论著

文章编号:1000-5404(2011)02-0164-05

G蛋白偶联受体在雌激素诱导人甲状腺未分化癌FRO细胞增殖中的作用及其机制

吴婷婷,龙方懿,贾朝莉,刘智敏 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室)

【摘要】 **目的** 探讨G蛋白偶联受体(G-protein coupled receptor,GPER)在雌激素促进人甲状腺未分化癌FRO细胞增殖中的作用及其机制。**方法** 不同浓度(0、10^{-10}、10^{-9}、10^{-8} mol/L)的17β-雌二醇(17β-Estradiol,E2)处理FRO细胞不同时间(0、12、24 h),MTT法检测细胞增殖率;10^{-8} mol/L的E2处理FRO细胞不同时间(0~24 h),流式细胞术检测E2对FRO细胞周期的影响;设计合成针对GPER的小干扰RNA(GPER-siRNA)并转染FRO细胞;Western blot检测FRO细胞中Akt与ERK1/2磷酸化水平与GPER蛋白的表达。**结果** 不同浓度(0、10^{-10}、10^{-9}、10^{-8} mol/L)的E2处理FRO细胞不同时间(0、12、24 h),细胞增殖率随浓度和时间的增加而增加,且10^{-8} mol/L的E2处理24 h后,细胞增殖率为(16.5±2.1)%;10^{-8} mol/L的E2处理FRO细胞不同时间(0、12、24 h),细胞周期$S/G_2/M$期细胞的比例随时间的增加而增加;E2(10^{-8} mol/L)处理FRO细胞不同时间(0、5、10、15、30 min),ERK1/2与Akt的磷酸化水平分别在15 min与10 min达到最大;将GPER-siRNA转染FRO细胞48 h,GPER的蛋白表达显著减少;E2作用于分别加入PD98059(30 μmol/L)、LY294002(50 μmol/L)以及转染GPER-siRNA的FRO细胞15 min和10 min,与E2处理组相比,ERK1/2和Akt的磷酸化水平降低;E2作用于分别加入PD98059、LY294002及转染GPER-siRNA的FRO细胞24 h,与E2处理组相比,增殖率由(16.5±2.1)%降至(11.2±1.3)%、(9.6±1.5)%、(7.2±1.3)%($P<0.05$)。**结论** E2通过GPER激活ERK1/2、PI3K-Akt途径,促进FRO细胞的增殖。

【关键词】 雌激素;甲状腺癌;GPER;ERK1/2;PI3K-Akt

【中图法分类号】 R730.23;R736.1;R977.12 【文献标志码】 A

G-protein coupled receptor improves 17β-Estradiol induced proliferation of human anaplastic thyroid carcinoma FRO cells

Wu Tingting, Long Fangyi, Jia Chaoli, Liu Zhimin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of G-protein coupled receptor (GPER) on 17β-Estradiol (E2) induced proliferation of human anaplastic thyroid carcinoma FRO cells. **Methods** FRO cells were treated with different concentration (0, 10^{-10}, 10^{-9} and 10^{-8} mol/L) of E2 for different time periods (0, 12 and 24 h), and cell growth was evaluated by MTT assay. After the cells were treated by 10^{-8} mol/L E2 for different time periods (0, 12 and 24 h), cell cycle was analyzed by flow cytometry. RNA interference against GPER (GPER-RNAi) was designed and synthesized, then transfected to FRO cells. The levels of phosphorylated ERK1/2, phosphorylated Akt and GPER were analyzed by Western blot analysis. **Results** Treatment with different concentration (0, 10^{-10}, 10^{-9} and 10^{-8} mol/L) of E2 for different times (0, 12 and 24 h), the cell growth rates were increased in dose- and time-dependent manners. When FRO cells were treated with 10^{-8} mol/L E2 for 24 h, the cell growth rate was (16.5±2.1)%. After the cells were treated with 10^{-8} mol/L E2 for different times (0, 12 and 24 h), the percentages of $S/G_2/M$ phase were increased in a time-dependent manner. E2-induced accumulation of phosphorylated ERK1/2 and phosphorylated Akt in FRO cells reached peak at 15 min and 10 min respectively after E2 treatment. The expression of GPER was reduced significantly when GPER-siRNA was transfected to FRO cells for 48 h. Pretreatment with PD98059 (30 μmol/L), LY294002 (50 μmol/L) and GPER-siRNA obliterated the inductive effects of E2 on ERK1/2 phosphorylation and Akt phosphorylation at 15 min and 10 min respectively in FRO cells. Meanwhile pretreatment with PD98059, LY294002 and GPER-siRNA obliterated the inductive effects of E2 on cell growth. and the growth rates were reduced to (11.2±1.3)%, (9.6±1.5)% and (7.2±1.3)% respectively compared with those of E2-treated cells

【通信作者】 刘智敏,E-mail:liuzm9999@yahoo.com.cn

[(16.5 ± 2.1)%, $P < 0.05$]. **Conclusion** E2 can promote proliferation of FRO cells *via* ERK1/2 and PI3K-Akt pathway in a GPER-dependent manner.

[Key words] estrogen; thyroid carcinoma; G-protein coupled receptor; ERK1/2; PI3K-Akt

Corresponding author: Liu Zhimin, E-mail: liuzm9999@yahoo.com.cn

雌激素包括 17β-雌二醇(17β-Estradiol,E2)是一类由卵巢分泌、具有广泛生物学活性的类固醇化合物,对内分泌系统、心血管系统、机体的代谢等生理过程均有作用[1]。E2 的作用机制主要有两方面:一是基因型效应,即 E2 与胞内雌激素受体(estrogen receptor,ER)结合后入核,在细胞核内与靶基因的雌激素反应元件(estrogen response element,ERE)结合后激活其转录;二是非基因型效应,即 E2 与其膜性受体结合后,迅速激活细胞内的第 2 信使系统从而引起相应的生理效应。GPER(以前曾命名为 GPR30)是近年发现的一种新型雌激素膜性受体,1977 年 Pietras 等发现雌激素有快速效应,因而推测可能有膜受体的存在[2]。2005 年 Thomas 等正式提出 GPER 是一种新的雌激素受体[3]。已有研究证明多种组织均表达 GPER,其生理功能包括促进细胞增殖与分化等。甲状腺癌作为一种与雌激素相关的肿瘤,其发生、发展可能与 GPER 的表达水平有关。本研究以人甲状腺未分化癌 FRO 细胞为模型,探讨 E2 对 FRO 细胞增殖的影响以及 GPER 在 E2 诱导细胞增殖中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人甲状腺未分化癌 FRO 细胞株由香港中文大学外科实验室提供,pGenesil-1 质粒购自晶赛公司,胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、RPMI1640 培养液购自 HyClone 公司,RPMI1640 培养基(不含酚红)、E2、PD98059、LY294002、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司,SDS 配胶试剂盒、免疫印迹化学发光剂 ECL 为碧云天生物技术有限公司产品,鼠抗人 β-actin、兔抗人 p-Akt、兔抗人 t-Akt 购自 Santa Cruz 公司,兔抗人 GPER 购自 Abcam 公司,鼠抗人 p-ERK1/2、鼠抗人 t-ERK1/2 购自 Cell signaling 公司,*Hind*Ⅲ、*Bam*HⅠ、*Sal*Ⅰ限制性内切酶购自 TaKaRa 公司,Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,GPER-siRNA 序列由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 细胞培养

人甲状腺未分化癌 FRO 细胞贴壁培养于含 10% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基中,置 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度孵箱常规传代培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 细胞生长测定

取对数生长期的细胞,经胰酶消化后制成单细胞悬液,以 5 000个/孔接种于 96 孔培养板中。待其完全贴壁后,用无血清、无酚红培养液培养 24 h,使细胞同步化。取不同浓度的 E2(0、10^{-10}、10^{-9}、10^{-8} mol/L)处理 FRO 细胞一定时间(0、12、24 h);E2(10^{-8} mol/L)作用于分别加入 PD98059(30 μmol/L)、LY294002(50 μmol/L)以及转染 GPER-siRNA 的 FRO 细胞 24 h,按以上分组方式处理 FRO 细胞后,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl,37 ℃孵育 4 h。吸弃培养液,每孔加入 DMSO 150 μl,于振荡器上振荡 10 min。待紫色结晶完全溶解后,在 490 nm 波长处测定光密度值[D(490)],计算增殖率。实验重复3 次。

1.4 流式细胞仪检测细胞增殖

用 10^{-8} mol/L 的 E2 处理 FRO 细胞 0、12、24 h,PBS 洗涤 2 次,加入 75% 的冰乙醇,4 ℃固定过夜。次日离心收集固定细胞,PBS 洗涤 2 次,用 0.2 ml PBS 将细胞轻轻吹打成单细胞悬液,用 20 μg/ml PI 和 200 mg/ml RNase A 避光染色 30 min,经 200 目尼龙网过滤后,流式细胞仪检测。实验重复 3 次,所得数据经 Quest 软件收集、储存和分析,计算各周期相细胞的百分率。

1.5 GPER-siRNA 的构建和转染

根据 GenBank 中人 GPER mRNA(NM_001039966)全长序列,设计 siRNA 序列,命名为 GPER-siRNA(+),并同时设计阴性对照序列,命名为 GPER-siRNA(-)。GPER-siRNA(+)正义链 5′-GATCCGCATGTACAGCAGCGTCTTCTTCAAGAGAGAAGACGCTGCTGTACATGTTTTTTGTCGACA-3′,反义链 5′-AGCTTGTCGACAAAAAACATGTACAGCAGCGTCTTCTCTCTTGAAGAAGACGCTGCTGTACATGCG-3′;GPER-siRNA(-)正义链 5′-GATCCGTACTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCGGAGTATTTTTTGTCGACA-3′,反义链 5′-AGCTTGTCGACAAAAAATACTCCGAACGTGTCACGTTCTCTTGAAACGTGACACGTTCGGAGTACG-3′。将 siRNA 的单链退火,与 pGenesil-1 质粒连接,转化 DH5α 感受态细胞,挑取单菌落提取质粒,用 Lipofectamine 2000 转染,48 h 后检测 GPER 蛋白表达水平。

1.6 Western blot 检测蛋白表达水平

根据不同实验要求:E2(10^{-8} mol/L)处理 FRO 细胞不同时间(0、5、10、15、30 min);将 GPER-siRNA(+)、GPER-siRNA(-)质粒转染 FRO 细胞 48 h;E2 作用于分别加入 PD98059(30 μmol/L)、LY294002(50 μmol/L)以及转染 GPER-siRNA 的 FRO 细胞 15 min 和 10 min,按以上 3 种分组处理 FRO 细胞后,取总蛋白 50 μg 进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗,4 ℃过夜。TBST 洗膜后加二抗,常温孵育 1 h,TBST 洗膜后,用 ECL 发光法显色,Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像以及 Quantity One 软件分析条带。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验重复 3 次。使用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 E2对人甲状腺未分化癌FRO细胞的促增殖作用

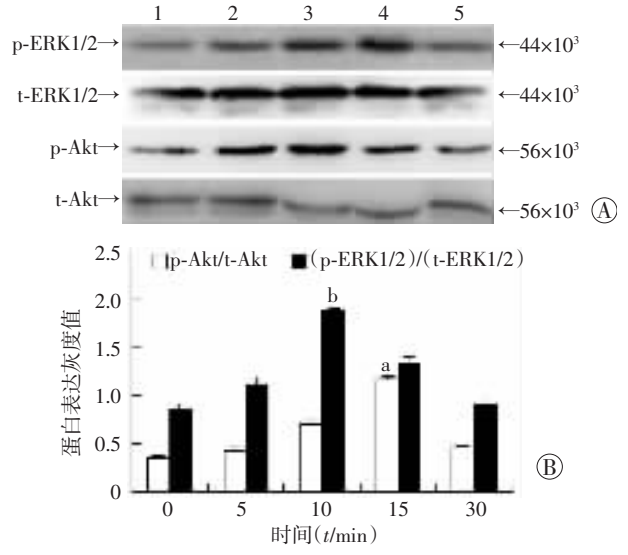
用不同浓度的E2(0、10^{-10}、10^{-9}、10^{-8} mol/L)处理人甲状腺未分化癌FRO细胞24 h,MTT法测得细胞增殖率分别为0、(6.5±1.1)%、(10.7±1.9)%、(16.5±2.1)%。表明E2具有促进人甲状腺未分化癌FRO细胞增殖的作用,且随着浓度的增加,E2的促增殖作用逐渐增强($P<0.05$);当用10^{-8} mol/L的E2处理人未分化甲状腺癌FRO细胞0、12、24 h,细胞的增殖率分别为0、(8.2±2.0)%、(16.5±2.1)%,表明随着处理时间增加,E2对人甲状腺未分化癌FRO细胞的促增殖作用逐渐增强($P<0.05$)。

2.2 E2促进人甲状腺未分化癌FRO细胞G_0/G_1期向$S/G_2/M$期移行

用10^{-8} mol/L的E2处理人甲状腺未分化癌FRO细胞0、12、24 h,G_0/G_1期细胞的比例分别为(78.49±4.32)%、(62.78±4.16)%、(51.44±2.31)%,$S/G_2/M$期细胞的比例分别为(21.51±4.32)%、(37.22±4.16)%、(48.56±2.31)%($P<0.05$)。表明随着E2处理时间的增加,G_0/G_1期细胞的比例逐渐减少,$S/G_2/M$期细胞的比例逐渐增加,说明E2可以促进人甲状腺未分化癌FRO细胞G_0/G_1期向$S/G_2/M$期移行。

2.3 E2促进人甲状腺未分化癌FRO细胞Akt和ERK1/2磷酸化水平增高

用E2处理人甲状腺未分化癌FRO细胞0、5、10、15、30 min,Western blot法检测ERK1/2和Akt的磷酸化水平。结果显示,随着E2处理FRO细胞时间的增加,ERK1/2和Akt的磷酸化水平逐渐增高,在15 min时ERK1/2的磷酸化水平达到峰值,随后降低,而Akt的磷酸化水平在10 min达到峰值(图1),表明E2在短时间内可促进FRO细胞Akt和ERK1/2磷酸化水平增高。

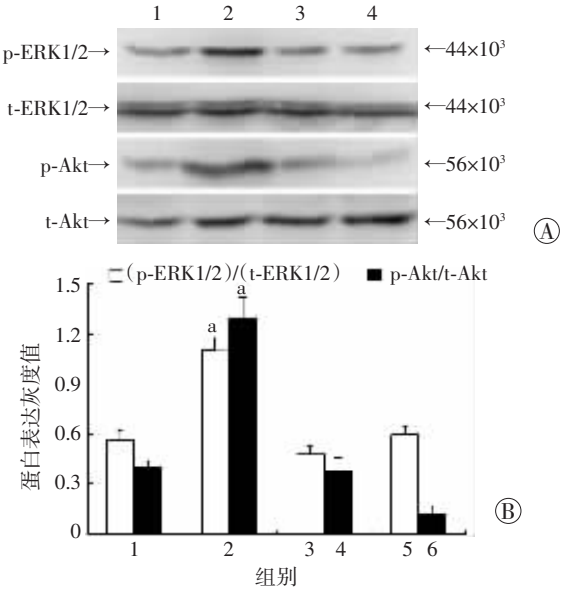


A:定性分析 1:0 min 2:5 min 3:10 min 4:15 min 5:30 min;B:定量分析 a $P<0.05$,与0 min时(p-ERK1/2)/(t-ERK1/2)的值比较 b $P<0.05$,与0 min时p-Akt/t-Akt的值比较

图1 Western blot检测E2处理不同时间对FRO细胞ERK1/2和Akt蛋白磷酸化水平的影响

2.4 E2促进人甲状腺未分化癌FRO细胞增殖与ERK1/2和Akt磷酸化水平增高有关

E2处理FRO细胞15 min和10 min,与对照组相比,ERK1/2和Akt的磷酸化水平增高,E2处理FRO细胞24 h后,细胞增殖明显($P<0.05$);PD98059、LY294002分别与E2共同作用FRO细胞15 min和10 min,与E2处理组相比,ERK1/2和Akt的磷酸化水平显著降低,PD98059、LY294002分别与E2共同作用FRO细胞24 h后,细胞的增殖水平下降,增殖率由(16.5±2.1)%分别降至(11.2±1.3)%、(9.6±1.5)%($P<0.05$)(图2),说明E2促进人甲状腺未分化癌FRO细胞增殖与ERK1/2和Akt磷酸化水平增高有关。



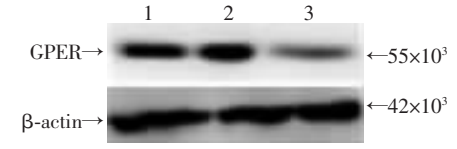
A:定性分析 1:对照组 2:E2处理组 3:PD98059处理组 4:E2+PD98059处理组;B:定量分析 1:对照组 2:E2处理组 3:PD98059处理组 4:LY294002处理组 5:E2+PD98059处理组 6:E2+LY294002处理组 a $P<0.05$,与1、5、6比较

图2 Western blot检测E2、PD98059、LY294002对FRO细胞ERK1/2和Akt蛋白磷酸化水平的影响

2.5 E2促进人甲状腺未分化癌FRO细胞Akt、ERK1/2的磷酸化水平增高与GPER有关

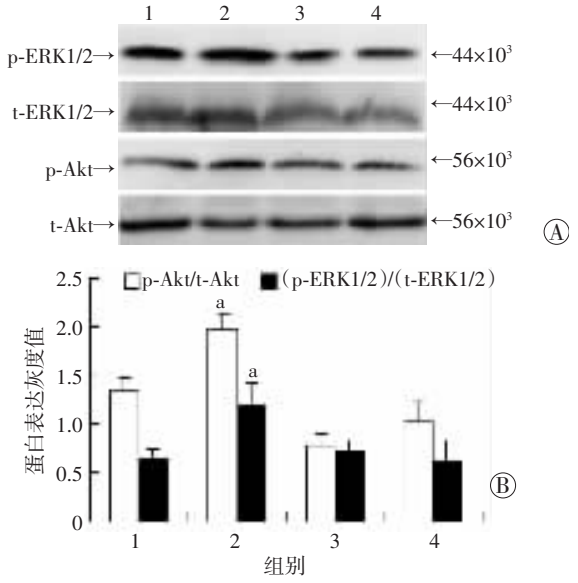
将GPER-siRNA(+)、GPER-siRNA(-)质粒转染FRO细胞48 h,Western blot检测GPER蛋白表达水平。对照组、GPER-siRNA(-)组、GPER-siRNA(+)组中,GPER的蛋白表达灰度值分别为0.51±0.05、0.48±0.04、0.12±0.03。与对照组相比,GPER-siRNA(+)可有效抑制GPER蛋白表达($P<0.05$);而GPER-siRNA(-)处理后GPER蛋白表达水平无明显改变($P>0.05$)(图3)。说明GPER-siRNA(+)可以有效抑制GPER蛋白表达,保证后续实验的进行。

E2分别作用转染GPER-siRNA(+)的FRO细胞15 min和10 min,与E2处理组相比,ERK1/2和Akt的磷酸化水平降低($P<0.05$);转染GPER-siRNA(+)的FRO细胞与对照组相比,ERK1/2和Akt的磷酸化水平无明显变化($P>0.05$)(图4)。说明E2促进人甲状腺未分化癌FRO细胞Akt、ERK1/2的磷酸化水平增高与GPER有关。



1:对照组 2:GPER-siRNA(-)组 3:GPER-siRNA(+)组

图 3　Western blot 检测各组 FRO 细胞 GPER 蛋白的表达



1:对照组 2:E2 处理组 3:GPER-siRNA(+)组 4:E2 + GPER-siRNA(+)组;A:定性分析;B:定量分析　a:$P < 0.05$,与对照组及 E2 + GPER-siRNA(+)组比较

图 4　Western blot 检测各组 FRO 细胞 p-ERK1/2、p-Akt 蛋白在 FRO 细胞中的表达

2.6　E2 促进 FRO 细胞增殖与 GPER 有关

进一步探讨 E2 的促增殖作用与 GPER 的关系,结果显示,E2 处理组与对照组相比,细胞增殖明显,增殖率为(16.5 ± 2.1)%($P < 0.05$);E2 作用转染 GPER-siRNA(+)的 FRO 细胞 24 h,与 E2 处理组相比,增殖率由(16.5 ± 2.1)% 降至(7.2 ± 1.3)%,细胞的增殖水平下降;转染 GPER-siRNA(+)的 FRO 细胞与对照组相比,细胞增殖无明显差异($P > 0.05$)。说明 E2 促进 FRO 细胞增殖与 GPER 有关。

3　讨论

甲状腺癌是一种与雌激素相关的内分泌系统肿瘤。体外实验表明 E2 可促进甲状腺乳头状癌 NPA87、KAT5 细胞和滤泡状癌 WRO 细胞增殖[4]。以往的研究认为 E2 的促增殖机制与雌激素受体有关,E2 通过与 ER 结合后入核,激活 c-fos、c-myc 等癌基因转录,促进细胞增殖。GPER 的发现,使人们对雌激素受体有了新的认识。E2 与 GPER 结合后,可通过活化第 2 信使,调节非基因依赖的快反应信号途径[5]。

本研究对 GPER 在 E2 促进 FRO 细胞增殖中的作用机制进行探讨,发现 E2 促进 FRO 细胞的增殖随浓度的增加而增加;在同一浓度下,随着处理时间的增加而增加,表明 E2 呈剂量和时间依赖性地促进 FRO 细胞增殖;同时,E2 可以改变 FRO 细胞的周期相分布,随着作用时间的延长,G_0/G_1 期细胞比例减少,$S/G_2/M$ 期比例增加,即静止期细胞减少,更多的细胞进入复制和分裂期,提示 E2 可通过作用特定的周期相关蛋白来改变 FRO 的细胞周期分布,从而促进 FRO 细胞增殖。

GPER 是 G 蛋白偶联受体家族的一员,已证明细胞质膜、高尔基体膜、内质网膜上均可检测到 GPER 的表达[6]。研究表明,E2 可以促进 GPER 表达阳性的乳腺癌 MCF-7、SKBR3 细胞 ERK1/2、Akt 的磷酸化水平增加,对 GPER 表达阴性的 MDA-MB-231 细胞无此作用,但是将 GPER 转入 MDA-MB-231 细胞后,可恢复 E2 对 ERK1/2、Akt 的活化,说明 E2 促进乳腺癌 MCF-7、SKBR3 细胞 Akt、ERK1/2 的磷酸化水平增高与 GPER 有关[7]。本研究发现,人甲状腺未分化癌 FRO 细胞 GPER 表达阳性,随着 E2 作用时间的增加,FRO 细胞 ERK1/2 和 Akt 的磷酸化水平呈现先增高后逐渐降低至处理前水平的变化趋势,同时 PD98059(ERK1/2 抑制剂)、LY294002(Akt 抑制剂)、GPER-siRNA(+)可抑制 E2 对 ERK1/2、Akt 的磷酸化,说明 E2 通过 GPER 活化 ERK1/2、PI3K-Akt 途径。近期研究显示,E2 与 GPER 作用的机制可能是,E2 与 GPER 结合后,活化 G 蛋白,诱导细胞表面的类肝素结合的表皮生长因子(HB-EGF)释放,使表皮生长因子受体(EGFR)二聚化,从而激活 ERK1/2、PI3K-Akt 途径[8-9]。

研究表明,卵巢癌和乳腺癌病人的低生存率与 GPER 的高表达有关[10-11]。在乳腺癌 SKBR3(ER^-, $GPER^+$)细胞、皮肤角质细胞中,E2 通过 GPER 诱导 c-fos、cyclinD 等原癌基因表达,促进细胞增殖[12-13]。本实验证明 E2 可以通过 GPER,促进人甲状腺未分化癌 FRO 细胞 ERK1/2、Akt 的磷酸化水平增加,同时,已有研究证明磷酸化的 ERK1/2 可与其他核转录因子结合,激活 c-myc、CREB、c-fos 等,促进细胞增殖;磷酸化的 Akt 能激活 CDK4 和 CDK2,使细胞进入 S 期,并诱导 DNA 合成,促进细胞增殖。因此推测,E2 促进 FRO 细胞增殖可能与 GPER 介导的 Akt、ERK1/2 的磷酸化水平增加有关。本研究结果显示,PD98059、LY294002、GPER-siRNA 均可抑制 E2 诱导的 FRO 细胞增殖,增殖率由(16.5 ± 2.1)% 分别降至(11.2 ± 1.3)%、(9.6 ± 1.5)%、(7.2 ± 1.3)%,表明 E2 通过 GPER 激活 ERK1/2、PI3K-Akt 通路,促进 FRO 细胞增殖。但是,对于 GPER 的促增殖作用,也有研究发现 GPER 可通过活化 ERK1/2、上调 p21 的表达,抑制前列腺癌细胞的增殖[14];此外,GPER 的特异性激动剂 G1 作用于小鼠粗线期精母细胞,可通过上调促凋亡基因 Bax 的表达,促进细胞凋亡[15]。因此,GPER 对细胞增殖的作用可能与细胞种类不同以及相同信号通路作

用不同的靶基因有关。

综上所述，E2通过GPER，促进人甲状腺未分化癌FRO细胞Akt、ERK1/2的磷酸化水平增高，诱导FRO细胞增殖。因此，对于甲状腺癌等雌激素相关内分泌系统肿瘤的治疗，尤其是ER阴性，GPER阳性的病例，GPER蛋白的研究对疾病的发生、发展，患者的个体化治疗和预后均具有重要意义。

参考文献：

[1] 欧文君，姚珍薇，骆建云，等. 雌激素受体2基因多态性与绝经后女性骨密度的相关性研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(1)：81－84.

[2] Pietras R J, Szego C M. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells[J]. Nature, 1977, 265(5589): 69－72.

[3] 张吉强，蔡文琴. 脑内雌激素受体的研究进展[J]. 局解手术学杂志，2009，18(1)：1－2.

[4] Kumar A, Klinge C M, Goldstein R E. Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors alpha and beta[J]. Int J Oncol, 2010, 36(5): 1067－1080.

[5] Revankar C M, Cimino D F, Sklar L A, *et al*. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling[J]. Science, 2005, 307(5715): 1625－1630.

[6] Filardo E, Quinn J, Pang Y, *et al*. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane[J]. Endocrinology, 2007, 148(7): 3236－3245.

[7] Filardo E J, Quinn J A, Bland K I, *et al*. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs *via* trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(10): 1649－1660.

[8] Filardo E J, Quinn J A, Frackelton A R Jr, *et al*. Estrogen action *via* the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis[J]. Mol Endocrinol, 2002, 16(1): 70－84.

[9] Filardo E J. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen *via* the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002, 80(2): 231－238.

[10] Smith H O, Arias-Pulido H, Kuo D Y, *et al*. GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2009, 114(3): 465－471.

[11] Filardo E J, Graeber C T, Quinn J A, *et al*. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(21): 6359－6366.

[12] Kanda N, Watanabe S. 17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression[J]. J Invest Dermatol, 2004, 123(2): 319－328.

[13] Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, *et al*. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(26): 27008－27016.

[14] Chan Q K, Lam H M, Ng C F, *et al*. Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G(2) cell-cycle arrest[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(9): 1511－1523.

[15] Chimento A, Sirianni R, Delalande C, *et al*. 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 320(1/2): 136－144.

（收稿：2010-08-04 修回：2010-09-26）

（编辑　汪勤俭）

（上接159页）

入路辅以鼻内镜检查后，大局感强，有利于彻底消融鼻后孔及咽鼓管圆枕周围的腺样体[7]，特别有利于保护咽鼓管咽口结构，术后并发症少，微创效果好。本组2岁患儿也成功手术，避免了经鼻鼻内镜电动负压切割切除、鼻内镜辅助经鼻腔等离子消融术需患者鼻腔宽敞的限制，当然也不会造成鼻腔并发症。且术中配合使用低温等离子，残余腺样体经消融后可做到基本无出血，术野干净[8]。腺样体等离子消融术后患儿鼻塞、张口呼吸、打鼾症状消失说明腺样体肥大是引起阻塞的主要因素[9]。一直以来腺样体肥大被认为是引起分泌性中耳炎的重要原因：①因为咽鼓管的机械性阻塞或功能障碍所致，增生肥大的腺样体压迫、阻塞咽鼓管咽口，导致咽鼓管和中耳腔引流障碍；②腺样体还可以释放炎性递质，如前列腺素、组胺等增加血管的通透性，引起咽鼓管和中耳黏膜水肿。所以治疗分泌性中耳炎首先需要处理肥大的腺样体[4,10]。本组病例中伴发分泌性中耳炎的5例患者在手术后听力改善证明了腺样体肥大是造成分泌性中耳炎的重要原因。综上所述，鼻内镜辅助经口腔腺样体等离子消融术不失为具备条件的医院切除腺样体手术的首选术式。

参考文献：

[1] 郑灵，潘明金，王红伟，等. 低温等离子手术治疗儿童鼾症20例[J]. 重庆医学，2008，37(20)：2281－2282.

[2] Havas T, Lowinger D. Obstructive adenoid tissue: an indication for powered-shaver adenoidectomy[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2002, 128(7): 789－791.

[3] 李树华，石洪金，董卫东，等. 传统腺样体切除术后腺样体残留情况调查[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志，2006，41(2)：138－139.

[4] 喻妮，韩红蕾，刘剑锋，等. 鼻内镜腺样体切除术治疗分泌性中耳炎[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志，2007，15(1)：20－22.

[5] Valera F C, Avelino M A, Pettermann M B, *et al*. OSAS in children: correlation between endoscopic and polysomnographic findings[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2005, 132(2): 268－272.

[6] 黄建聪，杨钦泰，张革化，等. 内镜下儿童腺样体切除3种不同术式的疗效和优越性评价[J]. 中国内镜杂志，2009，15(7)：700－703.

[7] 张继东，张扬，李宏伟，等. 鼻内镜下腺样体吸切术对咽鼓管周围组织的处理[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科，2009，16(9)：510－512.

[8] 陈钢，吴慧莉，孙汝山，等. 经鼻和口进路腺样体切除术出血分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志，2009，23(14)：652－654.

[9] 牟基伟，姚雅芬，张爱华，等. 鼻内镜下扁桃体腺样体联合摘除术治疗小儿阻塞性睡眠呼吸暂停通气综合征62例分析[J]. 中国内镜杂志，2009，15(8)：881－882.

[10] 陈伟南，杨海涕，陈秋坚，等. 耳内镜下鼓膜置管联合腺样体切除术治疗儿童分泌性中耳炎[J]. 中华耳科学杂志，2010，8(2)：200－202.

（收稿：2010-08-10 修回：2010-11-01）

（编辑　吴培红）