基础研究 文章编号：0253-3626(2009)03-0273-04

雌激素受体 α、β 亚型在多囊卵巢综合征大鼠子宫内膜中的表达及意义

艾 芳，丘 彦
（重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨雌激素受体 α、β 亚型（Estorgen receptor α、Estrogen receptor β，ERα、ERβ）在多囊卵巢综合征（Polycystic ovary syndraome，PCOS）大鼠子宫内膜中的表达。方法：应用脱氢表雄酮（Dehydroepiandrosterone，DHEA）联合胰岛素构建 PCOS 大鼠模型（30 只）；采用放射免疫法测定大鼠血清性激素水平；免疫组化和 RT-PCR 技术检测 ERα、ERβ 蛋白及 mRNA 在 PCOS 大鼠和正常大鼠子宫内膜上的表达。结果：PCOS 大鼠子宫内膜 ERα 蛋白的表达高于对照组（$P<0.01$）；ERβ 蛋白的表达两组无明显差异（$P>0.05$）；RT-PCR 检测显示 ERα、ERβ mRNA 在子宫内膜中的表达与免疫组化结果一致。结论：ERα 在 PCOS 大鼠子宫内膜中的表达增高。

【关键词】雌激素受体 α；雌激素受体 β；多囊卵巢综合征；子宫内膜
【中国图书分类法分类号】R332 【文献识别码】A 【收稿日期】2008-07-21

Expression and significance of estrogen receptor α and β in endometrium of rats with polycystic ovary syndrome

AI Fang, et al
(*Center of Assisted Reproduction, the First Affiliated Hospitial, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To determine the expression of estrogen receptor α and estrogen receptor β (ERα, ERβ) in the endometrium of rats with polycystic ovary syndrome(PCOS). *Methods*: PCOS model was made by dehydroepiandrosterone (DHEA) and insuline (n=30). The serum hormone levels were examined by radioimmunoassay. The expression of the mRNA and protein of ERα and ERβ in endometrium of two groups were observed by using reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)and immunohistochemistry. *Results*: The expression of protein of ERα in PCOS group in endometrium was significantly higher than those in the control group($P<0.01$); whereas, the expression of protein of ERβ in endometrium was not significantly different between the two groups($P>0.05$). RT-PCR analysis showed the same expression of ERα mRNA and ERβ mRNA in endometrium as immunohistochemistry. *Conclusion*: ERα in endometrium of PCOS rats is expressed excessively.

【Key words】Estrogen receptor α; Estrogen receptor β; Polycystic ovary syndrome; Endometrium

多囊卵巢综合征(Polycystic ovary syndrome, PCOS)是育龄妇女常见的内分泌疾病，以持续性排卵障碍、不孕为特征。异常的内分泌改变使子宫内膜分化不良，影响胚胎植入，导致低妊娠率和高流产率；此外，还影响子宫内膜正常的周期性变化，导致子宫内膜可能有不同程度的增生，发展为子宫内膜癌的风险也增加。子宫是雌激素作用的重要靶器官，雌激素受体(Estrogen receptor, ER)是雌激素发挥作用的重要枢纽[1]，ER 有 ERα、ERβ 两种亚型，它们在组织中的分布和表达不尽相同，具有不同的生理、病理作用[2,3]和相反的基因转录调节功能[4,5]。ERα、ERβ 表达的正常与否和子宫的生理功能及病理变化密切相关。目前有关 ER 亚型在 PCOS 的表达与子宫内膜病变相关性的研究甚少。本研究通过构建 PCOS 大鼠模型，对 ERα、ERβ 在 PCOS 大鼠和正常大鼠子宫内膜上的表达强度进行对照研究，探讨 ERα、ERβ 在多囊卵巢综合征子宫内膜病变中的作用。

作者介绍：艾 芳(1983-)，女，硕士，
研究方向：生殖内分泌。
通讯作者：丘 彦，女，教授，E-mail:cqartq@163.com。
基金项目：重庆市科委自然科学基金项目(CSTC,2005AC0051)。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立

42 d 龄雌性 SD 大鼠（重庆医科大学动物中心提供）50

只，体重 180～200 g，随机分为模型组（30 只）和对照组（20 只）。模型组采用 DHEA 联合胰岛素（诺和灵 N）的方法[6]构建 PCOS 模型：大鼠于 42 d 龄时开始颈背部皮下注射 DHEA 3 mg/（100 g·d）+0.2 ml 注射用油剂，腹部皮下注射胰岛素 2 IU/d；对照组于 42 d 龄开始颈背部皮下注射注射用油剂 0.2 ml。两组均连续注射 28 d 停药，模型组大鼠阴道涂片检查 10 d，阴道上皮无周期性变化后 20 只用于实验室检查，余 10 只仍每日阴道涂片，以观察 PCOS 模型的稳定性。

1.2 动物取材及实验室检查

模型组和处于动情间期的对照组取血，放射免疫法测血清雄激素（Androgen，T）、雌二醇（Estrogen，E_2）、孕激素（Priges-tigeb，P）、卵泡刺激素（Follicule-sfimulating hormone，FSH）、黄体生成素（Luteotropic hormone，LH）、空腹血糖（Fasting blood-glu-cose，FPG，FPG）、空腹血胰岛素（Fasting blood-insulin，FINS）。取血后处死大鼠，取双侧卵巢及一侧子宫角用 4%多聚甲醛固定，常规石蜡包埋切片，分别进行 HE 染色病理组织学分析及免疫组织化学检测；取另一侧子宫角，迅速刮取子宫内膜置于液氮中冻存用于 RT-PCR 检测。

1.3 免疫组化半定量分析大鼠子宫内膜 ERα、ERβ 的蛋白表达

石蜡切片脱蜡至水后行 S-P 法免疫组化染色，兔多抗 ERα、兔多抗 ERβ（北京博奥森）效价均为 1∶50。具体步骤按试剂盒（北京中衫）说明进行。免疫组化结果分析采用北航图像中心研制的真彩色病理图像分析系统 4.0 软件，每个标本选 3 张切片，每张切片随机选 5 个含有子宫内膜腺体的视野（×400 倍），测定面积积分光密度值（Area integral optical density，AIOD），用阳性积分光密度值/μm^2 表示。

1.4 RT-PCR 方法检测大鼠子宫内膜 ERα、ERβ 的 mRNA 表达

按 Trizol 试剂盒（美国 Invitrogen 公司）说明书提取子宫内膜总 RNA。引物序列 ERα：上游 5'-CTGCCAAGGAGACTC GCTAC-3'，下游 5'-AAGTGCCCATTTCATTTCG-3'，产物长 315bp；ERβ：上游 5'-TTGTGCCAGCCCTGTTACTA-3'，下游 5'-TACGCCGGTTCTTGTCTAT-3'，产物长 201 bp；内参 β actin：上游 5'-GACCCAGATCATGTTTGAGACC-3'，下游 5'-GCAGTA ATCTCCTTCTGCATCC-3'，产物长 600 bp。扩增条件为 ERα：94℃3 min；94℃30 s，54℃30 s，72℃5 s，32 循环后 72℃5 min；ERβ：94℃3 min；94℃30 s，58℃30 s，72℃50 s，38 循环后 72℃5 min；β-actin：94℃3 min；94℃变性 30 s，54℃30s，72℃ 50 s，28 循环后 72℃5 min。扩增产物于 1.5%琼脂糖凝胶中电泳，凝胶成像分析系统下扫描分析。

1.5 统计学处理

所有数据用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，统计学处理采用 SPSS 11.0 软件分析，组间比较采用 t 检验，$P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结 果

2.1 动情周期变化

对照组大鼠动情周期规律出现；模型组大鼠药物注射 28 d 后连续阴道涂片显示无规律动情周期，见大量白细胞，偶见少量角化细胞，持续处于动情间期，提示无排卵；用于观察模型稳定性的 10 只 PCOS 大鼠停药后 30 d 均未恢复规律动情周期。

2.2 血清性激素水平及血胰岛素变化

模型组血清 T 水平显著高于对照组（$P<0.01$），LH、LH/FSH 的比值显著高于对照组（$P<0.01$），P 水平显著低于对照组（$P<0.01$），FSH 与对照组相比较无显著性差异（$P>0.05$），E_2 略高于对照组，但差异无显著性（$P>0.05$）；模型组 FINS、FPG 显著高于对照组（$P<0.01$）（表 1）。

2.3 卵巢的形态学变化

对照组大鼠卵巢色泽红，表面光滑；镜下可见黄体及不同发育阶段的卵泡，卵母细胞清晰，颗粒细胞层数多（6~10 层），排列紧密。模型组大鼠卵巢体积增大，表面呈囊性，色灰白；镜下见多个扩张的囊泡，闭锁卵泡常见，囊泡内卵母细胞或放射冠消失，颗粒细胞层数减少（2~3 层），排列疏松，极少见黄体形成（图 1）。

2.4 免疫组化结果

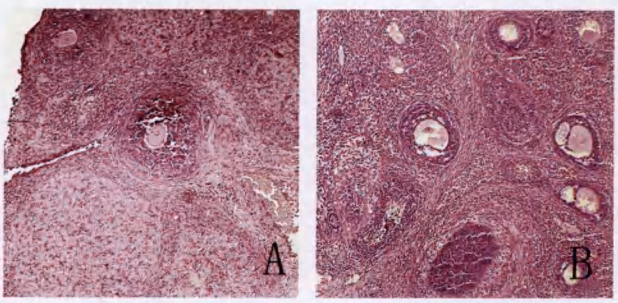
子宫中 ERα、ERβ 的分布相似。ERα 在子宫内膜腺上皮细胞、内膜腔上皮细胞、内膜间质细胞和平滑肌细胞上均有表达，以内膜腺上皮细胞表达最强，细胞核的表达强于细胞质。ERβ 主要在内膜腺上皮细胞表达，部分表达在腔上皮细胞和平滑肌细胞上，细胞核的表达强于细胞质（图 2）。ERα 和 ERβ 蛋白表达分析：模型组子宫内膜 ERα 蛋白表达高于对照组（$P<0.01$）；两组大鼠子宫内膜的 ERβ 蛋白表达无明显差异（$P>0.05$）（表 2）。

表 1 血清激素值及 FPG、FINS 的比较（$\bar{x}\pm s$）

组别＼项目	T（ng/ml）	E_2（pg/ml）	P（ng/ml）	LH（IU/L）	FSH（IU/L）	LH/FSH	FINS（IU/L）	FPG（mmol/L）
对照组	均<0.10	30.76±5.75	33.40±5.91	0.83±0.21	1.01±0.31	0.92±0.32	14.32±1.60	3.73±0.26
模型组	3.04±0.78	33.17±6.68	11.78±2.41	1.58±0.29	0.86±0.29	1.68±0.43	41.80±5.41	4.09±0.24
P 值	<0.01	>0.05	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

2.5 RT-PCR 结果

ERα、ERβ 在两组大鼠的子宫内膜中均有表达，ERαmRNA 表达强烈，而 ERβmRNA 表达较弱（图 3）。模型组子宫内膜 ERαmRNA 的表达明显强于对照组（$P<0.01$），而两组在 ERβmRNA 的表达上无明显差异（$P>0.05$）（表 3）。



A.对照组　　B.模型组

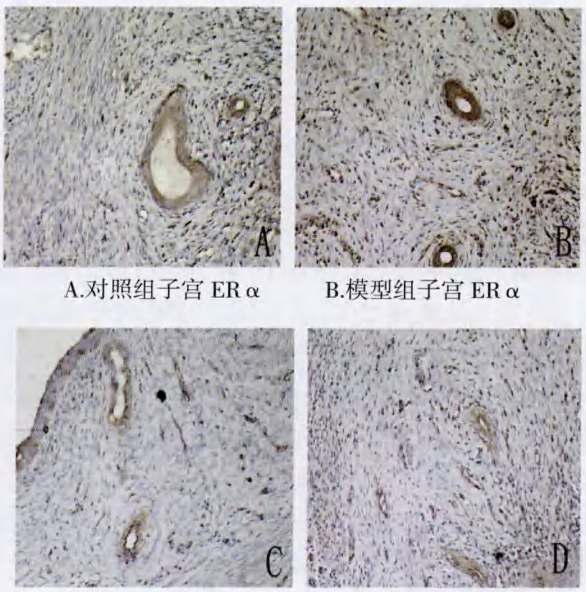
图 1　各组大鼠卵巢组织 HE 染色切片（×200）

表 2　两组大鼠子宫内膜 ERα、ERβ 染色 AIOD 值的比较（$\bar{x}\pm s$）

组别\项目	例数	ERα 的 AIOD 值	ERβ 的 AIOD 值
对照组	20	0.32 ± 0.04	0.12 ± 0.02
模型组	20	0.46 ± 0.05	0.13 ± 0.02
P 值	—	<0.01	>0.05

表 3　两组大鼠子宫内膜 ERα、ERβmRNA 表达的比较（$\bar{x}\pm s$）

组别\项目	例数	ERα mRNA	ERβ mRNA
对照组	20	0.84 ± 0.15	0.20 ± 0.04
模型组	20	1.13 ± 0.14	0.21 ± 0.05
P 值	—	<0.01	>0.05



A.对照组子宫 ERα　　B.模型组子宫 ERα

C.对照组子宫 ERβ　　D.模型组子宫 ERβ

图 2　各组大鼠子宫 ERα、ERβ 免疫组化染色（×400）



1、2.对照组子宫内膜 ERα；3、4.模型组子宫内膜 ERα；5、6.对照组子宫内膜 ERβ；7、8.模型组子宫内膜 ERβ

图 3　各组大鼠子宫内膜 ERα、ERβ 产物凝胶成像电泳图

3　讨　论

3.1　DHEA 联合 INS 诱导 PCOS 大鼠模型的评价

单纯使用 DHEA 造模是目前常用的方法，但 DHEA 构建的动物模型血清 LH 水平降低[7]，而临床上约有 60% 的 PCOS 患者存在高 LH 血症，95% 的患者存在 LH/FSH 升高，故该研究中采用 DHEA 联合胰岛素法构建 PCOS 模型。胰岛素能刺激卵巢卵泡膜细胞和间质细胞合成雄激素，降低血中性激素结合蛋白，增加雄激素浓度，利用胰岛素刺激卵泡膜细胞和间质细胞增加 LH 受体的作用，提高 LH 水平[8]，使动物模型在性激素水平上更符合人 PCOS 的病理特征，且可能更有效的构建出胰岛素抵抗的病理改变。

本研究构建的 PCOS 模型大鼠卵巢体积增大，表面呈囊性扩张；镜下见多个扩张的囊泡，囊泡内卵母细胞或放射冠消失，颗粒细胞层数减少（2~3 层），极少有黄体形成；与正常大鼠相比较，PCOS 大鼠血清 T、LH、LH/FSH 比值增高，P 水平较低；PCOS 大鼠 E2 略高于正常大鼠，但无显著性差异；此外，PCOS 大鼠的 FPG、FINS 高于对照组。因此，本研究构建的 PCOS 模型与 PCOS 的病理特征相符。

3.2　雌激素受体亚型在 PCOS 模型大鼠子宫内膜的异常表达

ER 属于核受体超家族成员，是激素调节的转录因子。ER 有 ERα、ERβ 两种亚型，它们在组织中的分布和表达不尽相同，从而产生不同的生理和病理作用。本研究中免疫组化和 RT-PCR 检测结果表明大鼠子宫内膜中的 ERα、ERβ 在分布和表达上有明显差别，ERα 表达强烈，而 ERβ 表达微弱，提示ERα 是子宫的优势受体，雌激素主要通过 ERα 发挥作用。

雌激素对 ER 有上调作用,而孕激素对 ER 则起到下调作用,内分泌的紊乱影响性激素对 ER 的调节,影响 ER 的正常表达。Quezada 等[9]采用免疫组化和 RT-PCR 等技术对 8 例 PCOS 患者子宫内膜中 ERα、ERβ 的表达水平进行检测,发现 PCOS 患者子宫内膜中的 ERαmRNA 及蛋白质表达均较正常妇女增高,ERβ 的表达较无显著变化,提示 PCOS 内膜对雌激素刺激的敏感性增加,推测 PCOS 内膜受到长期雌激素的单一刺激而无孕激素的对抗,可能是造成 ERα 表达增加的原因之一。PCOS 患者由于排卵障碍,血清 E_2 理论上较低,但 PCOS 患者雌激素的长期持续作用使 ERα 的基因转录处于激活状态导致 ERα 表达的升高[9~11]。本研究结果显示,PCOS 大鼠子宫内膜 ERα 的表达高于正常大鼠,这种变化在蛋白和 mRNA 水平是一致的;PCOS 大鼠的血清 E_2 水平较正常组略高,这可能是由一部分外源性雄激素转化而来,E_2 水平的增高及长期雌激素的刺激可能引起 ERα 表达的增高。

雌激素是 ER 的天然配体,然而除了雌激素以外,ER 还能被其他配体激活而发挥生物学效应。Okon 等[12]对 10 例自发性流产的 PCOS 患者血清 T 水平及子宫功能相关性蛋白进行检测,发现 T 水平高的患者有子宫内膜增生或分泌不良的表现,提出 T 除可以与内膜上的自身受体结合外,还可以与 ER 结合,影响子宫内膜增生和分泌。本研究构建的 PCOS 大鼠的血清 T 显著增高,ERα 的表达也增加,可能会导致 T 与 ERα 之间的交叉作用增强。子宫作为性激素作用的最大靶器官,雌激素和雄激素作用同时加强,可能对子宫尤其是内膜的正常发育和分化产生不利影响。

ERα、ERβ 在子宫内膜功能层中的表达随着月经周期变化而有所不同,在增生晚期和分泌早期表达最高,分泌中晚期表达开始下降。分泌中期子宫内膜中 ER 表达的下调是子宫内膜呈可容受状态的重要调节因素。Gregory [11]检测了 49 例不孕患者分泌期的子宫内膜,发现 ERα 较正常妇女增高,与子宫容受性有关的整合素蛋白 αvβ3 却下降,推测 ERα 在胚胎着床期的持续高水平表达会抑制整合素蛋白 αvβ3 的表达,增加子宫内膜对雌激素的敏感性,降低子宫内膜容受性,从而影响胚胎着床。另外,激素内环境的紊乱和激素受体表达的异常影响胚胎的正常发育,导致流产。Bozdogan [13]对 48 例子宫内膜增生或患子宫内膜癌的妇女内膜 ERα 进行检测,发现 ERα 水平明显增高,提出 ERα 表达增高与子宫内膜增生、子宫内膜癌的发病密切相关。综上所述,ERα 的表达异常和 ERα/ERβ 的比例失调与PCOS 患者月经失调、不孕甚至患激素依赖性肿瘤相关。

本研究构建的 PCOS 大鼠模型与人 PCOS 的病理特征相符,实验结果显示 PCOS 大鼠子宫内膜 ERα 的表达改变,可能有助于今后 PCOS 基础和临床的深入探讨。

参 考 文 献

[1] Brodowska A, Laszczynska M, Starczewski A, et al. The localization of estrogen receptor alpha and its function in the ovaries of postmenopausal women[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2007, 45(4):325-330.

[2] Pallottini V, Bulzomi P, Galluzzo P, et al. Estrogen regulation of adipose tissue functions: involvement of estrogen receptor isoforms[J]. Infect Disord Drug Targets, 2008, 8(1):52-60.

[3] Taylor A H, Guzail M, AI-Azzawi F. Differential expression of estrogen receptor isoforms and androgen receptor in the normal vulva and vagina compared with vulval lichen sclerosus and chronic vaginitis [J].Br J Dermatol, 2008, 158(2):319-328.

[4] Lazennec G. Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis[J].Cancer Lett, 2006, 231(2):151-157.

[5] Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, et al. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonsts/antagonists[J]. Mol Pharmanol, 1998, 54(1):105-112.

[6] 田 君,丘 彦.多囊卵巢综合征动物模型构建的比较研究[J].重庆医科大学学报,2008,33(4):419-422.

[7] 冯光荣,尤昭玲,贺 冰,等.多囊卵巢综合征动物模型建立的研究现状与展望[J].湖南中医药导报,2004,10(1):45-46.

[8] Blank S K, McCartney C R, Marshall J C. The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome[J]. Hum Reprod Update, 2006, 12(4):351-361.

[9] Quezada S, Avellaira C, Johnson M C, et al. Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome[J]. Fertil Steril, 2006, 85(4):1017-1026.

[10] Matthews J, Gustafsson J A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta[J]. Mol Interv, 2003, 3(5):281-292.

[11] Gregory C W, Wilson E M, Apparao K B, et al. Steroid receptor coactivator expression throughout the menstrual cycle in normal and abnormal endometrium[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(6):2960-2966.

[12] Okon M A, Laird S M, Tuckerman E M, et al. Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function[J]. Fertil Steril, 1998, 69(4):682-690.

[13] Bozdogan O, Atasoy P, Erekul S, et al. Apoptosis - related proteins and steroid hormone receptors in normol, hyperplastic, and neoplastic endometrium[J]. Int J Gynecol Pathol, 2002, 21(4):375-382.

(责任编辑:冉明会)