论著

文章编号:1000-5404(2007)08-0674-04

n-6/n-3多不饱和脂肪酸对乳腺癌大鼠乳腺癌组织CYP17和CYP19表达的影响

王 静,糜漫天,韦 娜,王 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,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨不同n-6/n-3多不饱和脂肪酸(PUFA)膳食构成比对MNU诱导的乳腺癌大鼠血清雌二醇水平及乳腺组织CYP17、CYP19 mRNA表达的影响。**方法** 雌性SD大鼠65只随机分为5组,即n-6 PUFA组、10:1 n-6/n-3组、5:1 n-6/n-3组、1:1 n-6/n-3组和正常对照组,前4组以50 mg/kg MNU单次腹腔注射诱导大鼠乳腺肿瘤发生,正常对照组注射等体积无菌生理盐水。给药后立即分组喂养不同饲料,并在8周和18周时经阴道涂片证实间情期,股动脉取血液并剖取乳腺组织,采用放射免疫法检测血清雌二醇水平,利用RT-PCR技术检测乳腺组织中CYP17、CYP19 mRNA表达状况。**结果** 4组乳腺癌大鼠血清雌二醇水平及乳腺组织中CYP17、CYP19的表达较正常对照组均有所升高,其中n-6组最高,其余各组随n-6/n-3值减小而下降,1:1 n-6/n-3组显著低于n-6组。**结论** 不同n-6/n-3 PUFA膳食构成比对MNU诱导的乳腺癌大鼠血清雌二醇水平及乳腺组织CYP17、CYP19 mRNA的表达具有不同影响,1:1 n-6/n-3 PUFA膳食构成比能有效抑制乳腺癌大鼠血清雌二醇水平及乳腺组织CYP17、CYP19 mRNA表达的升高。

关键词:n-6/n-3多不饱和脂肪酸;乳腺癌大鼠;血清雌二醇;CYP17;CYP19

中图法分类号:R151.2;R394.3;R737.9 **文献标识码**:A

Effect of n-6/n-3 PUFA dietary of different constituent ratio on expressions of CYP17, CYP19 mRNA in rat breast tissues of MNU-induced breast cancer

WANG Jing, MI Man-tian, WEI Na, WANG Bin (Department of Nutritional and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid dietary of different constituent ratio on the serum level of estradiol and expressions of CYP17, CYP19 in MNU-induced rat breast cancer tissues. **Methods** Totally 65 female SD rats were randomly divided into 5 groups: n-6 PUFA, 10:1 n-6/n-3 PUFA, 5:1 n-6/n-3 PUFA, 1:1 n-6/n-3 PUFA and normal control. Except control group receiving physiological saline, all rats were given a single intraperitoneal injection of MNU (50 mg/kg) and switched to different diets containing fatty acids mentioned above. After 8 and 18 weeks, the serum level of estradiol and expressions of CYP17, CYP19 in the breast tissues of different groups were determined by RIA and RT-PCR. **Results** The serum level of estradiol and expressions of CYP17, CYP19 in rat breast cancer tissues were higher than normal control, highest in n-6 group and gradually decreased with the ratio of n-6/n-3 decreasing. **Conclusion** n-6/n-3 PUFA dietary of different constituent ratio can diversely influence the serum level of estradiol and expressions of CYP17, CYP19 in MNU-induced rat breast cancer tissues. n-6/n-3 PUFA dietary with constituent ratio of 1:1 can significantly inhibit the increased serum level of estradiol and increased expressions of CYP17, CYP19 in breast cancer tissues.

Key words: n-6/n-3 PUFA; breast cancer; estradiol; CYP17; CYP19

多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)是指有2个或2个以上不饱和双键结构的脂肪酸,也称多烯脂肪酸。根据第1个不饱和键位置不同,可分n-6、n-3两大类。PUFA为人体重要的脂肪酸,在体内发挥众多生理作用,研究表明,n-6 PUFA可促进乳腺癌的发生发展,而n-3 PUFA则具有相反作用[1-4]。所以不同n-6/n-3 PUFA膳食构成对于乳腺

基金项目:国家自然科学基金(30500408);达能营养研究与实验基金(2004) Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500408) and Danone Nutrition Foundation (2004)

作者简介:王 静(1973-),女,河南省洛阳市人,硕士研究生,主治医师,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68752291,E-mail:chongwangyufei@126.com

通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292,E-mail:mimt@sina.com

收稿日期:2007-01-09;修回日期:2007-01-22

癌的发生发展以及预防具有重要影响。雌激素水平的升高是乳腺癌发病最重要的危险因素之一。研究[5,6]表明，血清雌二醇水平升高可能是促进乳腺癌发病的主要因素之一，细胞色素 P450 系统的 17α-羟化酶（CYP17）和芳香化酶（CYP19）是雌激素合成过程中的限速酶，对于机体雌激素的合成具有重要影响。本实验以含不同 n-6/n-3 PUFA 膳食构成比的饲料喂食大鼠，并以甲基亚硝基脲（methylnitrosourea，MNU）诱导乳腺癌，观察不同比例 n-6/n-3 PUFA 对 MNU 诱导的乳腺癌大鼠血清雌二醇水平及乳腺组织中 CYP17、CYP19 mRNA 表达的影响。

1　材料与方法

1.1　动物模型与分组

清洁级雌性 SD 大鼠（45 d 龄）65 只，体质量 140～170 g，购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。适应性喂养 5 d 后，随机分为 5 组，即 n-6 PUFA 组、10∶1 n-6/n-3组、5∶1 n-6/n-3 组、1∶1 n-6/n-3 组和正常对照组，每组 13 只。前 4 组按 Lu 等[7] 的方法，在 SD 雌性大鼠 50 d 龄时，以 50 mg/kg 的 MNU，单次腹腔注射诱导大鼠乳腺肿瘤发生。正常对照组注射等体积的无菌生理盐水。给药后立即分组喂养不同的饲料，各组饲料按韦娜等[8] 的方法配制，持续 18 周。将大鼠置于（22±2）℃、50% 湿度及正常昼夜节律的环境中饲养，自由饮水。

1.2　主要试剂

MNU 购于 Sigma 公司，临用前用含 0.05% 冰醋酸的无菌生理盐水配成 10 mg/ml 的溶液。n-6 PUFA 以四川嘉里粮油工业公司的“金龙鱼”牌葵花籽油（主要含亚油酸）提供；n-3 PUFA 以山东鸿洋神生物公司的鱼油（主要含 EPA 和 DHA）提供。雌二醇放射免疫测定试剂盒购于上海生物制品研究所，Trizol 分离试剂购于 Invitrogen 公司，Erason 购于华氏生物技术公司，RNA 酶抑制剂、dNTP、Olig（dT）18 购于上海生工生物工程技术有限公司，M-MuLV 逆转录酶、*Taq* DNA 聚合酶购于 Promega 公司，溴化乙啶购于 Sigma 公司，PCR 标准购于北京天为时代科技公司。

1.3　指标检测

1.3.1　乳腺肿瘤病理结构观察　　实验末期，活杀大鼠并剥离乳腺肿瘤，经 10% 福尔马林液固定 24 h 后，石蜡包埋切片，按常规进行 HE 染色，然后在光镜下观察乳腺组织的病理变化。

1.3.2　乳腺肿瘤诱发率　　以发生乳腺肿瘤的大鼠数与大鼠总数相比，即为乳腺肿瘤的诱发率。

1.3.3　血清雌二醇水平的测定　　大鼠以 2% 的戊巴比妥钠（40 mg/kg）腹腔麻醉，股动脉取血液 5 ml 置于 10 ml 离心管中，3 000 r/m 离心 10 min，温度控制在 4 ℃，取上层血清置于 5 ml 冻存管置 -80 ℃低温冰箱留待检查。利用雌二醇放射免疫测定试剂盒按测定方法测定。

1.3.4　乳腺组织总 RNA 的提取　　分别于 8 周 和 18 周剪取各组乳腺组织 0.1 g，制备组织匀浆，利用 Trizol 试剂常规提取总 RNA。每个样品取 1 μl，ddH_2O 稀释 200 倍后用核酸蛋白定量仪测定 RNA 含量与纯度。整个过程所有使用的器械及液体均经 0.1% DEPC 水处理，戴消毒手套操作，防止 RNA 酶污染。

1.3.5　RT-PCR 检测 CYP17、CYP19 mRNA 表达　　总 RNA 3 μg，65 ℃水浴 5 min 和 0 ℃冰浴 5 min 后，依次加入 RNA 酶抑制剂 20 U、10 mmol/L dNTP 2 μl、Oligo（dT）18 1 μg、5×反应缓冲液 4 μl、M-MuLV 逆转录酶 200 U，加 Erasol 处理的去离子水至 20 μl，37 ℃孵育 1 h，再于 70 ℃放置 10 min 终止反应。取逆转录产物 1.5 μl 进行 PCR 反应。引物应用 Primer 5.0 引物设计软件设计，CYP17 引物由赛百盛合成，CYP19 引物由英骏公司合成，内参引物由上海生工合成。CYP17、CYP19 及内参照 β-actin 引物序列、退火温度及产物长度见表 1。扩增的反应参数为 95 ℃、5 min，94 ℃、45 s，退火温度（58.2 ℃、55.0 ℃、60.0 ℃）、45 s，72 ℃、1 min，共 30 个循环，72 ℃延长 10 min。反应结束后，各取 5 μl PCR 扩增产物，以含 0.5 μg/ml 溴化乙啶的 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳，紫外透射仪下进行观察，并用凝胶成像系统进行照相。

表 1　PCR 引物序列及退火温度

名称	引物序列	产物长度（bp）	退火温度（℃）
β-actin	上游：5′-AAGTCCCTCACCCTCCCAAAAG-3′	97	58.2
	下游：5′-AAGCAATGCTGTCACCTTCCC-3′		
CYP17	上游：5′-GCGACAGAAATCTGGTGGACAA -3′	461	55.0
	下游：5′- GATACGCAGCACTTCTCGGATG -3′		
CYP19	上游：5′-GCTTCTCATCGCAGAGTATCG-3′	289	60.0
	下游：5′-CAAGGGTAAATTCATTGGGCTG-3′		

1.4　统计学处理

所有数据均以 $x \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　乳腺癌组织病理学观察

病理切片观察显示，MNU 诱导的各组乳腺肿瘤组织表面凹凸不平，内面呈脂肪样病变。经 HE 染色，能确定各组诱发的乳腺肿瘤均为乳腺导管癌，其病理变化为乳腺腺腔的导管上皮细胞恶性增生、排列紊乱，层次不清、呈筛孔状，腺腔狭窄或完全消失，证实乳腺癌模型制造成功，见图 1。

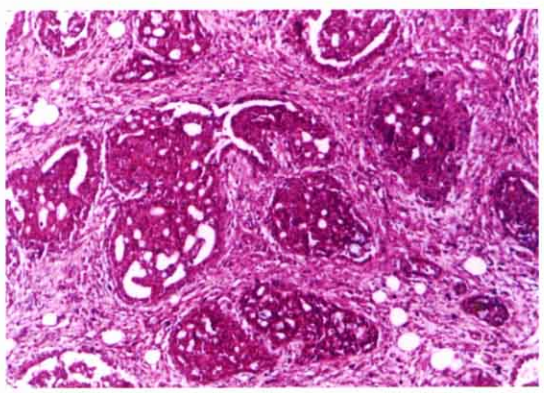


图 1　实验大鼠乳腺癌组织病理学观察　（HE×100）

2.2 不同 n-6/n-3 PUFA 膳食构成比对实验大鼠乳腺肿瘤诱发率的影响

在各 MNU 处理组中均有乳腺肿瘤发生，其中 10:1 n-6/n-3 组乳腺肿瘤诱发率最高，为 92.31%（12/13），n-6 组和 5:1 n-6/n-3 组乳腺肿瘤诱发率分别为 76.92% 和 84.62%（10/13，11/13），均约为 1:1 n-6/n-3 组乳腺肿瘤诱发率（46.15%，6/13）的 2 倍，见图 2。

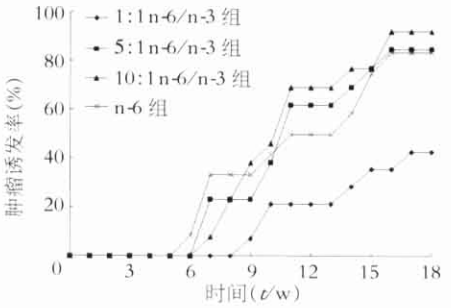


图 2 各组大鼠肿瘤诱发率变化

2.3 不同 n-6/n-3 PUFA 膳食构成比对乳腺癌大鼠血清雌二醇水平的影响

实验大鼠血清雌二醇水平的检测结果表明，MNU 诱导的乳腺癌大鼠血清雌二醇水平均较对照组有所升高，且 18 周时比 8 周时又有所升高，但 1:1 n-6/n-3 组与对照组相比不存在显著差异（$P>0.05$），n-6 组血清雌二醇水平最高，其余 3 组随 n-6/n-3 比值减小而有下降趋势，1:1 n-6/n-3 组血清雌二醇水平 8 周和 18 周时均显著低于 n-6 组，并在 18 周时显著低于 10:1 n-6/n-3 组，见表 1。

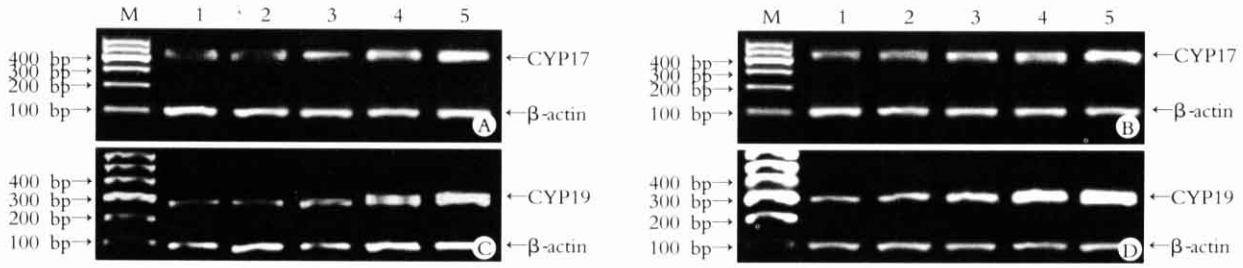
表 1 各组实验大鼠血清雌二醇水平（ng/L，$\bar{x}\pm s$）

组别	8 周	18 周
对照组	36.5 ± 5.2	37.2 ± 5.4
1:1 n-6/n-3	38.3 ± 6.2	40.5 ± 6.7
5:1 n-6/n-3	42.7 ± 7.1	45.8 ± 8.3
10:1 n-6/n-3	47.8 ± 8.6[a]	53.3 ± 9.1[ac]
n-6	54.3 ± 10.2[bc]	57.1 ± 11.4[bc]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.05$，与 1:1 n-6/n-3 组比较

2.4 不同 n-6/n-3 PUFA 膳食构成比对乳腺癌大鼠 CYP17、CYP19 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示，8 周后，MNU 诱导的乳腺癌大鼠乳腺组织中 CYP17、CYP19 mRNA 的表达较对照组均有所升高，但 1:1 n-6/n-3 组与对照组差别不大，4 组中以 n-6 组表达最强，其余 3 组随 n-6/n-3 比值减小而下降。实验 18 周时与 8 周时相比，各组 CYP17、CYP9 mRNA 的表达有所增加，但表达趋势与 8 周时相同，随 n-6/n-3 比值增加而表达增强，其中以 n-6 组表达最强，其余 3 组依次递减，1:1 n-6/n-3 组表达水平显著低于 n-6 组，见图 3。



M：标准；1：对照组；2：1:1 n-6/n-3 组；3：5:1 n-6/n-3 组；4：10:1 n-6/n-3 组；5：n-6 组

A：CYP17 8 周；B：CYP17 18 周；C：CYP19 8 周；D：CYP19 18 周

图 3 CYP17、CYP19 mRNA 表达的 RT-PCR 检测结果

3 讨论

雌激素水平的升高普遍被认为是乳腺癌发病最危险因素之一，血清雌二醇的浓度可能是患乳腺癌的主要决定因素。一方面，雌激素可以通过其受体传达信号，介导各种生长因子的表达，促进细胞的生长和增殖，另一方面，雌激素代谢过程中产生的某些活性代谢物可与 DNA 形成加合物损伤 DNA。而体内雌激素水平的高低取决于合成与代谢之间的动态平衡，其中涉及众多酶类，如 CYP17 和 CYP19 就是雌激素合成过程中的两个关键酶，其表达高低及活性水平对于机体雌激素的合成均具有重要影响[9]。胆固醇是所有类固醇激素的前体，雌二醇在一系列不同的酶如碳链裂解酶、CYP17、CYP19 的催化作用下从胆固醇经过许多步骤合成，其中 CYP17 催化孕烯醇酮和孕酮的 17α-羟化反应，并具有 17,20 碳链裂解酶活性，这两步酶反应对雌激素和雄激素合成是必需的。17,20 碳链裂解酶活性决定烯醇酮和孕酮生成雌激素和雄激素的比例，目前认为 17α 羟化及 17,20 碳链裂解酶活性的升高可能是乳腺癌危险增加的因素之一[10,11]。机体正常组织或肿瘤组织中的雄激素经芳香化反应可转为雌激素，这对于绝经妇女和乳腺癌患者来说，是体内雌二醇的

一个重要来源[12,13]。因此 CYP19 的活性决定了局部雌激素的水平。可见，CYP17 和 CYP19 表达水平和活性水平的高低与体内雌激素的水平密切相关。

乳腺癌是一种与膳食脂肪关系极为密切的肿瘤，大量研究表明不同种类的脂肪酸对乳腺癌的发生发展影响不同。研究证实，n-3 PUFA 如鱼油具有抑制肿瘤细胞增殖及诱导肿瘤细胞凋亡的抗肿瘤作用，而 n-6 PUFA 如豆油、玉米油却具有促进肿瘤发生和肿瘤细胞生长等促肿瘤作用，其中的详细机制尚不明了。本研究结果表明，不同 n-6/n-3 PUFA 膳食构成比对 MNU 诱导的大鼠乳腺肿瘤发生具有不同影响，在各 MNU 处理组中均有乳腺肿瘤的发生，其中 10∶1 n-6/n-3 组乳腺肿瘤诱发率最高，其次为 n-6 组和 5∶1 n-6/n-3 组，均约为 1∶1 n-6/n-3 组乳腺肿瘤诱发率的 2 倍，可见，1∶1 n-6/n-3 膳食脂肪构成能够有效降低 MNU 诱导的实验大鼠乳腺癌的发生。本研究通过放射免疫方法检测了各组实验大鼠血清雌二醇水平，结果证实，MNU 诱导的乳腺癌大鼠其血清雌二醇水平均较正常对照组有所升高，且 18 周时比 8 周时进一步升高，但 1∶1 n-6/n-3 组、5∶1 n-6/n-3 组与正常对照组相比不存在显著差异，n-6 组血清雌二醇水平最高，其余 3 组随 n-6/n-3 值减小而下降，1∶1 n-6/n-3 组血清雌二醇水平显著低于 n-6 组，可见在 MNU 诱导的乳腺癌发生发展过程中往往随体内雌激素水平的升高，而膳食中不同比例的 n-6、n-3 PUPA 对其具有不同的影响。本实验的结果表明，实验大鼠体内雌激素水平随膳食中 n-6/n-3 比例的增加而增高，与实验中大鼠乳腺癌发生率随 n-6/n-3 值的增加而增加相一致，这提示 n-6、n-3 PUFA 对 MNU 诱导实验大鼠乳腺癌发生的影响可能与雌激素途径有关。实验进一步检测了实验大鼠乳腺组织中 CYP17、CYP19 mRNA 表达的情况，检测结果表明，各组 MNU 诱导的乳腺癌大鼠，其乳腺组织中 CYP17、CYP19 基因的表达水平随膳食中 n-6/n-3 值的增大而增强，并且与正常对照组相比均有所增强，但 1∶1 n-6/n-3 组与正常对照组差异不大，而 n-6 组明显高于 1∶1 n-6/n-3 组。这表明，大鼠乳腺组织中 CYP17、CYP19 的表达水平普遍增强，而膳食中不同比例的 n-6、n-3 对其具有不同的影响，CYP17、CYP19 基因的表达水平随膳食中 n-6/n-3 值的增大而增强，而 CYP17 和 CYP19 是体内雌激素合成过程中的限速酶，其表达水平的升高促进雌激素的合成，这与血清雌二醇水平的检测结果相一致。

乳腺癌的形成无疑是受多因素的影响，而雌激素合成及代谢相关酶通过影响雌激素及其代谢产物的形成起作用，PUFA 对乳腺癌发生发展的影响也是多方面的，雌激素途径可能是其作用的一个重要通路，其详细机制值得进一步研究。

参考文献：

[1] Hardy S, St-Onge G, Joly E, *et al*. Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40 [J]. J Biol Chem, 2005, 280(14): 13285 - 13291.

[2] Binukumar B, Mathew A. Dietary fat and risk of breast cancer [J]. World J Surg Oncol, 2005, 3: 45 - 51.

[3] Yu F L, Greenlaw R, Fang Q, *et al*. Studies on the chemopreventive potentials of vegetable oils and unsaturated fatty acids against breast cancer carcinogenesis at initiation [J]. Eur J Cancer Prev, 2004, 13(4): 239 - 248.

[4] 韦　娜，糜漫天. n-6/n-3 多不饱和脂肪酸不同比例对乳腺癌细胞脂代谢调控基因的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(7)：652 - 655.

[5] Cassidy R A, Natarajan S, Vaughan M. The link between the insecticide heptachlor epoxide, estradiol, and breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 90(1): 55 - 64.

[6] Callejo J, Cano A, Medina M, *et al*. Hormonal environment in the induction of breast cancer in castrated rats using dimethylbenzanthracene: influence of the presence or absence of ovarian activity and of treatment with estradiol, tibolone, and raloxifene [J]. Menopause, 2005, 12(5): 601 - 608.

[7] Lu S, Zhang X, Badowi A F, *et al*. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib inhibits promotion of mammary tumorigenesis in rats fed a high fat diet rich in n-6 polyunsaturated fatty acids [J]. Cancer Lett, 2002, 184(1): 7 - 12.

[8] 韦　娜，糜漫天，王　斌. 不同膳食脂肪酸构成影响 MNU 诱导大鼠乳腺肿瘤发生的研究[J]. 营养学报，28(3)：247 - 251.

[9] 谭　丽，张　蕾，朱桂金. 中国汉族人多囊卵巢综合征患者 CYP17 基因多态性分析[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(3)：438 - 441.

[10] Piller R, Verla-Tebit E, Wang-Gohrke S, *et al*. CYP17 genotype modifies the association between lignan supply and premenopausal breast cancer risk in humans[J]. J Nutr, 2006, 136(6): 1596 - 1603.

[11] Hong C C, Thompson H J, Jiang C, *et al*. Association between the T27C polymorphism in the cytochrome P450 c17alpha (CYP17) gene and risk factors for breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 88(3): 217 - 230.

[12] Han D F, Zhou X, Hu M B, *et al*. Polymorphisms of estrogen-metabolizing genes and breast cancer risk: a multigenic study[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(18): 1507 - 1516.

[13] Tiulpakov A, Kalintchenko N, Semitcheva T, *et al*. A potential rearrangement between CYP19 and TRPM7 genes on chromosome 15q21.2 as a cause of aromatase excess syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(7): 4184 - 4190.

（编辑　张大春）