

银杏叶提取物改善肺内淋巴转运对大鼠矽肺病程的影响

陈紫莺^a, 候晓敏^a, 崔洁^a, 田盈^a, 马景景^a, 郝小惠^b, 郭灵丽^b, 马凤丹^b, 刘和亮^{a, b}

摘要:

[目的] 通过银杏叶提取物改善矽肺大鼠肺内淋巴转运, 探讨其对矽肺病程的影响。

[方法] Wistar雄性大鼠随机分为正常对照组、处理对照组、染尘组及处理组, 每组按不同采样时间又分为第7天、第14天、第28天、第42天、第56天5个亚组, 每组6只。染尘组及处理组大鼠以非气管暴露法气管内注入1 mL二氧化硅混悬液(50 mg/mL); 处理组每日经食道灌注银杏叶提取物混悬液(100 mg/kg); 正常对照组灌入等剂量生理盐水, 处理对照组灌入等剂量银杏叶提取物混悬液。分别检测肺组织中羟脯氨酸、血管内皮生长因子受体-3(VEGFR-3)及淋巴液中硅元素水平。

[结果] 染尘组和处理组与对照组相比, 大鼠染尘后 VEGFR-3 及淋巴液硅元素水平均在时间上呈先增高后降低趋势, 于第14天达高峰; 羟脯氨酸含量持续增加。与染尘组比较, 处理组第28~56天 VEGFR-3 水平升高($P<0.05$), 淋巴液硅元素水平在第7~28天亦升高($P<0.05$); 各时间点处理组羟脯氨酸含量均低于染尘组($P<0.05$)。Pearson相关性分析显示, 染尘组及处理组淋巴液硅元素与肺组织 VEGFR-3 均呈正相关($r=0.651$, $P<0.01$; $r=0.613$, $P<0.01$); 硅元素与肺组织羟脯氨酸均呈负相关($r=-0.786$, $P<0.01$; $r=-0.899$, $P<0.01$)。

[结论] 银杏叶提取物可能通过促进淋巴循环, 加快肺内二氧化硅的排除。

关键词: 矽肺; 淋巴循环; 银杏叶提取物; 硅元素; 血管内皮生长因子受体-3

引用: 陈紫莺, 候晓敏, 崔洁, 等. 银杏叶提取物改善肺内淋巴转运对大鼠矽肺病程的影响[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(4): 366-370. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.17559

Effects of promoting pulmonary lymphatic transportation by *Ginkgo biloba* extract on the pathogenesis of silicosis in rats CHEN Zi-ying^a, HOU Xiao-min^a, CUI Jie^a, TIAN Ying^a, MA Jing-jing^a, HAO Xiao-hui^b, GUO Ling-li^b, MA Feng-dan^b, LIU He-liang^{a, b} (a.School of Public Health b.Medical Research Center, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China). Address correspondence to LIU He-liang, E-mail: tsruoshui@163.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To explore the effect of lymphatic transportation on the pathogenesis of silicosis in rats by promoting the intrapulmonary lymphatic transportation by *Ginkgo biloba* extract.

[Methods] Wistar male rats were randomly divided into normal control, treatment control, silicosis model, and treatment groups. Each group was further divided into five subgroups according to sampling time of 7, 14, 28, 42, and 56 d, respectively, with six rats in each subgroup. The rats in the silicosis model group and the treatment group were injected with 1 mL silica suspension (50 mg/mL) by intratracheal instillation. The treatment group was injected with *Ginkgo biloba* extract suspension (100 mg/kg) everyday by gavage. The normal control was given saline at the same volume, and the treatment control group was given *Ginkgo biloba* extract suspension at the same volume. The levels of hydroxyproline (HYP) and vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) in lung and silicon in lymph were measured for each group.

[Results] Compared with the control group, both the VEGFR-3 and silicon in lymph rose up and peaked on day 14, while the HYP level continuously increased over time in both the silicosis model group and the treatment group. Compared with the silicosis

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 81673119); 唐山市科技计划项目(编号: 15130212C); 河北省高等学校科学技术研究项目(编号: ZD2016026)

[作者简介] 陈紫莺(1991—), 女, 硕士生; 研究方向: 劳动卫生与环境卫生; E-mail: 369024271@qq.com

[通信作者] 刘和亮, E-mail: tsruoshui@163.com

[作者单位] 华北理工大学 a.公共卫生学院 b.医学实验研究中心, 河北 唐山 063210

model group, the level of VEGFR-3 in the treatment group significantly increased from day 28 to day 56 ($P<0.05$), the level of silicon in lymph also increased from day 7 to day 28 ($P<0.05$), and the level of HYP decreased at all time points ($P<0.05$). The level of silicon in lymph was positively correlated with the level of VEGFR-3 in lung in the model group and the treatment group ($r=0.651$, $P<0.01$; $r=0.613$, $P<0.01$), and negatively correlated with the level of HYP ($r=-0.786$, $P<0.01$; $r=-0.899$, $P<0.01$), according to the results of Pearson correlation analysis.

[Conclusion] *Ginkgo biloba* extract could promote lymphatic circulation and accelerate lymphatic transport of silica in lung.

Keywords: silicosis; lymphatic circulation; *Ginkgo biloba* extract; silicon; vascular endothelial growth factor receptor-3

Citation: CHEN Zi-ying, HOU Xiao-min, CUI Jie, et al. Effects of promoting pulmonary lymphatic transportation by *Ginkgo biloba* extract on the pathogenesis of silicosis in rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2018, 35(4): 366-370. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.17559

矽肺是我国法定职业性尘肺病中最严重的一种,其发病机制尚未明确。有研究表明,肺淋巴系统可能参与矽肺的发病过程^[1]。本课题组前期实验证明,矽肺大鼠肺组织淋巴管增生^[2-3],提示肺内淋巴循环在矽肺的发病过程中起重要作用。本研究拟在此基础上以银杏叶提取物促进矽肺大鼠淋巴循环,通过检测淋巴管内皮特异性标记物 VEGFR-3 验证此作用,以羟脯氨酸反映肺组织胶原含量变化,观察改善大鼠肺内淋巴循环对矽肺病程的影响,探讨肺内淋巴循环在矽肺发病中的作用,为矽肺的预防及治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SPF 级成年雄性 Wistar 大鼠 120 只,体重 180~220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司;染尘用二氧化硅粉尘(由河北省煤矿卫生与安全重点实验室提供),结晶型游离二氧化硅含量 99%,粒径 0.5~10.0 μm ,80% 粒径范围在 1.0~5.0 μm 。二氧化硅粉尘充分干燥研磨后以生理盐水配制成 50 mg/mL 的混悬液,高压灭菌后备用;兔多克隆抗体血管内皮生长因子受体-3 (vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3) (Abcam, 英国);羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国);Masson 染色试剂盒(北京益利精细化学品有限公司,中国);银杏叶提取物(浙江省康恩贝制药股份有限公司,中国)。用泡酸(10%硝酸)无硅化处理移液器吸头、EP 管、离心管等耗材。

1.2 动物分组及模型建立

Wistar 雄性大鼠按体重随机分为正常对照组、处理对照组(银杏叶提取物)、染尘组(二氧化硅粉尘)及处理组(二氧化硅粉尘+银杏叶提取物)。每组按不同采样时间又分为第 7 天、第 14 天、第 28 天、第 42 天、第 56 天 5 个亚组,每组 6 只。染尘组及处理组大鼠以

非气管暴露法气管内一次性染毒,注入 1 mL 上述二氧化硅混悬液;染毒后,处理组每日经食道灌注银杏叶提取物混悬液(100 mg/kg);正常对照组灌入等剂量生理盐水,处理对照组每日灌入等剂量银杏叶提取物混悬液。

1.3 生物样本的采集与处理

大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉,手持手术剪沿大鼠腹白线打开腹腔,暴露肠系膜根部,找到与肠系膜上动脉相伴行的肠淋巴管进行插管,以无硅真空采血管收集淋巴液^[4],收集时间大约为 30 min;腹主动脉采血,离心(300 $\times g$, 10 min)后分离血清,分装于无硅化处理过的 EP 管中;取右下肺最大横径处肺组织以 4% 多聚甲醛固定。所有样本于 -80℃ 保存。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 病理学观察 HE 染色及 Masson 染色观察肺组织的病理学改变,固定后的肺组织常规脱水、石蜡包埋、切片,行 HE 染色、Masson 染色,显微镜下观察病理学改变情况。

1.4.2 肺部淋巴管增生情况检测 Western blot 法定量检测各组大鼠右下肺 VEGFR-3 蛋白的表达水平,以 GAPDH 作为内参。

1.4.3 淋巴液中的硅元素水平测定 电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)法检测淋巴液中硅元素水平,准确操作并记录数据。

1.4.4 肺组织羟脯氨酸含量测定 取各大鼠适量右下肺边缘组织放于玻璃匀浆器中于冰上研磨,制成组织匀浆,严格按照试剂盒操作说明进行检测。

1.5 统计学分析

以 Excel 2007 建数据库,SPSS 17.0 统计软件做统计分析,数据均以($\bar{x} \pm s$)形式表示,多组间的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验;相关分析采用 Pearson 相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

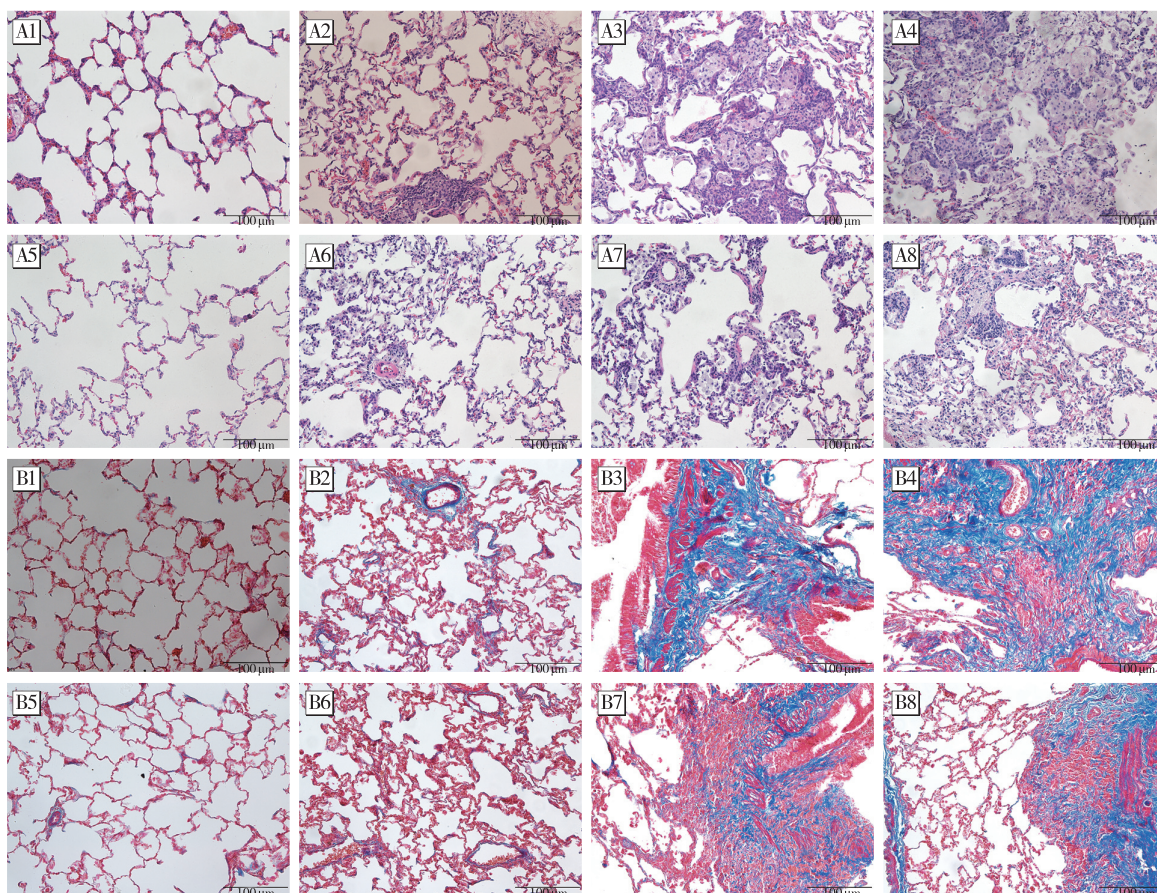
2.1 肺组织标本肉眼观察

从外观上看,对照组各大鼠肺组织大致正常,颜色为粉红色。染尘组第7天时,肺组织出现水肿、弥漫性出血;第14天时,肺组织可见海绵样改变,肺体积明显增大,并出现片状出血;第28天时,灰白结节散在分布于肺组织;第42天时,灰白结节体积增大,质地变硬;第56天时,肺组织明显萎缩,质地坚硬。处理组大鼠肺组织病变与之相似,只是症状较染尘组有所减轻。

2.2 大鼠肺组织病理改变

HE 染色结果(图1)显示:2个对照组结构基本正常。染尘组第14天即可见中性粒细胞、巨噬细胞的轻度浸润;第28天可见巨噬细胞逐渐聚集,肉芽肿结节形成;第56天时纤维性结节形成。

Masson 染色结果(图1)显示:蓝色的为胶原纤维,红色的为红细胞、肌纤维。2个对照组结构基本正常。染尘组第14天时肺组织纤维开始沉积;第28天可见小血管壁及支气管周围胶原增生明显,逐渐聚集;第56天时肺组织纤维化程度加重。



[注]A: HE 染色; B: Masson 染色。1: 正常对照组; 2: 染尘组第14天; 3: 染尘组第28天; 4: 染尘组第56天; 5: 处理对照组; 6: 处理组第14天; 7: 处理组第28天; 8: 处理组第56天。

图1 各组大鼠肺组织形态学变化

处理组各时间点大鼠肺组织病变与染尘组变化过程相似,但程度较染尘组有所减轻。

2.3 肺部淋巴管增生情况

Western blot 检测结果(表1,图2)显示,染尘组和处理组大鼠肺组织 VEGFR-3 表达水平均出现先增高后降低的趋势,两组均于第14天时达到峰值。染尘组与正常对照组、处理组与处理对照组相比较,第7~42天肺组织 VEGFR-3 蛋白表达水平均较高(均 $P < 0.05$);与染尘组比较,处理组第28~56天肺组织 VEGFR-3 蛋

白表达水平明显增高(均 $P < 0.05$)。

表1 大鼠肺组织 VEGFR-3 的相对表达情况 ($n=6$)

时间点	正常对照组	处理对照组	染尘组	处理组
第7天	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.02	0.71 ± 0.02^a	0.73 ± 0.01^a
第14天	0.41 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.90 ± 0.01^a	0.92 ± 0.01^a
第28天	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.81 ± 0.01^a	0.86 ± 0.02^{ab}
第42天	0.36 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.52 ± 0.01^a	0.63 ± 0.02^{ab}
第56天	0.41 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.35 ± 0.04	0.44 ± 0.01^b

[注]a: 与相应对照组比较, $P < 0.05$; b: 与染尘组比较, $P < 0.05$ 。

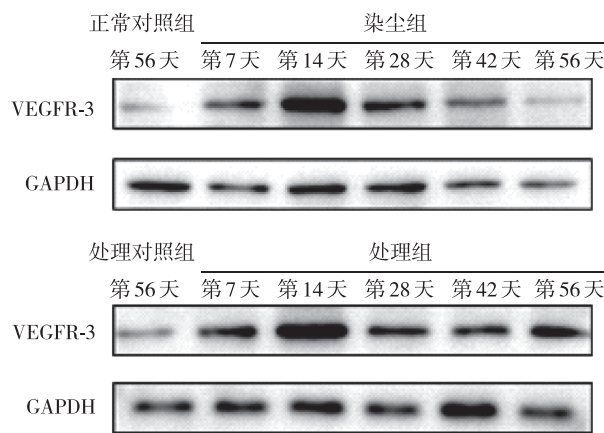


图2 Western blot检测大鼠肺组织 VEGFR-3 的表达

2.4 淋巴液中硅元素水平的变化情况

由表2可知,染尘组与处理组大鼠的淋巴液硅元素水平均呈现先增高后降低的趋势,于第14天时达到峰值。除第56天外,染尘组其余各时间点的淋巴液硅元素水平均高于正常对照组($P<0.05$)。与染尘组比较,第7~28天处理组大鼠淋巴液硅元素水平均较高($P<0.05$)。

表2 大鼠淋巴液硅元素水平(mg/L, $n=6$)

时间点	正常对照组	处理对照组	染尘组	处理组
第7天	0.63 ± 0.02	0.65 ± 0.06	1.37 ± 0.22 ^a	1.65 ± 0.45 ^{ab}
第14天	0.66 ± 0.05	0.70 ± 0.11	1.43 ± 0.04 ^a	1.66 ± 0.08 ^{ab}
第28天	0.64 ± 0.02	0.65 ± 0.03	0.86 ± 0.06 ^a	0.98 ± 0.04 ^{ab}
第42天	0.61 ± 0.07	0.63 ± 0.09	0.84 ± 0.09 ^a	0.89 ± 0.08 ^a
第56天	0.64 ± 0.04	0.67 ± 0.02	0.78 ± 0.07	0.83 ± 0.02 ^a

[注]a:与相应对照组比较, $P<0.05$; b:与染尘组比较, $P<0.05$ 。

2.5 肺组织羟脯氨酸的含量

由表3可知,染尘组和处理组肺组织羟脯氨酸含量均持续性增加。与相应对照组比较,两组各时间点羟脯氨酸含量均较高($P<0.05$);与染尘组比较,处理组各时间点羟脯氨酸含量较低($P<0.05$)。

表3 大鼠肺组织中羟脯氨酸含量(mg/g, $n=6$)

时间点	正常对照组	处理对照组	染尘组	处理组
第7天	0.50 ± 0.03	0.52 ± 0.02	0.84 ± 0.04 ^a	0.73 ± 0.03 ^{ab}
第14天	0.54 ± 0.06	0.54 ± 0.02	1.26 ± 0.04 ^a	1.04 ± 0.04 ^{ab}
第28天	0.52 ± 0.05	0.51 ± 0.06	1.58 ± 0.04 ^a	1.35 ± 0.06 ^{ab}
第42天	0.57 ± 0.02	0.52 ± 0.03	1.74 ± 0.06 ^a	1.49 ± 0.06 ^{ab}
第56天	0.55 ± 0.01	0.55 ± 0.05	1.90 ± 0.26 ^a	1.73 ± 0.05 ^{ab}

[注]a:与相应对照组比较, $P<0.05$; b:与染尘组比较, $P<0.05$ 。

2.6 硅元素水平与 VEGFR-3 及羟脯氨酸的相关分析

淋巴液中硅元素水平与肺组织 VEGFR-3 及羟脯氨酸含量的 Pearson 相关分析结果显示,染尘组硅元素

与 VEGFR-3 呈正相关($r=0.651$, $P<0.01$);处理组硅元素与 VEGFR-3 亦呈正相关($r=0.613$, $P<0.01$)。染尘组硅元素与羟脯氨酸呈负相关($r=-0.786$, $P<0.01$),处理组硅元素与羟脯氨酸亦呈负相关($r=-0.899$, $P<0.01$)。

3 讨论

淋巴系统作为人体的重要防御体系,由淋巴组织、淋巴管道及其中的淋巴液组成,有组织液回收、脂质代谢、免疫防御等生理功能。近年来随着淋巴管特异性标志物的发现,大量实验研究已证实淋巴管的生成与机体感染、淋巴水肿、肿瘤转移以及肥胖等疾病密切相关^[5-7]。

有研究表明,通过疏通肺内血液、淋巴循环,可使矽肺患者缺氧症状得到改善^[8-9],矽尘进入肺间质后可循淋巴管向肺门引流,引起肺门淋巴结矽性病变及淋巴管阻塞,推测淋巴循环在矽肺病变中有一定作用。淋巴管的形成受多种因素调控^[10],其中 VEGFR-3 是淋巴管内皮细胞特异性标志物,VEGFR-3 与其配体血管内皮生长因子-C 特异性结合后可促进淋巴管生成^[11];抑制 VEGFR-3 或血管内皮生长因子-C 的表达,可在一定程度上抑制淋巴管的增生^[12-13]。银杏叶为银杏科植物银杏的干燥叶,其提取物具有改善微循环的作用^[14]。本研究以银杏叶提取物作用于二氧化硅染尘大鼠,结果显示,染尘组与处理组大鼠肺组织 VEGFR-3 及淋巴液硅元素水平均呈先增高后降低的趋势,而肺组织羟脯氨酸含量持续升高。相关性分析结果显示,VEGFR-3 与淋巴液硅元素水平呈正相关,羟脯氨酸与淋巴液硅元素呈负相关。推测矽尘进入大鼠肺内造成损伤,并刺激肺内淋巴管出现代偿性增生,从而加快肺内二氧化硅的淋巴转运,淋巴液中硅元素水平随之升高。但随着染尘时间延长,矽尘不断在肺内蓄积,超出了肺内淋巴循环的代偿能力,肺组织 VEGFR-3 及淋巴液硅元素水平随之降低,羟脯氨酸含量持续升高,大鼠矽肺纤维化程度加重。处理组大鼠经银杏叶药物作用后,肺内淋巴循环得到改善,淋巴管增生情况更加明显,并加快了肺内二氧化硅的淋巴排除,肺组织 VEGFR-3 及淋巴液硅元素水平较染尘组均有不同程度升高,从而使处理组各时间点羟脯氨酸水平均低于染尘组,减缓了矽肺病程发展。

二氧化硅的化学性质极其稳定,但其在体内可形成可溶解的硅酸,通过硅酸盐的形式使体内硅元素水平升高,即使染尘后短时间内也会明显升高。淋巴液

的采集较血液采集更困难,因此制约了淋巴循环的研究。本研究所采集的淋巴液为肠系膜淋巴液,采集方法相对简便。肠淋巴液中的硅元素一般主要来源为食物,但通过设立的对照组,可以知道染尘组大鼠肠淋巴液的硅元素主要为染尘所致。本研究初步验证了淋巴循环在矽肺中的作用。本课题组下一步将采用胸导管淋巴液的采集方法,开辟一个更精确的胸部淋巴循环的观察窗口。本研究以银杏叶提取物作用于矽肺大鼠,在一定程度上减缓了矽肺病程的进展。银杏叶提取物除了改善微循环的作用外,还具有抗炎、抗氧化等药理作用^[14],推测其可能通过多种途径抑制矽肺纤维化。本研究通过检测 VEGFR-3 观察大鼠肺内淋巴管的增生情况,证明改善矽肺大鼠肺内淋巴循环确实可以加快二氧化硅的排除,进一步验证了肺内淋巴系统在矽肺发病过程中的作用,提示改善肺内淋巴循环功能可能是一种临床治疗矽肺的新手段。

参考文献

- [1] TAEGER D, BRÜNING T, PESCH B, et al. Association between lymph node silicosis and lung silicosis in 4384 German uranium miners with lung cancer[J]. Arch Environ Occup Health, 2011, 66(1): 34-42.
- [2] 李艳辉,王宏丽,郝小惠,等.肺淋巴管增生在矽肺大鼠发病过程中的作用[J].中国工业医学杂志,2013,26(4): 250-252, 321.
- [3] 刘微,刘和亮,张秀峰,等.矽肺大鼠肺内淋巴管增生与纤维化进程的关系[J].环境与职业医学,2016,33(8): 753-757.
- [4] 刘艳凯,牛春雨,赵自刚,等.麻醉大鼠肠淋巴循环的研究[J].微循环学杂志,2000,10(1): 4-6.
- [5] BRESLIN JW. Mechanical forces and lymphatic transport[J]. Microvasc Res, 2014, 96: 46-54.
- [6] STACKER SA, Williams SP, Kamezis T, et al. Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(3): 159-172.
- [7] BRESTOFF JR, KIM BS, SAENZ SA, et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity[J]. Nature, 2015, 519(7542): 242-246.
- [8] RAGHU G, COLLARD HR, EGAN JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(6): 788-824.
- [9] BADESCH DB, ABMAN SH, SIMONNEAU G, et al. Medical therapy for pulmonary arterial hypertension: updated ACCP evidence-based clinical practice guidelines[J]. Chest, 2007, 131(6): 1917-1928.
- [10] GAJE PN, STOIA-DJESKA I, CIMPEAN AM, et al. Lymphangiogenesis as a prerequisite in the pathogenesis of lung fibrosis[J]. In Vivo, 2014, 28(3): 367-373.
- [11] KIM H, KATARU RP, KOH GY. Regulation and implications of inflammatory lymphangiogenesis[J]. Trends Immunol, 2012, 33(7): 350-356.
- [12] BZOWSKA M, MEZYK-KOPEĆ R, PRÓCHNICKI T, et al. Antibody-based antiangiogenic and antilymphangiogenic therapies to prevent tumor growth and progression[J]. Acta Biochim Pol, 2013, 60(3): 263-275.
- [13] CHANG YW, SU CM, SU YH, et al. Novel peptides suppress VEGFR-3 activity and antagonize VEGFR-3-mediated oncogenic effects[J]. Oncotarget, 2014, 5(11): 3823-3835.
- [14] 张鹏飞,廖丽君,邓祯,等.银杏叶提取物的药理作用及其临床应用研究进展[J].辽宁中医杂志,2017,44(2): 426-429.

(收稿日期: 2017-09-07; 录用日期: 2018-01-16)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 陶黎纳)