

· 基础研究 ·

CXCL4与高氧诱导新生小鼠性别差异性肺损伤的相关研究

王会芳,程怀平,吴蝉桐,张媛,包天平,田兆芳*

南京医科大学附属淮安第一医院新生儿科,淮安市小儿呼吸诊疗重点实验室,江苏 淮安 223300

[摘要] 目的:探讨肺组织CXC趋化因子配体4(chemokine C-X-C motif ligand 4, CXCL4)与高氧诱导新生小鼠性别差异性肺损伤的关系及相关机制。方法:32只C57BL/6J新生小鼠(雄性、雌性各16只)随机分为4组:高氧雄性组、高氧雌性组、空气雄性组、空气雌性组(每组8只)。高氧组小鼠置于95%氧浓度下暴露7d,空气组于室内环境($FiO_2=21%$)中饲养。串联质谱标签(tandem mass tags, TMT)定量蛋白组学技术检测4组小鼠肺组织中蛋白质的表达变化,筛选差异表达的蛋白质;ELISA法检测肺组织匀浆CXCL4含量;HE染色法观察小鼠肺组织病理改变;冰冻切片免疫荧光染色检测肺组织“M4”型巨噬细胞(MMP7⁺ S100A8⁺)分布情况。结果:高氧暴露组肺组织肺泡化程度降低,辐射状肺泡计数(radial alveolar count, RAC)明显减小($P < 0.001$);与高氧雌性组相比,高氧雄性组RAC值下降($P < 0.01$)。TMT筛选出的CXCL4在高氧雄性组差异性表达上调;肺组织匀浆验证了质谱分析结果。高氧雄性小鼠肺组织MMP7⁺ S100A8⁺细胞增多。结论:高氧诱导新生小鼠肺损伤程度存在性别差异,雄性损伤程度高于雌性,可能与CXCL4诱导肺“M4”型巨噬细胞形成存在一定的相关性。

[关键词] CXC趋化因子配体4;性别;高氧;新生;小鼠;肺损伤

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)08-1142-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190809

Correlation of CXCL4 and lung injury with sexual dimorphism in neonatal mice induced by hyperoxic

Wang Huifang, Cheng Huaiping, Wu Chantong, Zhang Yuan, Bao Tianping, Tian Zhaofang*

Department of Neonatology, the Affiliated Huaian No.1 People's Hospital of Nanjing Medical University, the Pediatric Diagnosis and Treatment Respiratory Key Laboratory of Huai'an, Huaian 223300, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the relationship between chemokine C-X-C motif ligand 4 (CXCL4) and gender differences in lung tissues of neonatal mice with hyperoxia-induced lung injury. **Methods:** Thirty-two mouse pups (16 animals per sex), were randomly and equally assigned to four groups: Hyperoxia-male group, Hyperoxia-female group, Room air-male group and Room air-female group, with 8 mice in each group. The mice in air group were exposed to room air ($FiO_2=21%$) and those in hyperoxia group were exposed to hyperoxia ($FiO_2 \geq 95%$) for 7 days. All animals were sacrificed and lung tissues were excised for analysis via histological staining, tandem mass tags (TMT) technology and immunofluorescence staining. The levels of CXCL4 in tissue homogenates were measured. **Results:** The mouse pups exposed to hyperoxia had significant reductions in the degree of alveolarization, and radial alveolar count (RAC) in lung tissues ($P < 0.001$) was significantly decreased in hyperoxia-exposed animals and was decreased to a larger extent in males compared with females ($P < 0.01$). Under hyperoxia intervention, CXCL4 upregulated was exclusively differentially regulated in hyperoxia exposed neonatal male mice compared to room air controls. M4 macrophage (MMP7⁺ S100A8⁺) infiltration was higher in male mice following postnatal hyperoxia exposure. **Conclusion:** These findings highlight sex-specific differences in hyperoxic lung injury, and male neonatal mice are more susceptible to hyperoxia-mediated lung injury and display larger arrest in lung alveolarization, which suggests the changes in M4 macrophages induced by CXCL4 may play a crucial role in sexual differences in neonatal hyperoxic lung injury.

[Key words] chemokine C-X-C motif ligand 4 (CXCL4); sex; hyperoxia; neonatal; mice; lung injury

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(08): 1142-1146]

[基金项目] 国家自然科学基金(81801495);淮安市小儿呼吸诊疗重点实验室(HAP201607)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lyh0729@163.com

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是早产儿,尤其是极低及超低出生体重儿呼吸系统常见的慢性肺疾病。研究发现BPD可受多种因素影响,如胎龄、性别、宫内感染、有创机械通气时间、高浓度氧吸入等;而性别是BPD发生的独立危险因素,早产男婴发病率高于女婴^[1];高氧诱导BPD模型新生小鼠肺损伤程度同样存在性别差异,雄性重于雌性^[2-3],其发病机制目前尚不清楚,其中肺解剖结构、生理功能及性激素等不同可能是造成BPD肺损伤性别差异的原因。近年来有关肺损伤免疫反应的性别差异引起了广大学者的重视^[4]。CXC趋化因子配体4(chemokine C-X-C motif ligand 4, CXCL4),由活化血小板产生,是一种具有多效性的CXC趋化因子,在血液凝固、血管生成、肿瘤生长和免疫系统调节中发挥重要作用^[5]。CXCL4与巨噬细胞极化相关,能够诱导“M4”型巨噬细胞的形成^[6]。本课题组在前期研究发现高氧诱导新生小鼠肺组织损伤程度与巨噬细胞极化有关^[7],但未考虑性别这一因素,且目前对巨噬细胞的分类存在多种方法,故本实验采用串联质谱标签(tandem Mass Tags, TMT)定量蛋白质组学技术筛选与性别差异相关蛋白,并给予验证,利用免疫荧光技术等研究巨噬细胞极化情况,探索高氧诱导新生小鼠肺损伤性别差异的相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料

由南京医科大学医药实验动物中心购得出生时间相差30 min以内的新生C57BL/6J小鼠32只(雄性、雌性各16只)。数字式测氧仪为无锡Farstar医学设备有限公司产品,氧气由南京医科大学附属淮安第一医院中心实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 性别鉴定

观察新生小鼠肛门与生殖器距离,雄性小鼠二者之间距离约0.3 cm,雌性小鼠约0.1 cm;生后第1天观察小鼠肛门生殖器区色素斑^[8],仅雄性小鼠肉眼可见此区色素沉着。据此2种方法判断32只小鼠,16只为雄性,余为雌性。

1.2.2 模型制备

将32只C57BL/6J新生小鼠称重后按暴露的气体和性别不同随机分为4组:高氧雄性组、高氧雌性组、空气雄性和空气雌性组,每组8只(体重无显著差异, $P > 0.05$)。高氧暴露组置于60 cm×50 cm×40 cm

自制氧箱($\text{FiO}_2 \geq 95\%$)中暴露7 d,由数字式氧浓度仪监测;空气暴露组置同一室内环境($\text{FiO}_2 = 21\%$)下7 d。维持室温22~26 °C。实验期间,每24 h开箱更换垫料、补充饲料和水,同时将高氧暴露组与空气暴露组母鼠互换,避免母鼠氧中毒影响对幼鼠的哺乳能力。本实验得到南京医科大学附属淮安第一医院动物研究伦理委员会批准。

1.2.3 标本采集

高氧暴露7 d,称小鼠体重,予4%水合氯醛(0.1 mL/g)腹腔麻醉。右上肺置于4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,制备HE染色病理切片;左上肺制成匀浆,ELISA法检测CXCL4水平;右下肺制成冰冻切片检测免疫荧光表达;4 °C PBS清洗余肺组织,由液氮速冻置于-80 °C冰箱储存,用于TMT蛋白质组学分析检测。

1.2.4 TMT标记定量蛋白质组学检测

将样本送于北京诺禾致源科技股份有限公司,严格按照总蛋白提取、蛋白质检、TMT标记、馏分分离、液质检测等方法,应用TMT标记定量技术进行蛋白组学测序,定量检测不同组别的蛋白表达水平。

1.2.5 ELISA法检测肺组织匀浆CXCL4水平

操作严格按照试剂盒要求进行。

1.2.6 肺组织形态分析及肺损伤病理学评估

根据本实验室之前的方法^[9],计算辐射状肺泡计数(radical alveolar count, RAC)值评估肺泡化程度,即呼吸性细支气管中心至最近纤维隔或胸膜垂直线上的肺泡数目,反映终末呼吸单位所含肺泡数目。每个标本随机选取5张切片,以双盲的方式光学显微镜下每张切片随机选取5个视野进行观察并测量RAC,最终取平均值。

1.2.7 免疫荧光双标染色技术检测肺组织冰冻切片MMP-7和S100A8双染阳性细胞

小鼠肺组织冰冻切片置于4%多聚甲醛室温固定15 min,用0.1% TritonX-100室温通透30 min,加入抗基质金属蛋白酶(matrix metalloprotein, MMP)-7和钙结合蛋白S100A8抗体,4 °C孵育过夜;加入FITC标记山羊抗鼠和CoraLite594标记驴抗兔二抗避光孵育1 h, PBS洗片3次,用含DAPI的防淬灭封片剂封片,正置共聚焦显微镜下观察染色结果。

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行最终数据的统计学分析,计量资料表示为均数±标准差($\bar{x} \pm s$),两组间比较采用t检验,多组间比较采用两因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况

实验过程中小鼠全部存活。高氧暴露小鼠反应迟钝、自主活动减少,呼吸困难表现加重,口周发绀,高氧暴露7 d后体重减轻($P < 0.01$);雄性高氧组与雌性高氧组体重增长差异无统计学意义($P > 0.05$)。两因素方差分析显示性别和高氧两因素对小鼠体重增长无明显交互作用。

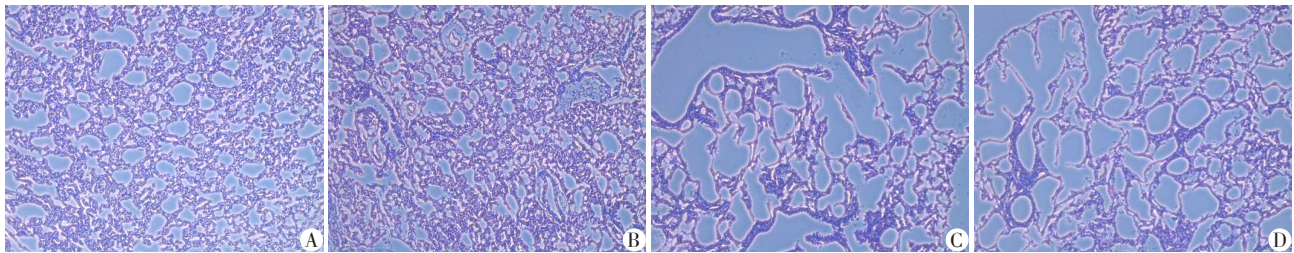
2.2 肺组织形态分析及病理学检查

HE结果显示,高氧暴露小鼠肺泡直径增大、肺泡腔内可见明显渗血,肺泡数目减少,肺泡间隔增厚,可见大量渗出的炎症细胞和巨噬细胞,RAC值

下降($P < 0.001$);与高氧雌性组相比,高氧雄性组RAC值减少($P < 0.01$)。两因素方差分析显示性别和高氧两因素对小鼠RAC变化有显著交互作用。肺组织HE及RAC值见图1、2。

2.3 TMT标记定量蛋白质组检测结果

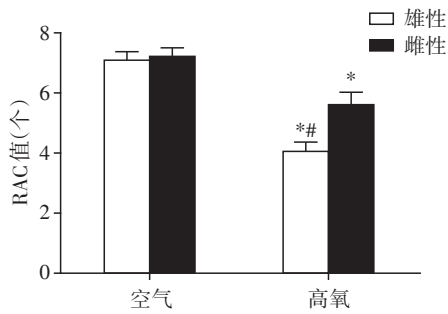
每组取3个肺组织样本进行TMT标记定量蛋白质组检测。与空气雄性组相比,仅在高氧雄性组差异表达的蛋白共425个,其中118个上调(如CXCL4上调1.24倍),307个下调;与空气雌性组比较,仅在高氧雌性组差异表达的蛋白共377个,其中178个表达上调,199个表达下调;高氧雄性和高氧雌性小鼠均差异表达的蛋白共750个,其中341个表达上调,409个表达下调。



A:空气雄性组;B:空气雌性组;C:高氧雄性组;D:高氧雌性组。

图1 各组肺组织病理(HE,×100)

Figure 1 Pathological changes of lung tissues in each group(HE,×100)



与空气组同性别比较, $P < 0.001$;与雌性组比较, $*P < 0.01$ ($n=8$)。

图2 各组小鼠肺组织RAC值

Figure 2 RAC in each group

2.4 肺组织匀浆CXCL4水平

ELISA结果显示,高氧雌性小鼠CXCL4水平与空气雌性组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);与空气雄性组相比,高氧雄性组CXCL4含量增多($P < 0.05$);与高氧雌性组比较,高氧雄性组CXCL4水平增大($P < 0.05$,图3)。

2.5 “M4”型巨噬细胞在小鼠肺组织浸润情况

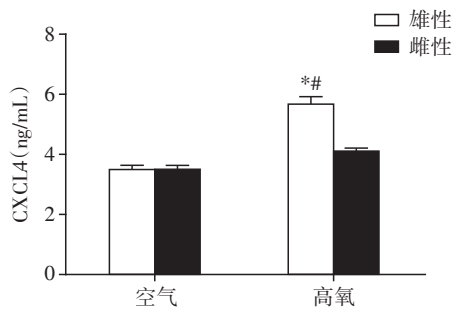
MMP7和S100A8是肺“M4”型巨噬细胞特异性表面标志物。免疫荧光染色结果显示肺组织出现

特异性标志物(图4)。细胞核显蓝光,MMP7显绿光,S100A8显红光。可见较多MMP7和S100A8共表达;仅见少部分MMP7阳性的细胞同时表达S100A8。

3 讨论

性别作为一种重要的生物学变量,在肺疾病发生及预后方面具有特殊作用。有研究报道,即使在后肺表面活性剂时代,极早产男婴(胎龄24~26周)BPD相关并发症风险仍显著升高^[2-3]。本组研究结果证实与高氧雌性组相比,高氧雄性组RAC值减少,这与文献的结论相符。研究发现BPD肺损伤性别差异的发病机制与肺内皮细胞对高氧反应的差异性,肺间充质细胞血小板源性生长因子(PDGF)受体信号通路的缺陷^[10],性激素对肺发育的影响^[11],Notch通路激活和肺纤维化相关基因表达的差异^[12],肺血管生成的差异调节^[13],HIF-1 α 调控的生长分化因子15(GDF15)表达差异^[14]等有关。

近年来肺损伤免疫反应的性别差异受到重视,涉及染色体补体的遗传差异,性激素(雌激素、黄体

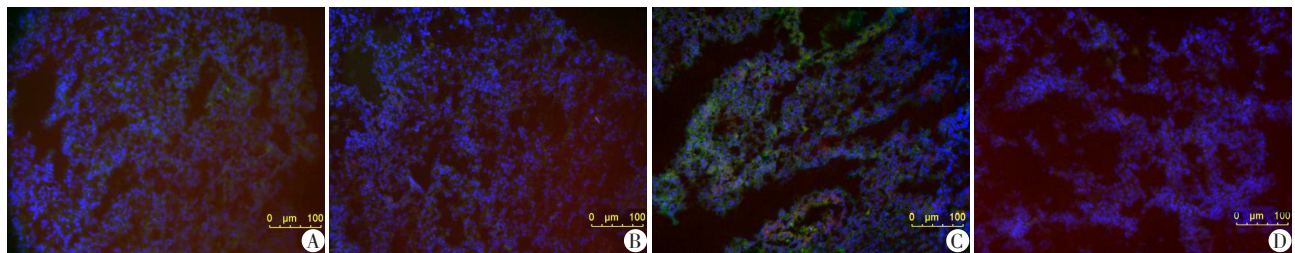


与空气组同性别比较,* $P < 0.05$;与雌性组比较,* $P < 0.05$ ($n=8$)。

图3 各组肺组织匀浆 CXCL4水平

Figure 3 The levels of CXCL4 in tissue homogenates of each group

酮和雄激素)的急性激活或产前组织/表观遗传效应,以及性染色体的性腺外效应,如编码基因和补偿机制(如通过X染色体失活减少基因剂量差异)等。肺巨噬细胞作为肺组织炎症反应和损伤的中心环节,在肺组织免疫中起着重要调节作用。我们在前期研究的基础上,为探讨巨噬细胞极化与性别差异性是否存在相关性,应用同位素标签特异性标记多肽氨基集团进行TMT质谱分析,并计量多样品中蛋白质的相对含量,从而寻找与巨噬细胞极化的相关因子。本实验TMT蛋白组学结果显示,CXCL4仅在高氧雄性组中差异性高表达;肺组织匀浆检测



A:空气雄性组;B:空气雌性组;C:高氧雄性组;D:高氧雌性组。

图4 各组小鼠肺“M4”型巨噬细胞免疫荧光表达(免疫荧光,×200)

Figure 4 Fluorescence expression of M4 macrophages in each group(Immunofluorescence,×200)

证实4组中CXCL4水平存在差异性。小鼠肺组织免疫荧光结果显示MMP7和S100A8抗原双阳性的细胞在高氧雄性组表达增多。研究证实MMP-7和S100A8抗原双阳性的细胞可作为“M4”型巨噬细胞的表面标志物^[15]。“M4”型与传统的M1、M2型不同,是一种终末巨噬细胞,由CXCL4刺激单核细胞后转化形成,“M4”型的典型特征是血红蛋白清道夫受体(CD163)完全缺失以及低表达抗原呈递分子HLA-DR,主要分泌TNF- α 、IL-6、TRAIL、CCL18、CCL22、MMP7、MMP-12以及S100A8^[16]。IL-6、TNF- α 等促炎因子参与BPD性别差异的发病机制^[17],与本研究中高氧雄性组“M4”型明显增加相一致,提示高氧雄性小鼠CXCL4水平升高,可能诱导肺组织“M4”型形成增多,继而通过释放相关的细胞因子,参与肺损伤,导致高氧暴露后小鼠肺损伤存在性别差异。

CXCL4可以广泛作用于不同类型细胞,促进中性粒细胞募集到炎症组织,加强单核细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞和T细胞的活化、增殖和分化。研究发现肺急性铜绿假单胞菌感染^[18]、脓毒性肺损伤^[19]及甲型流感病毒感染^[20]等过程中,CXCL4通过中性粒细胞募集和细胞内杀菌等起关键作用;CXCL4可促进肺肿瘤生长^[21],参与急性肺损伤^[22]的发病机

制。研究报道CXCL4作用于单核细胞膜上CXCL4受体后,可通过瞬时和延迟效应两种方式发挥作用^[5]。瞬时效应途径主要通过激活鞘氨醇激酶1(sphingosine kinase 1,SphK1)刺激PI3K、Syk和p38 MAP激酶的形成,从而促使活性氧(ROS)的产生;延迟效应途径则通过激活SphK1,刺激细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases,ErK)和c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)活化,活化后的Erk可抑制caspase-3和caspase-9诱导单核细胞的生成和分化;此外Erk及JNK也可增加促炎细胞因子的释放发挥作用。高氧暴露致雄性小鼠肺组织“M4”形成增多进而参与BPD性别差异的发生机制尚需进一步研究。

本实验不足在于只研究“M4”型巨噬细胞在小鼠肺组织中的表达差异,基于目前结果,进一步研究CXCL4如何诱导“M4”型形成,系统阐明其在BPD性别差异发生中的确切机制,将可能为BPD防治提供新的分子靶标,增强我们治疗该疾病的能力。这也是精准医疗的基础之一。

[参考文献]

[1] Zysman-Colman Z,Tremblay GM,Bandeali S,et al. Bron-

- chopulmonary dysplasia - trends over three decades [J]. Paediatr Child Health, 2013, 18(2):86-90
- [2] Nardiello C, Mižiková I, Morty RE. Looking ahead: where to next for animal models of bronchopulmonary dysplasia? [J]. Cell Tissue Res, 2017, 367(3):457-468
- [3] Solaligue DES, Rodríguez-Castillo JA, Ahlbrecht K, et al. Recent advances in our understanding of the mechanisms of late lung development and bronchopulmonary dysplasia [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 313(6): L1101-L1153
- [4] Ghosh S, Klein RS. Sex drives dimorphic immune responses to viral infections [J]. J Immuno, 2017, 198(5): 1782-1790
- [5] Kasper B, Petersen F. Molecular pathways of platelet factor 4/CXCL4 signaling [J]. Eur J Cell Bio, 2011, 90(6-7): 521-526
- [6] Domschke G, Gleissner CA. CXCL4-induced macrophages in human atherosclerosis [J]. Cytokine, 2017, pii: S1043-4666(17)30254-5
- [7] 唐云, 赵赛, 杨丽娟, 等. 高氧暴露对新生大鼠肺组织巨噬细胞亚型表达的影响 [J]. 现代医学, 2015(5): 537-542
- [8] Wolterink - Donselaar IG, Meerding JM, Fernandes C. A method for gender determination in newborn dark pigmented mice [J]. Lab Anim(NY), 2009, 38(1): 35-39
- [9] Bao TP, Wu R, Cheng HP, et al. Differential expression of long non-coding RNAs in hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia [J]. Cell Biochem Funct, 2016, 34(5): 299-309
- [10] Fulton CT, Cui TX, Goldsmith AM, et al. Gene expression signatures point to a male sex-specific lung mesenchymal cell PDGF receptor signaling defect in infants developing bronchopulmonary dysplasia [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 17070
- [11] Sallon C, Provost PR, LeBlanc D, et al. Essential intracrine androgenic action in lung development for both sexes [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2018, 183: 184-191
- [12] Balaji S, Dong X, Li H, et al. Sex-specific differences in primary neonatal murine lung fibroblasts exposed to hyperoxia *in vitro*: Implications for Bronchopulmonary Dysplasia (BPD) [J]. Physiol Genomics, 2018, 50(11): 940-946
- [13] Coarfa C, Zhang Y, Maity S, et al. Sexual dimorphism of the pulmonary transcriptome in neonatal hyperoxic lung injury: identification of angiogenesis as a key pathway [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 313(6): L991-L1005
- [14] Zhang Y, Jiang W, Wang L, et al. Sex-specific differences in the modulation of Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) by hyperoxia *in vivo* and *in vitro*: role of Hif-1 α [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 332(1): 8-14
- [15] Erbel C, Tyka M, Helmes CM, et al. CXCL4 - induced plaque macrophages can be specifically identified by co-expression of MMP7⁺ S100A8⁺ *in vitro* and *in vivo* [J]. Innate Immun, 2015, 21(3): 255-265
- [16] Ruytinx P, Proost P, Van Damme J, et al. Chemokine-induced macrophage polarization in inflammatory conditions [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1930
- [17] Lingappan K, Jiang W, Wang L, et al. Sex-specific differences in neonatal hyperoxic lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016, 311(2): L481-L493
- [18] Yue L, Pang Z, Li H, et al. CXCL4 contributes to host defense against acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection [J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0205521
- [19] Hwaiz R, Rahman M, Zhang E, et al. Platelet secretion of CXCL4 is Rac1-dependent and regulates neutrophil infiltration and tissue damage in septic lung damage [J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(22): 5347-5359
- [20] Guo L, Feng K, Wang YC, et al. Critical role of CXCL4 in the lung pathogenesis of influenza (H1N1) respiratory infection [J]. Mucosal Immunol, 2017, 10(6): 1529-1541
- [21] Pucci F, Rickelt S, Newton AP, et al. PF4 promotes platelet production and lung cancer growth [J]. Cell Rep, 2016, 17(7): 1764-1772
- [22] Bdeir K, Gollomp K, Stasiak M, et al. Platelet-specific chemokines contribute to the pathogenesis of acute lung injury [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2017, 56(2): 261-270

[收稿日期] 2019-02-17