

# 肺淋巴管增生在矽肺大鼠发病过程中的作用

李艳辉<sup>1</sup>, 王宏丽<sup>1</sup>, 郝小惠<sup>2</sup>, 陈慧<sup>1</sup>, 赵金垣<sup>3</sup>, 刘和亮<sup>1,2</sup>

(1. 河北联合大学公共卫生学院, 河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学医学实验研究中心, 河北 唐山 063000; 3. 北京大学第三医院职业病研究中心, 北京 100083)

**摘要:** 目的 探讨肺淋巴管增生在矽肺大鼠发病过程中的作用。方法 采用酶组织化学、透射电子显微镜观察、RT-PCR 等方法检测矽肺大鼠肺组织中淋巴管增生情况。结果 矽肺大鼠肺组织从染尘后第 7 天开始即发现增生的淋巴管, 且随着染尘时间的延长, 淋巴管增生呈现先增多后减少的趋势; 淋巴内皮透明质酸受体 1 (LYVE-1) 的表达情况也与此类似。结论 矽肺大鼠发病过程中出现肺组织淋巴管增生, 提示肺淋巴管增生可能在矽肺的发病过程中具有一定的作用。

**关键词:** 二氧化硅; 矽肺; 肺淋巴管增生

中图分类号: R135.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-221X(2013)04-0250-03

## Study on effect of pulmonary lymphatics hyperplasia in pathogenesis of silicosis in rats

LI Yan-hui\*, WANG Hong-li, HAO Xiao-hui, CHEN Hui, ZHAO Jin-yuan, LIU He-liang

(\* . School of Public Health, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the role of lymphatics hyperplasia in pathogenesis of silicosis in rats. **Methods** A series of modern biological techniques such as enzyme histochemistry, transmission electron microscopy, and RT-PCR, were used to detect the situation of lymphatics hyperplasia in lung tissue of silicosis rats. **Results** Pulmonary lymphatics hyperplasia was found in silicotic rats since 7th days after SiO<sub>2</sub> exposure, and presented a trend from increase to decrease; meanwhile, the expression of lymphatic endothelial hyaluronan receptor 1 (LYVE-1) a similar manner as well. **Conclusion** The results showed that there was certain pulmonary lymphatics hyperplasia in silicotic rats which may have some important role in the pathogenesis of silicosis.

**Key words:** silicon dioxide; silicosis; pulmonary lymphatics hyperplasia

据文献报道<sup>[1]</sup>, 接尘工人肺内的粉尘滞留量达到 10 g 左右就可以引起壹期矽肺病变, 接尘工人在平均粉尘浓度 2.0 mg/m<sup>3</sup> 左右、游离二氧化硅含量约占 30%、粉尘粒度 < 5 μm 占 60% ~ 80% 的条件下, 年吸入的“可吸入性”二氧化硅粉尘可达 30 g, 而实际上肺内二氧化硅粉尘年滞留量只有 0.72 g, 表明被吸入的粉尘将近 98% 被排出了肺外。在终末细支气管至肺泡区的小气道末端, 由于缺乏上呼吸道粘液纤毛系统, 故难以咯痰方式来排除粉尘, 推测肺内一定存在其它高效有力的二氧化硅排出、代谢途径。有学者认为二氧化硅为肺泡巨噬细胞吞噬, 可经淋巴系统沉积于肺门或支气管淋巴结, 也可经血循环沉积于其他脏器<sup>[2]</sup>, 但这一学说还缺乏有力的证据。因此, 本实验拟通过观察矽肺发病不同阶段肺组织内淋巴管增生情况, 来探讨其在矽肺发病机制中的可能作用。

## 1 材料与方法

收稿日期: 2013-02-06

基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划项目 (项目编号: 092761100D)

作者简介: 李艳辉 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 环境与呼吸系统疾病。

通讯作者: 刘和亮, 教授, E-mail: heliangliu@tom.com。

## 1.1 实验动物分组及模型的建立

无特定病原体健康雄性 Wistar 大鼠 56 只, 体重 (180 ~ 220) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。按体重随机分为 7 组, 每组 8 只, 第 1 组为正常对照组, 其余为模型组 (按染尘后观察时间分为 1 d、7 d、14 d、28 d、42 d 和 56 d 组)。通过一次性非气管暴露法 (0.9% 生理盐水溶液配制 1 ml 50 g/L 的矽尘混悬液, 乙醚麻醉大鼠后将混悬液缓慢注入大鼠气管) 建立染矽尘大鼠模型; 对照组大鼠则注入等量 0.9% 氯化钠溶液。建模后, 所有动物均自由饮水、予 SPF 级饲料。

## 1.2 主要试剂与仪器

矽尘由河北省煤矿卫生与安全重点实验室提供, 纯度 99%, 粒子大小 0.5 ~ 10.0 μm, 80% 的粒子直径在 1.0 ~ 5.0 μm 之间; 染矽尘质量浓度为 50 g/L, 用生理盐水配制成混悬液, 高压蒸气灭菌后备用。

5'-核苷酸酶-碱性磷酸酶双重染色<sup>[3,4]</sup> 反应液 I: 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.2) 40 ml + 腺苷 5'-磷酸钠 31 mg + 2.5% 硫酸镁 5 ml + 2% 硝酸铅 1 ml; 反应液 II: 萘酚 AS-MX 磷酸钠 40 mg + 二甲基甲酰胺 2 ml + 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.2) 40 ml + 固蓝 BB

盐 40 mg。Wistar 大鼠淋巴内皮透明质酸受体 1 (LYVE-1) 引物 (上游: GCACCGTCCAAGTCAAGAC, 下游: GTCTGAGGATGAAGCCGACTAG)。

另需 M-MLV 反转录酶, 两步法 Realtime RT-PCR 试剂盒 (SYBR Green), 透射电子显微镜 (日本日立公司, H-7650)。

### 1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 肺组织的大体观察 用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 由 75% 乙醇作体表消毒, 经股动脉放血致死。无菌操作环境下, 取出大鼠肺组织, 观察是否有病变。取右下肺最大横径处肺组织部分经 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋切片供病理检查, 部分经液氮速冻做冰冻切片, 行 5'-核苷酸酶-碱性磷酸酶双重染色; 取约 2 mm<sup>3</sup> 肺组织经戊二醛固定, 供电子显微镜观察; 其余肺组织放入液氮中用于提取 RNA。

1.3.2 病理学观察 进行常规 HE 染色, 矽结节分级参照 King 五级分类法分类。

1.3.3 透射电子显微镜观察 根据透射电子显微镜要求将组织进行处理切片观察。

1.3.4 淋巴管定性观察, 5'-核苷酸酶-碱性磷酸酶双重染色, 组织经 -20 °C 冰冻切片风干, 滴加反应液 I, 37 °C 孵育 60 min, 蒸馏水冲洗后加入 1% 硫化铵, 约 2 min, 蒸馏水冲洗后滴加反应液 II, 37 °C 孵育 30 min, 蒸馏水冲洗, 水溶性封片剂封片。光镜下观察淋巴管呈棕色, 血管呈蓝色。

1.3.5 淋巴管定量观察 实时荧光定量 PCR, 常规提取肺组织总 RNA, 采用 20 μl 反转录反应体系合成 cDNA, 反应条件 42 °C 15 min (反转录反应), 95 °C 2 min (反转录酶的失活反应); 采用 20 μl 反应体系经荧光定量 PCR 扩增, 反应条件为 95 °C 15 s, 58 °C 20 s, 共 45 个循环。

### 1.4 统计学处理

数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 检验水准  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠肺组织病理改变

光镜下可见对照组大鼠肺组织结构正常, 模型组大鼠随时间进展逐渐出现矽肺病理变化, 证实大鼠矽肺模型造模成功。

### 2.2 大鼠肺组织淋巴管的表达情况

5'-核苷酸酶-碱性磷酸酶双重染色中 (图 1, 见封三) 淋巴管呈棕色, 血管外壁为蓝色, 内壁为棕色。在正常对照组大鼠肺组织中, 肺泡区未见淋巴管; 在模型组大鼠肺组织中, 肺泡区不仅有血管, 也可明显发现只

呈棕色的淋巴管, 其管壁薄, 管腔呈不规则形。

### 2.3 大鼠肺组织透射电子显微镜观察

正常对照组大鼠肺组织中, 肺泡壁完整, 有丰富的毛细血管网, 肺泡 I 型上皮细胞和肺泡 II 型上皮细胞完好, 细胞内各细胞器正常且在肺泡壁区未发现淋巴管。在模型组大鼠肺组织中, 随着染尘时间的增加, 肺泡壁逐渐增厚, 组织间隙增宽, 可见大量胶原纤维和成纤维细胞浸润, 肺泡 II 型上皮细胞核质脱落, 板层小体和线粒体空泡化, 血管内皮细胞变性坏死, 血管周围出现增生的淋巴管 (图 2, 见封三)。

### 2.4 大鼠肺组织淋巴管表达量的变化

实时荧光定量 PCR 检测结果显示 (表 1), 随着染尘时间的增加, LYVE-1 表达量逐渐增多, 在第 28 天时达到高峰, 随后逐渐降低, 但也显著高于对照组。

表 1 RT-PCR 检测各组大鼠肺组织 LYVE-1 表达结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | n | LYVE-1 表达量 ( $\Delta\text{ct}$ ) |
|---------|---|----------------------------------|
| 正常对照组   | 8 | 1.00 ± 0.000                     |
| 染尘 1 d  | 8 | 1.01 ± 0.116                     |
| 染尘 7 d  | 8 | 1.67 ± 0.433 **                  |
| 染尘 14 d | 8 | 2.82 ± 0.542 **                  |
| 染尘 28 d | 8 | 4.64 ± 0.972 **                  |
| 染尘 42 d | 8 | 2.98 ± 0.638 **                  |
| 染尘 56 d | 8 | 2.27 ± 0.879 *                   |

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

淋巴循环 (lymph circulation) 是血液循环系统的重要辅助部分, 毛细淋巴管分布数目与毛细血管相近, 是组织液向血液循环回流的重要系统, 对维持机体正常生命活动具有极为重要的生理意义。

在正常肺组织中, 淋巴管分布于气管及大血管附近, 肺泡区罕见; 而在特发性肺间质纤维化 (IPF) 可在肺泡区见到淋巴管增生, 甚至在成纤维细胞周围也可见淋巴管增生, 且淋巴管的直径、数目及出现区域均随 IPF 发病严重性的增加而增加<sup>[5]</sup>; 有研究认为, 肺泡区域的淋巴管增生在 IPF 发病过程中是一关键因素<sup>[6]</sup>; 而在矽肺发病过程中有关淋巴管增生的研究还未见报道。

在众多淋巴管与血管的鉴别方法中, 特异性较强的是 5'-核苷酸酶-碱性磷酸酶双重染色法, 其原理系根据淋巴管内皮细胞和血管内皮细胞的不同酶谱的活性差异, 进行染色区分<sup>[7,8]</sup>。本研究采用此种染色法发现模型组大鼠的肺组织中存在淋巴管增生, 并且增生的淋巴管大多围绕在血管周围, 光镜下可见增生的淋巴管呈环状、条索状或裂隙状, 壁薄, 腔内无红细

胞;电镜显示淋巴管内皮较薄,无基底膜,管腔不规则,瓣膜较多。LYVE-1 是 Banerji 等<sup>[9]</sup>于 1999 年在寻找与 CD44 相关的 HA 受体时发现的一种新的 HA 受体,是目前公认的淋巴管内皮细胞特异性标志物之一<sup>[10]</sup>。本研究采用 RT-PCR 方法对大鼠肺组织中的淋巴管特异性标志物 LYVE-1 的表达情况进行了检测,发现随染尘时间的延长,大鼠肺组织中 LYVE-1 表达出现先增高后降低的趋势,并与正常对照组 LYVE-1 的表达情况存在显著性的差异。

在正常的肺组织中,除了支气管组织内的淋巴管,肺实质组织中罕见淋巴管。而本研究发现,矽肺大鼠肺实质组织中不仅存在淋巴管,而且出现增生,提示淋巴管的增生可能与矽肺的病程进展有关。在大鼠肾间质纤维化模型的研究中发现<sup>[11]</sup>,肾内毛细血管网受到破坏后,常以增生的淋巴管代替血管进行物质转运。因此设想,当大鼠吸入过量的二氧化硅粉尘,由于各种机制引起肺部毛细血管网破坏,可能通过刺激肺巨噬细胞引起肺内淋巴管增生<sup>[12]</sup>,以使二氧化硅粉尘得以排出体外,构成了接触二氧化硅粉尘后矽肺形成的机体早期的“代偿期”;随着染尘时间的延长,大量二氧化硅粉尘聚集在肺淋巴系统,引起淋巴循环障碍,二氧化硅粉尘在肺内大量积累,诱发肺内纤维组织增生,形成矽肺,是为“失代偿期”。所以,肺内淋巴管过量增生可作为二氧化硅过量接触的早期征象;肺内淋巴循环障碍则视为矽肺发病的早期标志;而疏导肺内淋巴系统、改善肺淋巴系统循环则可能成为矽肺病防治新的研究方向。

#### 参考文献:

- [1] 初桂敏,李连,王宏.露天铁矿工肺内粉尘存留量与尘肺发病关

系的探讨[J].中国工业医学杂志,2004,17(4):260-261.

- [2] 张文昌,夏昭林.职业卫生与职业医学[M].北京:科学出版社,2008:84-85.
- [3] Kato S, Yasunaga A, Uchida U. Enzymer-Histochemical method for identification of lymphatic capillaries [J]. Lymphology, 1991, 24: 125-129.
- [4] 李颖,范尔钟,胡承杰,等.5'-核苷酸酶-碱性磷酸酶双重染色在鉴别微淋巴管和微血管中的应用[J].中华病理学杂志,2004,33(3):290-291.
- [5] El-Chemaly S, Malide D, Zudaire E, et al. Abnormal lymphangiogenesis in idiopathic pulmonary fibrosis with insights into cellular and molecular mechanisms [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(10):3958-3963.
- [6] Masahiro Yamashita M D, Noriyuki Iwama M D, Fumiko Date, et al. Characterization of lymphangiogenesis in various stages of idiopathic diffuse alveolar damage [J]. Human Pathology, 2009, 40: 542-551.
- [7] Guo W, Zhu Y, Yu P K, et al. Quantitative study of the topographic distribution of conjunctival lymphatic vessels in the monkey [J]. Exp Eye Res, 2012, 94(1):90-97.
- [8] Katos, Itonage I, Ji R C, et al. Enzyme triple staining for differentiation of lymphatics from venous and arterial capillaries [J]. Lymphology, 1996, 29(1):15-19.
- [9] Banerji S, Ni J, Wang S X, et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph specific receptor for hyaluronan [J]. Cell Biol, 1999, 144: 789-801.
- [10] Hirai S, Naito M, Terayama H, et al. Lymphangiogenesis in chronic inflammation in the testis [J]. Andrology, 2013, 1(1):147-154.
- [11] Katsuyuki Matsui, Katalyn Nagy-Bojarsky, Pirjo Laakkonen. Lymphatic microvessels in the rat remnant kidney model of renal fibrosis: aminopeptidase and podoplanin are discriminatory markers for endothelial cells of blood and lymphatic vessels [J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2003, 14: 1981-1989.
- [12] Maruyama K, Li M, Cursiefen C, et al. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages [J]. J Clin Invest, 2005, 115(9):2363-2372.

(上接第 245 页)

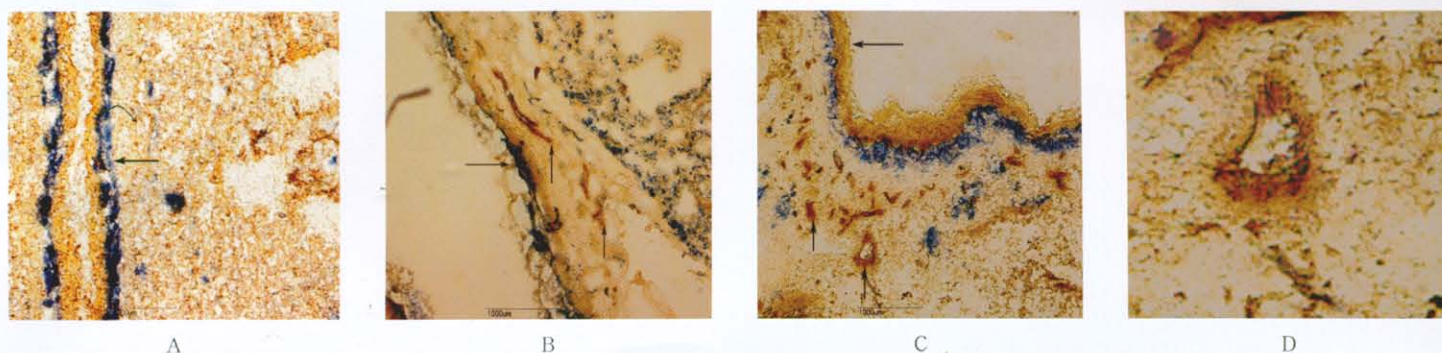
指标,运动情况可分正常运动、运动减弱、无运动、反常运动。本组病例中,轻型中毒患者左室壁运动多不受影响,中-重型中毒患者中有 27 例心肌运动伴不同程度减弱,暴发型患者的室壁运动减弱较明显,部分接近无运动,反常运动在本组病例中未出现。

综上所述,彩色多普勒超声的血流显像技术可敏感反映肾脏的血流灌注情况,超声心动图的心功能指标 EF 及室壁运动情况可敏感反映心肌收缩减弱程度,对临床治疗有指导性作用。肾脏血流显像Ⅲ型或Ⅳ型、RI>0.70、EF<30%预后极差,死亡率较高。彩色多普勒超声在急性百草枯中毒治疗中的应用,可为治疗措施的制定和预后评估提供重要依据<sup>[5]</sup>。

#### 参考文献:

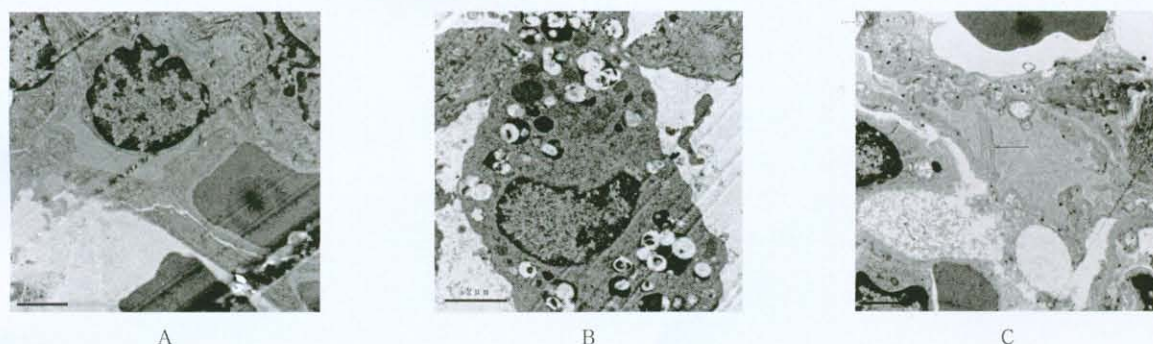
- [1] 佟飞,田英平,石汉文,等.急性百草枯中毒大鼠肺组织中基质金属蛋白酶及其组织抑制表达变化的研究[J].中国急救医学,2010,26(1):41-43.
- [2] Rocco P R, Negri E M, Kurtz P M, et al. Lung tissue mechanics and extra cellular matrix remodeling in acute lung injury [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 164(6):1067.
- [3] 徐瑞,周聊生,姜兹谟,等.多普勒超声肾血流测定对高血压病早期肾损害的预测性研究[J].中华超声影像学杂志,2010,9(10):607-609.
- [4] Tomita M, Okuyama T, Hidaka K, et al. Early differential gene expression of rat lung after exposure to paraquat [J]. Free Radic Res, 2004, 38(8):821.
- [5] Pond S M, Rivory L P, Hampson E C, et al. Kinetics of toxic doses of paraquat and the effects of hemoperfusion in the dog [J]. J Toxicol Clin Toxicol, 2010, 31(2):229-246.

## 肺淋巴管增生在矽肺大鼠发病过程中的作用(正文见250~252页)



注：淋巴管呈棕黄色，血管内壁呈棕黄色，外壁呈蓝色；其中A为正常对照组大鼠肺组织，可见外壁被染成蓝色的血管（“—”标记处），未发现淋巴管阳性；B、C分别为模型组14d和28d大鼠肺组织，图中“—”为血管，“↑”为淋巴管；D为模型组28d大鼠肺组织中淋巴管，可见其管壁薄，管腔呈不规则状。

图1 不同处理组的大鼠肺实质区经5'-核苷酸酶-碱性磷酸酶双重染色结果（×200）



注：A为正常对照组大鼠肺组织，可见毛细血管紧贴肺泡壁；B为模型组大鼠肺组织内尘细胞，可见大量溶酶体吞噬异物；C为模型组大鼠肺组织内增生的淋巴管，图中“—”为淋巴管瓣膜。

图2 不同处理组大鼠肺组织透射电子显微镜观察结果（×8000）

## 氟中毒大鼠生长板Ihh、PTHrP mRNA及蛋白表达的变化（正文见253~255页）

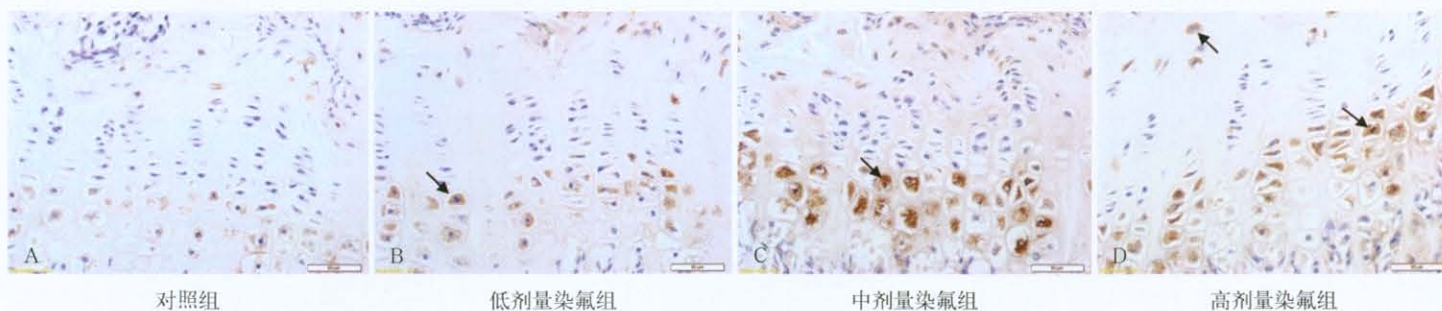


图1 大鼠生长板PTHrP蛋白表达结果（免疫组化，×400）

## 丙烯酰胺亚慢性染毒大鼠脑组织线粒体形态变化对能量代谢的影响 (正文见275~276页)

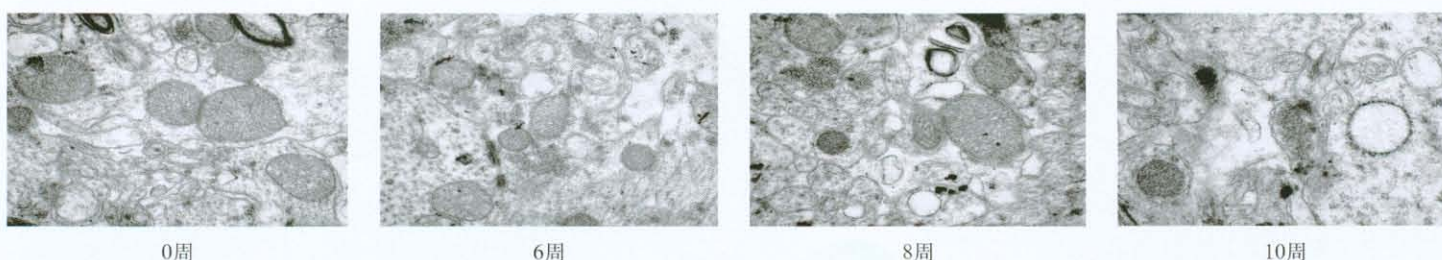


图1 不同时间点大鼠脑组织线粒体超微结构变化（×20.0k）