

超声引导注射骨髓间充质干细胞治疗胎兔支气管肺发育不良

赖芳萍¹, 吕国荣^{1,2}, 王大春³, 成文召³, 徐武¹, 石恒捷⁴, 何韶铮¹

摘要: **目的** 探讨超声引导下注射骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)治疗胎兔支气管肺发育不良(BPD)的作用及可能机制。 **方法** 检测 BM-MSCs 细胞表面标志物、三系分化能力、慢病毒包装与感染能力。将新西兰孕兔随机分为 A 组(正常组)、B 组(LPS 组)和 C 组(LPS+BM-MSCs 组),每组选取 3 只新西兰孕兔、10 只胎兔。于孕 23 d 在超声引导下 B、C 组经右肺组织注射脂多糖(LPS),A 组注射等量生理盐水。孕 27 d 超声引导下 A、B 组经右肺组织注射生理盐水,C 组注射 BM-MSCs。孕 29 d 后行剖宫产分离胎兔肺组织。采用苏木精-伊红(H-E)染色观察肺组织病理改变,RT-PCR 检测肺组织中白细胞介素 1β (IL- 1β)、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管内皮生长因子(VEGF)、肺泡表面活性蛋白 A(SPA)、肺泡表面活性蛋白 B(SPB)和肺泡表面活性蛋白 C(SPC) mRNA 的表达。 **结果** BM-MSCs 细胞表面标记物 CD29 和 CD44 阳性,CD11b/c 和 CD45 阴性,具有三系分化能力。慢病毒-增强型绿色荧光蛋白(EGFP)感染所有 rBM-MSCs 需 24 h。不同组别中,B 组肺组织辐射状肺泡计数(RAC)数量较 A 组明显减少;C 组肺组织 RAC 数量较 A 组稍减少,较 B 组稍增加,差别有统计学意义($P<0.05$)。与 A 组比较,B 组胎兔肺组织肺泡壁增厚,炎性细胞浸润,肺泡结构简化,数量减少,部分表现为充气不均匀;与 A 组比较,C 组胎兔肺组织肺泡壁稍增厚,肺泡少量炎性细胞浸润;与 B 组比较,C 组肺组织肺泡壁变薄,肺泡数量增多,炎性细胞浸润减少。与 A 组比较,B 组胎兔肺组织中 IL- 1β 、IL-6、IL-10、TNF- α 和 VEGF mRNA 的表达上升,C 组较 B 组表达下降;与 A 组比较,B 组胎兔肺组织中 SPA、SPB 和 SPC mRNA 的表达下降,C 组较 B 组表达上升,差别有统计学意义($P<0.05$)。 **结论** 超声引导下注射 LPS 可引起支气管肺发育不良,BM-MSCs 胎肺注射治疗可减轻肺组织病理变化,推测可能通过分泌各种因子减轻炎症反应,促进肺泡发育、损伤修复和血管重建。

关键词: 支气管肺发育不良; 超声; 脂多糖; 骨髓间充质干细胞治疗

文献标志码: A **文章编号:** 1672-4194(2023)04-0265-07

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是早产儿常见的慢性肺部疾病,也是影响早产儿生命安全的重要疾病之一^[1]。虽然随着新生儿重症监护技术的进步,早产儿生存率有所上升,但目前仍缺乏切实有效的治疗措施。近年来研究^[2]发现,细胞治疗在早产儿肺修复中具有重要前景。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是具有自我更新能力的多能非造血干细胞,广泛应用于类风湿关节炎、干燥综合征和乳腺癌等研究中,已有多项 MSCs 治疗早产儿 BPD 的临床试验^[3-6]。笔者拟通过超声引导下经胎兔肺组织注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)建立 BPD 动物模型,探讨经胎肺注射骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)对 BPD 的治疗作用,寻找临床 BPD 高风险胎儿产前干预治疗的新方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料 4.5 kg 清洁级健康新西兰孕兔[泉州医学高等专科学校,SYXK(闽)2016-0001]; LPS(美国 Sigma 公司);抗 CD11b/c(MA1-80091,中国赛默飞世尔科学公司);抗 CD45(MA5-28392,中国赛默飞世尔科学公司);抗 CD29(MAB1951,德国默克集团);抗 CD44(MA4400,中国赛默飞世尔科学公司)一抗;山羊抗小鼠 IgG Alexa Fluor 488(A-11001,中国赛默飞世尔科学公司)或山羊抗大鼠 IgG Alexa Fluor 488(A-11006,中国赛默飞世尔科学公司);分化试剂盒(中国 Cyagen 公司);脂质体 3000(美国 Invitrogen 公司);RNA 提取试剂盒、高通量 cDNA 逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒(中国康为世纪公司);白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肺泡表面活性蛋白 A(surfactant-associated protein A, SPA)、肺泡表面活性蛋白 B(surfactant-associated protein B, SPB)、肺泡表面活性蛋白 C(surfactant-associated protein C, SPC)引物(上海生工生物工程公司)。所有动物实验均获得福建医科大学附属第二医院机

收稿日期: 2023-03-01

资助项目: 福建省自然科学基金项目(2020J01220)

作者单位: 1. 福建医科大学 附属第二医院超声科,泉州 362000;

2. 泉州医学高等专科学校 超声科,泉州 362000;

3. 福建医科大学 附属第二医院干细胞实验室,泉州 362000;

4. 泉州市中医院 超声科,泉州 362000

作者简介: 赖芳萍,女,规培医师,医学硕士

通信作者: 何韶铮, Email: heshzh98@qq.com

构动物伦理使用委员会批准〔2020〕福医附二伦理审字〔52〕号)。

1.2 方法

1.2.1 BPD 动物新模型的制备 新西兰孕兔于孕 23 d 在超声检查下确定胎兔数量和位置,确认最佳穿刺部位和进针路线后,超声引导下经胎兔右肺组织注射 0.15 mL LPS (1 mg/mL),于孕 29 d 后剪取胎肺组织进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, H-E) 染色,观察肺组织病理学变化。

1.2.2 BM-MSCs 的制备 本研究采用全骨髓培养法。选用 3 月龄雄性新西兰大白兔。兔子饲养在单独的笼子里,在 12 h 光照和 12 h 黑暗的循环下自由饮食。3%戊巴比妥钠静脉麻醉后,在胫骨近端穿刺,用肝素注射器抽取 2 mL 骨髓液。用 8 mL 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 悬浮骨髓液,用 Ficoll 试剂在 $400\times g$ 20 °C 下密度梯度离心 30 min 获取细胞。收集单个核细胞白蛋白层,用 PBS 洗涤 3 次。细胞接种 10 mL α -必需培养基 (α -minimum essential medium, α -MEM),加入 10% FBS 和 1% PBS,置于直径为 10 cm 的培养瓶中,在 37 °C、体积分数为 0.05 的 CO₂ 培养箱培养。第 3 天完全更换培养基,去除所有非贴壁细胞。后每 2 d 更换培养基,直至贴壁细胞群达到 80%~90% 融合,加入 1:5 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸,保存细胞传代。

1.2.3 BM-MSCs 细胞表面标志物的流式细胞分析 细胞表面标记物采用流式细胞仪进行抗体染色。用 0.05% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸收集培养的兔骨髓间充质干细胞 (rabbit bone marrow mesenchymal stem cells, rBM-MSCs) (P3 期),用 PBS 洗涤,在 4 °C、 $200\times g$ 离心 5 min 沉淀。每个样本被等分成至少包含 10^6 个细胞。将细胞重悬于 50 μ L 兔血清中阻断 Fc 受体,用抗 CD11b/c、抗 CD45、抗 CD29 和抗 CD44 一抗孵育细胞。荧光偶联二抗使用山羊抗小鼠 IgG Alexa Fluor 488 或山羊抗大鼠 IgG Alexa Fluor 488 进行双染色。在 4 °C 下与一抗、二抗和适当的同型对照孵育 30 min。清洗后用流式细胞仪对细胞进行分析。

1.2.4 BM-MSCs 分离细胞的三系分化 根据分化试剂盒说明书,使用分化试剂盒评估 P3 期 rBM-MSCs 的成脂、成软骨和成骨分化潜力。将细胞以 5×10^5 的密度接种于明胶打印的 6 孔板中,在含 10% 胎牛血清的基础培养基中单层培养至 90% 融合,用成脂分化培养基和成骨分化培养基替换培养基培养 14~21 d,每 3 d 更换 1 次培养基。在结

束时进行分化评估,细胞用 10% 甲醛固定 10 min,用 PBS 洗涤 3 次,用油红-O 染色 15 min,评估脂质形成对脂肪形成的影响;或茜素红 S 染色 30 min,评估矿物沉积对成骨的影响。采用球体培养系统评估 rBM-MSCs 的软骨分化。 1×10^6 细胞在 15 mL 离心管中离心 ($150\times g$ 离心 5 min),置于 1 mL 软骨形成培养基中。球体培养维持 28 d,每 2 d 更换 1 次培养基。将球体培养物在 4 °C 的固定液中浸泡过夜。经酒精和石蜡包埋梯度脱水后,将微球切成 5 μ m 段,放在聚赖氨酸包覆的载玻片上,用甲苯胺蓝 (一种异色染色剂) 对糖胺聚糖进行染色。

1.2.5 慢病毒包装及感染 采用慢病毒 pCSII-CMV-EGFP 载体系统在 rBM-MSCs 中表达增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP)。对于慢病毒的包装,用 9 μ g pCMV- Δ 8/9、9 μ g pCSII-CMV-EGFP 和 4.5 μ g pVSV-g 在直径为 10 cm 的培养瓶中转染 293T 细胞,使用脂质体 3 000。慢病毒 48 h 收集上清,4 °C $25\,000\times g$ 离心浓缩 2.5 h。慢病毒 40 mL 上清液与 1 mL α -MEM 培养基重悬。在含有 rBM-MSCs 的培养瓶中添加 4 μ g/mL 聚凝胺,进行 50 μ L 的慢病毒感染。

1.2.6 动物分组及超声引导介入治疗 将新西兰孕兔随机分为 A 组 (正常组)、B 组 (LPS 组) 和 C 组 (LPS+BM-MSCs 组),每组选取 3 只新西兰孕兔、10 只胎兔,于孕 23 d 在超声检查下确定胎兔数量和位置,确认最佳穿刺部位和进针路线后,超声引导下 B、C 组胎兔经右肺组织注射 LPS (1 mg/mL) 0.15 mL, A 组注射等量生理盐水。孕 27 d 超声引导下 A、B 组胎兔经右肺组织注射生理盐水, C 组注射 BM-MSCs (1×10^7 个/胎),注药后超声观察确认药物弥散 (图 1)。于孕兔妊娠第 29 天后,行剖宫产取出胎兔,记录每只母兔产下新生兔数量。



箭头为药物弥散。

图 1 超声引导下注射药物

Fig. 1 Ultrasound-guided drug injection

1.2.7 动物肺组织标本采集与处理 实验胎兔剪取左肺下叶,经固定、脱水、浸蜡、包埋和切片等步骤制作成肺组织切片,每只新生兔随机抽取10张切片,常规H-E染色。显微镜下观察肺组织病理学变化。每组随机抽取10张切片,测量辐射状肺泡计数(radical alveolar counts, RAC):在每个视野中从细支气管中心至最近的纤维隔或胸膜做垂直连线,对该直线上的肺泡进行计数,作为胎兔RAC值。留取右肺组织做实时荧光定量PCR,根据RNA提取试剂盒说明书,提取总RNA,并进行纯度与浓度的

测定,根据高通量cDNA逆转录试剂盒说明书,获得逆转录产物。以管家基因*GAPDH*作为内参组(图2),每组做2个重复孔,总反应体系为10 μ L,置于7500荧光定量PCR仪中进行扩增反应,95 $^{\circ}$ C预变性10 min,95 $^{\circ}$ C变性10 s,55 $^{\circ}$ C退火20 s,40个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 s,测定不同样本*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-10*、*TNF- α* 、*VEGF*、*SPA*、*SPB*和*SPC* mRNA表达拷贝数。进一步比较不同组别目的基因mRNA表达量的差别。目的基因mRNA的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

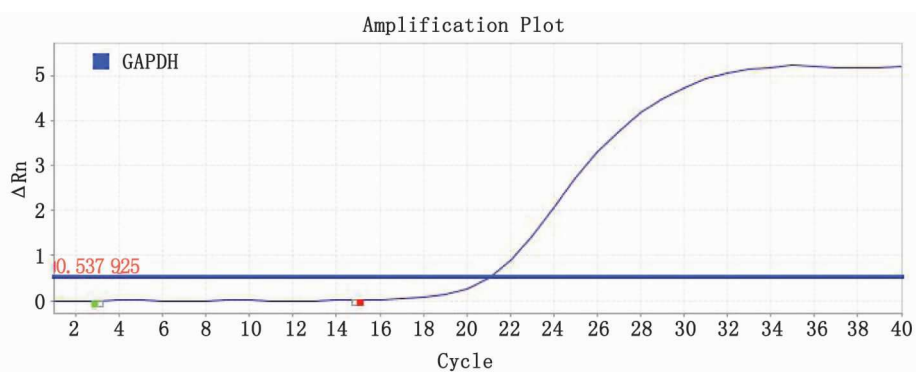


图2 实时荧光定量PCR

Fig.2 Real-time fluorescence quantitative PCR

1.3 统计学处理 采用GraphPad Prism 7、SPSS 23.0统计软件分析数据。计量资料以 $\bar{X} \pm S$ 表示,不同组别采用方差分析,各组间两两比较采用两独立样本*t*检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞分析 对rBM-MSCs进行抗体染色,清洗后用流式细胞仪分析与同型对照,rBM-MSCs细胞表面标记物有阳性和阴性两种,CD29和CD44两项标记物阳性,CD11b/c和CD45阴性(图3A),证实其为rBM-MSCs。

2.2 三系分化细胞分析 通过14~28 d的分化培养,用适当的染料对细胞进行染色,以证明其分化为成脂、成软骨和成骨谱系。以上结果通过显示含有脂滴的脂肪细胞被油红-O染色,通过1%阿利新蓝溶液中糖胺聚糖染色显示发育成软骨细胞,以及通过茜素红S染色显示骨细胞分化的钙沉积得到证实(图3B)。

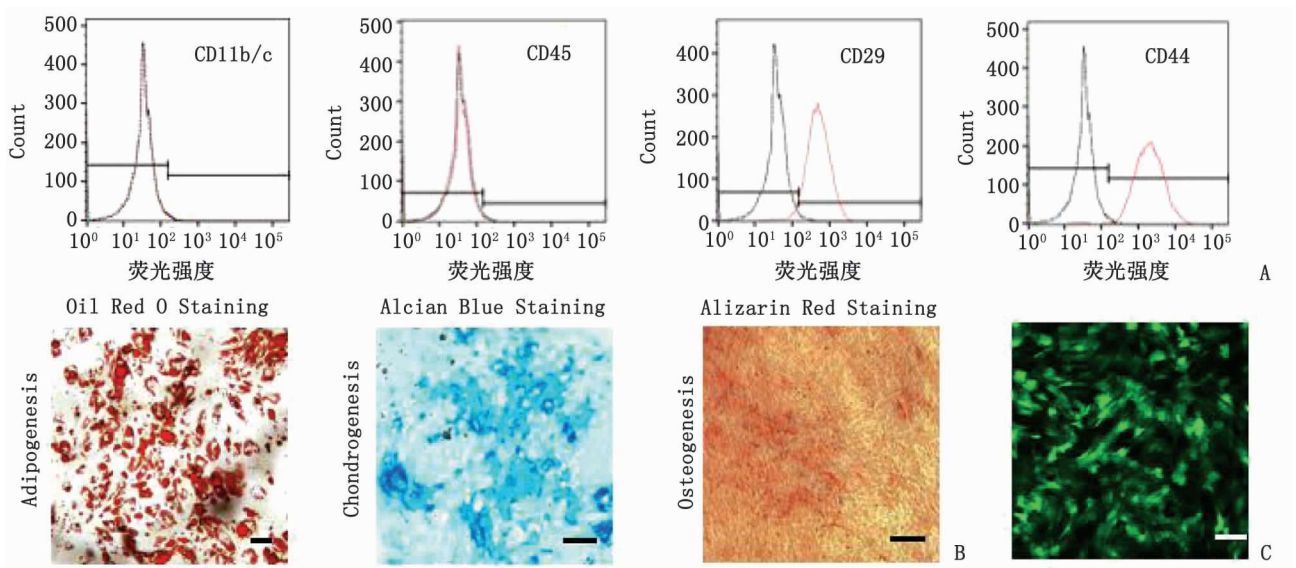
2.3 EGFP在rBM-MSCs中的表达 通过50 μ L的慢质-EGFP感染10 cm培养皿中的rBM-MSCs,连续观察rBM-MSCs的过程,可见感染所有

rBM-MSCs需24 h,证实通过荧光蛋白染色后24 h,细胞中可见rBM-MSCs(图3C)。

2.4 不同组别肺组织肺泡RAC比较 与A组比较,B组肺组织肺泡RAC数量明显减少,差别有统计学意义($P < 0.05$);与A组比较,C组肺组织肺泡RAC数量稍减少,差别有统计学意义($P < 0.05$);与B组比较,C组肺组织肺泡RAC数量稍增加,差别有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 肺组织病理学变化 A组为正常肺组织。与A组比较,B组肺组织肺泡壁增厚,炎性细胞浸润,肺泡结构简化,数量减少,部分表现为充气不均匀;与A组比较,C组肺组织肺泡壁稍增厚,少量炎性细胞浸润,未恢复至正常肺组织表现;与B组比较,C组肺组织肺泡壁变薄,肺泡数量增多,炎性细胞浸润减少,病变程度减轻(图4)。

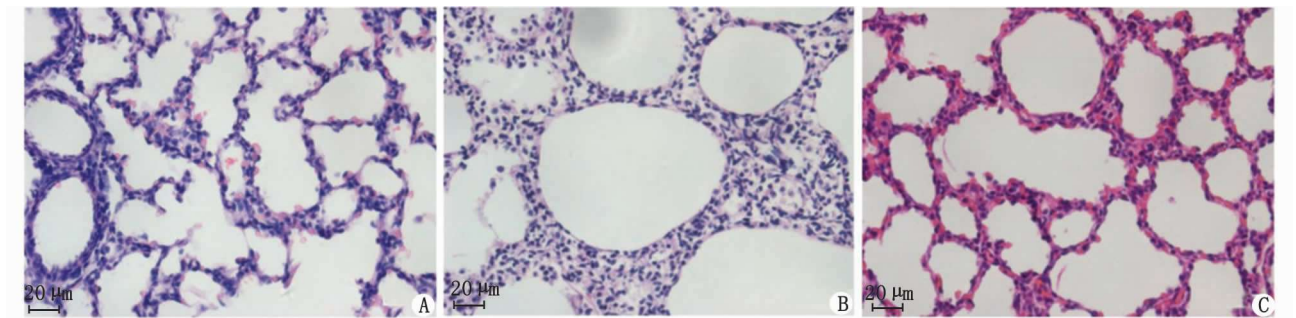
2.6 肺组织炎性因子、VEGF、SPA、SPB和SPC mRNA的表达 与A组比较,B组胎兔肺组织中*IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-10*、*TNF- α* 和*VEGF* mRNA的表达上升,C组较B组表达下降;与A组比较,B组胎兔肺组织中*SPA*、*SPB*和*SPC* mRNA的表达下降,C组较B组表达上升,差别有统计学意义($P < 0.05$,表1)。



BM-MSCs:骨髓间充质干细胞;EGFP:增强型绿色荧光蛋白;rBM-MSCs:兔骨髓间充质干细胞;Adipogenesis:成脂;Chondrogenesis:成软骨;Osteogenesis:成骨;Oil Red O Staining:油红-O 染色;Alcian Blue Staining:阿利新蓝染色;Alizarin Red Staining:茜素红 S 染色。A:流式细胞仪检测兔 BM-MSCs 表面抗原 CD11b/c、CD45、CD29 和 CD44 特异性抗体;B:BM-MSCs 成脂分化、软骨分化和成骨分化的代表性图像;C:慢质-EGFP 感染 rBM-MSCs 的代表性图像 24 h。

图 3 BM-MSCs 的免疫表型分析和三谱系评估

Fig. 3 Immunophenotypic analysis and tri-lineage assessment of BM-MSCs



LPS:脂多糖;BM-MSCs:骨髓间充质干细胞。A:A 组(正常组);B:B 组(LPS 组);C:C 组(LPS+BM-MSCs 组)。

图 4 不同组别胎兔肺组织病理改变(H-E 染色 ×400)

Fig. 4 Pathological changes of lung tissue in different groups of fetal rabbits(H-E staining ×400)

表 1 不同组间肺组织 *IL-1β*、*IL-6*、*IL-10*、*TNF-α*、*VEGF*、*SPA*、*SPB* 和 *SPC* 的 mRNA 表达

Tab. 1 The mRNA level of *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10*, *TNF-α*, *VEGF*, *SPA*, *SPB*, and *SPC* in lung tissue in different groups

分组	<i>IL-1β</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-10</i>	<i>TNF-α</i>	<i>VEGF</i>	<i>SPA</i>	<i>SPB</i>	<i>SPC</i>
A 组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
B 组	2.78±0.10 [△]	1.38±0.01 [△]	1.92±0.04 [△]	1.74±0.02 [△]	1.49±0.01 [△]	0.56±0.02 [△]	0.80±0.02 [△]	0.48±0.00 [△]
C 组	1.93±0.10 ^{△▲}	1.02±0.01 [▲]	1.56±0.01 [▲]	1.30±0.02 ^{△▲}	0.92±0.00 [▲]	1.92±0.06 [▲]	2.47±0.05 ^{△▲}	1.75±0.00 ^{△▲}

表中数据为 $\bar{X} \pm S$ 。n=10。LPS:脂多糖;BM-MSCs:骨髓间充质干细胞;*IL*:白细胞介素;*TNF-α*:肿瘤坏死因子-α;*VEGF*:血管内皮生长因子;*SPA*:肺泡表面活性蛋白 A;*SPB*:肺泡表面活性蛋白 B;*SPC*:肺泡表面活性蛋白 C。A 组:正常组;B 组:LPS 组;C 组:LPS+BM-MSCs 组。与 A 组比较,△:P<0.05;与 B 组比较,▲:P<0.05。

3 讨 论

BPD 是在多种产前和产后因素的干扰下,肺泡和肺血管发育受阻和损伤导致的慢性肺疾病,指新生儿出生后氧依赖超过 28 d、X 射线胸片异常或纠

正胎龄 36 周仍需持续用氧^[7-8]。关于 BPD 发病机制的研究发现,其危险因素包括宫内生长受限、氧化应激、先兆子痫、宫内感染、绒毛膜羊膜炎、机械通风、液体超负荷、动脉导管未闭、母亲吸烟、特定的营养不足、产后炎症和表观遗传因素等^[9-10]。目前关

于BPD动物实验模型主要是通过高氧暴露法、低氧诱导法、宫内炎症诱导法、石棉诱导、博莱霉素诱导法、内毒素暴露法、机械通气损伤法和转基因法等,其中最典型为宫内炎症诱导法和内毒素暴露法,其通过羊膜腔注射途径给药^[11]。赖为桢等^[12]发现,超声引导下经胎兔肺组织注射肺表面活性物质可有效预防早产兔肺损伤,且其效果高于羊膜腔注射。笔者在超声引导下经胎兔肺组织注射LPS建立BPD模型,孕23 d经胎肺组织注射LPS(1 mg/mL)后,其病理为肺组织肺泡壁增厚、炎性细胞浸润、肺泡结构简化、数量减少和部分表现为充气不均匀,且BPD组RAC较正常组下降,验证在孕兔妊娠晚期经胎肺组织注射LPS诱导建立BPD模型的可行性,且成功率较高。

MSCs在急性肺损伤、糖尿病等疾病中的治疗作用已被证实,是治疗肺损伤最有希望的干细胞类型之一^[13-14]。MSCs可以通过分泌多种抗炎因子、生长因子、免疫抑制分子、外泌体、趋化因子、补体和各种代谢物来调节机体的免疫反应,促进损伤肺组织修复^[15]。本研究证实提取BM-MSCs成功,且其具有分化功能。产前超声引导下胎肺注射BM-MSCs可减少BPD病变的程度,超声情况下可观察到稍高回声从注射部位向周边蔓延。本研究结果显示,IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 和VEGF mRNA在BPD胎兔肺组织中表达升高,而经BM-MSCs治疗后表达下降;SPA、SPB和SPC mRNA在BPD胎兔肺组织中表达下降,而经BM-MSCs治疗后表达上升。IL-1 β 、IL-6是炎症因子,可由巨噬细胞单核细胞和淋巴细胞等多种细胞产生;IL-10是抗炎因子,可由巨噬细胞、单核细胞、B细胞和活化的T细胞等分泌;TNF- α 是促炎细胞因子,可由巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞、NK细胞和CD4⁺T细胞等分泌,四者均参与免疫调节、炎症过程。IL-1 β 、IL-6和TNF- α 高表达表示体内出现炎症反应,破坏周围组织;IL-10高表达可抵抗机体炎症反应,减轻其对周围组织的破坏,BPD机体出现炎症反应,四者表达上升,当机体炎症缓解后,其表达下降。因此,BM-MSCs可能通过抗炎作用来减少BPD的损伤程度。此外,BM-MSCs可通过归巢功能到达损害的器官并分化为肺血管内皮细胞,提高VEGF的表达水平^[16]。VEGF是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子,可在体内诱导血管新生,VEGF高表达可促进血管新生和缺血组织供血重建,BPD时肺泡、肺血管损伤及发育受阻,其表达上升促进血管修复。

产前胎肺组织注射BM-MSCs可增加SPA、SPB和SPC mRNA的表达,RAC明显增多,这可能是由于BM-MSCs可降低转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)的表达水平,TGF- β 1与II型肺泡上皮细胞的表达相关,且BM-MSCs具有向组织特异性细胞分化的潜能,可在炎症、放射等条件下向II型肺泡上皮细胞分化^[17-18]。SPA、SPB和SPC是II型肺泡上皮细胞分泌的肺表面活性物质,是肺泡发育成熟的标志,SPA、SPB和SPC mRNA可促进肺组织发育成熟。因此,笔者推测BM-MSCs可能通过分泌各种因子减轻炎症反应,促进肺泡发育和肺组织修复,增加肺血管重建,逆转BPD导致的肺组织损伤,对BPD的产前干预治疗有效。

参考文献:

- [1] DASSIOS T, WILLIAMS E, HICKEY A, et al. Mortality after 36 weeks postmenstrual age of extremely preterm infants in neonatal care: The impact of growth impairment and bronchopulmonary dysplasia [J]. Early Hum Dev, 2022, 171: 105618.
- [2] WEISS D J, CHAMBERS D, GIANGRECO A, et al. An official American Thoracic Society workshop report: Stem cells and cell therapies in lung biology and diseases [J]. Ann Am Thorac Soc, 2015, 12(4): S79-97.
- [3] GHORYANI M, SHARIATI-SARABI Z, TAVAKKOL-AF-SHARI J, et al. Amelioration of clinical symptoms of patients with refractory rheumatoid arthritis following treatment with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells: A successful clinical trial in Iran [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1834-1840.
- [4] YAO G H, QI J J, LIANG J, et al. Mesenchymal stem cell transplantation alleviates experimental Sjögren's syndrome through IFN- β /IL-27 signaling axis [J]. Theranostics, 2019, 9(26): 8253-8265.
- [5] 贾文婷, 陈国福, 张雪鹏, 等. ADAM17-shRNA转染的BMSCs对乳腺癌移植瘤ADAM17/EGFR和Ki-67的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(4): 589-595.
- [6] 黄高展, 刘春华. 间充质干细胞治疗早产儿支气管肺发育不良的研究进展 [J]. 汕头大学医学院学报, 2022, 35(2): 123-125.
- [7] ENDO T, SAMPEI M, FUKUDA S. Kangaroo mother care alters chromogranin A and perfusion index in preterm babies [J]. Pediatr Int, 2021, 63(1): 53-59.
- [8] JOBE A H, BANCALARI E. Bronchopulmonary dysplasia [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(7): 1723-1729.
- [9] CAI H W, JIANG L, LIU Y S, et al. Development and verification of a risk prediction model for bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants [J]. Transl Pediatr, 2021, 10(10): 2533-2543.

- [10] 贾昕,梅花,张钰恒,等. 早产儿支气管肺发育不良的危险因素研究进展[J]. 中国小儿急救医学,2016,23(10):707-710.
- [11] 邵冠楠,游雪琴,汪吉梅. 新生儿支气管肺发育不良动物模型建立方法概述[J]. 中华新生儿科杂志(中英文),2020,35(1):68-72.
- [12] 赖为怪,何韶铮,郑新颖,等. 超声引导下注射肺表面活性物质预防早产兔肺损伤的实验研究[J]. 临床超声医学杂志,2020,22(12):881-884.
- [13] CAPLAN A I. Mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 1991,9(5):641-650.
- [14] KO J Z H, JOHNSON S, DAVE M. Efficacy and safety of mesenchymal stem/stromal cell therapy for inflammatory bowel diseases: An up-to-date systematic review[J]. Biomolecules,2021,11(1):82.
- [15] 岳银艳,刘帅. 间充质干细胞对支气管肺发育不良防治的研究进展[J]. 国际生物制品学杂志,2022,45(2):116-120.
- [16] 赵晓建,卢彩平,褚伟伟,等. 间充质干细胞归巢到大鼠肺气肿组织分化为肺血管内皮细胞[J]. 中国组织工程研究,2017,21(29):4728-4733.
- [17] 王俊艳,许建英. 骨髓间充质干细胞对肺气肿大鼠转化生长因子 $\beta 1$ 和肿瘤坏死因子 α 表达的影响[J]. 国际呼吸杂志,2015,35(5):351-357.
- [18] LIANG Y, YIN C P, LU X, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells protect lungs from smoke inhalation injury by differentiating into alveolar epithelial cells *via* Notch signaling[J]. J Biosci,2019,44(1):2.

The Study of Ultrasound Guidance Injection of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Treat Fetal Rabbit Bronchopulmonary Dysplasia

LAI Fangping¹, LYU Guorong^{1,2}, WANG Dachun³, CHENG Wenzhao³,
XU Wu¹, SHI Hengjie⁴, HE Shaozheng¹

1. Department of Ultrasonic Medicine, The Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China;

2. Department of Ultrasonic Medicine, The Quanzhou Medical College, Quanzhou 362000, China;

3. Stem Cell Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China;

4. Department of Ultrasonic Medicine, Quanzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Quanzhou 362000, China

ABSTRACT: **Objective** To investigate the role and possible mechanism of ultrasound-guided injection of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) for treatment of fetal rabbit bronchopulmonary dysplasia. **Methods** Detection of BM-MSCs cell surface markers, three-line differentiation ability, lentivirus packaging and infection ability. Pregnant New Zealand rabbits were randomly divided into group A (normal), group B (LPS) and group C (LPS + BM-MSCs), with 3 pregnant New Zealand rabbits in each group and 10 fetal rabbits in each group. On the 23rd day of gestation in New Zealand pregnant rabbits, lipopolysaccharide (LPS) was injected into the right lung tissue of fetal rabbits in groups B and C under the guidance of ultrasound, and the same amount of normal saline was injected into group A. Under ultrasound guidance on the 27th day of pregnancy, each fetal rabbit in group A and group B was injected with normal saline through right lung tissue, and each fetal rabbit in group C was injected with BM-MSCs through right lung tissue. After 29 days of pregnancy, through a cesarean section separated lung tissue from fetal rabbit. The pathological changes of the lung tissue were evaluated by hematoxylin-eosin (H-E) staining, and mRNA expression of *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- α* , *VEGF*, *SPA*, *SPB*, and *SPC* was detected by RT-PCR. **Results** The surface markers of BM-MSCs were positive for CD29 and CD44, and negative for CD11b/c and CD45. BM-MSCs had the ability of three-line differentiation. It took about 24 hours for all rBM-MSCs to be infected by lentiviruses expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP). In different groups, the number of RAC in group B was significantly reduced compared with group A; the number of RACs in group C was slightly reduced compared with group A. The number of RAC in group C was slightly increased compared to group B. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with group A, the fetal rabbit lung tissue in group B alveolar wall was thickened, inflammatory cells infiltrated, the alveolar structure simplified, the number reduced, and some manifestations were uneven inflatable. Compared with group A, the fetal rabbit lung tissue in group C

alveolar wall was slightly thickened, and inflammatory cells infiltrated. Compared with group B, the fetal rabbit lung tissue in group C alveolar wall became thinner, the number of alveolar increased, and the inflammatory cell infiltration reduced. Compared with group A, the expression of *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- α* , and *VEGF* mRNA in the lung tissue of fetal rabbits in group B increased, while the expression decreased in group C compared with group B. Compared with group A, the expression of *SPA*, *SPB*, and *SPC* mRNA in the lung tissue of fetal rabbits in group B decreased, and the expression in group C increased compared with group B. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Ultrasound guided injection of lipopolysaccharide can cause bronchopulmonary dysplasia, and BM-MSCs fetal lung injection therapy can alleviate pathological changes in lung tissue. It is speculated that various factors may be secreted to alleviate inflammation, promote alveolar development, injury repair, and vascular reconstruction.

KEY WORDS: bronchopulmonary dysplasia; ultrasound; lipopolysaccharide; bone marrow mesenchymal stem cells therapy

(编辑:张慧茹)

读者-作者-编者

中国医药卫生“核心期刊”标准专家共识(第一版)

1. 没有政治错误,增强“四个意识”,坚定“四个自信”,做到“两个维护”。
2. 具有 CN 和 ISSN(刊登在杂志指定位置)。
3. 具有相关领域专家组成的编辑委员会(名单每年刊登 1~2 次)。
4. 具有明确、固定的编辑部地址,包括联系方式及符合要求的编辑人员和办公条件,具有固定的投稿平台和网站。
5. 发表的论文有 1~2 位同专业评审专家评审且同意发表。同等条件下,发表的论文文末标明评审专家姓名的杂志优先(指同意发表的专家,不同意发表的专家姓名不刊登)。
6. 发表论文的文末标明本文责任编辑的姓名。
7. 具有严格的不端行为检测制度,发表论文整体复制比 $<30\%$,单篇复制比 $<15\%$ 。
8. 有完善的编辑部管理制度及论文“三审五定”的操作流程规定。
9. 学术、技术类期刊年发文量小,按 240 页月刊计算,每期不多于 100 篇。
10. 经期刊所在学科领域专家评审认可,或在本学科排序位于前五分之四。
11. 论文相关资料和数据,包括单位介绍信、实验数据、实验图片、专家审稿意见等必须上传期刊投稿平台备查,以防学术造假。
12. 期刊学术质量指数排名在前 80% 范围内,促进学术交流和知识传播。