

托瑞米芬对更年期大鼠骨与子宫组织的选择性调节作用

夏贤 张绍芬 刘旸 蒋竞 朱慧庭 毕崇萍 刘建华

摘要: 目的 了解托瑞米芬对更年期大鼠骨与子宫组织的选择性调节作用。方法 30 只 SD 雌性大鼠(12 m 龄)随机分为更年期组(生理盐水灌胃每只 1 mL/d),雌激素组予戊酸雌二醇 800 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}$ 灌胃,托瑞米芬组予 6 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{d}$ 灌胃。3 个月处死动物,测定血清 E_2 水平、称子宫湿重、DPX-L 型双能 X 线骨密度仪测定腰椎与股骨骨密度,IMS 细胞自动图像分析系统测定子宫腔上皮厚度(μm)、子宫间质厚度(μm)、子宫横切面面积(mm^2)进行计量分析,RT-PCR 技术测定子宫内膜 ER- α mRNA 表达。结果 托瑞米芬组子宫湿重、子宫(除腔上皮以外)的各计量参数、子宫内膜 ER- α mRNA 表达水平均明显低于雌激素组和更年期组;而腰椎与股骨骨密度值与雌激素组无明显差异,均大于更年期组。结论 托瑞米芬对更年期大鼠骨组织呈类雌激素样作用,对子宫及内膜组织呈抗雌激素作用。其抗雌激素效应与 ER- α mRNA 表达下降有关,并与机体激素环境有关。

关键词: 托瑞米芬; 雌激素; 子宫内膜; ER- α mRNA; BMD

Elective modulation of toremifene on bone and uterine tissues of menopausal rats XIA Xian, ZHANG Shaofen, LIU Yang, et al. Department of Gynecology, Obstetrics and Gynecology Hospital of Fudan University, Shanghai 200011, China

Abstract: Objective To investigate the selective modulation of toremifene on the bone and uterine tissue of menopausal rats. **Methods** Thirty female SD rats(12-months old) were randomized into three groups: menopause group (fed with distilled water 1 mL/d); estrogen group (fed with estradiol valerate 800 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}$); toremifene group (fed with toremifene 6 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{d}$). All rats were sacrificed 3 months later, the level of serum estradiol(E_2) was determined and the gross weight of uterus were scaled. The lumbar and femoral bone mass density(BMD) were measured with the DEXA Bone Densitometer and the histologic parameters of the uterus were analyzed, including luminal epithelial thickness(μm), stromal thickness(μm), and cross-sectional area(mm^2) with IMS automatic cell-image-analyzing system, and the expression of endometrial ER- α mRNA was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** The gross weight and histologic parameters of the uterus except luminal epithelial thickness and the ER- α mRNA expression in toremifene group were significantly lower than those of the other two groups. No significant difference was found between the toremifene group and the estrogen group in the lumbar and femoral BMD. The lowest BMD was found in the menopause group. **Conclusions** Toremifene has estrogen-like effect on the bone tissue and anti-estrogen effect on the uterus and endometrium in menopausal rats. The anti-estrogen effect is related with the decreased ER- α mRNA expression and hormonal level of the body.

Key words: Toremifene; Estrogen; Endometrium; ER- α mRNA; BMD

基金项目: 上海市科委基础研究重点项目(04JC1492); 上海市医学重点学科(妇产科学)建设项目(05-III-0165)

作者单位: 200011 上海, 复旦大学附属妇产科医院(夏贤、张绍芬、蒋竞、朱慧庭); 南京市鼓楼医院(刘旸); 上海市华东医院(毕崇萍); 中科院上海药物所毒理组(刘建华)

通讯作者: 张绍芬, Email: zhangshaofen@163.com

托瑞米芬是在乳腺癌治疗研究中被开发的 SERM 类抗肿瘤新药, 可在乳腺癌组织发挥有效的抗雌激素效应, 绝经后妇女长期治疗应用发现有助于保持骨密度、改善血脂等有益的雌激素样效应。但托瑞米芬对子宫内膜的作用目前研究结论尚不一致。本文通过动物实验了解托瑞米芬对更年期大鼠腰椎及股骨骨密度的作用, 及其对子宫内膜的影响,

探讨托瑞米芬的选择性雌激素受体调节剂的作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象

30 只 SD 雌性大鼠(12 m 龄)由复旦大学实验动物部提供(合格证号 SCSK 沪动 0033 号),体重平均(392.99 ± 40.24)g,按清洁级标准饲养。自由饮水和标准颗粒饲料。30 只大鼠随机分为 3 组:更年期组(生理盐水灌胃每天 1 mL/只)雌激素组予戊酸雌二醇 800 μg/kg·d 灌胃(参考夏维波、孟迅吾等采用的剂量^[1])托瑞米芬组予 6 mg/kg·d 灌胃。3 个月后全部颈动脉放血处死,血标本离心取血清, - 20℃ 保存。称子宫湿重,取单侧子宫浸于 10% 福尔马林液中固定。

1.2 血内分泌激素测定

放免法测定血清雌二醇水平,试剂盒由天津德普生物技术公司提供。

1.3 腰椎与股骨骨密度

大鼠处死后采用 DPX-L 型双能 X 线骨密度仪(美国 Lunar 公司生产)测定。

1.4 子宫组织形态计量分析

采用 IMS 细胞自动图像分析系统(摄像机:Panasonic,型号 MV-CP 410,显微镜 Olympus BH。医学图像分析软件由上海申腾信息技术有限公司提供)作形态计量。测定以下指标^[2]:(1)子宫腔上皮厚度(luminal epithelial thickness,μm)每隔 0.2 mm 距离取测量点,计算平均值代表一个样本值;(2)子宫间质厚度(stromal thickness,μm)每个子宫横切面取 6 个等距离点测量,取其均数作为一个样本值;(3)子宫内膜厚度(μm),取以上二者之和代表一个样本值;(4)子宫组织横切面面积(mm²):分别测得除外围浆膜层以外的子宫横切面覆盖面积及子宫腔面积,二者相减求得。

1.5 RT-PCR 法测子宫内膜 ER-α mRNA 表达

PCR 引物根据基因库检索所得原基因序列,参考文献[3]设计,委托上海申能博彩生物技术有限公司合成。

目的蛋白	正义链及反义链序列	目的带长
ER-a	5'-TAT GGG GTC TGG TCC TGT GA-3'	359bp
	5'-ACC ATC TGG TCA GCT GTC AAG-3'	
β-actin	5'-CGT TGA CAT CCG TAA AGA-3'	173bp
	5'-AGC CAC CAA TCC ACA CAG-3'	

PCR 及反应产物半定量分析以 β-actin 为内对照,ER-α mRNA 表达水平表示为该基因扩增条带光密度值与 β-actin 基因扩增条带光密度值之比。

1.6 统计学方法

采用 SPSS11.1 统计软件进行 t 检验,各指标均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ & 0.01 作为有统计学差异的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠实验末子宫湿重、血清雌二醇水平比较

可见雌激素组子宫湿重最高,托瑞米芬组子宫湿重最低。雌激素组血 E₂ 水平明显高于更年期组与托瑞米芬组,见表 1。

表 1 各组大鼠实验末子宫湿重与血清 E₂ 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	子宫湿重(g)	E ₂ (pg/mL)
更年期组	10	0.49 ± 0.08	14.89 ± 15.23
雌激素组	10	0.76 ± 0.16 *	132.55 ± 123.97**
托瑞米芬组	10	0.31 ± 0.06 [△]	30.81 ± 27.96

注 与更年期组比, * $P < 0.01$,[△] $P < 0.01$,** $P < 0.05$;
与托瑞米芬组比, * $P < 0.01$,** $P < 0.05$

2.2 各组大鼠腰椎与股骨骨密度比较

可见雌激素组与托瑞米芬组腰椎与股骨骨密度之间无显著差异,但都明显大于更年期组,见表 2。

表 2 各组大鼠腰椎与股骨骨密度($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	腰椎骨密度(g/cm ²)	股骨骨密度(g/cm ²)
更年期组	10	0.248 ± 0.013	0.280 ± 0.014
雌激素组	10	0.307 ± 0.020 *	0.301 ± 0.010 *
托瑞米芬组	10	0.311 ± 0.012 [△]	0.300 ± 0.014 [△]

注 与更年期组比, * $P < 0.05$,[△] $P < 0.05$

2.3 各组大鼠子宫组织形态计量分析

可见雌激素组子宫组织形态计量各参数均为最高,明显大于更年期组与托瑞米芬组。托瑞米芬组除子宫腔上皮厚度外的其他各参数均明显小于更年期组,见表 3。

2.4 各组大鼠子宫内膜 ER-α mRNA 表达水平

试验末更年期组($n = 7$)、雌激素组($n = 8$)、托瑞米芬组($n = 8$),子宫内膜 ER-α mRNA 表达分别为:0.576 ± 0.210、0.859 ± 0.172、0.373 ± 0.131 雌激素组表达明显高于更年期组($P < 0.05$),亦高于托瑞米芬($P < 0.01$),托瑞米芬组表达亦明显低于更年期组($P < 0.05$),见图 1。

表 3 各组大鼠子宫组织形态计量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	子宫腔上皮厚度(μm)	子宫间质厚度(μm)	子宫内膜厚度(μm)	子宫组织横切面面积(mm^2)
更年期组	10	15.34 $\pm$ 5.46	462.69 $\pm$ 159.54	478.03 $\pm$ 159.19	4.14 $\pm$ 1.87
雌激素组	10	27.36 $\pm$ 9.81 [*]	589.18 $\pm$ 103.48 [*]	616.54 $\pm$ 105.32 [*]	6.17 $\pm$ 1.68 [*]
托瑞米芬组	10	11.23 $\pm$ 4.15	221.67 $\pm$ 50.96 [△]	232.90 $\pm$ 53.30 [△]	1.93 $\pm$ 0.39 ^{△△}

注 与更年期组比, ^{*} $P < 0.05$, [△] $P < 0.01$, ^{△△} $P < 0.05$ 与托瑞米芬组比较, ^{*} $P < 0.01$

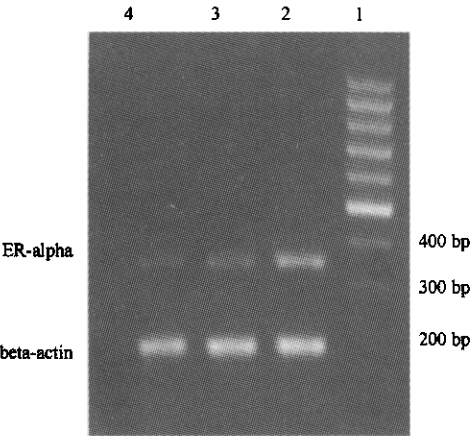


图 1 各组大鼠试验末子宫内膜 ER- α mRNA 表达情况
1. 100 bp DNA Marker; 2. 雌激素组; 3. 更年期对照组; 4. 托瑞米芬组

3 讨论

3.1 托瑞米芬对骨组织的类雌激素样作用

托瑞米芬是三苯乙烯衍生物,与三苯氧胺属于同类药物。有关托瑞米芬及三苯氧胺的临床与动物实验研究,均表明可以减少骨量丢失。Scarpellini F^[4]等采用激素替代组与托瑞米芬组的随机对照研究,对象为 65 岁以上的老年妇女。托瑞米芬 60 mg/d(或经皮雌二醇 50 $\mu\text{g}/\text{d}$)加快诺酮 0.5 mg/d 持续应用 1 年,对骨矿含量测定显示两组均改善了骨质疏松,而激素替代治疗组作用较托瑞米芬组更为明显。Frolik^[5] LI^[6]等研究均显示 17 β -雌二醇、三苯氧胺与雷洛昔芬可以预防去势导致的尿吡啶交联的升高,可以抑制骨量丢失。Karlsson^[7]等研究也证实托瑞米芬可降低尿吡啶交联蛋白及尿羟脯胺酸/肌酐水平,抑制骨吸收,并且显示可以改善小梁骨的厚度,且呈现与托瑞米芬剂量相关的作用。本研究与以往研究结果一致,托瑞米芬被证实与雌激素组作用相同可以改善更年期大鼠腰椎与股骨的骨量。托瑞米芬组与雌激素组对骨量的影响未见显著差异。

3.2 托瑞米芬对更年期大鼠子宫组织的抗雌激素作用与内膜 ER- α mRNA 表达

本实验雌激素组子宫湿重明显大于更年期组与托

瑞米芬组;子宫腔上皮、子宫间质、子宫内膜厚度及子宫组织横切面面积各参数计量也为最高,反映了高度的子宫营养作用。托瑞米芬组则显示子宫湿重及除子宫腔上皮以外的其他各子宫参数指标均低于更年期组,显示了抗雌激素作用。托瑞米芬组子宫内膜 ER- α mRNA 表达亦明显低于雌激素组与更年期组,提示托瑞米芬的抗雌激素效应与 ER- α mRNA 表达下降有关。

托瑞米芬对子宫表现出雌激素效应抑或抗雌激素效应的报道不完全一致。Kenneth^[8]采用 50 d 龄保留卵巢的 SD 雌性大鼠,予托瑞米芬 28 d,观察到对子宫生长的几乎全面的抗雌激素效应;但对子宫腔上皮却有刺激生长作用,表现出对不同组织程度不等的雌激素/抗雌激素作用。Nephew^[9]的实验也发现,卵巢完整的大鼠予托瑞米芬后,其子宫重量和肌层厚度均明显下降,但子宫腔上皮和腺上皮细胞有所增加。Karlsson S 等^[7]研究发现托瑞米芬可使去势大鼠子宫湿重增加,减轻去势引起的子宫萎缩程度,使间质和肌层厚度都有所恢复。该研究同时发现托瑞米芬与 17 β -雌二醇合并应用可以拮抗雌激素的子宫增重作用,并在一定程度上抑制了雌激素对子宫腔上皮、间质与肌层的增生作用。以上研究显示托瑞米芬作用与机体激素环境可能有关,对有一定雌激素水平者可表现出抗雌激素作用,而对卵巢切除术后雌激素水平低下者则表现为雌激素作用。本实验对象为 12 m 龄更年期大鼠并非去势鼠,体内仍有一定水平的雌激素存在,托瑞米芬治疗长达 3 m,故而表现出明显的抗雌激素效应。

托瑞米芬属于 SERM 类药物,其组织选择性作用的分子机制在近来发现雌激素受体亚型 ER- β 以后有了更进一步认识。目前认为可有 3 种相互作用的机制来解释^[10],靶组织两种 ER 亚型表达的差异;不同配体结合引起的 ER 构型变化的差异;共调节蛋白表达水平的差异及与 ER 结合的种类、数量的不同。可见其组织选择性作用机制相当复杂。本实验研究提示雌二醇、托瑞米芬甚至三苯乙烯类对子宫内膜雌激素作用可能主要由同一 ER 受体亚型 ER- α 介导,并可能是此类药物雌激素作用的主要介

质。

目前已了解 ER- β mRNA 在大鼠成骨细胞的表达高于 ER- α mRNA^[11],在人类成骨细胞中 ER- α 、ER- β 均有表达,推测 ER- β 对骨代谢的作用略大于 ER- α ^[12]。ER- α 的表达和调控可能在破骨细胞形成中发挥重要作用^[13]。本研究有关 ER- α mRNA 表达的研究仅是初步的工作,有关 SERM 类药物对骨代谢与子宫内膜及其他靶组织的选择性雌激素受体调节机制还有待深入的研究。

【 参 考 文 献 】

- [1] Xia WB, Meng XW, Xing XP, et al. Effects of estradiol valerate on osteoporosis in ovariectomized rats. Chin J Obstet gynecol, 2001, 36 : 606 -609. (in Chinese)
- [2] Ke HZ, Chen HK, Simmons HA, et al. Comparative effects of droloxifen, Tamoxifen, and estrogen on bone, serum cholesterol, and uterine histology in the ovariectomized rat model. Bone, 1997, 20 : 31-39.
- [3] Martha L. Campbell-Thompson, Estrogen receptor α and β expression in hypergastrointestinal tract with reulation of Trefol Factor Family 2 mRNA levels in ovariectomized rats. Biochemi Biophysi Res Commun, 1997, 240 : 478-483.
- [4] Scarpellini F, Sbracia M. A controlled trial between hormone replacement therapy and toremifene in aged post-menopausal women 65 years old or more. Fertil steril, 2000, 4 : 188.
- [5] Frolik CA, Bryant HU, Black EC, et al. Time-dependent changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomised

rats Effects of raloxifene HCL, tamoxifen, Oestrogen and alendronate. Bone, 1996, 18 : 621-627.

- [6] Li XM, Takahashi K, Kushida S, et al. The effect of tamoxifen on bone metabolism and skeletal growth is different in ovariectomised and intact rats. Calci. Tissue Int, 1996, 59 : 271-276.
- [7] Karlsson S, Mantyla E, Hirsimaki Y, et al. The effect of toremifene on bone and uterine histology and on bone resorption in Ovariectomised Rats, Pharmacology and Toxicology, 1999, 84 : 72-80.
- [8] Kenneth PN, Elizabeth O, Ronald A, et al. Effect of oral administration of Tamoxifen, Toremifen, Dehydroepiandrosterone, and Vorozole on uterine histomorphology in the rat (44493). Society for Experimental Biology and Medicine, 2000, 223 : 288-294.
- [9] Nephew KP, Osborne E, Lubet RA, et al. Effects of oral administration of tamoxifen, toremifene, dehydroepiandrosterone, and vorozole on uterine histomorphology in the rat. Proc Soc Exp Biol Med, 2000, 223 : 288-294.
- [10] Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators-mechanisms of action and application to clinical practice. New Eng Jour Med, 2003, 349 : 618-629.
- [11] Dnoe Y, Miyaura C, Ohta H, et al. Expression of estrogen receptor beta in rat bone. Endocrinology, 1997, 138 : 4509-4512.
- [12] Arts J, Kuiper GG, Janssen JM, et al. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFD cells. Endocrinology, 1997, 138 : 5067-5070.
- [13] Oreffo RO, Kusec V, Virdi AS, et al. Expression of estrogen receptor-alpha in cells of the osteoclastic lineage. Histochem cell Biol, 1999, 111 : 125-133.

(收稿日期: 2005-08-01)