

钙和维生素 D 对高脂饮食诱发的小鼠乳腺上皮增生的影响

薛乐勋 袁保梅 王建民 许培人 王建成

摘要 本研究目的是观察饮食中添加钙和维生素 D 对高脂饮食诱发的小鼠乳腺上皮细胞增生的影响。将四周龄小鼠随机分成三组,分别给予对照 AIN-76A 饲料,高脂低钙低维生素 D 饲料(试验饲料 I)和高脂加钙加维生素 D 饲料(试验饲料 II)。饲养九周后终止试验,小鼠植入渗透泵灌注溴脱氧尿苷(BrdU)72 小时。结果显示试验饲料 I 组的小鼠乳腺终末小导管上皮细胞 BrdU 标记指数与对照饲料组比较明显升高($P < 0.05$)。而试验饲料 II 组的 BrdU 标记指数与对照组相似($P > 0.05$)。本实验研究发现进一步证明,高脂饮食能诱发小鼠乳腺小导管上皮细胞的增生,同时也提示饮食中添加钙和维生素 D 有助于预防高脂饮食的这种不良作用。

关键词 乳腺;上皮细胞增生;钙;维生素 D

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤之一,对妇女的健康构成了严重威胁。流行病学及许多实验研究发现,一些常见的恶性肿瘤如乳腺癌、结肠癌等与饮食中的脂肪含量密切相关。当食物中的脂肪占每天总热量的 30%~40% 时,乳腺癌的发生率明显升高^[1]。我们以前的实验结果显示,在未用任何致癌剂的情况下,单纯喂饲高脂饮食即能导致小鼠乳腺导管上皮细胞增生^[2,3]。业已证明,饮食中补充钙和维生素 D 能明显抑制与高脂饮食相关的结肠上皮细胞增生^[4~6]为了寻找安全、有效、易于推广预防乳腺癌的方法,我们进行了钙和维生素 D 预防高脂饮食诱发小鼠乳腺癌上皮细胞增生的实验研究,现将初步结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 饲料 对照饲料按美国营养研究所研制的鼠类饲料 AIN-76A 配方配制^[7],每克饲料中含脂肪(玉米油)50mg,钙 5.0mg,维生素 D₃1.0IU;高脂低钙低维生素 D 饲料(试验饲料 I),每克饲料含脂肪(玉米油)200mg,钙 0.5mg,维生素 D₃0.5IU;高脂加钙及维生素 D 饲料(试验饲料 II),每克饲料中含脂肪(玉米油)200mg,钙 7.0mg,维生素 D₃2.3IU。

1.2 动物及处理 三周龄雌性 C57BL/6J 小鼠,饲养在塑料盒内,每盒 5 只。动物室,室温 23℃,相对湿度 50%,明暗各 12 小时。经一周检疫后随机分成三组:对照饲料组,试验饲料 I 及实验饲料 II 组,分别喂饲对照饲料及实验饲料。试验周期为九周,实验结束时,所有

动物接受 BrdU 灌注,剂量 1.44mg/鼠,灌注 72 小时后,断颈处死动物,取乳腺固定在 95% 的乙醇中,24 小时后将标本移入 95% 乙醇中固定。组织经石蜡包埋,切片用 HE 及免疫组化染色,分别供病理组织学检查和 BrdU 标记指数测定。

1.3 小鼠乳腺形态学 小鼠乳腺导管在显微镜下大体分大、中、小三种类型的导管,详细描述见从前的报导^[3]。

1.4 免疫组化 切片在 58℃ 加热大约 40 分钟,继之于二甲苯中脱蜡,过梯度乙醇溶液。为使双股 DNA 变性,需要在室温下浸入 2N 的盐酸溶液中 90 分钟,而后与 10% 正常马血清一起孵育 60 分钟,以便除去非特异性结合。然后切片与 1:1000 抗 BrdU 单克隆抗体(Becton-Dickinson,美国)在室温下作用 1 小时,再置 4℃ 冰箱中过夜。次日切片与 1% 生物素马抗小鼠 IgG 和 Avidin 生物素过氧化物酶复合物(ABC 试剂盒,美国)分别在室温下各孵育一小时,最后切片用 0.03% 二氨基联苯胺染色,苏木素复染。在上述每次孵育前,需用 PBS(7.4)冲洗三次。

BrdU 阳性细胞表现为细胞核呈棕褐色。用显微镜在 400× 下计数 200 个视野/鼠。内容包括各类导管的数目,不同导管上皮细胞总数以及 BrdU 阳性细胞总数。上皮细胞增生率以标记指数表示:

$$\text{BrdU 标记指数} = \frac{\text{标记细胞数}}{\text{细胞总数}}$$

1.5 统计学分析 对动物体重和乳腺导管上皮细胞 BrdU 标记指数的组间比较,采用 t 检验进行显著性检测。

作者单位:430052 郑州,河南医科大学医学实验中心(薛乐勋、袁保梅、王建民、许培人);河南中医学院生理教研室(王建成)

2 结果

2.1 体重 实验开始时,不同饲料组间平均体重相近($P>0.05$)。各组动物在九周实验期间,均未出现死亡。实验结束时,两个高脂饲料组的动物体重分别为 20.1 ± 1.2 、 $20.3 \pm 0.8(\bar{x} \pm s)$,对照组动物体重为 18.8 ± 0.7 。高脂饲料组动物体重增加较对照组多,但组间差异在统计学上无显著性($P>0.05$),提示三组饲料组动物的热量摄入相似。

2.2 导管增殖及免疫组化研究 附表概括了两种试验饲料对乳腺导管增殖(导管数/鼠)及导管上皮细胞增生率的影响。

2.2.1 大导管 实验结束时,三个饲料组动物的平均大导管数及导管上皮细胞 BrdU 标记指数的差异在统

计学上无显著性($P>0.05$)。

2.2.2 中导管 与大导管一样,各组间的小鼠平均导管数及上皮细胞的 BrdU 标记指数相似($P>0.05$)。

2.2.3 小导管 九周喂饲实验后,每只小鼠平均小导管数,两个试验饲料组与对照组间的差异无显著性($P>0.05$)。然而,高脂低钙低维生素 D 饲料组的 BrdU 标记指数远较对照组或高脂加钙加维生素 D 饲料组的为高($P<0.05$),但对照饲料组与高脂加钙加维生素 D 饲料组间的 BrdU 标记指数相似($P>0.05$)。

上述发现表明,给小鼠喂饲高脂低钙低维生素 D 饲料能诱发乳腺小导管上皮细胞过度增生,而通过给高脂饲料添加钙和维生素 D 则能预防高脂饮食诱发的乳腺小导管上皮细胞的过度增生。

表 1 小鼠乳腺导管数和导管上皮细胞 BrdU 标记指数

	大导管			中导管			小导管		
	对 ^a	I	II	对	I	II	对	I	II
动物数(只)	7	6	7	7	6	7	7	6	7
导管数/鼠 ^b	12.4 (2.5) ^c	10.8 (1.4)	12.1 (2.3)	98.0 (11.3)	77.3 (10.9)	77.1 (6.8)	4.4 (0.9)	5.2 (1.6)	3.9 (1.0)
BrdU 标 记指数	0.0175 (0.006)	0.03147 (0.0244)	0.02568 (0.0129)	0.01796 (0.0152)	0.02969 (0.0137)	0.01023 (0.004)	0.01226 (0.0045)	0.03959 ^d (0.0109)	0.0119 (0.0066)

注:a. 对 I、II 分别代表对照饲料、试验饲料 I 和 II 组;b. 表示每只鼠所检查的 200 个视野内的导管数;c. 括号内数字为标准误;d. 与对照组和试验饲料 II 组比较,差异显著($P<0.05$)

3 讨论

乳腺终末小导管是乳腺癌的好发部位,大多数人的乳腺癌发生在小导管上皮^[8,9]。本实验研究中喂饲高脂低钙低维生素 D 饲料小鼠的小导管乳腺上皮细胞 BrdU 标记指数明显升高,这与文献报道一致^[3,10]。人类乳腺癌病因学非常复杂,涉及到多种环境和遗传因素。流行病学研究发现饮食脂肪与乳腺癌发病率增高密切相关^[11,12]。实验研究也同样证实摄入的脂肪酸量和类型能明显影响化学诱发的乳腺癌^[13,14]。当给动物喂饲高脂饮食时,乳腺肿瘤的诱发率明显上升,而且潜伏期缩短。此外,富含 Omega-6(n-6)多不饱和脂肪酸的玉米油比富含饱和脂肪酸的牛油促癌作用更强^[14]。癌化学预防的定义是采用一种或多种制剂逆转或抑制癌前向癌变过程的进展。业已证明,钙和维生素 D 能有效地抑制高脂饮食诱发的结肠上皮细胞的增生^[4~6],故本实验研究的目的是观察钙和维生素 D 对高脂饮食诱发的乳腺上皮细胞增生是否有效。结果显示食用含有 20% 玉米油的高脂低钙低维生素 D 饲料的小鼠乳腺小导管上皮细胞的 BrdU 标记指数显著高于食用仅含有 5% 玉米油的对照组小鼠。然而当增加高脂饲料中钙和维生素 D 含量后,则小导管上皮细胞的 BrdU 标记指数与对照饲料组的相似。这些发现进一步证明,n-6 多不饱和

脂肪酸能导致乳腺小导管上皮细胞的过度增生,而饮食中添加钙和维生素 D 则能阻断 n-6 多不饱和脂肪酸的这种作用。

钙可使增生的结肠上皮逆转为接近正常状态^[6],其机制是食物中钙与结肠腔内的胆汁酸、脂肪酸结合形成不溶性的钙皂^[15]。然而钙在某些缺乏胆汁酸的组织(如乳腺、胰腺、前列腺)中仍有抗增生作用^[3,16,17],因此钙的上述作用机制不能解释它能预防高脂饮食诱发的乳腺上皮增生的抗增生作用。我们推测钙在乳腺组织中的抗增生作用机制包括:(1)钙能抑制鸟氨酸脱羧酶的活性;(2)促进 DNA 修复,抑制基因突变;(3)增加具有抗癌作用的松果体激素 Melatonin 的分泌。维生素 D 除了参与肠道钙的吸收和维持骨钙代谢平衡外,同样具有诱导细胞分化和抑制乳腺上皮增生作用^[18,19]。本研究中高脂加钙及维生素 D 饲料(试验饲料 II)中的脂肪含量虽然与试验饲料 I 的完全相同,但喂饲试验饲料 II 的小鼠则未出现乳腺小导管上皮细胞 BrdU 标记指数显著升高。这进一步证实了饮食中添加钙和维生素 D 有助于预防高脂饮食诱发的乳腺小导管上皮细胞增生,提示食物中的钙和维生素 D 在干扰与高脂饮食相关的乳腺癌发生过程中是有效的化学预防剂。

参 考 文 献

- 1 Nationl Center for Health Statistics;US Dept. Health Human Services, 1990,172:4~60
- 2 Xue LX, Newmark HL, Lipkin M. Mammary gland hyperproliferation and hyperplasia induced in mice by a Western-style diet. *Cancer Res*, 1995,36:596
- 3 Xue LX, Newmark HL, Lipkin M. Model of mouse mammary gland hyperproliferation and hyperplasia induced by a Western-style diet. *Nutr Cancer*, 1996,26:281~287
- 4 Newmark HL, Lipkin M, Maheswari N. Colonic hyperplasia and hyperproliferation induced by a nutritional stress diet with four components of Western-style diet. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82:491~496
- 5 Newmark HL, Lipkin M, Maheswari N. Colonic hyperproliferation induced in rats and mice by nutritional stress diets containing four components of a human Western-style diet (series 2). *Am J Clin Nutr*, 1991,54:209~214s
- 6 Lipkin M, Newmark HL. Effect of added dietary calcium on colonic epithelial-cell proliferation in subjects at high risk for familial colonic cancer. *N Eng J Med*, 1985, 313: 1381~1384
- 7 Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr*, 1977, 107:1324~1434
- 8 Wellings SR, Jensen HM. On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. *J Natl Cancer Inst*, 1973, 50:1111~1118
- 9 Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst*, 1975, 55:231~273
- 10 Zhang L, Bird RP, Bruce WR. Proliferative activity of murine mammary epithelium as affected by dietary fat and calcium. *Cancer Res*, 1987,47:4905~4908
- 11 Carroll KK, Khor HT. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog Biochem Pharmacol*, 1975,10:308~353
- 12 Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer*, 1975,15:617~631
- 13 Welsch CW, House JL, Herr BL, et al. Enhancement of mammary carcinogenesis by high levels of dietary fat: A phenomenon dependent on ad libitum feeding. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82:1615~1620
- 14 Hopkins GJ, Carroll KK. Relationship between amount and type of dietary fat in promotion of mammary carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz(a) anthracene. *J Natl Cancer Inst*, 1979, 62:1009~1012
- 15 Newmark HL, Wargovich S, Bruce WR. Colon cancer and dietary fat, phosphates and calcium: A hypothesis. *J Natl Cancer Inst*, 1984,72:1323~1325
- 16 Xue LX, Newmark HL, Leung D. Epithelial cell hyperproliferation induced in the exocrine pancreas of mice by a Western-style diet. *J Natl Cancer Inst*, 1996,88:1586~1590
- 17 Xue LX, Lipkin M, Newmark HL. Induced hyperproliferation in epithelial cells of mouse prostate by a Western-style diet. *Carcinogenesis*, 1997, 18:995~999
- 18 Colston KW, Berger U, Combes RC. Possible role for vitamin D in controlling breast cancer cell proliferation. *Lancet*, 1989,1:188~191
- 19 Koga M, Eisman JA, Sutherland RL. Regulation of epidermal growth factor receptor levels by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 1988, 48:2734~2739

Effects of dietary calcium and vitamin D on induced epithelial hyperproliferation in mouse mammary gland by a high-fat diet

Xue Lexun, et al

Laboratory Center of Medical Sciences, Henan

Medical Univeraity, Zhengzhou 450052

The present study was designed to investigate the effects of added dietary calcium and vitamin D on the development of epithelial cell hyperproliferation induced in the mammary gland of mice by a high-fat diet. Four-week-old C57BL/6J mice were randomly divided into three groups, and given control diet (AIN-76A), high-fat diet with reduced calcium and vitamin D (Experimental diet I) and high-fat diet with addition of

calcium and vitamin D (Experimental diet II), respectively. Nine weeks after the dietary intervention, the animals were implanted with osmotic pumps for 72 hours to infuse bromodeoxyuridine (BrdU). Findings revealed that mice on Experimental diet I had significantly increased ($P < 0.05$) BrdU-labeling indices of the terminal ducts of the mammary gland, compared to control diet group; however, BrdU-labeling indices of the terminal ducts were similar ($P > 0.05$) in the control diet and Experimental diet II groups. The present study further demonstrates that a high-fat diet induces hyperproliferation of epithelial cells in the terminal ducts, and also suggests that this effect of the high-fat diet can be prevented by increasing dietary calcium and vitamin D.

Key words: mammary gland; epithelial hyperproliferation; calcium; vitamin D

68 例骨转移瘤放疗止痛疗效分析

匡黎赫凡

恶性肿瘤晚期常出现骨转移,由于功能障碍、疼痛、食宿不便等,给患者带来痛苦。治疗上除用药物外,放疗为骨转移瘤首选之止痛手段。据文献报导,放疗对骨转移瘤的疼痛缓解率为 70%~90%。本文对我科 1994 年 2 月~1997 年 5 月期间收治的 68 例骨转移瘤的放疗疗效进行了回顾性分析,旨在进一步探讨更有效的放疗止痛方法。

1 材料和方法

一般资料:男 41 例,女 27 例,平均年龄 58.5 岁,有 X 线或 CT 为确诊依据,原发瘤均有病理证实,其中肺癌 43 例,乳腺癌 18 例,结肠癌 4 例,鼻咽癌 2 例,前列腺癌 1 例。68 例骨转移共 85 处病灶,11 例为多发性骨转移,余为孤立性胃转移。

放疗方法:均采用⁶⁰Co γ 射线外照射,根据病情,估计患者生存时间,预后不佳者可用少次大分割剂量止痛性放疗,生存期较长者采用常规分割剂量止痛放疗。其中 23 例采用少次大分割剂量放疗,即 300CGy/次,3 次/周,或 400~500CGy,2 次/周;45 例采用常规分割放疗,即 200CGy/次,5 次/周。肿瘤量:脊椎骨 4000~4500CGy,其他处骨 5000~6000CGy。

2 疗效分析

以放疗后病人疼痛的主观感觉为治疗评价标准:(1)完全缓解:疼痛完全消失;(2)部分缓解:基本上不用或偶用止痛药;(3)轻微缓解:仍需用止痛药缓解疼痛;(4)未缓解:治疗无效。临床观察如下:

附表 不同剂量组放疗疗效

放疗剂量	例数	完全缓解(%)	部分缓解(%)	轻微缓解(%)	未缓解(%)
大分割剂量组	23	14(60%)	6(26%)	2(8.6%)	1(4.3%)
常规分割剂量组	45	26(57.7%)	13(28.8%)	5(11.1%)	1(2.2%)
合计	68	40(58.8%)	19(27.9%)	7(10.3%)	2(2.9%)

同剂量组放疗疗效,统计学检验无显著性差异($P > 0.05$),止痛有效率达 86.7%,两组虽无统计学差异,但大分割剂量组简单易行,特别对年老体弱,截瘫病人避免了因每天放疗多次搬动的麻烦和摆位的难度,对骨转移患者是一种较为理想的放疗方式。

同时,在采用不同剂量组放疗时,我们分别观察了大分割剂量和常规分割剂量在 30Gy 的缓解率为 19 例(82.6%)和 33 例(73.3%),在 40Gy 时缓解率为 20 例(86.9%)和 39 例(86.6%),亦无统计学上的差异,但 30Gy 缓解期较短。且不同病理类型骨转移瘤的放疗,止痛效果无差别,与有关文献报导一致。

11 例多发骨转移瘤和 57 例孤立骨转移瘤放疗有效率分别为 81.8%和 87.7%,无统计学差异。但在临床上转移部位少者放疗疗效较多发转移瘤效果好(即有临床差异)。

放疗对骨转移瘤能达到满意止痛效果,既可缓解疼痛,又能消除患者功能障碍,且经济,但总的说来骨转移瘤患者预后不佳。

作者单位:442008 湖北十堰市,东风汽车公司中心医院 肿瘤科