维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)05-0480-04

性成熟小鼠卵巢和性未成熟小鼠体外培养卵泡的雌激素受体 α、β 亚型表达的研究

丘 彦,贺雪辉,王炼炼

(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:探讨小鼠体内成熟与卵泡体外培养两种情况下卵泡的雌激素受体 α 亚型和 β 亚型的分布及表达。方法:采用兔抗小鼠 ERα、ERβ 多克隆抗体分别对性成熟小鼠卵巢和性未成熟小鼠窦前卵泡体外培养后免疫组化染色,检测雌激素受体两种亚型的分布,并对各级卵泡的染色强度进行定量分析。结果:性成熟小鼠卵巢的免疫组化染色显示膜细胞和间质细胞 ERα 的染色阳性,ERβ 染色为阴性;原始卵泡的颗粒细胞 ERβ、ERα 染色均为阴性,从初级卵泡开始至成熟卵泡的颗粒细胞 ERβ 的染色呈阳性,ERα 染色为阴性。其中 ERβ 的表达水平在小窦状卵泡的颗粒细胞最高,大窦状卵泡的颗粒细胞染色次之,成熟卵泡的颗粒细胞染色下降。性成熟小鼠卵巢各级卵泡的颗粒细胞 ERβ 的免疫染色强度显示:除初级卵泡与小窦前卵泡之间颗粒细胞上的 ERβ 染色无差异外,其余各组卵泡之间颗粒细胞上 ERβ 的染色强度都具有显著差异($P<0.01$)。各级卵泡的卵母细胞两种 ER 亚型的染色都呈阳性。性未成熟小鼠各级卵泡的颗粒细胞、卵母细胞染色结果和染色强度定量分析结果分别同性成熟小鼠免疫组化染色和染色强度定量分析结果。结论:雌激素受体 β 亚型在卵泡发育中起主要作用。体内成熟和体外培养两种情况下卵泡两种雌激素受体的表达相似。

【关键词】雌激素受体 α 亚型;雌激素受体 β 亚型;卵泡发育;体外培养

【中国图书分类法分类号】R711.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-31

The expression of estrogen receptor α(ERα)and estrogen receptor β (ERβ) Informs on follicular development and maturation of mice

QIU Yan, et al

(*the Center of Assisted Reproduction, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the roles of estrogen receptor α (ERα)and estrogen receptor β (ERβ)Informs on follicular development and maturation of mice and to comprehend if there is difference between ERα and ERβ in follicles at all stages between in vivo maturation and in vitro culture. So as to learn more about the basic study of in vitro mature of immture oocyte by detecting ERα and ERβ expression in theca cells, interstitial cells and follicles of different stages of ovary in mature mice, and by culturing preantral follicles of immature mice and detecting detecting ERα and ERβ Isoforms expression in cultured follicles. *Method*: Detect distribution of ERα and ERβ Isoforms on the ovaries of mature mice and follicles from cultured preantral follicles of immature mice by immunohistochemistry with rabbit-anti-mouse polyclonal antibody of ERα and ERβ, and quantitatively evaluate the staining intensity of follicles at different stages. *Results*: ovarian immunohistochemistry of mature mice showed that Positive ERα staining was found in thecal cells and stromal cells and no positive ERβ staining in these two cells. ERα and ERβ staining were both negative in granular cells of primordial follicle, ERβ staining was positive in granular cells from primary up to preovulatory follicles, there was no positive staining of ERα in granular cells of these follicles. The most intense ERβ staining was observed in granular cells of small antral follicles, in big antral follicles ERβ staining of granular cells was lower, and much more lower in granular cells of preovulatory follicles, quantitatively analysis of the ERβ-staining intensity in granular cells of follicles at different stages showed that there was no significant difference in staining density of granular cells between primary follicle and small preantral follicles, but there is significant difference between all other follicles ($P<0.01$). The gradation of ERβ staining intensity of all follicles from strong to weak was small antral follicles, big antral

作者介绍:丘 彦(1958 -),女,主任医师,
主要研究方向:生殖内分泌,辅助生殖技术。

维普资讯 http://www.cqvip.com

follicles, preovulatory follicles, big preantral follicles, small preantral follicles. ERα and ERβ staining were both positive in oocytes. The immunostaining was the same in granulose cells and oocytes of follicles between mature and immature mice, as well as the result of staining intensity of ERβ quantitatively analysis in granular cells of follicles at different stages. *Conclusion*: The expression of ERα and ERβ in follicles of all stages was coincident between in vivo maturation and in vitro culture. ERβ played a capital role on follicular development.

【Key words】Estrogen receptor α; Estrogen receptor β; Follicular development; In vitro culture

雌激素受体(Estrogen receptor, ER)有两种亚型,即 ERα 和 ERβ,两种亚型在结构上高度同源,功能却存在很大的差异[1-3]。本实验通过检测性成熟小鼠卵巢的膜细胞、间质细胞和各级卵泡 ERα、ERβ 的表达情况,同时体外培养性未成熟小鼠窦前卵泡,检测其各级卵泡的 ERα 和 ERβ 的表达情况,探讨 ER 两种亚型的分布与小鼠卵泡发育、成熟的关系,了解体内成熟与卵泡体外培养两种不同情况下卵泡的 ERα、ERβ 的表达有无差异,为窦前卵泡的体外培养提供一种理论依据,加深对未成熟卵体外培养基础研究的认识。

1 材料和方法

1.1 实验动物

卵巢免疫组化采用 20 只 SPF 级性成熟昆明小白鼠,6~8 月龄,体重 18~22g。窦前卵泡培养采用 SPF 级性未成熟昆明小白鼠,2 周龄,在这个年龄阶段卵巢的卵泡以原始卵泡和含 1~2 层颗粒细胞的早期窦前卵泡为主[4]。体重 8~12g。

1.2 实验方法

1.2.1 卵巢免疫组化 SP 法 用 4%的多聚甲醇固定,石蜡包埋,切片(5μm)。脱蜡、水洗后用微波炉进行抗原修复,采用免疫组化 SP 法分别进行 ERα 和 ERβ 染色。用 DAB 显色,苏木精复染。抗 ERα 和 ERβ 多克隆抗体、均为北京博奥森生物有限公司产品。SP 二抗试剂盒为晶美公司产品。免疫组化阳性结果的定性判断标准为[5]:阴性:无棕黄色颗粒沉着 + 性(弱阳性):每高倍镜视野 <10%的细胞浆和细胞膜上出现棕黄色颗粒。++(中度阳性):每高倍镜视野 10%~60%的细胞浆和细胞膜上出现棕黄色颗粒。+++(强阳性):每高倍镜视野有 >60%的细胞浆和细胞膜上出现棕黄色颗粒。++++(极强阳性):每高倍镜视野有 100%的细胞浆和细胞膜上出现棕黄色颗粒。

1.2.2 光学显微镜下 HE 染色切片测量卵泡的直径 随机分别抽取 40 张 HE 染色切片,根据 Emmen[6]的方法分类分别测量 20 个原始卵泡、初级卵泡、小窦前卵泡、大窦前卵泡、小窦状卵泡、大窦状卵泡、排卵前卵泡的直径。

1.2.3 卵泡培养 未成熟小鼠断颈处死后,迅速将卵巢移到培养基中,在解剖显微镜下分离卵泡,保持卵泡的结构完整。用自制的玻璃吸管将卵泡转移到卵泡培养基中,用微滴培养方法[7]培养。孵育的第 1 天为 d0 天,以后依次为 d1、d2 等,共培养 16 天。每天在倒置显微镜下观察,记录卵泡直径、基底膜、卵泡轮廓和卵母细胞形态,颗粒细胞增生、窦形成、有无卵母细胞逸出。分别将此直径范围的 20~24 个左右的各级卵泡用拉制的玻璃吸管自注入小鼠心室或者膀胱中,用细线将开口处扎紧、封闭。然后投入 4%的多聚甲醇固定、石蜡包埋、连续切片。先挑取部分切片作 HE 染色,在确定 HE 染色的切片有卵泡 时,再将有卵泡的切片邻近的几张切片铺片,脱蜡后分别作 ERα、ERβ 染色。染色步骤除去0.01mol/L 枸橼酸缓冲液加热进行热修复一步,其余同卵巢组织染色步骤。

免疫组化结果的定量判断采用成都金盘电子科技大学多媒体技术有限公司生产的 GD-8 型医学病理图像分析系统进行定量分析。从所有 ERβ 免疫组化染色切片中随机选择 20 张切片和所有窦前卵泡培养后的卵泡 ERβ 免疫组化染色切片中随机选择 10 个初级卵泡、小窦前卵泡、大窦前卵泡、小窦状卵泡、大窦状卵泡,排卵前卵泡,在 ×400 高倍视野作染色强度的定量分析。反应物的标记强度为面积积分光密度 (Area integral optical density, AIOD), 即积分光密度 /μm^2。免疫组化染色强度的大小和 AIOD 值呈正比。

1.2.4 统计学处理 小鼠各级卵泡的直径及图像分析所得的 AIOD 值数据,用 SPSS10.0 统计软件进行分析处理。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,性成熟各小鼠和性未成熟小鼠组内各级卵泡两两间的比较采用 Tukey-HSD 法进行方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 双侧。

2 结 果

2.1 各级卵泡的直径范围见表 1

2.1.1 免疫组化染色光学显微镜分析结果

表 1 性成熟小鼠卵巢各级卵泡的直径($\bar{x} \pm s$)

卵泡分级	原始卵泡	初级卵泡	小窦前卵泡	大窦前卵泡	小窦状卵泡	大窦状卵泡	排卵前卵泡
n	10	10	10	10	10	10	10
直径大小	(40±12)μm	(114±13)μm	(141±12)μm	(165±14)μm	(200±32)μm	(281±29)μm	(386±37)μm

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 性成熟小鼠从初级卵泡到排卵前卵泡颗粒细胞上 ERβ 染色 AIOD 值($\bar{x}\pm s$)

卵泡分级	初级卵泡	小窦前卵泡	大窦前卵泡	小窦状卵泡	大窦状卵泡	排卵前卵泡
卵泡个数	10	10	10	10	10	10
AIOD 值	$1.03\pm0.112^{b,c,d,e,f}$	$1.039\pm0.007^{*}$	$1.127\pm0.013^{*}$	$1.504\pm0.011^{*}$	$1.191\pm0.015^{*}$	$1.151\pm0.009^{*}$

表中 * 代表小窦前卵泡、大窦前卵泡、小窦状卵泡、大窦状卵泡、排卵前卵泡各个组间比较都有统计学差异，$P<0.01$。b、c、d、e、f 分别代表初级卵泡与小窦前卵泡、大窦前卵泡、小窦状卵泡、大窦状卵泡、排卵前卵泡各组比较，其中 b 的 $P>0.05$，c、d、e、f 的 $P<0.01$。

表 3 性未成熟小鼠从初级卵泡到排卵前卵泡颗粒细胞上 ERβ 染色的 AIOD 值($\bar{x}\pm s$)

卵泡分级	初级卵泡	小窦前卵泡	大窦前卵泡	小窦状卵泡	大窦状卵泡	排卵前卵泡
卵泡个数	10	10	10	10	10	10
AIOD 值	$1.04\pm0.015^{b,c,d,e,f}$	$1.051\pm0.039^{*}$	$1.136\pm0.004^{*}$	$1.512\pm0.015^{*}$	$1.2\pm0.011^{*}$	$1.16\pm0.017^{*}$

表中 * 代表小窦前卵泡、大窦前卵泡、小窦状卵泡、大窦状卵泡、排卵前卵泡各个组间比较都有统计学差异，$P<0.01$。b、c、d、e、f 分别代表初级卵泡与小窦前卵泡、大窦前卵泡、小窦状卵泡、大窦状卵泡、排卵前卵泡各组比较，其中 b 的 $P>0.05$，c、d、e、f 的 $P<0.01$。

×400 倍视野下观察 ERβ 染色切片显示：原始卵泡的颗粒细胞 ERβ 的染色呈阴性，初级卵泡的颗粒细胞 ERβ 染色呈+阳性，小窦前卵泡颗粒细胞 ERβ 染色结果呈+阳性或者++阳性，大窦前卵泡颗粒细胞 ERβ 染色结果呈++阳性，小窦状卵泡颗粒细胞 ERβ 染色结果呈+++或者++++阳性，大窦状卵泡颗粒细胞 ERβ 染色的结果呈+++阳性，排卵前卵泡颗粒细胞 ERβ 染色的结果呈+++或者++阳性。窦状卵泡卵母细胞周围和窦腔周围的颗粒细胞 ERβ 染色较深。卵母细胞的染色呈++++阳性。膜细胞和间质细胞 ERβ 染色呈阴性。

×400 倍视野下观察 ERα 染色切片显示：各级卵泡颗粒细胞上 ERα 染色为阴性，卵母细胞为++++阳性，卵泡膜和间质细胞染色为+阳性。

2.1.2 性成熟小鼠从初级卵泡到排卵前卵泡颗粒细胞上 ERβ 染色的强度分析结果

方差分析显示各组卵泡除了初级卵泡与小窦前卵泡的颗粒细胞 ERβ 的 AIOD 值无差异外，其他各组之间 AIOD 值都有统计学差异($P<0.01$)。各级卵泡免疫组化染色强度由强到弱的顺序依次为：小窦状卵泡、大窦状卵泡、排卵前卵泡、大窦前卵泡、小窦前卵泡(见表 2 及图 1)。

2.2 性未成熟小鼠窦前卵泡培养的结果

卵泡培养结果窦前卵泡体外培养时，前 5 天生长较慢，大多数处于窦前卵泡的水平，d6 天卵泡生长加快，窦腔开始形成，d7、d8 天小窦腔形成，直径达到小窦状卵泡的标准，d11、d12 天大窦腔形成，d14 天大部分卵泡成熟，部分卵泡排卵(图2)。

性未成熟小鼠窦前卵泡培养后×400 倍视野下各级卵泡 ERα、ERβ 免疫组化的染色结果和各级卵泡颗粒细胞 ERβ 染色强度的定量分析结果分别同×400 倍视野下性成熟小鼠卵巢各级卵泡的ERα、ERβ 染色结果和各级卵泡颗粒细胞 ERβ 染色强度的定量分析结果(见表 3 及图 2)。

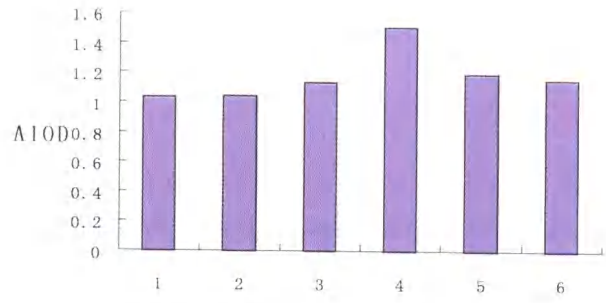


图 1 ERβ 在性成熟小鼠各级卵泡颗粒细胞上的表达。1、2、3、4、5、6 分别代表初级卵泡、小窦前卵泡、大窦前卵泡、小窦状卵泡、大窦状卵泡、排卵前卵泡。

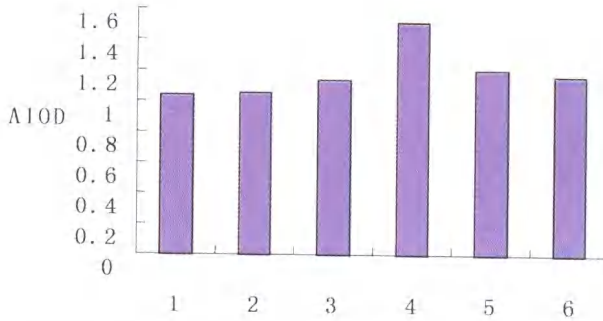


图 2 培养的性未成熟小鼠各级卵泡颗粒细胞 ERβ 的表达。1、2、3、4、5、6 分别代表初级卵泡、小窦前卵泡、大窦前卵泡、小窦状卵泡、大窦状卵泡、排卵前卵泡。

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

本研究发现原始卵泡的颗粒细胞无 ERβ 阳性染色,从初级卵泡开始出现阳性染色,而原始卵泡和初级卵泡的卵母细胞 ERα、β 的染色都呈阳性。Britt[8]等研究 ArKO 小鼠发现 E_2 有控制卵母细胞直径和原始卵泡池的作用。以上结果提示 ERα、ERβ 在介导原始卵泡向初级卵泡转化的过程可能都起到了一定作用,它们可能共同参与了介导 E 控制原始卵泡池的作用。本实验还发现颗粒细胞上 ERβ 的表达水平在小窦状卵泡阶段表达最高、排卵前卵泡、成熟卵泡颗粒细胞表达较高,而 ERα 在颗粒细胞无表达提示 ERβ 在窦状卵泡的发育中起了重要的作用。Emmen[6]等研究了 ER 亚型在卵泡生长和排卵中的作用,发现 βERKO 小鼠大窦状卵泡和黄体的数量减少,闭锁窦状卵泡的数量增加。体外培养这三种卵泡,发现 αERKO 卵泡的生长和野生型小鼠相似,但是合成雌激素的能力增加,而 βERKO 小鼠明显缺乏早期窦状卵泡到大窦状卵泡的过程,雌激素的分泌减少,排卵减少,与卵泡成熟的相关基因 Cyp19mRNA 表达水平降低,HCG 干预后排卵相关基因 Lhcgr 和 Ptgs2mRNA 表达水平降低。提示 ERβ 而不是 ERα 在卵泡发育中起到了直接作用,它促进小窦状卵泡向成熟卵泡转变的过程。本研究发现排卵前卵泡颗粒细胞上 ERβ 表达降低,与前人的研究结果一致[9],LH 和 HCG 在体内外都证实选择性降低排卵前卵泡颗粒细胞 ERβmRNA 的水平。排卵前卵泡颗粒细胞上 ERβ 水平降低的作用还不清楚,它可能与调节 β-微管蛋白和组胺 mRNA 的稳定性有关[10]。因此,促性腺激素对排卵前卵泡 ERβ 的调节对维持排卵前卵泡的正常功能起到了重要的作用。

Tommie 等报道在 20 周的胎儿卵巢卵子的胞浆都可以检测到 ERα 和 ERβ 蛋白的表达[11],与本实验的结果一致。而此前有多个研究者认为 E 与正常的卵子成熟有关系[12,13],这些结果提示 ERα、ERβ 共同介导了 E 对卵母细胞成熟的作用,卵丘细胞上 ER 受体的表达也提示 E 对卵子有一个旁分泌的效果。

本研究结果显示,除了原始卵泡外,生长卵泡的各阶段,从初级卵泡开始,小窦状卵泡、大窦状卵泡、成熟卵泡的颗粒细胞 ERβ 染色都呈阳性。提示 ERβ 可能参与了雌激素促进卵泡生长和发育的过程。Couse JF[14]的研究表明 ERβ 而不是 ERα 在促性腺激素介导的颗粒细胞的分化过程中起到了重要的作用,它对 LH 介导的排卵反应是必需的。实验发现在性成熟小鼠的卵泡膜细胞和间质细胞 ERα 染色呈阳性。雌激素的分泌是膜细胞和颗粒细胞在 FSH 和 LH 共同作用下完成的,膜细胞和颗粒细胞的协调作用对维持正常的卵巢功能很重要。ERα 在各级卵泡颗粒细胞上无表达,其他学者[15]也发现卵泡颗粒细胞上 ERα 的表达少或无,但是它对卵泡的发育和排卵也是必不可少的。

参 考 文 献

[1] Valley CC,Metivier R,Solodin NM,et al.Differential Regulation of Estrogen-Inducible Proteolysis and Transcription by the Estrogen Receptor {alpha} N Terminus[J].Mol Cell Biol,2005;25(13):5417-5428.

[2] Jing Huang,Xiaodong Li,Casey A,et al.Maguire, Binding of estrogen receptor β to estrogen response element in situ is independent of estradiol and Impaired byits Amino terminus [J]. Molecular Endocrinology,2005;23.

[3] Mueller SO,Katzenellenbogen JA,Korach KS,et al.Endogenous estrogen receptor beta is transcriptionally active in primary ovarian cells from estrogen receptor knockout mice[J].Steroids,2004;69(10):681-686.

[4] CortVrindt R S,Steirteghem,A C.In vitro maturation,fertillzation and embryo development of immature Oocytes from early preantral folllcles from prepuberal mice in a simplified culture system [J]. Human Reproduction,1996;11:2656-2666.

[5] 李 黎,陈士林,邢福祺.基质金属蛋白酶 9 及其组织抑制物 3 在人种植窗期子宫内膜的表达特点及作用[J].中华妇产科杂志,2000;35(9):544-546.

[6] Emmen JM,Couse JF,Elmore SA,et al.In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER){alpha} and ER {beta} null mice indicate a role for ER {beta} in follicular maturation[J].Endocrinology,2005;146(6):2817-2826.

[7] Mousset-Simeon N,Jouannet P,Le Cointre L.Comparison of three in vitro culture systems for maturation of early preantral mouse ovarian follicles[J].Zygote,2005;13(2):167-175.

[8] Britt KL,Saunders PK,McPherson SJ.Estrogen actions on follicle formation and early follicle development [J].Biol Reprod, 2004;71(5):1712-1723.

[9] Byers M,Juiper GGJM,Gustafsson JA,et al.Estrogen receptor-β mRNA expression in rat ovary:down-regulation by gonadotropins[J]. Mol Endocrinol,1997;11:172-182.

[10] Ross J.mRNA stability in mammalian cells [J].Microbiol Rev, 1995;59:423-450.

(下转第 527 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

群中发现血脂紊乱，提示早在糖尿病前期阶段就已存在脂毒性对胰岛 β 细胞的损害作用。

3.3 血糖代谢异常与年龄，性别，BMI，血压，血脂代谢异常关系

本研究表明年龄、体重指数、以及收缩压和血脂的异常对血糖异常发病均有影响。在陈良昆等所做的一项血糖调查报告中显示[2]，平均年龄、体重指数以及高血压患病率的增高伴随糖代谢异常的发生显著增加。周晓鸥，高平进等通过对尚未出现糖代谢异常的原发性高血压患者进行随访调查[11]，发现在 3 年的随访期间，新诊断的糖尿病和新增糖耐量异常远远高于一般人群，同时存在不同程度的血脂紊乱。这说明高血压进一步加速了糖代谢向异常转变的时程和代谢综合征的发生，年龄增长和肥胖两个风险因素可增加 DM 患病风险。

3.4 血糖代谢异常防治展望

目前已得到共识，IFG 是心血管疾病（CVD）的独立危险因素，糖代谢异常的冠心病患者冠状动脉病变严重。G.T.-C.Ko 研究表明[12]，在中国 2 型糖尿病患者中，控制血压和 BMI 是预防糖代谢异常及其所引起的心血管疾病，降低其死亡率的关键。这提示我们应该实施对全体人群的血糖监控，实行定期体检以提高糖代谢异常的知晓率。通过给予相关的健康教育和饮食及生活方式指导，控制血压、血脂等与糖代谢异常相关的多个因素对代谢综合征进行早期预防，结合对慢性病进行综合防治，将使我国糖尿病和心脑血管疾病的防治步入一个崭新的阶段。

参 考 文 献

[1] 孙冬玲，顾东风.代谢综合征的定义及其流行病学[J].中华预防医学杂志，2006；40(2)：133-135.

[2] Liang-Kung Chen, Ming-Hsien Lin, Zhi-Jun Chen, et al. Metabolic characteristics and insulin resistance of impaired fasting glucose among the middle-aged and elderly Taiwanese[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2006；(71)：170-176 .

[3] WHO.Definition, diagnosisand Classification Of diabetes mellitus and its complications[M].1999.

[4] WHO-ISH hypertension guidelines corrmaittee.1999 world health organization International society of hypertension guidelines for management of Hypertension[J].Hypertens, 1999；17：151-183.

[5] 中华心血管杂志委员会血脂防治小组防治对策专题组. 血脂异常防治建议[J].中华心血管病杂志，1997；25：169-173.

[6] 中国肥胖问题工作组数据汇总分析协作组. 我国成人体重指数和腰围对相关疾病危险因素异常的预测价值：适宜体重指数和腰围切点的研究[J].中华流行病学杂志，2002；23(1)：5-10.

[7] J.W.Williams, P.Z.Zimmet, J.E.Shaw, et al.Gender differences in the prevalence of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance in Mauritius.Does sexmatter[J].Diabetes UK.Diabetic Medicine, 2003；20：915-920.

[8] The DECODE Study Group.Are insulin resistance, impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance all equally strongly related to age[J].Diabetes UK.Diabetic Medicine, 2005；(22)：1476-1481.

[9] M.E.Piché, J.P.Després, A.Pascot, et al.Impaired fasting glucose vs. glucos intolerance in pre-menopausal women：distinct metabolic entiesand cardiovascular disease risk[J].Diabetic Medicine, 2004；(21)：730-737.

[10] 龚莉琳，张素华，李 蓉，等.不同糖耐量者胰岛 β 细胞功能与血脂的关系[J].重庆医学，2006；5(9)：775-777.

[11] 周晓鸥，高平进，初少莉，等.男性高血压患者发生糖代谢异常的危险因素[J].Chin J Hypertension, 2006；14(5)：346-351.

[12] G.T.-C.Ko, W.-Y.So, N.N.Chan, et al.Prediction of cardiovascular and total mortality in Chinese type 2 diabetic patients by the WHO definition for the metabolic syndrome [J].Diabetes, Obesity and Metabolism, 2006；(8)：94-104.

(上接第 483 页)

[11] Vaskivuo TE, Maentausta M, Torn S, et al.Estrogen receptors and estrogen-metabolizing enzymes in human ovaries during fetal development [J].Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2005；90(6)：3752-3756.

[12] Wang X-N, Greenwald GS.Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH and hCG receptors in hypophysectomized mice[J].J Reprod Fertil, 1993；99：403-413.

[13] Tesarik J, Mendoza C. Nongenomic effects of 17b-estradiol on maturing human oocytes：relationship to oocyte developmental potential[J].J Clin Endocrinol Metab, 1995；80：1438-1443.

[14] Couse JF JF, Yates MM, Deroo BJ.Estrogen Receptor-β?is Critical to Granulosa Cell Differentiation and the Ovulatory Response to Gonadotropins[J].Endocrinology, 2005；146(8)：3247-3262.

[15] Hiroi H, Inoue S, Watanabe T, et al.Differential immunolocalization of estrogen receptor α and β in rat ovary and uterus [J].J Mol Endocrinol, 1999；22：37-44.