

# 吲哚美辛对 COPD 大鼠 TNF- $\alpha$ 与 Bcl-2 和 Bax 表达的影响 \*

周兰英<sup>1</sup> 孙圣华<sup>2</sup> 高 健<sup>3</sup> 宋 薇<sup>1</sup> 杨小仙<sup>1</sup> 唐文祥<sup>2</sup>

(1 怀化医学高等专科学校 湖南 怀化 418000 ; 2 中南大学湘雅三医院呼吸科 湖南 长沙 410013 ;

3 湘西自治州人民医院呼吸内科 湖南 吉首 416000)

**摘要** 目的 探讨吲哚美辛对慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型大鼠趾长伸肌 TNF- $\alpha$  及 Bcl-2 和 Bax 表达的影响。方法 :100 只健康 Wistar 大鼠随机分为模型组和对照组(A 组)。模型组采用熏香烟和气管内滴注猪胰蛋白酶(PEE)法建立 COPD 模型大鼠,以低于 A 组大鼠平均体重的 90% 判断发生营养不良的标准,将模型组大鼠分为 COPD 营养正常组(B 组)和 COPD 营养不良组,COPD 营养不良组随机化原则分为 COPD 营养不良生理盐水组(C 组)、吲哚美辛 1 组(D 组)、吲哚美辛 2 组(E 组)、吲哚美辛 3 组(F 组)。A、B、C 三组灌注等量生理盐水, D、E、F 组给予不同剂量吲哚美辛(IND)灌胃干预。TUNEL 法测定趾长伸肌细胞凋亡率,免疫组织化学法测定 Bcl-2、Bax 蛋白表达,双抗体夹心法测定血清及趾长伸肌肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 浓度。结果 吲哚美辛干预后, E 组趾长伸肌细胞凋亡率、Bcl-2、Bax 的蛋白表达、趾长伸肌匀浆和吲哚美辛干预后血清 TNF- $\alpha$  浓度低于 C、D、F 组,但高于 A、B 组,  $P < 0.05$  E 组趾长伸肌 Bcl-2 蛋白表达高于 C、D、F 组,低于 A、B 组,  $P < 0.05$ 。结论 Bcl-2、Bax 及 TNF- $\alpha$  参与 COPD 模型大鼠趾长伸肌细胞凋亡,适当剂量的吲哚美辛可改善 COPD 营养不良模型大鼠趾长伸肌的凋亡。

**关键词** 慢性阻塞性肺疾病;骨骼肌;细胞凋亡;Bcl-2;Bax;TNF- $\alpha$

中图分类号:Q95-3,Q291,Q75 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)06-1044-04

## The Influence of Indomethacin on the Expression of TNF- $\alpha$ and Bcl-2 and Bax in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rat Model \*

ZHOU Lan-ying<sup>1</sup>, SUN Sheng-hua<sup>2</sup>, GAO Jian<sup>3</sup>, SONG Wei<sup>1</sup>, YANG Xiao-xian<sup>1</sup>, TANG Wen-xiang<sup>2</sup>

(1 Huaihua Medical college, Huaihua, Hunan, 418000, China;

2 Respiratory department of The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan, 410013, China;

3 Department of Respiratory, Xiangxi Autonomous Prefecture Peoples Hospital, Jishou, Hunan, 416000, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of indomethacin on the expression of Bcl-2, TNF- $\alpha$  and Bax in extensor digitorum longus in the COPD rat's models. **Methods:** 100 healthy Wistar rats were randomly divided into model group and control group (group A). The model group rat was performed with intratracheal instillation of porcine pancreatic elastase (PEE) and exposed to cigarette smoke to establish COPD models. Malnutrition was defined if the body weight of the rats in the model group was lower than 90% of the mean body weight of the control group. All model rats were divided into non-malnutrition COPD group (group B) and malnutrition COPD group, and the malnutrition COPD group rats were randomly divided into four groups: physiologic saline control group (group C), Indomethacin intervention group 1 (group D), Indomethacin intervention group 2 (group E) and Indomethacin intervention group 3 (group F). Isotonic physiologic saline was administered to the group A, B and C, different dose of Indomethacin was administered to group D, E, F by gavage. The apoptosis rates of the cell in extensor digitorum longus muscle were measured by TUNEL method, the Bcl-2, Bax protein expression and the concentrations of TNF- $\alpha$  in the serum, the extensor digitorum longus muscle from these rats were measured by immunohistochemical method, take the method of double mono-cloned antibody for detecting the concentrations of TNF- $\alpha$  in the serum and extensor digitorum longus muscle homogenates from these rats. **Results:** After indomethacin intervention, the rates of muscle cell apoptosis, the concentration of TNF- $\alpha$ , Bcl-2 and the Bax protein expression, extensor digitorum longus muscle homogenates, the concentrations of TNF- $\alpha$  in the serum in the Indomethacin intervention group 2 (group E) were lower than those in the group C, D, F and higher than those in the group A, B ( $P < 0.05$ ), the Bcl-2 protein expression in extensor digitorum longus muscle in group E was higher than that in C, D, F group and was lower than that in group A, B ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The Bcl-2, Bax and TNF- $\alpha$  are involved in occurrence of the cell apoptosis of extensor digitorum longus in COPD model rats, appropriate dose of indomethacin can improve the apoptosis of extensor digitorum longus muscle of COPD model rats.

**Key words:** Chronic obstructive pulmonary disease; Skeletal muscle; Apoptosis; Bcl-2; Bax; TNF- $\alpha$

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3, Q291, Q75 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2012)06-1044-04

\* 基金项目:怀化医学高等专科学校资助项目(2010KY07)

作者简介:周兰英(1975-)女,硕士,讲师,主要研究方向:慢性阻塞性肺疾病。Tel:13762926344, E-mail:16215092@qq.com

△通讯作者:孙圣华, E-mail: hhyzly@126.com

(收稿日期:2011-08-31 接受日期:2011-09-09)

## 前言

COPD 患者的营养状态情况与其病情的严重程度及预后密切相关,严重者可伴有体重进行性下降,预后欠佳。临床上称为“恶病质综合征”<sup>[1]</sup>。不明原因的骨骼肌萎缩和体重减轻,非脂肪体重减轻可影响 COPD 患者外周肌的功能、健康状态<sup>[2]</sup>和预后。COPD 患者营养不良和骨骼肌减少可能与全身炎症反应尤其是 TNF- $\alpha$  参与的细胞凋亡密切相关<sup>[3]</sup>,凋亡抑制基因 Bcl-2 及凋亡促进基因 Bax 在细胞凋亡过程中起十分重要的作用。本试验选用不同剂量的吲哚美辛干预 COPD 大鼠,观察吲哚美辛对 COPD 大鼠趾长伸肌细胞凋亡率、Bcl-2 及 Bax 表达、血清及趾长伸肌 TNF- $\alpha$  浓度,在动物实验中筛选出适当剂量的吲哚美辛治疗 COPD,为临床治疗 COPD 患者提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 模型组成模后分组及用吲哚美辛干预

100 只成年雄性 Wistar 大鼠,清洁级,10 周龄,体重(264.26 $\pm$ 31.98)g,购自湖南农业大学实验动物中心,经湖南省动物检疫所检验合格,许可证号:SCXK(湘)2006-0001。全营养饲料由湖南农业大学实验动物中心自制,有偿提供。饲养条件相同。随机数字表法将实验动物分为正常组(A 组)和模型组,参照宋一平<sup>[4]</sup>等自制吸烟染箱复制 COPD 大鼠模型。模型组大鼠在 1-14 天、15-60 天在自制被动吸烟染箱吸烟,第 15 天气管内滴注猪胰蛋白酶 20 $\mu$ /100g.Bw( Sigma 公司分装,上海森雄科技实业有限公司代理) A 组假暴露在同一天气管内滴注等量生理盐水。造模时间为 60 天,造模成功后将低于正常组平均体重 90%的大鼠分为 COPD 营养正常组(B 组),COPD 营养不良组,营养不良组随机化原则分为 C、D、E、F 组 A、B、C 组给予等量生理盐水灌胃, D 组(IND0.5mg/kg.d)、E 组(IND1.0mg/kg.d)、F 组(IND2.0mg/kg.d) 均灌胃干预 14 天。吲哚美辛干预前后取尾静脉血测 TNF- $\alpha$ 。

### 1.2 检测方法

#### ①骨骼肌和肺组织病理学标本检测:急性大出血法处死动物

物,无菌、快速分离大鼠趾长伸肌,称重后剪断,右肺垂直于支气管的肺矢状面最大周径处取材,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋后连续切片,HE 染色。②TUNEL 技术(美国罗氏公司)测定趾长伸肌细胞凋亡率,每张切片随机取 5 个不相关高倍视野( $\times$ 400)进行细胞计数,计算出平均值。凋亡细胞核呈黄色或棕黄色,正常细胞核呈蓝色。趾长伸肌细胞凋亡率=凋亡细胞核/(凋亡细胞核+正常细胞核) $\times$ 100%。③免疫组织化学法(美国 Santa Cruz 公司)检测趾长伸肌 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达,每张切片随机取 5 个高倍视野,应用 Image-Pro Plus version 6.0 图像处理系统对骨骼肌 Bcl-2 蛋白进行半定量分析,选用光密度(Density)值和积分光密度(IOD)值分析。④双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定血清和趾长伸肌匀浆中 TNF- $\alpha$  浓度。

### 1.3 数据分析

用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用完全随机分组的 LSD 法,两组间比较采用成对 t 检验,  $P<0.05$  认为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠 COPD 模型的判定

模型组大鼠均有明显的喘息,咳嗽明显,卧底弓背等呼吸困难的表现,肺功能检测发现 PEF、FEV0.3 和 FEV0.3/FVC 较正常组降低,  $P<0.05$ ,说明模型组大鼠存在阻塞性通气功能障碍。肺组织病理结果显示模型组大鼠细支气管狭窄变形,管壁增厚,纤毛倒伏脱落,杯状细胞增生,黏膜下及管壁周围有大量炎性细胞浸润,肺泡间隔破裂,相互融合成肺大泡等肺气肿表现。模型组大鼠肺功能改变及肺组织病理变化符合 COPD 模型大鼠,造模成功。

### 2.2 大鼠体重、趾长伸肌质量测定结果

吲哚美辛干预后各组大鼠体重、体重增长值及趾长伸肌质量检测结果见表 1。结果表明:C、D、E、F 组吲哚美辛干预后大鼠体重较干预前增高,尤其是 E 组大鼠体重增长值和趾长伸肌质量高于 C、D、F 组。

表 1 吲哚美辛干预后各组大鼠体重、体重增长值及趾长伸肌质量结果( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 The results of rat body weight/growth of body weight/quality of extensor digitorum longus muscle in each group after indomethacin intervention

Group	N	Body weight(g)		Growth of rats body weight(g)	Extensor digitorum longus muscle(g)
		The first day	The 28th day		
Group A	17	344.41 $\pm$ 25.97	376.71 $\pm$ 28.05	32.29 $\pm$ 13.66	0.396 $\pm$ 0.029
Group B	37	344.27 $\pm$ 11.07	363.05 $\pm$ 20.72	18.78 $\pm$ 15.02	0.381 $\pm$ 0.023
Group C	10	292.60 $\pm$ 14.71**	289.70 $\pm$ 25.03**●	2.0 $\pm$ 11.73**●	0.301 $\pm$ 0.027**●
Group D	10	293.00 $\pm$ 6.85**	302.90 $\pm$ 10.47**●	9.9 $\pm$ 4.43**●	0.313 $\pm$ 0.011**●
Group E	10	296.90 $\pm$ 10.69**	323.10 $\pm$ 15.19**■*	26.2 $\pm$ 8.70**■*	0.337 $\pm$ 0.017**■*
Group F	10	294.70 $\pm$ 6.65**	303.00 $\pm$ 10.71**●	8.30 $\pm$ 6.27**●	0.312 $\pm$ 0.013**●

Note: \*  $P<0.05$  Other groups compared with Group A; #  $P<0.05$  Other groups compared with Group B;  $\square$   $P<0.05$  Other groups compared with Group D; ●  $P<0.05$  Other groups compared with Group E; ★  $P<0.05$  Other groups compared with Group F.

### 2.3 各组大鼠血清及趾长伸肌 TNF- $\alpha$ 检测结果

吲哚美辛干预前后血清以及趾长伸肌匀浆中 TNF- $\alpha$  浓度

见表 2。结果表明:各组大鼠干预后血清 TNF- $\alpha$  浓度较干预前降低,尤其是 E 组大鼠干预后血清 TNF- $\alpha$  浓度降低明显,而且

趾长伸肌匀浆中 TNF- $\alpha$  浓度较 C、D、F 组低, 说明 1.0mg/kg.d 的吲哚美辛能改善血液及趾长伸肌中 TNF- $\alpha$  浓度。

表 2 吲哚美辛干预前后各组大鼠血清和趾长伸肌匀浆中 TNF- $\alpha$  浓度( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The concentrations of TNF- $\alpha$  in the serum and extensor digitorum longus muscle homogenates before/after indomethacin intervention

Group	N	Concentrations of TNF- $\alpha$ (pg/ml)		
		Serum before intervention	Serum after intervention	Extensor digitorum longus muscle
Group A	17	80.89 $\pm$ 3.53	83.95 $\pm$ 4.37	24.64 $\pm$ 2.12
Group B	37	99.71 $\pm$ 4.99*	104.89 $\pm$ 8.49 ■*	37.70 $\pm$ 3.14* *
Group C	10	124.40 $\pm$ 5.61* ■	128.75 $\pm$ 12.30 <sup>▲</sup>	58.87 $\pm$ 3.70* ■▲*
Group D	10	125.07 $\pm$ 8.22* ■	116.83 $\pm$ 11.92 **	38.26 $\pm$ 3.41* *
Group E	10	126.38 $\pm$ 8.32* ■	89.84 $\pm$ 13.76 <sup>▲</sup> #	26.45 $\pm$ 4.28 <sup>▲</sup> ■
Group F	10	125.55 $\pm$ 9.57* ■	115.42 $\pm$ 8.74 **	39.22 $\pm$ 3.84* ■*

Note: \*P<0.05 Other groups compared with Group A ; ■P<0.05 Other groups compared with Group B ; P<0.05 Other groups compared with Group C; ■ P<0.05 Other groups compared with Group D ; ▲P<0.05 Other groups compared with Group (D, F); ★P<0.05 Other groups compared with Group E

表 3 吲哚美辛干预前后各组大鼠趾长伸肌凋亡率、Bcl-2 及 Bax 表达值结果( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 The results of the rates of extensor digitorum longus muscle apoptosis/express of Bcl-2 and Bax in rats of each group after indomethacin intervention

Group	N	Extensor digitorum longus		
		Apoptosis rate (%)	Bcl-2	Bax
Group A	17	6.15 $\pm$ 1.68	44.72 $\pm$ 2.75	6.19 $\pm$ 2.71
Group B	37	14.24 $\pm$ 5.56	40.22 $\pm$ 4.38	9.56 $\pm$ 4.70
Group C	10	39.10 $\pm$ 3.60* ■●★	24.81 $\pm$ 4.70* ■●★	24.63 $\pm$ 5.16* ■●★
Group D	10	31.91 $\pm$ 4.20* ■●	33.69 $\pm$ 6.10* ■●	21.80 $\pm$ 6.08* ■●
Group E	10	18.46 $\pm$ 7.83* ■★	39.84 $\pm$ 2.96* ■★	11.87 $\pm$ 4.07* ■★
Group F	10	30.00 $\pm$ 2.54* ■●	32.19 $\pm$ 7.05* ■●	19.75 $\pm$ 4.38* ■●

注:与 A 组比 \*P<0.05 ;与 B 组比 #P<0.05 ;与 C 组比 P<0.05 ;与 D 组比 ■ P<0.05 ;●与 E 组比 P<0.05 ;★F 组比 P<0.05

Note: \*P<0.05 Other groups compared with Group A ; #P<0.05 Other groups compared with Group B ; P<0.05 Other groups compared with Group C; ■ P<0.05 Other groups compared with Group D ; ●P<0.05 Other groups compared with Group E; ★P<0.05 Other groups compared with Group F

#### 2.4 大鼠趾长伸肌细胞凋亡率、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达

吲哚美辛干预后趾长伸肌细胞凋亡率、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达见表 3。结果表明 E 组大鼠吲哚美辛干预后趾长伸肌细胞凋亡率、Bax 比 C、D、F 组低, Bcl-2 反之, 表明 1.0mg/kg.d 的吲哚美辛能通过改变 Bcl-2 及 Bax 表达而影响趾长伸肌细胞凋亡。

### 3 讨论

细胞凋亡是一种受基因调控的程序性的死亡, 与机体组织萎缩和功能退化有着密切联系。Alvar GN 等对 15 名 COPD 稳定期门诊患者股四头肌针刺活检检测骨骼肌细胞的凋亡率, 发现低 BMI 患者骨骼肌凋亡率明显高于 BMI 正常组, 认为骨骼肌凋亡是 COPD 体重减轻和骨骼肌萎缩的重要原因<sup>[9]</sup>。周志国等发现 TNF- $\alpha$  能促进 COPD 大鼠膈肌细胞凋亡及膈肌萎缩<sup>[6]</sup>。

TNF- $\alpha$  是一种主要由单核巨噬细胞产生, 具有诱导细胞凋亡、抗病毒及转录调节等多种生物学活性的细胞因子, 可能参与了 COPD 气道及全身炎症过程、肺功能损害、体重丢失等病

理生理过程。孙圣华研究表明, COPD 患者营养不良骨骼肌萎缩与细胞因子介导的代谢紊乱有关, 尤其是 TNF- $\alpha$  与 COPD 患者营养不良和骨骼肌减少密切相关<sup>[7]</sup>。崔新华等发现 Bcl-2 和 Bax 参与了一定质量浓度的 TNF- $\alpha$  可引起视网膜神经节细胞的凋亡<sup>[8]</sup>。

吲哚美辛为代表性非甾体抗炎药, 具有抗炎、解热及镇痛作用, 能抑制前列腺素合成酶的产生和环氧合酶的活性, 阻断花生四烯酸代谢产物的产生, 故能抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等炎症因子的产生, 从而减轻其介导的代谢紊乱, 改善营养不良的状况。有学者研究发现吲哚美辛可以降低 COPD 营养不良大鼠血清 TNF- $\alpha$  的水平, 可以改善 COPD 营养不良大鼠的营养状况<sup>[9]</sup>。周伟等研究发现适当剂量的吲哚美辛可以通过减少炎症细胞因子产生, 抑制泛素-蛋白酶体途径的激活, 缓解癌症恶病质小鼠肌蛋白的降解, 而高剂量的吲哚美辛并不具有更显著的作用<sup>[10]</sup>。

本研究选择 COPD 模型大鼠骨骼肌中的趾长伸肌作为研究对象, 伸趾长肌是大鼠肢体远心端的肌肉, 在大鼠活动中活动频率很高, 排除了废用性萎缩的可能。用不同剂量的吲哚美

辛干预大鼠,结果显示:E组大鼠体重、趾长伸肌质量、Bcl-2蛋白表达值均较C、D、F组高,但低于A、B组, $P<0.05$ 。E组趾长伸肌细胞凋亡率、TNF- $\alpha$ 、Bax蛋白表达值均低于C、D、F组,但高于A、B组, $P<0.05$ ,说明1.0mg/kg剂量的吲哚美辛可能能够拮抗COPD营养不良模型组大鼠骨骼肌细胞的凋亡,抑制炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 的产生,促进趾长伸肌凋亡抑制蛋白Bcl-2的表达,抑制趾长伸肌的凋亡。而小剂量的吲哚美辛可能达不到有效的血药浓度,治疗效果不理想,而大剂量的吲哚美辛可能由于剂量过大,对大鼠造成不良反应,治疗效果也不理想。综上所述,1.0mg/kg的吲哚美辛可能能够改善COPD营养不良模型大鼠趾长伸肌的凋亡。

#### 参考文献(References)

- [1] Grassi V, Carminati L, Cossi S, et al. Chronic obstructive lung disease [J]. Systemic manifestations. Recent Prog Med, 2003, 94(5): 217-226
- [2] Engelen MP, Schols AM, Does JD, et al. Skeletal muscle weakness is associated with wasting of extremity fat-free mass but not with air-flow obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(3): 733-738
- [3] Rennard SI. Inflammation in COPD: a link to systemic comorbidities [J]. Eur Respir, 2007, 16: 91-97
- [4] 宋一平, 崔德健, 茅培英, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道重塑及生长因子的研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(4): 417-419  
Song Yi-ping, Cui De-jian, Mao Pei-ying, et al. A study on pathological changes and the potential role of growth factors in the airway wall remodeling of COPD rat models [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2001, 24(4): 417-419
- [5] Alvar GN, Agusti, Jaume S, et al. Skeletal Muscle Apoptosis and Weight loss in Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 166(4): 485-489
- [6] 周志国, 陈平, 蔡珊等. 肿瘤坏死因子抗体对大鼠慢性阻塞性肺疾病全身炎症和膈肌的影响 [J]. 医学临床研究, 2010, 27(2): 226-229  
Zhou Zhi-guo, Chen Ping, Cai Shan, et al. Effect of Anti-TNF on Systemic Inflammation and Diaphragm of Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J]. Journal of Clinical Research, 2010, 27(2): 226-229
- [7] 孙圣华, 唐文祥, 刘纯等. 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 对慢性阻塞性肺疾病大鼠模型呼吸肌蛋白质分解代谢的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(3): 186-191  
Sun Sheng-hua, Tang Wen-xiang, Liu Chun, et al. Effects of tumor necrosis factor alpha on proteolysis of respiratory in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2007, 30(3): 186-191
- [8] 崔新华, 王静华, 王大博. TNF- $\alpha$ 诱导大鼠视网膜神经节细胞凋亡的研究 [J]. 眼科研究, 2008, 26(2): 108-112  
Cui Xin-hua, Wang Jing-hua, Wang Da-bo. Study on TNF- $\alpha$ -mediated apoptosis of retina ganglion cell [J]. Chinese Ophthalmic Research, 2008, 26(2): 108-112
- [9] 赵亚丽, 孙圣华, 刘纯等. COPD营养不良与细胞因子的关系及消炎镇痛干预实验研究 [J]. 医学临床研究, 2006, 23(10): 1572-1577  
Zhao Ya-li, Sun Sheng-hua, Liu Chun, et al. Relationship of Cytokine Level with Malnutrition Of Chronic obstructive Pulmonary Disease and Therapeutic Effects of Indomethacin [J]. Journal of Clinical Research, 2006, 23(10): 1572-1577
- [10] 周伟, 江志伟, 刘放南, 等. 吲哚美辛对癌性恶病质小鼠肌肉泛素-蛋白酶途径的影响 [J]. 肠外与肠内营养, 2004, 11(6): 348-352  
Zhou Wei, Jiang Zhi-wei, Liu Fang-nan, et al. Effects of indomethacin on ubiquitin-proteasome pathway in muscles of cancer cachectic mice [J]. Parenteral & Enteral Nutrition, 2004, 11(6): 348-352