

·基础研究·

## 柚皮素通过诱导血红素加氧酶-1的表达抑制氧化应激和血管钙化

周芹<sup>1</sup>, 宋艳<sup>2</sup>, 李金河<sup>3</sup>, 梁青春<sup>3</sup>

(1. 中山大学附属第一医院麻醉科, 广东广州 510080; 2. 中山大学附属第一医院病理科, 广东广州 510080; 3. 南方医科大学第三附属医院麻醉科, 广东广州 510630)

**摘要:**【目的】研究柚皮素对血管钙化发生的作用及氧化应激机制。【方法】采用不同浓度的柚皮素(5、10、20 μmol/L)处理大鼠血管平滑肌细胞和血管环,研究柚皮素对高磷高钙诱导的血管平滑肌细胞和血管环钙化程度的影响。用茜素红染色法测定细胞和血管环钙化的程度,荧光探针 DHE 检测活性氧(ROS)水平,qPCR 和 western blot 检测血红素加氧酶-1(HO-1)的表达水平。采用 HO-1 抑制剂 ZnPP9 处理血管平滑肌细胞,研究抑制 HO-1 对平滑肌细胞钙化的影响。【结果】柚皮素能明显减轻高磷高钙诱导的血管平滑肌细胞和血管环钙化。此外,柚皮素可明显上调 HO-1 的表达水平,降低 ROS 的水平;ZnPP9 能阻断柚皮素对血管平滑肌细胞钙化的抑制作用。【结论】柚皮素可通过上调 HO-1 的表达水平,降低 ROS 的水平和抑制高磷高钙诱导的血管钙化。

**关键词:**血管钙化;血管平滑肌细胞;慢性肾脏病;柚皮素;血红素加氧酶-1

**中图分类号:**R543 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2021)04-0528-07

**DOI:**10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2021.0407

## Naringenin Inhibits Oxidative Stress and Vascular Calcification by Up-regulating Heme Oxygenase-1 Expression

ZHOU Qin<sup>1</sup>, SONG Yan<sup>2</sup>, LI Jin-he<sup>3</sup>, LIANG Qing-chun<sup>3</sup>

(1. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Anesthesiology, The Third Affiliated Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510630, China)

Correspondence to: LIANG Qing-chun; E-mail: 1906968820@qq.com

**Abstract:**【Objective】To investigate the role of naringenin (NRG) in oxidative stress and vascular calcification and to find out the underlying mechanisms.【Methods】Different concentrations of NRG (5, 10, 20 μmol/L) was used to treat rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) and vascular rings with high calcium and phosphate-induced calcification. The calcification degree was evaluated by alizarin red staining. Reactive oxygen species (ROS) levels were assessed by dihydroethidium (DHE) fluorescence staining. Heme oxygenase-1 (HO-1) expression was determined by qPCR and western blot. We used HO-1 inhibitor ZnPP9 to treat rat VSMCs and confirmed the effect of HO-1 on calcification of VSMCs.【Results】NRG significantly ameliorated high calcium and phosphate-induced calcification of rat VSMCs and vascular rings in association with up-regulation of HO-1 expression and down-regulation of ROS levels. ZnPP9 blocked the inhibitory effect of NRG on VSMC calcification.【Conclusion】NRG inhibits oxidative stress and high calcium and phosphate-induced vascular calcification by up-regulating HO-1 expression.

**Key words:** vascular calcification; vascular smooth muscle cells (VSMCs); chronic kidney disease; naringenin (NRG); heme oxygenase-1(HO-1)

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2021, 42(4): 528-534]

收稿日期:2021-03-22

基金项目:广东省科技计划项目(2017ZC0089)

作者简介:周芹,主治医师,E-mail:jasminezhouqin@126.com;梁青春,通信作者,副主任医师,E-mail:1906968820@qq.com

血管钙化(vascular calcification)是常见的慢性肾脏病血管病变,其发病机制十分复杂。传统观点认为血管钙化仅仅是钙磷矿物质被动沉积于血管壁的过程。但是,越来越多的研究报道:在血管钙化过程中,大量的骨相关蛋白表达上调,改变基因的表达水平可影响血管钙化的发展<sup>[1-3]</sup>,说明血管钙化是可调控的,治疗血管钙化成为可能。氧化应激是导致慢性肾脏病血管钙化的关键因素<sup>[4-5]</sup>,抑制氧化应激可成为干预血管钙化的有效策略。血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)是抑制氧化应激的关键酶,目前临床上尚无诱导HO-1表达的药物用来干预血管钙化。柚皮素(Naringenin, NRG)是一种天然的黄酮类化合物,具有清除自由基和抗氧化的作用<sup>[6]</sup>。研究报道柚皮素可抑制血管平滑肌细胞增殖和血管内膜增生<sup>[7-8]</sup>,然而柚皮素对高磷高钙诱导的血管钙化是否有效尚不清楚。在本研究中,我们采用血管平滑肌细胞和血管环钙化模型,研究NRG对高磷高钙诱导的血管钙化的作用,并阐明HO-1介导NRG抑制血管钙化的机制,为慢性肾脏病血管钙化的防治提供新的策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

细胞培养基DMEM、胎牛血清(FBS)、TRIzol、BCA蛋白定量试剂盒购自Thermo Fisher Scientific公司;NRG、茜素红、 $\beta$ -甘油磷酸、活性氧试剂盒购自Sigma公司;钙检测试剂盒购自北京雷根生物公司;逆转录反应试剂盒、SYBR green试剂盒购自TaKaRa公司;Western blot超敏发光液购自Millipore公司。

### 1.2 细胞培养和药物处理

参考文献<sup>[9-10]</sup>的方法,从雄性SD大鼠(南方医科大学动物中心,许可证号:SCXK(粤)2011-0015)的胸主动脉分离血管平滑肌细胞。使用含10% FBS的DMEM培养基处理大鼠血管平滑肌细胞,代细胞长满后传代。钙化培养基(10 mmol/L的 $\beta$ -甘油磷酸+3 mmol/L的CaCl<sub>2</sub>)处理血管平滑肌细胞7 d诱导细胞钙化,普通生长培养基处理的细胞作为阴性对照。为了研究NRG对细胞钙化的影响,在高磷高钙的条件下,用不同浓度的NRG(5、10、20  $\mu$ mol/L)处理血管平滑肌细胞7 d。动物的使用已获中山大学附属第一医院动物伦理委员会的批准。

### 1.3 血管环组织培养和药物处理

分离主动脉血管环<sup>[11]</sup>,使用1%戊巴比妥钠麻醉处死雄性SD大鼠,暴露和分离胸主动脉,用眼科剪将其剪成5 mm左右长的血管环,加入钙化培养基,药物处理组血管环加入不同浓度的NRG(5、10、20  $\mu$ mol/L)7 d后,收集血管标本检测钙化程度。

### 1.4 检测细胞钙化

参考文献<sup>[11-12]</sup>,采用茜素红染色法检测血管平滑肌细胞和血管环钙化。将培养皿从细胞培养箱中取出,放置室温下,去除培养基,用PBS溶液洗3次,加入40 g/L的多聚甲醛,固定细胞10 min,然后用去离子水洗培养皿,加入2%茜素红(pH 4.2)溶液孵育5 min,加入去离子水洗去背景色,倒置显微镜下拍摄细胞。加入1 mL甲酸液体,充分混匀后液体变成黄色,用多功能酶标仪在波长为405 nm处检测吸光值。

### 1.5 检测血管环钙化

血管环茜素红染色:用40 g/L的多聚甲醛固定动脉环,使用梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡浸泡血管环,包埋好血管环制成血管石蜡块,将其切成5  $\mu$ m厚的组织切片,然后脱蜡水化,把切片组织浸泡在2%茜素红溶液中孵育5 min,去除多余染色液,用中性树胶封片保存,在倒置显微镜下观察并拍照。

### 1.6 检测钙离子浓度

采用比色法检测钙离子浓度,参考钙检测试剂盒说明书,先用预冷PBS清洗细胞和血管组织,加入蛋白裂解液处理,然后低温离心(3 000  $\times$ g, 4  $^{\circ}$ C, 3 min),将上清样品转移至1.5 mL离心管中,将2.5  $\mu$ L的待测样品和钙标准品加入96孔板中,配制钙离子显色工作液,每孔各加入200  $\mu$ L显色液,室温避光静置孵育10 min,使用多功能酶标仪检测在610 nm处的吸光值。

### 1.7 活性氧水平检测

采用活性氧检测试剂盒检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平,去除培养基,用PBS溶液洗3次,洗细胞后加入荧光染料二氢乙啶(dihydroethidium, DHE),37  $^{\circ}$ C避光孵育30 min,然后用PBS清洗细胞,荧光显微镜下拍照。

### 1.8 荧光定量qPCR

将细胞培养基吸取丢弃,加入1 mL RNA提取试剂TRIzol,参照试剂公司说明提取血管平滑肌细胞总RNA。取1  $\mu$ g mRNA,加入Takara PrimeScript

RT试剂,将mRNA逆转录为cDNA,配制20  $\mu\text{L}$  PCR反应体系:2 $\times$ SYBR premix (10  $\mu\text{L}$ ),50 $\times$  ROX Reference Dye II (0.4  $\mu\text{L}$ ),Primer mix (0.4  $\mu\text{L}$ ),cDNA (1  $\mu\text{L}$ ),ddH<sub>2</sub>O (8.2  $\mu\text{L}$ ),将PCR反应物混匀随后放入Real Time PCR仪上,进行荧光定量PCR反应:95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性15 min,95  $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s和60  $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸1 min(40次循环)。所用的引物信息如下: $\beta$ -actin (forward): TGTCACCAACTGGGACGATA,  $\beta$ -actin (reverse): GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA; HO-1 (forward): TTCAGAAGGGTCAGGTGTCC, HO-1 (reverse): CTGTGTGGCTGCTGTGTAAG。采用 $\beta$ -actin为内参基因,2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup> 的方法计算目的基因mRNA的相对量表达水平。

### 1.9 Western blot

加入蛋白裂解液提取血管平滑肌细胞总蛋白,BCA试剂盒检测蛋白质的浓度。蛋白样品100  $^{\circ}\text{C}$ 加热10 min后蛋白质充分变性。每孔上样20  $\mu\text{g}$ 蛋白样品,采用8% SDS-PAGE胶进行电泳分离蛋白,然后将蛋白电转移至PVDF膜,TBST洗膜3次,加入5%脱脂奶粉封闭液在室温下孵育1 h。加入一抗HMOX-1抗体(Proteintech,1:1 000)室温孵育1 h,TBST洗膜3次,然后加入二抗室温孵育1 h,TBST洗膜3次,加入超敏发光液ECL试剂,将膜放入LAS 500发光成像仪内曝光显影。

### 1.10 统计学分析

所有的计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,采用SPSS软件分析数据,两组以上均值比较采用单因素方差分析(One way-ANOVA)检验,两两比较采用Turkey法。当 $P<0.05$ 时被认为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 NRG抑制大鼠血管平滑肌细胞钙化

我们采用含高磷高钙的钙化培养基(calcifying medium, CM)诱导大鼠血管平滑肌细胞钙化。为研究NRG对高磷高钙诱导的血管平滑肌细胞钙化的作用,在CM的条件下,不同浓度的NRG(5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )处理大鼠血管平滑肌细胞7 d。茜红素染色结果显示:普通培养基(Growth medium, GM)处理的细胞未见钙化沉积,CM组的血管平滑肌细胞钙化明显增强(图1A);使用不同浓度的NRG(5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )后,大鼠血管平滑肌细胞钙化程度减轻(图1A),其中以浓度为20  $\mu\text{mol/L}$ 的NRG

效果最为明显。定量分析茜红素染色结果显示(方差分析的 $F=178.183, P=0.0003$ ):与GM组比较,CM组的细胞钙化明显增强(图1B,  $P=0.00002$ );与CM组比较,NRG处理组的细胞钙化程度明显减轻(图1B,  $P<0.001$ )。另外,不同浓度的NRG(5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )都能降低细胞钙离子浓度(图1C,  $P<0.001$ ),20  $\mu\text{mol/L}$ 的NRG效果最好。这些结果说明NRG可以浓度依赖性地抑制高磷高钙诱导的血管平滑肌细胞钙化,且浓度为20  $\mu\text{mol/L}$ 的NRG抑制血管钙化的作用最为明显。

五组定量分析茜红素染色结果比较,经单因素方差分析,五组间差异有统计学意义( $F=178.183, P=0.0003$ );采用Turkey法进一步作两两比较,发现CM组与GM组比较,差异有统计学意义( $P=0.00002$ ),NRG(5  $\mu\text{mol/L}$ )组与CM组比较,差异有统计学意义( $P=0.00016$ ),NRG(10  $\mu\text{mol/L}$ )组与CM组比较,差异有统计学意义( $P=0.00037$ ),NRG(20  $\mu\text{mol/L}$ )组与CM组比较,差异有统计学意义( $P=0.00083$ )。

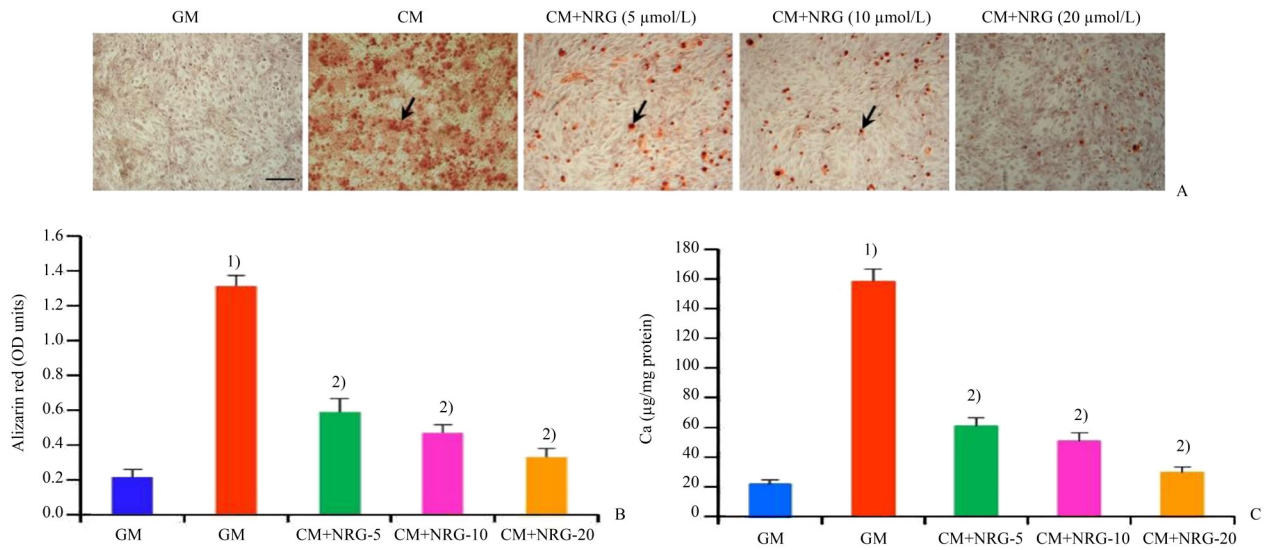
### 2.2 NRG抑制大鼠血管环钙化

为进一步研究NRG对血管钙化的作用,我们采用不同浓度的NRG(5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )处理血管环7 d。染色结果和定量分析显示(方差分析的 $F=267.048, P=0.00004$ ):与GM组比较,CM组的血管环钙化程度明显加重( $P<0.001$ ;图2A、B);与CM组比较,NRG处理组的血管环钙化程度明显减弱( $P<0.001$ ;图2A、B)。另外,我们发现:NRG可显著降低血管组织钙离子浓度( $P<0.001$ ;图2C)。

五组定量分析茜红素染色结果比较,经单因素方差分析,五组间差异有统计学意义( $F=267.048, P=0.00004$ );采用Turkey法进一步作两两比较,发现CM组与GM组比较,差异有统计学意义( $P=0.00037$ ),NRG(5  $\mu\text{mol/L}$ )组与CM组比较,差异有统计学意义( $P=0.00032$ ),NRG(10  $\mu\text{mol/L}$ )组与CM组比较,差异有统计学意义( $P=0.00017$ ),NRG(20  $\mu\text{mol/L}$ )组与CM组比较,差异有统计学意义( $P=0.00044$ )。

### 2.3 NRG抑制血管平滑肌细胞氧化应激

由于NRG具有清除自由基和抗氧化的作用,因此我们研究了NRG对血管平滑肌细胞氧化应激的影响。结果显示(方差分析的 $F=29.89, P=0.0001$ ):CM处理可升高血管平滑肌细胞ROS水平,而使用NRG可明显降低ROS水平(图3A、B),说明NRG可



A: Mineral deposition was assessed by alizarin red staining. B: Alizarin red staining was quantified. C: Calcium concentration was measured. Compared with GM, 1)  $P < 0.001$ ; Compared with CM, 2)  $P < 0.001$ . Scale bar=500  $\mu\text{m}$ .  $n=3$ .

图1 NRG对高磷高钙诱导的大鼠血管平滑肌细胞钙化的影响

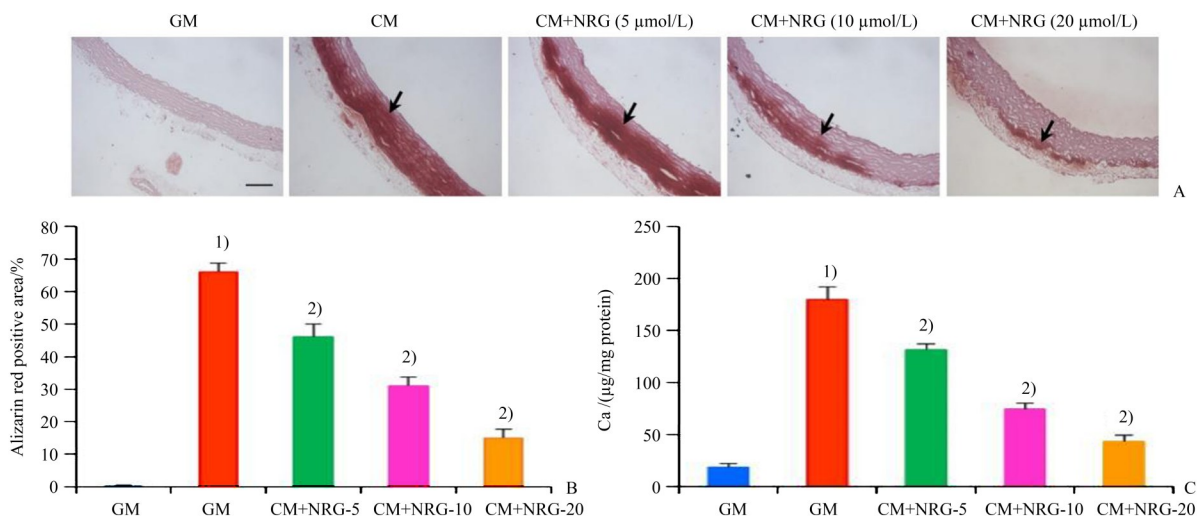
Fig. 1 Effect of NRG on high phosphate/calcium-induced calcification of rat VSMCs

减轻血管平滑肌细胞氧化应激。

四组定量分析茜素红染色结果比较,经单因素方差分析,四组间差异有统计学意义( $F=29.89, P=0.0001$ );采用Turkey法进一步作两两比较,发现CM组与GM组比较,差异有统计学意义( $P=0.00094$ ),NRG(10  $\mu\text{mol/L}$ )组与CM组比较,差异有统计学意义( $P=0.012$ ),NRG(20  $\mu\text{mol/L}$ )组与CM组比较,差异有统计学意义( $P=0.0005$ )。

#### 2.4 NRG上调血管平滑肌细胞HO-1的表达水平

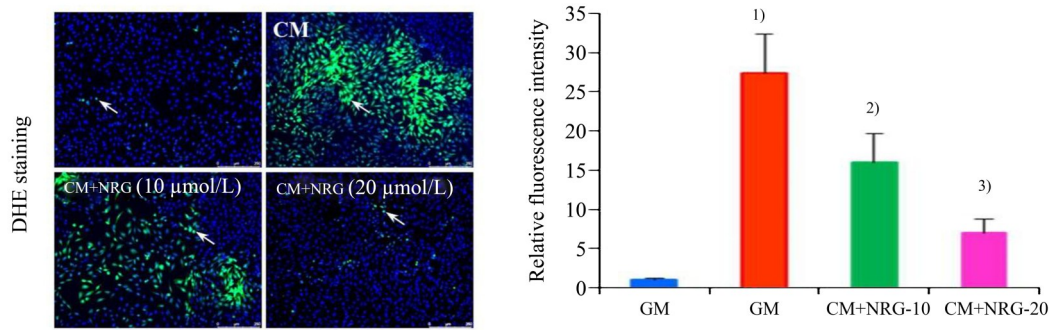
HO-1是抑制氧化应激的关键酶,我们研究了NRG对血管平滑肌细胞HO-1表达水平的影响。qPCR结果显示( $F=248.488, P=0.00002$ )NRG(20  $\mu\text{mol/L}$ )能明显增加血管平滑肌细胞HO-1 mRNA的表达水平( $P < 0.001$ ;图4A);Western blot结果也显示NRG能明显上调血管平滑肌细胞HO-1蛋白的表达水平( $P < 0.001$ ;图4B)。



A: Mineral deposition was assessed by alizarin red staining. B: Alizarin red staining was quantified. C: Calcium concentration was measured. Compared with GM, 1)  $P < 0.001$ ; Compared with CM, 2)  $P < 0.001$ . Scale bar=250  $\mu\text{m}$ .  $n=3$ .

图2 NRG对高磷高钙诱导的大鼠血管环钙化的影响

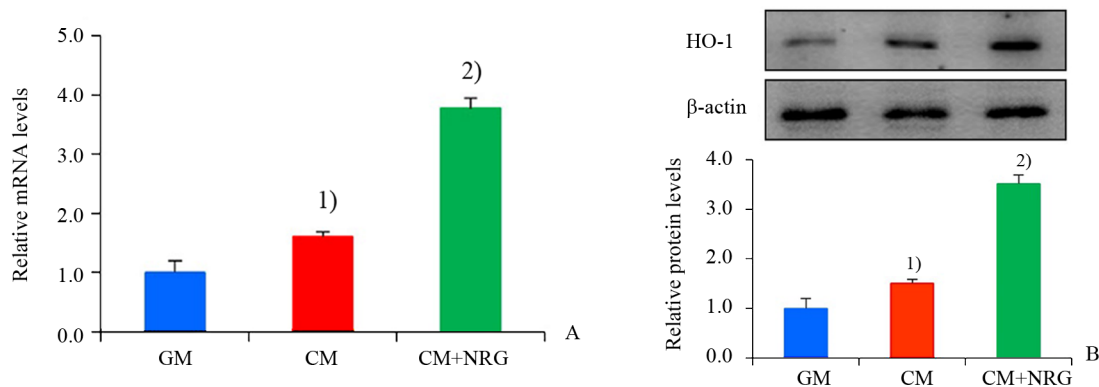
Fig. 2 Effect of NRG on high phosphate/calcium-induced calcification of rat aortic rings



A: ROS was detected by DHE staining,  $\times 100$ . B: ROS levels was quantified. Compared with GM, 1)  $P < 0.001$ ; Compared with CM, 2)  $P < 0.05$ , 3)  $P < 0.001$ .  $n = 3$ .

图3 柚皮素对高磷高钙诱导的大鼠血管平滑肌细胞氧化应激的影响

Fig. 3 Effect of NRG on high phosphate/calcium-induced oxidative stress in rat VSMCs



A: HO-1 mRNA expression was analyzed by qPCR. B: HO-1 protein expression was analyzed by western blot. Compared with GM, 1)  $P < 0.05$ ; Compared with CM, 2)  $P < 0.001$ .  $n = 3$ .

图4 NRG对大鼠血管平滑肌细胞HO-1表达水平的影响

Fig. 4 Effect of NRG on HO-1 expression in rat VSMCs

三组HO-1 mRNA结果比较,经单因素方差分析,3组间差异有统计学意义( $F=248.488$ ,  $P=0.00002$ );采用Turkey法进一步作两两比较,发现CM组与GM组比较,差异有统计学意义( $P=0.009$ ),CM+NRG组与CM组比较,差异有统计学意义( $P=0.0008$ )。

### 2.5 抑制HO-1阻断NRG对血管平滑肌细胞钙化的抑制作用

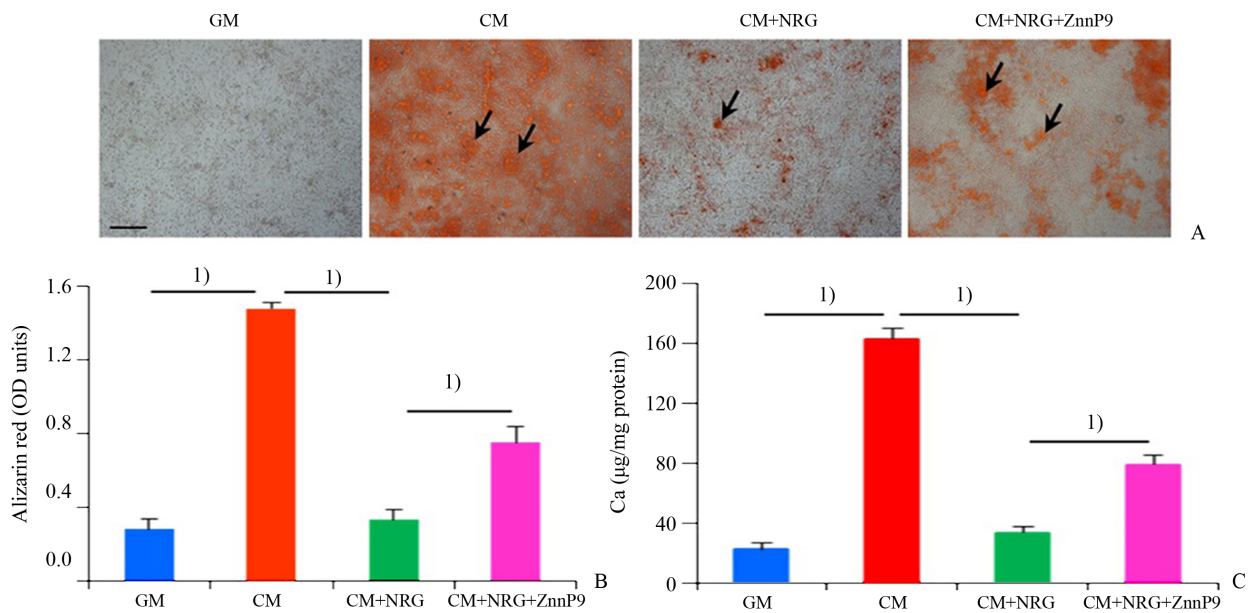
为了研究HO-1是否参与了NRG抑制血管平滑肌细胞钙化的过程,我们观察了HO-1抑制剂ZnPP9对NRG抑制血管平滑肌细胞钙化的影响。结果显示( $F=241.933$ ,  $P=0.00003$ ):与CM组比较,NRG( $20 \mu\text{mol/L}$ )处理的细胞钙化明显减轻,加入ZnPP9( $10^{-7} \text{mol/L}$ )能明显阻断NRG对血管平滑肌细胞钙化的抑制作用(图5A、B);另外,钙定量分析显示:ZnPP9能对抗NRG降低细胞钙离子浓度的作

用效应(图5C)。

四组定量分析茜素红染色结果比较,经单因素方差分析,四组间差异有统计学意义( $F=241.933$ ,  $P=0.00003$ );采用Turkey法进一步作两两比较,发现CM组与GM组比较,差异有统计学意义( $P=0.00049$ ),CM+NRG组与CM组比较,差异有统计学意义( $P=0.00069$ ),CM+NRG+ZnPP9组与CM+NRG组比较,差异有统计学意义( $P=0.00002$ )。

## 3 讨论

慢性肾脏病血管钙化临床上尚无有效的治疗方法,阐明血管钙化的分子调控机制,寻找其干预靶点具有极其重要的临床价值。在本研究中,我们采用平滑肌细胞和血管环钙化模型,研究NRG对血管钙化的作用。结果显示:不同浓度的NRG(5、



A: Mineral deposition was assessed by alizarin red staining. B: Alizarin red staining was quantified. C: Calcium concentration was measured. 1)  $P < 0.001$ .  $n=3$ .

图5 HO-1抑制剂ZnPP9对大鼠平滑肌细胞钙化的影响

Fig. 5 Effect of HO-1 inhibitor ZnPP9 on calcification of rat VSMCs

10、20  $\mu\text{mol/L}$ )均可明显减轻高磷高钙诱导的大鼠血管平滑肌细胞和血管环钙化。由于我们在研究NRG对血管钙化的作用时,采用了多个浓度NRG(5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )处理细胞和血管环,其中以NRG(20  $\mu\text{mol/L}$ )对血管钙化的作用效果最佳。因此,在后续研究NRG对HO-1 mRNA和蛋白的表达水平的影响时,采用了20  $\mu\text{mol/L}$ 的NRG处理细胞。NRG降低细胞ROS的水平,上调HO-1的表达水平,而抑制HO-1可阻断NRG减轻血管平滑肌细胞钙化的作用效应。这些结果提示:NRG可通过诱导HO-1的表达抑制氧化应激和血管钙化。

氧化应激的增强是许多血管钙化相关疾病如慢性肾脏病、高血压、糖尿病等的共同特征。慢性肾脏病血管钙化的病理机制十分复杂,氧化应激是导致慢性肾脏病血管钙化的重要发病机制<sup>[5]</sup>。在慢性肾脏病血管钙化发展过程中,主动脉氧化应激程度明显增加,而抑制氧化应激可改善动脉钙化<sup>[13]</sup>。高磷水平能诱导ROS的产生和血管钙化,抗

氧化剂能明显抑制氧化应激,延缓血管钙化的发展<sup>[14]</sup>。本研究表明:高磷高钙可刺激血管平滑肌细胞ROS的水平升高,促进平滑肌细胞钙化。使用NRG后可明显降低ROS的水平,抑制血管平滑肌细胞和血管环钙化。另外,既往研究表明:NRG可通过促进HO-1的表达发挥其抗氧化,抗细胞损伤等生物学作用<sup>[15-16]</sup>。我们的研究也发现:NRG可增加血管平滑肌细胞HO-1的表达水平,抑制血管钙化;而采用HO-1抑制剂后,NRG抑制平滑肌细胞钙化的作用明显减弱了。这些结果首次证实:NRG可通过调控HO-1抑制血管钙化。

综上所述,在钙磷代谢失调的条件下,氧化应激可诱导血管钙化。NRG可上调HO-1的表达水平,抑制氧化应激和血管细胞钙化。调节HO-1的表达水平可成为干预血管钙化的新策略,我们将采用动物实验进一步验证NRG通过调控HO-1的表达抑制慢性肾脏病血管钙化,为NRG治疗血管钙化提供实验依据。

## 参考文献

- [1] Zhang X, Li Y, Yang P, et al. Trimethylamine-n-oxide promotes vascular calcification through activation of NLRP3 (Nucleotide-binding domain, Leucine-rich-containing family, Pyrin domain-containing-3) inflammasome and NF- $\kappa$ B (Nuclear factor  $\kappa$ B) signals [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40 (3) : 751-765.
- [2] Li Z, Wu J, Zhang X, et al. CDC42 promotes vascular calcification in chronic kidney disease [J]. *J Pathol*, 2019, 249(4):461-471.
- [3] Gao C, Fu Y, Li Y, et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1-derived PGE2 inhibits vascular smooth muscle cell calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(1):108-121.
- [4] Yamada S, Taniguchi M, Tokumoto M, et al. The antioxidant tempol ameliorates arterial medial calcification in uremic rats: important role of oxidative stress in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(2):474-485.
- [5] Huang M, Zheng L, Xu H, et al. Oxidative stress contributes to vascular calcification in patients with chronic kidney disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 138: 256-268.
- [6] Zaidun NH, Thent ZC, Latiff AA. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin [J]. *Life Sci*, 2018, 208:111-122.
- [7] Xu C, Chen J, Zhang J, et al. Naringenin inhibits angiotensin II-induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration and decreases neointimal hyperplasia in balloon injured rat carotid arteries through suppressing oxidative stress [J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(10):1549-1555.
- [8] Cayci C, Wahlquist TC, Seckin SI, et al. Naringenin inhibits neointimal hyperplasia following arterial reconstruction with interpositional vein graft [J]. *Ann Plast Surg*, 2010, 64(1):105-113.
- [9] Dong Q, Chen Y, Liu W, et al. 25-Hydroxycholesterol promotes vascular calcification via activation of endoplasmic reticulum stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 880:173165.
- [10] Hou M, Song Y, Li Z, et al. Curcumin attenuates osteogenic differentiation and calcification of rat vascular smooth muscle cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 420(1-2):151-160.
- [11] Kong Y, Liang Q, Chen Y, et al. Hyaluronan negatively regulates vascular calcification involving BMP2 signaling [J]. *Lab Invest*, 2018, 98(10):1320-1332.
- [12] 梁青春, 宋艳, 陈燕亭, 等. 中性鞘磷脂酶2/神经酰胺调节高磷高钙诱导的血管平滑肌细胞成骨样分化和钙化 [J]. *中山大学学报(医学版)*, 2018, 39(3):329-334.
- Liang QC, Song Y, Chen YT, et al. nSMase2/ceramide regulates high calcium and phosphate-induced osteogenic differentiation and calcification of vascular smooth muscle cells [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2018, 39(3):329-334.
- [13] Yamada S, Taniguchi M, Tokumoto M, et al. The antioxidant tempol ameliorates arterial medial calcification in uremic rats: important role of oxidative stress in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(2): 474-485.
- [14] Chen Y, Zhao X, Wu H. Arterial stiffness: A focus on vascular calcification and its link to bone mineralization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(5):1078-1093.
- [15] Abdel-Magied N, Shedid SM. The effect of naringenin on the role of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like2 (Nrf2) and haem oxygenase 1 (HO-1) in reducing the risk of oxidative stress-related radiotoxicity in the spleen of rats [J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(7):788-795.
- [16] Jin Y, Wang H. Naringenin inhibits the hydrogen peroxide-induced SH-SY5Y cells injury through Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Neurotox Res*, 2019, 36(4): 796-805.

(编辑 孙慧兰)