

亚麻籽木酚素预防乳腺癌及与雌激素的关系

刘 珊¹, 王小兵¹, 李爱东², 刘朝阳¹, 田海梅¹, 李 莱¹,
赵文雅¹, 李艳芬¹, 刘 静¹, 宋培培¹, 张 伟¹

(1. 北京协和医学院, 中国医学科学院, 肿瘤医院, 生物检测中心, 北京 100021;

2. 北京协和医学院, 中国医学科学院, 肿瘤医院, 中心实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 通过卵巢切除术建立雌性大鼠去势模型, 探究亚麻籽粉木酚素预防乳腺癌的功能及与雌激素的关系。**方法** 将 48 只雌性 Wistar 大鼠随机分为基础饲料组 (BD)、基础饲料去势组 (BDC)、亚麻籽粉组 (FS) 和亚麻籽粉去势组 (FSC), 每组 12 只, 对全部大鼠进行二甲苯基蒽 (DMBA) 一次性灌胃 (2mg/kg 体重) 建立诱发的乳腺癌实验动物模型; 一周后对 BDC 组、FSC 组大鼠行去势手术, 连续观察 21 周, 测定瘤体的体积和重量, 并取乳腺组织进行病理学检查。**结果** 实验期间动物一般状况良好, 实验组大鼠未出现明显毒副作用; 亚麻籽粉组 (FS 和 FSC 组) 大鼠发生可触及肿瘤的时间较相应对照组晚 2 到 4 周; 亚麻籽粉组大鼠单纯性增生和不典型增生以及乳腺癌发生率和病灶数均显著低于相应对照组 (单纯性增生: FS vs BD, $P = 0.006^{**}$; FSC vs BDC, $P < 0.001^{**}$; 不典型增生: FS vs BD, $P = 0.048^{*}$; FSC vs BDC, $P = 0.014^{*}$; 乳腺癌: FS vs BD, $P = 0.028^{*}$; FSC vs BDC, $P < 0.047^{*}$); 亚麻籽粉组大鼠肿瘤体积和重量均小于基础饲料组; FS 和 FSC 组研究结果提示亚麻籽粉木酚素抑制增生发生及肿瘤细胞的生长的能力与实验动物体内雌性激素水平有关 (单纯性增生: $P = 0.008^{**}$; 不典型增生: $P = 0.042^{*}$; 乳腺癌: $P = 0.033^{*}$)。**结论** 亚麻籽粉木酚素可有效预防和降低化学诱癌剂 DMBA 所诱发的乳腺癌、癌前病变和单纯性增生的发生, 预防乳腺癌的功能和效果受到体内雌性激素影响。本研究结果对未来实施木酚素预防乳腺癌及有效人群的筛选具有参考价值。

【关键词】 木酚素; 亚麻籽粉; 大鼠; 乳腺癌

【中图分类号】 R730.1; R737.9 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)06-0043-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.06.010

Study of the Flaxseed Lignan on the Animal Model of Breast Cancer Prevention and the Relation with the Body Estrogen

LIU Shan¹, WANG Xiao-bing¹, LI Ai-dong², LIU Zhao-yang¹, TIAN Hai-mei¹,

LI Mo¹, ZHAO Wen-ya¹, LI Yan-fen¹, LIU Jing¹, SONG Pei-pei¹, ZHANG Wei¹

(1. Detection Center of Tumor Biology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; 2. Central Laboratory, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To explore the function of flaxseed powder lingans on the prevention of breast cancer and the relation with estrogen on the ovariectomized female rats. **Methods** Forty-eight female wistar rat were randomly divided into basal diet group (BD), basal diet castrate group (BDC), flaxseed group (FS) and flaxseed castrate group (FSC), All

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81071714)。

[作者简介] 刘珊 (1985 -), 女, 硕士生, 研究方向: 肿瘤预防。E-mail: candy_show@yeah.net。

[通讯作者] 张伟, 男, 研究员, E-mail: zhangww1954@126.com。

of the rats were treated with DMBA by intragastric administration at a dose of 2mg/kg weight to establish the experimental animal models of induced breast cancer and the BDC and FSC groups were operated for the ovariectomy. On the 21 week the volume and weight of the palpable tumors were measured and conducted pathological examination by pathologist.

Results The experimental animals were generally in well situation, there was no obvious toxic or side effect in experimental groups, palpable tumors appeared two to four weeks later in FS and FSC groups than that in the control; Compared with the control groups, the incidence and the average number of lesions of breast hyperplasia, atypical hyperplasia, breast cancer were significantly lower in flaxseed groups(hyperplasia:FS vs BD, $P=0.006^{**}$;FSC vs BDC, $P<0.001^{**}$; atypical hyperplasia:FS vs BD, $p=0.048^{*}$;FSC vs BDC, $P<0.014^{*}$; breast cancer:FS vs BD, $P=0.028^{*}$; FSC vs BDC, $P=0.047^{*}$), additionally, the volume and weight of the tumors were lower in flaxseed groups. The results also suggested that the ability of inhibiting the hyperplasia and tumor cell growth of the flaxseed lignans is related with estrogen states(hyperplasia: $P=0.008^{**}$;atypical hyperplasia: $P=0.042^{*}$;Breast cancer: $P=0.033^{*}$). **Conclusions** Flaxseed powder lignans can effectively prevent and reduce the occurrence of breast cancer, precancerous lesions and hyperplasia induced by DMBA, and the preventive effect of flaxseed powder lignans are affected by body estrogen. The above results may be of reference value for screening effective population and preventing breast cancer by lignans.

【Key words】 Lignans; Flax seed; Rat; Breast cancer

回顾性流行病学研究发现妇女服用亚麻籽木酚素可显著降低乳腺癌的发生风险,进一步发现绝经前妇女服用木酚素较绝经后妇女服用木酚素更能显著的降低乳腺癌的初发和复发风险,因此推测木酚素在绝经前、后妇女的预防乳腺癌功能的差异可能与妇女体内雌性激素分泌及代谢水平有关^[1,2],但目前尚缺乏直接实验证据支持上述观点。

本研究将首次通过实验动物模型研究并报道亚麻籽木酚素预防乳腺癌的功能效果及与雌激素关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康清洁级雌性 Wistar 大鼠 48 只,体重 200 g,购自华阜康生物科技有限公司,生产许可证编号:SCXK(京)2009-0007,动物使用许可编号:SYXK(京)2008-0025。动物随机分为 4 组:基础饲料组(basal diet, BD),基础饲料去势组(basal diet castrate, BDC),亚麻籽粉组(flax seed, FS),亚麻籽粉去势组(flax seed castrate, FSC),每组 12 只。

1.2 实验仪器、材料、试剂及配制方法

二甲基苯蒽(7,12-Dimethylbenz[α]anthracene, DMBA)购自美国 sigma 公司。吐温 80 购自北京化学试剂公司。1g DMBA 溶于 2 mL 吐温 80,充分搅拌,乳化均匀后加入麻油至 50 mL,振荡助溶,终浓度 20 mg/mL。大鼠基础饲料购自北京华阜康生物科技有限公司;亚麻籽粉饲料为基础饲料中添加 10%的亚麻籽粉。戊巴比妥钠购自北京索莱宝科技有限公司。脱毛剂为 8%的硫化钠溶液,硫化钠购

自北京化学试剂公司。称取 8g 硫化钠加入 40 mL 75%的酒精,温水定容到 100 mL。光学显微镜型号:OLYMPUS, BH-2。

1.3 模型制作

全部大鼠基础饲料饲喂,每笼两只隔离饲养,温度 22~24℃,湿度 50%~60%,饮用过滤水,饲料自由采食。适应性饲养一周后灌胃,以二甲基苯蒽灌胃复制乳腺癌大鼠模型,剂量为 20 mg/100 g 体重。灌胃后一周,建立大鼠去势模型,去势组行卵巢切除手术,非去势组行假手术。大鼠手术当日晨起禁食禁水,行 3%的戊巴比妥钠 50 mg/kg 体重肌肉注射麻醉,脊柱双侧消毒,铺巾,皮肤剪口,钝性剥离至腹腔,结扎输卵管,切除卵巢,缝合肌肉层及皮肤,注射青霉素,放回鼠笼。BD, FS 组进行假手术对照,只进行脊柱双侧切口,卵巢附近的部分脂肪切除及肌肉皮肤缝合,一周后拆线。动物摘除卵巢后逐只进行阴道涂片检查,参照正常大鼠性周期阴道细胞变化标准,连续观察 5 d,阴道上皮细胞无周期性变化,证明去势模型建立成功。

1.4 观察指标

1.4.1 一般状况观察 每天观察记录大鼠一般状况和大鼠死亡情况,记录大鼠肿瘤初发时间及部位,每周称量并记录大鼠体重、瘤体体积,处死后剥离瘤体称重。

1.4.2 病理组织学观察 21 周后断颈处死大鼠,观察并记录乳腺肿块数量、形态及大小。取材参考国内常用大鼠乳腺取材方法,沿颈部至腹股沟备皮后,将 6 对乳腺连同周围皮肤、皮下组织取下, PBS 漂洗, 10% 福尔马林固定 24 h, 乳腺组织自乳头部对

半切开,石蜡包埋,每个乳腺组织连续切片 10 张,二甲苯脱蜡,进行常规 HE 染色,中性树胶封片,显微镜下组织学观察乳腺腺体和导管上皮变化,以及相关改变的组织病理学特征。

1.5 计算方法

1.5.1 单纯性增生:单纯性增生发生率 = 乳腺单纯性增生大鼠数/该组存活大鼠数 × 100%

平均单纯性增生数 = 大鼠单纯性增生发生总数/该组乳腺单纯性增生大鼠数

单纯性增生抑制率 = (基础组平均单纯性增生数 - 给药组平均单纯性增生数)/基础组平均单纯性增生数) × 100%。

1.5.2 不典型增生:不典型增生发生率 = 乳腺不典型增生大鼠数/该组存活大鼠数 × 100%

平均不典型增生数 = 大鼠不典型增生发生总数/该组乳腺不典型增生大鼠数

不典型增生抑制率 = (基础组平均不典型增生数 - 给药组平均不典型增生数)/基础组平均不典型增生数) × 100%。

1.5.3 乳腺癌:乳腺癌发生率 = 癌变大鼠数/该组存活大鼠数 × 100%

平均癌变数 = 大鼠癌变发生总数/该组癌变大鼠数

抑癌率 = (基础组平均癌变数 - 给药组平均癌变数)/基础组平均癌变数 × 100%。

比较各组单纯性增生、不典型增生、乳腺癌发生情况,评价亚麻籽粉木酚素对乳腺单纯性增生、癌前病变、乳腺癌生长的抑制作用。

1.6 统计学分析处理

所有数据均采用 SPSS16.0 进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著意义, $P < 0.01$ 为差异具有极其显著意义,绘图采用 Microsoft Excel 软件。

2 结果

2.1 一般状况

48 只实验大鼠有 3 只死于腹泻,其余 45 只大

鼠在实验结束时均存活;存活各组大鼠体重无明显差异,见表 1,饲料中添加亚麻籽粉对大鼠生活质量无明显影响。BDC 组和 BD 组分别在诱癌剂灌胃给药后第 11 周和第 13 周首次出现可触及的乳腺部位肿块;而 FS、FSC 组在给药后第 15 周开始出现可触及肿块。记录可触及的大鼠肿块数,病理诊断区分肿块性质。大体观察肿瘤位于乳腺部位、质硬,并呈侵袭性生长,与乳腺组织间无明显分离,大的肿瘤可占据整个乳腺或超出乳腺范围,个别可见侵及皮肤并形成溃烂。肿瘤瘤重及体积见表 2。图 1 示不同组大鼠乳腺体表可触及肿瘤的生长情况,结果显示不同时期亚麻籽粉组大鼠肿瘤体积和重量均明显小于基础组,可见亚麻籽粉组大鼠肿瘤初发时间较基础组晚,解剖未发现肝、肺等重要脏器转移灶。

表 1 各组大鼠平均体重
Tab. 1 Average body weight of rats in each group

组别 Group	例数 N	体重(g) Body weight(g)
基础饲料去势组(BDC)	11	228.52 ± 2.36
基础饲料组(BD)	12	227.00 ± 3.29
亚麻籽粉去势组(FSC)	12	231.60 ± 4.13
亚麻籽粉组(FS)	10	229.10 ± 5.16

2.2 大鼠病理组织学观察结果

光镜观察结果显示各组大鼠均发生单纯性增生、不典型性增生及癌变(彩插 6 图 2),同一大鼠的多个乳腺出现不同程度的增生或癌变。正常乳腺导管可见导管上皮细胞排列有序,无明显炎性细胞浸润和间质结缔组织增生;单纯性增生可见导管上皮细胞失去正常的结构和层次;不典型增生可见导管上皮细胞排列较乱,细胞层次增多,极向消失,增生的细胞大小不一,可见核分裂象。浸润性乳腺癌可见细胞排列失去极性,排列紊乱,核深染,病理性核分裂像常见。

2.3 评定指标及标准

乳腺增生情况参照人体乳腺不典型增生诊断标准评定。统计并比较分析各组单纯性增生数、不典型增生(癌前病变)病灶数以及癌变病灶数,单纯性增生统计指标包括小叶增生、导管上皮增生、结

表 2 体表可触及的乳腺肿瘤体平均重量及体积比较
Tab. 2 Comparison of palpable tumor weights and volumes

组别 Group	瘤发例数/组例数 Rats number with tumor /group rats number	平均瘤重(g) Average tumor weight(g)	肿瘤体积(mm ³) Average tumor volume(mm ³)
基础饲料去势组(BDC)	6/11	16.32 ± 1.21	8887.66 ± 578.34
基础饲料组(BD)	5/12	14.12 ± 0.81	6262.63 ± 323.20
亚麻籽粉去势组(FSC)	1/12	2.21	1043.58
亚麻籽粉组(FS)	0/10	-	-

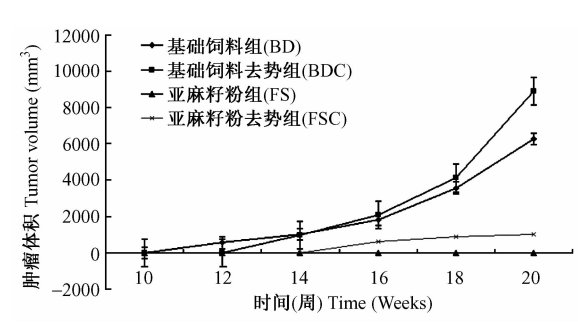


图 1 亚麻籽粉及去势对 DMBA 诱发大鼠体表可触及的乳腺瘤体生长的影响

Fig. 1 Impaction of Flax seed powder and castrated to DMBA-induced surface palpable breast tumor growth

表 3 DMBA 诱发各组大鼠乳腺上皮单纯性增生、不典型增生、乳腺癌的发生情况

Tab.3 The incidence of DMBA-induced mammary hyperplasia, mammary atypical hyperplasia and mammary carcinoma in rats

组别		基础饲料组	基础饲料去势组	亚麻籽粉组	亚麻籽粉去势组
Group		(BD)	(BDC)	(FS)	(FSC)
单纯性增生 Hyperplasia	组例数 Group number	12	11	10	12
	患病大鼠数 No. of bearing rats	12	7	4	7
	发生率(%) Incidence(%)	100.00	63.64	40.00	58.33
	每只病灶数(个) Medium No. of	14.29	16.75	8.50	14.20
	hyperplasia bearing rats				
	抑制率(%) Inhibitory rate(%)	—	—40.25(vs BD) 40.14(vs FSC)	15.22	
	P	—	—0.006**(vs BD) 0.008**(vs FSC)	<0.001**(vs BDC)	
不典型增生 Atypical hyperplasia	患病大鼠数 No. of bearing rats	10	9	5	7
	发生率(%) Incidence(%)	83.33	81.82	50.00	58.33
	每只病灶数(个) Medium No. of atypical	1.83	1.60	1.00	1.50
	hyperplasia bearing rats				
	抑制率(%) Inhibitory rate(%)	—	—	45.36(vs BD) 33.33(vs FSC)	6.25
	P	—	—	0.048*(vs BD) 0.042*(vs FSC)	0.014*(vs BDC)
	患癌大鼠数 No. of bearing rats	8	7	2	5
乳腺癌 Carcinoma	发生率(%) Incidence(%)	66.67	63.64	20.00	41.67
	每只病灶数(个) Medium No. of tumor	3.80	3.50	1.00	1.67
	each rat bearing				
	抑制率(%) Inhibitory rate(%)	—	—	73.68(vs BD) 40.12(vs FSC)	52.29
	P	—	—	0.028*(vs BD) 0.033*(vs FSC)	0.047*(vs BDC)

注：* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$

Note：* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$

缔组织增生、导管内增生；不典型增生统计指标包括导管上皮不典型增生；癌变统计指标包括导管内癌、小叶原位癌、浸润性癌等，结果见表 3；计算相应抑制率，结果体现亚麻籽粉组大鼠单纯性增生，不典型增生，癌变病灶数目均低于相应基础组，其中 FS 组的诱发癌变抑制率明显高于 FSC 组。大鼠结肠病理组织学观察部分有淋巴细胞浸润，无癌前期和癌的改变。

3 讨论

乳腺癌是成年女性最易患的恶性肿瘤之一，在欧美发达国家其发病率高居女性癌症首位，是女性

的主要死因之一。据世界卫生组织国际癌症研究中心(IARC)最近的估计(GLOBOCAN 2008),全球年新发女性乳腺癌病例达 138 万,占全部女性恶性肿瘤发病的 23%;死亡 46 万,占有女性恶性肿瘤死亡的 14%;近年来,我国乳腺癌发病率呈现快速明显上升的趋势,目前我国约有 47 万乳腺癌患者,城市地区乳腺癌的发病率和死亡率均位于女性常见恶性肿瘤前三位^[3]。因此,如何降低乳腺癌的发病率和死亡率,开展对乳腺癌的发病和复发的预防的相关研究具有重要的实际应用价值。

木酚素属于植物类雌激素,是一种与动物雌激素结构相似的生物活性物质,其在亚麻籽中的含量取决于亚麻的品种、种植气候和生态条件,一般约占籽重量的 0.9%~1.5%,比其它 66 种已知含木酚素的植物高 100~800 倍。近年研究发现木酚素在预防糖尿病及心血管疾病、发挥弱雌激素及抗雌激素效应、降血压、调节胆固醇代谢、抗艾滋病病毒和抗肝炎病毒、预防和治疗激素依赖肿瘤等方面都能发挥重要作用^[4],其中,木酚素对乳腺癌的预防和治疗功能的研究更是成为当今乳腺癌相关研究的热点。

木酚素在动物消化道内被微生物转化成动物木酚素,即肠二醇和肠内酯,二者均具有雌激素样和抗雌激素样生物活性,它们与体内雌激素雌二醇结构相似,能竞争性结合雌激素受体,从而抑制与雌激素相关的细胞和肿瘤的增殖^[5,6],因而可对激素相关性疾病和肿瘤表现出一定的治疗作用。乳腺癌是激素依赖性的恶性肿瘤,研究亚麻籽粉末木酚素在乳腺癌发生、发展中的干预和预防作用及其与雌激素的关系,将为预防和治疗乳腺癌的发生和复发提供重要的科学依据。

化学致癌剂二甲基苯蒽可诱导 Wistar 大鼠发生乳腺单纯性增生、不典型增生、原位癌和浸润性乳腺癌,并表现为渐进的谱带演变过程^[7,8],这个过程与人体乳腺癌癌变过程极为相似,因此建立可靠科学的动物研究模型,研究木酚素对诱发乳腺癌前病变以及乳腺癌的抑制作用,可为探讨乳腺癌的有效预防,以及研究木酚素预防乳腺癌的机制和效果产生重要影响;建立大鼠去势模型研究雌性激素对亚麻籽粉末木酚素抑癌作用的影响,在理论上可阐明亚麻籽粉末木酚素的抑癌作用与雌性激素间的关系以及作用结果,将揭示影响木酚素抑制乳腺癌作用的途径和机制,对于乳腺癌的预防和术后复发的控制和管理具有重要的指导价值。

由于人类和大鼠处于不同的生物阶梯,药物在体内作用过程和药效机制不可能完全相同^[9,10],且人类

患癌可能会受到心理相关因素的影响,所以该研究结果尚不能完全用来解释木酚素对人类乳腺癌的预防功能和作用机理,乳腺癌大鼠去势模型不能完全替代人类绝经后代谢的改变,因此利用木酚素代替或辅助药物防癌抗癌尚需要后续人群研究加以证实,但木酚素在预防癌前病变,抑制癌细胞生长、降低血胆固醇水平等方面的研究确实展现出可喜的前景^[11],且我国药用资源广泛,研究费用低,因此对木酚素进行深入研究,特别是对其防治乳腺癌的应用研究具有重要的临床意义和广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] Jianmin C, Jasdeep KS, Paul C, et al. Flaxseed and pure secoisolariciresinol diglucoside, but not flaxseed hull, reduce human breast tumor growth (MCF-7) in athymic mice [J]. *Nutrition And Disease*, 2009, 66(10):206-212.
- [2] Katharina B, Aida KZ, Alina V, et al. Meta-analyses of lignans and enterolignans in relation to breast cancer risk [J]. *Am J Clin Nutr*, 2010, 12(2):141-148.
- [3] Louis WC, Mary NC, Wings TL, et al. A rat cell line derived from DMBA-induced mammary carcinoma [J]. *Life Sciences*, 2003, 13(3):27-33.
- [4] Cecile VS, Pierre D, Christe P, et al. Phytoestrogen rich diets modulate expression of brca1 and brca2 tumor suppressor genes in mammary glands of female Wistar rats [J]. *Cancer Research*, 2003, 63(10):6607-6612.
- [5] Masao H, Atsuko M, Nobuyuki I, et al. Effects of dietary perilla oil, soybean oil and safflower oil on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced mammary gland and colon carcinogenesis in female SD rats [J]. *Carcinogenesis*, 1990, 11(5):731-727.
- [6] Zhou YJ, Liu YE, Cao JG, et al. Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16):112-118.
- [7] Dal ML, Zucchetto A, Talamini R, et al. Effect of obesity and other lifestyle factors on mortality in women with breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2008, 12(3):2188-2194.
- [8] Susan EM, Paola M, Stephen B, et al. Dietary lignan intakes and risk of pre-and postmenopausal breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2004, 11(1):440-444.
- [9] Anazi AF, Qureshi VF, Arbieri C, et al. Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices; an overview [J]. *J Nat Sci Biol Med*, 2011, 2(2):154-163.
- [10] Huis R, Morreel K, Fliniaux O, et al. Natural hypolignification is associated with extensive oligolignol accumulation in flax stems. *Plant Physiol*, 2012, 2(13):342-351.
- [11] Dong K, Pu JX, Zhang HY, et al. Lignans from Kadsura polysperma and Their Antineurodegenerative Activities [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(2):249-256.