

骨组织雌激素受体及其应用的研究进展

武晓蓉 李青南审校

绝经和年龄增长是妇女骨量丢失的两个重要因素,骨组织通过破骨与成骨的偶联活动而自我更新和重建。破骨细胞吸收旧骨,然后成骨细胞形成新骨,完成一次骨转换。如果新骨不能填满旧骨被吸收后留下的空隙,则骨代谢出现负平衡,骨量减少。雌激素不足与骨转换增加及骨量丢失加速有关,是妇女绝经后骨质疏松症(PMOP)的主要原因。雌激素替代疗法(ERT)治疗 PMOP 已在临床上广泛应用,其效果在国内外都是比较肯定的,被认为是 PMOP 防治的首选治疗方案,但具体作用机制不完全清楚。目前的认识已不局限于雌激素间接通过一些钙调节剂如降钙素、甲状旁腺激素及 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 等起作用,而是有了一些新突破,研究与之相关的位于成骨细胞和破骨细胞上的雌激素受体(ER)便成为一热门课题。但长期的 ERT 会产生一些明显的副作用及可能导致靶器官的癌变,于是人们又开始寻找一种妇女绝经后使用的更安全、更易接受的激素替代疗法,因此开发理想的雌激素类药物成为另一热点,这类药物除能产生雌激素的有益效果如对骨骼、心血管系统和大脑识别能力作用,对生殖系统无或极弱刺激作用。选择性雌激素受体调节剂就是一类与雌激素受体高亲和力结合,作用有组织选择性特点的化合物。笔者就雌激素受体、选择性雌激素受体调节剂方面的研究进展作一综述。

一、雌激素受体

雌激素受体属于甾体激素、甲状腺激素和视黄酸受体超家族中成员,结合配体后诱导受体构象变化,随后与靶基因上特异的雌激素应答元件(estrogen responsive element, ERE)结合,通过辅助因子的蛋白与蛋白相互作用启动转录。受体分为二个功能域:位于 N 端的弱组成型激活功能域(AF-1)和位于 C 端强的激素依赖激活功能域(AF-2),不同配基与雌激素受体结合后的选择性作用是由于对 AF-2 区三维结构不同影响所致,AF-1 和 AF-2 协

同发挥雌激素的功能。AF-1 介导的转录激活具有细胞类型特异的特点,其结构中一些丝氨酸(S104 S106 和 S118)被 MAP 激酶或周期蛋白激酶磷酸化而激活^[1]。

自 1986 年克隆出 ER 以来,人们已普遍接受了一种 ER 的观点。十多年来的工作也证明了雌激素的靶组织与靶细胞上基本都存在 ER。至 1996 年,Kniper 等^[2]第一次报道从大鼠卵巢和前列腺 cDNA 文库中成功地克隆出一种雌激素受体的新亚型,命名为雌激素受体 β (ER- β)。于是“经典”的雌激素受体被命名为 ER- α 。ER- α 有多种剪切形式,如第 3 外显子缺失的变异体可抑制野生型 ER- α 的 DNA 结合和反式激活;又如在配体结合域中插入 23 个氨基酸残基。目前对 ER- β 的结构已经有了较为全面的认识。此基因是一种编码 485 个氨基酸的蛋白,后来又有几个研究小组相继报道了不同大小的 ER- β 异构体基因,与前者的不同点在于有些异构体具有延伸的 N 末端,另一些异构体在细胞末端有切除区或插入区。两种雌激素受体拥有相同数目的外显子, DNA 结合域基本一样,提示它们能与相似的 DNA 反应元件结合;C-末端的配体结合域有 50% 以上的氨基酸相同;ER- β 也有两个与增强基因转录有关的活化功能区(activation function, AF)即 AF-1 和 AF-2,其中 AF-1 功能弱,而 AF-2 与 ER- α 的 AF-2 相似,提示它们在转录水平对不同的雌激素反应性基因作用不同,即转录基因需要 AF-1 和 AF-2 时 ER- β 的功能较 ER- α 弱;在不需 AF-1 时两种 ER 的功能相当。两种 ER 的配体结合特性相似,但 ER- β 对雌二醇的亲合力较 ER- α 低,提示很可能在循环雌激素水平升高时 ER- β 才能被激活,ER- β 的不同变异体对雌激素的亲合力也有差异。

研究表明两种 ER 不仅可各司其职,二者间还可相互作用。体外的谷胱甘肽 S 转移酶吸引试验和体内的免疫沉淀反应均证明了这一点,并提示体内 ER- α 和 ER- β 能交互作用,起交叉信号作用^[3]。不仅如此,尚能形成异二聚体而非同源二聚体,现已表

明 hER- α 和 hER- β 的异二聚体属非配体依赖性。ER- β 的不同变异体可彼此或与 ER- α 形成异二聚体,而且形成的异二聚体具有功能活性,提示在表达两种 ER 的部位异二聚体是主要的功能形式,在不同的靶细胞内雌激素能通过两种 ER 的不同组合形式活化不同基因网络。

二、雌激素受体与骨

1. ER 与骨的关系

骨是雌激素的重要靶器官之一,雌激素对维持骨吸收和骨形成具有极其重要的作用。流行病学资料表明:部分绝经前妇女亦可发生骨质疏松,体内雌激素水平高低与骨质疏松的发生无相关性^[4],其骨质疏松的发生可能与 ER 改变有关。1980 年就有人针对雌激素对骨代谢的影响提出在骨骼中一定有雌激素受体的存在。1987 年 Gray 等人首先在体外培养成骨细胞(OB)上发现了 ER^[5]。揭示了雌激素作用于骨的靶细胞,可直接作用于 OB。1988 年 Komm 和 Erikon 在蛋白和 mRNA 水平上证明了 OB 中 ER 的存在,并发现雌激素对 OB 的作用是通过调节骨基质蛋白(酸溶胶原蛋白等)、细胞因子(TGF- β 等)和转录因子(孕激素受体等)的产生来实现的^[6,7]。1991 年 Oursler 等人在鸡的破骨细胞及从人的巨嗜细胞得到的破骨细胞上发现了 ER 的存在,并同时证明了雌激素与破骨细胞上的雌激素受体相应答有抑制骨吸收的作用^[8]。ER 在骨组织、OB、OC 中均有表达,表明雌激素对骨组织的作用,是多位点作用于多种细胞而直接调节骨代谢。动物实验发现:大鼠 ER 基因外显子 2 破坏后,致使 ER 基因剔除,不论雌性、雄性,其骨密度(BMD)均比正常鼠降低 20%~25%,而且 ER 转基因雌性大鼠去卵巢后骨密度降低,进行雌激素替代治疗后并不能改善骨密度的下降,进一步提示 ER 在骨质疏松发病中可能起到枢纽的作用。不少学者认为雌激素通过 ER 对 OB 的增殖、分化、对机械应变的适应性应答^[9]及其基质蛋白的合成有直接促进作用,而且 OB 上 ER 的表达依赖于细胞周期。但也有一些研究认为雌激素对 OB(骨形成)的调节不是其主要功能,其主要功能是雌激素通过 ER 直接诱导 OC 凋亡、直接抑制 OC 的骨吸收活性和对其他组织细胞特别是产生细胞因子的细胞的作用,间接对绝经后骨代谢产生重要的影响^[10,11]。

2. ER 在骨中的分布

目前对 ER- α 、ER- β 在骨的不同分布已有初步了解,但对其作用机制尚不甚清楚。Onoe 等研究发现

ER- β mRNA 在骨髓中的高水平表达类似与在子宫和睾丸的表达,但较在卵巢和前列腺的表达为低。ER- β mRNA 在股骨干骺端和腰椎的骨松质的表达高于股骨干骨密质^[12]。由 OVX 所致的雌激素缺乏可诱导松质骨先产生骨吸收,因此可推断雌激素调节骨再建主要在松质骨。并且,ER- β mRNA 在大鼠骨肉瘤细胞(ROS17/2.8)中的表达高于 ER- α mRNA 表达。Byers 等报道 ER- β mRNA 主要位于卵泡的粒膜细胞,而在卵巢中低水平表达的 ER- α mRNA 则没有特异的细胞定位^[12],需要进一步通过原位杂交来检测 ER- β mRNA 在骨中的分布。ER- β mRNA 在雌雄大鼠中的表达是一致的。在人成骨细胞分化期,ER- α 、ER- β 表达也是不同的^[13]。实验表明:在人成骨细胞培养期,ER- β 表达逐渐递增,在第 21 天(矿化期)ER- β mRNA 表达较第 6 天(增殖期)平均高 9.9 ± 5.3 倍($n = 3$)。而相比之下,ER- α 表达达到第 1 天才略有提高(2.3 ± 1.7 倍),然后一直维持这个水平。总之,人成骨细胞内既有 ER- α ,又有 ER- β 存在,更充分说明了骨是雌激素的靶器官。再者 ER- α 、ER- β 在成骨细胞的不同调节可推测 ER- β 对骨代谢作用略大于 ER- α ^[13]。Ushiyama 用 RT-PCR 方法首次证实了人关节软骨细胞内也存在 ER- α 和 ER- β 的基因表达,男性的表达水平显著高于女性,而取材部位(臀、腰)与取材组织(正常、关节炎)无显著差异^[14]。

3. ER 基因多态性与骨代谢

目前发现,根据 ER 基因存在 Pvu II 和 Xba I 两个多态酶切位点进行限制性片段长度多态性(RFLP)分类,被酶切断时命名为 p 或 x,没有被酶切断时命名为 P 或 X,酶切可分别产生以下基因型:PP、Pp、pp;XX、Xx、xx。根据复合基因型的等位基因构成,存在 9 种单倍型等位基因。研究表明:ER 基因多态与骨质疏松的发生存在相关性。Kobayash 等^[15]分析日本 Nagano 县 238 名绝经后健康妇女基因型与 BMD 的关系发现:腰椎 BMD 的 Z 积分与 Pvu II 位点相关,各基因型对应 BMD 高低顺序为 PP < Pp < pp,而 Xba I 多态位点基因型对应的 BMD 高低顺序为 XX < Xx < xx。Smith^[16]1994 年首次报道 ER 基因突变的 28 岁男性病例,患者以骨发育障碍和高度的骨密度降低为特征,其腰椎骨密度仅为 0.745 g/cm^2 ,低于同龄正常人 3.1 sd ,这是雌激素通过其受体发挥维持骨骼成熟及矿化作用的例证,提示即使是男性,雌激素的作用也是非常重要的,显示了雌激素在骨代谢中的重要性。

三、雌激素受体的应用——雌激素受体调节剂 (SERMs)

由于雌激素替代疗法所产生的一些副反应:如阴道出血、乳房胀痛等及可能会导致靶器官的癌变,使其仍未普遍地被广大绝经后妇女接受。从而启发人们寻找一种副作用更少、效果更好的雌激素类似物。目前,选择性雌激素受体调节剂^[17](SERMs)是国外研制的一类热门药物,在人体的一些组织,它起到ER激动剂的作用,与雌激素一样,有保护骨骼和心脏的功能,使骨矿物质密度(BMD)增加,而在人体的另一些组织(如生殖道组织)。又是ER拮抗剂。临床上SERMs已用于预防和治疗骨质疏松症,与ERT比较保留了雌激素治疗作用的同时,又去除了治疗过程中的副反应,尤其是拮抗雌激素对子宫内膜的刺激成为可能。因此该类药物既有雌激素的优点,又克服了它的缺点,是一类理想的预防和治疗骨质疏松症药物,可供绝经期妇女长期服用。SERMs的作用机制仍未清楚,但可以明确的是雌激素受体是作用的关键因素。ER与配子结合后被激活,改变构象,使其能够与特定的DNA序列和亚序列结合,激活或抑制基因的表达^[18]。SERMs无论是对于骨、胆固醇代谢所表现的雌激素激动剂的效应还是在子宫及乳腺组织中所表现的拮抗剂的作用都与ER高亲和力的相互作用有关,但作用途径却完全不同。他莫昔芬(tamoxifen)是SERMs的代表药物,对摘除卵巢大鼠的骨吸收和骨形成都有抑制作用,可防止骨量减少,但在对子宫的刺激作用和癌变关系上成了难题,所以理想的对骨和心血管具有促进作用、对子宫内膜增生有抑制作用的药物雷洛昔芬(raloxifene)被开发利用。雷洛昔芬在骨代谢中与ER结合后激活的DNA序列物与其他雌激素激动剂作用的组织中的雌激素应答元件(ERE)不同,近来的研究提示其转录性激活与转录生长因子(transforming growth factor- β_3 , TGF- β_3)有关。由于TGF- β_3 启动基因缺乏经典的ERE,这提示存在一种新的ER介导激活细胞功能的途径,被称为“雷洛昔芬应答元件”(raloxifen response element, RRE)^[19]。说明由雷洛昔芬诱导的独特构象:雷洛昔芬-ER复合物激活了RRE途径,与TGF- β_3 等特异性DNA序列结合,起到雌激素诱导剂的作用。从各种雌激素制剂对于去势小鼠骨丢失预防作用的研究^[20]可见,雷洛昔芬、他莫昔芬显示的抗骨质丢失效应类似于雌激素,主要与抑制骨吸收、不抑制骨形成及降低骨的重建率有关。雷洛昔芬对提高骨密度的有效作用还与改进去

势鼠组织的生物力学特性有关。雷洛昔芬对各脏器不同作用的机制正在研究中。

四、结语

ER- α 和ER- β 作为雌激素受体的2种类型,在结构、功能、组织学分布上既有类似的一面,又有着明显的差异。尤其是ER- β 的发现极大地开拓了人们的视野,加深了人们对雌激素信号途径的认识。SERMs的出现无疑是一种绝经后妇女HRT的重要替代物,可有效地预防和治疗骨质疏松。但它对于绝经后妇女由于雌激素水平低下导致的其他症状如神经系统、生殖道萎缩等的治疗效果尚不明确,还需在临床上进一步观察总结。另外,人们尚需对内源性雌激素与外源性天然或合成雌激素的作用位点作更深一步的思考研究,并利用这些知识开发以不同的ER为靶的更理想药物,以期能更好地治疗或预防骨质疏松及其他雌激素相关疾病。

参 考 文 献

- 1 吕秋军,温利青. 雌激素受体配体组织选择性作用机制的研究. 中国药理学杂志, 2000, 35(3):1-3.
- 2 Kuiper GGJM, Enmark E, Pelto-Hulkko M, et al. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:5925-5930.
- 3 Ogawa S et al. Blochem Biophys Res Commun, 1995; 243(1):122-126.
- 4 Ongphiphahanakul B et al. J Endocrinol Invest, 1998 21(8):487-493.
- 5 韩萍,张金萍. 骨质疏松的发病机制和病因. 现代康复, 2001, 5(2):18.
- 6 Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, et al. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. Science, 1988, 241:81-84.
- 7 Eriksen EF. Evidence of estrogen receptor in normal human osteoblast-like cells. Science, 1988, 241:84-86.
- 8 Oursle MJ. Aliran osteoclast as estrogen target cells. Proc Natl Acad Sci. USA, 1991, 88:6613-6617.
- 9 Damien E, Price JS, Lanyon LE. The estrogen receptors' involvement in osteoblast's adaptive response to mechanical strain. J Bone Miner Res, 1998, 13:1275-1282.
- 10 Shevde NK, Pike JW. Estrogen modulates the recruitment of myelopoietic cell progenitors in rat through a stromal cell-independent mechanism involving apoptosis. Blood, 1996, 87:2683-2692.
- 11 Cheleuitte D, Mizuno S, Glowacki J. In vitro secretion of cytokines by human bone marrow: effects of age and estrogen status. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83: 2043-2051.
- 12 Onoe Y et al. Endocrinology, 1997, 138(10):4509-4512.
- 13 Arts J et al. Endocrinology, 1997, 138(11):5067-5070.
- 14 Ushiyama T et al. Osteoarthritis. Cartilage, 1999; 7(6): 560-566.
- 15 Kobayashi S et al. J Bone Miner Res, 1996, 11(3):306-311.
- 16 Smith EP et al. N Eng J Med, 1994, 331(16):1056-1061.

(下转第127页)

大 0.008 kg; 则真正男性较女性增加 1 kg 体重则 BMC 增加 0.020 kg。男性较女性增多 1 kg 体重引起的 BMC 的增加, 明显大于肌肉引起的 BMC 增加。就不同部位而言, 重力或肌力何者起主导作用, 何者就对 BMC 量的影响也起主导作用。如上肢肌力起主导作用, 则上肢的男性肌肉量每大于女性 1 kg, 则相应的 BMC 增加 0.053 kg (体重每大于 1 kg 引起的 BMC 增加 0.020 kg), 男性头部既不负重, 肌肉重量也少 (瘦体重主要由脑占有), 可能是男性头部 BMC 小于女性 5.1% 的原因, 见表 3。

男女排除体重的影响 (通过男女相同体重配对或体重校正) 后对 BMC、瘦体重、握力和、骨横切面积四个指标男性都大于女性。这 4 个指标越大说明骨的力学性能越好, 反之则骨的力学性能越差: 可能是男性骨质疏松症少于女性, 轻于女性的原因。男性的 BMC 和瘦体重分别大于女性 3.5% 和 27.8%, 男性未经体重校正的握力大于女性 71.9%, 经体重校正后仍大于女性 44%。Neu^[10] 2001 年报道, 男性 20~30 岁成人的骨力学强度大于女性主要是因为桡骨横切面积大于女性 9.4% (已经体重校正)。Masekides^[11] 发现随着老龄化, 男性腰椎横切面增大了 25%~30%, 男性大于女性。目前男性骨质疏松的诊断如何考虑男性骨强度这 4 个方面的优势, 尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Albright F, Smith PH, Richardson AM. Postmenopausal osteoporosis. JAMA, 1941, 116: 2467-2474.
- 2 Garn SM. The earlier gain and the later loss of cortical bone in nutritional perspective. S. M. Garn, ed, Springfield; Charles C. Thomas, 1970.
- 3 Mosekidec L. Sex differences in age-related changes in vertebral body size, density and biomechanical competence in normal individuals. Bone, 1990, 11: 67-73.
- 4 National Institutes of Health consensus conference. J Am Med Assoc, 1984, 252: 799-802.
- 5 Greenspan LM, Mailand E, Myers E, et al. Femoral bone loss progresses with age: a longitudinal study in women over age 65. J Bone Miner Res, 1994, 9: 1959-1965.
- 6 Frost H. Relationship between muscle strength and bone strength. 99 International osteoporosis conference, Xi'an, China, 1999.
- 7 邱贵兴, 孙明贵, 孙允高. 股骨力学分析及试验. 中华医学会全国骨质疏松诊断与治疗高级研讨班, 北京: 中国, 1999. 6-10.
- 8 Rico H, Revilla M, Hernandez ER. Sex differences in acquisition of total bone mineral mass peak assessed through dual-energy X-ray absorptiometry. Calcif Tissue Int, 1992, 51: 251-254.
- 9 Gallagher. Relationship to muscle and bone. 中华医学会全国骨质疏松诊断与治疗高级研讨班, 北京: 中国, 1999. 18-22.
- 10 Neu CM, Manz F, Rauch F, et al. Bone densities and bone size at the distal radius in healthy children and adolescents: a study using peripheral quantitative computed tomography. Bone, 2001, 28: 227-232.
- 11 Mosekides L. Normal vertebral body size and compressive strength relations to age and to vertebral and iliac trabecular bone compression strength. Bone, 1986, 7: 207-212.