

· 论 著 ·

COPD 骨骼肌萎缩患者股外侧肌 PPAR α mRNA 表达及血清炎症因子水平的研究*

何大川[#], 傅炜萍, 龙翔宇, 方利洲, 戴路明[△]

(昆明医学院第一附属医院呼吸科, 昆明 650031)

摘要:目的 探讨慢性阻塞性肺疾病(COPD)骨骼肌萎缩患者股外侧肌过氧化酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)mRNA 表达和血清炎症因子水平。方法 将 COPD 患者分为 COPD 萎缩组、COPD 非萎缩组, 10 例健康体检者作为对照组。检查患者及对照组用力呼气肺活量(FVC)、第一秒用力呼气量占预计值的百分比(FEV₁%PRE)及第一秒用力呼气量占用力肺活量百分比(FEV₁%FVC)。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒检测患者血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-8(IL-8)水平, 实时荧光定量 PCR 检测患者股外侧肌 PPAR α mRNA 表达水平。结果 与 COPD 非萎缩组及对照组比较, COPD 萎缩组患者股外侧肌 PPAR α mRNA 表达下调($P < 0.01$), PPAR α mRNA 表达与 FEV₁%PRE 及 FEV₁%FVC 呈正相关($r = 0.574, r = 0.613, P < 0.01$), 与 TNF- α 及 IL-8 呈负相关($r = -0.618, r = -0.690, P < 0.01$)。结论 PPAR α mRNA 表达的下调与 COPD 全身炎症反应及肺功能下降相关, 在 COPD 骨骼肌萎缩中有着重要作用。

关键词:肺疾病, 慢性阻塞性; 肌萎缩; 肺活量; 炎症; 过氧化酶体增殖物激活受体 α

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.35.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)35-3537-03

A research on PPAR α mRNA expression in vastus lateralis and serum levels of inflammatory cytokines in patients with COPD accompanied by skeletal muscle atrophy*

He Dachuan[#], Fu Weiping, Long Xiangyu, Fang Lizhou, Dai Luming[△]

(The Second Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

Abstract: Objective To explore the expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) mRNA in vastus lateralis muscle and serum inflammatory factors of patients with chronic obstructive pulmonary disease(COPD) accompanied by skeletal muscle atrophy. **Methods** Patients with COPD were divided into COPD atrophy group and COPD non-atrophy group. 10 healthy people who had undergone physical examination served as control group. Forced vital capacity (FVC), percentage of forced expiratory volume in first second to prediction (FEV₁%PRE) and percentage of forced expiratory volume in first second to forced vital capacity (FEV₁%FVC) of patients and healthy people were examined. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit was employed to assay serum levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin(IL)-8. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression level of PPAR α mRNA in vastus lateralis muscle of patients. **Results** The mRNA expression of PPAR α in vastus lateralis muscle of patients in COPD atrophy group decreased when compared to that in COPD non-atrophy group and control group ($P < 0.01$). It had positive correlation with FEV₁%PRE and FEV₁%FVC($r = 0.574, r = 0.613, P < 0.01$) and negative correlation with TNF- α and IL-8($r = -0.618, r = -0.690, P < 0.01$). **Conclusion** Down-regulation of PPAR α mRNA expression which has an important role in skeletal muscle atrophy is related to systemic inflammation and decline of pulmonary function.

Key words: pulmonary disease, chronic obstructive; muscular atrophy; vital capacity; inflammation; peroxisome proliferator-activated receptor alpha

多个研究结果及指南认为慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种全身性疾病^[1], COPD 患者在疾病进程中常有不明原因的体质量下降, 躯体构成发生改变, 骨骼肌萎缩及其功能失调, 骨骼肌萎缩及其功能失调是 COPD 的重要特征之一^[2]。COPD 合并骨骼肌功能障碍将进一步限制患者的活动能力, 使患者生活质量下降, 预后差, 预示着更高的死亡率^[3]。COPD 患者发生骨骼肌萎缩的机制目前尚不清楚, 有待探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对照组选取 2008 年 11 月至 2009 年 6 月到本院体检中心体检的健康者 10 例, 其中男 8 例, 女 2 例。所有 COPD 患者为同一时间段到本院参加 COPD 健康教育的稳定

期患者均符合 COPD 诊断标准: 吸入支气管扩张剂后第一秒用力呼气量占用力肺活量百分比(FEV₁%FVC) < 70%。其中 COPD 合并骨骼肌萎缩组(COPD 萎缩组)10 例, 男 7 例, 女 3 例, COPD 骨骼肌非萎缩组(COPD 非萎缩组)10 例, 男 7 例, 女 3 例。入选者排除患有肿瘤、心肝肾功能衰竭、代谢和内分泌疾病、严重消化系统疾病、合并肢体功能障碍的神经系统疾病等。本研究经医院医学伦理委员会同意并与所有入选者签定知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 肺功能及血气分析 行肺功能检查, 记录 FVC、FEV₁占预计值的百分比(FEV₁%PRE)、FEV₁%FVC。行血气分析检查, 记录氧分压(PaO₂)及二氧化碳分压(PCO₂)。

* 基金项目: 云南省科技计划资助项目(2008CD011)。 # 现在四川省南充市中心医院工作(邮编: 637000)。 △ 通讯作者, Tel: 13577096065; E-mail: dailuming@hotmail.com。

1.2.2 测量身高和体质量 体质量除以身高平方(m²)计算出体质量指数(BMI)。生物阻抗仪(Beurer 公司 德国)测得脂肪质量(FM)、去脂肪质量(FFM),FM 除以 m² 得出脂肪指数(FMI)、FFM 除以身高平方(m²)得出去脂肪指数(FFMI)。骨骼肌萎缩标准为: BMI ≤ 21 kg/m² 及 FFI ≤ 16 kg/m² (男)或 FFI ≤ 15 kg/m² (女)^[4]。

1.2.3 检测血清 C 反应蛋白(CRP)、白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α) 以 TNF-α ELISA 及 IL-8 ELISA 试剂盒检测 TNF-α、IL-8 水平,昆明医学院第一附属医院生化室检测超敏 CRP(hsCRP)水平。

1.2.4 骨骼肌标本收集保存 活检装置(Bard Peripheral vascular, Inc. USA)取股外侧肌 50 mg 作为实验标本, -80 °C 保存, 1 个月之内提取总 RNA 并合成 cDNA。

1.2.5 实时荧光定量 PCR Trizol 试剂(generay 生物公司, 上海)提取总 RNA, 分光光度计测定总 RNA 浓度。按 cDNA 合成试剂盒(Fermentals 生物公司, 立陶宛)说明以 2 mg 总 RNA 逆转录合成 cDNA。根据实时荧光定量试剂(Amresco 公司, 美国)说明以 1 mg cDNA PCR 仪(7300 Real time PCR System, USA)进行扩增, PPARα mRNA 上游引物: 5'-GGG ACA GAC TGA CAC CTT ACT T-3', 下游引物: 5'-ATG GGA CCC TTA TCA ATC CTA-3', 以管家基因(Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参照。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 63 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 33 个循环, 72 °C 延伸加时 5 min。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件对数据进行统计处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组均数比较用 *t* 检验, 多组均数比较应用单因素方差分析, 可能相关的数据用 Pearson 进行相关分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组相关项目比较 COPD 萎缩组与对照组和 COPD 非萎缩组体质量、BMI、FFM、FFMI 比较差异有统计学意义(均 *P* < 0.01), 对照组与 COPD 非萎缩组 BMI 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。对照组和 COPD 萎缩组及 COPD 非萎缩组肺功能两两比较, FEV₁%PRE、FEV₁%FVC、FVC%PRE 差异有统计学意义(均 *P* < 0.01)。COPD 萎缩组和 COPD 非萎缩组 PaO₂ 与对照组比较, 差异有统计学意义(均 *P* < 0.01)。见表 1。

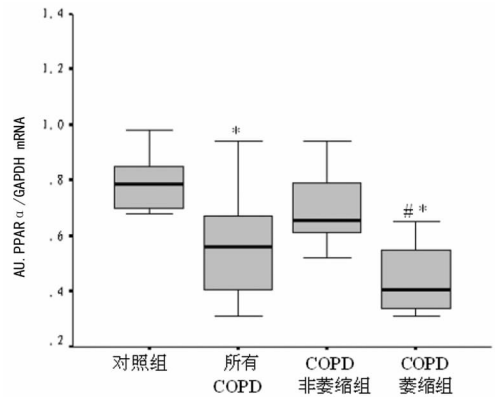
表 1 3 组相关项目比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	COPD 非萎缩组	COPD 萎缩组
年龄(岁)	55.5 ± 5.9	60.9 ± 8.7	61.3 ± 8.6
身高(cm)	164.2 ± 5.5	166.1 ± 7.2	164.7 ± 5.5
体质量(kg)	68.5 ± 6.4	64.8 ± 5.3	48.2 ± 3.0 ** ▲
BMI (kg/m ²)	25.4 ± 1.8	23.5 ± 1.1 *	18.2 ± 0.7 ** ▲
FFM (kg)	48.3 ± 4.7	47.0 ± 3.4	34.7 ± 2.5 ** ▲
FFMI(kg/m ²)	17.9 ± 1.3	17.0 ± 0.7	12.8 ± 1.3 ** ▲
FEV ₁ %PRE	101.1 ± 9.2	57.5 ± 11.3 **	40.5 ± 8.0 ** ▲
VFEV ₁ /FVC%	88.9 ± 4.7	65.3 ± 4.2 **	55.3 ± 6.5 ** ▲
FVC%PRE	100.0 ± 8.2	80.7 ± 6.4 **	66.5 ± 4.5 ** ▲
PaO ₂ (kPa)	10.9 ± 1.4	9.4 ± 0.7 **	8.6 ± 0.5 ** ▲
PCO ₂ (kPa)	5.3 ± 0.5	5.2 ± 0.7	5.7 ± 0.9

*: *P* < 0.05, **: *P* < 0.01, 与对照组比较; ▲: *P* < 0.01, 与 COPD 非萎缩组比较。

2.2 过氧化酶体增殖物激活受体 α(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARα) mRNA 表达水平 股外侧肌 PPARα mRNA 相对表达量对照组为 0.82 ± 0.15、COPD 萎缩组为 0.44 ± 0.12、COPD 非萎缩组为 0.69 ± 0.14, 所有 COPD

为 0.56 ± 0.18(图 1)。COPD 非萎缩组与对照组 PPARα mRNA 含量差异无统计学意义(*P* > 0.05); COPD 萎缩组与 COPD 非萎缩组和对照组 PPARα mRNA 含量差异有统计学意义(均 *P* < 0.01); 对照组和所有 COPD 患者 PPARα mRNA 含量差异有统计学意义(*P* < 0.01)。



*: *P* < 0.01, 与对照组比较; #: *P* < 0.01, 与 COPD 非萎缩组比较。

图 1 PPARα mRNA 表达水平

2.3 血清炎症因子水平 对照组和 COPD 萎缩组及 COPD 非萎缩组血清炎症因子水平 hsCRP 比较差异无统计学意义(*P* > 0.05), IL-8、TNF-α 两两比较差异有统计学意义(均 *P* < 0.01), 见表 2。

表 2 各组血清炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	COPD 非萎缩组	COPD 萎缩组
hsCRP	3.1 ± 0.9	4.2 ± 1.2	4.8 ± 2.3
IL-8	24.9 ± 4.6	42.5 ± 7.4 *	81.5 ± 8.2 * ▲
TNF-α	37.5 ± 5.0	76.7 ± 7.7 *	96.5 ± 11.2 * ▲

*: *P* < 0.01 与对照组比较; ▲: *P* < 0.01 与 COPD 非萎缩组比较。

2.4 PPARα mRNA 表达与 FFMI 及 BMI 相关关系 股外侧肌 PPARα mRNA 表达与 FFMI 及 BMI 呈正相关(*r* = 0.586, *r* = 0.626, *P* < 0.01), 见图 2。

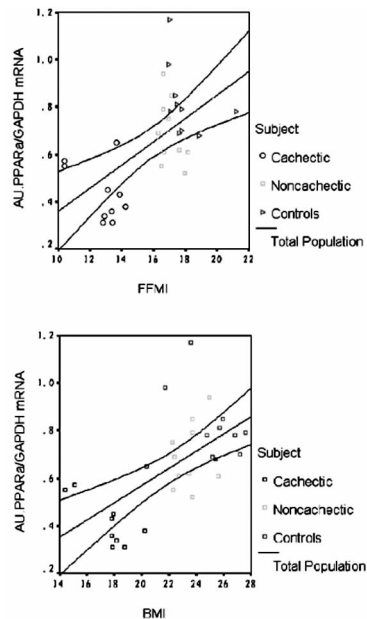


图 2 PPARα mRNA 与 FFMI 及 BMI 相关关系

2.5 PPARα mRNA 表达与肺功能相关关系 股外侧肌 PPARα mRNA 表达与 FEV₁%PRE 及 FEV₁%FVC 呈正相关

($r=0.574, r=0.613, P<0.01$), 见图 3。

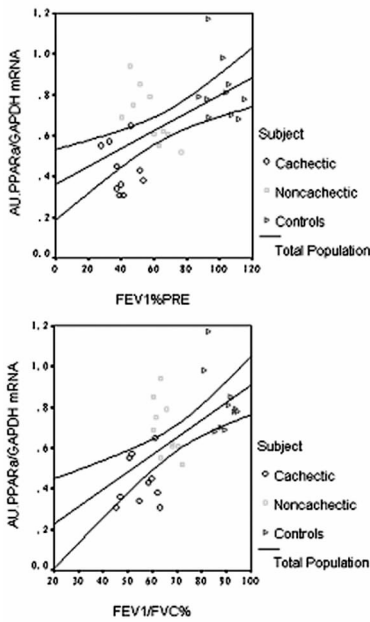


图 3 PPAR α mRNA 表达与肺功能相关关系

2.6 PPAR α mRNA 表达与炎症因子相关关系 股外侧肌 PPAR α mRNA 表达与 TNF- α 及 IL-8 呈负相关($r=-0.618, r=-0.690, P<0.01$), 见图 4。

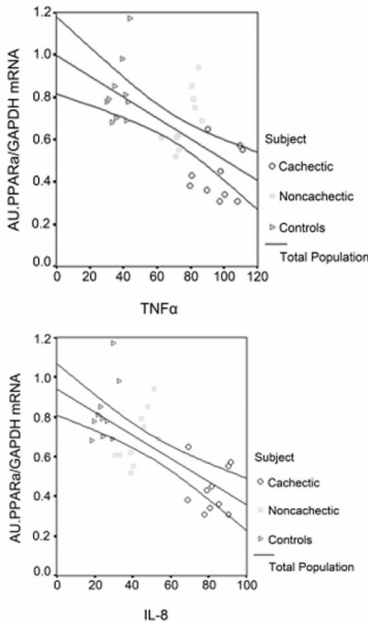


图 4 PPAR α mRNA 与炎症因子相关关系

3 讨论

骨骼肌萎缩是影响 COPD 患者最终存活率的重要原因^[3]。近来一些研究发现 PPAR α 可以参与全身炎症反应、调节骨骼肌氧化代谢、促进纤维类型的转换, 可能导致了 COPD 骨骼肌萎缩的发生^[4-5]。PPAR α 有 3 种类型: PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ 。Remels 等^[4] 研究发现 PPAR α mRNA 在 COPD 并骨骼肌萎缩患者中表达下降, PPAR α 与慢性炎症因子 TNF α 呈负相关, 但是研究的样本量偏小, 并且对照组入选对象 PaO₂ 轻微降低, 不能排除轻度 COPD 可能。

本研究结果显示, COPD 骨骼肌萎缩组股外侧肌 PPAR α mRNA 表达水平较 COPD 骨骼肌非萎缩组和对照组显著下降

($P<0.01$), COPD 骨骼肌非萎缩组和对照组 PPAR α mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$), 与 Remels 等^[4] 研究结果一致, 但不同的是 COPD 骨骼肌非萎缩组 PPAR α mRNA 表达量均值低于对照组, 而不是高于对照组, COPD 骨骼肌非萎缩组 PPAR α mRNA 表达量呈现下降趋势, 这种不同可能与本研究更加严格筛选健康者为对照组, 排除健康者合并轻度 COPD, 且对照组 PPAR α mRNA 表达量较所有 COPD 高($P<0.01$) 有关。有理由认为 COPD 骨骼肌萎缩患者股外侧肌 PPAR α mRNA 表达水平下调, 虽然部分 COPD 患者尚未出现外周骨骼肌萎缩, 但 PPAR α mRNA 表达已呈现下降趋势。

FFMI 和 BMI 可以评价身体组成及营养状况, 尤其 FFMI 可以反映肌肉质量所占比例, 因此本研究以 FFMI 和 BMI 作为评价身体组成及营养和确定骨骼肌萎缩的重要指标。本研究结果显示 PPAR α mRNA 表达与 FFMI 及 BMI 呈正相关, 说明 PPAR α mRNA 表达下调时 FFMI 及 BMI 下降, PPAR α mRNA 表达下调与骨骼肌萎缩相关; COPD 骨骼肌萎缩患者 PPAR α mRNA 表达与肺功能呈正相关; COPD 骨骼肌萎缩患者 PPAR α mRNA 表达与血清 TNF- α 及 IL-8 呈负相关。

PPAR α 主要在骨骼肌、心脏、肾脏和大肠表达, 研究发现 PPAR α 可通过下调核因子 NF- κ B 信息传导途径达到抗炎作用, 可广泛参与并调节炎症反应^[6]。本研究结果表明 COPD 骨骼肌萎缩患者 PPAR α mRNA 表达下调, 当 PPAR α 表达下调时对 NF- κ B 抑制减弱, 反过来 NF- κ B 又可进一步抑制 PPAR α 表达, 使得 NF- κ B 在氧化应激的作用下被激活, 激活的 NF- κ B 可启动 TNF- α 、IL-8 和其他炎症因子的表达参与炎症反应。因此 PPAR α mRNA 表达下调可促使 COPD 全身炎症反应发生并呈慢性进行性发展。本研究结果显示所有 COPD 患者及 COPD 骨骼肌萎缩血清 TNF- α 及 IL-8 显著升高而 CRP 水平无差异, 且 PPAR α mRNA 与 TNF- α 及 IL-8 呈负相关。有研究表明在基础代谢率增多和 FFMI 减少的 COPD 患者中血清 CRP 升高^[7], 但本研究未得到这样的结果, 可能因为 CRP 在大多情况下作为急性炎症反应的一个重要指标在稳定期的患者不一定会升高。由于标本取材所限, 本研究未检测股四头肌炎症因子水平, 但 Montes de Oca 等^[8] 研究证实了 COPD 患者股四头肌局部炎症因子水平升高, 持续的全身炎症反应可以使机体处于分解代谢状态, 可以导致骨骼肌萎缩的发生。

总之, 股外侧肌 PPAR α mRNA 在所有 COPD 及 COPD 合并骨骼肌萎缩的患者中表达下降, 在 COPD 骨骼肌非萎缩患者中表达呈下降趋势。血清 TNF- α 、IL-8 在 COPD 骨骼肌萎缩及非萎缩患者中升高。PPAR α mRNA 表达与 FFMI 及 BMI 呈正相关; 与 TNF- α 及 IL-8 呈负相关; 与 FEV₁% PRE 及 FEV₁% FVC 呈正相关。PPAR α mRNA 表达水平下调与 COPD 全身炎症反应及肺功能下降相关, 在 COPD 骨骼肌萎缩中有着重要作用。

参考文献:

[1] Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease; GOLD executive summary [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(6): 532-555.
 [2] Kim HC, Mofarrahi 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.

组比较差异有统计学意义(封 3 图 3)。各组大鼠滑膜组织 HIF-1 α 蛋白表达的免疫组化评分,见表 2。

3 讨 论

本实验用半定量的方法对各组目的/内参的灰度值进行了统计分析。结果表明 THH 高、中、低剂量组及地塞米松组与 CIA 模型组和对照组中的 HIF-1 α 表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。

从免疫组化结果可见滑膜组织中,对照组基本没有 HIF-1 α 蛋白表达;CIA 模型组 HIF-1 α 表达增强。HIF-1 α 在细胞核及细胞质中均表达。各个治疗组的情况则相对好得多,在滑膜细胞 HIF-1 α 表达只有少量核阳性,且颜色呈浅褐色,免疫组化结果有明显差异。半定量记分法结果显示各个治疗组与 CIA 模型组之间 HIF-1 α 的蛋白表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。

本研究显示在 CIA 模型中,THH 通过降低 HIF-1 α 的表达调控其下游基因,特别是降低其滑膜组织中 VEGF 的表达,进而控制其血管翳的生成。在临床用作治疗 RA,其主要成分雷公藤甲素被证实通过抑制 HIF-1 α 的表达及其活性,作为一种潜在的抗肿瘤药物^[12]。说明 THH 对于 CIA 模型组的治疗有明显疗效,已有一定的研究表明 THH 对于 RA 有一定的治疗作用^[13]。也有实验证明 THH 在一定浓度下对于 RA 滑膜巨噬样细胞和滑膜成纤维样细胞有诱导凋亡和明显抑制异常增殖作用^[14]。提示 THH 通过 HIF-1 α 的途径调节其下游基因的表达可能是治疗 RA 患者的作用机制之一。

参考文献:

- [1] 周润华,朱芳晓,王晓桃,等. 76 例类风湿关节炎患者抑郁症状临床分析[J]. 重庆医学,2010,39(4):466-468.
- [2] Westra J, Brouwer E, Bos R, et al. Regulation of cytokine-induced HIF-1 α expression in rheumatoid synovial fibroblasts[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007(1108):340-348.
- [3] Hashimoto A, Tarner IH, Bohle RM, et al. Analysis of vascular gene expression in arthritic synovium by laser-mediated microdissection[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(4):1094-1105.
- [4] Boulton J, Roberts K, Brookes MJ, et al. Overexpression of

cellular iron import proteins is associated with malignant progression of esophageal adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(2):379-387.

- [5] Tang N, Wang L, Esko J, et al. Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis[J]. Cancer Cell, 2004, 6(5):485-495.
- [6] 陈森洲,王险峰,侯巧燕,等. 低氧诱导因子-1 α 在 CIA 模型中的表达及其意义[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2010, 30(2):115-119.
- [7] Kajiwaru H, Luo Z, Belanger AJ, et al. A hypoxic inducible factor-1 α hybrid enhances collateral development and reduces vascular leakage in diabetic rats[J]. J Gene Med, 2009, 11(5):390-400.
- [8] 王钺,隆长锋. 中药昆明山海棠的研究进展[J]. 医学综述, 2006, 12(11):691-692.
- [9] 张彦文,范云双,王晓东,等. 昆明山海棠中具有免疫抑制活性的二萜类化合物[J]. 中草药, 2007, 38(4):493-496.
- [10] 韩玉. 昆明山海棠的药理作用研究进展[J]. 国外医学中医中药分册, 2005, 27(5):272-275.
- [11] Xu Y, Zheng YT, He L, et al. Study of Tripterygium hypoglaucom Hutch on mouse's splenic lymphocyte activation in vitro[J]. Zhong Yao Cai, 2008, 31(4):557-561.
- [12] 周光辉,钟秋生,朱永坤,等. 补肾活血方合火把花根片治疗类风湿关节炎临床研究[J]. 新中医, 2008, 40(9):46-47.
- [13] 曾润铭,杜世新,吴杰,等. 昆明山海棠与类风湿关节炎滑膜细胞体外增殖和凋亡[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(50):9892-9897.
- [14] Zhou ZL, Luo ZG, Yu B, et al. Increased accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α with reduced transcriptional activity mediates the antitumor effect of triptolide[J]. Mol Cancer, 2010(9):268.

(收稿日期:2011-05-09 修回日期:2011-07-12)

(上接第 3539 页)

- [3] 龙翔宇,何大川,戴路明,等. COPD 骨骼肌功能障碍与 PPAR α 基因多态性关系研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(18):2406-2408.
- [4] Remels AH, Schrauwen P, Broekhuizen R, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor expression is reduced in skeletal muscle in COPD[J]. Eur Respir J, 2007, 30(2):245-252.
- [5] Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability[J]. FASEB J, 2003, 17(15):2299-2301.
- [6] Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates

the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1[J]. J Biol Chem, 1999, 274(45):32048-32054.

- [7] Engelen MP, Schols AM, Does JD, et al. Skeletal muscle weakness is associated with wasting of extremity fat-free mass but not with airflow obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(3):733-738.
- [8] Montes de Oca M, Torres SH, De Sanctis J, et al. Skeletal muscle inflammation and nitric oxide in patients with COPD[J]. Eur Respir J, 2005, 26(3):390-397.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-08-12)