

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名：王峰

日期：2007.5.27

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解山东大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权山东大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

(保密论文在解密后应遵守此规定)

论文作者签名：王峰 导师签名：王峰 日期：2007.5.28

亚麻籽木酚素的分离纯化及其对裸鼠乳腺移植瘤影响的初步研究

研究生：王晓蕾

导师：张莲英副教授

专业：生物化学与分子生物学

中文摘要

研究目的：

提取亚麻籽木酚素——开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷（Secoisolariciresinol diglycoside, SDG）并利用两种不同方法进行分离和纯化，比较不同方法所得产品的产率及纯度；研究 SDG 对裸鼠乳腺移植瘤的影响。

研究方法：

一、从亚麻籽中提取 SDG，利用两种不同的方法（1、硅胶吸附柱层析+硅胶吸附柱层析，2、硅胶吸附柱层析+C18 反相柱层析）对 SDG 提取液分离、纯化，计算 SDG 产率，高效液相色谱分析确定产品纯度，对两种方法所得产品的产率及纯度对比并分析。

二、选用人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 对裸鼠进行异种移植；第 6 周将移植成功的裸鼠随机分为 3 组：对照组、SDG 组和亚麻籽组。每周测量瘤体大小并计算移植瘤表面积，同时记录裸鼠体重、摄食量；第 10 周处死动物，测量瘤体质量、瘤块大小，记录肿大淋巴结数。取肝脏、肺脏进行病理切片检查。RT-PCR 检测各组肿瘤组织中 Cyclin D1、p21 mRNA 的表达。

结果：

获得 SDG 纯化产品，方法 1、2 所得产品产率分别为 2.39%、1.92%；高效液相色谱（high performance liquid chromatographic, HPLC）分析确定产品纯度分别为 82.38%、87.96%；成功建立了人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的裸鼠移植瘤模型；与对照组相比，SDG

和亚麻籽组肿瘤表面积、瘤块质量、瘤体积均明显降低 ($P<0.05$), 肿大淋巴结数目有所减少; 各组动物体重及摄食量无明显差别, 各组肝脏、肺脏均未见明显的肿瘤细胞转移; 与 BD 组相比, SDG 组肿瘤组织中 p21 mRNA 的表达明显升高 ($P<0.05$), FS 组改变不显著; 三组肿瘤组织 Cyclin D1 mRNA 表达差异不显著。

结论:

利用两次硅胶吸附柱层析分离纯化的产品, 纯度略低于反相柱层析产品, 但产率提高 0.47%, 方法 1 较方法 2 更适合 SDG 的规模化生产; SDG 可抑制裸鼠 MDA-MB-231 细胞乳腺移植瘤的生长, SDG 使 p21 mRNA 的表达水平升高是其中一个重要的机制。

意义:

近 20 年来, 亚麻籽受到医药界的重视, 首先发现它富含 ω -3 多不饱和脂肪酸, 然后发现它含有对人体健康有重要保健作用的木酚素, 并且它是木酚素含量最高的食品, 因此, 美国国家肿瘤研究院 (NCI) 已把亚麻籽作为 6 种抗癌植物研究对象之一。

近年来, 以加拿大、澳大利亚、英国和美国为主的西方发达国家, 对亚麻籽作为功能食品的研究和开发做了大量的工作, 以亚麻籽粉为代表的产品早已面市多年, 成为中、老年人的常备保健品。最近, 符合疗效性要求的高纯度、标准化木酚素提取物的产品已上市, 可以广泛应用于胶囊、压片、谷物早餐和快餐食品的添加剂。此外含有 ω -3 脂肪酸、可溶性食物纤维和木酚素的营养功能性超浓乳状液和全乳饮料等多种产品也不断出现在市场上。我国在这方面至今仍属空白, 因此开展亚麻籽功能性成分的研究和开发工作刻不容缓。

我国有着极为丰富的亚麻籽资源, 内蒙、东北、新疆、山西等地产量较大。以亚麻籽为原料进行木酚素 SDG 等功能性成分的提取并对其药理作用进行研究, 这在医学、食品等诸多领域内具有十分积极的意义和巨大价值空间。

乳腺癌已经成为全球女性发病率最高的恶性肿瘤。调查显示, 经常食用富含木酚素食品的女性比其他女性患乳腺癌的几率低 33%, 此外多项研究证明亚麻籽木酚素 SDG 具有抑制肿瘤的作用, 但具体

作用机制尚不清楚。因此，进一步研究 SDG 抑制乳腺癌的机制，对于探讨乳腺癌的早期预防和治疗具有重要意义。

本研究通过两种方法对 SDG 进行分离纯化，并对比两种方法所得 SDG 产品的产率及纯度，为亚麻籽 SDG 的规模化生产探索更为简单的可行性方案；同时，在动物水平及分子水平上初步探讨了 SDG 对乳腺癌的抑制作用及可能机制。这些为亚麻籽功能性成分 SDG 的研究和开发以及乳腺癌有效防治措施的探索等提供了技术对策和理论支持。

关键词：亚麻籽；木酚素；开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷；乳腺癌；裸鼠

ISOLATION OF FLAXSEED LIGNANS AND EFFECT OF IT ON THE HUMAN BREAST CANCER XENOGRAFTS IN NUDE MICE

Postgraduate: WANG Xiao-lei

Supervisor: Prof. Zhang Lian-Ying

ABSTRACT

Purpose

To isolate and purify Secoisolariciresinol diglycoside(SDG) from flaxseed with two different methods and compare the yield and purity of it. To study the effect of SDG on the human breast cancer xenografts in nude mice.

Methods

SDG was isolated from flaxseed and purified with two different chromatographic methods(1.by silica gel column,2.by reverse-phase column).The yield was calculated and the purity was determined by high performance liquid chromatography (HPLC); Nude mice were xenografted with human breast cancer cell line MDA-MB-231;At week 6,mice were randomly divided into 3 groups(n=5 in each group):control group, SDG group, Flaxseed group. Body weight and food intake were recorded weekly. Tumors were measured and the surface areas were calculated. Mice were sacrificed at week 10.At necropsy, body weight, primary tumor weight and volume and the number of intumescent lymph node were recorded. Lung and live were analyzed at pathology. The expression of cyclin D1 and p21 were detected by RT-PCR.

Results

Purified SDG was obtained and the yield of SDG with the two different methods was 2.39% and 1.92%. Correspondingly, the purity of

isolated SDG was about 82.38% and 87.96% on the analysis of HPLC. The human breast cancer model was set up successively with the MDA-MB-231 cell line on the nude mice; The tumor surface areas, tumor weight and volumes of the SDG and Flaxseed group were significantly lower than control group. The mean number of intumescent lymph node were also lowed in the two groups. No significant difference in food intake or body weight change was recorded between groups. No tumor metastasis in lung and live was found in each group. Compared with BD group, p21 mRNA level in mammary tumor was significantly increased in SDG group, while not in FS group. The expression of Cyclin D1 was detected, with no significant difference between the treatment groups.

Conclusion

Compared with method 2, the yield was increased by 0.47 percentage point in method 1. Although the purity was a little lower than it in method 2, the method 1 was more suitable for the large-scale preparation in workshop; Dietary SDG can inhibit the growth of tumor in nude mice bearing human breast cancer cells MDA-MB-231, in which the increased expression of p21 by SDG was important.

Significance

In the past 20 years, the flaxseed is paid attention to in the medical field. Firstly, it was known that flaxseed is rich in ω -3 polyunsaturated fatty acid and then it was found that it contains lignans which is beneficial to health. Flaxseed, the richest source of lignans, has been regarded as one of the 6 kinds of anticancer plant by the national tumor research institute of U.S.A. In recent years, the western developed countries, such as Canada, Australia, Britain and U.S.A., have done a large amount of work on the flaxseed regarding it as a functional food. Many relevant products of flaxseed and SDG are appearing on the market constantly. Our country is still a blank so far in this respect, so it is very urgent to research the flaxseed and its functional composition.

There are extremely abundant flaxseed resources in our country. Inner Mongolia, the Northeast, Xinjiang and Shanxi, etc. are the high producing area. Researching the flaxseed and its lignans has very positive meaning and enormous value space in a great deal of fields such as medicine and food industry.

Breast cancer has already become a malignant tumour with highest morbidity in the whole women's world. Diet rich in lignans have exhibited anticancer activity with the lowered morbidity by 33%. It has been proved that SDG has anticancer activity, but the related mechanism is not clear. So, it is important to further study of it for probing into the early preventing and treatment of breast cancer.

In this article, we compared and analyzed the yield and purity of SDG of two different separation methods, which can make for providing more simple process for large-scale preparation of SDG in workshop; Further research is performed to study the inhibitory effect of SDG on the human breast cancer xenografts in nude mice., which is meaningful to the development of flaxseed and prevention and cure of human breast cancer.

Key Words: flaxseed; lignans; secoisolariciresinol diglycoside; breast cancer; nude mice

目 录

1-1	原创性声明及关于学位论文使用授权的声明
1-2	中文摘要
1-3	英文摘要
1-4	符号说明
1-5	前 言
1-6	材料与amp;方法
1-7	结 果
1-8	讨 论
1-9	结 论
1-10	附 表
1-11	附 图
1-12	参考文献
1-13	致 谢
1-14	攻读学位期间发表的学术论文
<<返回	

符 号 说 明

缩 写	英 文 名 称	中 文 名 称
bp	Base pair	碱基对
DDW	Double distilled water	双蒸水
DEPC	Diethylpyrocamate	焦炭酸二乙酯
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EB	Ethidiumbromide	溴化己锭
ED	Enterodiol	肠二醇
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid	乙二胺四乙酸
EGFR	Epidermal growth factor receptor	表皮生长因子受体
EL	Enterolactone	肠内酯
EP	Eppendorf	EP 管
ER	Estrogen receptor	雌激素受体
HEPES	N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-sulfonic acid	N-2-羟乙基哌嗪 -N'-2-乙磺酸
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱 (法)
HRT	Hormone replacement therapy	激素代替疗法
OD	Optical Density	光密度
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PE	Phytoestrogen	植物雌激素
RI	RNase inhibitor	RNA 酶抑制剂
rpm	Round per minute	每分钟转数
SDG	Secoisolariciresinol diglycoside	开环异落叶松树脂 酚二葡萄糖苷
SECO	Secoisolariciresinol	开环异落叶松脂 素

前 言

乳腺癌 (breast cancer) 是成年女性最常见的恶性肿瘤之一, 欧美发达国家中, 位居女性癌症发病率首位^[1]。仅在美国, 乳腺癌约占所有女性中诊断出癌症患者的 30%^[2]。与之对比, 我国虽在世界范围内仍属于乳腺癌发病率较低的国家, 但是近年来随着人们生活方式及环境等各类因素的改变, 乳腺癌发病率在我国女性人群中呈现出快速上升的趋势。

植物雌激素(phytoestrogen, PE)是一类存在于植物中, 与雌激素结构相近的生物活性物质。流行病学调查显示, 亚洲国家居民的乳腺癌发病率显著低于西方发达国家, 当前者移居到美国后, 随着饮食结构的改变, 该病的发病率则上升^[3]。调查发现这类现象与亚洲人普遍食用含较多植物雌激素的豆制品有关^[4, 5]。因此, 从植物中寻找植物雌激素类活性成分并探讨其对乳腺癌的抑制机制, 这对乳腺癌的预防与治疗具有深远的意义。

木酚素是植物雌激素的一类, 亚麻籽 (Flaxseed) 是其最丰富的来源之一。开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷 (Secoisolariciresinol diglycoside, SDG) 是亚麻籽木酚素最主要的成分。对于亚麻籽及其主要成分 SDG 与乳腺癌的关系, 多年来国外学者进行了逐步深入的研究, 并得到了较为确切的结论: 亚麻籽及其主要成分 (SDG 及亚麻籽油等) 对乳腺癌具有明显的抑制作用, 但具体机制尚未完全明确。

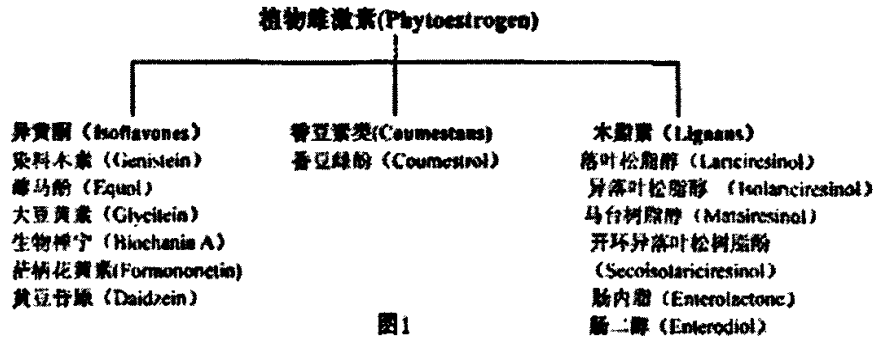
一、植物雌激素

植物雌激素是一类天然存在于植物中的非甾体类化合物, 这种化合物在结构和功能上类似于哺乳动物体内的雌激素。

(一) 分类

植物雌激素为杂环多酚类化合物, 依据分子结构的不同主要包括三大类 (图 1): 1. 异黄酮类(isoflavones)主要有大豆苷元(二羟基异黄酮, daidzein)、染料木素(三羟基异黄酮, genistein)、芒柄花黄素(formononetin)、生物禅宁 A(biochanin A)等; 2. 木酚素(lignans),

是具有 2, 3. 双苄基丁烷结构的一类化合物, 是许多植物中的次级组分, 用以构建木质素(lignan), 形成植物细胞壁; 3. 香豆素类 (coumarins) [3]。



(二) 来源

大豆及其制品(豆奶、豆腐)中富含异黄酮, 亚麻籽、小扁豆和谷物中含较多的木酚素, 而香豆素存在于黄豆芽、三叶草中。

(三) 生物学特征及作用

由于结构和甾体类激素相似, 因此可与体内的雌激素受体结合, 但其活性较人类雌激素弱 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 倍, 有雌激素和抗雌激素双重效应, 但发挥何种效应取决于内源性激素的量和雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 的种类和数量。植物雌激素多以糖苷的形式存在于植物中, 无生物活性, 进入体内经肠道细菌糖苷酶水解为有活性的苷元发挥效应。代谢物主要经尿和胆汁排泄, 经胆汁排泄的可经肠肝循环部分被重吸收。对预防癌症、心脏病、更年期综合症和骨质疏松症等具有重要作用。此外, 由于人们对植物雌激素的机理和潜能尚未完全弄清, 它们还可能存在一些负面效应。因此在美国, 对充当营养补充品的植物雌激素产品的标准化方法、制备方法和提取方法都有法规限制。为了给临床应用提供更多的理论依据, 大量的研究仍在进行中。

(四) 与乳腺癌的关系

在植物雌激素与乳腺癌关系的研究中, 流行病学、体内实验和体外实验的研究结果都证明其确切的抗乳腺癌作用, 主要机制包括: 雌激素作用和抗雌激素作用、诱导细胞凋亡、抗氧化、抑制酪氨酸激酶及拓扑异构酶 II (topoisomerase II) 的活性、抗血管生成等作用 [3]。

二、亚麻及亚麻籽

（一）亚麻及亚麻籽

亚麻 (*Linum usitatissimum* L.) 也称胡麻, 是一年生的草本植物, 适于温带和亚热带生存。主要产于加拿大、美国、阿根廷、中国、印度及俄罗斯等国。亚麻大致可以分为三类: 油用亚麻、纤维用亚麻、油纤两用亚麻。它作为医用, 生产纤维、油和食品的传统作物早有记载^[6]。

亚麻籽 (图 2), 是亚麻所结的种子, 亦称大胡麻、胡麻仁, 收藏于中华人民共和国药典。其味甘、性平, 具润燥、祛风等功效。临床用于皮肤瘙痒、麻风、眩晕、便秘等。自 1956 年 Bakke 等首次利用酸水解法从亚麻籽中分离出开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷 (Secoisolariciresinol diglycoside, SDG) 并发现其具有很强的药理学活性以来, 国外学者一直致力于亚麻籽的化学成分和药理活性研究, 并已经逐步将亚麻籽作为保健药品开发和商品化。近年来, 我国学者也开始对亚麻籽的研发予以重视。

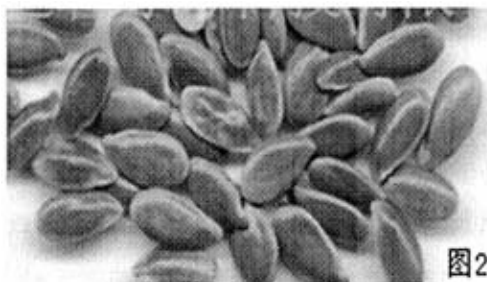


图2

（二）亚麻籽化学组成

亚麻籽的化学成分较为复杂, 现已分离的主要类别包括: 木酚素类、黄酮类、环肽类、生氰葡萄糖苷类、苯丙素葡萄糖苷类、脂肪酸类以及多种矿物质、维生素和氨基酸等其他种类^[7]。

（三）亚麻籽的主要功能性成分

目前, 人们越来越重视亚麻籽在食品工业、营养学、肿瘤学以及心脑血管疾病、糖尿病研究、医药研发等方面的重要价值。研究热点集中在它的几个主要的功能性成分: 亚麻籽胶、亚麻籽油以及最为重要的亚麻籽木酚素 SDG。

1. 亚麻籽胶

（1）化学组成及特性

亚麻籽胶也称富兰克胶（Flaxseedgum），其主要成分为多糖物质（占总质量的 80%）和蛋白质（占总质量的 9%）。含六种单糖组分：木糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、鼠李糖、岩藻糖^[8]。它已成为一种重要的天然植物胶。

（2）研究进展及应用

亚麻籽胶可被用于食品、医药、日用化工和轻纺等行业，发挥乳化剂、增稠剂、黏合剂、稳定剂的作用。已成为国家绿色食品发展中心认定的绿色食品专用添加剂^[9]。

2. 亚麻籽油

（1）化学组成及特性

亚麻籽油（Flaxseed oil）又称亚麻油，是从亚麻籽中制取的干性油，黄色透明液体。所含脂肪酸成分为饱和脂肪酸 9%-11%，油酸 13%-29%，亚油酸 15%-30%，亚麻酸 40%-60%^[10]。

亚麻籽油是 α -亚麻酸（ C_{18} : 3n-3 也称 ALA）最丰富的植物来源， α -亚麻酸是人体必需的 ω -3 脂肪酸系列的母体，在体内代谢可生成二十碳五烯酸（ C_{20} : 5n-3 EPA）和二十二碳六烯酸（ C_{22} : 6n-3 DHA），二者是深海鱼油的主要活性成分。 α -亚麻酸及代谢产物 EPA 和 DHA 是细胞膜的重要构成成分，对视力和智力起重要作用；调解 AA、前列腺素、白三烯等生物活性物质的合成，对维持人体正常生长起重要的作用^[11]。

（2）研究进展及应用

动物实验证明， α -亚麻酸对免疫抑制具有调节作用^[12]；食用亚麻籽油可能改变凝血反应及其它膜依赖性的反应，发挥抗变态反应、抗动脉粥样硬化、抗心律失常等效应。这些良好的效果已经在预防和治疗心脑血管疾病中得到应用^[13]；动物及健康人群的研究表明，当食用亚麻籽、亚麻籽油及鱼油后，可以明显降低细胞活素并使钙吸收、骨钙、骨密度随之升高，因此为女性绝经早期预防骨密度下降提供了可能^[14]；此外还证明， α -亚麻酸还具有抗肿瘤、抗血栓、营养脑细胞、调节植物神经等多种有益健康的作用。

由于亚麻籽油主要成分 α -亚麻酸及其代谢产物 EPA 和 DHA 的

重要生物活性，已经成为营养学及医药研究的热点话题。

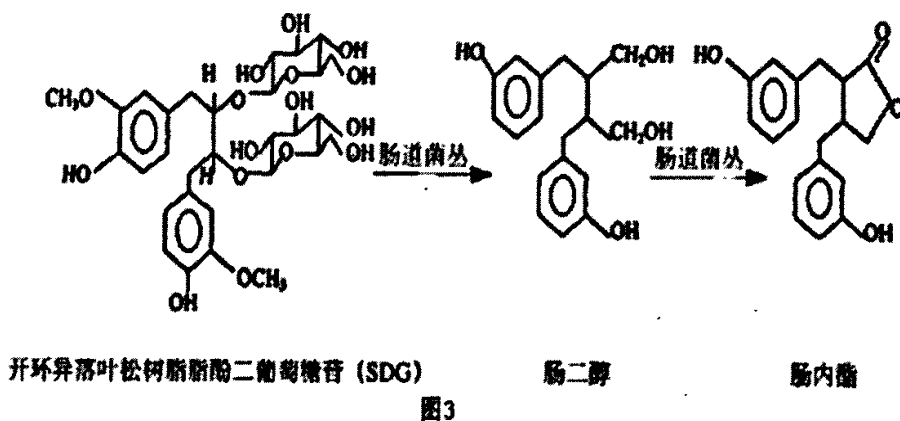
3. 亚麻籽木酚素

木酚素在一些植物中存在，如谷类（大麦、芥麦、燕麦、粟等）、椰菜、菠菜等，但在亚麻籽中的含量特别高，是一般植物的 200-800 倍^[15]。因此，亚麻籽是已知自然界中含木酚素最多的植物之一。亚麻籽中已分离鉴定的包括苷元类的木酚素如：开环异落叶松脂素

（Secoisolariciresinol SECO）以及苷类木酚素如：开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷（SDG）。SDG 于 1956 年首次从亚麻籽中分离。现已知它在生亚麻籽中的含量最高，为 6.1~13.3mg/g，在脱脂亚麻籽粕中含量是 11.7~24.1mg/g^[16]。SDG 已成为目前亚麻籽研究领域中最重要的一种植物雌激素前体和有效的抗氧化剂。

(1) SDG 化学性质：

SDG 分子式为 $C_{32}H_{46}O_{16}$ ，分子量为 686.71Da，其化学结构如下（图 3）：



(2) SDG 代谢途径：

SDG 是结合形式的糖苷，认为是不发挥活性的前体物质。而其代谢生成的 SECO 是具活性的植物雌激素，它消化后，在肠道经菌群厌氧发酵作用脱去葡萄糖基和甲基，分别形成肠二醇(enterodiol, ED)和肠内酯(enterolactone, EL)（图 3）。二者在结构上与雌二醇相似（图 4）^[17]，即所谓的哺乳动物木酚素（mammalian lignans）^[18]。ED 和 EL 在大肠吸收，在肝脏与葡萄糖醛酸和硫酸盐结合，然后分泌到胆汁和尿液当中。

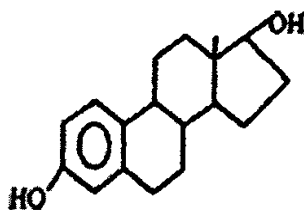


图4 17 β -雌二醇分子结构式

(3)SDG 药理学作用：

SDG 具有雌激素和抗氧化活性，此外还具有抗雌激素、抗癌、抗动脉粥样硬化、抗糖尿病的作用。因而 SDG 已经成为亚麻籽功能性成分中最具研究潜力的一类物质。

(4)与 SDG 活性相关疾病的研究及进展：

①与雌激素依赖性疾病的研究

1) 乳腺癌

多年来国外学者进行了逐步深入的研究，并得到了较为确切的结论：亚麻籽及其主要成分（SDG 及亚麻籽油等）对乳腺癌具有明显的抑制作用，但具体机制尚未完全明确。

2) 前列腺癌

研究发现木酚素的肠内酯可使人体 LNCaP 前列腺癌细胞的前列腺特异抗体水平下降。此外对 5 α 还原酶同工酶 1 和 2 均有抑制作用，这导致睾酮向 5 α 二氢睾酮转化的减少，会减缓前列腺癌细胞的生长^[19]；动物实验证明，摄取亚麻籽后成年鼠前列腺的相对重量和细胞增殖均减少，表明 SDG 对前列腺疾病有潜在的保护作用^[20]。

3) 经期综合征

几乎所有妇女进入绝经期后，都会出现程度不同的绝经症状，西方国家尤其突出，而且各种与性激素相关的疾病（骨质疏松、心血管病等）风险明显增加。20 世纪 90 年代，美国内科医生学院建议绝经前妇女采用激素替代疗法（hormone replacement therapy, HRT）。有研究显示，长期采用 HRT 具有一定的预防益处，但是出现了患乳腺癌风险增加的副作用。因此，人们转向天然存在于植物中的植物雌激素。研究表明亚麻籽及其木酚素对绝经妇女具有保护作用^[21]。

4) 骨质疏松

妇女的骨质疏松尤其与绝经期有关，因为雌激素的丧失加速了骨丢失。如果在临床绝经期前几年采用激素替代治疗，可防止骨丢失。1995年世界卫生组织以日本70岁以上的妇女为对象进行调查，结果显示骨密度高的群体其尿中的植物雌激素排泄量也是较多的，而植物雌激素的摄取量与尿中的排泄量呈正相关，可见植物雌激素的摄取量与骨密度也呈一定的相关性。在大鼠实验中，当幼年雌性大鼠性激素水平较低时，骨骼对有雌激素样作用的木酚素很敏感，因而证明SDG可以促进骨骼生长^[22]。

② 肿瘤

除对乳腺癌、前列腺癌的抑制作用以外，SDG还对结肠癌、黑素瘤具有很好的抑制效应。木酚素可潜在的调解人类结肠细胞的氧化性遗传损伤^[23]，并且是结肠癌细胞的生长抑制剂，但可能的机制并非是源自其抗雌激素活性^[24]。SDG可明显降低黑素瘤细胞的肺转移并抑制转移细胞的生长^[25]。

③ 糖尿病

SDG对糖尿病的预防和治疗也有积极作用。链脲霉素诱导的糖尿病大鼠摄入SDG后预防了75%的糖尿病发生，说明SDG具有保护效应^[26]。

④ 冠心病

SDG又是一种有效的抗氧化剂，因此它可以在心脑血管疾病的预防和治疗中发挥积极作用。研究表明，SDG能够减低高胆固醇性动脉硬化症，并伴随血清中的胆固醇、LDL-C及脂质体过氧化反应产物的降低和HDL-C及抗氧化物的升高^[27]。

⑤ 其他

目前许多研究表明，SDG可成为狼疮肾病的一种有效治疗手段^[28]。

三、亚麻籽木酚素与乳腺癌

已知SDG对正常乳腺能产生影响。动物实验观察到，摄入5%、10%的亚麻籽或者同样当量的SDG可促进正常乳腺结构的分化，证明亚麻籽影响乳腺的正常发育，并且SDG起主要作用^[29]。2004年，Tan KB等通过对幼年大鼠的研究发现，哺乳期经母体间接接受亚麻

籽或当量的 SDG 后, 在出生后 21 天其乳腺组织中终末导管的数量及乳腺上皮细胞较对照组升高, 说明促进了大鼠早期乳腺的形态学改变。同时证明这一改变是通过调节 EGFR 和 ER 信号系统完成, 并且在出生后 49-51 天时引起乳腺的进一步分化, 亚麻籽和 SDG 的生理学效应类似, 说明 SDG 主要引起这一效应^[30]。以上 SDG 对正常乳腺的影响, 被认为可以潜在的降低成年大鼠乳腺癌发生的风险。

对于亚麻籽及其主要成分 SDG 与乳腺癌的关系, 多年来国外学者进行了逐步深入的研究, 并得到了较为确切的结论: 亚麻籽及其主要成分 (SDG 及亚麻籽油等) 对乳腺癌具有明显的抑制作用。

Thompson L 等人于 1996 年首次证明, 化学诱导的大鼠乳腺癌发生的早期 (即致癌剂施加后 1 周) 添加 SDG 饲养 19 周后, 肿瘤发生例数、患癌鼠肿瘤个数等指标均明显降低, 说明 SDG 可以在肿瘤发生的早期起始阶段发挥明显的抑制效应^[31]; 随后的实验中, 研究人员使刚分娩结束的母鼠接受 BD、SDG、FS 三种不同的饮食处理, 使得 SDG 及 FS 通过乳汁间接到达哺乳期的子代大鼠, 断奶后子代大鼠喂饲普通饲料并于出生后 49-51 天 (即动情前期) 被灌注致癌剂, 21 周后 FS 组及 SDG 组的肿瘤发生、肿瘤数量及肿瘤大小均明显降低, 这说明幼年大鼠在哺乳期接触 FS 及 SDG 可以明显抑制成年后乳腺癌的发生和生长^[32]; Rickard S 等后来证明 FS 及 SDG 的处理延迟了化学诱导乳腺癌发生的进程^[33], 随后又发现试验组大鼠血浆中胰岛素类生长因子-I(IGF-I)被显著降低, 而 IGF-I 升高会提高乳腺癌发生风险^[34], 这也说明了 SDG 抑制乳腺癌的一个分子机制。以上研究均证明, 在化学诱导乳腺癌的模型中, 亚麻籽及 SDG 可以在动物生长发育的多个时期抑制乳腺癌的发生和发展, 同时 SDG 是主要的效应成分。

虽然目前通过实验已基本证明亚麻籽及 SDG 对乳腺癌具有确切的抑制作用, 但具体机制尚未完全明确, 有待于进一步的研究。

四、乳腺癌与细胞周期调控因子

正常细胞周期主要由 G1、S、G2 和 M 期组成。G1 期是从有丝分裂完成到 DNA 复制前期, 制造产生 rRNA, mRNA, tRNA 和核蛋白体; S 期是 DNA 合成期; G2 期是 RNA 和蛋白质的合成期; M 期是有丝分裂期,

遗传物质分配到子代细胞中去。G1-S相和G2-M相转换处各有一个节点(check point),通过对这两个节点的控制可调节细胞周期的进程,使不同的细胞周期事件在时间与空间上相互协调。Go期是暂时脱离细胞周期不进行增殖的时期。G1/S调控点控制从G1期进入S期,其相关基因包括p53、p21^{WAF1/CIP1}、GADD、Cyclin D、Cyclin E及CDK4等,影响这些基因的表达就会导致细胞周期进展的改变。

肿瘤产生的本质是细胞增殖的调节失控,而细胞的增殖要通过细胞周期来调控。细胞周期调控因子主要有三类:正向调节的细胞周期蛋白(Cyclin)和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK),负向调节的细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制蛋白(CKI)。CKI根据其结构特征可分为KIP(Kinase Inhibitor Protein)家族(p21^{WAF1/CIP1}、p27^{KIP1}、p57^{KIP2})和INK4(Inhibitor of CDK4)家族(p15^{INK4B}、p16^{INK4A}、p18和p19)。乳腺癌的发生、发展与细胞周期调控基因的变异密切相关。

(一) 乳腺癌与Cyclin D1

在细胞周期中, G1-S相转换处有一个节点,通过对此节点的控制可调节细胞周期进程。在G1-S节点处, Cyclin D1是G1期进展的限速控制因素。抑制Cyclin D1的活性,即可使细胞受阻于G1期,从而限制瘤细胞增殖,肿瘤被抑制。

1. Cyclin D1结构与功能

Cyclin D1,由位于11q13的CCND1基因编码,295个氨基酸组成,其分子量为34KD。在有生长因子的情况下, Cyclin D1在细胞周期中首先被合成,并于G1中期合成达到高峰, Cyclin D1与CDK4、CDK6结合形成二元复合物,使pRb磷酸化^[35]。pRb一旦被磷酸化,其结合E2F-1的作用丧失, E2F-1介导的mRNA转录得以进行,细胞进入增殖状态。因此, Cyclin D1的功能主要是促进细胞周期,促进细胞增殖。实验证明, Cyclin D1的过度表达与肿瘤发生发展密切相关^[36]。

2. Cyclin D1在乳腺癌中的表达及意义

Cyclin D1在正常乳腺组织中呈低表达,而在乳腺癌中呈高表达^[37]。由于Cyclin D1在G1-S相转换处起着重要作用,因此,通过抑制Cyclin D1表达有助于抑制细胞周期进程, Rb、P21等都可通过各种途径来调节Cyclin D1的表达,从而抑制乳腺癌的发生发展。

(二) 乳腺癌与p21^{WAF1/CIP1}

1. p21^{WAF1/CIP1}结构与功能

p21^{WAF1/CIP1}(以下简称p21)属于KIP家族, 基因定位于6P21.2, 包括3个长度分别68bp, 450bp, 1600bp的外显子。在p21基因编码区上游2.4Kb和大于8Kb处有两个p53结合区, 上游75核苷酸处有一个弱p53结合区。此外, 在上游1000-2000核苷酸处有肌源性转录因子MyoD(myogenic D)结合区, 上游50-104核苷酸处有SPI结合区^[38]。p21蛋白定位于细胞核, 由164个氨基酸构成, 分子量为21kD。N末端第21-26氨基酸与Cyclin D, Cyclin E结合, C末端第124-164氨基酸与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)结合, 中间第49-72氨基酸与CDK结合^[39]。

目前认为p21的功能主要有以下几方面: (1)由于p21 N端氨基酸及49-72氨基酸分别能与Cyclin, CDK结合, 使Cyclin-CDK复合物的激酶活性丧失, 使细胞周期停滞于G1期^[39], p21是目前认为最广泛的激酶抑制蛋白。(2)p21 C端第124-164氨基酸与PCNA结合, 覆盖PCNA上的某些功能区, 阻碍PCNA与DNA聚合酶 δ 形成复合物, 也可使DNA全酶复合物不能在DNA单链上滑动, 影响DNA复制^[40]。(3)细胞应激时, p21的N末端与应激激活蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK)结合, SAPK活性受阻, 致c-jun不能磷酸化, AP-1不能激活, 导致信号传导通路受阻, 也可引起细胞生长分化功能抑制^[41]。(4)还有报道p21可促进未分化细胞的分化, 促进正常分化细胞的衰老和死亡。

2. p21^{WAF1/CIP1}在乳腺癌中的表达及意义

研究表明, p21在乳腺癌中的表达高于正常乳腺组织。这被解释为一种反馈机制: 认为在肿瘤细胞生长过程中, 为了弥补p21的生长抑制作用, CDK和Cyclin D1必须提高其浓度, 而p21为了抑制肿瘤细胞的生长, 浓度也会随之相应提高, 但未能完全抑制Cyclin D1和CDK4的功能^[42]。

由于p21是目前认为最广泛的激酶抑制蛋白并具有多种抑制细胞增殖功能, 因而可以通过p21表达的调解从而抑制乳腺癌的发生、发展。

五、SDG 提取、分离研究进展

由于 SDG 具有广泛的药理作用及开发潜能, 自 1956 年首次成功分离后, 国外学者一直致力于 SDG 提取工艺的研究。

1995 年, Westcot 等人提出了一种从亚麻籽中提取 SDG 的方法: 用脂肪族醇溶剂从脱脂亚麻籽中提取。分离富集木酚素的醇溶液并将该溶液浓缩。浓缩物经碱催化水解, 使木酚素从复杂的形式中释放出来。得到的浓缩物先用液/液分离法富集木酚素, 再用离子交换树脂进一步富集, 最后用层析法分离得到纯度大于 90% 的木酚素^[43]。

1999 年, 美国芝加哥伊利诺斯大学药物学院的 Sheng-Xiang Qiu 等人提出了如下分离方法^[44], 脱脂亚麻籽用二氧杂环乙烷和乙醇按 1:1 的比例配成的溶液提取 24 h。溶剂蒸发后得到的浅黄色粉末在含有甲醇钠的无水甲醇中搅动 48 h, 得到的混合物在真空下浓缩得到浆体。该浆体用 5% 的 H_2SO_4 (pH=3) 酸化, 并用 CHCl_3 和水饱和的正丁醇中分离 3 次。正丁醇层合并后在真空下浓缩, 然后用于硅胶柱层析。先用 CHCl_3 -MeOH- H_2O 洗脱, 接着用逐渐增加极性(0%-20% MeOH) 的 CHCl_3 /MeOH 混合物进行梯度洗脱, 最后得到 SDG 等成分。

此外, 2001 年, 德国的 Braunschweig 大学食品化学研究所的 Andreas Degenhardt 等人提出用“高速逆流色谱法(HSCCC), 从亚麻籽中分离 SDG^[45]; 2002 年, 荷兰 Unilever 研究开发中心的 J.Fritsche 等人提出了“在线液相色谱-核磁共振光谱-质谱耦合法(LC-NMR-MS)”用于从亚麻籽中分离和分析 SDG^[46]; 2003 年, 瑞典大学食品科学系的 Christina Eliasson 等人开发出一种“碱提法”用于亚麻籽中的 SDG 和羟基肉桂酸的提取^[47]。

国内对亚麻籽木酚素研究的很少, 目前仅发现武汉工学院的刘大川, 江南大学食品学院的张文斌等发表过 SDG 提取方面的文章。前者的提取方法是首先将亚麻籽的乙醇提取物用旋转蒸发器浓缩成浆状, 然后真空冷冻成固体。此干燥物用一定量的无水甲醇溶解, 在溶液中加入三乙胺(三乙胺:甲醇=1: 100, v/v), 溶液不断旋转碱解(8h)。碱解后溶液适当浓缩。用冰醋酸调解至 pH=4。过滤后, 对滤液进行分离和分析。柱层析的洗脱液为甲醇/氯仿/醋酸, 比例为 50:50:3 (v/v/v)^[48]。2006 年, 张文斌, 许时婴发表了关于利用微波辅助提取法从脱脂亚麻籽中提取亚麻木酚素的文章, 从中确定了微波

辅助提取 SDG 的最佳工艺条件^[49]。

本文目的所在：一、结合国内、外的提取方法从脱脂亚麻籽粕粉末中提取 SDG，利用两种不同的方法（硅胶吸附柱层析、C18 反相柱层析）对 SDG 提取液进一步分离和纯化并计算产率，高效液相色谱分析确定所得 SDG 产品的纯度，通过对比分析两种产品的产率和纯度，为亚麻籽 SDG 的规模化生产探索更为简单的可行性方案；二、利用已获得的纯化 SDG，在动物水平、分子水平上初步探讨其对乳腺癌的抑制作用及可能的相关机制，从而为亚麻籽功能性成分的开发研究，探索乳腺癌有效的预防、治疗措施等方面提供积极的技术对策和理论支持。

材料与amp;方法

一、材料:

(一) 主要材料及试剂

亚麻籽粕	山西大同市华远实业有限责任公司
SDG 标准品	Dr.P.Winterhalter Technical University of Braunschweig, Germany 馈赠
ZCX-II 型硅胶 (200~300 目)	青岛海洋化工有限公司
层析硅胶 G 板	浙江四青生化材料厂
乙腈、甲醇 (色谱纯)	天津四友生物医学技术有限公司
RPMI 1640 培养基	Fermentas 公司
胰蛋白酶	Sigma 公司
DMSO、EDTA、HEPES、DEPC	加拿大 BioBasic Inc.
新生牛血清	杭州四季青生物工程材料有限公司
Trizol 试剂、PCR 试剂盒、Agarose	加拿大 BioBasic Inc.
RT 试剂盒	Fermentas 公司
PCR 引物	上海生工生物工程有限公司合成
其他试剂均为国产分析纯。	

(二) 细胞株

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 (雌激素受体阴性, ER-), 由本实验室液氮保存。

(三) 实验动物

BABL/c 裸鼠 (SPF 级), 雌性, 4~5 周龄, 体重(20±2)g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号: SCXK(沪)2003-0003]。山东大学动物实验中心 SPF 级饲养。

二、实验仪器

LH 系列通风橱	济南隆宏净化设备有限公司
DK-98-I 电子恒温水浴锅	天津市泰特斯仪器有限公司
80-2 离心沉淀器	上海手术器械厂
S-1 型迷你磁力搅拌器	北京倍的科学器材有限公司

SIGMA 2-16K 高速冷冻离心机	德国 SIGMA 公司
-20 低温冰箱	西门子公司
WF2 UV-2000 型紫外可见分光光度计	尤尼柯(上海)仪器有限公司
YP600 电子天平	上海精科公司
BL-220H 电子天平	日本 SHIMADZU 公司
2110 型收集器	美国 BIO-RAD 公司
N-1001S-WA 斜式旋转蒸发仪	日本 EYELA 公司
SHB-B95 型循环水式多用真空泵	郑州长城科工贸有限公司
真空冷冻干燥器 alpha1-4	CHRIST 公司
蛋白质工作站	Amerhsham Biosciences 公司
LA-6A 高效液相色谱分析仪	日本 SHIMADZU 公司
TL9000 系列色谱数据工作站	北京泰立化电子技术有限公司
FA1104 电子天平	上海天平仪器厂
Finnpipette 彩色单道可调式移液器	芬兰 Finnpipette 公司
VXQG02 型电热蒸汽消毒器	山东新华医疗器械有限公司
MDF392 -86℃超低温冰箱	日本 SANYO 公司
CO ₂ 细胞培养箱	美国 Forma Scientific 公司
SZ-D ₂ 倒置显微镜	重庆光学仪器厂
SW-CT-TF 型超净工作台	苏州净化仪器厂
SZ-93 自动双重纯水蒸馏器	上海玻璃仪器一厂
Gelman25mm 可换针头式滤器	美国 PALL 公司
1L 不锈钢正压滤器	宁波新芝仪器厂
青制 00000003 号电子卡尺	青海量具刀具有限责任公司
YX 型洁净动物柜	北京文惠净化设备厂
UV-120-02 紫外分光光度计	日本 岛津公司
PCR 扩增仪	Eppendorf 公司
DYY-10 型电泳仪、DYY-111 型电泳槽	北京市六一仪器厂
ZF-1 紫外投射仪	上海长明光学电子仪器厂
Smart View 凝胶扫描分析仪	上海复日生物试验技术研究所

三、方法

(一) SDG 的提取及纯化

1.提取

(1) 粉碎、脱脂:

称取一定量的亚麻籽粕, 粉碎并研磨成粉末状; 通风橱内, 亚麻籽粉未经正己烷脱脂(条件: 100 ml/50g 亚麻籽粉末, 室温, 充分搅拌, 1 h^[50]), 过滤去除正己烷, 脱脂粉末在通风橱内充分干燥。

(2) 溶剂法提取:

完全干燥的脱脂粉未经乙醇溶液充分浸提(条件: 70%乙醇, 液固比 16: 1, 45℃, 4 h^[48])。提取液经过滤、离心去除杂质, 经旋转蒸发器蒸发去除乙醇, 并浓缩至浆状。

(3) 碱水解:

浆状的浓缩提取物经 0.3 mol/L NaOH 进行碱水解(条件: 500 ml/100g 亚麻籽粕的提取物, 室温, 连续磁力搅拌 2 d^[16])。2 mol/L H₂SO₄ 小心调节 NaOH 水解液的 pH 值至弱酸性, 中止上述水解反应。蒸发、浓缩水解液, 得到 SDG 提取物, 作为上柱样品。

2.分离、纯化

(1) 方法一: 硅胶柱层析—硅胶柱层析

SDG 提取物经硅胶吸附柱层析(4×70 cm), 洗脱液为氯仿-甲醇-水, 即体积比为 65: 35: 10 混合液的下层溶液^[31]; 280 nm 波长紫外检测洗脱产物, 同时通过薄层色谱分析与标准品对比定性, 合并收集并浓缩得 SDG 粗品。

浓缩的 SDG 粗品二次过硅胶柱。

(2) 方法二: 硅胶柱层析—反相柱层析

SDG 提取物经硅胶柱吸附层析, 条件同方法一, 合并收集并浓缩得 SDG 粗品。

SDG 粗品经 C18 反相柱色谱分析, 进一步纯化, 收集产物并旋转蒸发浓缩、真空冷冻干燥, 得到 SDG 产品。

色谱条件: 软件: Amerhsham Biosciences 蛋白质工作站; 色谱柱: YMC-Pack Pro C18 (5 μm, 12nm, 150×4.6 mm); 检测波长: 215, 254, 280 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱床温度, 37℃; 洗脱条件: 流动相, 水, 甲醇。

3.产率计算

按如下公式计算：

$$\text{SDG产率} = \text{SDG产品质量 (g)} / \text{亚麻籽粕质量 (g)} \times 100\%$$

4. 纯度分析

(1) 样品液的配制

准确称取一定量的经纯化的 SDG 产品，置于 10 ml 的容量瓶中，用无水色谱甲醇溶解并定容，经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤，过滤所得液体将作为高效液相色谱分析的上柱测试液。

(2) 标准溶液的配制

准确称取 3.3mg 的 SDG 标准品(纯度>98%)，置于 10 ml 的容量瓶中，用无水色谱甲醇溶解并定容，配制成浓度为 0.33mg/ml 的标准溶液。

(3) 最大吸收波长的确定

将所配制的标准溶液和测试液用甲醇进行适当稀释，以无水甲醇为空白，按紫外分光光度法在 200-400 nm 范围内进行紫外光谱扫描，发现标准品、乙醇提取物的水解产物均在 280 nm 附近有吸收峰，因此，确定高效液相色谱分析时在 280 nm 波长条件下进行检测。

(4) 色谱条件

色谱柱，Diamonsil C18 ($5 \mu\text{m}$, $250 \times 4.6 \text{ mm}$)；紫外检测波长，280nm；柱床温度， 25°C ；流速，1.0ml/min；流动相：乙腈：1%冰醋酸溶液，体积比为 20：80，进样量： $10 \mu\text{l}$ 。

(5) 标准曲线制作

分别将配制好的 SDG 标准液稀释配制成为 100%、75%、50%、25%、12.5% 的 5 份浓度梯度溶液，分别进样 $10 \mu\text{l}$ ，按上述色谱条件测定各个浓度对应标准品的峰面积，以峰面积(Y)对进样浓度(X)进行线性回归分析，制作标准曲线。

(6) 纯度分析

将制备好的两个样品溶液按一定比例适当稀释后进样 $10 \mu\text{l}$ ，在上述相同的色谱条件下测定样品峰面积，按照外标法计算被测液中 SDG 的含量，推算出提取液中 SDG 总量，进而确定 SDG 提取品的纯度。

（二）细胞培养

1. 细胞复苏

从液氮中取出含有人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的冻存管，立即投入 37℃ 水浴中，不停摇晃，待 1 分钟内完全融化后，置于超净工作台上，75%酒精擦拭冻存管，将管内冻存液移至 10ml 离心管中，续加 D-Hanks 液约 5ml，1000r/min，离心 5min，弃上清，加入含 10%新生牛血清的 RPMI 1640 5ml，吹匀后转入 50ml 细胞培养瓶，置于 37℃、5%CO₂ 的恒温培养箱中培养。

2. 细胞传代

MDA-MB-231 细胞在含有 10%新生牛血清的 RPMI 1640 培养基中，37℃、5%CO₂ 条件下培养，隔一天换一次液，三天传一代。细胞传代时先倒掉旧培养基，适量 D-Hanks 液洗涤细胞两次，EDTA 5ml 冲洗，加入 0.25%胰蛋白酶 1ml，镜下观察细胞，待细胞变圆游离后，加入新鲜培养基 5ml，吹匀细胞，分装细胞培养瓶，每瓶续加培养基至 5ml 培养。

3. 细胞收集

选择生长密度约为 70%~90%的对数生长期细胞，提前 24 h 更换新鲜培养基，胰蛋白酶消化、离心，无菌生理盐水洗涤 2 次，经白细胞计数板计数，并调整细胞浓度约为 $5 \times 10^7/\text{ml}$ 。经台盼蓝染色确定细胞活力在 95%以上。

（三）建立裸鼠移植瘤模型

购入 BABL/c 裸鼠（SPF 级），雌性，4~5 周龄，体重(20±2)g。于洁净动物柜中 SPF 级无菌饲养（条件：昼夜明暗交替 12:12h，温度：22-24℃，50%湿度）。待一周的适应期满后，接受 MDA-MB-231 细胞株异种移植：取收集好的乳腺癌细胞，在每只裸鼠的右侧上肢腋部皮下接种 0.2 ml（含 1×10^7 个细胞）^[51, 52]。记录初始体重，定期观测裸鼠体重变化、摄食及接种部位肿瘤生长情况。

（四）动物分组及给药

1. 饲料加工

山东大学动物实验中心饲料加工房协助加工三种裸鼠饲料：采用全价饲料配方配制普通饲料，颗粒饲料机加工制成直径为 1cm 的

颗粒饲料，低温烘干。饲喂前经高温高压蒸汽灭菌处理。三种饲料成分如下：

(1) 普通饲料 (Base diet, BD)：全价饲料，未做任何添加处理。

(2) SDG 饲料：普通饲料添加 10%亚麻籽当量的 SDG。

(3) 亚麻籽饲料 (Flaxseed, FS)：普通饲料添加 10%亚麻籽。

2. 动物分组及给药

动物接种 10 天后，可见接种部位有白色圆形的小突起，以后逐渐明显，5 周后，裸鼠移植瘤长径长至 0.8cm 左右。

移植后第 6 周起，将 15 只模型鼠，根据肿瘤大小和体重随机分为 3 组：BD 组（对照组）、SDG 组及 FS 组，分别喂饲以上三种不同的饲料。

3. 观察指标

每周记录动物体重、摄食量，测量移植瘤大小，并计算肿瘤表面积。移植后第 10 周，处死动物，记录肿瘤质量、肿大淋巴结数，同时计算肿瘤体积。

按下列公式^[53]计算瘤表面积 (S) 和瘤体积 (V)：

$$S = (\text{长}/2 \times \text{宽}/2) \times 3.14 \quad (1)$$

$$V = (\text{长}/2 \times \text{宽}/2 \times \text{厚}/2) \times 3.14 \quad (2)$$

取动物肝脏、肺脏，经 4%多聚甲醛固定，石蜡包埋，切片(5 μm)，染色后进行组织病理学分析，观测脏器内肿瘤细胞转移情况。

(五) RT-PCR 检测肿瘤组织 Cyclin D1、p21 mRNA 的表达

1. 引物设计

Cyclin D1 引物：（扩增产物长度：408bp）

F: 5'CTGTCGCTGGAGCCCGTGAAAAAG3'

R: 5'GAAGTTGTTGGGGCTCCTCAGGTT3'

p21 引物：（扩增产物长度：260bp）

F: 5' -GATGTCCGTCAGAACCCA-3'

R: 5' -CTGCCTCCTCCCAACTCA-3'

β-actin 引物：（扩增产物长度：550bp）

F: 5' -GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'

R: 5' -CTCCTTAATGTCACGCACGATTT-3

2.总 RNA 的提取

(1) 裂解: 在液氮中将肿瘤组织研磨成粉末状, 并移至 1.5 mlEP 管中, 每 100mg 组织中加入 1.0ml 的 Trizol 进行细胞裂解。

(2) 分离: 将经过 Trizol 裂解的细胞在 15-30℃下放置 5min 后, 加入 200 μ l 氯仿, 盖紧管盖, 用力振荡 15s, 室温放置 2-3min。2-8℃, 12000rpm 离心 5min, 离心后分三层, 从上到下依次是无色水相层、间层、酚/氯仿层, RNA 存在于最上边的无色水相层。

(3) RNA 沉淀: 转移水相至另一个 RNAase-free 的新 EP 管中, 加入等体积的异丙醇, 15-30℃放置 5min, 2-8℃, 12000rpm 离心 5min 沉淀 RNA。

清洗: 小心移去上清, 加入 75%乙醇清洗沉淀 (每次 700 μ l), 2-8℃, 12000rpm 离心 2min。

(4) 重溶: 短暂晾干 RNA (不可干透), 然后用 30-50 μ l DEPC 水溶解 RNA。

(5) 贮存: 已溶解的 RNA 贮存于-70℃冰箱中。

(6) 测 RNA 的浓度和纯度: 用紫外分光光度仪检测所提 RNA, 要求达到如下范围: OD260/OD280=1.8~2.0, 浓度 0.5-1.1 μ g/ μ l。

3.将总 RNA 样品反转录成 cDNA (Revert Aid TM First Stand cDNA Synthesis Kit)

(1) 冰上准备好各反应液:

总 RNA	1 μ g
随机引物六聚体 (0.2 μ g/ μ l)	1 μ l
DEPC 水	up to 12 μ l

轻轻混匀, 并离心 3-5s。

(2) 70℃放置 5min, 冰上冷却, 短暂离心。

(3) 冰上依次加入以下成分:

5×reaction buffer	4 μl
RI(20U/μl)	1 μl
10mM dNTP mixture	2 μl

轻轻混匀，短暂离心。

(4) 25℃保温 5min。

(5) 加入 M-MuLV 反转录酶 (200U/μl) 1 μl。

(6) 25℃反应 10min, 42℃反应 60 min。

(7) 70℃, 10min 中止反应，冰上冷却，-20℃贮存。

4.PCR 反应

(1) 冰上准备好反应体系：

模板	2 μl
10×PCR buffer	5 μl
2.5mM dNTP mixture	4 μl
引物 1 (β-actin 上下游引物)	各 1 μl
引物 2 (p21 上下游引物)	各 1 μl
灭菌三蒸水	up to 50 μl

(2) 94℃预变性 5min。

(3) 加入 Taq 酶 (5U/μl) 0.25 μl。

(4) 循环扩增：

p21:

94℃	1min
58℃	1min
72℃	1min

Cyclin D1:

94℃	1min
50℃	1min
72℃	1min

30 个循环后，72℃延伸 10min 中止反应，扩增产物存放于 4℃冰箱保存，待电泳分析。

5.PCR 产物分析

取 PCR 扩增产物 18 μ l, 10 $\times$ 上样缓冲液 2 μ l, 混匀后上样, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 0.5 $\times$ TBE 缓冲液, 100V 电压电泳 30min, EB 染色, 然后经凝胶扫描仪扫描。

结 果

一、SDG 提取及分离纯化

亚麻籽粕经过溶剂法提取，碱水解及层析分离、纯化（图 5），得到 SDG 纯化产品。方法一、二所得 SDG 产品产率分别为 2.39% 和 1.92%。

HPLC 分析：回归方程及相关系数分别 $y=2775.4x-1924.6, R^2=0.999$ ，回归线性图见图 6。说明 SDG 标准品曲线在 0.04-0.33mg/mL 浓度范围内线性关系良好。按照外标法计算，方法一、二所得 SDG 产品纯度分别为 82.38% 和 87.96%。SDG 标准品及样品 1、2 的 HPLC 洗脱曲线见图 7。

二、裸鼠体内成瘤情况

裸鼠自接种第 10 天开始，移植瘤开始稳定增长。至接种后第 5 周，裸鼠移植瘤长径已长至 0.8cm 左右，15 只裸鼠全部成瘤，接种成功率为 100%。

三、裸鼠体重及摄食量变化

如表 1 所示，加药前后，各组裸鼠的体重及摄食量无明显改变，组间差异无统计学意义。说明食物中添加亚麻籽或 SDG 对动物体重、摄食量等基本无显著影响。

四、亚麻籽及 SDG 对裸鼠移植瘤生长的影响

如图 8 所示，与 BD 组相比，SDG 组及亚麻籽组肿瘤平均表面积增长速度均下降；两组平均瘤块质量、瘤体积（表 2）均降低（ $P<0.05$ ）。FS 的抑制效应较 SDG 强，但二者统计学差异并不明显。

五、腹腔肿大淋巴结计数及肝、肺转移情况

图 9 显示，SDG、FS 两组肿大淋巴结平均数少于 BD 组，且 SDG 组最少。各组肝脏、肺脏的病理切片中均未发现明显的肿瘤细胞转移现象。

六、RT-PCR 检测肿瘤组织 Cyclin D1、p21 mRNA 的表达

图 10 显示，与 BD 组相比，SDG 组肿瘤组织 p21 表达明显升高（ $P<0.05$ ）但 FS 组改变并不显著（图 11）；SDG 组及 FS 组中 Cyclin

D1 表达虽与 BD 组相比有所降低，但统计学差异不显著（图 12）。

讨 论

对于亚麻籽木酚素 SDG 的提取和分离、纯化方法,国外学者多年来一直致力于如何使其更加优化的研究当中,但是我国相关的研究并不多见。目前研究已经证明,SDG 具有多种重要的生物活性,因此探讨如何能突破实验室研究的局限性以大规模工厂化生产 SDG 产品是一项重要并且意义深远的工作。本课题中,我们首先采用了刘大川等人经优化研究后的亚麻籽 SDG 醇提方案^[48],得到了相当于亚麻籽粕重量 1/10 的提取精膏;SDG 是以一种络合物而非游离的状态存在于亚麻籽当中^[50],因此我们利用碱水解的方法解除了 SDG 提取品的络合状态,使 SDG 从复杂的形式中释放、游离出来;在 SDG 分离、纯化的实验室研究中,近年来涌现出越来越多的技术:反相柱层析、高速逆流色谱法、在线液相色谱-核磁共振光谱-质谱耦合法等一系列方法,然而,大部分方法由于技术条件的限制,无法满足 SDG 规模化生产的工艺要求。本课题中,我们针对硅胶吸附柱层析和反相柱层析两种不同的纯化方法,进行了对比性研究:研究发现,经过两次硅胶吸附柱层析(方法一)后的 SDG 产品,其产率为 2.39%,而经过一次硅胶吸附柱层析及一次反相柱层析(方法二)后产率为 1.92%,前者较后者提高了 0.47%。两种方法的产品纯度分别经 HPLC 分析后确定为 82.38%和 87.96%,方法二较方法一的产品纯度有所提高。对比两种方法的 SDG 产率和纯度可知,虽然方法一的纯度稍低于方法二,但是产率却提高,综合而言它较后者更适用于规模化的生产制备当中。同时,反相柱层析虽然可以进行小型制备性分离纯化,但由于 C18 色谱柱价格昂贵、洗脱条件较为严格等原因,它也并不适合 SDG 产品的规模化制备和生产。基于以上两方面的原因,我们分析认为,采用两次硅胶吸附柱层析分离、纯化 SDG 提取品,其流程简单、易于操作,比较适合亚麻籽 SDG 的规模化生产制备。不过,值得注意的是,此种方法除简单,柱床填充物成本相对反相柱低等优点之外,其洗脱溶液含高挥发的氯仿较多,这也可能在实际的工厂化生产当中受到限制。因而,如何能运用更加简

单、快捷的方法获得产率更高、纯度更高的 SDG 产品，仍是我国目前亚麻籽木酚素产业化生产的关键所在，需要进一步的不断优化研究。

在 SDG 对乳腺癌影响的研究当中，已经有动物实验证明，母代大鼠哺乳期摄入 10% 的亚麻籽或同样当量的 SDG，可促进子代正常乳腺的分化，因而推测可潜在降低子代大鼠乳腺癌发生的风险^[29]，此外，可以抑制子代化学诱导乳腺癌的发生，降低肿瘤大小及数量；Chen 等^[54]在 MCF-7 细胞(ER+)乳腺癌裸鼠移植模型的研究中发现，摄入 10% 亚麻籽可以抑制肿瘤的生长，同时加强化疗药物他莫西芬的抗肿瘤效应。以上研究中证明，摄入 10% 剂量的亚麻籽对乳腺癌具有确切的抑制作用，且木酚素 SDG 是亚麻籽当中起主要作用的抑癌成分。因此，本研究采用了 10% 亚麻籽或同样当量 SDG 这一剂量水平进行研究，发现此剂量对 MDA-MB-231 细胞(ER-)乳腺癌移植瘤的生长，也起到明显的抑制作用，其中亚麻籽的抑制效用更为明显，这可能是由于亚麻籽中含有的其它植物雌激素及油脂成分所造成。

SDG 虽是不发挥活性的前体物质，但在动物体或人类肠道消化后，可经肠道内菌群厌氧发酵作用分别形成肠二醇和肠内酯，二者即所谓的哺乳动物木酚素，它们与体内雌二醇结构类似，因而影响一些激素相关性疾病，如乳腺癌、前列腺癌等。因此，对于雌激素受体阳性的乳腺癌(ER+)，SDG 可以通过其弱雌激素及抗雌激素作用发挥抑制肿瘤的效应。本研究建立的是雌激素受体阴性的乳腺癌移植瘤模型(ER-)，同样观察到亚麻籽及 SDG 对此类型的乳腺癌移植瘤发挥了明显的抑制效应。因此，我们推测这一效应可能是通过 SDG 的一些非雌激素相关机制来完成的，例如：亚麻籽及 SDG 可明显降低大鼠血浆胰岛素类生长因子 I 水平^[34]，因此可能通过调节信号转导通路来发挥抑癌作用；SDG 是一种有效的抗氧化剂，这种作用对于抑制肿瘤具有积极的作用，SDG 抗氧化作用是由于它能够捕捉羟自由基，此外在体内的代谢产物 ED、EL、SECO 等也具有较强的抗氧化活性^[55]。

正常细胞周期主要由 G1、S、G2 和 M 期组成。G1 期是从有丝

分裂完成到 DNA 复制前期，制造产生 rRNA，mRNA，tRNA 和核蛋白体；S 期是 DNA 合成期；G2 期是 RNA 和蛋白质的合成期；M 期是有丝分裂期，遗传物质分配到子代细胞中去。G1-S 相和 G2-M 相转换处各有一个节点(check point)，通过对这两个节点的控制可调节细胞周期的进程，使不同的细胞周期事件在时间与空间上相互协调。Go 期是暂时脱离细胞周期不进行增殖的时期。G1/S 调控点控制从 G1 期进入 S 期，其相关基因包括 p53、p21^{WAF1/CIP1}、GADD、CyclinD、CyclinE 及 CDK4 等，影响这些基因的表达就会导致细胞周期进展的改变。

细胞周期调控因子主要有三类：正向调节的细胞周期蛋白(Cyclin)和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)，负向调节的细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制蛋白(CKI)。CKI根据其结构特征可分为KIP(Kinase Inhibitor Protein)家族(p21^{WAF1/CIP1}、p27^{KIP1}、p57^{KIP2})和INK4(Inhibitor of CDK4)家族(p15^{INK4B}、p16^{INK4A}、p18和p19)。p21是目前已知具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白，通过依赖或者非依赖p53途径，参与细胞生长、发育、分化、衰老及DNA损伤修复等多种功能的调解。p21对广泛CDK的抑制作用预示了其在肿瘤发生、发展中的作用。el-Deiry的体外实验表明，在表达野生型p53的细胞用DNA损伤药物阿霉素作用后可发现p21表达水平的增高，提示p21的表达可能提高了肿瘤细胞对化疗药物的易感性^[56]。因此，p21的表达升高可能对肿瘤的化疗也起着重要的介导作用。许多研究已发现，p21与肿瘤的发生、发展密切相关，它可抑制乳腺癌、结肠癌、白血病和脑肿瘤等多种肿瘤细胞的增殖。

为了探讨SDG及亚麻籽对雌激素受体阴性乳腺癌产生明显抑制效应的机制，我们在分子水平上做了进一步的研究。实验结果显示：SDG明显提高了肿瘤组织当中p21的mRNA表达水平。因此我们推测，SDG可能通过提高p21的mRNA的表达量，促使肿瘤细胞在细胞生长周期中的G1期处受到阻滞，并且促进了p21对肿瘤生长的其它方面的负性作用，肿瘤生长因而受到明显抑制。但其具体的作用方式未清，有待于后期实验进行更加深入的研究和探讨。此外，虽然SDG组和FS组中肿瘤组织Cyclin D1的表达都有所降低，但是可能由于样本量较少等原因

统计分析差异并不显著，认为SDG产生的抑制作用，并非主要基于对此种细胞周期蛋白的调解来完成。

此外，我们对亚麻籽及SDG是否影响乳腺癌转移做了初步探索，虽然各组都观察到了淋巴结肿大的现象，但各组间并未发现有明显差异，肝脏、肺脏也未发现肿瘤细胞的明显转移现象。这可能是由于样本量较少，干预时间较短等原因，值得进一步研究。

乳腺癌已经成为严重危害女性身体健康的一种疾病，尽管不断进步的治疗技术和药物水平使得乳腺癌致死率大为降低，但是患者的数量却在不断攀升，乳腺癌的早期预防已经成为女性关注的焦点。“美国癌症协会”估计，有1/3的癌症患者死亡都与他们不健康的饮食习惯以及缺乏锻炼有关，虽然到目前为止还没有确切证明食物能够治疗乳腺癌或者预防乳腺癌，但是许多调查显示，食用某些食物确实对治疗或预防有所帮助，探讨预防乳腺癌的饮食方法对于乳腺癌的早期预防具有重要意义。一项由3000多名女性参加的研究显示，经常食用富含木酚素食品的女性比其他女性患乳腺癌的几率低33%。本研究显示，亚麻籽木酚素SDG可以抑制人乳腺癌移植瘤的生长，这为食用亚麻籽有助于预防乳腺癌的发生提供更加有利的证据。

手术治疗是乳腺癌的主要治疗方法，随着患者对术后生活质量要求的不断提高，外科学术式逐渐趋向于保守，而根据患者的年龄、肿瘤类型等综合因素制定合理有计划的综合治疗方案变得越来越重要。除手术和放、化疗以外，内分泌治疗在乳腺癌的全身治疗中占有相当重要的地位。雌激素受体是乳腺癌一个重要的预后和预期因子，对于乳腺癌内分泌治疗的选择和预测内分泌治疗价值中具有重要意义。在乳腺癌的内分泌治疗中，雌激素受体阳性患者的有效率可达50%~60%，而雌激素受体阴性患者的有效率仅为10%左右。本研究提示，SDG可为雌激素受体阴性的乳腺癌患者或雌激素不敏感的晚期乳腺癌患者提供一个可能有效的治疗措施。

结 论

利用硅胶柱层析—硅胶柱层析的分离纯化方法较硅胶柱层析—反相柱层析的方法更为简单，适合于 SDG 的规模化生产；10%的亚麻籽或同样当量的 SDG 可以使人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 (ER-) 裸鼠乳腺移植瘤的生长受到抑制。SDG 使 p21mRNA 的表达水平升高是其中一个重要的机制。加大亚麻籽木酚素 SDG 产品的开发并对其抗癌机制进一步研究，对乳腺癌的预防和治疗具有十分重要的意义。

附 表

组 别	体 重/g		摄 食 量,g/天/只	
	加 药 前	加 药 后	加 药 前	加 药 后
BD	22.99±0.91	24.59±0.80	3.13±0.31	3.16±0.32
SDG	22.5±1.12	24.49±0.92	2.85±0.34	3.12±0.33
FS	23.12±1.10	24.65±1.12	2.92±0.31	2.97±0.40

表 1 各组干预前后裸鼠体重及摄食量变化 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab1 _Change of nude mice body weight and food intake
in each group before and after treatment

组 别	肿瘤体积/mm ³	肿瘤质量/g
BD	1489.7±256.33	2.19±0.18
SDG	639.35±110.5△	1.01±0.15△
FS	459.28±110.0△	0.83±0.05△

△P<0.05

表 2 各组平均瘤质量及瘤块体积 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab2 The mean volume and weight of xenografted tumor in each group

附 图

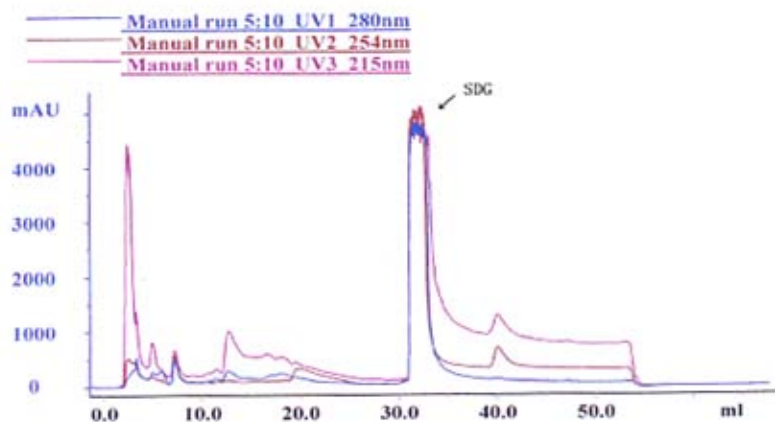


图 5 C18 反相柱层析(检测波长 280nm、254nm、215nm)

Figure 5 C18 reversed-phase column chromatography analysis of SDG fraction(UV detection was at:280nm、254nm、215nm)

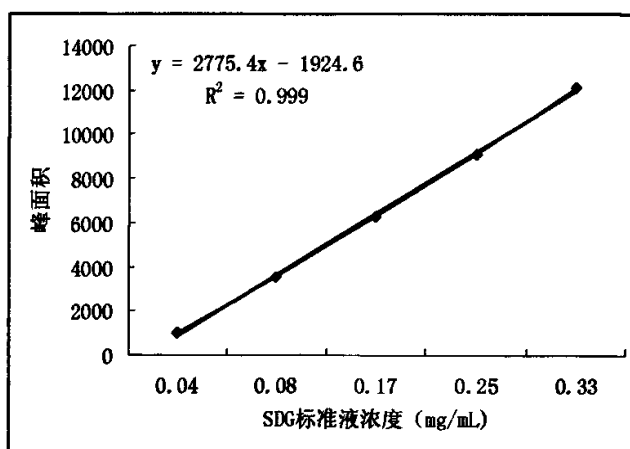


图6：SDG标准曲线

Figure 6. Standard curve of SDG

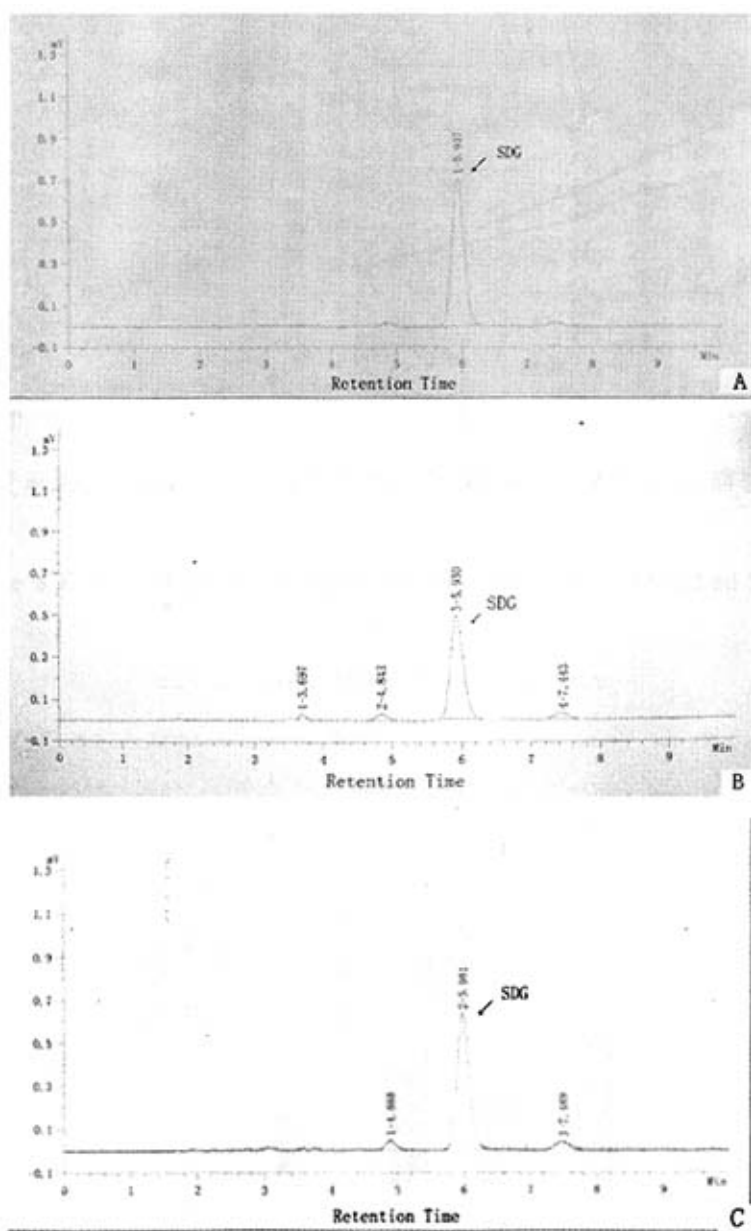


图 7 HPLC 分析

A: SDG 标准品

B: 样品 1

C: 样品 2

Figure 7 HPLC analysis of the SDG fraction

A: reference sample of SDG

B: sample 1

C: sample 2

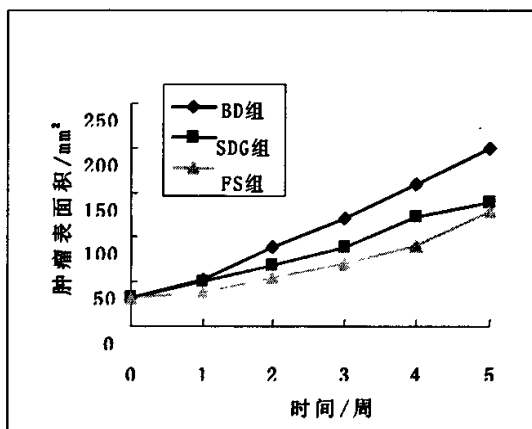


图8 亚麻籽及SDG对人乳腺癌细胞MDA-MB-231裸鼠移植瘤生长的影响

Figure 8 Effect of flaxseed and SDG on growth of established human breast cancer,MDA-MB-231,in nude mice.

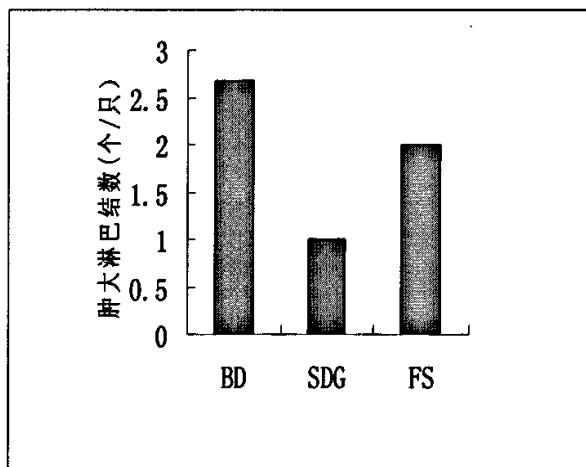


图9 各组平均肿大淋巴结数

Figure 9 The mean number of intumescent lymph node in each group

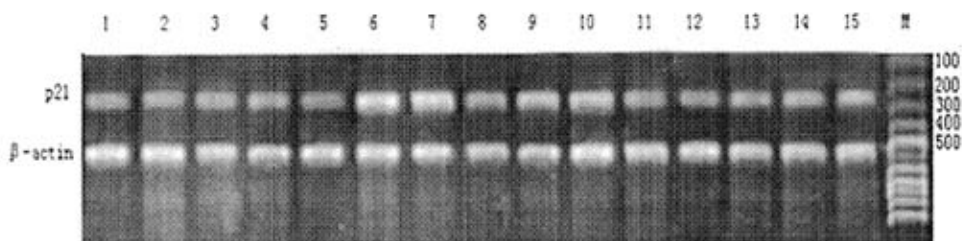


图10 各组肿瘤组织中p21 mRNA表达
Figure.10 p21 mRNA level in primary mammary tumors of the treatment groups.
M: marker
1-5, BD group
6-10, SDG group
11-15, FS group

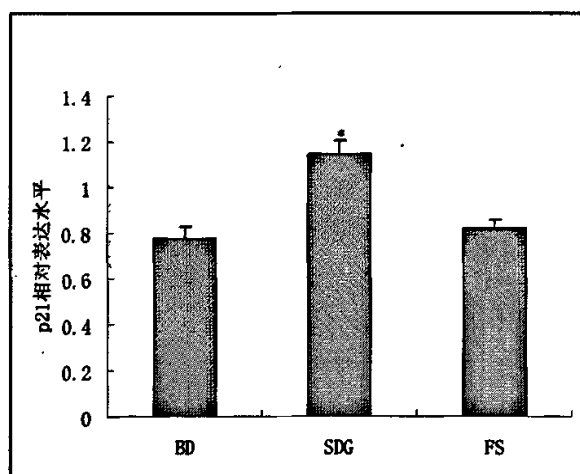


图 11RT-PCR 分析各组肿瘤中 p21 mRNA 表达水平, *P<0.05
Figure 11 RT-PCR analysis of p21 mRNA level in primary mammary tumors of the treatment groups, *P<0.05

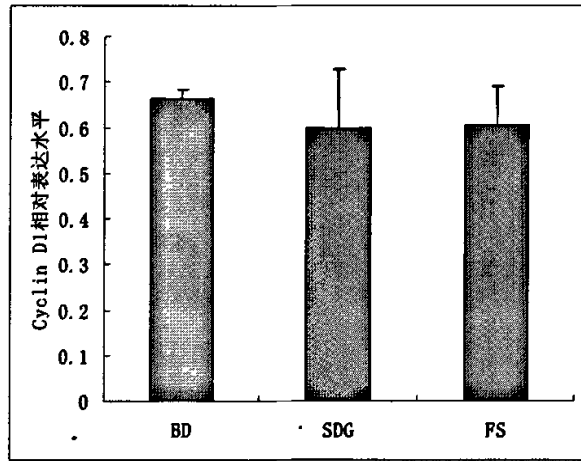


图 12 RT-PCR 分析各组肿瘤中 Cyclin D1 mRNA 表达水平

Figure 12 RT-PCR analysis of mRNA level in primary mammary tumors of the treatment groups.

参 考 文 献

- [1] Greenlee RT, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin., 2000, 50(1): 7-33.
- [2] Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin. 2001, 51(1): 15-36.
- [3] 赵良才, 汤立建, 李庆林, 等。植物雌激素干预乳腺癌的研究进展[J]。中国中药杂志, 2006, 31 (12) : 957-960。
- [4] Ingram D, Sanders K, Kolyhaba M, et al. Case-control study of phytoestrogens and breast cancer[J]. Lancet, 1997, 350(9083): 990-994.
- [5] Hulten K, Winkvist A, Lenner P, et al. An incident case-referent study on plasma enterolactone and breast cancer risk[J]. Eur J Nutr, 2002, 41(4): 168-176.
- [6] 朱爱国, 喻春明. 亚麻[J]。中国麻业, 2002, 24 (5): 46-49。
- [7] 张才煜, 张本刚, 杨秀伟。亚麻籽化学成分及其药理作用研究进展[J]。中国新药杂志, 2005, 14 (5): 525-530。
- [8] 陈海华, 许时婴, 王璋。亚麻籽胶化学组成和结构的研究[J]。食品工业科技. 2004, 25 (1) : 103-105。
- [9] 赵毅。亚麻籽的功能性成分及其在食品工业中的应用价值。山西食品工业, 2005, 2: 31-33。
- [10] 吴艳霞。亚麻籽及亚麻籽油[J]。陕西粮油科技, 1994, 19 (2): 22-23。
- [11] 杨天奎, 张根旺。论 α -亚麻酸的必需性[J]。郑州粮食学院学报, 1995, 16 (4): 38-43。
- [12] Benquet C, et al. Modulation of exercise-induced immunosuppression by dietary polyunsaturated fatty acids in mice[J]. Toxicol Environ Health. 1994 Oct; 43(2): 225-237.
- [13] Ipatova OM, Prozorovskaia NN, Baranova VS, et al. . Biological activity of linseed oil as the source of omega-3 alpha-linolenic acid. Biomed Khim. 2004 Jan-Feb; 50(1): 25-43.

- [14] Kettler DB. Can manipulation of the ratios of essential fatty acids slow the rapid rate of postmenopausal bone loss[J]. Med Rev,2001,6(1):61-77.
- [15] 陈见南。国外亚麻子保健作用综合研究和应用近况[J]。中国医药情报, 2001, 7 (3) : 54-56。
- [16] Johnsson P,Kamal-Eldin A,Lundgren LN.HPLC method for analysis of Secoisolariciresinol diglycoside in flaxseeds[J].Agric Food Chem.2000,48(11):5216-5219.
- [17] 胡晓军。亚麻木酚素的营养保健作用[J]。中国食物与营养,2005, 8: 36-37。
- [18] 余文三。植物雌激素研究进展[J]。国外医学卫生学分册, 1999, 26 (2): 84-87。
- [19] Bylund A, Zhang JX, Bergh A,et al. Rye bran and soy protein delay growth and increase apoptosis of human LNCaP prostate adenocarcinoma in nude mice[J].Prostate,2000,42 (4) : 304-314.
- [20] Tou J, et al, Dose, timing, and duration of flaxseed exposure affect reproductive indices and sex hormone levels in rats[J].J Toxicol Environ Health A. 1999,23;56(8):555-570.
- [21] Haggans C, et al,Effect of flaxseed consumption on urinary estrogen metabolites in postmenopausal women[J]. Nutr Cancer,1999, 33(2): 188.
- [22] Ward WE, et al, Exposure to purified lignan from flaxseed (*Linum usitatissimum*) alters bone development in female rats[J].Br J Nutr. 2001,86(4):499-505.
- [23] Pool-Zobel BL, Adlercreutz H, Glei M, et al. Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells[J]. Carcinogenesis. 2000,21:1247-1252.
- [24] Sung M, et al,Lignans are growth inhibitors of colon tumor cells and they may act through mechanisms other than antiestrogenic activity[J]. Anticancer Res 1998,18(3A):1405-1408.
- [25] Li D, Yee JA, Thompson LU, Yan L. Dietary supplementation with

- secoisolariciresinol diglycoside (SDG) reduces experimental metastasis of melanoma cells in mice[J]. *Cancer Letters*. 1999;142:91-96.
- [26] Prasad K, Mantha SV, Muir AD, Westcott ND. Protective effect of secoisolariciresinol diglucoside against streptozotocin-induced diabetes and its mechanism[J]. *Mol Cell Biochem*. 2000,206:141-150.
- [27] Prasad K, Reduction of serum cholesterol and hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed[J]. *Circulation*. 1999,99(10):1355-1362.
- [28] Clark WF, et al. A novel treatment for lupus nephritis: lignan precursor derived from flax[J]. *Lupus*. 2000,9(6):429-436.
- [29] Tou J & Thompson L. Exposure to flaxseed or its lignan component during different developmental stages influences rat mammary gland structures[J]. *Carcinogenesis*, 1999,20(9): 1831-1835.
- [30] Tan KP, Chen J, Ward WE, Thompson LU, Mammary gland morphogenesis is enhanced by exposure to flaxseed or its major lignan during suckling in rats[J]. *Exp Biol Med* (Maywood). 2004 ,229(2):147-157.
- [31] Thompson L, et al, Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed[J]. *Nutr Cancer*, 1996,26:159-165.
- [32] Chen J, Tan KP, Thompson LU, Exposure to flaxseed or its purified lignan during suckling inhibits chemically induced rat mammary tumorigenesis[J]. *Exp Biol Med*. 2003,228(8):951-958.
- [33] Rickard S, et al, Flaxseed and SDG treatment, regardless of dose, appeared to delay the progression of MNU-induced mammary tumorigenesis. *Nutr Cancer*; 1999,35(1): 50-57.
- [34] Rickard S, Yuan YA, Plasma insulin-like growth factor I levels in rats are reduced by dietary supplementation of flaxseed or its lignan secoisolariciresinol diglycoside[J]. *Cancer Lett*. 2000,161(1):47-55.
- [35] Chen J, Prters R, Saha P, et al. A 39 amino acid fragment of the cell cycle regulator p21 is sufficient to bind PCNA and partially inhibit DNA replication in vivo. *Nucleic Acids Res*, 1996,24(9):1727-1733.

- [36] WangTC, Cardiff RD, Zukerberg,et al.Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclinD1 transgenic mice.Nature,1995,369(6482):669- 671.
- [37] Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA,el al. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer.Oncogene,1993,8(8):2127-2133.
- [38] el-Deiry WS,Tokino T ,Velculescu VE,et a l.WAF1,a potential mediator of p53 tumor suppression.Cell,1993,75(4):817-825.
- [39] Lin J,Reichner C ,Wu X ,et a l.Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1gene activities.Mol Cell Biol,1996,16(4):1786-1793.
- [40] Umar A ,Buermeyer AB,Simon JA,et al.Requiremen tfor PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis.Cell,1996,87(1):65-73.
- [41] Shim J, Lee H, Park J,et al.A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinase.Nature,1996,381(6585):804-806.
- [42] ReedW ,Flrenes VA,Holm R,et al.Elevated levels of p27,p21 and cyclinD 1 correlate with positive oestrogen and progesterone receptor status in node-negative breast carcinoma patients.Virchows Arch,1999,435(2):116-241.
- [43] Westcott et al ,Process for ex tracting lignans from flaxseed,United States Patent,March 31,1995.
- [44] ShengX Q ,Lu Z Z ,Lumonadio L ,et al .Isolation and characterization of flaxseed constituents.pharmaceutical Biology,1999,37(1):1-7.
- [45] Degenhardt A, Habben S, Winterhalter P. Isolation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) by high-speed counter-current chromatography. [J]Chromatogr A, 2002,943(2):299-302.
- [46] Fritsche J,Angoelal R,Dachtler M. On-line liquid-chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy-mass spectrometry coupling for the separation and characterization of

secoisolariciresinol diglucoside isomers in flaxseed[J].Chromatogr A. 2002,972(2):195-203.

[47] Eliasson C, Kamal-Eldin A, Andersson R,et al. High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction[J]. Chromatogr A. 2003 ,1012(2):151-159.

[48] 刘大川, 庞美霞, 吴波。亚麻籽木脂素-开环异落叶松树脂酚二葡萄糖苷提取工艺的研究[J]。中国油脂, 2002, 27 (5) : 83-86。

[49] 张文斌,许时婴。亚麻木酚素的微波辅助提取工艺研究[J]。天然产物研究与开发, 2006, 18: 286-290。

[50] Muir AD, Westcott ND. Quantitation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside in baked goods containing flax seed or flax meal[J].Agric Food Chem,2000,48(9):4048-4052.

[51] 汪毅。裸鼠乳腺移植模型的制作概况[J]。重庆医科大学学报, 2003, 28 (3): 398-401。

[52] Miyazaki M, Lamharzi N, Schally AV ,et al.Inhibition of growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts in nude mice by bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3940-II and RC-3095[J].Eur J Cancer. 1998,34(5):710-717.

[53] Chen Jianmin,Wang Linda,Thompson LU. Flaxseed and its components reduce metastasis after surgical excision of solid human breast tumor in nude mice[J].Cancer Lett,2006,234(2):168-175.

[54] Chen Jianmin,Hui E,Ip T,et al. Dietary flaxseed enhances the inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (mcf-7) in nude mice[J].Clin Cancer Res,2004,10(22):7703-7711.

[55] Prasad K. Antioxidant Activity of Secoisolariciresinol Diglucoside-derived Metabolites, Secoisolariciresinol, Enterodiol, and Enterolactone[J].Int. J. Angiol.2000, 9(4):220-225.

[56] el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53 mediated G 1 arest and apoptosis.Cancer

Res,1994,54(5):1169-1174.

致 谢

首先感谢我的导师张莲英副教授，本课题是在她的悉心关怀和精心指导下完成的。张老师严谨的治学态度，渊博的学识，以及对我在工作、学习中各方面的关怀使我感受甚深，终生受益。

本课题的研究工作还得到了张建业教授、姜安丽教授、苑辉卿教授、胡晓燕高级实验师、孔峰实验师、吴伟芳实验师及刘传华、崔福爱等诸位老师的大力支持与帮助，在此一并表示衷心的感谢。感谢赵元、丁岩、孙惠等师姐及蔡捷、杨亚培、任凯、张亚伦、涂兵等同学对我的鼓励与帮助！

感谢远方的父母对我的理解与支持，是他们的爱给了我面对一切困难的勇气和力量。

感谢今天出席参加毕业论文答辩的各位专家、教授。

谢谢大家！

最后再次向所有关心和支持我的人表示衷心的感谢！

攻读学位期间发表的学术论文

1. 亚麻籽木酚素的提取及其对裸鼠乳腺移植瘤生长的影响, 中国生化药物杂志, 2007, 28 (3): 176-178 第一作者。
2. 姜黄素对裸鼠乳腺移植瘤 p21 及 CD44V₆ 表达的影响, 中国病理生理杂志。(录用待发表) 第一作者。
3. 1 种新的天然 α -葡萄糖苷酶的分离纯化及其活性测定, 中国生化药物杂志, 2007, 28 (1): 20 第六作者。
4. Regulation of zinc transporters by dietary zinc supplement in breast cancer. Mol Biol Rep. 2007 May 1 第四作者。