文章编号:1000-5404(2008)09-0795-04

论著

戊酸雌二醇对去势大鼠阴道雌激素受体亚型α、β表达的影响

连 艳,杨 鹰,谢荣凯,韩 静,刘 萍,林桂兰 (第三军医大学新桥医院妇产科,重庆 400037)

摘 要:**目的** 通过研究戊酸雌二醇对去势大鼠阴道雌激素受体(estrogen receptor, ER)亚型α、β表达的调节,探讨雌激素受体亚型与绝经期泌尿生殖道萎缩的相关性。**方法** 4月龄SD雌性大鼠80只,分为正常组、假手术组、去势组、药物干预组,每组20只。药物组大鼠于术后4周每天戊酸雌二醇灌胃给药,其余3组给予等量生理盐水灌胃。8周后处死大鼠,分离摘取阴道进行ERα、ERβ免疫组织化学染色及mRNA半定量RT-PCR检测。**结果** ①ERα、ERβ在正常阴道鳞状上皮细胞、基质纤维细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞核及细胞质中均有表达,以阴道鳞状上皮细胞表达最强,且ERβ较ERα表达弱($P<0.05$)。②去势组ERα较正常组、假手术组表达减弱($P<0.05$),ERβ表达减弱更为明显($P<0.01$)。③药物干预组ERα表达较去势组明显增强($P<0.05$),与正常组、假手术组比较无显著差异($P>0.05$),ERβ表达无明显增强。**结论** ERα是大鼠阴道优势表达的雌激素受体亚型;去势后阴道ER亚型表达下调,以ERβ明显;戊酸雌二醇可明显上调去势大鼠阴道ERα的表达,但不上调ERβ的表达。

关键词:去势;雌激素受体;阴道;药物
中图法分类号:R322.65;R711.5;R977.12 **文献标识码**:A

Effect of estradiol valerate on expressions of estrogen receptor-alpha and -beta in vagina of ovariectomized rats

LIAN Yan, YANG Ying, XIE Rong-kai, HAN Jing, LIU Ping, LIN Gui-lan (Department of Obstetrics and Gynecology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate regulative effect of estradiol valerate on the expressions of estrogen receptor-alpha (ERα) and -beta (ERβ) in the vagina of rats after ovariectomy. **Methods** A total of 80 adult female SD rats weighing about 340 g were randomly and equally allocated into 4 groups: normal control group, sham operation group, ovariectomized group and drug group. Estradiol valerate ($1.2\ mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) was given to the drug group for 4 weeks by gavage in 4 weeks after ovariectomy. Rats from the other 3 group administered normal saline of same volume by gavage at same time period. Immunohistochemical methods were used to determine ERα and ERβ in superficial and deep compartments in the vagina. The mRNA expression levels of of the 2 subtypes were measured by semi-quantitative RT-PCR. **Results** ERα and ERβ were expressed in squamous epithelial cells, stromal fibroblasts, vascular endothelial cells, and smooth muscle cells, and most in squamous epithelial cells ($P<0.05$). Expression of ERα was significantly stronger than that of ERβ. Expression of ERα in the vagina was significantly up-regulated in drug group ($P<0.05$), whereas ERβ was not significant changed ($P>0.05$). **Conclusion** ERα is the major subtype of estrogen receptor in vaginal tissue of rats. ERα and ERβ expressions are down-regulated in the vaginal tissues after ovariectomy. Our findings show that estradiol valerate can up-regulate the expression of ERα but ERβ.

Key words: ovariectomy; estrogen receptor; vagina; estradiol valerate

雌激素及其受体参与雌性生殖器官生理功能的调节。目前认为更年期女性常见的泌尿生殖道萎缩症状与低雌激素水平有关[1],但临床使用雌激素替代治疗(estrogen replacement therapy, ERT)并不能缓解患者所有的症状。故有学者提出雌激素受体(estrogen receptor, ER)亚型α、β的表达变化可能与之相关[2]。我们通过观察ERα、ERβ在正常、去势和戊酸雌二醇药物治疗后大鼠阴道的组织学定位及表达水平,比较

基金项目:第三军医大学科研基金(06XG036)
Supported by the Research Foundation of Third Military Medical University(06XG036)
作者简介:连 艳,女,山东省烟台市人,硕士研究生,主治医师,主要从事妇科肿瘤和妇科内分泌方面的研究。电话:13228687579,E-mail:Lianlian-512@163.com
通信作者:谢荣凯,电话:(023)68774612,E-mail:Xrkai@163.com
杨 鹰,电话:(023)68755612
收稿日期:2007-12-03 修回日期:2007-12-29

两者在介导雌激素生理作用方面的异同，初步探讨雌激素受体亚型与生殖道萎缩症状的相关性。

1 材料与方法

1.1 建立动物模型及动物取材

4月龄SD大鼠[第三军医大学实验动物中心提供，生产许可证SCXK(渝)20070003]80只，体质量320～350 g，实验期间动物饲养于二级动物室，温度25 ℃左右。分为正常组、假手术组、去势组、药物干预组，每组20只。去势组，切除双侧卵巢，术后每天逐只进行阴道上皮角化检查，连续5 d，观察阴道上皮角化细胞无周期性变化，以证明去势成功；假手术组，打开腹腔重复手术步骤但不切除卵巢；药物干预组，于术后4周给予戊酸雌二醇(1.2 mg/kg)生理盐水悬浊液灌胃给药。其余3组给予等量生理盐水灌胃，1次/d，8周后速眠新Ⅱ注射液0.3 ml/kg肌肉注射麻醉，腹部正中切口进腹，分离摘取阴道，将其与周围脂肪组织完全剥离，称湿质量。4%多聚甲醛固定6 h，常规石蜡包埋切片进行免疫组织化学检测，另取新鲜阴道组织液氮冻存。

1.2 免疫组化染色及定量分析

采用S-P法(SP-9001试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供)进行免疫组织化学检测，石蜡切片脱蜡至水后入枸橼酸盐缓冲液微波修复抗原，然后严格按试剂盒说明书进行操作。对照实验用已知的ER阳性的乳腺癌组织作阳性对照，用PBS代替一抗作阴性对照。细胞核、细胞质出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。应用IPP(Image Pro Plus 6.0，USA)图像分析系统进行半定量分析，每张切片选取5个有代表性的高倍视野(×200)，计数阳染细胞及全部细胞，并计算染色指数，即5个高倍视野中阳性细胞数与全部细胞数的比率。

1.3 半定量RT-PCR方法检测

1.3.1 总RNA的提取　选取30 mg新鲜阴道进行组织匀浆，按Trizol试剂盒(美国Invitrogen公司提供)说明书提取总RNA。

1.3.2 引物设计与合成　借助计算机引物设计软件Primer Premier 5.0设计，选择β-actin作为内参照。引物序列为①ERα：上游5′-TGAAGCACAAGCGTCAGAGA-3′，下游5′-CGTAGCCAGCAACATGTCAA-3′，产物长度为501 bp；②ERβ：上游5′-TGCCAATCATCGCTCCTCTA-3′，下游5′-CGCCGGTTCTTGTCTATGGT-3′，产物长度317 bp；③内参β-actin：上游5′-TTCCAGCCTTCCTTCCTGG-3′，下游5′-TTGCGCTCAGGAGGAGCAAT-3′，产物长度为224 bp。以上引物均由上海生物工程有限公司合成纯化。

1.3.3 RT-PCR检测　RT-PCR试剂盒由TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司提供。按试剂盒说明书提供的方法反转录成cDNA。阴性对照用去离子水作模板。PCR反应体系：10×PCR Buffer 5 μl，dNTP (10 mmol/L) 2 μl，$MgCl_2$ 3 μl，上下游引物各0.5 μl，*Taq*酶(5 U/μl) 0.5 μl，cDNA模板4 μl，加无RNase水到反应总体积50 μl。PCR循环参数为94 ℃预变性5 min；然后94 ℃ 1 min，57 ℃(ERβ为60 ℃) 30 s，72 ℃ 1 min，共扩增30个循环；最后72 ℃延伸10 min。

1.3.4 电泳及分析　取10 μl PCR扩增产物于含核酸染色剂的2%琼脂糖凝胶中，90 V电泳30 min，Gel Doc 2000型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)观察结果并照相，所有标本RT-PCR扩增产物均出现224 bp的β-actin扩增条带，证实逆转录所得cDNA的完整性和PCR反应成功。利用Bio-Rad凝胶成像系统成像，Quantity One图像分析软件扫描分析电泳条带吸光度。

1.4 统计学处理

数据采用$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 13.0进行统计分析。两组间比较采用完全随机设计资料Student's t检验，多组间比较采用完全随机设计资料的单因素方差分析和SNK检验。

2 结果

2.1 阴道大体观察结果

大体上看，去势组阴道明显萎缩，体积小于正常组和假手术组，且湿质量最轻，仅有正常组、假手术组和药物组的1/4左右，去势组与其他3组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。假手术组、药物组与正常组间无明显差异($P>0.05$)，见表1。

表1 4组大鼠阴道湿质量、雌激素受体亚型染色指数比较($n=20$，$\bar{x} \pm s$)

组别	阴道湿质量(g)	ERα	ERβ
正常组	0.085±0.018[a]	0.319±0.062[a]	0.092±0.031[a]
假手术组	0.092±0.027[a]	0.295±0.102[b]	0.067±0.024[b]
去势组	0.023±0.006	0.184±0.044	0.020±0.006
药物组	0.090±0.013[a]	0.312±0.074[a]	0.031±0.008

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与去势组比较

2.2 阴道HE染色结果

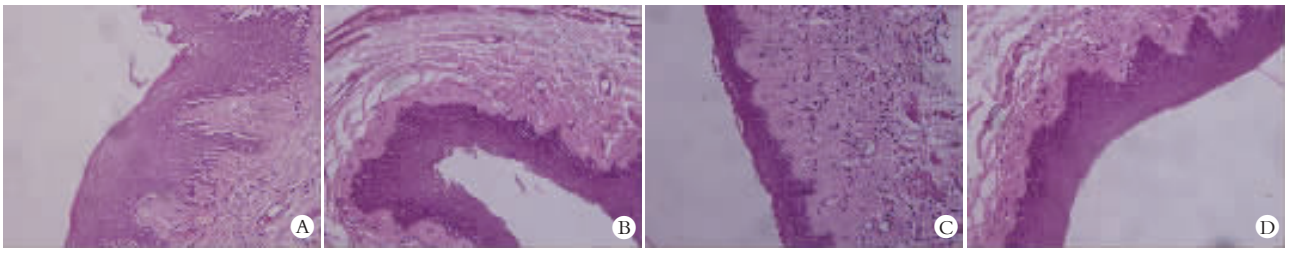
正常组、假手术组阴道壁较厚，黏膜可见特征性皱褶结构，表面覆有复层鳞状上皮，去势组大鼠阴道壁变薄、黏膜上皮明显萎缩；给予雌激素后，大鼠阴道壁有轻度增厚，黏膜上皮大至恢复正常水平。见图1。

2.3 ERα、ERβ免疫组化检测结果

细胞核、细胞质染成棕黄色颗粒者为阳性细胞。在ERα免疫组化切片中，棕黄色颗粒可位于细胞核和细胞质内；在ERβ免疫组化切片中，棕黄色颗粒主要位于细胞质内。①ERα、ERβ在正常组、假手术组阴道鳞状上皮细胞、基质纤维细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞核及细胞质中均有表达，以阴道鳞状上皮细胞表达最强，但ERβ较ERα表达弱($P<0.05$)。②去势后ERα表达水平较正常组、假手术组下降($P<0.05$)，以ERβ表达水平下降更为明显($P<0.01$)。③药物干预组ERα表达较去势组明显增强($P<0.05$)，与正常组、假手术组比较无显著差异($P>0.05$)。ERβ未见明显表达。正常组和假手术组ERα、ERβ的表达强度和分布无明显差异($P>0.05$)，见图2、3，表1。

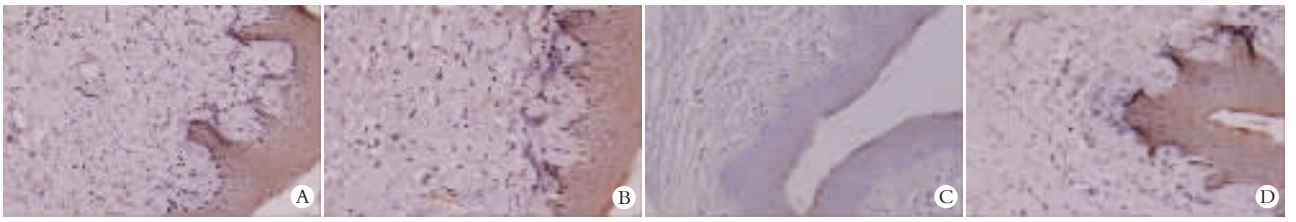
2.4 ERα、ERβ mRNA半定量RT-PCR检测结果

4组大鼠阴道均检测到ERα mRNA和ERβ mRNA的表达，见图4。半定量分析显示正常组、假手术和药物组阴道ERα mRNA表达水平明显高于去势组($P<0.01$)；ERβ mRNA在各组阴道表达变化趋势与ERα mRNA一致，但表达水平较ERα mRNA低($P<0.05$)。



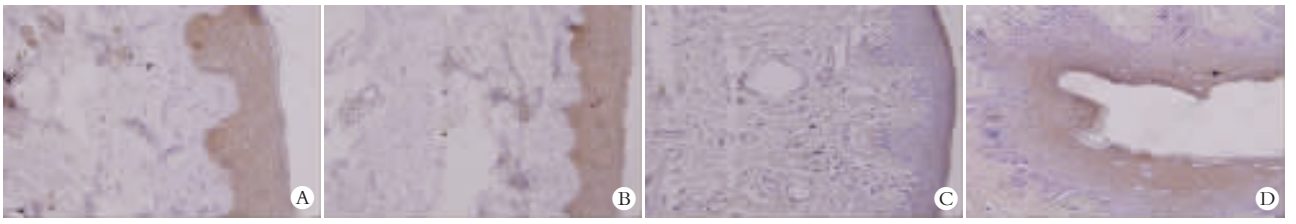
A:正常组;B:假手术组;C:去势组;D:药物组

图 1　大鼠阴道壁病理观察　(HE×200)



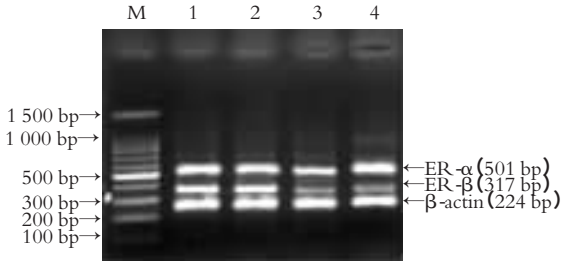
A:正常组;B:假手术组;C:去势组;D:药物组

图 2　ERα 在大鼠阴道的表达　(S-P×200)



A:正常组;B:假手术组;C:去势组;D:药物组

图 3　ERβ 在大鼠阴道的表达　(S-P×200)



M:标准;1:正常组;2:假手术组;3:去势组;4:药物组

图 4　ERα、ERβ mRNA RT-PCR 检测结果

3　讨论

女性绝经后体内的雌激素水平明显下降,生殖内分泌系统发生改变,出现子宫、阴道泌尿生殖器官的萎缩。目前,ERT 在临床上得到了广泛应用,在一定程度上缓解了由泌尿生殖器官萎缩所引发的阴道干涩、黏膜抵抗感染能力下降等症状。但绝经期妇女压力性尿失禁(SUI)的发病率较高[2],有研究认为可能与雌激素水平下降造成女性泌尿生殖道支撑组织萎缩和张力减退有关[3]。阴道壁组织是支撑尿道和膀胱底的重要组织结构,过度松弛常可造成 SUI,然而 ERT 的临床疗效并不理想。

目前采用摘除卵巢大鼠模型已经有绝经期骨质疏松大鼠模型[4],以及用于研究有雌激素样作用药物的去势大鼠模型[5]。本实验采用去势大鼠模型模拟绝经期妇女生殖器萎缩现象,观察 ERα、ERβ 在大鼠阴道的组织学定位及表达水平的差异,初步探讨了其与泌尿生殖道萎缩症状的相关性。

本研究表明,大鼠阴道组织各类细胞均有 ERα 和 ERβ 的表达,但在各类细胞中的表达水平不同。其中以鳞状上皮细胞表达阳性率最高,基质纤维细胞次之,血管内皮细胞和平滑肌细胞中两种受体表达均较弱,且发现 ERα 为优势表达的雌激素受体亚型,这表明 ERα 和 ERβ 的表达存在一定的组织及细胞分布的特异性。Gebhart 等[6,7]认为 ERα 和 ERβ 在不同组织器官中分布不同及相应 mRNA 表达有差异;两种受体亚型的表达水平不同是造成雌激素作用组织特异性的物质基础,故阴道各类细胞 ERα 和 ERβ 表达的差异可能与其介导雌激素生理作用相关。

本研究结果还显示,大鼠去势后由于雌激素水平降低,阴道壁变薄、黏膜上皮明显萎缩,同时 ERα、ERβ 在阴道各类细胞中的表达也明显下降,ERβ 几乎不表达。临床研究也发现绝经后妇女阴道 ERα 和 ERβ mRNA 表达均显著下降[6],表明 ER 亚型在促进性腺

成熟，维持女性生殖器官功能方面具有重要作用。戊酸雌二醇药物治疗，可使阴道黏膜上皮增厚，并明显上调 ERα 在去势大鼠阴道黏膜上皮细胞的表达，提示外源性雌激素对阴道黏膜上皮细胞的增殖分化作用主要由 ERα 所介导[8]，但对 ERβ 的表达上调作用甚微。

综上所述，正常情况下，雌激素是通过 ERα 和 ERβ 多位点作用于多种细胞调节阴道的生理机能，而去势后大鼠阴道的雌激素作用位点明显减少，雌激素主要通过 ERα 呈单一位点作用于阴道黏膜上皮细胞发挥生理作用。目前认为 ERα 和 ERβ 介导不同的生物效应。Kuiper 等[9]认为 ER 两种亚型可分别或相互聚合成同质（αα and ββ）或异质二聚体（αβ），组织对雌激素的反应可能就取决于 ER 总量以及两种 ER 亚型各自的表达水平和形成的同质或异质二聚体的比例。因此我们推测，绝经期妇女雌激素水平下降，可造成阴道组织各种细胞 ER 亚型表达的下降或缺失；ERT 后 ERα 表达上调和 ERβ 表达继续缺失，引起二聚体的比例发生改变，从而影响了雌激素生理作用的发挥，并可能造成绝经期妇女泌尿生殖道支撑组织萎缩和张力减退，引发 SUI，其机制有待深入研究。

参考文献：

[1] Moalli P A, Talarico L C, Sung V W, *et al*. Impact of menopause on collagen subtypes in the arcus tendineous fasciae pelvis[J]. Am J Obstet Gynecol, 2004, 190(3): 620 – 627.

[2] Swanson S G, Drosman S, Helmond F A, *et al*. Tibolone for the treatment of moderate to severe vasomotor symptoms and genital atrophy in postmenopausal women: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. Menopause, 2006, 13(6): 917 – 925.

[3] Biri A, Durukan E, Maral I, *et al*. Incidence of stress urinary incontinence among women in Turkey[J]. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2006, 17(6): 604 – 610.

[4] Devareddy L, Khalil D A, Smith B J, *et al*. Soy moderately improves microstructural properties without affecting bone mass in an ovariectomized rat model of osteoporosis[J]. Bone, 2006, 38(5): 686 – 693.

[5] 余增丽，李文杰，张立实. 金雀异黄酮对人成骨细胞增殖及分化的影响[J]. 卫生研究，2004，33(5)：569 – 571.

[6] Gebhart J B, Rickard D J, Barrett T J, *et al*. Expression of estrogen receptor isoforms alpha and beta messenger RNA in vaginal tissue of premenopausal and postmenopausal women[J]. Am J Obstet Gynecol, 2001, 185(6): 1325 – 1330.

[7] 徐鹰妮，姜 军，程 鸿，等. ERα 和 ERβ 在不同类型乳腺组织的表达及意义[J]. 第三军医大学学报，2007，29(11)：1093 – 1095.

[8] Wada-Hiraike O, Hiraike H, Okinaga H, *et al*. Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta$^{-/-}$ mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(48): 18350 – 18355.

[9] Kuiper G G, Carlsson B, Grandien K, *et al*. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta[J]. Endocrinology, 1997, 138(3): 863 – 870.

（编辑 王 红）

（上接 790 页）

2 讨论

根据 2003 年中华医学会风湿病学分会发布的 SS 指南[1]，pSS 诊断主要依据口、眼部症状体征、唇腺组织学检查、涎腺功能受损及抗 SSA、抗 SSB 抗体阳性。但由于 pSS 可累及多系统、多器官，包括涎腺、泪腺、关节、血液、皮肤、肾、肝等，其临床表现往往复杂多样，极易造成漏诊或误诊。据报道[2]，我国 pSS 患者中以口干、眼干为首发症状的分别占 70% 和 50% 左右，而抗 SSA 及抗 SSB 抗体的阳性率也仅在 40% 左右，相当一部分患者以非特征性的关节肿痛、雷诺现象、肾小管酸中毒或肝损害为首发症状，因此 pSS 的诊断必须在全面分析病情的基础上作出综合判断。本例患者由肾小管酸中毒导致严重代谢性骨病，对基础病造成了混淆和掩盖，导致临床一度误诊。事实上，经过我们仔细询问病史，患者在发病早期曾有口干、眼干症状。在掌握这一线索后，我们及时行唇腺黏膜及肾组织活检，最终得出了 pSS 的诊断。

pSS 发生时肾小球、肾小管间质均可受损，表现为系膜增生、球性或节段性硬化、肾小管萎缩、间质淋巴细胞浸润、纤维化等，部分患者可有小动脉纤维素样坏死。本病例肾小球及肾小管间质病变均较重，废弃肾小球较多，可能为病程较长所致。pSS 肾脏损害以远端肾小管受损最突出，因此临床常有肾小管性酸中毒及尿浓缩功能障碍等表现。由于肾小管损伤，尿钙重吸收减少，患者尚可出现高钙尿、肾钙化、结石、血钙降低等情况[3]。本病例正是在肾小管间质慢性损害的基础上，继发了严重的肾小管性酸中毒和代谢性骨病。对于这类患者，除了针对 pSS 给予激素或免疫抑制剂治疗外，纠正酸中毒、强化补钙及促进骨质矿化亦十分重要。我们在给予口服醋酸泼尼松的同时，通过每日静注葡萄糖酸钙、甘油二磷酸，以及口服钙剂及枸橼酸合剂，使患者血钙在 3 d 内快速上升到正常水平，再给予降钙素冲击促进骨质矿化，患者 2 周后病情即获明显缓解，可下床活动。

总之，pSS 不典型病例可能无明显口干、眼干症状，抗 SSA、抗 SSB 抗体亦可能为阴性，及时行组织学活检，在排除其他疾病的前提下，有助于本病的诊断。pSS 肾损害继发骨软化、骨质疏松时，激素使用并非禁忌，在强化钙磷补充的前提下，使用激素不会加重骨病变，反而有助于迅速控制病情发展。

关键词：干燥综合征 肾损害
中图法分类号：R442.8 文献标识码：B

参考文献：

[1] 中华医学会风湿病学分会. 干燥综合征指南(2003 年)[J]. 现代实用医学，2003，15(12)：769 – 771.

[2] 刘英志，张丽君. 原发性干燥综合征的临床首发症状分析[J]. 医学理论与实践，2006，19(8)：903 – 905.

[3] Srinivasan S, Slomovic A R. Sjogren syndrome[J]. Compr Ophthalmol Update, 2007, 8(4): 205 – 212.

（编辑 张 维）