文章编号:1000-5404(2014)23-2353-05

论著

弹性纤维系统在小鼠支气管肺发育不良中的动态表达规律

刘秋彤,韩文莉,郭春宝,余本莉,刘朝云,邓 春 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院新生儿诊治中心1病房,重庆医科大学儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室)

[摘要] **目的** 观察支气管肺发育不良模型小鼠肺发育过程中弹性蛋白及其相关蛋白的表达情况,探讨弹性蛋白平衡紊乱在支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)中的作用。**方法** 新生1 d内的C57BL/6小鼠按随机数字表法分为两组:BPD组及对照组,BPD组应用高浓度氧暴露建立BPD模型,运用HE染色和免疫组化法观察各组小鼠肺组织形态学改变,弹性纤维染色观察各组小鼠弹性纤维含量,荧光定量PCR技术观察弹性蛋白及其相关蛋白mRNA在各组小鼠中随时间变化的表达情况。**结果** 与对照组相比,BPD组小鼠第3天开始肺部次级脊形成受阻,直至21 d可见肺泡融合导致正常肺泡结构消失,次级脊消失,弹性纤维和弹性蛋白明显增加且紊乱无序的沉积在肺泡间隔上;BPD组弹性蛋白及其相关蛋白基因的表达显示:Tropoelastin及其相关合成蛋白Fibrillin-1、Fibrillin-2、Fibulin-4、Fibulin-5 mRNA的表达在给氧21 d时有不同程度的增加($P<0.05$),弹性蛋白交联酶Lox mRNA在给氧3~21 d较对照组明显增加($P<0.01$),弹性蛋白降解酶Neutrophil elastase mRNA在给氧1~14 d表达较对照组增加($P<0.05$),21 d时减少至与对照组无明显差异($P>0.05$)。**结论** 弹性蛋白平衡是肺泡发育的重要机制,弹性蛋白平衡紊乱在BPD小鼠病理过程中起着重要作用。

[关键词] 弹性蛋白;支气管肺发育不良;肺发育
[中图法分类号] R-332; R341; R725.602 [文献标志码] A

Dynamic expression profiles of elastic fiber system in hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia in newborn mice

Liu Qiutong, Han Wenli, Guo Chunbao, Yu Benli, Liu Zhaoyun, Deng Chun (Ward 1, Centre of Neonatal Diagnosis and Treatment, Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood Cofounded by Chongqing and Ministry of Education, the Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of elastin fiber and its related proteins in newborn mice with bronchopulmonary dysplasia (BPD) induced by hyperoxia and investigate the disorder of elastin expression in the development of BPD. **Methods** C57BL/6 mice at 1 day postnatally were randomly divided into control and BPD group (exposure to hyperoxia). HE staining and immunofluorescence assay were used to the morphological changes of mouse lung, elastic fiber staining for the contents of elastic fibers, and Q-PCR to determine the mRNA expression of tropoelastin and related proteins. **Results** Compared to the control, the mice of BPD group were failure to form secondary crest at 3 d, fewer and larger alveoli at 21 d, secondary crest disappeared and elastic fibers were distributed in bad orders and accumulated in the connective tissue matrix. In BPD group, the mRNA expression of tropoelastin, and fibrillin-1, -2, -4 and -5 were increased in 21 d ($P<0.05$). The expression of Lox at mRNA level was increased at 3 to 21 d after exposure to hyperoxia ($P<0.01$). While, the mRNA expression of neutrophil elastase was significantly increased at 1 to 14 d ($P<0.05$). **Conclusion** The balance of elastin fiber is essential for alveoli development. The disturbed elastin fiber structure plays an important role in the pathologic process of BPD.

[**Key words**] elastin; bronchopulmonary dysplasia; lung development

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270058). Corresponding author: Deng Chun, E-mail:dengcgcb@163.com

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是一种发生在早产儿的慢性肺部疾病,是早产儿机械通气或氧疗后常见的并发症,具有很高的发病率和病死率[1]。随着围产医学的进步,出生体质量低于

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270058)
[通信作者] 邓 春,E-mail:dengcgcb@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1612.022.html(2014-11-06)

1 500 g的极低出生体质量儿和早产儿,存活率逐年增加,然而低胎龄和低出生体质量均会导致BPD的发病率增加[2]。目前认为,BPD的病理改变主要是总体肺泡数量下降、肺泡结构简单化和实质纤维化。其中,无序的弹性纤维形成过剩表达在受损的肺泡是BPD病理表现中最突出的组织学特征[3],但其具体发病机制尚未阐明。

弹性蛋白作为弹性纤维中最主要和最具有特征性的蛋白,其作为肺泡强度和弹性支架在肺组织中起着重要作用以外,在肺部发育和终端气道的分支中也同样必不可少。肺部弹性纤维尽管有广泛的研究,Bland等[4]率先研究了8~24 h机械通气小鼠肺损伤中弹性蛋白合成、降解的特点,但在BPD发生过程中的合成方式、组装过程及功能尚无深入的探索与尝试。本研究拟在观察弹性蛋白及其相关基因在对照组生鼠和BPD小鼠中随时间变化的表达情况,分析高浓度氧是如何影响弹性蛋白的平衡以及在BPD中肺纤维化的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料与实验动物

弹性纤维染色试剂盒购自福建迈新生物有限公司,兔抗小鼠Tropoelastin多抗购自Abcam公司,兔超敏免疫组化检测试剂盒和DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥,RNA抽提试剂盒购自Omega公司,PrimeScript RT reagent Kit和反转录试剂盒购自宝生物工程公司,引物由生工生物工程合成,其他试剂为国产分析纯。清洁级健康1 d龄C57BL/6J小鼠,雌雄不拘,平均体质量1.18 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号[SCXK(渝)2007-002]。

1.2 动物分组及BPD小鼠模型的制备

将60只新生1 d内的C57BL/6小鼠按随机数字表法分为BPD组和对照组,每组30只。BPD组:新生小鼠与哺乳母鼠共同置于自制密闭氧箱中,维持FiO_2在0.60左右,CO_2浓度<0.5%,温度24~26 ℃,湿度50%~60%,每日定时开箱1 h,称量,添加水、饲料及更换垫料,观察各组动物的一般状态,并与对照组交换哺乳母鼠以避免母鼠因高氧中毒导致哺乳能力下降。对照组:置于同一室内正常空气中,FiO_2为0.21,其他控制因素及实验方法与BPD组相同。

1.3 标本采集

分别在小鼠日龄的第1、3、7、14、21 d,每组按随机数字表法抽取3只小鼠,称量,麻醉后开胸分离肺组织。取出右肺置于-80 ℃保存备用,左肺于4%多聚甲醛中固定,用于肺组织HE病理染色、醛品红染色(Gomori)及免疫组化检测。

1.4 肺组织形态学观察及放射状肺泡计数(RAC)

石蜡切片经常规脱蜡、水化后行HE染色,于光镜下观察各组肺组织形态随时间的变化,并将每组动物各时间点抽取5张肺组织切片,每张切片选取5个视野计数,行放射状肺泡计数:呼吸性细支气管至最近胸膜的垂线上的肺泡数目,取平均值。

1.5 醛品红染色及次级脊计数

石蜡切片经常规水化后按试剂盒说明书进行染色,光镜下观察各组小鼠弹性纤维分布情况,参照Kathleen的计数方法[5],进行次级脊计数,次级脊可反映弹性纤维分布情况和肺泡分隔情况,每组动物抽取2张切片,每张切片选取5个视野,取平均值。

1.6 肺组织Tropoelastin动态监测

石蜡切片常规脱蜡至水,具体操作按照试剂说明书进行,兔抗小鼠Tropoelastin多抗1∶400稀释,4 ℃孵育过夜,二抗为山羊抗兔HRP-IgG,DAB显色。实验重复5次,应用光学显微镜采集各组各时间点图像,以细胞膜上有棕黄色颗粒着色为阳性细胞。利用Image-Pro Plus图像分析软件,测定平均积分光密度值(IOD)来表示阳性产物的表达强度。

1.7 RT-PCR检测各组小鼠肺组织Tropoelastin及其相关蛋白mRNA表达

按试剂盒说明书提取肺组织总RNA,反转录反应制备cDNA,反应体系共20 μL。引物由生工生物合成,序列如下:Tropoelastin:上游5′-GGTGGTATTGGTGGCATCGG-3′,下游5′-GCCTTGGCTTTGACTCCTGTG-3′;Fibrillin-1:上游5′-CCAACTCGTGTCGGCTGTG-3′,下游5′-GCTGTATCTCCATTGTCTCCC-3′;Fibrillin-2:上游5′-CAACCTCGTCACAAAGTCGG-3′,下游5′-TTGGCATCACCTTACATTCATC-3′;Fibulin-4:上游5′-CTCTGGGCGTTTCTGCTGTT-3′,下游5′-GCCATCTGTGCATTCCGTGT-3′;Fibulin-5:上游5′-GGGCTCATACTTCTGCTCG-3′,下游5′-GATGGTGAATGGCTGGTCT-3′;Lox:上游5′-CGCAAAGAGTGAAGAACCA-3′,下游5′-GTGTCCTCCAGACAGAAGC-3′;Neutrophil elastase:上游5′-GGAGGCTGTGGATCTGGATTG-3′,下游5′-TGGGATGGGTAAGAAGGTGGT-3′;内参基因β-actin:上游:5′-CAGCCTTCCTTCTTGGGTAT-3′,下游5′-GCTCAGTAACAGTCCGCCTA-3′。反应条件:95 ℃ 2 min→95 ℃ 10 s→57 ℃ 15 s→72 ℃ 45 s,共40个循环;72 ℃延伸10 min。采用相对定量法,测定目的基因及β-actin的PCR产物的Ct值。

1.8 统计学分析

数据采用SPSS 17.0统计学软件进行分析,结果以$\bar{x} \pm s$表示,两样本间两两比较采用t检验。

2 结果

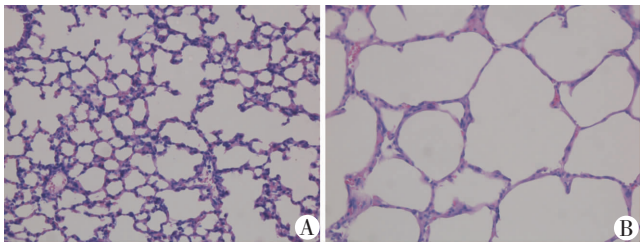
2.1 小鼠的一般状态及体质量

对照组小鼠生长良好,反应灵敏,体质量逐渐增加,3周后可断奶自主进食。BPD组小鼠生长缓慢,7 d开始出现活动减少,精神萎靡,7 d时BPD组体质量[(3.18±0.33)g]较对照组[(3.96±0.27)g]显著降低($P<0.05$),随着高氧暴露时间的延长,14 d和21 d时BPD组体质量[(4.65±0.57)g、(5.21±0.87)g]与空气组[(7.57±0.61)g、(10.34±0.72)g]差异更为显著($P<0.01$),并且对外界刺激反应差、毛发灰黄,出现对氧的依赖,离氧后表现为呼吸急促,呼吸动度增大,恢复供氧后症状可有所缓解。

2.2 肺组织病理HE染色观察

对照组的肺组织随着日龄的增加,肺泡结构逐渐规整,数

量增多,肺泡间隔变薄。BPD 组 7 d 时可见肺间质细胞增加,肺泡腔增大;14 d 时肺组织较同期对照组肺泡数目减少;到 21 d 时已失去正常肺泡结构,出现肺泡融合,肺泡数目明显减少,结构简单化,终末气腔直径明显扩大,肺泡间隔增厚(图 1)。



A:对照组;B: BPD 组

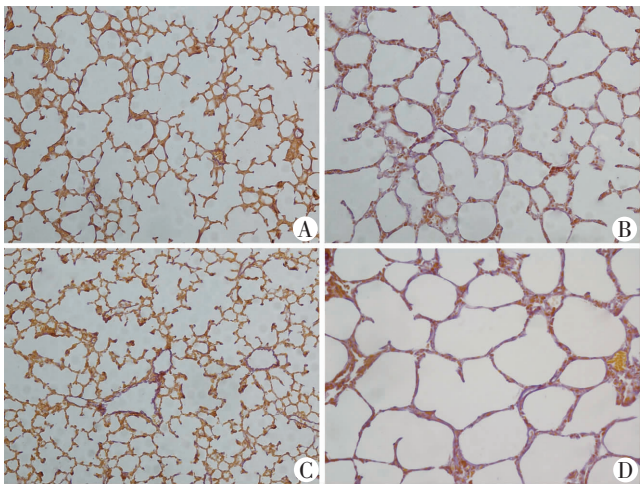
图 1 两组小鼠 21 d 肺组织形态学观察 (HE ×200)

2.3 放射状肺泡计数(RAC)

对照组随日龄增加而肺泡化程度增加,RAC 逐渐增加,而 BPD 组 RAC 从肺泡期开始减少,3 d 时 BPD 组 RAC(4.67 ± 1.07)较对照组(5.67 ± 1.07)显著减少($P<0.05$),14 d 和 21 d 时 BPD 组 RAC(4.58 ± 0.90)、(3.83 ± 1.11)较对照组(9.08 ± 1.62)、(11.17 ± 1.47)显著减少($P<0.01$)。

2.4 肺组织弹性纤维染色及次级脊(Secondary Crest)观察

醛品红染色后光镜下弹性纤维成深紫色,底色为不同程度的黄色。对照组次级脊随着肺泡化程度逐渐增加,弹性纤维逐渐沉积在次级脊顶端,偶见散在弹性纤维分布,次级脊数量 14 d 达高峰,21 d 时肺泡逐渐发育成熟后次级脊计数下降。BPD 组在 14 d 次级脊数量(3.83 ± 1.47)与对照组(54.00 ± 3.16)相比显著减少($P<0.01$),弹性纤维未沉积在次级脊顶端并开始在肺泡间隔出现异常增生,21 d 时次级脊几乎完全消失,弹性纤维明显增加并且在肺泡间隔增厚,迂曲,不规整分布(图 2)。

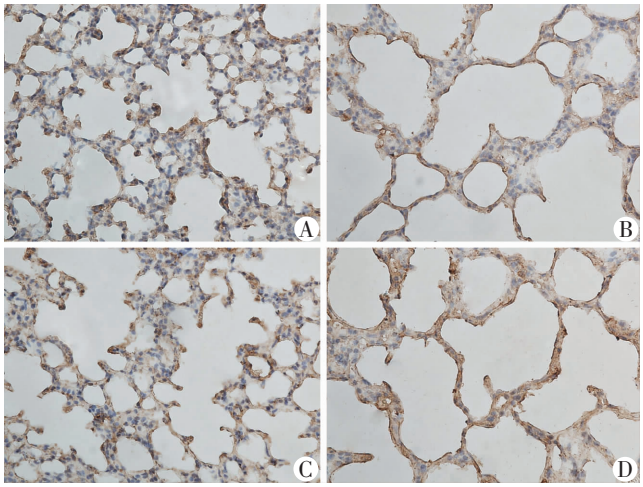


A:对照组 14 d;B: BPD 组 14 d;C:对照组 21 d;D: BPD 组 21 d

图 2 两组小鼠肺组织弹性纤维染色观察 (醛品红 ×200)

2.5 免疫组化检测原弹性蛋白(Tropoelastin)在肺组织表达

Tropoelastin 在 BPD 组 14 d 和 21 d 时表达分别为(116.11 ± 9.82)和(129.53 ± 10.05)均较对照组(94.36 ± 6.57)和(83.55 ± 18.86)表达增加($P<0.05$),14 d 可见 Tropoelastin 主要在肺泡间隔表达,随着氧气暴露的时间延长,Tropoelastin 在肺泡间隔呈现不规则的分布(图 3)。



A:对照组 14 d;B: BPD 组 14 d;C:对照组 21 d;D: BPD 组 21 d

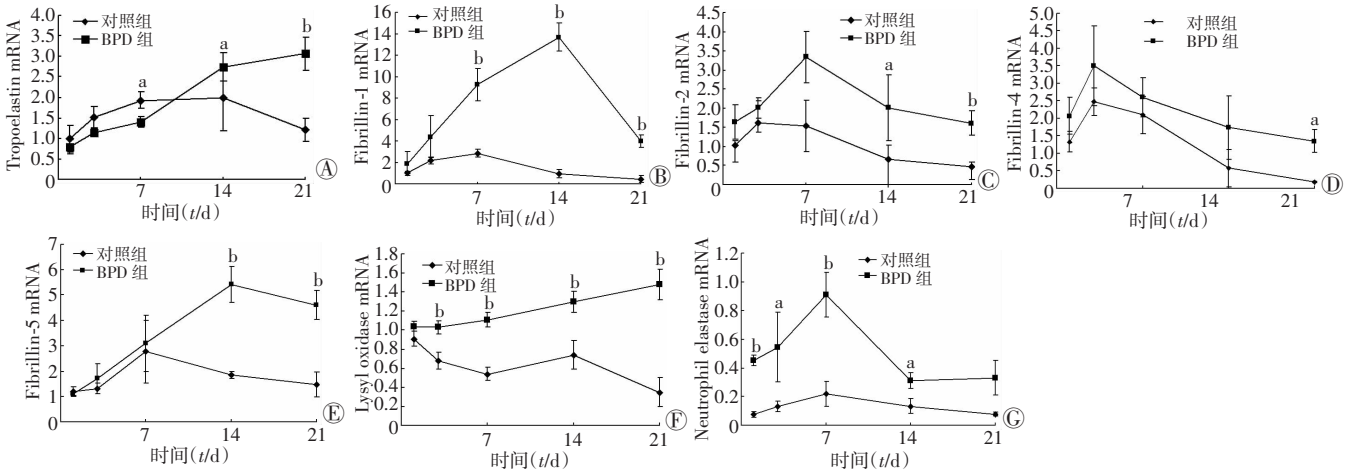
图 3 两组小鼠肺组织 Tropoelastin 免疫组化检测 (二步法 ×400)

2.6 各组肺组织中 Tropoelastin、Fibrillin-1、Fibrillin-2、Fibulin-4、Fibulin-5、Lysyl oxidase、Neutrophil elastase mRNA 的动态变化

Tropoelastin 及其相关合成蛋白 Fibrillin-1、Fibrillin-2、Fibulin-4、Fibulin-5 mRNA 在对照组中均呈现出现增加后减少的趋势,与对照组相比,BPD 组 Tropoelastin 在 21 d 时均有不同程度的增加($P<0.05$,$P<0.01$)(图 4A、B、C、D、E)。弹性蛋白交联酶 Lox mRNA 在对照组中 1 d 时已有表达,随着日龄增加逐渐表达减少;BPD 组 Lox mRNA 的表达从 3 ~ 21 d 均较对照组明显升高($P<0.01$)(图 4F);弹性蛋白降解酶 Neutrophil elastase mRNA 的表达在对照组随日龄增加呈现先增加后减少的趋势;BPD 组中 Neutrophil elastase mRNA 的表达从 1、3、7、14 d 较对照组有不同程度的增加($P<0.05$,$P<0.01$),21 d 时下降至与对照组无显著差异($P>0.05$)(图 4G)。

3 讨论

BPD 的早期病理特点是肺泡和血管的生长紊乱,而晚期则表现为纤维增生性气道损伤和肺实质的纤维化[1]。其中无序的弹性蛋白形成过剩表达在受损的肺泡是 BPD 后期肺部最主要的变化[3]。肺弹性蛋白的表达依赖于蛋白合成、组装和降解过程的平衡。其中,合成过程是由血管平滑肌细胞和各种成纤维细胞分泌其前体原弹性蛋白,由弹性蛋白结合蛋白转移到细胞表面[6]并自我聚集成几微米直径的球状物,这是弹性纤维形成的第一步[7]。随后,原弹性蛋白与细胞间的 Fibrillin-1, 2 结合,并且作为支架,引导弹性蛋白组装和交联[8]。与 Fibrillin 结合后的原弹性蛋白经过 Lox 氧化脱氨基作用交联后成为不溶性的弹性蛋白,



A: Tropoelastin mRNA; B: Fibrillin-1 mRNA; C: Fibrillin-2 mRNA; D: Fibulin-4 mRNA; E: Fibulin-5 mRNA; F: Lox mRNA; G: Neutrophil elastase mRNA

a: $P<0.05$; b: $P<0.01$, 与对照组比较

图4 各组小鼠弹性蛋白及其相关蛋白 mRNA 表达的动态变化

并沉积到 Fibulin-4,5 上形成成熟的弹性蛋白[9]。最后通过 Fibulin-4,5 与细胞上的整合素受体结合而结合到相应细胞上。如此,弹性蛋白的合成、组装及沉积就完成了。除此之外,另一个影响弹性蛋白平衡的因素就是弹性蛋白的降解。弹性蛋白的降解过程是通过 Elastase 介导,其主要是由多核型白细胞和单核细胞分泌的基质金属蛋白酶(MMP)[10]。弹性蛋白酶在弹性蛋白平衡以及肺泡重塑中发挥了重要作用,蛋白酶/抗蛋白酶比例失衡,将导致弹性蛋白酶和弹性蛋白降解的增加,造成组织结构破坏。

弹性蛋白不仅在正常肺泡中,作为结构支架的提供者,而且在肺泡发育过程中起着关键作用。新的肺泡壁形成过程首先是由肺泡隔两边延伸出一个包括双毛细血管层并逐渐沉积弹性蛋白的小嵴,称为次级脊[11]。在随后的发育中,次级脊不断延伸并将肺泡分隔得更小且更均匀,以增加气血交换的面积。Wendel 等[5]研究发现缺乏弹性蛋白基因的小鼠肺组织在囊泡期之前,呈现出较少的肺泡和终末囊端扩张,且均未存活超过 4 d。本研究发现在正常氧浓度环境中的小鼠次级脊从第 3 天开始形成,随着日龄增加,弹性蛋白逐渐在其顶端规则有序的沉积,次级脊不断延伸,数量不断增加,在第 14 天达高峰,21 d 开始下降,次级脊的发育时间与小鼠肺发育过程中的肺泡期时间相吻合。而 BPD 组中小鼠 21 d 时肺弹性纤维明显增加并且在肺泡间隔增厚,迂曲,不规整分布,次级脊的发育明显受阻,说明弹性蛋白作为次级脊的形成中的重要物质参与肺泡期肺的发育过程,为新的肺泡隔的形成提供了物质基础。

目前,对于弹性蛋白在 BPD 发生过程中的具体机制,尚不十分明确。文献报道在死于 BPD 的机械通气患儿肺内弹性蛋白表达明显增高[12-15],弹性蛋白的沉积和表达增高同样出现在机械通气的早产羔羊模型内,这与 BPD 小鼠体内肺肌成纤维细胞呈增加趋势相吻合。以上研究充分证明了弹性蛋白在 BPD 的病理过程中表达增高且相关基因的不平衡。任何一个弹性蛋白合成的相关蛋白出现异常,均会导致弹性蛋白的紊乱:Fibrillin-1 基因敲除鼠由于弹性蛋白紊乱而导致升主动脉破裂从而表现出新生儿期至死性[16];Lox 基因敲除小鼠由于胶原蛋白和弹性蛋白交联失败,纤维成熟障碍引起主动脉破裂导致围产期死亡[17];Fibulin-5 基因敲除鼠在成年期其主动脉迂曲且失去顺应性、肺部重度肺气肿和皮肤松弛,并且可以在病变部位观察到零散的弹性蛋白[18];整合素 αvβ3 作为弹性蛋白和细胞间链接的重要桥梁,其基因敲除鼠同样表现出血管弹性蛋白沉积紊乱[19]等。本研究在高浓度氧暴露所致 BPD 的新生鼠中发现弹性蛋白合成的主要基因:Tropoelastin、Fibrillin-1、Fibrillin-2、Fibulin-4、Fibulin-5 mRNA 的表达在 21 d 时均有不同程度的增加,表现为高峰滞后,与 BPD 后期纤维化这一病理变化相吻合。

弹性蛋白的交联酶 Lox 作为弹性蛋白合成中的重要酶,参与弹性蛋白交联过程使原弹性蛋白氧化为成熟的弹性蛋白。有研究证明 BPD 小鼠 Lox 表达增加是由于在高氧肺损伤新生小鼠体内的 TGF-β 表达上调从而促进肺成纤维细胞产生 Lox,并提出 Lox 的表达增加促进其与弹性蛋白交联,使弹性蛋白在 ECM 和肺泡重塑过程中稳定性过度增加,从而影响肺的发

育[16,20]。本研究中 Lox mRNA 的表达在 BPD 组较对照组从 3～21 d 均明显增加($P<0.01$)。弹性蛋白的平衡紊乱可能与弹性蛋白过度交联有关。除此之外,弹性蛋白酶在弹性蛋白的平衡和 BPD 的病理进程中,同样起着重要作用。Hilgendorff[21]发现,弹性蛋白酶分解弹性蛋白后形成的弹性蛋白多肽片段,可以诱导肺部炎症和细胞凋亡,促进 BPD 的发生,而气管内滴注弹性蛋白酶抑制剂可以保护 24 h 高氧机械通气对肺的损伤。本研究发现 Neutrophil elastase 在 BPD 组 1 d 时表达已有明显增加($P<0.01$),并且在囊泡期及肺泡前期较对照组有不同程度的增加,肺泡后期开始下降,21 d 时下降至与对照组无明显差异,是弹性蛋白相关蛋白基因中出现变化最早的基因,可能是 BPD 中弹性蛋白紊乱的始动因素。

因此,我们可以推断,BPD 小鼠在囊泡期和肺泡前期,Lox 和 Neutrophil elastase 表达上调引起弹性蛋白过度交联和降解增加,是这一时期弹性蛋白紊乱的主要原因,其中,表达量最早出现变化的 Neutrophil elastase,可能是 BPD 中弹性蛋白紊乱的始动因素;在肺泡后期和肺泡成熟期,Neutrophil elastase 表达下降,弹性蛋白合成的相关基因不协调的增加,导致肺部弹性纤维沉积增多、紊乱和不规则,肺逐渐纤维化。但是否因为囊泡期和肺泡前期 Neutrophil elastase 的表达增加,使得弹性蛋白分解后形成的弹性蛋白多肽片段增加,诱导肺部炎症和细胞凋亡或反馈性的促进弹性蛋白合成增加,最终导致肺实质纤维化这一典型的 BPD 病理改变,还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] Jobe A H. The new bronchopulmonary dysplasia[J]. Curr Opin Pediatr, 2011, 23(2): 167－172.

[2] Jensen E A, Schmidt B. Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol., 2014, 100(3): 145－157.

[3] Morty R E. Targeting elastase in bronchopulmonary dysplasia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 184(5): 496－497.

[4] Bland R D, Ertsey R, Mokres L M, *et al*. Mechanical ventilation uncouples synthesis and assembly of elastin and increases apoptosis in lungs of newborn mice. Prelude to defective alveolar septation during lung development? [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294(1): L3－L14.

[5] Wendel D P, Taylor D G, Albertine K H, *et al*. Impaired distal airway development in mice lacking elastin[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 23(3): 320－326.

[6] Hu Q, Loeys B L, Coucke P J, *et al*. Fibulin-5 mutations: mechanisms of impaired elastic fiber formation in recessive cutis laxa[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(23): 3379－3386.

[7] Ramirez F, Sakai L Y, Rifkin D B, *et al*. Extracellular microfibrils in development and disease[J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(18): 2437－2446.

[8] Sato F, Wachi H, Ishida M, *et al*. Distinct steps of cross-linking, self-association, and maturation of tropoelastin are necessary for elastic fiber formation[J]. J Mol Biol, 2007, 369(3): 841－851.

[9] Bax D V, Rodgers U R, Bilek M M, *et al*. Cell adhesion to tropoelastin is mediated *via* the C-terminal GRKRK motif and integrin alphaVbeta3[J]. J Biol Chem, 2009, 284(42): 28616－28623.

[10] Veness-Meehan K A, Bottone F G Jr, Stiles A D. Effects of retinoic acid on airspace development and lung collagen in hyperoxia-exposed newborn rats[J]. Pediatr Res, 2000, 48(4): 434－444.

[11] Burri P H. Structural aspects of prenatal and postnatal development and growth of the lung[M]// McDonald J A. Lung growth and development, New York: Marcel Dekker, Inc, 1997: 1－35.

[12] Hinek A, Braun K R, Liu K, *et al*. Retrovirally mediated overexpression of versican v3 reverses impaired elastogenesis and heightened proliferation exhibited by fibroblasts from Costello syndrome and Hurler disease patients[J]. Am J Pathol, 2004, 164(1): 119－131.

[13] Jobe A H, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(7): 1723－1729.

[14] Pierce R A, Albertine K H, Starcher B C, *et al*. Chronic lung injury in preterm lambs: disordered pulmonary elastin deposition[J]. Am J Physiol, 1997, 272(3 Pt 1): L452－L460.

[15] Deng C, Wang J, Zou Y, *et al*. Characterization of fibroblasts recruited from bone marrow-derived precursor in neonatal bronchopulmonary dysplasia mice[J]. J Appl Physiol (1985), 2011, 111(1): 285－294.

[16] Carta L, Pereira L, Arteaga-Solis E, *et al*. Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development[J]. J Biol Chem, 2006, 281(12): 8016－8023.

[17] Maki J M, Sormunen R, Lippo S, *et al*. Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues[J]. Am J Pathol, 2005, 167(4): 927－936.

[18] Nakamura T, Lozano P R, Ikeda Y, *et al*. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis *in vivo*[J]. Nature, 2002, 415(6868): 171－175.

[19] Choi E T, Khan M F, Leidenfrost J E, *et al*. Beta3-integrin mediates smooth muscle cell accumulation in neointima after carotid ligation in mice[J]. Circulation, 2004, 109(12): 1564－1569.

[20] Kumarasamy A, Schmitt I, Nave A H, *et al*. Lysyl oxidase activity is dysregulated during impaired alveolarization of mouse and human lungs[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(12): 1239－1252.

[21] Hilgendorff A, Parai K, Ertsey R, *et al*. Inhibiting lung elastase activity enables lung growth in mechanically ventilated newborn mice[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 184(5): 537－546.

(**收稿**:2014-06-24;**修回**:2014-09-30)

(编辑 黄 超)