

氟维司群对未成熟小鼠子宫和阴道雌激素受体表达的影响

曲亚坤¹, 李鑫², 陈婷², 徐颖², 林娜^{1,2*}(¹首都医科大学中医药学院, 北京 100069; ²中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要 为观察氟维司群对雌激素效应的作用及其对靶器官中雌激素受体表达的影响, 以未成熟小鼠为实验模型, 随机分成正常对照组、氟维司群(500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ip)组、17 β -雌二醇组(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ig)和17 β -雌二醇+氟维司群(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ +500 $\mu\text{g}/\text{kg}$)4组, 给药7 d后麻醉取小鼠的子宫和阴道, HE染色法观察其组织形态学变化、免疫组织化学和Western blot技术检测其雌激素受体 α (ER α)和雌激素受体 β (ER β)表达的情况。结果显示, 氟维司群可明显影响未成熟小鼠子宫和阴道的生长发育和雌激素受体的表达, 同时可显著抑制17 β -雌二醇的促未成熟小鼠子宫、阴道生长发育以及促雌激素受体表达的作用。提示氟维司群具有抗雌激素样作用, 其机制可能与下调靶器官雌激素受体表达有关。

关键词 氟维司群; 子宫; 阴道; 雌激素受体; 表达

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)02-0210-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160214

引用本文 曲亚坤, 李鑫, 陈婷, 等. 氟维司群对未成熟小鼠子宫和阴道雌激素受体表达的影响[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(2): 210-214.

Cite this article as: QU Yakun, LI Xin, CHEN Ting, *et al.* Effects of fulvestrant on the estrogen receptor expression in uterus and vagina of immature mice[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(2): 210-214.

Effects of fulvestrant on the estrogen receptor expression in uterus and vagina of immature mice

QU Yakun¹, LI Xin², CHEN Ting², XU Ying², LIN Na^{1,2*}¹School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069;²Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract To observe the estrogen-like effects of fulvestrant and its influence on estrogen receptor expression of fulvestrant, this study set control, fulvestrant (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ip), 17 β -estradiol (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ig) and 17 β -estradiol + fulvestrant (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ +500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) groups. 7 days after dosing, mice were anesthetized; their uterine and vagina were collected. HE method was used to determine morphological changes of the tissues; protein expression levels of estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β) in uterus and vagina were detected by immunohistochemistry and Western blot. The results showed that fulvestrant could obviously influence the growth of the uterus and vagina and expression of estrogen receptor in immature mice. Meanwhile, fulvestrant could significantly inhibit the growth of the uterus and vagina and increase estrogen receptors expression in immature mice. The research showed that fulvestrant has anti-estrogen-like effects, which may be related to the down-regulation of estrogen receptor expression in the target organs.

Key words fulvestrant; uterus; vagina; estrogen receptor; expression

This study was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB505300, No. 2011CB505305) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81573632)

收稿日期 2015-12-04 **通信作者** * Tel: 010-64014411-2869 E-mail: linna888@163.com

基金项目 国家重点基础研究发展计划(“九七三”计划)资助项目(No. 2011CB505300, No. 2011CB505305); 国家自然科学基金资助项目(No. 81573632)

氟维司群(fulvestrant, ICI)是一种类固醇抗雌激素药物,其化学结构与雌二醇类似,为 17β -雌二醇(estradiol, E_2)的烷基胺类似物^[1],但无雌激素样作用。临床上作为一类雌激素受体(estrogen receptors, ERs)下调剂广泛用于乳腺癌的治疗,在缺乏雌激素的情况下,较大程度地延缓肿瘤的生长,对于ERs 阳性晚期乳腺癌患者具有良好疗效^[2]。ICI 可以克服第一代选择性雌激素受体拮抗剂他莫西芬治疗乳腺癌过程中导致患者发生子宫内膜癌的缺点^[3-4],而其对生殖系统的作用及机制的研究报道较少,多直接用于雌激素样作用受体机制实验研究的工具药,未见其对实验动物的生殖靶器官子宫和阴道的形态及ERs 的分布及表达影响的系统报道。本实验通过未成熟小鼠模型,观察ICI 对小鼠子宫、阴道形态学及ERs 的作用,并探讨其相关机制。

1 材 料

1.1 药品与试剂

17β -雌二醇(美国Sigma 公司);氟维司群(上海瀚香生物科技有限公司);伊红染液、苏木精染液(北京中杉金桥生物技术有限公司);两步法免疫组化试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);兔抗鼠ER α 抗体、ER β 抗体(北京盛世中方生物技术有限公司);ECL 发光剂(北京普利莱基因技术有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪 器

BMJ-1 生物组织包埋机、QPJ-C 轮转式切片机、ZPJ-1A 展片机、KPJ-1A 烤片机(天津天利航空机电有限公司);BX60 光学显微镜(美国Olympus 公司);电泳仪(美国Bio-Rad 公司);凝胶成像仪(法国Vilber Lourmat 公司)。

1.3 动 物

昆明种小鼠,雌性,出生21 d,体重(9~12) g,购自中国军事医学科学院,动物许可证号SYXK(军)2012-0004。实验期间饲养在二级动物室,室温(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2 方 法

2.1 分组及给药

健康雌性未成熟小鼠40只,随机分为4组:对

照组、ICI 组、 E_2 组、 E_2 + ICI 组,每组10只。ICI 组500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ICI 混悬液腹腔注射给药, E_2 组100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ E_2 混悬液灌胃给药, E_2 + ICI 组同时给ICI 及 E_2 ,两种药物给药中间间隔0.5 h,对照组给予等量的蒸馏水及生理盐水灌胃和腹腔注射,每天1次,连续7 d。处死前禁食12 h。

2.2 取 材

小鼠末次给药后24 h,称重,麻醉,脱颈处死后迅速剖腹摘取子宫和阴道。左侧子宫角、宫颈近端阴道部分放入10%的甲醛溶液中固定,供形态学观察和免疫组织化学检测;右侧子宫角、宫颈远端阴道部分立即置于 -80°C 冰箱冷藏,等待Western blot 检测^[5]。

2.3 组织形态学观察

子宫和阴道组织经10%甲醛溶液固定48 h后,流水冲洗30 min,进行脱水和石蜡包埋并切片,进行HE 染色,中性快干胶封片,在光学显微镜下进行组织形态学检查^[5]。

2.4 免疫组织化学染色

按“2.3”项下方法制备组织切片,脱蜡水化,3%双氧水封闭,微波修复至室温后血清封闭,滴加兔抗鼠ER α /ER β 多克隆抗体(1:20 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后,用两步法免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒进行ER α /ER β 免疫组织化学染色。显微镜下观察显色效果,约2 min 至棕黄色时用蒸馏水充分洗涤中止反应,脱水后中性快干胶封片,在光学显微镜下进行免疫组织化学检查^[5]。

2.5 Western blot 检测 ERs 蛋白

子宫、阴道组织用RIPA 试剂(50~100 mg 组织,加裂解液500~1 000 μL)提取蛋白,制备12% SDS-聚丙烯酰胺分离胶和5%堆积胶,电泳后湿转至PVDF 膜上。5%(TBST 稀释)脱脂奶粉室温振荡封闭2 h 后一抗ER α (1:200)或ER β (1:1 000)或GAPDH(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。恢复室温后TBST 洗膜,用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(1:5 000)孵育2 h,洗膜后加入ECL 反应1 min,采用凝胶成像系统观察印迹结果,以蛋白条带灰度代表蛋白表达量,最终以目的蛋白与GAPDH 的比值来评价蛋白表达水平^[5]。

2.6 统计方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,采用SPSS 16.0 软件进行统计分析, $P < 0.05$

表示有显著性差异。

3 结 果

3.1 ICI 对未成熟小鼠靶器官组织形态学的影响

组织切片(图 1)显示,对照组为正常发育的小鼠,子宫形态表现为宫腔大,子宫内膜上皮为呈单层正方形,子宫内膜间质紧密,少见腺体,与对照组比较,ICI 组子宫体积明显变小,子宫内膜变薄,内膜上皮细胞多为单细胞紧密排列,几乎不见腺体;E₂ 组宫腔变大,子宫内膜明显加厚,腺体丰富;与 E₂ 组比较,E₂ + ICI 组子宫体积明显变小,子宫内膜变薄,腺体数目明显减少。

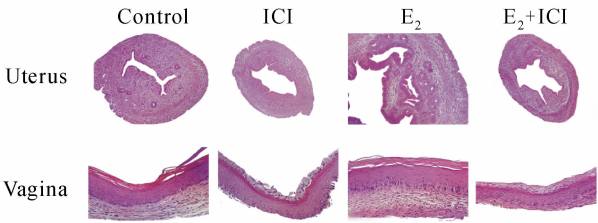


Figure 1 Effects of fulvestrant (ICI) on the histology of uterus and vagina in the immature mice (×200)
E₂: Estradiol

对照组的阴道组织上皮由 1~2 层鳞状上皮组成,具有角化细胞层,与对照组比较,ICI 组阴道萎缩,阴道上皮细胞层变薄,角化程度降低;E₂ 组阴道上皮角化明显,鳞状上皮细胞层增厚明显;与 E₂ 组比较,E₂ + ICI 组阴道明显萎缩,阴道上皮细胞层数减少。

3.2 ICI 对未成熟小鼠靶器官 ER 亚型分布的影响

免疫组化结果(图 2)显示,对照组的 ER α 主要表达在子宫内膜、腺上皮细胞和子宫间质中,ER β 主要分布在子宫内膜和腺上皮细胞中;ICI 组子宫 ER α 、ER β 阳性表达相对减弱,腔上皮及腺上皮阳性细胞较少,内膜间质中基本无阳性表达;E₂ 组 ER α 、ER β 在小鼠子宫内膜上皮和腺上皮细胞、内膜间质细胞中阳性表达均很明显,其中 ER β 稍弱于 ER α (与对照组比较, $P < 0.01$, $P < 0.001$);与 E₂ 组比较,E₂ + ICI 组 ER α 、ER β 在腔上皮和腺上皮表达均明显减弱(与 E₂ 组相比, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。

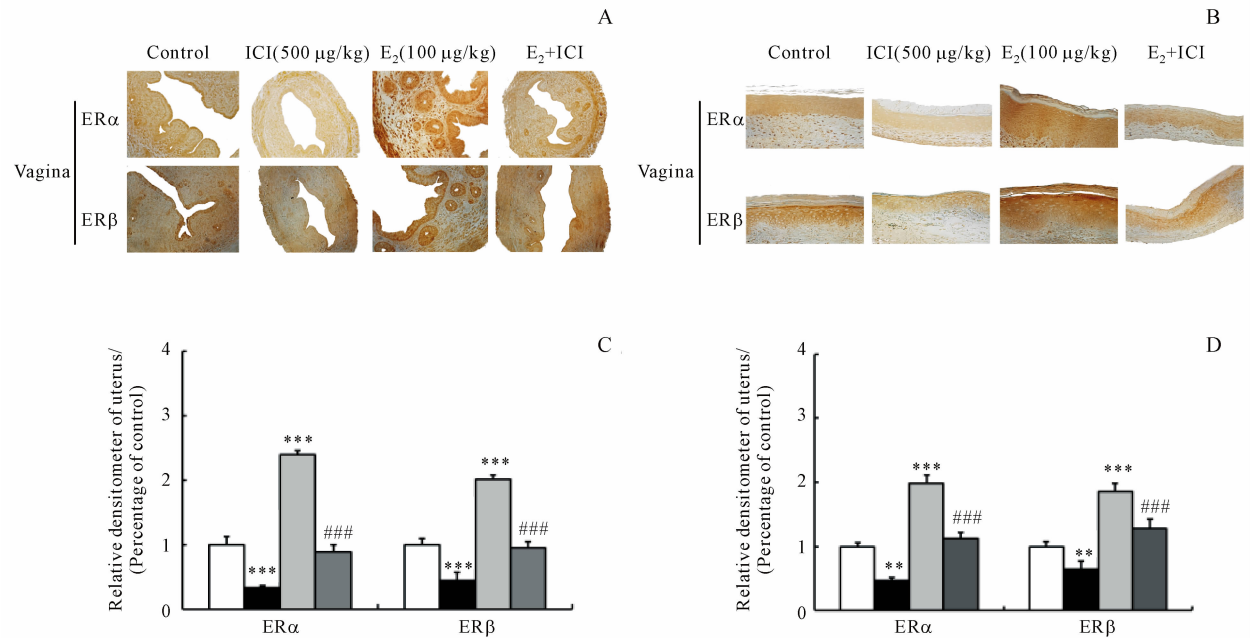


Figure 2 Effects and relative mean densitometer of ICI treatment on estrogen receptors (ERs) expression in the uterus (A,C) and vagina (B,D) (×400) ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs E₂ group

如图 2 所示,ER α 、ER β 在对照组阴道中主要分布在阴道鳞状上皮细胞、角化上皮、基质纤维细胞和平滑肌细胞中,其中以鳞状上皮细胞中表达最

强;ICI 组 ER α 、ER β 表达均不明显;E₂ 组 ER α 、ER β 在阴道鳞状上皮细胞、基质纤维细胞、平滑肌细胞及胞浆中均有表达,都以鳞状上皮细胞中表达

最强,其中 ER β 稍弱于 ER α (与对照组比较, $P < 0.01$, $P < 0.001$);与 E $_2$ 组比较,E $_2$ + ICI 组 ER α 、ER β 在上述细胞中表达均明显降低 (与 E $_2$ 组相比, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。

3.3 ICI 对未成熟小鼠靶器官 ER 亚型表达的影响

Western blot 结果 (图 3) 显示子宫、阴道的

ER α 表达均高于 ER β 。与对照组相比,ICI 组子宫、阴道 ER α 、ER β 表达均明显下降,ER α 的效果更加明显,E $_2$ 组子宫、阴道 ER α 、ER β 蛋白表达均显著上升 (与对照组比较, $P < 0.01$, $P < 0.001$);与 E $_2$ 组比较,E $_2$ + ICI 组的表达显著降低 (与 E $_2$ 组相比, $P < 0.01$, $P < 0.001$),并下调子宫 ER α 与 ER β 的比值。

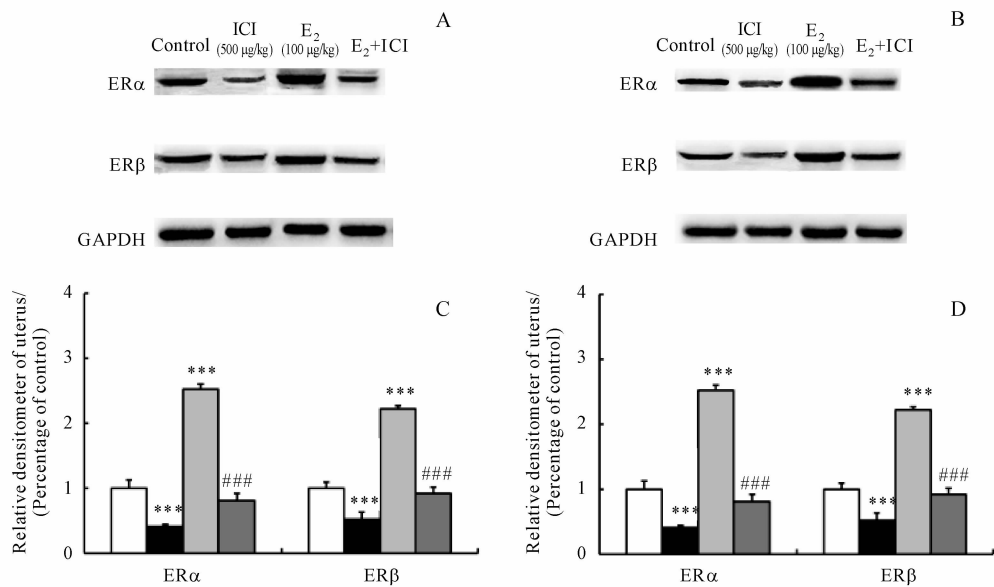


Figure 3 Effects and relative mean densitometer of ICI on expressions of ERs at protein levels in uterus (A,C) and vagina (B,D) in the immature mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs E $_2$ group

4 讨论

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一,第一代选择性雌激素受体拮抗剂他莫西芬对乳腺癌晚期治疗具有较好的疗效,但弱的拟雌激素样作用会导致妇女子宫内膜癌的发生,使其在乳腺癌的早期预防中产生局限性。完全雌激素受体拮抗剂 ICI 不仅对于他莫昔芬及芳香化酶抑制剂治疗失败的乳腺癌患者有一定疗效,而且安全性较好^[6],没有子宫内膜癌的风险,且较少出现短暂性阴道出血副作用、未见诸如阴道干涩和性欲变化等报道^[1]。本研究以未成熟小鼠作为研究对象,使用临床等效剂量的 ICI 给药 1 周,观察其对靶器官子宫、阴道形态学影响,并探讨其作用机制。

HE 染色结果显示 ICI 给药 1 周后小鼠子宫、阴道明显萎缩,体内正常的雌激素生理效应被抑制,同时 ICI 抑制 E $_2$ 对小鼠靶器官生长发育的促

进作用,提示 ICI 对子宫和阴道具有较好的抗雌激素效应。

免疫组化及 Western blot 结果显示,ICI 显著降低小鼠子宫、阴道上皮细胞和内膜细胞等 ERs 阳性的表达,同时显著下调 E $_2$ 对子宫阴道 ERs 的增加作用,且对 ER α 的下调作用高于 ER β 。提示 ICI 对子宫阴道的抑制作用可能主要是由 ER α 所介导。

雌激素对 ERs 阳性的妇科肿瘤的发生发展具有重要作用^[7],ICI 可与雌激素竞争性与 ERs 结合,亲和力与 E $_2$ 相似,抑制体内的雌激素效应^[8],从而降低对妇科肿瘤细胞的促增殖作用。ICI 作为雌激素受体拮抗药,使激素受体上的转录活性区域 AF1 和 AF2 均失活,加速了 ERs 功能的丧失^[9],并且可下调 ERs。ER α 在妇科肿瘤的发生发展过程中扮演着重要的角色,同时在生殖系统的分布及功能调控中也起主导作用^[10]。本实验中,ICI 下调

生殖靶器官 ER α 的研究结果间接验证了干预 ER α 途径可能是 ICI 治疗妇科肿瘤的机制之一,也是其发挥治疗作用而不引起子宫内膜癌及阴道副作用的可能机制。

近年来,绝大部分对 ICI 的研究报道均以转移性或芳香化酶抑制剂耐药性的乳腺癌为切入点,通过临床观察或体内外实验研究,对其临床作用进行阐述。如姜航等^[11]对曾接受过芳香化酶抑制剂治疗的复发转移性乳腺癌患者的临床疗效进行研究,发现 ICI 是治疗失败后可选择的重要治疗手段。吴梅红等^[12]分析了对芳香化酶抑制剂耐药的晚期 Luminal B 型(HER-2 阳性)乳腺癌患者,认为 ICI 联合曲妥珠单抗可能是较好的治疗方案。Agrawal 等^[13]通过对临床晚期乳腺癌患者样本进行生物学效应研究,发现 Ki67 具有作为生物标志物的潜力,从而预测了 ICI 的治疗结果。而 Quenel-Tueux 等^[14]以绝经后乳腺癌患者为研究对象,证明阿那曲唑和 ICI 群均有效且耐受性良好。

本实验研究表明,ICI 对未成熟小鼠的子宫和阴道的生长发育具有明显的抑制作用,且能拮抗 E₂ 对未成熟小鼠靶器官促增殖作用,推测 ER α 是其发挥抑制子宫阴道过度增殖的作用靶点,也是抑制激素依赖型肿瘤的途径之一。本研究结果将为 ICI 在临床上用于妇科肿瘤治疗的安全性评估提供依据。

参考文献

- [1] Zhou ES, Wang S, Dong CE. The progress on the development of selective estrogen receptor down regulator (SERDs) and their molecular biological mechanism [EB/OL]. [2013-02-05]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201302-99>.
- [2] Zhang Y, Wang JH, Sun H, et al. Effect and safety of fulvestrant in the treatment of patients with receptor-positive metastatic breast cancer[J]. *China Prac Med* (中国实用医药), 2014, 9(21): 1-3.
- [3] Liu KH, Cao RX. The research progression is the resistance to endocrine therapy in breast cancer in vitro[J]. *J Pract Oncol* (实用肿瘤杂志), 2015, 25(9): 494-498.
- [4] Zhang Y. Vascular protective effects and mechanism research of PQS on postmenopausal women with coronary heart disease(西洋参茎叶总皂苷对绝经后女性冠心病患者的血管保护效应及机制研究)[D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2013.
- [5] Ma XP, Xu Y, Ding J, et al. Effects of estradiol valerate on the estrogen receptor expression in uterus, vagina and mammary gland of ovariectomized rats[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2014, 45(3): 341-345.
- [6] Lu HY, Cai JF, Wang XJ. The research progress of clinical application of fulvestrant[J]. *J Prac Oncol* (实用肿瘤杂志), 2012, 27(5): 562-564.
- [7] Tan WH, Liu W, Guan YM. The research progress is between estrogen receptor subtypes and gynecological tumors[J]. *Chin J Birth Health Hered* (中国优生与遗传杂志), 2005, 13(6): 116-126.
- [8] Zheng ZH, Liu P. Fulvestrant[J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2004, 13(1): 78-79.
- [9] Jiang H, Wang T, Jiang ZF. Some clinical issues of fulvestrant for the treatment of breast cancer[J]. *Clin Medica J* (临床药物治疗杂志), 2012, 10(2): 9-13.
- [10] Chen M, Zhao PW, Sun LP, et al. The effect of estrogen receptors in gynecological malignancies[J]. *China Med* (中国医药), 2015, 10(6): 926-928.
- [11] Jiang H, Wang T, Zhang SH, et al. Fulvestrant for the treatment of advanced breast cancer after prior aromatase inhibitor therapy[J]. *China Oncol* (中国癌症杂志), 2013, 23(3): 224-228.
- [12] Wu MH, Wang M, Wang W, et al. Combination of fulvestrant and trastuzumab for the treatment of Luminal B (HER-2 positive) advanced breast cancers after prior aromatase inhibitors[J]. *Chin Clin Oncol* (临床肿瘤学杂志), 2014, 6(19): 512-515.
- [13] Agrawal A, Robertson JF, Cheung KL, et al. Biological effects of fulvestrant on estrogen receptor positive human breast cancer: short, medium and long-term effects based on sequential biopsies[J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(1): 146-159.
- [14] Quenel-Tueux N, Debled M, Rudewicz J, et al. Clinical and genomic analysis of a randomised phase II study evaluating anastrozole and fulvestrant in postmenopausal patients treated for large operable or locally advanced hormone-receptor-positive breast cancer[J]. *Brit J Cancer*, 2015, 113(4): 585-594.