

大豆异黄酮和塞来昔布预防大鼠乳腺癌的发生

杨定勇, 赵之婧, 覃春阳, 杨立民
(昆明医科大学第二附属医院胸心外科, 云南 昆明 650101)

[摘要] **目的** 观察大豆异黄酮和塞来昔布对 7, 12- 二甲基苯蒽 (7, 12-dimethylbenz anthracene, DMBA) 诱发的大鼠乳腺癌形成的影响, 并探讨其抗肿瘤机制. **方法** 90 只 SD 雌大鼠随机分成 DMBA 组 (A 组)、DMBA+SOY (B 组) 组和 DMBA+ 塞来昔布 (C 组) 3 组, 每组 30 只. 分别给予 DMBA 油剂灌胃复制大鼠乳腺癌模型, 同时 B 组和 C 组分别给予含 SOY 及塞来昔布的饲料喂养至实验结束, 观察各组大鼠乳腺癌的发生率、潜伏期及肿瘤数目. **结果** B 组 (48.28%) 和 C 组 (48.15%) 乳腺癌发生率低于 A 组 (79.31%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B 组 (14.71 ± 1.90) 周和 C 组 (14.46 ± 1.85) 周乳腺癌发生的潜伏期长于 A 组 (12.96 ± 2.12) 周, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B 组 (1.79 ± 0.80) 个和 C 组 (1.62 ± 0.77) 个乳腺癌发生数目少于 A 组 (2.43 ± 0.99) 个, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). **结论** 大豆异黄酮和塞来昔布对 SD 大鼠乳腺癌的发生、发展有一定的抑制作用.

[关键词] DMBA; 大豆异黄酮; 塞来昔布; 乳腺肿瘤

[中图分类号] R73-36*1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 12-0022-04

The Chemopreventive Effect of Soybean Isoflavones and Celecoxib on DMBA-induced Breast Cancer in Rats

YANG Ding-yong, ZHAO Zhi-jing, QIN Chun-yang, YANG Li-min
(Dept. of Cardiothoracic Surgery, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University,
Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To observe the chemopreventive effect of soybean isoflavones and celecoxib on DMBA-chemically induced breast cancer in rats, and explore the mechanisms. **Methods** A total of 90 rats were randomly divided into 3 groups: DMBA group (control group), soybean isoflavones group and celecoxib group, each group contained 30 rats. DMBA was intragastrically given to SD female rats to build breast cancer model. Meanwhile, rats in soybean isoflavones group and celecoxib group received soybean isoflavones and celecoxib treatments, respectively. The occurrence rate, latency period, number of breast cancer were observed and analysed. **Results** The incidence of mammary tumors in soybean isoflavones group (48.28%) and celecoxib group (48.15%) were both lower than that in the DMBA group (79.31%), with statistical difference ($P < 0.05$). The latency periods of mammary tumors in soybean isoflavones group (14.71 ± 1.90 weeks) and celecoxib group (14.46 ± 1.85 weeks) were longer than that in DMBA group (12.96 ± 2.12 weeks), with statistical difference ($P < 0.05$). The tumor numbers of soybean isoflavones group (1.79 ± 0.80) and celecoxib group (1.62 ± 0.77) were less than that of DMBA group (2.43 ± 0.99), with statistical difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Soybean isoflavones and celecoxib could effectively prevent the occurrence of DMBA-induced breast cancer in female rats.

[Key words] DMBA; Soybean isoflavones; Celecoxib; Breast neoplasms

[基金项目] 云南省应用基础研究基金资助项目 (2009ZC112M)

[作者简介] 杨定勇 (1986~), 男, 四川凉山州人, 在读硕士研究生, 住院医师, 主要从事乳腺癌的防治工作.

[通讯作者] 杨立民. E-mail: ylmwell@yahoo.com.cn

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一, 随着我国社会经济的快速发展, 乳腺癌的发病率成逐年增高、发病年轻化的趋势. 乳腺癌的一级预防(病因预防)越来越引起人们的重视, 一级预防除了改变生活方式、增加运动及避免肥胖等外, 食物、药物预防是近年研究的热点. 研究显示大豆提取物大豆异黄酮(soybean isoflavones, SOY)和环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)选择性抑制剂塞来昔布具有防治肿瘤作用^[1-6]. 但两者在动物乳腺癌实验研究中较少, 本研究用化学致癌剂 7, 12-二甲苯蒽(7, 12-dimethylbenz anthracene, DMBA)诱发 SD 雌大鼠乳腺癌形成过程中, 观察 SOY 和塞来昔布对雌大鼠乳腺癌发生、发展的影响, 并探讨其抗肿瘤机制.

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂来源

选用健康、未育、雌性 SD 大鼠 90 只(购自昆明医科大学实验动物中心), 体重 120~130 g. 昆明医科大学动物中心饲养(饲料内不含大豆及大豆油), 适应性饲养 1 周后开始实验.

7, 12-二甲苯蒽(7, 12-dimethylbenz anthracene, DMBA)购于美国 Sigma 公司; 大豆异黄酮购于广东长兴科技有限公司; 塞来昔布购于美国辉瑞制药有限公司.

1.2 动物分组及造模方法

所有雌大鼠经适应性饲养后, 随机分成 DMBA (A) 组、DMBA+SOY (B) 组和 DMBA+塞来昔布 (C) 3 组, 每组 30 只. 将 DMBA 溶于食用油中(5 g/支, 溶于 500 mL 食用油中备用), 按 10 mg/100 g 大鼠体重灌胃 2 次, 间隔 7 d, 诱发大鼠乳腺癌模型. SOY 和塞来昔布分别按 80 mg/kg 和 1 000 mg/kg 比例均匀拌于饲料中, 从第 2 次 DMBA 灌胃后第 1 天开始, B 组和 C 组每天分别给予含 SOY 及塞来昔布饲料喂养, 直至 20 周实验结

束.

1.3 观察项目及方法

造模后每日观察各组大鼠进食、毛发、排泄、精神等情况, 每周观察记录 6 对乳腺外观、有无结节或肿块. 以第 2 次 DMBA 灌胃至触及大鼠乳腺肿瘤时间计算潜伏期. 记录大鼠乳腺肿瘤发生时间及肿瘤数目; 喂养至 20 周后, 处死大鼠, 计数肿块数量, 观察肿块形态, 测量肿瘤长径, 计算肿瘤发病率.

1.4 组织学观察

取乳腺肿瘤组织置于 4% 甲醛液固定、石蜡包埋、切片及 HE 染色, 确定乳腺肿瘤病理类型.

1.5 统计学处理

应用 SPSS 统计软件进行数据分析. 采用 χ^2 及 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 大体及病理组织学观察结果

大鼠自给药后第 9 周开始, A 组率先出现乳腺肿瘤, 大小约 0.5~0.7 cm, 质硬、活动度差、呈类圆形; 至 20 周实验结束, 共有 5 只大鼠死亡(A 组 1 只, B 组 1 只, C 组 3 只. 其中 3 只为第 1 次灌胃后 2 周内死亡, 5 只大鼠死亡原因不明). 50 只成功诱发乳腺癌, 最小直径为 0.3~0.4 cm, 最大直径 3.9~4.1 cm. 其中导管原位癌 3 只, 浸润性导管癌 32 只, 浸润性小叶癌 7 只, 其他 8 只.

2.2 各组间乳腺癌发生率的比较

实验结束时死亡大鼠未纳入统计. 至第 20 周, A 组、B 组、C 组乳腺癌发病率分别是: 79.31% (23/29)、48.28% (14/29)、48.15% (13/27); B 组和 C 组乳腺癌发生率低于 A 组, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.046$, $P < 0.05$; $\chi^2 = 5.914$, $P < 0.05$). B 组与 C 组乳腺癌发生率无显著性差异 ($\chi^2 = 0.000$, $P > 0.05$), 见表 1.

表 1 各组间乳腺肿瘤发生率比较

Tab. 1 Comparison of the incidence of breast cancer between different groups

组别	存活总数(只)	发生乳腺癌只数(只)	发生率(%)
A 组	29	23	79.31
B 组	29	14	48.28*
C 组	27	13	48.15*

与 A 组比较, * $P < 0.05$.

2.3 各组间乳腺癌平均发生时间的比较 (潜伏期)

A 组、B 组、C 组平均发生肿瘤时间分别是：(12.96 ± 2.12) 周、(14.71 ± 1.90) 周、(14.46 ± 1.85) 周；B 组和 C 组乳腺肿瘤发生时间晚于 A 组，差异有统计学意义 ($t=2.540, P<0.05$; $t=2.136, P<0.05$)。B 组与 C 组间无统计学意义 ($t=0.348, P>0.05$)，见表 2。

2.4 各组间乳腺癌平均发生数目的比较

A 组、B 组、C 组乳腺癌平均发生数目分别为：(2.43 ± 0.99) 个、(1.79 ± 0.80) 个、(1.62 ± 0.77) 个；B 组和 C 组乳腺癌发生数目小于 A 组，差异有统计学意义 ($t=2.068, P<0.05$; $t=2.569, P<0.05$)。B 组与 C 组间无统计学意义 ($t=0.562, P>0.05$)，见表 2。

表 2 各组间诱发乳腺癌的潜伏期及乳腺癌发生数目的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of the latency period and number of breast cancer between different groups ($\bar{x} \pm s$)

组 别	乳腺癌平均发生时间 (周)	乳腺癌平均发生数目 (个)
A 组	12.96 ± 2.12	2.43 ± 0.99
B 组	14.71 ± 1.90*	1.79 ± 0.80**
C 组	14.46 ± 1.85*	1.62 ± 0.77**

与 A 组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.05$ 。

3 讨论

SOY 是大豆等豆科植物的提取物，是一种天然的植物雌激素，其结构与雌二醇相似，现多被用于预防或治疗女性更年期综合征。此外，它还有多种生物学作用，包括：抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、抗神经退变及神经保护、预防骨质疏松、抗菌、提高免疫力等^[7]。其抗肿瘤作用目前受到关注，主要由其雌激素样作用和非激素作用所致。它与雌激素竞争结合雌激素受体 (ER)，减轻雌激素的促细胞增殖作用，抑制一些依赖于雌激素生长的肿瘤的增殖，从而降低与雌激素有关的肿瘤发病危险；而 Ganry^[1]发现其还有抗氧化作用，能减轻自由基、活性氧对细胞的损伤，防止细胞突变和肿瘤发生；赵净洁等^[2]报道，SOY 可通过调控细胞周期蛋白、细胞凋亡蛋白等的表达，抑制癌细胞的发展；其还通过抑制拓扑异构酶活性，导致细胞 DNA 双链断裂，从而抑制癌细胞生长^[3]；Oki 等^[4]的研究表明，SOY 中的染料木素可作为酪氨酸蛋白激酶 (PTK) 的抑制剂，抑制 PKT 活性，影响细胞促有丝分裂的信号传导，进而抑制肿瘤细胞的生长；Ravindranath 等^[5]报道，SOY 还有抑制肿瘤血管的生成，限制肿瘤生长的作用。SOY 通过类雌激素作用、抗氧化作用、调控细胞周期蛋白及凋亡相关蛋白的表达、调节肿瘤细胞合成中所需的酶和抑制肿瘤血管生成等机制来抑制肿瘤的发生、发展和转移。

据统计，欧美国家居民平均每天摄入异黄酮不足 5 mg，东南亚国家每天摄入异黄酮大约为 30 mg，比欧美国家高 7 倍以上，从而使乳腺癌、结

肠癌的发病率显著降低^[8]。Cotterchio 等^[9]的研究发现，植物雌激素的摄入，可显著降低结直肠癌的发病率。Hirose 等^[10]的研究表明，日本女性在绝经前摄入大豆异黄酮的量与乳腺癌发病风险呈负相关，而在绝经后则无此关系。本实验用人工合成的 SOY 进行 DMBA 诱发的 SD 大鼠乳腺癌发生、发展的干预性研究。结果表明：SOY 与对照组相比，可以降低 SD 大鼠乳腺癌的发生率 ($P<0.05$)，亦可以延长乳腺癌发生的潜伏期 ($P<0.05$)，减少乳腺癌发生的数目 ($P<0.05$)。说明 SOY 对 SD 大鼠乳腺肿瘤的发生、发展具有抑制作用。这与 Brown 等^[11]的研究结果相一致，他们的结果还表明：SOY 的抑制作用还与 SOY 的浓度相关。

环氧酶 (cyclooxygenase, COX) 是花生四烯酸合成前列腺素的限速酶。目前发现在哺乳动物中至少有两种同工酶：COX-1 和 COX-2。COX-2 在大多数正常组织中不表达，只有在炎症或肿瘤等情况下，才会被缺氧、细胞因子、生长因子或激素等诱导产生，参与生物体内多种病理生理过程^[12]。近年来研究显示，COX-2 在乳腺癌组织中有不同程度高表达。Guo 等^[13]采用免疫组化检测 94 例乳腺癌组织中 COX-2 的表达，其中 46.8% 的癌组织有过表达，且 COX-2 阳性表达与病人预后密切相关。尹宜发等^[14]用同样方法检测 152 例乳腺癌组织，COX-2 的阳性表达率为 58.6%，COX-2 的表达与临床分期、淋巴结转移、远处转移等有关，且 COX-2 高表达组的 5 a 无病生存率低于 COX-2 低表达组。目前 COX-2 参与肿瘤发生发展的机制尚不完全清楚，主要表现在以下几个方面：刺激

细胞增殖、增加癌细胞侵袭力、抑制肿瘤细胞凋亡、抑制机体免疫功能、促进肿瘤新生血管生成等^[12]。

选择性和非选择性 COX 抑制剂能够有效阻止 COX 的活性。COX 是非甾体抗炎药作用的靶点, 应用非甾体抗炎药进行乳腺癌的防治受到关注。Lanza-Jacoby 等^[15]发现, 塞来昔布能预防和治疗乳腺癌, 而且有明显的剂量相关性。其抗肿瘤机制可能有促肿瘤细胞凋亡、降低 PG 的合成、增强机体免疫力、抑制癌细胞浸润和转移、抑制肿瘤血管生成等^[6]。本实验表明, 对照组的乳腺癌诱发率、肿瘤发生的潜伏期及数目与塞来昔布组相比, 均有统计学意义 ($P < 0.05$)。塞来昔布可降低大鼠乳腺癌的发生率; 延长乳腺癌发生潜伏期; 减少乳腺癌发生的数目。表明塞来昔布也能抑制 DMBA 诱发的大鼠乳腺癌的发生、发展。这与 Harris 等^[16]研究的结果一致。

[参考文献]

- [1] GANRY O. Phytoestrogen and breast cancer prevention [J]. *Eur Cancer Prev*, 2002, 11(6): 519 - 522.
- [2] 赵净洁, 俞明, 孟令章, 等. 大豆异黄酮抗癌防癌机制研究进展 [J]. *中国公共卫生*, 2010, 26(11): 1 390 - 1 392.
- [3] JI S, WILLIS G M, FRANK G R, et al. Soybean isoflavones, genistein and genistin, inhibit rat myoblast proliferation, fusion and myotube protein synthesis [J]. *Nutr*, 1999, 129(7): 1 291.
- [4] OKI T, SOWA Y, HIROSE T, et al. Genistein induces Gadd45 gene and G2/M cell cycle arrest in the DU145 human prostate cancer cell line [J]. *FEBS Lett*, 2004, 577(1): 55 - 59.
- [5] RAVINDRANATH M H, MUTHUGOUNDER S, PRESSER N, et al. Anticancer therapeutic potential of soy isoflavone, genistein [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2004, 546: 121 - 165.
- [6] REICHEL A, BROSS K, VOGT T, et al. Pioglitazone and rofecoxib combined with angiostatically scheduled trofosamide in the treatment of far-advanced melanoma and soft tissue sarcoma [J]. *Cancer*, 2004, 101: 2 247 - 2 256.
- [7] 刘晓林, 李芳, 樊海梅, 等. 大豆异黄酮的生物学作用及其临床应用的研究进展 [J]. *医学综述*, 2012, 18(13): 2 099 - 2 102.
- [8] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics, 2007 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57(1): 43 - 46.
- [9] COTTERCHIO M, BOUCHER B A, MANNO M, et al. Dietary phytoestrogen intake is associated with reduced colorectal cancer risk [J]. *J Nutr*, 2006, 136(12): 3 046 - 3 053.
- [10] HIROSE K, IMAEDA N, TOKUDOME Y, et al. Soybean products and reduction of breast cancer risk: a case-control study in Japan [J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(3): 15 - 22.
- [11] BROMN N M, BELLES C A, LINDLEY S L, et al. Mammary gland differentiation by early life exposure to enantiomers of the soy isoflavone metabolite equol [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(11): 3 042 - 3 050.
- [12] 刘小旭, 康华峰, 王西京, 等. 环氧酶-2 抑制剂预防大鼠化学性乳腺癌 [J]. *第四军医大学学报*, 2007, 28(1): 27 - 29.
- [13] GUO G L, YANG G L, LI Z Y, et al. The effect of cyclooxygenase-2 on lymphangiogenesis in breast cancer [J]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2008, 46(2): 132 - 135.
- [14] 尹宜发, 徐弘, 李思维, 等. 乳腺癌中环氧化酶 2 与 p53 的表达及其与预后的关系 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2012, 24(1): 20 - 23.
- [15] LANZA-JACOBY S, MILLER S, FLYNN J, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, prevents the development of mammary tumors in Her-2/neu mice *Cancer Epidemiol Biomarkers J P*, 2003, 12(12): 1 486 - 1 491.
- [16] HARRIS R E, ALSHAFIL G A, ABOU-ISSA H, et al. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(8): 2 101 - 2 103.

(2012 - 09 - 17 收稿)