论著

文章编号:1000-5404(2011)18-1920-04

CXCL12/CXCR4在高氧致新生大鼠肺损伤中的动态变化及意义

姚 兰[1],许 峰[1],罗 冲[2],李 祝[1],方 芳[1],刘成军[1] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院,儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室:PICU[1],肾内科[2])

[摘要] **目的** 检测趋化因子12(CXCL12)[又名基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor 1, SDF-1)]及其受体(Cys-X-Cys receptor 4,CXCR4)在高氧致新生大鼠肺损伤中的变化,初步探讨其在新生大鼠高氧肺损伤中的作用及可能机制。**方法** SD新生大鼠64只,按随机数字表达法分为空气对照组和高氧组,高氧组吸入氧体积分数≥0.95(95% O_2)的高氧建立高氧肺损伤动物模型。高氧刺激3、7、14、21 d后分别取2组新生大鼠行肺组织病理学检查;水解法测肺组织羟脯氨酸含量;实时荧光定量PCR检测肺组织CXCL12和CXCR4 mRNA; Western blot检测肺组织CXCR4蛋白。**结果** 病理学检查显示,高氧组肺组织炎症明显,结构紊乱,高氧暴露时间越长,损伤越明显。肺组织羟脯氨酸的含量在高氧刺激14 d和21 d后[(493.69±127.50)、(582.55±174.78)μg/g]明显高于空气对照组[14 d(327.52±46.97)μg/g($P<0.05$),21 d(321.27±60.63)μg/g($P<0.01$)]。高氧组CXCL12 mRNA表达在高氧刺激14 d及21 d后[(2.12±1.08)、(2.68±0.87)]均高于相应对照组[0.68±0.22($P<0.05$),0.51±0.18($P<0.01$)],CXCR4 mRNA表达在高氧刺激7、14、21 d后(0.53±0.23、0.36±1.15、0.31±0.19)均低于相应对照组[(2.80±1.14、2.71±1.26,$P<0.05$),(2.93±0.14,$P<0.01$)]。肺组织CXCR4蛋白的表达高氧刺激7、14、21 d后(2.06±0.64、2.84±0.83、1.38±0.34)均高于相应对照组[1.37±0.41($P<0.05$),0.81±0.27($P<0.01$),0.85±0.23($P<0.05$)]。**结论** CXCL12/CXCR4可能在高氧肺损伤的炎症反应和纤维化过程中发挥了重要作用。

[关键词] 趋化因子CXCL12;趋化因子受体4;高氧肺损伤;纤维化
[中图法分类号] R392.3;R459.6;R563 [文献标志码] A

Dynamic changes of CXCL12/CXCR4 in neonatal rats with hyperoxia-induced lung injury and their significance

Yao Lan[1], Xu Feng[1], Luo Chong[2], Li Zhu[1], Fang Fang[1], Liu Chengjun[1] ([1]Department of Pediatric Intensive Care Unit, [2]Department of Nephrology, Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood of Ministry of Education, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing,400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the role of chemotatic factor 12 (CXCL12), also known as stromal cells-derived factor 1(SDF-1), and its Cys-X-Cys receptor 4 (CXCR4) in hyperoxia-induced lung injury and its possible mechanism. **Methods** Sixty-four Sprague-Dawley neonatal rats were randomly divided into control group and hyperoxia group. An animal model of hyperoxia-induced lung injury was established by inhaling ≥95% O_2. After 3, 7, 14, and 21 days' inhaling, the rats were killed and lung tissue samples were taken for pathological examination. Hydroxyproline level in lung tissue samples was measured with the hydrolysis method. Expression of CXCL12, CXCR4 mRNA and CXCR4 protein in lung tissue samples was detected by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting, respectively. **Results** Pathological examination showed significant inflammation and structural disorder in lung tissue of hyperoxia group. The longer the exposure to hyperoxia was, the severer the injury was. The hydroxyproline level in lung tissue samples was significantly higher in hyperoxia group than in control group after exposure to hyperoxia for 14 and 21 d(493.69±127.50 μg/g and 582.55±174.78μg/g *vs* 327.52±46.97μg/g and 321.27±60.63 μg/g, $P<0.05$ or $P<0.01$). The expression level of CXCL12 mRNA was markedly higher in hyperoxia group than in control group after exposure to hyperoxia for 14 and 21 d(2.12±1.08 and 2.68±0.87 *vs* 0.68±0.22 and 0.51±0.18, $P<0.01$). However, the expression level of CXCR4 mRNA was significantly lower in hyperoxia group than in

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5388);重庆市卫生局资助项目(渝卫科教|2008|45号)
[通信作者] 刘成军,电话:(023)63622664,E-mail:liucwd@163.com

control group(0.53 ±0.23, 0.36 ±0.15 and 0.31 ±0.19 *vs* 2.80 ±1.14, 2.71 ±1.26 and 2.93 ±0.14, $P<0.05$) after exposure to hyperoxia for 7, 14, and 21 d, while the expression level of CXCR4 protein was significantly higher in hyperoxia group than in control group after exposure to hyperoxia for 7,14 and 21 d(2.06 ±0.64, 2.84 ±0.83 and 1.38 ±0.34 *vs* 1.37 ±0.41, 0.81 ±0.27 and 0.85 ±0.23, $P<0.05$). **Conclusion** CXCL12/CXCR4 may play an important role in inflammatory reaction and fibrosis of hyperoxia-induced lung injury.

[**Key words**] chemotatic factor 12; Cys-X-Cys receptor 4; hyperoxia-induced lung injury; fibrosis

Supported by the National Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5388) and the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (|2008|45).
Corresponding author: Liu Chengjun, Tel:86-23-63622664, E-mail: liucwd@163.com

氧疗是临床上重要的治疗手段,而长时间高浓度的用氧易导致高氧性肺损伤,主要病理特点为肺部的早期炎症反应和晚期纤维化改变。新生儿特别是早产儿氧疗还可能导致肺发育受阻,出现支气管肺发育不良(broncho-pulmonary dysplasia, BPD)[1]。目前高氧肺损伤发病机制不完全清楚,亦无特异有效的治疗手段。近年研究发现趋化因子12(CXCL12),即基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor 1,SDF-1),与其趋化因子受体(Cys-X-Cys receptor 4,CXCR4)在炎症反应中通过趋化炎性细胞参与炎症反应的发生、发展,同时在多种组织器官的纤维化过程中通过趋化成纤维细胞到病灶区及促进纤维细胞向肌成纤维细胞转化而参与纤维化过程[2]。也有研究发现通过干预CXCL12/CXCR4的作用可以减轻组织纤维化[3-5]。CXCL12/CXCR4轴是否亦参与了高氧肺损伤鲜有报道。本实验检测高氧肺损伤新生大鼠肺组织CXCL12/CXCR4的表达变化,初步探讨CXCL12/CXCR4在高氧肺损伤中的作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型和标本采集

自然分娩的SPF级新生SD大鼠64只(购自重庆医科大学实验动物中心),体质量(5.0 ±0.5)g,雌雄不限。按随机数字表法分为空气对照组和高氧组。高氧组置于动物氧仓中,持续通入纯氧,测氧仪(数字测氧仪CY100型,杭州立华仪器有限公司)检测氧浓度,保证氧体积分数≥0.95(95% O_2);空气组置于同一室内空气中。环境温度22~26 ℃,湿度60% ~70%。每日上午9时开箱更换母鼠、垫料,添加饲料、水,开箱时间不超过1 h。分别于实验后3、7、14、21 d,用10%水合氯醛麻醉新生鼠,迅速打开胸腔取出肺组织,左肺4%多聚甲醛固定,右肺置于-80℃冰箱保存,用于PCR和Western blot检测。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 总RNA提取试剂盒购自TIANGEN公司,逆转录试剂盒和SYBR Green试剂盒购自TaKaRa公司,引物由北京三博远志生物技术公司合成,全蛋白提取试剂盒、Lorry法蛋白含量检测试剂盒、SDS-PAGE凝胶配置试剂盒、超敏ECL化学发光试剂盒、羟脯氨酸测试盒均购自KeyGEN公司,CXCR4抗体购自Abcam,β-actin抗体、二抗(IgG-HRP)和SDS-PAGE蛋白上样缓冲液均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2.2 肺组织病理变化 4%多聚甲醛固定肺组织24 h后,冲水,脱水,石蜡包埋,HE染色和Masson染色。光镜下观察肺组织的病理改变。

1.2.3 水解法检测肺组织羟脯氨酸含量 按照说明书,准确称取肺组织湿质量50~100 mg,加入1 ml水解液沸水浴水解20 min后,加指示剂,调定pH值,加入相应试剂充分反应后,取上清测定550 nm处的吸光度。根据公式计算出肺组织羟脯氨酸含量。

1.2.4 qRT-PCR(Real-time PCR)检测肺组织CXCL12和CXCR4 mRNA的表达 从肺组织中提取总RNA,测定RNA的浓度与纯度后逆转录为cDNA。采用荧光染料(SYBR Green)法,Bio-Rad CFX96荧光定量PCR仪检测CXCL12和CXCR4 mRNA的表达。CXCL12上游:5′-CAACGTCAAACATCTGAAAATCCTC-3′,下游:5′-ACTTTAATTTCGGGTCAATGCACAC-3′,扩增片段为107 bp;CXCR4上游:5′-CAAGACTACGGTCATCCTTATCCTG-3′,下游:5′-TCTCGAACTCACATCCTTGCTTG-3′,扩增片段119 bp;内参GAPDH上游:5′-GCAAGTTCAACGGCACAGTCA-3′,下游:5′-TCACCCCATTTGATGTTAGCG-3′,扩增片段为106 bp。反应体系25 μl,反应条件:95 ℃变性35 s,CXCL12、CXCR4、GAPDH退火温度分别为58.1、55.5、60 ℃,退火30 s,95 ℃延伸10 s,共40个循环。据扩增曲线和熔点曲线检测反应的特异性,结果以GAPDH标准化,应用Bio2Rad CFX96 Manager软件分析目的基因的相对表达量(△△ct法)。

1.2.5 Western blot检测CXCR4蛋白表达 将肺组织匀浆提取全蛋白,Lorry检测试剂盒测定蛋白浓度。取50 μg蛋白样品进行SDS-PAGE电泳,转膜,50 g/L脱脂奶粉室温封闭1 h后,加入封闭液稀释的CXCR4抗体(1∶1 500)和β-actin(1∶2 000),4 ℃孵育过夜,TBST漂洗3次后加入二抗(1∶1 000),37 ℃孵育2 h后,TBST漂洗3次,ECL显色曝光,显影,测定光密度值。

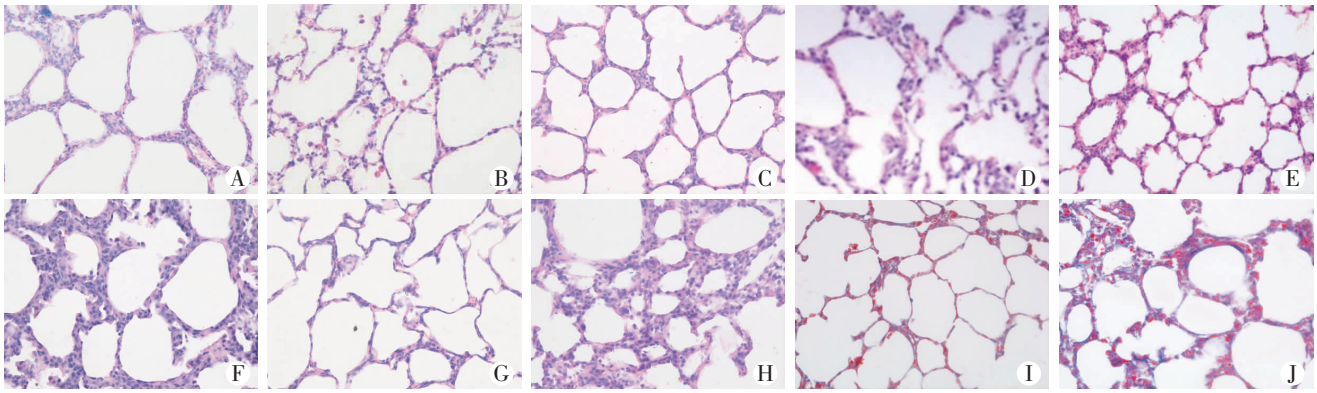
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 16.0统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 肺组织病理观察

空气对照组肺泡间隔正常,无炎症细胞浸润。各高氧暴露组大鼠肺组织均有不同程度的病理改变。高氧暴露3 d及7 d



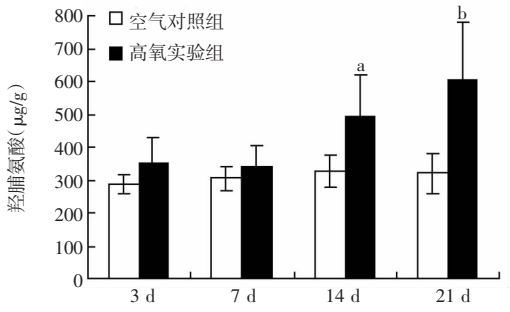
A-H:HE染色; I-J:Masson染色; A:空气对照组3 d; B:高氧组3 d; C: 空气对照组7 d; D:高氧组7 d; E、I:空气对照组14 d; F、J:高氧组14 d; G:空气对照组21 d; H:高氧组21 d

图1　HE染色和Masson染色观察各组大鼠肺组织病理形态学变化　(×400)

组,肺泡上皮细胞肿胀,肺泡壁增厚,间质充血水肿,炎性细胞浸润,肺泡结构紊乱;以高氧暴露7 d组更明显。高氧暴露14 d及21 d组,肺内炎性渗出减少,水肿减轻,肺组织结构更加紊乱,间隔明显增宽,间质细胞和肺上皮细胞明显增生,胶原样物质增多,出现肺纤维化倾向;尤以高氧暴露21 d更明显。见图1。

2.2　羟脯氨酸含量测定

高氧组肺组织羟脯氨酸含量在高氧刺激14 d后明显增加,且14 d及21 d组均高于相应时间点的空气对照组,差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$,图2)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空气对照组比较

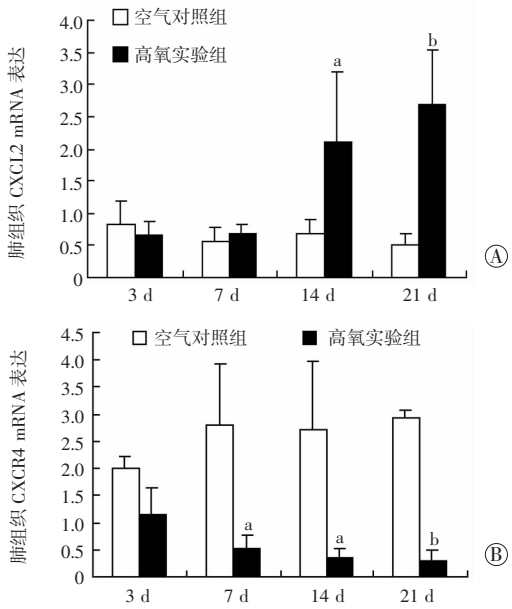
图2　碱水解法测定各组大鼠肺组织羟脯氨酸含量

2.3　肺组织CXCL12/CXCR4 mRNA表达水平

空气对照组各时间点肺组织CXCL12和CXCR4 mRNA表达无明显差异。高氧组肺组织CXCL12 mRNA的表达在3 d和7 d同相应时间点空气对照组无明显差异。高氧组14、21 d表达明显升高,且较空气对照组14 d及21 d表达高。高氧组CXCR4 mRNA表达在7、14、21 d均明显低于空气对照组,差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。见图3。

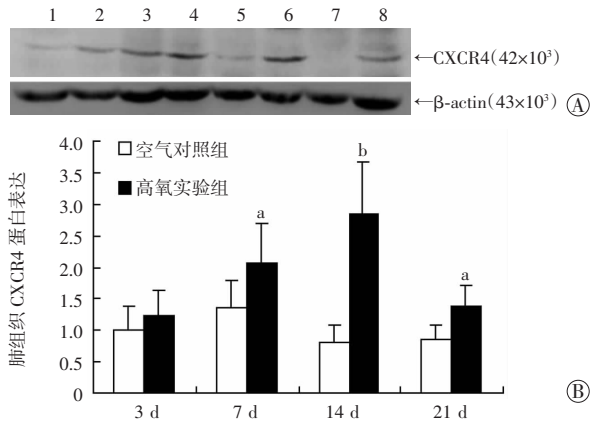
2.4　肺组织CXCR4蛋白表达

Western blot检测发现空气对照组各时间点肺组织CXCR4蛋白表达无明显差异,经高氧刺激7、14、21 d后,新生大鼠肺组织CXCR4蛋白的表达明显增加,且均高于同一时间点的空气对照组,差异有显著性($P<0.05$,$P<0.01$,图4)。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与同时相点空气对照组比较

图3　荧光定量PCR检测各组大鼠肺组织CXCL12(A)和CXCR4(B) mRNA表达



A:Western blot检测　1:空气对照组3 d;2:高氧组3 d;3:空气对照组7 d;4:高氧组7 d;5:空气对照组14 d;6:高氧组14 d;7:空气对照组21 d;8:高氧组21 d; B:半定量分析　a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与同时间点空气对照组比较

图4　Western blot检测各组大鼠肺组织CXCR4蛋白的表达

3 讨论

SDF-1属于趋化因子CXC家族,命名为CXCL12,同其受体CXCR4结合后参与了心脏等器官的发育、干细胞的迁移、肿瘤的生长转移等多种病理生理过程[2,6-8]。近年研究发现,CXCL12/CXCR4轴在炎症反应和多种组织器官的纤维化过程中亦发挥着重要作用,在脂多糖和博来霉素导致的肺损伤和肺纤维化中CXCL12/CXCR4轴起着十分重要的作用。Strieter等[9]发现在脂多糖诱导的急性肺损伤中,尤其在炎症持续期,CXCL12/CXCR4轴可促进中性粒细胞的趋化,加重炎症反应。在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化过程中,通过CXCL12/CXCR4轴,可趋化外周血或骨髓中表达CXCR4的纤维细胞到损伤肺组织,诱导病灶中纤维细胞向肌成纤维细胞转化,促进肺纤维化发生[9-11]。移植骨髓来源的表达CXCR4的纤维细胞亦促进了高氧肺损伤诱导的新生大鼠肺纤维化[12]。因此,CXCL12/CXCR4轴在高氧肺损伤中的作用机制值得进一步探讨。

本研究通过给予95%的氧建立新生大鼠高氧肺损伤模型,对支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞计数、分类、肺湿/干质量及肺组织病理变化进行检测,结果显示在高氧暴露3 d和7 d后,肺组织以炎症反应为主,细胞计数和肺湿/干质量在高氧暴露7 d后最高,同课题组以往研究[13]结果一致。BALF细胞中以中性粒细胞为主[14],而CXCR4在中性粒细胞和单核细胞细胞膜均有表达,虽然在高氧暴露3、7 d后,肺组织CXCL12 mRNA的表达未见明显变化,但肺组织CXCR4蛋白的表达在高氧暴露7 d后明显增高亦可说明CXCL12/CXCR4轴很可能参与了高氧肺损伤炎症反应中炎症细胞的趋化。

高氧刺激新生大鼠14 d和21 d后,肺组织羟脯氨酸含量明显增加,结合肺组织病理变化,显示高氧肺损伤肺组织纤维化明显。肺组织CXCL12 mRNA和CXCR4蛋白表达在高氧刺激14 d和21 d后明显增高,同羟脯氨酸含量的变化具有一致性,且已有研究表明CXCL12/CXCR4在其他原因导致的肺纤维化中发挥了重要作用,推测CXCL12/CXCR4很可能参与了高氧肺损伤后期的纤维化。

本实验发现损伤后组织CXCR4 mRNA的表达明显降低,高氧肺损伤新生鼠肺组织CXCR4 mRNA和蛋白的表达变化不一致。CXCR4 mRNA表达在高氧暴露7 d后开始明显下降,而CXCR4蛋白表达在高氧暴露7 d后明显增加。这可能系本研究所选取的时间点错过了肺损伤后CXCR4 mRNA表达上升时段及峰值时段,或者与基因转录及转录后水平的变化有关,也可能系肺组织CXCR4的表达在高氧暴露后受抑制,而CXCR4蛋白的增高是肺外趋化而来。具体原因还有待进一步研究证实。

综上,CXCL12/CXCR4很可能通过趋化炎症细胞加重炎症反应,趋化纤维细胞和促进纤维细胞向肌成纤维细胞的转化加重肺纤维化而参与高氧肺损伤。有研究用CXCL12拮抗剂AMD3100、CXCL12抗体,或者通过抑制CXCR4下游的PI3K-Akt-mTOR信号转导通路均能明显减轻博来霉素导致的肺纤维化[3-5]。若能对CXCL12/CXCR4轴在高氧肺损伤中的作用机制进一步研究和调控,可能能为预防和治疗高氧肺损伤提供新的思路。

参考文献:

[1] Jobe A H, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia[J]. Am J Respair Crit Care Med, 2001, 163(7): 1723-1729.
[2] 崔红霞, 冯一中, 顾振纶, 等. CXCL12/CXCR4生物轴与特发性肺纤维化研究进展[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(3): 298-301.
[3] Song J S, Kang C M, Kang H H, *et al*. Inhibitory effect of CXC chemokine receptor 4 antagonist AMD3100 on bleomycin induced murine pulmonary fibrosis [J]. Exp Mol Med, 2010, 42(6): 465-472.
[4] Young K C, Torres E, Hatzstergos K E, *et al*. Inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis attenuates neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Circ Res, 2009, 104(11): 1293-1301.
[5] Mehrad B, Burdick M D, Strieter R M. Fibrocyte CXCR4 regulation as a therapeutic target in pulmonary fibrosis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(8/9): 1708-1718.
[6] 邱际华, 刘求真, 陈丽, 等. CXCR4/SDF-1对鼻咽癌细胞增殖与迁移能力的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(7): 598-600.
[7] 张园园, 胡国华, 袁琨, 等. SDF-1/CXCR4对喉癌细胞归巢的作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(12): 1316-1320.
[8] 孙梯业, 赵永亮, 颜伟, 等. CXCR4在VEGF-C介导的胃癌淋巴道转移中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(2): 162-165.
[9] Strieter R M, Keeley E C, Burdick M D, *et al*. The role of circulating mesenchymal progenitor cells, fibrocytes, in promoting pulmonary fibrosis[J]. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2009, 120: 49-59.
[10] Phillips R J, Burdick M D, Hong K, *et al*. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis[J]. J Clin Invest, 2004, 114(3): 438-446.
[11] Xu J, Mora A, Shim H, *et al*. Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 37(3): 291-299.
[12] Deng C, Wang J, Zou Y, *et al*. Characterization of fibroblasts recruited from bone marrow derived precursor in neonatal Bronchopulmonary dysplasia (BPD) mice[J]. J Appl Physiol, 2011. [Epub ahead of print]
[13] 刘成军, 许峰, 匡凤梧, 等. 基质金属蛋白酶及其组织抑制剂在高氧性肺损伤中的变化[J]. 实用儿科临床杂志, 2004, 19(10): 842-844.
[14] 许峰, 霍泰辉, 翁颂铭, 等. 高浓度氧对早产鼠肺一氧化氮合酶基因表达的影响[J]. 中华儿科杂志, 2002, 40(1): 37-40.

(**收稿**:2011-04-17;**修回**:2011-05-29)
(编辑 王 红)