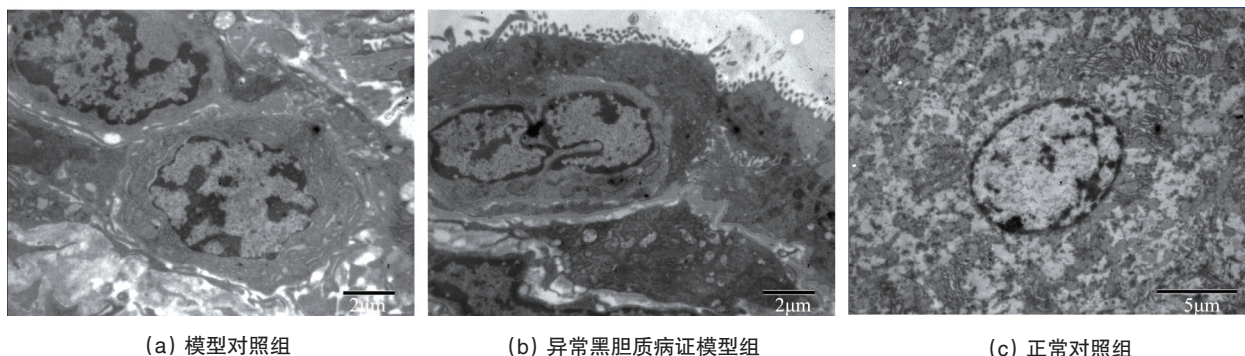


图3 DEN诱导第20周时肝脏超微结构

Fig. 3 Ultrastructural changes of the liver treated by DEN at the 20th week

### 3 讨论

DEN是具有中性和致癌性双重效应的化学毒剂<sup>[6]</sup>,其作为致癌物与人原发性肝癌的发生发展存在着一定的相似性,具有较高的诱癌成功率和良好的专一性,都经过肝细胞损伤、增生、形成假小叶、发生肝硬化、再发展成肝癌等过程,目前已广泛用于原发性肝癌的诱癌模型<sup>[7-10]</sup>。张志敏等<sup>[11]</sup>采取间歇期喂养,即实验组大鼠自由饮用99 μg/mL的DEN溶液,隔天更换1次,连续饮用5周后,改饮普通灭菌食用水3周,再继续饮用99 μg/mL的DEN溶液的方法,经16周成癌率达到96%。程延安等<sup>[12]</sup>利用类似的方法经14周成癌率为86%,推测这种方法可以加强肝细胞对损伤的修复,使基因突变积累加剧,加速了肝癌的形成。

本实验在异常黑胆质证载体动物模型基础上,以小剂量的DEN溶于灭菌食用水中供大鼠自由饮用20周成功诱发了大鼠肝细胞癌和混合细胞癌。肝脏大体形态观察显示,异常黑胆质型肝癌病证模型组和对照肝癌组肝脏表面第11、15、20周都出现结节,但异常黑胆质型肝癌病证模型组结节数量和直径在不同时间点都比对照肝癌组严重,异常黑胆质型肝癌病证模型组肝脏切面20周时出现癌巢并发生坏死。病理形态动态及电镜观察显示,随着诱癌时间的推移,早期肝脏发生中毒性反应,主要表现为肝细胞变性、坏死、中毒再生;之后出现肝纤维化、结节增生、增大及肝硬化;20周时演变成肝癌,异常黑胆质型肝癌病证模型组成癌率为100%,而模型对照组成癌率为72%,与张志敏<sup>[11]</sup>及程延安等<sup>[12]</sup>相比成功率一致。

实验过程中发现,模型组肝脏的病理变化,如肝细胞增生—硬化—癌变等病理变化与文献报道的DEN诱癌过程中形态与病理变化特征一致<sup>[5,13-16]</sup>。经DEN诱导20周后,肝癌对照组肝小叶结构消失,出现典型的假小叶结构、纤维组织明显增生,其中3例表现为肝硬化的特征,其余8例个别视野伴有散在的肝癌灶型病灶,但肝癌细胞的异型性不明显,其中1例为肝硬化合并胆管上皮细胞癌、1例为肝硬化合并肝细胞性肝癌、4例为肝细胞性肝癌、2例为肝细胞性肝癌合并胆管上皮细胞癌;异常黑胆质型肝癌病证模型组12例均为肝细胞性肝癌合并胆管上皮细胞癌,肝小叶完全消失并出现弥漫分布的癌细胞,分化差,癌细胞异型性非常明显,有巨核及多核癌细胞,癌细胞排列成条索状,有些癌组织中有纤维组织分隔。总而言之,异常黑胆质型肝癌病证模型组成癌率严重程度明显高于肝癌对照组,提示异常黑胆质体液在异常黑胆质型肝癌病证动物模型中能促进肝癌的发生和发展,其机制之一可能是异常黑胆质体液引起内分泌免疫紊乱<sup>[17]</sup>,促使肿瘤的发生发展加速。根据维吾尔医学体液论异常体液的分型标准,恶性肿瘤可分为异常黑胆质型、异常黏液质型、异常血液质型和异常黏液质型,在维医分型中,异常黑胆质型肿瘤是最常见的恶性肿瘤。本课题组之前的研究表明肿瘤的快速发生和发展可能与异常黑胆质体液有关<sup>[5,15,18,19]</sup>。张莉等<sup>[20]</sup>

也发现在恶性肿瘤中异常黑胆质型肿瘤占72%,非异常黑胆质型肿瘤(异常黏液质型、异常血液质型和异常黏液质型)占28%。

异常黑胆质体液不仅是病理产物,更是一种致病因素。异常黑胆质病证结合动物模型的研究结果表明<sup>[18,19,21]</sup>,异常黑胆质体液通过促使内分泌免疫的紊乱而加速相关疾病,这些疾病又促进紊乱而加重异常黑胆质证。本研究结果显示,在大鼠发生肝癌的过程中DEN是诱发肝癌的主要原因,异常黑胆质体液起到促进作用。DEN引起肝细胞炎症—硬化—癌变,破坏机体的平衡,加重异常黑胆质体证;异常黑胆质体证又促进肝细胞癌变而形成恶性循环。因此推测, DEN与异常黑胆质体液协同作用是导致异常黑胆质型肝癌病证快速发展的因素之一。

### 4 结论

按照维吾尔医模型建立标准,采用干寒环境、干寒饲料和异常物理刺激等多重因素复合作用建立异常黑胆质证大鼠模型,经DEN进一步诱导建立异常黑胆质型肝癌病证大鼠模型,根据实验结果可得出以下结论:

- 1) 利用DEN成功建立肝癌病证大鼠模型。
- 2) 异常黑胆质体液在异常黑胆质型肝癌病证动物模型中能促进肝癌的发生和发展。

### 参考文献 (References)

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Srivatanakul P, Sriplung H, Deerasamee S. Epidemiology of liver cancer: An over view[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2004, 5(2): 118-125.
- [3] 上海医药.《2012中国肿瘤登记年报》发表[J]. 上海医药, 2013, 34(4): 7. Shanghai Medical & Pharmaceutical Journal. The 2012 annual report of China tumor published[J] Shanghai Medical & Pharmaceutical Journal, 2013, 34(4): 7.
- [4] 哈木拉提·吾甫尔. 维吾尔医气质、体液论及其现代研究[M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2003: 34-37, 131-133. Ufur Halmurat. Modern research of Uighur medicine temperament body fluid theory[M]. Urumqi: Xinjiang Science Technology Publishing Company, 2003: 34-37, 131-133.
- [5] 玉苏甫·吐尔逊, 斯坎德尔·白克力, 哈木拉提·吾甫尔等. 异常黑胆质型肝癌病证模型肝硬化期的肝脏形态学研究[J]. 科技导报, 2010, 28(24): 82-88. Tursun Yusupjan, Bakri Iskandar, Ufur Halmurat, et al. Morphological study on hepatic tissue in hepatocirrhosis phase of hepatocarcinoma carrying abnormal Savda model[J]. Science & Technology Review, 2010, 28(24): 82-88.
- [6] Okubo H, Moriyama M, Tanaka N, et al. Detection of serum and intrahepatic hepatocyte growthfactor during DEN-induced carcinogenesis in the rat[J]. Hepatology Research, 2002, 24(4): 385-394.
- [7] Sengupta D, Chowdhury K D, Sarkar A, et al. Berberine and S allyl cysteine mediated amelioration of DEN + CCl<sub>4</sub> induced hepatocarcinoma [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA): General Subjects, 2013, 1840

- (1): 219-244.
- [8] Leng T, Liu N, Dai Y, et al. Dissection of DEN-induced platelet proteome changes reveals the progressively dys-regulated pathways indicative of hepatocarcinogenesis[J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(12): 6207-6219.
- [9] Nagahara T, Okano J, Fujise Y, et al. Preventive effect of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on DEN-induced hepatocarcinogenesis in rats[J]. Medicine Science Entry for Biomedicine & Pharmacotherapy, 2010, 64(5): 319-326.
- [10] Sehrawat A, Sultana S. Evaluation of possible mechanisms of protective role of Tamarix gallica against DEN initiated and 2-AAF promoted hepatocarcinogenesis in male Wistar rats[J]. Life Sciences, 2006, 79(15): 1456-1465.
- [11] 张志敏, 王阁, 陈川, 等. 改进性DEN诱发大鼠肝癌模型的建立与病理形态学研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1164-1167.  
Zhang Zhimin, Wang Ge, Chen Chuan, et al. Pathologic and morphologic study on modified DEN-induced hepatocarcinoma model in rats[J]. Journal of Third Military Medical University, 2007, 29(12): 1164-1167.
- [12] 程延安, 袁利超, 党双锁, 等. 间断小剂量DEN诱发大鼠肝癌模型研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2005, 12(11): 806-808.  
Cheng Yan'an, Yuan Lichao, Dang Shuangshuo, et al. Research of rat hepatocarcinogenesis model induced by low doses of DEN interruptedly [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2005, 12(11): 806-808.
- [13] 金星林, 千昌石, 杜希臣, 等. 改良法建立大鼠原发性肝癌变模型与病理形态学研究[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(17): 2593-2595.  
Jin Xinglin, Qian Changshi, Du Xichen, et al. Pathologic and morphologic study on modified DEN-induced hepatocarcinoma model in rats[J]. China Journal of Modern Medicine, 2009, 19(17): 2593-2595.
- [14] 吴清洪, 顾为望, 程天明, 等. 二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌模型的建立及其应用[J]. 动物医学进展, 2001, 22(3): 50-51.  
Wu Qinghong, Gu Weiwang, Cheng Tianming, et al. Establishment of a rat model carrying hepatocellular carcinoma by DENA induced and its application[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2001, 22(3): 50-51.
- [15] 玉苏甫·吐尔逊, 哈木拉提·吾甫尔, 阿不都卡德尔·库尔班, 等. 二乙基亚硝胺诱发大鼠肝硬化模型的建立及病理学研究[J]. 新疆医科大学学报, 2011, 34(3): 261-264.  
Tursun Yusup, Upur Halmurat, Kurba Abdukadir, et al. Pathologic study on DEN-induced hepatocirrhosis model in rats[J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2011, 34(3): 261-264.
- [16] 汤靛. DEN 诱导大鼠肝癌模型的代谢组学研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2010.  
Tang Liang. Metabonomic investigations of DEN induced hepatocellular carcinoma in SD rat[D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2010.
- [17] 努尔买买提·艾买提, 哈木拉提·吾甫尔, 阿迪力. 异常黑胆质载体动物模型免疫学本质的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(12): 903-907.  
Ammat Nurmammat, Upur Halmurat, Adili, et al. Study on the abnormal savda syndrome animal model of immunological nature[J]. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2006, 12(12): 903-907.
- [18] 张莉, 哈木拉提·吾甫尔, 胡尔西旦·尼可孜, 等. 异常黑胆质载体动物肿瘤模型的建立及其神经内分泌免疫指标的改变[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(5): 376-381.  
Zhang Li, Upur Hmurat, Niyazi Huexidan, et al. Establishment of abnormal savda syndrome tumor model and the alteration of its neuro-endocrine-immune network[J]. International Journal of Pathology and Clinical Medicine, 2007, 27(5): 376-381.
- [19] 张有辉, 玉苏甫·吐尔逊, 哈木拉提·吾甫尔, 等. 异常黑胆质型肝病证模型肝硬化期免疫、内分泌紊乱状态[J]. 科技导报, 2010, 28(11): 39-41.  
Zhang Youhui, Tursun Yusup, Upur Halmurat, et al. Disordered immune-endocrin network in hepatocirrhosis phase of hepatocarcinoma of carrying abnormal savda model[J]. Science & Technology Review, 2010, 28(11): 39-41.
- [20] 张莉, 哈木拉提·吾甫尔, 玛依努尔·艾力, 等. 恶性肿瘤的维医分型及其神经内分泌免疫网络紊乱研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(2): 119-121.  
Zhang Li, Upur Halmurat, Aili Mayinuer, et al. Type and neuroendocrine immune network disorder of malignant tumor in Uygur Medicine[J]. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2008, 14(2): 119-121.
- [21] 买买提·努尔艾合提, 厉蓓, 董竞成. 维吾尔族传统医学异常黑胆质证的研究概况[J]. 中国民族医药杂志, 2013(2): 44-49.  
Nurahmat Mammad, Li Bei, Dong Jingcheng. Survey of studies on abnormal Savda syndrome in traditional Uighur medicine[J]. Journal of Medicine & Pharmacy of Chinese Minorities, 2013(2): 44-49.

(责任编辑 吴晓丽)

《科技导报》征集“封面文章”

为快速反映中国最新科技研究成果,《科技导报》拟利用刊物最显著位置——封面将最新科研成果第一时间予以突出报道。来稿要求:研究成果具创新性或新颖性;反映该领域中国乃至世界前沿研究水平;可以图片形式予以反映,图片美观、清晰、分辨率超过300dpi;文章篇幅不限,要说明研究的背景、方法、取得的结果,以及结论。在线投稿:www.kjdb.org。