文章编号:1000-5404(2007)22-2185-03

论著

原因不明月经过少患者子宫内膜雌激素受体α表达的研究

袁 瑞[1],乐爱文[1],姚珍薇[1],朱元方[2],耿 力[1] (重庆医科大学:[1]附属第一医院妇产科,重庆 400016,[2]附属第二医院妇产科,重庆 400010)

提 要:目的 探讨雌激素受体α(estrogen receptor, ERα)在原因不明月经过少和月经量正常患者子宫内膜组织中的表达情况。**方法** 选取试验组(原因不明月经过少患者)40例,对照组(月经量正常的其他妇科疾病患者)40例。取2组子宫内膜组织,通过逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR),进行计算机图像分析,半定量研究ERα mRNA的表达。运用Western blot半定量研究ERα的蛋白表达。**结果** 原因不明月经过少患者与月经量正常的其他妇科疾病患者的子宫内膜相比,ERα mRNA和蛋白质表达均降低($P<0.05$)。**结论** ERα在原因不明月经过少患者子宫内膜中的表达低于月经量正常患者的子宫内膜,且可能与月经量多少有关。

关键词:月经过少;雌激素受体;逆转录-多聚酶链反应
中图法分类号:R339.22;R394;R711.510.2 **文献标识码**:A

ERα gene expression in unknown aetiology hypomenorrhea

YUAN Rui[1], LE Ai-wen[1], YAO Zhen-wei[1], ZHU Yuan-fang[2], GENG Li[1] (Chongqing Medical University: [1]Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing 400016, [2]Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing, 400010, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of the human estrogen receptor α subtype (ERα) in the endometrium of unknown aetiological hypomenorrhea and normal menstrual volume. **Methods** The endometrial samples of 40 patients with unknown aetiological hypomenorrhea specimens and 40 with normal menstrual volume were collected. RT-PCR and computer densitometry were used to investigate the semi-quantitative expression of the ERα subtype at mRNA level. Western blotting was employed to investigate the protein expression of ERα subtype. **Results** The mRNA and protein expressions of ERα were decreased in unknown aetiological hypomenorrhea compared with normal menstrual volume endometrium ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of ERα is decreases in unknown aetiological hypomenorrhea endometrium, which may be related to the menstrual volume.

Key words: hypomenorrhea; estrogen receptor; RT-PCR

原因不明月经过少(月经量少于30 ml)是近年来逐渐引起人们关注的一类症状,该类患者性激素水平在正常范围,无内外科疾病及先天性生殖系统发育畸形,予以性激素治疗,无明显疗效甚至无效[1]。对其进行宫腔镜检查,可发现患者的子宫内膜光滑、菲薄,表现为生长发育不良。该类患者孕卵在子宫内膜不易种植、着床,进而导致反复流产、不孕、闭经的前躯症状等,同时也降低了利用辅助生殖技术受孕的成功率。雌激素(estrogen)是调节子宫内膜生长的主要激素,而雌激素必须与雌激素受体(estrogen receptor,ER)结合才能发挥生物学效应,ER是雌激素对子宫内膜发挥生理作用的桥梁[2]。雌激素正常,使我们推测是否子宫内膜ER表达异常,因此我们进行对原因不明月经过少患者子宫内膜ERα表达的临床研究,以期了解月经过少的机制。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取2003年2月至2005年11月在本科就诊的原因不明月经过少患者40例作为试验组,年龄20~40岁,平均32.8岁。选取同期因其他妇科疾病行宫腔镜检查的月经量正常患者40

基金项目:重庆市卫生局科研项目(06-2-059)
Supported by the Scientific Research Project of Bureau of Public Health of Chongqing (06-2-059)

作者简介:袁 瑞(1964-),女,四川省隆昌县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事妇科内窥镜及肿瘤方面的研究,发表论文20余篇。电话:13002306803,E-mail:leaiwen@126.com
通讯作者:乐爱文,电话:13224083290

收稿日期:2007-04-30;**修回日期**:2007-06-18

例作为对照组，年龄 20～40 岁，平均 29.6 岁。原因不明月经过少的纳入标准：①月经量少于 30 ml（根据月经失血图法[3,4]）。②性激素水平检测在正常范围。③宫腔镜检查：月经第 5 天子宫内膜光滑、菲薄，宫腔无黏连，输卵管开口清晰可见。④排除其他内科疾病如糖尿病、结核以及甲状腺、肾上腺等内分泌疾病、外科疾病、先天性疾病等。⑤B 超：子宫内膜厚度 <5 mm。⑥个体间无血缘关系，检查前 3 个月未接受任何性激素治疗。两组患者临床资料、生化指标比较见表 1、2。

表 1 两组患者年龄及人工流产次数比较（$n=40$，$\bar{x}\pm s$）

组别	年龄（岁）	人工流产次数（次）
试验组	32.81 ± 3.61	2.79 ± 1.32
对照组	29.62 ± 3.71	2.45 ± 1.38
t	1.839	0.681
P	0.081	0.502

表 2 两组血清性激素水平比较（$n=40$，$\bar{x}\pm s$）

组别	雌激素（pg/ml）	孕酮（ng/ml）	卵泡刺激素（mIU/ml）	黄体生成素（mIU/ml）	催乳素（ng/ml）	睾酮（ng/ml）
试验组	69.56 ± 31.58	2.73 ± 1.65	7.29 ± 0.24	5.61 ± 2.44	12.94 ± 6.52	0.79 ± 0.23
对照组	65.21 ± 35.64	2.41 ± 0.77	7.42 ± 0.31	6.36 ± 2.12	13.98 ± 8.12	0.84 ± 0.18
t	0.481	0.786	−1.011	−0.689	−0.786	−0.797
P	0.635	0.452	0.290	0.491	0.476	0.425

1.2 试验方法

1.2.1 标本收集　采用美国史赛克公司 5.07 mm 连续灌流宫腔镜，取对照组和实验组子宫内膜组织 0.5～1.0 g，保存于液氮中后再转入 −70 ℃冰箱中保存备用。

1.2.2 ERα mRNA 表达　根据 GenBank 中人 ERα 基因序列设计 ERα 引物序列。上游：5′-CAGCAGGTGCCCTACTACCT-3′；下游：5′-ATCATCTCTCTGGCGCTTGT-3′，产物 444 bp。内参 GAPDH 引物：上游：5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′；下游：5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′，产物 450 bp。以上引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

RNA 的提取和质控：Trizol 液提取胎盘组织总的 RNA。2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性，见 28S、18S 及 5S 3 条带，说明 RNA 完整性较好。结果判定：在 Gel Scan 凝胶图像成像仪（上海天能科技有限公司）上扫描，记录各特异性 DNA 扩增带密度，以目的基因的 DNA 扩增片段密度与相应的内参照 GAPDH 扩增片段密度的比值作为其 mRNA 表达水平的定量指标。

1.2.3 蛋白质表达　采用 Western blot 半定量法研究蛋白质表达，参照《分子生物学》第 3 版。通过提取总蛋白→变性→SDS-PAGE 凝胶电泳→用转移槽转印蛋白质→考马斯亮蓝染胶及脱色→用抗体耦联物进行免疫检测→用发光底物显影。结果判定：用 Gel Scan 图像分析处理系统对条带进行扫描，定量。每条泳道除测定条带的光密度和面积外，同时测定无条带处光密度值作为本底。计算条带的积分光密度值。

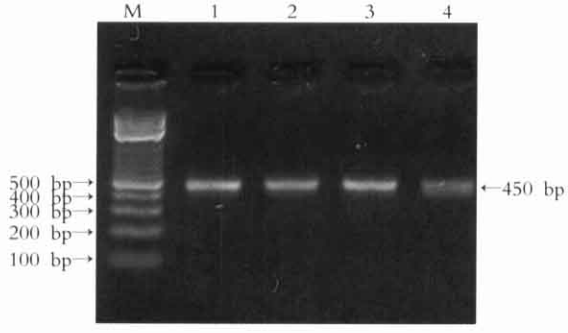
1.3 统计学方法

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

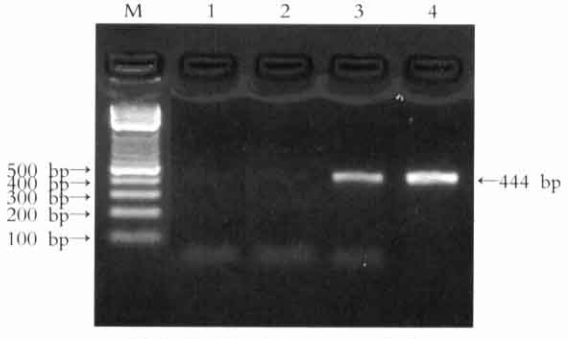
2.1 两组 ERα mRNA 的电泳结果

从图 1、2 可以看出两组内参表达量一致，两组条带均位于 400～500 bp，试验组 ERα mRNA 表达量较对照组有所下降。



M：标准；1，2：试验组；3，4：对照组

图 1 内参 GAPDH 电泳图

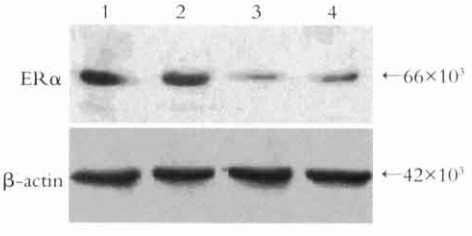


M：标准；1，2：试验组；3，4：对照组

图 2 ERα mRNA RT-PCR 产物电泳图

2.2 两组 ERα 蛋白质的电泳结果

从图 3 中可以看出两组 β-actin 表达无差异，试验组 ERα 蛋白质表达比对照组低。



1，2：对照组；3，4：试验组

图 3 两组 ERα 蛋白质电泳图

2.3 两组 ERα 的表达量

试验组和对照组 ERα mRNA 和蛋白质相比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。说明试验组 ERα 表达比对照组低，见表 3。

表 3 两组患者 ERα 表达量比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	ERα mRNA	ERα 蛋白质表达
试验组	0.888 ± 0.274	600.810 ± 212.844
对照组	1.263 ± 0.353	797.275 ± 85.386
t	−2.653	−2.709
P	0.016	0.014

3 讨论

ERα 是糖蛋白，属于Ⅰ型核变体超家族成员（包括甾体激素、甲状腺素、视黄醛受体等）。ERα 基因由

8 个外显子和 7 个内含子组成[1]。ERα 位于细胞质或细胞核内，具有转录因子的作用，一旦与雌激素结合即形成二聚体，通过与靶基因中的雌激素反应元件特异性结合刺激靶基因转录，可激活核内调节基因的表达[5,6]。ER 是调节月经的主要激素，作用主要体现在：一方面促进子宫内膜血管的周期性重建；另一方面促进子宫内膜的增生修复[1]。在子宫内膜中 ER 以 ERα 为主，它在该器官中所有类型的细胞中均有表达。

Li 等[7]对正常人和卵巢癌患者卵巢 ERα 进行定量测定。结果显示，卵巢癌患者 ERα/ERβ mRNA 比正常人高十几倍，且 ERα/ERβ 蛋白质也是正常的两倍。多囊卵巢综合征患者子宫内膜 ERα 表达较正常子宫内膜低。有研究者对同龄者正常内膜与子宫内膜癌患者中 ER mRNA 及蛋白质进行比较，结果显示，ERα 在正常组织中表达降低[8]。Western blot 进一步证实了 ERα 在蛋白质水平的缺失。目前尚少见对原因不明月经过少患者子宫内膜 ERα 表达的研究。

本研究通过对试验组及对照组血清 6 项性激素[包括卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌激素(E_2)、催乳素(PRL)、孕酮(P)及睾酮(T)]进行检查，结果显示，两组性激素水平在正常值范围内，差异无统计学意义。这一结果与经典的水平下降学说相矛盾。另外两组患者年龄及人工流产次数比较结果显示，两组各年龄阶段分布比较均匀，两组年龄及人工流产次数比较差异亦无统计学意义(表 2)。因此排除了性激素、年龄及人工流产次数对 ERα 表达的影响。

本研究中，试验组和对照组子宫内膜 ERα mRNA 和蛋白质的表达差异有显著性(t 值分别为 -2.653、-2.709；P 值分别为 0.016、0.014)，表明试验组 ERα 表达比对照组低。Mylonas 等[9]研究表明，ERα 在女性月经周期的子宫内膜中都有表达，但在绝经后妇女的子宫内膜中表达下降。本研究选在月经第 5 天，两组的子宫内膜均有 ERα 表达，与其结论相符。但试验组 ERα 表达下降，表现与绝经妇女有相似的表达，提示其具有向绝经期过渡的倾向，这可以部分解释临床上观察到的一些原因不明月经过少患者发展到后期可提前绝经。有研究表明，ERα 变异型有 6 种[10]。本实验用唯一 ERα 基因序列设计的引物即可出现子宫内膜组织 ERα 表达，说明 ERα 变异不一定存在组织特异性。

组织病变与受体含量下降的内在联系可能是：①各种损伤因子影响受体产生和作用的各个环节，引起细胞代谢和功能紊乱，导致细胞病变。②受损的子宫内膜所产生的某些物质损伤受体作用环节的某一步骤，使受体不能正常运转。③ERα 基因多态性改变，产生功能障碍[11]。④上述机制综合作用和(或)其他伤害机制共同作用，形成恶性循环。雌二醇和 ERα 都是促进子宫内膜增生的因子[12]。由于 ERα 的表达下降，使组织对雌激素的刺激增殖作用呈低高反应状态，细胞有丝分裂活动减弱，细胞核内 DNA 和细胞质内 RNA 合成下降，细胞增生不活跃，局部组织增生不良形成子宫内膜菲薄，呈现宫腔镜检查所见结果，因此，我们推测 ERα 表达降低可能参与月经量过少的发生。

参考文献：

[1] 郑筱萸. 中药新药治疗月经不调的临床研究指导原则[M]// 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则. 北京：中国医药科技出版社，2002：239.

[2] Jabbour H N, Kelly R W, Fraser H M, *et al*. Endocrine regulation of menstruation[J]. Endocr Rev, 2006, 27(1): 17-46.

[3] 冯力民，夏思兰，丛　捷，等. 应用月经失血图评估月经血量[J]. 中华妇产科杂志，2001，36(1)：51.

[4] Higham J M, O'Brien P M, Shaw R W. Assessment of menstrual blood loss using a pictorial chart[J]. Br J Obstet Gynaecol, 1990, 97(8): 734-739.

[5] Girault I, Bieche I, Lidereau R. Role of estrogen receptor alpha transcriptional coregulators in tamoxifen resistance in breast cancer[J]. Maturitas, 2006, 54(4): 342-351.

[6] Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, *et al*. Normal and malignant human endometrium express immunohistochemically estrogen receptor alpha (ER-alpha), estrogen receptor beta (ER-beta) and progesterone receptor (PR)[J]. Anticancer Res, 2005, 25(3A): 1679-1686.

[7] Li A J, Baldwin R L, Karlan B Y. Estrogen and progesterone receptor subtype expression in normal and malignant ovarian epithelial cell cultures[J]. Am J Obstet Gynecol, 2003, 189(1): 22-27.

[8] O'Toole S A, Dunn E, Sheppard B L, *et al*. Oestrogen regulated gene expression in normal and malignant endometrial tissue[J]. Maturitas, 2005, 51(2): 187-198.

[9] Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, *et al*. Steroid receptors ERalpha, ERbeta, PR-A and PR-B are differentially expressed in normal and atrophic human endometrium[J]. Histol Histopathol, 2007, 22(2): 169-176.

[10] Flouriot G, Griffinn C, Kenealy M, *et al*. Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor-alpha gene are generated by alternative splicing and promoter usage[J]. Mol Endocrinol, 1998, 12(12): 1939-1954.

[11] 袁　瑞，乐爱文，夏恩兰，等. 雌激素受体 α 基因 *Pvu* Ⅱ、*Xba* Ⅰ、STR 多态性与原因不明月经过少的关系[J]. 第三军医大学学报，2007，29(3)：231-233.

[12] Sant'Ana-de-Almeida E C, Nogueira A A, Candido-dos-Reis F J, *et al*. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in endometrial polyps and adjacent endometrium in postmenopausal women[J]. Maturitas, 2004, 49(3): 229-233.

(编辑　汪勤俭)