



虾青素通过激活Nrf2/HO-1通路抑制瓣膜间质细胞钙化

赵全公, 王国坤, 徐志云

The inhibition effect of astaxanthin on calcification of aortic valve interstitial cells by activating the Nrf2/HO-1 Pathway

ZHAO Quangong, WANG Guokun, XU Zhiyun

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202412057>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

Keap1-Nrf2通路在炎症疾病中的研究进展

Research progresses on Keap1-Nrf2 pathway in inflammatory diseases

药学实践与服务. 2025, 43(3): 97-108, 116 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202405013

全反式维甲酸对肝星状细胞活化及氧化应激的作用和机制探索

Exploration of the role and mechanism of all-trans retinoic acid on activation and oxidative stress of hepatic stellate cell

药学实践与服务. 2024, 42(7): 291-296 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202312054

新斯的明与山莨菪碱联合应用对肺型氧中毒的保护作用及其机制的研究

Protective effect and mechanisms of neostigmine in combination with anisodamine against pulmonary oxygen toxicity

药学实践与服务. 2024, 42(10): 433-438, 444 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202310049

基于网络药理学和分子对接技术研究金芪清疏颗粒治疗社区获得性肺炎的潜在机制

Study on the potential mechanism of JQSG for the treatment of CAP based on network pharmacology and molecular docking technology

药学实践与服务. 2024, 42(11): 471-478 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202312014

米格列醇激活UCP1介导棕色脂肪改善冷暴露小鼠损伤的研究

Anti-frostbite effect of miglitrol on cold-exposed mice through UCP1-mediated thermogenic activation

药学实践与服务. 2025, 43(1): 1-5, 16 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202404005

雀梅藤石油醚提取物诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡的实验研究

Induction of apoptosis in triple-negative breast cancer cells by petroleum ether extract of *Sageretia thea*

药学实践与服务. 2024, 42(6): 253-259 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202311055



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

虾青素通过激活 Nrf2/HO-1 通路抑制瓣膜间质细胞钙化

赵全公, 王国坤, 徐志云 (中国人民解放军海军军医大学第一附属医院心血管外科 上海 200433)

[摘要] 目的 研究虾青素(AST)对成骨诱导培养基(OM)诱导瓣膜间质细胞(VICs)钙化作用和机制。方法 采用 CCK-8 分析不同浓度虾青素对 VICs 增殖的影响; 虾青素干预 OM 培养 VICs 后茜素红染色检测钙结节, Western Blot 检测成骨分化标志 ALP、Runx2 蛋白表达水平; Western Blot 及细胞免疫荧光检测细胞 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平; DCFH-DA 荧光染色检测细胞内活性氧(ROS)水平。结果 CCK-8 结果显示虾青素适宜干预浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$; 虾青素处理减轻 OM 诱导 VICs 钙结节形成, 抑制 VICs 的成骨分化标志 ALP、Runx2 的表达($P<0.01$), 增强 Nrf2 和 HO-1 的表达, 并降低了细胞内活性氧的水平($P<0.01$)。结论: 虾青素可能通过增强 Nrf2/HO-1 抗氧化信号通路减轻 VICs 氧化应激水平与钙化。

[关键词] 虾青素; 钙化; 瓣膜间质细胞; 氧化应激; Nrf2/HO-1 通路

[文章编号] 2097-2024(2025)00-0001-05 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202412057

The inhibition effect of astaxanthin on calcification of aortic valve interstitial cells by activating the Nrf2/HO-1 Pathway

ZHAO Quangong, WANG Guokun, XU Zhiyun (Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To clarify the effect and mechanisms of astaxanthin on the calcification of aortic valve interstitial cells (VICs) induced by osteogenic medium (OM). **Methods** The CCK-8 assay was used to analyze the effects of different concentrations of astaxanthin on the proliferation of VICs. After treating VICs with astaxanthin in OM, Alizarin Red staining was performed to detect calcified nodules, and Western blotting was used to measure the expression levels of osteogenic differentiation markers ALP and Runx2. Additionally, Western blotting and immunofluorescence detection were utilized to assess the expression levels of Nrf2 and HO-1 proteins. The levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) were measured by DCFH-DA fluorescence staining. **Results** The CCK-8 results indicated that the optimal concentration of astaxanthin for intervention was 25 $\mu\text{mol/L}$. Astaxanthin treatment reduced the formation of calcified nodules induced by OM in VICs, and inhibited the expression of osteogenic differentiation markers ALP and Runx2 ($P<0.01$). Furthermore, Astaxanthin treatment decreased the expression levels of Nrf2 and HO-1 ($P<0.01$), and reduced intracellular reactive oxygen species levels ($P<0.01$). **Conclusion** Astaxanthin may mitigate oxidative stress and calcification in VICs by enhancing the Nrf2/HO-1 antioxidant signaling pathway.

[Key words] Astaxanthin; Calcification; Valve interstitial cells; Oxidative stress; Nrf2/HO-1 Pathway

钙化性主动脉瓣疾病(CAVD), 在老年人群中较为常见, 尤其是 65 岁及以上的患者中, 发病率可达 25 ~ 30%^[1]。在瓣膜病变早期, 脂质沉积、机械损伤及炎症反应等多种致病因素导致细胞内过氧化氢和超氧化物的过度积聚, 引发 DNA 损伤, 继而引起 DNA 修复机制功能失调, 并通过上调 AKT 信号通路导致 Runx2 的表达, 促进早期瓣膜间质细

胞(VICs)表型改变^[2-4]。虾青素(AST)是一种类胡萝卜素化合物, 具有多种生物活性, 包括抗氧化、抗炎和抗衰老等生物学功能^[5]。有研究发现虾青素通过激活 Nrf-2/HO-1 信号通路抑制椎间盘软骨终板中的氧化应激和钙化^[6]。目前, 虾青素对主动脉瓣钙化的影响鲜有报道。因此, 本研究旨在探讨虾青素对主动脉瓣钙化的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 猪瓣膜组织

选取 4 月龄家猪(上海五丰食品有限公司), 体重约 50 kg, 获取主动脉瓣组织后, 放入含 1% 青-链霉素的预冷无菌磷酸盐缓冲液中, 置于冰盒迅速

[基金项目] 国家自然科学基金(82070402, 82370250); 海军军医大学面上孵化项目(2022MS024)

[作者简介] 赵全公, 博士研究生, 研究方向: 主动脉瓣膜的钙化机制, Email: zqg18351992113@163.com

[通信作者] 徐志云, 教授, 研究方向: 心血管疾病的发病机制, Email: zhiyunx@hotmail.com

返回实验室进行细胞的分离与培养。

1.2 主要试剂

AST 购自 MedChemExpress 公司; DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; CCK-8、活性氧检测试剂盒、茜素红染色液购自上海碧云天生物科技有限公司; 精蛋白重组人胰岛素注射液为丹麦诺和诺德公司; 二水合磷酸二氢钠购自国药集团化学试剂公司; L-抗坏血酸购自德国默克生命科学公司; CD31 抗体、Vimentin 抗体、Runx2 抗体、Nrf2 抗体购自武汉三鹰生物科技有限公司; ALP 抗体购自江苏亲科生物有限公司; HO-1 抗体购自英国 Abcam 公司。

1.3 瓣膜间质细胞的钙化诱导

用无菌 PBS 溶液冲洗掉瓣叶表面血液, 加入 I 型胶原酶, 37 °C 摇床内消化 15 min。后用无菌棉签擦去表面残留内皮细胞, 无菌 PBS 溶液冲洗三次。再次加入 4 ml I 型胶原酶, 37 °C 摇床内消化 5 ~ 8 h。200 目一次性无菌滤网过滤后离心, 使用 15% FBS DMEM 培养基重悬后铺板。2 ~ 3 d 换液, 传代至 3 ~ 5 代进行钙化诱导。成骨诱导培养基(OM)配方为: 10^{-7} mol/L 胰岛素, 50 μ g/ml 抗坏血酸, 2 mmol/L 磷酸二氢钠, 5% 胎牛血清, 1% 青霉素-链霉素的高糖 DMEM 培养基。

1.4 CCK-8 检测细胞活力

将 VICs 以 2×10^4 /孔接种到 96 孔板中。待细胞汇合度达 50% 时, 加入不同浓度的 AST 溶液(0、5、10、20、50、100、200、400 μ mol/L), 继续培养过夜。根据 CCK-8 试剂盒说明书进行细胞生长活力检测。

1.5 茜素红染色

OM 培养 7 d 后, 用无菌 PBS 清洗 3 次, 用 75% 酒精固定 10 min, 吸去后再用无水乙醇脱水, 吸去无水乙醇晾干见培养皿底变为干燥白色后加入 500 μ l 茜素红染液, 染色 2 min 后使用无水乙醇清洗至洗液变透明, 进行镜下拍照。

1.6 蛋白质印迹

提取细胞总蛋白后, 使用 BCA 法测定蛋白浓度, 然后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。转膜后在使用脱脂奶粉溶液室温下进行封闭 1 h, TBST 洗脱 3 次, 每次 5 min; 一抗 4 °C 孵育过夜(抗体稀释比例: Runx2 1 : 1000; ALP 1 : 500; HO-1 1 : 2000; Nrf2 1 : 1000); TBST 洗脱 3 次后二抗室温孵育 60 min; TBST 洗脱 3 次, ECL 显色液显影, 凝胶成像系统显影, 独立重复实验 3 次, Image J 软件分析。

1.7 免疫荧光染色

干预结束后 PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min; 吸弃甲醛, PBS 每 3 min 洗涤 3 次, 用 0.2% Triton X 溶液室温破膜细胞 20 min; PBS 洗涤 3 次后每孔加入 5% BSA 封闭液, 室温封闭 1 h; 吸弃封闭液, 加入一抗(抗体稀释比例均为 1:200)4 °C 过夜孵育; 吸弃一抗, PBS 洗涤 3 次后, 加入二抗, 室温避光孵育 1 h; 吸弃二抗标记后的抗体, 加入 PBS, 避光条件下洗涤 3 次, 最后加入含 DAPI 的抗荧光淬灭染剂, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.8 细胞活性氧检测

处理后的 VICs 用含 DCFH-DA 的培养液替代培养液, 在 37 °C 下孵育 20 min。随后, 使用荧光显微镜采集图像, 并通过 Image J 软件分析图像的荧光强度。

1.9 统计学分析

所有实验数据采用“平均值 $\pm$ 标准差”表示, 应用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计分析。两组数据间比较采用 *t* 检验, 多组数据间比较采用 One-Way ANOVA 及 Post Hoc 检验。*P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AST 对原代分离的猪 VICs 生长活力的影响

免疫荧光鉴定结果显示原代分离的猪 VICs 呈明显的间质细胞标志物 Vimentin 阳性, 内皮标志物 CD31 阴性(图 1A), 细胞纯度超过 95%, 满足实验所需。CCK-8 结果显示, 浓度低于 20 μ mol/L 时, AST 处理不影响 VICs 的生长活力; AST 浓度在 50 ~ 400 μ mol/L 时, VICs 的生长活力随 AST 浓度的增加而明显抑制(图 1B)。后续实验采用浓度为 20 μ mol/L 的 AST 作为干预浓度。

2.2 AST 抑制 OM 诱导的 VICs 成骨分化

经 OM 成骨诱导后, 茜素红染色后显示 VICs 形成明显的钙化结节, 而 AST 处理的 VICs 钙化结节显著减少(图 2A、2B)。Western blot 检测结果显示, 经 OM 成骨诱导后, VICs 中成骨标志物 ALP 和 Runx2 的蛋白表达明显增加, 而 AST 处理的 VICs 中两者表达的增加得到明显缓解(图 2C、2D)。

2.3 AST 激活 VICs 中 Nrf2/HO-1 通路的表达

免疫荧光结果显示, Nrf2 和 HO-1 的表达在 OM 诱导的 VICs 中明显降低; AST 处理显著增加了两者的表达, 且 Nrf2 的细胞定位主要集中在细胞核内(图 3A-3B)。Western blot 结果进一步证

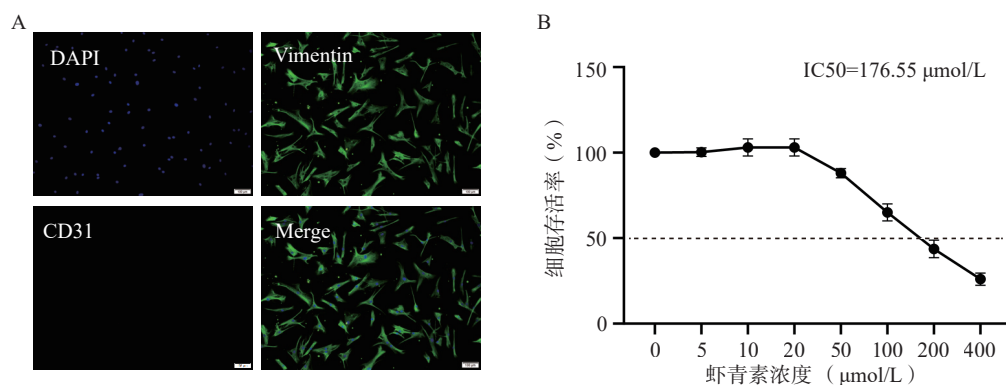


图 1 AST 对原代分离的猪 VICs 生长活力的影响

A. 瓣膜间质细胞免疫荧光鉴定, 标尺=200 μm; B. AST 对 VICs 生长活力的影响

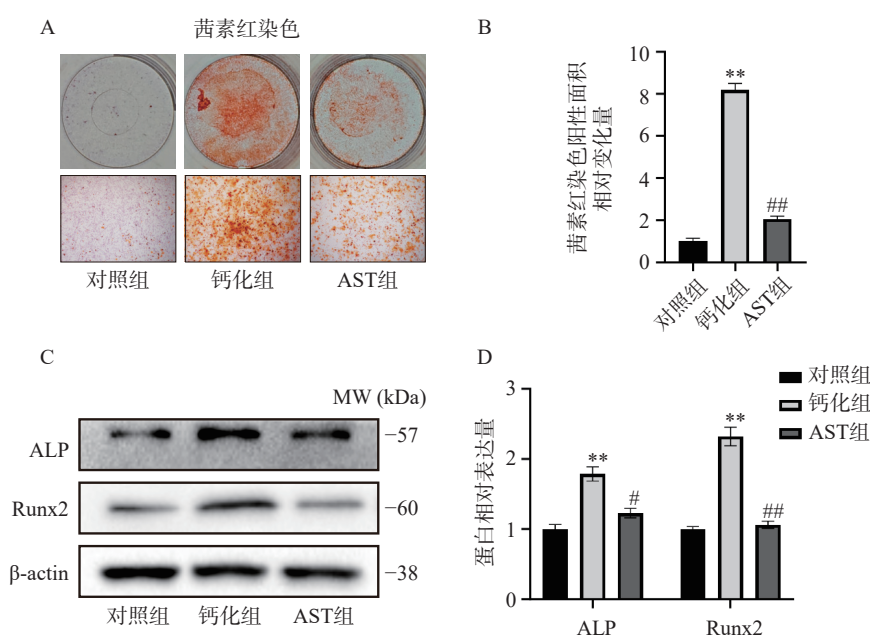


图 2 AST 抑制 OM 诱导的 VICs 成骨分化

A、B. 茜素红染色及相对定量分析结果($n=6$); C、D. Western Blot 检测 ALP、Runx2 的相对表达及定量分析结果($n=3$)

** $P<0.01$, 与对照组相比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与钙化组相比

实, AST 的处理显著缓解了 OM 诱导后 Nrf2 和 HO-1 表达的降低(图 3C-3D)。

2.4 AST 减轻 VICs 中 ROS 的积累

DCFH-DA 染色结果显示, 正常状态下 VICs 中 ROS 水平较低; OM 诱导后, VICs 中的 ROS 水平明显增加; AST 处理后 VICs 中的 ROS 水平明显降低, 为 OM 组的(47.09 ± 5.46)%(图 4A-4B)。

3 讨论

随着我国人口老龄化程度逐渐加重, CAVD 已成为社会的严重负担, 显著影响老年人的心脏健康^[7-9]。寻找能够延缓或防止 CAVD 进展的新治疗策略具有重要意义。CAVD 的发病机制复杂, 涉及炎症反应、氧化应激、免疫、细胞外基质重构等多种生物学过程^[10,11]。瓣膜间质细胞在各种病理因

素作用下向成骨细胞转变, 导致钙盐沉积及钙化灶形成^[12,13]。

氧化应激(OS)是指体内或者细胞内氧自由基的生成与清除紊乱, 导致活性氧化因子(ROS)异常积累, 在体内或者细胞内积蓄从而引发氧化损伤的过程^[14,15]。ROS 通过氧化脂质、蛋白质和 DNA, 导致细胞功能障碍和凋亡, 促进瓣膜纤维化和钙化。ROS 激活 NF-κB 等炎症通路, 诱导促炎因子(如 IL-6、TNF-α)的表达, 进一步加剧瓣膜损伤。然而, CAVD 的发病机制相当复杂, 确切机制尚未完全阐明。本研究发现, AST 在体外钙化模型中能减轻瓣膜间质细胞成骨分化。从机制上看, AST 通过增强 Nrf2/HO-1 抗氧化信号通路来抑制瓣膜间质细胞的钙化, 突显了其作为 CAVD 新型治疗药物的潜力。这些发现表明, AST 的抗氧化特性对其保护

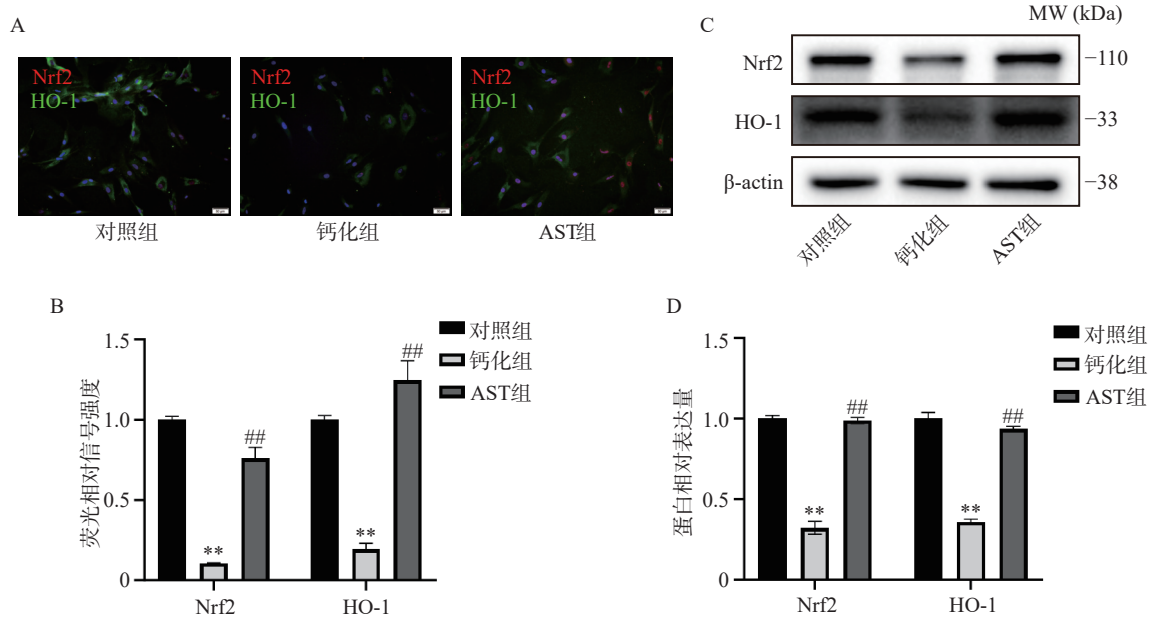


图3 AST激活VICs中Nrf2/HO-1通路的表达

A、B. 免疫荧光检测 Nrf2 及 HO-1 表达与相对定量分析结果($n=6$), 标尺=50 μm; C、D. Western Blot 检测 Nrf2、HO-1 相对表达量及定量分析结果($n=3$)

** $P<0.01$, 与对照组相比; ## $P<0.01$, 与钙化组相比

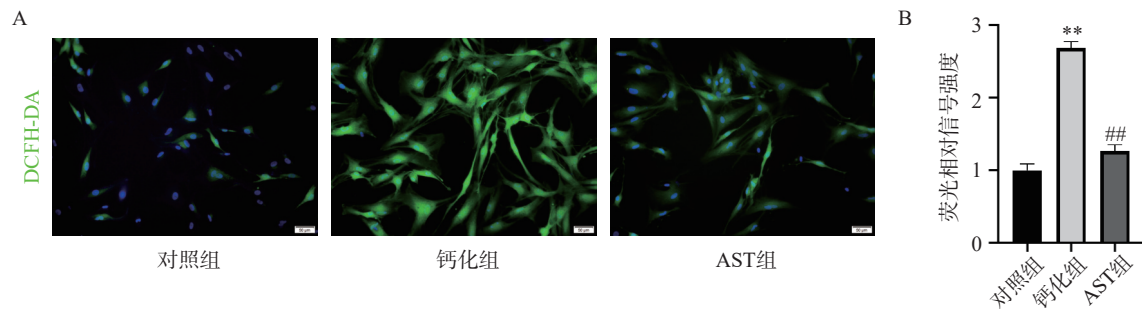


图4 AST减轻VICs中ROS的积累

A、B. DCFH-DA 荧光染色结果及相对定量分析($n=6$), 标尺=50 μm

** $P<0.01$, 与对照组相比; ## $P<0.01$, 与钙化组相比

主动脉瓣的效果具有一定作用。

AST 具有显著抗炎和抗氧化作用, 被称为“超级抗氧化剂”^[16,17]。在心血管、神经、肿瘤和骨关节炎领域的多项研究表明, AST 可以通过激活 Nrf2 通路调节氧化应激, 减少炎症反应并恢复线粒体功能^[18,19]。炎症反应、氧化应激、机械应力、脂质代谢紊乱、年龄和其他因素可能会导致 CAVD。在这些因素的影响下, 瓣膜间质细胞发生病理变化, 导致瓣叶钙化^[20-22]。在过去的二十年中, 越来越多的研究表明, ROS 在 CAVD 中发挥重要作用^[23,24]。ROS 通过诱导氧化应激、炎症和钙化促进 CAVD 的发展, 而 Nrf2/HO-1 通路通过抗氧化、抗炎和抗钙化作用发挥保护效应。在 CAVD 中, Nrf2/HO-1 通路的失调可能导致氧化应激加剧和瓣膜病变进展。我们的体外结果表明, AST 激活了

VICs 的 Nrf2/HO-1 信号通路, 有效减少了 VICs 中的 ROS 生成, 维持氧化还原稳态最终抑制钙化。

本研究发现 AST 在抑制主动脉瓣钙化方面显示出较好的结果, 但该实验仅在体外进行, 后续仍需在大规模临床试验中进一步验证其长期安全性和有效性。研究还应考虑 AST 与其他药物之间的相互作用, 以确保最佳的应用适应症。此外, AST 还具有其他可能抑制钙化的作用, 如减轻炎症反应等。总的来说, AST 展现出抑制主动脉瓣钙化的潜力, 其在心血管疾病预防和治疗中的应用值得进一步研究。未来的研究将有助于明确 AST 提升心血管健康的具体机制及临床意义。

【参考文献】

[1] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collab-

- orators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 1789-1858.
- [2] BRANCHETTI E, SAINGER R, POGGIO P, et al. Antioxidant enzymes reduce DNA damage and early activation of valvular interstitial cells in aortic valve sclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(2): e66-74.
- [3] LIBERMAN M, BASSI E, MARTINATTI M K, et al. Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(3): 463-470.
- [4] SHU L, YUAN Z, LI F, et al. Oxidative stress and valvular endothelial cells in aortic valve calcification[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114775.
- [5] LI Y F, LI J F, XU S, et al. Tetrahedral framework nucleic acid-based delivery of astaxanthin suppresses chondrocyte pyroptosis and modulates oxidative stress for the treatment of osteoarthritis[J]. *Adv Health Mater*, 2024, 13(28): e2401452.
- [6] YANG G H, LIU X Y, JING X Z, et al. Astaxanthin suppresses oxidative stress and calcification in vertebral cartilage endplate via activating Nrf-2/HO-1 signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 119: 110159.
- [7] MARTIN S S, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. 2024 heart disease and stroke statistics: a report of US and global data from the American heart association[J]. *Circulation*, 2024, 149(8): e347-e913.
- [8] CONRAD N, MOLENBERGHS G, VERBEKE G, et al. Trends in cardiovascular disease incidence among 22 million people in the UK over 20 years: population based study[J]. *BMJ*, 2024, 385: e078523.
- [9] STRANGE G, STEWART S, CELERMAJER D, et al. Poor long-term survival in patients with moderate aortic stenosis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74(15): 1851-1863.
- [10] MONCLA L M, BRIEND M, BOSSÉ Y, et al. Calcific aortic valve disease: mechanisms, prevention and treatment[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(8): 546-559.
- [11] PARRA-IZQUIERDO I, SÁNCHEZ-BAYUELA T, LÓPEZ J, et al. Interferons are pro-inflammatory cytokines in sheared-stressed human aortic valve endothelial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10605.
- [12] IQBAL F, SCHLOTTER F, BECKER-GREENE D, et al. Sortilin enhances fibrosis and calcification in aortic valve disease by inducing interstitial cell heterogeneity[J]. *Eur Heart J*, 2023, 44(10): 885-898.
- [13] ZHENG K H, TZOLOS E, DWECK M R. Pathophysiology of aortic stenosis and future perspectives for medical therapy[J]. *Cardiol Clin*, 2020, 38(1): 1-12.
- [14] SIES H, JONES D P. Reactive oxygen species(ROS) as pleiotropic physiological signalling agents[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 363-383.
- [15] FORRESTER S J, KIKUCHI D S, HERNANDES M S, et al. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signalling[J]. *Circ Res*, 2018, 122(6): 877-902.
- [16] JIANG X D, ZU L, WANG Z Y, et al. Micro-algal astaxanthin could improve the antioxidant capability, immunity and ammonia resistance of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 102: 499-510.
- [17] ZHANG Y, YE Y, DING W, et al. Astaxanthin is ketolated from Zeaxanthin independent of fatty acid synthesis in *Chromocloris zofingensis*[J]. *Plant Physiol*, 2020, 183(3): 883-897.
- [18] PEREIRA C P M, SOUZA A C R, VASCONCELOS A R, et al. Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(1): 37-48.
- [19] SONG X D, WANG B S, LIN S C, et al. Astaxanthin inhibits apoptosis in alveolar epithelial cells type II in vivo and in vitro through the ROS-dependent mitochondrial signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(11): 2198-2212.
- [20] XIE K J, ZENG J X, WEN L M, et al. Abnormally elevated EZH2-mediated H3K27me3 enhances osteogenesis in aortic valve interstitial cells by inhibiting SOCS3 expression[J]. *Atherosclerosis*, 2023, 364: 1-9.
- [21] BOSSE K, HANS C P, ZHAO N, et al. Endothelial nitric oxide signaling regulates Notch1 in aortic valve disease[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 60: 27-35.
- [22] LIU Z T, WANG K, JIANG C, et al. Morusin alleviates aortic valve calcification by inhibiting valve interstitial cell senescence through Ccnd1/Trim25/Nrf2 axis[J]. *Adv Sci*, 2024, 11(20): e2307319.
- [23] LI J Y, ZENG Q C, XIONG Z Y, et al. Trimethylamine N-oxide induces osteogenic responses in human aortic valve interstitial cells in vitro and aggravates aortic valve lesions in mice[J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(8): 2018-2030.
- [24] PENG X, SU S W, ZENG J X, et al. 4-Octyl itaconate suppresses the osteogenic response in aortic valvular interstitial cells via the Nrf2 pathway and alleviates aortic stenosis in mice with direct wire injury[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 188: 404-418.
- [收稿日期] 2024-12-27 [修回日期] 2025-04-02
[本文编辑] 崔俐俊