

二氧化硅刺激 U937 细胞介导 VEGF-C 生成 对人淋巴内皮细胞管状结构形成的影响

张劲松^a, 崔洁^a, 李欣颖^a, 郭灵丽^{a, b}, 郝小惠^{a, b}, 王宏丽^b, 刘和亮^{a, b}

华北理工大学 a. 公共卫生学院 b. 河北省器官纤维化重点实验室, 河北 唐山 063210

摘要:

[背景] 课题组前期动物实验研究表明, 二氧化硅(SiO₂) 诱导的矽肺大鼠早期肺组织中出现大量淋巴管生成, 其对于清除肺内粉尘, 缓解矽肺发病进程具有重要意义, 但淋巴管生成的具体分子机制尚未明确。

[目的] 探究 SiO₂ 介导人单核巨噬细胞株 U937 产生血管内皮生长因子 C (VEGF-C) 对人淋巴内皮细胞 (HLECs) 管状结构形成的影响及作用机制。

[方法] 采用不同质量浓度 (后称: 浓度) (0、25、50、100、200 mg·L⁻¹) SiO₂ 刺激 U937 细胞不同时间 (12、24、48 h)。Western blotting 检测 U937 细胞中 VEGF-C 蛋白水平, ELISA 法检测细胞培养上清液中 VEGF-C 蛋白水平。选择 VEGF-C 蛋白表达水平最高的 SiO₂ 刺激浓度和时间, 收集其细胞培养上清液作为条件培养基 (CM)。HLECs 分为阴性对照组、CM 对照组、CM 处理组、VEGF-C 处理组。CM 处理组采用 SiO₂ 刺激后的 CM 处理, VEGF-C 处理组采用含质量浓度 5 000 ng·L⁻¹ 的人 VEGF-C 重组蛋白培养基处理, CM 对照组采用未经 SiO₂ 刺激的细胞培养上清液处理, 阴性对照组为常规培养。HLECs 增殖能力实验, CM 处理组采用体积分数为 10%、50% 和 100% 的 CM 处理细胞, 培养 24、48、72 h; 迁移能力和管状结构形成能力实验均采用 100% CM 处理细胞, 分别培养 12 h 和 6 h。通过 MTS 法检测 HLECs 增殖能力, 划痕实验和基质胶管形成实验检测细胞迁移和管状结构形成能力。

[结果] 与 0 mg·L⁻¹ 组相比, SiO₂ 浓度为 50 mg·L⁻¹, 刺激时间为 24 h 时, VEGF-C 蛋白水平在 U937 细胞和细胞培养上清液中均最高 [分别为 (1.12±0.08) 和 (5 464.00±231.21) ng·L⁻¹]。随着作用时间 (24、48、72 h) 的延长, CM 浓度越大, HLECs 的增殖能力越强, 72 h 时 100% CM 处理组的细胞增殖能力最强 (2.00±0.13), 与对照组相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 72 h 时 VEGF-C 处理组 HLECs 的增殖能力增强 (1.67±0.10), 与对照组相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。CM 处理组和 VEGF-C 处理组中 HLECs 迁移面积比 [(53.64±4.74) %、(56.82±5.72) %] 增加, 与对照组相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。CM 处理组和 VEGF-C 处理组中 HLECs 的管腔数量 (7.20±1.30、8.20±1.64) 和管分枝数量 (32.60±5.13、38.20±8.70) 增加, 与对照组相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

[结论] SiO₂ 可能通过介导人单核巨噬细胞株 U937 产生 VEGF-C, 从而促进 HLECs 的增殖、迁移及管状结构形成。

关键词: 矽肺; 淋巴管生成; 人单核巨噬细胞; 淋巴内皮细胞; 血管内皮生长因子 C

Effect of VEGF-C production mediated by SiO₂ stimulated U937 cells on tubular structure formation of human lymphatic endothelial cells ZHANG Jin-song^a, CUI Jie^a, LI Xin-ying^a, GUO Ling-li^{a, b}, HAO Xiao-hui^{a, b}, WANG Hong-li^b, LIU He-liang^{a, b} (a.School of Public Health b.Hebei Key Laboratory of Organ Fibrosis, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China)

Abstract:

[Background] Our preliminary animal experiment results show that silica (SiO₂) induces significant lymphangiogenesis in rat lung tissues in early stage, which may be of great significance in removing lung dust and alleviating the pathogenesis of silicosis. However, the specific molecular mechanism of lymphangiogenesis has not been fully understood.

[Objective] This experiment explores the effect of SiO₂ stimulated human mononuclear macrophages U937 producing vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) on the tubular

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.20261

基金项目

国家自然科学基金项目 (81673119); 中国煤矿尘肺病防治基金会项目 (201911J035)

作者简介

张劲松 (1996—), 男, 硕士生;
E-mail: 944264191@qq.com

通信作者

刘和亮, E-mail: tsruoshui@163.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2020-05-23

录用日期 2020-09-16

文章编号 2095-9982(2020)11-1106-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

张劲松, 崔洁, 李欣颖, 等. 二氧化硅刺激 U937 细胞介导 VEGF-C 生成对人淋巴内皮细胞管状结构形成的影响 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (11): 1106-1111.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20261

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LIU He-liang, E-mail: tsruoshui@163.com

Competing interests None declared

Received 2020-05-23

Accepted 2020-09-16

►To cite

ZHANG Jin-song, CUI Jie, LI Xin-ying, et al. Effect of VEGF-C production mediated by SiO₂ stimulated U937 cells on tubular structure formation of human lymphatic endothelial cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(11): 1106-1111.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20261

structure formation of human lymphatic endothelial cells (HLECs).

[Methods] U937 cells were stimulated with different concentrations of SiO_2 (0, 25, 50, 100, and 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) for different time (12, 24, and 48 h). Western blotting and ELISA were used to detect the VEGF-C protein level in U937 cells and in cell culture supernatant respectively. The combination of SiO_2 stimulation concentration and time generating the highest VEGF-C protein expression level was selected for further experiment, and the cell culture supernatant was collected as conditioned medium (CM). HLECs were divided into four groups. The CM treatment group was treated with CM stimulated by SiO_2 , the VEGF-C treatment group with a medium containing 5000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ human VEGF-C recombinant protein, the CM control group with cell culture supernatant without SiO_2 stimulation, and the negative control group without any administration. The cell proliferation of HLECs was detected by MTS method after the cells were treated by 10%, 50%, and 100% CM for 24, 48, and 72 h; the cell migration and tubular structure formation were detected by scratch test and matrigel tube formation test after the cells were treated by 100% for 12 h and 6 h respectively.

[Results] The SiO_2 stimulation at 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h produced the highest VEGF-C protein level in both U937 cells and cell culture supernatant [(1.12±0.08) and (5464.00±231.21) $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively] compared with the 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ group. With time extension (24, 48, and 72 h), the CM concentration was higher, and the proliferation of HLECs was enhanced. The 100% CM treatment group at 72 h had the highest cell proliferation (2.00±0.13), the VEGF-C treatment group at 72 h also showed increased proliferation (1.67±0.10), and the differences were significant compared with the control group ($P<0.05$). The migration area ratios of HLECs in the CM treatment group and the VEGF-C treatment group [(53.64±4.74)% and (56.82±5.72)% respectively] were increased compared with the control group ($P<0.05$). The number of tubes (7.20±1.30, 8.20±1.64) and the number of tube branches (32.60±5.13, 38.20±8.70) of HLECs were increased in the CM treatment group and the VEGF-C treatment group compared with the control group ($P<0.001$).

[Conclusion] SiO_2 may promote the proliferation, migration, and tubular structure formation of HLECs by stimulating human mononuclear macrophages U937 to produce VEGF-C.

Keywords: silicosis; lymphangiogenesis; human mononuclear macrophage; lymphatic endothelial cell; vascular endothelial growth factor C

矽肺是一种以肺部炎症、矽结节形成和间质纤维化为主要表现,并且难以治愈的职业病,通常是由于职业性接触矽尘而引起^[1]。有较多实验研究表明淋巴系统作为重要的免疫清除系统参与了矽肺的发病进程^[2-3]。本课题组前期动物实验研究发现,二氧化硅(silica , SiO_2)诱导的矽肺大鼠疾病早期肺部出现较多新生淋巴管,与体内硅元素的排出相关;给予丹参酮、银杏叶提取物等药物治疗后淋巴管生成进一步增加,肺内硅元素排出增多,炎症、纤维化程度得到缓解^[4-5]。但淋巴管生成的具体分子机制尚未作进一步研究。

SiO_2 颗粒进入肺部的早期阶段,被肺巨噬细胞吞噬,促使其活化并释放大量炎症因子,具有活化淋巴管的功能,促进淋巴管生成增加^[6]。血管内皮生长因子C (vascular endothelial growth factor C, VEGF-C) 作为炎症因子中主要的促淋巴管生成因子,可与其位于淋巴内皮细胞 (lymphatic endothelial cells, LECs) 上的血管内皮生长因子受体3结合,促进淋巴管生成^[7]。因此,推测矽肺早期的淋巴管生成与 SiO_2 诱导肺巨噬细胞活化产生 VEGF-C 作用于 LECs 密切相关。本研究通过 SiO_2 刺激人单核巨噬细胞株 U937,收集细胞培养上清液用于体外培养人淋巴内皮细胞 (human lymphatic endothelial cells, HLECs),观察细胞培养上清液中的 VEGF-C 及其对 HLECs 增殖、迁移及管状结构形成的影

响,探究矽肺早期肺部淋巴管生成的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

HLECs (上海子实生物有限公司,中国); U937 细胞 (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,中国); 内皮细胞培养基 (endothelial cell medium, ECM) (Science cell, 美国); 1640 培养基 (Gibco, 美国); 胎牛血清 (Gibco, 美国); 佛波醇酯 (phorbol myristate acetate, PMA) (上海碧云天生物技术有限公司,中国); SiO_2 (粒径为 0.5~10 μm) (Sigma, 美国); VEGF-C 兔多克隆抗体 (Affinity Biosciences, 美国); 人 VEGF-C ELISA 试剂盒 (无锡市东林科技发展有限公司,中国); 人 VEGF-C 重组蛋白 (Sino Biological, 中国); MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] 细胞增殖试剂盒 (Promega, 美国); Matrigel 基质胶 (Corning, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 U937 细胞株采用体积分数为 90% 的 1640 培养基和 10% 胎牛血清进行传代培养。HLECs 采用 ECM 培养基进行传代培养,5 到 10 代为工作细胞。

1.2.2 SiO_2 刺激 U937 细胞 SiO_2 充分研磨,高压灭菌后备用。U937 细胞株经 PMA 诱导 48 h 成为贴壁的单核巨噬细胞后,采用浓度为 0、25、50、100、200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

的SiO₂刺激,刺激时间为12、24、48 h。

1.2.3 Western blotting 法检测 U937 细胞中 VEGF-C 蛋白表达 收集细胞,裂解离心后提取蛋白,聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测细胞内VEGF-C蛋白表达,以 β -actin作为内参。

1.2.4 ELISA 法检测 U937 细胞培养上清液中 VEGF-C 蛋白表达 根据试剂盒说明书,采用ELISA法定量检测U937细胞培养上清液中VEGF-C的蛋白表达水平。

1.2.5 条件培养基 (conditioned medium, CM) 制备 U937细胞经PMA诱导48 h成为贴壁的单核巨噬细胞后,除去培养基,并用PBS洗涤两次,采用含SiO₂的ECM作为基础培养基(0.5%胎牛血清)培养。培养相应时间后,收集细胞培养液于超速离心机(离心半径5.5 cm) 3 000 r·min⁻¹, 4℃离心5 min,收集上清液作为CM, -80℃保存备用。

1.2.6 HLECs 分组 HLECs采用ECM培养基传至5~10代。实验分为4组:阴性对照组,CM对照组,CM处理组,VEGF-C处理组。CM处理组采用SiO₂刺激后VEGF-C表达水平最高的U937细胞培养上清液培养,VEGF-C处理组采用含质量浓度5 000 ng·L⁻¹的人VEGF-C重组蛋白的ECM基础培养基培养,CM对照组采用未经SiO₂刺激的培养相同时间的U937细胞培养上清液培养,阴性对照组采用ECM基础培养基培养。各组胎牛血清均为0.5%。具体培养时间见后续实验。

1.2.7 HLECs 增殖能力检测 HLECs接种于96孔板,每孔细胞数量为(6~8) × 10³个,每孔加入100 μ L ECM完全培养基。细胞贴壁后,去除培养基;CM处理组加入100 μ L体积分数分别为10%、50%和100%的CM,VEGF-C处理组、CM对照组、阴性对照组分别加入100 μ L相应的培养基(详见1.2.6)进行处理。设置空白孔。每组各设5个复孔,在37℃、5% CO₂条件下培养24、48、72 h后,向每个孔中加入10 μ L MTS试剂,孵育4 h。采用酶标仪测定光密度值(D),测定波长为490 nm。细胞增殖率 = $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.2.8 HLECs 迁移能力检测 细胞接种于6孔板,每孔细胞数量为(4~5) × 10⁵个。待细胞融合,立即使用1 000 μ L移液器吸头垂直于孔板划痕。PBS缓慢冲洗3次,洗去划下的细胞。各组加入2 mL相应的培养基(详见1.2.6)进行处理。为了排除细胞增殖的影响,培养12 h后,于倒置显微镜下针对划痕区域选取5个随机视野(4倍),通过Image J 1.52v软件计算细胞迁移面积比,面积比增大,表明细胞迁移能力增强。细

胞迁移面积比 = (0 h 该组细胞未覆盖面积 - 12 h 该组细胞未覆盖面积) / 0 h 该组细胞未覆盖面积 × 100%。

1.2.9 HLECs 管状结构形成能力检测 Matrigel 基质胶4℃过夜冷溶,96孔板每孔加入50 μ L Matrigel 基质胶,37℃聚合45 min。根据实验分组,通过不同培养基调整HLECs浓度并接种于96孔板,每孔细胞数量为1.5 × 10⁴个。每组设3个复孔。37℃培养6 h后,于显微镜下选取5个随机视野(10倍)并拍照,使用Image J 1.52v软件分析图像中生成的管腔数量和管分枝数量^[8]。

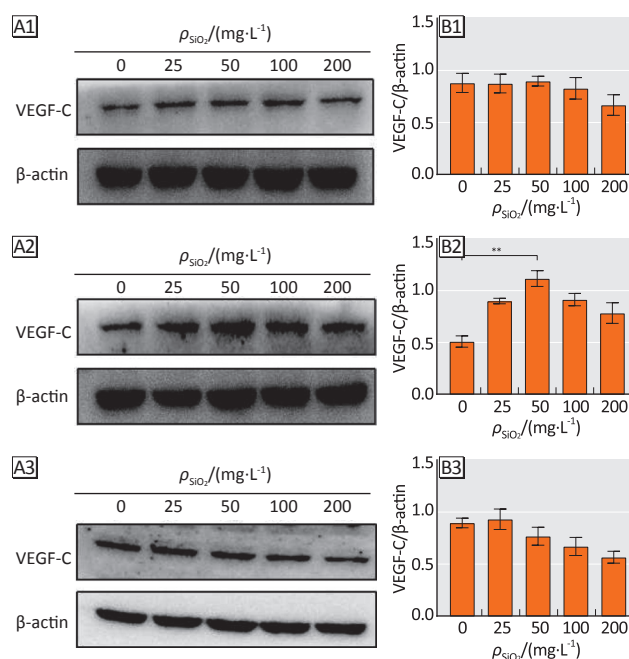
1.3 统计学分析

采用SPSS 21.0统计软件进行统计分析。多组数据间的比较采用方差齐性检验和单因素方差分析,两两比较采用LSD检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 SiO₂ 刺激 U937 细胞后 VEGF-C 蛋白表达

图1显示,不同浓度的SiO₂刺激细胞12、48 h后,两时点的最大值分别与0 mg·L⁻¹浓度组相比,VEGF-C蛋白表达无明显增高(P 分别为0.833、0.579)。当SiO₂刺激24 h,细胞中VEGF-C蛋白表达水平于50 mg·L⁻¹组达到峰值(1.12 ± 0.08),与0 mg·L⁻¹浓度组相比差异具有统



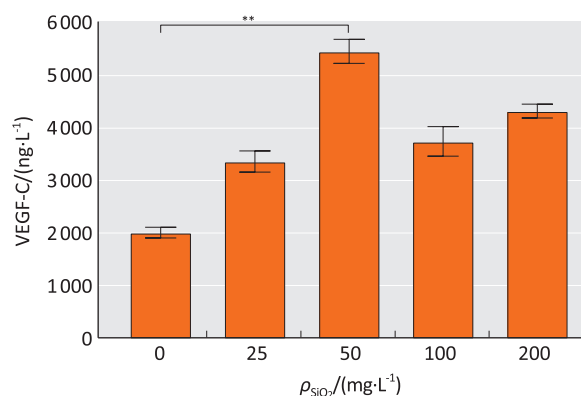
[注] A: 蛋白电泳图; B: VEGF-C蛋白表达水平变化直条图。1: SiO₂刺激12 h; 2: SiO₂刺激24 h; 3: SiO₂刺激48 h。**: 与0 mg·L⁻¹浓度组相比, $P < 0.05$ 。

图1 不同浓度SiO₂刺激12、24、48 h后U937细胞中VEGF-C的蛋白表达水平变化

Figure 1 Changes of VEGF-C protein expressions in U937 cells exposed to different concentrations of SiO₂ for 12, 24, and 48 h

计学意义 ($P<0.05$)。ELISA 结果显示, 当 SiO_2 刺激时间为 24 h, 浓度为 $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, VEGF-C 在 U937 细胞培养上清液中的蛋白含量最高 [$(5464.00\pm231.21)\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$], 与 $0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 2; 12 h 组和 48 h 组的细胞培养上清液中 VEGF-C 蛋白含量较低, 各组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

因此选择浓度 $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SiO_2 刺激 U937 细胞 24 h 后的培养上清液作为 CM, 用于后续实验。



[注] **: 与 $0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组相比, $P<0.05$ 。

图2 不同浓度 SiO_2 刺激 24 h 后 U937 细胞培养上清液中 VEGF-C 的蛋白表达水平变化

Figure 2 Changes of VEGF-C protein expressions in U937 cell culture supernatant exposed to different concentrations of SiO_2 for 24 h

2.2 HLECs 增殖能力

如表 1 所示, 培养 48、72 h 后, CM 处理和 VEGF-C 处理可明显增强 HLECs 的增殖能力。随着 CM 体积分数的增加, 细胞增殖能力增强, 100% CM 组的细胞增殖能力最大。因此后续实验均采用 100% CM 处理细胞。

表1 不同体积分数 CM 处理和 VEGF-C 处理 24、48、72 h 后 HLECs 增殖能力的变化 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

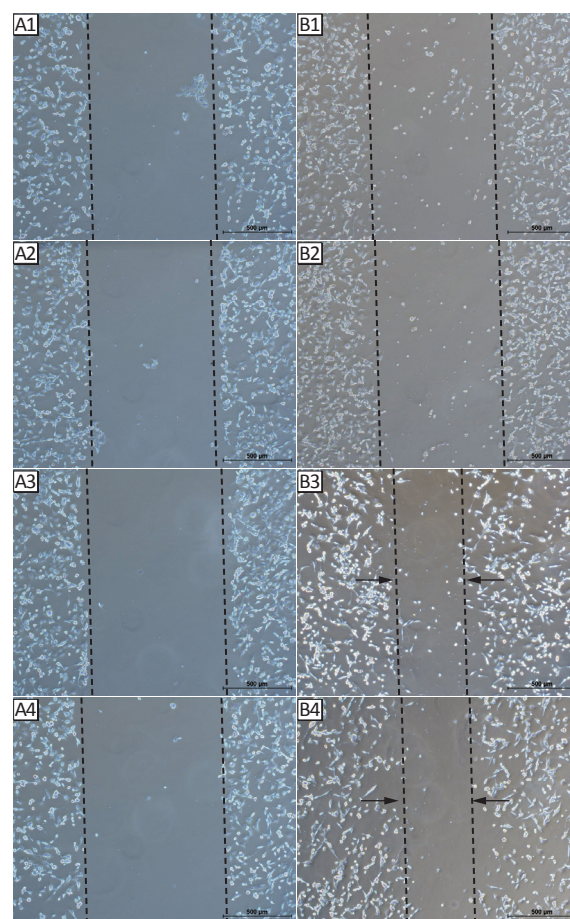
Table 1 Changes of the proliferation of HLECs exposed to different volumefrac of CM and VEGF-C for 24, 48, and 72 h ($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	处理时间/h		
	24	48	72
阴性对照组	100.00	100.00	100.00
CM 对照组	100.00	100.00	100.00
10% CM	93.33±6.66	94.67±7.64	103.00±14.53
50% CM	107.33±15.57	116.00±12.49 ^c	136.33±9.02 ^{abc}
100% CM	131.00±10.58 ^{abcd}	140.33±17.62 ^{abcd}	200.33±13.61 ^{abcd}
VEGF-C	119.67±19.86	136.33±8.96 ^a	167.00±9.54 ^a
F	4.35	10.57	48.42
P	0.027	0.001	0.001

[注] a: 与阴性对照组相比, $P<0.05$; b: 与 CM 对照组相比, $P<0.05$; c: 与 10% CM 处理组相比, $P<0.05$; d: 与 50% CM 处理组相比, $P<0.05$ 。

2.3 HLECs 迁移能力

划痕实验结果显示, 处理 12 h 后, 4 个组的 HLECs 的细胞迁移面积比不全相同 ($F=213.12, P<0.001$)。与阴性对照组和 CM 对照组相比, CM 处理组和 VEGF-C 处理组 HLECs 的细胞迁移面积比均明显增加 ($P<0.05$), 表明 HLECs 细胞的迁移能力增强。阴性对照组和 CM 对照组之间差异无统计学意义 ($P=0.27$)。见图 3、表 2。



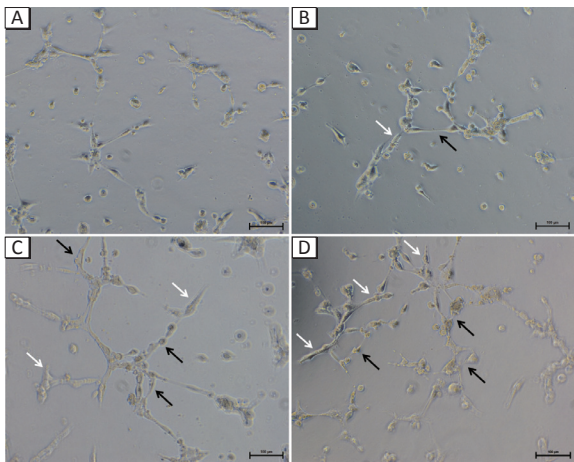
[注] A: 处理 0 h; B: 处理 12 h。1: 阴性对照组; 2: CM 对照组; 3: CM 处理组; 4: VEGF-C 处理组。黑色箭头为 12 h 后细胞未覆盖面积明显减少。

图3 100% CM 处理和 VEGF-C 处理 12 h 后 HLECs 迁移能力的变化

Figure 3 Changes of the migration of HLECs exposed to 100% CM and VEGF-C for 12 h

2.4 HLECs 管状结构形成能力

对各组管状结构生成数量统计分析发现, 4 个组情况不全相同 ($P<0.001$); 100% CM 处理组和 VEGF-C 处理组中形成的管腔数量、管分枝数量明显高于阴性对照组和 CM 对照组 ($P<0.05$), 阴性对照组和 CM 对照组之间差异无统计学意义 ($P=0.60$)。见图 4、表 2。



[注] A :阴性对照组;B :CM对照组;C :CM处理组;D :VEGF-C处理组。
黑色箭头为形成的管腔;白色箭头为形成的管分枝。

图4 100% CM处理和VEGF-C处理6h后HLECs管状结构形成的变化

Figure 4 Changes of the tubular structure formation of HLECs exposed to 100% CM and VEGF-C for 6 h

表2 100% CM和VEGF-C处理后HLECs迁移能力和管腔数量及管分枝数量的变化水平 (n=5, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 Changes of the migration and the number of tubes and branches of HLECs exposed to 100% CM and VEGF-C (n=5, $\bar{x}\pm s$)

组别	处理12h后细胞迁移面积比/%	处理6h后	
		管腔数量	管分枝数量
阴性对照组	6.84±2.98	0.60±0.55	10.20±3.27
CM对照组	9.84±2.23	1.20±0.84	8.40±2.07
CM处理组	53.64±4.74 ^{ab}	7.20±1.30 ^{ab}	32.60±5.13 ^{ab}
VEGF-C处理组	56.82±5.72 ^{ab}	8.20±1.64 ^{ab}	38.20±8.70 ^{ab}
F	213.12	57.93	39.80
P	<0.001	<0.001	<0.001

[注] a :与阴性对照组相比, $P<0.05$; b :与CM对照组相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

矽肺病是一种慢性肺部炎症和进行性肺间质纤维化疾病,发病机制尚未完全阐明,目前也无有效的治疗方法^[9],因此其发病机制研究尤为重要。本课题组前期动物实验证明,矽肺大鼠病变早期肺部淋巴管生成对肺内矽尘排出起重要作用,并有效延缓了矽肺病程进展^[4-5]。基于此,本实验旨在通过体外细胞实验进一步探讨矽肺病早期肺部淋巴管生成的分子机制。实验结果表明SiO₂刺激肺内巨噬细胞分泌淋巴管生成关键因子VEGF-C并作用于LECs,通过促进LECs的管状结构形成,进而促进肺部淋巴管再生。

众所周知,矽肺病早期表现为肺巨噬细胞活化,吞噬SiO₂粉尘颗粒,诱发肺部急性炎症反应。活化的巨噬细胞可分泌大量的炎性因子和致纤维化因子,其中的炎性因子VEGF不仅对炎症细胞具有趋化性,也是淋巴管形成的主要作用因子^[10-11]。人们普遍认为

VEGF-C是淋巴管生成最重要的介导因子之一,其可与位于LECs的血管内皮生长因子受体3结合,促进淋巴管生成^[12-14]。VEGF-C已被证明是淋巴管正常发育所必需的,特别是那些从胚胎静脉中发芽长出的淋巴管^[15]。在细菌病原体诱导的皮肤急性炎症模型中,CD11b⁺巨噬细胞向发炎区域和相关淋巴结浸润,通过分泌VEGF-C/D促进淋巴管生成,加速炎症介质消除^[16]。Yamashita等^[17]研究表明,CD68⁺/CCR7⁺肺巨噬细胞通过分泌VEGF-C可在肺泡区域形成新的淋巴管。因此本实验重点研究了SiO₂介导人单核巨噬细胞株U937产生VEGF-C对HLECs管状结构形成的影响。

尽管研究认为淋巴管生成过程由几个单一步骤组成(浸润、毛细淋巴管构成、管状分支、网络形成与成熟),但确切的机制仍未完全明了^[18]。在关于淋巴管生成的众多机制研究中,普遍认为LECs的增殖、迁移与管状结构形成密切相关,它们是反映淋巴管生成的三个关键指标^[19-20]。因此,本研究通过收集SiO₂作用后的U937细胞培养上清液用于体外培养HLECs,观察培养上清液中的VEGF-C对HLECs增殖、迁移及管状结构形成的影响。结果表明,50 mg·L⁻¹的SiO₂刺激U937细胞24 h时细胞内合成和分泌到细胞培养上清液中的VEGF-C蛋白表达水平均达到最高峰值。本课题组前期研究也发现,针对不同细胞器进行体外诱导的矽肺模型,50 mg·L⁻¹ SiO₂,作用时间24 h,可作为诱导的最佳刺激条件。因此,将50 mg·L⁻¹的SiO₂刺激U937细胞24 h的细胞培养上清液收集处理后作为CM。通过观察不同体积分数的CM对HLECs增殖能力的影响,发现100% CM刺激HLECs的细胞增殖能力最强。因此在迁移和管形成实验中均采用100% CM。为了表征CM中的VEGF-C发挥的促淋巴管生成作用,本实验采用与CM中相同质量浓度的人VEGF-C重组蛋白单独处理HLECs。结果表明,与对照组相比,100% CM处理和VEGF-C处理均可增强HLECs的迁移和管状结构形成能力($P<0.05$);阴性对照组和CM对照组各项指标之间差异均无统计学意义($P>0.05$)。Western blotting和ELISA结果显示,未经SiO₂刺激的U937细胞培养上清液也可表达一定量的VEGF-C蛋白,但对HLECs的增殖、迁移和管结构形成能力未产生影响。本研究选用两个指标即管腔数量和管分枝数量能更好地反映LECs管状结构形成能力。

已有研究表明矽肺病人淋巴结内粉尘含量明显高于肺内粉尘量,并证实了肺内淋巴系统对粉尘清除

的重要作用^[21]。因此对矽肺病中肺内淋巴管生成的分子机制的研究具有重要意义。本研究首次探讨了矽肺病变早期肺部淋巴管生成的分子机制,证实SiO₂可能通过诱导肺巨噬细胞活化,分泌促淋巴管生成的关键因子VEGF-C并作用于LECs,通过促进LECs的增殖、迁移和管状结构形成,进而促进淋巴管生成,为进一步在分子层面通过早期调控淋巴管生成缓解矽肺病变进程奠定了实验基础。但该分子机制在体内发挥的作用需进一步探讨。

参考文献

- [1] MILLERICK-MAY M L, SCHRAUBEN S, REILLY M J, et al. Silicosis and chronic renal disease [J]. *Am J Ind Med*, 2015, 58 (7) : 730-736.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 崔洁, 陈紫莺, 马景景, 等. 丹参酮 IIA 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] 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.
- [6] KERJASCHKI D. The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115 (9) : 2316-2319.
- [7] HASEGAWA S, NAKANO T, TORISU K, et al. Vascular endothelial growth factor-C ameliorates renal interstitial fibrosis through lymphangiogenesis in mouse unilateral ureteral obstruction [J]. *Lab Invest*, 2017, 97 (12) : 1439-1452.
- [8] TZENG HE, CHANG AC, TSAI CH, et al. Basic fibroblast growth factor promotes VEGF-C-dependent lymphangiogenesis via inhibition of miR-381 in human chondrosarcoma cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (25) : 38566-38578.
- [9] YAN W, WU Q, YAO W, et al. MiR-503 modulates epithelial-mesenchymal transition in silica-induced pulmonary fibrosis by targeting PI3K p85 and is sponged by lncRNA MALAT1 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1) : 11313.
- [10] FLISTER M J, WILBER A, HALL K L, et al. Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF- κ B and Prox1 [J]. *Blood*, 2010, 115 (2) : 418-429.
- [11] BEAINI S, SALIBA Y, HAJAL J, et al. VEGF-C attenuates renal damage in salt-sensitive hypertension [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (6) : 9616-9630.
- [12] CUI Y, LIU K, MONZON-MEDINA M E, et al. Therapeutic lymphangiogenesis ameliorates established acute lung allograft rejection [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125 (11) : 4255-4268.
- [13] TACCONI C, CORREALE C, GANDELLI A, et al. Vascular endothelial growth factor C disrupts the endothelial lymphatic barrier to promote colorectal cancer invasion [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148 (7) : 1438-1451.e8.
- [14] YE H Y W, CHENG C C, YANG S T, et al. Targeting the VEGF-C/VEGFR3 axis suppresses Slug-mediated cancer metastasis and stemness via inhibition of KRAS/YAP1 signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (3) : 5603-5618.
- [15] KARKKAINEN M J, HAIKO P, SAINIO K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5 (1) : 74-80.
- [16] KATARU R P, JUNG K, JANG C, et al. Critical role of CD11b⁺ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution [J]. *Blood*, 2009, 113 (22) : 5650-5659.
- [17] 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) : 1553-1563.
- [18] ROBERING J W, WEIGAND A, PFUHLMANN R, et al. Mesenchymal stem cells promote lymphangiogenic properties of lymphatic endothelial cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22 (8) : 3740-3750.
- [19] CAO Z, SHANG B, ZHANG G, et al. Tumor cell-mediated neovascularization and lymphangiogenesis contrive tumor progression and cancer metastasis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1836 (2) : 273-286.
- [20] MOLDOBAEVA A, JENKINS J, ZHONG Q, et al. Lymphangiogenesis in rat asthma model [J]. *Angiogenesis*, 2017, 20 (1) : 73-84.
- [21] CHAPMAN J S, RUCKLEY V A. Microanalyses of lesions and lymph nodes from coalminers' lungs [J]. *Br J Ind Med*, 1985, 42 (8) : 551-555.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 丁瑾瑜)