

· 基础研究 ·

递增负荷运动及恢复过程中大鼠雌激素受体 mRNA 表达的变化及其意义*

郑 陆¹ 潘力平² 高 丽² 王 超¹ 顾 芳¹ 沈东颖²

摘要 目的:观察持续 9 周递增负荷运动的不同训练周期及恢复过程大鼠 HPO 轴各环节 ER mRNA 水平的变化,探讨持续运动应激致动情周期紊乱 ER 水平变化的机制。**方法:**对不同训练周期及恢复过程的大鼠,采用 RT-PCR 检测下丘脑、垂体、卵巢、子宫各环节 ER mRNA 的表达,采用液相平衡竞争放射免疫分析法检测其血清雌二醇水平。**结果:**训练 7 周结束时,垂体及下丘脑 ER mRNA 表达及血清 E₂ 水平均显著降低,卵巢及子宫 ER mRNA 表达则显著增加;HPO 轴各环节 ER mRNA 表达的变化持续至恢复 2 期,血清 E₂ 水平持续至恢复 3 期基本复原。**结论:**递增负荷运动大鼠 HPO 轴各环节 ER mRNA 表达对运动负荷的反应不尽相同,ER mRNA 表达的变化与血清 E₂ 水平密切相关,其表达水平的非同一性可能是运动性月经失调病理过程的重要一环。

关键词 递增负荷运动; 雌激素受体 mRNA 表达; 雌二醇; 反转录聚合酶链式反应; 运动性月经失调; 病理机制
中图分类号: R455, R493 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2007)-07-0592-04

Changes and significance of ER mRNA expression during progressive increasing load training and recovery periods in rats/ZHENG Lu, PAN Liping, GAO Li, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22 (7):592—595

Abstract Objective: To explore the changes of ER level by gene expression in estrous cycle dysfunction in continuous 9 weeks exercises stress and recovery courses. **Method:** ER mRNA expression in each segment of HPO axis were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and serum E₂ dynamic changes was measured by fluid equation competition RIA after 7 and 9 weeks training, 2 and 4 estrous cycles recovery courses. **Result:** After 7 weeks trainings ER mRNA in hypothalamus and pituitary and serum E₂ level decreased markedly, ovarian and uterus ER mRNA significantly increased. ER mRNA changes of each site of HPO axis lasted to the 2nd recovery period, and the changes of serum E₂ lasted to the 3th recovery period. **Conclusion:** After progressive increasing load training reactions of ER mRNA expression in each segment of HPO axis were different. ER mRNA expression was related to lower serum steroids concentrations, especially, E₂ concentration. The different ER mRNA expression level of HPO axis may be responsible for the athletic menstrual irregularity.

Author's address Capital Institute of Physical Education, Beijing, 100088

Key words progressive increasing load training; ER mRNA expression; estradiol; reverse transcription polymerase chain reaction; athletic menstrual irregularity; pathological mechanism

运动性月经失调 (athletic menstrual irregularity) 是女性参加运动训练所遇到的特殊医学问题。研究已证实, 长期运动训练可导致女运动员下丘脑-垂体-卵巢轴 (hypothalamus-pituitary-ovarian axis, HPO) 功能受抑, 表现为低促性腺激素及低性腺类固醇水平。伴随着大负荷运动训练所出现的激素水平的变化, 大鼠性腺卵巢及性器官子宫亦均具有较高的雌、孕激素受体 (estrogen receptor, ER; progesterone receptor, PR) 表达^[1-2]。但迄今为止, 出现这些受体表达变化的机制尚不清楚。已知正常动情周期中, 大鼠 HPO 轴各环节 ER 表现出的周期性变化是由雌二醇 (estradiol, E₂) 影响下的激素依赖性变化^[3-4], 那么, 持续运动所导致的低 E₂ 环境中, ER mRNA

表达会发生什么变化? 与 E₂ 水平的关系如何? 其调节机制又是怎样的?

目前关于长期运动训练影响下, HPO 轴激素受体基因表达变化及机制的相关研究, 以及其受体基因表达在运动后恢复过程的变化特点等均尚未见报道。而关于这些问题的研究, 对于全面阐释运动性月经失调的病理机制过程, 进而有效地预防或治疗, 具有十分重要的意义。

* 基金项目: 北京市重点实验室开放研究课题 (2005-16)

1 首都体育学院, 北京海淀北三环中路 11 号, 100088

2 山东体育学院, 250063

作者简介: 郑陆, 女, 博士, 教授

收稿日期: 2006-08-24

本研究的主要目的: 通过检测大鼠在不同训练周期运动后及恢复过程 HPO 轴各环节 ER mRNA 的动态变化, 从基因表达水平探讨持续运动应激致动情周期紊乱 ER 水平变化的机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组及运动负荷的设定

雌性 SD 大鼠(2 月龄)210 只, 体重 210 ± 18 g, 由上海计划生育研究所西普尔-必凯实验动物有限公司提供。经连续 3 个动情周期的阴道脱落细胞学检查具有正常动情周期者(180 只), 随机分为运动组、恢复组及正常对照组。动物分组及运动负荷的设定标准详见已发表文献^[5]。运动及恢复组大鼠训练至 8 周时, 各项监测指标综合评价确诊为运动性动情周期紊乱后, 再进行巩固性训练 1 周; 若未达到预期标准, 则持续运动 1 周, 继而进入恢复阶段。以体重、疲劳程度、Hb、BUN、血乳酸、血总 T、T/C 比值及阴道脱落细胞学监测等指标监控造模过程^[5]。

1.2 动物取材和前期样本处理

见前期实验报道^[5]。将切取的下丘脑脑块、垂体、卵巢及子宫迅速置于预冷的焦碳酸二乙酯(DEPC)水中, 盥洗数次后, 以酒精灯烘烤后的软薄锡纸包裹, 标记后速置液氮罐中保存。待测 ER mRNA。将所取血样注入一洁净采血管中, 静置后低温离心分离血清, 并按各种激素测定所需血量进行分装, 置 -70°C 冰箱贮存备用。

1.3 激素测定方法

血清 E_2 测定采用液相平衡竞争放射免疫分析法进行复管测定。所需放射免疫分析药盒分别由天津九鼎医学生物工程有限公司提供, 激素指标测定的批间变异系数均 $< 5\%$ 。

基因	扩增引物序列	产物
ER	Left: GTGGGCATGATGAAAGGC	500bp
	Right: TCGTGCTGCAGAGTCAGG	
β -actin	Left: CTACAATGAGCTGCGTGTGGC	300bp
	Right: CAGGTCCAGACGCAGGATGGC	

1.4 RT-PCR 实验所需仪器设备、试剂与引物

仪器设备和器材见前期实验报道^[5]。引物均由上海生物工程有限公司合成。

1.5 RT-PCR 实验流程

以 Trizol™ 法对组织样品进行总 RNA 提取, 以电泳鉴定样品 RNA 质量: 取 1 小份样品, 以紫外分光光度计进行 RNA 定量。测定 RNA 样品在波长 260nm 和 280nm 的紫外吸收值。据 1 OD260 相当于 $40 \mu\text{g/ml}$ RNA 确定 RNA 的含量, 并据 OD260/OD280 比值判定 RNA 样品的纯度。另取 $2 \mu\text{l}$ 样品用于电泳检测, 其余置 -80°C 冰箱中保存。高质量的 RNA 电泳图应出现清晰的 28s 和 18s 两条带, 且 28s 带的亮度应是 18s 带的 2 倍。经 M-MLV 逆转录合成第一链, 并取 $2 \mu\text{l}$ RT 产物行凝胶电泳检测 cDNA 合成效率与质量。对目的基因及 β -actin 特异性引物进行 PCR 扩增。

PCR 条件:	94 $^{\circ}\text{C}$	预变性	5min	
	94 $^{\circ}\text{C}$	变性	30s	
	52 $^{\circ}\text{C}$ (53 $^{\circ}\text{C}$)	复性	30s	×30 个循环
	72 $^{\circ}\text{C}$	聚合	40s	
	72 $^{\circ}\text{C}$	延伸	10min	

取 $3 \mu\text{l}$ PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果, 并以 Image tool 3.0 图像分析软件分析 EB 染色情况及目的基因与 β -actin 灰度比值。

1.6 统计学分析

所有数据采用 SPSS 软件包, 以 Student's *t* 不配对资料双尾 *t* 检验对训练组及对照组大鼠血清 E_2 及 ER/ β -actin mRNA 分别进行显著性检验, 并以 One-way ANOVA 对不同训练周期大鼠的血清 E_2 及 ER/ β -actin mRNA 进行组间差异比较。

2 结果

持续递增负荷训练 7 周后, 大鼠下丘脑及垂体 ER/ β -actin mRNA 与对照组相比均明显减少 ($P < 0.01-0.05$), 过度训练周差异更显著, 这种显著减少一直持续至恢复 2 期结束; 卵巢及子宫 ER/ β -actin mRNA 则显著高于对照组, 并持续至恢复 2 期结束 ($P < 0.05-0.01$)。不同训练周期间大鼠 ER mRNA 表现为恢复 2、4 周期与训练 7、9 周相比具有显著性。结果见表 1、图 1—4。

不同训练周期血清性激素水平的变化见图 5。大鼠血清 E_2 水平自第 7 周结束始显著降低, 均表现出明显的随运动负荷加大及训练周期加长而降低的

表 1 不同训练周期大鼠 HPO 轴 ER mRNA 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

基因表达	C	T ₇	T ₉	R ₂	R ₄
下丘脑	0.96±0.06	0.73±0.10 ^②	0.65±0.11 ^②	0.81±0.10 ^{③④}	0.89±0.10 ^③
垂 体	0.88±0.04	0.70±0.12 ^②	0.63±0.13 ^②	0.73±0.11 ^①	0.81±0.11 ^③
卵 巢	0.94±0.05	1.09±0.11 ^①	1.19±0.10 ^②	1.08±0.17 ^{③④}	0.98±0.01 ^④
子 宫	0.95±0.14	1.17±0.13 ^①	1.10±0.07 ^①	1.07±0.09 ^①	1.00±0.02 ^⑤

与对照组相比: ① $P < 0.05$; ② $P < 0.01$; 与 T₉ 组相比: ③ $P < 0.05$; ④ $P < 0.01$; 与 T₇ 组相比: ⑤ $P < 0.05$ 。C 组值为 C₃—C₉ 均值

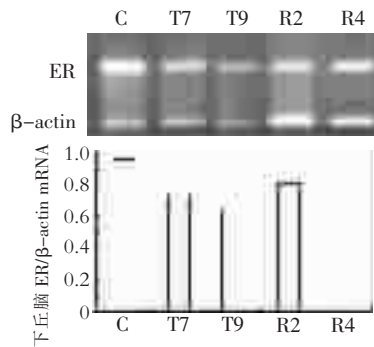


图 1 不同训练周期大鼠下丘脑 ER mRNA 水平的变化

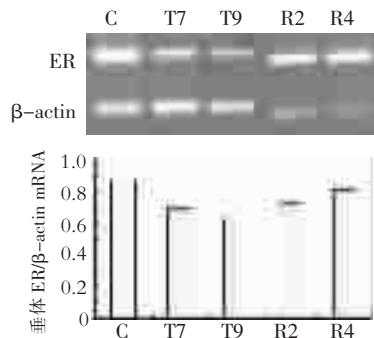


图 2 不同训练周期大鼠垂体 ER mRNA 水平的变化

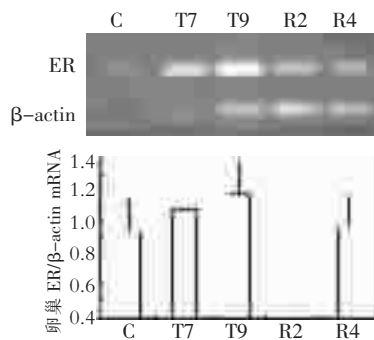


图 3 不同训练周期大鼠卵巢 ER mRNA 水平的变化

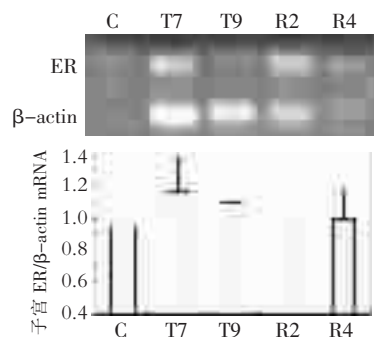
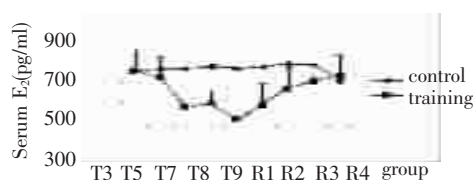


图 4 不同训练周期大鼠子宫 ER mRNA 水平的变化

图 5 不同训练周期大鼠血清 E₂ 水平的变化

趋势,至 9 周训练后降至最低 ($P < 0.001$),并且这种低血清 E₂ 水平一直持续至恢复的第 3 个周期结束时,基本恢复至正常水平。

3 讨论

众所周知,激素通过其特定的靶细胞受体来发挥生理作用,靶细胞对激素的相应反应则是决定激素作用效果的又一重要因素。与其它类固醇激素相同,女性生殖激素通过与靶细胞中 ER 及 PR 的结合,使受体活化,并与靶基因中的特定 DNA 片段-激素反应元件(HREs)结合,促进或抑制靶基因的表达,从而引起生物学效应。雌性动物正常性生理周期中,雌激素呈现规律的周期性变化,并通过 ER 发挥对生殖及许多重要器官组织的功能调节,显现其生物学效应。在正常生理周期的调控中,E₂ 通过其长周期调节,使 LH 分泌急速增加,形成排卵前的 LH 高峰,而这种效应正是雌激素在垂体的正反馈作用的结果,进而调控 HPO 轴的中枢环节-下丘脑促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)的释放。

激素通过其特定的靶细胞来发挥生理作用,受体在介导激素的生物效应中起着关键作用,同时,受体的数量和亲和力等又必然随着内、外环境所引起的机体状态的适应性变化,而发生相应改变^[6]。当激素水平发生变化时,细胞通过调节受体数目(结合容量),起到贮存和缓冲的作用,将反应控制在适宜的幅度,使受体水平与激素水平相互适应,从而维持机体的稳态。受体数目的变化与其合成及降解量、受体的再循环、受体结合位点的状况有关。正常生理周期中,E₂ 对于 ER 及 PR 具有正向调节效应,而 P 对 ER 及 PR 具有负向调节作用^[3,7-8],即使是外源性补充 E₂ 的个体^[9]。去卵巢大鼠体内雌激素下降,ER 呈现增量调节^[10]。本实验中,持续递增负荷训练 7 周后,大鼠下丘脑及垂体 ER mRNA 与对照组相比均明显减少,这种显著减少一直持续至恢复 2 期结束。由于在这种低性腺类固醇水平状态下(大鼠血清 E₂ 水平自第 7 周结束始显著降低,至 9 周训练后降至最低),正常 E₂ 水平对 ER 的上调效应受到抑制,因此,出现大鼠下丘脑及垂体 ER mRNA 表达,在运动 7 周及 9 周均显著降低的变化。

正常生理周期中,GnRH 受体(gonadotropin-releasing hormone receptor,GnRHR)mRNA 表达的变化为激素依赖性的调节过程,体内性腺类固醇激素,特别是 E₂,成为 GnRHR 基因表达调节的重要调节因子^[11]。另外有研究显示,人类 GnRH 基因的 5'-

侧翼区存在雌激素受体^[12],因此,ER在GnRH的作用中具有特殊效应。我们的一项平行实验表明,经7—9周递增负荷运动训练后,大鼠下丘脑、垂体GnRHR mRNA表达均明显减少,那么,本实验中ER mRNA在下丘脑及垂体显著降低的结果提示,持续运动训练导致下丘脑及垂体部位ER基因的转录减少,ER水平可能降低,进一步影响了E₂通过ER介导对GnRHR合成的促进作用,因而使GnRH与GnRHR的结合减少,GnRH的生物学效应难以正常发挥,即低E₂水平通过干扰ER的合成和介导作用影响了下丘脑及垂体GnRHR的合成。这可能是运动训练所致动情周期紊乱所具有的特征性改变。

本实验同时发现,运动7周及9周,大鼠ER mRNA表达在卵巢及子宫均显著增强。该结果与我们对卵巢及子宫ER和PR的平行实验结果吻合一致^[1];运动应激刺激作用下,大鼠发生以低促性腺激素及低性腺类固醇水平为特征的动情周期紊乱,在此过程中ER和PR的正常激素依赖性活化作用可能受到抑制,导致其卵巢、子宫环节非激素依赖性活化作用增强,提高靶基因的转录调节活性,进而出现ER和PR结合量增加。因此,运动训练所导致的低性腺类固醇水平对ER基因的影响作用发生在转录水平,而这种影响可能是其受体基因的非激素依赖性活化作用增强的结果。但是,何以出现HPO轴中枢与外周环节ER mRNA、ER结合量的迥异现象以及其调控机制等问题,有待进一步的实验予以澄清。递增负荷运动出现的ER mRNA表达的应激性改变,或许正是机体维持自稳态的一种自我调节方式,而这种改变可能亦是运动性月经失调发生机制中的一个重要的病理过程。提示,通过检测HPO轴ER mRNA及ER水平,结合血中E₂水平的变化程度,将有助于正确诊断运动性月经失调。

运动后经过2个动情周期的恢复过程,下丘脑、垂体ER mRNA仍显著低于对照组;卵巢、子宫ER mRNA表达水平仍明显高于对照组,直至4个动情周期的恢复后,方基本完全复原。血清E₂水平表现为,至恢复的第3个动情周期,基本恢复至正常水平。由此可以看出,ER mRNA表达水平的恢复与血清性腺类固醇激素-E₂水平密切相关,因此,E₂水平影响下的激素依赖性调节过程,是ER mRNA表达

水平得以迅速恢复的主要原因。

4 结论

递增负荷运动7周结束始ER mRNA表达在下丘脑及垂体均显著减少,卵巢及子宫ER mRNA表达出现显著增加,并持续至恢复2期结束。ER mRNA表达的减少与血清性腺类固醇水平的降低密切相关。ER mRNA经过4个动情周期的恢复过程,其水平基本恢复至正常,而导致恢复的主要原因与血清E₂水平的复原密切相关。

参考文献

- [1] 郑陆,潘力平,隋波,等.递增负荷运动过程中ER、PR水平的变化及其与性腺类固醇的关系[J].山东体育学院学报,2005,21(5):54—57.
- [2] 毛杉杉,李国盛.大鼠运动性动情周期抑制时子宫雌、孕激素受体变化的研究[J].天津体育学院学报,1999,14(2):26—28.
- [3] Bergman MD, Schachter BS, Karelus K, et al. Up-regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estrous cycle: the role of estradiol[J]. Endocrinology,1992,130(4):1923—30.
- [4] Padmanabhan V, Dalkin A, Murat Y, et al. Are immediate early genes involved in gonadotropin-releasing hormone receptor gene regulation? Characterization of changes in GnRH receptor (GnRHR), c-fos, and c-jun messenger ribonucleic acids during the ovine estrous cycle[J]. Biology of Reproduction,1995,53:263—269.
- [5] 郑陆,潘力平,隋波,等.递增负荷运动过程中抗生殖激素水平变化特点及机制的研究[J].山东体育学院学报,2005,21(6):64—67.
- [6] 吕宝璋,卢建,安明榜主编.受体育[M].第1版.合肥:安徽科学技术出版社,2000.35,248.
- [7] Nephew KP,Long X,Osborne E, et al.Effect of estradiol on estrogen receptor expression in rat uterine cell types[J].Biol Reprod,2000,62(1):168—77.
- [8] Murata T, Narita K, Honda K, et al.Changes of receptor mRNAs for oxytocin and estrogen during the estrous cycle in rat uterus[J]. J Vet Med Sci, 2003,65(6):707—12.
- [9] Stygar D, Muravitskaya N, Eriksson B, et al.Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2003,7(1):40.
- [10] 陈伯英,程立海,高慧等.电针对大鼠脑内雌激素受体蛋白及其mRNA表达的影响[J].生理学报,1998,50(5):495—500.
- [11] Bauer -Dantoin AC, Jameson JL. Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the ovary during the rat estrous cycle[J]. Endocrinology,1995,136(10):4432—4438.
- [12] Radovick S, Ticknor CM, Nakayama Y, et al. Evidence for direct estrogen regulation of human GnRH-gene[J]. J Clin Invest,1991,88:1649—1655.