

慢性阻塞性肺疾病大鼠膈肌纤维类型改变和膈肌细胞凋亡的研究

季 磊,孙丽华*,谭 焰,谷 伟

(南京医科大学附属南京第一医院呼吸科,江苏 南京 210006)

[摘要] **目的:**通过对慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)大鼠膈肌纤维分类的改变及膈肌凋亡的研究来探讨膈肌疲劳的发病机制,并以此寻找治疗膈肌疲劳的新途径。**方法:**40 只雄性 Wistar 大鼠随机分成健康对照组和 COPD 模型组,每组 20 只。模型组大鼠置于烟雾浓度为 5%的密封熏箱内(每天 2 次,每次 30 min,间隔 8 h,共 28 d),第 1、14 天向气管内注射脂多糖 200 μg。健康对照组大鼠放入密闭箱内但不进行烟熏,第 1、14 天气管内注入生理盐水 200 μl。第 29 天将大鼠处死取膈肌及肺,测量各组膈肌的凋亡率、Fas 蛋白的表达和 Caspase-3 基因表达,电镜以及膈肌纤维分类染色观察形态。**结果:**第 28 天后 COPD 模型组大鼠膈肌细胞的凋亡率、Fas 蛋白及 Caspase-3 基因的表达水平均高于健康对照组 ($P < 0.01$),相对于健康对照组,模型组 I 型纤维比例增加而 II 型纤维比例减少($P < 0.01$)。**结论:**在 COPD 的发生过程中存在膈肌细胞过度凋亡及纤维类型的改变,Caspase-3 和 Fas/FasL 途径参与了膈肌细胞凋亡的调控,并且纤维类型的改变导致 COPD 患者晚期膈肌疲劳治疗困难。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病;膈肌;凋亡;膈肌纤维类型

[中图分类号] R563

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)02-194-05

Adaptations of diaphragmatic muscle fibres and apoptosis of diaphragmatic muscle cell in rats with chronic obstructive pulmonary disease

Ji Lei,SUN Li-hua*,TAN Yan,GU Wei

(Department of Respiratory Medicine,Nanjing First Hospital Affiliated to NJMU,Nanjing 210006,China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the pathogenesis of diaphragmatic fatigue by diaphragm fibers classification changes and diaphragmatic apoptosis in rats with chronic obstructive pulmonary disease(COPD),in order to find new treatment of diaphragmatic fatigue. **Methods:** Forty male Wistar rats were randomly averagely divided into healthy control group and COPD group. The rats in the COPD group were exposed to 5% smoke in a sealed box (twice for each day,30 minutes for each time,interval 8 hours,lasting for 28 days),and 200 μg lipopolysaccharide was injected intratracheally on the 1st and 14th day. On the 29th day,the rats were sacrificed for detection of apoptosis rate,Fas protein and Caspase-3 gene expression of diaphragmatic muscle cell,and observation of the morphologic changes by electron microscope and diaphragm myofibers classification dyeing. **Results:** On the 28th day,destruction of alveolar walls and enlargement of alveolar space were observed in the COPD group,the diaphragmatic muscle cell apoptosis rate,the Fas protein and Caspase-3 gene expression were higher than those of the control group($P < 0.01$). Compared to the healthy controls,the type I fiber proportion in the COPD group was increased,while the II type fiber proportion was reduced (both $P < 0.01$). **Conclusion:** Abnormal apoptosis of diaphragmatic muscle cell and fiber type of change were present in rats with COPD. Caspase-3 and Fas/FasL way could be involved in the apoptosis of diaphragmatic muscle cell,the regulation of fiber type of change in the late patients with COPD,which causes difficult to treat diaphragmatic muscle fatigue.

[Key words] chronic obstructive pulmonary disease(COPD);diaphragm;apoptosis;diaphragm muscle fiber types

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(2): 194-198]

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pul-

monary disease,COPD)患者晚期的主要死因是呼吸衰竭,而呼吸肌疲劳是引起呼吸衰竭的原因之一。膈肌作为主要的呼吸肌,其收缩所产生的通气量约占静息通气量的 80%,膈肌疲劳被认为是呼吸衰竭

[基金项目] 南京市科技发展计划(YKK10103)

*通讯作者,E-mail:nfhsun@sina.com

发生的重要的病理生理机制之一^[1]。关于膈肌疲劳的发病机制的假说以及实验研究很多, Degens 等^[2]的研究表明肺气肿仓鼠的膈肌和比目鱼肌中有凋亡的发生。在 Ottenheijm 等^[3]的研究中提到, COPD 患者膈肌纤维类型在缺氧、疲劳、氧化应激等因素作用下会发生适应性转变。本次实验通过建立 COPD 大鼠模型, 从膈肌细胞的凋亡以及其肌纤维类型的改变的角度来探讨膈肌疲劳的发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar 雄性大鼠(SPF 级)购自浙江省动物实验中心; 实验用烟为南京市售一品梅牌过滤嘴香烟(江苏中烟工业有限责任公司出品); 脂多糖(LPS)购自美国 Sigma 公司; Fas 一抗购自南京凯基生物科技发展有限公司; Caspase 一抗购自美国 Bioworld 公司; SP 试剂盒购自福州迈新生物科技有限公司; TUNEL 试剂盒购自南京凯基生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 COPD 大鼠动物模型的建立

将 40 只体重 150~200 g 的雄性 Wistar 大鼠采用随机数字表法分为健康对照组和 COPD 模型组, 每组 20 只。参照宋一平等^[4]的方法并加以改进制作 COPD 模型: COPD 模型组大鼠放入密闭箱内, 用一品梅牌香烟(焦油量 11 mg, 烟气烟碱 0.8 mg, 烟气一氧化碳 14 mg)以 5% 烟雾浓度进行烟熏, 2 次/d, 0.5 h/次, 2 次间隔时间为 8 h, 共 28 d。第 1、14 天不给予烟熏, 气管内注入 200 μ l 内毒素(LPS) 200 μ g。健康对照组大鼠放入密闭箱内但不进行烟熏, 2 次/d, 0.5 h/次, 2 次间隔时间为 8 h, 共 28 d。第 1、14 天气管内注入生理盐水 200 μ l。

1.2.2 膈肌的取材和组织的准备

第 29 天, 将大鼠以 5% 的水合氯醛腹腔注射(350 mg/kg)麻醉后, 立即开胸取右下肺和左侧膈肌的大部分, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋、制片, 用于 HE 染色病理学检查、免疫组化及 TUNEL 实验。另外取左侧膈肌的少部分切成 1 mm³ 固定于戊二醛, 用于做电镜检测。取右侧膈肌组织立刻保存于液氮罐中用于 RT-PCR 及膈肌纤维的分型染色。

1.2.3 膈肌凋亡的检测

将固定于 5% 戊二醛制成超薄切片, 在透射电镜下直接观察凋亡细胞。

采用 TUNEL 检测膈肌细胞凋亡率, 每个膈肌标本制切片 5 张, TUNEL 法染色后每个盖玻片 200

倍视野下取 5 个视野记录阳性细胞数, 计算阳性细胞率(100 个细胞中所含的阳性细胞数)。

免疫组化法检测膈肌细胞胞浆内 Fas 蛋白的表达, 将膈肌标本用多聚甲醛固定后制片, 常规链霉素亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)法进行染色, 使用 SABC 免疫组化试剂盒检测。阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。以胞质呈棕黄色染色为阳性表达。操作步骤严格按照产品说明书进行, 最后应用美国 Media Cybernetics 公司专业图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 进行图像分析, 计算出阳性率。

RT-PCR 法检测 Caspase-3 基因表达, 取管家基因 GAPDH 为阳性对照。GAPDH 基因引物序列为: 上游: 5'-TGAGGCCGGTGCTGAGTATGT-3', 下游: 5'-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3', 扩增长度 299 bp。Caspase-3 基因引物序列为: 上游: 5'-GAAC-GAACGGACCTGTGG-3', 下游: 5'-GGGTGCGGTA-GAGTAAGC-3', 扩增长度 218 bp。采用 Bio Rad Quantity One 成像系统进行图像分析和扫描, 以 Caspase-3 与 GAPDH 灰度比值反映 Caspase-3 表达量。

1.2.4 膈肌纤维类型染色

采用两种染色法, 第一种是 ATP 酶组织化学滴染法, 染色结果: I 型纤维为灰色, II 型纤维为黑色; 第二种方法是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸四唑氧化还原酶(NADH-TR)染色法, 根据染色反应的强弱结果为: I 型为深蓝色、II 型为浅蓝色。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件包, 各组数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异采用单因素方差分析判断, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 COPD 肺组织病理形态学改变

两组肺组织 HE 染色病理切片见图 1。健康对照组大鼠 HE 染色下支气管、肺组织上皮结构完整, 支气管纤毛排列整齐, 气管周围无炎细胞浸润, 肺泡结构完整, 大小均匀一致。造模组大鼠有支气管黏膜纤毛柱状上皮细胞部分脱落, 纤毛倒伏、缺失、杯状细胞增生, 黏膜下层及肌层大量炎性细胞浸润, 肺泡扩张融合, 肺泡隔明显增厚, 肺泡直径增大等支气管炎、肺气肿的特征性病理学改变。

2.2 膈肌凋亡的检测

在透射电镜下可以直接观察到凋亡细胞, 这是

证明凋亡存在的最直接的证据,电镜下(图 2)健康对照组大鼠,正常细胞核染色质均匀分布于整个细胞中,而模型组核染色质边移,凝聚在核膜下,呈典型的新月形。显微镜下(图 3)两组标本中呈棕黄色的细胞核为 TUNEL 阳性细胞,即凋亡细胞,呈现出形态不规则,排列紊乱,大小不一的凋亡细胞特点,

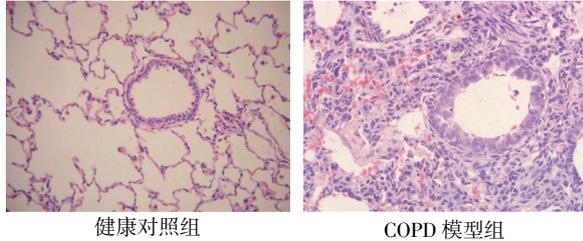


图 1 肺组织病理改变(HE, × 400)
Figure 1 Pathologic changes of the lung(HE, × 400)

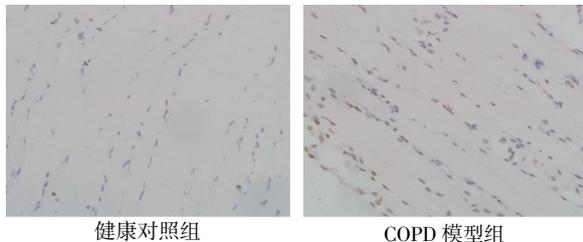


图 3 膈肌细胞凋亡的 TUNEL 染色(× 200)
Figure 3 The apoptosis of the diaphragm detected by TUNEL (× 200)

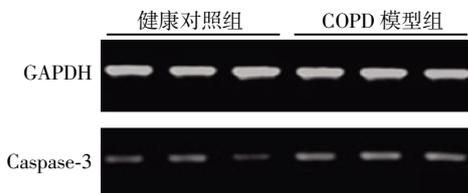


图 5 Caspase-3 基因 RT-PCR 电泳结果
Figure 5 Expression of Caspase-3 in the diaphragm by RT-PCR

健康对照组与 COPD 模型组的凋亡率差异具有统计学意义(表 1)。模型组大鼠膈肌 Fas 蛋白的表达明显升高(图 4),显微镜下两组标本中胞质内呈现黄色的部分即为 Fas 蛋白,健康对照组与 COPD 模型组差异具有统计学意义(表 1),Caspase-3 基因表达差异也具有统计学意义(图 5,表 1)。

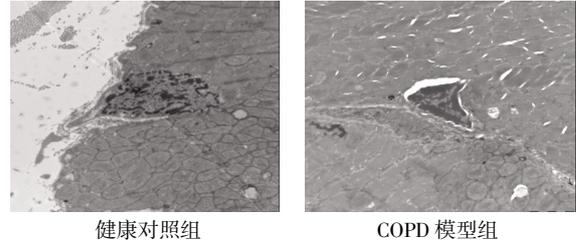


图 2 电镜下膈肌细胞凋亡改变(× 12 000)
Figure 2 Apoptosis of diaphragm cells in the electron microscope (× 12 000)

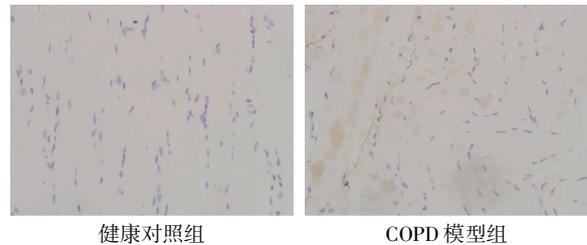


图 4 膈肌 Fas 蛋白免疫组化阳性细胞表达(SABC, × 200)
Figure 4 Expression of Fas in the diaphragm(SABC, × 200)

2.3 膈肌纤维类型的改变

ATP 酶 pH10.4 染色,清晰显色 I 型纤维为灰色,II 型纤维为黑色(图 6)。NADH-TR 染色清晰地显示 I 型为深蓝色、II 型为浅蓝色(图 7)。如图所示,COPD 模型组 II 类纤维的比例明显低于健康对照组,并且 I 类纤维的表达高于健康对照组,二者差异具有统计学意义(表 2, $P < 0.01$)。

表 1 膈肌凋亡率、凋亡蛋白及基因的检测结果

Table 1 The results of diaphragm apoptosis, apoptotic protein and gene (n=20, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 膈肌细胞凋亡率(%) | Fas 蛋白表达率(%) | Caspase-3 基因表达 |
|----------|---------------|---------------|----------------|
| 健康对照组 | 1.72 ± 0.87 | 12.78 ± 0.34 | 1.02 ± 0.21 |
| COPD 模型组 | 39.73 ± 3.54* | 20.28 ± 0.34* | 2.40 ± 0.20* |

与健康对照组比较, * $P < 0.01$ 。

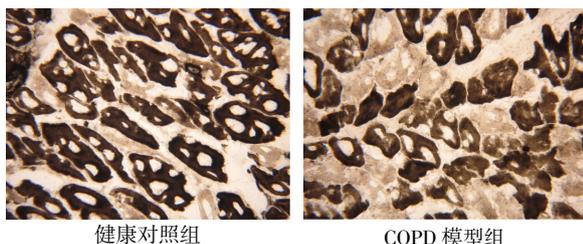


图 6 膈肌纤维类型的改变(ATP 酶染色, × 400)
Figure 6 Changes in diaphragm fiber types(ATP, × 400)

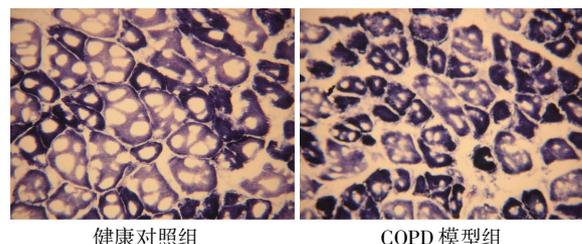


图 7 膈肌纤维类型的改变(NADH-TR 染色, × 400)
Figure 7 Changes in diaphragm fiber types(NADH-TR, × 400)

表 2 膈肌纤维类型的检测结果

Table 2 Changes in diaphragm fiber types

(n=9, %, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | I 型纤维 | II 型纤维 |
|----------|---------------|---------------|
| 健康对照组 | 37.36 ± 2.25 | 62.64 ± 2.25 |
| COPD 模型组 | 44.94 ± 2.61* | 54.84 ± 2.28* |

与健康对照组比较, *P < 0.01。

3 讨 论

近年来 COPD 肺外周骨骼肌功能障碍(peripheral skeletal muscle dysfunction, PSMD) 成为研究热点, 骨骼肌萎缩及其功能失调是 COPD 重要的特征之一^[5], 在运动受限的 COPD 患者中, 约 40% 左右的患者肺功能没有严重受损但其骨骼肌萎缩及功能障碍很明显^[6]。膈肌属于骨骼肌, 同时也是主要的呼吸肌。COPD 患者, 特别是中重度患者的膈肌疲劳主要表现在肌力下降、耐力下降、易疲劳等方面。组成膈肌的纤维主要分为 I 型纤维和 II 型纤维两类, 其中 II 型又分为 II A、II B 和 II X^[7], 这两种纤维内的氧化酶主要为琥珀酸脱氢酶和 ATP 酶, 在不同类型的纤维细胞中氧化酶的浓度及活性存在差异性。I 型纤维为慢缩氧化纤维, 约占 55%, 依赖有氧氧化, 但其氧化酶活性低。II 型为快缩纤维, 其中 II B 的氧化方式是无氧酵解, 属于快缩糖酵解纤维, 约占 24%, 琥珀酸脱氢酶活性低, ATP 酶活性高。II A 型为快缩氧化纤维, 约占 21%, 可以利用有氧氧化也可以利用糖酵解供能, 其琥珀酸脱氢酶活性和 ATP 酶活性介于 I 型和 II B 之间。II X 很少, 一般被认为在人类中不表达^[8]。II 型纤维具有收缩力大、ATP 酶活性高的特点, 单位张力的能耗约为 I 型纤维的 2 倍多, 因而同 I 型纤维相比, 在相同负荷下 II 型纤维更易疲劳, 更易受损^[9]。绝大多数 COPD 患者都存在老年化、营养不良、应用糖皮质激素及 β 受体激动剂等情况, 这些因素都会导致膈肌的纤维类型发生适应性的改变^[8]。Levine 等^[10]证明 COPD 患者, 早在中期其膈肌的纤维组成就发生了改变, 即 I 型纤维比例升高, II 型纤维比例降低, 并且如果以肺功能衡量其 COPD 的严重程度指标, I 型纤维比例和 FEV1% 成反比。本实验动物为大鼠, 其膈肌的纤维比例构成与人是有区别的, 其 II 型纤维比例更高, 在此次实验中采用了两种染色方法, 发现与对照组相比, COPD 模型组 II 型纤维比例有所降低, 差异具有统计学意义, 证实了膈肌纤维类型发生适应性的改变是客观存在的。一些学者认为, COPD 患者膈肌纤维类型向 I 型纤维改变是有益的, 这更能使膈肌耐受

超负荷而不致疲劳^[11]。然而 II 型纤维比例的降低会导致膈肌收缩乏力, 这也是为什么 COPD 晚期患者会出现顽固性膈肌无力, 导致呼吸衰竭, 预后很差的原因^[12]。

上述导致膈肌纤维类型改变的最终途径都是导致一种纤维类型细胞的凋亡, 另一种纤维类型细胞的再生。近年来的研究结果表明, 细胞凋亡参与 COPD 的形成^[13], 大量的氧自由基可诱导膈肌细胞凋亡而导致膈肌疲劳^[14]。本实验中 COPD 模型组大鼠膈肌的 TUNEL 阳性细胞率, 免疫组化 Fas 蛋白表达及 Caspase-3 基因表达水平显著高于对照组, 在电镜下观察到凋亡细胞的存在, 这些都间接或直接证明了 COPD 大鼠膈肌细胞的凋亡是客观存在的。Fas 和 FasL 是肿瘤坏死因子(TNF)家族的一对介导细胞凋亡的细胞表面分子。细胞表达的 Fas 和其天然配体 FasL 结合后发出凋亡信号, 导致 Fas 蛋白表达的细胞发生凋亡。而 Caspase-3 最主要是作用于多聚(ADP-核糖)聚合酶 [poly(ADP-ribose)polymerase, PARP], 该酶与 DNA 修复、基因完整性监护有关。作用的结果是使受 PARP 负调控影响的 Ca^{2+}/Mg^{2+} 依赖性核酸内切酶的活性增高, 裂解核小体间的 DNA, 引起细胞凋亡。可以推测, 如果能够在 COPD 早期阻止膈肌的凋亡, 从而尽量地减少膈肌纤维类型的改变, 相信会对预防 COPD 晚期的呼吸衰竭起到明显的作用。这样从另一方面解释了为什么早期应用无创通气能迅速缓解呼吸肌疲劳, 改善气体交换, 缩短住院时间, 降低呼吸衰竭的发生率, 而晚期 COPD 患者膈肌凋亡严重, 膈肌纤维改变已经很明显, 所以无创通气效果不理想^[15]。

总之, 呼吸衰竭是 COPD 患者病情恶化及其死亡的重要病因之一, 积极探讨呼吸衰竭的发病机制、寻找病因, 尽可能在疾病的早期进行预防性治疗, 对改善 COPD 患者的呼吸功能, 生活质量及其预后都有重要意义。本实验研究从膈肌纤维类型的改变以及膈肌凋亡方面做了初步的探讨, 为未来进一步研究 COPD 患者呼吸肌功能障碍及探索新的临床治疗方案提供了新方向。

[参考文献]

- [1] Ottenheim CA, Heunks LM, Sieck GC, et al. Diaphragm dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172(2): 200-205
- [2] Degens H, Swisher AK, Heijdra YF, et al. Apoptosis and Id2 expression in diaphragm and soleus muscle from the emphysematous hamster [J]. Am J Physiol Regul Integr

- Comp Physiol, 2007, 293(1): R135-144
- [3] Ottenheim CA, Heunks LM, Dekhuijzen RP. Diaphragm adaptations in patients with COPD [J]. *Respir Res*, 2008, 24(1): 9-12
- [4] 宋一平, 茅培英. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. *中华内科杂志*, 2000, 39(8): 51-52, 73-74
- [5] Kim HC, Mofarrah M, Hussain SN. Skeletal muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2008, 3(4): 637-658
- [6] Rabinovich RA, Ardite E, Mayer AM, et al. Training depletes muscle glutathione in patients with chronic obstructive pulmonary disease and low body mass index[J]. *Respiration*, 2006, 73(6): 757-761
- [7] Clanton TL, Levine S. Respiratory muscle fiber remodeling in chronic hyperinflation: dysfunction or adaptation [J]. *J Appl Physiol*, 2009, 107(1): 324-335
- [8] Polla B, D'Antona G, Bottinelli R, et al. Respiratory muscle fibres: specialisation and plasticity [J]. *Thorax*, 2004, 59(9): 808-817
- [9] Barreiro E, de la Puente B, Minguella J, et al. Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 171(10): 1116-1124
- [10] Levine S, Nguyen T, Kaiser LR, et al. Human diaphragm remodeling associated with chronic obstructive pulmonary disease: clinical implications [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 168(6): 706-713
- [11] Nguyen T, Shrager J, Kaiser L, et al. Developmental myosin heavy chains in the adult human diaphragm: co-expression patterns and effect of COPD [J]. *J Appl Physiol*, 2000, 88(4): 1446-1456
- [12] Sauleda RJ. Clinical consequences of muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Nutr Hosp*, 2006, 21(Suppl 3): 69-75
- [13] Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, et al. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema [J]. *Respir Res*, 2006, 30(3): 7-53
- [14] Smith-Blair N. Mechanisms of diaphragm fatigue [J]. *AACN Clin Issues*, 2002, 13(2): 307-319
- [15] 谭 焰, 孙丽华, 乔 岩, 等. 无创通气对无呼吸衰竭 COPD 患者呼吸肌疲劳的影响 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2006, 26(8): 686-689

[收稿日期] 2011-10-05

本刊现已起用网上稿件管理系统，作者登陆
<http://jnmu.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。