

雌激素受体在椎间盘组织中的表达及意义

张银昌, 王 强, 杨 昕, 董利军

(皖南医学院弋矶山医院关节骨科 241000 安徽省芜湖市)

【摘要】目的:通过观察雌激素 α 、 β 受体在正常与退变的人椎间盘组织的表达,探讨雌激素受体(ER)与椎间盘退变的关系。方法:根据改良 Pfirrmann 分级将收集的椎间盘组织分为三组:对照组,外伤导致腰椎爆裂性骨折手术取出的正常髓核组织(Pfirrmann 分级 1~2 级);观察组,女性腰椎滑脱及腰椎间盘突出症手术取出的退变髓核组织,Pfirrmann 分级 3~4 级为 A 组,5 级为 B 组。用 HE 染色法观察对照组和 A、B 组各 15 例人腰椎椎间盘髓核组织及髓核细胞的形态学变化;用免疫组织化学染色法(Elivison 二步法)检测对照组和 A、B 组髓核组织中 ER- α 、ER- β 的表达;采用 Western-blot 法检测对照组和观察组髓核组织中 ER- α 、ER- β 的表达。结果:HE 染色示对照组髓核组织中髓核细胞分布均匀,形态完整,未见明显细胞凋亡现象,细胞外基质染色鲜亮,分布均匀;A、B 两组髓核细胞分布不均匀,形态不规则,凋亡现象明显,细胞核增大,染色深,细胞外基质减少,色彩灰暗,B 组较 A 组更为明显。免疫组织化学染色示 ER- α 、ER- β 在对照组的髓核组织见有明显棕黄色颗粒,在 A、B 两组表达减少,以 ER- β 减少最显著,经统计学分析,A、B 两组与对照组间 ER- β 的表达有显著性差异($P<0.01$),ER- α 的表达较对照组无统计学差异($P>0.05$),其中 A 组和 B 组间无明显差异($P>0.05$)。Western-blot 方法检测,ER- α 表达 A 组(0.876 ± 0.058)、B 组(0.757 ± 0.045)较对照组(0.885 ± 0.036)降低,但无统计学差异($P>0.05$);ER- β 表达 A 组(0.947 ± 0.043)、B 组(0.626 ± 0.042)较对照组(1.275 ± 0.150)显著降低($P<0.01$),B 组较 A 组表达明显减少($P<0.01$)。结论:在人的髓核组织中的髓核细胞(类软骨细胞)的胞核和胞浆中均存在 ER。ER- α 、ER- β 在退变的椎间盘组织都明显减少,以 ER- β 最为明显,提示雌激素可能通过 ER- β 的介导对髓核细胞功能起调控作用。

【关键词】髓核细胞;雌激素;雌激素受体;免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2013.08.13

中图分类号:R681.5,R977.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2013)-08-0739-05

基金项目:皖南医学院中青年自然科学基金(项目编号:WK2012F07)

第一作者简介:男,(1983-),医师,医学硕士,研究方向:腰椎退变性疾病

电话:(0553)5739574 E-mail:zhangyinchang_0216@yahoo.com.cn

通讯作者:董利军 E-mail:879870162@qq.com

- in inflammatory and immunomodulatory processes[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1572(2): 274-284.
8. 刘辉,尹芳秋,许崇亮. 半乳凝素-1 的神经保护作用[J]. 生命的化学, 2008, 28(3): 302-303.
9. Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, et al. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis[J]. J Neurosci Methods, 2002, 115(1): 97-105.
10. 蔡文琴,李活标. 发育神经生物学[M]. 北京:科学出版社, 1999. 82.
11. Sasaki T, Hirabayashi J, Manya H, et al. Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor[J]. Glycobiology, 2004, 14(4): 357-363.
12. Kadoya T, Oyanagi K, Kawakami E, et al. Oxidized galectin-1 advances the functional recovery after peripheral nerve injury[J]. Neurosci Lett, 2005, 380(3): 284-288.
13. Han H, Xia YY, Wang SK, et al. Synergistic effects of galectin-1 and reactive astrocytes on functional recovery after contusive spinal cord injury [J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2011, 131(6): 829-839.
14. Sakaguchi M, Okano H. Neural stem cells, adult neurogenesis, and galectin-1: from bench to bedside[J]. Develop Neurol, 2012, 72(7): 1059-1067.
15. Yamane J, Nakamura M, Iwanami A, et al. Transplantation of galectin-1-expressing human neural stem cells into the injured spinal cord of adult common marmosets [J]. J Neurosci Res, 2010, 88(7): 1394-1405.
- (收稿日期:2012-10-20 末次修回日期:2013-04-22)
- (英文编审 蒋欣/党 磬)
- (本文编辑 李伟霞)

Expression and significance of estrogen receptors in disci intervertebrales tissue/ZHANG Yinchang, Wang Qiang, YANG Xin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2013, 23(8): 739-743

[Abstract] Objectives: To investigate the relationship of ER with degeneration of intervertebral disc furtherly by detecting the expression of estrogen receptor in normal and degenerative disc tissues. **Methods:** According to Pfirrmann grading, dividing into three groups: control group, the nucleus pulposus of the normal lumbar burst fracture; observation group, the nucleus pulposus removed from women who suffered spondylolisthesis and lumbar prominent surgery, according to Pfirrmann grading, divided into group A and B. To observe the morphological changes of nucleus pulposus and nucleus pulposus cells with HE staining in control group and group A, B. To detect the expression and distribution of ER- α , ER- β in nucleus pulposus by immunohistochemical staining(Elivison two-steps) in control group and group A, B. To test the expression of ER- α , ER- β in nucleus pulposus by West-blotting in control group and group A, B. **Results:** HE staining showed that nucleus pulposus cells in the control group were intact and evenly distributed, no obvious cell apoptosis, extracellular matrix stained bright and evenly distributed. While nucleus pulposus cells in group A, B were irregular shaped and unevenly distributed, Obvious cell apoptosis, the nuclei enlarged, dark staining, extracellular matrix stained gray and unevenly distributed, group B was more obvious than group A. Immunohistochemical staining showed that obvious brown-yellow particles were stained in the nucleus pulposus of the control group, while just a little in the study group, ER- β had been found the most obvious reduced. The statistical analysis between control group and group A, B had significant difference($P<0.01$). However, the expression of ER- α did not have any significant difference between the control group and group A, B($P>0.05$). There was no significant difference between group A and B($P>0.05$). West-blotting showed that compared with control group(0.885 ± 0.036), ER- α in group A(0.876 ± 0.058), group B(0.757 ± 0.045) was lower, but no statistical significance($P>0.05$). ER- β in group A(0.947 ± 0.043), group B(0.626 ± 0.042) were significantly reduced than the control group (1.275 ± 0.150)($P<0.01$). The expression of ER- β had significant difference between the group A and B($P<0.01$). **Conclusions:** There are expression of estrogen receptors in man's nucleus pulposus cells. The expression of ER- α , ER- β were significantly reduced in degenerative disc tissue, the ER- β is most obvious. The results suggest that the function of nucleus pulposus cells may be regulated directly by estrogen through ER- β .

[Key words] Nucleus pulposus cell; Estrogen; estrogen receptor; Immunohistochemistry

[Author's address] Department of Orthopedics, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu, 241000, China

针对退变性腰椎滑脱(Degenerative spondylolisthesis)在女性中的高发病率,一直以来学者们也进行了多方面的研究探讨。导致退变性腰椎滑脱的病因很多,很复杂,具体的发病机制还不清楚。在过去几十年中,大多数研究仅强调了关节突关节形态的异常等,而DS的患有显著的性别差异,这表明性激素尤其是雌激素在DS发病中可能的作用。雌激素是人类及其他高等动物体内最重要的激素之一,具有广泛的生理功能;雌激素受体是属于甾体激素受体大家族的一种核受体,可介导雌激素实现其功能。本实验是通过检测雌激素 α 、 β 受体在正常与退变的人椎间盘组织的表达及分布,进一步探讨雌激素及其受体与椎间盘退变的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

2010年8月~2012年2月在皖南医学院弋矶山医院病理科收集的对照组椎间盘髓核组织和观察组腰椎椎间盘髓核组织,同时检测研究对象的血清17- β 雌二醇(17 β -estradiol, E2)水平。所有标本获得及操作都经过患者及家属知情同意,并通过我院伦理委员会审批。

1.2 分组

根据pfirrmann^[1]椎间盘磁共振显像分级分为三组。对照组:外伤导致腰椎爆裂性骨折手术取出的15例椎间盘组织;年龄40~52岁,平均年龄46岁,血清雌激素水平 $32.22\sim43.54\text{pg/ml}$,平均为 $36.12\pm1.23\text{pg/ml}$;Pfirrmann分级为1~2级;观察A组:15例女性腰椎滑脱及腰椎间突出手术取出的

椎间盘组织;年龄 44~60 岁,平均 52 岁,血清雌激素水平 29.15~40.84pg/ml,平均为 35.10 ± 1.09 pg/ml;Pfirrmann 分级为 3~4 级;观察 B 组:15 例女性腰椎滑脱及腰椎间盘突出手术取出的椎间盘组织;年龄 45~62 岁,平均年龄 54 岁,血清雌激素水平 27.33~41.04pg/ml,平均为 33.53 ± 1.11 pg/ml;Pfirrmann 分级为 5 级。

1.3 主要试剂

兔抗 ER- α 、ER- β (北京博奥森生物技术有限公司);兔二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)

1.4 HE 及免疫组织化学染色

取不含纤维环的髓核组织常规固定,按照酒精浓度梯度脱水透明,每块标本切成 0.2×0.2 cm 大小浸蜡包埋,将包埋好的蜡块固定于切片机上,切成 $5 \mu\text{m}$ 厚薄片。每个蜡块标本切 4 块,其中一块做 HE 染色,另外三张做免疫组织化学法染色,分别加 ER- α 抗体、ER- β 抗体、PBS 液,其中 PBS 液作为空白对照。脱蜡染色(HE 染色过程、免疫组织化学法染色过程不累述)。同法取大鼠的子宫组织,检测 ER- α 、ER- β 的分布情况,作为阳性对照。

1.5 Western-blot 实验

用微量天平称取 80mg 髓核组织,组织加入 1ml 裂解液低温快速匀浆,采用紫外分光光度法测定蛋白浓度。采用 BCA 法进行蛋白定量。取蛋白 100ug 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至 NC 膜上,用 5%脱脂奶粉室温封闭 2h,随后加入稀释的一抗(1:1000),4℃过夜。漂洗后加入稀释的二抗,室温孵育 1h。碱性磷酸酶显色试剂盒显色后,凝胶图像处理系统扫描并进行条带灰度值分析。

1.6 图像采集和统计学分析

在光学显微镜(Olympus CX31 型)下对照组和 A、B 组的每张切片连续采集 5 个视野($\times 400$ 倍),使用病理图像分析系统(CAMIAS007,China)测定每个视野下阳性反应的平均光密度,取每张 5 个视野的平均光密度的平均值作为该例的测量值,数值变量结果以均数 \pm 标准差表示,采用 SPSS 17.0 软件进行完全随机设计的单因素方差分析和 q 检验,经过统计学分析各组血清雌激素水平无显著性差异($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 HE 染色结果

对照组髓核组织,可见髓核组织中髓核细胞分布均匀,髓核细胞形态完整,未见明显细胞凋亡现象,细胞外基质染色鲜亮,分布均匀(图 1)。A、B 组髓核组织,可见髓核细胞形态不规则,分布不均匀,凋亡现象明显,细胞核增大,染色深,细胞外基质减少,色彩灰暗,B 组较 A 组更为明显(图 2)。

2.2 免疫组织化学染色

ER- α 、ER- β 在对照组的髓核组织见有明显棕黄色颗粒,在 A、B 组表达减少(图 3、4),以 ER- β 减少最显著,经统计学分析,A、B 组与对照组间 ER- β 的表达有显著性差异($P < 0.01$);ER- α 的表达无统计学差异($P > 0.05$),A 组和 B 组间无明显差异($P > 0.05$,表 1)。本研究取大鼠的 ER- α 或 ER- β 在其子宫内膜上皮及腺体的细胞质和细胞核内呈现阳性表达作为阳性对照;取对照组,其中用 PBS 代替一抗反应结果呈阴性作为阴性对照(图 5~8)。

2.3 Western-blot 检测结果

经统计学分析,A、B 组与对照组间 ER- β 的表达有显著性差异($P < 0.01$),ER- α 的表达较对照组无统计学差异($P > 0.05$)。A、B 两组间比较 ER- β 表达也有显著性差异($P < 0.01$,图 9,表 2)。

3 讨论

腰椎间盘突出作为一个完整的结构单元,由纤维环、髓核和软骨终板三部分组成。由于生理性及病理性多种因素的影响,腰椎间盘突出容易发生退行性变。腰椎间盘的退变被认为是腰椎间盘突出症、腰椎滑脱等疾病的病理基础。椎间盘退变主要表现为椎间盘细胞的老化和细胞外基质成分的变化,如髓核细胞由软骨细胞表型转变为纤维软骨细胞表型,细胞外基质中蛋白多糖、水及 II 型胶原蛋白丢失破坏了正常椎间盘和椎体的解剖结构,直接导致椎间盘力学特征丧失。

Benk 等^[2]在 7~22 周胎儿的腰椎、胸椎软骨及骺软骨中观测到了胞浆 ER 和胞核 ER,说明椎体软骨也是雌激素敏感组织。徐小彬等^[3]通过检测绝经后女性退变性腰椎滑脱患者(A 组)与女性腰椎管狭窄患者(B 组)的软骨终板内雌激素受体的表达,显示 A 组患者软骨终板中雌激素受体表达

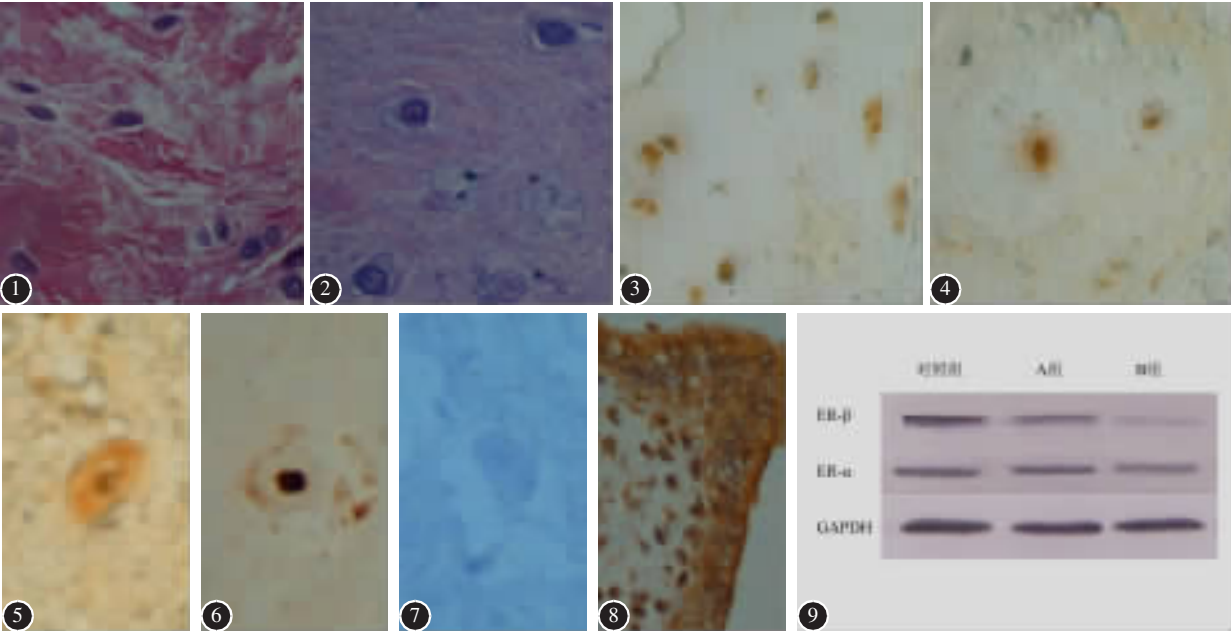


图 1 对照组髓核组织 HE 染色示髓核细胞分布均匀,形态完整,未见明显细胞凋亡现象(×400) 图 2 B 组髓核组织 HE 染色示髓核细胞形态不规则,分布不均匀,凋亡现象明显(×400) 图 3 免疫组化染色示 ER-β 在对照组髓核中有明显棕黄色颗粒(×400) 图 4 免疫组化染色示 ER-β 在 B 组髓核表达较对照组明显减少(×400) 图 5 ER-α 在对照组髓核细胞的胞核及胞浆中均有表达(×400) 图 6 ER-β 在对照组髓核细胞的胞核有显著表达(×400) 图 7 在对照组,用 PBS 代替一抗反应结果呈阴性(×400) 图 8 取大鼠的 ER-α 在其子宫内膜上皮及腺体的细胞质和细胞核内呈现阳性表达作为阳性对照(×400) 图 9 Western-blot 法检测对照组和 A、B 组 ER-α、ER-β 和 GAPDH 蛋白的表达

Figure 1 HE staining showed that nucleus pulposus cells in the control group are intact and evenly distributed, no obvious cell apoptosis(×400) **Figure 2** Nucleus pulposus cells in group B were irregular shaped and unevenly distributed, Obvious cell apoptosis(×400) **Figure 3** Immunohistochemical staining showed that obvious brown-yellow particles are stained in the nucleus pulposus of the control group (×400) **Figure 4** Immunohistochemical staining showed that brown-yellow particles obvious reduced in group B(×400) **Figure 5** The expression of ER-α in the nucleus and cytoplasm of the nucleus pulposus cells in control group(×400) **Figure 6** The expression of ER-β in the nucleus of the nucleus pulposus cells expressed significantly(×400) **Figure 7** The control group, in which the reaction with PBS instead of primary antibody were negative as a negative control(×400) **Figure 8** ER-α positive staining in rat's uterus of endometrial epithelial and glandular their cytoplasm and nucleus as a positive control(×400) **Figure 9** The expression of ER-α, ER-β and GAPDH protein in man's nucleus pulposus by west-blotting in control group and group A, B

表 1 各组 ER-α、ER-β 阳性反应平均光密度值
($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 1 The mean density of ER positive staining in esch groups of nucleus pulposus

	ER-α	ER-β
对照组 Control group	0.1189±0.0155	0.1662±0.0205
A组 Group A	0.1049±0.0093	0.0835±0.0062 ^①
B组 Group B	0.1001±0.0110	0.0688±0.0056 ^①

注:①与对照组比较 $P<0.01$
Note: Compared with control group, $P<0.01$

表 2 western-blot 法检测各组 ER-α、ER-β 蛋白表达结果
($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 2 the expression of each group of ER-α and ER-β by west-blotting

	ER-α	ER-β
对照组 Control group	0.885±0.036	1.275±0.150
A组 Group A	0.876±0.058	0.947±0.043 ^①
B组 Group B	0.757±0.045	0.626±0.042 ^{①②}

注:①与对照组比较 $P<0.01$, ②与 A 组比较 $P<0.01$
Note: ①Compared with control group, $P<0.01$; ②Compared with group A, $P<0.01$

量较 B 组患者显著下调。Wang 等^[4]研究表明,绝经后加速终板软骨退变硬化,从而影响椎间盘的营养供应和新陈代谢,影响椎间盘的退变,从而导致腰椎一系列症状。Imada 等^[5]通过病例对照研究发现卵巢切除后患者 DS 的发病率是非切除患者的 3 倍,他们认为这是由于卵巢切除造成体内雌激素水平降低导致的。Baron 等^[6]研究表明绝经前后女性的椎间盘高度有显著差别。Yves 等^[7]通过研究雌激素替代和非替代治疗的绝经后妇女椎间盘高度发现,替代治疗组能够显著维持椎间盘的高度。Li 等^[8]研究表明植物雌激素白藜芦醇能显著调节体外培养的牛髓核细胞 MMP-13 和 ADAMTS-4 的表达,提示其可能作为一种独特的生物治疗,以减缓椎间盘退变。这些研究表明雌激素有维持椎间盘高度、防止椎间盘退变的作用。借此根据我们研究所得结果推测雌激素通过其受体的介导对髓核细胞发挥保护性作用,维持髓核组织的基质成分。

本研究 HE 染色发现对照组髓核细胞分布均匀,细胞形态完整规则,基质染色鲜亮;A、B 组可见髓核细胞出现退变,形态不规则,出现合体细胞和巨大细胞,分布不均匀,凋亡现象增加,细胞核增大,染色深,细胞外基质减少。同时本研究通过免疫组织化学法及 Western-blot 法检测到在人的髓核细胞(类软骨细胞)胞核和胞浆中存在 ER- α 和 ER- β ,A、B 组髓核细胞中 ER- α 、 β 表达较对照组均有差异,且以 ER- β 表达差异性为著,A、B 组之间 ER- β 表达也有明显差异,表明髓核组织退变程度与 ER- β 的表达有紧密关系,我们推测雌激素可能主要通过 ER- β 介导对髓核细胞的结构和功能起调控作用。Lee 等^[9]在培养的软骨细胞中加入 17 β -雌二醇,发现可以降低软骨细胞 MMP-1 的合成,维持 MMPs 和 TIMPs 之间的平衡,发挥对软骨细胞的保护作用。应用同样的方法,Claassen 等^[10]发现雌激素可以保护软骨细胞免受氧化应激的损害作用。上述研究表明雌激素可以促进软骨细胞合成、分泌蛋白多糖和 II 型胶原,故我们推测雌激素可通过上述机制对髓核细胞发挥保护性作用,促进髓核细胞合成、分泌蛋白多糖和 II 型胶原,维持髓核组织的基质成分,减缓椎间盘的退变。本研究发现,在退变髓核组织中 ER- β 的表达量较对照组显著下降,且与髓核组织退变程度密切相关,以此推理,雌激素对髓核细胞的保

护性作用减弱,髓核细胞基质分泌下降、降解增加,最终加重椎间盘的退变。然而雌激素是否对髓核细胞有作用,是直接作用还是间接作用,具体的作用机制还有待进一步探索。

本研究证明了髓核细胞中存在 ER,ER- α 、ER- β 在退变椎间盘组织都明显减少,以 ER- β 最为明显,提示雌激素可能通过 ER- β 的介导对髓核细胞功能起调控作用。为进一步研究雌激素与椎间盘退变性疾病之间的关系提供了分子生物学基础。

4 参考文献

1. Griffith JF, Wang YX, Antonio GE, et al. Modified Pfirrmann grading system for lumbar intervertebral disc degeneration[J]. Spine, 2007, 32(24): 708-712.
2. Benk H, Blick SI, et al. Localization of estrogen receptors in long bones and vertebrae of human fetuses [J]. Calcif Tissue Int, 1993, 53(2): 91-96.
3. 徐小彬,吴小涛. 女性退行性腰腿痛椎体终板内雌激素受体的表达及其意义[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(4): 153-156.
4. Wang YX, Griffith JF. Menopause causes vertebral endplate degeneration and decrease in nutrient diffusion to the intervertebral discs[J]. Med Hypotheses, 2011, 77(1): 18-20.
5. Imada K, Matsui H, Tsuji H. Oophorectomy predisposes to degenerative Spondylolisthesis[J]. J Bone Joint Surg Br, 1995, 77(1): 126-130.
6. Baron YM, Brincaat MP, Calleja-Agius J, et al. Intervertebral disc height correlates with vertebral body T-scores in premenopausal and postmenopausal women [J]. Menopause Int, 2009, 15(2): 58-62.
7. Yves MB, Mark PB, Raymon DG, et al. Intervertebral disc height in treated and untreated overweight post-menopausal women[J]. HumanRepr, 2005, 20(12): 3566-3570.
8. Li X, Phillips FM, An HS, et al. The action of resveratrol, a phytoestrogen found in grapes, on the intervertebral disc [J]. Spine, 2008, 33(24): 2586-2595.
9. Lee YJ, Lee EB, Kwon YE, et al. Effect of estrogen on the expression of matrix metalloproteinase MMP-1, MMP-3, and MMP-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase MMP-1 in osteoarthritis chondrocytes [J]. Rheumatol Int, 2005, 23(6): 282-288.
10. Claassen H, Schünke M, Kurz B. Estradiol protects cultured articular chondrocytes from oxygen-radical-induced damage [J]. Cell Tissue Res, 2005, 319(3): 439-445.

(收稿日期:2012-05-28 修回日期:2013-02-16)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)