

## • 实验研究 •

## 大鼠吸入氯气后肺组织 Claudin-3 蛋白及其 mRNA、Occludin mRNA 表达变化

## Expression changes of Claudin-3 and Occludin in lungs of rats exposed to chlorine

江俊康, 覃江纯, 许培培, 瞿建华, 王春, 陈刚

(南通大学公共卫生学院, 江苏 南通 226019)

**摘要:** 将40只SD雄性大鼠随机分为1个对照组和4个不同浓度的氯气染毒组,染毒10 min,6 h后行血气分析,取右肺中叶组织测湿干重比W/D和上叶组织行病理切片观察,Western blot法检测右肺副叶组织 Claudin-3 蛋白表达水平,RT-PCR法测右肺下叶组织 Claudin-3 mRNA及Occludin mRNA相对表达。与对照组相比,(42.00±3.18) mg/m<sup>3</sup>及以上浓度氯气染毒组大鼠肺组织 Claudin-3 蛋白表达水平均有降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );且与对照组相比,各染毒组大鼠肺组织 Claudin-3 mRNA、Occludin mRNA表达水平也均有降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示大鼠吸入氯气后肺组织 Claudin-3、Occludin 表达减少可能是ALI肺水肿形成的机制之一。

**关键词:** 氯气; Claudin-3; Occludin; 急性肺损伤

**中图分类号:** R994 **文献标识码:** B

**文章编号:** 1002-221X(2014)02-0111-03

**DOI:** 10.13631/j.cnki.zggyyx.2014.02.012

氯气中毒最常见和最重要的病理改变是急性肺损伤(ALI)和肺水肿<sup>[1]</sup>,目前对氯气中毒致ALI和肺水肿的发病机制研究仅限于其对血管活性物质释放、微血管通透性及肿瘤坏死因子和白细胞介素等的影响<sup>[2-4]</sup>。本研究通过观察大鼠吸入氯气致ALI时 Claudin-3及Occludin蛋白及基因表达的变化,探讨其发病的可能分子机制,为临床治疗提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

液氯(99%,南通江山农药化工股份有限公司),兔抗claudin-3抗体(BioWorld公司)、RT-PCR引物及试剂盒(上海英骏公司)等。

### 1.2 实验动物

健康成年雄性SD大鼠40只,体重(200±20)g,南通大学实验动物中心提供。将实验动物随机分为1个对照组和(10.28±1.73) mg/m<sup>3</sup>、(42.00±3.18) mg/m<sup>3</sup>、(102.00±6.96) mg/m<sup>3</sup>、(160.14±6.87) mg/m<sup>3</sup>4个氯气染毒组。

### 1.3 染毒

采用动式染毒方法,大鼠分别吸入上述不同浓度氯气10 min。对照组大鼠除吸入空气中不含氯气外,其它操作与染毒组相同。所有大鼠均在染毒后6 h处死。

### 1.4 标本采集及指标测定

(1)取腹主动脉血测动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)。(2)取右肺中叶组织,准确称重后放入80℃烘箱,72 h后再称重,计算W/D值。(3)取右肺上叶组织,10%中性甲醛固定24 h以上,HE染色后光学显微镜观察。(4)Western blot法检测右肺副叶组织 Claudin-3 蛋白表达水平:取肺组织加蛋白裂解液,组织匀浆后,取上清液,稀释后测定,根据原液中蛋白质浓度确定上样量,水浴蛋白变性;上样于SDS-PAGE凝胶电泳;用半干转运系统将蛋白质从凝胶上转到PVDF膜上;牛奶室温封闭2 h;用1:800稀释的兔抗 Claudin-3 抗体在4℃与膜孵育过夜后,TBST清洗;用1:10 000稀释的二抗抗体在室温与膜孵育1 h,TBST清洗;ECL显色5 min;曝光、显影、定影。此外,用同样的方法检测内参β-actin蛋白的表达,其中β-actin抗体为1:50 000稀释,无需二抗孵育。(5)RT-PCR法测右肺下叶组织 Claudin-3 mRNA及Occludin mRNA相对表达。Claudin-3引物序列:上游,5'-CATCCTGCTGGC-CGCCTTCG-3';下游,5'-CCTGATGATGGTGTGGCCGAC-3';产物175bp。Occludin引物序列:上游,5'-CTGTCTAT-GCTCGTCATCG-3';下游,5'-CATTCCCAGATCTAATGACGC-3';产物294 bp。β-actin引物序列:上游,5'-TCTGGAGGCTGTG-GTGGCT-3';下游,5'-AAGTGAGTTCTCGAGCAGGGA-3';产物344 bp。逆转录条件:65℃、5 min,37℃、2 min,37℃、50 min及70℃、15 min。PCR条件:94℃、4 min,94℃、30 s,58℃/57℃、30 s,72℃、1 min,总循环30次,最后延伸72℃、10 min。于凝胶成像分析系统紫外灯下观察凝胶电泳结果,用Quantity One图像采集系统对凝胶进行图像采集和扫描。

### 1.5 统计学处理

样本数据均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,应用SPSS17.0软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PaO<sub>2</sub>和W/D变化

与对照组相比,各染毒组大鼠PaO<sub>2</sub>降低,W/D比值升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );且随染毒浓度增加,各染毒组大鼠PaO<sub>2</sub>进一步降低,W/D比值升高更明显,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果见表1。

### 2.2 病理改变

对照组大鼠肺组织结构完整,肺泡间隔正常,肺间质未见炎症细胞浸润、血管充血、渗出,肺泡腔内未见渗出、出血、炎性细胞浸润,肺泡扩张良好。染毒组大鼠肺泡间隔增

收稿日期:2013-09-22

作者简介:江俊康(1962—),男,硕士,研究方向:职业中毒防治及其机制研究,E-mail:jkjiang@ntu.edu.cn。

宽,肺泡壁断裂,肺间质有不同程度的水肿、充血及炎性细胞浸润,肺泡腔内有片状伊红渗出及出血,肺泡结构破坏;且随氯气染毒浓度升高,病变加剧,呈现一定的剂量-效应关系。

表 1 不同浓度氯气染毒后大鼠 PaO<sub>2</sub> 和 W/D 的变化 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

染毒剂量 (mg/m <sup>3</sup> )	PaO <sub>2</sub> (mm Hg)	W/D
0	141.60 ± 4.88	4.97 ± 0.08
10.28 ± 1.73	111.25 ± 8.66	5.59 ± 0.09
42.00 ± 3.18	99.88 ± 6.13	6.48 ± 0.36
102.00 ± 6.96	88.40 ± 4.93	7.48 ± 0.11
160.14 ± 6.87	70.63 ± 7.29	8.31 ± 0.27

### 2.3 肺组织 Claudin-3 蛋白表达情况

与对照组相比, (42.00 ± 3.18) mg/m<sup>3</sup> 及以上浓度染毒组大鼠肺组织 Claudin-3 蛋白表达水平均有降低,差异有统计学意义 (P < 0.05)。见图 1。

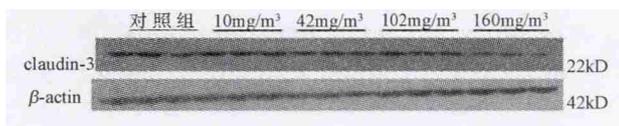


图 1 不同浓度氯气染毒后大鼠肺组织 Claudin-3 蛋白表达变化

### 2.4 肺组织 Claudin-3 mRNA 表达情况

与对照组相比,各染毒组大鼠肺组织 Claudin-3 mRNA 表达水平均有降低,差异有统计学意义 (P < 0.05)。见图 2。

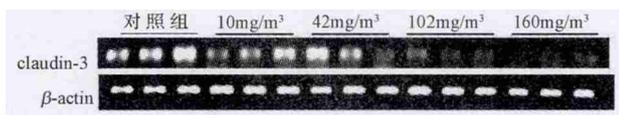


图 2 不同浓度氯气染毒后大鼠肺组织 Claudin-3 mRNA 表达变化

### 2.5 肺组织 Occludin mRNA 表达情况

与对照组相比,各染毒组大鼠肺组织 Occludin mRNA 表达水平均有降低,差异有统计学意义 (P < 0.05)。见图 3。

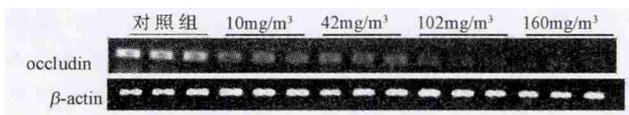


图 3 不同浓度氯气染毒后大鼠肺组织 Occludin mRNA 表达变化

## 3 讨论

本研究发现,氯气染毒后大鼠 PaO<sub>2</sub> 降低, W/D 比值升高,且随染毒浓度加大, PaO<sub>2</sub> 降低更明显, W/D 比值升高更显著 (P < 0.05); 同时也观察到剂量依赖性的肺组织病理学改变,这些都表明上述浓度氯气吸入染毒 10 min 成功建立了大鼠 ALI 模型。研究还发现,与对照组相比 (42.00 ± 3.18) mg/m<sup>3</sup> 及以上浓度染毒组大鼠肺组织 Claudin-3 蛋白表达水平均降低,差异具有统计学意义 (P < 0.05); 另外,各染毒组大鼠肺组织 Claudin-3 mRNA、Occludin mRNA 表达水平也都有所降低,差异有统计学意义 (P < 0.05)。可见,紧密连接组成蛋白 Claudin-3、Occludin 可能参与了大鼠氯气中毒性 ALI

肺水肿的发病过程。

紧密连接 (tight junction, TJ) 是一种广泛分布于血管内皮细胞间和肺泡上皮细胞顶端的细胞间连接蛋白,是细胞间最为基本、最为常见的结构形式,它是由多种蛋白分子组成,可使相邻的细胞膜紧靠在一起,形成一系列“拉链样”结构的吻合点,最终构成一种环绕细胞的物理性屏障,是液体经过细胞旁途径进入肺泡腔的关键选择性屏障结构<sup>[5]</sup>,对维持机体肺血管和呼吸膜的通透性有非常重要的作用<sup>[6]</sup>,从而保证了机体内环境的相对稳定。在紧密连接跨膜蛋白中, Claudin、Occludin 等是目前了解较为清楚的主要功能调节蛋白,两者共同连接封闭相邻的上皮细胞间隙,在紧密连接屏障结构功能中起重要作用<sup>[7]</sup>。有研究发现肺脏中主要表达 Claudin-3<sup>[8,9]</sup>,多种致伤因子可导致肺组织 Claudin-3、Occludin 蛋白表达的改变,细胞间隙通透性增大,正常生理屏障功能遭受破坏,最终导致多种疾病的发生<sup>[10-12]</sup>。因此, Claudin、Occludin 在 ALI 发病过程中具有重要作用。

正常生理条件下,紧密连接能阻止血管内液体与蛋白渗出进入肺泡腔,维持肺内液体和各组分的相对稳定状态。大鼠吸入氯气引发急性炎症反应,多种调节细胞间紧密连接的信号传导分子,如钙离子、一氧化氮合酶<sup>[13]</sup>、肌球蛋白轻链激酶<sup>[14]</sup>、酪氨酸酶系统、蛋白激酶 A (PKA) 及蛋白激酶 C (PKC) 等活化,作用于紧密连接蛋白上的特定氨基酸靶位点——肌球蛋白和肌动蛋白,最终通过肌球蛋白和肌动蛋白等构成的微丝结构收缩和磷酸化来调节紧密连接的通透性<sup>[15]</sup>。微丝在整个细胞内扩展并施加张力,保持细胞的形态、运动功能和维护细胞间的连接结构。由于紧密连接蛋白与细胞内部肌动蛋白微丝联系密切,肌动蛋白微丝解聚后,上皮细胞层屏障通透性显著增加。微丝磷酸化后则可破坏紧密连接结构,使其屏障功能下降,引起上皮通透性增加;同时,与紧密连接构成连接复合体的肌动蛋白、肌球蛋白收缩后,对紧密连接膜会产生离心性的牵引力,直接破坏紧密连接,使其渗透性大大提高,大量的液体和蛋白可经此途径进入肺泡腔,并形成肺水肿<sup>[16]</sup>。

### 参考文献:

- [1] Leikauf G D, Pope-Varsalona H, Concel V J, et al. Functional genomics of chlorine-induced acute lung injury in mice [J]. Proc Am Thorac Soc, 2010, 7 (4): 294-296.
- [2] 吴山, 蒋志学, 孙明, 等. 氯气染毒致大鼠肺水肿时内皮素-1 和 E-选择素的变化 [J]. 中国工业医学杂志, 2003, 16 (5): 268-273.
- [3] 吴山, 蒋志学, 盛延良, 等. 氯气染毒致大鼠肺水肿时白细胞介素-8 和肿瘤坏死因子的变化 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003, 21 (4): 283-284.
- [4] Song W, Wei S, Liu G, et al. Postexposure administration of a {beta} 2-agonist decreases chlorine-induced airway hyperreactivity in mice [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 45 (1): 88-94.
- [5] González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, et al. Tight junction proteins [J]. Prog Biophys Mol Biol, 2003, 81 (1): 1-44.

- [6] Aijaz S, Balda M S, Matter K. Tight junctions: molecular architecture and function [J]. *Int Rev Cytol*, 2006, 248 (1): 261-298.
- [7] Mazzon E, Cuzzocrea S. Role of TNF- $\alpha$  in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation [J]. *Respir Res*, 2007, 8 (1): 75-76.
- [8] Hewitt K J, Agarwal R, Morin P J. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues [J]. *BMC Cancer*, 2006, 6 (1): 186-187.
- [9] Coyne C B, Gambling T M, Boucher R C, *et al.* Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285 (5): 1166-1178.
- [10] Han X, Fink M P, Yang R, *et al.* Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice [J]. *Shock*, 2004, 21 (3): 261-270.
- [11] 许浒, 许燕萍, 黄庆华. 细菌感染对大鼠呼吸道上皮细胞紧密连接蛋白的影响 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25 (5): 306-307.
- [12] 王继承. 肺泡上皮间紧密及缝隙连接在急性肺损伤中结构及功能的改变 [D]. 第一军医大学硕士学位论文, 2003.
- [13] Han X, Fink M P, Uchiyama T, *et al.* Increased iNOS activity is essential for pulmonary epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286 (2): 259-267.
- [14] Laukoetter M G, Bruewer M, Nusrat A. Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2006, 22 (2): 85-89.
- [15] Shen L, Black E D, Witkowski E D, *et al.* Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119 (10): 2095-2106.
- [16] 张布衣, 姚根有. 紧密连接蛋白 Claudins 的研究进展 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2006, 26 (1): 14-16.

## 三种不同齿科材料研磨粉尘的扫描电子显微镜观察

### Observation on grinding dusts of three different dental materials with SEM

王蔚, 侯玉明, 刘名, 艾红军

(中国医科大学附属口腔医院修复科, 辽宁 沈阳 110002)

**摘要:** 应用扫描电子显微镜 (SEM)、能谱定量分析仪 (EDX) 分析齿科用树脂、Vitallium 金属及全瓷瓷块三种不同材料研磨粉尘的表面形态、元素组成, 结果显示调磨后的颗粒物质形态及尺寸均不相同, 其中以全瓷瓷块研磨粉尘的尺寸最小。旨在为今后齿科粉尘对医师机体产生不良影响的持续研究提供理论依据。

**关键词:** 齿科材料; 研磨粉尘; 扫描电子显微镜 (SEM)

中图分类号: R135.1 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2014)02-0113-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2014.02.013

随着齿科材料的不断发展, 全瓷冠所具有的稳定的色泽、良好的生物相容性, Vitallium 金属支架较好的延展、耐腐蚀性以及树脂基托的易调磨、易修补性已经逐渐成为齿科医师修复义齿的主要选择<sup>[1]</sup>。由于义齿制作过程中不可避免存在误差, 口腔修复科医师在给患者进行义齿佩戴过程中需要对义齿进行调磨, 因此, 可能会使医师所在的工作环境内的粉尘含量增高, 长期在粉尘含量较高的环境中工作会对齿科医师的机体产生不良影响<sup>[2-4]</sup>。本文针对目前国内口腔临床常用三种修复体的主要材料, 树脂、Vitallium 金属、全瓷, 应用口腔临床常用的车针对其进行研磨, 获得与口腔临床完全一致的粉尘颗粒, 采用扫描电子显微镜 (SEM) 及能谱定量分析仪 (EDX) 对三种不同材料研磨颗粒粉尘的表面形态及元素组成进行分析检测, 为今后研究齿科粉尘对医师机体可

能产生的潜在不良影响提供前期的研究基础及理论依据。

#### 1 材料和方法

##### 1.1 主要材料和仪器

树脂基托 (日进齿科有限公司), Vitallium 金属 (美国登氏柏公司), 全瓷瓷块 (德国 VITA 公司), 金刚砂车针 (日本松风公司), 扫描电子显微镜 (SSX-550 型, 日本岛津公司)。

##### 1.2 实验方法

1.2.1 样本制备 采用与临床同样的树脂、Vitallium 金属以及全瓷瓷块制备实验模块 (14 mm × 14 mm × 3 mm), 应用临床常用的金刚砂车针分别在密闭容器内对其进行调磨处理, 收集调磨后的颗粒粉尘各 10 mg。

1.2.2 样本处理 取各实验组样本, 固定于载物台上真空中喷镀金膜, 用 SEM 及 EDX 对各组样本进行检测观察。

#### 2 结果

3 种不同材料研磨颗粒的表面形态及元素组成如图 1 所示。树脂研磨的颗粒呈团块状, 大小不一, 尺寸相差较大, 表面不规则; Vitallium 金属颗粒较大, 形状不规则, 呈薄片状、卷曲波纹状结构; 全瓷瓷块颗粒相对较小, 呈团块状不规则结构。

EDX 分析显示, 树脂研磨颗粒的主要成分仅为 C、O 元素, Vitallium 金属研磨颗粒主要成分为 Mo、Cr、Co 等, 全瓷瓷块研磨颗粒的元素组成为 O、Si、K、Al 等。3 种不同材料研磨颗粒的具体元素成分见表 1, 其中 Vitallium 金属研磨颗粒的 Cr、Co、Mo 含量高达 97% 以上, Fe 的含量为 2.163 wt%。

#### 3 讨论

义齿的修复及调磨是齿科医师的主要工作之一, 国内外

收稿日期: 2013-11-05; 修回日期: 2014-01-15

基金项目: 辽宁省教育厅基金资助项目 (L2011131)

作者简介: 王蔚 (1975-), 女, 医学博士, 教授, 主任医师, 主要从事口腔修复临床及新型种植材料的研发。