

老年 SD 大鼠自发性肿瘤的病理学观察

周晓丽, 张 倩, 高 峰, 钱智勇

(天津市疾病预防控制中心毒理科, 天津 300011)

[摘要] 目的 观察 SD 大鼠自发性肿瘤发生情况, 为开展新药致癌试验提供背景数据。方法 某项致癌试验正常对照组中 4 周龄 SPF 级 SD 大鼠共 120 只, 雌雄各半, 实验前观察 1 周, 常规饲料饲养 104 周后实施安乐死。对实验期间死亡大鼠和处死大鼠进行解剖后称量心、肺、肝、脾、肾、肾上腺、胸腺、脑、睾丸和附睾(或子宫)等器官, 常规病理学取材制片后光学显微镜观察各脏器自发肿瘤的类型和发生率。结果 共观察了 113 只 SD 大鼠(试验过程中损失了 7 只), 患瘤大鼠占 66.4% (75/113), 其中良性肿瘤占 48.7% (55/113), 恶性肿瘤占 17.7% (20/113)。雄性大鼠发生肿瘤 49.1% (28/57), 其中良性肿瘤占 50.9% (26/57), 恶性肿瘤占 3.5% (2/57); 良性肿瘤主要是垂体腺瘤(36.8%)和肾上腺髓质腺瘤(7.0%), 恶性肿瘤主要是甲状腺腺癌(1.8%)和纤维肉瘤(1.8%)。雌性大鼠发生肿瘤 83.9% (47/56); 其中良性肿瘤占 51.8% (29/56), 恶性肿瘤占 32.1% (18/56); 良性肿瘤主要是垂体腺瘤(50.0%)、乳腺纤维腺瘤(12.5%)和乳腺腺瘤(12.5%), 恶性肿瘤主要是乳腺腺癌(25.0%)和纤维肉瘤(3.6%)。结论 正常饲养的 2 岁多的 SD 大鼠自发肿瘤发生率较高, 且良性肿瘤发生率高于恶性肿瘤, 可能与衰老、肿瘤以及个体差异有关。

[关键词] 自发性肿瘤; 病理学观察; SD 大鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0420-06

新药致癌性研究是药物非临床安全性评价的重要内容, 通过考察药物在动物体内的潜在致癌作用, 评价和预测可能对人体造成的危害, 并以风险控制计划、说明书、临床监察、上市后监测等手段进行风险控制^[1]。由于致癌试验需要 6 个月以上甚至更长(国际上致癌试验一般周期为 24 个月)的动物给药时间, 对动物质量(高质量的动物可避免自发疾病对试验结果的影响)、动物房环境、动物福利以及操作人员的技术要求(比如避免连续 24 个月经口给药时发生操作失误)比较高。在致癌试验动物(尤其是大鼠的

品系)选择中, 针对不同药物可以更好更合理挑选动物品种、品系和性别(如果需要)。在组织病理分析和诊断中, 更准确判断肿瘤和药物的关系, 综合评价药物对动物的致癌影响^[2]。根据本实验室最近开展的一项 SD 大鼠致癌试验, 本文分析该试验中对照组 120 只 SD 大鼠喂饲 2 年后的各种肿瘤发生率, 并进行病理学观察。由于对照组未经染毒和任何人为干扰, 可以认为其发生的肿瘤病变及其发生率的高低在进行致癌试验结果评价时具有重要的参照价值。另外, 不同品系及不同批次大鼠的自发肿瘤及其发生率可存在一定的差异, 本文进一步丰富了现有 SD 大鼠自发肿瘤病变及其发生率的资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物和饲养环境

致癌试验中正常对照组 SPF 级 SD 大鼠 120

[收稿日期] 2019-11-05

[作者简介] 周晓丽(1987—), 女, 技师, 研究方向: 维生素对高脂血症的作用与机制。

E-mail: zxl88224@126.com

[通信作者] 钱智勇(1971—), 主任技师, 研究方向: 转基因食品的安全性评价。E-mail: qzyong@sohu.com

只,雌雄各半,体质量40~60 g,4周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2012-0001]。所有大鼠饲养于天津市疾病预防控制中心屏障设施内[SYXK(津)2014-0001],室温控制在20~25℃,相对湿度40%~70%,12 h照明,12 h黑暗。动物按不同性别分笼饲养,对照组食用常规动物饲料,自由饮水,每周更换1次鼠盒及垫料。所有动物检疫观察1周,即观察动物的活动、饮食等表现。动物在使用前,经兽医检查合格后进行致癌试验。

1.2 仪器与试剂

全自动 Thermo 染色机购自美国 Thermo Electron 公司,ASP3000 全自动封闭脱水机和 EG1150H 石蜡包埋机购自德国 Leica 公司,BX51 显微镜购自日本 Olympus 公司,CP323S 天平购自德国 Sartorius 公司,苏木精和伊红染色液购自哈尔滨格林标本技术开发有限公司。

1.3 大体病理学检查

致癌试验周期为104周,试验结束后用戊巴比妥钠(50 mg/kg,腹腔注射)麻醉动物,通过腹主动脉取血法将动物安乐死。常规检查动物体质、发育和营养状况,检查口、鼻、外耳、肛门和外生殖器有无异常。系统剖检包括脏器的位置、大小、色泽和质地是否正常,有无粘连、肿瘤等,胸腔、心包、腹腔及颅腔有无积液或出血。着重检查皮肤、皮下及各脏器有无包块,注意包块的色泽、硬度和大小等。试验期间每日进行临床观察,将自然死亡与濒死的动物及时进行剖检。

1.4 组织病理学检查

对致癌试验过程中死亡的动物、因濒死而被处死的动物、试验结束时所有存活动物处死后均进行全面的大体解剖,解剖时详细记录肿瘤的部位、形状、大小、质地、颜色和肿瘤个数等。将下列组织用质量分数4%的甲醛溶液固定,供进一步组织病理学观察:病变及肿瘤组织、脑(包括大脑、小脑、脑干)、脊髓、心、肺、气管、肝、脾、肾、胰、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、膀胱、肾上腺、垂体、甲状腺(包括甲状旁腺)、胸腺、附睾、睾丸、前列腺、卵巢、子宫、肌肉、

骨、淋巴结和眼球等脏器。取固定的组织和器官,经脱水后石蜡包埋,切片(厚度为3~5 μm),苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜检查。诊断术语参照美国毒性病理学会(Society of Toxicology Pathology)指导文件 *Standardized System of Nomenclature and Diagnostic Criteria*。天津市疾病预防控制中心毒理科负责进行组织病理学检查,并计算各种肿瘤病变的发生率。

1.5 数据处理和统计分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均值间比较采用独立样本 *t* 检验,率的比较用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

对120只SD大鼠在不同时间段的死亡率进行统计。由于试验过程中死亡7只,且发现时脏器已发生自溶,失去病理学观察意义,因此仅对113只大鼠进行了病理学检查,其中雌性大鼠56只,雄性大鼠57只。试验期间观察到这些大鼠的临床主要表现为体表肿块、脱毛、步态异常、活动减少、消瘦、腹泻、会阴污秽、眼有血性分泌物等,个别动物出现下肢瘫痪和血尿。

2.2 死亡率

雌性大鼠最早死亡时间为试验第49周,雄性大鼠最早死亡时间为第62周。死亡动物解剖时未发现异常,病理学观察无器质性病变。试验第27~52周时动物死亡率为1.7%(2/120),雌性大鼠死亡率略高于雄性大鼠;随着时间延长,死亡率呈现递增趋势,第53~78周死亡率为16.7%(20/120),雌雄大鼠死亡率相当;第79~104周死亡率为41.7%(50/120),雌性大鼠死亡率高于雄性(表1)。

表1 20只SD大鼠不同时间段死亡率

Table 1 Mortality of 120 SD rats in different time periods

死亡时间	动物数 (n=120)	雌性 (n=60)	雄性 (n=60)	[n(%)]	
				P 值	
第27~52周	2(1.7)	2(3.3)	0(0)	0.081	
第53~78周	20(16.7)	10(16.7)	10(16.7)	1.000	
第79~104周	50(41.7)	28(46.7)	22(36.7)	0.152	

2.3 肿瘤发生情况

总体肿瘤发生率为 66.4%，单发和多发性肿瘤比例相似，详见表 2。

表 2 113 只 SD 大鼠自发性肿瘤发生情况

Table 2 Spontaneous tumorigenesis in 113 SD rats

肿瘤发生 情况	动物数 (n=113)	雌性 (n=56)	雄性 (n=57)	P 值
所有肿瘤	75(66.4)	47(83.9)	28(49.1)	<0.001
良性肿瘤	55(48.7)	29(51.8)	26(50.9)	0.887
恶性肿瘤	20(17.7)	18(32.1)	2(3.5)	<0.001
单发肿瘤	40(35.4)	17(30.4)	23(40.4)	0.138
多发肿瘤	35(31.0)	30(53.6)	5(8.8)	<0.001

2.4 良性肿瘤病理类型

雄性大鼠以垂体腺瘤最多见（36.5%），其次是肾上腺髓质腺瘤（7.0%）。垂体腺瘤在解

剖时可见垂体肿大，大小约 0.3 cm × 0.4 cm × 0.4 cm，可与周围组织完全剥离，有些可见局部出血；主要表现为嗜酸性腺瘤、嗜碱性腺瘤、嫌色细胞腺瘤和混合细胞腺瘤，其中嗜酸性细胞腺瘤多见，嫌色细胞腺瘤少见。其他的良性肿瘤有肾上腺皮质腺瘤、甲状腺瘤、皮肤纤维瘤和脂肪瘤等。

雌性大鼠以垂体腺瘤（50.0%）、乳腺纤维腺瘤（12.5%）和乳腺腺瘤（12.5%）最多见。垂体腺瘤临床表现和大体解剖所见与前述的雄性大鼠基本相同。乳腺良性肿瘤大体解剖可见乳腺部位皮下单个或多个肿块，最大直径可达 11~16 cm，可与周围组织剥离，灰白色或伴有红色区域。雌性大鼠其他良性肿瘤病变有肾上腺髓质腺瘤、皮肤纤维瘤、甲状腺腺瘤、子宫内膜息肉和子宫平滑肌瘤等（表 3）。

表 3 SD 大鼠良性肿瘤病变类型及发生率

Table 3 Histological types and incidences of benign neoplastic lesions in SD rats

发生部位或脏器	肿瘤类型	动物数(n=113)	雌性(n=56)	雄性(n=57)	P 值
垂体	腺瘤	49(43.4)	28(50.0)	21(36.8)	0.064
肝	血管瘤	1(0.9)	0(0)	1(1.8)	0.155
大脑	海绵状血管瘤	1(0.9)	1(1.8)	0(0)	0.155
肾上腺	皮质腺瘤	9(8.0)	5(8.9)	4(7.0)	0.602
胰腺	胰岛细胞瘤	1(0.9)	0(0)	1(1.8)	0.155
甲状腺	腺瘤	4(3.5)	2(3.6)	2(3.5)	0.989
乳腺	腺瘤	7(6.2)	7(12.5)	0(0)	—
	纤维腺瘤	7(6.2)	7(12.5)	0(0)	—
子宫	内膜息肉	1(0.9)	1(1.8)	0(0)	0.155
	平滑肌瘤	1(0.9)	1(1.8)	0(0)	0.155
皮肤	纤维瘤	7(6.2)	4(7.1)	3(5.3)	0.552
	脂肪瘤	1(0.9)	0(0)	1(1.8)	0.155

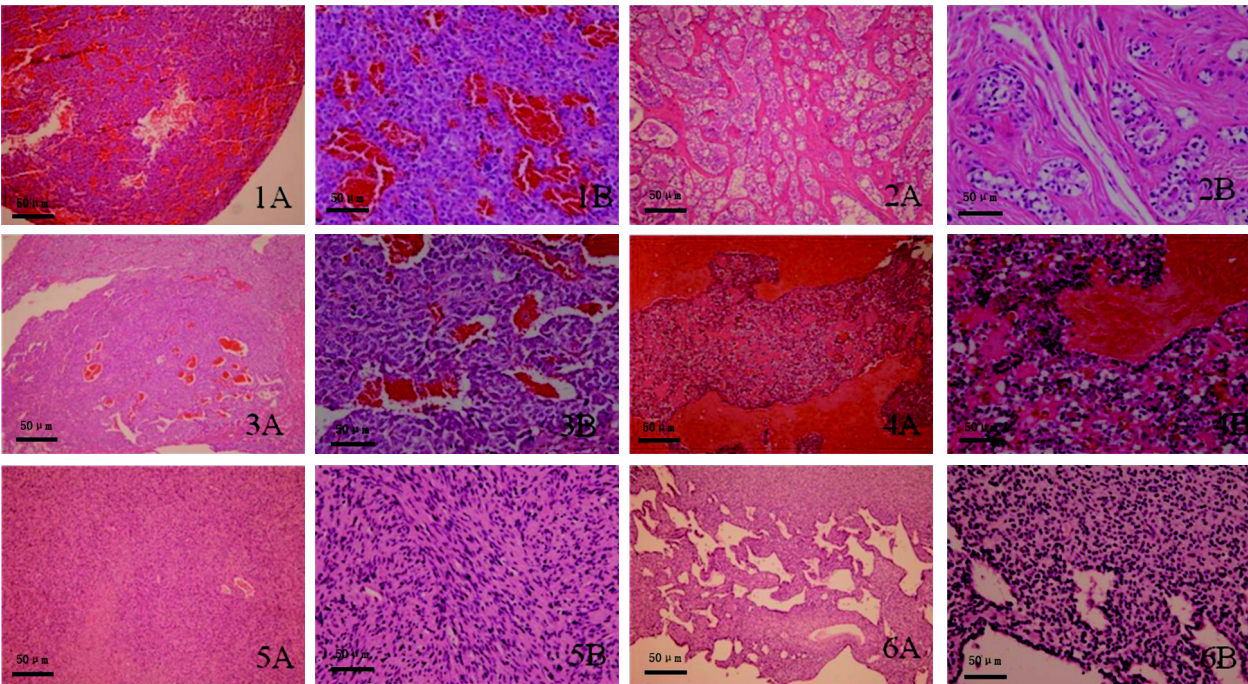
2.5 恶性肿瘤病理类型及其发生率

从表 4 可见，雄性大鼠恶性肿瘤主要有甲状腺癌（1.8%）和皮肤纤维肉瘤（1.8%），雌性大鼠恶性肿瘤主要有乳腺癌（25.0%）、皮肤纤维肉瘤（3.6%）、膀胱移行上皮细胞癌（1.8%）和肝癌（1.8%）等。有的动物腮部出现肿瘤，刚发现时多为直径约 1 cm 的轻微隆起，长到直径约 3~5 cm 时呈球形隆起，后期肿瘤表面溃破，内部坏死，肿瘤压迫一侧眼睛和耳朵，也影响口腔摄食，解剖时与周围组织界限不清，经

病理检查其为腺癌。发生于内脏器官的恶性肿瘤多数在动物死亡后才发现，可见恶性肿瘤病变已扩散到周围组织，与周围组织粘连在一起，或扩散至全身器官。此外，生长在皮下的球形恶性肿瘤病变与皮下良性细胞球形肿瘤的临床和大体解剖情况类似，但生长较快，瘤体较大，肿瘤中心部位可见坏死，病理类型为纤维肉瘤，一般并发脾脏肿大，光学显微镜下可见脾脏髓外造血增加。典型肿瘤组织经 HE 染色后病理学观察结果见图 1。

表 4 SD 大鼠恶性肿瘤病变类型及发生率
Table 4 Histological types of malignant neoplastic lesions in SD rats and their incidences

发生部位或脏器	肿瘤类型	动物数(n=113)	雌雄(n=56)	雄性(n=57)	[n(%)] P 值
肝	肝癌	1(0.9)	1(1.8)	0(0)	0.155
乳腺	腺癌	14(12.4)	14(25.0)	0(0)	< 0.001
膀胱	移行上皮细胞癌	1(0.9)	1(1.8)	0(0)	0.155
甲状腺	腺癌	1(0.9)	0(0)	1(1.8)	0.155
皮肤	纤维肉瘤	3(2.7)	2(3.6)	1(1.8)	0.407



1A 和 1B 示垂体嗜酸性腺瘤，瘤细胞体积较大，核圆形或染色浅，细胞质丰富嗜酸性，细胞排列成巢状；2A 和 2B 示乳腺纤维腺瘤，腺上皮和纤维细胞呈肿瘤性增生；3A 和 3B 示肾上腺髓质腺瘤，瘤细胞质丰富，排列成巢或团索状；4A 和 4B 示乳腺癌，癌细胞呈单层或多层乳头状增生；5A 和 5B 示皮肤纤维肉瘤，肉瘤细胞短梭形，大小不一，核染色深，可见核分裂象；6A 和 6B 示膀胱移行上皮细胞癌，移行上皮细胞可见细胞异型性和分裂象，向周围组织浸润。A 为 HE 低倍视野，B 为 HE 高倍视野。

图 1 大鼠自发性肿瘤病理组织学观察（HE 染色）
Figure 1 Pathological observation of spontaneous tumors in rats (HE staining)

3 讨论

自发肿瘤是大鼠生物学特征的重要表现形式之一。自 1979 年开始，有报道显示裸小鼠可自发肿瘤，随后国外陆续有 SPF 级大鼠自发肿瘤的报道^[3-4]。本文通过对新药致癌试验期为 104 周的正常对照组 113 只 SD 大鼠自发肿瘤的组织病理学检查结果进行详细分析，总结了雄性和雌性 SD

大鼠各种自发良性和恶性肿瘤病变及其发生率；结果显示，雄性大鼠以垂体腺瘤和肾上腺髓质腺瘤高发，雌性大鼠以垂体腺瘤、乳腺纤维腺瘤和乳腺腺瘤高发，这些高发的肿瘤均为良性肿瘤。肖成荣等^[5]对喂养 2 年的 Wistar 大鼠生存、体质量及进食量进行观察与分析，发现雄性大鼠死亡率、死亡动物平均活存时间具有高于雌性大鼠的趋势，雌性大鼠的自发性肿瘤发生率

较雄性大鼠略高,并且存在同一只大鼠多器官发生肿瘤的现象。

肿瘤的发生与性别相关。本研究结果显示,雌性大鼠恶性肿瘤发生率高于雄性大鼠。动物肿瘤生态学研究^[6]结果表明,在1 077例肿瘤中,雌性动物的肿瘤发生率高于雄性和去势动物,雌性占48.7%,雄性占40%,去势动物占11.3%。性别差异也因肿瘤良恶性不同有所区别。良性肿瘤中,雄性动物的检出例数多于雌性和去势动物;恶性肿瘤则相反,雌性动物的检出例数明显多于雄性和去势动物。雌性大鼠恶性肿瘤发生率远远高于雄性大鼠的原因可能是,检出率高的好发恶性肿瘤如乳腺癌等多发生于雌性大鼠。本文还详细介绍了与肿瘤病变相关的临床表现和大体解剖所见,可为相关技术人员特别是初次开展SD大鼠致癌试验的人员提供一些参考和借鉴。

根据肿瘤发生率进行评定时,主要通过统计学显著性检验来评价,如果染毒组的肿瘤发生率高于对照组且差异具有统计学意义(最好具有剂量-反应关系),则认为致癌试验结果为阳性^[7]。有研究^[8]表明,当对照组肿瘤自发率分别为1%、5%、10%、20%和30%,染毒组肿瘤发生率相应为20%、30%、40%、50%和60%时,才有90%的把握度获得阳性结果。动物数不变的情况下,如果对照组动物自发性肿瘤发生率很高,则可降低统计学显著性检验的效率,掩盖受试物所引起的肿瘤病变发生率的增高,干扰对研究结果的准确评价^[7]。

不同实验室、不同品系大鼠、不同批次大鼠以及不同时间开展的致癌试验中,动物自发性肿瘤类型及其发生率可存在一定的差异。对于同一种属、同一品系、同一实验室条件下饲养的大鼠,其自发肿瘤的发生率随着动物生命周期的延长而增加^[9],这与本实验结果一致。有文献报道^[10],176只SD大鼠中雄性大鼠良恶性肿瘤发生率分别为35.6%和16.1%,雌性大鼠良恶性肿瘤发生率分别为61.8%和15.7%;本研究中雄性大鼠良恶性肿瘤发生率分别为50.9%和3.5%,雌性大鼠良恶性肿瘤发生率分别为51.8%和32.1%。文献^[10]报道中雄性大鼠恶性肿瘤发生率高于本研究结果,这种现象可能与SD大鼠来源、样本数

量和饲养条件等因素有关。Son^[11]统计了1 284只雄性SD大鼠和1 264只雌性SD大鼠的自发肿瘤情况,结果发现SD大鼠最常发生的肿瘤为垂体腺瘤,其次为乳腺纤维腺瘤和乳腺癌;在50周致癌实验终点安乐死的动物中,垂体腺瘤的发生率分别为雄性37%和雌性79.5%。本研究中肿瘤发生率最高的类型分别是雄性大鼠的垂体腺瘤和肾上腺髓质腺瘤,雌性大鼠的垂体腺瘤、乳腺纤维腺瘤和乳腺腺瘤,其中垂体腺瘤的发生率分别为雄性36.8%和雌性50.0%,且雌性发生率高于雄性,这与Son的结果一致。

SD大鼠、F344大鼠和TR1及TR2系大鼠自发肿瘤发生率的资料表明,这些品系大鼠的自发肿瘤也以垂体腺瘤和乳腺癌最高发^[12-15]。这些品系大鼠中以SD大鼠的自发腺瘤发生率最高,可达70%;本研究中113只SD大鼠自发肿瘤总体发生率为66.4%,与该结论接近。本文报告的SD大鼠自发肿瘤及其发生率进一步丰富了现有SPF级SD大鼠自发性肿瘤的数据资料,可为我国毒性致癌试验的安全性评价提供一定的参考和借鉴。

参考文献:

- [1] ICH. S6(R1): Addendum to ICH S6: Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals[EB/OL]. 2009-10-29. <http://www.ich.cog>.
- [2] 黄明珠, 富欣. 有关开展致癌试验的现状[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3):590.
- [3] Crabbs TA, Frame SR, Laast VA, et al. Occurrence of spontaneous amphophilic-vacuolar renal tubule tumors in Sprague-Dawley rats from subchronic toxicity studies[J]. Toxicol Pathol, 2013, 41(6):866-871.
- [4] Kuzutani K, Shibunishi T, Kangawa Y, et al. Spontaneous mammary adenocarcinoma in a twelve-week-old female Sprague-Dawley rat [J]. J Toxicol Pathol, 2012, 25(3):221-224.
- [5] 肖成荣, 谭洪玲, 马增春, 等. Wistar大鼠二年喂养对其生存、体质量、进食量及自发性肿瘤发生率的观察与分析[J]. 实验动物科学, 2014, 31(1):34-40.
- [6] 王雯慧, 陈怀涛. 动物肿瘤病的发生与动物性别的关系[J]. 甘肃畜牧兽医, 1996(1):9-10.
- [7] 吕秋军. 新药药理学研究方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007:414-415.
- [8] Son WC, Gopinath C. Early occurrence of spontaneous tumors in CD-1 mice and Sprague-Dawley rats[J]. Toxicol

- Pathol, 2004, 32(4):371-374.
- [9] Mann SW, Yuschak MM, Amyes SJ, et al. A combined chronic toxicity/carcinogenicity study of sucralose in Sprague-Dawley rats[J]. Food Chem Toxicol, 2000, 38 (Suppl 2):S71-89.
- [10] 何亚男, 张素才, 张惠铭. SD 和 Wistar 大鼠自发性肿瘤的病理学观察[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(4):249-254.
- [11] Son WC. Factors contributory to death of young Sprague-Dawley rats in carcinogenicity studies[J]. Toxicol Lett, 2004, 153(2):213-219.
- [12] 王捷, 乔良, 于峰, 等. 克草胺慢性毒性及致癌性联合实验研究[J]. 卫生毒理学杂志, 2001(1):40-41.
- [13] 马国云, 董竞武, 金耀球, 等. 三唑磷农药对大鼠的致癌性实验病理观察[J]. 环境与职业医学, 2007(6):592-595.
- [14] 尹纪业, 董延生, 袁本利, 等. F344大鼠自发性肿瘤的病理学观察[J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(3):188-192.
- [15] 林炳水, 窦桂荣, 王东茂, 等. TR1 和 TR2 系大鼠中自发性肿瘤观察[J]. 上海实验动物科学, 1987(3):131-132.

Pathological Observation of Spontaneous Tumor in Aged SD Rats

ZHOU Xiaoli, ZHANG Qian, GAO Zheng, QIAN Zhiyong
(Department of Toxicology, Tianjin Center for Disease Control
and Prevention, Tianjing 300011, China)

Correspondence to: QIAN Zhiyong, qzyong@sohu.com

[Abstract] Objective To observe the occurrence of spontaneous tumors in SD rats, and to provide the background data for carrying out new drug induction trials. **Methods** In a carcinogenicity test, 120 normal SD rats (SPF-grade) at 4 weeks of age were divided into male and female with the same number. All rats were observed for one week before the experiment. After 104 weeks of conventional feeding, the sedation was performed. The dead rats during the experiment and the sacrificed rats were dissected. The organs such as heart, lung, liver, spleen, kidney, adrenal gland, thymus, brain, testis and epididymis (or uterus) were weighed, and the types and incidence of spontaneous tumors in each organ were observed by an optical microscope after routine pathology. **Results** A total of 113 SD rats were observed (7 rats were lost during the test), the tumor-bearing rats accounted for 66.4% (75/113), of which the benign tumors accounted for 48.7% (55/113), and the malignant tumors accounted for 17.7% (20/113). Tumors occurred in 49.1% (28/57) of male rats, of which 50.9% (26/57) were benign tumors, and 3.5% (2/57) were malignant tumors; the benign tumors were mainly pituitary adenomas (36.8%) and adrenal medulla tumor (7.0%), the malignant tumors were mainly thyroid adenocarcinoma (1.8%) and fibrosarcoma (1.8%). Female rats had tumors of 83.9% (47/56), of which the benign tumors accounted for 51.8% (29/56), and the malignant tumors were 32.1% (18/56); the benign tumors were mainly pituitary adenomas (50.0%), breast fibrous glands tumors (12.5%) and breast adenomas (12.5%), the malignant tumors were mainly breast adenocarcinoma (25.0%) and fibrosarcoma (3.6%). **Conclusion** The incidence of spontaneous tumors was higher in more than 2 years old SD rats, and the incidence of benign tumors was higher than that of malignant tumors, which may be related to aging, tumors and individual differences.

[Key words] Spontaneous tumor; Pathological observation; SD rats