

苯并(a)芘诱导小鼠前胃癌模型的建立及共轭亚油酸对其预防作用

陈炳卿¹, 薛英本¹, 杨艳梅¹, 刘家仁¹, 郑玉梅¹, 刘瑞海²

(1. 哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150001; 2. Cornell University, Ithaca, New York, USA)

摘要: 目的 用苯并(a)芘[B(a)P]建立小鼠前胃癌模型,观察不同构成的共轭亚油酸(CLA)对前胃癌的抑制作用以及与脂质过氧化物的关系。方法 通过灌胃方式给予昆明种小鼠 B(a)P,建立前胃癌模型。用光学显微镜作病理组织检查,用比色法测定丙二醛(MDA)含量。结果 利用 B(a)P 成功地在昆明种小鼠体内建立了前胃癌模型,病理结果分析表明所建立的前胃癌为鳞状细胞癌;小鼠前胃肿瘤的计数结果表明,B(a)P 组,75% c9, t11-CLA 组,98% c9, t11-CLA 组,98% t10, c12-CLA 组的肿瘤发生率分别为 100%, 75.0%, 69.2% 和 53.8%;并且 75% c9, t11-CLA, 98% c9, t11-CLA, 98% t10, c12-CLA 明显降低前胃肿瘤的直径,但对荷瘤小鼠的平均荷瘤数没有影响;与阴性对照组和 B(a)P 对照组相比,CLA 处理能提高小鼠体内 MDA 含量。结论 B(a)P 诱导昆明种小鼠的前胃组织形成鳞状细胞癌;不同构成 CLA 对 B(a)P 诱导小鼠前胃癌均具有抑制作用,并且 MDA 可能是 CLA 发挥预防肿瘤作用的可能机理之一。

关键词: 苯并(a)芘; 亚油酸, 共轭; 前胃癌

中图分类号: R979.1.9

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)05-0354-04

苯并(a)芘[B(a)P]是一类具有致癌作用的多环芳烃族化合物,有大量资料表明其对多种动物均具有致癌性^[1]。小鼠口服 1 次 2 mg B(a)P 即可诱发出前胃癌,并有剂量反应关系。喂饲含 B(a)P 饲料,250 mg·kg⁻¹可诱发前胃癌,喂饲时间长可诱发

肺癌及白血病,也有剂量反应关系。大鼠口服 100 mg B(a)P 可诱发乳腺癌,每天口服 2.5 mg B(a)P 可诱发食管及前胃乳头状瘤。肿瘤的化学预防是目前肿瘤研究领域的又一热点,本文研究共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)作为肿瘤预防剂对 B(a)P 诱导小鼠前胃癌的预防作用。

CLA 是 Pariza 等^[2]在研究烤肉过程中所形成的致突变物时发现的一种可抑制突变形成的物质。随后,Ha 等^[3]提纯并确定此物质为 CLA,并证实其具有很强的抗癌作用。CLA 是一大类亚油酸的同分异构体,按双键的位置和空间构象可分为 8 种同分异构物。目前,国外对 CLA 的抗癌作用研究很多,但大部分使用人工合成的 CLA 同分异构物不同单体的混合物,而且 CLA 混合物中不同单体的比例也不尽相同^[4,5],并且关于 CLA 抗癌机理尚无定论,有些研究结果表明,CLA 可能通过诱发肿瘤细胞中脂质过氧化产物形成而抑制肿瘤细胞生长^[6]。在国内外,未见报道用纯度达到 98% 的 CLA 单体对肿瘤抑制作用的研究,仅本课题组曾采用纯度 75% c9, t11-CLA 来研究 CLA 对 B(a)P 诱导的小鼠前胃癌的预防作用,结果发现其对肿瘤发生的抑制率达 40%^[7]。本文利用 B(a)P 建立小鼠前胃癌模型,研究不同构成 CLA 对小鼠前胃癌的抑制作用,并同时分析 CLA 对小鼠体内脂质过氧化产物产生能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

B(a)P 购于德国 Fluka 公司。纯度 75% 的 c9, t11-CLA, 纯度 98% 的 c9, t11-CLA, 纯度 98% 的 t10, c12-CLA 由美国 Cornell 大学刘瑞海博士提供。丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒,南京建成生物工程研究所。

1.2 动物处理

6~7 周龄昆明种雌性小鼠[(20±2.9)g]由哈尔

收稿日期: 2002-02-04 接受日期: 2002-07-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870661)

作者简介: 陈炳卿(1934-),女,教授,博士生导师,主要从事食物污染及食物中活性成分作用研究及食物与肿瘤分子生物学研究。

*联系作者 E-mail: bingqingchen@sina.com

滨医科大学肿瘤研究所提供。观察 2 周后,按体重随机分为 5 组,每组 15 只。将 B(a)P 溶于色拉油中,浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,小鼠 ig 剂量为 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,对照组给予相同量的不含 B(a)P 的色拉油,持续 ig 4 周,每周 2 次。在给予 B(a)P 的 2 周后用实验饲料,其中含 80% 基础饲料和 20% 脂肪(用色拉油代替),各组小鼠按表 1 给予不同的饲料,持续 7 周后换基础饲料。至第 26 周时断髓处死小鼠,记录每组的荷瘤动物数、肿瘤的平均直径、动物的荷瘤数。鼠胃置于中性福尔马林固定,HE 染色,光学显微镜检查。

Tab 1. The diets given after 2-week benzopyrene [B(a)P]-treatment

Group	Diet
A Salad oil control	Standard diet
B B(a)P control	Standard diet
C B(a)P + 75% c9, t11-CLA	Experimental diet containing 0.8% c9, t11-CLA(purity 75%)
D B(a)P + 98% c9, t11-CLA	Experimental diet containing 0.5% c9, t11-CLA(purity 98%)
E B(a)P + 98% t10, c12-CLA	Experimental diet containing 0.5% t10, c12-CLA(purity 98%)

Each mouse except for mice in A group was given $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ B(a)P-containing salad oil[5 g B(a)P in 1 L of salad oil] ig twice every week for 4 weeks. The experimental diets(C – E group) were given for 7 weeks after 2 week treatment of B(a)P followed by the standard diet for 17 weeks. The experimental diet contained 80% (W/W) standard diet and 20% (W/W) salad oil containing different conjugated linoleic acid(CLA) as indicated in the table.

1.3 小鼠血浆中丙二醛的检测

血浆中的 MDA 含量测定采用南京建成生物工程研究所的 MDA 测定试剂盒检测,操作步骤按照试剂盒的说明书进行。

1.4 数据处理及统计学分析

采用 SPSS 软件包对小鼠肿瘤发生率、肿瘤平均

直径、平均荷瘤数进行方差分析。

2 结果

2.1 苯并(a)芘诱导的小鼠前胃癌模型的建立

图 1A 是色拉油对照组正常小鼠的胃,表面光滑,无肿瘤出现;B,C 为 B(a)P 诱导的小鼠前胃癌,可见黄白色,形状大小不一的呈乳头状肿物,最大直径为 4.5 mm,呈现菜花样外观。在显微镜下观察,可见对照组小鼠的胃组织结构排列有序,前胃上皮各层细胞层次明显,并且鳞状上皮细胞和腺上皮细胞排列整齐,D 所示正常胃组织的鳞状上皮和腺上皮交界处;经 B(a)P 诱导形成的前胃肿物的切片结果表明,E 所示前胃复层扁平上皮过度角化,基底细胞局灶性增生,棘细胞肥大,排列紊乱,并且呈乳头状向下生长,病理诊断为不典型增生;F 所示前胃上皮基底细胞增生活跃,排列紊乱,并穿过基底膜向下生长,形成原位癌。上述试验结果表明,在本实验中利用 B(a)P 成功地建立了小鼠前胃癌模型。

2.2 不同来源共轭亚油酸对小鼠前胃癌的抑制作用

表 2 为第 26 周处死动物后,对小鼠前胃癌的统计结果。可以看出,CLA 可以明显抑制 B(a)P 诱导的小鼠前胃癌,虽然 D 组和 E 组中 CLA 的含量为 0.5%,但两组动物肿瘤发生率明显低于 B 组,并且有低于 C 组(CLA 含量为 0.8%)的趋势;C 组仅显示出降低肿瘤发生的趋势;然而各组中荷瘤小鼠的平均荷瘤数没有明显差异;同时发现,C,D 和 E 组中动物肿瘤的平均直径明显小于 B 组。

2.3 小鼠血浆中丙二醛的检测结果

由表 3 结果表明,在 C,D 和 E 组中小鼠血浆中 MDA 的水平明显高于 A,B 组,其中 C 组的 MDA 水平接近 A,B 组的 1 倍;并且 C 组动物血浆中的 MDA 水平同样显著高于 D,F 组。

Tab 2. Inhibition of B(a)P-induced forestomach neoplasia in female Kunming mice by conjugated linoleic acid

Group	No. of experimental mice	No. of tumor-bearing mice	Total Tumors	Tumors/tumor-bearing mouse	Average diameter of tumor/cm
A	14	0	0	0	0
B	12	12	31	2.6 ± 0.9	0.22 ± 0.09
C	12	9	23	2.6 ± 0.7	$0.157 \pm 0.047^*$
D	13	9	22	2.4 ± 0.5	$0.13 \pm 0.08^*$
E	13	7	21	3.0 ± 0.6	$0.13 \pm 0.08^*$

The treatments of group A-E were the same as indicated in Tab 1. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, compared with group B.

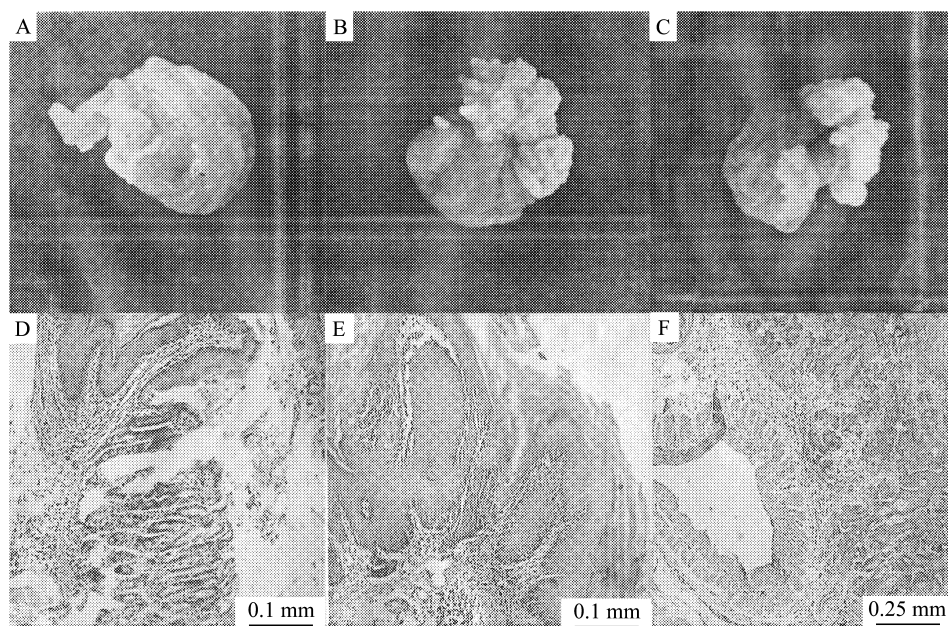


Fig 1. The pathological examination of mouse forestomach neoplasia induced by B(a)P. A: normal forestomach; B, C: forestomach neoplasia, D: normal forestomach; E: atypical hyperplasia; F: carcinoma *in situ*.

Tab 3. Effect of conjugated linoleic acid on malondialdehyde(MDA) in mouse plasma

Group	MDA/nmol·L ⁻¹
A	10.0 ± 1.6
B	9.9 ± 1.8
C	17.7 ± 4.6* # △▲
D	14.0 ± 4.1* #
E	13.3 ± 3.5*

$\bar{x} \pm s$, $n = 12 - 14$. * $P < 0.05$, compared with the group A; # $P < 0.05$, compared with the group B; △ $P < 0.05$, compared with the group D; ▲ $P < 0.05$, compared with the group E.

3 讨论

本文利用 B(a)P 成功地在昆明种小鼠体内建立前胃癌模型,病理分析结果为鳞状细胞癌,这与以往的研究结果相一致^[7]。B(a)P 的致癌性较强,使得研究对其致癌性有化学预防作用的肿瘤化学预防剂显得更为重要^[1]。

Ha 等^[4]利用含量为 90% CLA 混合物来研究 CLA 对 B(a)P 诱导的小鼠前胃癌的抑制作用时发现,CLA 能够抑制肿瘤的发生;Ip 等^[5]用含混合物(c9, t11-和 t9, c11-占 43.3%, t10, c12-占 45.3%)的饲料喂饲动物时发现,随着 CLA 含量的增加,各组中 DMBA 诱导的乳癌的发生率下降。本研究同样

证实不同构成 CLA 均能抑制 B(a)P 诱导的小鼠前胃癌的发生,并且 98% t10, c12-CLA 的抑制作用最强,这提示 CLA 对肿瘤的抑制除了和纯度有关外,很可能与其结构形式有关。

最初,CLA 被认为通过氧化作用保护机体免受自由基的损伤来预防肿瘤的发生^[6],但 O'shea 等^[7]研究发现 CLA 主要通过脂质过氧化产物对肿瘤细胞的细胞毒性作用而抑癌,并进一步证实 CLA 诱导的抗氧化酶活性的提高不能有效地防护脂质过氧化产物对肿瘤细胞的细胞毒性作用。最近该课题组又证实,主要含有 c9, t11-CLA 的甘油三酸酯的牛乳脂肪对 MCF-7 肿瘤细胞同样具有细胞毒作用。作者课题组^[6]研究发现,75% c9, t11-CLA 可以提高 B(a)P 诱导小鼠血浆中 MDA 的含量,但 CLA 对正常小鼠血浆中 MDA 的水平没有影响。然而,最近 Svanhild 等^[8]报道 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 E 可以完全消除 CLA 对 MDA 形成的影响,但 CLA 仍表现出抑制肿瘤细胞增殖的活性,因此,CLA 诱导的脂质过氧化产物对肿瘤细胞的毒性作用仅仅是 CLA 抑制肿瘤细胞增殖的可能机理之一。

本试验同样证实了 CLA 可提高 B(a)P 诱导小鼠血浆中的 MDA 水平,并且首次报道高纯度的 CLA 也具有此作用,同时发现 CLA 提高血浆中 MDA 的水平与其预防肿瘤的发生关系密切,但本实验结果显示,与 98% c9, t11-CLA, 98% t10, c12-CLA 相比,

75% c9, t11-CLA 在提高小鼠血浆中 MDA 水平方面表现出更强的活性,而在动物实验的肿瘤发生率方面,75% c9, t11-CLA 却并未表现出很强的抑制作用,因此推测 CLA 预防肿瘤发生的机理相当复杂,不能通过单一的生化现象来解释,这与 Svanhild 等^[8]的研究结果相一致。

4 参考文献:

- [1] Sun CH, Wu K, Wang CX, Zhang BL, eds. *Research advances in Carcinogen and Anticarcinogen*(致癌物与抗癌物研究进展)[M]. Changchun: Jilin Science and Technology Publishing House, 1997. 40 – 50.
- [2] Pariza MW, Hargraves WA. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene[J]. *Carcinogenesis*, 1985, **6**(4):591 – 593.
- [3] Ha YL, Grimm NK. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid[J]. *Carcinogenesis*, 1987, **8**(12):1881 – 1887.
- [4] Ha YL, Storkson J. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid[J]. *Cancer Res*, 1990, **50**(4):1097 – 1101.
- [5] Ip C, Banni S. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats[J]. *J Nutr*, 1999, **129**(12):2135 – 2142.
- [6] Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid[J]. *Cancer Res*, 1991, **51**(22):6118 – 6124.
- [7] O'Shea M, Stanton C, Devery R. Antioxidation enzyme defence responses of human MCF-7 and SW480 cancer cells to conjugated linoleic acid[J]. *Anticancer Res*, 1999, **19**(3A):1953 – 1960.
- [8] Svanhild S, Krokan HE. The inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives (CLA) of linoleic acid on the growth of human tumor cell lines is in part due to increased lipid peroxidation[J]. *Anticancer Res*, 1995, **15**(4):1241 – 1246.

Establishment of mouse forestomach neoplasia model induced by benzopyrene and chemopreventive effects of conjugated linoleic acid

CHEN Bing-Qing¹, XUE Ying-Ben¹, YANG Yan-Mei¹, LIU Jia-Ren¹, ZHENG Yu-Mei¹, LIU Rui-Hai²

(1. Public Health School of Harbin Medical University, Harbin 150001, China; 2. Cornell University, Ithaca, New York, USA)

Abstract: **AIM** To establish mouse forestomach neoplasia model and observe the relation of inhibitory effect on forestomach neoplasm and lipid peroxidation of conjugated linoleic acid (CLA) of different constituent. **METHODS** Forestomach neoplasm model induced by B(a)P in Kunming mice was established. The numbers of tumor in forestomach and the tumor diameter were counted, and malondialdehyde in mouse plasma was examined by colorimetry. **RESULTS** The incidence of neoplasm in B(a)P control group, 75% c9, t11-CLA group, 98% c9, t11-CLA group, 98% t10, c12-CLA group was 100%, 75.0%, 69.2%, 53.8%, respectively; CLA isomers could decrease significantly the average diameter of tumor, but show no effects on the average tu-

mor numbers in tumor-bearing mice; in contrary to salad oil control and B(a)P control group, CLA could increase malondialdehyde in mouse plasma.

CONCLUSION Squamous carcinoma was established in mouse forestomach induced by benzopyrene; CLA of different constituent inhibited the formation of forestomach neoplasm and the increased level of malondialdehyde may be one of the mechanisms of the inhibition of CLA on tumor.

Key words: benzopyrene; linoleic acid, conjugated; forestomach neoplasia

Foundation item: The project supported by National Science Foundation of China (39870661)

(本文编辑 石 涛)