

鸭的实验性原发性肝癌

朱堃熹 林在尧 周阳生 秦爱霞

(江苏农学院畜牧兽医系)

国内某地是人原发性肝癌的高发地区。从动物肝病调查,发现当地畜禽(鸭、猪、牛)的肝病也很普遍,而且在鸭子和老母猪均检出原发性肝癌,其中特别是鸭肝癌的检出率极高,例如一次在该地区的两个公社随机取样剖检470只成年鸭,发现肝脏病变极为普遍,检出原发性肝癌11例,占2.4%。而且随着鸭龄的增长,肝癌的检出率更是大幅度增加,四年以上老鸭的肝癌检出率高达15%以上^[1]。

根据流行病学调查结果,初步分析鸭肝癌的地区分布与人的肝癌之间存在一定的关系,凡是人肝癌发病率高的地区,鸭肝癌的检出率也高;同样地,人肝癌相对低发的地区,鸭肝癌的检出率也相应偏低。这一情况说明,这个地区人和鸭的原发性肝癌可能存在着相同的致癌因子。

这个地区喂鸭的饲料以玉米为主,一般占全部饲料的80~90%,其次是元麦和其他杂粮,但所占比例不大。通过调查,发现玉米霉变化较严重,大多有黄曲霉污染,其中产毒菌株约占30%左右,远比其他肝癌低发地区为高。黄曲霉毒素是一种强烈的致癌物质,国外已有报道能引起鸭、猪和猴等动物的原发性肝癌^[2-4]。

本试验的目的,是观察肝癌高发地区黄曲霉污染的霉玉米以及从霉玉米分离的产毒黄曲霉纯培养物对鸭子的毒性和致癌作用,以进一步明确该地区鸭肝癌高发的主要原因,并为该地区人肝癌的发生原因提供动物试验的资料。

试验方法

为了尽量排除周围环境中其他因子的干扰,着重观察黄曲霉污染玉米对鸭子的毒性和致癌作用,本试验选择在远离该地的肝癌非高发区某地进行。所有试验用鸭均为当地麻鸭,与高发区的鸭属同一品种。采用同一批来源的种蛋孵化,雏鸭在相同的条件下饲养至两个半月龄(体重2公斤左右)开始进行试验。试验鸭分成三组:霉玉米组50只,正常对照组30只,后来增加一组喂黄曲霉纯培养物组34只,目的是进一步确定从肝癌高发区霉玉米中分离的产毒黄曲霉菌株的致癌作用,并与霉玉米组作比较。

鸭群饲料配合为碎米、麸皮、米糠及青饲料。霉玉米组另加从肝癌高发区运来的霉玉米,先经测定其黄曲霉毒素 B_1 含量,根据毒素含量高低折算和确定霉玉米的配合量。在试验开始半个月,喂的剂量较大,平均每只试验鸭每天摄入毒素约50微克,以后减少为15微克。在两年半试验期间,先后从高发区共运来霉玉米七批,各批玉米的含毒量最高为500ppb,最低为150ppb,多数在200ppb左右。玉米的供应是时断时续的,试验

组实际喂霉玉米的时间累计共13个月, 每只鸭子在试验期间摄入黄曲霉毒素B₁的总量, 平均为6000微克。

黄曲霉纯培养物组是从肝癌高发区霉玉米分离到的一株产B₁毒素较高的黄曲霉菌, 培养于蔗糖—酵母浸膏培养液中, 取纯培养物滤液经测定B₁毒素含量后混和在饲料中喂饲。每只鸭子每周喂毒素的剂量为600~800微克, 分两次喂给, 连续两年。在整个试验期间, 每只鸭子摄入B₁毒素的累计总量, 平均为13600~32600微克。

在试验过程中, 除了观察鸭群的食欲、体重、精神状态等外部表现之外, 间隔六个月抽样剖腹作肝组织活检, 观察肝脏病变的发展状况。自然死亡的鸭子均作组织切片检查, 组织块用10%福马林固定, 石蜡切片和苏木素—伊红染色。部分肝癌组织切片作粘液染色。

试验结果

一、霉玉米组

鸭群对黄曲霉毒素的耐受性存在明显的个体差异。在开始喂霉玉米的三个月之内, 试验鸭先后死亡12只, 最早的在第26天即中毒死亡。病鸭显现精神萎顿, 衰弱无力, 步态不稳, 倒地后常不能起立, 叫声嘶哑, 体膘消瘦, 排绿色稀粪。剖检均为急性或亚急性中毒性肝炎的病理变化。

从喂霉玉米16个月后, 试验组陆续出现肿瘤病鸭, 至30个月全部试验鸭死亡或宰杀为止, 先后共出现各种肿瘤22例, 诱发率为44%。种类见表一。

在22例肿瘤病鸭中, 发现同时有三种肿瘤的1例, 有两种肿瘤的9例, 有一种肿瘤的12例。其中12例肝癌(内9例同时出现恶性间皮细胞瘤)的公母比例为6:6, 无明显性别差异。

二、黄曲霉纯培养物组

在喂纯培养物的整两年时间中, 试验鸭自然死亡17只, 人工剖杀17只。在喂后第22个月出现第一例肝癌病鸭。两年后全部剖杀, 共发现肝癌3例和胆管瘤1例, 未发现间皮细胞瘤。

三、正常对照组

对照组30只鸭子在与试验组相同的环境和饲养条件下(不喂霉玉米和黄曲霉培养物), 饲养两年以后全部剖杀, 未发现明显肝脏病变和任何肿瘤。

病理变化

霉玉米组和黄曲霉纯培养物组的试验鸭在试验过程中不同时期死亡, 肝脏均有明显病变。按照病程的长短不同, 肝脏病变大体上可以分成三种形式, 即急性和亚急性中毒性肝炎、肝硬化及肝癌, 霉玉米组并出现比例很大的恶性间皮细胞瘤。分别简述如下:

一、中毒性肝炎

喂霉玉米三个月以内死亡的试验鸭, 主要显现急性或亚急性中毒性肝炎病变。眼观上, 肝脏肿大, 色泽变淡, 呈灰黄色、黄色或棕黄色, 硬度稍增加, 表面粗糙, 多数有细颗粒状感觉。肝脏表面和切面上有数量不等的针尖至针头大的灰白色小点。胆囊扩

表 1 22 例 肿 瘤 分 类 表

鸭 号	性 别	诱 癌 时 间	诱 发 肿 瘤 种 类		
			肝 癌	恶 性 间 皮 细 胞 瘤	其 他 肿 瘤
327	公	16个月	+	+	—
1253	公	17个月	+	+	—
28	母	17个月	-	+	—
29	母	18个月	+	+	—
1268	公	18个月	-	+	—
30	公	18个月	-	+	—
1262	公	18个月	+	-	—
1219	母	19个月	+	+	—
31	母	19个月	-	+	—
32	母	19个月	-	+	—
33	公	19个月	-	+	—
35	公	22个月	-	+	—
36	公	22个月	-	+	—
37	母	24个月	-	+	—
38	公	24个月	+	+	—
1273	母	24个月	+	-	—
39	母	24个月	+	-	—
40	公	25个月	+	+	—
41	母	25个月	+	+	—
42	公	25个月	+	+	—
43	母	27个月	-	+	胆管瘤、肺腺瘤
46	母	29个月	+	+	—

张, 充满淡黄色稀薄胆汁。其他器官除心外膜出血和小肠粘膜卡他性炎症外, 一般不见明显病变。

显微镜下, 主要为肝细胞严重变性、胆管增生和炎性细胞浸润。肝细胞广泛发生实质变性和空泡化(图1), 在病程较短的病例, 肝实质破坏更是严重, 切片中往往仅见呈团块状或岛屿状的残留实质, 周围有大量增生的胆管组织包围。变性肝细胞的胞浆内有多量胆色素颗粒沉着。有些病例的肝切片中可见散在小坏死灶。

所有病例的肝切片中均见胆管组织显著增生。在2例喂霉玉米14天后扑杀的试验鸭, 即可见到此种以胆管组织明显增生为特征的中毒性肝炎变化, 这是黄曲霉毒素中毒的一个主要特点。胆管增生的形式, 一是从汇管区开始, 增生的胆管上及细胞象新生毛细血管一样, 伸入肝小叶内, 将小叶分隔成假小叶或代替实质组织。二是沿着小叶周围增生, 将小叶重重包围, 肝小叶萎缩, 周围可见厚层的增生胆管组织(图2)。三是在很多区域中, 增生的胆管密集形成较大的增生结节。

增生的胆管细胞看来有两种起源, 一是来源于一种所谓卵圆细胞, 这种细胞在初期即见大量增生, 几乎不见胞浆, 主要为嗜碱性染色较深的胞核, 卵圆细胞可以转变成成为胆管上皮细胞, 除此之外, 肝小叶内增生的胆管上皮, 有一部分从其形态和染色上, 可

以看出系从肝细胞索转变而来,这种过渡型的细胞一般较大,胞浆较多,染色较正常肝细胞增深,呈紫红色,胞核为长圆形或梭形,嗜碱性染色增深,可以看出从肝细胞转变而来的痕迹,整个肝细胞索转变成胆管细胞索,有些具有清楚的管腔。

所有肝切片中,均可见到炎性细胞广泛增生浸润,主要是淋巴细胞和一些浆细胞及嗜酸白细胞,弥漫地浸润在肝细胞索间和增生胆管组织间,并常见多量淋巴细胞增生聚集成结节状,形成肉眼上所见到的灰白色小点病灶。

二、肝硬化

从喂霉玉米6个月后开始做的肝脏活检和死鸭剖检中,多数发现肝硬化。眼观上肝脏一般不肿大,有时体积萎缩,表面明显粗糙不平,呈颗粒状或结节状,从小米至绿豆大,突出于表面(图3),肝脏硬度增加,呈灰黄色或淡棕黄色,并常有黄绿色胆汁沉着斑纹。

显微镜下的明显特点为胆管组织弥漫增生和伴有纤维组织增生,并出现再生肝细胞结节。大量增生的胆管组织将肝小叶分隔和包围,肝细胞显现程度不等的颗粒变性和空泡变性。汇管区和小叶间均有纤维组织增生,间质增宽,血管周围纤维组织增生更明显。纤维组织增生区内往往同时夹杂大量增生胆管,并有多量淋巴细胞浸润。

从形态学上看,引起肝硬化的原因主要是由于大量胆管组织增生所造成,而纤维组织增生的量并不很多,这和其他原因引起的以纤维组织成份增生为主的肝硬化不同,也是鸭子黄曲霉毒素中毒肝硬化的特征。

三、肝癌

霉玉米组和黄曲霉纯培养物组共出现原发性肝癌15例,类型分布如下表:

现将各型肝癌的病变特点概述如下:

1.肝细胞型肝癌 眼观上6例为结节型,1例为巨块型。结节的直径0.5~1.5厘米,数量1~2个不等,也有弥漫多发的(图4)。1例巨块型的肿瘤团块重达100克(图5)。各例肝脏大多呈明显的结节性肝硬化。

肝癌类型	肝癌数	%
肝细胞型肝癌	7	46.66
胆管细胞型肝癌	5	33.34
混合型肝癌	3	20.00

显微镜下,根据7例肝细胞癌的组织结构,大致分以下两种类型:

(1) **腺癌型** 此型占大多数,癌细胞多形成密集的腺管状,具有腺腔(图6)。细胞为多边形或立方形,胞浆丰富,常发生空泡化,核圆形或椭圆形,大小不均,核仁大而显著。有些腺管结构不清楚,细胞排列致密,形成细胞条索。多数癌结节不见包膜,与周围肝组织之间无明显界限,结节内纤维性成分很少。

(2) **团块型** 癌结节具有较完整的包膜,有些结节的癌细胞组织被纤维组织细索分隔成大小不一的团块(图7);有的形成致密的细胞条索(图8);有的是各个细胞散在分开,排列零乱(图9)。癌细胞为圆形或多边形,大小不一致。有时在癌细胞团块内可见多量大小不等的深染伊红的玻璃样圆珠(图7),是癌细胞透明变性的产物。

有一例巨块型肝细胞癌,癌细胞团块的结构比较特殊。显微镜下,癌结节周围有较厚的纤维性包膜,实质组织被纤维间质分隔成大片的细胞团块,团块中央为扩大的形状

不规则的窦状隙(肝窦), 内含淡红色均质的蛋白性物质。癌细胞的形状不规则, 呈多边形、圆形和扁平形。围绕窦状隙周围的癌细胞为扁平形, 细胞层次很厚, 略似复层鳞状上皮(图10)。很多癌细胞团块中央发生凝固性坏死。

2. 胆管细胞型肝癌 外观上均为结节型, 大小不一, 从粟粒至樱桃大, 灰白色。在组织结构上, 胆管细胞癌主要呈两种组织类型:

(1) **索状型** 癌结节不具完整包膜, 结节周围小胆管显著增生, 结构一般比较规则。结节内的胆管组织显现明显的异型变化, 上皮细胞失去腺管状结构, 变成双行的细胞索, 或是密集成大小不一的团块, 散在分布, 胞核为圆形、椭圆形或长圆形, 排列很不规则, 相互迭积, 如多核巨细胞。结节内含有大量疏松的纤维性间质, 并有淋巴细胞浸润(图11)。

(2) **腺管型** 此型较多见, 结节周围有薄的纤维性包膜, 发出纤维条索伸入结节内, 将实质分隔成大小不等的小叶。小叶内的癌组织形成致密排列的、大小和形状不一的腺管(图12), 具有清楚的管腔, 腺管之间也有少量纤维细索分隔。腺管上皮细胞高低不一, 呈立方状、柱状或不规则状, 胞核圆形, 核分裂相较多见。

3. 混合型肝癌 肝脏同时存在肝细胞癌和胆管细胞癌两种结节。

总 结

1. 从我们为期两年半的鸭子诱癌试验的结果证明, 国内某地受黄曲霉毒素污染的霉玉米对鸭子具有强烈的致癌作用。同时也证明, 从该地霉玉米分离的产毒黄曲霉菌株的纯培养物对鸭子确实具有致癌作用。霉玉米和黄曲霉纯培养物引起的鸭子肝脏病变相同, 说明霉玉米的毒性作用主要是由于黄曲霉毒素所致。

在霉玉米组50只试验鸭中检出各种肿瘤22例, 诱癌率为44%, 包括肝癌3例, 恶性间皮细胞瘤9例, 肝癌伴发恶性间皮细胞瘤9例, 恶性间皮细胞瘤伴发胆管瘤和肺腺瘤1例。在黄曲霉纯培养物组34只试验鸭中检出肿瘤4例, 诱癌率为11.76%, 包括肝癌3例和胆管瘤1例。这两组试验鸭肝癌的病变类型与该地自然发生的鸭肝癌基本相同。因此, 结合流行病学调查资料, 可以确定该地鸭肝癌高发的主要原因, 是由于长期摄食了产毒黄曲霉污染的霉玉米(包括其他饲料)所致。

2. 从本试验的结果估计, 连续喂饲霉玉米一年左右, 即可诱发鸭肝癌。鸭子的霉玉米致癌剂量, 以所含黄曲霉毒素计算, 平均每只鸭子为每天15微克左右, 但在试验开始阶段必须应用较大剂量, 造成肝脏中毒性损伤, 再以小剂量持续刺激, 诱癌容易成功。

3. 试验中可以看出, 鸭子对于黄曲霉毒素的耐受性, 个体差异很是显著。在同样喂饲霉玉米的条件下, 有些鸭子在早期即发生急性或亚急性中毒死亡, 而有些鸭子则肝脏病变并不严重。此外, 在我们定期进行的肝组织活检中, 发现有些鸭子在停喂霉玉米一段时间以后, 肝脏的病变可以减轻和甚至消失。

4. 霉玉米组和黄曲霉纯培养物组的试验结果相比, 可以明显看出自然霉变玉米对鸭子的毒性和致癌作用比黄曲霉培养物更强。如果单纯根据黄曲霉毒素的含量计算, 纯培养物组实际摄入的毒素量, 比霉玉米组要高近五倍, 而且喂饲毒素的时间也比霉玉米组长。可是, 无论是鸭子的肝脏病变和诱癌率, 霉玉米组反而比纯培养物组严重。我们

认为这是因为自然霉变玉米的成分比较复杂,除了黄曲霉毒素之外,可能还含有其他未知的毒性物质,对黄曲霉毒素起着协同作用或促进作用,因此其致癌作用比单纯黄曲霉毒素更强。在我们的试验中,霉玉米组出现19例恶性间皮细胞瘤就是一个证明。这个情况对于研究制订粮食和饲料的黄曲霉毒素允许量,应该加以考虑,因为根据用纯毒素做的动物试验结果制订的允许量,与霉变粮食不一定完全符合,必须注意到粮食中的因素比纯毒素复杂,两者在黄曲霉毒素含量相同的情况下,霉变粮食的毒性作用比纯毒素强烈。

5. 关于鸭的恶性间皮细胞瘤见另文报道〔5〕。

参 考 文 献

1. 江苏农学院 某地区两公社鸭肝病调查1974 肝癌防治研究资料汇编
2. Carnaghan, R. B. A. Hepatic Tumors in Ducks Fed A Low Level of Toxic Groundnut Meal 1965. Nature
3. Shalkop, W. T. The Carcinogenic Effect of Sows Fed Aflatoxins For 28~30 Months. 1974. Amer. J. Vet. Res. 35:5
4. Gapalan, C. Induction of Hepatic Carcinoma With Aflatoxin in Rhesus Monkey. 1972. Fd. Cosmet. Toxicol. 10.
5. 朱堃熹等 19例鸭恶性间皮细胞瘤的病理学研究 本刊11卷1期

The Experimental Primary Liver Cancer of Ducks

K.H.Chu, Z.Y.Lin, Y.S.Chou, A.S.Zin,

(Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine of Jiangsu Agricultural College)

Abstract

In certain locality, where was a high incidence region of duck primary liver cancer. The corn was used as a chief feed for these animals, and the contamination of fungi (*Aspergillus flavus*) and aflatoxins were more heavier in corn than the other foodstuffs in that region.

In order to evaluate the exact etiological factors of the duck liver cancer, the experiment have been conducted for the study of carcinogenic effect of the mouldy corn for thirty months. In this trail, 3 groups of ducks were used, (1) 50 ducks fed mouldy corn, (2) 34 ducks fed a culture of *A. flavus* isolating from the mouldy corn, and (3) 30 ducks as control.

It was found that mouldy corn contaminated with aflatoxins in the diet of ducks resulted in the induction of liver cancers. From the 16th. month of the carcinogenic experiment, in mouldy corn group there 12 cases of liver cancer were induced. Which include three types of liver cancer; 5 cases of hepatocellular carcinomas, 4 cholangiocellular carcinomas, and 3 mixed type hepatocarcinomas.

In the *A. flavus* culture group, after a period of 24 months, there were 3 cases of liver cancer induced, including 2 hepatocellular carcinomas and one cholangiocellular carcinoma.

It is apparent that the carcinogenic effect of the mouldy corn was more strong than the fungal cultures.

The histological morphology of each type of the liver cancers were described in detail. The present investigation concluded that the mouldy corn seem to play the most important role in the causation of duck liver cancer in that region.

图 1：中毒性肝炎、肝细胞明显颗粒变性和空泡化 (H.E. × 200)

图 2：中毒性肝炎，肝小叶萎缩，周围有大量胆管组织增生和淋巴细胞浸润 (H.E. × 80)

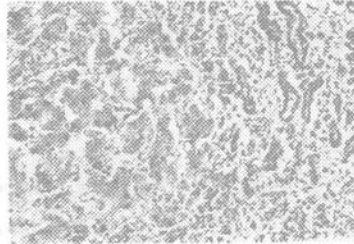
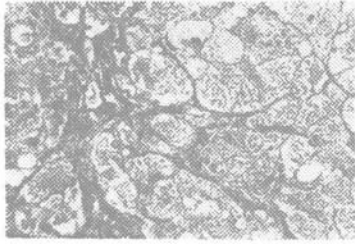


图 3：结节性肝硬化

图 4：肝细胞癌 (多发性结节炎)

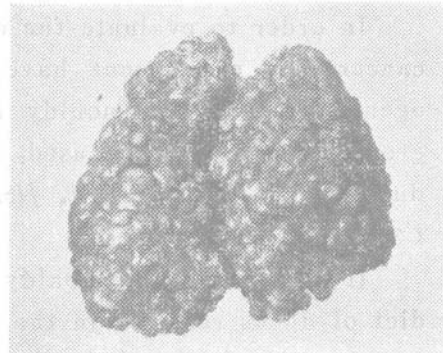
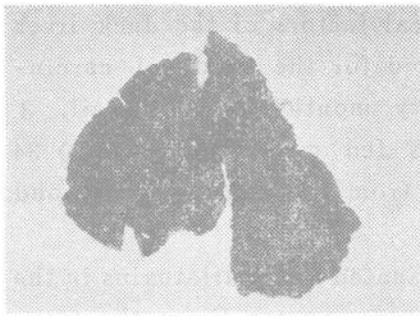


图 5：肝细胞癌 (巨块型)

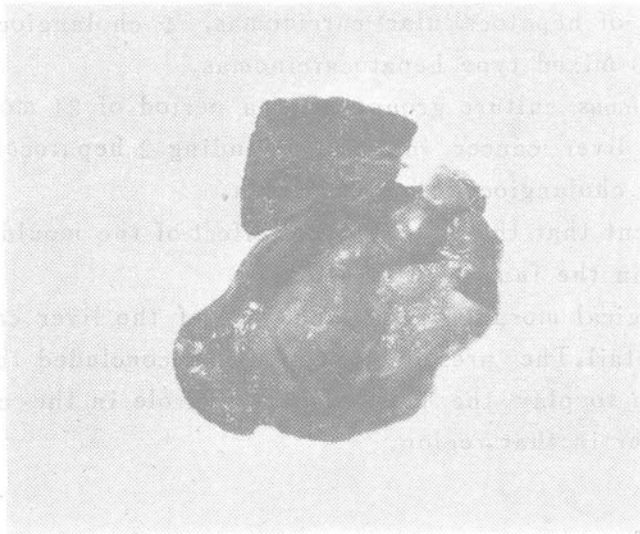


图 6：肝细胞癌（腺癌型，H.E.×80）

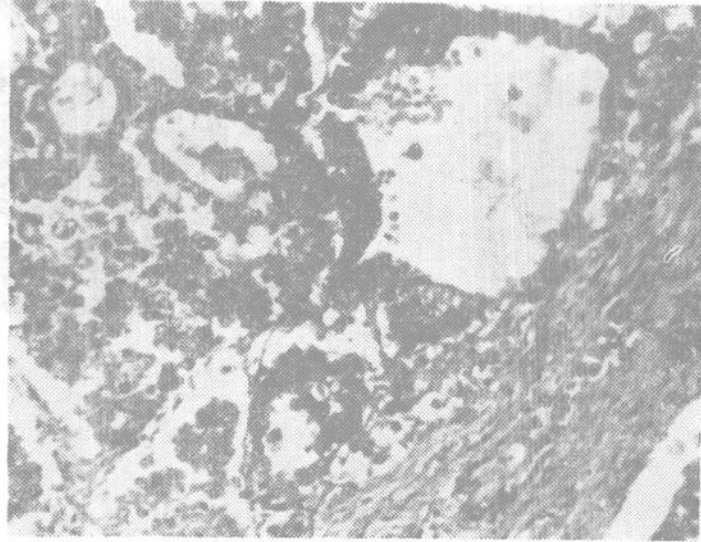


图 7：肝细胞癌（团块型，H.E.×80） 图 8：肝细胞癌（索状型H.E.×80）

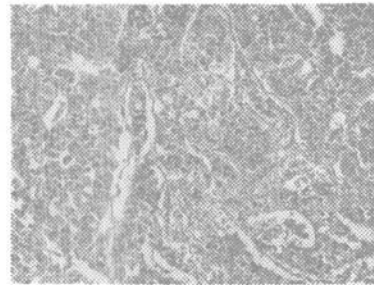
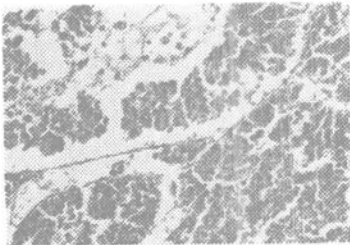


图 9：肝细胞癌、癌细胞散在分开、排列零乱（H.E.×80）

图 10：肝细胞癌、癌细胞排列略如鳞状上皮（H.E.×80）

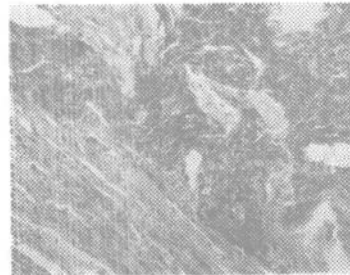
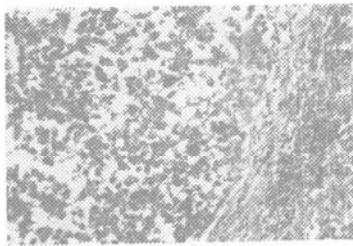


图11: 胆管细胞癌(索状型, H.E. × 80)

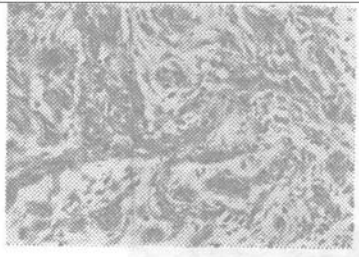


图12: 胆管细胞癌(腺管型H.E. × 80)

