

基础研究

青少年特发性脊柱侧凸患者骨组织中
雌激素受体的表达

吴洁, 邱勇, 张乐, 王斌, 俞扬, 朱泽章

(南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科 210008 江苏省南京市)

【摘要】目的:探讨青少年特发性脊柱侧凸(AIS)患者骨组织中雌激素受体的表达情况。**方法:**28例志愿者分为两组,其中AIS组患者18例,男3例,女15例,年龄12~18岁,平均 (14.4 ± 1.4) 岁,Cobb角 $40^\circ\sim 125^\circ$,平均 60.1° ;先天性脊柱侧凸(CS)组患者10例,男6例,女4例,年龄11~19岁,平均 (15.4 ± 2.6) 岁,Cobb角 $37^\circ\sim 120^\circ$,平均 63.3° 。术中取肋骨,用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测骨组织中雌激素受体 α (ER α)和 β (ER β)的表达情况。**结果:**AIS组和CS组患者骨组织中ER α mRNA和ER β mRNA的阳性表达率均无显著性差异($P>0.05$);AIS组中ER α mRNA和ER β mRNA表达阳性患者中的相对含量分别为 1.24 ± 0.08 和 1.07 ± 0.10 ,CS组为 1.24 ± 0.09 和 1.08 ± 0.10 ,两组比较无显著性差异($P>0.05$);但两组患者ER β mRNA的阳性表达率与其Cobb角大小呈明显负相关(AIS组 $r=-0.613$, $P=0.007$;CS组 $r=-0.648$, $P=0.043$)、与Risser分级无关,ER α mRNA的阳性表达率与Cobb角、Risser分级无关,AIS患者的ER α mRNA和ER β mRNA的阳性表达率与其Lenke分型无关。**结论:**AIS患者骨组织中ER α mRNA和ER β mRNA的表达可能不是引起AIS的主要原因,但ER β mRNA的表达可能对骨生长的调控作用较大,值得进一步研究。

【关键词】青少年特发性脊柱侧凸;雌激素受体;骨组织

中图分类号:R682.3 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2007)-07-0528-04

Expression of estrogen receptor in bone tissue of adolescent idiopathic scoliosis/WU Jie, QIU Yong, ZHANG Le, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2007, 17(7):528-531

【Abstract】 Objective: To study the expression of estrogen receptor α (ER α) and β (ER β) mRNA in bone tissue of adolescent idiopathic scoliosis (AIS), and investigate their relationship with the pathogenesis of scoliosis. **Method:** 28 cases were divided into two groups, AIS group consisted of 18 patients (3 males and 15 females) with an average of 14.4 ± 1.4 years old, ranging from 12 to 18 years old; and average Cobb angle of 60.1° (range, $40^\circ\sim 125^\circ$). Congenital scoliosis (CS) group consisted of 10 patients (6 males and 4 females) with an average of 15.4 ± 2.6 years old, ranging from 11 to 19 years old; and average Cobb angle of 63.3° (range, $37^\circ\sim 120^\circ$). The mRNA expression of ER subtypes α and β were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. **Result:** There was no significant difference with respect to the positive rate of the ER α mRNA and ER β mRNA expression in bone tissue between two groups ($P>0.05$). The expression level of ER α mRNA and ER β mRNA was 1.24 ± 0.08 and 1.07 ± 0.10 in AIS group and 1.24 ± 0.09 and 1.08 ± 0.10 in CS group respectively, which showed no significant difference ($P>0.05$). However, the expression of ER β mRNA in bone tissue was negatively correlated with Cobb angle in AIS and CS patients ($r=-0.613$, $P=0.007$ and $r=-0.648$, $P=0.043$ respectively) while it was not associated with Risser sign, and the expression of ER α mRNA was not correlated with Cobb angle and Risser sign ($P>0.05$). Additionally, the expression of ER α mRNA and ER β mRNA in AIS patients was not correlated with their Lenke types. **Conclusion:** The expression of ER α mRNA and ER β mRNA in bone tissue of AIS patients might have no association with the etiology of scoliosis. ER β mRNA expression in bone tissue, however, may play relatively important role to bone growth.

【Key words】 Adolescent idiopathic scoliosis; Estrogen receptor; Bone tissue

【Author's address】 Spine Service, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical School, Nanjing, 210008, China

性的青春期发育和骨骼的生长过程中都是必不可少的^[1]。雌激素必须通过与细胞内特异性雌激素受体(estrogen receptor, ER)结合,才能发挥其生物学效应,ER 的数量及功能状态与其效应密切相关。1 例 ER 基因突变的男性患者出现生长板不融合揭示了雌激素在骨生长中的重要性^[2]。此后,对骨组织中 ER 的研究成为人们关注的焦点。ER 包括两种亚型,即经典的 ER α 和后发现的 ER β ^[3]。青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)的发病机理目前未明,但骨生长发育异常已基本被广大学者接受,且 AIS 患者中男女发病比例为 1:6^[4],该病的发生及发展与 ER 是否有一定的关系尚不清楚。本研究通过测定 AIS 患者骨组织中 ER 的表达情况,并以先天性脊柱侧凸(congenital scoliosis, CS)为对照,探讨 ER 与 AIS 发生、发展的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择本院 2003 年 7 月至 2004 年 10 月在脊柱外科接受手术治疗的 AIS 患者 18 例为研究组,男 3 例,女 15 例,年龄 12~18 岁,平均(14.4 $\pm$ 1.4)岁,术前 Cobb 角 40°~125°,平均 60.1°。Lenke 分型^[5]:Lenke 1 型 9 例(Lenke 1A-型 1 例,Lenke 1AN 型 3 例,Lenke 1B-型 1 例,Lenke 1BN 型 3 例,Lenke 1CN 型 1 例),Lenke 2 型 2 例(Lenke 2AN 型 1 例,Lenke 2BN 型 1 例),Lenke 5 型 7 例(Lenke 5C+型 1 例,Lenke 5CN 型 6 例)。Risser 分级:1 级 5 例,2 级 6 例,3 级 4 例,4 级 3 例。AIS 的诊断由临床和 X 线片确诊,并经 MRI 证实,以排除 Chiari 畸形和脊髓空洞等神经损害的脊柱侧凸;患者无其它性激素相关性疾病及内分泌疾患,且未应用过任何激素类药物。对照组为同期接受手术治疗的 10 例 CS 患者,男 6 例,女 4 例,年龄 11~19 岁,平均(15.4 $\pm$ 2.6)岁;术前 Cobb 角 37°~120°,平均 63.3°;Risser 分级 1 级 2 例,2 级 3 例,3 级 1 例,4 级 4 例。取材均经患者及其父母的知情同意,并获得南京大学医学院附属鼓楼医院伦理委员会的同意和认可。

1.2 实验试剂和仪器

抽提 RNA 的 Trizol 试剂购自美国 Gibco 公司,逆转录酶 superscript III 购自 Invitrogen 公司,脱氧核苷三磷酸(dNTP)和寡聚脱氧胸苷(Oligo

dT) 购自 New England 公司,Taq 酶购自日本 TAKARA 公司,雌激素受体引物和 β -肌动蛋白(β -actin)引物由上海生物工程技术有限公司合成,琼脂糖购自美国 Promega 公司,其它试剂为国产分析纯。仪器有 MJ 公司 PTC-200 基因扩增仪, Heraeus 公司 Stratos 高速冷冻离心机,上海复日公司 FR-200 紫外成像系统。

1.3 实验方法

1.3.1 骨标本取材 所有研究对象术中取髂骨植骨时取髂骨的松质骨,立即密封后置于液氮瓶中保存。

1.3.2 骨组织中总 RNA 的抽提 用 Trizol 试剂采用一步法提取组织总 RNA:将所取髂骨用剪刀剪成碎片,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗至发白(去除血细胞),加入 1ml Trizol 试剂,震荡 15min,加入 500 μ l 氯仿,剧烈震荡 15s,静置 2min,4℃条件下 14000 转/min 离心 15min,取上层水相至新的 Eppendorf 管中,加入 500 μ l 异丙醇,充分混匀,14000 转/min 离心 10min 后,弃上清,在沉淀中加入 75%乙醇 1ml 洗涤 2 次,7000 转/min 离心 5min,再去上清,加入去离子水 55℃ 10min 充分溶解,调整浓度为 0.21 μ g/ μ l,分光光度计测其 260nm/280nm 比值在 1.8~2.0,证明抽提效果好。

1.3.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 取总 RNA 模板 2 μ l、ER α (或 ER β)上下游引物各 2 μ l、Tag DNA 聚合酶 1 μ l、dNTP 1 μ l、莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)逆转录酶 2 μ l、氯化镁 1.5 μ l 及 10% Buffer 5 μ l,补加无菌去离子水至 50 μ l 为反应总体积。 β -actin 为内参照。ER α 的上游引物为 5'-ACTGTGCAGTGTGCAATGAC-3',下游引物为 5'-CAACAAGGCACTGACCATCT-3';ER β 的上游引物为 5'-TTGTGCGGAGACAGAGAAGT-3',下游引物为 5'-ATCATGGCCTTGACACAGAG-3';内参对照物 β -actin 上游引物为 5'-TTCCAGCCTTCCTTCCTGG-3',下游引物为 5'-TTGCGCTCAGGAGGAGCAAT-3'。PCR 反应条件:94℃变性 30s,61℃退火 60s,72℃延伸 60s,35 个循环,末次循环 72℃延伸 6min。

1.3.4 PCR 产物分析 在含有 0.5%溴化乙锭的 1%琼脂糖凝胶上加入扩增产物缓冲液,8V/cm 电泳 30min,紫外光观察并拍摄扩增条带。数码摄像后应用 Molecular Analyst 图像分析软件对条带进

行吸光度峰值下灰度积分, 所得数值与相应 β -actin 灰度积分值的比值即为 ER mRNA 的相对含量。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 用 Fisher's 确切概率法检验 ER mRNA 的阳性表达率, 并将其与患者的 Lenke 分型、Cobb 角大小及 Risser 分级进行相关性分析, 用 Mann-Whitney U 检验统计 ER mRNA 的相对表达量。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

琼脂糖凝胶电泳 β -actin 条带在 250bp 左右, ER α 条带出现在 410bp, 在 500bp 和 750bp 之间出现一条带为 530bp 左右的 ER β (图 1)。



图 1 ER α mRNA 和 ER β mRNA 扩增产物凝胶电泳图

AIS 组和 CS 组患者骨组织中 ER α mRNA 和 ER β mRNA 的阳性表达情况见表 1。两组患者骨组织中 ER α mRNA 和 ER β mRNA 的阳性表达率均无统计学差异 ($P > 0.05$)。将 AIS 组和 CS 组患者骨组织中 ER α mRNA 和 ER β mRNA 的阳性表达情况与其 Cobb 角大小及 Risser 分级进行相关性分析、AIS 组 ER α mRNA 和 ER β mRNA 的阳性表达与其 Lenke 分型进行分析, 结果显示两组患者骨组织中 ER α mRNA 的表达与 Cobb 角及 Risser 分级无关 ($P > 0.05$); 两组 ER β mRNA 的表达与其 Cobb 角大小呈明显负相关 (AIS 组 $r = -0.613, P = 0.007$; CS 组 $r = -0.648, P = 0.043$), 与 Risser 分级无关(表 2)。AIS 患者的 ER α mRNA 和 ER β mRNA 的阳性表达率与其 Lenke 分型无关 ($P > 0.05$)(表 3)。

两组患者骨组织中 ER α mRNA 和 ER β mRNA 表达阳性患者中的表达量见表 4。AIS 组 (10 例) 和 CS 组 (5 例) 患者骨组织中 ER α mRNA

和 ER β mRNA 的表达量均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 1 两组患者骨组织中 ER α mRNA 和 ER β mRNA 的阳性表达情况

	ER α mRNA	ER β mRNA
AIS 组	10/18 (55.6%)	13/18 (72.2%)
CS 组	5/10 (50.0%)	7/10 (70.0%)

表 2 两组患者骨组织中 ER α mRNA 和 ER β mRNA 的阳性表达与 Cobb 角及 Risser 分级的关系

	AIS 组		CS 组	
	ER α mRNA	ER β mRNA	ER α mRNA	ER β mRNA
Cobb 角 $< 60^\circ$	5/10 (50.0%)	10/13 (76.9%)	2/5 (40.0%)	6/7 (85.7%)
$\geq 60^\circ$	5/10 (50.0%)	3/13 (23.1%)	3/5 (60.0%)	1/7 (14.3%)
Risser ≤ 2 级	5/10 (50.0%)	5/13 (38.5%)	2/5 (40.0%)	4/7 (57.1%)
> 2 级	5/10 (50.0%)	8/13 (61.5%)	3/5 (60.0%)	3/7 (42.9%)

注: 将 Cobb 角 $\geq 60^\circ$ 定为脊柱侧凸严重

表 3 AIS 组患者骨组织中 ER α mRNA 和 ER β mRNA 的阳性表达与 Lenke 分型的关系

	Lenke 1 型	Lenke 2 型	Lenke 5 型
ER α mRNA (10 例)	5/9 (55.6%)	1/2 (50%)	4/7 (57.1%)
ER β mRNA (13 例)	6/9 (66.7%)	2/2 (100%)	5/7 (71.4%)

表 4 两组患者骨组织中 ER α mRNA 和 ER β mRNA 的表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

	ER α mRNA	ER β mRNA
AIS 组	1.24 $\pm$ 0.08	1.07 $\pm$ 0.10
CS 组	1.24 $\pm$ 0.09 ^①	1.08 $\pm$ 0.10 ^①

注: ①与 AIS 组比较 $P > 0.05$

3 讨论

ER 是核受体超家族成员之一^[6], 位于胞浆和细胞核内, 具有转录因子的作用。1986 年 Green 等^[7]从人乳腺癌细胞中发现并克隆了第一种 ER (ER α)。人类 ER α 基因位于第 6 号染色体的长臂上, 由 140kb 以上的碱基对组成, 包括 8 个外显子和 7 个内含子, 由 595 个氨基酸组成, 分子量为 66kDa。1996 年 Kuiper 等^[8]从大鼠的前列腺和卵巢中发现并克隆出 ER β 。同年 Mosselman 等^[9]克隆出人源性 ER β 。人类 ER β 基因位于第 14 号染色

体上,由 40kb 碱基、485 个氨基酸组成,分子量为 54kDa。雌激素调节着诸如子宫内膜、乳腺、骨骼、心血管、脑及泌尿生殖道等组织的细胞生长和分化^[10-12],但它们在组织中的分布大不相同,即使在同一组织中也经常表现为 ER 亚型的不同表达。

骨是雌激素发挥作用的重要靶器官之一。研究表明,雌激素对维持骨吸收和骨形成之间的平衡有着极其重要的作用,而雌激素是通过其受体介导的机制发挥对骨代谢调控的^[13-15]。Onoe 等^[13]报告从幼鼠的成骨细胞中分离出 ER α 和 ER β mRNA,但 ER β mRNA 的水平明显高于 ER α mRNA,且 ER β 在松质骨和腰椎中为高表达,而在皮质骨中表达则较低,雄性大鼠和雌性大鼠骨组织中 ER β mRNA 的表达和分布无明显区别,从而说明成骨细胞对雌激素的反应是一复杂过程,不仅源于 ER α 的表达调控,而且与 ER β 的作用密不可分。Lihuan 等^[14]研究提出在人类成骨肉瘤(MG63)细胞中,破骨细胞分化过程的基质样蛋白的合成是通过 ER β 而发挥作用的。然而 Collier 等^[15]用微分离技术从人巨噬细胞瘤获得的纯破骨细胞中没有发现 ER 的存在,且雌激素不能直接抑制破骨细胞的骨吸收作用,从而说明 ER 可能只存在于破骨细胞前体中,促进其增殖分化,随着破骨细胞分化成熟,雌激素受体的表达消失。

本研究用 RT-PCR 方法对 AIS 和 CS 患者骨组织中 ER α mRNA 和 ER β mRNA 的表达进行了研究,结果表明,两组之间的 ER α mRNA 和 ER β mRNA 的表达均无显著性差异。由于 CS 的病因很明确,系脊柱的先天发育异常造成,故推测 ER 两种亚型的表达可能不是引起 AIS 的主要原因。但是,AIS 和 CS 患者 ER β mRNA 的表达与 Cobb 角大小呈负相关,而 ER α mRNA 的表达与 Cobb 角及 Risser 分级无关,从而提示 ER 两种亚型在骨代谢中的作用有区别,ER β 可能对骨生长的调控作用更大,这与国外学者的研究结果相类似^[16]。由于本研究未能选择到非脊柱侧凸的对象作为对照组(研究对象来源困难),而仅使用了 CS 患者作为对照,故研究结果有一定的局限性,有必要选择正常非脊柱侧凸者作为对照进行研究。

4 参考文献

1. Frank GR. Role of estrogen and androgen in pubertal skeletal physiology [J]. Med Pediatr Oncol, 2003, 41(3): 217-221.
2. Smith EP, Boyd J, Frank GR, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen receptor gene in man [J]. N Engl J Med, 1994, 331(16): 1059-1061.
3. Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor β isoform of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogen and antiestrogens [J]. Endocrinology, 1999, 140(12): 5566-5578.
4. DiMeglio A, Bonnel F. Growth of the Spine. In: Raimondi AJ (ed). The Pediatric Spine: Principles of Pediatric Neurosurgery [M]. New York: Springer-Verlag, 1989. 39-47.
5. Lenke LG, Betz RR, Harms J, et al. Adolescent idiopathic scoliosis: a new classification to determine extent of spinal arthrodesis [J]. J Bone Joint Surg Am, 2001, 83(8): 1169-1181.
6. Bord S, Horner A, Beavan S, et al. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(5): 2309-2431.
7. Green S, Walter P, Kumar V, et al. Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A [J]. Nature, 1986, 320(6058): 1343-1319.
8. Kuiper G, Enmark E, Peltö-Huikko M, et al. Cloning of a novel estrogen receptor expression in rat prostate and ovary [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 5925-5930.
9. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER Beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor [J]. FEBS Lett, 1996, 392(1): 49-53.
10. Kan YW, Dozy AM. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75(11): 5631-5635.
11. Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogens [J]. Endocr Rev, 1994, 15(3): 275-300.
12. Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen [J]. FASEB J, 1996, 10(5): 615-624.
13. Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, et al. Expression of estrogen receptor beta in rat bone [J]. Endocrinology, 1997, 138(10): 4509-4512.
14. Lihuan C, Rongfa B, Jennifer I, et al. Estrogen receptor beta modulates synthesis of bone matrix proteins in human osteoblast-like MG63 cells [J]. J Cell Biochem, 2003, 89(1): 152-164.
15. Collier FM, Huang WH, Holloway WR, et al. Osteoclasts from human giant cell tumors of bone lack estrogen receptors [J]. Endocrinology, 1998, 139(3): 1258-1267.
16. Damien E, Price JS, Lanyon LE, et al. Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in males as well as females [J]. J Bone Mineral Research, 2000, 15(11): 2169-2177.

(收稿日期: 2006-08-04 修回日期: 2007-06-04)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 李伟霞)