

# 异常黑胆质性肝癌病证模型肝硬化期的肝脏形态学研究

玉苏甫·吐尔逊<sup>1</sup>, 斯坎德尔·白克力<sup>2</sup>, 哈木拉提·吾甫尔<sup>1</sup>, 阿不都卡德尔·库尔班<sup>3</sup>, 阿布力孜·阿卜杜扎依尔<sup>3</sup>, 阿地里江·阿布力米提<sup>4</sup>

1. 新疆医科大学维吾尔医学系, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011
3. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011
4. 新疆医科大学国际教育学院, 乌鲁木齐 830011

**摘要** 为了探讨异常黑胆质体液对异常黑胆质性肝癌病证模型肝硬化期的影响,在异常黑胆质载体大鼠模型的基础上,用二乙基亚硝胺(DEN)诱发建立维吾尔医异常黑胆质性肝癌病证模型大鼠发生肝硬化,对大鼠第5、7、9、11周时肝脏的外观、病理变化和超微结构进行动态观察。结果表明,模型对照组和异常黑胆质病证模型组均经过肝细胞损伤、肝细胞增生、肝硬化等改变;但异常黑胆质病证模型组大鼠肝脏外观的变化明显快于模型对照组;在同一时间,异常黑胆质病证模型组肝细胞水肿程度、不典型增生、假小叶的形成等病理表现和糖原、线粒体减少等超微结构变化均较模型对照组严重。由此可以得出,在异常黑胆质载体大鼠模型的基础上,用DEN诱导的异常黑胆质性肝癌病证模型肝脏病变的发生过程中异常黑胆质体液可能具有促进和加快肝细胞坏死,肝细胞增生灶,肝细胞增生结节,肝硬化,直至肝细胞癌过程的作用,而这一过程接近人类肝癌的发病特点和过程。表明异常黑胆质性肝癌病证模型肝硬化期的建立具有一定的可行性。

**关键词** 维吾尔医学;异常黑胆质;形态学;二乙基亚硝胺

**中图分类号** R256.4

**文献标识码** A

**文章编号** 1000-7857(2010)24-0082-07

## Morphological Study on Hepatic Tissue in Hepatocirrhosis Phase of Hepatocarcinoma Carrying Abnormal Savda Model

TURSUN Yusupjan<sup>1</sup>, BAKRI Iskandar<sup>2</sup>, UPUR Halmurat<sup>1</sup>, KURBAN Abdukadir<sup>3</sup>, ABDUZAYIR Abliz<sup>3</sup>, ABULIMITI Adilijiang<sup>4</sup>

1. Department of Uighur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. College of Basic Medical, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
3. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
4. College of International Education, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

**Abstract** The effect of abnormal savda on the inducing and developing process of hepatocirrhosis phase in hepatocarcinoma carrying abnormal savda model is studied under the direction of Uighur medicine, establishing the abnormal savda disease rat model serving as a base, using DEN further to establish hepatocarcinoma carrying abnormal savda disease rat model till hepatocirrhosis occurs. The surface of the liver and its pathological and ultrastructural changes in the 5th, 7th, 9th, 11th weeks were dynamically observed, respectively. The results show that both in the model control group and the abnormal savda syndrome model group there is the pathological changing process of hepatotoxic lesion, hepatic proliferation, hepatocirrhosis, but the pathological changes of the liver surface in the abnormal savda syndrome model group is faster than those in the model control group. At the same time point, the dropsical level of liver cell, typeless hyperplasia,

收稿日期: 2010-04-21; 修回日期: 2010-11-08

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(30525023)

作者简介: 玉苏甫·吐尔逊, 硕士研究生, 研究方向为中西医病证结合的研究, 电子信箱: yusupjan210@163.com; 阿地里江·阿布力米提(通信作者), 讲师, 研究方向为维医病证结合动物模型的研究, 电子信箱: adilijiang1980@yahoo.com.cn

the fake foliole level in liver, the ultrastructural changes of decreasing heparin and chondriosome in liver cells in abnormal savda syndrome model group exceed those in the model control group. These findings indicate that in the process of establishing abnormal savda disease rat model serving as a base, using DEN further to establish hepatocarcinoma carrying abnormal savda disease rat model, the abnormal savda hilit accelerates the inducing and developing process of hepatocyte to hepatic cellular proliferation andU to hepatocellular carcinoma and this process is similar to the process of human hepatocarcinoma. It is also stable and reliable.

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

## 0 引言

肝癌是中国常见恶性肿瘤之一,其发生机制尚待阐明。全世界每年发病不少于100万新患者,是最常见的人类致死性恶性肿瘤之一,位居全球癌症发病率的第5位,病死率的第3位,5年生存率在4.5%以下,远低于其他恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。目前一般认为,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。采用人体材料全面研究癌变进程受种种限制,影响了对肝癌发生发展进程的深入研究,所以实验性动物模型的应用成了研究者的必然选择。而其中因诱发性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。异常黑胆质证是肿瘤、高血压、糖尿病和哮喘等复杂性疾病发生、发展的主要原因,在维吾尔恶性肿瘤的分型中,异常黑胆质型最为常见。本课题组以往的研究在异常黑胆质证动物模型的基础上,以S180肉瘤为肿瘤细胞株,先形成小鼠腹水瘤,然后将腹水中的肿瘤细胞移植到小鼠的皮下,成功建立了异常黑胆质载体肿瘤移植性动物模型,即病证结合模型<sup>[2]</sup>。本研究以维吾尔医学理论为指导,在建立异常黑胆质载体大鼠模型的基础上,用二乙基亚硝胺(DEN)诱发建立维吾尔医异常黑胆质性肝癌病证模型大鼠发生肝硬化,探讨异常黑胆质液体对异常黑胆质性肝癌病证模型肝脏病变发生、发展的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 干寒属性饲料的制备

在普通鼠饲料中按每千克7:3的比例加入芫荽子和大麦(两者等比例混合),制成颗粒状干饲料,委托新疆维吾尔自治区医学试验动物中心加工。

### 1.2 动物分组及喂养

选取雄性Wistar大鼠140只,体重(150±30)g,稳定饲养3d后,分成以下处理:

1) 实验组:70只。按照文献[3]、[4]和维吾尔医学异常体液与环境的关系,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30min/次,电压35V,1次/d;第2周35min/次,40V,1次/d;第3周45min/次,45V,1次/d)、制动(第1周45min/次,1次/d;第2周60min/次,1次/d;第3周90min/次,1次/d)、强迫游泳(水温(20±5)℃,1次/d,5min/次)等多因素复合作用3周,建立维吾尔医学异常黑胆质证载体

大鼠模型。3周异常黑胆质证载体大鼠模型成功后处死6只动物并取标本,再分组为:①异常黑胆质证组,29只,整个实验过程中均饮用灭菌食用水。②异常黑胆质病证模型组,35只,用灭菌食用水配制浓度0.1mg/mL的DEN溶液,自由饮用,每天更换1次,连续饮用11周停药。上述两组采用异常黑胆质证造模复合因素第2周强度维持异常黑胆质证。

2) 对照组:70只。在室温下(温度(25±3)℃,相对湿度60%~80%)用普通鼠饲料饲养,随机饮食水,未受任何刺激,饲养3周后处死6只动物并取标本,再分组为:①正常对照组,29只,整个实验过程中均饮用灭菌食用水。②模型对照组,35只,用灭菌食用水配制浓度0.1mg/mL的DEN溶液,自由饮用,每天更换1次,连续饮用11周停药。

### 1.3 样品制备

各组动物分别在DEN诱发的第5、7、9周时麻醉状态下取血后颈椎脱臼处死6只并取组织标本,至11周时在麻醉状态下取血后颈椎脱臼处死所有动物。动物处死后,迅速取肝脏组织固定于10%的甲醛溶液中,经5d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。取体积小小于1mm<sup>3</sup>的肝组织,用4%戊二醛和1%锇酸双固定,丙酮梯度脱水,Epon812环氧树脂包埋,超薄切片,铅铀染色,JEM100CXII透射电镜观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 肝脏大体观察结果

病证模型第5周时,正常对照组和异常黑胆质证组的肝脏表面都呈正常外观,表面光滑、色泽红润但后者色泽明显加深;在第7、9、11周时肝脏表面的变化与第5周时基本相似;模型对照组和异常黑胆质病证模型组的肝脏表面光滑,但颜色暗红、血管丰富(图1)。

病证模型第7周时,模型对照组的肝脏颜色微黄,表面出现多个大小不一的灰白色圆形结节;异常黑胆质病证模型组的肝脏表面尚光滑和未见明显结节,但部分大鼠肝叶表面出现黄色斑点(图2(a))。

第9周时,模型对照组肝脏表面尚光滑、边缘有结节样改变;异常黑胆质病证模型组肝脏表面逐渐粗糙、质地较硬、边缘变钝,有数量、大小不一的灰白色圆形结节(图2(b))。

第11周时,模型对照组的肝脏颜色暗红,有颗粒感和肝脏边缘有结节样改变;异常黑胆质病证模型组肝脏表面粗糙、出现散在黑褐色点斑,可见肝脏表面有出血点(图2(c))。

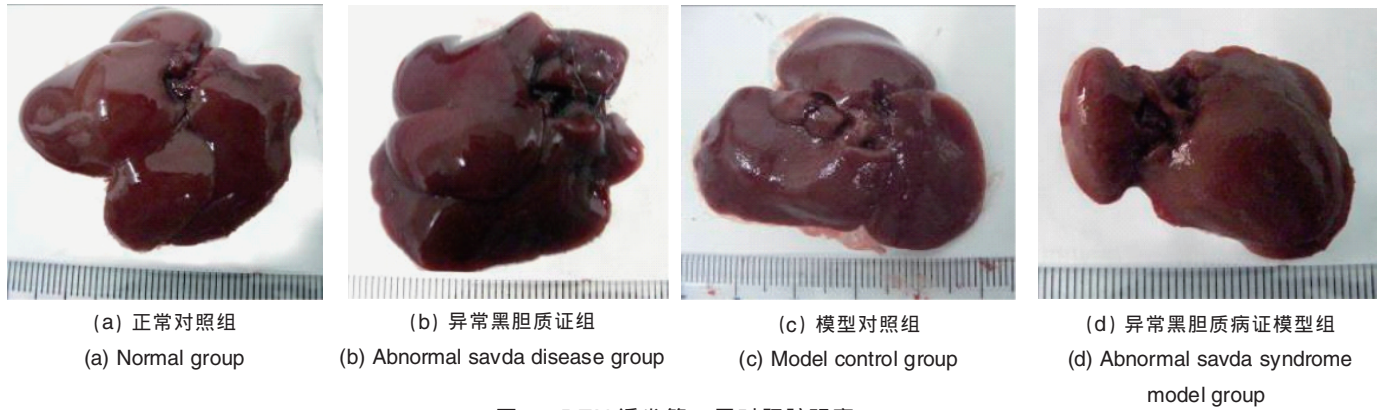


图 1 DEN 诱发第 5 周时肝脏观察

Fig. 1 The 5th week's surface of the hepatic induced by DEN

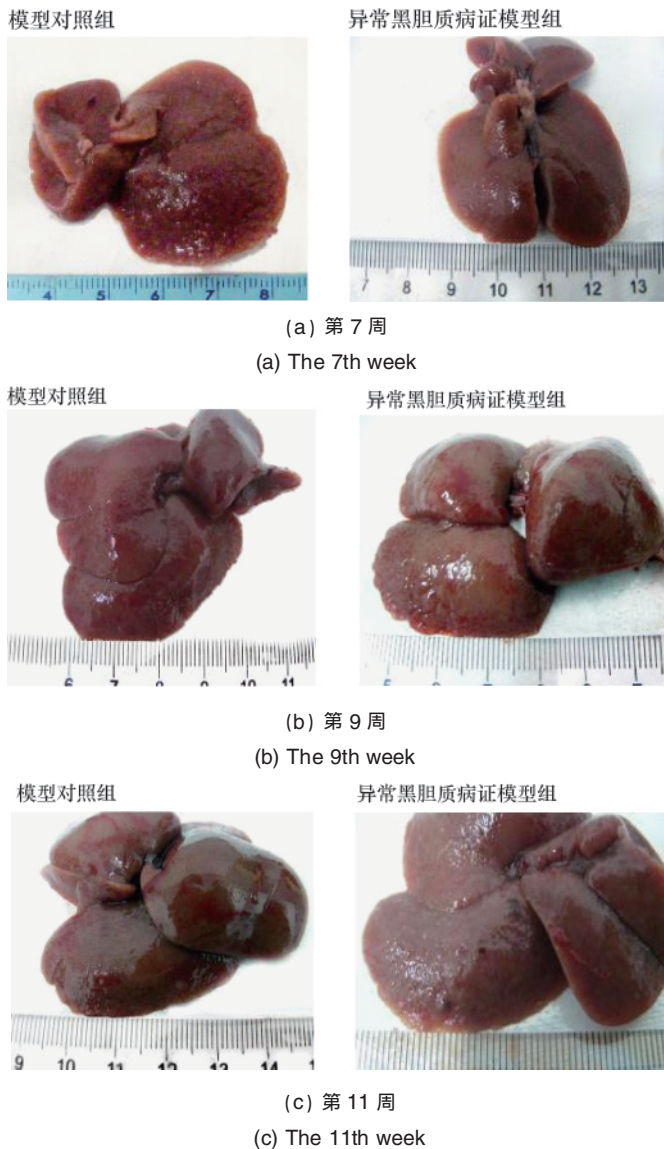


图 2 DEN 诱发的肝脏观察

Fig. 2 Surface of the hepatic induced by DEN

2.2 肝脏病理观察

病证模型第 5 周时, 正常对照组的肝小叶结构清晰, 肝

细胞索排列整齐、肝窦正常、未见水肿和坏死肝细胞, 在第 7、9、11 周时未见明显异常; 异常黑胆质证组的肝小叶结构完整清晰, 门管区有少量炎细胞聚集, 个别肝细胞轻微水肿; 模型对照组的肝小叶结构清晰, 未见纤维组织增生, 部分细胞水肿和细胞肿大; 异常黑胆质证模型组的肝小叶结构完整清晰, 未见纤维组织增生, 肝细胞水肿明显 (图 3)。

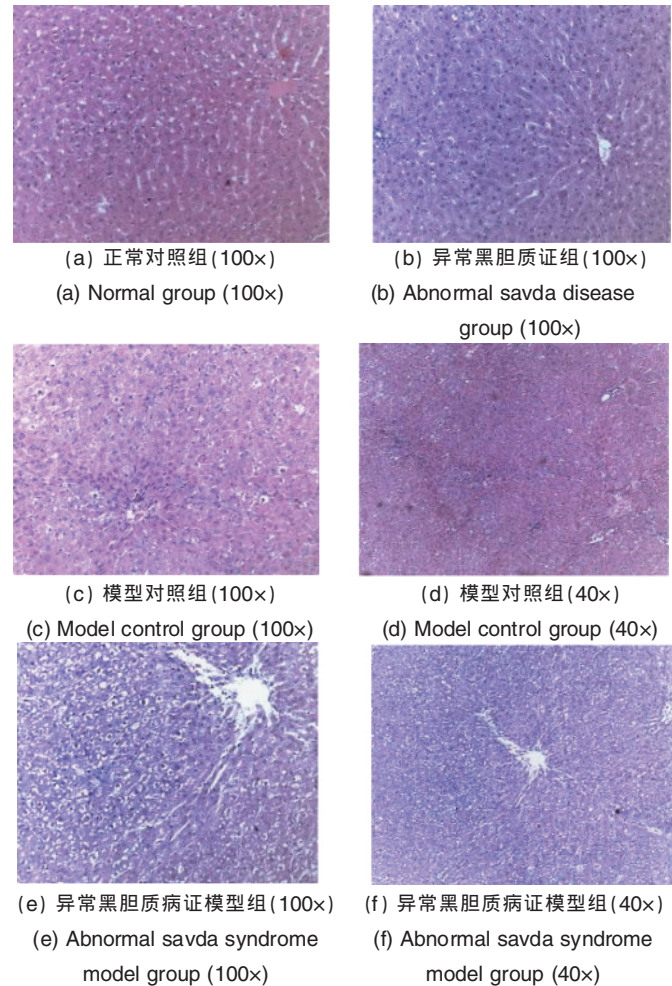


图 3 DEN 诱发的第 5 周时肝脏病理学变化

Fig. 3 The 5th week's pathological changes of the hepatic induced by DEN

第7周时,异常黑胆质证组的肝细胞轻度水肿,偶见点状坏死;模型对照组的部分肝小叶周边界板肝细胞坏死(碎片状坏死),纤维组织轻度增生和肝细胞再生,偶见部分细胞水肿;异常黑胆质病证模型组的肝细胞坏死和纤维组织增生明显、肝细胞再生、假小叶形成且界限清晰等(图4)。

第9周时,异常黑胆质证组与第7周时相比无明显变化;模型对照组的纤维组织增生,肝小叶结构尚完整,可见分割肝小叶为大小不一的假小叶;异常黑胆质病证模型组已形

成典型的假小叶结构,可见双核的再生肝细胞(图5)。

第11周时,异常黑胆质证组的肝细胞水肿;模型对照组的纤维组织增生明显,正常肝小叶结构消失,形成典型的假小叶结构,肝细胞水肿较重;异常黑胆质病证模型组的肝脏可见形成大小不一的肝细胞团,形成假小叶结构,肝脏纤维间隔变宽,其中见较多炎细胞浸润、部分肝细胞水肿、变性、坏死,可见再生肝细胞、部分小胆管内见胆汁淤积,如图6所示。

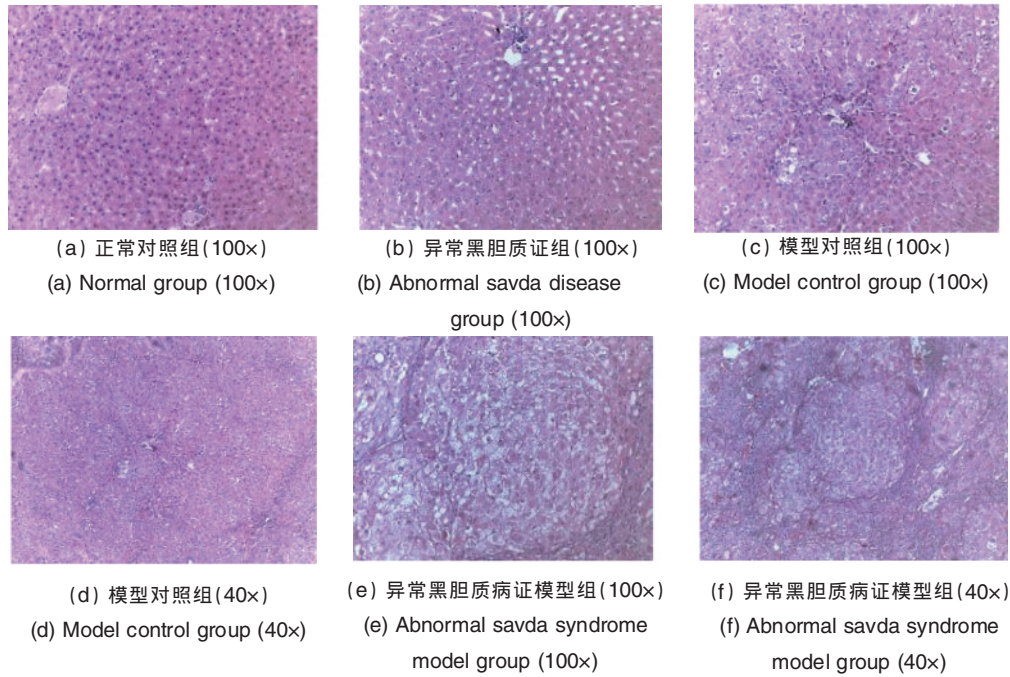


图4 DEN诱发的第7周时肝脏病理学变化

Fig. 4 The 7th week's pathological changes of the hepatic induced by DEN

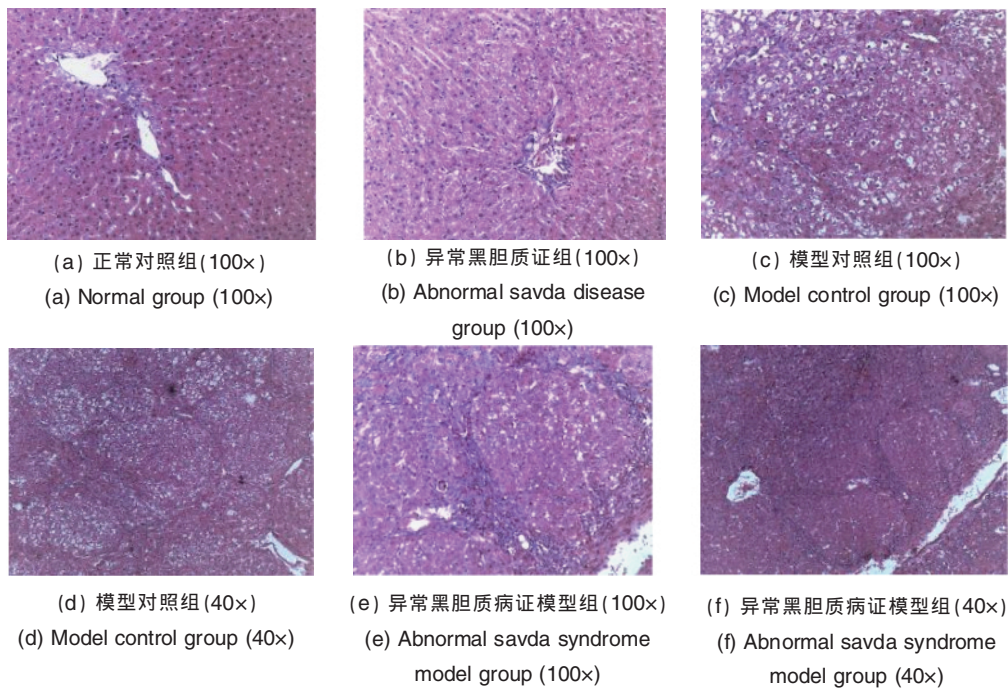


图5 DEN诱发的第9周时的肝脏病理学变化

Fig. 5 The 9th week's pathological changes of the hepatic induced by DEN

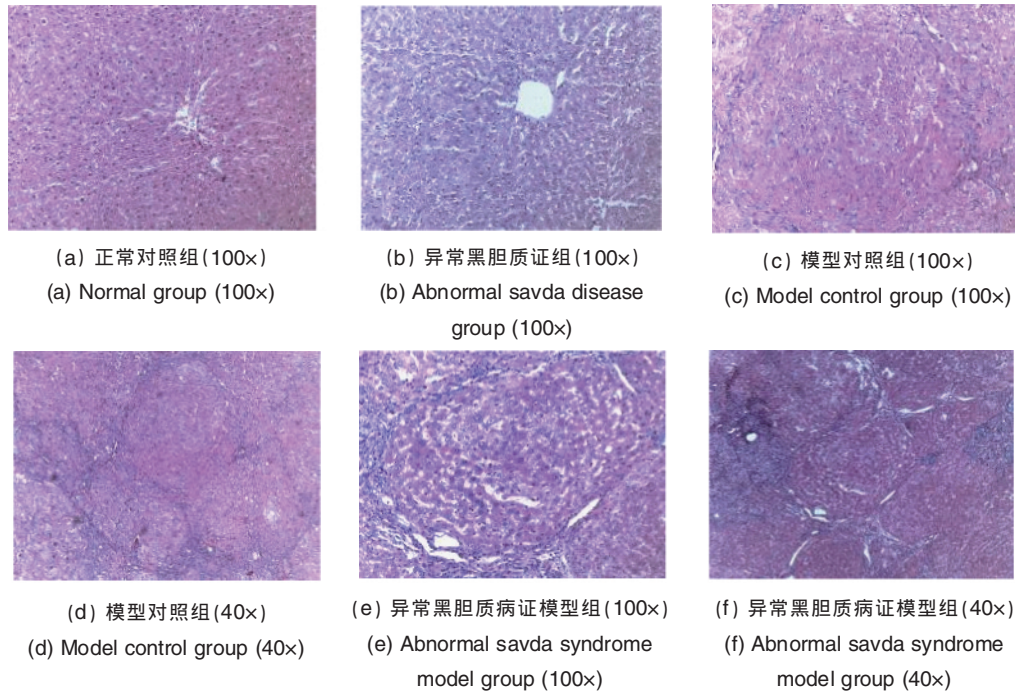


图 6 DEN 诱发的第 11 周时肝脏病理学变化

Fig. 6 The 11th week's pathological changes of the hepatic induced by DEN

2.3 肝脏超微结构观察

病证模型第 5 周时,正常对照组肝细胞核圆,细胞基质均匀一致,细胞器分布均匀,结构未见异常,糖元较丰富,毛细胆管可见短粗的微毛,肝细胞血窦面微绒毛丰富,肝血窦内皮细胞肿胀;在第 7、9、11 周时肝脏结构基本正常;异常黑胆质证组肝细胞轻微肿胀,细胞核圆,异染色质轻微增多,并可见双核,细胞器分布基本一致,线粒体数目轻微增多,结构基本正常,肝糖元轻微减少,在毛细胆管周围可见较多溶酶体,肝细胞内可见少量髓样小体,血窦内皮细胞正常,毛细胆管轻微扩张和肝血窦面微绒毛尚可;模型对照组细胞核表面略显粗糙,异染色质有增加,肝细胞肿胀明显,细胞基质密度降低,并可见细胞内环面内质网扩张,毛细胆管和肝血窦结构基本正常,肝糖元减少明显和线粒体数目尚可;异常黑胆质病证模型组细胞核表面略显粗糙,肝细胞轻微水肿和肝细胞肿胀,肝糖元轻微减少和线粒体数目尚可,细胞器分布不均匀,可见个别干细胞凋亡(图 7)。

第 7 周时,异常黑胆质证组肝细胞髓样小体增多,毛细胆管轻微改变,其余变化与第 5 周时基本相似;模型对照组的细胞核不规则,异染色质增多,线粒体轻微肿胀,数目增多,毛细胆管扩张,细胞间隙增宽和细胞间有胶原纤维增生;异常黑胆质病证模型组肝细胞水肿和肝细胞肿胀,滑面内质网增生,质地增加,肝细胞间隙明显增加,假窦隙形成,线粒体肿胀和数目增多,毛细胆管扩张明显和细胞间有胶原纤维增生(图 8)。

第 9 周时,异常黑胆质证组的肝细胞基质变淡,细胞器分布不均匀,毛细胆管扩张,肝糖元尚可,出现淋巴细胞攻击

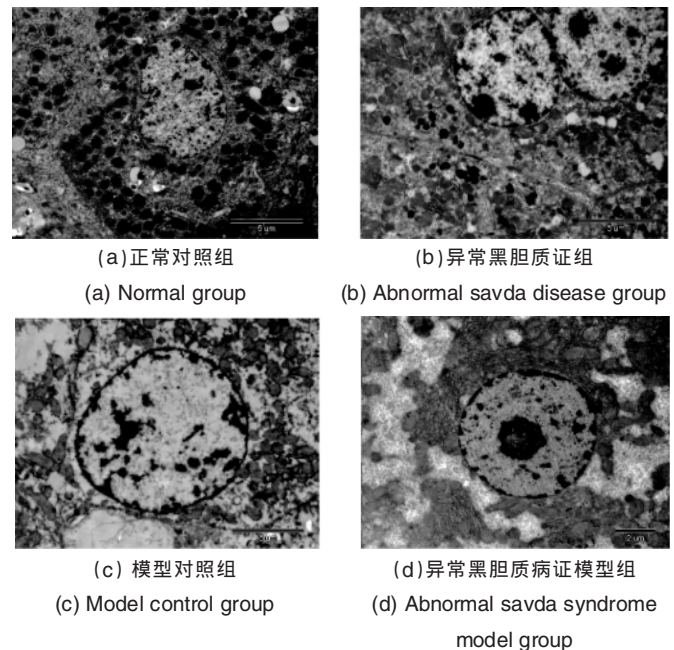


图 7 DEN 诱发的第 5 周时肝脏细胞超微结构变化(9400x)

Fig. 7 The 5th week's ultrastructural changes of the hepatic induced by DEN (9400x)

肝细胞,血窦面微绒毛轻微减少和肝细胞略微肿胀;模型对照组肝细胞血窦面微绒毛减少,细胞器分布不均匀,毛细胆管轻微扩张,可见肝细胞核仁边集,肝细胞内可见少量溶酶体,细胞间隙增宽和微绒毛增多;异常黑胆质病证模型组肝糖原继续减少,出现个别肝细胞坏死,其余变化与第 7 周相似(图 9)。

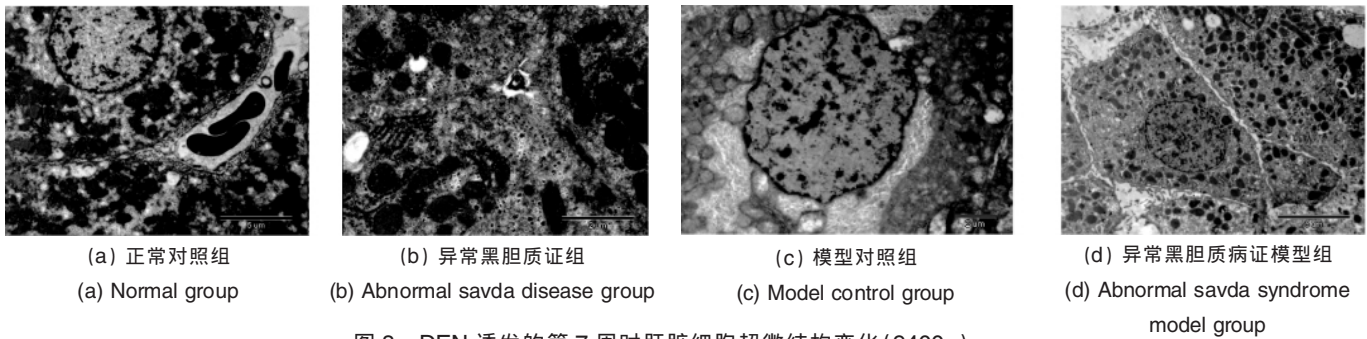


图 8 DEN 诱发的第 7 周时肝脏细胞超微结构变化 (9400×)  
Fig. 8 The 7th week's ultrastructural changes of the hepatic induced by DEN (9400×)

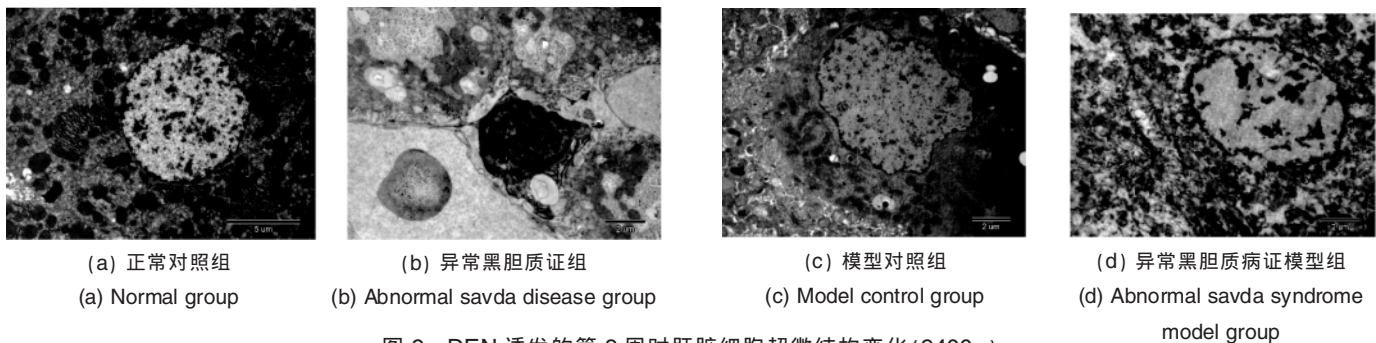


图 9 DEN 诱发的第 9 周时肝脏细胞超微结构变化 (9400×)  
Fig. 9 The 9th week's ultrastructural changes of the hepatic induced by DEN (9400×)

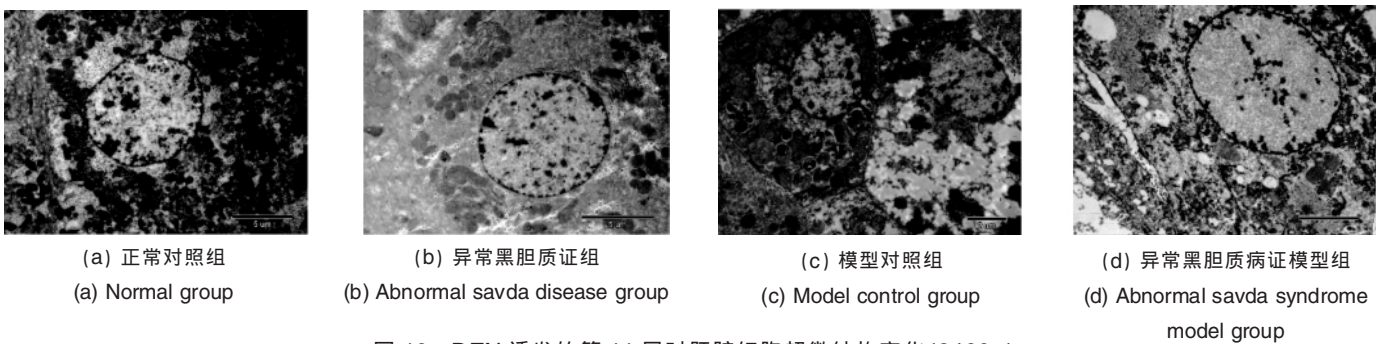


图 10 DEN 诱发的第 11 周时肝脏细胞超微结构变化 (9400×)  
Fig. 10 The 11th week's ultrastructural changes of the hepatic induced by DEN (9400×)

第 11 周时, 异常黑胆质证组的肝细胞内可见溶酶体增多, 其余变化与第 9 周时基本相同。模型对照组在第 9 周基础上肝细胞普遍肿胀和水肿, 毛细胆管扩张, 肝细胞质增加, 核仁边移, 大小形态各异, 肝糖原继续减少; 异常黑胆质病证模型组在第 9 周的基础肝细胞质增加, 线粒体数目增多, 大小形态各异, 肝糖原减少明显 (图 10)。

### 3 讨论

DEN 诱发大鼠肝癌模型是实验性肝癌研究应用最为广泛的动物模型之一。研究表明, DEN 是一种很强的化学致癌剂, 对肝脏有明显的亲和性, 首先会使大鼠肝脏发生中毒性改变, 如变性、坏死、继而出现肝细胞结节性增生和肝硬化, 最后是弥漫性肝癌<sup>[3-4]</sup>。其癌变过程与人类肝癌发生过程非常相似, 诱癌成功率高, 周期短, 简便易行, 病变典型等优点, 有

较好的实用性。有学者在 DEN 诱发实验性肝癌大鼠模型的基础上施加了肝郁脾虚证, 建立了病证结合模型, 该模型提示肝郁脾虚证促进肝癌的发生发展<sup>[5]</sup>。也有学者在湿热证的基础上建立湿热型肝癌病证结合模型, 该模型提示病证结合组大鼠的肝癌组织微血管的病变比正常对照组肝脏组织重<sup>[6]</sup>。张有辉等<sup>[7]</sup>也发现, 在异常黑胆质性肝癌病证模型肝脏病变的发生过程中, DEN 是其发生的主要原因, 异常黑胆质体液起了促进作用。

维吾尔医学的体液学说认为, 体液是人体中的各种营养物质在肝脏中形成的, 能被机体所转化, 为人的生命活动赋予力量的复杂液体的总称, 分为胆液质、血液质、黏液质和黑胆质。正常体液在数量和质量上发生改变, 成为对人体有害的体液时被称为异常体液。其中异常黑胆质体液与肿瘤、高血压、糖尿病和哮喘等复杂性疾病的发生、发展有着极为密

切的关系<sup>⑧</sup>。异常黑胆质证不仅包括一定的病理生理状态,而且代表疾病在发展过程中某一阶段的动态表现。异常黑胆质体液不仅是病理产物,更是一种致病因素。异常黑胆质体液也可能通过影响机体 HPA 轴的活性促进肿瘤的发生、发展;反过来,恶性肿瘤也会使神经内分泌免疫紊乱,加重异常黑胆质证,形成恶性循环<sup>⑨</sup>。

本实验研究表明,在 DEN 诱发的第 5、7、9、11 周,观察肝脏病理结果发现,异常黑胆质病证模型组在同一时间点上比模型对照组肝细胞出现的损伤坏死或异常增生,甚至细胞水肿程度、形成假小叶结构等病理改变明显或快;从超微结构变化来看,异常黑胆质病证模型组的肝细胞核内染色质的变化、细胞器的数量形态、基质密度和肝糖元的变化等均明显较模型对照组快和重;同时核仁边移、细胞器大小形态各异,肝糖原继续减少等变化提示肝细胞有进一步癌变的可能,这与文献[10]~[12]报道相似。其随时间的变化趋势表现为异常黑胆质病证模型组肝脏的病变发展速度明显快于模型对照,提示异常黑胆质体液可能促进异常黑胆质肝癌病证模型肝脏病变发生、发展。

总之,在异常黑胆质载体大鼠模型的基础上,用 DEN 诱导的异常黑胆质肝癌病证模型肝硬化的发生过程中异常黑胆质体液可能具有促进和加快肝脏病变作用,此模型的建立具有一定的可行性。

#### 4 结论

1) 在异常黑胆质载体大鼠模型的基础上,用 DEN 诱导的异常黑胆质肝癌病证模型肝硬化的过程中异常黑胆质体液可能具有促进和加快肝脏病变的发生和发展。

2) 在异常黑胆质载体动物模型的基础上,用 DEN 建立异常黑胆质肝癌病证模型具有一定的可行性。

#### 参考文献 (References)

- [1] 毛一雷, 杜顺达, 桑新亭, 等. 肝细胞癌治疗的现状和展望 [J]. 中国实用外科杂志, 2004, 24(6): 380-381.  
Mao Yilei, Du Shunda, Sang Xinting, et al. Chinese Journal of Practical Surgery, 2004, 24(6): 380-381.

- [2] 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 Huerxidan, et al. International Journal of Pathology and Clinica lMedicine, 2007, 27(5): 376-381.
- [3] Qian Y, Ling C Q. Preventive effect of Ganfujian granule on experimental hepatocarcinoma in rats[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(5): 755-757.
- [4] Okubo H, Moriyama M, Tanaka N, et al. Detection of serum and intrahepatic hepatocyte growth factor during DEN induced carcinogenesis in the rat[J]. Hepatol Res, 2002, 24(4): 385-394.
- [5] 王济, 顾立刚, 王庆国, 等. 肝郁脾虚因素促进 DEN 诱发大鼠实验性肝癌的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(1): 18-20.  
Wang Ji, Gu Ligang, Wang Qingguo, et al. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2003, 10(1): 18-20.
- [6] 施京红, 刘德传, 吴仕九, 等. 清香散对湿热型肝癌模型大鼠细胞凋亡、肿瘤血管生成的影响[J]. 陕西中医, 2009, 25(1): 84-86.  
Shi Jinghong, Liu Dechuan, Wu Shijiu, et al. Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2009, 25(1): 84-86.
- [7] 张有辉, 玉苏甫·吐尔逊, 哈木拉提·吾甫尔, 等. 异常黑胆质肝癌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): 39-42.  
Zhang Youhui, Tursun Yusup, Upur Halmurat, et al. Science & Technology Review, 2010, 28(11): 39-42.
- [8] 哈木拉提·吾甫尔, 阿不都热依木·玉苏甫. 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.  
Upur Halmurat, Yusup Abdiryim. Theory of mizaj and hilit in Uighur medicine and modern study [M]. Urumqi: Xinjiang Scientific and Technical Publisher, 2003.
- [9] 张莉, 哈木拉提·吾甫尔, 玛依努尔·艾力, 等. 异常黑胆质肿瘤动物模型下丘脑-垂体-肾上腺形态学的改变 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(12): 1581-1586.  
Zhang Li, Upur Halmurat, Ali Mayinuer, et al. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2009, 24(12): 1581-1586.
- [10] Wallace D C. Mitochondrial diseases in man and mouse [J]. Science, 1999, 283(5407): 1482-1488.
- [11] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death[J]. Biochem J, 1999, 341: 233-249.
- [12] Chen Q, Gong B, Almasan A. Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: Evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2000, 7(2): 227-233.

(责任编辑 吴晓丽)

#### ·学术动态·

## “第九届国际可靠性、维修性、安全性会议”征文

中国现场统计研究会将于 2011 年 6 月 12—16 日在贵阳市召开“第九届国际可靠性、维修性、安全性会议”。

征文内容: 可靠性、安全性理论及其应用; 可靠性、安全性管理; 可靠性、维修性、安全性设计和分析; 可靠性试验及验证; 可靠性设计方法和工具; 概率风险评估方法; 高价速应力测验; 加速寿命试验; 贮存可靠性; 故障诊断技术; 软件可靠性; 软件安全性。

摘要截稿日期: 2011 年 1 月 31 日。

联系方式: 北京石龙经济开发区永安路 1 号(102308) 邓周辉; 电话: 15885019114; 传真: 010-60806888; 电子信箱: icrms2011@geu.edu.cn。

会议网站: www.icrms.cn。