

# 脂多糖对新生小鼠肺血管内皮细胞的影响及机制探讨

邓思俊 张晗 郭春宝 刘旭薇 游瑶瑶 邓春\*

(重庆医科大学附属儿童医院新生儿科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室,  
儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

**摘要** 该文旨在探讨脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)对新生小鼠肺血管内皮细胞的影响及机制。将分离培养的肺血管内皮细胞随机分为空白对照组和LPS组;用10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的LPS处理细胞后分别于0 h、6 h、12 h、24 h、48 h时间点收集细胞标本进行检测;采用划痕实验观察LPS对肺血管内皮细胞迁移的影响;用荧光定量PCR(Real-time PCR, RT-PCR)检测白介素-1 $\beta$ (*IL-1 $\beta$* )、巨噬细胞炎性蛋白-1 $\alpha$ (*MIP-1 $\alpha$* )、单核细胞趋化蛋白-1(*MCP-1*)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (*TNF- $\alpha$* ) mRNA水平变化;Western blot检测血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)及核因子 $\kappa\text{B}$ (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa\text{B}$ )相关蛋白P65水平的变化。结果显示,体外分离培养的肺血管内皮细胞成鹅卵石样排列,VIII因子相关抗原和CD31表面抗原荧光染色阳性。划痕实验中,LPS组细胞在12 h的迁移高于对照组( $P<0.001$ );荧光定量PCR检测到LPS组分泌的炎症因子*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 和趋化因子*MIP-1 $\alpha$* 、*MCP-1*的mRNA表达明显高于对照组( $P<0.001$ );Western blot显示,LPS组与对照组相比,VEGF蛋白表达在24 h、48 h处降低( $P<0.05$ ),VEGFR2蛋白表达在各时间段都明显降低( $P<0.001$ ),同时,NF- $\kappa\text{B}$ 相关蛋白P65活性显著升高( $P<0.05$ )。研究表明,脂多糖诱发的炎症反应影响肺血管内皮细胞的发育,其机制可能与NF- $\kappa\text{B}$ 通路激活,诱导炎症因子、趋化因子表达升高和VEGF/VEGFR2表达下降有关。

**关键词** 脂多糖;新生小鼠;肺血管内皮细胞;血管内皮生长因子受体2;NF- $\kappa\text{B}$

## Effect of Lipopolysaccharide on Pulmonary Vascular Endothelial Cells and Its Mechanism in Neonatal Mice

Deng Sijun, Zhang Han, Guo Chunbao, Liu Xuwei, You Yaoyao, Deng Chun\*

(Department of Neonatology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education  
Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation base of  
Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China)

**Abstract** This study aimed to investigate the effects and mechanisms of lipopolysaccharide (LPS) on pulmonary vascular endothelial cells in neonatal mice. The cells were randomly divided into blank control group and LPS group. The cells were treated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS, and the cell samples were collected at 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h. The migration of pulmonary vascular endothelial cells was observed by the scratch test; the mRNA expression of Chemokine and inflammatory cytokines in the lung vascular endothelial cells were determined by Real-time

收稿日期: 2018-09-27 接受日期: 2019-01-16

国家自然科学基金(批准号: 81270058)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-63638842, E-mail: dengcgcb@163.com

Received: September 27, 2018 Accepted: January 16, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81270058)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-63638842, E-mail: dengcgcb@163.com

网络出版时间: 2019-04-01 13:43:49

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190401.1343.024.html>

PCR (RT-PCR); the protein level of P65, VEGF and VEGFR2 were determined by Western blot. The results showed that the pulmonary vascular endothelial cells were exhibited as polygon and presented typical cobblestone-like morphology after fusion to monolayer with contact inhibition. Immunofluorescence staining revealed that the expressions of CD31 and factor VIII-related antigen were positive. The migration of LPS group cells in the scratch test was higher than that of the control group at 12 h ( $P < 0.001$ ). The mRNA expression of inflammatory factors *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$*  and chemokines *MIP-1 $\alpha$*  and *MCP-1* secreted by LPS group was significantly higher than that control group by Real-time PCR ( $P < 0.001$ ); the protein expression of NF- $\kappa$ B-related protein P65 activity increased ( $P < 0.05$ ), the expression of VEGFR2 protein on the surface of pulmonary vascular endothelium was significantly decreased ( $P < 0.001$ ); the vascular endothelial growth factor (VEGF) in LPS group was decreased. This study demonstrated that the inflammatory response induced by lipopolysaccharide affects the development of pulmonary vascular endothelial cells, and its mechanism might be related to the activation of NF- $\kappa$ B pathway, the induction of inflammatory factors, the increase of chemokine expression and the decrease of VEGF/VEGFR2 expression.

**Keywords** lipopolysaccharide; neonatal mouse; pulmonary vascular endothelial cells; vascular endothelial growth factor 2; NF- $\kappa$ B

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是早产儿高氧机械通气引起的最常见并发症,具有很高的发病率和死亡率,并且其严重性一直延续到成年期<sup>[1]</sup>。近年来,随着围生医学的发展,既往以肺间质纤维化为特征的经典型BPD逐渐减少,但在超早产儿中,以肺泡发育阻滞和肺微循环障碍为病理特征的新型BPD发生率并未降低。现有的肺表面活性物质、产前激素和先进的通气技术并不能解决这种新型BPD的问题,有效的预防和治疗措施依然缺乏<sup>[2]</sup>。临床研究表明,炎症是BPD的主要危险因素<sup>[3-5]</sup>。Lu等<sup>[6]</sup>发现,胎儿肺部炎症介质介导的血管新生扰乱生理性血管发育,破坏气道和毛细血管之间的关系,是BPD发病重要机制。革兰氏阴性细菌外表面的主要成分[细菌内毒素或脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)]诱导多种内皮功能障碍,包括促凝血活性紊乱、增强内皮通透性和过度表达促炎介质,是用于实验有效的炎症启动因子<sup>[7]</sup>。但是,目前LPS对肺血管内皮细胞的影响机制尚不明确,因此,探讨LPS对肺血管内皮细胞的影响对进一步了解BPD具有重要意义。

血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)由一层扁平细胞所组成,呈单层连续性衬在血管内面,形成血管的内壁。在炎症反应、损伤及免疫应答等多种病理生理过程中发挥作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可通过结合血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor 2, VEGFR2)驱动生后生理性血管的形

成<sup>[8]</sup>。有研究表明,在BPD患者的VEGF检测中发现了不一样的结果<sup>[9-10]</sup>。NF- $\kappa$ B在炎症反应中被认为有着重要的调节作用。我们推测,LPS对肺血管内皮细胞的影响可能是由NF- $\kappa$ B激活、炎症因子、趋化因子和VEGF/VEGFR2表达变化所引起的。本研究通过给予LPS刺激肺血管内皮细胞,观察炎症对肺微血管内皮细胞表达的VEGF/VEGFR2、NF- $\kappa$ B活性及炎症因子和趋化因子的改变,初步说明炎症在BPD中的作用及可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料和实验动物

DMEM培养基及胎牛血清购自Gibco公司; LPS(货号: L2880)购自Sigma公司; 兔抗小鼠CD31购自Abcam公司; 兔抗小鼠八因子抗体购自Novus公司; 免疫荧光二抗购自Protein公司; VEGFR2、VEGF、P65多抗购自武汉三鹰生物科技有限公司; 全蛋白提取试剂盒和BCA蛋白测量试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司; TRIzol购自Invitrogen公司; 反转录试剂盒购自TaKaRa公司; 引物由北京华大基因研究中心有限公司合成。健康新生24 h内的C57BL/6小鼠,雌雄不拘,由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号[SCXK(渝) 2007-002]。本研究符合重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

### 1.2 分离培养原代新生小鼠肺血管内皮细胞

将30只新生24 h内的C57BL/6小鼠颈髓离断后

放入装有75%酒精的烧杯中, 浸泡5 min左右。用组织剪逐层剪开胸腔, 眼科镊取下肺组织, 移除气管及支气管后, 将其浸泡于含有青霉素、链霉素的PBS溶液中备用。用PBS反复冲洗多次, 以去除肺组织的血迹。PBS冲洗后, 将其剪碎至1 mm左右, 吸去多余PBS后移至离心管中。加入浓度为0.1%的胶原酶消化20 min后, 用含FBS的DMEM中和, 过200目筛网过滤, 4 °C、300 ×g离心10 min, 弃上清, 用含FBS的DMEM的培养基重悬, 多次差速贴壁法去除杂细胞。以 $2 \times 10^4$ 个细胞/mL接种于24孔板中, 24 h后首次全量换液, 此后2~3天换1次液, 并在光学显微镜下观察细胞形态。

### 1.3 血管内皮细胞的鉴定

采用两种方法进行鉴定。(1)VIII因子相关抗原鉴定: 将细胞接种在24孔板中, 待细胞生长接近融合时, 去培养基, 用PBS清洗3次, 多聚甲醛室温固定10 min, PBS清洗。用PBS稀释的0.3% Trion-X 100打孔10 min, PBS清洗3次后用5% BSA室温封闭30 min; 细胞和抗VIII因子抗体于37 °C孵育过夜, 免疫荧光Cy3标记的二抗孵育30 min, PBS洗3次, 用DAPI染核30 min, 细胞荧光淬灭剂封片后, 荧光显微镜观察拍照。(2)CD31表面抗原鉴定: 将细胞接种在24孔板中, 待细胞生长接近融合时, 去培养基, 用PBS清洗3次, 多聚甲醛室温固定10 min, PBS清洗。5% BSA室温封闭30 min; 细胞和VIII因子抗体于37 °C孵育过夜, 免疫荧光Cy3标记的二抗于37 °C孵育30 min, PBS洗3次, 用DAPI染核30 min, 细胞荧光淬灭剂封片后, 荧光显微镜观察拍照。

### 1.4 肺血管内皮细胞的划痕实验

肺血管内皮细胞以 $2 \times 10^4$ 的密度接种于6孔板中, 待细胞生长铺满板时用100 μL枪头垂直从底部划过, PBS清洗3次。对照组用无血清培养基培养, 实验组用LPS浓度为10 μg/mL的培养基培养。细胞在37 °C孵箱中培养24 h, 于特定时间在倒置显微镜下观察细胞划痕距离变化并拍照分析。此实验在相同条件下至少重复3次。

### 1.5 *IL-1β*、*TNF-α*、*MIP-1α*、*MCP-1*的RT-PCR检测

使用TRIzol提取细胞总RNA, 反转录反应制备cDNA, 反应体系共10 μL。引物由华大基因合成, 序列如下。*IL-1β*: 上游5'-GGC TGG ACT GTT TCT AAT GC-3', 下游5'-AGC TTC TCC ACA GCC ACA AT-3';

*TNF-α*: 上游5'-ACG GCA TGG ATC TCA AAG AC-3', 下游5'-GTG GGT GAG GAG CAC GTA GT-3'; *MIP-1α*: 上游5'-AGA TTC CAC GCC AAT TCA TC-3', 下游5'-CCC AGG TCT CTT TGG AGT CA-3'; *MCP-1*: 上游5'-CCC AAT GAG TAG GCT GGA GA-3', 下游5'-TCT GGA CCC ATT CCT TCT TG-3'; 内参基因*GAPDH*: 上游5'-CAG CGA CAC CCA CTC CTC CAC CTT-3', 下游5'-CAT GAG GTC CAC CAC CCT GTT GCT-3'。反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 64.5 °C 30 s, 共40个循环。采用相对定量法测定*IL-1β*、*MIP-1α*、*MCP-1*及*GAPDH*的PCR产物的Ct值。实验重复3次。

### 1.6 Western blot检测

蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白, BCA测定蛋白浓度, 加上样缓冲液后于沸水中煮沸10 min, 按序上样, 电泳后4 °C度转膜, BSA封闭1 h, 加入稀释的一抗(VEGFR2稀释浓度为1:500, P65的稀释浓度为1:500, VEGF稀释浓度为1:500, β-肌动蛋白的稀释浓度为1:1 000), 4 °C孵育过夜。第二天进行洗膜, 然后加入1:5 000稀释的二抗, 室温孵育1 h, 洗膜, 显色, 采集图像, 最后用Quantity One分析软件对结果进行灰度值分析, 蛋白含量用目的蛋白——β-肌动蛋白(β-actin)来表示。实验重复3次。

### 1.7 统计学分析

本实验采用Graphpad Prism 6.01统计软件进行统计学分析, 两组间检验采用两独立样本t检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 新生小鼠肺血管内皮细胞形态学观察

体外培养的新生小鼠肺血管内皮细胞呈类圆形或梭形, 形成单层后成鹅卵石样排列(图1)。

### 2.2 VIII因子相关抗原鉴定

VIII因子相关抗原, 是一种大分子蛋白质, 主要表达于血管内皮细胞、巨核细胞及血小板, 是目前判定血管内皮细胞的公认标准<sup>[11-12]</sup>。培养的新生小鼠肺血管内皮细胞VIII相关抗原鉴定结果, 在荧光显微镜下, 细胞内可见明亮的红色荧光(图2)。

### 2.3 CD31抗原鉴定结果

血小板内皮细胞黏附分子-1(platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)又名CD31, 主要表达于内皮细胞、血小板、巨噬细胞, 被认为是一

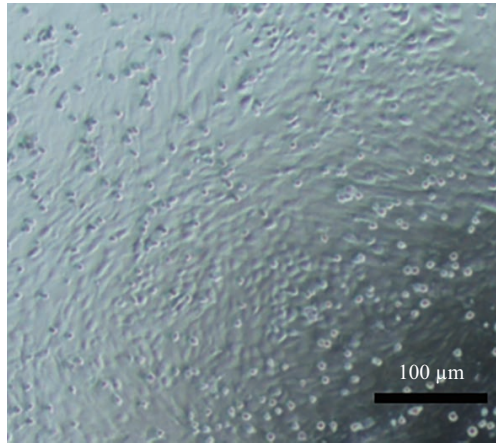
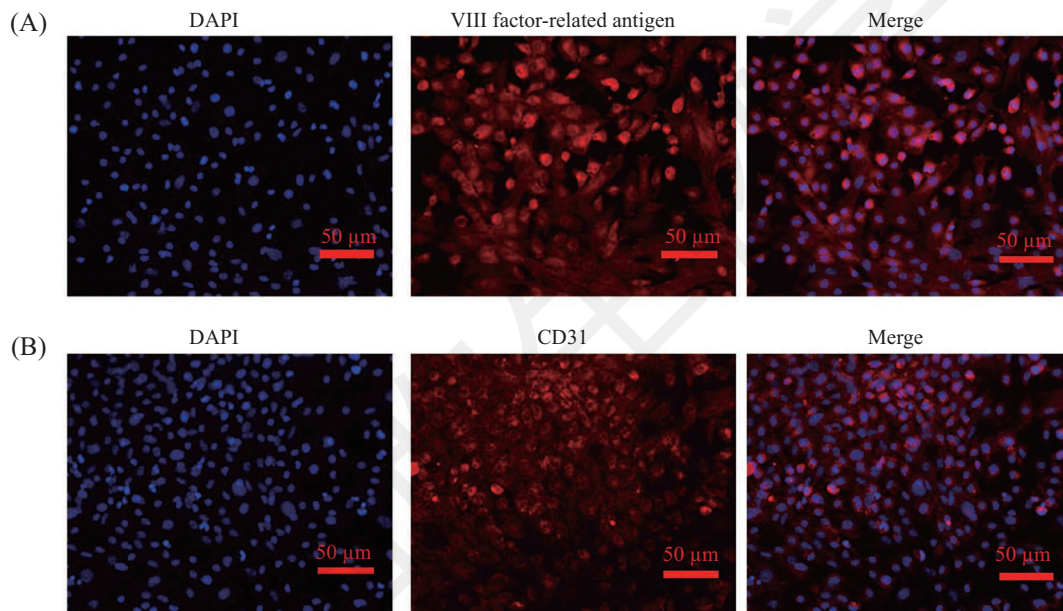


图1 原代培养的小鼠肺血管内皮细胞在倒置显微镜下观察的细胞鹅卵石样生长  
**Fig.1 Cobblestone-like growth of cells observed in primary cultured mouse pulmonary vascular endothelial cells under an inverted microscope**



A: VIII因子相关抗原鉴定结果; B: CD31抗原免疫荧光鉴定结果。

A: cells identification for VIII factor-related antigen; B: cell identification for CD31 antigen.

图2 细胞荧光鉴定结果

**Fig.2 Cytofluorescence identification result**

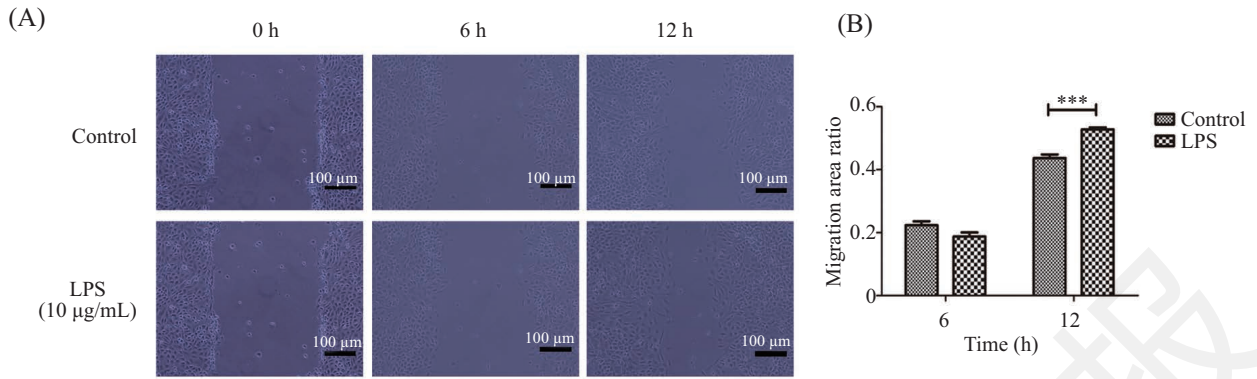
种成熟的和不成熟的血管内皮细胞标记物<sup>[13]</sup>。荧光显微镜下观察发现,培养的新生小鼠肺血管内皮细胞可见红色荧光(图2)。

#### 2.4 LPS能促进小鼠肺血管内皮细胞的迁移

在划痕实验中, LPS能促进肺血管内皮细胞的迁移(图3)。与空白对照组相比, LPS组在6 h的迁移面积比与对照组相比没有统计学差异( $P>0.05$ ); 在12 h时, LPS与对照组相比迁移面积比具有统计学差异( $P<0.05$ , 图3)。这说明, LPS(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )作用于细胞后, 在12 h时能促进肺血管内皮细胞迁移。

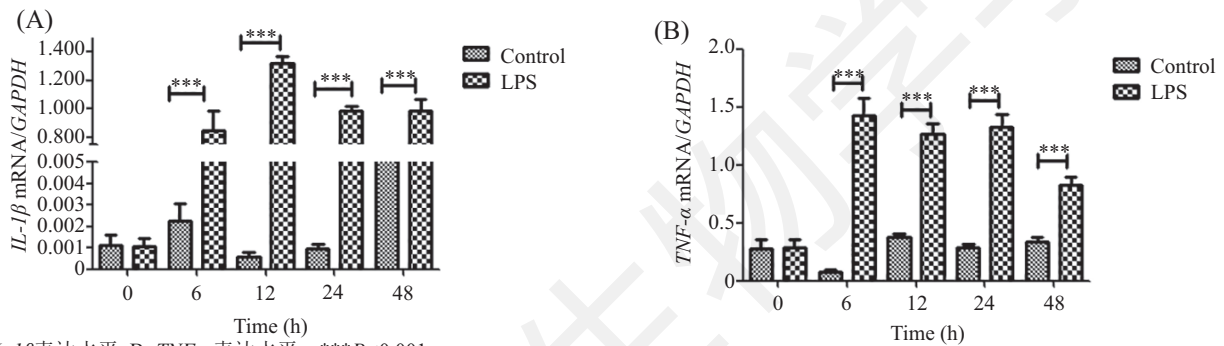
#### 2.5 肺血管内皮细胞炎性细胞因子mRNA表达的变化

IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 是由多种类型细胞产生的重要细胞因子, 其中活化的单核细胞、肺上皮细胞和血管内皮细胞是其主要来源, 在BPD的发展中起着重要的作用。我们的研究结果发现, LPS组的IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA水平在6 h、12 h、24 h、48 h均较对照组明显升高( $P<0.001$ )(图4A)。其中IL-1 $\beta$ 在12 h达到高峰后有所下降但仍高于对照组(图4B)。而TNF- $\alpha$ 在6 h后持续高表达, 并且



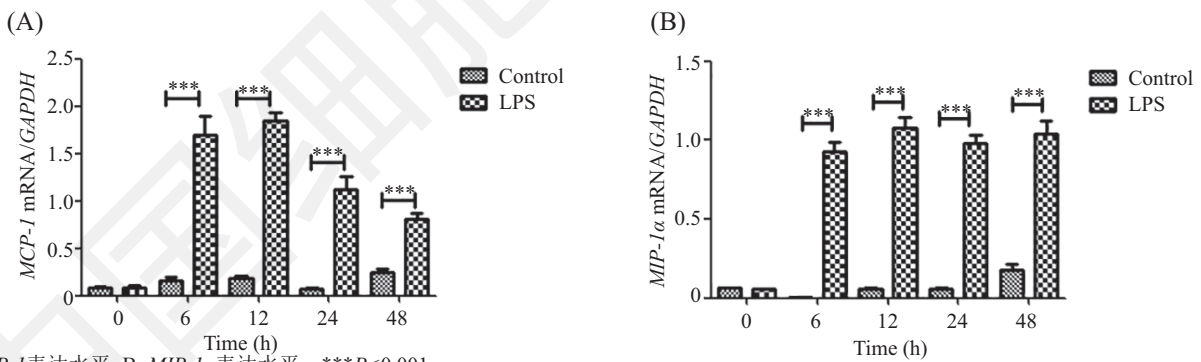
A: 在倒置显微镜下观察细胞的迁移; B: A图的统计分析,  $***P < 0.001$ 。  
A: observing cell migration under an inverted microscope; B: the statistic analysis of A,  $***P < 0.001$ .

图3 LPS对肺血管内皮细胞迁移的影响  
Fig.3 Effect of LPS on migration of pulmonary vascular endothelial cells



A: *IL-1β*表达水平; B: *TNF-α*表达水平。  $***P < 0.001$ 。  
A: the expression level of *IL-1β*; B: the expression level of *TNF-α*.  $***P < 0.001$ .

图4 肺血管内皮细胞分泌的炎症细胞因子的变化  
Fig.4 Changes of inflammatory cytokines secreted by pulmonary vascular endothelial cells



A: *MCP-1*表达水平; B: *MIP-1α*表达水平。  $***P < 0.001$ 。  
A: the expression level of *MCP-1*; B: the expression level of *MIP-1α*.  $***P < 0.001$ .

图5 肺血管内皮细胞分泌的趋化因子的变化  
Fig.5 Changes in chemokines secreted by pulmonary vascular endothelial cells

在48 h有所下降但高于对照组。这说明, LPS能刺激肺血管内皮细胞加强分泌炎症细胞因子IL-1β和TNF-α。

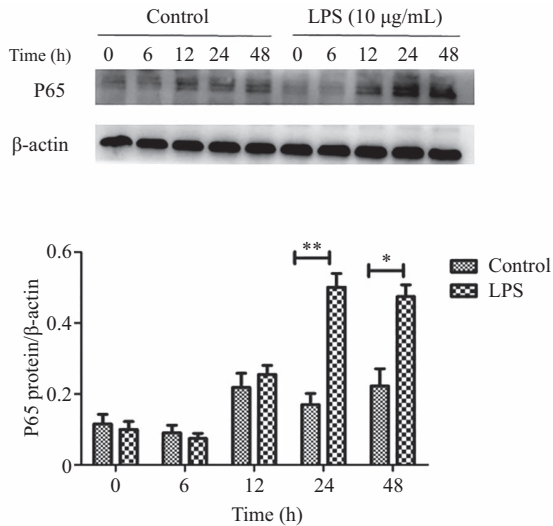
### 2.6 肺血管内皮细胞趋化因子mRNA表达的变化

RT-PCR结果显示, LPS组 *MIP-1α*、*MCP-1*在0 h较对照组均无明显变化( $P > 0.05$ ), 而在6 h、12 h、

24 h、48 h均显著升高( $P < 0.001$ ), 其中*MCP-1*在12 h达到高峰后有所下降但仍高于对照组(图5)。提示在LPS可刺激肺内皮细胞表达*MIP-1α*、*MCP-1*。

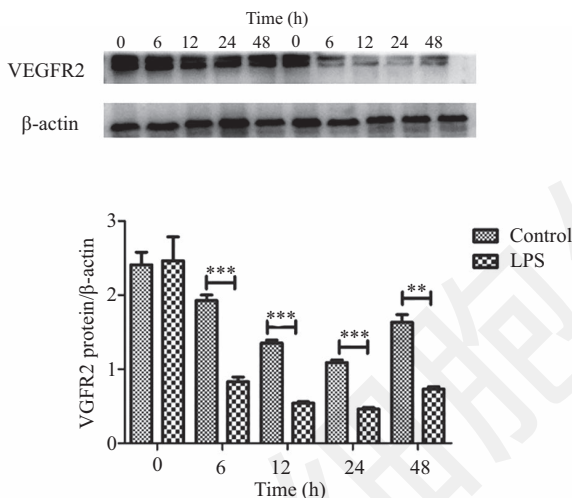
### 2.7 肺血管内皮细胞中NF-κB活性相关蛋白P65表达变化

NF-κB最普遍的活化形式就是由P50或P52



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

图6 肺血管内皮细胞 NF- $\kappa$ B 相关蛋白 P65 的表达  
Fig.6 Expression of NF- $\kappa$ B-related protein P65 in pulmonary vascular endothelial cells



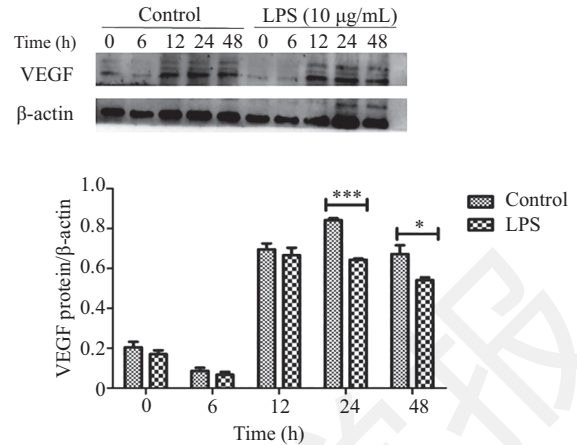
\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图8 肺血管内皮细胞 VEGFR2 蛋白表达  
Fig.8 Expression of VEGFR2 protein in pulmonary vascular endothelial cells

和 P65 组成的异二聚体<sup>[15]</sup>。Western blot 结果显示, LPS 组 NF- $\kappa$ B 活性在 0 h 和 6 h 较对照组无明显改变 ( $P > 0.05$ ), 而在 12 h、24 h、48 h 较对照组升高, 其中 24 h 和 48 h 的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。这提示, LPS 可使 NF- $\kappa$ B 的活性升高。

## 2.8 肺血管内皮细胞中 VEGF 和 VEGFR2 蛋白分子的变化

VEGF/VEGFR2 信号驱动出生后肺血管的生成。Western blot 检测结果显示: LPS 组 VEGF 蛋白表达量在 0 h、6 h、12 h 较对照组无明显改变 ( $P > 0.05$ ), 而在 24 h、48 h 明显降低 ( $P < 0.05$ ); VEGFR2 蛋白表



\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图7 肺血管内皮细胞 VEGF 蛋白表达  
Fig.7 Expression of VEGF protein in pulmonary vascular endothelial cells

达量在 6 h、12 h、24 h、48 h 显著降低 ( $P < 0.001$ ) (图 7 和图 8)。这说明, LPS 刺激肺内皮细胞可抑制 VEGF 和 VEGFR2 的表达, 且 VEGFR2 早于 VEGF 被抑制。

## 3 讨论

肺脏是肺血管内皮细胞含量最为丰富的器官<sup>[17]</sup>, 肺血管内皮细胞在病理条件下, 不仅是炎症反应的主要靶细胞<sup>[18]</sup>, 更是活跃的炎症细胞和效应细胞。其功能和结构的完整性对于维持正常肺功能至关重要, 这种特殊的细胞类型是研究肺功能不全、细胞分子机制及许多肺部疾患的理想细胞来源<sup>[19]</sup>。因此, 分离培养纯度高的肺血管内皮细胞是研究的关键。国内分离肺血管内皮细胞多采用贴壁分离法, 但此方法获得的细胞数量少, 且细胞分布不均匀, 很难形成单层细胞, 培养周期过长。本研究借鉴 Lou 等<sup>[17]</sup>和 Kim 等<sup>[18]</sup>分离方法并加以改进, 用酶消化法结合差速贴壁法分离培养肺血管内皮细胞。由于成年的小鼠的肺血管内皮细胞处于静止状态<sup>[20]</sup>, 并且几乎不增殖, 因此我们选择新生的小鼠来分离肺血管内皮细胞。本研究采用了一种新的方法成功分离培养了小鼠肺血管内皮细胞, 并且发现该方法简单经济, 避免了血管内皮细胞生长因子的使用, 应用抗菌素减少了细胞的污染, 提高了成功率, 经过分离培养得到的肺血管内皮细胞具有纯度较高、稳定性较好、增殖能力较强的特点。

肺泡简单化和肺血管发育平衡紊乱是 BPD 突出的病理特征<sup>[21]</sup>。有研究提出了 BPD 发病的“血管假

说<sup>[22]</sup>, 认为血管发育紊乱与肺泡发育紊乱是导致BPD发生的原因。生物学研究表明, 肺血管内皮细胞在血管生成及炎症反应中具有重要的生物学功能<sup>[22]</sup>。早期的血管生成和血管结构的形成需要内皮细胞的激活、增值、迁移和分化<sup>[23]</sup>。如果血管内皮细胞受到影响, 那么血管发育过程会发生异常导致功能发生改变。炎症是BPD的重要影响因素, 脂多糖能诱发强烈的炎症反应, 进一步研究发现, LPS影响肺血管内皮细胞对BPD的发病具有重要的意义。

产前感染可使胎儿暴露于多种炎症因子和异常生长因子中, 从而扰乱肺泡分隔和血管发育过程, 是导致早产儿BPD的最主要原因, 而细胞因子在炎症反应的启动和持续过程中发挥着至关重要的作用<sup>[24]</sup>。NF- $\kappa$ B在血管调节中具有重要的作用, 其调控的许多炎症因子能强有力地刺激血管生成。我们的结果发现, LPS刺激肺血管内皮细胞后能诱导NF- $\kappa$ B活性升高, 并且导致IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 表达均明显升高。有研究发现, 趋化因子MCP-1和MIP-1 $\alpha$ 与血管生成有关<sup>[14]</sup>, 并且MIP-1 $\alpha$ 和MCP-1产生的血管有别于正常的肺血管, 表现为肺微血管显著扩展, 与肺泡上皮失去紧密连接, 可见于患有BPD的人类婴儿肺组织中。同时研究表明, IL-1 $\beta$ 影响新生儿肺泡隔及毛细血管的发育<sup>[25]</sup>, 还能和TNF- $\alpha$ 发生协同作用, 增加血管内皮通透性导致炎症因子向肺间质的扩散, 引起并加重肺损伤<sup>[26]</sup>。炎症介质LPS和IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 可激活NF- $\kappa$ B, 启动细胞的免疫应答, 同时NF- $\kappa$ B的活化可增强IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的基因转录使IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的产生与释放增多, 导致炎症信号放大, 产生炎症瀑布反应, 加重细胞的损伤。因此, 我们推测, 炎症介导的异常血管的形成扰乱了正常气道和血管之间的关系, 并且炎症因子对肺血管内皮细胞的进一步损伤导致内皮细胞屏障功能受损, 这可能是BPD的发病机制。

同时我们的研究发现, 炎症刺激肺血管内皮细胞时并没有VEGF及VEGFR2的表达升高, 反而抑制了VEGF及VEGFR2的表达。VEGF在肺泡微血管的形成中具有重要的调节作用, VEGF通过结合VEGFR2驱动生后生理性血管的形成在生后肺血管发育过程中具有重要的作用<sup>[8]</sup>。在以往的研究中发现, BPD患者中的VEGF减少<sup>[27]</sup>, 增强VEGF信号可挽救高氧导致的肺泡损害。在新生大鼠高氧BPD模型中, VEGF及其受体VEGFR2表达降低<sup>[28]</sup>, 说明BPD

病理情况下生理性血管形成受损。这种血管生成与上皮细胞分泌的VEGF无关, 表现为肺毛细血管与气道上皮失去紧密连接, 这将增加氧气空间和毛细血管间的距离, 产生气体交换障碍, 其中异常的血管可在BPD患者中被观察到。以上研究说明, 炎症可通过抑制VEGF/VEGFR2的表达, 使生理性血管生成受阻。

综上所述, 我们推论, 肺部BPD的发生机制可能是通过激活NF- $\kappa$ B通路来增强炎症介质表达, 下调VEGF/VEGFR2抑制生理性血管的发育, 刺激病理血管形成的。炎症刺激的血管生长独立于VEGF诱导的血管形成, VEGF介导的肺血管形成与上皮细胞紧密连接, 是肺发育的正确选择, 但在BPD病理条件下, VEGF的表达反而降低, 肺血管形成将与气道上皮失去紧密的连接, 肺血管重塑脱离常规, 产生气体交换的潜在障碍, 引起BPD的病理改变。因此, 进一步了解病理情况下肺毛细血管形成分子机制可以阐明BPD血管和肺泡发育改变的过程。炎症对细胞因子等的调控机制还不确定, 可在未来的实验中进一步进行验证。

## 参考文献 (References)

- 1 Vosdoganes P, Lim R, Moss TJ, Wallace EM. Cell therapy: a novel treatment approach for bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 2012; 130(4): 727-37.
- 2 Jain D, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia: clinical perspective. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2014; 100(3): 134-44.
- 3 Bose CL, Dammann CE, Laughon MM. Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008; 93(6): F455-61.
- 4 Speer CP. Pulmonary inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *J Perinatol* 2006; 26 Suppl 1: S57-62.
- 5 Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* 1996; 97(2): 210-5.
- 6 Lu A, Sun B, Qian L. Combined iNO and endothelial progenitor cells improve lung alveolar and vascular structure in neonatal rats exposed to prolonged hyperoxia. *Pediatr Res* 2015; 77(6): 784-92.
- 7 Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 2003; 101: 3765-77.
- 8 Shimotake J, Derugin N, Wendland M, Vexler ZS, Ferriero DM. Vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibition promotes cell death and limits endothelial cell proliferation in a neonatal rodent model of stroke. *Stroke* 2010; 41(2): 343-9.
- 9 Ambalavanan N, Novak ZE. Peptide growth factors in tracheal

- aspirates of mechanically ventilated preterm neonates. *Pediatr Res* 2003; 53(2): 240-4.
- 10 Hasan J, Beharry KD, Valencia AM, Strauss A, Modanlou HD. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in tracheal aspirate fluid of preterm neonates at birth may be predictive of bronchopulmonary dysplasia/chronic lung disease. *Pediatrics* 2009; 123(6): 1541-7.
- 11 Chen Y, McCarron RM, Golech S, Bembry J, Ford B, Lenz FA, *et al.* ET-1 and NO-mediated signal transduction pathway in human brain capillary endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284(2): C243-9.
- 12 Ulger H, Karabulut AK, Pratten MK. Labelling of rat endothelial cells with antibodies to vWF, RECA-1, PECAM-1, ICAM-1, OX-43 and ZO-1. *Anat Histol Embryol* 2002; 31(1): 31-5.
- 13 Kato R, Mizuno S, Kadowaki M, Shiozaki K, Akai M, Nakagawa K, *et al.* Sirt1 expression is associated with CD31 expression in blood cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2016; 17(1): 139.
- 14 Miller JD, Benjamin JT, Kelly DR, Frank DB, Prince LS. Chorioamnionitis stimulates angiogenesis in saccular stage fetal lungs via CC chemokines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 298(5): L637-45.
- 15 Lin HL, Shen KP, Chang WT, Lin JC, An LM, Chen IJ, *et al.* Eugenosedin-A prevents high-fat diet increased adhesion molecules through inhibition of MAPK- and p65-mediated NF- $\kappa$ B pathway in rat model. *J Pharm Pharmacol* 2013; 65(2): 300-9.
- 16 Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, *et al.* Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000; 96(1): 34-40.
- 17 Lou JN, Mili N, Decrinch C, Donati Y, Kossodo S, Spiliopoulos A, *et al.* An improved method for isolation of microvascular endothelial cells from normal and inflamed human lung. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998; 4(7): 529-36.
- 18 Kim NS, Kim SJ. Isolation and cultivation of microvascular endothelial cells from rat lungs: effects of gelatin substratum and serum. *Yonsei Med J* 1991; 32(4): 303-14.
- 19 杨红, 斯琴, 孙仁宇. 肺血管内皮细胞在大鼠急性损伤发生中的作用. *中国病理生理杂志(Yang Hong, Si Qin, Sun Renyu. Chinese Journal of Pathophysiology)* 2000; 16(9): 831-4.
- 20 陈斌, 陈余清, 蔡映云. 抗血管生成治疗肿瘤研究的进展. *国外医学, 内科学分册*. 广州: 中山大学出版社, 2006, 290-4.
- 21 Baker CD, Abman SH. Impaired pulmonary vascular development in bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology* 2015; 107(4): 344-51.
- 22 Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia: "a vascular hypothesis". *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(10 Pt 1): 1755-6.
- 23 Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386(6626): 671-4.
- 24 陈晓斌. 细胞因子在早产儿支气管肺发育不良中的研究现状. *浙江医学(Chen Xiaosa. Zhejiang Medical Journal)* 2018; 40(3): 307-9.
- 25 Bry K, Whitsett JA, Lappalainen AU. IL-1 disrupts postnatal lung morphogenesis in the mouse. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36(1): 32-42.
- 26 Wu MF, Chen ST, Yang AH, Lin WW, Lin YL, Chen NJ, *et al.* CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages. *Blood* 2013; 121(1): 95-106.
- 27 Bhatt AJ, Pryhuber GS, Huyck H, Watkins RH, Metlay LA, Maniscalco WM. Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(10 Pt 1): 1971-80.
- 28 Thébaud B, Ladha F, Michelakis ED, Sawicka M, Thurston G, Eaton F, *et al.* Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation* 2005; 112(16): 2477-86.