

• 论著 •

# 脐带间充质干细胞对早产大鼠支气管肺发育不良肺组织 DNA 甲基化的影响

李聪<sup>1</sup> 陈姗姗<sup>1</sup> 朱华甦<sup>1</sup> 黄金献<sup>1</sup> 李栋<sup>2</sup> 时庆<sup>2</sup> 鞠秀丽<sup>1,2</sup>

(1 山东大学齐鲁医院儿科, 山东 济南 250012; 2 山东大学干细胞与再生医学研究中心)

**[摘要]** **目的** 探讨脐带间充质干细胞(U-MSCs)对早产大鼠支气管肺发育不良(BPD)肺组织 DNA 甲基化的影响。**方法** 提取 U-MSCs 进行培养,并行表型鉴定与三系分化能力检测。将早产大鼠随机分为 BPD 建模组(含体积分数 0.95 氧处理)和对照组(C 组,含体积分数 0.21 氧处理)。处理 9 d 后将 BPD 建模组大鼠随机分为 PBS 治疗组(A 组)和 U-MSCs 治疗组(B 组),正常空气中的大鼠作为 C 组。A 组每只大鼠通过尾静脉注射磷酸盐缓冲液(PBS)100  $\mu$ L, B 组每只大鼠通过尾静脉注射含  $2 \times 10^8$  个 U-MSCs 的悬液 100  $\mu$ L, C 组每只大鼠通过尾静脉注射 PBS 100  $\mu$ L,每隔 3 d 注射 1 次,共注射 2 次。治疗 8 d 以后收集 A、B、C 组的肺组织进行 DNA 甲基化的检测。**结果** 提取的 U-MSCs 高度表达 U-MSCs 表面标记物 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 和 CD166,而不表达 CD31、CD45 和 HLA-DR,并且具有成骨、成脂和成软骨的能力。B 组大鼠生长发育水平和活动度明显高于 A 组,肺组织损伤程度和炎细胞浸润水平显著低于 A 组。与 C 组相比较, A 组中 *A1bg*、*Guca1b*、*Hoxa6*、*LOC500331*、*Alox12*、*Arid4b*、*Btnl8*、*Cldn18*、*Clstn1*、*Defb22*、*Gpatch11*、*Lep*、*Lsm4*、*Mboat7*、*Mgat5*、*Olr1689*、*Olr1707*、*Olr556*、*Psmb8*、*Rbm14*、*RGD1561039* DNA 甲基化水平明显下降( $F = 24.98 \sim 1546.46$ ,  $P < 0.05$ ), B 组与 A 组相比,以上 DNA 的甲基化水平明显回升,差异有显著性( $P < 0.05$ );而 B 组与 C 组相比除 *Hoxa6*、*LOC500331* DNA 甲基化水平下降外,其他基因的甲基化水平比较差异无显著性( $P > 0.05$ )。**结论** BPD 模型中存在 DNA 甲基化情况。U-MSCs 可能通过影响 BPD 肺组织 DNA 的甲基化水平影响疾病的发展。

**[关键词]** 间充质基质细胞;脐带;支气管肺发育不良;DNA 甲基化;大鼠

**[中图分类号]** R563.9;R394 **[文献标志码]** A

**EFFECT OF UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS ON DNA METHYLATION IN THE LUNG TISSUE OF PRETERM RATS WITH BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA** LI Cong, CHEN Shanshan, ZHU Huasu, HUANG Jinxian, LI Dong, SHI Qing, JU Xiuli (Department of Pediatrics, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the effect of umbilical cord mesenchymal stem cells (UMSCs) on DNA methylation in the lung tissue of preterm rats with bronchopulmonary dysplasia (BPD). **Methods** UMSCs were extracted for culture, and phenotypic identification and assessment of three-line differentiation ability were performed. Preterm rats were randomly divided into BPD modeling group (treated with oxygen at a volume fraction of 0.95) and control group (treated with oxygen at a volume fraction of 0.21). After 9 days of treatment, the rats in the BPD modeling group were randomly divided into PBS treatment group (group A) and UMSCs treatment group (group B), and the rats in normal air were used as control group (group C). The rats in group A were injected with 100  $\mu$ L phosphate buffered saline (PBS) via the tail vein, those in group B were injected with 100  $\mu$ L suspension containing  $2 \times 10^8$  UMSCs via the tail vein, and those in group C were injected with 100  $\mu$ L PBS via the tail vein; injection was performed once every 4 days, with a total of 2 injections. On day 8 after the treatment started, lung tissue samples were collected from groups A, B, and C for DNA methylation detection. **Results** The extracted UMSCs had high expression of the UMSC surface markers CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, and CD166, with no expression of CD31, CD45, and HLA-DR, and had the osteogenic, adipogenic, and chondrogenic abilities. Compared with group A, group B had significantly higher level of growth and development and degree of activities, as well as significantly lower degree of lung tissue damage and level of inflammatory cell infiltration. Compared with group C, group A had significant reductions in the DNA methylation levels of *A1bg* *Guca1b*, *Hoxa6*, *LOC500331*, *Alox12*, *Arid4b*, *Btnl8*, *Cldn18*, *Clstn1*, *Defb22*, *Gpatch11*, *Lep*, *Lsm4*, *Mboat7*, *Mgat5*, *Olr1689*, *Olr1707*, *Olr556*, *Psmb8*, *Rbm14*, and *RGD1561039* ( $F = 24.98 \sim 1546.46$ ,  $P < 0.05$ ), while group B had significant increases in these levels compared with group A ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the methylation level of other genes except

*Hoxa6*, *LOC500331* in group B when compared with group C ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** There is DNA methylation in the BPD model. UMSCs can influence disease progression by affecting DNA methylation level in BPD lung tissue.

**[收稿日期]** 2019-09-19; **[修订日期]** 2019-10-18

**[基金项目]** 山东省重点研发计划(2017GSF18155, 2017-GSF218015);济南市自然科学基金(201704066);山东省自然科学基金(ZR2018MH012)

**[通讯作者]** 鞠秀丽, Email: jxlqlyy@163.com

**[KEY WORDS]** Mesenchymal stromal cells; Umbilical cord;

Bronchopulmonary dysplasia; DNA methylation; Rats

支气管肺发育不良(BPD)是早产儿的主要并发症,可导致终身呼吸道疾病<sup>[1]</sup>。BPD 主要继发于宫内炎症、感染以及产后机械通气<sup>[2]</sup>,主要特征是肺泡和肺血管发育受损<sup>[3]</sup>。近年来的研究发现,BPD 与 DNA 甲基化相关<sup>[2-4]</sup>。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基化转移酶的作用下,在基因组 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5' 碳位共价键结合一个甲基基团,是表观遗传学中最常见的一些修饰,DNA 的甲基化水平会影响疾病的进展<sup>[5-6]</sup>。脐带间充质干细胞(U-MSCs)是一种具有多向分化和免疫调控能力的细胞,研究表明,其对于 BPD 有明显的治疗作用<sup>[7-8]</sup>,可以影响肺组织 DNA 表达<sup>[9-10]</sup>。本研究旨在探讨 U-MSCs 是否可能通过影响 BPD 肺组织中 DNA 甲基化水平来发挥作用。现将结果报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料来源

脐带组织由山东大学齐鲁医院妇产科提供,使用该组织已获得知情同意和山东大学齐鲁医院伦理委员会(中国济南)的批准。SPF 级 SD 孕鼠 6 只,由山东大学实验动物中心提供。

### 1.2 仪器与试剂

脐带、胰蛋白酶-EDTA 消化液、青霉素/链霉素、胎牛血清均由美国 Gibco 公司生产, $\alpha$ -MEM 培养基由中国 TBD 公司生产,戊巴比妥由美国 Sigma 公司生产,抗人 CD29、CD31、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105、CD166、HLA-DR 单克隆流式抗体由美国 eBioscience 公司生产。

### 1.3 方法

**1.3.1 U-MSCs 的提取和鉴定** 将人来源的脐带组织用含青霉素/链霉素的生理盐水反复冲洗 3 次后切成约 1 mm<sup>3</sup> 大小的组织块,将组织块均匀铺于培养瓶中,4 h 以后加入含体积分数 0.10 胎牛血清和 50 mg/L 的青霉素/链霉素的  $\alpha$ -MEM 培养基,37 °C 下在潮湿、黑暗、含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养至有细胞爬出后,将细胞消化并进行进一步扩增。

当细胞生长到覆盖培养瓶 80% 时,使用胰蛋白酶消化扩增后的细胞并进行细胞计数,将  $1 \times 10^6$  个细胞置于 100  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液(PBS)中垂悬,分别用抗人 CD29、CD31、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105、CD166、HLA-DR 特异的荧光标记的流式抗

体进行染色后,室温条件下孵育 30 min,用 PBS 清洗 3 次后通过流式细胞技术检测以上表面抗体的表达情况,通过表面标记物的表达情况鉴定 U-MSCs 的表型。

诱导分化培养体系配制及细胞诱导分化:①成骨分化培养基由含体积分数 0.1 胎牛血清的低葡萄糖 DMEM、0.1  $\mu$ mol/L 地塞米松、50 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸酯和 0.2 mmol/L 抗坏血酸组成。细胞经过培养基培养 24 d 以后通过茜素红染色,观察分化后细胞中的橙红色钙沉积物。②成脂分化培养基是由含有体积分数 0.1 胎牛血清的高葡萄糖 DMEM、0.25 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、0.1 mmol/L 地塞米松、0.1 mmol/L 吡啶美辛、1.07  $\mu$ mol/L 胰岛素组成。细胞经过培养基培养 24 d 后使用油红 O 染液对细胞进行染色,观察分化细胞中红色脂质液泡的形成情况。③成软骨分化培养基由含体积分数 0.1 FBS 的高葡萄糖 DMEM、100 g/L 丙酮酸钠、0.05 g/L 抗坏血酸、0.05 g/L 脯氨酸、0.5 mmol/L 地塞米松、胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠培养基补充剂(ITS)、 $1 \times 10^{-5}$  g/L 转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ ) 和 50 nmol/L 胰岛素组成。细胞经过培养基培养 24 d 后,使用阿利新蓝染色来检查分化细胞中蛋白聚糖的蓝色染色情况。

**1.3.2 BPD 大鼠模型的建立** SD 孕鼠共 6 只,孕 20 d 时将 2 只母鼠行剖宫产娩出早产鼠 22 只,将早产鼠全身清理并刺激呼吸后随机分组,近期自然分娩的 4 只母鼠作为代养母鼠,早产鼠出生 6 h 内,将 2 只代养母鼠及 12 只早产鼠作为 BPD 组分别置于独立的透明封闭氧舱,持续给予医用氧气,同时使用测氧仪持续检测以保证氧体积分数维持在  $0.950 \pm 0.020$ ,二氧化碳体积分数维持在 0.003,9 d 后停止高氧处理,BPD 模型建立。2 只代养母鼠连同早产鼠(10 只)作为对照组(C 组)移于独立的室内标准鼠笼,空气中氧体积分数维持在  $0.210 \pm 0.020$ 。各组早产鼠均由近期自然分娩母鼠喂养,各组母鼠均可自由进饮食,12-12 h 昼夜环境下生活,室温维持在 22~24 °C,湿度 60%~80%。为了防止母鼠氧气中毒导致哺乳能力下降,每日 9:00 对置于空气和高氧条件下的母鼠调换一次,同时清理鼠笼和氧舱,补充水和食物,开舱时间不大于 1 h。在高氧处理后的第 3、5、9 天,分别处死 C 组和 BPD 组 1 只大鼠并进行苏木精-伊红(HE)染色观察肺组织结构。

**1.3.3 进行 U-MSCs 细胞治疗** 高氧处理 9 d 后将 BPD 组大鼠随机分为 PBS 治疗组 (A 组) 和 U-MSCs 治疗组 (B 组), 正常空气中生活的大鼠为 C 组。胰蛋白酶消化收集 3~5 代 U-MSCs 细胞并进行计数, PBS 垂悬后调整细胞密度为  $2 \times 10^9$  个/L, A 组每只大鼠通过尾静脉注射 PBS 100  $\mu$ L, B 组每只大鼠通过尾静脉注射 U-MSCs 细胞悬液 100  $\mu$ L, C 组的每只大鼠通过尾静脉注射 PBS 100  $\mu$ L, 每隔 3 d 注射 1 次, 共注射 2 次。8 d 后用戊巴比妥腹腔注射麻醉各组大鼠并且处死, 取左上肺组织浸泡于 PBS 配制的 40 g/L 多聚甲醛溶液中, 24 h 内石蜡包埋并进行 HE 染色, 取左下肺组织用于 DNA 甲基化检测, 取右肺组织迅速置于液氮罐冻存用于后续研究, 同时观察各组大鼠的毛发及发育情况。

**1.3.4 大鼠肺组织 DNA 的甲基化检测** 使用 Me-DIP-chip (Methylated DNA Immunoprecipitation) 技术通过 Hiseq 平台对每组 3 只大鼠肺组织样本进行全基因组 DNA 甲基化检测, 该检测由上海康成生物技术有限公司完成。

1.4 统计学分析

使用 SPSS Statistics 21.0 软件进行统计分析, 计量结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组数据比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

2 结 果

2.1 U-MSCs 的提取和鉴定

原代提取的 U-MSCs 可以在体外快速增殖, 对胰酶消化后的细胞进行流式细胞技术检测, 发现细

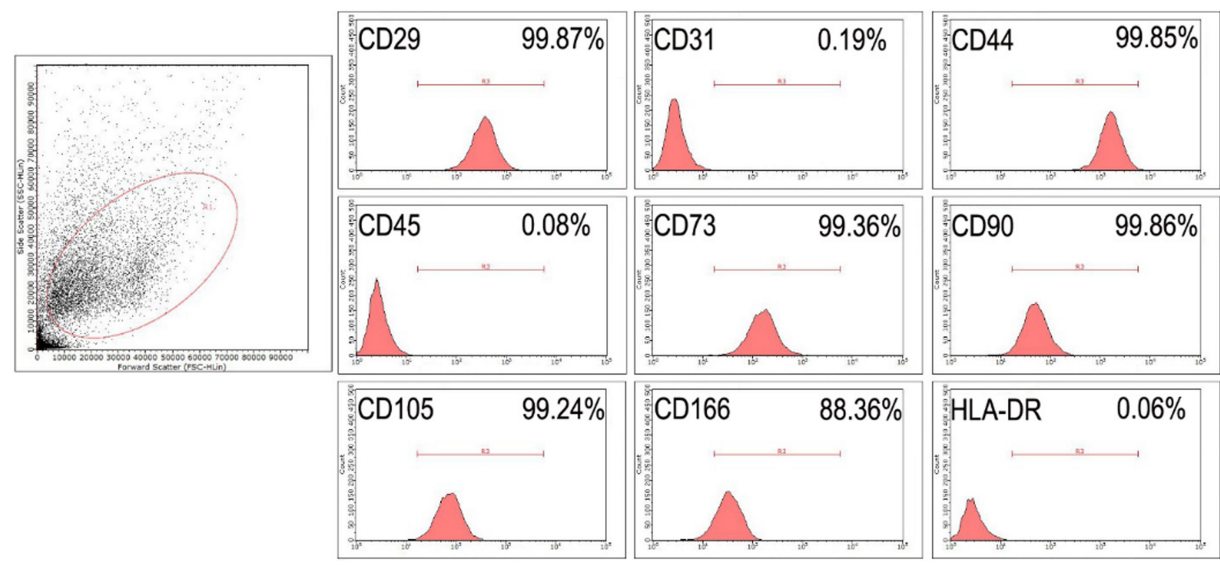
胞高度表达 U-MSCs 的表面标记物 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 和 CD166, 而不表达血细胞标记物 CD31、CD45 以及 HLA-DR (图 1)。原代提取的 U-MSCs 表现出典型的纺锤形成纤维细胞样形态 (图 2A), 并且可以分化为骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞。成脂分化诱导培养基培养 24 d 后经油红 O 将细胞染色可见细胞内有脂质蓄积的存在。染色后分化的细胞可见许多红色的脂质小滴 (图 2B), 证明细胞具有成脂分化的能力; 成骨分化诱导培养基培养 24 d 后经茜素红染色后可见细胞内有红色钙矿化 (图 2C), 证明细胞具有成骨分化的能力; 成软骨分化诱导培养基培养 24 d 后经阿利新蓝染色后可见细胞内有蓝染的蛋白聚糖 (图 2D), 证明细胞具有成软骨分化能力。

2.2 肺发育不良大鼠模型的建立

经过 9 d 不同氧浓度处理, C 组大鼠食量正常, 生长发育良好, 体质量生长快, 活动度正常, 皮毛光泽; BPD 组大鼠离开高氧环境后呼吸急促, 体格生长缓慢, 身体消瘦, 反应差, 活力下降, 皮毛暗淡无光。高氧处理后的第 3、5、9 天肺组织 HE 切片显示, 随着模型建立时间的延长, BPD 组大鼠正常肺组织结构消失, 肺泡腔隙增大, 肺泡融合, 肺间隔较厚, 肺泡周围纤维组织增生严重 (图 3), BPD 模型建立成功。而 C 组大鼠肺组织结构规整, 肺泡数量较多, 大小均匀, 肺间隔较薄。

2.3 治疗后各组大鼠一般情况及肺部病理表现

经过 U-MSCs 治疗 8 d 后, C 组大鼠生长发育正常, 体质量增长快, 活动度正常, 皮毛光泽; A 组大



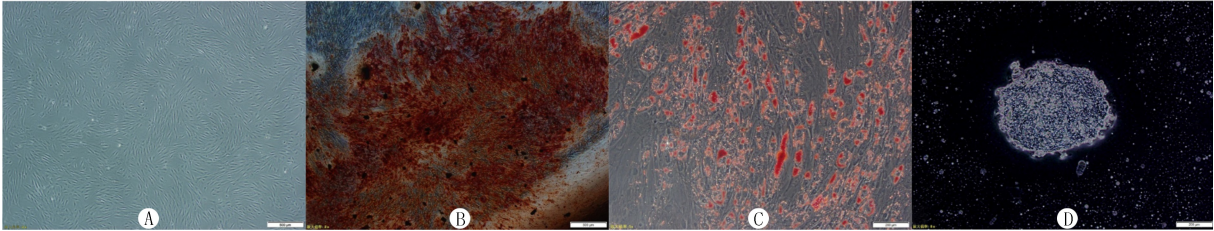
分离培养的原代 U-MSCs 细胞进行 MSC 表面标记 CD29、CD31、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105、CD166 和 HLA-DR 染色, 原代细胞高度表达 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166, 不表达 CD31、CD45 和 HLA-DR

图 1 U-MSCs 细胞表型的鉴定



鼠体质量增长缓慢,活动度极低,毛发暗淡无光泽;与 A 组相比,B 组大鼠生长发育趋于正常,体质量明显增加,活动度增加,皮毛暗淡明显改善。HE 染色显示 C 组大鼠肺组织结构规整,肺泡大小均匀,肺间隔较薄,无明显炎症细胞浸润(图 4a);A 组大

鼠肺组织结构紊乱,肺泡融合,肺间隔增厚,纤维组织增生明显,大量炎症细胞浸润(图 4b);B 组大鼠肺组织结构比较规整,存有正常肺泡,肺间质较薄,肺泡周围纤维组织增生明显降低,少量炎症细胞浸润(图 4c)。



A: 培养的细胞表现出纺锤形的成纤维细胞样形态;B: 茜素红染色;C: 油红 O 染色;D: 阿尔新蓝染色

图 2 原代 U-MSCs 的形态和多向分化能力

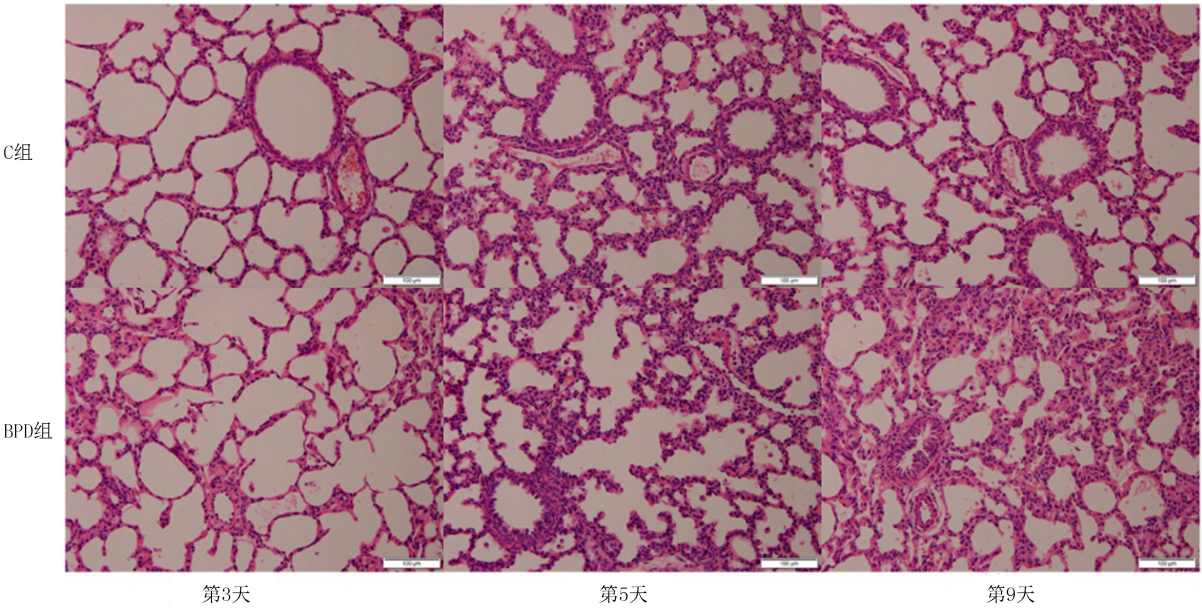
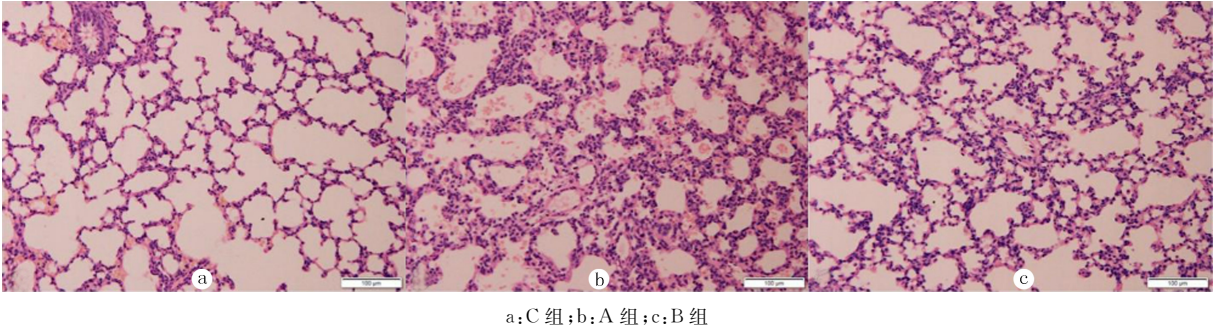


图 3 不同时间高氧处理后 C 组与 BPD 组肺组织切片 HE 染色结果



a: C 组; b: A 组; c: B 组

图 4 U-MSCs 细胞治疗后,3 组肺组织切片 HE 染色结果

2.4 全基因组甲基化检测结果

DNA 甲基化检测结果显示,与 C 组相比,A 组中 *A1bg*、*Guca1b*、*Hoxa6*、*LOC500331*、*Alox12*、*Arid4b*、*RGD1561039*、*Cldn18*、*Clstn1*、*Defb22*、*Gpatch11*、*Lep*、*Lsm4*、*Mboat7*、*Mgat5*、*Olr1689*、*Olr1707*、*Olr556*、*Psm8*、*Rbm14*、*Btnl8* DNA 甲基

化水平明显下降( $F=24.98\sim1546.46, P<0.05$ ),B 组与 A 组相比,以上 DNA 的甲基化水平明显回升,差异有显著性( $P<0.05$ );而 B 组与 C 组相比,除 *Hoxa6*、*LOC500331* DNA 甲基化水平下降外,其他基因的甲基化水平比较差异无显著性( $P>0.05$ )。见表 1。

表 1 各组肺组织 DNA 甲基化修饰区域的数量值( $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	<i>A1bg</i>	<i>Guca1b</i>	<i>Hoxa6</i>	<i>LOC500331</i>	<i>Alox12</i>	<i>Arid4b</i>	<i>Btn18</i>
C 组	3	51.33±0.57	25.00±1.00	59.00±1.00	51.00±1.00	12.00±1.00	9.00±1.00	9.00±1.00
A 组	3	5.66±1.52	5.66±0.57	4.66±1.52	12.33±0.57	1.33±0.57	0±0	0±0
B 组	3	60.33±1.52	28.33±1.52	23.66±2.52	44.33±1.52	12.00±1.00	9.00±1.00	9.00±1.00

分组	<i>n</i>	<i>Cldn18</i>	<i>Clstn1</i>	<i>Defb22</i>	<i>Gpatch11</i>	<i>Lep</i>	<i>Lsm4</i>	<i>Mboat7</i>
C 组	3	43.33±1.52	25.0±2.00	13.66±1.52	80.00±2.00	0±0	12.00±1.73	16.00±1.00
A 组	3	7.66±0.57	4.33±0.57	0±0	30.66±2.08	0±0	0±0	3.33±1.15
B 组	3	43.33±1.52	25.0±2.00	13.66±1.52	80.00±2.00	9.66±1.15	12.00±1.73	16.00±1.00

分组	<i>n</i>	<i>Mgat5</i>	<i>Olr1689</i>	<i>Olr1707</i>	<i>Olr556</i>	<i>Psmb8</i>	<i>Rbm14</i>	<i>RGD1561039</i>
C 组	3	9.66±1.52	9.66±1.52	14.33±3.51	16.00±1.00	8.66±0.57	12.00±2.00	16.00±1.00
A 组	3	0±0	0±0	0±0	2.66±0.57	0±0	0±0	2.33±1.52
B 组	3	9.66±1.52	9.66±1.52	14.33±3.51	16.00±1.00	8.66±0.57	12.00±2.00	16.00±1.00

3 讨 论

BPD 是影响早产儿生存质量和生长发育的重要疾病,造成的肺损伤往往是不可逆的<sup>[11]</sup>,临床上尚无有效防治方法。U-MSCs 是脐带来源的多能干细胞,可以从脐带组织中进行大量提取<sup>[12]</sup>。这些具有强大增殖能力的细胞可以维持多向分化能力并且具有强大的免疫调控功能<sup>[13-14]</sup>,其在临床上已经有了广泛应用。之前已有文献表明 U-MSCs 在治疗 BPD 方面具有良好效果<sup>[15-16]</sup>,这与 U-MSCs 的免疫调控和多向分化能力密切相关<sup>[17-18]</sup>,但是 U-MSCs 如何在肺组织 DNA 甲基化水平上进行调控进而影响 BPD 的预后尚未见相关研究。本研究通过建立 BPD 模型并进行 U-MSCs 治疗,证明了 U-MSCs 可以通过减轻 BPD 的肺损伤程度、增加肺组织修复能力、减轻肺组织间隔厚度和炎症浸润水平来缓解病情,提高患者生存质量。

经过 U-MSCs 治疗的 BPD 大鼠与没有经过 U-MSCs 治疗的大鼠相比,生长发育加快,体质量明显增加,活动度增加,皮毛暗淡改善,整体情况明显改善。肺部病理切片显示肺组织结构较规整,存有正常肺泡,肺间质较薄,肺泡周围纤维组织增生明显降低,仅有少量炎症细胞浸润,说明 U-MSCs 可以修复受损的肺组织,减轻局部炎症水平,可能是通过免疫调控因子的分泌来发挥作用的<sup>[19-20]</sup>。甲基化检测结果表明,高氧损伤后早产大鼠的肺组织 DNA 会发生甲基化程度的改变,这会影响下游蛋白的表达水平,而 U-MSCs 对损伤肺组织的修复作用很可能是通过影响肺组织 DNA 甲基化程度来发挥作用并通过改变 DNA 甲基化水平来影响 BPD 的进展。

在筛选出的 DNA 中,*Cldn18* 和 *Lep* 与肺部发育尤为相关。*Cldn18* 是唯一已知的肺特异性紧密

连接蛋白,是肺泡 I 型细胞中最丰富的密蛋白,同时也在肺泡 II 型细胞中高表达,其表达水平受肺成熟激动剂和炎症递质的调节,当敲除或减少 *Cldn18* 的表达时会导致肺泡屏障功能障碍和肺泡生成受损<sup>[21-22]</sup>。有研究证明间充质干细胞可以通过分泌血管生成素-1 来恢复培养的人肺泡 II 型细胞中的上皮蛋白渗透性,而血管生成素-1 可以通过抑制 NF-kappaB 的活动来阻止 *Cldn18* 的解体,增强肺组织上皮的修复能力和细胞间的紧密连接能力<sup>[23-24]</sup>。本研究结果表明 U-MSCs 治疗 BPD 后可以降低肺组织中 *Cldn18* 甲基化水平,这表明 U-MSCs 分泌血管生成素-1 来抑制 *Cldn18* 解体的作用很可能是通过 DNA 的低甲基化来增强 *Cldn18* 表达,进而促进肺泡上皮之间紧密连接的恢复和肺部血管的生成,最终增强肺组织的修复能力。

有文献提出 *Lep* 作为肺泡 II 型细胞旁分泌相互作用中的重要信号分子<sup>[25]</sup>,为表面活性物质的合成提供脂质底物<sup>[26-27]</sup>,而在肺部炎症期间出现的 *Lep* 表达水平增加的证据表明 *Lep* 的抑制炎症作用显著<sup>[28]</sup>。其可以通过降低中性粒细胞的聚集与浸润,降低 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-8 的表达,从而减轻肺组织的损伤<sup>[29-30]</sup>。因此我们推测 U-MSCs 可以通过降低 BPD 肺组织中 *Lep* 的甲基化水平来增强其表达,促进下游 *Lep* 蛋白的合成,发挥更强的抑制炎症的作用,进一步减轻肺组织炎症反应和损伤。

U-MSCs 对 *Cldn18* 和 *Lep* 的低甲基化作用的具体通路尚不明确,有待进一步在基因水平和蛋白水平来进行探索和证明。除此之外,其他发生甲基化改变的基因在肺发育不良中也有着不同的作用,例如 *Hoxa6*,是调控肺发育的关键基因,其甲基化程度的降低会增加肺血管以及间质细胞的生成<sup>[31]</sup>; *Alox12* 是炎症反应的重要基因,其表达升高会提高



炎症水平,同时可能通过调节血管内皮生长因子的表达来增加肺血管生成<sup>[32-33]</sup>; *Mgat5* 是白细胞在炎症部位聚集所必需的基因,它能够增加气道中性粒细胞数量和气道炎症反应程度,同时促进炎症细胞因子 IFN- $\gamma$  等的表达<sup>[34]</sup>; *Btl8* 能够刺激 T 细胞的增殖和细胞因子产生,促进炎症反应,同样, *Psm8* 也是炎症通路的一员<sup>[35]</sup>。

与此同时,还有部分基因在肺发育不良中的作用尚不明确,例如 *A1bg*, 主要产生于肝脏,并分泌到血浆,有研究表明其在血浆中的水平与炎症程度有关,该蛋白的整体功能目前仍是未知<sup>[36]</sup>。 *Arid4b* 能够调节骨髓细胞的组蛋白甲基化状态和涉及造血作用的各种基因的表达,在人类早期发育中具有关键作用<sup>[37]</sup>。 *Clstn1* 与细胞黏附程度的增加有关;但是 *Rbm14*、*Mboat7*、*Lsm4*、*Gpatch11* 在肺组织中的作用尚未见相关研究。而 *RGD1561039*、*Olr1689*、*Olr1707*、*Olr556*、*LOC500331* 和 *Defb22* 虽然在肺发育不良中有明显改变,但是该基因只在大鼠中表达,对人类早产儿肺发育不良的参考意义不大。

综上所述,本研究通过检测 BPD 治疗前后肺组织中 DNA 甲基化程度的差异,筛选出部分具有显著统计学意义的相关基因,为进一步阐明 U-MSCs 治疗 BPD 机制打下了一定基础。

### [参考文献]

- [1] ROFAEL S A D, MCHUGH T D, TROUGHTON R, et al. Airway microbiome in adult survivors of extremely preterm birth: The EPICure study[J]. *Eur Respir J*, 2019, 53(1): 1801225.
- [2] ZHU Y T, FU J H, YANG H P, et al. Hyperoxia-induced methylation decreases RUNX3 in a newborn rat model of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Respir Res*, 2015, 16:75.
- [3] CHAO C M, MOISEENKO A, KOSANOVIC D, et al. Impact of Fgf10 deficiency on pulmonary vasculature formation in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(9):1429-1444.
- [4] CUNA A, HALLORAN B, FAYE-PETERSEN O, et al. Alterations in gene expression and DNA methylation during murine and human lung alveolar septation[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 53(1):60-73.
- [5] TRAUBE F R, CARELL T. The chemistries and consequences of DNA and RNA methylation and demethylation[J]. *RNA Biol*, 2017, 14(9):1099-1107.
- [6] JONES M J, GOODMAN S J, KOBOR M S. DNA methylation and healthy human aging[J]. *Aging Cell*, 2015, 14(6): 924-932.
- [7] PIERRO M, THÉBAUD B, SOLL R. Mesenchymal stem

- cells for the prevention and treatment of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 11:CD011932.
- [8] GÜLAŞI S, ATICI A, YILMAZ Ş N, et al. Mesenchymal stem cell treatment in hyperoxia-induced lung injury in newborn rats[J]. *Pediatr Int*, 2016, 58(3):206-213.
- [9] SAMMOUR I, SOMASHEKAR S, HUANG J, et al. The effect of gender on mesenchymal stem cell (MSC) efficacy in neonatal hyperoxia-induced lung injury[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10):e0164269.
- [10] COLLINGS C K, ANDERSON J N. Links between DNA methylation and nucleosome occupancy in the human genome [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2017, 10:18.
- [11] JOBE A H. Mechanisms of lung injury and bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Perinatol*, 2016, 33(11):1076-1078.
- [12] SIMONES A A, BEISANG D J, PANOSKALTSIS-MORTARI A, et al. Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia: A clinical review[J]. *Pediatr Res*, 2018, 83(1-2):308-317.
- [13] RAICEVIC G, NAJAR M, BUSSE H, et al. Comparison and immunobiological characterization of retinoic acid inducible gene-I-like receptor expression in mesenchymal stromal cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):2896.
- [14] MOHAMMADIPOOR A, ANTEBI B, BATCHINSKY A I, et al. Therapeutic potential of products derived from mesenchymal stem/stromal cells in pulmonary disease[J]. *Respir Res*, 2018, 19(1):218.
- [15] WILLIS G R, FERNANDEZ-GONZALEZ A, ANASTAS J, et al. Mesenchymal stromal cell exosomes ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia and restore lung function through macrophage immunomodulation[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 197(1):104-116.
- [16] AUGUSTINE S, AVEY M T, HARRISON B, et al. Mesenchymal stromal cell therapy in bronchopulmonary dysplasia: Systematic review and Meta-analysis of preclinical studies[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(12):2079-2093.
- [17] KANG M, THÉBAUD B. Stem cell biology and regenerative medicine for neonatal lung diseases[J]. *Pediatr Res*, 2018, 83(1-2):291-297.
- [18] KWON J H, KIM M, BAE Y K, et al. Decorin secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells induces macrophage polarization via CD44 to repair hyperoxic lung injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19):E4815.
- [19] YUE Y Y, LUO Z Q, LIAO Z C, et al. Excessive activation of NMDA receptor inhibits the protective effect of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells on promoting alveolarization in bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Physiol, Cell Physiol*, 2019, 316(6):C815-C827.
- [20] CALCATERRA V, AVANZINI M A, MANTELLI M, et al. A case report on filamin A gene mutation and progressive pulmonary disease in an infant: A lung tissue derived mesenchymal stem cell study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(50):

- e13033.
- [21] SWEERUS K, LACHOWICZ-SCROGGINS M, GORDON E, et al. Claudin-18 deficiency is associated with airway epithelial barrier dysfunction and asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(1):72-81.e1.
  - [22] KOTTON D N. Claudin-18: Unexpected regulator of lung alveolar epithelial cell proliferation[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(3):903-905.
  - [23] LAFEMINA M J, SUTHERLAND K M, BENTLEY T, et al. Claudin-18 deficiency results in alveolar barrier dysfunction and impaired alveologenesis in mice[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 51(4):550-558.
  - [24] FANG X H, NEYRINCK A P, MATTHAY M A, et al. Allogeneic human mesenchymal stem cells restore epithelial protein permeability in cultured human alveolar type II cells by secretion of angiopoietin-1[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(34):26211-26222.
  - [25] CHEN H, LIANG Z W, WANG Z H, et al. Akt activation and inhibition of cytochrome C release: Mechanistic insights into leptin-promoted survival of type II alveolar epithelial cells[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(10):2313-2324.
  - [26] VERNOOY J H, UBAGS N D, BRUSSELLE G G, et al. Leptin as regulator of pulmonary immune responses: Involvement in respiratory diseases[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2013, 26(4):464-472.
  - [27] HAO W M, WANG J, ZHANG Y, et al. Leptin positively regulates MUC5AC production and secretion induced by interleukin-13 in human bronchial epithelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(2):979-984.
  - [28] DE BLASIO M J, BOIJE M, KEMPSTER S L, et al. Leptin matures aspects of lung structure and function in the ovine fetus[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(1):395-404.
  - [29] SUZUKAWA M, KOKETSU R, BABA S, et al. Leptin enhances ICAM-1 expression, induces migration and cytokine synthesis, and prolongs survival of human airway epithelial cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(8):L801-L811.
  - [30] WATANABE K, SUZUKAWA M, ARAKAWA S, et al. Leptin enhances cytokine/chemokine production by normal lung fibroblasts by binding to leptin receptor[J]. *Allergol Int*, 2019, 68S:S3-S8.
  - [31] ZHANG H Y, LIU Y, YAN L X, et al. Increased levels of the long noncoding RNA, HOXA-AS3, promote proliferation of A549 cells[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6):707.
  - [32] NIE D, HILLMAN G G, GEDDES T, et al. Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(18):4047-4051.
  - [33] NIE D T, KRISHNAMOORTHY S, JIN R X, et al. Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(27):18601-18609.
  - [34] BAHAEI N S, KANG B N, FRENZEL E M, et al. N-Glycans differentially regulate eosinophil and neutrophil recruitment during allergic airway inflammation[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(44):38231-38241.
  - [35] ARIMA K, KINOSHITA A, MISHIMA H, et al. Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(36):14914-14919.
  - [36] CLERC F, REIDING K R, JANSEN B C, et al. Human plasma protein N-glycosylation[J]. *Glycoconj J*, 2016, 33(3):309-343.
  - [37] CIAUDO C, SERVANT N, COGNAT V, et al. Highly dynamic and sex-specific expression of microRNAs during early ES cell differentiation[J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(8):e1000620.

(本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 380 页)

- Combined methylmalonic acidemia and homocysteinemia presenting predominantly with late-onset diffuse lung disease: A case series of four patients[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2017, 12(1):58.
- [28] 贺建新, 郭雅洁, 冯雪莉, 等. X 染色体连续缺失致慢性肉芽肿病和 Mcleod 综合征 2 例报告并文献复习[J]. *临床儿科杂志*, 2016, 34(8):614-617.
  - [29] WAMBACH J A, CASEY A M, FISHMAN M P, et al. Genotype-phenotype correlations for infants and children with ABCA3 deficiency[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 189(12):1538-1543.
  - [30] MCCANDLESS S E, BRUNGER J W, CASSIDY S B. The burden of genetic disease on inpatient care in a children's hospital[J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 74(1):121-127.
  - [31] HU X Y, LI N, XU Y F, et al. Proband-only medical exome sequencing as a cost-effective first-tier genetic diagnostic test for patients without prior molecular tests and clinical diagnosis in a developing country: The China experience[J]. *Genet Med*, 2018, 20(9):1045-1053.
  - [32] PRAKASH V, MOORE M, YÁÑEZ-MUÑOZ R J. Current progress in therapeutic gene editing for monogenic diseases[J]. *Mol Ther*, 2016, 24(3):465-474.
  - [33] MENDELL J R, AL-ZAIDY S, SHELL R, et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(18):1713-1722.
  - [34] LONG C Z, LI H, TIBURCY M, et al. Correction of diverse muscular dystrophy mutations in human engineered heart muscle by single-site genome editing[J]. *Sci Adv*, 2018, 4(1):eaap9004.

(本文编辑 耿波 厉建强)