

## 紧密连接蛋白 Occludin 与 ZO-1 在 COPD 大鼠肺部的表达

句红萍<sup>1)</sup>, 汪玉娇<sup>2)</sup>, 张伟<sup>1)</sup>, 段艳萍<sup>3)</sup>, 钱忠义<sup>4)</sup>, 井晓洁<sup>1)</sup> 柳爱华<sup>5)</sup>, 宝福凯<sup>2)</sup>

(1) 昆明市经开人民医院, 云南昆明 650236; 2) 昆明医科大学病原生物学与免疫学系; 3) 组织胚胎学与解剖学系; 4) 生物化学与分子生物学系; 4) 病理学与病理生理学系; 5) 生物化学与分子生物学系, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 探索慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 肺泡上皮结构改变的潜在机制。 **方法** 建立大鼠 COPD 模型, 于建模第 28 天, 42 d 分批处死大鼠, 采用免疫组化观察大鼠肺泡上皮紧密连接中闭锁蛋白 (Occludin) 和闭锁小带蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1) 的分布和表达。 **结果** COPD 时, 42 d 实验组肺泡上皮细胞 Occludin 和 Zo-1 表达明显下降 ( $P < 0.05$ ); 28 d 实验组肺泡上皮细胞 Occludin 和 Zo-1 表达有所降低, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 42 d 实验组和 28 d 实验组相比肺泡上皮细胞 Occludin 表达明显降低,  $P < 0.05$ , ZO-1 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。 **结论** COPD 时, 紧密连接蛋白表达减少, 并随着时间的延长, Occludin 表达进一步降低, 由此证明, Occludin 和 Zo-1 表达与肺泡上皮屏障的破坏密切相关。

**[关键词]** COPD; 闭锁蛋白; 闭锁小带蛋白 1; 肺泡上皮; 紧密连接蛋白

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 06 - 0043 - 05

## Expression of Tight Junction Protein Occludin and ZO-1 in Lungs of COPD Rats

JU Hong - Ping<sup>1)</sup>, WANG Yu - Jiao<sup>2)</sup>, ZHANG Wei<sup>1)</sup>, DUAN Yan - Ping<sup>3)</sup>, QIAN Zhong - Yi<sup>4)</sup>, JING Xiao - Jie<sup>1)</sup>, LIU Ai - hua<sup>2)</sup>, BAO Fu - kai<sup>2)</sup>

(1) Jingkai District Hospital of Kunming, Kunming Yunnan 650236; 2) Dept. of Microbiology and Immunology; 3) Dept. of Histology and Anatomy; 4) Dept. of Biochemistry and Molecular Biology; 5) Dept. of Pathology and Pathophysiology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the potential mechanism of alveolar epithelial structure alternation in COPD. **Method** We established a COPD rat model, and dissected the rats in batches after 28 days and 42 days from the day establishing the model, then observed the distribution and expression of Occludin and ZO-1 in the rat alveolar epithelium tight junction regions by immunohistochemistry. **Results** The expression of Occludin and Zo-1 in alveolar epithelia cells of COPD rats declined dramatically ( $P < 0.05$ ) on day 42, the expression of Occludin and Zo-1 in alveolar epithelia cells had a little decrease, but there was no significant difference ( $P > 0.05$ ). Compared to the experimental group on 28 day, the expression of Occludin and Zo-1 in alveolar epithelial cells on day 42 had a dramatic decrease ( $P < 0.05$ ), but the expression of ZO-1 had no significant difference ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** In COPD rat model, the expression of tight junction protein decreases, and with the extension of time, the expression of Occludin will decline further more, proving that the expression of Occludin and ZO-1 is closely related to the destruction of alveolar epithelial barrier.

**[Key words]** COPD; Occludin; ZO-1; Alveolar epithelium; Tight junction protein

**[基金项目]** 昆明市卫生局科研基金资助项目 (2010-03)

**[作者简介]** 句红萍 (1968~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 主任医师, 主要从事呼吸疾病诊治与研究。汪玉娇和句红萍对本文有同等贡献。

**[通讯作者]** 宝福凯. E-mail:baofukai@126.com; 柳爱华. E-mail:lunaliu123@yahoo.com.cn.

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种具有气流受限特征的疾病, 气流受限不完全可逆, 呈进行性发展, 与肺部对有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关. COPD 的发病机制尚未完全明了, 目前普遍认为气道、肺实质和肺血管的慢性炎症是主要发病机制, 除炎症外, 肺部的蛋白酶和抗蛋白酶失衡、氧化与抗氧化失衡以及自主神经系统功能紊乱 (如胆碱能神经受体分布异常) 等也在 COPD 发病中起重要作用<sup>[1-2]</sup>. 然而这些机制主要强调了气道上皮细胞和炎症细胞在 COPD 发病中所起的作用, 未能充分解释 COPD 病人表现的肺泡壁破坏, 肺泡扩张所引起的肺泡上皮结构改变的潜在机制. 因此, 研究肺泡上皮结构改变的具体原因对 COPD 具有重要意义.

紧密连接 (Tight junction) 通常位于上皮细胞顶端相邻细胞间, 紧密连接分子由闭锁蛋白 (Occludin), 紧密连接蛋白 (Claudins) 和连接粘附分子 (junctional adhesion molecules, JAMs) 三种完整的膜蛋白和闭锁小带蛋白 (ZO-1、ZO-2 和 ZO-3) 等外周胞浆蛋白组成, 其中 ZO-1 将 Occludin 定位于细胞连接处, 这两个蛋白是构成紧密连接屏障功能的重要蛋白, 对保持紧密连接的完整性起到关键作用<sup>[3-5]</sup>. 肺泡上皮细胞间存在此连接, 是肺泡上皮屏障的重要组成部分, 从而维持肺泡结构的稳定. COPD 病人引起肺泡壁破坏, 肺泡扩张可能于肺泡上皮结构中紧密连接的破坏有一定的关系.

## 1 实验材料

### 1.1 实验动物

Wistar 大鼠, 雄 15 只, 雌 15 只, 体重 180 ~ 220 g, 共 30 只. 购自昆明医科大学实验动物学部, 标准喂养, 自由饮水.

### 1.2 主要试剂和器材

(1) LPS (脂多糖): 内毒素 1 mg/mL, 购自美国 Sigma 公司; (2) 红河牌香烟, 购自红河集团; (3) 自制烟熏染毒箱; (4) 一抗: 多克隆兔抗 Occludin 抗体 (ab32721), 购自于香港 Abcam 公司, 稀释度 1:100; 多克隆兔抗 ZO1 抗体 (SC10804) 购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 稀释度 1:100; (5) 二抗: 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (bse-0295G) 购于北京博奥森生物技术有限公司; (6) SABC 免疫组化染色试剂盒购于晶美公司; (7) OLYMPUS CX31 显微镜 (日本产); (8)

HMIAS-2000 高清晰度彩色病理图文报告系统, 购于武汉千屏影像有限公司.

### 1.3 实验方法

**1.3.1 实验动物分组及动物模型制备** 30 只 SD 大鼠随机分为 3 组: 28 d 正常对照组 (A1 组), 42 d 正常对照组 (A2), 28 d 实验组 (B 组), 42 d 实验组 (C 组). 每组 10 只大鼠 (分别雄 5 只, 雌 5 只). B 组和 C 组大鼠分别置于吸烟箱内吸烟 (2 次/d, 每次 30 min). B 组于第 1 天, 第 15 天气管内注入 0.2 mL 含 200  $\mu$ g 的脂多糖, C 组于第 1 天, 第 15 天, 第 28 天气管内注入 0.2 mL 含 200  $\mu$ g 的脂多糖, 气管滴脂多糖当日不吸烟, 正常对照组 (A1 和 A2 组) 不做任何处理, 饲养条件相同. 所有操作均在无菌条件下进行 (由技术人员进行操作). 各组大鼠分别于造模后 28 d、42 d 处死.

**1.3.2 标本的采集** 造模结束后, 4% 的水合氯醛 (1 mL/100 g) 腹腔注射麻醉大鼠, 取大鼠左肺组织浸泡固定于 4% 的多聚甲醛溶液中.

**1.3.3 肺组织常规病理分析** 肺组织经甲醛固定, 不同浓度酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 腊块切成 4  $\mu$ m 切片, 贴片后行 HE 染色, 光镜下观察.

**1.3.4 Occludin、Zo-1 在肺组织中的免疫组化染色** 肺组织蜡块切成 4  $\mu$ m 切片后采用链霉素亲和素-生物素 (SABC) 法行免疫组化染色, 实验步骤严格按免疫组化试剂盒说明书操作. 以 0.01 mol 磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替第 1 抗体作为阴性对照, 光镜下观察. 免疫组化染色结果通过图像分析, 测出 Occludin、Zo-1 表达的平均灰度.

### 1.4 统计学处理

数据采用 SPSS 统计软件分析, 计量资料用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用秩和检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 肺组织的病理改变

A1 和 A2 组: 肺脏大体观察无明显异常改变. HE 染色可见肺泡结构完整, 清晰, 肺泡大小均匀, 未见明显病变. B 组和 C 组: 大体观察可见所有肺组织均有肿胀, 肺表面呈灰白色. HE 染色可见肺泡间隔变薄, 断裂, 肺泡结构不完整, 肺泡腔不规则扩大, 有明显的中性粒细胞浸润及红细胞渗出, 细胞排列散乱, C 组较 B 组更明显, 有更多红细胞及巨噬细胞浸润 (见图 1).

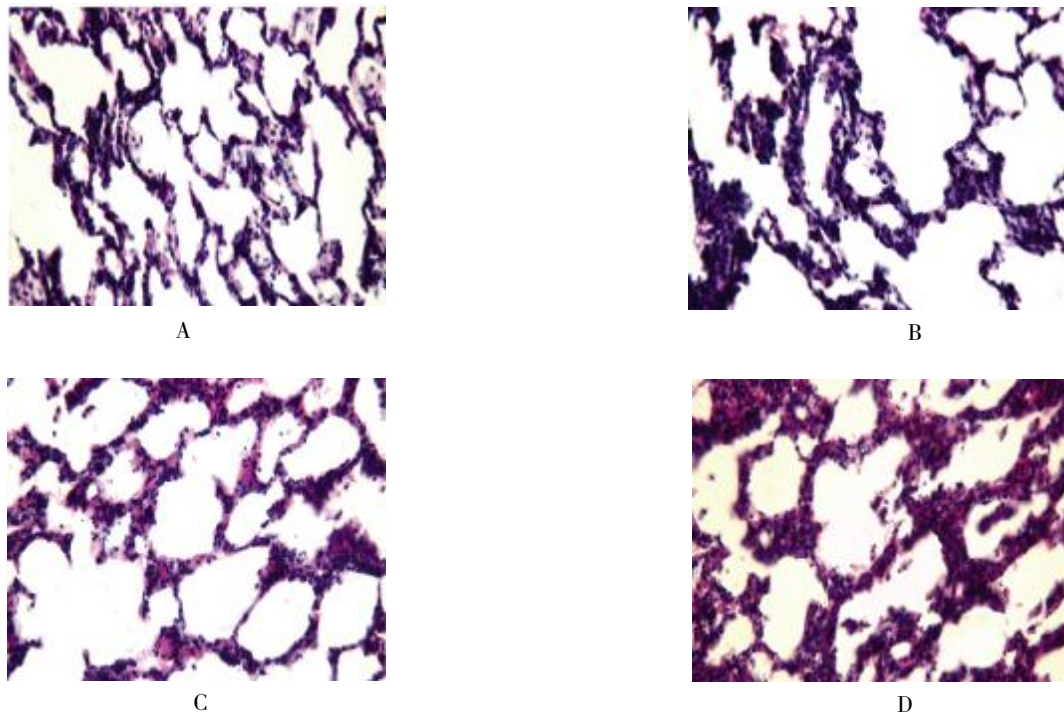


图 1 各组大鼠肺组织病理学改变 ( $\times 400$ )

Fig. 1 The histopathological changes of lung tissues of rats in each group

A:Group A1; B:Group A2; C:Group B; D:Group C.

## 2.2 Occludin 在肺组织中的表达

免疫组化染色可见 Occludin 在正常对照组 (A1 和 A2 组) 大鼠肺泡上皮细胞大量表达呈棕褐色, 在 B 组和 C 组表达分别较 A1 和 A2 组减弱, Occludin 表达的平均灰度变化 B 组与 A1 组相比差异无统计学意义 ( $z = -0.926, P = 0.355$ ); C 组与 A2 组相比差异有统计学意义 ( $Z = -2.205, P = 0.027$ ); B 组和 C 组相比, 差异有统计学意义 ( $Z = -2.467, P = 0.014$ ), 见图 2, 表 1.

## 2.3 Zo-1 在肺组织中的表达

免疫组化染色可见 ZO-1 在正常对照组 (A1 和 A2 组) 大鼠肺泡浆大量表达呈棕褐色, 在 B 组和 C 组表达分别较 A1 和 A2 组降低. ZO-1 表达的平均灰度变化 B 组与 A1 组相比差异无统计学意

义 ( $Z = -1.938, P = 0.053$ ); C 组与 A2 组相比差异统计学意义 ( $Z = -2.16, P = 0.031$ ); B 组和 C 组相比, 差异无统计学意义 ( $Z = -0.733, P = 0.463$ ), 见图 3, 表 1.

## 3 讨论

肺泡上皮细胞间的紧密连接是肺泡上皮屏障形成的关键, 紧密连接主要存在于上皮细胞, 内皮细胞的连接复合体中, 使相邻细胞膜紧靠在一起, 形成环绕细胞的物理屏障结构<sup>[6]</sup>. 紧密连接是细胞间连接的一种重要形式, 是维持组织细胞完整性的力量之一<sup>[7]</sup>. 其主要功能是: 首先是作为屏障功能, 防止溶液中的分子沿细胞间隙渗入体内, 从而保证

表 1 4 组肺组织 Occludin、ZO-1 表达的平均灰度变化比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of the mean grayscale of Occludin and ZO-1 expression in lung tissues of rats in four groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Occludin 平均灰度	ZO-1 平均灰度
28 d 对照组 (A1 组)	5	119.40 $\pm$ 14.65	88.09 $\pm$ 7.80
28 d 实验组 (B 组)	10	125.73 $\pm$ 5.57	63.71 $\pm$ 19.29
42 d 对照组 (A2 组)	5	136.38 $\pm$ 11.98	88.57 $\pm$ 3.71
42 d 实验组 (C 组)	10	110.32 $\pm$ 12.09 <sup>△▲</sup>	73.33 $\pm$ 19.25 <sup>△</sup>

与 A2 组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ .

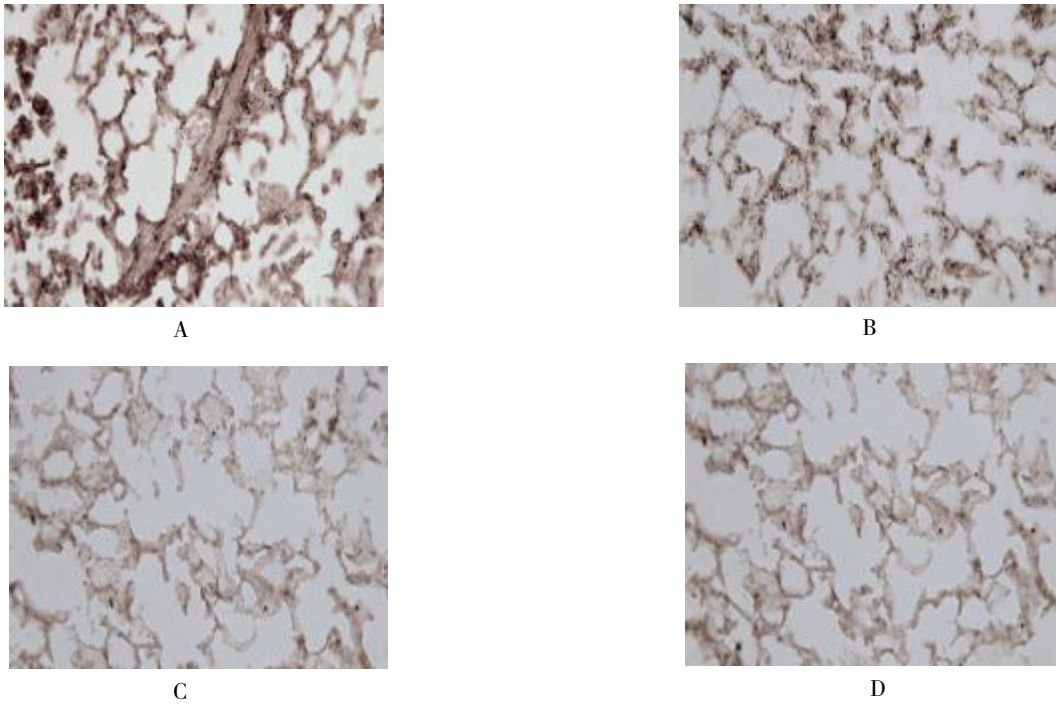


图 2 Occludin 在正常及 COPD 大鼠肺部表达的免疫组化结果 (×400)

Fig. 2 The expression of Occludin in lung tissues of normal rats and COPD rats detected with immunohistochemistry (×400)

A:Group A1; B:Group A2; C:Group B; D:Group C.

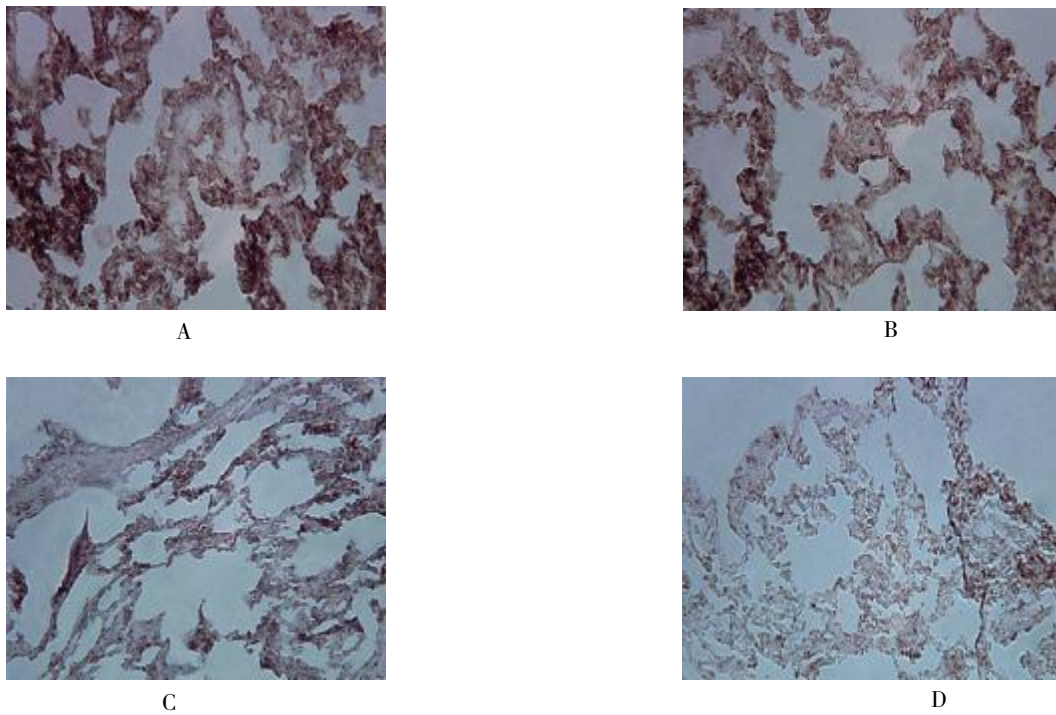


图 3 ZO-1 在正常及 COPD 大鼠肺部表达的免疫组化结果 (×400)

Fig. 3 The expression of ZO-1 in lung tissues of normal rats and COPD rats detected with immunohistochemistr

A:Group A1; B:Group A2; C:Group B; D:Group C.

了机体内环境的相对稳定。其次是隔离作用,产生并维持细胞的极性,选择性的通过某些大分子物质,使游离端与基底面质膜上的膜蛋白行使各自不同的膜功能,最后紧密连接蛋白形成一个运输和信号的平台调节细胞生长、增殖、分化和去分化<sup>[8]</sup>。

在紧密连接中, Occludin 是跨膜整合蛋白,也是形成细胞紧密连接的主要蛋白,执行紧密连接的屏障功能, ZO-1 属于细胞内蛋白,位于 Occludin 和细胞骨架之间,也影响着细胞间的通透性<sup>[9]</sup>。肺泡上皮细胞有选择性的限制一些物质的运动并且通过不同方式选择性吸收一些物质<sup>[10]</sup>。其中,肺泡上皮细胞间紧密连接的状况直接影响着肺泡上皮的屏障功能,也决定着肺泡上皮细胞的完整性。紧密连接遭到破坏,肺泡上皮屏障的功能也将破坏,肺泡上皮细胞的完整性也不复存在。笔者通过 COPD 的实验模型,证实了 COPD 时肺泡上皮屏障的改变可能与肺泡上皮细胞紧密连接蛋白的一系列变化有关。COPD 时,42 d 实验组肺泡上皮细胞 Occludin、ZO-1 表达平均灰度与正常对照组(A2 组)比较有所降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明 42 d 实验组紧密连接 Occludin、ZO-1 数量明显减少。28 d 实验组肺泡上皮细胞 Occludin、ZO-1 表达平均灰度与正常对照组(A1 组)比较无统计学意义( $P > 0.05$ ),可能是由于造模时间过短所引起,由此也说明 COPD 引起肺上皮细胞间紧密连接蛋白数量改变的时间大于 28 d;42 d 实验组和 28 d 实验组 Occludin 平均灰度相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),ZO-1 平均灰度相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。这说明肺泡上皮细胞 Occludin 随造模时间的增加而明显减少,ZO-1 则无明显变化。

在肺部疾病中,上皮细胞间紧密连接的通透性改变起着重要的作用。决定着疾病的发生和发展。Occludin 是最早发现的紧密连接蛋白,分子量为 65 kD,由 504 个氨基酸组成,包括 4 个跨膜区,其氨基端和羧基端都位于细胞内,羧基端直接或间接地与胞质蛋白如 ZO-1、ZO-2 相互作用,进而与骨架蛋白连接。研究发现人和鼠的 Occludin cDNA 序列约 90% 同源,因此,鼠是研究 Occludin 的良好模型。胞质紧密粘连蛋白(zonula occludens, ZO)是紧密连接的结构性蛋白,属于膜相关鸟氨酸激酶家族,由 1 745 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 220 000。有 3 个异构体,即 ZO-1、ZO-2 和 ZO-3。位于细胞质内膜表面,与绝大多

数紧密连接蛋白以及细胞骨架相连,ZO-1 在紧密连接包膜定位中起重要作用<sup>[6,11-13]</sup>。

目前,COPD 引起肺泡上皮结构破坏的机制还不完全清楚,通过本次试验说明了 COPD 患者肺泡上皮屏障的改变可能与肺泡上皮细胞紧密连接蛋白的一系列变化有关。其具体机制还有待于进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2007,30(1):8-17.
- [2] BARNES P J, SHAPIRO S D, PAUWELS R A. Chronic obstructive pulmonary disease:molecular and cellular mechanisms[J]. Eur Respir J,2003,22:672-688.
- [3] 赵晓云,李波,曹立业,等. 小细胞肺癌细胞诱发人脑微血管内皮细胞紧密连接的开放[J]. 解剖科学进展,2009,15(2):183-187,191.
- [4] 陶治,杨晓,宋永喜. 紧密连接蛋白及其在肺癌中的异常表达[J]. 医学综述,2010,16(12):1 812-1 815.
- [5] YEAMAN C, GRINDSTAFF K K, NELSON W J. NEW Perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity[J]. Physiol Rev,1999,79(1):73-98.
- [6] 邵立健,朱清仙. 一种跨膜蛋白——闭锁蛋白的研究现状[J]. 国外医学:生理、病理科学与临床分册,2004,24(3):263-266.
- [7] 李玉英,陈枫,谭红梅,等. 大鼠Occludin 基因克隆及其在肺泡II型上皮细胞中的表达[J]. 重庆医学,2008,37(19):2 203-2 204.
- [8] SCHNEEBERGER E E, LYNCH R D. The tight junction:a multifunctional complex[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2004,286:1 213-1 228.
- [9] BOUVRY D, PLANE'S C, MALBERT-COLAS L, et al. Hypoxia-induced cytoskeleton disruption in alveolar epithelial cells [J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2006,35:519-527.
- [10] VANDRIESSCHE W, KREINDLER J L, MALIK A B, et al. Interrelations/cross talk between transcellular transport function and paracellular tight junctional properties in lung epithelial and endothelial barriers [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2007,293:520-524.
- [11] SOINI Y. Claudins in lung diseases[J]. Respiratory Research,2011,12:1-11.
- [12] 闫洪领,王季猛. 胞质紧密粘连蛋白1的研究现状[J]. 医学综述,2008,14(17):2 589-2 591.
- [13] 康慧媛,于力,王莉莉. 闭锁小带蛋白1研究进展[J]. 生物技术通讯,2009,20(4):576-579.

(2012-03-07 收稿)