

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.03.016

## 去势大鼠髌突软骨雌激素受体及 II 型胶原表达的研究\*

张跃蓉,白建新,刘忠林,范迪

(遵义医学院口腔解剖生理学教研室,贵州遵义 563003)

**[摘要]** 目的 观察去势大鼠髌突软骨组织学变化,并检测雌激素受体(ER)和 II 型胶原(Col II)的表达,分析去势后髌突软骨生长代谢的变化,探讨雌激素缺乏与颞下颌关节骨关节炎(OA)的关系。方法 HE 染色观察大鼠去势后不同时期髌突软骨组织学变化,免疫组织化学法检测去势大鼠髌突软骨 ER 及 Col II 表达,并运用图像分析仪测量并计算其平均阳性染色面积百分比。结果 雌激素缺乏导致髌突软骨退行性改变。去势后大鼠 ER 和 Col II 的表达受到抑制,且随作用时间的延长,其作用增强。结论 雌激素缺乏或低下导致大鼠髌突软骨病损。低浓度雌激素降低或抑制 ER 表达,髌突软骨胶原表达与雌激素相关。

**[关键词]** 软骨;受体,雌激素;胶原;髌突软骨;平均阳性染色面积百分比

**[中图分类号]** R323;R780.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)03-0339-03

## Expression of ER and type II collagen in the condylar cartilage of ovariectomized rats\*

Zhang Yuerong, Bai Jianxin, Liu Zhonglin, Fan Di

(Department of Oral Anatomy and Physiology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the dynamic histological changes of condylar cartilage, and detect expression of estrogen receptors and collagen type II in the ovariectomized rat, exploring the relationship between OA and abnormality of shorting estrogen. **Methods** Histological changes of condylar cartilage of the ovariectomized rat at different ages were observed by HE staining method. The expression of estrogen receptors and collagen type II were determined by immunohistochemical method, and the average percentage of positive staining area was measured by image analyzer. **Results** The lack of estrogen led to the degeneration of condylar cartilage. The expression of ER and Col II were suppressed at low concentration of estrogen, and these effects were enhanced when the treating time was prolonged. **Conclusion** The lack of estrogen might lead to the rat's condylar cartilage lesion, and the low concentration of estrogen could suppress the expression of ER. These results highlight the results that expression of condylar cartilage collagen is associated with estrogen.

**[Key words]** cartilage; receptors, estrogen; collagen; condylar cartilage; average percent of positive area

雌激素与雌激素受体(estrogen receptors, ER)结合在生物体内有着十分广泛的生物学效应,ER 的数量及功能与雌激素的生物学效应发挥密切相关。研究报道多种属颞下颌关节中均存在 ER,且以髌突软骨分布最多,因此探究雌激素对髌突软骨的生物学作用日益受到重视。雌激素水平的异常变化,通过不同作用机制导致软骨动态代谢失衡出现一系列生理和病理改变,提示雌激素水平对维持软骨的正常功能具有重要意义,由此推测雌激素对颞颌关节紊乱病(temporomandibular joint disorder, TMD)的发生、发展有重要影响,而雌激素的生物学效应及平衡无一不与 ER 息息相关。ER 主要有两种亚型 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ ,其不论是生物学效应还是分布均存在较大的差异,这是 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  在不同组织发挥不同生物学效应的基础。探究髌突软骨雌激素的生物学效应,可为临床运用雌激素替代治疗(estrogen replacement therapy, ERT) TMD 提供可靠的实验依据。本实验拟采用苏木素-伊红(HE)染色和免疫组织化学的方法检测去势大鼠不同时期髌突软骨形态学变化,以及软骨内 ER 和 II 型胶原(collagen type II, Col II)的差异表达,以期对雌激素缺乏与颞下颌关节骨病之间的相关性提供有力佐证。

## 1 材料与方 法

## 1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 12 周龄未交配雌性 SD 大鼠 32 只,体质量 200~250 g,第三军医大学提供。平均分为 4 组(对照

组、去势一月组、去势二月组、去势三月组),适应性饲养 3 d 后动物实验。

1.1.2 实验试剂及仪器 ER $\alpha$  多克隆抗体、ER $\beta$  多克隆抗体、抗体稀释液(博奥森,北京);兔抗鼠 Col II 单克隆抗体、柠檬酸抗体修复液、通用型兔二步法免疫组织化学检测试剂盒、山羊血清封闭液、胃蛋白酶消化液、DAB 显色试剂盒(中杉金桥,北京);Olympus 显微镜(IX71, Japan);自动显微照相装置(QIM-AGING, Canada)。

## 1.2 方法

1.2.1 动物处理 采用背入式方法行大鼠双侧卵巢切除术。

1.2.2 标本制备 麻醉下(25%乌拉坦, 5 mg/kg)整体取出双侧颞下颌关节,多聚甲醛固定,乙二胺四乙酸(EDTA)液中脱钙 4 d,常规脱水,石蜡包埋切片(厚约 4  $\mu$ m)。

1.2.3 HE 染色 常规 HE 染色,LeicaDM2500 显微镜下应用 Leica qwin 软件采集图像。

1.2.4 免疫组织化学染色 常规脱蜡至水,3%的过氧化氢孵育 15 min,微波法抗原修复,自然冷却至室温,正常血清 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min 封闭非特异性位点,Col II 单克隆抗体,雌激素受体(ER $\alpha$ , ER $\beta$ )多克隆抗体以 1:50 稀释,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日依次经通用型兔二步法免疫组织化学检测试剂盒 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,常规二氨基联苯胺(DAB)显色 3 min,苏木素轻度衬染,脱水透明封片,应用 Leica qwin 软件采集图像,在髌突软骨前、中、后部各选取 3 个 80 $\times$ 80 像素大小的区域,分别测量阳

性染色面积和被测量面积,最后计算出总的平均阳性染色面积百分比。

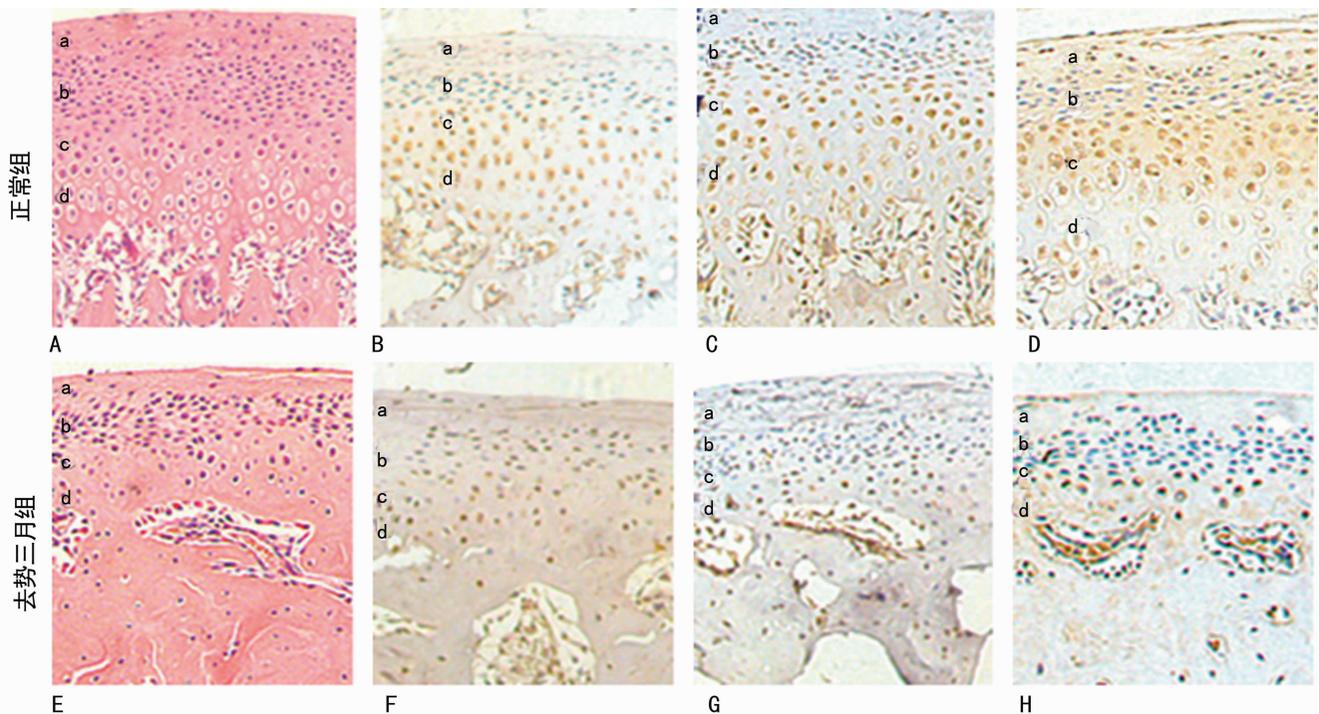
**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,进行单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠髌突软骨 HE 染色结果** 对照组大鼠髌突软骨各层细胞排列整齐,界限清晰,增殖层和过渡层细胞较小,排列紧密,肥大层细胞胞核大而深染;去势组大鼠髌突软骨厚度变薄,尤以肥大层明显,细胞排列无序,界限不清晰,细胞层数由对照组的 6~8 层减少至 3~4 层,肥大层细胞体积明显变小,胞核亦较小且淡染,细胞密度稀疏,见图 1。

**2.2 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  免疫组织化学染色观察** 对照组 ER $\alpha$  主要在过渡层和肥大层表达,过渡层细胞质内可见大量棕黄色的异染基质,而细胞核偶见异染棕黄色,细胞外基质呈浅蓝色;肥大层

软骨细胞的细胞质与细胞核均被异染成棕黄色,且分布均匀,钙化软骨层 ER $\alpha$  少量表达,纤维层和增殖层未见表达。去势组细胞明显小于对照组,细胞核亦较小,ER $\alpha$  仅表达于肥大层的软骨细胞内,细胞质少有棕黄色染色,而细胞核均被异染成棕黄色,随着去势时间的延长,肥大层细胞明显变小,密度降低,软骨细胞内 ER $\alpha$  阳性染色逐渐减弱。对照组 ER $\beta$  在大鼠髌突软骨呈不均质性分布,纤维层和增殖层未见表达,过渡层可见 ER $\beta$  表达,细胞质被异染成棕黄色,细胞核呈浅蓝色,ER $\beta$  集中表达于肥大层,细胞质与细胞核均可被异染成棕黄色,且以细胞核内强表达,钙化软骨层 ER $\beta$  少量表达,颜色较前两层浅。去势组大鼠过渡层偶见 ER $\beta$  表达,主要表达在细胞质,ER $\beta$  集中表达于肥大层,细胞质与细胞核均可被异染成棕黄色,且以细胞核内强表达。随时间的延长,肥大层细胞逐渐变小,细胞核亦变小,其在细胞内的表达亦较弱,染色较浅,有些细胞甚至不表达,见图 1。



a:纤维层;b:增殖层;c:过渡层;d:肥大层。A:正常组大鼠髌突软骨 HE 染色;B:正常组大鼠髌突软骨 ER $\alpha$  免疫组织化学染色;C:正常组大鼠髌突软骨 ER $\beta$  免疫组织化学染色;D:正常组大鼠髌突软骨 CII 免疫组织化学染色;E:去势三月组大鼠髌突软骨 HE 染色;F:去势三月组大鼠髌突软骨 ER $\alpha$  免疫组织化学染色;G:去势三月组大鼠髌突软骨 ER $\beta$  免疫组织化学染色;H:去势三月组大鼠髌突软骨 CII 免疫组织化学染色。

图 1 大鼠髌突软骨中部 HE 及免疫组织化学染色结果 ( $\times 100$ )

**2.3 Col II 的免疫组织化学染色观察** 对照组 Col II 在大鼠髌突软骨呈不均质表达:髌突软骨纤维层、增殖层可见小而密集的细胞,细胞核染成蓝色,细胞质及细胞外基质染成极浅的淡黄色,不易分辨;过渡层的细胞外基质染成较浅的棕黄色,细胞核染色较浅,细胞质染色较深,细胞与细胞外基质界限不清;肥大层细胞外基质染成大片棕黄色,与细胞界限清晰,细胞质染色较深而细胞核染色较浅;钙化软骨层外基质较少,可见少量条状异染棕黄色基质,细胞质呈空泡状,细胞质与细胞核界限清晰。去势组髌突软骨 CII 集中表达于肥大层软骨细胞胞外基质,细胞内亦有少量棕黄色染色,主要表达在细胞质内。随着去势时间的延长,细胞内和细胞外 Col II 阳性表达逐渐减弱,见图 1。

**2.4 平均阳性面积百分比** 去势组大鼠髌突软骨 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、Col II 平均阳性面积百分比比较对照组均明显降低,具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。且随去势时间延长,ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、Col II 的平均

阳性面积百分比均逐渐降低,见表 1。

表 1 大鼠 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、Col II 免疫组织化学染色平均阳性面积百分比 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	n	ER $\alpha$	ER $\beta$	Col II
对照组	8	36.7 $\pm$ 1.0	33.7 $\pm$ 0.7	55.5 $\pm$ 3.1
去势一月组	8	25.3 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	14.8 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	46.9 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>
去势二月组	8	20.6 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	7.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	29.1 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>
去势三月组	8	9.6 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	4.0 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	13.5 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

## 3 讨论

国内外众多研究显示,动物或人的关节组织内 ER 表达与雌激素的水平密切相关,雌激素发挥生理作用需要 ER 的介导,与受体结合,形成激素-受体复合物,进入细胞核或细胞质

内,诱导不同生物化学效应<sup>[1-2]</sup>。

Dai 等<sup>[3]</sup>和 Oshima 等<sup>[4]</sup>应用免疫组织化学技术和葡聚糖-炭末法在电镜下定量大鼠关节软骨 ER 表达水平,发现老年雌性大鼠和去势大鼠 ER 表达量明显下降,而于世宾等<sup>[5]</sup>的实验结果提示早期应用雌激素干预可抑制去势大鼠髌突软骨中 ER 水平降低,从而防止 OA 的发生。另有研究证明,ER 调节剂具有 ERT 的作用,且能促进 ER 的表达水平<sup>[6]</sup>。本实验通过免疫组织化学方法检测去势后大鼠不同时期髌突软骨 ER 差异表达,结果显示,随着去势时间延长,ER 的平均阳性染色面积百分比呈倍增降低,借此,推测雌激素水平的降低,抑制了髌突软骨细胞 ER 的表形和表达,进而出现髌突软骨的病变。有学者分析,去势或卵巢功能衰竭后 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  的表达下调,是由于体内雌激素水平过低导致“相对闲置”的 ER 降解,进而导致 ER 的下降。且 ER 主要分布在肥大层,其表达水平与肥大层及过渡层的厚度密切相关。因此,随着机体雌激素水平的异常改变,ER 降低,依赖于 ER 调节机制失衡,导致细胞代谢紊乱,肥大层逐渐变薄,细胞数量减少<sup>[7]</sup>。

有研究证明在雌激素水平波动时,可以通过影响白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和基质金属蛋白酶(MMPs)等相关细胞因子,进而影响髌突软骨的代谢<sup>[8-10]</sup>。庞磊等<sup>[11]</sup>和宋春平等<sup>[12]</sup>研究结果显示,雌激素影响髌突软骨细胞的增殖分化,依剂量不同其作用具有双向性,在生理剂量范围内(10<sup>-10</sup>-10<sup>-8</sup>M),表现为促进作用,且与剂量呈正相关,高浓度或低浓度的雌激素水平均会降低软骨细胞增殖,增加细胞凋亡。本实验以动物模型为研究对象,髌突软骨 HE 染色结果显示,大鼠机体低浓度雌激素水平时,呈现出髌突软骨细胞生长代谢被抑制的表象,表现为细胞和细胞核变小,细胞层数减少,细胞密度降低,排列层次紊乱,软骨厚度变薄等。

张跃蓉等<sup>[2]</sup>实验证明 ER 与 Col II 在髌突软骨中分布一致,雌激素可选择性的结合不同亚型的 ER,从而调节髌突软骨细胞分泌 Col II 的能力。动物实验表明,卵巢切除后,大鼠髌突关节表面出现胶原纤维松解、肥大层变薄、软骨层次紊乱及骨小梁疏松等一系列的退行性样改变;Oestergaard 等<sup>[6]</sup>在研究去势 SD 大鼠模型发现,Col II 的降解定位于软骨缺损区。Ravn 等<sup>[13]</sup>发现,ERT 治疗的绝经后妇女,尿中 Col II 羧基末端肽的水平降低,推断 Col II 的降解水平明显降低,表明 Col II 降解受到抑制。本实验结果显示,去势组大鼠髌突软骨内 Col II 的平均阳性染色面积百分比随着去势时间延长显著下降,证明雌激素的缺乏导致髌突软骨 Col II 降解,细胞外基质损失,软骨出现病损。有研究显示,去势后由于关节软骨内 ER 应激能力降低,软骨组织中 MMP 表达增高,使其与组织抑制物金属蛋白酶抑制物(TIMPs)的平衡被打破,导致 Col II 代谢增加,软骨基质破坏;Li 等<sup>[8]</sup>研究证明在雌激素缺乏的情况下,骨关节内 IL-1 $\beta$ 、IL-6 $\beta$  的含量会升高,而 IL-1 $\beta$ 、IL-6 $\beta$  受体拮抗剂(IL-1 $\alpha$ )的活性会被抑制,转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )能促进蛋白多糖的合成和软骨细胞的增殖<sup>[14]</sup>,并刺激 TIMPs 合成,抑制了 MMPs 对软骨的降解作用,机体内生理浓度的雌二醇有利于软骨细胞表达 TGF- $\beta$ 1,雌二醇浓度的降低将减少 TGF- $\beta$ 1 表达,且不利于髌突软骨细胞的表型的维持;邢艳等<sup>[15]</sup>的动物实验研究也表明,雌激素的异常变化能同时引起 RA 滑膜细胞 IL-6、IL-1 及 MMP-1/TIMP-1 mRNA 的异常表达,提示雌激素水平相对过高或过低,可以通过影响关节滑膜等组织,间接对关节软骨产生不利的影响。雌激素对髌突软骨的影响需要的 ER 介导,所以最终作用机制与 ER 的异常表达也密切相关。

## 参考文献

- [1] Nozawa-Inoue K, Amizuka N, Ikeda N, et al. Synovial membrane in the temporomandibular joint—its morphology, function and development [J]. Arch Histol Cytol, 2003, 66(4): 289-306.
- [2] 张跃蓉, 庞磊, 刘忠林. 雌激素受体与 II 型胶原在人髌突软骨中的表达 [J]. 华西口腔医学杂志, 2013, 31(5): 526-529.
- [3] Dai G, Li J, Liu X, et al. The relationship of the expression of estrogen receptor in cartilage cell and osteoarthritis induced by bilateral ovariectomy in Guinea pig [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2005, 25(6): 683-686.
- [4] Oshima Y, Matsuda K, Yoshida A, et al. Localization of estrogen receptors alpha and beta in the articular surface of the rat femur [J]. Acta Histochem Cytochem, 2007, 40(1): 27-34.
- [5] 于世宾, 王美青, 赵伟. ER $\alpha$  在大鼠颞下颌关节中表达的初步研究 [J]. 口腔医学研究, 2005, 21(5): 6-9.
- [6] Oestergaard S, Sondergaard BC, Hoegh-Andersen P, et al. Effects of ovariectomy and estrogen therapy on type II collagen degradation and structural integrity of articular cartilage in rats; implications of the time of initiation [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(8): 2441-2451.
- [7] Wu S, Ruan Y, Zhu X, et al. Estrogen receptors and the activity of nitric oxide synthase in the artery of female rats receiving hormone replacement therapy [J]. Horm Res, 2000, 53(3): 144-147.
- [8] Li H, Cuartas E, Cui W, et al. IL-1 receptor-associated kinase M is a central regulator of osteoclast differentiation and activation [J]. J Exp Med, 2005, 201(7): 1169-1177.
- [9] Yang SY, Wu B, Mayton L, et al. Protective effects of IL-1Ra or vIL-10 gene transfer on a murine model of wear debris-induced osteolysis [J]. Gene Ther, 2004, 11(5): 483-491.
- [10] 徐晓梅, 税桦桦, 黄丽, 等. 异常咬合对成年大鼠颞颌关节影响的初步研究 [J]. 泸州医学院学报, 2010, 33(2): 133-137.
- [11] 庞磊, 张跃蓉, 刘忠林. 雌激素对人髌突软骨细胞增殖分化的影响 [J]. 华西口腔医学杂志, 2013, 31(6): 628-632.
- [12] 宋春平, 汲平. 雌激素对颞下颌关节的影响 [J]. 口腔颌面修复学杂志, 2007, 8(4): 301-303.
- [13] Ravn P, Warming L, Christgau S, et al. The effect on cartilage of different forms of application of postmenopausal estrogen therapy: comparison of oral and transdermal therapy [J]. Bone, 2004, 35(5): 1216-1221.
- [14] 万荣, 杨庆铭, 邓廉夫, 等. 雌激素对关节软骨细胞生长因子 mRNA 表达的影响 [J]. 上海医学, 2005, 28(2): 104-106.
- [15] 邢艳, 蒋红, 刘青松, 等. 雌激素对 RA 滑膜细胞增殖和炎症介质表达的影响 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(2): 130-133.