

· 实验研究 ·

早产鼠高氧暴露后肺组织血管内皮生长因子和一氧化氮合酶的动态变化及相互关系

韦伟, 王伟, 宁琴, 罗小平

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的 最近研究表明, 血管内皮生长因子(VEGF)及内皮型一氧化氮合酶(eNOS)功能的缺失, 在支气管肺发育不良(BPD)发病机制中发挥了重要的作用。该文通过动态观察持续中浓度高氧暴露(60% O₂)对早产大鼠肺内 VEGF 蛋白及 mRNA 和 eNOS 蛋白及 mRNA 表达的影响, 探讨 BPD 的发病机制。方法 将 21 d 孕早产鼠随机分为高氧暴露组(简称高氧组)和空气对照组(简称空气组), 分别置于常压高氧仓中(60% O₂)和正常空气中暴露。分别于生后 1, 4, 7, 11, 14 d 每组各处死 6 只大鼠, 留取肺组织标本。苏木精-伊红染色观察病理改变, 免疫组化检测 VEGF 和 eNOS 蛋白表达, 逆转录-聚合酶链反应方法检测 VEGF 和 eNOS mRNA 表达。结果 早产鼠高氧暴露 4 d 后出现肺泡间隔减少, 微血管发育异常, 间质纤维化, 且病变随着高氧暴露时间的延长而加重。高氧组大鼠第 4, 7 天时肺组织 VEGF 蛋白表达明显低于相应空气对照组 ($P < 0.05$), VEGF mRNA 表达亦显著减少 ($P < 0.05$)。随着暴露时间的延长, VEGF 蛋白和 mRNA 进行性降低。高氧组大鼠在高氧暴露过程中肺组织 eNOS 蛋白和 mRNA 表达亦随着暴露时间的延长而降低。结论 高氧暴露导致早产鼠肺组织 VEGF 和 eNOS 表达持续性减少, 微血管发育异常和肺泡化受阻。这些由高氧暴露诱导产生的 BPD 样损害, 可能与 VEGF 和 eNOS 的表达下调有关, 且二者之间存在着密切的联系。 [中国当代儿科杂志, 2007, 9(5): 473-478]

[关键词] 高氧; 支气管肺发育不良; 血管内皮生长因子; 一氧化氮合酶; 早产大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)05-0473-06

Dynamic changes in vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in lungs of premature rats after hyperoxia exposure

WEI Wei, WANG Wei, NING Qin, LUO Xiao-Ping. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Luo X-P, Email: xpluo@tjh.tjmu.edu.cn)

Abstract: Objective Recent studies suggest that the disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) functions plays a pivotal role in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia (BPD). The aim of this study was to investigate the changes of VEGF and eNOS expression in the lungs of premature rats exposed to moderate hyperoxia in order to explore possible relationships with BPD. **Methods** Premature rats delivered by hysterotomy at 21 days gestation were randomly continuously exposed to moderate hyperoxia (60% FiO₂) and room air. The rats were sacrificed at 1, 4, 7, 11 and 14 days of exposure (6 rats at each time point). Lung sections were stained with hematoxylin and eosin for histological examination. Expression of VEGF and eNOS proteins and mRNA were assayed using immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** After 4 days of hyperoxia, lungs developed interstitial fibrosis, abnormal vascular patterns and decreased alveolar septation. These changes became more obvious with more prolonged hyperoxia exposure. The expression of VEGF protein after 4 and 7 days of exposure decreased significantly in the hyperoxia group compared with controls. The expression of VEGF mRNA in the hyperoxia group was also lower after 4 and 7 days of exposure. Both VEGF protein and mRNA levels decreased with increasing hyperoxia exposure time. The expressions of eNOS protein and mRNA also progressively decreased with increasing hyperoxia exposure. **Conclusions** Hyperoxia caused progressive reduction in lung VEGF and eNOS expression as well as abnormalities of lung structures, including decreased vascular growth and impaired alveolarization. These histologic changes are similar to those of BPD. The data support a link between BPD and decreased expression of VEGF and eNOS. [Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(5): 473-478]

Key words: Hyperoxia; Bronchopulmonary dysplasia; Vascular endothelial growth factor; Endothelial nitric oxide synthase; Premature rats

[收稿日期] 2007-01-30; [修回日期] 2007-02-15

[基金项目] 国家杰出青年科学基金资助项目(30125019); 国家自然科学基金面上项目(30271379)。

[作者简介] 韦伟, 女, 硕士研究生。主攻方向: 新生儿疾病。

[通讯作者] 罗小平, 教授, 博士生导师, 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 邮编: 430030。

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是早产儿常见的慢性肺疾病。在对因 BPD 致死的婴儿尸检中发现其肺组织有以肺泡和血管发育不良为特点的发育停滞征象^[1]。尽管在 BPD 中肺发育受损的机制尚不十分清楚,但血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 功能的缺失在 BPD 的发病机制中扮演了重要的角色^[2]。另外,内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 基因缺失小鼠在生后缺氧时表现出更高的肺部发育异常易感性^[3]。而给予新生鼠 SU-5416 (一种 VEGF 受体阻滞剂) 后,鼠肺内 eNOS 表达下调^[4]。而且,大部分 VEGF 的血管发生效应都是由 NO 介导的^[5]。这些证据提示,在 BPD 发病过程中 VEGF 和 eNOS 的表达是两个重要的因素,且二者之间有着密切的相互关系。本文通过动态观察持续中浓度氧暴露对早产鼠肺组织 VEGF 和 eNOS 表达的影响,探讨 BPD 发生的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

体重 250 g 左右清洁级 SD 大鼠 (由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供),雌雄鼠夜间合笼交配 (3:1),次日晨取雌鼠阴道分泌物涂片,镜检见精子,当日记为妊娠第 1 天。从孕 21 d 母鼠剖宫产获得早产鼠,12 h 内随机分为空气对照组和高氧实验组。

1.2 动物模型的制备

高氧组置于氧箱中,使氧浓度维持在 (60% ± 5%),每日用数字式测氧仪 (美国 OM225ME 型) 监测,用钙石灰吸收 CO₂,使其浓度小于 0.5%,温度 25 ~ 26 °C,湿度 60% ~ 70%,每天开箱 1 h,喂水及饲料,更换垫料,称重,与空气组互换母鼠以避免母鼠因氧中毒而致护理能力降低;空气组置于同一室内空气中 (氧浓度 21%),饲养条件与高氧组相同。

1.3 标本采集

第 1, 4, 7, 11, 14 天 分别从两组中各抽取 6 只,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉。气管插管保持肺充气状态,开胸放血, PBS 冲洗肺直至白色,左支气管结扎,迅速切取左肺,用冷生理盐水洗净残血,吸干水分,液氮速冻后存于 -80 °C 冰箱,用于 RT-PCR。右支气管注入 4% 多聚甲醛至肺尖膨胀,取右肺,置同一固定液中 4 °C 固定 12 h,常规石蜡包埋切片,连续切片,5 μm/片,用于苏木精-伊红染色和免疫组化检测。

1.4 病理学检查

常规制备石蜡切片 (5 μm),乙醇梯度脱水,苏木精-伊红染色,光镜下观察肺组织病理变化。

1.5 肺组织 VEGF 和 eNOS 免疫组织化学染色

SP 法, (北京中山生物技术公司 SP9001、SP9002 试剂盒),切片脱蜡至水,高压抗原修复,0.3% H₂O₂ 甲醇封闭 30 min,正常羊血清封闭 30 min,分别加入 1:100 稀释的小鼠抗大鼠 VEGF 一抗 (北京中山生物技术公司) 及 1:50 兔抗鼠 eNOS 一抗 (北京中山生物技术公司),4 °C 过夜,0.01 M PBS 充分洗涤后加入生物素标记的羊抗小鼠及羊抗兔 IgG,37 °C 孵育 30 min,加入辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 37 °C 30 min, DAB (北京中山生物技术公司) 镜下显色约 1 min。结果判定以细胞浆有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。苏木精轻度复染,脱水,透明,封片,镜下观察。阴性对照以 0.01 M PBS 替代一抗。每例随机抽取染色清晰的切片 5 张,每张切片于光镜下 (×200) 随机选取 5 个视野,固定窗口面积,利用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统,测定平均光密度以表示阳性产物的强度。

1.6 逆转录-聚合酶链反应

利用 Trizol 试剂 (上海生工生物工程技术服务有限公司) 提取肺组织总 RNA, DU530DNA/Protein 分析仪 (Beckman) 测定 RNA 浓度,逆转录反应体系为 2 μg 总 RNA, 1 μL Oligo (dT) 15, 1 μL dNTP Mix (10 mmol/L), 0.5 μL Rnasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/μL), 1 μL M-MuLV Reverse Transcriptase (Promega, 200 U/μL), 共 20 μL。VEGF 和 eNOS mRNA GeneBank 序列号分别为: NM_013062 和 NW_001084825。以 β-actin 为内参照。引物及其反应步骤见表 1。PCR 反应体系包括 2 μL cDNA, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 3 μL MgCl₂ (25 mmol/L), 1 μL dNTP Mix (10 mmol/L), 1 μL Taq 聚合酶 (1 U/μL), 共 50 μL。各取 10 μL 目的基因和内参照 PCR 产物 2.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL 溴化乙锭) 电泳 (60 V, 25 min, 美国 BIO-RAD 公司电泳仪)。利用凝胶成像分析系统 (美国 UVP 公司), 测定目的基因 PCR 产物条带与 β-actin PCR 产物条带的光密度, 计算两者比值作为目的基因的相对表达量。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 12.0 统计软件进行统计学处理,所有数据均以均数加减标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组间比较采用单因素方差分析,组间差异显著性采用 SNK 法检验。P < 0.05 判定为差异有显著性。

表1 VEGF、eNOS 和 β -actin 引物序列及 PCR 步骤

引物	产物大小(bp)	引物序列	PCR 反应步骤
β -actin	158 bp	上游 5'-ACCACCATGTACCCAGGCAT-3' 下游 5'-ATCTGCTGGAAGGTGGACAGT-3'	95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 56.8℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 终末延伸 10 min
VEGF	657 bp	上游 5'-CCACAGTGTCAGGCAGCTAA-3' 下游 5'-CCATGGTCCCACAGAGTCTT-3'	95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 53.7℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 终末延伸 10 min
eNOS	342 bp	上游 5'-CACGAGGACATTTTCGGACT-3' 下游 5'-TAGGCAAGCGCTTTACCACT-3'	95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 54.5℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 终末延伸 10 min

2 结果

2.1 肺组织病理学检查

与空气组相比,高氧暴露 1 d 时,新生鼠肺组织病理学改变不明显,高氧暴露 4 d 时表现为小血管扩张、充血,肺泡腔内出现大量以中性粒细胞为主的炎症细胞,肺间质内细胞增多;高氧暴露 7 d 时,肺泡内仍可见炎症细胞,肺间隔中度增宽,其中间质细胞及胶原样物质增生,肺组织结构紊乱。高氧暴露 11 d、14 d 时,肺泡数量明显减少,肺间隔明显增宽,其内成纤维细胞及胶原样物质明显增多,肺泡结构紊乱,部分萎陷,符合 BPD 的病理改变(图 1)。

2.2 高氧持续暴露后早产鼠肺组织 VEGF 蛋白和 mRNA 表达的变化

空气组大鼠 VEGF 蛋白主要在肺泡间隔表达,

在血管平滑肌和支气管上皮细胞也可见阳性染色,生后 1 d 主要以传导气道上皮为主,4 d 以后远端气道上皮表达增加,7 d 以后肺泡上皮和肺泡间隔明显增多,14 d 达高峰(图 2),以后持续高表达。VEGF mRNA 主要在肺泡间隔表达,以肺泡角处明显,在小气道上皮细胞偶有表达,在平滑肌细胞和血管内皮细胞没有表达。高氧组 VEGF 蛋白平均光密度 1 d 时与空气组 1 d 相比差异无显著性($P > 0.05$);其余在 4,7,11,14 d 高氧组表达均显著低于空气组($P < 0.05$),高氧组 VEGF mRNA 平均光密度 1 d 时与空气组相比差异无显著性,其余在 4,7,11,14 d 高氧组表达均显著低于空气组($P < 0.05$)。蛋白及 mRNA 表达与时间的关系如下:新生鼠高氧暴露第 4 天起,VEGF 蛋白和 mRNA 开始减少,并随着暴露时间的延长持续性降低,高氧组内不同天数组之间表达差异也有显著性($P < 0.05$)。见图 3。

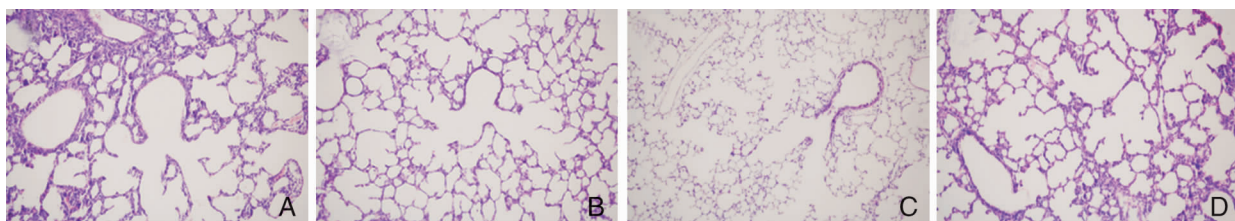


图1 两组新生大鼠肺组织苏木精-伊红染色($\times 200$)。A:空气组 1 d; B:高氧组 1 d,肺组织病理学改变不明显; C:空气组 14 d; D:高氧组 14 d,肺泡数量明显减少,肺间隔明显增宽,肺泡结构紊乱,部分萎陷。

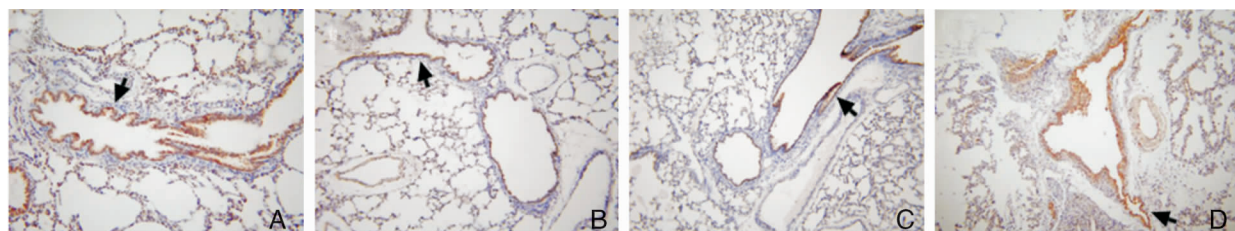


图2 两组新生大鼠肺组织组化染色($\times 200$)。A:14 d 空气组 VEGF 表达; B:14 d 高氧组 VEGF 表达; C:14 d 空气组 eNOS 表达; D:14 d 高氧组 eNOS 表达,分别可见高氧组的 VEGF 和 eNOS 表达比空气组有明显减少。

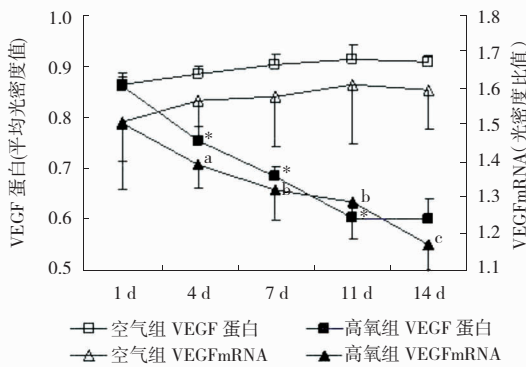


图3 两组新生大鼠1~14 d VEGF mRNA、蛋白表达水平。

横坐标为暴露天数,左侧纵坐标为蛋白表达水平,由平均光密度表示。右侧纵坐标为 mRNA 表达水平,由目的基因与 β -actin PCR 产物条带的光密度比值表示(“*”表示高氧组在 4 d,7 d,11 d 的表达与前一次测量相比,减少差异均有显著性。“a”表示高氧组 VEGFmRNA 的表达在 4 d 与 1 d 相比,“b”表示 7 d 和 11 d 与 4 d 相比,“c”表示 14 d 与 11 d 相比,减少差异均具有显著性)。

2.3 高氧持续暴露后早产鼠肺组织 eNOS 蛋白和 mRNA 表达的变化

空气组与高氧组 eNOS 表达均主要分布于气道上皮细胞及血管内皮细胞,高氧组肺泡巨噬细胞也有阳性表达,中性粒细胞无阳性染色(图2)。1 d 时高氧组与空气组 eNOS 蛋白表达无显著差别($P > 0.05$);4,7,14 d 时均较空气组低($P < 0.05$)。高氧组 eNOS mRNA 平均光密度 1 d 时与空气组相比无显著差异;4 d 及 14 d 时均较空气组 4 d 和 14 d 时低($P < 0.01$),见图4。高氧组 eNOS 蛋白和 mRNA 表达与时间的关系如下:新生鼠高氧暴露第4天起, eNOS 蛋白和 mRNA 表达开始减少,并随着暴露时间的延长进行性降低,在高氧暴露 14 d 时几乎检测不到 eNOS 蛋白和 mRNA 的表达,见图5。

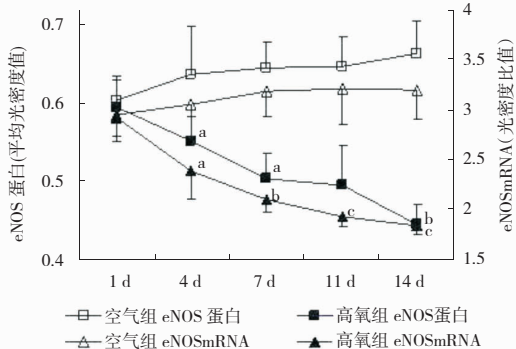


图4 两组新生大鼠1 d~14 d eNOS mRNA、蛋白表达水平。

横坐标为暴露天数,左侧纵坐标为蛋白表达水平,由平均光密度表示。右侧纵坐标为 mRNA 表达水平,由目的基因与 β -actin PCR 产物条带的光密度比值表示(高氧组 eNOS 蛋白表达折线中“a”表示在 4 d 和 7 d 时与 1 d 相比,“b”表示 14 d 与 11 d 相比,减少差异均具有显著性;高氧组 eNOSmRNA 表达折线中,“a”表示 4 d 与 11 d 相比,“b”表示 7 d 与 4 d 相比,“c”表示 11 d,14 d 与 7 d 相比,减少差异均具有显著性)。

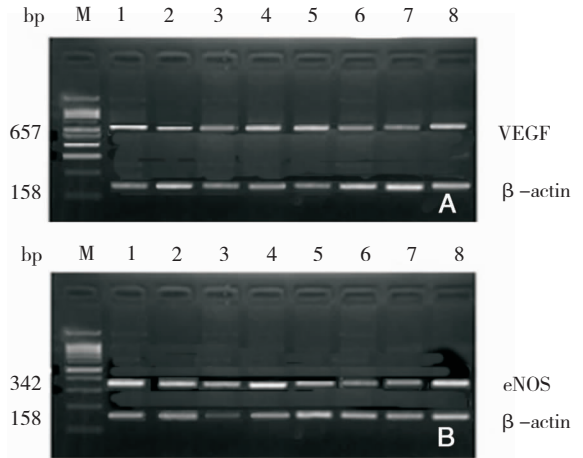


图5 各组新生大鼠肺组织目的基因表达情况。A 为 VEGF 基因;B 为 eNOS 基因。其中 M 道为 Marker,100 bp DNA ladder;2,3,5,6 和 7 道分别为 1 d,4 d,7 d,11 d 和 14 d 高氧组,1,5 和 8 分别为 1 d,7 d 和 14 d 空气组。其中 6,7 道条带亮度与 8 道相比显著降低。

3 讨论

BPD 是早产儿急性呼吸衰竭辅助通气和氧疗后常见的慢性肺部疾病^[6],约 60% 存活的早产儿发生慢性肺部疾病^[7]。已有大量研究证实,高氧暴露可导致肺部不同程度的急慢性损伤,但其发病机制并未完全阐明。建立合适的动物模型是研究高氧肺损伤的前提,而将早产鼠暴露于高氧环境可以提供非常有效的研究 BPD 发病机制的模型^[8,9]。中浓度持续(2 周)的高氧暴露模型更符合临床 BPD 的病理生理改变^[10]。本文利用早产新生大鼠 60% O_2 暴露模型探讨 BPD 发病机制。高氧暴露 1 d 时肺组织病理学改变与空气组无明显差别,高氧暴露 4 d 后开始出现炎症浸润和肺间质内细胞增多,7 d 时出现肺间隔增宽和肺组织结构紊乱。14 d 后高氧组的肺发育较空气组明显落后,肺泡数量减少,出现大而简化的肺泡,肺间质纤维化,肺组织有少许炎性细胞浸润,与临床 BPD 的病理改变类似。

从实验结果可看出,早产鼠在高氧暴露后,肺组织 VEGF 和 eNOS 的蛋白及 mRNA 表达与空气组相比均呈持续性降低。VEGF 是具有内皮细胞专一性的促细胞分裂剂和生长因子,它可以刺激血管发生并保护内皮细胞不受损伤^[11]。在肺发育早期过程中,VEGF 在调节上皮-内皮细胞之间相互作用中起着至关重要的作用^[12]。Jakkula 等^[13]发现,用 VEGF 治疗高氧肺损伤动物模型可以促进肺部内皮细胞的生长和存活,进而促进血管的生长,改善肺泡化过程。VEGF 基因治疗可以提高生存率,促进肺

的血管发生,并且可以预防高氧肺损伤中的肺泡损害^[14]。大量证据表明,VEGF 调控的血管发生,是正常肺发育过程中肺泡化所必需的,并且在肺发育初期阻滞 VEGF 将导致 BPD 的发生^[13]。研究还发现,通过对 VEGF 的调节,对以不可逆的肺泡结构丧失为特征的肺部疾病有潜在的治疗作用^[15]。在本实验早产鼠高氧暴露造成的 BPD 模型中,VEGF mRNA 和蛋白表达均呈现持续的降低,我们推断,高氧后迟发的肺部结构异常可能与持续性的 VEGF 信号传导通路异常有关。Jakkula 等^[13]发现给予新生鼠 VEGF 受体阻断剂 SU5416,能降低肺发育过程中肺泡化的程度和肺/体重比率,进一步证明了受损的 VEGF 信号通路阻滞了肺的发育。

我们的研究结果显示,高氧暴露后不仅有 VEGF 表达的降低,还有与之相平行的 eNOS mRNA 和蛋白的表达下降。而 VEGF 和 eNOS 两者之间的相互关系和共同作用,迄今仍未完全阐明。eNOS 是 NO 合成的限速酶,其主要作用是直接调节 NO 产物的生成及其生物学效应。研究表明,eNOS 和 NO 在体循环和肿瘤中 VEGF 诱导的血管发生中起着重要的作用^[16]。VEGF 可以通过调节 NO 的释放而对血管发生和肺泡化造成直接的影响^[17]。而 VEGF 诱导的血管发生也大部分是通过 NO 介导的,缺乏 eNOS 的鼠肺呈现出末梢微小动脉分支不足和肺静脉生长失调的肺泡管发育失调的表现^[3]。体外实验研究表明,VEGF 可以上调 eNOS 的表达并且使 NO 产物增多^[18],而用 eNOS 阻滞剂阻断 NO 的产生会明显的抑制 VEGF 诱导的促有丝分裂和血管发生作用。同样的结果在活体实验中也得到证实,在 eNOS 敲除小鼠模型中,eNOS 表达的缺失严重损害了 VEGF 诱导的血管发生^[19]。最近研究表明 NO 可能更多地参与调节血管生长和肺泡化^[20],在新生儿高氧肺损伤后 VEGF 信号传导通路紊乱以后,吸入 NO 却可以保护肺的正常发育^[21]。而先前在一些动物模型中的研究也显示,在高氧暴露期间吸入 NO 可以减少急性肺损伤,减轻氧化损伤和炎症,并且能减轻高氧损伤时的肺泡结构破坏^[22,23]。VEGF-NO 信号通路可能在大鼠出生后早期的肺发育中起着决定性的作用^[24]。

结合此次实验的结果,可以推断,VEGF 信号通路可能是通过调控 eNOS 的表达和 NO 产物的生成来调节肺泡和血管的发育,而在 BPD 的发病过程中,VEGF-NO 信号通路的受阻可能具有关键性的意义。早产鼠高氧 BPD 模型中的肺部结构异常,包括血管发育和肺泡化障碍的原因,可能是由于高氧中

肺内一些炎症因子的激活导致了 VEGF 的下调,致使 VEGF 信号传导通路受阻,因而导致 eNOS 的下调,继而减少其催化产物 NO 的释放。由于没有足够的 NO 参与调节血管生长和肺泡化以及提高内皮的功能,最终导致血管发生和肺泡化过程停滞,发生 BPD^[25,26]。VEGF 调节 eNOS 表达的机制目前尚不清楚,用 SU1498 阻断 KDR 受体酪氨酸激酶,能同时阻断 eNOS 的上调,从而提供了更多的证据表明可能是 KDR 受体调控了 eNOS 的上调^[19]。而高氧暴露具体如何导致 VEGF 表达持续降低潜在的机制目前也不清楚,可能与高氧诱导因子 2 (hypoxia-inducible factor 2-alpha, HIF-2a) 的表达受抑制有关,尚需要进一步的研究。^[27-29]

本文不足之处在于实验中所观察到的高氧诱发 VEGF 和 eNOS 肺组织内低表达的时间变化是未经呼吸机治疗的结果,与临床 BPD 有一定的差异;加之设计中没有干预,因此尚不能直接根据结果完全判定两者间的因果关系,仍需进一步的研究和探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia: "a vascular hypothesis." [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(10 Pt 1): 1755-1756.
- [2] Bhatt AJ, Pryhuber GS, Huyck H, Watkins RH, Metlay LA, Manciasco WM. Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and Tie-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(10 Pt 1):1971-1980.
- [3] Han RN, Babaei S, Robb M, Lee T, Ridsdale R, Ackerley C, et al. Defective lung vascular development and fatal respiratory distress in endothelial NO synthase deficient mice: a model of alveolar capillary dysplasia? [J]. *Circ Res*, 2004, 94(8): 1115-1123.
- [4] Tang JR, Markham NE, Lin YJ, McMurtry IF, Maxey A, Kinsella JP, et al. Inhaled nitric oxide attenuates pulmonary hypertension and improves lung growth in infant rats after neonatal treatment with a VEGF receptor inhibitor [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287(2): L344-L351.
- [5] Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B, Hewett P, Ahmed S, Ahmed A. VEGF-E activates endothelial nitric oxide synthase to induce angiogenesis via cGMP and PKG-independent pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(4): 1275-1282.
- [6] Bland RD, Albertine KH, Carlton DP, Kullama L, Davis P, Cho SC, et al. Chronic lung injury in preterm lambs: abnormalities of the pulmonary circulation and lung fluid balance [J]. *Pediatr Res*, 2000, 48(1): 64-74.
- [7] Jobe AJ. The new BPD: an arrest of lung development [J]. *Pediatr Res*, 1999, 46(6): 641-643.
- [8] Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispe JR. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 1998, 275(1 Pt 1): L110-L117.
- [9] 刘雪雁, 吴捷, 薛辛东. 高氧致新生鼠肺损伤时肾组织一氧

- 化氮及氧自由基的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(1): 71-74.
- [10] Han RN, Buch S, Tseu I, Young J, Christie NA, Frndova H, et al. Changes in structure, mechanics, and insulin-like growth factor-related gene expression in the lungs of newborn rats exposed to air or 60% oxygen[J]. *Pediatr Res*, 1996, 39(6): 921-929.
- [11] Risau W. Mechanisms of angiogenesis[J]. *Nature*, 1997, 386(6626): 671-674.
- [12] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial-growth factor[J]. *Endocr Rev*, 1997, 18(1): 4-25.
- [13] Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, Hirth KP, Tudor RM, Voelkel NF, et al. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279(3): L600-L607.
- [14] Thebaud 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[J]. *Circulation*, 2005, 112(16): 2383-2385.
- [15] Thebaud 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[J]. *Circulation*, 2005, 112(16): 2477-2486.
- [16] Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells[J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(12): 3131-3139.
- [17] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 669-676.
- [18] Young SL, Evans K, Eu JP. Nitric oxide modulates branching morphogenesis in fetal rat lung explants[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282(3): L379-L385.
- [19] Shen BQ, Lee DY, Zioncheck TF. Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(46): 33057-33063.
- [20] Balasubramaniam V, Tang JR, Maxey A, Plopper CG, Abman SH. Mild hypoxia impairs alveolarization in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284(6): L964-L971.
- [21] Tang JR, Markham NE, Lin YJ, McMurtry IF, Maxey A, Kinsella JP, et al. Inhaled nitric oxide attenuates pulmonary hypertension and improves lung growth in infant rats after neonatal treatment with a VEGF receptor inhibitor[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287(2): L344-L351.
- [22] Turanlahti M, Pesonen E, Lassus P, Andersson S. Nitric oxide and hyperoxia in oxidative lung injury[J]. *Acta Paediatr*, 2000, 89(8): 966-970.
- [23] Hu X, Guo C, Sun B. Inhaled nitric oxide attenuates hyperoxic and inflammatory injury without alteration of phosphatidylcholine synthesis in rat lungs[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2007, 20(1): 75-84.
- [24] Kunig AM, Balasubramaniam V, Markham NE, Morgan D, Montgomery G, Grover TR, et al. Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 289(4): L529-L535.
- [25] 杜靖, 杜立中, 蒋静静, 唐兰芳, 吴西玲. 一氧化氮吸入对新生鼠高氧肺损伤时表面活性蛋白 A 和肺甘露糖结合力的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(6): 486-490.
- [26] 杨群, 邵肖梅, 王晓宁, 郭春宝, 孙波. 吸入一氧化氮对早产猪未成熟肺的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(1): 54-58.
- [27] Leuwerke SM, Kaza AK, Tribble CG, Kron IL, Laubach VE. Inhibition of compensatory lung growth in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282(6): L1272-L1278.
- [28] 富建华, 薛辛东. 高氧致 CLD 早产鼠肺组织超微结构及其氧化应激反应的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2004, 6(1): 16-19.
- [29] 富建华, 薛辛东. 慢性肺疾病早产鼠肺组织转化生长因子 β_1 基因及蛋白表达的动态变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(3): 207-211.

(本文编辑: 吉耕中)