

· 论 著 ·

## 慢性阻塞性肺病患者膈肌肌凝蛋白重链表型的变化

白冲<sup>1\*</sup>, 陈若华<sup>2</sup>, 陆方林<sup>3</sup>, 黄盛东<sup>3</sup>, 商艳<sup>1</sup>, 马凌云<sup>1</sup>, 李强<sup>1</sup>, 刘忠令<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433; 2. 长海医院儿科; 3. 长海医院胸心外科)

**[摘要]** 目的: 研究以呼吸负荷和肺容量慢性增加为特点的慢性阻塞性肺病(COPD)患者膈肌中肌凝蛋白表型的变化。方法: 24例患者经开胸手术取膈肌标本。通过非变性电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结合Western印迹分析检测膈肌肌凝蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)各种异构体组分改变。分析患者第1秒用力肺活量(FEV<sub>1</sub>)、肺总量(TLC)和功能残气量(FRC)等检测结果与慢MHC( $\beta$ MHC)占总MHC比例的相关性。结果: 慢性过度负荷与 $\beta$ MHC比例增加, 快MHC比例减少有关; COPD患者 $\beta$ MHC比例为(75.36 $\pm$ 9.00)%, 明显高于对照组的(50.00 $\pm$ 4.81)% ( $P < 0.01$ );  $\beta$ MHC比例与FEV<sub>1</sub>呈线性负相关( $r = -0.89$ ,  $P < 0.01$ ), 与TLC呈线性正相关( $r = 0.60$ ,  $P < 0.01$ ), 与FRC呈线性正相关( $r = 0.74$ ,  $P < 0.01$ )。结论: COPD患者快肌凝蛋白比例减少而慢肌凝蛋白比例增加, 这种改变与肺过度充气有关, 也可能反映膈肌对于新的功能需要的适应。

**[关键词]** 肺疾病, 阻塞性; 膈肌; 肌凝蛋白重链; 表型

**[中图分类号]** R 563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)07-0733-04

### Changes of myosin heavy chain phenotype in diaphragm of chronic obstructive pulmonary disease patients

BAI Chong<sup>1\*</sup>, CHEN Ruo-Hua<sup>2</sup>, LU Fang-Lin<sup>3</sup>, HUANG Sheng-Dong<sup>3</sup>, SHANG Yan<sup>1</sup>, MA Ling-Yun<sup>1</sup>, LI Qiang<sup>1</sup>, LIU Zhong-Ling<sup>1</sup> (1. Department of Respiratory Diseases, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pediatrics, Changhai Hospital; 3. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the phenotype changes of myosin heavy chain (MHC) in the diaphragm of severe chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients characterized by chronic increase in respiratory load and lung volume. **Methods:** Diaphragm biopsies were obtained from 24 patients underwent thoracic surgery. MHC isoforms were analyzed with electrophoresis in non-denaturing conditions, SDS-glycerol PAGE, and Western blotting. Forced expiratory volume in 1 s (FEV<sub>1</sub>), total lung capacity (TLC), and functional residual capacity (FRC) of the 24 patients were measured before surgery. **Results:** Human diaphragm contained at least 4 myosin isoforms (1 slow and 3 fast). Chronic overload was associated with the increase in the percentage of slow  $\beta$ MHC and fast MHC.  $\beta$ MHC in emphysematous patients was (75.36 $\pm$ 9.00)%, much higher than that in control group (50.00 $\pm$ 4.81)% ( $P < 0.01$ ). Linear correlations were found between  $\beta$ MHC percentage and FEV<sub>1</sub> ( $r = -0.89$ ,  $P < 0.01$ ), TLC ( $r = 0.60$ ,  $P < 0.01$ ), and FRC ( $r = 0.74$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The human adult diaphragm is composed of a balanced proportion of slow and fast myosin isoforms. In COPD patients, fast myosins decreases and slow myosins increases, which may be related to lung hyperinflation and reflect an adaptation of the diaphragm to the new functional requirements.

**[KEY WORDS]** lung disease, obstructive; diaphragm; myosin heavy chain; phenotype

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(7): 733-736]

[1] 慢性阻塞性肺病(COPD)患者存在膈肌疲劳, 而膈肌疲劳发生的机制尚不清楚。肌凝蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)异构体组分的变化是目前横纹肌病理疲劳机制研究的一个热点, 研究<sup>[1]</sup>表明, MHC不仅决定了整个肌凝蛋白分子的ATP酶活性, 还与肌纤维最大收缩速度有关。肌肉负荷的慢性增加可以使MHC组分发生改变, 即由高ATP酶活性的快MHCs比例降低, 而低ATP酶活性的慢MHC( $\beta$ MHC)比例升高, 肌凝蛋白的这种转变与降低未负荷肌肉的收缩速度和节约能耗密切相关

关, 是病理情况下的一种有效代偿<sup>[2]</sup>。本研究拟通过非变性蛋白电泳免疫印迹法及SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳免疫印迹法检测COPD患者不同表型的肌凝蛋白及其异构体组分改变, 并结合临床有关肺功能指标分析两者之间的相关性。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(39900066)。

**[作者简介]** 白冲(1964-), 男(汉族), 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师

\*Corresponding author. E-mail: bc7878@sohu.com

### 1 材料和方法

1.1 研究对象 24例食管癌或肺癌手术患者,均未接受长期激素治疗,营养状态良好。所有患者术前均进行完整的肺功能检测,包括第1秒用力肺活量(FEV<sub>1</sub>)和用力肺活量(FVC),肺总量(TLC)和功能残气量(FRC),并签署了知情同意书。所有患者分为2组。COPD组14例,其中男12例,女2例,年龄

(61.4 ± 10.2)岁,为稳定期COPD患者,诊断明确,肺功能II级,即30% FEV<sub>1</sub>/FVC < 70%, FEV<sub>1</sub>占预计值的百分比[FEV<sub>1</sub>(%pre)] < 80%;对照组10例,其中男8例,女2例,年龄(65.5 ± 7.5)岁,为肺功能正常、无COPD的食管癌患者,两组患者肺功能情况见表1。手术时在膈肌近食管的相同部位取50~100mg肌肉组织作为检测标本。所有标本在取样后立即放入液氮中保存待用。

表1 两组肺功能情况和βMHC比例分析结果

Tab 1 Lung function and βMHC in COPD and control group

Group	n	FEV <sub>1</sub> (%pre)	FEV <sub>1</sub> /FVC(%)	TLC(%)	FRC(%)	βMHC(%)
COPD	14	62.35 ± 6.90**	58.88 ± 7.72**	101.50 ± 25.61	114.64 ± 28.60*	75.36 ± 9.00**
Control	10	97.50 ± 4.01	91.81 ± 5.83	90.20 ± 7.24	92.70 ± 18.85	50.00 ± 4.81

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs control group

1.2 药物和试剂 丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、N-三羟甲基氨基甲烷(Tris)、四甲基乙二胺(TEMED)、溴酚蓝、吐温20、二氨基联苯胺(DAB)购自美国Amresco公司,十二烷基磺酸钠(SDS)、乙二醇双(α-氨基乙酸)醚四乙酸(EGTA)购自美国Sigma公司,鼠抗人快MHC单抗(NCL-MHCf)、鼠抗人慢MHC单抗(NCL-MHCc)、兔抗鼠抗体购自英国Novocastra公司。

1.3 非变性条件凝胶电泳标本处理 20mg肌肉标本捣碎后,4倍体积的改良Guba's溶液(0.3mol/L KCl, 0.1mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.001mol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.01mol/L Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1%叠氮钠和1%β-巯基乙醇)调成匀浆,以4~30000×g,离心20min,上清液置于-2050%甘油中保存。

1.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳标本处理 肌肉匀浆中加入10倍体积缓冲液:20mmol/L KCl, 2mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mmol/L EGTA (pH 6.8),以12000×g离心2min;上述缓冲液重复洗涤1次,40mmol/L Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1mmol/L EGTA (pH 9.5)重悬沉淀,室温作用15min;粗提肌凝蛋白,以4~12000×g,离心15min,上清液中蛋白浓度用Bradford法测定。

1.5 非变性条件凝胶电泳 用0.01mol/L Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>和50%甘油40倍稀释粗提液,1×丙烯酰胺非变性胶,每个样孔上样30μl(1~2mg肌凝蛋白),以pH 8.5的0.05%溴酚蓝显色示踪,电压14V/cm,1~3h恒温电泳20~24h,转膜,Western印

迹检测。

1.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 肌凝蛋白抽提液与2×SDS上样缓冲液(4×Tris-HCl/SDS 25ml pH 6.8,甘油20ml,SDS 4g,DTT 3.1g,溴酚蓝1mg,加水定容至100ml)等量混匀,6%聚丙烯酰胺凝胶电泳,每个样孔上样30μl(1~2mg肌凝蛋白),以预染标记的蛋白标记显色示踪,电压60V/cm,室温下电泳2h,转膜,Western印迹检测。

1.7 Western印迹检测MHC 将Whatman 3M滤纸和NC膜用转移缓冲液浸泡3~5min;在阳极石墨板上平铺3层Whatman 3M滤纸,在其上依次平铺NC膜、凝胶和另3层Whatman 3M滤纸,去除滤纸间水泡,安装好阴极石墨板,70~75mA转移2h以上;转移完毕后标记膜的方向。将NC膜放入含封闭液(5%脱脂奶粉+TBST)的托盘中,平放在缓摇摇床上,室温下封闭1h,倾去封闭液,用TBST漂洗NC膜2~3次,每次10min;将NC膜浸入托盘中,加1:500稀释的NCL-MHCf和NCL-MHCc(一抗),平放于缓摇摇床上,室温下作用2h;取出NC膜,回收一抗稀释液,用足量TBST漂洗NC膜2~3次,每次10min;将NC膜浸入以1:2000稀释的兔抗鼠抗体溶液中(二抗),置缓摇摇床上室温下孵育1~2h;取出NC膜,回收二抗稀释液,用足量TBST漂洗NC膜2~3次,每次10min。取5μl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液加入10ml DAB溶液,摇匀后倒入托盘;将NC膜浸入显色液中,置缓摇摇床上缓摇30min,同时观察显色反应;待棕褐色条带显色清晰后,用ddH<sub>2</sub>O冲洗终止反应;将结果扫描入电脑,NC膜干燥后保存于干净塑料袋中。



1.8 结果显示和统计学处理 将Western印迹检测结果用UVF凝胶成像系统扫描,去除无关背景和杂渍。以杂交阳性电泳条带的灰度值作半定量分析, $\beta$ MHC比例以其占总肌凝蛋白和总MHC中相对百分数平均值来表示。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Student *t* 检验和Wilcoxon秩和检验; $\beta$ MHC百分比与FEV<sub>1</sub>、TLC、FRC等肺功能指标间的相关性用非参数Mann-Whitney法进行组间比较和回归分析。

## 2 结果

2.1 非变性蛋白电泳 图1示COPD患者(P1~14)和对照组(C1~10)患者膈肌肌凝蛋白电泳图。其中I型耐疲劳肌纤维( $\beta$ MHC组成的肌凝蛋白)电泳迁移最慢,与其他哺乳类动物膈肌肌凝蛋白相似,在这两组患者中膈肌肌凝蛋白均分离为快和慢迁移带,分别对应于快和慢肌凝蛋白表型。然而,各自含量却各不相同。在所有标本中都检测出慢肌凝蛋白,为一深黑的靠后的迁移条带。但是快肌凝蛋白含量变化较大,一部分样本能清晰检测到3条快肌凝蛋白条带,而另一部分却只检测到2条。COPD患者慢肌凝蛋白比例明显上升。

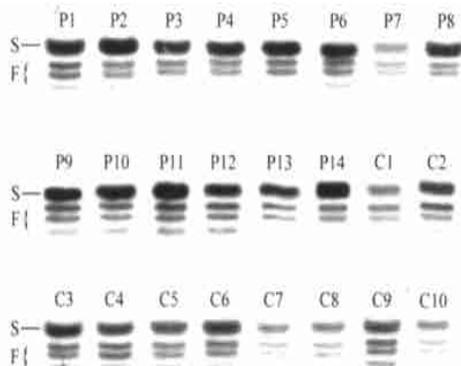


图1 膈肌肌凝蛋白非变性电泳

Fig 1 Electrophoresis of diaphragm myosin in nondenaturing conditions

P1-14: COPD patients; C1-10: Control patients;

S: Slow myosin; F: Fast myosin

2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳免疫印迹 聚丙烯酰胺凝胶电泳发现在14例COPD患者和10例对照组患者中,MHC异构体比例存在着明显的差异,见图2。其中I型MHC( $\beta$ MHC)组成的快迁移条带在COPD患者中的比例较对照组明显增加,24份标本的变性和非变性电泳结果相比,慢肌凝蛋白和I型MHC的比例间相关性很强( $r=0.97, P<0.01$ )。COPD组及对照组各样本间 $\beta$ MHC比例相对稳定,COPD组 $\beta$ MHC比例为 $(75.36 \pm 9.00)\%$ ,高

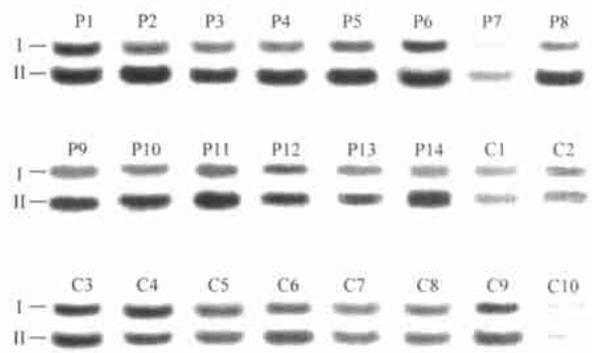


图2 膈肌肌凝蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig 2 SDS-glycerol PAGE of diaphragm myosin

P1-14: COPD patients; C1-10: Control

patients; I: MHC I; II: MHC II

于对照组的 $(50.00 \pm 4.81)\%$  ( $P<0.01$ )。见表1。  
2.3 COPD及对照患者膈肌中慢肌凝蛋白与肺功能关系 COPD稳定期患者 $\beta$ MHC慢肌凝蛋白占总肌凝蛋白比例较对照组增加25% [ $(75.36 \pm 9.00)\%$  vs  $(50.00 \pm 4.81)\%$ ,  $P<0.01$ ]。 $\beta$ MHC比例和反应气道阻力慢性增加的FEV<sub>1</sub>以及肺充气的肺总量(TLC)和功能残气量(FRC)等相关性分析结果表明,FEV<sub>1</sub>和 $\beta$ MHC间负相关性( $r=-0.89, P=0.0001$ ), $\beta$ MHC和TLC、FRC间有相关性(分别为 $r=0.60, P=0.0018$ ;  $r=0.74, P=0.0001$ )。上述分析结果显示肌凝蛋白向 $\beta$ MHC的转变与肺过度充气 and 气道阻塞成正比。

## 3 讨论

横纹肌中存在由不同类型MHC异构体组成的多种肌凝蛋白异构体,本研究结果显示,人膈肌中至少存在4种肌凝蛋白异构体,与国外同类研究结果一致<sup>[3]</sup>。在以往横纹肌的相关研究中发现,慢性过度负荷导致 $\beta$ MHC的增加而快MHC异构体相对减少<sup>[4-6]</sup>。本研究中发现,人膈肌同样存在这一现象。随着COPD患者肺功能恶化的加剧,这种MHC的转变也有增加的趋势。

非变性凝胶电泳可根据蛋白分子荷电量、分子量等多种因素的综合差异将肌凝蛋白异构体分离。通过这种方法可以将人膈肌肌凝蛋白粗提物区分为2组条带:第1组为由3个条带组成的快迁移组,另一为单一宽黑条带组成的慢迁移组,这两种条带大致分别相当于快和慢肌凝蛋白异构体<sup>[7]</sup>。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳可以根据分子量差异区分不同MHC异构体<sup>[5]</sup>。与非变性的焦磷酸凝胶电泳不同的是,快迁移条带相当于慢MHC( $\beta$ MHC)组成的肌凝蛋白,而慢迁移条带相当于快

MHC 组成的肌凝蛋白。在肺功能正常或接近正常患者标本中,快迁移MHC 异构体占总MHC 的一半,这与焦磷酸胶电泳中相应的慢迁移条带的比例一致,证实在正常人膈肌中总肌凝蛋白的快慢MHC 比例接近。SDS-聚丙烯酰胺电泳不仅能有效区分快、慢MHC 组成的电泳条带,而且能进一步观察到快MHC 中MHC II<sub>a</sub>、MHC II<sub>x</sub> 等异构体之间的差别,但本实验结果并未观察到后者的差别,这可能与这几种异构体相对分子质量差别较小以及电泳时间较短等因素有关。

通过对比 24 例患者标本的两种不同蛋白电泳结果,发现焦磷酸胶电泳中慢肌凝蛋白的比例和聚丙烯酰胺凝胶电泳中  $\beta$ MHC 的比例明显相关,前者观察到的慢迁移条带相当于  $\beta$ MHC 组成的肌凝蛋白。采用 Western 印迹结果对目的蛋白电泳条带进行半定量分析,是为了减少杂蛋白成分对电泳结果的影响,进而影响对结果的判断。本实验结果表明, COPD 患者慢肌凝蛋白比例增加,而快肌凝蛋白比例减少。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,进一步发现这种变化主要是MHC 不同异构体的蛋白表达水平发生了改变,以  $\beta$ MHC 表达增加最为显著。

为进一步了解慢肌凝蛋白比例增加的机制,本实验对  $\beta$ MHC 比例和肺功能之间进行了相关性分析,初步设想, COPD 患者肺功能的改变可以慢性增加对膈肌的负荷,就像心脏的慢性血流动力过度负荷引起的改变一样,使肌凝蛋白表型比例发生改变<sup>[8]</sup>。实验结果证实,慢肌凝蛋白比例与 TLC、FRC、FEV<sub>1</sub> 均相关。尽管还不能就此结果而简单断言两者之间存在必然的因果关系,但是,这些结果已足以说明肌凝蛋白由快向慢的转变程度随肺充气和气道阻塞程度的增加而增加。FRC 决定了吸气前膈肌的长度,当 FRC 增加时膈肌缩短,这样膈肌产生呼吸驱动的能力减弱<sup>[9]</sup>。

肌凝蛋白表型比例与相应的肺功能参数相关并不意味着MHC 异构体成分改变造成了这些生理指标的改变,而是说明较高的气道阻塞和肺过度充气,导致了慢肌凝蛋白比例升高。这种肌凝蛋白表型的转变,与以往有关快骨骼肌在不同负荷条件下肌凝蛋白表型变化类似<sup>[10]</sup>。但尚不清楚人膈肌在过度牵拉和(或)负荷时肌凝蛋白表型变化的触发因素的详细情况。COPD 患者膈肌过度牵拉使膈肌收缩长度缩短,这种情况下呼吸负荷增加使肌肉随之改变,因此,导致有害的机械和能量变化可能是触发因素之一。当然也不能排除其他触发因素。Ribera 等<sup>[11]</sup>发现 COPD 患者在呼吸阻力和工作负荷增加时,吸气肌群的氧化酶增加,结构蛋白发生改变,与本实验的

结果一致。今后有必要进一步实验以明确在人膈肌的长期过度负荷中各种旁路和机制。

本实验结果表明,与其他的横纹肌相似,膈肌中的肌凝蛋白存在一定的可塑性。为适应慢性过度负荷情况下呼吸功能需要,膈肌肌凝蛋白基因表达发生明显改变,即快MHC 表达减少而慢MHC 表达增加。COPD 患者膈肌中肌凝蛋白分子水平的变化与其生理变化是一致的,因此在 COPD 患者中使用呼吸肌康复治疗改善肺功能,减少气道阻塞和肺过度充气,以减少快MHC 向  $\beta$ MHC 转变,是值得进一步探索的方法。

### [参考文献]

- [1] Seward DJ, Haney JC, Rudnicki MA, et al. bHLH transcription factor myoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 280(2): 408-413.
- [2] Swynghedauw B. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles [J]. *Physiol Rev*, 1986, 66(3): 710-771.
- [3] Mercadier JJ, Schwartz K, Schiaffino S, et al. Myosin heavy chain gene expression changes in the diaphragm of patients with chronic lung hyperinflation [J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(18): 529-534.
- [4] Schiaffino S, Reggiani C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle [J]. *J Appl Physiol*, 1994, 77(2): 493-501.
- [5] Sieck GC, Prakash YS, Han YS, et al. Changes in actomyosin ATP consumption rate in rat diaphragm muscle fibers during postnatal development [J]. *J Appl Physiol*, 2003, 94(5): 1896-1902.
- [6] Ennion S, Sant J, Pereira A, et al. Characterization of human skeletal muscle fibers according to the myosin heavy chains they express [J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 1995, 16(1): 35-43.
- [7] Han YS, Geiger PC, Cody MJ, et al. ATP consumption rate per cross bridge depends on myosin heavy chain isoform [J]. *J Appl Physiol*, 2003, 94(6): 2188-2196.
- [8] Hartmann N, Martrette JM, Westphal A. Influence of the Lurcher mutation on myosin heavy chain expression in skeletal and cardiac muscles [J]. *J Cell Biochem Suppl*, 2001, 36(Suppl): 222-231.
- [9] Kin DK, Zhu J, Kozyak BW, et al. Myosin heavy chain and physiological adaptation of the rat diaphragm in elastase-induced emphysema [J]. *Respir Res*, 2003, 4(1): 1-19.
- [10] Sasaman F, Karpati G, Shoubridge EA. Nuclear genetic control of mitochondrial translation in skeletal muscle revealed in patients with mitochondrial myopathy [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(14): 1669-1681.
- [11] Ribera F, N'Guessan B, Zoll J, et al. Mitochondrial electron transport chain function is enhanced in inspiratory muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(6): 873-879.

[收稿日期] 2003-12-11

[修回日期] 2004-04-22

[本文编辑] 曹 静