

饮酒促进 TA2 小鼠乳腺癌的发生及机制探讨

徐陌¹, 陈志军², 桂照华¹, 陈丹蕾¹, 赵浩东¹, 杨帆¹, 汪思应^{1*}

(1. 安徽医科大学病理学与病理生理学教研室, 合肥 230032; 2. 重庆市云阳县人民医院, 重庆 4045000)

【摘要】 目的 探讨酒精是否促进小鼠乳腺癌的发生及可能的作用机制。方法 建立饮酒 TA2 小鼠模型, 用 ANALOX AM1 酒精分析仪检测 TA2 小鼠血液的酒精浓度, 确保动物模型的建立; 观察比较酒精组 TA2 小鼠(饮用含 2% 酒精的无菌水)与对照组 TA2 小鼠(饮用不含酒精的无菌水)的乳腺癌发生率、肿瘤的生长速度以及肿瘤的大小; 酶联免疫法(ELASA)检测两组小鼠血清中雌激素水平的差异。结果 饮酒组 TA2 小鼠自发乳腺癌的比例显著增加($P < 0.05$), 成瘤平均天数明显缩短($P < 0.05$), 生成肿瘤的重量和体积均有增加但差异无显著性($P > 0.05$)。饮酒组 TA2 小鼠体内的雌激素水平明显升高($P < 0.05$)。结论 酒精促进 TA2 小鼠乳腺癌的发生, 该作用可能通过雌激素水平的增加来实现。

【关键词】 酒精; TA2 小鼠; 乳腺癌; 雌激素

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 05-0563-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.05.017

Alcohol promotes the tumorigenesis of spontaneous breast cancer in TA2 mice and the possible potential mechanism

XU Mo¹, CHEN Zhi-jun², GUI Zhao-hua¹, CHEN Dan-lei¹, ZHAO Hao-dong¹, YANG Fan¹, WANG Si-ying^{1*}

(1. Department of Pathology and Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Yunyang County People's Hospital, Chongqing 404500)

【Abstract】 Objective To explore whether alcohol promotes the development of breast cancer in TA2 mice and the possible potential mechanism. **Methods** Thirty-two 6-8-week old nulliparous female TA2 mice were randomly divided into control and ethanol-exposure groups, 16 mice in each group. The mice of the ethanol-exposure group were given 2% ethanol in drinking water, and the mice of control group received regular drinking water. Serum ethanol concentration in the TA2 mice was measured using an ANALOX AM1 alcohol analyzer. The incidence of breast cancer, tumor growth rate and tumor size of the ethanol-exposure and control groups were observed and compared. The estrogen levels of the two groups was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELASA). **Results** Compared with the control group, the tumor formation rate of spontaneous breast cancer in the alcohol-exposure group was significantly increased (62.5% vs. 43.75%, $P < 0.05$), the average number of days of tumor formation was shortened (285 days vs. 335 days, $P < 0.05$), the tumor weight and volume were increased but not significant ($P > 0.05$), and the level of estrogen in the ethanol-exposure mice was significantly higher than that in the control group ($P > 0.05$). **Conclusions** Alcohol promotes the tumorigenesis of spontaneous breast cancer in TA2 mice, which may be associated to the increase of estrogen levels.

【Key words】 Ethanol; TA2 mouse; Breast cancer; spontaneous; Estrogen level

Corresponding author: WANG Si-ying. E-mail: sywang@ahmu.edu.cn

乳腺癌是严重威胁女性健康的恶性肿瘤, 发病率和死亡率在女性恶性肿瘤中排名第一^[1]。已确定酒精是促发乳腺癌的重要危险因素, 现有的流行

病学和实验研究表明酒精与乳腺癌风险之间存在正相关性^[2-4]。目前关于酒精促进乳腺癌的研究主要集中在酒精可以促进已有乳腺肿瘤的生长, 增强乳

[作者简介] 徐陌, 女, 研究生, E-mail: xumo820@foxmail.com

[通讯作者] 汪思应, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤分子生物学。E-mail: sywang@ahmu.edu.cn

腺癌细胞的侵袭和转移能力^[5-7]。实验室前期也有相关研究,通过建立模拟人类饮酒状况的饮酒小鼠(C57BL/6)模型,证明了一定浓度的乙醇(饮用水中含 2% 酒精)可以促进小鼠乳腺肿瘤的生长和转移,且酒精上调乳腺癌组织内单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)的水平可能是酒精影响乳腺癌生长转移的机制之一^[8]。然而,目前还没有直接的证据证明酒精可以促进乳腺肿瘤的发生,相关的报道并不多见,具有一定的研究价值和意义。

近交系小鼠津白 2(Tientsin Albino 2, TA2)是天津医科大学筛选培育多年建立的自发性乳腺癌高发模型。它于 1969 年成功繁殖,并于 1984 年由国际小鼠遗传标准命名委员会认证。TA2 小鼠源于 KM 种小鼠,在无外部诱导剂或致癌物刺激时具有很高的自发性乳腺癌发生率^[9]。TA2 经产雌鼠自发乳腺癌的发生率为 81%,见瘤鼠龄为 330 d;未经产雌鼠乳腺癌发生率为 41%,见瘤鼠龄为 435 d^[10]。TA2 自培育以来已作为动物模型成功用于多项乳腺肿瘤相关的研究:因其乳腺癌的生物学行为与人妊娠相关乳腺癌(pregnancy-associated breast cancer, PABC)极为相似,是研究 PABC 浸润转移机制的良好动物模型^[11];且有研究显示 TA2 小鼠的乳腺癌细胞呈三阴性,是研究三阴性乳腺癌的理想模型^[12]。

前期研究中,实验室已成功掌握建立饮酒小鼠动物模型的方法(SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠)^[8,13],本实验采用类似的方法建立饮酒 TA2 小鼠模型,并利用这一模型研究饮酒是否促进乳腺癌的发生及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6~8 周龄未经产雌性 TA2 小鼠 32 只,体重 18~22 g,购自安徽医科大学动物实验中心【SCXK(皖)2011-002】。饲养于安徽医科大学动物实验中心普通环境内【SYXK(皖)2011-007】。温度 22~25℃,昼夜明暗周期 12 h/12 h。

1.1.2 主要试剂

无水乙醇(Sigma 公司);小鼠雌激素(E)酶联免疫检测试剂盒(北京华迈科生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 TA2 饮酒小鼠模型

TA2 小鼠随机分为两组(对照组和模型组各 16 只),酒精组($n=16$)的小鼠自晚上 8:00 开始给予含 2% 酒精的饮用水(2 mL 无水乙醇+98 mL 灭菌水配制 100 mL 含 2% 酒精的饮用水)12 h,次日上午 8:00 更换为常规饮用水至晚上 8:00,如此往复。对照组($n=16$)的小鼠仅提供常规灭菌饮用水。每天监测常规水与含酒精的水的消耗,对照组和酒精组之间的液体摄入差异无显著性。在早上 8:00 用 1 mL 注射器收集小鼠尾静脉血,用 Analox AM1 酒精分析仪(Analox Instruments, Lunenburg, MA)测定血液乙醇浓度(BEC)。

1.2.2 动物实验

观察记录两组 TA2 小鼠自发乳腺肿瘤的时间,待自发肿瘤后小鼠生长至濒死状态时(约 1 年的时间),结束实验,颈椎脱臼法处死小鼠,取出自发成瘤的肿瘤组织,称取肿瘤组织的重量,并记录肿瘤组织的体积,体积基于下式计算: $V=1/2 \times a \times b^2$ (用刻度盘测量肿瘤的两个垂直尺寸径, a 为肿瘤最长径, b 为肿瘤最短径)。

1.2.3 TA2 小鼠血清雌激素水平检测

实验结束后,小鼠眼球取血,室温静置 1~2 h 后 4℃ 离心(一般 4000 r/min,离心 20 min),得到的上清液即为血清,可小心将上清吸出(注意切勿吸出细胞成分),分装后置于 -80℃ 保存或立即检测,采用小鼠雌激素(E)酶联免疫检测试剂盒检测小鼠血清雌激素水平,严格遵循说明书的步骤操作。

1.3 统计学处理

实验数据用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,实验结果均采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

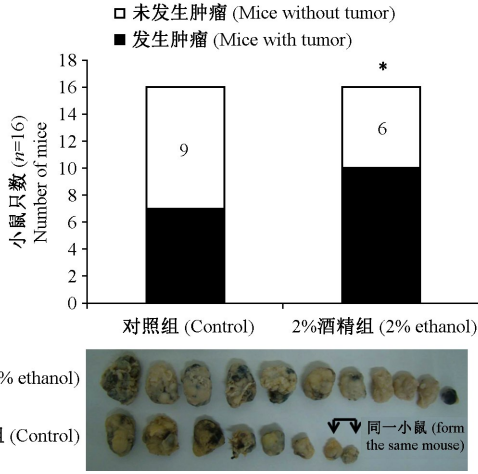
2.1 饮酒对 TA2 小鼠肿瘤发生率的影响

根据实验方法将具有自发乳腺癌特性的 TA2 小鼠分为酒精组和对照组,实验结束时,酒精组 TA2 小鼠 10 只自发乳腺肿瘤,发生率为 62.5% (10/16),而对照组仅 7 只小鼠自发乳腺肿瘤,发生率为 43.75% (7/16)。酒精组 TA2 小鼠的自发乳腺肿瘤的发生率明显高于对照组。如图 1。

2.2 饮酒对 TA2 小鼠肿瘤自然发生时间的影响

分别记录实验组与对照组各小鼠自发乳腺肿瘤的自然发生时间,对照组 TA2 小鼠平均见瘤鼠龄 335 d,2% 酒精组 TA2 小鼠平均见瘤鼠龄 285 d。酒

精组 TA2 小鼠自发乳腺肿瘤的时间较对照组明显缩短 ($P < 0.05$), 差异具有显著性。如图 2。

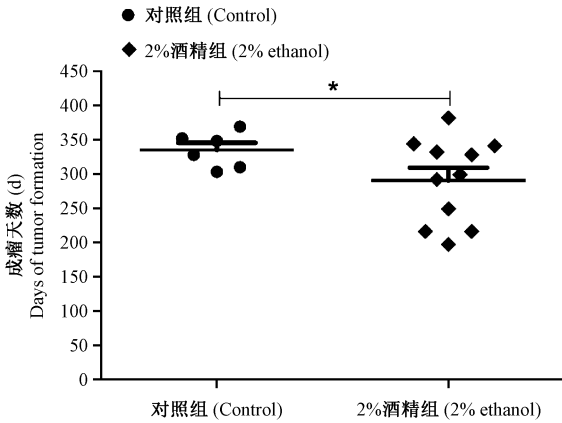


注:与对照组比, * $P < 0.05$ 。

图 1 饮酒对 TA2 小鼠肿瘤发生率的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Fig. 1 Effect of ethanol on the incidence of breast cancer in TA2 mice



注:与对照组比, * $P < 0.05$ 。

图 2 饮酒对 TA2 小鼠肿瘤自然发生时间的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Fig. 2 Effect of ethanol on the time of spontaneous mammary tumor formation

2.3 饮酒对 TA2 小鼠自发肿瘤重量的影响

待 TA2 小鼠自发乳腺肿瘤后生长至濒死状态, 处死小鼠, 取出小鼠肿瘤组织测量其重量, 2% 酒精组 TA2 小鼠肿瘤的平均重量略高于对照组, 但差异无显著性 ($P > 0.05$)。如图 3。

2.4 饮酒对 TA2 小鼠自发肿瘤体积的影响

按照实验方法测量各肿瘤组织的最长径和最短径, 并计算肿瘤体积大小, 饮用 2% 酒精的小鼠肿瘤体积略大于对照组, 但差异无显著性 ($P > 0.05$)。

如图 4。

2.5 饮酒对 TA2 小鼠血清雌激素水平的影响

为了进一步研究酒精促进 TA2 小鼠自发乳腺肿瘤的机制, 我们通过 EILSA 实验检测小鼠血清中雌激素水平, 结果显示酒精组 TA2 小鼠的血清雌激素水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 差异有显著性。如图 5。

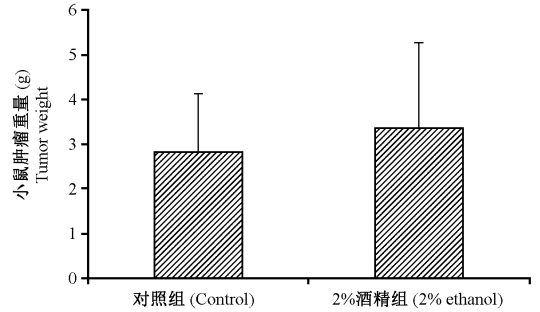


图 3 饮酒对 TA2 小鼠自发肿瘤重量的影响

Fig. 3 Effect of ethanol on the tumor weight in the TA2 mice

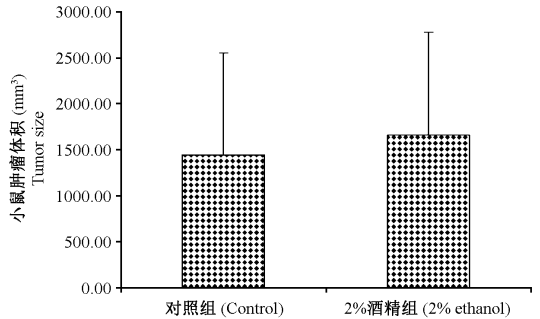
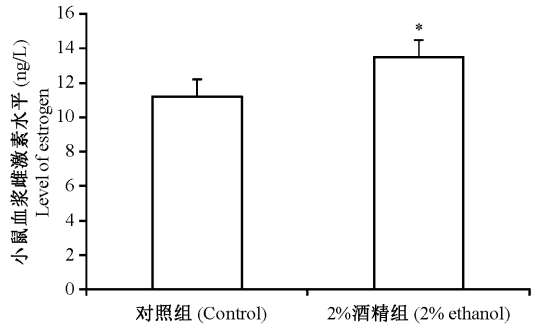


图 4 饮酒对 TA2 小鼠自发肿瘤体积的影响

Fig. 4 Effect of ethanol on the tumor size in the TA2 mice



注:与对照组比, * $P < 0.05$ 。

图 5 饮酒对 TA2 小鼠血清雌激素水平的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Fig. 5 Effect of ethanol on the level of estrogen in the TA2 mice

3 讨论

酒精是乳腺癌一个已确定的危险因素, 并且以剂量依赖的方式增加乳腺癌风险; Smith-Warner 及

其同事报道了酒精和乳腺癌之间的线性关系,每天饮用含有 10 g 酒精的饮品乳腺癌的发病率增加 10%,且与饮用酒精量呈正相关(总量小于 60 g/d)^[2]。Singletary 和 Gapstur2001 年也总结了酒精滥用或过度饮酒(≥ 3 次/天)与女性乳腺肿瘤发病率增加之间的关系^[3]。近年来关于饮酒与肿瘤的关系及酒精对肿瘤作用机制的研究不断增加,但主要集中在酒精促进肿瘤进展及相关的分子机制的研究。本实验室也曾在前期研究中模拟人类的饮酒状况建立饮酒小鼠模型,并证明了一定浓度的乙醇(饮用水中含 2% 酒精)可以促进 C57BL/6 小鼠乳腺肿瘤的生长和转移,且酒精上调乳腺癌组织内 MCP-1 的水平可能是酒精影响乳腺癌生长转移的机制之一^[8]。但酒精是否可以促进肿瘤的发生还没有确切的定论,相关报道也很少见。且目前的研究大都采用体外细胞培养或将乳腺癌细胞接种至免疫缺陷小鼠体内,难以完全模拟人类饮酒的体内生理状况。本研究我们通过模拟人类的饮酒状况建立 TA2 饮酒小鼠模型,并利用 TA2 小鼠的高发原发性乳腺癌的特性来探讨饮酒与乳腺癌发生之间的关系。研究结果显示,当 TA2 小鼠的日常无菌水中添加 2% 浓度的酒精后,小鼠自发乳腺癌的比例增加,发生率高达 62.5%,并且成瘤平均天数缩短,生成肿瘤的重量和体积也有一定增加但不具有显著性差异。以上结果证明了酒精可以促进乳腺癌的发生。本研究为探讨酒精与乳腺癌发生之间的关系提供了一种可能的实验方法和动物模型,在此基础上可以进一步研究酒精促进乳腺癌发生的可能作用机制。

目前已有证据证明雌激素水平的升高是乳腺癌的一个危险因素,高水平的雌激素可以通过激活雌激素途径刺激细胞增殖从而促进乳腺癌的发展^[14]。流行病学研究显示,饮酒的女性具有较高的雌激素水平^[15],因此有观点认为酒精可能通过雌激素途径影响乳腺癌;酒精可能通过增加芳香化酶(一种将雄激素转化为雌激素的酶)来增加体内的雌激素水平;也可能增加了其受体 ER α 的表达,使得酒精存在下乳腺癌细胞对雌激素更加敏感^[4,5,16]。我们在 TA2 小鼠摄入酒精的同时监测其血液的雌激素水平,饮酒组 TA2 小鼠体内的雌激素水平明显升高,这可能与更高的肿瘤发生率和肿瘤生长速率相关。

总之,酒精可以促进 TA2 小鼠乳腺癌的发生,该作用可能通过增加雌激素水平而实现,相关作用机制还需进一步研究和探讨。鉴于越来越多的女性经常性饮用酒精饮料,因此了解酒精如何促进乳腺癌的发生发展,确定酒精影响乳腺癌的机制,可以为

女性提供乳腺癌与酒精相关的预防建议及治疗策略,降低其发生风险,为其治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Oeffinger KC, Fontham ET, Etzioni R, et al. Breast cancer screening for women at average risk: 2015 guideline update from the American Cancer Society [J]. JAMA, 2015, 314(15): 1599-1614.
- [2] Smith-Warner SA, Spiefelman D, Yaun SS, et al. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies [J]. JAMA, 1998, 279(7): 535-540.
- [3] Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms [J]. JAMA, 2001, 286(17): 2143-2151.
- [4] Zhang SM, Lee IM, Manson JE, et al. Alcohol consumption and breast cancer risk in the women's health study [J]. Am J Epidemiol, 2007, 165: 667-676.
- [5] Etique N, et al. Ethanol stimulates proliferation, ER α and aromatase expression in MCF-7 human breast cancer cells [J]. Int J Mol Med, 2004, 13(1): 149-155.
- [6] Wong AW, Dunlap SM, Holcolomb VB, et al. Alcohol promotes mammary tumor development via the estrogen pathway in estrogen receptor alpha-negative HER2/neu mice [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2012, 36(4): 577-587.
- [7] Wang Y, Xu M, Ke ZJ, et al. Cellular and molecular mechanisms underlying alcohol-induced aggressiveness of breast cancer [J]. Pharmacol Res, 2016, 115: 299-308.
- [8] Wang S, Xu M, Luo J, et al. Ethanol promotes mammary tumor growth and angiogenesis: the involvement of chemoattractant factor MCP-1 [J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 133(3): 1037-1048.
- [9] 林炳水, 刘家勇, 李华, 等. TA2 系小鼠自发瘤的观察 [J]. 天津医药, 1982, 10(6): 345-347.
- [10] 朱悦, 张诗武, 贾兴红, 等. 津白 II 小鼠自发乳腺癌病理相关特征分析 [J]. 天津医科大学学报, 2007, 2(13): 149-150.
- [11] Wang X, Huang C, Zhang D, et al. The effect of high gravidity on the carcinogenesis of mammary gland in TA2 mice [J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 63(5): 396-409.
- [12] Sun B, Zhang S, Zhang D, et al. Identification of metastasis-related proteins and their clinical relevance to triple-negative human breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(21): 7050-7059.
- [13] 卢艳敏, 李菲菲, 杨金莲, 等. 饮酒小鼠动物模型建立及其对雌性激素的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(5): 41-44.
- [14] Tan H, Zhong Y, Pan Z. Autocrine regulation of cell proliferation by estrogen receptor-alpha in estrogen receptor-alpha-positive breast cancer cell lines [J]. BMC Cancer, 2009, 9: 31.
- [15] Chen WY, Colditz GA, Rosner B, et al. Use of postmenopausal hormones, alcohol, and risk for invasive breast cancer [J]. Ann Intern Med, 2002, 137(10): 798-804.
- [16] Yue W, Yager JD, Wang JP, et al. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis [J]. Steroids, 2013, 78(2): 161-170.