

大豆异黄酮总提取物对去卵巢裸鼠雌激素依赖型乳腺癌细胞移植肿瘤的影响

吴倩^①, 金念祖^{①*}, 余静^①, 赵人珍^①, 于泽平^②, 乔善磊^①, 陆晓和^③, 张淳文^①

① 南京医科大学公共卫生学院卫生检验系, 南京 210029;

② 中国人民解放军普通外科研究所, 南京军区南京总医院, 南京 210002;

③ 南京军区南京总医院药学部, 南京 210002

* 联系人, E-mail: yvx@njmu.edu.cn

2008-07-22 收稿, 2008-10-19 接受

国家自然科学基金(批准号: 30572133)资助项目

摘要 以去卵巢荷瘤裸鼠为模型, 喂食不同浓度的大豆异黄酮总提取物(6.25, 12.5 和 25 g/kg), 探讨大豆异黄酮总提取物对雌激素依赖型乳腺肿瘤的影响。用常规免疫组织化学方法检测肿瘤细胞核抗原 ki-67 的表达, Real-Time PCR 检测雌激素相关基因 pS_2 表达, 化学发光酶免疫法检测裸鼠血清中雌激素的含量。与对照组相比, 喂食大豆异黄酮总提取物组裸鼠 MCF-7 移植瘤体积明显增加($P<0.05$), 肿瘤细胞增殖能力显著增强($P<0.05$), pS_2 基因的表达增强($P<0.05$), 同时血清中雌激素的水平也因喂食大豆异黄酮总提取物而升高($P<0.05$)。因此, 在本实验浓度范围内, 大豆异黄酮总提取物对去卵巢裸鼠雌激素依赖型乳腺癌细胞移植肿瘤的生长有促进作用。

关键词
大豆异黄酮
乳腺癌
裸鼠
MCF-7
雌激素
ki-67
 pS_2

流行病学研究表明, 亚洲女性人群的乳腺癌发生率明显低于西方女性^[1], 但是移民的发生率会迅速升高^[2]。这种移民乳腺癌发生率的改变反映了生活习惯的, 尤其是饮食模式的不同所带来的影响^[3]。在研究亚洲饮食保护因素中发现, 这可能与摄入高剂量的大豆食品有关^[4]。

大豆食品一直以来是亚洲饮食的主要组成部分, 其中含有许多与乳腺肿瘤生长有关的生物活性物质, 其中以异黄酮类的研究最被重视。大豆异黄酮类在结构上与内源性雌激素 E_2 (estradiol) 相近。大豆异黄酮中主要存在 4 种成分, 分别为染料木黄酮(genistein, 又称金雀异黄素)、染料木苷(genistin)、大豆苷元(daidzein)和大豆苷(daidzin)。大豆在摄食后, 肠道微生物将染料木苷(genistin)和大豆苷(daidzin)代谢为相应的糖苷配基染料木黄酮(genistein)和大豆苷元(daidzein)^[4,5]。染料木黄酮和大豆苷元可以和雌激素受体结合而显示弱的雌激素效应, 具有减轻更年期

症状等潜在健康效益^[6]。

目前有关大豆制品的摄入与乳腺癌危险度关系的流行病学研究认为, 大豆制品中的异黄酮可能使乳腺癌发生风险降低, 特别是在中国和日本, 豆腐和豆酱对乳腺癌的发生有明显的保护作用。但细胞实验和动物实验研究的结果却不相一致, 在不同的生理和药理浓度下, 大豆异黄酮对乳腺肿瘤细胞和乳腺肿瘤细胞移植瘤的生长既有促进作用, 又有抑制作用, 其机制尚未明确。

尽管如此, 高剂量大豆异黄酮的补充剂已被广泛认同, 如大豆蛋白纯品或大豆异黄酮胶囊已被用来直接销售给健康妇女预防乳腺癌或减少更年期症状和减少乳腺癌痊愈者的复发。但由于有关大豆异黄酮单体的体内和体外研究数据及流行病学调查结果不一致, 所以要对大豆异黄酮与乳腺癌二者之间的关系进行严格的评估才可以给出安全可靠的建议。

鉴于目前研究大豆异黄酮与雌激素依赖型乳腺

肿瘤关系的体内外实验通常都采用大豆异黄酮单体成分,如染料木黄酮、大豆苷元或代谢物雌马酚。假设大豆异黄酮单体和总提取物在体内代谢上存在着某种差异,或是有可能在大豆异黄酮总提取物中的各成分之间还存在着协同或拮抗作用。因此本研究选用市场上销售的用于生产保健品的大豆异黄酮总提取物作为研究对象,在动物饲料中添加不同剂量的大豆异黄酮总提取物以观察大豆异黄酮总提取物对雌激素依赖型乳腺肿瘤的作用。

1 材料与方法

(i) 材料。裸鼠(BALB/C-nu/nu)购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,雌性,3~4 周龄,重 16.0~18.0 g,饲养于层流罩中。乳腺癌细胞系:雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性的 MCF-7 细胞系,南京医科大学基础医学院孙玉洁教授惠赠;DMEM 为 Gibco (USA)产品;胰蛋白酶, Sigma (USA)公司;胎牛血清,杭州四季青生物工程有限公司;大豆异黄酮总提取物,上海方华生物科技有限公司产品,成分经 HPLC 证实(数据未显示);雌二醇缓释贴片,浙江亚太药业有限公司;Ki-67 免疫组化试剂盒,武汉博士德(BO STER)公司;RNA 提取试剂盒,申能博彩生物科技有限公司;Real-Time PCR 试剂,宝生物工程有限公司;动物饲料,江苏省协同医药生物工程有限公司。

(ii) 细胞培养。人乳腺癌细胞 MCF-7 培养于 DMEM 培养液中,常规加 10% BCS, 100 $\mu\text{g/mL}$ 青霉素, 100 U/mL 链霉素, 0.2 U/mL 胰岛素, 0.1 nmol/L 雌激素, 37°C, 5% CO_2 培养箱中培养。

(iii) 去卵巢裸鼠人乳腺癌细胞移植模型的建立。裸鼠(BALB/C-nu/nu), 雌性, 3~4 周龄, 饲养于层流罩中 7 d 适应环境后做双侧卵巢切除手术, 于 7 d 恢复后给予雌激素贴片(含 0.6 mg 雌二醇)刺激, 7 d 后在背部皮下植入 MCF-7 细胞, 每只植入 1×10^7 个细胞 $\cdot 200 \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{点}^{-1}$, 观察肿瘤生长情况^[7]。

(iv) 动物分组。当裸鼠背部肿瘤表面积达到 10 mm^2 时将其分为 4 组: I 组(8 只): 对照组, 饲料中不加任何大豆成分; II 组(8 只): 6.25 g/kg; III 组(8 只): 12.5 g/kg; IV 组(8 只): 25 g/kg(大豆异黄酮总提取物/饲料), 同时去除雌二醇贴片。每周称重, 用游标卡尺测量肿瘤的长和宽, 计算表面积 = (长/2 + 宽/2) π , 16 周后处死裸鼠, 收集血样和肿瘤组织进一步分析。

(v) 常规免疫组织化学方法检测肿瘤细胞核抗原 ki-67 的表达。采血后断颈处死裸鼠, 迅速取出肿瘤组织, 一部分经液氮速冻, 以备提取 RNA。另一部分组织用 10% 福尔马林固定液固定, 石蜡包埋, 切片厚 4 μm , 组织切片经二甲苯脱蜡, 乙醇梯度水化, 3% H_2O_2 去离子水孵育 5~10 min, 阻断内源性过氧化物酶。PBS 冲洗 2 min, 3 次。加鼠抗人 ki-67 抗体(中杉金桥, 1:3000), 37°C 孵育 1~2 h, PBS 冲洗 2 min, 3 次; 加山羊抗小鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体(中杉金桥), 37°C 孵育 30 min, PBS 冲洗 2 min, 3 次。DBA 显色。PBS 冲洗, 苏木精复染, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 封片, 光镜下观察。两名高年资病理科医生每组随机取 5 个肿瘤共 25 个视野, 光学显微镜(400 $\times$)下观察, 计数每个视野中阳性细胞数, 以平均百分率表示。

(vi) 以 Real-Time PCR 检测雌激素相关基因 pS_2 的表达。取 100 mg 肿瘤组织, 放入研磨器中, 加 1 mL TriBlue, 在冰上迅速研磨, 按照试剂盒说明提取 RNA, 利用反转录酶 PrimeScriptTM RTase 将 RNA 反转录成 cDNA, 然后使用含有 SYBR Green I 的 Real-Time PCR 反应试剂, 以合成的 cDNA 为模板进行 Real-time PCR 反应(Chromo 4 Four-Color Real-Time System, BIO-RAD), 每个样品做 3 个平行样, 以 GAPDH 为内参照。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法处理 Real-Time PCR 的数据^[8]。 pS_2 引物序列: F, 5'-AATAAGGGCTGCTGTTTCG-3'; R, 5'-AAGCGTGTCTGAGGTGTCC-3'。 GAPDH 引物序列: F, 5'-GAAGGTGAAGGTCGGA-GTC-3'; R, 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'。

(vii) 化学发光酶免疫法检测裸鼠血清中雌激素的含量。裸鼠经眼眶取血, 分离血清, 采用化学发光酶免疫法, 使用 BECKMAN COULTER Access 全自动微粒子化学发光免疫分析仪测定裸鼠血清中雌激素的含量。

(viii) 统计方法。实验结果以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示。采用 Stata 7.0 统计软件进行秩变换检验, Scheffe 法分析组间差异。当 $P < 0.05$ 时, 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤生长

MCF-7 细胞接种后 5 d 左右, 在接种部位背部皮下出现肿瘤小块, 质地较硬, 随着时间迁移, 肿块逐渐增大(图 1)。待肿瘤表面积长到约 10 mm^2 时, 移去雌二醇贴片, 分组喂食不同的饲料, 观察 16 周。

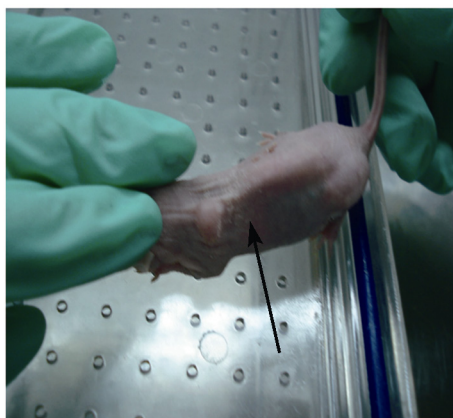


图1 去卵巢裸鼠 MCF-7 肿瘤细胞移植肿瘤

MCF-7 细胞接种后 5 d 左右, 在接种部位背部皮下出现肿瘤小块, 质地较硬, 随着时间肿块逐渐增大. 图中为荷瘤裸鼠第 30 天左右肿瘤生长情况, 箭头所指为 MCF-7 乳腺肿瘤细胞移植肿瘤

由于雌二醇贴片的摘除, 在观察的前 6 周各组肿瘤表面积无明显变化, 随着喂食时间的延长, II、III 和 IV 组肿瘤表面积逐渐增大, 而空白组肿瘤反而有缩小的趋势. 各组裸鼠 MCF-7 移植瘤的平均表面积的变化如图 2 所示. 当第 16 周时, 各组肿瘤表面积为: I 组 $11.97 \pm 2.47 \text{ mm}^2$; II 组 $35.5 \pm 1.93 \text{ mm}^2$ 是(I 组的 2.96 倍); III 组 $38.13 \pm 0.55 \text{ mm}^2$ (I 组的 3.19 倍); IV 组 $31.28 \pm 3.78 \text{ mm}^2$ (I 组的 2.61 倍). II~IV 组与 I 组相比较, 肿瘤表面积具有统计学差异($P < 0.05$).

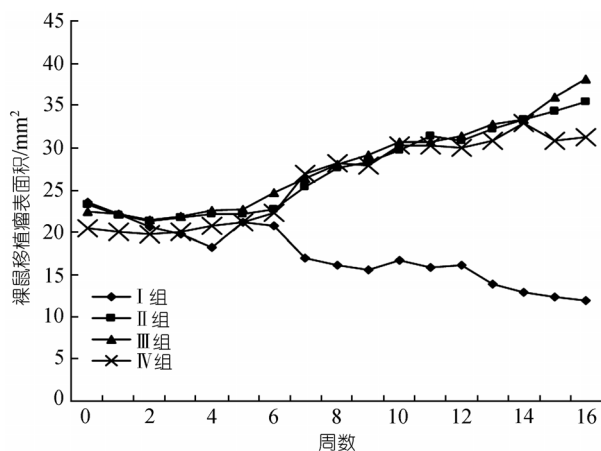


图2 大豆异黄酮提取物对裸鼠 MCF-7 移植瘤生长的作用
每周测量肿瘤大小 1 次, 连续 16 周, 取最大径(长)及其垂直径(宽), 计算表面积($\bar{x} \pm \text{SD}$, mm^2). 图中数据为每组 8 只裸鼠移植肿瘤表面积的均值

2.2 ki-67 在肿瘤组织中的表达

ki-67 在各个组中的表达百分率分别为: I 组

($6.7 \pm 1.5\%$), II 组($48.5 \pm 7.9\%$), III 组($56.0 \pm 14.2\%$), IV 组($21.4 \pm 6.1\%$)(图 3). II、III 组 ki-67 的表达明显升高, 与 I 组比较有统计学差异($P < 0.05$), 说明大豆异黄酮总提取物促进肿瘤细胞核抗原 ki-67 的表达. IV 组 ki-67 的表达与 I 组比较无明显变化, 没有统计学差异($P > 0.05$).

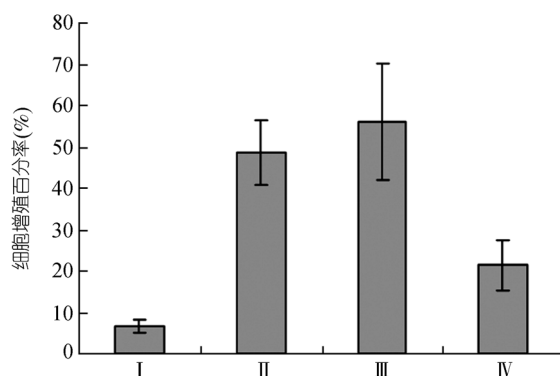


图3 大豆异黄酮总提取物对 MCF-7 移植瘤细胞增殖的影响

Ki-67 可以作为肿瘤细胞增殖的免疫组织化学标志. 每组随机选取 5 个肿瘤共 25 个视野, 计数每个视野中的阳性细胞数, 以增殖百分率表示, 数据为 $\bar{x} \pm \text{SD}$

2.3 移植肿瘤组织中 pS_2 的表达

以 Real-Time PCR 检测 pS_2 (雌激素相关基因) mRNA 的表达, 以观察大豆异黄酮总提取物对 pS_2 (雌激素相关基因)表达的调节作用. 与 I 组相比较, II 和 III 组 pS_2 的表达明显提高, 分别是其 9.2($P < 0.05$)和 4.2 倍($P < 0.05$), IV 组 pS_2 的表达虽为 I 组的 1.9 倍, 但无统计学意义($P > 0.05$)(图 4).

2.4 裸鼠血清中雌激素的含量

各组裸鼠血清中雌激素的含量为: I 组, $44.0 \pm 4.58 \text{ ng/L}$; II 组, $85.5 \pm 7.66 \text{ ng/L}$; III 组, $85.75 \pm 21.75 \text{ ng/L}$; IV 组, $37 \pm 6.35 \text{ ng/L}$. II 和 III 组裸鼠血清中雌激素水平有所升高, 与 I 组比较有统计学差异($P < 0.05$), 说明 6.25、12.5g/kg 剂量组大豆异黄酮总提取物可上调雌激素的分泌. IV 组雌激素水平没有明显变化($P > 0.05$)(图 5).

3 讨论

目前, 针对大豆异黄酮类中的染料木黄酮(genistein)的研究比较深入, 但其结果也多种多样, 在体内外实验中既有抑制乳腺肿瘤生长的作用, 又有促进乳腺肿瘤发生的作用. 在药理浓度的浓度(30~185

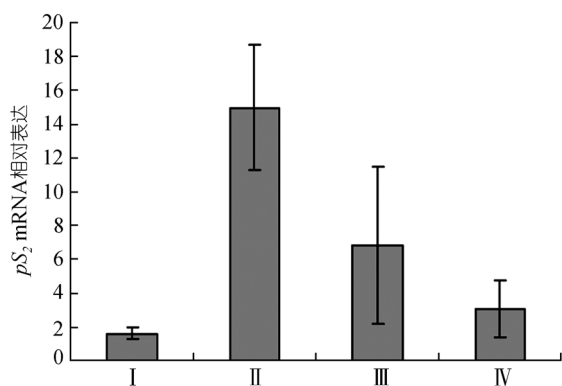


图4 大豆异黄酮总提取物对肿瘤组织 pS_2 基因表达的影响
以 SYBR Green I 为染料, Real-Time PCR 分析肿瘤组织中 pS_2 的相对表达, 同时以 GADPH 为内参, 数据为 $\bar{x} \pm SD$

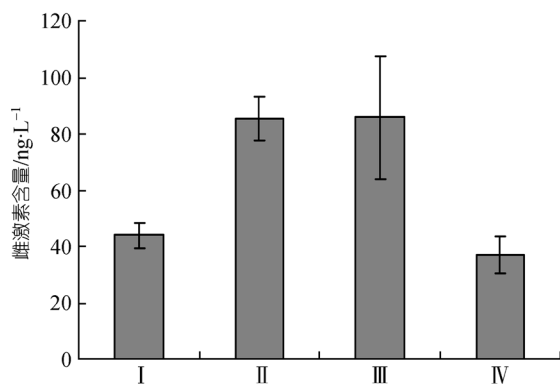


图5 裸鼠血清中雌激素的含量
数据为 $\bar{x} \pm SD$

$\mu\text{mol/L}$)下, 在体外实验中发现染料木黄酮具抑制乳腺肿瘤细胞生长的作用, 可以抑制上皮生长因子受体酪氨酸激酶及拓扑异构酶 II 的活性, 使细胞阻滞于G2-M期, 并诱导细胞发生凋亡, 此外还具有抗氧化性, 抑制血管生成等作用^[9,10]。但从正常饮食来说, 仅仅食用大豆食品, 人体血液中的染料木黄酮浓度只介于 $0.5 \sim 5 \mu\text{mol/L}$ 之间^[11], 而此时染料木黄酮表现为雌激素样的作用, 促进雌激素受体(ER)- α 的活化^[12~15], 促进乳腺肿瘤细胞的增生, 抑制三苯氧胺的抗肿瘤效应^[16,17]。

动物实验中染料木黄酮对乳腺肿瘤发生的作用也给出了不同的结果。一般来说, 在动物暴露于致癌物质或乳腺肿瘤发生后, 开始给予染料木黄酮膳食, 不管给予剂量的多少, 都不会减少乳腺肿瘤的发生, 但可以延长肿瘤的潜伏期^[18~22]。还有报道称, 染料木黄酮可以降低绝经前裸鼠模型的乳腺癌细胞移植肿瘤的生长^[23,24]; 另一些研究报道, 在去卵巢裸鼠绝经

模型中, 膳食染料木黄酮可促进由致癌物质诱导的雌激素依赖性乳腺肿瘤和雌激素依赖性乳腺肿瘤细胞移植肿瘤的生长^[25,26]。此外, 青春前期或青春前期摄入染料木黄酮是可以减少雌激素依赖性乳腺肿瘤的发生率^[27~29]。

在针对大豆苷元(daidzein)和其代谢物雌马酚(equol)的研究中, Helferich等人^[30]发现, 大豆苷元和雌马酚($0.001 \sim 50 \mu\text{mol/L}$)可以促进体外MCF-7 细胞的增殖。以 $1000 \mu\text{g/g}$ 的大豆苷元或雌马酚喂食荷瘤裸鼠, 虽然其血浆中大豆苷元或雌马酚浓度在上述体外试验浓度范围的中间, 但发现大豆苷元对肿瘤生长仅有轻微的刺激作用, 对 pS_2 mRNA 的表达无明显作用; 而雌马酚对移植瘤的生长和 pS_2 mRNA 的表达均无明显作用。这些结果表明药代动力学或代谢过程的某些因素可能会削弱大豆苷元和雌马酚在裸鼠体内的所产生的雌激素效应。

我们先前的实验发现, 大豆异黄酮总提取物在体外对MCF-7 细胞的增殖具有同染料木黄酮相似的作用(数据未显示)。在本研究中, 添加大豆异黄酮总提取物的 6.25 和 12.5 g/kg 剂量组的乳腺肿瘤细胞增殖明显, pS_2 的表达上调, 血清雌激素水平升高。 25 g/kg 高剂量组未呈现雌激素效应, 这可能是由于血清中大豆异黄酮的浓度没有随着喂食剂量的增加而升高, 因此也就未呈现剂量效应关系。本次喂食大豆异黄酮总提取物的动物实验与Allred等人^[31,32]报道的喂食染料木黄酮的动物实验结果相似, 提示染料木黄酮是在动物体内主要起雌激素效应的大豆异黄酮成分, 其作用未受到大豆异黄酮总提取物中其他成分的明显影响。

染料木黄酮及其他代谢物可以与雌激素竞争结合雌激素受体 α 及 β , 从而调节雌激素在体内的作用。女性一生中影响乳腺发育的内源性雌激素水平变化很大, 可能使大豆异黄酮在高雌激素水平(如妊娠期), 中雌激素水平(如绝经前期)和低雌激素水平(如儿童期和绝经后期)时对乳腺的作用不同。本研究中 6.25 和 12.5 g/kg 剂量组裸鼠血清中雌激素明显比空白对照组雌激素水平高, 说明在体内雌激素水平较低(去卵巢)时, 大豆异黄酮具有弱雌激素效应, 表现出提高雌激素水平的作用, 因此, 这一结果可以解释服用大豆异黄酮可以缓解绝经期妇女的更年期症状。但是在 6.25 和 12.5 g/kg 剂量组中MCF-7 移植肿瘤细胞增殖明显, 雌激素相关基因 pS_2 的表达也明显增强, 说明大豆

异黄酮在此浓度内促进去卵巢裸鼠 MCF-7 移植肿瘤的生长. 因此, 当服用高提纯、高浓度的大豆异黄酮胶囊时, 可能潜在地提高乳腺癌发生的危险.

本研究结果与食用富含大豆的食品可预防癌症的研究结果背道而驰, 但喜食豆类食品的亚洲妇女患乳腺癌的风险较低, 说明可能与健康的生活习惯再加上直接食用大豆而不是豆类替代品有关. 与食用豆腐等以大豆为原料的豆类食品相比, 食用经过提纯的大豆异黄酮提取物或单体可能会刺激 MCF-7 移植瘤的生长, 说明大豆中的其他活性成分可能会影响大豆异黄酮在体内的代谢过程和作用, 从而阻止雌激素依赖

型乳腺肿瘤的发生或发展. 约翰斯霍普金斯大学的肿瘤学和环境健康学副教授布鲁斯特罗克说: “我们还应考虑到亚洲妇女有更多的体力活动, 较少饮酒, 生育也较早, 而且她们的饮食结构与西方妇女不同. 食用经过高度提纯的豆类替代品产生的生物学效应与直接食用大豆或饮用豆浆有很大不同.”

尽管不明确的生物学的效应, 大豆异黄酮已经作为绝经期妇女缓解更年期症状的补充剂^[33,34]. 但是如果是对那些易患乳腺癌的高危妇女或乳腺癌术后痊愈的妇女, 推荐使用高剂量的大豆异黄酮作为补充剂还为之过早.

参考文献

- 1 Parkin D M, Muir C S, Whelan S L. Cancer incidence in five continents. Lyon (France): IACR, 1992
- 2 Ziegler R G, Hoover R N, Pike M C, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. J Natl Cancer Inst, 1993, 85: 1819—1827^[DOI]
- 3 Henderson B E, Pike M C, Bernstein L, et al. Cancer Epidemiology and Prevention. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1996. 1022—39
- 4 Adlercreutz C H, Goldin B R, Gorbach S L, et al. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. J Nutr, 1995, 125(3 Suppl): 757S—770S
- 5 Barnes S, Peterson G, Grubbs C, et al. Potential role of dietary isoflavones in the prevention of cancer. In: Jacobs M M, ed. Diet and Cancer: Markers, Prevention, and Treatment. New York: Plenum Press, 1994. 135—147
- 6 Kris-Etherton P M, Hecker K D, Bonanome A, et al. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am J Med, 2002, 113(Suppl 9B): 71S—88S^[DOI]
- 7 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Methods, 2001, 25(4): 402—408^[DOI]
- 8 吴倩, 金念祖, 余静, 等. 去卵巢裸鼠人乳腺癌移植模型的建立. 南京医科大学学报, 2008, 28: 13—15
- 9 Messina M, Persky V, Setchell K D R, et al. Soy intake and breast cancer: A review of the *in vitro* and *in vivo* data. Nutr Cancer, 1994, 21: 113—131
- 10 Bouker K B, Hilakivi-Clarke L. Genistein: Does it prevent or promote breast cancer? Environ Health Perspect, 2000, 108: 701—708^[DOI]
- 11 Messina M J, Loprini C L. Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. J Nutr, 2001, 131(11 Suppl): 3095S—3108S
- 12 Wang T T, Sathyamoorthy N, Phang J M. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. Carcinogenesis, 1996, 17: 271—275^[DOI]
- 13 Collins B M, McLachlan J A, Arnold S F. The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. Steroids, 1997, 62: 365—372^[DOI]
- 14 Zava D T, Duwe G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells *in vitro*. Nutr Cancer, 1997, 27: 31—40
- 15 Kuiper G G, Lemmen J G, Carlsson B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology, 1998, 139: 4252—4263^[DOI]
- 16 Ju Y H, Doerge D R, Allred K F, et al. Dietary genistein negates the inhibitory effect of tamoxifen on growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) cells implanted in athymic mice. Cancer Res, 2002, 62: 2474—2477
- 17 Constantinou A I, White B E, Tonetti D, et al. The soy isoflavone daidzein improves the capacity of tamoxifen to prevent mammary tumours. Eur J Cancer, 2005, 41: 647—654^[DOI]
- 18 Cohen L A, Zhao Z, Pittman B, et al. Effect of intact and isoflavone-depleted soy protein on NMU-induced rat mammary tumorigenesis. Carcinogenesis, 2000, 21: 929—935^[DOI]
- 19 Ueda M, Niho N, Imai T, et al. Lack of significant effects of genistein on the progression of 7,12-dimethylbenz (a)anthracene-induced mammary tumors in ovariectomized Sprague-Dawley rats. Nutr Cancer, 2003, 47: 141—147^[DOI]
- 20 Jin Z, MacDonald R S. Soy isoflavones increase latency of spontaneous mammary tumors in mice. J Nutr, 2002, 132: 3186—3190

- 21 Constantinou A I, Lantvit D, Hawthorne M, et al. Chemopreventive effects of soy protein and purified soy isoflavones on DMBA-induced mammary tumors in female Sprague-Dawley rats. *Nutr Cancer*, 2001, 41: 75—81^[DOI]
- 22 Gallo D, Giacomelli S, Cantelmo F, et al. Chemoprevention of DMBA-induced mammary cancer in rats by dietary soy. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, 69: 153—164^[DOI]
- 23 Hewitt A L, Singletary K W. Soy extract inhibits mammary adenocarcinoma growth in a syngeneic mouse model. *Cancer Lett*, 2003, 192: 133—143^[DOI]
- 24 Shao Z M, Wu J, Shen Z Z, et al. Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Cancer Res*, 1998, 58: 4851—4857
- 25 Ju Y H, Allred C D, Allred K F, et al. Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. *J Nutr*, 2001, 131: 2957—2962
- 26 Allred C D, Allred K F, Ju Y H, et al. Dietary genistein results in larger MNU-induced, estrogen-dependent mammary tumors following ovariectomy of Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis*, 2004, 25: 211—218^[DOI]
- 27 Lamartiniere C A, Cotroneo M S, Fritz W A, et al. Genistein chemoprevention: Timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J Nutr*, 2002, 132: 552S—558S
- 28 Hilakivi-Clarke L, Onojafe I, Raygada M, et al. Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis. *Br J Cancer*, 1999, 80: 1682—1688^[DOI]
- 29 Pei R J, Sato M, Yuri T, et al. Effect of prenatal and prepubertal genistein exposure on N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *In Vivo*, 2003, 17: 349—357
- 30 Ju Y H, Fultz J, Allred K F, et al. Effects of dietary daidzein and its metabolite, equol, at physiological concentrations on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in ovariectomized athymic mice. *Carcinogenesis*, 2006, 27(4): 856—863^[DOI]
- 31 Allred C D, Ju Y H, Allred K F, et al. Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *Carcinogenesis*, 2001, 22: 1667—1673^[DOI]
- 32 Allred C D, Allred K F, Ju Y H, et al. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res*, 2001, 61: 5045—5050
- 33 Tice J A, Ettinger B, Ensrud K, et al. Phytoestrogen supplements for the treatment of hot flashes: The isoflavone clover extract (ICE) study. A randomized controlled trial. *JAMA*, 2003, 290: 207—214^[DOI]
- 34 Wuttke W, Jarry H, Becker T, et al. Phytoestrogens: Endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas*, 2003, 44(Suppl 1): S9—20^[DOI]