

· 博士之窗 ·

## 木通致大鼠肿瘤作用的实验研究

裘 奇<sup>1△</sup> 刘志红<sup>1</sup> 印洪林<sup>2</sup> 周晓军<sup>2</sup> 陈惠萍<sup>1</sup> 黎磊石<sup>1</sup>

**内容提要** 目的:观察木通所致大鼠肿瘤的发生演变过程、生物学行为、病理学及免疫组化特征。方法:用不同剂量木通水煎剂给大鼠灌胃建立急性肾损伤模型,进行组织形态学及免疫组化的动态观察。结果:(1)实验头 3 个月组织形态学未见大鼠发生肿瘤及肾脏发生明显肿瘤样增生改变。(2)实验 6 个月 3 个剂量组肾脏肿瘤样增生发生率均为 100.0%。其中 2 例进行免疫组化研究,波形蛋白(vimentin)、增殖细胞核抗原(PCNA)均表达阳性,平滑肌肌动蛋白(SMA)、p53 均表达阴性。(3)实验 6 个月 3 个剂量组肾脏肿瘤发生率分别为 42.8%、25.0%及 0,包括 4 例肾脏间叶性肿瘤及 1 例肾母细胞瘤。其中 3 例肾脏间叶性肿瘤免疫组化研究显示,vimentin、PCNA、肿瘤细胞均表达阳性。SMA、p53 分化成熟的肿瘤细胞表达阳性。(4)实验 6 个月 3 个剂量组肾外肿瘤发生率分别为 14.3%、12.5%和 12.5%,其中乳腺导管上皮肿瘤、甲状腺滤泡上皮肿瘤和皮肤附件上皮肿瘤各发生 1 例。对照组未见肿瘤发生。结论:大剂量木通具有致大鼠肿瘤作用。其中肾脏肿瘤发生率相对较高,组织学类型以肾脏间叶性肿瘤为主。分化成熟的肾脏间叶性肿瘤伴有 vimentin、SMA、p53 和 PCNA 的阳性表达。肾外肿瘤发生率相对较低。

**关键词** 木通 肿瘤 肿瘤样增生 肾脏间叶性肿瘤 肾母细胞瘤

**Experimental Study on Oncogenicity of Aristolochia Manshuriensis in Rats** QIU Qi, LIU Zhi-hong, YIN Hong-lin, et al *Institute of Nephrology, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing (210002)*

**Objective:** To observe the oncogenetic process, biological behavior, pathological and immunohistochemical features of tumor induced by Aristolochia manshuriensis (AM) in rats. **Methods:** Acute renal injury model was established with AM decoction in different dosages by gastrogavage to observe the histomorphologic and immunohistochemical features dynamically. **Results:** (1) At month 0, 1 and 3, the occurrence of renal tumor or tumor-like proliferation was not observed; (2) At month 6, the occurrence of renal tumor-like proliferation in all the three AM dosage groups (50 g/kg, 30 g/kg and 20 g/kg) was 100.0%. Immunohistochemical examination conducted in 2 rats showed that the short spindle-shaped interstitial cells were expressed positively both by vimentin and proliferative cell nuclear antigen (PCNA), but were shown negative for smooth muscle actin (SMA) and p53; (3) At month 6, the occurrence of renal tumor in the three dosage groups was 42.8%, 25.0% and 0% respectively, including 4 cases of renal mesenchymal tumor and 1 case of nephroblastoma. Immunohistochemical examination conducted in 3 cases of renal mesenchymal tumor showed that the short spindle-shaped tumor cells expressed both by vimentin and PCNA, and SMA and p53 were positive for well-differentiated tumor cells. (4) The occurrence of extrarenal tumor in the three dosage groups was 14.3%, 12.5% and 12.5% respectively, 1 case of mammary duct epithelial tumor, 1 thyroid follicle epithelial tumor and 1 skin appendicular epithelial tumor. No tumor occurred in the control group. **Conclusion:** Large dosage of AM is oncogenic. The occurrence of renal tumor was relatively high, and the histological type is mainly mesenchymal. Vimentin, SMA, PCNA and p53 positive expression was shown for well-differentiated renal mesenchymal tumor. The occurrence of extrarenal tumor is rather low.

**Key words** Aristolochia manshuriensis, tumor, tumor-like proliferation, renal mesenchymal tumor, nephroblastoma

1. 南京大学医学院肾脏病研究所(南京 210002) 2. 南京军区南京总医院病理科

△南京大学医学院博士研究生

木通(*Aristolochia manshuriensis* Kom.), 又称关木通、木通马兜铃, 为马兜铃科(*Aristolochiaceae*)马兜铃属(*Aristolochia*)植物。《中华人民共和国药典》规定关木通的临床用量为 3~6g/d。临床木通中毒患者的服药剂量常超过规定剂量的数倍至 10 倍, 有的甚至达 100~200g, 多数在 1 日内 1 次或两次服下, 导致急性肾功能衰竭及死亡事故。作者先前报道应用中药木通在国内首次建立了大鼠急性肾损伤的动物模型, 初步观察了木通急性肾损伤作用的功能改变和病理学特点<sup>(1)</sup>。鉴于临床上已观察到, 木通急性中毒往往遗留慢性小管间质性损伤, 推测药物成分有可能造成细胞的慢性持续性损害<sup>(2)</sup>。我们利用木通所致大鼠急性肾损伤的动物模型, 动态观察了木通急性肾损伤作用对肾功能和病理学改变的远期影响(另文发表)。在这项研究中, 首次发现木通具有致肿瘤作用, 国内外尚未见报道。本实验对木通所致大鼠肿瘤的发生演变过程、生物学行为、病理学及免疫组化特征进行了研究。

### 材料与方法

1 药物 中药木通购自南京市医药股份有限公司中药材经营部, 经中国药科大学丁林生教授鉴定为马兜铃科植物木通马兜铃(*Aristolochia manshuriensis* Kom.), 俗称关木通。木通水煎剂由本院中药制剂室制备。方法如下: 取木通生药材 2000g, 加 6~8 倍自来水, 浸泡 30min, 加热至沸, 煎煮 30min, 倾出药液, 残渣再加入 4~5 倍自来水, 煎煮 30min, 合并两次药液, 过滤、浓缩后制成 1000ml 水煎剂(相当于 2g 生药/ml) 4℃ 放置备用。

2 动物 清洁级 SD 大鼠(Grade II, Certificate No 99-004) 雌性, 体重 160~180g, 中国科学院上海实验动物中心提供。

3 分组及给药方法 大鼠按体重随机分为 A、B、C、D 4 组。A 组为 40 只, 其余 3 组均为 30 只。前 3 组每天分别灌胃给予 50、30、20g/kg 的木通水煎剂, A、B 组给药 7 天, C 组给药 15 天。D 组为对照组, 给予等量饮用水 15 天。给药期间大鼠自由饮食、饮水。

4 观察项目及检测方法 实验 0、1、3、6 个月各剂量组分别取 6~9 只大鼠, 经氯胺酮麻醉后, 对各组大鼠进行主要器官检查, 并留取组织标本, 进行病理学及免疫组织化学检查。

4.1 组织病理学检查 大鼠组织用 10% 中性福尔马林固定, 经脱水、透明、石蜡包埋、切片后行 HE 染色。

4.2 免疫组织化学检查 石蜡切片用链霉生物

素-过氧化酶(S-P)法进行细胞角蛋白(cytokeratin, CK)、上皮细胞膜抗原(EMA)、波形蛋白(vimentin)、平滑肌肌动蛋白(SMA)、肌球蛋白(myoglobin)、 $\alpha$ -抗胰蛋白酶(AAT)、S-100 蛋白、增殖细胞核抗原(PCNA)和 p53 蛋白免疫酶标。S-P 试剂盒及所用抗体均购自 Maxim Biotech, Inc. (USA)。

5 统计学处理 组间差异采用 *t* 检验。两样本率的比较采用四格表的确切概率法。

### 结 果

1 大鼠组织形态学改变 实验 1、3 个月组织形态学未见大鼠发生肿瘤, 也未见大鼠肾脏发生明显肿瘤样增生改变, 肾脏受损小管周围间质偶见小灶性细胞浸润, 以炎细胞为主。实验 6 个月大鼠发生肾脏肿瘤样增生、肾脏肿瘤和肾外肿瘤。3 个剂量组肾脏肿瘤样增生的发生率均为 100%, 与 D 组比较, 差异均有显著性( $P < 0.01$ )。肾脏肿瘤发生率分别为 42.8% (3/7)、25.0% (2/8) 和 0, 与 D 组比较, 差异亦有显著性( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。其中有 4 例肾脏间叶性肿瘤和 1 例肾母细胞瘤。3 个剂量组肾外肿瘤发生率分别为 14.3% (1/7)、12.5% (1/8) 和 12.5% (1/8), 其中乳腺导管上皮肿瘤、甲状腺滤泡上皮肿瘤和皮肤附件上皮肿瘤各发生 1 例, 与 D 组比较, 差异无显著性( $P > 0.05$ )。3 个剂量组全身性肿瘤发生率分别为 57.2% (4/7)、37.5% (3/8) 和 12.5% (1/8), 与 D 组比较, 差异有显著性( $P < 0.05$ )。D 组大鼠肾脏肿瘤样增生、肾脏肿瘤及肾外肿瘤发生率均为 0。

2 实验 6 个月大鼠肾脏肿瘤样增生及肾脏肿瘤的组织病理学特点

2.1 大鼠肾脏间叶性肿瘤样增生的组织病理学特点 肾脏大体标本可无外观改变, 也可形成肿块。肿块大小不一, 小者直径 2~3mm, 外观可见白色点状颗粒, 切面观可见肿块在皮质或皮髓交界处呈浸润性或囊性生长, 肾脏形态正常。直径大者可达 1.5cm, 外观呈白色或灰白色, 病变多位于肾脏的一极, 病变区域呈膨胀性生长, 体积增大, 表面突起, 肾脏正常形态发生改变。病变区域占整个肾脏的 1/6~1/2 不等。切面色白, 质地均匀, 较正常部位组织硬, 偶见微囊(图 1, 见插页 5)。

光镜下肿瘤样增生轻重不一。轻者肿瘤样增生区域呈灶性分布, 主要位于皮髓交界处。可见分化幼稚的间叶细胞围绕肾小管浸润性生长, 细胞呈短梭形, 胞浆较少, 淡染, 核染色深, 无异形性(图 2, 见插页 5)。重者肿瘤样增生区域呈大片状分布, 间质可见弥漫性

增生的分化较为成熟的短梭形或梭形细胞,胞浆红染或淡染,核染色深,呈长圆形或杆状,围绕于残存的肾小管周围,以残存的肾小管为中心向外生长(图3,见插页5)。间质内纤维组织弥漫性增生、变性,部分间质区域水肿(图4,见插页5)。多数小管萎缩、消失,少数呈囊性扩张,小管上皮细胞变性,管腔内偶见蛋白管型,偶见残存肾小球。病变区域与正常肾组织区域无明显分界。

## 2.2 大鼠肾脏间叶性肿瘤的组织病理学特点

A2、A5、A6、B5号大鼠肿瘤均为肾脏间叶性肿瘤。大体可见肿瘤均位于大鼠肾脏的一极,仍可见残余正常肾脏形态。肿瘤大小分别为 $4.0\text{cm} \times 3.2\text{cm} \times 2.4\text{cm}$ 、 $4.0\text{cm} \times 3.8\text{cm} \times 3.0\text{cm}$ 、 $3.5\text{cm} \times 3.0\text{cm} \times 2.0\text{cm}$ 和 $2.2\text{cm} \times 1.6\text{cm} \times 1.4\text{cm}$ ,其中A5号大鼠肿瘤重达33g。体积较大的肿瘤占据大部分腹腔。切面可见肿瘤无包囊,色灰白,质地软硬不一,可见坏死或出血灶,有的可形成大小不一的囊腔(图5,插页5)。A5号大鼠光镜下可见大片的分化幼稚的短梭形肿瘤细胞呈弥漫性密集排列,细胞小,呈圆形或卵圆形,胞浆少,核膜厚,核深染(图6,见插页5)。肿瘤间质内可见多灶性出血坏死区域。B5号大鼠具有平滑肌肉瘤的组织学特点,光镜下可见大片的形态一致的梭形肿瘤细胞弥漫性分布。肿瘤细胞分化成熟,形成与平滑肌相似,胞浆红染,核染色深,呈长圆形或杆状(图7,见插页5)。肿瘤区域与正常肾组织区域无明显分界。A2、A6号大鼠具有纤维肉瘤的组织学特点。光镜下可见大片的形态一致的梭形肿瘤细胞弥漫性分布。肿瘤细胞形态与成纤维细胞相似,胞浆红染或淡染,核染色深,呈长圆形或杆状,易见核分裂象,异形性明显(图8,见插页5)。部分区域肿瘤细胞分化幼稚,呈弥漫性密集排列,细胞小,呈圆形或卵圆形,胞浆少,核膜厚,核深染。部分肿瘤区域内纤维组织弥漫性增生、变性。

2.3 大鼠肾母细胞瘤组织病理学特点 大体可见肿瘤发生于大鼠右侧肾脏,大小为 $3.7\text{cm} \times 3.5\text{cm} \times 2.4\text{cm}$ ,肿瘤有包囊,外观色灰白,部分区域可见出血坏死。切面囊实性,实性成分质地较硬。囊间组织颜色、质地与囊内成分相仿,周边小部分区域有出血灶。

光镜下肿瘤酷似人肾母细胞瘤的细胞形态(图9,见插页5),主要由两种成分组成。(1)间叶性成分:可见肿瘤细胞排列紧密,呈巢状弥漫性分布,细胞体积小,呈圆形、卵圆形或短梭形,胞浆少,核膜厚,核深染,核分裂象易见。(2)上皮性成分:肿瘤细胞通常排列成管状或小管状结构,位于胚基成分的内部或外周。分

化好的肿瘤细胞呈立方或柱状,排列齐,形成明显的管腔,管腔大小不一,腔内未见分泌物。细胞可见不同程度的异型性和病理性分裂象。未见肾小球样结构。

3 免疫组化研究 木通实验1个月、3个月大鼠肾脏间质浸润细胞的免疫组化研究未发现 vimentin、SMA、PCNA 和 p53 有异常的阳性表达。

木通实验6个月大鼠肾脏间质细胞肿瘤样增生的免疫组化研究表明,vimentin、PCNA:2例大鼠均表达阳性。CK、EMA、SMA、myoglobin、AAT、S-100 蛋白和 p53 均表达阴性。而肾脏间叶性肿瘤的免疫组化研究表明,vimentin、PCNA:3例大鼠均表达阳性。SMA、p53:分化成熟的肿瘤细胞(形态似平滑肌)表达阳性,分化幼稚的肿瘤细胞表达阴性。CK、EMA、myoglobin、AAT、S-100 蛋白均表达阴性。1例大鼠肾母细胞瘤免疫组化研究表明,vimentin、SMA:肿瘤间叶性成分表达阳性。CK:肿瘤上皮性成分表达阳性。EMA、myoglobin、AAT、S-100 蛋白、PCNA 和 p53 均表达阴性。

## 讨 论

实验6个月大鼠发生肿瘤,木通所致大鼠肿瘤的生物学特点(1)肿瘤的发生与木通剂量和观察时间有关。实验1个月、3个月组织形态学未见大鼠发生肿瘤或明显肿瘤样增生。实验6个月时,大鼠发生全身性肿瘤,肾内、肾外肿瘤的发生均呈剂量依赖性。(2)肿瘤发生的年龄倾向。本研究采用6~8周龄雌性大鼠,用中药木通成功诱发出大鼠肾脏间叶性肿瘤(RMT)。以往实验研究表明<sup>(3)</sup>,肾脏间叶性肿瘤主要发生于幼年大鼠(尤其是4周龄的大鼠),但无性别倾向。4月龄以上的大鼠较难诱发RMT,而自发性RMT则非常罕见。(3)肿瘤发生及生长速度很快。实验1个月、3个月肾脏大体标本未见任何形态改变,镜下也未观察到明确的肾脏间质细胞肿瘤样增生。实验6个月肾脏肿瘤样增生及肾脏肿瘤发生率显著升高,最大肾脏肿瘤直径近4.0cm,重达33g。说明肿瘤发生及生长速度很快。以往研究表明<sup>(3)</sup>,RMT生长迅速,通常5个月内肉眼便可见。生长迅速的肿瘤可长得非常大,据报道可重达128g,并有侵犯肾周局部组织和邻近腹壁的倾向。而以硬化的胶原组织为主的纤维瘤样RMT生长速度较为缓慢。(4)肿瘤具有多发性,肾脏肿瘤发生率相对较高,肾外肿瘤发生率相对较低。1962年,Magee和Barnes<sup>(4)</sup>首次报道了用含有50~200ppm二甲基硝胺(DMN)的饲料诱导出大鼠肾脏间叶性肿瘤及上皮性肿瘤、肝细胞癌和肺腺瘤,短期

较大剂量喂养方式较易诱发大鼠肾脏肿瘤,长期较小剂量喂养方式较易诱发大鼠肝脏肿瘤。1983 年, Sunter 等<sup>[5]</sup>用 1,2-二甲基胍诱导超过 90% 大鼠发生肾脏肿瘤,主要为肾脏间叶性肿瘤。双侧肾脏肿瘤多见,且为多发。大鼠同时还发生小肠和结肠肿瘤。(5) 本研究中未见转移性肿瘤。Hard<sup>[3]</sup>观察到 17% 的肿瘤发生肾外侵犯,RMT 的转移通常累及肺脏和肠系膜淋巴结,偶见肝脏转移。RMT 发生转移的机会似乎与肿瘤体积过大及纤维肉瘤区域中梭形细胞结构不良有关。

本研究与 Hard 等<sup>[6,7]</sup>用二甲基硝胺(DMN)所诱导的大鼠肾脏间叶性肿瘤的形态学演变过程较为相似。随着肿瘤样增生范围逐渐扩大,肿瘤样增生区域内可见弥漫性增生的分化,较为成熟的短梭形或梭形细胞分割围绕于残存的肾小管和肾小球周围,直至小管和小球完全萎缩、消失,形成肾脏间叶性肿瘤。肿瘤分化程度不一,肿瘤实质区域与正常肾组织区域无明显分界,提示肿瘤浸润性生长的特性。

木通所致大鼠 RMT 的免疫组化研究表明(1)肿瘤为间叶起源(vimentin 阳性),而非上皮起源(EMA 和 CK 均为阴性)。(2)肾脏间叶性肿瘤 SMA 的表达与肿瘤组织学分化有关:分化幼稚的间叶性肿瘤,SMA 表达阴性;分化成熟的间叶性肿瘤(肿瘤细胞形态类似于平滑肌),SMA 表达阳性或强阳性。(3)p53 的表达与肿瘤组织学分化也有关:分化成熟的间叶性肿瘤(肿瘤细胞形态类似于平滑肌),p53 表达阳性;分化幼稚或分化中等的间叶性肿瘤,p53 表达均为阴性。(4)肿瘤细胞增殖活跃,恶性程度高;3 例肾脏间叶性肿瘤 PCNA 均表达阳性。

目前认为<sup>[3,8]</sup>RMT 是间叶起源的浸润性肿瘤,可由分化幼稚的原始间叶细胞、梭形的成纤维样细胞、平滑肌样细胞、横纹肌样细胞以及肿瘤性的血管组织细胞等多种成分构成,并可以其中任何一种成分为其主要实质成分,构成纤维肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤或血管肉瘤等间叶性肿瘤。由于 RMT 与人类先天性中胚层肾脏肿瘤(congenital mesoblastic nephroma, CMN)的组织学与超微结构特点非常相似,它们已被作为 CMN 的实验动物模型<sup>[9]</sup>。

本研究中发现 1 例大鼠肾母细胞瘤,其组织学类型酷似人肾母细胞瘤,与已报道的大鼠肾母细胞瘤组织学类型相似<sup>[10,11]</sup>,主要由上皮性分化成分和间叶性分化成分组成。本研究免疫组化表明,肿瘤上皮性成分 CK 阳性,间叶性成分 vimentin 阳性,并已向平滑肌分化(SMA 阳性),但 PCNA 和 p53 均表达阴性。传统

观点认为,肾母细胞瘤起源于生后肾的胚基,肿瘤细胞与其有着显著的相似性。一项用乙基亚硝基尿素(ENU)通过胎盘诱导肿瘤的实验研究表明<sup>[10]</sup>,肿瘤发生的早期阶段可表现为小的嗜碱性胚基细胞位于肾脏最外带的近曲小管之间。肾母细胞瘤随着肿瘤团块明显增大,胚基肿瘤细胞逐渐分化成器官样的原始小管或小球结构。

## 参 考 文 献

1. 裴奇,刘志红,陈惠萍,等.木通所致大鼠急性肾损伤的实验观察.肾脏病与透析肾移植杂志 1999;8(1):15—18.
2. 黎磊石.由木通肾毒性研究带来的思考.肾脏病与透析肾移植杂志 1999;8(1):1—2.
3. Hard GC. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the kidney, renal pelvis and ureter. IARC Sci Publ 1990(99):301—344.
4. Magee PN, Barnes JM. Induction of Kidney tumors in the rat with dimethylnitrosamine (N-nitroso-dimethylamine). J Pathol Bact 1962;84:19—31.
5. Sunter JP, Senior PV. Induction of renal tumors in rats by the administration of 1,2-dimethylhydrazine. J Pathol 1983;140:69—75.
6. Hard GC, Butler WH. Cellular analysis of renal neoplasia: light microscope study of the development of interstitial lesions induced in the rat kidney by a single carcinogenic dose of dimethylnitrosamine. Cancer Res 1970;30(11):2806—2815.
7. Hard GC, Butler WH. Cellular analysis of renal neoplasia: induction of renal tumors in dietary-conditioned rats by dimethylnitrosamine, with a reappraisal of morphological characteristics. Cancer Res 1970;30(11):2796—2805.
8. Hard GC. Experimental models for the sequential analysis of chemically-induced renal carcinogenesis. Toxicol Pathol 1986;14(1):112—122.
9. Deshpande RB, Hasgekar NN, Chitale AR, et al. Rat renal mesenchymal tumor as an experimental model for human congenital mesoblastic nephroma: II. Comparative pathology. Pediatr Pathol 1989;9(2):141—151.
10. Hard GC. Differential renal tumor response to N-ethylnitrosourea and dimethylnitrosamine in the Nb rat: basis for a new rodent model of nephroblastoma. Carcinogenesis 1985;6(11):1551—1558.
11. Sharma PM, Bowman M, Yu BF, et al. A rodent model for Wilms tumors: embryonal kidney neoplasms induced by N-nitroso-N'-methylurea. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91(21):9931—9935.

(收稿 2000-07-31 修回 2000-12-21)

# 木通致大鼠肿瘤作用的实验研究

裘 奇 刘志红 印洪林 周晓军 陈惠萍 黎磊石

(正文见 291)

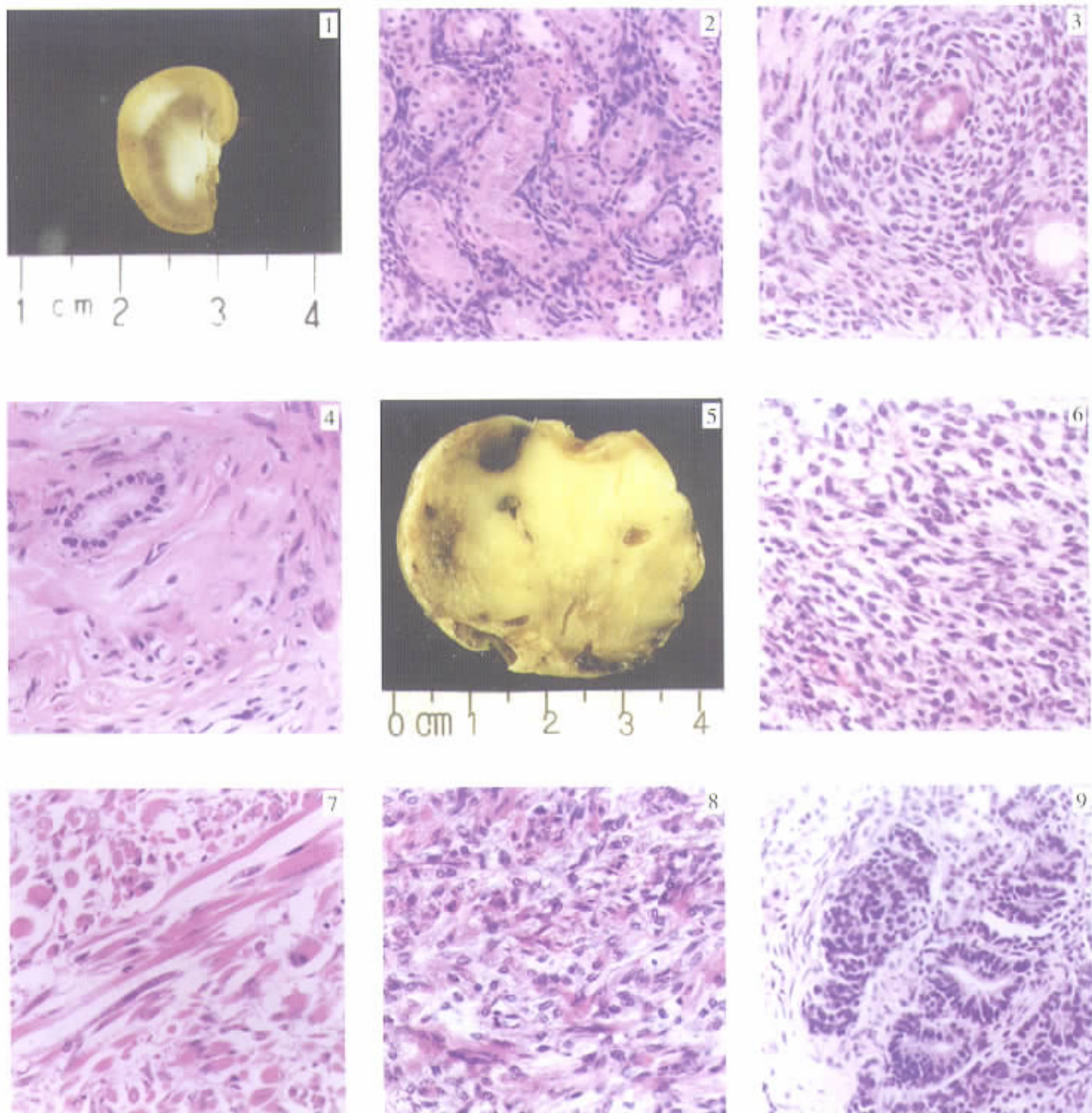


图1 大鼠肾脏间质肿瘤样增生。切面观可见病变区域色白,在皮髓交界处呈浸润性生长。图2 大鼠肾脏间质肿瘤样增生。分化幼稚的间叶细胞围绕肾小管浸润性生长,核染色深(HE $\times$ 200)。图3 大鼠肾脏间质肿瘤样增生。间质可见弥漫性增生的分化较为成熟的短梭形或梭形细胞,围绕于残存的肾小管周围(HE $\times$ 200)。图4 大鼠肾脏间质肿瘤样增生。部分间质内纤维组织弥漫性增生、变性、小管萎缩、消失(HE $\times$ 200)。图5 大鼠肾脏间叶性肿瘤的大体形态。图6 大鼠肾脏间叶性肿瘤。可见大片的分化幼稚的短梭形肿瘤细胞呈弥漫性密集排列,细胞小,核深染(HE $\times$ 200)。图7 大鼠肾脏间叶性肿瘤。可见大片的分化幼稚的短梭形肿瘤细胞弥漫性分布,形态与平滑肌相似(HE $\times$ 200)。图8 大鼠肾脏间叶性肿瘤。肿瘤细胞数多,与纤维细胞相似(HE $\times$ 200)。图9 大鼠肾母细胞瘤。可见典型的上皮性和间叶性两种成分(HE $\times$ 200)。