

重组人 β 防御素 -2 基因对支气管肺发育不良新生鼠肺泡及肺血管发育的影响

杨娇娇 陈翠娥 孙媛媛 郭金余 狄天伟 张希希

【摘要】 目的 研究重组人 β 防御素 -2(human β defensin-2, hBD2)对高氧诱导支气管肺发育不良(BPD)新生鼠肺泡及肺血管发育的影响。方法 将 48 只新生 SD 大鼠随机分为空气组、高氧组、空载体组和 hBD2 组,每组 12 只。大鼠暴露于 90%高氧箱内 14d 建立 BPD 模型,hBD2 组于第 4 天气管穿刺注入 1×10^7 /ml 含有 hBD2 编码基因的重组腺病毒 25 μ l,空载体组注入等量空载体腺病毒。于第 7、14 天采集肺组织标本,qPCR 检测肺组织 hBD2 mRNA 表达;比较各组大鼠肺组织形态学变化,测定肺泡辐射状计数(RAC)和平均内衬间隔(MLI);免疫组化测定肺组织血管内皮生长因子(VEGF)表达,ELISA 法测定肺组织炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 表达水平。结果 梯度稀释法测定病毒滴度为 1×10^9 /ml,用稀释液稀释 100 倍得到 1×10^7 /ml。在大鼠出生后第 7、14 天,与 hBD2 组比较,空气组、高氧组、空载体组大鼠 hBD2 mRNA 表达水平均明显为低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);第 7、14 天,高氧组和空载体组大鼠的 RAC、MLI、AOD 值、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 的表达水平与空气组、hBD2 组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。HE 染色及免疫组化染色结果显示高氧暴露后大鼠肺泡及肺血管发育受阻,hBD2 组大鼠肺泡和肺血管发育改善。结论 hBD2 基因治疗可促进高氧诱导 BPD 新生鼠的肺泡及肺血管发育,并减轻肺部炎症。

【关键词】 人 β 防御素 -2 支气管肺发育不良 高氧 肺泡 血管内皮生长因子 炎症

Effects of recombinant human β defensin-2 gene on alveoli and pulmonary vascular development in bronchopulmonary dysplasia newborn rats YANG Jiaojiao, CHEN Cuie, SUN Yuanyuan, et al. Department of Pediatrics, the People's Hospital of Cangnan, Wenzhou 325800, China

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of recombinant human β defensin-2 (hBD2) on alveoli and pulmonary vascular development in hyperoxia induced bronchopulmonary dysplasia (BPD) newborn rats. Methods Newborn SD rats were randomly divided into air group, O₂ group, O₂+Ad group and O₂+Ad-hBD2 group, each group containing 12 rats. The newborn rats were exposed to 90% hyperoxia for 14 days to establish the BPD model. The rats in O₂+Ad-hBD2 group were injected with 1×10^7 /ml recombinant hBD2 gene 25 μ l through intratracheal puncture on P4, and the rats in O₂+Ad group were injected with the same amount of adenovirus. Lung tissue samples were collected on P7 and P14, and the expression of hBD2 mRNA in lung tissues was detected by qPCR. Lung tissue morphology were compared, and the radical alveolar count (RAC) and mean linear Intercept (MLI) were determined. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression were determined by immunohistochemical and ELISA method for determination of lung tissue inflammation factor TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 levels. Results hBD2 mRNA expression levels were significantly lower in air group, O₂ group and O₂+Ad group than that in O₂+Ad-hBD2 group on P7 and P14(all $P < 0.05$). The expression of RAC, MLI, VEGF(AOD), TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in air group and O₂+Ad-hBD2 group were different significantly from that in O₂ group and O₂+Ad group on P7 and P14(all $P < 0.05$). HE staining and immunohistochemical staining results showed that alveoli and pulmonary vascular development were obstruction after exposed to 90% hyperoxia, but alveoli and pulmonary vascular development improved in O₂+Ad-hBD2 group. Conclusion hBD2 gene therapy

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.22.2019-2601

基金项目:温州市科技局项目(Y20180234);温州市科技局项目(Y20140497)

作者单位:325800 温州,苍南县人民医院儿科(杨娇娇、郭金余);义乌市妇幼保健院新生儿科(陈翠娥);温州医科大学附属第一医院儿科(孙媛媛);浙江大学医学院附属儿童医院新生儿科(狄天伟);玉环市人民医院儿科(张希希)

通信作者:孙媛媛,E-mail:61132318@qq.com

can promote the development of alveoli and pulmonary vascular in hyperoxic induced BPD, and reduced pulmonary inflammation.

【Key words】 Human β defensin-2 Bronchopulmonary dysplasia Hyperoxia Alveoli Vascular endothelial growth factor Inflammation

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是极低和超低出生体重儿最常见的并发症, 主要表现为肺泡和肺血管发育受限^[1], 近年来发病率逐年升高^[2]。BPD 预后差, 患儿容易发生肺部感染、肺动脉高压, 并影响神经系统及生长发育^[3-5]。目前 BPD 的治疗措施有限, 因此, 寻找预防和治疗 BPD 的方法至关重要。 β 防御素-2 (β defensin-2, BD2) 是抗菌肽的一员, 具有广谱抗菌活性, 主要表达于呼吸道、皮肤及泌尿生殖道的黏膜上皮细胞^[6], 可诱导、募集炎症因子和免疫细胞, 并影响细胞增殖和分化。人 β 防御素-2 (human β defensin-2, hBD2) 在急性肺损伤、肺部感染、肺囊性纤维化、慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 等肺部疾病中发挥重要作用^[7-10], 并可通过抑制炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 的表达, 保护绿脓杆菌引起的肺损伤^[11]。本实验通过建立高氧致 BPD 动物模型, 并将重组 hBD2 基因转染至新生鼠肺组织, 进一步探讨 hBD2 对 BPD 肺泡及肺血管发育的影响, 为 BPD 治疗提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SD 成年大鼠购自上海实验动物中心 [SCXK(沪)2012-0002], 以雌雄比 2:1 配比合笼交配直到自然生产。本实验对象即为自然生产的新生 SD 大鼠, 共 48 只, 体重 6~7g。

1.2 主要仪器和试剂 氧舱自动控制系统 (温州医科大学机能实验中心), 24h HBO-2B 型控氧仪 (浙江建德梅城电化分析仪器厂), 测氧装置 (德国 Envite C-Wismar 公司), 二氧化碳检测仪 (德国 Envite C-Wismar 公司), TG radiant Thermoblock PCR 扩增仪 (德国 Biometra 公司), 腺病毒载体 GV135 (上海吉凯基因公司), E.coli DH5 α 感受态菌株 (上海吉凯基因公司), Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司), 293T 细胞 (上海吉凯基因公司), 戊巴比妥钠 (浙江美谷生物科技有限公司), 4% 多聚甲醛 (浙江美谷生物科技有限公司), PBS (浙江美谷生物科技有限公司), Trizol 裂解液 (浙江美谷生物科技有限公司), 3% 过氧化氢溶液 (浙江美谷生物科技有限公司), 血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 免疫组化试剂盒一抗 (美国 Abcam 公司), 二抗 PV9001 兔鼠通用二抗试剂盒

(北京中杉金桥生物技术有限公司), 二氨基联苯胺显色液 (DAB) (北京中杉金桥生物技术有限公司), TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 ELISA 检测试剂盒 (广州瑞生科技公司)。
1.3 动物模型建立及分组 将 48 只大鼠按随机数字表法分为空气组、高氧组、空载体组和 hBD2 组 4 组, 每组 12 只。空气组置于 21% 氧浓度的空气中, 其他组均置于氧浓度 90% 的高氧箱内 14d。hBD2 组经气管穿刺气管腔内注入含有 1×10^7 /ml hBD2 和编码基因的重组腺病毒 25 μ l; 空载体组注入等量对照腺病毒 (不含 hBD2 编码基因)。室温控制在 20~25 $^{\circ}$ C, 给予动物 12h 光照/12h 黑暗交替的环境, 每日开箱 1h, 称重、观察大鼠状态及更换代乳鼠。

1.4 hBD2 重组腺病毒载体构建 hBD2 基因引物按照分子克隆实验指南设计, 并在上下游引物的 5' 分别引入 BamHI/AgeI 酶切位点, 引物序列为: 上游引物: 5'-AGGTCGACTCTAGAGGATCCCGCCACCATGAGGGTC-TTGATATCTC-3', 下游引物: 5'-TCCTTGTAGTCCATAC-CTGGCTTTTTGTCAGCATTTTG-3', 以质粒或菌液为模板进行 PCR 扩增, 获得全长 236bp 的 hBD2 cDNA。将 hBD2 cDNA 片段用连接到具有绿色荧光蛋白 (GFP) 标记的线性腺病毒载体 GV135 上, 转化进 E.coli DH5 α 感受态菌株中, 筛选阳性克隆, 抽提质粒后用 BamHI/AgeI 双酶切鉴定并测序, 得到正确质粒。使用 Lipofectamine 2000 将表达 hBD2 的腺病毒载体和腺病毒包装质粒混合并共同转染到 293T 细胞, 荧光显微镜观察 GFP 的表达评估转染效率, 10~15d 后低速离心收集细胞并重悬, -80 $^{\circ}$ C/37 $^{\circ}$ C 反复冻融, 振荡 3 次, 4 $^{\circ}$ C、7 000r/min 离心收集病毒上清液, 采用梯度稀释法测定病毒滴度。

1.5 标本采集 分别于大鼠出生后第 7、14 天, 每组随机取 6 只大鼠, 1% 戊巴比妥钠 0.01~0.02ml/g 腹腔注射麻醉, 依次切开胸前皮肤, 钝性分离皮下组织、肌肉, 切断肋骨, 打开胸腔, 暴露肺组织, 结扎右侧支气管, 以 4% 多聚甲醛灌注左肺, 浸入 4% 多聚甲醛固定, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 用作肺组织形态学分析及免疫组化, 将右肺置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 用作肺组织 qPCR 及 ELISA 检测。

1.6 肺组织 hBD2 mRNA 表达水平检测 采用 qPCR 法。取 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中冻存的大鼠肺组织约 100 μ g, Trizol 裂解液提取肺组织总 RNA, 逆转录获得 cDNA, 再置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。采用 7 500 RT-PCR 系统 SDS 软

件,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 hBD2 mRNA 表达水平,结果取平均值。

1.7 肺组织形态学观察 4%多聚甲醛固定 24h 后,切取左肺中叶,乙醇溶液梯度脱水,石蜡包埋,制作 4~5 μ m 切片,经 HE 染色后观察肺组织形态。光镜下摄片,按照文献的方法,测定肺泡辐射状计数(radial alveolar count,RAC)^[12]和平均内衬间隔(the mean linear intercept,MLI)^[13]。

1.8 肺组织 VEGF 表达水平检测 采用免疫组化法。肺组织切片脱蜡,抗原修复,3%过氧化氢溶液处理,血清封闭,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜(浓度为 1:100),PBS 冲洗后加入二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 50min,DAB 显色,中性树脂封片,镜下观察。用 PBS 替代一抗作阴性对照。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行分析,计算每个视野内的染色区域的平均光密度(AOD)值,来反映 VEGF 表达水平。

1.9 肺组织 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IL-10 表达水平检测 采用 ELISA 法。称量组织块 100mg,加入预冷的 0.9%氯化钠溶液 0.9ml,剪碎组织块后倒入匀浆器中制备 10%的组织匀浆,低温低速离心 15min,取 500 μ l 的上清液备用,按照试剂盒说明书操作测定各炎症因子表达水平。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组 hBD2 基因构建评估及病毒滴度测定 hBD2 基因转染 24h 后即可在荧光显微镜下观察到带有绿色荧光的 293T 细胞,见图 1(插页),梯度稀释法测定病毒滴度为 1×10^9 /ml,用稀释液稀释 100 倍得到 1×10^7 /ml。

2.2 4 组大鼠肺组织 hBD2 mRNA 表达水平比较 在大鼠出生后第 7、14 天,与 hBD2 组比较,空气组、高氧组、空载体组大鼠 hBD2 mRNA 表达水平均明显为低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 1。

表 1 4 组大鼠肺组织 hBD2 mRNA 表达水平比较

组别	n	第 7 天	第 14 天
空气组	6	0.36 \pm 0.07*	0.56 \pm 0.19*
高氧组	6	0.33 \pm 0.04*	0.48 \pm 0.20*
空载体组	6	0.32 \pm 0.05*	0.56 \pm 0.07*
hBD2 组	6	0.56 \pm 0.08	2.91 \pm 1.11
F 值	-	19.22	27.46
P 值	-	<0.05	<0.05

注:与 hBD2 组比较,* $P<0.05$

2.3 4 组大鼠肺泡发育情况比较 肺组织形态学显示,随日龄增加,空气组大鼠肺组织发育逐渐成熟,肺泡明显增多;高氧组及空载体组第 7 天即可观察到肺泡简单化,即表现为肺泡壁变薄,部分肺泡融合,第 14 天时肺发育受阻现象更加明显,肺泡腔扩大,数目减少,结构紊乱,而 hBD2 组肺泡发育受阻不明显,见图 2(插页)。第 7、14 天,高氧组和空载体组大鼠的 RAC 和 MLI 与空气组、hBD2 组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 2。

表 2 4 组大鼠肺组织 RAC 及 MLI 比较

组别	n	RAC(个)		MLI(μ m)	
		第 7 天	第 14 天	第 7 天	第 14 天
空气组	6	7.70 \pm 1.52	10.12 \pm 2.69	55.58 \pm 1.43	41.58 \pm 7.35
高氧组	6	4.91 \pm 1.49* Δ	6.03 \pm 1.36* Δ	71.77 \pm 3.39* Δ	72.08 \pm 2.41* Δ
空载体组	6	4.52 \pm 1.38* Δ	6.28 \pm 1.05* Δ	72.08 \pm 4.01* Δ	73.67 \pm 3.56* Δ
hBD2 组	6	6.55 \pm 1.71	2.33 \pm 0.95	57.02 \pm 1.87	47.83 \pm 3.31
F 值	-	5.67	8.93	59.32	77.96
P 值	-	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与空气组比较,* $P<0.05$;与 hBD2 组比较, $\Delta P<0.05$

2.4 4 组大鼠肺组织 VEGF 表达水平比较 肺组织 VEGF 免疫组化染色后显示 VEGF 主要表达于肺泡上皮及肺间隔,随大鼠日龄增长,空气组大鼠肺组织 VEGF 表达量逐渐增加,高氧组及空载体组大鼠肺组织 VEGF 表达量无增加,见图 3(插页)。第 7、14 天,高氧组和空载体组大鼠肺组织中 AOD 值均明显低于空气组和 hBD2 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 3。

表 3 大鼠肺组织 AOD 值比较

组别	n	第 7 天	第 14 天
空气组	6	0.16 \pm 0.007	0.19 \pm 0.006
高氧组	6	0.11 \pm 0.009* Δ	0.11 \pm 0.007* Δ
空载体组	6	0.11 \pm 0.007* Δ	0.12 \pm 0.006* Δ
hBD2 组	6	0.15 \pm 0.007	0.17 \pm 0.017
F 值	-	72.19	75.63
P 值	-	<0.05	<0.05

注:与空气组比较,* $P<0.05$;与 hBD2 组比较, $\Delta P<0.05$

2.5 4 组大鼠肺组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 表达水平比较 第 7、14 天,高氧组和空载体组肺组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达明显高于空气组和 hBD2 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);第 7、14 天,高氧组、空载体组、hBD2 组肺组织 IL-10 表达高于空气组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 4。

3 讨论

早产儿尤其是极早早产儿出生时肺发育尚未成熟,

表 4 4 组大鼠肺组织炎症因子表达水平比较(pg/ml)

组别	n	TNF- α		IL-1 β		IL-6		IL-10	
		第 7 天	第 14 天	第 7 天	第 14 天	第 7 天	第 14 天	第 7 天	第 14 天
空气组	6	261.76 \pm 21.62	246.36 \pm 23.89	4746.25 \pm 1720.89	4633.46 \pm 1758.74	94.60 \pm 4.12	90.45 \pm 6.45	62.89 \pm 4.04	58.92 \pm 4.36
高氧组	6	335.18 \pm 9.99 ^{*Δ}	357.03 \pm 13.70 ^{*Δ}	8837.10 \pm 1205.90 ^{*Δ}	9854.68 \pm 967.92 ^{*Δ}	108.80 \pm 9.91 ^{*Δ}	114.83 \pm 8.31 ^{*Δ}	86.13 \pm 5.38 ^{*Δ}	96.71 \pm 3.43 ^{*Δ}
空载体组	6	333.11 \pm 13.82 ^{*Δ}	356.58 \pm 12.74 ^{*Δ}	8078.48 \pm 1205.90 ^{*Δ}	9830.86 \pm 661.58 ^{*Δ}	113.58 \pm 9.69 ^{*Δ}	117.15 \pm 9.46 ^{*Δ}	84.15 \pm 5.42 ^{*Δ}	98.65 \pm 4.74 ^{*Δ}
hBD2 组	6	278.33 \pm 40.15	224.00 \pm 15.40	3183.00 \pm 335.50	4507.65 \pm 1706.35	95.01 \pm 9.69	90.71 \pm 7.21	108.47 \pm 6.67 ^{**}	132.88 \pm 6.91 ^{**Δ}
F 值	-	14.33	93.90	29.05	30.14	9.87	20.55	69.66	86.58
P 值	-	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与空气组比较,* P <0.05,** P <0.01;与 hBD2 组比较, ΔP <0.05

处于小管期和囊管期,肺泡气体交换功能严重受阻,因此,早期的高浓度吸氧或机械通气对于维持早产儿的生存是必需的。但是高浓度吸氧或机械通气在改善了早产儿存活率的同时,亦使得 BPD 发病率逐年升高^[2]。BPD 预后差,容易继发肺部感染、肺动脉高压,同时影响早产儿神经系统发育及生长发育。

防御素为富含半胱氨酸的阳离子蛋白质,包含 16~50 个氨基酸,属于抗菌肽家族,广泛存在于人体皮肤和黏膜上皮细胞中,并在抵御病原微生物、介导获得性免疫应答、调节机体免疫反应及抗肿瘤等方面发挥重要作用。hBD2 是第 1 个发现的可诱导表达的抗菌肽,其可通过破坏细菌磷脂膜的完整性,改变磷脂酶渗透性从而发挥直接灭菌作用^[11];局部组织发生炎症反应时,hBD2 表达增加,继而募集中性粒细胞来清除病原体,同时刺激树突状细胞和记忆性 T 细胞的趋化作用,进一步发挥免疫调节和抗炎作用^[14]。研究发现,急性肺损伤大鼠模型肺组织 hBD2 的表达增加,其表达量与 TNF- α 的表达水平成正相关,提示 hBD2 对急性肺损伤具有保护作用^[7]。在肺部感染模型中,外源性 hBD2 可上调抑炎因子 IL-4、IL-10 和 IL-13 表达,并下调促炎因子 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-5、IL-6、IL-8、IL-18 和 TNF- α 表达,证实了 hBD2 可通过调节肺部炎症反应,从而改善肺部感染^[12,14-15]。Stamer 等^[16]研究发现早产儿肺组织 hBD2 表达量少,而足月儿肺组织 hBD2 表达量明显增加,提示 hBD2 可作为肺发育不成熟的指标之一。

炎症是 BPD 发生、发展的主要原因之一,当不成熟的肺暴露于高氧环境时,肺部炎症反应增强,炎性细胞浸润,影响肺泡和肺血管发育,最终导致 BPD。临床研究表明,患 BPD 的风险与血清中高水平和持续表达的多种炎症介质相关^[17]。Köksal 等^[18]检测了 102 例早产儿血清和支气管肺泡灌洗液中炎症因子水平,显示 BPD 患儿血清和支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 均高于非 BPD 患儿,说明上述细胞因子在 BPD 发病中

可能起到关键作用。Oncel 等^[19]发现 TNF- α 抑制剂依那西普能改善高氧暴露的鼠肺损伤,促进肺泡成熟,抑制炎症反应,并减轻氧化应激,对 BPD 具有保护作用。本实验显示新生大鼠暴露于高氧环境后出现肺泡简单化,表现为 RAC 减少及 MLI 增大,同时,肺组织促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达水平升高,外源性 hBD2 可增加 RAC,减小 MLI,改善肺泡发育,并可下调 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 表达。既往临床研究表明,患 BPD 的早产儿出生后 24h 及 2 周时血清 IL-10 水平明显低于非 BPD 早产儿^[20],细胞实验亦表明,重组 IL-10 治疗可减轻高氧对胎鼠肺泡 II 型细胞的损伤^[21]。本实验中,肺组织抑炎因子 IL-10 在高氧组和空载体组较空气组升高,hBD2 组表达更高,提示高氧环境下,新生鼠可能通过反应性增加 IL-10 表达来抑制炎症反应,但作用轻微,hBD2 可通过促进肺组织 IL-10 表达,进而增强其抑炎作用。

VEGF 是血管内皮细胞特异的有丝分裂原,由肺泡上皮细胞产生,影响血管内皮细胞的迁徙、生存、增殖和分化,是整个胚胎期、胎后期和生后肺血管生长发育最关键的调节因子,在建立正常肺形态和肺功能中发挥重要作用^[22]。VEGF 表达水平可直接影响肺血管及肺泡发育,在 BPD 的发生发展中发挥着重要作用。Been 等^[23]报道,BPD 患儿肺泡灌洗液中 VEGF 表达水平明显低于非 BPD 患儿,且表达水平持续下降。在高氧致 BPD 动物模型中,亦发现 VEGF 表达量显著低于空气对照组^[24-27],外源性 VEGF 可改善高氧所致的肺泡及肺血管发育受阻^[24]。本实验显示新生大鼠暴露于高浓度氧气后,肺组织 VEGF 表达减少,提示肺血管发育受阻,而外源性 hBD2 干预后,肺组织 VEGF 表达升高,提示 hBD2 可改善高氧所致的新生鼠肺血管发育受阻。

综上所述,hBD2 可改善 BPD 新生鼠肺泡及肺血管发育受阻,与其抗炎机制相关,此研究为 BPD 治疗提供了新的理论依据。在后续的实验,笔者将进行不同剂

量 hBD2 的对照研究以及进一步的机制研究,以找到最佳的剂量及更全面的作用机制。

4 参考文献

- [1] Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(7):1723–1729. DOI: 10.1164/ajrccm.163.7.2011060.
- [2] McEvoy CT, Jain L, Schmidt B, et al. Bronchopulmonary dysplasia: NHLBI Workshop on the Primary Prevention of Chronic Lung Diseases[J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2014, 11(3):146–153. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201312-424LD.
- [3] Jeng SF, Hsu CH, Tsao PN, et al. Bronchopulmonary dysplasia predicts adverse developmental and clinical outcomes in very-low-birthweight infants[J]. *Dev Med Child Neurol*, 2008, 50(1): 51–57. DOI: 10.1111/j.1469-8749.2007.02011.x.
- [4] Doyle LW. Respiratory function at age 8–9 years in extremely low birthweight/very preterm children born in Victoria in 1991–1992[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2006, 41(6):570–576. DOI: 10.1002/ppul.20412.
- [5] Gibson AM, Reddington C, McBride L, et al. Lung function in adult survivors of very low birth weight, with and without bronchopulmonary dysplasia[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2015, 50(10):987–994. DOI: 10.1002/ppul.23093.
- [6] Schutte BC, McCray PB Jr. [beta]-defensins in lung host defense[J]. *Annu Rev Physiol*, 2002, 64:709–748. DOI: 10.1146/annurev.physiol.64.081501.134340.
- [7] Liu KX, Chen SQ, Zhang H, et al. Intestinal ischaemia/reperfusion upregulates beta-defensin-2 expression and causes acute lung injury in the rat[J]. *Injury*, 2009, 40:950–955. DOI: 10.1016/j.injury.2009.01.103.
- [8] Dalcin D, Ulanova M. The Role of Human Beta-Defensin-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary Infection in Cystic Fibrosis Patients [J]. *Infect Dis Ther*, 2013, 2:159–166. DOI: 10.1007/s40121-013-0015-5.
- [9] Liao Z, Dong J, Hu X, et al. Enhanced expression of human beta-defensin 2 in peripheral lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Peptides*, 2012, 38(2):350–356. DOI: 10.1016/j.peptides.
- [10] Arnason JW, Murphy JC, Kooi C, et al. Human β -defensin-2 production upon viral and bacterial co-infection is attenuated in COPD[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5):e0175963. DOI: 10.1371/journal.pone.0175963.
- [11] Shen Z, Fang L, Zhao L, et al. beta-defensin 2 ameliorates lung injury caused by *Pseudomonas* infection and regulates proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rat [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15:13372–13387. DOI: 10.3390/ijms150813372.
- [12] Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 2–intrauterine and early post-natal lung growth[J]. *Thorax*, 1982, 37:580–583. DOI: 10.1136/thx.37.8.580.
- [13] 张超凤, 区庆坚, 王志红, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠慢性阻塞性肺疾病[J]. *心血管病杂志*, 2011, 30(1):62–66. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5062.2011.01.018.
- [14] Kota S, Sabbah A, Chang TH, et al. Role of human beta-defensin-2 during tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB-mediated innate antiviral response against human respiratory syncytial virus[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(33):22417–22429. DOI: 10.1074/jbc.M710415200.
- [15] Scharf S, Hippenstiel S, Flieger A, et al. Induction of human beta-defensin-2 in pulmonary epithelial cells by *Legionella pneumophila*: involvement of TLR2 and TLR5, p38 MAPK, JNK, NF-kappaB, and AP-1[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 298(5):687–695. DOI: 10.1152/ajplung.00365.2009.
- [16] Starner TD, Agerberth B, Gudmundsson GH, et al. Expression and Activity of beta-Defensins and LL-37 in the Developing Human Lung[J]. *J Immunol*, 2005, 174(3):1608–1615. DOI: 10.4049/jimmunol.174.3.1608.
- [17] Ambalavanan N, Carlo WA, D'Angio CT, et al. Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants[J]. *Pediatrics*, 2009, 123(4):1132–1141. DOI: 10.1542/peds.2008-0526.
- [18] Köksal N, Kayik B, etinkaya M, et al. Value of serum and bronchoalveolar fluid lavage pro- and anti-inflammatory cytokine levels for predicting bronchopulmonary dysplasia in premature infants[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2012, 23(2):29–35. DOI: 10.1684/ecn.2012.0304.
- [19] Oncel MY, Yurttutan S, Alyamac Dizdar E, et al. Beneficial Effect of Etanercept on Hyperoxic Lung Injury Model in Neonatal Rats [J]. *J Invest Surg*, 2016, 29(1):1–5. DOI: 10.3109/08941939.2015.1034898.
- [20] Mao X, Qiu J, Zhao L, et al. Vitamin D and IL-10 Deficiency in Preterm Neonates With Bronchopulmonary Dysplasia[J]. *Front Pediatr*, 2018, 7(6):246. DOI: 10.3389/fped.2018.00246.
- [21] Lee HS, Lee DG. rIL-10 enhances IL-10 signalling proteins in foetal alveolar type II cells exposed to hyperoxia[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(7):1538–1547. DOI: 10.1111/jcmm.12596.
- [22] Thébaud B, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175(10):978–985. DOI: 10.1164/rccm.200611-1660PP.
- [23] Been JV, Debeer A, van Iwaarden JF, et al. Early alterations of growth factor patterns in bronchoalveolar lavage fluid from preterm infants developing bronchopulmonary dysplasia[J]. *Pediatr Res*, 2010, 67(1):83–89. DOI: 10.1203/PDR.0b013e3181c13276.
- [24] Thébaud B, Ladha F, Michelakis ED, 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[J]. *Circulation*, 2005, 112(16):2477–2486. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.541524.
- [25] Hosford GE, Olson DM. Effects of hyperoxia on VEGF, its receptors, and HIF-2alpha in the newborn rat lung [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(1): 161–168. DOI: 10.1152/ajplung.00285.2002.
- [26] 王玲, 封志纯, 吕回. 血管内皮生长因子和血管生成素-1 在高氧诱导新生鼠支气管肺发育不良的表达及其对肺发育的影响[J]. *实用*

(下转第 2407 页)

- Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2018, 137(12):e493. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000558.
- [2] Kumar S, de Lusignan S, McGovern A, et al. Ischaemic stroke, haemorrhage, and mortality in older patients with chronic kidney disease newly started on anticoagulation for atrial fibrillation: a population based study from UK primary care[J]. *BMJ*, 2018, 360:k342. DOI: 10.1136/bmj.k342.
- [3] Fleg JL, Forman DE, Berra K, et al. Secondary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease in older adults: a scientific statement from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2013, 128(22): 2422–2446. DOI: 10.1161/01.cir.0000436752.99896.22.
- [4] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2012, 125(1): e2–e220. DOI: 10.1161/CIR.0b013e31823ac046.
- [5] Tang L, Patao C, Chuang J, et al. Cardiovascular risk factor control and adherence to recommended lifestyle and medical therapies in persons with coronary heart disease (from the National Health and Nutrition Examination Survey 2007–2010)[J]. *Am J Cardiol*, 2013, 112(8): 1126–1132. DOI: 10.1016/j.amjcard.
- [6] 中华医学会心血管病学分会, 中国康复医学会心血管病专业委员会, 中国老年学学会心脑血管病专业委员会. 冠心病康复与 2 级预防中国专家共识[J]. *中华心血管病杂志*, 2013, 41(4): 267–275. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253–3758.2013.04.003.
- [7] Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)[J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(2): 119–177. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx393.
- [8] Han BH, Sutin D, Williamson JD, et al. Effect of Statin Treatment vs Usual Care on Primary Cardiovascular Prevention Among Older Adults: The ALLHAT-LLT Randomized Clinical Trial [J]. *JAMA Intern Med*, 2017, 177(7): 955–965. DOI: 10.1001/jamainternmed.2017.1442.
- [9] Schiele F, Ecarnot F, Chopard R. Coronary artery disease: Risk stratification and patient selection for more aggressive secondary prevention[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2017, 24(3): 88–100. DOI: 10.1177/2047487317706586.
- [10] 梁东亮, 李小鹰, 王斯悦. 冠心病患者 2 级预防中的循证药物治疗现状[J]. *世界最新医学信息文*, 2016, 16(39): 41–42. DOI: 10.3969/j.issn.1671–3141.2016.39.020.
- [11] Libungan B, Stensdotter L, Hjalmarson A, et al. Secondary prevention in coronary artery disease. Achieved goals and possibilities for improvements[J]. *Int J Cardiol*, 2012, 161(1): 18–24. DOI: 10.1016/j.ijcard.2011.04.025.
- [12] 李小鹰, 王林, 于普林, 等. 老年人冠心病治疗与 2 级预防现状调查 [J]. *中华老年医学杂志*, 2012, 31(10): 909–914. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254–9026.2012.10.025.
- [13] Byrne P, Cullinan J, Murphy C, et al. Cross-sectional analysis of the prevalence and predictors of statin utilisation in Ireland with a focus on primary prevention of cardiovascular disease[J]. *BMJ Open*, 2018, 8(2): e18524. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-018524.
- [14] Arca M, Ansell D, Averna M, et al. Statin utilization and lipid goal attainment in high or very-high cardiovascular risk patients: Insights from Italian general practice[J]. *Atherosclerosis*, 2018, 271: 120–127. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.02.024.
- [15] Wang Y, Zhong M, Wang Z, et al. The preventive effect of antiplatelet therapy in acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis[J]. *Crit Care*, 2018, 22(1): 60. DOI: 10.1186/s13054-018-1988-y.
- [16] Mehta SR, Bainey KR, Cantor WJ, et al. 2018 Canadian Cardiovascular Society/Canadian Association of Interventional Cardiology Focused Update of the Guidelines for the Use of Antiplatelet Therapy[J]. *Can J Cardiol*, 2018, 34(3): 214–233. DOI: 10.1016/j.cjca.2017.12.012.
- [17] 袁永梅. 冠心病 2 级预防中他汀类药物用药依从性的影响因素分析及其预防对策[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2015(7): 55–57. DOI: 10.3969/j.issn.1008–5971.2015.07.015.
- (收稿日期: 2018-03-18)
(本文编辑: 俞骏文)

(上接第 2393 页)

医学杂志, 2014, 30(4): 525–528. DOI: 10.3969/j.issn.1006–5725.2014.04.008.

- [27] Kaya G, Saldır M, Polat A, et al. Evaluation of Etanercept Treatment in Newborn Rat Model with Hyperoxic Lung Injury[J]. *Fetal*

Pediatr Pathol, 2016, 35(5): 327–338. DOI: 10.1080/15513815.2016.1189018.

(收稿日期: 2019-09-01)

(本文编辑: 俞骏文)