

# 莱菔硫烷通过 Nrf-2、Sirt-1 改善氧化应激诱导的血管钙化

杜亚琴 李怡 王莉

**【摘要】** 目的 探讨莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)在氧化应激所致血管钙化中的作用与机制。方法 采用 $\beta$ -甘油磷酸处理大鼠血管平滑肌细胞(RASMCs)构建尿毒症血管钙化模型。RASMCs分为正常对照组、1  $\mu\text{mol/L}$  SFN组、5  $\mu\text{mol/L}$  SFN组、钙化组、钙化+1  $\mu\text{mol/L}$  SFN组、钙化+5  $\mu\text{mol/L}$  SFN组,分别培养72 h。MTT检测细胞的生存情况, Von Kossa观察细胞钙化情况,微板法测定细胞中钙离子含量,实时荧光定量PCR检测细胞中纤维细胞生长因子23(FGF-23)mRNA的表达,Western印迹检测骨调蛋白(OPN)、核心结合因子 $\alpha$ 1(Runx-2)及核转录因子NF-E2相关因子2(Nrf-2)、沉默信息调节因子2相关酶1(Sirt-1)的蛋白表达。激光共聚焦显微镜观察细胞线粒体的损伤,同时活性氧测定检测细胞内活性氧自由基(ROS)的含量。结果 (1)SFN对正常细胞的存活率没有影响,但低浓度和高浓度均能增加钙化组细胞存活率(均 $P < 0.05$ );(2)与钙化组比较,钙化+1  $\mu\text{mol/L}$  SFN组、钙化+5  $\mu\text{mol/L}$  SFN组细胞内钙盐沉积、钙离子含量及FGF23 mRNA的表达均减少(均 $P < 0.05$ );(3)与钙化组比较,钙化+1  $\mu\text{mol/L}$  SFN组、钙化+5  $\mu\text{mol/L}$  SFN组细胞内ROS的产生及线粒体的损伤减少,OPN、Runx-2的表达减弱,Nrf-2、Sirt-1、Cleaved Caspase-3的蛋白表达增加(均 $P < 0.05$ )。结论 SFN能通过Nrf-2、Sirt-1改善氧化应激引起的ROS沉积及线粒体功能紊乱,减轻血管钙化。

**【关键词】** 氧化性应激; 血管钙化; 核转录因子NF-E2相关因子2; 沉默信息调节因子2相关酶1; 莱菔硫烷

基金项目:国家自然科学基金(81270828)

**Sulforaphane ameliorates oxidative stress induced vascular calcification by regulating Nrf-2 and Sirt-1** Du Yaqin, Li Yi, Wang Li. Department of Nephrology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

Corresponding author: Wang Li, Email: scwangli62@163.com

**【Abstracts】 Objective** To investigate the role and mechanism of sulforaphane (SFN) in vascular calcification induced by oxidative stress. **Methods** The uremic vascular calcification model was established by treating rat vascular smooth muscle cells (RASMCs) with  $\beta$ -glycerophosphate. RASMCs were divided into 6 groups: normal control (NC) group, 1  $\mu\text{mol/L}$  SFN group, 5  $\mu\text{mol/L}$  SFN group, calcification group, 1  $\mu\text{mol/L}$  SFN+calcification group, 5  $\mu\text{mol/L}$  SFN+calcification group, and were all cultured for 72 h. Cell viability was measured by MTT. RASMCs calcification was visualized by Von Kossa staining. Calcium content was quantified by the microplate test, and mRNA level of FGF-23 was tested by real-time PCR. The expressions of OPN, Runx-2, Nrf-2 and Sirt-1 were evaluated by Western blotting. Confocal microscope was employed to observe mitochondria damage in RASMCs and the production of ROS in RASMCs was measured by reactive oxygen species assay. **Results** (1) SFN did not affect cell viability of the NC group, but both low dosage and high dosage increased the cell viability of calcification group (all  $P < 0.05$ ). (2) Compared with calcification group,

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1001-7097.2017.12.007

作者单位: 610072 成都, 四川省医学科学院 四川省人民医院肾脏内科

通信作者: 王莉, Email: scwangli62@163.com

SNF treatment decreased the calcium concentration, intracellular calcium deposition and the mRNA level of FGF-23 (all  $P < 0.05$ ). (3) Compared with calcification group, SNF treatment decreased the fluorescence intensity, mitochondria injury and the protein expressions of OPN and Runx-2, but increased the protein expressions of Nrf-2, Sirt-1 and cleaved caspase-3 (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** SNF can effectively protect RASMCs against vascular calcification induced by oxidative stress, since it prevents the ROS production and mitochondria dysfunction through Nrf-2 and Sirt-1.

**【Key words】** Oxidative stress; Vascular calcification; Nrf-2; Sirt-1; Sulforaphane

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81270828)

终末期肾病(ESRD)目前缺乏有效的治疗措施<sup>[1]</sup>,而血管钙化在ESRD中普遍存在,它增加了患者心血管疾病的发生率和病死率<sup>[2]</sup>。ESRD血管钙化是一个主动过程,钙磷的沉积促进血管平滑肌细胞向成骨样细胞转化,并表达骨样分化标志物<sup>[3]</sup>,导致血管中膜钙化<sup>[4]</sup>。目前ESRD患者的治疗措施主要集中在纠正异常的钙、磷、甲状旁腺激素水平方面。

氧化应激是自由基的生成与清除失衡的结果,有研究显示其可引起血管钙化<sup>[5]</sup>。核转录因子Nrf-2相关因子(Nrf-2)是细胞内调控氧化应激的重要抗氧化因子,激活Nrf-2可保护细胞免受炎症的影响<sup>[6-7]</sup>。虽然已知Nrf-2在肺纤维化、动脉粥样硬化中起着重要作用<sup>[8]</sup>,但Nrf-2和氧化应激对ESRD患者血管钙化的影响仍不清楚。

莱菔硫烷(SFN)是一种来自十字花科植物中的抗氧化剂,其可诱导抗氧化酶的产生<sup>[9]</sup>。研究表明SFN在狼疮肾炎和肾脏纤维化中均有保护作用<sup>[8-10]</sup>,是一种非常有前景的药物。文献显示SFN能够通过沉默信息调节因子2相关酶1(Sirt-1)逆转高磷诱导的血管钙化<sup>[11-12]</sup>。本研究通过SFN预理由高磷构建的尿毒症血管钙化模型,观察Nrf-2及Sirt-1的表达,研究SFN是否通过调控Nrf-2及Sirt-1抵抗氧化应激诱导的ESRD的血管钙化。

## 材料与方 法

### 一、主要试剂

莱菔硫烷(美国Sigma),大鼠血管平滑肌细胞系(RASMC,美国Sciencell),高糖DMEM(美国Hyclone),胎牛血清(FBS,美国Gibco),青霉素/链霉素(美国Hyclone),地塞米松、L-抗坏血酸、 $\beta$ -甘油磷酸(美国Sigma),活性氧检测试剂盒(江苏碧云天),SYBR Premix Ex Taq(日本TAKARA),

PrimeScript RT 试剂盒(日本TAKARA),钙盐染色剂(珠海贝索),钙测定试剂盒(南京建成),兔多克隆Nrf-2抗体、兔多克隆Sirt-1抗体、兔多克隆OPN抗体、兔多克隆Runx-2抗体(武汉三鹰),兔多克隆caspase-3抗体(美国CST),鼠多克隆GAPDH抗体(美国Sigma),HRP标记山羊抗兔IgG抗体、HRP标记山羊抗鼠IgG抗体(武汉三鹰)。

### 二、方法

1. 细胞培养与分组: RASMCs采用含有10% FBS、100 U/ml青霉素、100 g/ml链霉素的高糖DMEM(葡萄糖浓度为25.0 mmol/L)培养基液,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养,待细胞长至80%~90%融合时消化传代,取对数期细胞用于后续实验,并根据Byon等<sup>[13]</sup>的研究配制钙化培养基。分组:不同浓度的SFN(1  $\mu$ mol/L、5  $\mu$ mol/L)预处理RASMCs 5 h后分为正常对照组、1  $\mu$ mol/L SFN组、5  $\mu$ mol/L SFN组、钙化组、钙化+1  $\mu$ mol/L SFN组、钙化+5  $\mu$ mol/L SFN组,并继续培养72 h。

2. MTT检测细胞增殖情况:对数期生长的RASMCs按 $5 \times 10^3$ 个细胞/孔种植于96孔细胞培养板中,每组设置5个复孔,不同浓度的SFN(1  $\mu$ mol/L、5  $\mu$ mol/L)预处理细胞5 h后继续培养72 h,收集细胞按照MTT说明书操作,以570 nm为吸收波长,酶标仪检测各组相对吸光度值。

3. Von-Kossa染色:去除细胞培养基,75%乙醇固定细胞5 min, PBS洗涤1 min $\times$ 3次,硝酸银避光、室温染色30 min,蒸馏水洗涤细胞,紫外线照射30 min,硫代硫酸钠还原5 min,伊红复染30 s,蒸馏水洗涤,风干后置于显微镜下观察细胞内钙化沉积情况。

4. 细胞内钙离子测定:各组细胞去除培养基后加入100  $\mu$ l去离子水,收集细胞于1.5 ml的EP管中,2500 $\times$ g离心10 min,取10%的均浆上清液,采用微板法细胞内钙离子测定试剂盒检测,按说

说明书操作,酶标仪波长设置为 610 nm,测取各组吸光度(A)值。

5. 实时荧光定量 PCR 检测: Trizol 提取各组细胞总 RNA,测定浓度后按照说明书合成并扩增 cDNA,引物序列: FGF23 上游 5'-CACTACCTGGT GAGCTTGGG-3',下游 5'-CTTCCTCTGCACTCGG TAGC-3',产物长度 250 bp; GAPDH 上游 5'-AGGC ACCAAGATACTTACAAAAC-3',下游 5'-GGTGG TGAAGTTGTTTTGCGA-3',产物长度 277 bp,扩增 40 循环,目的基因的相对量采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  获得。

6. Western 印迹检测蛋白表达: 预冷 PBS 清洗细胞,加入 RIPA 裂解液,低温离心收集上清,BCA 法测定各组蛋白浓度,取 20  $\mu$ g 总蛋白与等量 2 $\times$ SDS 样品缓冲液混合,干式恒温器 97 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min,10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h,1 $\times$ TBST 清洗 5 min $\times$ 3 次,一抗 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜: Nrf-2 (1:800)、Sirt-1 (1:600)、Runx-2 (1:800)、OPN (1:800)、Caspase-3 (1:600)、GAPDH (1:10 000),1 $\times$ TBST 清洗 5 min $\times$ 3 次,HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体 (1:10 000)、HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体 (1:10 000) 室温摇床孵育 1 h,1 $\times$ TBST 清洗 5 min $\times$ 3 次,电化学发光(ECL)液(美国 Millipore)显色,ImageQuant LAS4000 mini 成像系统(美国通用电气)采集图像。

7. 活性氧自由基(ROS)的测定: 对数期生长的 RASMCs 按  $5\times 10^3$  个细胞/孔密度种植于黑色避光的 96 孔细胞培养板中,每组设置 5 个复孔,孵育过夜后 5  $\mu$ mol/L SFN 预处理 5 h 后继续培养 12 h、24 h、48 h 后按照活性氧试剂说明书处理后将细胞放置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 15 min,用无血清 DMEM 培养基洗涤细胞 1 min $\times$ 3 次后,荧光酶标仪检测荧光值。

8. 共聚焦显微镜: 制作细胞爬片,5  $\mu$ mol/L SFN 预处理 5 h 后继续培养 72 h,以正常培养基作为对照组,收集细胞后 PBS 清洗 3 min $\times$ 2 次,滴加 100 nmol/L Mito-tracker Red FM (美国 Life Technologies) 染液,37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 45 min, PBS 清洗 3 min $\times$ 3 次,滴加 DAPI 染细胞核,细胞培养箱中孵育 15 min, PBS 清洗 3 min $\times$ 3 次,吸干细胞爬片上的液体后采用 Fluoromount Aqueous Mounting Medium (美国 Sigma) 封片,共聚焦显微镜观察和采集图像。

### 三、统计方法

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,数据使用单因素方差分析, $P < 0.05$  视为差异有统计学意义。

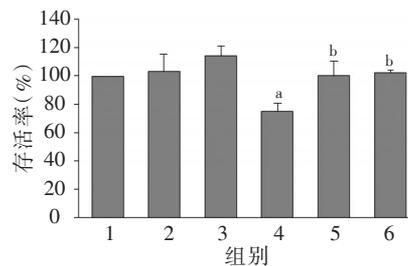
## 结 果

1. SFN 增强钙化细胞的存活率: 1  $\mu$ mol/L、5  $\mu$ mol/L SFN 预处理细胞 5 h 后继续培养 72 h,钙化组细胞存活率降至  $(75.37\pm 5.13)\%$ ,钙化+1  $\mu$ mol/L SFN 组、钙化+5  $\mu$ mol/L SFN 组细胞存活率分别提升至  $(100.84\pm 10.21)\%$ 、 $(102.81\pm 1.26)\%$ 。见图 1。

2. SFN 减少钙化细胞中 ROS 的含量及线粒体的损伤: 活性氧检测时荧光强度代表 ROS 的含量,同时 Mito-tracker 染色检测细胞线粒体损伤,线粒体受损越严重其荧光强度越弱。与钙化组  $(1.29\pm 0.03)$  比较,5  $\mu$ mol/L SFN 预处理细胞 5 h 分别继续钙化培养 12 h、24 h 和 48 h,细胞内 ROS 的含量分别降至  $1.04\pm 0.02$ 、 $0.94\pm 0.03$ 、 $0.86\pm 0.15$ 。此外,与正常对照组比较,钙化组增加细胞线粒体损伤,而钙化+5  $\mu$ mol/L SFN 组细胞线粒体损伤减轻,见图 2。

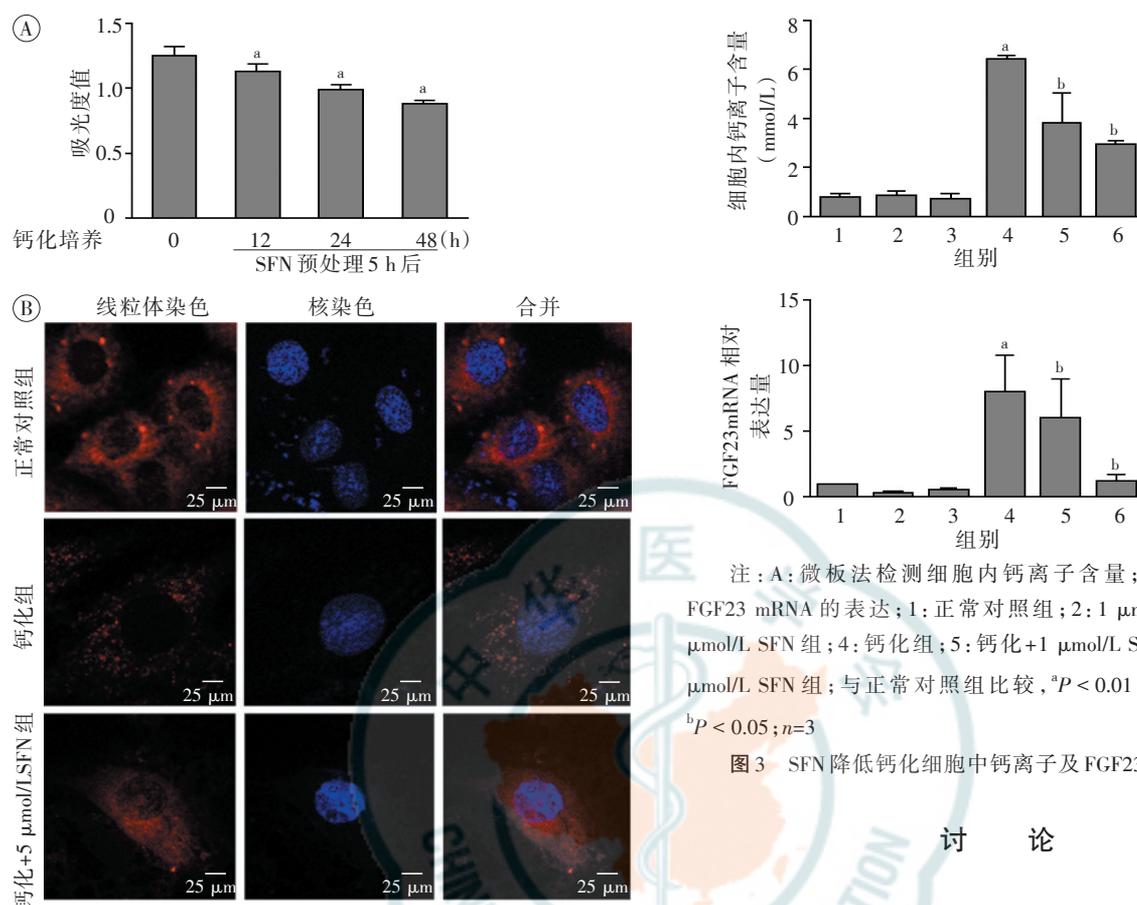
3. SFN 降低钙化细胞中钙离子含量及 FGF23 mRNA 的表达: 与正常对照组  $(0.85\pm 0.13)$  mmol/L 比较,钙化组细胞内钙离子含量  $(6.43\pm 0.15)$  mmol/L 增加,同时钙化组细胞内 FGF23 mRNA 的表达增加,而钙化+1  $\mu$ mol/L SFN、钙化+5  $\mu$ mol/L SFN 组细胞内钙离子含量分别减弱至  $(3.86\pm 1.18)$  mmol/L、 $(2.96\pm 0.08)$  mmol/L,同时细胞内 FGF23 mRNA 的表达减弱,见图 3。

4. SFN 降低钙化细胞中钙盐沉积及 OPN、Runx-2 蛋白表达,增加 Nrf-2、Sirt-1 的蛋白表达: 与正常对照组比较,钙化组细胞内钙盐沉积及



注: 1: 正常对照组; 2: 1  $\mu$ mol/L SFN 组; 3: 5  $\mu$ mol/L SFN 组; 4: 钙化组; 5: 钙化+1  $\mu$ mol/L SFN 组; 6: 钙化+5  $\mu$ mol/L SFN 组; 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与钙化组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ;  $n=3$

图 1 SFN 增强钙化细胞的存活 (MTT 法)



注: A: 微板法检测细胞内钙离子含量; B: RT-PCR 检测 FGF23 mRNA 的表达; 1: 正常对照组; 2: 1 μmol/L SFN 组; 3: 5 μmol/L SFN 组; 4: 钙化组; 5: 钙化+1 μmol/L SFN 组; 6: 钙化+5 μmol/L SFN 组; 与正常对照组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.01; 与钙化组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05; *n* = 3

图 3 SFN 降低钙化细胞中钙离子及 FGF23 mRNA 水平

## 讨 论

氧化应激是引起慢性肾病血管钙化的诱因之一,而 ROS 作为氧化应激的主要介质可来自线粒体<sup>[14]</sup>。研究表明高磷诱导线粒体产生氧化应激,可诱导血管平滑肌细胞向成骨样细胞转化<sup>[15]</sup>。因此在本研究中我们根据 Byon 等<sup>[13]</sup>的研究,使用钙化培养基孵育 RASMCs,采用 Mito-tracker Red FM 观察细胞线粒体损伤情况。与正常对照组比较,我们发现钙化引起细胞线粒体损伤,同时增强细胞内 ROS 的产生,其作用呈时间依赖性。

因 Paloian 等<sup>[18]</sup>发现高磷诱导血管钙化可增加细胞内钙盐沉积,在研究中我们检测了细胞内钙盐沉积及钙离子含量。我们发现钙化组促进细胞内钙盐沉积、增加细胞内钙离子含量,而 SFN 减弱钙化细胞内钙盐沉积、降低钙化细胞内钙离子含量。FGF23 作为成纤维细胞生长因子家族中一员,是重要的骨分泌激素,可通过肾脏等器官调控血清中磷的含量。我们发现细胞培养 72 h,钙化组细胞内的 FGF23 mRNA 升高,而 SFN 预处理细胞却能降低钙化组细胞内 FGF23 mRNA 的表达,这与既往 Paloian 等<sup>[18]</sup>的研究结果一致。

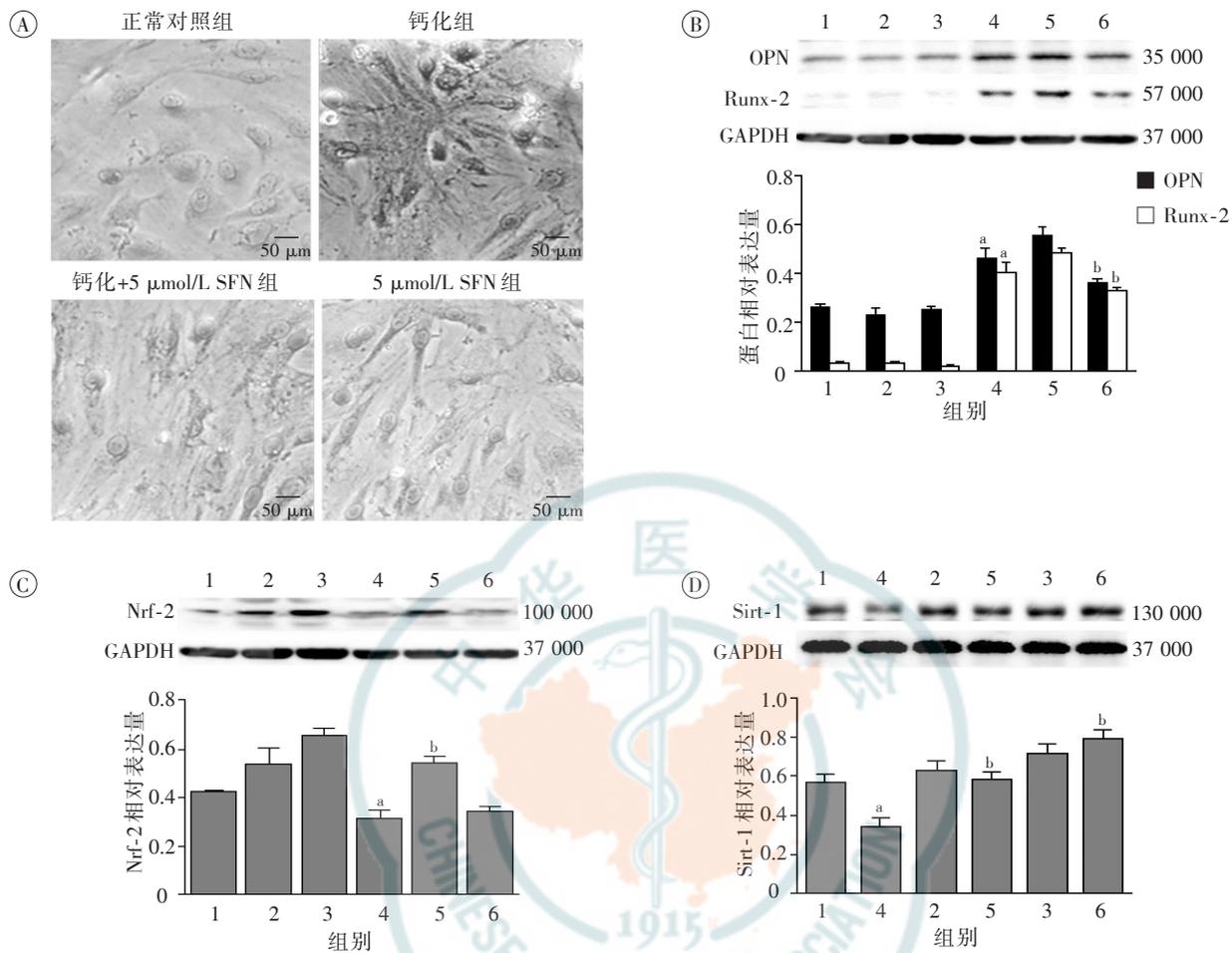
有研究发现 SFN 能够抑制氧化应激引起的肾脏损伤<sup>[19]</sup>,但其作用机制尚不清楚。成骨细胞转

注: A: 活性氧检测 ROS 的产生,与正常对照组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; *n* = 3; B: 共聚焦显微镜检测线粒体的损伤

图 2 SFN 减少钙化细胞中 ROS 的产生及线粒体损伤

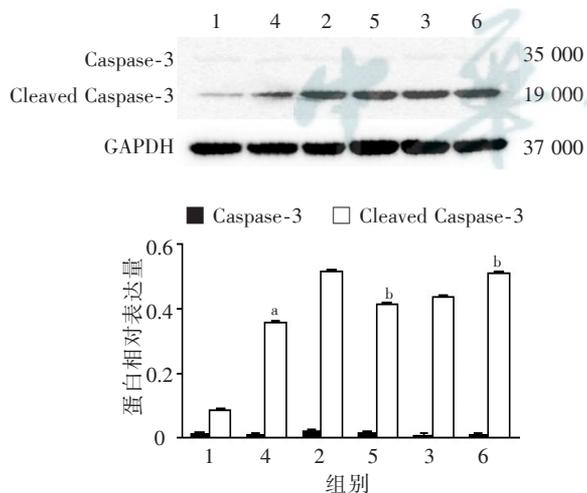
OPN、Runx-2 的蛋白表达增加(均 *P* < 0.01);与钙化组比较,钙化+5 μmol/L SFN 组细胞内钙盐沉积减少,OPN、Runx-2 的蛋白表达下降(均 *P* < 0.05)。与正常对照组比较,钙化组细胞内 Nrf-2 的总蛋白表达减弱(*P* < 0.01);与钙化组比较,钙化+1 μmol/L SFN 组细胞内 Nrf-2 的总蛋白表达增强(*P* < 0.05),但并未见到 5 μmol/L SFN 增强细胞内 Nrf-2 的总蛋白表达。与正常对照组比较,钙化组 Sirt-1 的蛋白表达减弱(*P* < 0.01);与钙化组比较,钙化+1 μmol/L SFN 组、钙化+5 μmol/L 组 Sirt-1 的蛋白表达均增加(均 *P* < 0.05)。见图 4。

5. SFN 增加钙化细胞内 Cleaved Caspase-3 的蛋白表达:与正常对照组比较,钙化组增强 Cleaved Caspase-3 的蛋白表达(*P* < 0.01);与钙化组比较,钙化+1 μmol/L SFN 组、钙化+5 μmol/L 组 Cleaved Caspase-3 的蛋白表达均增加(均 *P* < 0.05)。见图 5。



注: A: Von kossa 染色检测细胞内钙盐沉积; B: OPN、Runx-2 蛋白相对表达量(Western 印迹); C: Nrf-2 蛋白相对表达量(Western 印迹); D: Sirt-1 及蛋白相对表达量(Western 印迹); 1: 正常对照组; 2: 1 μmol/L SFN 组; 3: 5 μmol/L SFN 组; 4: 钙化组; 5: 钙化+1 μmol/L SFN 组; 6: 钙化+5 μmol/L SFN 组; 与正常对照组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.01; 与钙化组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05; *n*=3

图 4 SFN 对 Nrf-2、Sirt-1、OPN、Runx-2 的蛋白表达及钙化细胞中钙盐沉积的影响



注: 1: 正常对照组; 2: 1 μmol/L SFN 组; 3: 5 μmol/L SFN 组; 4: 钙化组; 5: 钙化+1 μmol/L SFN 组; 6: 钙化+5 μmol/L SFN 组; 与正常对照组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.01; 与钙化组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05; *n*=3

图 5 SFN 上调钙化细胞中 Cleaved Caspase-3 的蛋白表达(Western 印迹)

分化的特异转录因子 Runx2 被认为是血管钙化的启动标志, 有研究发现细胞外高磷可通过上调 Runx2 的表达而诱导血管钙化。Byon 等<sup>[13]</sup>研究发现氧化应激可通过 AKT 信号通路调节 Runx2, 进而诱导血管钙化<sup>[16]</sup>。Li 等<sup>[17]</sup>也发现氧化应激可增强 OPN、Runx2 的表达诱导 RASMCs 向成骨样细胞转化。Sirt-1 作为一种长寿蛋白, 其可抑制氧化应激引起的细胞凋亡而增强细胞的生存能力<sup>[20]</sup>。已有研究发现 SFN 能够上调 Sirt-1 的表达逆转高磷诱导的血管钙化<sup>[11-12]</sup>。还有研究显示 Nrf-2 在氧化应激下可通过 Nrf-2/AREs 通路增强下游 HO-1、NQO-1 等抗氧化剂的表达, 清除氧自由基, 抵抗氧化损伤<sup>[21-22]</sup>。基于上述研究, 我们使用 1 μmol/L 或 5 μmol/L SFN 预处理细胞后继续钙化培养 72 h, 并检测 Sirt-1、Nrf-2、OPN、Runx2 的蛋白表达。与钙化组比较, SFN 能上调 Sirt-1 的蛋白表达, 减弱

钙化细胞中 OPN、Runx2 的蛋白表达,从而改善高磷诱导的血管平滑肌细胞钙化。同时我们还观察到低剂量(1  $\mu\text{mol/L}$ )的 SFN 能在钙化培养后增加血管平滑肌细胞内总 Nrf-2 的表达水平,但并未观察到稍高剂量(5  $\mu\text{mol/L}$ )SFN 能在钙化后进一步增强细胞内 Nrf-2 的总蛋白表达。这提示钙化培养以后, SFN 激动 Nrf-2 总蛋白表达的作用可能没有剂量依赖关系。但由于 Nrf-2 是一种核转录因子,当 Nrf-2 激活时会发生核质穿梭,入核修饰后的 Nrf-2 才能继续诱发下游基因活化并产生相应的效应<sup>[23]</sup>,而我们目前的研究仅限于研究 Nrf-2 的总蛋白。我们下一步将研究 SFN 对钙化培养的血管平滑肌细胞中 Nrf-2 核质穿梭的影响,并进一步验证 SFN 是否参与调控 Nrf-2 的核质穿梭和蛋白质修饰。

因凋亡参与血管钙化的发生,我们发现 SFN 增强钙化细胞中 Cleaved Caspase-3 的表达,这与 Zhang 等<sup>[24]</sup>的研究结果一致。

虽然通过 $\beta$ -甘油磷酸处理大鼠血管平滑肌细胞模拟尿毒症高磷状态引起血管钙化,我们发现 SFN 可调控 Nrf-2、Sirt-1 水平并有效改善由 ROS 引起的氧化应激损伤,但证明 SFN 这一重要作用仍需要进一步的体内研究。

目前临床上使用的多种抗氧化剂如维生素 C、E 等,因其自身结构使其预防心血管事件的临床试验失败<sup>[25-26]</sup>,而我们发现来自天然食物中的 SFN 可通过调控内源性的 Nrf-2 和 Sirt-1 水平发挥抗氧化作用,抵抗血管钙化,这为血管钙化的防治提供了新的策略。

#### 参 考 文 献

- [1] Kiuchi MG, Mion D Jr. Chronic kidney disease and risk factors responsible for sudden cardiac death: a whiff of hope? [J]. *Kidney Res Clin Pract*, 2016, 35(1): 3-9. DOI: 10.1016/j.krep.2015.11.003.
- [2] Nitta K, Akiba T, Uchida K, et al. Left ventricular hypertrophy is associated with arterial stiffness and vascular calcification in hemodialysis patients[J]. *Hypertens Res*, 2004, 27(1): 47-52.
- [3] Valdivielso JM. [Vascular calcification: types and mechanisms] [J]. *Nefrologia*, 2011, 31(2): 142-147. DOI: 10.3265/Nefrologia.pre2010.Nov.10754.
- [4] Bees G, Zarjou A, Agarwal A, et al. Pharmacological induction of ferritin prevents osteoblastic transformation of smooth muscle cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(2): 217-230. DOI: 10.1111/jcmm.12682.
- [5] Bartnicki P, Fijałkowski P, Majczyk M, et al. Effect of methoxy polyethylene glycol - epoetin beta on oxidative stress in predialysis patients with chronic kidney disease[J]. *Med Sci Monit*, 2013, 19: 954-959. DOI: 10.12659/MSM.884024.
- [6] Xing HY, Cai YQ, Wang XF, et al. The cytoprotective effect of hyperoside against oxidative stress is mediated by the Nrf2-ARE signaling pathway through GSK-3 $\beta$  inactivation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145183. DOI: 10.1371/journal.pone.0145183.
- [7] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47: 89-116. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046.
- [8] Shin DH, Park HM, Jung KA, et al. The NRF2 - heme oxygenase - 1 system modulates cyclosporin A - induced epithelial - mesenchymal transition and renal fibrosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(8): 1051 - 1063. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.021.
- [9] Rizzo B, Maltese G, Paraskevi MP, et al. Induction of antioxidant genes by sulforaphane and klotho in human aortic smooth muscle cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 75 Suppl 1: S14-S15. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.588.
- [10] Jiang T, Tian F, Zheng H, et al. Nrf2 suppresses lupus nephritis through inhibition of oxidative injury and the NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory response[J]. *Kidney Int*, 2014, 85(2): 333-343. DOI: 10.1038/ki.2013.343.
- [11] Li YP, Wang SL, Liu B, et al. Sulforaphane prevents rat cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury in vitro via activating SIRT1 and subsequently inhibiting ER stress[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(3): 344 - 353. DOI: 10.1038/aps.2015.130.
- [12] Takemura A, Iijima K, Ota H, et al. Sirtuin 1 retards hyperphosphatemia - induced calcification of vascular smooth muscle cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(9): 2054-2062. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.216739.
- [13] Byon CH, Javed A, Dai Q, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(22): 15319-15327. DOI: 10.1074/jbc.M800021200.
- [14] El AM, Angulo J, Rodríguez - Mañas L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 380-401. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.003.
- [15] 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]. *Kidney Int*, 2011, 79(10): 1071 - 1079. DOI: 10.1038/ki.2011.18.
- [16] Steitz SA, Speer MY, Curinga G, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers[J]. *Circ Res*, 2001, 89(12): 1147-1154.

- [17] Li X, Wu G, Shang P, et al. Anti-nephrolithic potential of catechin in melamine-related urolithiasis via the inhibition of ROS, apoptosis, phospho-p38, and osteopontin in male Sprague-Dawley rats[J]. *Free Radic Res*, 2015, 49(10): 1249 - 1258. DOI: 10.3109/10715762.2015.1061187.
- [18] Paloian NJ, Leaf EM, Giachelli CM. Osteopontin protects against high phosphate-induced nephrocalcinosis and vascular calcification[J]. *Kidney Int*, 2016, 89(5): 1027 - 1036. DOI: 10.1016/j.kint.2015.12.046.
- [19] Zheng H, Whitman SA, Wu W, et al. Therapeutic potential of Nrf2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2011, 60(11): 3055 - 3066. DOI: 10.2337/db11-0807.
- [20] Saunders LR, Verdin E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging[J]. *Oncogene*, 2007, 26(37): 5489-5504. DOI: 10.1038/sj.onc.1210616.
- [21] Pan H, He M, Liu R, et al. Sulforaphane protects rodent retinas against ischemia-reperfusion injury through the activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114186. DOI: 10.1371/journal.pone.0114186.
- [22] Myzak MC, Dashwood RH. Chemoprotection by sulforaphane: keep one eye beyond Keap1[J]. *Cancer Lett*, 2006, 233(2): 208-218. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.02.033.
- [23] Hayashi R, Takeuchi N, Ueda T. Nuclear Respiratory Factor 2 $\beta$  (NRF-2 $\beta$ ) recruits NRF-2 $\alpha$  to the nucleus by binding to importin -  $\alpha$ : $\beta$  via an unusual monopartite-type nuclear localization signal[J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(18): 3536 - 3548. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.07.007.
- [24] Zhang Z, Li C, Shang L, et al. Sulforaphane induces apoptosis and inhibits invasion in U251MG glioblastoma cells[J]. *Springerplus*, 2016, 5: 235. DOI: 10.1186/s40064-016-1910-5.
- [25] Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2002, 360(9326): 23-33. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)09328-5.
- [26] Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, et al. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(3): 154 - 160. DOI: 10.1056/NEJM200001203420302.

(收稿日期: 2017-08-06)

(本文编辑: 王欣)

· 读者·作者·编者 ·

## 中华医学会杂志社关于论文二次发表的声明

某些由政府机构和专业组织制定的指南以及作者以其他语言发表的科研成果等,需要让更多的读者了解。根据国际惯例(参考《向生物医学期刊投稿的统一要求》)和我国的实际情况,凡符合下列条件并提供相应材料,中华医学会系列杂志允许或接受论文用同一种语言或另一种语言的二次发表。

1. 作者须征得相关期刊的同意,首次发表论文的期刊和准备二次发表的期刊均无异议。作者需向二次发表的期刊提供首次发表该文期刊的同意书,论文首次发表的时间和论文复印件、单行本或原稿。

2. 尊重首次发表的权益,二次发表至少在首次发表1周之后。

3. 二次发表的论文应面向不同的读者,建议节选或摘要刊登。

4. 二次发表的论文须完全忠实原文,真实反映原有的资料及观点,作者的顺序不能改动。

5. 在二次发表的题名中应标出是某篇文章的二次发表(全文、节选、全译或节译)。

6. 在二次发表的题名页脚注中,要让读者、同行和文献检索机构知道该文已经全文或部分发表过,并标引首次发表的文献。如:“本文首次发表在《中华内科杂志》,2006, 45(1): 21-24”,英文为“This article is based on a study first reported in the *Chin J Intern Med*, 2006, 45 (1): 21-24”。

7. 美国国立医学图书馆不提倡对翻译文章二次发表,如果文章首次发表在 Medline 收录的杂志中,将不再标引翻译文章。

中华医学会杂志社