文章编号:1000-5404(2005)23-2317-04

论著

辛基酚和三羟异黄酮对二甲基苯蒽诱发大鼠乳腺肿瘤的影响

彭俊华,糜漫天,朱俊东,于 斌 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨辛基酚(OP)和三羟异黄酮(GEN)共同作用对二甲基苯蒽(DMBA)诱发大鼠体内乳腺癌发病的影响。**方法** 雌性SD大鼠分为阴性对照组(C组)、模型对照组(Mod)及3个实验组:GEN、OP和GEN+OP组。第22和第29天两次灌胃DMBA致癌(C组除外),实验组于第1~7天皮下注射GEN和/或OP。d210处死大鼠,观察肿瘤发生情况、组织病理、超微结构和血中雌二醇、孕酮的变化。**结果** Con组未发生肿瘤,Mod组肿瘤发生率为14/21,肿瘤体积和质量分别为(13.8±2.3) cm^3和(13.5±2.0) g;OP组肿瘤发生率为20/21($P<0.05$);GEN和GEN+OP组的肿瘤发生率分别为7/21($P<0.05$)和12/21,肿瘤的体积分别为(3.8±2.3) cm^3和(4.4±3.7) cm^3,质量分别为(4.3±3.4) g和(5.3±4.2) g;组织和超微结构显示OP组肿瘤细胞分化程度低,GEN组和GEN+OP组肿瘤细胞分化程度高,乳腺增生较多。**结论** OP可能会促进DMBA诱导乳腺癌的发生,GEN能抑制诱发乳腺癌的发生,GEN与OP同时作用时仍能降低大鼠乳腺癌的发生。

关键词: 乳腺肿瘤;环境雌激素;辛基酚;三羟异黄酮
中图法分类号: R730.231.1; R737.9; R977.12 **文献标识码:** A

Effect of octylphenol and genistein on 7, 12-dimethylbenz[a] anthracene-induced mammary cancer in rats

PENG Jun-hua, MI Man-tian, ZHU Jun-dong, YU bin (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of octylphenol and genistein on 7, 12-dimethylbenz[a] anthracene (DMBA)-induced mammary cancer in prepubertal rats. **Methods** Female SD rats was randomly divided into control group, model group, genistein (GEN) group, octylphenol (OP) group, GEN+OP group. The rats in GEN group, OP group, GEN+OP group were subcutaneously injected with GEN and/or OP from d1 to d7 (the day when the injection began was named as d1, others likewise). DMBA was given to rats except control rats by intragastric administration on d22 and d29. Rats were killed to observe the incidence of breast carcinoma and the changes of histologic pathology on d210, ultrastructure, serum estradiol and progesterone. **Results** There was no breast tumor in rats of control group. In model group, the incidence of breast carcinoma was 14/21, tumor size and weight were (13.81±2.34) cm^3 and (13.54±2.02) g respectively. In OP group, the incidence of breast carcinoma was 20/21($P<0.05$). In the groups of GEN and GEN+OP, the incidence of breast tumor were 7/21 ($P<0.05$) and 12/21 respectively, tumor size (3.8±2.3) cm^3 and (4.4±3.7) cm^3 respectively, tumor weight (4.3±3.4) g and (5.3±4.2) g respectively. Histological and ultrastructural analysis showed that cell differentiation were lower in OP group. The cell differentiation were higher and the proliferation of glandular and atypical hyperplasia were more obvious in groups of GEN and GEN+OP. **Conclusion** Octylphenol maybe accelerate DMBA-induced mammary tumors and genistein can inhibit DMBA-induced breast tumors. The DMBA-induced mammary tumors can be inhibited when rats were treated with genistein and octylphenol.

Key words: breast cancer; enviromental estrogen; octylphenol; genistein

近年来,有关环境雌激素污染与人类健康关系的研究日益增多,尤其是乳腺癌发生与环境雌激素暴露的关系备受关注。辛基酚(octylphenol, OP)主要用于生产非离子表面活性剂、增塑剂、热稳定剂、光稳定剂、石油添加剂、燃料油稳定剂、铜矿萃取剂等,还被广泛

作者简介:彭俊华(1966-),男,湖南省祁东县人,博士,副主任医师,主要从事环境毒理和营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68752291,E-mail: junhua_p@sohu.com
通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292,E-mail: mimt@vip.sina.com
收稿日期:2005-04-22;修回日期:2005-09-17

用于制造奶瓶、罐头盒、食品包装袋等的内壁涂层。据报道在地面水、自来水、食品中均检测到 OP[1]。三羟异黄酮(genistein, GEN)是一种植物雌激素,摄入 GEN 能降低乳腺癌的发病[2],大鼠皮下注射 OP 能增加子宫癌的发病率[3],OP 对乳腺癌发病有何影响,GEN 和 OP 联合作用对乳腺癌的影响如何,目前国内外少见报道。本研究以二甲基苯蒽(7,12-dimethylbenz[a] anthracene,DMBA)诱导大鼠乳腺肿瘤,观察 OP、GEN 对乳腺肿瘤发病的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

DMBA 和 OP,纯度 >98%,Sigma 产品。GEN,纯度 >98%,西安交大保赛生物技术公司。二甲亚砜(DMSO),进口分装试剂,用于配制 GEN 和 OP。雌二醇(estradiol,E_2)、孕酮(progestogen,P4)试剂盒,Beckman-coulter 产品。

1.2 乳腺肿瘤模型与分组

19~20 日龄 SPF 级雌性 Sprague-Dawley 大鼠 94 只,体质量(60±5) g,由第三军医大学野战外科研究所动物中心提供,分为 5 组:①模型对照组(Mod),皮下注射(s.c) 二甲亚砜 + 灌胃(i.g.) DMBA;②GEN 组,s.c 500 mg·kg^{-1}·d^{-1}的 GEN + i.g. DMBA; ③OP 组,s.c 120 mg·kg^{-1}·d^{-1}的 OP + i.g. DMBA; ④GEN + OP 组,同时 s.c 500 mg·kg^{-1}·d^{-1}的 GEN 和 120 mg·kg^{-1}·d^{-1}的 OP + i.g. DMBA;⑤阴性对照组(C),只给予玉米油和 DMSO 处理。实验处理各组 21 只大鼠,阴性对照组 10 只大鼠。均采用大鼠后腿外侧皮下注射,鼠龄 21 d 开始注射,计为第 1 天(d1),连续给药 7 d,1 次/d,停药 14 d 后,第 22 天将 100 mg/kg DMBA(玉米油溶) i.g. 给予除 Con 组外的其他 4 组大鼠,7 d 后即第 29 天再给 1 次同剂量 DMBA。在此期间的所有动物再不做其他任何处理。第 29 天开始观察,每周一、四 2 次检查大鼠肿瘤出现情况,记录肿块出现时间、部位和数量,每只大鼠有 6 对乳房,每个乳房部位出现 1 个可触及体表肿块为 1 个肿块数。肿瘤诱发率 = 肿瘤大鼠数/大鼠总数。大鼠在昼夜交替、室温 20~23 ℃的环境中饲养,自由饮水进食,AIN-76A 饲料喂养。

1.3 病理及超微结构检查

于第 119 天及第 210 天,颈椎脱臼处死大鼠,切开皮肤,暴露乳腺,检查乳腺,取肿瘤、称重、游标卡尺测定肿瘤的最小直径 a、最大径 b,按 $V = a^2b/2$ 公式计算肿瘤体积[4],并记录其分布、形态,10% 甲醛固定,常规制片、染色,光镜观察。2.5% 戊二醛固定,常规电镜包埋、切片、染色,透射电镜观察。

1.4 血清中雌二醇、孕酮检测

于第 105、119 及 210 天,经阴道涂片检查,证实间情期,眶静脉取血,按试剂盒要求进行,用化学分光分析仪检测。

1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 辛基酚和三羟异黄酮对大鼠乳腺肿瘤发生的影响

在整个实验中,C 组未见肿瘤发生。给予环境雌激素后,Mod 组在第 84 天出现肿瘤,OP 组和 GEN + OP 组在第 92 天出现肿瘤,在第 119~148 天,乳腺肿瘤发生率迅速增高,到实验结束时(第 210 天),各组肿瘤发生有差异,OP 明显促进乳腺肿瘤发生,GEN 抑制肿瘤生长(表 1,图 1), GEN 组及 GEN + OP 组乳腺癌的发病率较 OP 组明显降低。随时间的延长,各组每只大鼠肿瘤个数增加。在第 210 天时,GEN 组和 GEN + OP 组每只大鼠的肿瘤个数明显低于模型组,同时,这两组乳腺肿瘤的平均体积和平均重量都较模型组明显减少(表 1)。

表 1 辛基酚和三羟异黄酮对 DMBA 诱导大鼠乳腺肿瘤的体积、质量及发生率的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of genistein and/or octylphenol on the size, weight and occurrence rate of DMBA-induced mammary tumors in rats ($\bar{x} \pm s$)

Groups	No. of tumors	Tumor size (cm^3)	Tumor weight (g)	Tumor rate (%)
Control	0	0	0	0/10
Model	33	14.8±8.6	13.5±2.0	14/21
GEN	5	3.8±2.3**	4.3±3.4**	7/21*
OP	38	5.3±4.8*	6.1±4.2*	20/21*
GEN + OP	25	4.4±3.7*	5.3±4.2*	12/21

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* model

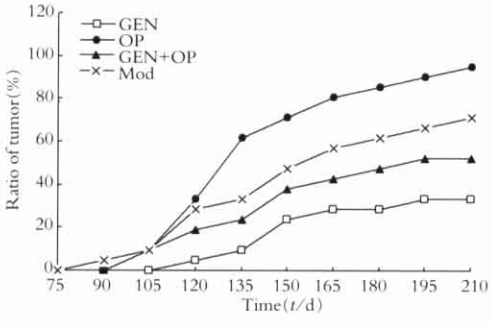


图 1 辛基酚和三羟异黄酮对 DMBA 诱导的乳腺肿瘤发生个数的影响

Fig 1 Effects of genistein and/or octylphenol on the number of mammary tumors induced by DMBA in female rats

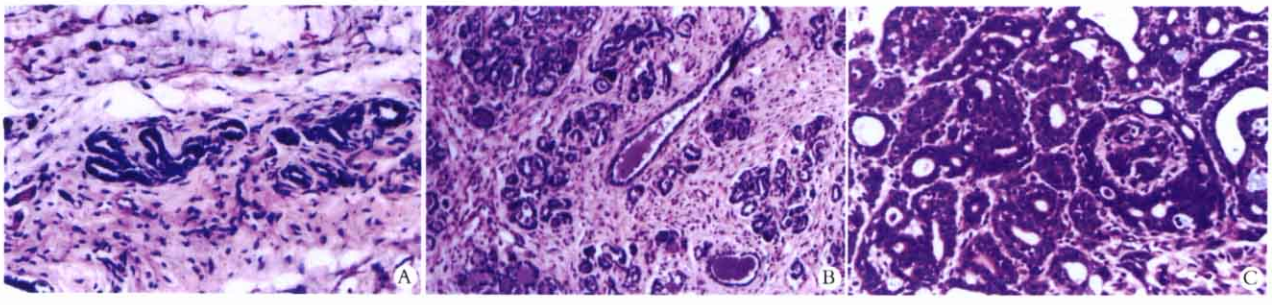
2.2 大鼠乳腺肿瘤的组织病理学变化

乳腺恶性肿瘤大体外观可分为球形、椭圆形或多结节不规则形,肿块表面凹凸不平,似有小颗粒,肿块上布满小血管,组织呈色灰白或暗红,切面呈实性或囊性瘤体伴出血,坏死,以第 1、2 对乳腺区多见。第 210 天 Mod 组 33 个肿瘤全为乳腺癌,光镜下表现为癌组织呈片团状分布,筛孔样排列,细胞为卵圆形,核大深染,部分区域癌组织呈凝固性坏死,腺管腔中可见嗜酸性分泌物。GEN 组乳腺肿瘤 3 个为乳腺癌,2 个为不典型性癌变, 2 个为小叶增生,小叶增生组织光镜下表现为腺管大量增生,结构完整,排列整齐,腺管中见嗜酸性分泌物增多;OP 组乳腺肿瘤 31 个为乳腺癌,7 个为不典型性癌变;GEN + OP 组乳腺肿瘤 22 个为乳腺癌,3 个为不典型性癌变,2 例为导管上皮增生。正常乳腺、小叶增生及乳腺癌见图 2。

2.3 大鼠乳腺肿瘤的超微结构变化

Mod 组肿瘤细胞核大,呈不规则形态,异染色质增多,核浆比例明显增大,胞质中细胞器减少,线粒体肿胀,内质网扩张,细胞内腺腔和微绒毛少见,细胞连接少,未见分泌颗粒,见图

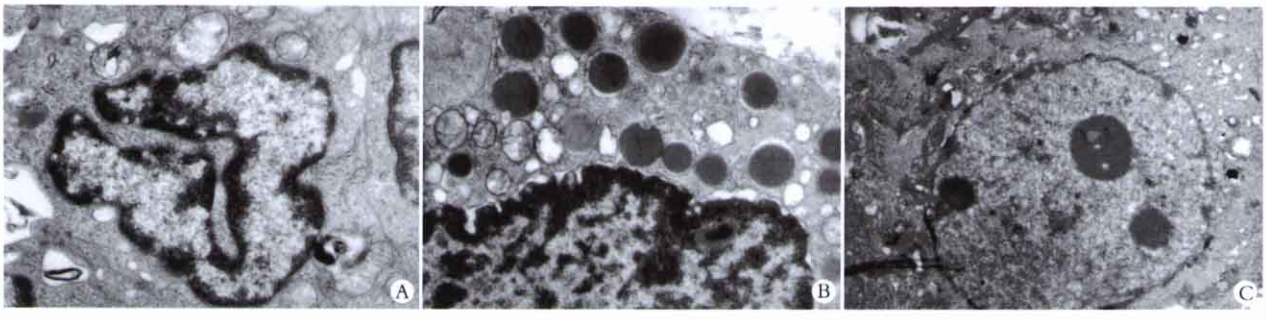
3A；GEN 组细胞核浆比例趋于正常，细胞核大小基本一致，核形态趋于正常，核仁大，细胞中微腺腔和微绒毛多见，部分细胞线粒体、核糖体增多，细胞间质增多，肿瘤细胞分化更趋良性，胞质间分泌颗粒较多，呈空泡样，见图 3B。OP 组细胞核大，核仁大且多，可见核分裂象，细胞增生活跃，胞质中线粒体、内质网丰富，见图 3C。GEN + OP 组细胞核浆比例趋于正常，染色质边集、凝固，细胞凋亡增多，细胞器丰富，胞质间脂滴颗粒增多，细胞恶性程度降低。



A: Normal lobules of mammary gland (HE × 200); B: Hyperplasia of mammary lobule in GEN group (HE × 100); C: Mammary cancer in model group (HE × 200)

图 2　DMBA 诱导大鼠第 119 天时乳腺的组织学改变

Fig 2　Histologic changes of mammary gland in DMBA-induced rats on day 119



A: Model group　Decreased organell in cytoplasm (TEM × 10 000); B: GEN group　Abundant organells in cytoplasm (TEM × 10 000); C: OP group　Abundant organell in cytoplasm (TEM × 7 000)

图 3　辛基酚和三羟异黄酮对 DMBA 诱导大鼠第 119 天的乳腺超微结构改变

Fig 3　Effects of octylphenol and/or genistein on ultrastructure of mammary gland in DMBA-induced female rats on day 119

2.4　大鼠血中雌激素含量的变化

随大鼠的生长，大鼠血中雌二醇的含量降低，Mod 组第 105、119 天高于 C 组，Mod 组第 119 天血中雌二醇水平明显升高；Mod 组孕酮水平随大鼠生长变化不大，但 Mod 组在第 119、210 天明显高于 C 组。GEN 组雌二醇含量在第 105 天明显降低，第 119 天时明显增高；OP 组第 210 天雌二醇明显高于 C 组和 Mod 组。GEN、OP、GEN + OP 组在 3 个时相点血中孕酮含量均明显高于 C 组，OP 组血中孕酮水平在第 105、119 天明显高于 Mod 组，第 210 天明显低于 Mod 组，见表 2。

乳腺组织增生主要发生在雌二醇、孕酮水平同时增高的作用期。第 119 天时，GEN 组、Mod 组和 GEN + OP 组血中雌二醇、孕酮水平均明显高于 C 组，且大鼠在第 119 ~ 148 天乳腺肿瘤发生较多；OP 组第 210 天时雌二醇、孕酮水平明显高于 C 组，OP 组的乳腺肿瘤发生也较多，表明乳腺组织增生与血中雌二醇、孕酮水平同时增高相关，GEN 和 OP 通过影响血中雌二醇、孕酮水平进而影响乳腺肿瘤的发生。

表 2　辛基酚和三羟异黄酮对雌鼠血中雌二醇和孕酮水平的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Effect of GEN and/or OP on estradiol (E2) and progesterone (P4) in female rats ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Groups	E2 (μg/L)			P4 (mg/L)		
	Day 105	Day 119	Day 210	Day 105	Day 119	Day 210
Control	243.5 ± 2.1	181.0 ± 8.5	88.7 ± 10.2	20.2 ± 2.8	6.2 ± 0.6	7.8 ± 3.2
Model	253.0 ± 11.3	241.5 ± 13.4$^{\#}$	83.2 ± 13.9	29.6 ± 2.3	28.6 ± 1.4$^{\#\#}$	29.4 ± 5.5$^{\#\#}$
GEN	185.5 ± 3.5$^{*\#\#}$	246.5 ± 5.0$^{\#}$	98.3 ± 3.1	31.3 ± 1.4$^{\#}$	26.0 ± 1.73$^{\#\#}$	26.7 ± 2.0$^{\#\#}$
OP	207.5 ± 6.4$^{*\#}$	170.5 ± 10.6*	122.0 ± 21.7$^{*\#}$	128.2 ± 10.3$^{*\#\#}$	32.9 ± 1.3$^{*\#\#}$	21.2 ± 3.3$^{*\#\#}$
GEN + OP	218.5 ± 9.2	220.0 ± 8.5$^{\#}$	86.7 ± 13.6	122.4 ± 9.4$^{*\#\#}$	20.5 ± 8.4$^{\#\#}$	30.5 ± 3.7$^{\#\#}$

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* control; *: $P<0.05$, *vs* model

3 讨论

乳腺癌是妇女常见的恶性肿瘤,其发病与遗传、内分泌和环境等多种因素有关,尤其与性激素密切相关。环境雌激素(environment estrogen chemicals,EECs)是一类在结构或功能上与内源性雌激素相似的一大类化学物,包括工业化合物、杀虫剂、药物、真菌毒素、植物化合物等。越来越多的研究证实 EECs 能激活或抑制内分泌系统功能,给人类健康带来危险,特别是生殖、发育、遗传毒性与致癌性[5]。

研究表明 OP 可损伤小鼠睾丸细胞 DNA,降低雄性生殖能力[6],OP 还能增加 N-乙基-N′-硝基-N-亚硝基胍所诱导的子宫腺癌的发病率[3]。GEN 在不同环境中可表现出雌激素或抗雌激素活性,流行病学及动物学研究表明,出生后至青春期前进食含 GEN 的大豆制品,能降低每只大鼠肿瘤个数的发生[7]。

本实验以 DMBA 诱导乳腺癌,采用 GEN 和 OP 联合作用青春期前的大鼠,结果显示,GEN 及 GEN + OP 组能降低大鼠乳腺肿瘤发病率及每只大鼠的肿瘤个数,肿瘤体积明显缩小,肿瘤重量明显减轻。OP 组能明显增加 DMBA 诱导乳腺肿瘤的发病率,虽然 OP 组肿瘤体积和重量明显降低,这可能与肿瘤的性质不同、肿瘤发病率增高有关。电镜显示 OP 能促进乳腺癌细胞增殖,表现为乳腺癌细胞的核仁大而多,细胞中微腺腔及微绒毛几乎见不到,细胞分化程度高,肿瘤恶性程度高,OP 促进乳腺肿瘤发生;而 GEN 则促进乳腺癌细胞分化,促进乳腺癌细胞的凋亡,阻止癌变过程中乳腺上皮细胞增生及不典型增生的变化,最终表现为降低乳腺癌的发病;GEN 能拮抗 OP 对乳腺癌发病的影响。这与 Murrill 等[8]认为 GEN 降低乳腺癌的发病是因为 GEN 能促进乳腺的分化相类似。

徐红等[9]研究认为血清中雌激素、孕激素水平增高可能是致乳腺纤维腺瘤、乳腺癌的直接原因。乳腺组织增生主要发生在雌二醇、孕酮水平同时增高的作用期。本研究表明,Mod 组血中雌二醇和孕酮含量均比 C 组高,特别是 Mod 组的孕酮含量在各个时相点均比 C 组明显增高,这与前人的研究结果一致。临床乳腺癌的抗雌激素治疗都是通过去除、抑制、阻断或干扰雌激素所介导的细胞生长和分化作用,以减少肿瘤的发生率或抑制癌细胞的生长。本实验结果显示,GEN 组大鼠血清雌二醇在第 105 天时明显降低,这与 Lu 等[10]报道的健康妇女摄入大豆膳食能明显降低循环中雌二醇和孕酮相一致。随大鼠的生长,血清雌二醇呈降低趋势,但各组降低的速度不同,第 210 天时,OP 组雌二醇含量明显高于 Mod 组,但孕酮含量则明显低于 Mod 组。GEN 组和 GEN + OP 组血中雌二醇在第 210 天时呈增高趋势,但无统计学意义。最近,Yasuo 等[11]发现乳腺癌患者血清及癌组织中的雌二醇水平和孕激素受体含量增高与乳腺癌发生、发展和预后相关。本研究结果表明 GEN 的抑癌作用、OP 的促癌效应与血中雌二醇、孕酮含量改变有关。

本研究表明青春前期摄取 OP 可能会促进 DMBA 诱导乳腺癌的发病,肿瘤恶性程度高,青春前期摄取 GEN 具有阻断和抑制致乳腺癌诱导剂的良好作用,当机体同时摄取 GEN 和其他环境雌激素时,GEN 仍能降低乳腺癌的发病,因此,本研究认为青春前期摄取 GEN 具有可有保护和预防乳腺癌作用,该预防作用与血清中雌二醇、孕酮含量改变有关,其分子机制有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 彭俊华,糜漫天. 环境雌激素辛基酚检测的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2004, 31(3): 143 - 148.

[2] Shu X O, Jin F, Dai Q, *et al*. Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001, 10(5): 483 - 488.

[3] Yoshida M, Katsuda S, Tanimoto T, *et al*. Induction of different types of uterine adenocarcinomas in Donryu rats due to neonatal exposure to high-dose p-t-octylphenol for different periods[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(10): 1745 - 1750.

[4] Garlsson G, Gullbery B, Hafstrom L. Estimation of liver tumor volume using different formulas - an experimental study in rats[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1983, 105(1): 20 - 23.

[5] Knorr S, Braunbeck T. Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese medaka (Oryzias latipes) after continuous exposure to octylphenol[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2002, 51(3): 187 - 196.

[6] Raychoudhury S S, Blake C A, Millette C F. Toxic effects of octylphenol on cultured rat spermatogenic cells and Sertoli cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1999, 157(3): 192 - 202.

[7] Hilakivi Clarke L, Onojafe I, Raygada M, *et al*. Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis[J]. Br J Cancer, 1999, 80(11): 1682 - 1688.

[8] Murrill W B, Brown N M, Zhang J X, *et al*. Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats[J]. Carcinogenesis, 1996, 17(7): 1451 - 1457.

[9] 徐 红, 王为忠, 张新国,等. 血清雌二醇、孕激素与乳腺疾病关系的研究[J]. 医学研究生学报, 2004, 17(1): 30 - 32.

[10] Lu L J, Anderson K E, Grady J J, *et al*. Decreased ovarian hormones during a soya diet: implications for breast cancer prevention[J]. Cancer Res, 2000, 60(15): 4112 - 4121.

[11] Miyoshi Y, Akazawa kenji, Kamigaki S, *et al*. Prognostic significance of intra-tumoral estradiol level in breast cancer patients[J]? Cancer Lett, 2004, 216(1): 115 - 121.

(编辑 陈聪连)