

肿瘤学基础及实验

主 编 高 进
副主编 章静波



北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社

87565

肿瘤学基础及实验

主 编 高 进

副 主 编 章 静 波

北 京 医 科 大 学 联 合 出 版 社
中 国 协 和 医 科 大 学

〔京〕新登字147号

肿瘤学基础及实验

主 编 高 进

责任编辑 高秋萍

*

北京医科大学
中国协和医科大学联合出版社出版

星城印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

*

787×1092毫米1/32 8.25印张 182千字
1992年2月第1版 1992年2月北京第1次印刷

印数：1—2000

ISBN 7-81034-078-6/R·78

定价：5.80 元

内 容 简 介

本书曾以讲义形式为中国协和医科大学研究生班讲课试用二年，经广泛征求意见后重新编写而成。内容包括肿瘤学实验研究中重要基础理论和所需基本技术以及研究方法。如实验室常用动物自发瘤，动物诱发瘤，可移植性瘤，瘤细胞侵袭和转移模型系统的建立和应用，以及组织培养技术、器官培养技术、分子杂交技术与电子计算机图像分析系统在定量研究中的应用等；在理论方面阐述了肿瘤分子生物学基础、恶性肿瘤细胞侵袭和转移机理的讨论等；介绍了免疫缺陷动物和无菌动物及其在肿瘤研究中的应用。本书作者根据本身肿瘤实验研究中的经验体会，并注重于内容的实用性、先进性、理论性和前瞻性，因此所含理论、方法与技术有较高的应用性、可重复性与可靠性，可供从事肿瘤学实验研究工作者阅读和参考，对研究生和医学生也是一本必备的教材与工具书。

参加本书编写人员

主 编：高 进

副主编：章静波

编 委：李敏民 中国中医研究院图书情报研究所

汪 歌 中国医学科学院实验动物研究所

高 进 中国医学科学院基础医学研究所

章静波 中国医学科学院基础医学研究所

1376/8

代 序

鉴于实验肿瘤学老前辈杨简教授生前在肿瘤实验研究方面做出的成绩，现引证其遗作中的有关内容作为本书代序。

“肿瘤的实验研究，目的是利用在动物内生长的肿瘤，探索及了解肿瘤生长的本质及规律，或寻找对肿瘤生长有抑制作用的药物与治疗方法。

实验肿瘤学的创立，标志着人类与肿瘤作斗争的过程跨进了一个新阶段。从此，人体肿瘤的错综复杂的现象，可以在被控制的条件下进行探索。……人们成功地移植了动物的肿瘤，为实验肿瘤学的创立奠定了基础。20世纪初，用煤焦油涂抹兔耳诱发出皮肤癌后，相继利用一些多环碳氢化合物、偶氮染料、亚硝胺以及致癌病毒或放射线等，几乎可以在动物中复制出所有与人类肿瘤相应的动物模型，为肿瘤研究提供了极为有利的条件。”*

“癌瘤的生物学行为……危害性最大的是浸润与转移。特别是浸润是一个关键问题。一个癌瘤如果不是具有这两个特性，癌症就不会是一个可怕的疾病了。因此，在抗癌斗争中对浸润与转移本质的了解，就成为中心工作之一。……目前在癌瘤还没有找到特异的疗法之前，对于如何控制浸润与转移的发生，以拯救更多的癌症病人，已再度成为一个重要的基础理论研究课题。”**

*摘自《病理学》（中山医学院编，1978年版）。

**摘自1977年全国肿瘤基础理论研究规划会上的中心发言：“有关肿瘤浸润与转移的一些问题”（浸润现已改为侵袭）。

前 言

恶性肿瘤是严重危害人类健康的常见病和多发病，全世界每年约有590万肿瘤新病人出现，同时每年死于癌症者约430万，几乎占全世界每年死亡总人数的1/10。在致死疾病中，按总死亡人数计，肿瘤占第二或第三位。目前我国肿瘤发病和死亡粗略估计为：每年约出现新病人100万人，死于肿瘤者80万人左右，待治者约150万人。我国死亡率最高的有9种肿瘤，依次为胃癌、食管癌、肝癌、宫颈癌、肺癌、肠癌、白血病、鼻咽癌和乳腺癌。这9种肿瘤占全部癌症死亡病人的89%，其中前3种即胃癌、食管癌和肝癌占全部癌症死亡病人的60%。^{*}许多国家癌症发病率还在继续增高。因此癌症研究是当前极为重要的课题。

肿瘤不仅是医学而更重要的是生物学问题。由于肿瘤本身的复杂性，给研究工作带来了极大困难。不难看出，要研究肿瘤发生的原因，肿瘤的演发 (development)，肿瘤的演进 (progression)，肿瘤细胞本身的生物学特性，肿瘤发展过程中宿主反应性，肿瘤基因调控等问题，必须从实验医学、实验生物学、细胞生物学、分子生物学、遗传学、免疫学、生物化学、生物物理学等多学科进行广泛探求。

肿瘤实验研究是肿瘤学中最基本的研究手段和途径。本书乃根据作者多年以至几十年肿瘤实验研究中的经验、体会和曾应用的各种技术方法及基本理论编写而成。全书包括实验病理学方法、细胞生物学方法、分子生物学方法等，并对肿瘤实验研究基本原理结合文献进行了讨论。本书基本属于工具书性质。由于时间仓促，未能广泛征求有关专家意见，加之作者水平有限，难免有错误或缺点，谨希读者批评指正。

^{*}引自李保荣“我国癌症防治研究的现状”(百科知识, 1986, (3): 59~62)

目 录

代序

前言

第一章 肿瘤实验研究发展简史·····	(1)
第二章 常用实验动物自发瘤及其病理学·····	(5)
一、概论·····	(5)
二、各类动物自发瘤·····	(6)
第三章 动物肿瘤模型及其应用·····	(38)
一、诱发肿瘤模型的建立及应用·····	(38)
二、可移植性肿瘤的建立及应用·····	(61)
第四章 免疫缺陷动物与其在肿瘤研究中的应用·····	(88)
一、免疫缺陷动物简介·····	(88)
二、裸小鼠的发现和简史·····	(94)
三、裸小鼠胸腺残遗器官及其它有关器官与 组织的研究·····	(95)
四、免疫缺陷动物在肿瘤研究中的应用·····	(100)
第五章 无菌动物的培育及其在肿瘤研究中的应用	(109)
一、无菌动物的基本概念·····	(109)
二、无菌动物发展简史·····	(110)
三、无菌动物的产生和培育·····	(111)
四、无菌动物的主要特征·····	(111)
五、国内无菌动物研究概况·····	(113)
六、无菌动物在肿瘤研究中的作用·····	(114)
第六章 组织培养及其在肿瘤研究中的应用·····	(118)
一、概论·····	(118)

二、肿瘤细胞的常见生物学通性·····	(125)
三、肿瘤组织的体外培养·····	(127)
四、建立人类肿瘤细胞系·····	(135)
第七章 器官培养在肿瘤研究中的应用·····	(142)
一、器官培养方法的简史·····	(142)
二、器官培养技术的分类·····	(145)
三、器官培养基本原理和在肿瘤研究中的应用·····	(146)
第八章 细胞杂交及其在肿瘤研究中的应用·····	(153)
一、细胞工程学—细胞杂交的基本概念·····	(153)
二、杂交细胞的基本特性·····	(154)
三、细胞片段的融合·····	(155)
四、杂种(融合)细胞的选择·····	(158)
五、杂种细胞的特性·····	(162)
六、细胞杂交技术在肿瘤研究中的应用·····	(165)
附录·····	(174)
第九章 癌基因、抗癌基因与肿瘤形成·····	(180)
一、癌基因的基本概念·····	(180)
二、癌基因的激活机理·····	(181)
三、癌基因产物及其在致癌中的作用·····	(183)
四、癌基因与肿瘤的转移·····	(186)
五、细胞杂交与抗癌基因·····	(192)
六、RB与p ⁵³ 基因的基本性质·····	(193)
七、抗癌基因与细胞周期的调控·····	(195)
第十章 癌细胞侵袭和转移特性的研究·····	(200)
一、癌细胞侵袭性的研究·····	(200)
二、癌细胞转移性的研究·····	(218)
三、癌细胞侵袭和转移的发生机制和相关	

问题的探讨.....	(236)
四、小结.....	(248)

第一章 肿瘤实验研究发展简史

人类为了认识和诊治肿瘤，曾采取各种不同方法和途径进行探索和研究，目的是为了能在人为控制的条件下对人类肿瘤错综复杂的现象和机理进行各种实验研究。按有记载的资料估计，已经历了约150多年漫长的时间，迄今，终于建立了较为系统和完整的肿瘤实验研究体系和方法学。肿瘤实验研究的发展大致可分为三个主要阶段：即第一阶段（1834年～1915年）为萌芽阶段，人们着手考虑如何使用实验研究手段去探索肿瘤的奥秘，进行了初步的肿瘤移植研究；第二阶段（1915年～1966年）为发展阶段，动物诱发肿瘤模型开始建立到大量可移植性动物肿瘤模型建立及应用；第三阶段（1966年～至今）为迅速发展阶段，裸小鼠发现和培育成功，开始直接利用人类肿瘤进行各种实验并广泛开展了体外培养研究。在第一阶段中，首先从人类肿瘤异种移植研究开始。如早在1834年Leidy第一个把人类肿瘤组织移植于蛙的皮下，并见人类肿瘤移植片有血管形成，但肿瘤本身未见进行性生长。这个实验虽并未得到肿瘤生长，但作者第一次做了如此大胆地尝试，在肿瘤实验性研究方面迈出了第一步。相继于1843年Klenck进行了肿瘤的同种移植，获得成功；1875年～1877年Новинский用几十只马和狗进行了肿瘤移植研究；1889年Wehr在狗身上，Hanau在大鼠身上以及Morau（1891年～1894年）在小鼠身上等先后进行同种移植并得到成功，为肿瘤实验研究奠定了基础。第二阶段，是指用化学致癌物诱发

出肿瘤，首次建立诱发性肿瘤模型，为发展阶段。1915年～1918年Yamagiwa, Ichikawa(山极和市川)首次用煤焦油长时间涂抹兔耳部皮肤，诱发出皮肤乳头状瘤和癌；相继1924年和1925年Kennaway用热解法（pyrolysis）成功地获得了致癌性煤焦油。这为肿瘤病因学和化学致癌作用的研究开辟了新的途径。此后人们从沥青中分离出不少多环芳香烃类致癌物。同时有偶氮染料、芳香胺类、病毒因素、放射线及其它物理因素致癌实验研究相继获得成功。特别是1956年发现了亚硝胺类致癌物，找出多种不同结构的亚硝胺有特异的器官亲和性，并经化学致癌物诱发出了过去未能得到特异部位的诱发肿瘤模型。1961年黄曲霉菌毒素致癌作用的确立，使肿瘤病因学等实验研究更向前推进了一步。此外在这50余年中肿瘤（包括诱发瘤和可移植性瘤）实验模型的建立也推动了肿瘤病因学的实验研究。因此，1956年后发展甚为迅速。第三阶段为迅速发展阶段。在长期以动物肿瘤为主要对象进行肿瘤实验研究的基础上，开始转向直接利用人类肿瘤在不同免疫缺陷动物（以T-细胞免疫缺陷的裸鼠为主）身上进行人类肿瘤各种不同的实验，同时也提出了许多新的观点，建立了许多新的技术。1966年Flanagan首次描述和报道了裸小鼠后，于1969年Rygaard等第一次将人类肿瘤成功地移植到裸小鼠并使其存活，相继1975年后裸大鼠被重新发现和不同联合免疫缺陷动物相继被培育成功。此后科学工作者开始直接利用人类肿瘤进行实验研究，使肿瘤实验研究有了长足的进展。在这个阶段提出了不少新观点，如恶性细胞失去接触抑制(contact inhibition)的观点，Fidler等首次证明恶性原发瘤内有不同转移能力细胞亚群存在等。新技术方面，如单克隆抗体的创立和应用，细胞杂交技术与分子生物学技术，

特别是癌基因技术在肿瘤实验研究中的应用等。这些新观点、新技术，对深入认识和揭示肿瘤本质具有重要意义。

与肿瘤实验研究有关的实验动物的发展，对肿瘤研究也起着举足轻重的作用。早期肿瘤实验研究中只使用狗、马、羊和鼠类等一般常规动物。1912年~1922年Slye等培育出近交系小鼠，即过去称之为“纯系动物”这对减少肿瘤实验中的个体差异和进行肿瘤移植创立了重要条件。40年代后无菌环境的设备隔离器(isolator)研制成功。1946年Reynier等培育成可供实验用的无菌动物（详见第五章），这为肿瘤实验研究又开辟了一个新的途径。相继英国医学研究院实验动物中心（Laboratory Animals Center）提出实验动物标准化的问题，并于1958年订出了实验动物标准。

我国实验性肿瘤研究始于40年代末和50年代初。40年代末李铭新教授等用去性腺雄性或雌性小鼠，在脾内移植卵巢200天或更长长时间后，诱发出卵巢肿瘤。解放后1953年开始创立了我国自己的可移植性瘤株。50年代末中国医学科学院实验医学研究所病理室杨简教授所领导的小组建立了我国第一个“肿瘤保种传代室”。1955年中国医学科学院实验医学研究所病理室李铭新教授培育成中国1号（C-1），1956年后天津医学院肿瘤研究室李漪教授培育成津白1（TA1）和津白2（TA2）等近交系小鼠。相继于60年代后肿瘤病因学实验研究，特别是结合我国高发的食管癌、肝癌、宫颈癌等病因学及癌变机理的实验研究，已在许多实验室内开展。70年代后建立了大量可移植瘤株，目前已达30株以上（详见第三章），并有30余系人类癌细胞系被建立。80年代初引进了不同免疫缺陷动物，多数省、市大的科研单位已建立了裸鼠培育室，并已制定出医学实验动物管理暂行条例。除动物实验的迅速

发展外, 器官培养、组织培养、单克隆抗体、酶标技术、细胞杂交、分子杂交等各种新技术的引进、建立和应用, 是肿瘤实验研究中不可缺少的重要先决条件。目前我国实验性肿瘤的研究正在蓬勃发展, 大量国外新技术被引进并应用, 众多的科技人才的成长, 已构成一支很强的实验肿瘤专业队伍, 而且建立了不少近代化实验室。现有肿瘤专业刊物7种以上, 已出版不少肿瘤实验性研究专著, 如《食管癌的实验研究》、《615近交系小鼠及其在实验肿瘤研究中的应用》等。这标志着我国肿瘤实验研究已步入国际先进行列。

(高 进)

参 考 文 献

1. 高进. 肿瘤模型复制. 见: 郭鹑编. 人类疾病的动物模型. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 27~43
2. Homburger F主编 (杨简、王衡文主译). 癌的病理生理学. 北京: 人民卫生出版社, 1965. 109~112, 459~566
3. 高进. 裸鼠建立的过程及其在肿瘤异种移植中的作用. 国外医学肿瘤分册, 1981. (2): 52~55
4. Abercrombie M. Contact inhibition and malignant(review). Nature. 1979. 281:259~262
5. Fidler I J and Kripke M L. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. Science, 1977. 197:892~895
6. 白希清主编. 病理学. 第2版. 北京: 科学出版社, 1987. 12~18. 785~834
7. 钟品仁主编. 哺乳类实验动物. 北京: 人民卫生出版社, 1983. 2~3
8. 诸建新, 李肇玖主编. 615近交系小鼠及其在实验肿瘤研究中的应用. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 1~4

第二章 常用实验动物自发瘤 及其病理学

一、概 论

动物自发瘤自然分布规律的研究属于比较肿瘤学的范畴。比较肿瘤学 (comparative oncology) 是肿瘤学中的一个分枝, 分自发瘤和实验性肿瘤两大部分。自发瘤包括植物肿瘤、多细胞动物自发瘤, 并涉及生物进化论等问题。实验性致癌作用、实验性肿瘤治疗及动物肿瘤的流行病学等研究是比较肿瘤学干线中分出的另些分枝; 实验性肿瘤免疫学、病毒致癌研究、化学致癌研究、放射线致癌研究, 其它物理因素致癌研究、肿瘤体外实验研究等也属于比较肿瘤学的分枝。上述分枝除自发瘤外, 统称实验肿瘤学。本章主要论述与实验性肿瘤有关的一些动物中的自发瘤及其病理学。

既往习惯将实验用动物误认作实验动物, 这是不确切的, 实际上实验动物仅是实验用动物中的一类。现已将实验用动物分为三大类。

(一) 实验动物: 为检查、鉴定、诊断、教学、制造原料等研究需要而进行驯养、繁殖、育成的动物, 如小鼠和大鼠, 还有仓鼠类、豚鼠、其它啮齿类与鹌鹑等, 均已实验动物化了。

(二) 家畜: 因人类社会生活需要而驯养、培育、繁殖、生产的动物、被转用于实验者有产业家畜 (猪、马、

牛、羊、鸡、鹅、鸽、兔等)和社会家畜(犬、猫等),其中部分家畜如Buggle狗、小型猪等已培育成实验动物,但品质尚不能与鼠类相比。

(三) 野生动物:是从自然界捕获的动物,如两栖类、爬虫类、鱼类(鲫鱼、泥鳅等)、无脊椎动物(蛤蜊类、墨鱼类、蟹类、海胆类)、鸟类、灵长类(猿猴等)。除少数外,一般不容易进行人工繁殖生产。

在相似的生态环境中,同一品系的动物个体在不同场所及时间内,各自所发生的自发瘤的比较肿瘤学观察,为肿瘤病因学、流行病学、病理学、诊断学、治疗学、药物学等研究提供了重要的依据。有的学者认为比较肿瘤学对生物进化的概念具有铺路石子的位置。前瞻性回顾动物自发瘤也的确给人类肿瘤如病毒病因等研究以启示。1908年和1911年Ellerman, Bang和Rous相继发现鸡白血病细胞和鸡肉瘤的滤过液可诱发鸡白血病和肉瘤。病毒诱发肿瘤的观点,当时虽未被人们所接受,但一些学者相继对其进行了探讨。1936年高癌系小鼠乳汁因子(乳腺癌病毒, Bittner virus)和1951年Gross对小鼠白血病病毒的鉴定,使科学工作者重视了人类肿瘤的病毒病因。现已发现了人类肿瘤如Burkitt氏淋巴瘤、鼻咽癌、白血病、肉瘤、乳腺癌、宫颈癌、肝癌等可能与病毒密切相关的证据。

二、各类动物自发瘤

鉴于自然条件下产生的自发瘤具有较大的研究价值,已引起人们的注视。

(一) 鱼类:大量检查证明,鱼类肿瘤与人类常见肿瘤

近似。很多资料提示，鱼类肿瘤的发生与环境污染，特别是水的污染有密切关系。肿瘤可发生于鱼类的各个部位，如皮肤的乳头状瘤、纤维瘤、软组织或一些器管的脂肪瘤、平滑肌瘤、横纹肌瘤、骨及软骨骨瘤、软组织及骨髓等部位的恶性淋巴瘤、神经肿瘤、黑色素瘤、还有各个部位的肉瘤和癌等。已知其中很多肿瘤如恶性淋巴瘤、乳头状瘤等，是由病毒引起的。

(二) 两栖类：实验中最常采用蛙的肿瘤。如北美的“豹蛙 (*Rana pipens*)”自发肾肿瘤就是1934年Lucke'详述的蛙肾腺癌。据Dawe报告，1905年生物学家Smallwood首次描述了蛙肾癌，并经研究证明由Herpes virus (称为Lucke'氏病毒)引起。1952年Lucke'又报道，10 000多只豹蛙中肾肿瘤的发生率为2.7%，雄性多于雌性，多数肿瘤位于双侧；北美豹蛙肾癌的自发转移与温度有关，温度在28°C时，转移率高达77%，而温度为7°~18°C时转移率仅为6%。McKinnell研究提出，其转移可能与细胞运动相关的骨架结构有关。

(三) 鸟类：鸟类肿瘤常见，多发于家禽，其中以鸡的肿瘤最为多见。禽类肿瘤发生的位次是，鸡占首位，鸽占第二位，其次为鸭、鹅、鸚鵡等。

1. 鸡肿瘤：鸡肿瘤多属恶性，其形态结构和来源繁多，如肌肉的肉瘤、白血病、卵巢癌等，尚有良性肿瘤如纤维瘤、乳头状瘤、平滑肌瘤等。江苏省检测67.36万只鸡结果显示，肿瘤检出率0.229%。概观其中部分肿瘤如白血病、骨石化病、马立克氏病、原发性肝细胞癌等，呈流行性发生或群发。一些与人类相同的肿瘤如食管癌、原发性肝癌，具有类似地理性分布的迹象，提示环境在致癌因素中的重要意义。鸡肿瘤的发生与年龄有关，如1岁龄时肿瘤发生率为