文章编号:1000-5404(2008)06-0543-03

论著

雌激素受体β蛋白及其同分异构体mRNA在女性慢传输性便秘患者乙状结肠壁内的表达

张广军,刘宝华,童卫东 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科,重庆 400042)

摘 要:目的 研究雌激素受体β(estrogen receptor β, ERβ)蛋白及其同分异构体mRNA在女性慢传输性便秘(slow transit constipation, STC)患者乙状结肠的表达。**方法** 采用RT-PCR及Western blot技术检测20例女性STC患者以及20对照组乙状结肠ERβ蛋白及其同分异构mRNA的表达。**结果** $ERβ_1$、$ERβ_2$及$ERβ_5$ mRNA在女性STC患者及对照组乙状结肠均有表达,$ERβ_3$及$ERβ_4$ mRNA在两组中均无表达,STC组$ERβ_1$、$ERβ_2$及$ERβ_5$ mRNA表达量均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。Western blot结果显示STC组乙状结肠ERβ蛋白表达较对照组明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** ERβ与STC的发病有关。

关键词: 慢传输性便秘;雌激素受体β;同分异构体
中图法分类号: R322.45;R394.2;R574.620.2 **文献标识码:** A

Expression of ERβ and its isoform in sigmoid colon of female patients with slow transit constipation

ZHANG Guang-jun, LIU Bao-hua, TONG Wei-dong (Department of General Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of ERβ protein and ERβ isoform mRNA in sigmoid colon of female slow transit constipation patients. Methods RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of ERβ protein and ERβ isoform mRNA of 20 patients with STC and 20 age-matched controls. Results ERβ protein and $ERβ_1$, $ERβ_2$ and $ERβ_5$ mRNA were detected in the two groups lower in STC group than that in control group ($P<0.01$), but $ERβ_3$ and $ERβ_4$ mRNA were not detectable. Conclusion ERβ is involved in genesis of STC.

Key words: slow transit constipation; ERβ; isoform

结肠慢传输性便秘(slow transit constipation, STC)主要为结肠内容物传输缓慢引起,症状顽固,多发于女性[1]。STC病因和发病机制复杂,迄今尚无定论,国内外对STC的研究,主要集中在Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)、肠神经递质及胃肠激素等方面。近年来关于性激素及其受体在STC中的作用受到关注,本研究通过免疫组化研究发现女性STC患者乙状结肠ERβ蛋白表达较正常对照组明显减少,提示ERβ与STC的发病有关[2]。本研究通过RT-PCR及Western blot方法检测女性STC患者乙状结肠ERβ蛋白及其同分异构体mRNA的表达,以便为深入探讨STC的发病机制提供线索。

基金项目: 重庆市自然科学基金(2006BB5114)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(2006BB5114)
作者简介: 张广军,男,山东临沂市人,博士研究生,主要从事胃肠动力学方面的研究。电话:(023)68757950,E-mail:zhanggj1977@126.com
通信作者: 刘宝华,电话:(023)68757951,E-mail:lbh57268@163.com
收稿日期: 2007-11-16;**修回日期:** 2008-01-10

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 实验组 选取我院2005年11月至2007年5月间手术治疗的女性STC患者20例,年龄22~72岁,平均43.95岁。病程2~29年,平均11.2年。所有病例符合罗马Ⅱ标准。主要症状为排便困难、便意消失、大便次数减少及腹胀等,均有长期服用泻剂的病史,包括大黄、番泻叶及果导片等。口服不透X线标志物结肠传输试验显示传输时间均大于96 h。所有患者均行电子结肠镜排除肿瘤,肛肠测压及钡灌肠排除巨结肠,请神经内科会诊排除精神及神经方面疾病。排粪造影或四重造影显示:14例伴直肠黏膜内脱垂,3例伴直肠前突,3例伴盆底痉挛综合征,3例伴盆底疝。电子结肠镜显示3例伴结肠黑便病。所有病例行全结肠切除,回肠-直肠吻合术,其中17例经腹腔镜手术,3例行开腹手术,8例同时行子宫悬吊,1例行直肠前突修补,2例行吻合器痔上黏膜环切除术(procedure for prolapse and hemorrhoids, PPH),2例行直肠黏膜纵行缝合术。

1.1.2 对照组 选取同期手术的直肠癌女性患者20例,其中Dukes A期15例,Dukes B_1期5例,年龄21~70岁,平均45.5岁。无便秘症状及泻剂服用史,无精神及神经异常表现。

1.1.3 标本选取 手术时选取女性 STC 患者乙状结肠作为实验组标本,选取同期手术的直肠癌患者距离癌灶 20 cm 以上的乙状结肠作为对照组标本。标本取出后,剔去肠脂垂,生理盐水洗净肠内容物,切成 2 cm×1 cm 大小,液氮迅速冷却保存待用。

1.2 主要试剂

RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司),Tripure(Roche 公司),所有引物由 Invitrogen 公司合成。兔抗 ERβ 多抗(中杉公司),小鼠抗 β-actin 单抗(Novus 公司),抗兔 IgG-HRP、抗小鼠 IgG-HRP(sigma 公司),PVDF 膜(Dupont 公司),ECL 增强化学发光检测试剂盒(Pierce 公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 RT-PCR 检测 ERβ 同分异构体 mRNA 的表达 按 Tripure 操作说明书提取组织总 RNA,进行逆转录反应合成 cDNA。$ERβ_{1-5}$引物序列如下:①$ERβ_1$引物:正义链 5′-ACCGATGCTTTGGTTTGG-3′;反义链 5′-GGGAGCCCTCTTTGCTTTTA-3′,PCR 产物 274 bp;②$ERβ_2$引物:正义链 5′ -GACAGAGAAGTGCCGACGAG-3′;反义链 5′-GGTCACTGCTCCATCGTTGC-3′,PCR 产物 799 bp;③$ERβ_3$引物:正义链 5′-TCAACAGCCACGGGAATGAG-3′;反义链 5′-CTTTCACCTGTCTTCAACCC-3′,PCR 产物 529 bp;④$ERβ_4$引物:正义链 5′-GTGACC GATGCTTTGGTTTG-3′;反义链 5′-ATCTTTCATTGCCCACATGC-3′,PCR 产物为 314 bp;⑤$ERβ_5$引物:正义链 5′-GGCATCTCCTCCCAGCAGCAAT-3′;反义链 5′-TCCCATCCCAAGCCCAAGCAG-3′,PCR 产物为 117 bp。β-actin 引物:正义链 5′-GGCATGGGTCAGAAGGAT-3′,反义链 5′-ATGTCACGCACGATTTCC-3′,产物为500 bp。PCR 反应条件如下:①$ERβ_1$、$ERβ_2$、$ERβ_5$:94℃预变性 5 min;PCR 循环:94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min。②$ERβ_3$:94 ℃预变性 5 min;PCR 循环:94 ℃ 45 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环,最后 72 ℃延伸5 min。$ERβ_4$:94 ℃预变性 5 min;PCR 循环:94 ℃ 45 s,53 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min。PCR 产物以 1% 或 2% 的琼脂糖凝胶上电泳检测,以 β-actin 作为内参照。

1.3.2 Western blot 检测 ERβ 蛋白表达 RIPA 裂解液裂解组织,制备蛋白样品,加入样品行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后将蛋白转至 PVDF 膜上,封闭液封闭 PVDF 膜,加一抗(1∶200 兔抗 ERβ 多抗,1∶2 000 小鼠抗 β-actin 单抗)及二抗(抗兔 IgG-HRP,抗小鼠 IgG-HRP)行免疫印迹检测,ECL 显色。

1.4 图像分析

RT-PCR 及 Western blot 结果用 Labwork™ Analysis Software 软件分析各条带的累计光密度值,计算各样本 ERβ 累计光密度值与 β-actin 内参的比值,表示 ERβ 蛋白及其同分异构体 mRNA 的相对表达量。

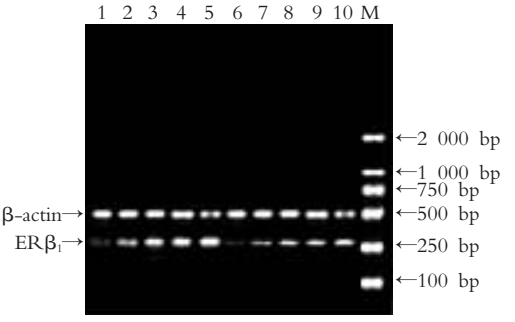
1.5 统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异进行 t 检验。

2 结果

2.1 ERβ 同分异构体 mRNA 表达

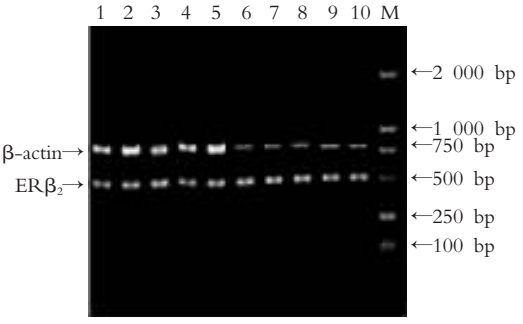
2.1.1 $ERβ_1$ mRNA 表达 RT-PCR 检测表明,$ERβ_1$ mRNA 在 STC 组及对照组均有表达,STC 组表达量较对照组显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)(表 1,图 1)。



M:DNA 标准(DL 2000);1~5:对照组 $ERβ_1$ RT-PCR 产物;6~10:STC 组 $ERβ_1$ RT-PCR 产物;β-actin 为内参照

图 1 $ERβ_1$ RT-PCR 结果

2.1.2 $ERβ_2$ mRNA 表达 RT-PCR 检测表明,$ERβ_2$ mRNA 在 STC 组及对照组均有表达,STC 组表达量较对照组显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)(表 1,图 2)。



M:DNA 标准(DL 2000);1~5:对照组 $ERβ_2$ RT-PCR 产物;6~10:STC 组 $ERβ_2$ RT-PCR 产物;β-actin 为内参照

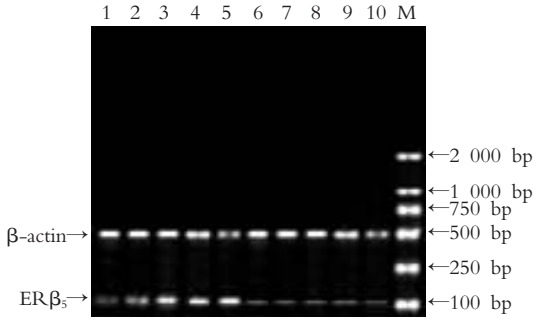
图 2 $ERβ_2$ RT-PCR 结果

表 1 各组 $ERβ_1$ mRNA、$ERβ_2$ mRNA、$ERβ_5$ mRNA 及 ERβ 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	$ERβ_1$mRNA	$ERβ_2$mRNA	$ERβ_5$mRNA	ERβ 蛋白
对照组	0.92±0.31	1.45±0.28	1.01±0.25	0.99±0.24
STC 组	0.58±0.15[a]	0.53±0.16[a]	0.46±0.15[a]	0.51±0.1[a]

a:$P<0.01$,与对照组比较

2.1.3 $ERβ_5$ mRNA 表达 RT-PCR 检测表明,$ERβ_5$ mRNA 在 STC 组及对照组均有表达,STC 组表达量较对照组显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)(表 1,图 3)。

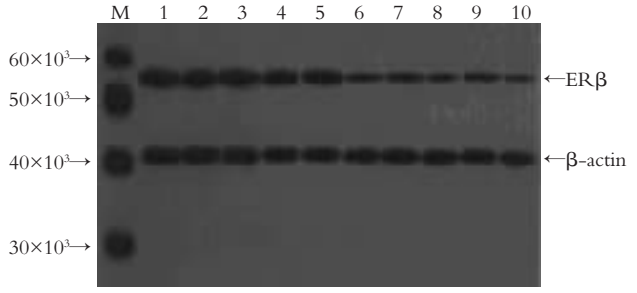


M:DNA 标准(DL 2000);1~5:对照组 $ERβ_5$ RT-PCR 产物;6~10:STC 组 $ERβ_5$ RT-PCR 产物;β-actin 为内参照

图 3 $ERβ_5$ RT-PCR 结果

2.2　ERβ 蛋白表达

Western blot 检测表明,ERβ 蛋白在 STC 组及对照组均有表达,STC 组表达量较对照组显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)(表 1,图 4)。



M:Biotinylated protein ladder;1 ~ 5:正常对照组;6 ~ 10:STC 患者;β-actin 为内参照

图 4　ERβ Western blot 结果

3　讨论

雌激素是最主要的女性激素之一,在人体内,雌激素通过与其特异性受体相结合而发挥重要的生理作用。本研究通过 RT-PCR 及 Western blot 方法检测 ERβ 蛋白及其同分异构体 mRNA 在女性 STC 患者乙状结肠的表达,进一步验证前期的研究结果,并为 STC 的发病原因提供新思路。

ERβ 包括 5 种同分异构体,即 $ERβ_{1\sim5}$。$ERβ_1$、$ERβ_2$、$ERβ_4$及 $ERβ_5$广泛分布于多种组织中,而 $ERβ_3$仅在睾丸中表达[3]。ERβ 异构体 1 ~ 7 外显子为相同序列,其主要区别位于第 8 外显子。ERβ1 是唯一有全部功能的同分异构体,可形成同源二聚体,$ERβ_2$、$ERβ_4$、$ERβ_5$无内在活性,只能和 $ERβ_1$形成异源二聚体启动转录[4]。Foley 等[5]采用 Western blot 的方法显示 ERβ 在正常结肠黏膜组织中有高表达。Moore 等[3]用 RT-PCR 方法在正常人结肠组织中检测到 $ERβ_1$、$ERβ_2$及 $ERβ_5$表达。近来有学者研究显示, ERβ 是结肠内唯一表达的雌激素受体,主要在结肠上皮细胞表达,在众多胃肠道上皮以及非上皮细胞起到重要的调控作用[5]。由于 ERβ 是结肠主要表达的雌激素受体,其表达决定了结肠对雌激素的反应。

近年来,关于性激素受体对肠道动力的影响受到重视,Xiao 等[1]研究证明 STC 患者结肠过度表达孕激素受体,从而导致收缩性 G 蛋白的下调,抑制性 G 蛋白的上调,推测孕激素受体的异常表达可能是 STC 的原因之一。但是关于 ER 对 STC 的作用国内外尚少见报道。我们通过免疫组化研究发现女性 STC 患者乙状结肠 ERβ 蛋白表达较正常对照组明显减少[2]。ERβ 有 5 种同分异构体,具体哪种同分异构体在 STC 患者结肠中有表达,表达情况如何,尚不清楚。

本研究通过 RT-PCR 显示,$ERβ_1$ mRNA、$ERβ_2$ mRNA 及 $ERβ_5$ mRNA 在女性 STC 患者及正常对照组乙状结肠结肠中均有表达,与 Moore 等[3]报道一致,女性 STC 患者乙状结肠 $ERβ_1$、$ERβ_2$及 $ERβ_5$ mRNA 的表达量均低于对照组。同时通过 Western blot 证明 STC 患者结肠 ERβ 蛋白明显低于对照组,进一步验证了我们前期的免疫组化结果。ERβ 是通过什么信号通路影响 STC 的呢? 现已证明 STC 等众多胃肠动力紊乱性疾病都存在 ICC 数目减少[7]。ICC 在失去局部微环境 c-kit 信号刺激后可转化呈现平滑肌样表型转化,表现为 ICC 数目的减少。c-kit 信号通路对 ICC 发育、分化及胃肠道节律性活动的稳定至关重要,是维持 ICC 表型稳定的关键。有研究表明,阻断 ER 可以导致 c-kit mRNA 几乎不表达,因此 ER 参与调控 c-kit 信号通路[8,9]。由此可知,ERβ 及其同分异构体 $ERβ_1$、$ERβ_2$及 $ERβ_5$ mRNA 表达降低可能通过影响 c-kit 信号通路导致 ICC 数目减少,进而导致 STC。

综上所述,STC 患者乙状结肠 ERβ 蛋白及 $ERβ_1$、$ERβ_2$及 $ERβ_5$ mRNA 表达量均较对照组降低,提示 ERβ 与 STC 的发病有关。

参考文献:

[1] Xiao Z L, Pricolo V, Biancani P, *et al*. Role of progesterone signaling in the regulation of G-protein levels in female chronic constipation[J]. Gastroenterology, 2005, 128(3): 667 - 675.

[2] 张　林, 童卫东, 刘宝华. 慢传输型便秘患者乙状结肠雌激素 β 受体分布的免疫组化观察[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1246 - 1248.

[3] Moore J T, McKee D D, Slentz-Kesler K, *et al*. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 247(1): 75 - 78.

[4] Leung Y K, Mak P, Hassan S, *et al*. Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(35): 13162 - 13167.

[5] Foley E F, Jazaeri A A, Shupnik M A, *et al*. Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon[J]. Cancer Res, 2000, 60(2): 245 - 248.

[6] Konstantinopoulos P A, Kominea A, Vandoros G, *et al*. Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation[J]. Eur J Cancer, 2003, 39 (9): 1251 - 1258.

[7] Lyford G L, He C L, Soffer E, *et al*. Pan-colonic decrease in interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation [J]. Gut, 2002, 51 (4): 496 - 501.

[8] Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling[J]. Nature, 2001, 411 (6835): 355 - 365.

[9] 童卫东, 刘宝华, 熊仁平, 等. 慢传输性便秘乙状结肠 c-kit 蛋白和 mRNA 表达[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26 (12): 1052 - 1054.

(编辑　邓强庭)