

# 外源性硫化氢对人脐静脉平滑肌细胞钙化的影响及其可能机制

刘爽<sup>1</sup>, 武慧娟<sup>2</sup>, 咎海英<sup>2</sup>, 杨晓玲<sup>2</sup>, 徐华<sup>2</sup>, 张鸣号<sup>2</sup>, 曹军<sup>2</sup>, 李桂忠<sup>2</sup>

(1. 滨州医学院医药研究中心, 山东省烟台市 264003; 2. 宁夏医科大学基础医学院病理生理学系, 宁夏银川市 750004)

[关键词] 细胞钙化; 平滑肌细胞; 硫化氢; 骨桥蛋白

[摘要] **目的** 探寻外源性硫化氢对人脐静脉平滑肌细胞(HUSMC)钙化的影响及机制。**方法** 在成功复制 HUSMC 钙化模型基础上, 给予硫化氢钠(NaHS)进行培养, 实验分为 6 组( $n=6$ ): 对照组、钙化组、单纯 NaHS 组( $8.0 \times 10^{-6}$  mol/L NaHS)、钙化 + NaHS 高剂量组( $4.0 \times 10^{-5}$  mol/L NaHS)、钙化 + NaHS 中剂量组( $8.0 \times 10^{-6}$  mol/L NaHS)、钙化 + NaHS 低剂量组( $1.6 \times 10^{-6}$  mol/L NaHS)。对各组 HUSMC 进行 Von Kossa 染色、显微图像分析, 并检测各组碱性磷酸酶活性、钙离子含量, 荧光定量 PCR 法检测细胞中骨桥蛋白 mRNA 的表达, 放射免疫法检测培养液中骨桥蛋白含量。**结果** 硫化氢可明显减少 HUSMC 钙结节的聚集生长, Von Kossa 染色显示细胞聚集处棕褐色钙结节较钙化组明显减轻, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 钙化 + NaHS 高剂量组、钙化 + NaHS 中剂量组、钙化 + NaHS 低剂量组钙化细胞百分比、细胞钙含量和碱性磷酸酶活性较钙化组明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 培养液中骨桥蛋白含量及其细胞内骨桥蛋白 mRNA 表达均较钙化组减少, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 硫化氢可以减轻 HUSMC 钙化的程度, 其机制可能是通过下调细胞内骨桥蛋白 mRNA 的表达, 进而导致骨桥蛋白生成减少而实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Effects of Exogenous Hydrogen Sulfide on Calcification in Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cell and the Underlying Mechanism

LIU Shuang<sup>1</sup>, WU Hui-Juan<sup>2</sup>, ZAN Han-Ying<sup>2</sup>, YANG Xiao-Ling<sup>2</sup>, XU Hua<sup>2</sup>, ZHANG Ming-Hao<sup>2</sup>, CAO Jun<sup>2</sup>, and LI Gui-Zhong<sup>2</sup>

(1. Medicine and Pharmacy Research Center of Binzhou Medical College, Yantai, Shandong 264003; 2. Pathophysiology Department, School of Basic Medical Science of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

[KEY WORDS] Cell Calcification; Smooth Muscle Cells; Hydrogen Sulfide; Osteopontin

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects and underlying mechanism of the exogenous hydrogen sulphide( $H_2S$ ) donor hydrosulfide(NaHS) on calcification (CAL) in human umbilical vein smooth muscle cell (HUSMC). **Method** Using NaHS intervention on the basis of successfully copied HUSMC calcification model, and experiment were randomly divided into 6 groups ( $n=6$ ): the control group, calcification group, pure NaHS group (NaHS), CAL-NaHS-H group ( $4.0 \times 10^{-5}$  mol/L NaHS), CAL-NaHS-M group ( $8.0 \times 10^{-6}$  mol/L NaHS), CAL-NaHS-L group ( $1.6 \times 10^{-6}$  mol/L NaHS). Calcium deposition in HUSMC were detected by Von Kossa staining, and calculated Von Kossa staining by micro-image analysis system; the total calcium contents were calculated by ultraviolet spectrophotometry. The alkaline phosphatase (ALP) activity were calculated by automated enzyme-linked immunosorbent; The osteopontin mRNA expression were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The osteopontin content were calculated by radioimmunoassay.

**Results**  $H_2S$  can significantly reduce the calcification of the HUSMC. Compared with CAL group, Von Kossa staining showed brown nodules were significantly reduced in CAL-NaHS-H group, CAL-NaHS-M group and CAL-NaHS-L group ( $P < 0.05$ ). Compared with CAL group, the percentage of positive cells in calcification, the calcium content, ALP levels and OPN content and mRNA expression was significantly reduced in CAL-NaHS-H group, CAL-NaHS-M group and CAL-

[收稿日期] 2014-07-01

[修回日期] 2014-09-26

[基金项目] 宁夏自然科学基金项目(NZ09105)

[作者简介] 刘爽, 硕士, 讲师, 主要从事心血管病理生理学、呼吸睡眠基础性研究工作, E-mail 为 liushuangdoctor888@163.com. 曹军, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事血管钙化发生机制研究, E-mail 为 caoj@nxmu.edu.cn. 通讯作者李桂忠, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管病理生理学研究工作, E-mail 为 lilylove36@163.com。

NaHS-L group respectively ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion**  $H_2S$  could inhibit the HUSMC calcification and the mechanism may be downregulating expression of OPN mRNA in the intracellular, thereby causing OPN generated to reduce.

经大量实验研究证实,血管钙化(vascular calcification)是心脑血管疾病发生发展的重要危险因素之一<sup>[1]</sup>,是多种心血管疾病如:动脉粥样硬化、高血压、糖尿病血管病变、血管损伤等共同存在的病理表现<sup>[2]</sup>。现研究发现血管钙化是异位于大动脉及中动脉内膜、中膜上钙盐过量沉积而引起的钙化,其过程属于主动性的,并且是可调节的。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)是构成血管中膜的主要细胞成份,正常情况下血管的舒缩功能取决于组成血管中膜血管平滑肌细胞的状态,而其异常增殖又可参与动脉粥样硬化、血管重塑、血管再狭窄等病理生理过程<sup>[3]</sup>。目前硫化氢被认为是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之后的第三种气体信号分子<sup>[4]</sup>。Wu等<sup>[5]</sup>通过采用大鼠主动脉钙化模型发现,用维生素D和烟碱将实验大鼠诱导后,血浆硫化氢水平及主动脉胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶表达较对照组明显降低,揭示硫化氢对血管钙化有一定的影响。本实验通过将硫化氢供体硫氢化钠(NaHS)作用于人脐静脉平滑肌细胞(human umbilical vein smooth muscle cell, HUSMC)钙化模型,进而研究硫化氢对钙化HUSMC的影响及其可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 脐静脉来源

人脐静脉取自宁夏医科大学总医院妇产科住院产妇分娩的健康、足月男性新生儿脐带。

### 1.2 主要试剂

硫氢化钠(Sigma公司);细胞钙离子浓度比色法定量检测试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测试剂盒(南京建成生物有限公司);骨桥蛋白(osteopontin, OPN)放射免疫测定试剂盒(北京康肽生物技术有限公司); $\beta$ -甘油磷酸盐(上海如吉生物有限公司);100 bp DNA Ladder、TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix、TransStart™ Top Green qPCR SuperMix(北京全式金生物技术有限公司);TRIzol(Invitrogen);Primer(上海生工生物工程有限公司);其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 硫化氢培养钙化平滑肌细胞及分组

选择生长状态良好的第3~5代HUSMC,调整细胞数至 $1.0 \times 10^8$  cells/L,待细胞生长融合至80%

~90%,分组给予不同终浓度NaHS进行培养。实验共分为6组:对照组:培养液中含100 kU/L青霉素、链霉素和10%胎牛血清;钙化组:在对照组基础上加入 $\beta$ -甘油磷酸盐( $\beta$ -GP),使其终浓度为12 mmol/L钙化培养液;单纯NaHS组:在对照组基础上加入NaHS使其终浓度为 $8.0 \times 10^{-6}$  mol/L;钙化+NaHS低剂量组、钙化+NaHS中剂量组、钙化+NaHS高剂量组:在钙化组基础上加入NaHS使其终浓度分别为 $1.6 \times 10^{-6}$  mol/L、 $8.0 \times 10^{-6}$  mol/L、 $4.0 \times 10^{-5}$  mol/L。

### 1.4 Von Kossa 染色观察钙沉积

制作细胞爬片,每两天换液一次,连续培养10天。于4℃、4%多聚甲醛固定60 min;5%硫代硫酸钠孵育30 min,蒸馏水冲洗;1%硝酸银溶液紫外线下染色30 min,蒸馏水冲洗;5%硫代硫酸钠孵育2 min;1%中性红复染30 min,蒸馏水漂洗后观察。封片,观察钙沉积情况,采图<sup>[6]</sup>。参考文献[7]运用Motic Images Advanced 3.2显微图像分析系统<sup>[8]</sup>对Von Kossa染色图片进行分析。通过数码显微镜采集实时图像,对已分割好图像进行自动计算阳性细胞占总细胞数的百分比,记录数据,并进行统计学分析。

### 1.5 碱性磷酸酶的检测

刮脱6组细胞至样品管中,经超声波破碎仪破碎细胞(功率40 W)5 min(破碎10 s,间隔10 s),显微镜下观察细胞完全破碎后离心10 min,吸取上清液用ALP检测试剂盒检测ALP活性。

### 1.6 钙含量的检测

刮脱6组细胞,加入3 mL GENMED清理液,混匀、离心弃上清液;加入200  $\mu$ L GENMED裂解液,混匀,转移至预冷离心管;涡旋震荡15 s;冰槽孵育30 min;移取10  $\mu$ L上清液进行蛋白定量检测。细胞钙离子浓度比色法定量检测试剂盒检测钙含量。

### 1.7 放射免疫法检测培养液中骨桥蛋白含量

培养细胞10天,每两天换液一次,分别收集6组细胞培养上清液。严格按照试剂盒使用说明书,将放射性标记物<sup>125</sup>I-骨桥蛋白加入各个待测样品和标准品中,4℃条件下孵育24 h,当竞争反应达到平衡后,加入分离试剂,室温孵育15 min,使分离试剂与结合的抗体OPN形成沉淀,3500 r/min离心15 min,弃去上清液。使用 $\gamma$ 计数器测定沉淀物中的放射性强度,由该放射性强度比B/T对应抗体的量

制出标准曲线,即可从标准曲线所得的公式计算出待测样品中 OPN 的含量。

1.8 荧光定量 PCR 法检测骨桥蛋白 mRNA 的表达

采用 Premier 5.0 进行 OPN 引物设计筛选,引物序列号为 NM\_001040058.1,上游引物 5'-CAA CCG AAG TTT TCA CTC CAG-3',下游引物 5'-ATT CAA CTC CTC GCT TTC CAT-3'。β-actin 引物序列为上游 5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3',下游 5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3'。荧光定量 PCR 扩增反应体系:95℃ 预变性 30 s 后,95℃ 5 s、55℃ 15 s、72℃ 10 s,40 个循环;72℃ 30 s。OPN mRNA 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值表示。

1.9 统计学处理方法

计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多样本均数间比较采用 One-way ANOVA 检验,组间两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验进行统计学分析, $P < 0.05$  为差异有显著性。

2 结 果

2.1 平滑肌细胞 Von Kossa 染色变化及染色显微图像分析结果

对照组和单纯 NaHS 组平滑肌细胞形态正常,可见核仁,细胞均呈峰谷状分布,无棕褐色钙结节

存在;与对照组相比,钙化组可见大量聚集的钙结节存在,且钙结节呈现棕褐色;与钙化组相比,钙化 + NaHS 高剂量组、钙化 + NaHS 中剂量组、钙化 + NaHS 低剂量组 HUSMC 聚集生长减少,且聚集处棕褐色钙结节较钙化组明显减轻(图 1)。

Motic Images Advanced 3.2 显微图像分析结果显示,与对照组相比,钙化组中钙化细胞百分比升高了 44.34 倍( $P < 0.05$ );与钙化组相比,钙化 + NaHS 高剂量组、钙化 + NaHS 中剂量组、钙化 + NaHS 低剂量组钙化细胞百分比分别下降了 71.02%、67.04%、64.60%,差异具有显著性( $P < 0.05$ )。钙化 + NaHS 三个剂量组间差异无显著性( $P > 0.05$ ;表 1)。

2.2 硫化氢对平滑肌细胞钙含量的影响

与对照组相比,钙化组钙离子含量增加 106.26% ( $P < 0.05$ );与单纯 NaHS 组相比,钙化组钙离子含量增加了 131.47% ( $P < 0.05$ );与钙化组相比,钙化 + NaHS 高剂量组、钙化 + NaHS 中剂量组及钙化 + NaHS 低剂量组钙离子含量分别降低了 24.94%、15.89%、13.30% ( $P < 0.05$ );钙化 + NaHS 高剂量组较钙化 + NaHS 中剂量组及钙化 + NaHS 低剂量组钙含量分别下降了 10.76%、13.43% ( $P < 0.05$ );钙化 + NaHS 中剂量组与钙化 + NaHS 低剂量组之间钙离子含量差异无显著性( $P > 0.05$ ;表 1)。

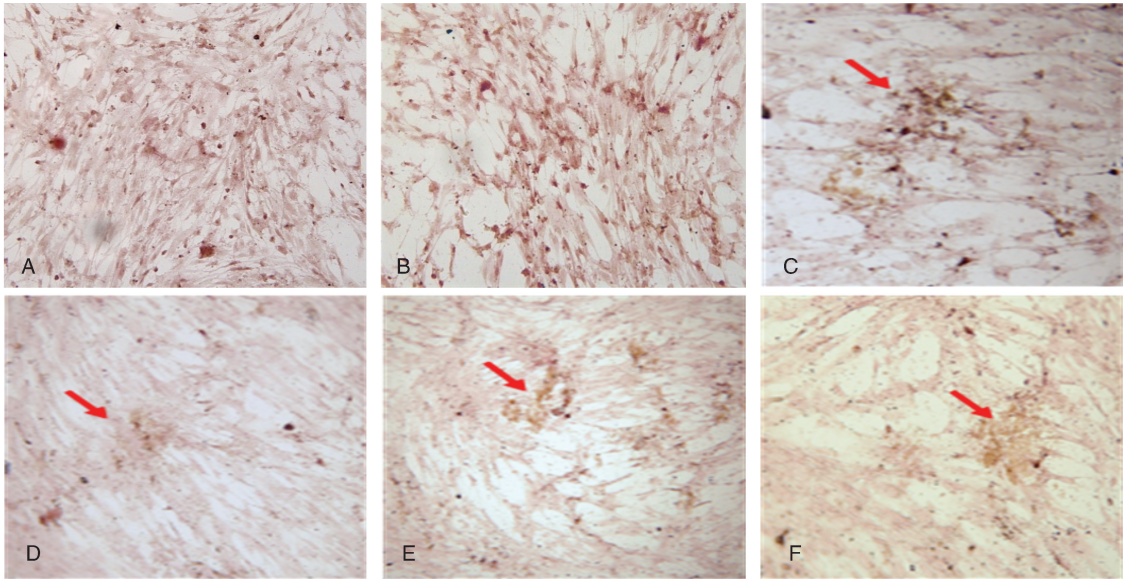


图 1. 平滑肌细胞 Von Kossa 染色结果(×100) A 为对照组,B 为单纯 NaHS 组,C 为钙化组,D 为钙化 + NaHS 高剂量组,E 为钙化 + NaHS 中剂量组,F 为钙化 + NaHS 低剂量组。

Figure 1. The results of Von Kossa staining of smooth muscle cells(×100)

2.3 硫化氢对平滑肌细胞碱性磷酸酶活性的影响

与对照组相比,钙化组 ALP 活性升高了

48.77%,差异有显著性( $P < 0.05$ ),单纯 NaHS 组 ALP 活性升高了 5.38%,差异无显著性( $P > 0.05$ );



与钙化组相比,钙化 + NaHS 高剂量组、钙化 + NaHS 中剂量组及钙化 + NaHS 低剂量组 ALP 活性分别降低了 18.19%、16.59% 和 12.97%,差异有显著性 ( $P < 0.05$ );而钙化 + NaHS 高剂量组、钙化 + NaHS 中剂量组及钙化 + NaHS 低剂量组之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ ;表 1)。

2.4 硫化氢对平滑肌细胞培养液中骨桥蛋白含量的影响

表 1. HUSMC 钙化细胞百分比、钙含量、ALP 活性及细胞培养液 OPN 含量( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1. The percentage of HUSMC calcifying vascular cell, calcium content, ALP activity and cell culture fluid OPN content( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

分 组	钙化细胞百分比 (%)	钙含量 (mmol/10 <sup>5</sup> cells)	ALP 活性 (μg/10 <sup>5</sup> cells)	OPN 含量 (μg/L)
对照组	0.10 ± 0.05	82.37 ± 2.01	1.34 ± 0.49	8.94 ± 0.44
单纯 NaHS 组	0.17 ± 0.13	73.40 ± 0.48 <sup>a</sup>	1.41 ± 0.29	9.01 ± 0.11
钙化组	4.52 ± 1.27 <sup>ab</sup>	169.90 ± 1.93 <sup>ab</sup>	1.99 ± 0.07 <sup>ab</sup>	13.63 ± 0.37 <sup>ab</sup>
钙化 + NaHS 高剂量组	1.31 ± 0.05 <sup>ac</sup>	127.52 ± 1.86 <sup>ac</sup>	1.63 ± 0.01 <sup>ac</sup>	10.27 ± 0.26 <sup>c</sup>
钙化 + NaHS 中剂量组	1.49 ± 0.19 <sup>ac</sup>	142.90 ± 2.80 <sup>ac</sup>	1.66 ± 0.10 <sup>ac</sup>	10.98 ± 0.29 <sup>c</sup>
钙化 + NaHS 低剂量组	1.60 ± 0.06 <sup>ac</sup>	147.30 ± 3.98 <sup>acd</sup>	1.73 ± 0.02 <sup>ac</sup>	11.92 ± 0.15 <sup>ac</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组相比;b 为  $P < 0.05$ ,与单纯 NaHS 组相比;c 为  $P < 0.05$ ,与钙化组相比;d 为  $P < 0.05$ ,与钙化 + NaHS 低剂量组相比。

2.5 硫化氢对 HUSMC 骨桥蛋白 mRNA 表达的影响

与对照组相比,钙化组 OPN mRNA 表达增加了 4.04 倍 ( $P < 0.05$ )。与钙化组相比,钙化 + NaHS 高剂量组、钙化 + NaHS 中剂量组和钙化 + NaHS 低剂量组中 OPN mRNA 表达分别降低了 62.90%、47.42% 和 37.70% ( $P < 0.05$ ;表 2)。

表 2. 硫化氢对平滑肌细胞 OPN mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. The effect of H<sub>2</sub>S on the expression of OPN mRNA in cultured smooth muscle cells( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	OPN mRNA
对照组	6	1.00 ± 0.00
单纯 NaHS 组	6	1.12 ± 0.19
钙化组	6	5.04 ± 0.04 <sup>ab</sup>
钙化 + NaHS 高剂量组	6	1.87 ± 0.04 <sup>ac</sup>
钙化 + NaHS 中剂量组	6	2.65 ± 0.12 <sup>ac</sup>
钙化 + NaHS 低剂量组	6	3.14 ± 0.21 <sup>ac</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组相比;b 为  $P < 0.05$ ,与单纯 NaHS 组相比;c 为  $P < 0.05$ ,与钙化组相比。

3 讨 论

血管钙化是普遍存在于动脉粥样硬化、糖尿

与对照组相比,钙化组培养液中 OPN 含量升高了 52.46%,差异有显著性 ( $P < 0.05$ ),单纯 NaHS 组培养液中 OPN 含量降低了 7.80%,差异无显著性 ( $P > 0.05$ );与钙化组相比,钙化 + NaHS 高剂量组、钙化 + NaHS 中剂量组及钙化 + NaHS 低剂量组培养液中 OPN 含量分别下降了 24.65%、19.44% 和 12.55%,差异有显著性 ( $P < 0.05$ ;表 1)。

病、肾血管病变、血管损伤修复及血管老化等疾病中的病理过程,是引起心血管疾病的重要危险因素<sup>[9]</sup>。近年来国内外研究证实,血管钙化过程不是钙盐的被动沉积,而是一种类似于骨骼形成和骨骼修复的主动、可调节、可预防的过程<sup>[10]</sup>,并且受到体内多种因素的调控。大量研究发现当血管平滑肌细胞暴露于高磷环境时,可通过上调成骨细胞转录因子核结合因子 α 亚单位 (Cbfα1),使其表达成骨细胞表型,从而导致血管钙化的发生<sup>[11]</sup>。血管平滑肌细胞表达成骨细胞表型是血管钙化过程的中心环节。其主要特征是血管平滑肌细胞在高磷等诸多外在因素的作用下,平滑肌细胞内磷含量增加,易导致细胞内凋亡小体形成,从而直接引起钙化的发生,部分细胞还可发生成骨细胞样表型转变,促使钙化调节蛋白表达增加,上调 Cbfα1,促进成骨相关性基因的表达,从而导致血管钙化的发生<sup>[12]</sup>。

大量动物实验表明,硫化氢在诸多心血管疾病如低氧性肺动脉高压、高血压、感染性休克以及心肌缺血损伤等疾病的发生发展中具有极其重要的保护作用,其具有扩张血管、降低血压<sup>[13]</sup>、抑制平滑肌细胞增殖<sup>[14]</sup>等多种心血管效应,并在心血管疾病的调节中具有广泛的生物学活性,因此提出并证实

了硫化氢是心血管功能调节的又一种新型气体信号分子。

OPN 是最早在骨细胞外基质中被分离出的一种重要酸性磷酸化糖蛋白,被看作是血管钙化的标志性蛋白。Hirota 等<sup>[15]</sup>证实 OPN mRNA 在正常动脉中不表达,但在粥样硬化动脉中其表达随着粥样硬化程度增加而增加。Shioi 等<sup>[16]</sup>发现牛血管平滑肌细胞通过  $\beta$ -GP 可诱导其发生钙化。在牛血管平滑肌细胞培养的第 14 天钙化组 OPN 表达明显高于对照组。本研究通过荧光定量 PCR 方法证实 OPN mRNA 的表达与钙化显著相关,与有关报道一致,提示其参与了钙化调节。目前研究表明,OPN 可能是通过其转录后磷酸化修饰来抑制血管钙化,未磷酸化的 OPN 则无此作用<sup>[17]</sup>。而硫化氢是目前被确定的第一个通过直接开放血管平滑肌细胞上  $K_{ATP}$  通道而发挥作用的开放剂<sup>[18]</sup>,从而起到舒张血管和抑制血管平滑肌增生的作用,但其对血管钙化调节的机制尚不清楚。本研究通过研究硫化氢对钙化的作用,证实在适于 HUSMC 生长的硫化氢浓度范围内,硫化氢浓度越高对钙化的减轻作用越明显。同时得出硫化氢在抑制钙化的过程中也降低了 OPN 的表达,而硫化氢在抑制钙化的同时是否通过抑制 OPN 磷酸化途径进而降低 OPN 表达量还需进一步研究证实。同时推测钙化程度的降低可能是硫化氢与 OPN 转录后磷酸化修饰共同协同而产生的,但其具体的机制尚需进一步阐明。

#### [参考文献]

- [1] Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, et al. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy [J]. *Med Res Rev*, 2001, 21(4): 274-301.
- [2] 齐永芬. 血管钙化发病机制研究新进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(3): 280-282.
- [3] 黄娟. 结缔组织生长因子与血管钙化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(7): 663-665.
- [4] Wagner CA. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator [J]. *J Nephrol*, 2009, 22(2): 173-176.
- [5] Wu SY, Pan CS, Geng B, et al. Hydrogen sulfide ameliorates vascular calcification induced by vitamin D3 plus nicotine in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(3): 299-306.
- [6] 孙崇然, 刘恩重. Von Kossa 染色的方法改进[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2006, 40(1): 70-71.
- [7] 张鸣号, 彭亮, 曹军. 显微图像分析法与人工计数法在免疫组化结果判读中的应用[J]. *宁夏医科大学学报*, 2009, 31(2): 261.
- [8] Dellegrottaglie S, Sanz J, Rajagopalan S. Molecular determinants of vascular calcification: a bench to bedside view [J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6(5): 515-524.
- [9] 王刚, 边云飞, 白瑞, 等. 肾素通过非血管紧张素 II 途径促进大鼠血管平滑肌细胞钙化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(4): 294-295.
- [10] Evrard S, Delanaye P, Kamel S, et al. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers [J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 438C: 401-414.
- [11] Shroff RC, Shanahan CM. The vascular biology of calcification [J]. *Semin Dial*, 2007, 20(2): 103-109.
- [12] Zhao MM, Xu MJ, Cai Y, et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification in vitro and in vivo [J]. *Inter Society Nephrol*, 2011, 79: 1 071-079.
- [13] Du Y, Wang Y, Wang L, et al. Cartilage oligomeric matrix protein inhibits vascular smooth muscle calcification by interacting with bone morphogenetic protein-2 [J]. *Circ Res*, 2011, 108(8): 917-928.
- [14] Kapustin A, Davies JD, Reynolds JL, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization [J]. *Circ Res*, 2011, 109(1): e1-12.
- [15] Hirota S, Imakita M, Kohri K, et al. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification [J]. *Am J Pathol*, 1993, 143(4): 1 003-008.
- [16] Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, et al.  $\beta$ -Glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15: 2 003-009.
- [17] Li X, Speer MY, Yang H, et al. Vitamin D receptor activators induce an anticalcific paracrine program in macrophages: requirement of osteopontin [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(2): 321-326.
- [18] Hideo Kimura. Hydrogen sulfide: its production, release and functions [J]. *Amino Acids*, 2011, 41(1): 113-121.

(此文编辑 许雪梅)