

肺淋巴循环障碍对矽肺发病进程的影响研究

崔洁¹,陈紫莺¹,王宏丽¹,郭灵丽^{1,2},郝小惠^{1,2},刘和亮^{1,2}

摘要 目的 探讨肺淋巴循环障碍对矽肺发病进程的影响。方法 采用胸导管结扎建立肺淋巴循环障碍模型。SPF级成年雄性SD大鼠24只随机分为对照组、结扎对照组、矽肺组、矽肺+结扎胸导管组(以下简称矽肺+结扎组)。每组各6只。对照组不做处理;结扎对照组给大鼠结扎胸导管后正常饲养;矽肺组大鼠采用动式染尘法建立矽肺模型(染尘仓内SiO₂粉尘浓度2 000 mg/m³,每天给予大鼠动式染尘3 h);矽肺+结扎组大鼠先手术结扎大鼠胸导管,再进行动式染尘,染尘条件与矽肺组相同。HE染色观察肺组织病理变化;天狼猩红染色观察胶原沉积;免疫组化观察肺部淋巴管增生;Western blot检测大鼠肺组织中核转录因子(NF-κBp65)和血管内皮生长因子受体(VEGFR-3)、平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达水平。结果 HE和天狼猩红染色结果显示,相较于对照组,矽肺组和矽肺+结扎组大鼠肺组织病变更为严重。免疫组化结果显示矽肺组和矽肺+结扎组大鼠肺组织内有淋巴管增生。Western blot结果显示肺组织中NF-κBp65和α-SMA的蛋白含量矽肺+结扎组均高于矽肺组,分别为(2.42±0.05) vs (1.80±0.01)、(2.81±0.06) vs (2.57±0.01)。相反,矽肺+结扎组大鼠肺组织内VEGFR-3的含量低于矽肺组(0.87±0.01) vs (0.97±0.03)。结论 结扎胸导管可使矽肺大鼠肺部出现淋巴循环障碍,加快矽肺发病进程。

关键词 矽肺;胸导管结扎;淋巴管增生;淋巴循环障碍

中图分类号 R 135.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)06-0972-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.024

矽肺是一种古老的尘肺病,主要由长期吸入游离二氧化硅(SiO₂)引起,作为采矿和制造等行业工人面临的主要职业健康问题,每年可导致约24 000人死亡^[1]。由于矽肺的发病机制尚不明确,目前尚

未发现有效的治疗方法。因此,对其发病机制展开深入研究意义重大。有证据^[2]表明,肺淋巴系统在矽肺发病机制中占据重要地位,淋巴结纤维化导致肺部矽尘的清除受阻,加速肺损伤。Yu et al^[3]和课题组前期研究^[4]表明,促进大鼠肺部淋巴管生成可改善矽肺大鼠肺淋巴转运,减少肺间质内SiO₂沉积,延缓矽肺进展。但肺部淋巴循环障碍对矽肺发病进程的影响尚未有研究,该研究拟在探讨肺淋巴循环障碍对矽肺发病进程的影响。研究通过手术结扎大鼠胸导管,建立矽肺淋巴循环障碍模型,通过检测肺组织内淋巴管的变化以及参与淋巴管生成因子和纤维化进程相关因子的表达,从新的视角探讨肺淋巴管在矽肺发病机制中的重要作用,为矽肺的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级成年雄性SD大鼠24只(体质量180~250 g)购自北京华阜康实验动物有限公司,饲养于华北理工大学动物实验中心屏障实验室[SYXK(冀)2020-0007];SiO₂粉尘购自河北省煤矿卫生与安全重点实验室。该研究经华北理工大学动物伦理委员会批准(审批号:LX2019035)。

1.2 主要试剂与仪器 天狼猩红染色试剂盒(北京雷根生物科技有限公司),手术黏合剂(唐山华北理工大学附属医院),苏木精(武汉珠海贝索生物科技有限公司),平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)(英国Abcam公司),手术电凝针(张家港市航天医疗电器厂),核转录因子(nuclear factor-κBp65, NF-κBp65)(美国Affinity Biosciences公司),血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3)(英国Abcam公司)。

1.3 动物分组与模型建立 将28 d大鼠随机分为对照组、结扎对照组、矽肺组及矽肺+结扎组, n=6。对照组不做处理;结扎对照组大鼠被麻醉后先手术分离颈部组织,暴露胸导管,后采用手术电凝针将胸导管结扎,用手术黏合剂闭合手术部位,于小动物体温维持毯上进行术后保温,待其意识恢复后正常饲养1 d;矽肺模型组大鼠采用HOPE-MED8050系列

2022-04-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81673119);中国煤矿尘肺病防治基金会资助科研项目(编号:201911J035);河北省省级研究生创新资助项目(编号:CXZZBS2020124)

作者单位:华北理工大学¹公共卫生学院,²河北省器官纤维化重点实验室,唐山 063210

作者简介:崔洁,女,博士研究生;

刘和亮,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: tsruoshui@163.com

动式染毒控制装置(染尘仓内浓度 $2\ 000\ \text{mg}/\text{m}^3$, 每天给予动式染尘 3 h)建立矽肺模型;矽肺 + 结扎组大鼠先手术暴露并结扎胸导管,用手术黏合剂闭合手术组织后正常饲养 1 d,然后给予与矽肺组相同处理。

1.4 肺组织病理学检查 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠,将其固定于鼠板上。采用腹主动脉采血法处死大鼠,获取右下肺,并将其置于 4% 多聚甲醛固定液中,24 h 后制作石蜡切片,并进行 HE 和天狼猩红染色。正置光学显微镜和偏振光显微镜下获取图片。其余肺组织分装于高压 EP 管内置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

1.5 肺部淋巴管的变化 将肺组织石蜡切片进行常规脱蜡至水,高压修复抗原。于切片上滴加内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育 10 min。滴加 LYVE-1 (1 : 100), $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜,滴加 IgG 聚合物 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 30 min,用 DAB 显色试剂盒显色,常规复染,脱水透明,中性树脂封片,显微镜获取图像。

1.6 肺组织内细胞因子的检测 将各组大鼠肺组织研磨匀浆,并提取肺组织蛋白,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳和电转。孵育一抗 VEGFR-3 (1 : 800)、NF- κ Bp65 (1 : 500)、 α -SMA (1 : 500) 于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱内过夜。山羊抗兔或抗小鼠二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 2 h。使用 ECL 发光试剂于 ECLTM 蛋白检测系统检测信号,使用 Image J 软件进行图像分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,计量资料多组间的比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),两两比较采用 LSD 检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理学结果 HE 染色结果 (图 1) 显示,与对照组相比,矽肺组大鼠肺组织内有大量炎性细胞浸润,肺泡壁增厚;矽肺 + 结扎组大鼠相较于对照组和矽肺组病变更为严重,表现为肺泡结构被破坏,以巨噬细胞和成纤维细胞为主细胞性结节形成。

2.2 天狼猩红染色结果 如图 2 所示,与对照组比较,矽肺模型组大鼠肺组织内出现条索样 I (绿色)、III 型 (强橙黄色) 胶原沉积;与矽肺模型组相比,矽肺 + 结扎组大鼠肺组织内胶原沉积更为明显。

2.3 肺组织内淋巴管 免疫组化结果如图 3 所示,对照组内未观察到淋巴管,而矽肺组大鼠肺组织内有明显的 LYVE-1 阳性淋巴管的出现,矽肺 + 结扎

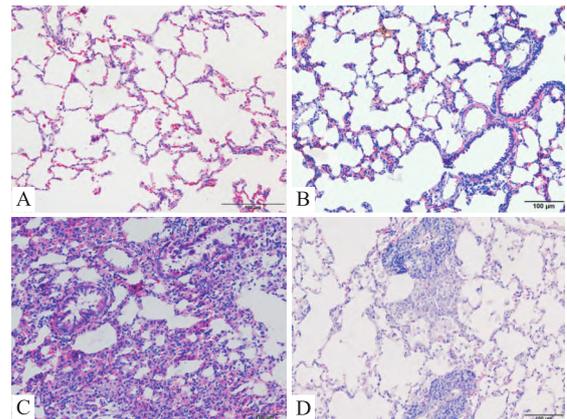


图 1 HE 染色 $\times 100$

A: 对照组; B: 结扎对照组; C: 矽肺组; D: 矽肺 + 结扎组

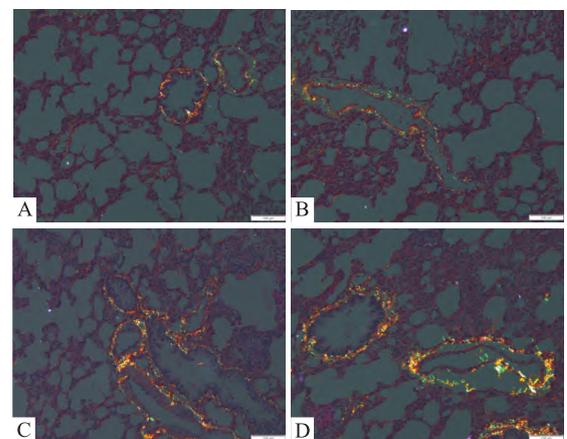


图 2 天狼猩红染色 $\times 100$

A: 对照组; B: 结扎对照组; C: 矽肺组; D: 矽肺 + 结扎组

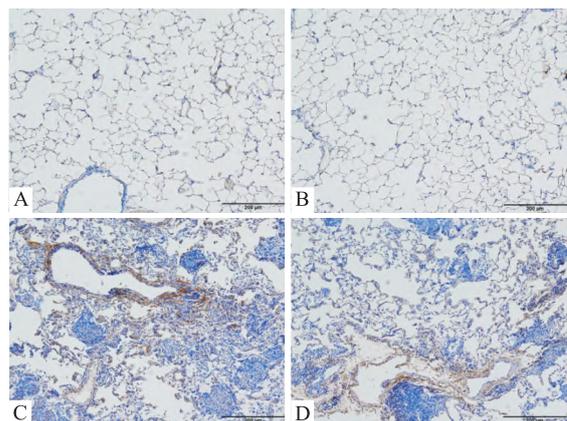


图 3 免疫组化染色 $\times 200$

A: 对照组; B: 结扎对照组; C: 矽肺组; D: 矽肺 + 结扎组

组大鼠肺组织内有阳性淋巴管出现,但官腔萎缩塌陷。

2.4 各组大鼠淋巴管生成因子 VEGFR-3 表达含量的比较 与对照组相比,矽肺组大鼠肺组织内

VEGFR-3 的表达上调[分别为(0.35 ± 0.01)、(0.97 ± 0.03)], 差异有统计学意义($P < 0.05$); 结扎矽肺大鼠胸导管后, VEGFR-3 的表达(0.87 ± 0.01) 相较于矽肺组下调, 差异有统计学意义($F = 1\ 356.72, P < 0.05$)。见图 4。

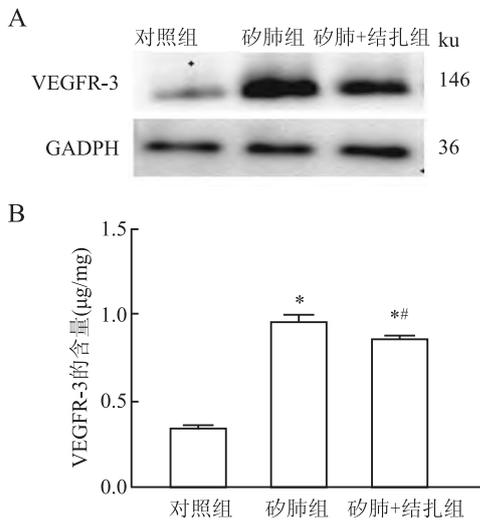


图 4 各组大鼠肺组织中 VEGFR-3 的表达

A: 电泳图; B: VEGFR-3 蛋白表达统计图; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与矽肺组比较: # $P < 0.05$

2.5 各组大鼠肺组织内炎症因子和致纤维化因子的表达含量的比较 Western blot 结果表明, 与对照组相比, 矽肺组大鼠肺组织内 NF- κ Bp65 [(1.80 ± 0.01) vs (0.60 ± 0.11), $F = 421$] 和 α -SMA [(2.57 ± 0.01) vs (0.40 ± 0.05), $F = 1\ 801$] 的表达明显增高, 矽肺 + 结扎组[分别为(2.42 ± 0.05)、(3.24 ± 0.06)] 高于矽肺组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

矽肺是中国最严重的职业病^[5], SiO₂ 的累积呼

吸暴露量(暴露强度和持续时间的函数)是矽肺发生的主要因素^[6]。矽肺动物模型的建立, 为矽肺发病机制研究提供了便利。动式染尘是近年来新兴的一种建立矽肺模型的新方法^[7]。此方法相较于以往的矽肺造模方式如一次性非气管暴漏灌注和暴漏气管灌注 SiO₂ 悬浊液, 采用该方法建立矽肺动物模型可以较好的模拟工人接触 SiO₂ 粉尘的过程, 减少因人为操作不当造成的动物死亡, 但是此法耗时长, 成本高。该研究 HE 和天狼猩红染色结果表明, 采用动式染尘法成功建立了矽肺大鼠模型, 且在造模过程中发现, 动物未出现死亡情况。

由于矽肺的发病机制尚不明确, 因此, 对矽肺发病机制进行深入研究十分必要。课题组前期研究^[4]表明, 改善肺淋巴管循环可以有效的延缓矽肺病情进展, 但是肺淋巴循环障碍对矽肺发病进程的影响尚待证实。胸导管是肺部淋巴系统通向体循环系统的重要通道^[8]。因此, 结扎胸导管可中断正常淋巴循环。基于此, 该研究旨在通过结扎胸导管建立肺淋巴循环障碍模型, 探讨肺淋巴循环障碍对矽肺病情进展的影响。HE、天狼猩红染色结果显示, 矽肺 + 结扎胸导管组大鼠肺组织病变更为严重, 表明矽肺淋巴循环障碍模型建立成功。

淋巴管的活化、生成以及淋巴引流的增强可对机体的免疫反应和炎症过程产生一定调节作用, 当淋巴管网络进行重塑时, 淋巴组织引流能力加强, 由此可去除体内积聚的组织液、免疫细胞、组织碎片、生长因子等加快炎症的消退^[9]。巨噬细胞等白细胞受到刺激产生的大量 VEGF-C 是淋巴管生成的重要调节因子^[10-11], 可使组织炎症部位及其下游淋巴结处的淋巴管密度增加。该研究免疫组化和免疫印迹结果显示, 矽肺大鼠和矽肺 + 结扎组大鼠染尘后肺部出现了淋巴管增生, 且淋巴管特异性标记因子 VEGFR-3^[12-13] 的表达相较于对照组上调, 推测大鼠

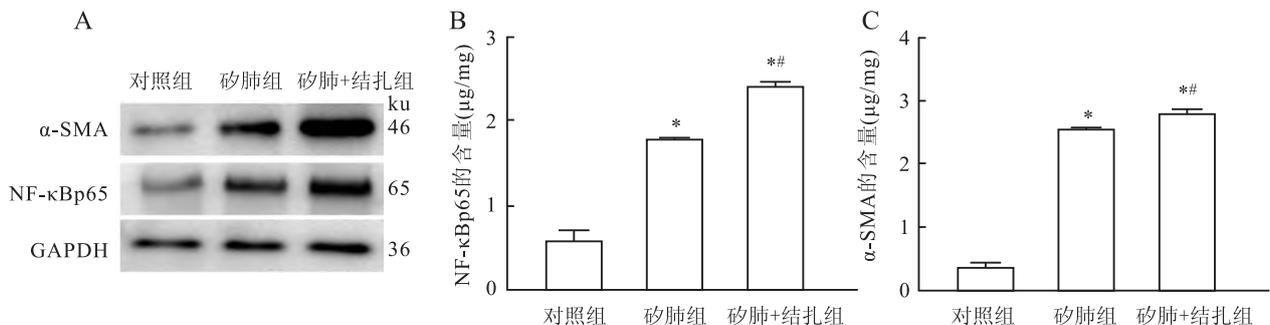


图 5 各组大鼠肺组织中 NF- κ Bp65 和 α -SMA 的含量

A: 蛋白电泳图; B: NF- κ Bp65 蛋白表达统计图; C: α -SMA 蛋白表达统计图; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与矽肺组比较: # $P < 0.05$

染尘初期由于粉尘进入后被巨噬细胞吞噬,从而促进了肺部淋巴管增生,这与该课题组体外研究^[14]结果一致。

胸导管到肺实质的淋巴循环异常是肺淋巴疾病的重要原因^[15]。该研究进一步探讨了结扎矽肺大鼠胸导管后对矽肺发病进程的影响。该研究表明,矽肺+结扎胸导管组大鼠虽出现肺部淋巴管增生,但NF- κ Bp65和 α -SMA的表达均高于矽肺模型组,可能由于其胸导管被结扎,导致染尘初期肺内淋巴转运障碍,粉尘及炎性细胞因子不能及时排出而积聚于肺组织,导致炎症长时间无法消退,加重了肺组织损伤,从而导致了纤维化。

在对矽肺机制的研究^[2]中,人们已经开始注意到淋巴结,尤其是肺门淋巴结在清除肺部粉尘中的作用,并认为淋巴结瘀滞堵塞可能是肺纤维化进展的一个因素。该研究首次探讨矽肺淋巴循环障碍对矽肺发病进程的影响,通过手术结扎胸导管成功建立肺淋巴循环障碍模型,并证明了肺淋巴循环障碍会加快矽肺病情进展。但是该研究未进行淋巴液T细胞的检测以确定结扎胸导管的成功率,其影响矽肺进程的具体机制也还需进一步探讨。

参考文献

- [1] Mossman B T, Glenn R E. Bioreactivity of the crystalline silica polymorphs, quartz and cristobalite, and implications for occupational exposure limits (OELs) [J]. Crit Rev Toxicol, 2013, 43 (8) :632-60.
- [2] Cox-Ganser J M, Burchfiel C M, Fekedulegn D, et al. Silicosis in lymph nodes: the canary in the miner[J]. J Occup Environ Med, 2009, 51(2) : 164-9.
- [3] Yu J, Mao L, Guan L, et al. Ginsenoside Rg1 enhances lymphatic transport of intrapulmonary silica via VEGF-C/VEGFR-3 signaling in silicotic rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 472(1) : 182-8.

- [4] 崔洁,陈紫莺,马景景,等.丹参酮II A 磺酸钠对大鼠矽肺早期的干预作用[J].环境与职业医学,2019,36(1):79-83.
- [5] 贾艳春,刘英宇,魏中秋,等.硫氧环蛋白过氧化物酶1对矽肺大鼠肺纤维化的影响[J].安徽医科大学学报,2017,52(5):705-9.
- [6] Hoy R F, Chambers D C. Silica-related diseases in the modern world[J]. Allergy, 2020,75(11):2805-17.
- [7] Liu Y, Xu H, Geng Y, et al. Dibutylryl-cAMP attenuates pulmonary fibrosis by blocking myofibroblast differentiation via PKA/CREB/CBP signaling in rats with silicosis[J]. Respir Res, 2017, 18(1) : 1-11.
- [8] 周智,贺大璞.肺淋巴循环的研究进展[J].现代医药卫生,2015,31(7):1030-3.
- [9] Yamashita M, Iwama N, Date F, et al. Macrophages participate in lymphangiogenesis in idiopathic diffuse alveolar damage through CCL19-CCR7 signal[J]. Hum Pathol, 2009, 40(11) : 1553-63.
- [10] Zhang Y, Zhang C, Li L, et al. Lymphangiogenesis in renal fibrosis arises from macrophages via VEGF-C/VEGFR3-dependent autophagy and polarization[J]. Cell Death Dis, 2021,12(1):109.
- [11] Nakamoto S, Ito Y, Nishizawa N, et al. Lymphangiogenesis and accumulation of reparative macrophages contribute to liver repair after hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. Angiogenesis, 2020, 23(3) :395-410.
- [12] Oliver G, Kipnis J, Randolph G J, et al. The Lymphatic vasculature in the 21st century: novel functional roles in homeostasis and disease[J]. Cell, 2020, 182(2) :270-96.
- [13] Hwang S D, Song J H, Kim Y, et al. Inhibition of lymphatic proliferation by the selective VEGFR-3 inhibitor SAR131675 ameliorates diabetic nephropathy in db/db mice [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(3) :219.
- [14] Zhang J, Cui J, Li X, et al. Increased secretion of VEGF-C from SiO₂-induced pulmonary macrophages promotes lymphangiogenesis through the Src/eNOS pathway in silicosis[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 218:112257.
- [15] 何丽,侯小萌,沈文彬,等.淋巴循环障碍与塑型性支气管炎[J].中华结核和呼吸杂志,2018,41(7):551-3.

Study on the influence of pulmonary lymphatic circulation disorder on the pathogenesis of silicosis

Cui Jie¹, Chen Ziyang¹, Wang Hongli¹, Guo Lingli^{1,2}, Hao Xiaohui^{1,2}, Liu Heliang^{1,2}

(¹School of Public Health, ²Key Laboratory of Organ Fibrosis, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210)

Abstract Objective To explore the influence of pulmonary lymphatic circulation disorder on the pathogenesis of silicosis. **Methods** A pulmonary lymphatic circulation disorder model was established by thoracic duct ligation. Twenty-four SPF adult male SD rats were randomly divided into control group, ligation control group, silicosis group

成人癫痫患者认知情绪调节策略及其对生活质量的影 响

代梦瑶,王 玉,周 农

摘要 目的 探讨成人癫痫患者认知情绪调节策略及其对生活 质量的影响。**方法** 采用横断面调查研究方法,对 83 例成人癫痫患者和 53 例性别、年龄、受教育程度与之匹配的健康成人,采用中文版认知情绪调节问卷(CERQ-C)、癫痫患者生活质量量表(QOLIE-31)评估。**结果** ① 癫痫组在积极认知情绪调节策略(PCER)总分及部分子项得分均低于对 照组($t = -5.587 \sim -2.837, P < 0.05$)。消极认知情绪调 节策略(NCER)总分及部分子项均高于对照组($t = 2.198 \sim 4.028, P < 0.05$)。② 癫痫组生活质量得分均低于对照组($t = -7.109 \sim -4.226, P < 0.001$)。③ Pearson 相关分析显 示:PCER 及部分子项与生活质量总分呈正相关($r = 0.391 \sim 0.581, P < 0.001$)。NCER 及部分子项与生活质量总分呈负

相关($r = -0.731 \sim -0.540, P < 0.001$)。④ 多元逐步线性 回归分析显示:发作担忧与灾难化、发作频率呈负相关($t = -3.063 \sim -2.574, P < 0.05$);综合生活质量与灾难化呈负 相关($t = -2.214, P < 0.05$);情感健康与积极重新关注呈正 相关($t = 2.376, P < 0.05$);情感健康与灾难化呈负相关($t = -2.219, P < 0.05$);精力与责难他人呈负相关($t = -2.768, P < 0.05$);认知功能与积极重新关注呈正相关($t = 2.593, P < 0.05$);药物影响与责难他人呈负相关($t = -3.348, P < 0.05$);生活质量总分与积极重新关注呈正相关($t = 2.833, P < 0.05$);生活质量总分与灾难化呈负相关($t = -2.729, P < 0.05$)。**结论** 遭遇负性生活事件时,成人癫痫患者较健康 人群更多地使用深思、灾难化、责难他人等消极认知情绪调 节策略,这与癫痫患者生活质量减退密切相关。

关键词 癫痫;认知情绪调节;生活质量

中图分类号 R 742.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0976-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.025

2022-03-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82071460)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院神经内科,合肥 230022

作者简介:代梦瑶,女,硕士研究生;

周 农,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail:

zhouhong@foxmail.com

癫痫是常见的神经系统慢性疾病,既往研

and silicosis + ligation thoracic catheter group (hereinafter referred to as silicosis + ligation group) with 6 rats in each group. The control group was left untreated; the rats in the ligation control group were fed with thoracic duct ligation and the rats were fed normally; the rats in the silicosis group were established a silicosis model using dynamic dusting method (the concentration of SiO₂ dust in the dusting chamber was 2 000 mg/m³, and the rats were given dynamic dusting for 3 hours per day); the rats in the silicosis + ligation group were first surgically ligated to the rat thoracic duct, and then subjected to dynamic dust staining. The conditions for staining were the same as those in the silicosis group. HE staining was used to observe lung tissue pathological changes; Sirius scarlet staining was used to observe collagen Deposition; immunohistochemical observation of pulmonary lymphatic hyperplasia; Western blot was used to detect nuclear factor-κBp65 (NF-κBp65), vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) and α-smooth muscle actin(α-SMA) in rat lung tissue. **Results** The results of HE and Sirius scarlet staining showed that the lung tissue lesions of the silicosis group and the silicosis + ligation group were more severe compared with the control group. The results of immunohistochemistry showed that there was lymphatic hyperplasia in the lung tissue of the rats in the silicosis group and the silicosis + ligation group. Western blot showed that the protein content of NF-κBp65 and α-SMA in lung tissues were higher in the silicosis + ligation group than that of the silicosis group (2.42 ± 0.05) vs (1.80 ± 0.01), (2.81 ± 0.06) vs (2.57 ± 0.01), respectively. On the contrary, the content of VEGFR-3 in the lung tissue of rats in the silicosis + ligation group was lower than that of the silicosis group (0.87 ± 0.01) vs (0.97 ± 0.03). **Conclusion** Ligation of the thoracic duct can cause lymphatic circulatory disorders in the lungs of silicosis rats and accelerate the onset of silicosis.

Key words silicosis; thoracic ducts ligation; lymphangiogenesis; lymphatic circulation disorder