

中国医学科学院基础医学研究所
病理研究室实验肿瘤组
杨 简 高 进 主编

食管癌的实验研究

人 民 卫 生 出 版 社

食管癌的实验研究

中国医学科学院基础医学研究所

病理研究室实验肿瘤组

杨 简 高 进 主 编

人 民 卫 生 出 版 社

食管癌的实验研究

杨 简 高 进 主编

人 民 卫 生 出 版 社 出 版

人 民 卫 生 出 版 社 印 刷 厂 印 刷

新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行

787×1092毫米16开本 10 $\frac{1}{2}$ 印张 30插页 239千字

1980年1月第1版第1次印刷

印数：1—11,100

统一书号：14048·3751 定价：2.45元

前 言

食管癌是我国常见的癌症之一，几乎遍及全国各地，且呈显著的地区性分布，以山区及农村发病较多。河南、河北、山西、山东四省与北京市，早已发现为高发地区。近年来经过调查，证实四川、湖北、广东、福建、陕西、江苏、广西、新疆等省、区也有高发地区或相对高发地区，但以河南的林县与山西的阳城为全国（甚至全世界）的最高发病地区。国外如南非的达兰斯开及伊朗、德国、苏联、智利、波多黎各等国家与地区也有比较集中的高发区的报导，因此，食管癌属于全球性疾病，受到了普遍的重视。食管癌的好发年龄多为50~70岁，正当一个人在最有经验能为人类多作贡献之年不幸而丧生，对国家说来是一个莫大的损失。因此食管癌的防治研究在许多地方都被列为一项重点工作。在食管癌防治研究工作中，病因与发病条件的研究是一个关键问题。经过地区的病因调查，以便发现可疑的病因线索，而伴随的病因的验证工作又是不可缺少的一个环节。通过实验室的验证，以找到并肯定真正的病因与发病条件。中国医学科学院原实验医学研究所（现改名为基础医学研究所）的病理学系实验肿瘤研究组，于1963年开始进行食管癌的实验病因研究工作。在1965年组织了病因调查组，深入林县高发地区进行病因调查，发现了某些可疑的病因和发病线索，回到实验室后开展了各项验证工作，试图找出该地区的病因和发病条件，为现场的防治工作提出综合性预防措施，为改进食管癌病人的治疗，从而达到减少其发病率，提供确实的实验证据。该组人员在十多年内从事实验病因工作，写成了二十八篇科研论文，并总结出对林县高发地区食管癌发生原因与条件的看法。在该组的工作中，包括病因调查，动物食管癌与癌前病变模型的建立，可疑病因与发病条件的验证，以及与食管癌发生有关的各种基础理论研究，如癌变的阻断，增生与癌变的关系，癌变过程中免疫反应以及病理形态学及超微结构的研究等等，均有涉及。该组工作的方向与方法，不仅对食管癌的研究工作有参考的价值，也可以作为研究其他癌症的借鉴。为此将该组在十多年来发表与未发表的论文汇集成册，以供食管癌研究的工作同志们参考。由于我们认识与水平所限，工作中难免有缺点和错误，敬希读者批评指正。

目 录

前言	[3]
病因调查	1
河南省林县现场食管癌病因调查	1
食管癌与癌前病变动物模型的建立及其病理形态学的观察	4
食管癌动物模型	4
一、动物食管癌的实验性诱发	4
二、甲基苄基亚硝胺诱发大鼠食管癌的观察	8
三、甲基苄基亚硝胺诱发大鼠食管癌的癌变过程中病理学及组织发生学的观察	19
四、甲基苄基亚硝胺诱发小鼠前胃癌过程中病理形态学与组织发生学的观察	27
五、甲基苄基亚硝胺诱发三种不同系别小鼠前胃癌的实验研究及癌变过程中病理形态学的动态观察	36
六、甲基苄基亚硝胺诱发小鼠前胃鳞癌过程中各阶段病变的组织学及超微结构的观察	44
七、可移植性小鼠前胃鳞状细胞癌株 (FC) 的建立经过、生长特性、病理形态、间质反应与超微结构等的观察	49
食管 (包括前胃) 癌前病变的动物模型	59
一、维生素 A 缺乏与慢性食管炎、咽炎、胃炎及上皮增生关系的实验研究——慢性食管炎与上皮增生模型的建立	59
二、柠檬醛致瘤作用的实验观察——大鼠前胃癌前病变 (乳头状瘤) 模型的建立	64
可疑病因和发病条件的验证	69
一、从天花板上刮下的烟灰中致癌物质的测定	69
二、经呼吸道吸入的物质能否到达食管的实验观察	69
三、林县癌户酸菜的原料、制作方法、化学测定与霉菌的分离培养	73
四、四川盐亭短期发酵酸菜汁对甲基苄基亚硝胺诱发小鼠前胃肿瘤影响的实验研究	73
五、可疑发病条件的验证	82
林县食物中的霉菌与食管癌发生和发展关系的实验研究	83
一、林县食管癌户酸菜中白地霉促癌作用的实验研究	83
甲、白地霉对小鼠致病性的观察	83
乙、白地霉对亚硝胺诱发小鼠前胃癌促癌作用的观察	87
二、林县食管癌户酸菜中白地霉致瘤作用的初步观察	95
三、白地霉致瘤作用的进一步实验研究	101
四、林县癌户酸菜中白地霉致瘤作用的进一步实验——浓缩的白地霉培养液与维生素 A 缺乏对大鼠前胃的致瘤作用的观察	103
五、林县食物中霉菌 1、2、3 号培养物的毒性与致病性的观察	107
有关食管癌的有关一些基础理论的研究	114
一、食管上皮增生与癌变关系的实验研究——在停止给致癌物质后增生的转归	114
二、食管上皮癌变药物抑制的实验研究——维生素 A 抑制亚硝胺诱发大鼠食管上皮癌变的初步观察	120

三、食管上皮癌变的药物阻断的实验研究——争光霉素对亚硝胺诱发大鼠食管上皮癌变的作用·····	126
四、甲基苄基亚硝胺诱发小鼠前胃癌过程中机体免疫反应的动态观察·····	132
五、正常 615 系小鼠的食管、前胃、胸腺、脾脏和地区淋巴结在发育过程中形态学及组织化学的观察·····	141
实验治疗·····	150
一、岩参和攀枝花对甲基苄基亚硝胺诱发的小鼠前胃肿瘤实验治疗的初步研究·····	150
二、岩参和攀枝花对亚硝胺诱发的小鼠前胃癌实验治疗的进一步研究·····	156
结束语·····	161

病因调查

河南省林县现场食管癌病因调查

(一) 林县食管癌的发病率及过去对病因的研究情况

林县食管癌发病率及死亡率极高, 严重地威胁着当地人民的健康和生命。自 1959 年以来, 河南医学院和林县人民医院对食管癌的防治进行了大量的工作, 并取得了不少成绩。连续几年来, 在全县进行了普查和复查, 对该县的发病情况与发病因素进行了调查研究, 发现每年食管癌的发病人数约 500~600 人, 其发病率在 59、60 及 63 年分别为 95.76/10 万、96.96/10 万和 115.00/10 万, 其中以北半部的任村、河顺、东岗、石板岩等公社发病率最高, 东南部的公社发病率较低。死亡率与发病率有平行关系。病因调查结果指出, 粗食、热食以及吃酸菜等因素的综合作用与食管癌的发生有关, 食管炎可能是食管癌的癌前疾病, 而口腔疾患及口腔卫生不良, 可能导致食管炎的发生。至于家族史问题也曾注意到, 认为血缘关系似乎没有共同生活的关系重要。这些发现为食管癌的病因探讨提供了有价值的线索。

(二) 病因调查工作的情况

1965 年第二届全国肿瘤会议召开后, 在卫生部的领导下, 同年四月份成立了林县食管癌防治研究基地。根据肿瘤会议的精神以及林县食管癌防治基地的要求, 中国医学科学院实验医学研究所于 1965 年 4 月 13 日组织了食管癌病因调查工作组, 前赴林县现场进行食管癌的病因调查。我们的调查是从病因学和发生学的角度出发, 针对林县发病特高的情况去进行食管癌病人的家庭访问。调查时特别注意发现饮食与生活中可能进入食管的致癌因素和促癌因素。选择发病率较高或较低的几个大队为对象, 然后深入到一些自然村或生产队中, 通过队干部或卫生所大夫了解其一般生产、生活情况以及食管癌的发病情况, 然后至癌户及非癌的对照户进行挨家挨户的调查访问。除了按拟定的调查表格项目逐项询问并注意现在的一般生活环境情况之外, 还着重调查其 20 年前的生活情况及饮食习惯。此外, 实地观察了各户的环境、居住条件、饮食与卫生状况, 注意发现所有可能与癌的发生有关的特殊现象, 并收集了各种样品如酸菜、烟熏玉米、卧室墙壁刮下的煤烟、各种食用树叶及野菜、盐和煤等带回实验室作有关的化验。为了较全面地了解情况, 在调查过程中除了访问患者本人外, 还通过其亲属、邻居, 老年人和干部进行侧面了解。对于一些发病率较高或特别低的队或自然村, 则作为重点调查对象, 对个别多癌户则对其情况了解更为详细。试图通过点与面工作的结合, 通过患者与非癌对照者的调查对比, 以及高癌地区与低癌地区的比较, 从各方面寻找出食管癌发病可能的线索。1965 年的调查计划分为一般调查和重点复查二个阶段。自 1965 年 4 月 19 日至 7 月 8 日完成了第一阶段的现场调查工作, 除了东岗公社因故未去调查外, 已对林县所属的十四个公社, 35 个大队中的 55 个自然村及 325 户进行了调查, 其中癌户 125 户, 可疑癌户 37 户及非癌对照户 163 户。此外, 并利用休整时间对林县医院门诊及住院的食管癌病人共 49 例进行了病因调查。

(三) 可能与食管癌发病有关的现象

1. 卧室内无通风设备的煤炉 林县人家在冬季没有烧炕取暖的习惯,而是在室内的两个炕头之间设一个无烟筒的煤炉,作为取暖兼煮食之用。在调查过的十四个公社中,除了石板岩及南部的一些公社在近年来才改用煤火取暖外,其他公社均在解放以前很长时间,或解放后便在卧室内生煤炉取暖。卧室内之煤炉生火时间每年达4~5个月之久。炉子本身不设通风烟囱,加之卧室一般狭小,绝大多数也没有通风设备,因此卧室内空气流通状况极差。煤的不充分燃烧所产生的产物有无致癌作用,以及有无可能作用于食管粘膜等,是值得重视的问题。

2. 烟熏食物 石板岩公社社员在卧室内不生煤炉。冬季在室内烧柴火取暖,因而悬挂在屋顶及在屋外窗口屋檐下之玉米有的被烟火熏黑,长期食用这些烟熏的食物与食管癌发病有无关系,也是值得注意的。

3. 好食酸菜 林县人民长期以来习惯以酸菜为主要副食,每天每顿都不离酸菜,至为突出。酸菜是以红薯叶,红、白萝卜叶为主要原料。每年制一次,储存在大缸中,能食用七、八个月之久。在解放前酸菜之食量很大,“糠菜半年粮”是其生活的写照。如遇荒年粮食不足,则食酸菜的量更大。还有,过去小孩从三岁开始即食酸菜,直到老死,很少间断。一般人自缸中取出酸菜后,有的用水略为淘洗一下,有的只挤去酸水,不加热即行进食,故不仅量多而且酸度也大。食管受到长期大量酸性食物的刺激,将引起什么改变,它与癌的发生有无关系,值得重视。此外,我们调查了60户的酸菜中发现有47户有发霉现象,曾将林县取样的酸菜作培养,发现有白地霉的纯培养。

4. 烟、酒嗜好 林县居民过去与现在都无嗜酒习惯,因此嗜酒在林县不是一个发病因素。但林县男人过去不少有抽旱烟习惯,抽旱烟与抽香烟不同,其吞咽动作比较多,可能咽下的东西也较多,因此也值得重视。

5. 饮食习惯 林县人民过去生活困苦,食大量粗粮,而又多有热食,进食快的习惯。一般人因劳动强度大,食物质量差而稀薄,故食量均较大。这些粗、热、快和量大与蹲食等因素对食管的刺激作用是不容忽视的。

6. 口腔卫生不好与缺齿 林县居民过去普遍无刷牙及漱口的习惯。有些地区盛产柿子,群众常食大量“柿子炒面”、柿饼等,又常吃酸菜与柿醋,由于甜与酸的食物经常作用于牙齿,加以口腔不洁,故居民患龋齿的也很普遍。早年(30岁左右)掉牙现象甚为普遍,有些人甚至仅在40岁左右牙齿便已全部掉光。因此,由于缺齿,食物进口后不能充分咀嚼,缩短了口腔内停留时间,因而增加了热和粗的食物对食管的刺激。

7. 食管癌的家族史 林县食管癌的家族史极为明显,在一个家庭中同时或先后有几个食管癌患者的现象并不罕见,它究竟对病因学上有何意义是值得重视的。我们从调查中发现有家族史之癌患者大多数有共同生活时间较长的历史,直系亲属中父系的较母系的多,兄弟较姐妹的多,旁系中夫妻同患食管癌的例子也较多。看来共同生活在同一环境中,生活与饮食习惯均较相似,接受相同的发病因素关系较大。但遗传性和传染性问题也不能完全忽视,应作进一步调查研究。我们发现的三个多癌(7、8个与12个癌患者)家族应作为这一问题的重点研究对象。

(四) 体会及建议

1. 1965年第一阶段的调查工作已告一段落,从三个月来得到的初步结果看来,食管癌的病因可能是非常复杂的,要找出具体而明确的发病因素,需要从事大量艰苦细致

的调查研究工作，还要有足够数量的对照资料作对比，有些问题还要利用动物实验和化学检查作进一步分析，最后还需要通过人群的实践去经受考验，因此目前的工作仅仅是一个开端，还有待于继续深入。

2. 应大力加强防癌宣传及三个预防试点的工作。目前林县地区群众中对食管癌存在恐惧心理，普遍流传着“吃麦不吃秋，吃秋不吃麦”的说法，因此应大力开展防癌宣传工作。目前已有的三个预防试点（即柳林、桑耳庄、曲山）的工作很有意义，今后应继续执行严格的预防措施和经常的细致的调查工作，这可能为阐明与最后证实食管癌发病因素提供极有价值的资料。

（五）初步印象

根据以上从现场病因调查所获得的资料，我们对林县食管癌的病因提出以下几点初步印象，作为今后进一步分析研究和制订今年的第二阶段工作计划的参考。

1. 林县各地的食管癌病例确实很多，而且家族史又极为明显(69.6%)，这说明当地生活环境中，必然有一些独特的、长期作用的、而被多数居民所接受的致癌因素和促癌因素。

2. 在前人进行的病因研究的基础上，我们发现一些新的，可能与发病有关的因素：如卧室中无通风设备的取暖与煮食兼用的煤炉；普遍受到霉菌(白地霉)所污染的酸菜；烟熏的食物(玉米)等等值得特别加以分析研究。

3. 林县居民由于过去传统的生活和饮食习惯，使大多数人的食管粘膜经常接受多种多样的机械性(粗食、快咽)、化学性(酸菜)与温热性(热食)的刺激，这些刺激物可能具有强烈的促癌作用。

4. 林县地方的一些特殊情况和条件：如缺水、缺齿、口腔不洁、快咽、巨大食量与蹲食等等，可能对外来刺激物的进入食管，以及对粘膜的刺激起着促进与加强作用。

5. 根据我们的调查资料，在125个癌户中喝酒者只占17户(13.6%)，不喝酒者占103户(86.4%)，饮酒史不详的5户，似乎可以比较肯定的说，在林县食管癌的发病因素中嗜酒不是一个主要因素。

6. 林县女性患食管癌的不在少数，男女比例为1.27:1，而绝大多数的女性都不抽烟、不喝酒，因此可以肯定，林县女性的食管癌的发病因素中不存在烟、酒问题。

7. 在癌的家族史方面，我们发现69.6%的户有家族史，并发现三户多癌户（分别有7、8及12例癌患者）。根据资料的初步分析，家族史似乎以直系多于旁系，父系多于母系，兄弟多于姐妹，而夫妻同患的也不少，还有共同生活时间长的较多。这些事实似乎说明：在食管癌的家族史问题上，长期共同生活在相同的环境中，接受相同的致癌因素似较遗传性或感染性更为重要。

8. 林县食管癌北部多于南部，具有地区分布特点，这可能与南部居民食酸菜的量较少，食的方法不一样（加入稀饭内煮熟），而且十多年卧室没有煤炉，也没有烟熏的食物有关。

9. 根据林县多数人家单调的食物及其简单的加工方法（蒸或煮）可以认为，食物由于烹调而产生致癌物质的可能性并不存在。

10. 根据林县居民一向的偏食习惯，对于营养缺乏，特别是维生素缺乏，究竟在食管粘膜会引起什么改变，对癌的发生与发展方面将引起什么作用，值得加以重视。

杨简、陈妙兰、祝庆蕃、卞春云、金英、瞿荣华（1965年完成）

食管癌与癌前病变动物模型的建立

及其病理形态学的观察

食管癌动物模型

一、动物食管癌的实验性诱发

为了阐明从防癌普查与临床调查所得食管癌发病因素的作用,以及检查可疑物质对食管上皮的致癌性,需要在适宜的动物身上诱发出食管癌模型,以便进行研究。动物食管癌模型的创立,还有利于实验治疗与可移植的癌株的建立。因此,在防治食管癌的工作上是一项重要的基本工作。动物食管癌的诱发在国外^[1~5]、国内都有过尝试。作者为了进行食管癌病因学与发病学的研究,曾在一些动物身上造成食管癌模型,并作了初步报导^[6]。现将各次实验结果报告如下:

材料与方法

实验是在昆明和A系小鼠、中国地鼠及wistar系大鼠身上进行的。用碳氢化合物类的20-甲基胆蒎(简称MC),与9,10-二甲基1,2-苯蒎(简称DMBA)作致癌剂。为了使致癌物能长期与食管上皮基底细胞直接接触,我们建立了食管腹段穿线、颈段穿线和腹段粘膜下穿线等三种手术方法。它分为以下几个步骤。

1. 含致癌物质棉线的制备法 取细棉线,洗去淀粉浆,经高压消毒后备用。将一定量的致癌物质放于表面玻璃上或试管内,加热溶化后,将棉线的一段浸在其中,逐条处理,最后计出每根线所沾之量(一般可沾0.7~2.5毫克)。

2. 食管腹段穿线手术 大鼠、小鼠及中国地鼠的食管腹段都比较长,在横膈下长约0.5~0.7厘米。我们就是利用这一特点在腹段进行穿线的。

取体重25~30克之小鼠、中国地鼠或60~114克之大鼠,在戊巴比妥钠全身麻醉下,于前上腹靠左侧肋弓下(后一阶段从背部进行手术,效果较佳)剪开腹壁,将胃拉出腹外,然后分离肝叶,露出食管腹段。用持针器将已穿好粘有致癌物质棉线之小针,从食管腹段上端前面穿过食管全层,直达管腔,在腔内向下约行走一段0.2厘米,于贲门上2毫米处穿出食管壁外,并即打一结。二个游离线端又相互打成一结。这样即可使粘有致癌物质的线段穿在食管内面,而两端无致癌物质的线段则露在浆膜面。为了使食管腔内容物不致从二个线孔溢出,以烧灼器从胃底之大网膜上灼取一小块组织,覆盖于食管穿线处(从背部施手术时,则取卵巢周围的脂肪组织),可以防止手术后一部分的食管旁脓肿。术后动物饥饿四小时然后给食。动物五个一罐,给标准硬块饲料及自来水,随意饮用。每日早晚上下班前后注意检查,如发觉动物健康不良即处死。术后一部分小鼠早期因肺炎、食管阻塞,晚期因脓肿、食管憩室炎等合并症而死。从实验开始至结束约50%死亡。

3. 食管腹段粘膜下穿线手术 方法同上,只是动物于麻醉前从食管灌入 0.01 毫升龙胆紫液。针头穿过肌层不进食管腔,只在粘膜下行走 0.1 厘米,然后再穿出肌层。拉出时以线上不沾有龙胆紫液为准。术后脓肿与憩室形成并不多见,动物死亡也较少。

4. 食管颈段穿线法 方法基本上与腹段穿线相似,只是手术改在食管的颈段进行。将动物颈部皮肤从正中切开,分离气管前方的肌层,露出气管后,分离后面的食管,将其从气管下面向左侧拉出,即可进行穿线。手术后很少见到脓肿与憩室形成,部分动物发生了与皮肤相通的食管瘘管。

5. 食管切片标本制作法 动物手术经过 4~6 个月后,用放血法处死。将食管与胃相连取出,平铺于厚纸板上。从纵轴剪开食管,经过肉眼与解剖显微镜观察,然后将其投入 Bouin 氏液中固定。部分动物则在固定后,用刀片沿食管左右两侧将胃切去,然后将食管与胃从正中线切开,分为二个等半,将二个切面并排作石蜡包埋,阶段性连续切片,苏木素-伊红染色,进行病理组织学检查。前胃及腺胃均经过肉眼与放大镜或解剖显微镜观察,如有可疑病灶,则行常规切片检查。

实验结果

(一) 食管上皮病变为的分级

根据病变种类与可能的发展程序,我们将食管上皮病变分为以下六级: 0 级,无病变; I 级,非瘤性病变,包括上皮的单纯性增生及乳头状增生; II 级,癌前病变,包括不典型增生、乳头状瘤(图 1, 4)、内生性上皮瘤、早期上皮浸润等; III 级,原位癌,早期癌(图 5); IV 级,浸润性癌,癌已侵犯肌层(图 6); V 级,广泛浸润癌,即癌已穿过外膜广泛地侵犯食管邻近的肝及淋巴结。(图 2, 9~10) 每例动物以其最高级别的病变进行统计。

(二) 食管癌的诱发结果

1. 腹段穿线结果 在 56 只 A 系小鼠经过 137 天后,发现早期癌 9 例,浸润性癌 3 例,广泛浸润的癌 8 例,共诱发出食管癌 20/56 例 (35.71%)。在第三批昆明种小鼠中,经过 195 天,分别诱发出癌 13/37, 7/47 及 11/66 例,其发生率分别为 35.13%、14.89% 及 15.15% (表 1)。

在 Wistar 大鼠的二批实验中,虽然经过了 334 天之久,但只有少数上皮的癌前病变,未发现癌。只引起一例平滑肌肉瘤。穿空白线的大鼠经过 354 天,只见一些上皮的增生。中国地鼠经过 252 天,只引起 2 例纤维肉瘤(图 3)。

2. 颈段穿线结果 在 78 只昆明种小鼠中,经过 36~271 天,发现 6 例癌,其中 2 例为早期癌, 3 例为广泛浸润的癌, 1 例为癌肉瘤。此外还诱发出 7 例肉瘤,其中 4 例为纤维肉瘤, 3 例平滑肌肉瘤。颈段穿线发生的癌见于穿线部位,很早即侵入邻近器官(气管、甲状腺等),长大的癌可以从外面看到或摸到。

3. 腹段粘膜下穿线结果 食管腹段穿线法虽然诱发出 35.7% 的癌,但在小鼠身上同时也发生了一些合并症,如脓肿及憩室。粘膜下穿线法就是针对这些问题而改良的方法之一。如表所示,30 只昆明种小鼠经过 80~109 天后,发生了 11 例癌,其中广泛浸润的癌 6 例,浸润性癌 4 例,早期癌 1 例。另一批 29 只昆明种小鼠的实验,经过 20~164 天,发现 3 例早期癌, 3 例肉瘤(1 例纤维肉瘤, 2 例平滑肌肉瘤)。粘膜下穿线法引起较少的脓肿与憩室,小鼠中途死亡的也较少。

(三) 食管癌发生部位

在各次实验中,诱发出的70例食管癌都发生在食管穿线的部位(腹段或颈段),其中有的发生于上皮隧道口(图7),或人工憩室之壁,由此再侵入食管壁。

表1 动物食管上皮各级病变的例数,种类及级别

穿线部位	实验动物种类	动物数	实验天数	食管上皮病变级别						平滑肌肉瘤	纤维肉瘤	纤维瘤
				0级	I级	II级	III级	IV级	V级			
				无病变	增生性病变	癌前病变	早期癌	浸润性癌	广泛浸润的癌			
腹段粘膜穿线	A系小鼠	56	46~137	22	10	4	9	3	8			
	昆明种小鼠	37	17~195	11	9	3	6	1	6			1
	"	47	26~42	9	25	6	4	1	2			
	"	66	16~189	25	18	13	4	1	5*			
	Wistar大鼠	24	24~264	16	6	2						
	"	55	334	45	7	2				1		
	中国地鼠	20	252	11	7						2	
颈膜穿线	昆明种小鼠	78	36~271	57	8		2		4*	3	4	
腹下段穿膜线	昆明种小鼠	30	80~109	8	6	5	1	4	6			
	"	29	20~164	13	8	2	3			2	1	
对照穿空(腹段粘)	昆明种小鼠	18	3~354	15	3							
	Wistar大鼠	12	354	10	2							

* 其中1例有为癌肉瘤。

(四) 食管及邻近器官的病变

动物食管在穿上含致癌物质的线段后,有时发生了急性和慢性食管炎,不少病例还合并食管旁脓肿或肝脓肿。围绕穿入食管壁的线段可见新旧肉芽组织和异物肉芽肿的形成,很快(3~4天内),被鳞状上皮长入,形成一条上皮隧道将线包围(图7),可能一部分线段因此被推出腔内而脱失。被穿过的肌层常见瘢痕形成及使肌层中断,而此处则多见到局部的粘膜膨出,形成所谓人工憩室(图1)。有时憩室体积相当大,其壁由新生上皮被覆,腔内充满食物,憩室壁还发生慢性炎症及溃疡形成。此外,在实验动物的胃,除1例中国地鼠的前胃发现由于胃壁脓肿引起的上皮乳头状增生,1例大鼠由于食管下段的纤维肉瘤浸润前胃,引起的乳头状肉瘤以外,所有其余动物的前胃及腺胃以及其他部位或器官都没有发现癌或其他有关病变。

讨 论

动物食管鳞状上皮癌的诱发,国内外都有过一些尝试,但尚未获得令人满意的结果。

Stewart 氏的实验只引起了小鼠几例早期食管癌; Druckrey^[3]、Schoental^[4]等报导在研究亚硝酸类衍生物的致癌性时,除诱发出了大鼠的胃癌外,还意外地发现食管癌。Horie^[5]最近报告使用致癌物质的酒精溶液用强迫饮用的方法,经过 187 及 565 天分别引起 2 例小鼠食管鳞癌。他们使用的方法比较接近实际情况,能解释一些发病因素,但诱发率很低,时间较长,且同时诱发较多的前胃、咽、舌、下腭和皮肤等处的癌。本文实验的结果说明,使用含碳氢化合物类的致癌物质的棉线,穿在小鼠食管腹段、颈段及腹段粘膜下的三种方法,都能在 2~6 个月内诱发出食管鳞状上皮癌。其中最早发生的一例早期癌为 16 天,浸润性癌为 59 天,广泛浸润的癌为 56 天。都属于腹段穿 MC 线的昆明种小鼠。癌的发生部位都比较固定在穿线部位,是本法的一个特点。同时由于与致癌物质接触的上皮只是线穿过的地方,因此没有同时在其他部位和器官引起癌,这些特点有利于验证发病条件和作为实验治疗的工具。在诱发出的 70 例癌中,63 例是鳞状细胞癌,2 例为癌肉瘤(鳞癌+纤维肉瘤),癌的类型比较一致。此外,还有不少属于食管上皮的癌前病变,如不典型增生、乳头状增生及乳头状瘤等。诱发出的食管癌及癌前病变的组织类型与人类的食管鳞癌非常相似。但诱发率还比较低(约 35.0%)可能有三个原因:①线段上所沾的致癌物质较少(0.7~2.5 毫克),而与上皮细胞直接接触的量又是不多的,因为只有穿过食管壁的二个孔道才能发挥作用。②诱发时间尚短因此部分动物只是呈现癌前病变,尚未演变成癌。③线结可能早期脱落。这说明用穿线法诱发食管癌还必须克服如感染、憩室形成与避免线的脱落等问题。在后几个实验,我们将线的两端相互打成一结,克服了线结脱落的缺点,而从前腹壁手术切口剪一块腹壁组织代替了大网膜来包缠穿线部位,也减少了一部分食管旁脓肿的发生。在进一步探索其他方法时,还必须考虑改进使用灌喂方法,并设法延长致癌物质在食管内停留时间或直接涂抹食管粘膜等方法。

在我们应用的几种试验动物中,A 系与昆明种小鼠的食管上皮对碳氢化合物类致癌物质的致癌作用显然是比较敏感的,因为全部 70 例癌都发生在它们身上。在中国地鼠及 Wistar 大鼠都未能诱发出癌,而且早期的上皮性病变也很少,说明利用碳氢化合物类致癌物质,和用穿线方法诱发食管癌,中国地鼠与大鼠不是适宜的动物。

总 结

使用含有致癌物质(MC, DMBA) 0.25~0.5 毫克的棉线穿在食管腹段、颈段管壁或腹段粘膜下的三种方法,经 2~6 月,在昆明种及 A 系小鼠都能诱发出食管癌。其诱发率在腹段法分别为 20/56, 13/37, 7/47 及 10/66 例;颈段法为 6/78 例,腹段粘膜下法分别为 11/30 及 3/29 例。在这诱发出的 70 例食管癌中,31 例为广泛浸润的癌(V 级),10 例为浸润性癌(IV 级),29 例为早期癌(Ⅲ级)。除其中 2 例为癌肉瘤外,其余 68 例都属鳞状上皮癌。此外还发现食管的平滑肌肉瘤与纤维肉瘤以及上皮的不典型增生、内生性上皮瘤、早期上皮浸润、乳头状增生、乳头状瘤和原位癌等食管上皮的早期病变。这些癌及病变都发生在线穿过食管壁所形成的上皮隧道壁或发生在与隧道连通的人工憩室的上皮,由此直接侵入食管壁或突入食管腔内。在中国地鼠及大鼠都没有发现癌。实验结果说明,小鼠食管上皮与碳氢化合物类化学致癌物质的直接接触,是可以发生癌变的。食管腹段与颈段穿含有致癌物质棉线方法是一个可用的食管癌造模法,它具

有方法简便、节省致癌剂、诱发率可达35%，癌的发生部位固定，癌的组织类型比较一致，出现时间较早等特点。昆明种和A系小鼠是比较合适的动物。

杨简、陈妙兰、金英、卞春云、王淑华（1965年完成）

参 考 文 献

1. Stewart, H. L., Lorenz, E., J. Nat. Cancer. Inst., 10:147, 1949.
2. Druckrey, H., Proussmann, R., Schmaehl, D. und Mueller, M., Naturwiss., 48:165, 1961.
3. Druckrey, H., Proussmann, R., Schmaehl, D. und Blum, G., Naturwiss., 48:722, 1961.
4. Schoental, R., Brit. J. Cancer., 16:92, 1962.
5. Akio Horie, Soishi Koheni and Masasori Kuratsune, Gann, 56:429, 1965.
6. 杨简, 陈妙兰, 金英: 食管癌实验诱发的初步报告, 肿瘤学附刊, 2 (4):340, 1964.

二、甲基苄基亚硝胺诱发大鼠食管癌的观察

自1958年以来, 在全国不同的省份已相继发现食管癌的高发区。河南林县坚持了十多年的现场工作, 多次的现场病因调查与对比调查^[1,2], 为食管癌病因的探讨提供了大量宝贵资料^[3], 各种可疑病因线索有待进一步的验证。

食管癌具有明显的地区性分布这一特点, 使我们首先考虑水土环境中的致癌因素问题。近几年来, 已引起世界科学工作者的极大注意。特别自1956年 Magee 等应用亚硝胺诱发大鼠肝癌成功后^[10], 各国学者相继对亚硝胺及其前身物质仲胺和亚硝酸盐在环境中分布的调查, 及动物实验研究进行了大量的工作^[3,4,11-22]。1961年 Druckrey 和 Schoental, Magee 等人用亚硝胺在大鼠选择性的诱发出了食管癌^[23,24,25]。1968年 Mc. Glashan 等提出关于亚硝胺与食管癌关系的引人注目的报导^[18]。对于非洲班图地区和赞比亚食管癌高发区, 一些学者也提出了亚硝胺的病因问题^[26-28]。国外大量的关于亚硝胺与食管癌关系的论述^[4], 对于探讨我国食管癌的病因, 提供了极为重要的线索。

根据林县食管癌防治工作的要求, 为了进一步探讨其病因及发病条件, 一方面已在林县现场开展了环境中亚硝胺及其前身物质以及微量元素的测定^[5], 另一方面在我们研究组进行了亚硝胺致癌的实验研究, 希望制成理想的食管癌动物模型, 为验证发病条件, 抗食管癌药物的定向筛选, 以及癌变理论的研究等工作提供材料。

材料与方法

实验选用了我院第三研究室肿瘤生化组合成的甲基苄基亚硝胺, (methyl-benzyl-nitrosamine 简称 MBNA)。

实验分为以下四组:

(一) MBNA 诱发大鼠食管癌实验组

体重100~120克的 Wistar 系大鼠116只, 雌雄各半。10只一笼, 分笼饲养, 喂以标准硬块饲料及自来水。

每天用针管(9号腰麻穿刺针头)灌喂0.2%的 MBNA 水溶液。每周七次。分两个剂量组:

1mg/kg/日组: 98 只大鼠。

5mg/kg/日组: 18 只大鼠。

每天观察体征。每周称体重一次, 以调整灌喂药量。5mg 剂量组连续给药至动物自行死亡。1mg 剂量组每月处死 5~8 只, 以便观察病变的动态, 至 10 个月将全部动物用乙醚麻醉方法处死。解剖检查食管及各重要脏器 (肝、肺、脾、肾)。石蜡包埋, 苏木素-伊红染色。

(二) 甲基苄胺与亚硝酸钠内合成诱发大鼠食管癌实验组

Wistar 系大鼠 26 只。实验组 17 只, 每天灌喂 10% 的甲基苄胺油溶液和 10% 的亚硝酸钠水溶液。剂量各为 40mg/kg/日。另对照组大鼠 9 只, 每天只灌喂 10% 的甲基苄胺油溶液。剂量也为 40mg/kg。

(三) MBNA 短期大剂量 (冲击量) 诱发大鼠食管癌实验组

Wistar 系大鼠 12 只, 分为两个小组: 一组 5 只大鼠, 每日灌喂 0.4% 的 MBNA 水溶液, 剂量为 15mg/kg, 共给药 10 次。另一组 7 只大鼠, 每日灌喂 0.2% 的 MBNA 水溶液, 剂量为 5mg/kg, 共给药 16 次。停药后每日观察体征及体重的变化。至动物自行死亡。处理方法同上。

(四) MBNA 通过胎盘诱发仔鼠食管癌实验组

雌性成年 Wistar 系大鼠 7 只, 在交配后的整个怀孕期, 每日灌喂 0.2% 的 MBNA 水溶液, 剂量为 1mg/kg, 至仔鼠生下后停药。仔鼠共 41 只, 不加任何处理, 饲养至成年后处理。

根据我们动物室的观察与国外资料记载, Wistar 系大鼠从来未见到自发的食管癌^[30-33]。

实验结果

(一) 1mg/kg 剂量组

98 只大鼠按给药时间的长短 (每月一组, 1~10 个月) 共分为 10 个小组 (I~X)。

1. 体征与体重的变化 实验的早期未见明显的毒性反应。体重稳步上升, 每周平均增长 10 克左右。在整个实验过程中约有 20% 的动物因肺炎而死亡。

在实验的后期, 食管发生肿瘤后, 皮毛蓬松, 活动减少。晚期呈现虚弱, 弓背和卷缩。最明显的症状是饮食减少。体重随之急剧下降, 至死亡前可减少 50 克左右。动物发生症状后, 一般只能存活 2~3 周 (少数大鼠可活得更长些, 但终因食管梗阻而饿死)。解剖时胃内大多是空虚的。

2. 食管的肉眼变化 可以分成: (1) 无明显变化; (2) 粘膜增厚; (3) 白斑形成; (4) 乳头状瘤 (图 11~14) 等四类 (表 1)。有关肉眼变化的详细描述见另文^[9]。

在实验的头四个月, 约有一半动物的食管肉眼上有明显变化。五个月后, 绝大多数动物的食管能看到变化。在肉眼变化中粘膜增厚最为多见, 共有 67 例; 其次为白斑形成 49 例。肉眼上见到的乳头状瘤共 42 例。乳头状瘤发生的最高峰在第 7 个月, 发生率为 13/17 例 (77%)。

3. 大鼠食管的病理组织学变化 在 MBNA 诱癌的过程中, 食管上皮的组织学变化是比较复杂的。我们按照它的组织学特征与可能的发展先后程序, 试把其分成 5 级 19 种

表1 MBNA (1mg/kg) 诱发大鼠食管癌食管粘膜肉眼变化例次统计表

组别	给药天数	MBNA 总剂量 mg/kg	动物数	肉眼变化			
				无明显变化	粘膜增厚	白斑形成	乳头状瘤
I	30(15~43)	15~43	8	4	3	0	1
II	60(60~64)	60~64	7	2	2	2	2
III	95	95	6	2	4	3	2
IV	123(120~136)	126~136	9	5	4	2	1
V	152(141~167)	141~167	12	3	6	6	6
VI	185(176~203)	176~203	12	3	8	8	6
VII	210(203~227)	203~227	17	2	15	13	13
VIII	240(237~256)	237~256	7	0	7	6	4
IX	270(263~290)	263~290	7	0	7	4	3
X	305(294~307)	294~307	13	2	11	5	4
总		和	98	23	67	49	42

病变类型。

0级：无病变。

I级：增生性病变。包括基底细胞增生，单纯增生，花蕾样增生，外突型乳头样增生，内翻型乳头样增生，角化亢进和白斑形成。

II级：癌前病变。包括早期乳头状瘤，外突型乳头状瘤，内翻型乳头状瘤，上皮早期浸润，上皮不典型增生和脐样病灶。

III级：早期癌瘤。包括乳头状瘤癌变，原位癌和早期癌。

IV级：癌。包括乳头状癌和浸润性癌。

上述各种病变的详细描述及其间的相互关系见另文^[9]。

(1) 食管上皮各种病理组织学变化的统计分析：见表2。

0级，无病变：在实验的早期仅见一例食管上皮没有变化。

I级，增生性病变：发生较早，而且例次均较高。在实验的第一个月即已出现。以后发生的例次逐渐增多。

基底细胞增生是病变中最常见的（图13），共97例。它是各种病变发生的基础。单纯增生居第二位，共79例。基底细胞花蕾样增生有36例。乳头样增生中，外突型与内翻型的发生率无明显差别，前者为28例，后者为27例。角化亢进和白斑形成是很常见的，分别占66例和55例。

II级，癌前病变：有50例大鼠发生了乳头状瘤（表4），其发生率仅次于基底细胞增生和单纯增生，为本实验最常见的一种食管良性肿瘤。乳头状瘤在镜下可以分为外突型（图14）和内翻型两大类。外突型（40只大鼠共发生70例次）比内翻型（23只大鼠共23例次）约多一倍。而且发生的早（第27天），至于内翻型乳头状瘤到实验的第95天时才开始发生。早期乳头状瘤和内翻型乳头状瘤在肉眼上不易看出，因此经切片确诊的乳头状瘤（50例）比肉眼看到的（42例）例数要多。在外突型乳头状瘤中又分为早期的，狭基有蒂的和宽基无蒂的3类。其中早期的共21例；狭基有蒂的最多见，共32例，宽基无蒂的较少，只17例，发生的也比较晚。在同一只大鼠的食管上，可以同时发生多

种类型的乳头状瘤，在 50 只大鼠上各种类型的乳头状瘤共发生 93 例次。其最高发生率在 6~8 个月。上皮早期浸润共有 18 例，集中于 7~9 个月，最高发生率为 3/7 例（43%）。上皮的不典型增生是少见的，仅有 11 例，自实验的第 4 个月才开始出现。发生率在 7~8 个月最高，为 5/17 例和 2/7 例（约 30%）。“脐样病灶”也是较常见的病变，共 23 例，很早即出现（第 1 个月），在第 10 月发生率最高，达 8/13 例（62%）。

表 2 MBNA (1mg/kg) 诱发大鼠食管癌食管各种病变在不同时间发生例次统计表

组别	给药天数	MBNA 总剂量 mg/kg	动物 数	正常	增生性病变							癌前病变					早期癌	癌
				0 级	I 级							I 级					II 级	IV 级
				无病	基底细胞增生	单纯增生	花蕾样增生	外突型增生	内头翻样增生	角化增生	白斑形成	外突型乳头状瘤	内头翻样增生	上皮早期浸润	不典型增生	脐样病灶	乳头状瘤癌变	原位癌
				变	生	生	生	生	生	生	生	早期	狭基有蒂	宽基无蒂	翻样型	早期浸润	早期	晚期
I	30(15~43)	15~43	8	0	8	7	2	1		4	2	1	1				1	
II	60(60~64)	60~64	7	1	6	5				3	2	3						
III	95	95	6	0	6	4	2	2	2	1	3	1	1		3	1		
IV	123(120~136)	120~136	9	0	9	3	2	3		3	3	1	1	1		1	1	3
V	152(141~167)	141~167	12	0	12	9	5	3	4	10	10	3	3	1	2	1	2	1
VI	185(176~203)	176~203	12	0	12	11	5	4	5	11	7	3	5	4	4	2	3	2
VII	210(203~227)	203~227	17	0	17	14	3	7	6	16	12	6	9	4	5	5	5	4
VIII	240(237~256)	237~256	7	0	7	7	6	2	2	6	4	3	4	4	2	3	2	2
IX	270(263~290)	263~290	7	0	7	6	5	3	2	5	6	2	3	1	4	3	1	1
X	305(294~307)	294~307	13	0	13	13	6	3	6	7	6	1	2	2	3	2	8	1
总和				98	1	97	79	36	28	27	66	55	21	32	17	23	18	11
																	23	14
																	2	3
																	5	6

III级，早期癌：共 19 例，其中乳头状瘤癌变是最多见的形式（图 15），共有 14 例，约占 30 例的各种食管癌的一半。第一例乳头状瘤癌变发生于第 185 天，总剂量为 185mg/kg。在第 7~8 个月，其发生率最高，分别达 7/17 例（41%）和 3/7 例（43%）。

原位癌是最少见的，仅有 2 例，但出现较早（154 天，总剂量为 154mg/kg）。早期癌也是很少见的，仅有 3 例。

IV级，癌：98 例大鼠中共发现癌 10 例，其中乳头状癌 5 例（图 18），浸润性癌 6 例（图 17）。一例大鼠同时发生了乳头状癌和浸润性癌。第一例乳头状癌发生于实验的第 176 天，总剂量为 176mg/kg。浸润性癌则开始于第 154 天，总剂量为 154mg/kg。

在 98 只大鼠中共有 23 只大鼠发生了各种癌瘤，共发生 30 例次。其中有 6 只大鼠同时发生 2 种以上的癌瘤：4 例在乳头状瘤癌变的同时，又发生了 2 例乳头状癌和 2 例浸润性癌；一例大鼠同时发生了原位癌和浸润性癌；另一例大鼠同时见有乳头状瘤癌变，乳头状癌和浸润性癌。乳头状瘤与癌发生于同一大鼠的就更多了。自 5 个月后乳头状瘤与癌的发生即有重叠现象。

在 MBNA 诱发大鼠的食管癌中，没有见到广泛浸润性的癌。癌仅侵犯到粘膜下层为止，还未见有侵入肌层的。局部淋巴结和肝、肺等脏器也未见有转移。曾多次把诱发