

## 虾青素对百草枯致大鼠肺纤维化的干预作用及机制

贺琛,俞小卫

(南京医科大学附属常州第二人民医院呼吸科,江苏 常州 213000)

**[摘要]** 目的:观察虾青素(astaxanthin,AX)对百草枯(paraquat,PQ)诱导大鼠肺纤维化的影响,并进一步探讨肺纤维化可能的发病机制。方法:SD大鼠随机分为正常对照组、PQ模型组及虾青素干预组。模型组及干预组大鼠腹腔注射百草枯造模后,干预组第2天起给予虾青素灌胃,对照组及模型组给予相应溶剂。分别于给药后第7、14、28天处死大鼠,测定大鼠血清中羟脯氨酸(hydroxyproline,HYP)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMP)1、MMP2、MMP9和基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase1,TIMP1)的含量,取固定部位肺组织切片行HE、Masson染色进行病理学观察,免疫组化法测定转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)的含量,对病理图像进行形态学测量分析。结果:①HE染色及Masson染色结果显示:干预组纤维化炎症程度明显低于模型组;②模型组大鼠中毒后羟脯氨酸较正常组增高( $P<0.05$ ),虾青素干预后,大鼠血清羟脯氨酸水平较模型组降低( $P<0.05$ );③PQ模型组在肺纤维化区域TGF- $\beta$ 1弱阳性表达,虾青素干预后,TGF- $\beta$ 1表达含量下降,第28天最为明显,差异有统计学意义( $P<0.05$ );④模型组与干预组MMP1、MMP2、MMP9表达含量均较正常对照组升高。MMP1、MMP2、MMP9在PQ中毒后表达量逐渐升高,第14天达到高峰后下降,但第28天含量仍高于对照组。与模型组相比,干预组MMP2、MMP9含量均有下降,第14、28天显著,其差异有统计学意义( $P<0.05$ )。TIMP1在干预期间与模型组及对照组无显著差异。结论:虾青素能够减弱肺纤维化大鼠肺组织病理的胶原沉积、减少肺组织中羟脯氨酸的含量、降低肺血清中MMP2、MMP9的含量,抑制肺组织中TGF- $\beta$ 1的分泌,从而减轻PQ引起的大鼠肺纤维化。

**[关键词]** 百草枯;肺间质纤维化;虾青素

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)04-413-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20170406

## Protective effects and mechanism of astaxanthin on paraquat poisoning-induced pulmonary fibrosis in rats

He Chen, Yu Xiaowei

(Department of Respiratory Medicine, Changzhou Second People's Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of astaxanthin on paraquat poisoning-induced pulmonary fibrosis in SD rats, and explore the mechanism of pulmonary fibrosis. **Methods:** The rats were randomly divided into three groups, including the normal control group, the PQ model group, and the astaxanthin group. The PQ group and the astaxanthin group were intraperitoneal injected with PQ. In the next day, the rats were treated by intragastric administration once a day. The control group and the PQ group were treated by the same dosage of solvent. On day 7, day 14, day 28 after treatment, the rats in each group were sacrificed. The levels of hydroxyproline (HYP) and TGF- $\beta$ 1 were measured. The levels of matrix metalloproteinase (MMP) 1, MMP2, MMP9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase1 (TIMP1) were determined in the serum of rat by ELISA, and the pathologic changes of lung tissues were observed by HE staining and Masson staining. **Results:** ①HE staining and Masson staining results showed that the degree of fibrosis in the astaxanthin group was significantly lower than that of the PQ group. ②The hydroxyproline content of model group was significantly higher than that of the normal group ( $P<0.05$ ). In the intervention of astaxanthin, the level of hydroxyproline in rat was decreased compared with the model group ( $P<0.05$ ). ③TGF- $\beta$ 1 was expressed in the PQ model group. After intervention of astaxanthin, the expression of TGF- $\beta$ 1 was decreased, especially at day 28, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). ④The expression levels of MMP1, MMP2 and MMP9 in the model group and the astaxanthin group were higher than those in the normal control group. The expressions of MMP1, MMP2, MMP9 after PQ poisoning were gradually increased, reached the highest point in day 14, then the expressions in day 14 began to decline but still higher than those of the control group. Compared with the model group, the contents of MMP9 and MMP2 in the astaxanthin group were decreased, and the difference was statistically signifi-

cant ( $P < 0.05$ ) in the day 14 and day 28. TIMP1 had no significant difference between the model group and the control group during the intervention period ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Astaxanthin can reduce the content of hydroxyproline, MMP9, and MMP2, inhibit the secretion of TGF- $\beta$ 1 in lung tissue, and decrease the collagen deposition in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis, further reduce PQ-induced pulmonary fibrosis in rats.

[Key words] paraquat; pulmonary fibrosis; astaxanthin

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(04): 413-418]

百草枯 (1-1-二甲基-4-4-联吡啶阳离子盐, paraquat, PQ) 是一种广泛使用的非选择性除草剂, 同时对人体也具有较强的毒性, 人类和动物的口服致死量仅约为 30~40 mg/kg。随着 PQ 在农业领域的广泛应用, 中毒事件逐年增加, 在众多发展中国家, 俨然已成为一个公共问题。百草枯中毒后可迅速分布在大多数组织中, 肺部、肾脏受累最为严重<sup>[1]</sup>, 主要表现为急性损伤、水肿、出血、炎性细胞浸润, 后期即可出现肺间质纤维化<sup>[2]</sup>。众所周知, 氧化应激反应是 PQ 中毒致肺纤维化的主要起始机制之一。PQ 中毒后组织内持续聚集大量的中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞, 其释放蛋白水解酶、氧自由基和炎症介质等, 进一步加重组织损伤, 加剧了 PQ 在肺组织中的氧化应激反应<sup>[3]</sup>。

虾青素即 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- $\beta$ , $\beta'$ -胡萝卜素, 是从海洋动物 (包括虾、蟹等甲壳类以及鲑鳟鱼类) 和少许植物中发现的一种类胡萝卜素的含氧衍生物, 其分子结构的碳骨架由中央多聚烯链和位于两侧的芳香环组成, 并在每个芳香环上各有一个酮基(=O)和一个羟基(-OH)。它是目前自然界发现的超强抗氧化剂之一<sup>[4]</sup>。国内外研究表明, 虾青素有显著的药理活性, 包括抗氧化、抗炎、抗肿瘤等作用<sup>[4-6]</sup>。然而, 虾青素对肺纤维化的影响尚不清楚。本研究的主要目的是确定和虾青素对肺纤维化的干预作用及作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

20%PQ 溶液 (先正达有限公司, 英国), 天然虾青素 (荆州市天然虾青素有限公司); 羟脯氨酸检测试剂盒 (南京建成公司); 大鼠转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 抗体 (Abcam 公司, 英国); 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)1、MMP2、MMP9 和基质金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase1, TIMP1) 检测试剂盒 (苏州卡尔文生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型的建立及给药方案

SPF 级成年雄性 SD 大鼠 54 只, 体重 (220 $\pm$ 20)g, 随机分为正常对照组、PQ 模型组及虾青素干预组, 每组 18 只。模型组和干预组一次性腹腔注射 PQ 农药 10 mg/kg; 对照组一次性腹腔注射生理盐水 10 mL/kg。干预组予 PQ 染毒后次日虾青素 200 mg/(kg·d) 灌胃, 对照组及模型组给予同剂量溶剂。分别于给药后第 7、14、28 天处死, 对照组、模型组及干预组随机处死 6 只大鼠。去除左肺, -80℃冻存; 以 4% 甲醛溶液对右肺组织进行内固定, 以备组织病理检查及免疫组化染色。实验期间, 大鼠自由饮水和进食。

#### 1.2.2 肺组织病理学观察

取大鼠右肺同一部位组织, 按常规病理学方法处理后进行 HE 染色及 Massion 染色, 观察肺组织形态学改变。

#### 1.2.3 肺血清 HYP 含量

不同处理后第 7、14、28 天, 各组随机选择 6 只大鼠, 按试剂盒说明书检测大鼠血清 HYP 含量。

#### 1.2.4 ELISA 检测 MMP1、MMP2、MMP9、TIMP1

各组随机选取存活大鼠 6 只, 取大鼠肺组织, 按试剂盒说明书检测大鼠 MMP1、MMP2、MMP9、TIMP1 表达水平。

#### 1.2.5 免疫组化法检测肺组织中 TGF- $\beta$ 1 的表达

肺组织石蜡切片常规脱蜡, 水化, 然后按免疫组化试剂盒说明书进行操作。应用 image plus pro6.0 图像采集软件观察、分析标本图片, 计算平均光密度 (mean optical density, MOD)。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多样本均数比较用单因素方差分析。以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠行为表现

模型组有 1 只大鼠在 20 d 内死亡, 其余各组大

鼠均无死亡。模型组及干预组染毒后出现中毒症状,表现为烦躁、易激惹、精神萎靡、毛发松散、拱背、呼吸急促、进食减少等,部分眼鼻处有血性分泌物,上述症状在染毒后 1 周内最为明显。干预组症状体征较模型组稍有减轻。对照组大鼠活泼好动、皮毛洁净、呼吸平稳,体重逐渐增加。

## 2.2 肺部组织病理变化

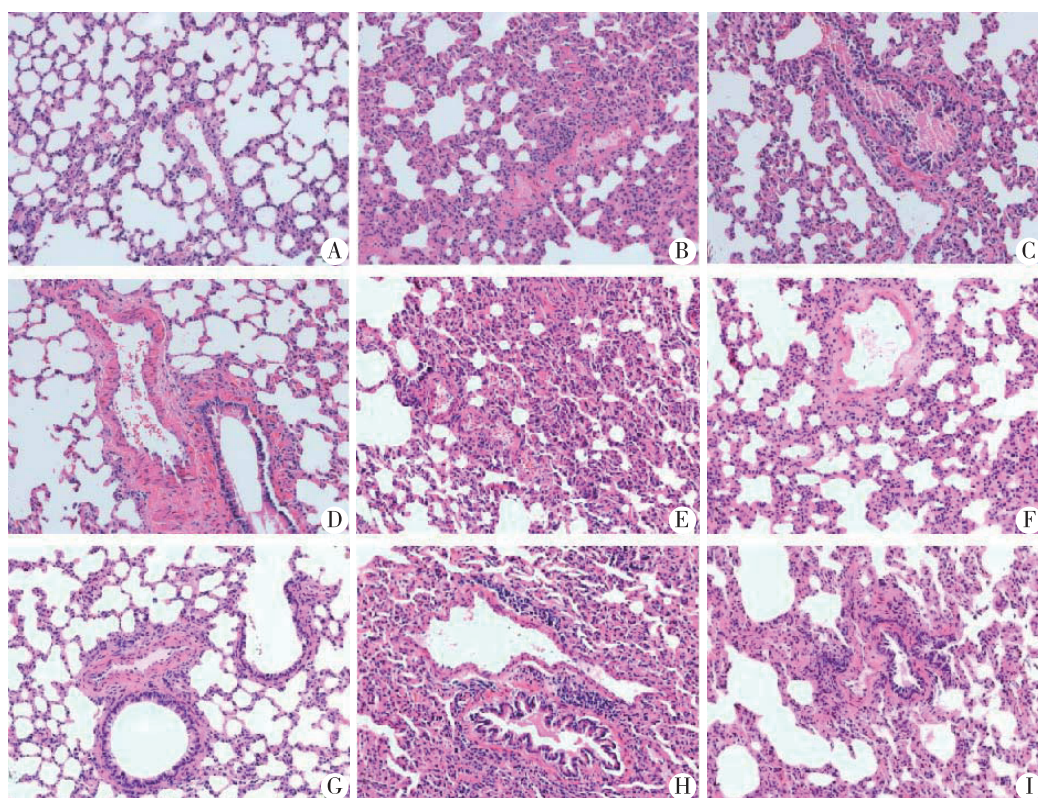
### 2.2.1 肉眼观察

对照组大鼠肺组织呈粉红色,质软,表面光滑。模型组大鼠 PQ 中毒后第 7 天肺组织充血肿胀,表面出现散在的出血点,局部出现瘀斑;第 14 天肺组织充血有所减轻,体积略有缩小,部分有实变灶形成;第 28 天两肺组织颜色暗红,稍硬,弹性较差。虾

青素干预组与模型组类似,肺组织颜色偏暗,体积缩小,触之弹性欠佳,但损伤程度较模型组略有减轻。

### 2.2.2 HE 染色

正常对照组肺组织结构清晰,肺泡壁薄,肺泡间隔正常,无明显充血、水肿,无明显炎性细胞浸润。模型组第 7 天,肺毛细管扩张充血,肺泡间隔水肿、增宽,肺泡腔内大量炎性细胞浸润;第 14 天肺泡炎性渗出有所减轻,肺泡间隔明显增厚,成纤维细胞增多,部分肺组织纤维组织增生;第 28 天广泛的肺泡结构塌陷、破坏,肺泡间隔进一步增宽,炎性浸润缓解。虾青素干预各组各时间点炎性细胞及纤维组织增生程度较同期的模型组有不同程度减轻(图 1)。



A、D、G: NS 对照组第 7、14、28 天肺组织结构正常,肺泡结构完整,肺泡壁纤细,无明显充血水肿;B: 模型组第 7 天肺泡炎症严重,肺泡腔内有炎性细胞及血性渗出;C: 干预组第 7 天,肺泡腔内炎性细胞程度及区域较模型组轻;E: 模型组第 14 天肺泡炎减轻,肺泡间隔明显增厚,部分肺泡塌陷,肺泡间质可见炎性细胞浸润;F: 干预组第 14 天肺部结构尚完整,炎症程度较轻;H: 模型组第 28 天肺泡炎症减轻,广泛的肺泡结构塌陷、破坏,肺泡结构消失;I: 干预组第 28 天呈肺纤维化程度较模型组轻,病变相对局限。

图 1 大鼠肺组织 HE 染色病理切片( $\times 200$ )

Figure 1 Pathological sections of rat lung tissues by HE staining ( $\times 200$ )

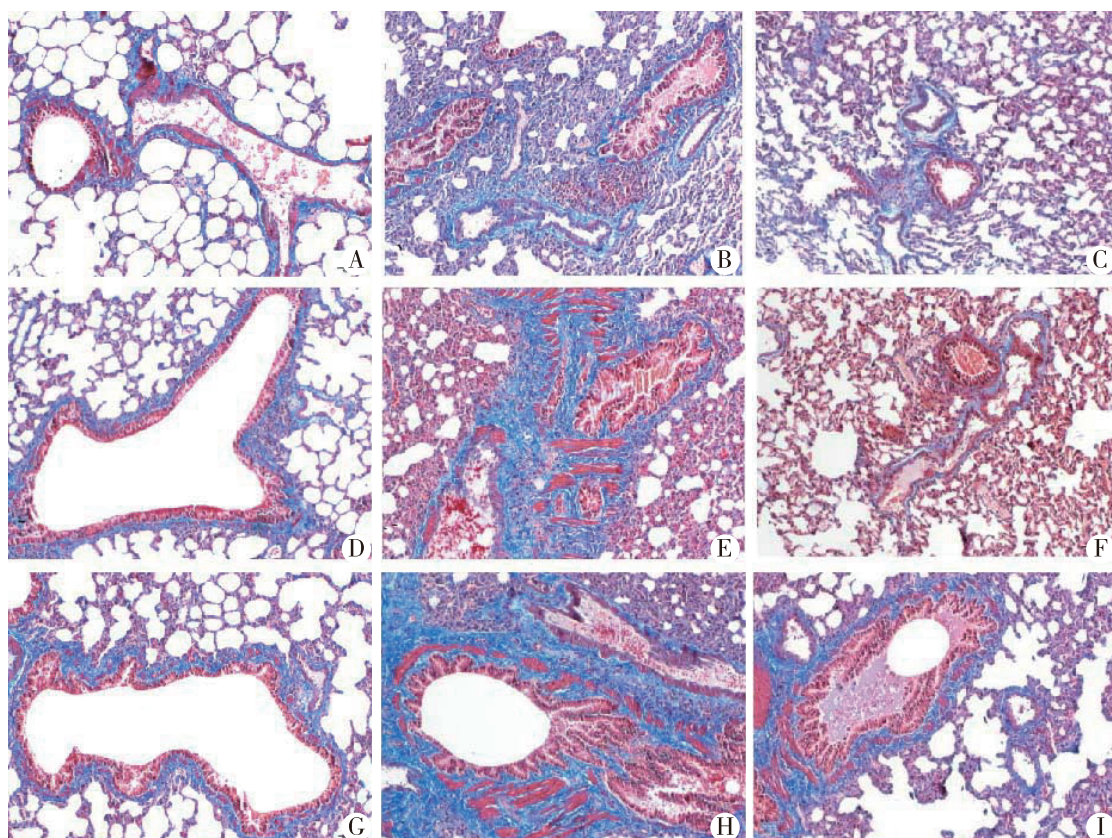
### 2.2.3 Massion 染色

模型组 PQ 大鼠中毒后肺间质、肺泡间隔可见胶原纤维增生,随时间延长逐渐增加,小血管及其周围更甚,逐渐向肺间质延伸,至第 28 天大量胶原沉积,肺泡结构大量破坏。虾青素干预组胶原染色

明显减轻。正常对照组仅见支气管周围有少量蓝绿色胶原纤维(图 2)。

## 2.3 各组血清中羟脯氨酸的含量变化

与正常对照组相比较,模型组与虾青素干预组各时间段(第 7、14、28 天)大鼠血清中 HYP 含量升



A、D、G:正常对照组仅见支气管周围有少量蓝绿色胶原纤维;B:模型组第7天时部分气管和血管壁周围可见蓝色胶基质沉积;E:模型组第14天时气道、肺泡间隔和血管壁有大量的蓝色胶原基质沉积;H:模型组第28天时气管周围及肺泡间隔可见明显增多的蓝色胶原基质沉积;C、F、I:干预组在第7、14、28天时,蓝色胶原基质沉积均较模型组减少。

图 2 大鼠肺组织 Masson 染色病理切片(×100)

Figure 2 Pathological sections of rat lung tissues by Masson staining (×100)

高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与模型组比较,虾青素干预组同期内 HYP 表达含量下降,第7天时差异无统计学意义( $P>0.05$ ),第28天时干预组 HYP 含量下降最为明显,其差异有统计学意义( $P<0.05$ ,图3)。

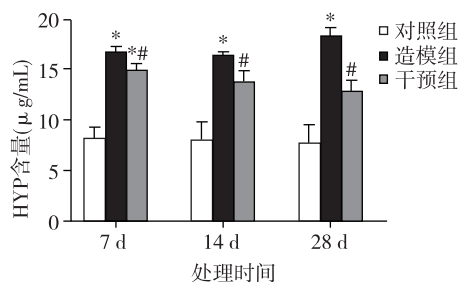
#### 2.4 肺组织 TGF-β1 表达水平

正常对照组肺组织 TGF-β1 表达较少。与对照

组相比,模型组在第7、14、28天时蛋白表达逐渐升高,两组间差别有统计学意义( $P<0.01$ )。干预组与模型组相比,TGF-β1 均有下降,第28天时最为显著,其差异有统计学意义( $P<0.05$ ,图4)。

#### 2.5 血清 MMP1、MMP2、MMP9、TIMP1 表达水平

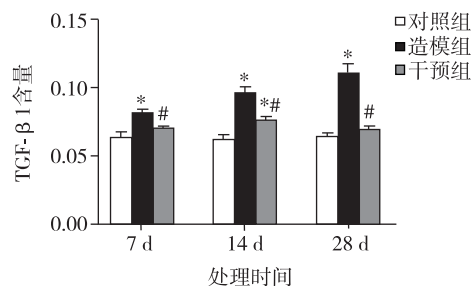
模型组与干预组 MMP1、MMP2、MMP9 表达量均较正常对照组增加。MMP1、MMP2、MMP9 在 PQ



与同时期对照组比较,\* $P<0.05$ 。与同时期模型组相比较,# $P<0.05$ 。

图 3 各组大鼠羟脯氨酸含量

Figure 3 Content of hydroxyproline in rats of each group

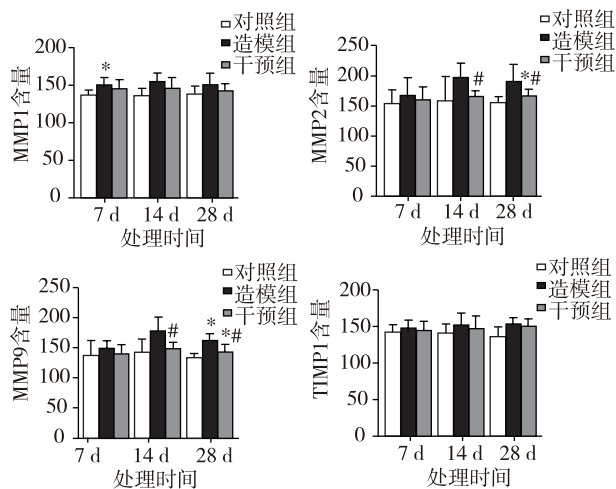


与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 4 各组大鼠不同时段 TGF-β1 平均光密度(MOD)值

Figure 4 Mean optical density (MOD) values of TGF-β1 in different time periods in rats of each group

中毒后第 14 天达到高峰,第 28 天较前下降。与模型组相比,干预组 MMP2、MMP9 含量均有下降,第 14、28 天明显,其差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。TIMP 在干预期间与模型组及对照组无显著差异(图 5)。



与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

图 5 大鼠 MMP1、MMP2、MMP9、TIMP1 表达

Figure 5 Expression of MMP1, MMP2, MMP9, and TIMP1 in rats

### 3 讨论

PQ 中毒,即使是轻微剂量,仍可在急性期通过 PQ 蓄积后引起限制性肺功能损伤,并在中毒晚期形成不可逆的肺间质纤维化,具有一定的致命性<sup>[7]</sup>。肺是 PQ 中毒的主要靶器官,可通过肺泡 II 型细胞的能量依赖性多胺摄取途径而积聚在肺内,经过氧化还原途径导致有毒的活性氧剧增<sup>[8]</sup>。尽管目前 PQ 导致肺纤维化的分子机制尚不清楚,但氧化和炎症介质被发现在这一过程中扮演了重要角色。在动物模型中可观察到 PQ 中毒后大鼠出现呼吸浅快、发绀等呼吸道症状以及肺部组织炎症细胞浸润、肺水肿等表现。在本研究前期,曾予 20、15 mg/kg 腹腔注射治疗进行预试验,但均出现不同程度死亡,20 mg/kg 为甚,死亡率大于 50%。不难看出,PQ 中毒死亡率与其剂量相关,这也与 Sun 等<sup>[8]</sup>的研究结果一致。近年来,多项体外研究报道已经确定了虾青素的抗氧化、清除氧自由基等作用<sup>[9]</sup>。而本研究表明,虾青素对 PQ 诱导的大鼠急性肺损伤及肺纤维化有保护作用。

多种细胞、细胞因子及炎症介质都与肺纤维化的发生有关。细胞因子在介导炎症的过程中所起的作用也日益受到重视。这些细胞因子之间相互作用,相互协调,形成一个复杂而多变的细胞因子网

络<sup>[8]</sup>。TGF- $\beta$  是肺间质纤维化形成及发展的关键性细胞因子,TGF- $\beta$  是 TGF- $\beta$  家族中参与肺纤维化的主要因子。在肺纤维化早期,TGF- $\beta$  1 主要趋化炎症细胞,诱导炎症因子的表达,协同加重炎症反应;在肺纤维化后期,主要促进成肺泡上皮向成纤维细胞的转化,增加胶原蛋白的合成,同时抑制胶原蛋白的分解,影响细胞外基质的代谢,促进肺纤维化的形成<sup>[10-11]</sup>。本研究通过检测 PQ 中毒大鼠肺组织 TGF- $\beta$  1 含量显示,模型组大鼠肺组织中各时间点 TGF- $\beta$  1 含量较对照组偏高,差异均有统计学意义,提示 TGF- $\beta$  1 参与了 PQ 中毒大鼠肺泡炎及肺纤维化的发生发展,这与前人的研究结果一致。而经过虾青素干预后 TGF- $\beta$  1 含量较模型组有一定程度的降低,差异有统计学意义,说明虾青素可抑制 TGF- $\beta$  1 的表达,这可能也是虾青素对肺纤维化保护作用的重要机制之一。

肺组织的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 也与肺纤维化密切相关,在肺纤维化过程中,促进成纤维母细胞和肌成纤维细胞持续增殖,分泌的胶原蛋白等大分子在肺间质中局部沉积,引起不可逆的细胞外基质堆积,最终导致肺间质纤维化<sup>[12]</sup>。此过程发展迅速,使正常的肺泡结构消失及肺泡闭塞,干扰有效的气体交换,最终导致中毒者因严重缺氧而死亡。胶原蛋白是 ECM 的主要成分,羟脯氨酸(HYP)则是机体胶原蛋白的主要成分之一,为胶原蛋白所特有,可作为衡量胶原组织代谢的重要指标。肺纤维化时,肺组织内胶原纤维量增加,因此 HYP 含量可以反映肺组织胶原蛋白及细胞外基质的含量,判断肺间质纤维化的程度。本研究中,在 PQ 诱导大鼠后,模型组及干预组较对照组 HYP 明显升高,提示这 2 组胶原蛋白明显增加;而虾青素干预后 HYP 含量较模型组有一定降低,第 28 天组效果更为明显,虾青素可能影响细胞外基质的合成从而保护肺纤维化。

在胶原蛋白降解的过程中,MMPs 和 TIMPs 是其最重要的蛋白酶<sup>[13]</sup>。MMPs 是属于金属蛋白酶中锌蛋白超家族的一种蛋白水解酶,被激活后会降解胶原蛋白,而 TIMPs 可抑制其活性。细胞外基质中包括多种胶原,分别为 I、III、IV、V 和 VI 型胶原,在纤维化肺组织内,沉积的主要是 I、III 型胶原,而 IV 型胶原是构成肺泡基膜主要成分。MMP1 是 MMPs 中降解 I 型胶原的关键酶,MMP2 和 MMP9 是 MMPs 降解 IV 型胶原的主要酶类;TIMP1 和 TIMP2 是 MMPs 的主要内源性抑制因子。MMPs 相应的表

达降低时提示肺组织内胶原降解减少,过量的 ECM 沉积。从本动物实验的病理结果可以看出,随着时间延长,模型组肺纤维化程度逐渐加重,MMP2、MMP9 表达含量均较对照组增加,第 14 天内最高,随后下降。而在虾青素干预下,其表达较 PQ 模型组下降,在此过程中,TIMP1 无明显变化,无明显抑制 MMP1、MMP2、MMP9 的活性,可能 TGF- $\beta$ 1 未通过 MMPs/TIMPs 途径下调胶原的降解。在最新研究中,Pardo 等<sup>[14]</sup>认为,通过 MMP 的浓度随时间的变化检测降解循环蛋白可成为 IPF 进展潜在的生物标志物。

虾青素能显著改善 PQ 诱导的肺纤维化模型,减轻肺组织肺泡炎症及肺纤维化程度,降低肺组织 TGF- $\beta$ 1、羟脯氨酸的表达水平,抑制多种基质蛋白酶活性来发挥对百草枯中毒大鼠肺组织的保护作用,为纤维化治疗提供了新思路。

#### [参考文献]

- [1] Awadalla EA. Efficacy of vitamin C against liver and kidney damage induced by paraquat toxicity[J]. *Exp Toxicol Pathol*,2012,64(5):431-434
- [2] Tomita M, Okuyama T, Katsuyama H, et al. Mouse model of paraquat-poisoned lungs and its gene expression profile[J]. *Toxicology*,2007,231(2/3):200-209
- [3] Riahi B, Rafatpanah H, Mahmoudi M, et al. Immunotoxicity of paraquat after subacute exposure to mice[J]. *Food Chem Toxicol*,2010,48(6):1627-1631
- [4] Naguib YM. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids [J]. *J Agric Food Chem*,2000,48(4):1150-1154
- [5] Song X, Wang M, Zhang L, et al. Changes in cell ultrastructure and inhibition of JAK1/STAT3 signaling pathway in CBRH-7919 cells with astaxanthin [J]. *Toxicol Mech Methods*,2012,22(9):679-686
- [6] Nakao R, Nelson OL, Park JS, et al. Effect of dietary astaxanthin at different stages of mammary tumor initiation in BALB/c mice [J]. *Anticancer Res*,2010,30(6):2171-2175
- [7] Xiangdong J, Ming L, Yijing Z, et al. Role of growth factors in acute lung injury induced by paraquat in a rat model[J]. *Hum Exp Toxicol*,2011,30(6):460-469
- [8] Sun S, Wang H, Zhao G, et al. Complement inhibition alleviates paraquat-induced acute lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*,2011,45(4):834-842
- [9] Dose J, Matsugo S, Yokokawa H, et al. Free radical scavenging and cellular antioxidant properties of astaxanthin[J]. *Int J Mol Sci*,2016,17(1):17
- [10] Meng Y, Yu CH, Li W, et al. Angiotensin-Converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis protects against lung fibrosis by inhibiting the MAPK/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*,2014,50(4):723-736
- [11] Steele MP, Schwartz DA. Molecular mechanisms in progressive idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Annu Rev Med*,2013,64:265-276
- [12] Wilson MS, Wynn TA. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation[J]. *Mucosal Immunol*,2009,2(2):103-121
- [13] Wang BL, Tu YY, Fu JF, et al. Unbalanced MMP/TIMP-1 expression during the development of experimental pulmonary fibrosis with acute paraquat poisoning [J]. *Mol Med Rep*,2011,4(2):243-248
- [14] Pardo A, Cabrera S, Maldonado M, et al. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Respir Res*,2016,17(1):23

[收稿日期] 2016-05-24

本刊现已启用网上稿件管理系统,作者登陆  
<http://jnm.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
 审理情况。