

## 快速誘導致肝癌法之研究

廖俊旺<sup>1</sup> 王順成<sup>2</sup>

本實驗之主要目的在研究快速誘導致肝癌之方法，以期加速國內研究肝癌之動物模式，試驗時將白鼠以 Diethylnitrosamine (DEN) 行腹腔注射，於飲水中添加 2-acetylaminofluorene (2-AAF)，試驗中並行部分肝切除手術，其間並測量白鼠飲水量、體重變化、酵素血清含量及觀察組織病理病變。

試驗結果：2-AAF 處理組飲水量在四週前，白鼠並無拒飲現象，第六週後至第十二週其飲水量有逐漸減少傾向。體重變化於第四、六、八週無影響，第十、十二週則處理組白鼠體重下降。絕對及相對肝重在處理組，四週有減輕現象，第六週後肝重逐漸增加且與對照組有顯著性差異。肝臟酵素 SGOT 及 SGPT 值處理組在第四、六、八週後均呈上升，第十及十二週則無顯著變化， $\gamma$ -GT 值在全部處理組白鼠均呈直線上升現象。組織病理觀察發現在第四週時，處理組白鼠肝臟有明顯的膽管上皮增生，第六週後呈現不同程度的肝增生性小結節、門脈周圍膽管上皮纖維化及肝腫瘤形成現象。

### 緒 言

已有愈來愈多的化學物質，被證實具致癌或致變異性之危險，短期內偵知這些化學物質潛在危險性之方法很多，如偵測致變異性之 Ames's 法及姊妹染色法 (Sister Chromatid Exchange, SCE) 及 DNA 修護法等均被廣泛使用，唯上述方法均缺乏活體試驗 (in vivo) 之證據，其與動物研究間之相關性頗引起爭議，因 Solt 等<sup>(6)</sup>，Tatematsu 等<sup>(7)</sup> 利用肝部分切除術及相關致肝癌理論，進行動物致癌之快速誘導法之研究，以期突破動物需長期試驗之困境。Ito 等<sup>(2)</sup> 利用此快速誘導方法篩檢 27 種供

試藥物，並證明此法與長期動物致癌性有良好之相關性，Pereia 等<sup>(4)</sup> 更利用此法研究不同實驗品系、性別之動物及不同施藥途徑，對產生肝癌比率間之差異，以加強此法適用範圍。Tamano 等<sup>(8)</sup> 進一步以  $\gamma$ -GT 染色法處理藥物劑量與肝癌產生之間相關性，證實此法具有相當之實用性。臺灣由於 SPF (Specific Pathogen Free) 之實驗動物設施並不普遍，欲大規模進行二年長期致癌性試驗，不僅耗費大，且在人力、財力、時間上亦無法配合，因此本所於 1989 年首度引入快速誘導致肝癌方法，並以國內條件加以調整，經二年不斷試驗改進，目前已完成 2-AAF (2-Acetylaminofluorene) 建立標準致癌試驗程序及量化試驗，本文僅針

民國 80 年 4 月受理

1. 國立中興大學獸醫研究所 臺灣、臺中

2. 臺灣省農業藥物毒物試驗所應用毒理系 臺灣、臺中、霧峯

對此試驗之方法程序及其試驗結果，加以敘述，希望能對國內致癌物質危險性評估及其他醫學試驗研究有所助益。

### 材料與方法

#### 一、供試藥物

1. Diethylnitrosamine (DEN), Sigma Chemical CO., USA.

2-Acetylaminofluorene (2-AAF), 95-97%, Sigma Chemical Co., USA.

#### 二、實驗動物

鼠 *Rattus norvegicus* (Wistar strain)，購自台大及成大動物中心，購入後在實驗動物房內檢疫一週，檢疫結果正常者，取體重 150±20 克鼠隻為供試動物，實驗動物房之溫度控制在 21-25°C，相對濕度為 70-85%，光 12 小時，暗 12 小時，雌雄鼠分別飼養在聚碳酸鹽材質 (Polycarbon, Clear, Japan) 之鼠籠 (長 265 mm×寬 425 mm×高 200 mm)，內舖薄片狀墊料及不銹鋼網墊，餵以粒狀飼料 (Purina Laboratory Chow, No. 5001, USA)，每隻每天投予 20-25 克，飲水則任其吸食。

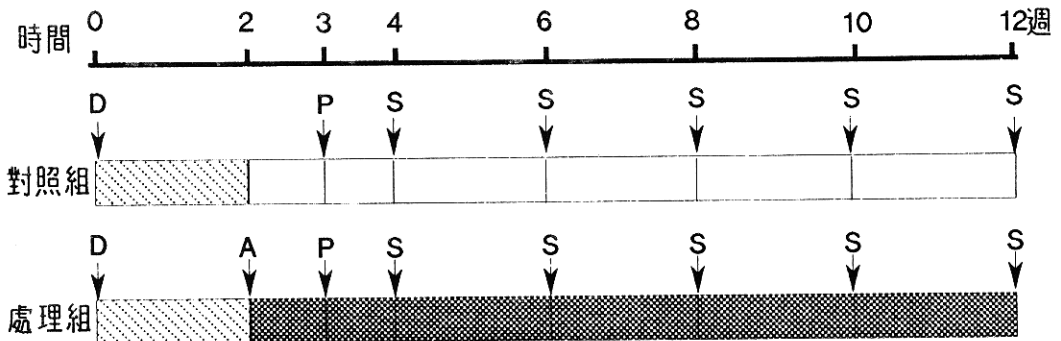
#### 三、試驗設計

分處理組及對照組二組，如圖一。試驗第 0 週以 0.9%生理鹽水配成 200 mg/ml 濃度之 DEN，每隻白鼠以 200 mg/kg 之劑量行腹腔注射，第 0-2 週餵食正常飼料及飲水，第 2 週後處理組於飲水中添加 200 ppm。2-AAF，對照組則不予供藥物，第 3 週行肝部分切除手術 (Partial hepatectomy)，各組分別於試驗後第四、六、八、十及十二週進行解剖，每次解剖二十隻 (處理組十隻及對照組十隻)，雌雄各半，試驗期間，每日稱飲水消耗量及每週稱重一次。

#### 四、血清生化分析

試驗組白鼠於各不同週數進行大體解剖 (Necropsy)，分別用乙醚全身麻醉後，切開腹中線，翻開腸管露出後大動脈，用採血針自其三角分叉處插入，待完全放血後，取 7-8 ml 全血裝於血球血清分離管內，室溫下靜置 30 分鐘，置入離心機以 3000 ppm 離心 15 分鐘，取血清 0.5 ml 於血清生化分析儀 (Vitalab®)，檢測血清中  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT)，Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 及 Glutamic pyruvic transaminase (GPT) 三種酵素含量變化。

#### 五、肉眼及組織病理檢查



D: Diethylnitrosamine  
200mg/kg 腹腔注射

A: 2-Acetylaminofluorene  
200mg/L 溶於飲水中

P: 部分肝切除手術

S: 解剖

圖一：試驗設計

解剖老鼠，記錄肉眼病變後，取出肝臟浸於10%中性福爾馬林固定液固定一星期，取肝臟經修片後，由自動組織脫水機(shandon Processor 2 LE®)脫水後，用石蜡包埋組織塊，以手搖式切片機(Leitz®)切成2-3 μm，經H& E 染色法染色，製成組織切片，於一般光學顯微鏡下觀察組織病理變化。

六、試驗觀察項目

包括：1. 飲水及體重之變化，2. 肝之絕對及相對重量，3. 血清中  $\gamma$ -GT、GOT、GPT 含量變化，4. 肝臟之組織病理變化。

結 果

一、處理白鼠飲水量之變化

以2-AFF添加於飲水中，白鼠並無拒飲之現象，處理四週後，處理組與對照組間其飲水量並無差異，但六週後至十二週處理組飲水量則有逐漸減少現象，第六週對照組為42 ml/隻/天，處理組為32 ml/隻/天；第八週對照組為35 ml/隻/天，處理組為24 ml/隻/天，處理組為24 ml/隻/天；第十週對照組為41 ml/隻/天，處理組為30 ml/隻/天；第十二週對照組為40 ml/隻/天，處理組為22 ml/隻/天。

表一：以2-AFF處理不同週數白鼠之肝絕對及相對體重值

藥物	時間 (週)	劑量 (mg/L)	體 重 (gn)	絕 對 肝 重 (gn)	肝相對體重 (%)
2-AFF	4	0	203.53 ± 82.83	7.43 ± 0.76	6.72
		200	204.74 ± 16.45	5.89 ± 1.30*	2.86*
	6	0	293.80 ± 61.17	9.29 ± 1.18	3.22
		200	278.87 ± 42.84	11.14 ± 1.80*	4.02*
	8	0	294.50 ± 42.84	8.33 ± 1.64	2.82
		200	286.88 ± 55.11	13.81 ± 4.19*	4.88*
	10	0	336.88 ± 84.26	10.84 ± 2.34	3.24
		200	306.00 ± 56.67	15.37 ± 6.26*	4.88*
	12	0	313.50 ± 68.05	9.87 ± 1.43	3.19
		200	273.44 ± 61.34	14.29 ± 5.62*	5.05*

顯著性差異；\* P<0.05

表二：以2-AFF處理白鼠不同週數之GPT、GOT、 $\gamma$ -GT值變化

藥物	時間 (週)	劑量 (mg/L)	GPT (u/L)	GOT (u/L)	$\gamma$ -GT (u/L)
2-AFF	4	0	66.85 ± 7.75	131.71 ± 9.99	0.14 ± 0.30
		200	124.28 ± 38.20*	216.57 ± 96.15*	7.71 ± 16.50*
	6	0	82.45 ± 13.54	137.44 ± 9.99	3.22 ± 2.99
		200	114.62 ± 37.83	164.50 ± 96.15*	19.00 ± 21.13*
	8	0	75.50 ± 15.29	127.25 ± 30.87	0.75 ± 0.88
		200	107.00 ± 18.95*	148.88 ± 33.49*	8.44 ± 6.06*
	10	0	99.44 ± 20.89	147.00 ± 32.50	0.22 ± 0.66
		200	107.11 ± 24.73	147.00 ± 23.27	15.22 ± 9.88*
	12	0	91.00 ± 11.94	152.25 ± 48.21	0.62 ± 0.51
		200	89.00 ± 15.32	123.22 ± 10.19	15.77 ± 14.29*

顯著性差異 \* P<0.05

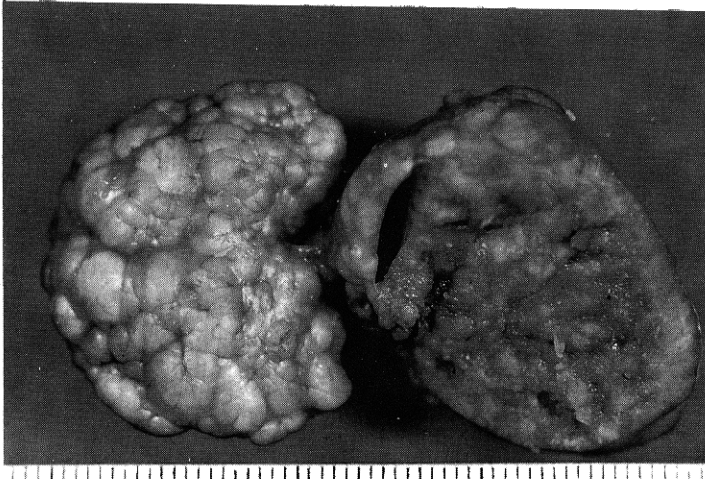
## 二、處理白鼠體重、絕對及相對肝重之變化

以 2-AFF 處理四週至八週後對白鼠體重並無影響，但十週及十二週之處理組，白鼠體重均下降，第十週對照組平均體重為 336 克/隻，處理組為 306 克/隻，第十二週對照組為 313 克/隻，處理組為 273 克/隻；絕對肝重(克)及相對肝重(%)在處理後四週有減輕現象，對照組為 7.4 克/隻(6.72%)，處理組為 5.9 克/隻(2.86%)，但六週後則均比對照組增加，第六週對照組為 9.3 克/隻(3.22%)，處理組為 11 克/隻(4.02%)；第八週對照組為 8.3

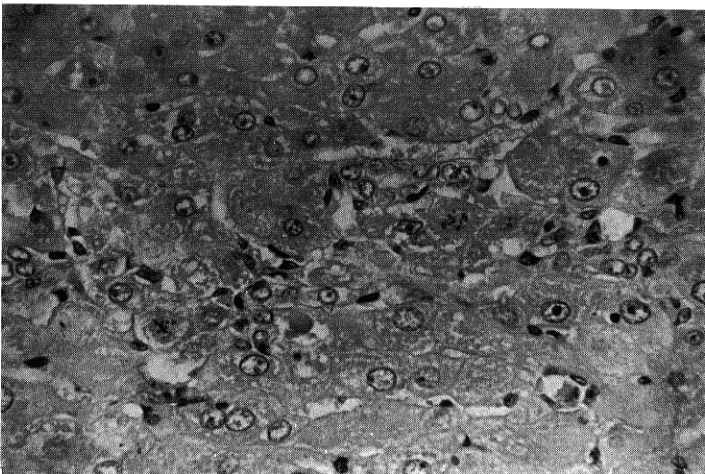
克/隻(2.82%)，處理組為 10.8 克/隻(4.88%)；第十週對照組為 10.8 克/隻(3.24%)，處理組為 15.4 克/隻(4.88%)；第十二週對照組為 9.9 克/隻(3.19%)，處理組為 14.2 克/隻(5.05%)，如表一。

## 三、處理白鼠 GOT、GPT 及 $\gamma$ -GT 之變化

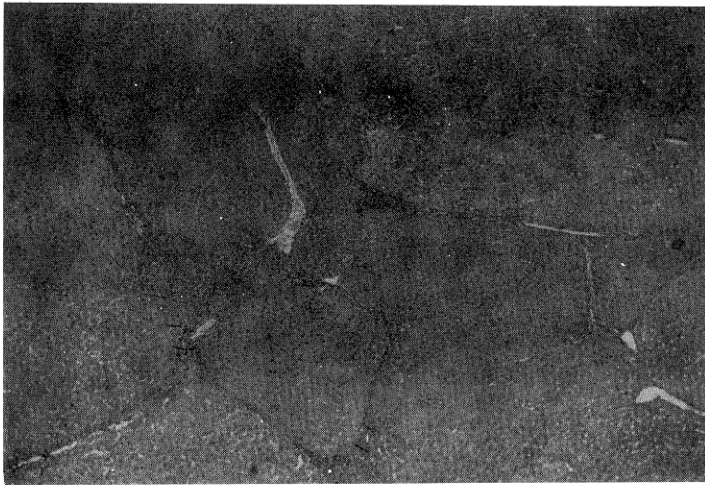
以 2-AFF 處理白鼠四、六、八週後，其 GOT 及 GPT 值均量顯著性上升；GOT 值：第四週對照組為 132  $\mu$ /l/隻，處理組為 217  $\mu$ /l/隻；第六週對照組為 137  $\mu$ /l/隻，處理組為 165  $\mu$ /l/隻；第八週對照組為 127  $\mu$ /



圖二：以 2-AAF 處理十二週後，雄鼠肝臟腫脹，表面有許多增生小結節。



圖三：以 2-AAF 處理八週後，雄鼠肝臟細胞腫脹，核仁明顯同時出現有絲分裂現象。H & E 染色。40 x.



圖四：以 2-AAF 處理八週後，雄鼠肝大葉周圍膽管上皮纖維化明顯。H&E 染色。40 x。

表三：以 2-AAF 處理白鼠不同週數肝之肉眼觀察病理變化

週數	動物數目	結節大小程度			
		+	++	+++	++++
4	♂ 3(5)	—	1	—	—
	♀ 4(5)	—	—	—	—
6	♂ 4(5)	4	1	1	—
	♀ 4(5)	—	—	—	—
8	♂ 4(5)	4	1	2	2
	♀ 4(5)	—	—	—	—
10	♂ 5(4)	5	2	2	2
	♀ 4(5)	1	—	—	—
12	♂ 4(5)	4	1	1	1
	♀ 5(5)	—	—	—	—

+: 輕度 ++: 中度 +++: 顯著

l/隻, 處理組為 149 μ/l/隻, GPT 值: 第四週對照組為 67 μ/l/隻, 處理組為 124 μ/l/隻; 第六週對照組為 82 μ/l/隻, 處理組為 115 μ/l/隻, 但處理十及十二週後, 其 GOT 及 GPT 值均與對照組無顯著差異。γ-GT 值於供試期間均顯著上升, 第四週對照組為 0.1 μ/l/隻, 處理組為 7.7 μ/l/隻; 第六週對照組為 3.2 μ/l/隻, 處理組為 19 μ/l/隻; 第八週對照組為 0.75 μ/l/隻, 處理組為 8.4 μ/l/隻; 第十週對照組為 0.2 μ/l/隻, 處理組為 15.2 μ/l/隻; 第十二週對照組為 0.6 μ/l/隻, 處理組為 15.7 μ/l/隻; 表二。

表四：以 2-AFF 處理白鼠不同週數肝之組織病理變化

週數	動物數目	膽管增生程度			增生小結節	膽管纖維化	肝腫瘤
		+	++	+++			
4	♂ 3(5)	—	2	1	3	—	—
	♀ 4(5)	3	—	—	3	—	—
6	♂ 4(5)	—	—	—	3	3	3
	♀ 4(5)	—	—	—	—	—	—
8	♂ 4(5)	—	—	—	4	4	4
	♀ 4(5)	—	—	—	—	—	—
10	♂ 5(5)	—	—	—	5	5	5
	♀ 4(5)	—	—	—	1	1	1
12	♂ 4(4)	—	—	—	4	4	4
	♀ 5(5)	—	—	—	—	—	—

+: 輕度 ++: 中度 +++: 顯著

l/隻, 處理組為 15.7 μ/l/隻; 表二。

#### 四、處理白鼠肉眼及組織病理變化

肉眼病變: 2-AFF 處理組第四週雄鼠肝臟表面粗糙, 散佈黃白色斑點, 第六、八、十及十二週後雄鼠肝臟明顯腫脹、小葉邊緣鈍、表面有許多大小不一的增生結節、其結節大小隨處理時間延長而逐漸增大(圖二), 雌鼠肝臟除第十週有一隻有結節性增生外, 其餘均無肉眼變化(表三)。組織病理變化: 2-AAF 處理組第四週, 無論雌雄鼠肝臟膽管上皮均有增生及初期增生性小結節, 其程度以雄鼠較為明

顯，膽管上皮增生主要集中在肝門脈區，細胞排列紊亂，形成許多偽小管。在正常肝細胞區散佈多發局部增生小結節，壓迫正常肝細胞，其核大小不一，核仁明顯，同時出現有絲分裂，細胞質腫脹空洞，細胞排列無次序(圖三)。第六、八、十及十二週處理組雄鼠肝細胞則有明顯惡性肝腫瘤細胞浸潤、腫瘤區中心壞死、核仁明顯空泡化、肝小葉周圍有纖維上皮細胞及膽管上皮伸入包圍、形成偽肝小葉及纖維化(圖四)，處理組雌鼠肝臟除第十週有一隻發生肝腫瘤外，其餘均無明顯組織病變(表四)。

## 討 論

試驗中，以 2-AFF 藥物處理六週之白鼠，飲水量均呈明顯下降，推測其原因，可能處理組白鼠肝臟均已形成腫瘤，肝臟代謝機能受損，故引起飲水消耗量減少。第四週、六週及八週處理組白鼠血清酵素，GOT 及 GPT 值顯著上升，推測此期肝臟細胞初步受損，釋放出較多的血清酵素，而第十及十二週 GOT 及 GPT 值與對照組卻無明顯差異，可能此期肝正常細胞已減少，大部份由腫瘤細胞所取代。 $\gamma$ -GT 值在供試期間試驗組均呈直線上升，表示肝腫瘤程度隨時間成正比增加，顯然  $\gamma$ -GT 值是肝腫瘤形成之一種很好間接指標。三種異常血清生化變化值均發生在處理組雄鼠，而雌鼠則無明顯差異，顯示出性別間的感受性差異存在。根據 Ito 等<sup>(3)</sup>研究指出，傳統之二年長期致腫瘤試驗方法，如強致肝腫瘤物質 2-AFF 誘發雄鼠肝臟腫瘤的機率為百分之百，本試驗利用快速誘發致肝腫瘤之技術，經六週後，雄鼠發生肝腫瘤之機率亦為百分之百。Ito 等<sup>(3)</sup>發現，若僅給予 2-AFF 者，其肝腫瘤以 GST 染色後，發生肝腫瘤面積比率較先給予 DEN 及 2-AFF 者為低，此論點與腫瘤發生理論：Initiation  $\rightarrow$  Promotion  $\rightarrow$  Progression，誘發腫瘤的理論相當符合。

前癌期增生性小結節，是本實驗主要觀察項目之一，但染色性是其相當重要之技術，一般傳統的 H&E 染色下判定，其細胞性偏嗜鹼性、嗜酸性或是空泡樣。現今已發展出數種特

殊染色法或組織化學酵素法加以區別 Popp 等<sup>(5)</sup>，雖然其作用機率尚未完全明瞭，卻十分助於前癌期之判定，目前最常用的組織化學酵素為  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT) 染色法，可作為肝腫瘤形成的重要指標，唯  $\gamma$ -GT 活性則易受環境因素、飲食、動物品系、年齡及致癌物劑量選擇等不同因素的影響，至於 Promoter 對誘發肝腫瘤上差別亦很大，如 WY-14、643 與 Phenobarbital 同為 Promoter，其作用機序不同，WY-14、643 產生肝增生性結節較大，數目卻不增，Phenobarbital 則相反。至於增生性結節發生的部位，亦常因致癌物的不同而有區別，如 2-AFF 常發生在肝右葉，Deoxycholic acid 發生在右葉比例比左葉多出四倍 Garvey 等<sup>(1)</sup>，因此研究致肝腫瘤之外在條件相當多，需要固定許多因素，試驗可信度始可提高。至於肝增生性小結節雖然也發生在年老的老鼠，但祇有在有致肝癌性物質存在時，其數目及大小才會增加，故增生性小結節為肝癌前期的重要指標<sup>(5)</sup>。唯本實驗正以  $\gamma$ -GT 酵素染色法，輔佐增生性小結節為判定肝癌發生之指標，希望在多重指標之印證下，可得到更加準確之結果。

## 誌 謝

本研究承行政院農業委員會補助經費，計畫編號：80-農建-7.1-糧-71-(2)，謹此致謝。

## 參考文獻

1. Garvey, L. K., O. Lyght., and J. A. Popp. (1988). Evaluation of deoxycholic acid (DCA) promotion in rat liver. *The Toxicologist*, 8: 195.
2. Ito N., M. Tatematsu., K. Nakaniishi., R. Hasegawa., T. Takano., K. Imaida., and T. Ogiso. (1980). The effects of various chemicals on the development of hyperplastic liver nodules in hepatectomized rats treated with N-Nitrosodiethylamine or N

- 2-Fluorenylacetamide. *Gann*. 71: 832-842.
3. Ito, N., T. Inoue., Y. Tagawa., T. Akoe., and M. Kagawa. (1986). Development of new rapid bioassay for carcinogen to predict the results of long-term carcinogenicity tests. *Carcinogenesis*. 9: 601-611.
  4. Pereira, M. A., S. L. Herren, A. L. Britt., and M. M. Khoury. (1983). Effects of strain, sex, route of administration and partial hepatectomy on the induction by chemical carcinogens of gamma-glutamyltranspeptidase foci in rat liver. *Cancer Letter*. 20: 207-214.
  5. Popp, J. A., and T. L. Goldsworthy. (1989). Defining foci of cellular alteration in short-term and medium-term rat liver tumor models. *Toxicology Pathology*. 17: 561-568.
  6. Solt, D. B., A. Medline, and E. Farber. (1977). Rapid emergence of carcinogen induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *Amer. K. J. Pathol*. 88: 595-618.
  7. Tatematsu, M., N. Murasai., K. Nakanishi., Y. Miyata., Y. Shinohara., and N. Ito. (1979). Sequential quantitative studies on hyperplastic nodules in the liver of rats treated with carcinogenic chemicals. *Gann*. 75: 125-130.
  8. Tamano, S., M. Tsuda., S. Fukushima., T. Masui., K. Hosoda., and N. Ito. (1983). Dose and sex dependent effects of 2-acetylaminofluorene, 3'-Me-DAB and DL-Ethionine in induction of gamma-glutamyltranspeptidase positive liver cell foci in rats. *Cancer Letter*. 20: 313-321.

## THE RAPID BIOASSAY METHOD FOR LIVE CARCINOGENESIS ON RAT

Jiunn-Wang Liao<sup>1</sup>, Shun-Cheng Wang<sup>2</sup>

This study is to set up rapid bioassay method for liver tumor and carcinogenesis detection on Wistar rats. The Diethylnitrosamine (DEN) was treated through i. p. method, then 2-Acetylaminofluorene (2-AAF) in drinking water was given for rats, and the partial hepatectomy was conducted. The water consumption, body weight, serum biochemical analysis, and main tissues pathological changes are also evaluated.

The result revealed, the water consumption were no difference between control and treated groups at 4 th week. But the water consumption decreased in treated groups significantly decreased in 6 th, 8 th, 10 th, and 12 th week, individually. The

body weight of treated rats decreased significantly at 10 th week and 12 th week, individually. The absolute and relative liver weight in treated group were lower than control's at 4 th week, They exhibited more heavier than control group at 6 th, 8 th, 10 th, and 12 th week, individually. SGOT and SGPT values increased at 4 th, 6 th, 8 th week in treated group, individually. The  $\gamma$ -GT value showed obviously high during all test periods in treated rats. Marked bile duct proliferation was found at 4 th week. Hyperplastic nodules, cholangiofibrosis and hepatomas formed at 6 th, 8 th, 10 th, and 12 th week, individually.

---

Received for Publication: April 1991

1. Department of Veterinary Medicine, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R. O. C.
2. Department of Applied Toxicolog, Taiwan Agricultural Chemical and Toxic Substances Reaserch Institute, Taichung, Taiwan, R. O. C.