

大豆异黄酮对 MMTV-erbB-2 转基因小鼠乳腺肿瘤中 MMP-2 和 TIMP-2 表达影响的研究 *

韩 丹 张广平 高社干 介晓阳 冯笑山[△]

(河南科技大学第一附属医院 河南 洛阳 471003)

摘要 目的 利用 MMTV-erbB-2 转基因小鼠,探讨食物中大豆异黄酮对 MMTV-erbB-2 转基因小鼠乳腺肿瘤发生发展的影响。方法 选择健康雌性 MMTV-erbB-2 转基因小鼠 60 只,随机分为实验组(自鼠龄四周起喂养含有大豆异黄酮的豆饲料)和对照组(喂养不含大豆异黄酮的普通饲料)。观察两组小鼠生长情况,观察各组小鼠乳腺肿瘤的发病率和潜伏期,记录肿瘤生长情况,并通过 HE 染色观察其病理类型,免疫组织化学染色 SP 法检测各组小鼠乳腺癌组织及正常乳腺组织中 MMP-2 和 TIMP-2 的表达并分析其关系。结果 豆饲料干预组、普通饲料干预组小鼠乳腺肿瘤的发病率分别为 36.7%、66.7%,豆饲料干预组小鼠乳腺肿瘤发病率与对照饲料干预组相比明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。小鼠肿瘤多生长在第 2-3 对乳腺上,两组小鼠乳腺肿瘤最大平均直径及潜伏期相比较差异无统计学意义。两实验组小鼠乳腺肿瘤组织经 HE 染色后全部确定为乳腺癌组织。两实验组小鼠乳腺肿瘤组织中 MMP-2 和 TIMP-2 表达均高于正常乳腺组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。MMP-2 和 TIMP-2 在乳腺肿瘤组织中表达呈负相关,在正常乳腺组织中表达无相关性。MMP-2 在豆饲料干预组、普通饲料干预组小鼠乳腺肿瘤组织中的阳性率分别为 83.3%、73.9%,各实验组阳性率相比较差异无统计学意义($P=0.888$)。TIMP-2 在豆饲料干预组、普通饲料干预组小鼠乳腺肿瘤组织中的阳性率分别为 33.3%、43.5%,各实验组阳性率相比较差异无统计学意义。结论 大豆异黄酮能抑制 MMTV-erbB-2 转基因小鼠乳腺肿瘤的发生,但其对小鼠乳腺肿瘤的作用与 MMP-2 及 TIMP-2 的表达无明显相关,具体机制尚待进一步研究。

关键词 大豆异黄酮;MMTV-erbB-2 转基因小鼠;乳腺癌;MMP-2;TIMP-2

中图分类号:Q95-33 R737.9 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)16-3053-04

Effect of Soybean Isoflavone on the Expression of MMP-2 and TIMP-2 in MMTV-erbB-2 Transgenic Mice's Breast Tumor*

HAN Dan, ZHANG Guang-ping, GAO She-gan, JIE Xiao-yang, FENG Xiao-shan[△]

(The First Affiliated Hospital of He'nan Science and Technology University, Luoyang 471003, China)

ABSTRACT Objective: This experiment using the MMTV-erbB-2 transgenic mice, discusses the influence of the soybean isoflavone in food to the occurrence and development of MMTV-erbB-2 transgenic mice's breast tumor. **Methods:** 60 female MMTV-erbB-2 transgenic mice were selected and divided into two groups: Bean feed intervention group: treated the mice with bean feed contain soybean isoflavones since four weeks after born; Ordinary feed intervention group: treated the mice with ordinary feed contains no soybean isoflavones. Observed the growth and the development of the mice, observed the incidence of breast cancer of the mice, the tumor latent period, record the growth situation of the tumor, made HE staining to observe the pathological type, using the immunohistochemistry staining to detected the MMP-2 and TIMP-2's expression in both normal breast tissue and breast tumor tissue of each group, and analyzed their relationship. **Results:** The incidence of breast tumor in bean feed intervention group and common feed intervention group were 36.7%, 66.7%. The incidence of breast tumor in bean feed intervention group were significantly reduced compared with the controlled feed intervention group, the difference had statistically significant ($P<0.05$). Most of the tumors located on the second and the third mammary gland, the maximum average diameter of the tumor in each groups compared to each other had no statistically significant difference. All the breast tumor tissues were determined to be breast cancer organizations by H E staining. The MMP-2 and TIMP-2's expression in breast tumor tissues were both higher than in normal breast tissues, the difference was statistically significant ($P<0.05$), the MMP-2 and TIMP-2's expression in breast tumor tissues had a negative correlation, and their expressions in normal breast tissue were unrelated. The positive rate of MMP-2 in bean feed intervention group and common feed intervention group's breast tumor tissue were 83.3% and 73.9%, the difference compared with each other had no statistically significant ($P=0.888$). The positive rate of TIMP-2 in beans feed intervention group and common feed intervention group's breast tumor tissue were 33.3% and 43.5%, the difference compared with each other had no statistically significant. **Conclusion:** Soybean isoflavone can restrain the breast tumor on MMTV-erbB-2 transgenic mice, but it have no obvious relation with the expression of MMP-2 and TIMP-2 in mice's breast tumor, and the specific mechanism need

* 基金项目 河南省医学科技攻关项目计划(200703082)

作者简介 韩丹(1984-)女,硕士研究生,主要从事消化道肿瘤和乳腺癌的研究。E-mail: handan840111@yanhoo.com.cn

[△]通讯作者 冯笑山, E-mail: samFeng137@hotmail.com

(收稿日期 2012-03-04 接受日期 2012-03-30)

to be studied further.

Key words: Soybean isoflavones; MMTV-erbB-2 transgenic Mice; Breast cancer; MMP-2; TIMP-2

Chinese Library Classification (CLC): Q95-33, R737.9 **Document code:** A

Article ID :1673-6273(2012)16-3053-04

前言

乳腺癌是常见的恶性肿瘤,在我国占全身恶性肿瘤的7%~10%,并呈逐年上升的趋势,特别是 erbB-2 基因过表达乳腺癌约占乳腺癌发病率的20%-40%,因其表现出高转移率和高死亡率,已经成为威胁女性健康的重要原因之一^[1]。近年来的研究表明,饮食和环境因素在乳腺癌的发生和发展过程中起到了非常重要的作用^[2]。大豆异黄酮(GST)作为新兴的肿瘤化学预防药物,与乳腺癌的关系越来越成为近年来的研究热点。MMP-2 是一种蛋白水解酶,可以水解细胞外基质(ECM)和基底膜(BM),TIMP-2 是 MMP-2 的抑制剂,能抑制 MMP-2 的蛋白水解作用,二者表达水平的动态平衡关系决定了 ECM 和 BM 的降解程度,对肿瘤的生长、侵袭与转移起到了非常重要的作用,可以作为原发肿瘤的评价指标,也可以作为肿瘤侵袭性与预后的评价指标。实验利用 MMTV-erbB-2 转基因小鼠这一良好的乳腺癌模型,采用喂养豆饲料的方法,研究饮食中的大豆异黄酮对小鼠乳腺癌发生发展的影响,并采用免疫组化 SP 法检测小鼠乳腺肿瘤组织中 MMP-2 及 TIMP-2 的表达,了解饮食中大豆异黄酮对小鼠乳腺癌的影响,为乳腺癌的早期预防和治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 MMTV-erbB-2

转基因小鼠,购于美国 JAX Lab (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME),许可证号:0207AX1。

1.2 饲养设施、实验饲料及用水

在 12-12 小时昼夜交替、室温 20-22℃ 的清洁级动物房中饲养,自由饮水,实验饲料配比为:豆饲料(玉米 0%,豆粉 40%,面粉 25%,麸皮 20%,糖 5%,植物油 5%,奶粉 5%);对照饲料(玉米 40%,豆粉 0%,面粉 25%,麸皮 20%,糖 5%,植物油 5%,奶粉 5%)。

1.3 实验试剂

浓缩型鼠抗人 MMP-2 单克隆抗体(北京鼎国昌盛生物技术有限公司代购美国 Santa Cruz 公司,工作浓度:1:150);浓缩型鼠抗人 TIMP-2 单克隆抗体(北京鼎国昌盛生物技术有限公司代购美国 Santa Cruz 公司,工作浓度:1:100);EDTA(pH 9.0)抗原修复液(福州迈新生物技术有限公司);免疫组化染色超敏试剂盒(福州迈新生物技术有限公司);DAB 酶底物显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.4 实验分组

随机选取鼠龄 5 周健康 MMTV-erbB-2 转基因雌性小鼠 60 只分为 2 个大组,分别为实验组(喂养豆饲料)和对照组(喂养对照饲料)。

1.5 观察指标

自鼠龄 10 周起,3 次/周,用触摸的方式检查小鼠的乳腺

(肿瘤直径达 3 mm 时可检出),记录所摸到肿瘤的日期以计算潜伏期及发瘤率,观察记录肿瘤最长径(单发肿瘤测量肿瘤最大长径,多发肿瘤测量其最大长径),记录肿瘤生长情况,待小鼠死亡后,收集肿瘤样本做病理切片,经 HE 染色后在显微镜下作形态学观察,并将小鼠乳腺肿瘤组织做石蜡切片,用免疫组化 SP 法检测肿瘤组织中 MMP-2 和 TIMP-2 的表达情况。

1.6 统计学方法

小鼠潜伏期和肿瘤生长情况采用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 软件进行完全随机设计的单因素方差分析和多重比较,各实验组肿瘤发生率及肿瘤组织中 MMP-2 和 TIMP-2 表达率的比较采用 χ^2 检验, MMP-2 和 TIMP-2 在肿瘤组织中的关系采用 spearman 相关性分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 各实验组小鼠生长情况

实验中发现,喂养豆饲料的实验组小鼠较喂养对照饲料的对照组小鼠进食量减少,体重增长缓慢,毛色稀疏,活动量减少,并且喂养豆饲料组小鼠更容易出现类腹泻样粪便,垫料潮湿等。各组小鼠体重均在 10 周-14 周趋于稳定,豆饲料干预组小鼠小鼠体重增长较对照饲料干预组小鼠缓慢,体重变化见图 1。各实验组小鼠体重增长变化相比较无统计学意义($P > 0.05$)。

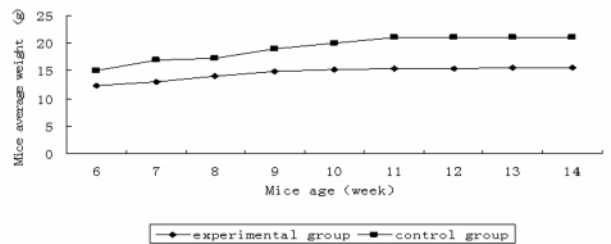


图 1 各实验组小鼠生长曲线

Fig.1 The growth curve of the mice in each group

2.2 各实验组肿瘤发生潜伏期

本实验中实验组小鼠乳腺肿瘤潜伏期为(368±17.12)天,对照组小鼠乳腺肿瘤潜伏期为(333±10.50)天,两组小鼠乳腺肿瘤潜伏期比较差异无统计学意义。

2.3 各实验组肿瘤生长情况

各实验组小鼠肿瘤多位于第 2 和第 3 对乳腺上,质地坚硬不平,少数肿瘤皮肤溃烂,肿瘤中心处变黑坏死。自首次触摸到肿瘤后每三天测量一次肿瘤直径(取最大直径)并记录,至实验结束,实验组和对照组平均最大直径分别为:12.63±0.89 mm、14.08±2.35 mm、实验组和对照组肿瘤平均最大直径比较差异无统计学意义。

2.4 各实验组小鼠发瘤率

实验中共有 31 只小鼠乳腺出现肿瘤,乳腺癌的总体发瘤率为 51.7%,其中实验组乳腺肿瘤发瘤率为 36.7%,对照组乳

腺肿瘤发瘤率为 66.7 % ,实验组小鼠发瘤率明显降低 ,两组乳腺肿瘤发瘤率相比较差异有明显统计学意义($P<0.05$)。

2.5 各实验小组肿瘤形态学观察情况

各实验小组肿瘤组织经 HE 染色后镜下观察 ,可见肿瘤组织内细胞排列密集 ,实质与间质分界清楚 ,肿瘤细胞核深度染色 ,异型性非常明显 ,肿瘤组织内坏死区周围被炎性细胞浸润 ,病理证实为乳腺癌。如图 2。

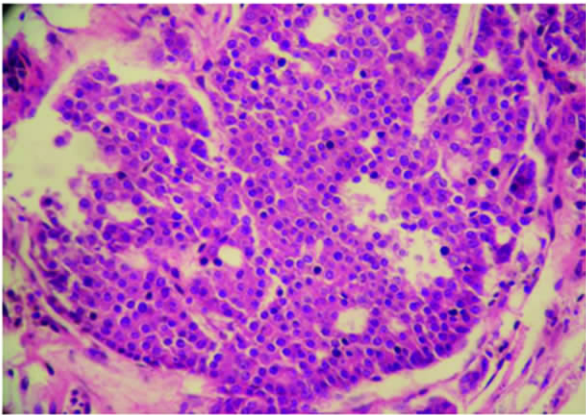


图 2 乳腺肿瘤细胞的形态学观察(HE 染色× 400)
Fig. 2 The morphological observation of the tumor(HE staining× 400)

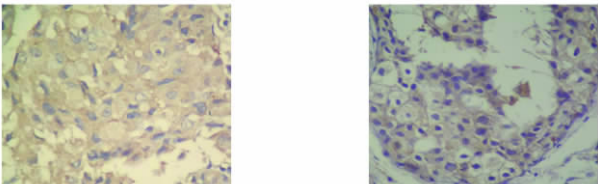
2.6 乳腺肿瘤组织与正常乳腺组织免疫组织化学染色结果

MMP-2 在 31 例乳腺癌组织中的阳性表达率为 74.2 % (23/31) ,在 29 例正常乳腺组织中的阳性表达率为 17.2 % (5/29) ,MMP-2 在乳腺肿瘤组织中的表达明显高于正常乳腺组织 ,两者相比较差异有统计学意义($P<0.01$) ;TIMP-2 在 31 例

乳腺癌组织中的阳性表达率为 38.7 %(12/31) ,在 29 例正常乳腺组织中的阳性表达率为 10.3 %(3/29) ,TIMP-2 在乳腺肿瘤组织中的表达明显高于正常乳腺组织 ,两者相比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.7 各实验小组肿瘤组织中 MMP-2 和 TIMP-2 表达情况

肿瘤组织中 MMP-2 和 TIMP-2 免疫阳性产物均呈棕褐色 ,如图 2。实验组和对照组乳腺癌组织中 MMP-2 表达阳性率对照组分别为 83.3 % ,73.9 % ,实验组和对照组乳腺癌组织中 TIMP-2 表达阳性率对照组分别为 33.3 % ,43.5 % ,两组小鼠乳腺肿瘤组织中 MMP-2 和 TIMP-2 表达阳性率比较无统计学意义。



MMP-2TIMP-2
图 3 MMP-2 和 TIMP-2 在乳腺肿瘤组织中的表达(免疫组化染色 SP 法× 400)

Fig. 3 MMP-2 and TIMP-2's expression in Tumor tissue
(Immunohistochemical staining, SP method× 400)

2.8 乳腺肿瘤组织中 MMP-2 与 TIMP-2 表达的相关性

在 31 例乳腺肿瘤组织中 ,MMP-2 高表达 (++)16 例 ,TIMP-2 低表达(-/+)22 例 ,MMP-2 低表达(-/+)15 例 ,TIMP-2 高表达(++)9 例 ,经相关性分析 ,MMP-2 和 TIMMP-1 在肿瘤组织中的表达呈显著负相关 $r=-0.551$, $P<0.01$,如表 1。

表1 乳腺肿瘤组织中 MMP-2 与 TIMP-2 表达的关系

Table 1 The relationship between the expression of MMP-2 and TIMP-2 in breast tumor

MMP-2	TIMP-2			
	-	+	++	+++
-	1	1	3	3
+	6	0	1	0
++	5	2	1	1
+++	7	0	0	0

2.9 正常乳腺组织中 MMP-2 和 TIMP-2 表达的相关性

在 29 例正常乳腺组织中 ,MMP-2 高表达 (++)4 例 ,MMP-2 低表达(-/+)25 例 ;TIMP-2 低表达(-/+)27 例 ,TIMP-2

高表达(++)2 例 ,经相关性分析 ,MMP-2 和 TIMP-1 在正常乳腺组织中的表达无相关性 $r=0.185$, $P>0.05$,如表 2。

表 2 乳腺组织中 MMP-2 与 TIMP-2 表达的关系

Table 2 The relationship between the expression of MMP-2 and TIMP-2 in breast tissue

MMP-2	TIMP-2			
	-	+	++	+++
-	22	1	1	0
+	1	0	0	0
++	2	0	1	0
+++	1	0	0	0

3 讨论

植物雌激素大豆异黄酮是大豆中的重要激素成分,也是人类膳食激素的主要组成部分^[3]。有大量的流行病学实验和研究证明,大豆异黄酮(GST)能影响肿瘤组织的血管生成,对肿瘤的发生发展产生重要影响^[4,5]。本实验利用 MMTV-erbB2 转基因小鼠这一稳定的乳腺癌模型,观察饮食中大豆异黄酮对小鼠乳腺癌发生发展的影响。

本实验发现 MMTV-erbB-2 转基因小鼠在本实验室生长状态良好,繁殖和适应能力较强。喂养豆饲料的实验组小鼠体重增加缓慢,且平均体重较喂养对照饲料的对照组小鼠减轻。这与大豆异黄酮广泛的生理作用有关,有关文献报道,进食含有大豆异黄酮的食物能改变基因的表达,从而影响脂类的代谢,干扰细胞摄取葡萄糖的过程,影响脂肪的分解和合成,并能改变 ATP 的合成过程^[6],减轻体重,减少脂肪堆积,并且能抑制食欲^[7]。本实验中大豆异黄酮干预后小鼠的生长情况及体重变化证明了其在人类和动物体内的新陈代谢作用。

研究证实大豆异黄酮可以通过调控基因表达,调控细胞周期及细胞凋亡的过程从而实现对多种肿瘤细胞增值的抑制^[8]。在本研究喂养豆饲料小鼠发病率较喂养对照饲料小鼠明显降低。大豆异黄酮能干预多种细胞信号转导途径,抑制细胞癌变的过程,能调节遗传事件诸如:诱导 DNA 的甲基化,直接或通过雌激素受体途径影响组蛋白的乙酰化过程等从而实现其抑癌作用^[9,10],可以抑制乳腺肿瘤细胞在细胞周期中从 G2 向 M 期转变,并能诱导阻滞在此周期内的凋亡^[11,12],在乳腺癌的发生阶段通常受到遗传事件的影响,而 GST 能上调 mRNA 对 BR-CAL 基因的表达来阻碍乳腺癌的发生^[13],本实验支持以上观点。

肿瘤新生血管形成在乳腺癌的发生发展,浸润转移中都起到了非常重要的作用。MMP-2 和 TIMP-2 是一对蛋白水解酶,MMP 通过降解基底膜及 ECM,改变肿瘤细胞的微环境,为血管内皮的迁移和新生血管的生长创造条件,TIMP-2 为 MMP-2 的抑制剂,可以抑制 MMP-2 的作用,二者的动态平衡影响着新生血管的形成过程^[14,15]。肿瘤新生血管不仅是肿瘤本身生长的必要条件,也是肿瘤组织浸润转移的组织学基础,对肿瘤生长,预后等起到了非常重要的作用。在本实验中,我们通过检测 MMTV-erbB-2 转基因小鼠乳腺肿瘤组织以及其正常乳腺组织中 MMP-2 和 TIMP-2 的表达,进一步了解大豆异黄酮对小鼠乳腺肿瘤的影响。在本实验中,小鼠正常乳腺组织和乳腺肿瘤组织中 MMP-2 表达的阳性率分别为 17.2%和 74.2%,TIMP-2 表达的阳性率分别为 10.3%和 38.7%,MMP-2 和 TIMP-2 在乳腺肿瘤组织中表达均高于其在正常乳腺组织中的表达,且在乳腺肿瘤组织中 MMP-2 和 TIMP-2 的表达成负相关,但二者在正常乳腺癌组织中的表达却无相关性。这与 Jones et al.^[16]的研究结果一致,在肿瘤组织中 MMP-2 和 TIMP-2 的高表达可能是由于细胞受到刺激后,MMP-2 分泌增加,继而刺激肿瘤细胞反射性分泌更多的 TIMP-2 来抑制肿瘤的进一步生长。MMP-2 和 TIMP-2 在肿瘤组织中的表达呈负相关,在评价肿瘤的生长情况,恶性程度及预后时,检测二者之间的平衡比单独检测单项指标更有意义。在本实验中,在实验组中用豆饲料干预小鼠后,其乳腺肿瘤组织中 MMP-2 及 TIMP-2 的表达与对照组相比较无明显差异,可以进一步增加实验小鼠数量进行验证,推测大豆异黄酮对乳腺癌的影响机制可能与 MMP-2 和 TIMP-2

的表达无关,其具体机制需要进一步研究。

随着肿瘤研究的进展,肿瘤的预防在肿瘤防治中起到了越来越重要的作用,大豆异黄酮作为一种明确的肿瘤抑制剂,其应用范围也越来越广泛,但是其作用效果还受到多种条件限制,而乳腺癌是一种受多因素影响,多阶段发展的复杂病变,我们需要大量的实验和临床研究来明确二者的关系,为乳腺癌的预防和治疗找到有效的方法。

参考文献(References)

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Cancer statistic,2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005,55(2):74-108
- [2] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics,2007[J]. CA Cancer Clin, 2007,57(1):43-66
- [3] Day JK, Besch Williford C, McMann TR, et al. Dietary genistein increased DMBA-induced mammary adenocarcinoma in wild-type, but not ER- KO mice[J]. Nutr Cancer, 2001,39(11):226-232
- [4] Bella Kaufman, Steven Stein, Michelle A Casey, et al. Lapatinib in combination with capecitabine in the management of ErbB2-positive (HER2-positive) advanced breast cancer[J]. Biologics, 2008,2(1): 61-65
- [5] Wu AH, Wan P, Hankin J, et al. Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian and Americans [J]. Carcinogenesis, 2002,23(9): 1491-1496
- [6] Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases [J]. Biol.Chem, 1987,262 (19): 5592-5595
- [7] Sakla MS, Shenouda S, Ansell J, et al. Genistein affects HER2 protein concentration, activation, and promoter regulation in BT-474 human breast cancer cells[J]. Endocrine, 2007,32: 69-78
- [8] Fang MZ, Chen D, Sun Y, et al. Reversal of hypermethylation and re-activation of p16INK4a, RARBeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy [J]. Clin. Cancer Res, 2005,11 (85): 7033-7041
- [9] Davis J N, Singh B, Bhuiyan M, et al. Genistein-induced up-regulation of p21WAF1, down-regulation of cyclin B, and induction of apoptosis in prostate cancer cells[J]. Nutr. Cancer, 1998, 32(16): 123-131
- [10] Lian F, Bhuiyan M, YW Li, et al. Genistein-induced G2-M arrest, p21WAF1 upregulation, and apoptosis in a non-small-cell lung cancer cell line[J]. Nutr. Cancer,1998, (38): 184-191
- [11] Upadhyay S, Neburi M, Chinni S, et al. Differential sensitivity of normal and malignant breast epithelial cells to genistein is partly mediated by p21(WAF1)[J]. Clin.Cancer Res, 2001,7(27):1782-1789
- [12] Li Y, Upadhyay S, Bhuiyan M, et al. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein [J]. Oncogene, 1998,18(99): 3166-3172
- [13] Cabanes A, Wang M, Olivo S, et al. Prepubertal estradiol and genistein exposures up-regulate BRCA1 mRNA and reduce mammary tumorigenesis[J].Carcinogenesis, 2004,25(25):741-748
- [14] Gfignon D, Sakr W, Toth M, et al. High levels of tissue inhibition on metalloproteinase 2 (TIMP-2)expression associated with poor outcome in invasive bladder cancer [J]. Cancm Res, 1996,56(7):1654-1659
- [15] Natuo S, Kanayama H, Takigawa H, et al. Setum levels of a tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)in bladder cancerpatients[J]. Int J urol, 1994, 1(3):228-231
- [16] Jones J L, Glynn P, Walker R A, et al. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors and the activator MT-MMP in primary breast carcinomas[J]. Pathol, 1999, 189(2): 161-168