

综述



黄辉, 中山大学附属第八医院副院长、高血压科主任, 博士研究生导师, 国家优秀青年科学基金获得者, 教育部霍英东高校优秀青年教师、广东省杰出青年医学人才。在血管钙化发生机制和临床转化方面取得国际创新性成果, 主持国家自然科学基金项目 9 项, 近五年以通讯作者在 *Circulation*、*J Clin Invest*、*Hypertension*、*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 等发表论著 30 余篇, 受邀撰写综述和专栏约稿 13 篇, 入选多个期刊封面故事。申请国家发明专利 5 项 (授权 1 项), 获软件著作权授权 1 项。

硫化氢在血管钙化中作用及机制的研究进展

马建帅¹, 陈洁², 黄辉^{1,*}

¹中山大学附属第八医院心内科, 深圳 518033; ²中山大学孙逸仙纪念医院放射肿瘤科, 广州 510000

摘要: 血管钙化(vascular calcification, VC)在糖尿病、慢性肾脏病、及心血管疾病等患者中是一种常见的病理过程, 表现为羟基磷灰石在血管壁上沉积。硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是继NO和CO之后在哺乳动物中发现的第三种气体信号分子, 它在心血管系统中具有抗炎、抗氧化应激等作用。近年来, 人们已经认识到H₂S具有抗VC的作用, 补充H₂S及其供体可以减轻VC。本文综述了H₂S对VC起保护作用的多种证据, 并强调了在VC发展过程中H₂S代谢改变, 及H₂S对VC病理生理改变的调控机制。

关键词: 血管钙化; 硫化氢; 代谢

Role and mechanism of hydrogen sulfide in vascular calcification

MA Jian-Shuai¹, CHEN Jie², HUANG Hui^{1,*}

¹Department of Cardiology, The Eighth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518033, China; ²Department of Radiation Oncology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, China

Abstract: Vascular calcification is a common pathological process in patients with diabetes, chronic kidney disease, and cardiovascular disease, manifested by the deposition of hydroxyapatite on the walls of blood vessels. Hydrogen sulfide is the third gas signal molecule found in mammals after nitric oxide and carbon monoxide, which has anti-inflammatory, antioxidant stress and other effects in the cardiovascular system. In recent years, it has been recognized that hydrogen sulfide has an anti-vascular calcification effect, and

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2020YFC2004405), the National Natural Science Foundation of China (No. 8201101103, 81870506, 91849208, 81670676, and 81422011), Project of Traditional Chinese Medicine in Guangdong Province (No. 20201062), Basic Research Project of Shenzhen Science and Technology Innovation Committee (No. JCYJ20180306174648342 and JCYJ20190808102005602), Shenzhen Futian District Public Health Research Project (No. FTWS2019003), and the Shenzhen Key Medical Discipline Construction Fund (No. SZXK002) to HUANG Hui. This work was also supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82073408) to CHEN Jie.

*Corresponding author. E-mail: huanghui765@hotmail.com

supplementation with hydrogen sulfide and its donors can alleviate vascular calcification. In this review, we discussed the various evidence of the protective effect of hydrogen sulfide on vascular calcification, and highlighted the hydrogen sulfide metabolism changes and the potential regulatory mechanisms of hydrogen sulfide on the pathophysiological changes in vascular calcification.

Key words: vascular calcification; hydrogen sulfide; metabolism

1 引言

血管钙化 (vascular calcification, VC) 在糖尿病、慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD)、及心血管疾病等患者中是一种常见的病理过程, 它的出现增加了原发疾病患者的住院率和死亡率^[1, 2]。VC 的发生、发展与多种因素相关, 例如: 年龄, 吸烟, 高血压等, 这些危险因素同样也会加重原发疾病进展^[3]。既往我们认为 VC 是一种类似于衰老的、被动的、退行性的过程。然而, 近年来的研究发现, VC 类似于骨发育代谢和软骨形成, 是一个主动的、多因素参与的、可调控的生物学过程^[4]。

血管的不同部位均可发生钙化, 包括内膜、中膜和瓣膜。主动脉瓣钙化开始于瓣膜深部, 之后从主动脉尖沿着主动脉的表面进入主动脉窦, 而影响瓣膜的开合。主动脉瓣钙化最终引起瓣叶变形、开闭功能异常而导致左室流出道严重梗阻, 易诱发心功能不全、血栓及心内膜炎等, 是心血管事件的独立危险因素^[5]。中膜钙化多累及大中型肌性动脉, 如股动脉、胸主动脉、腹主动脉等, 常常发生于无炎症细胞浸润和脂质沉积的环境中。中膜钙化影响动脉的顺应性, 使动脉僵硬度增加, 动脉的脉搏速度增加, 使收缩压和脉压升高, 因此增加了心脏的做功, 长此以往, 导致心肌肥厚, 甚至心力衰竭^[1, 6]。内膜钙化是指发生于粥样斑块内的羟基磷酸钙沉积, 多累及大动脉或冠状动脉。常常伴随细胞坏死、炎症和脂质的沉积, 多发生在动脉粥样硬化性疾病, 如冠心病。沉积在内膜的羟基磷酸钙可以改变动脉粥样硬化斑块的稳定性, 内膜钙化的部位和大小与心肌梗死发生密切相关^[7–9]。

VC 的病理生理机制是复杂的, 大量研究表明其涉及了炎症、氧化应激、细胞凋亡、自噬、基质降解等方面^[10]。因此目前尚无有效措施来防止 VC 的发生, 延缓 VC 的进展。硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S) 是继 NO 和 CO 之后在哺乳动物中发现的第三种气体信号分子, 它在心血管生理和病理条件下发挥的作用日益被我们了解^[11]。在过去的十年里, H₂S 已经被证明是由一系列组织合成的, 它作为一

个具有独特生理和生化效应的信号分子, 在生理和病理生理条件下发挥作用。

2 H₂S 合成代谢与分解代谢

几个世纪以来, H₂S 一直被认为是一种有毒的环境污染物, 对我们健康不利。在过去的十余年中, H₂S 被证明可以在体内多种组织中生成^[12]。作为一种具有独特生理和生化效应的信号分子, H₂S 在心血管、神经元、免疫、肾脏、呼吸、胃肠道、生殖和内分泌系统中都发挥着重要作用^[13]。哺乳动物细胞可以通过酶促或非酶促反应产生 H₂S (图 1)。大多数 H₂S 是由酶促反应生成, 与之相关的酶在严格调控下产生内源性 H₂S, 并有一定的组织特异性。

2.1 H₂S 的合成途径: 酶促反应

2.1.1 胱硫氨酸β-合成酶(cystathionine β-synthase, CBS)

CBS 是神经系统中 H₂S 的主要合成酶, 除了在海马、小脑、大脑表达之外, 还在肝脏、肾脏、子宫动脉、肠系膜动脉和颈动脉体中表达^[14–16]。CBS 通过 β-消除反应催化底物半胱氨酸生成产物 H₂S 和丝氨酸 (反应式: 半胱氨酸 + H₂O → 丝氨酸 + H₂S), 或通过 α、β-消除反应催化胱氨酸生成过硫半胱氨酸, 再生成 H₂S (反应式: 半胱氨酸 → 过硫半胱氨酸 + 丙酮酸 + NH₃ → H₂S); CBS 也可以通过 β-置换反应催化缩合两个半胱氨酸分子 (反应式: 半胱氨酸 + 半胱氨酸 → 羊毛硫氨酸 + H₂S) 或 γ-置换反应催化同型半胱氨酸和半胱氨酸反应生成 H₂S (反应式: 半胱氨酸 + 同型半胱氨酸 → 胱硫醚 + H₂S)^[17]。在人类中, CBS 通过 β-置换反应产生 H₂S 比通过 β-消除反应更加活跃^[18]。

2.1.2 半胱硫氨酸γ-裂解酶(cystathionine γ-lyase, CSE)

CSE 主要表达于心血管系统, 此外在肝脏、肾脏、胰腺、回肠、子宫和胎盘组织中 CSE 也有表达^[16, 19]。CSE 除了像 CBS 那样完成相同的消除反应和置换反应外, 还可以通过 α-消除反应直接生成 H₂S^[17]。另外 CSE 可以单独以同型半胱氨酸为

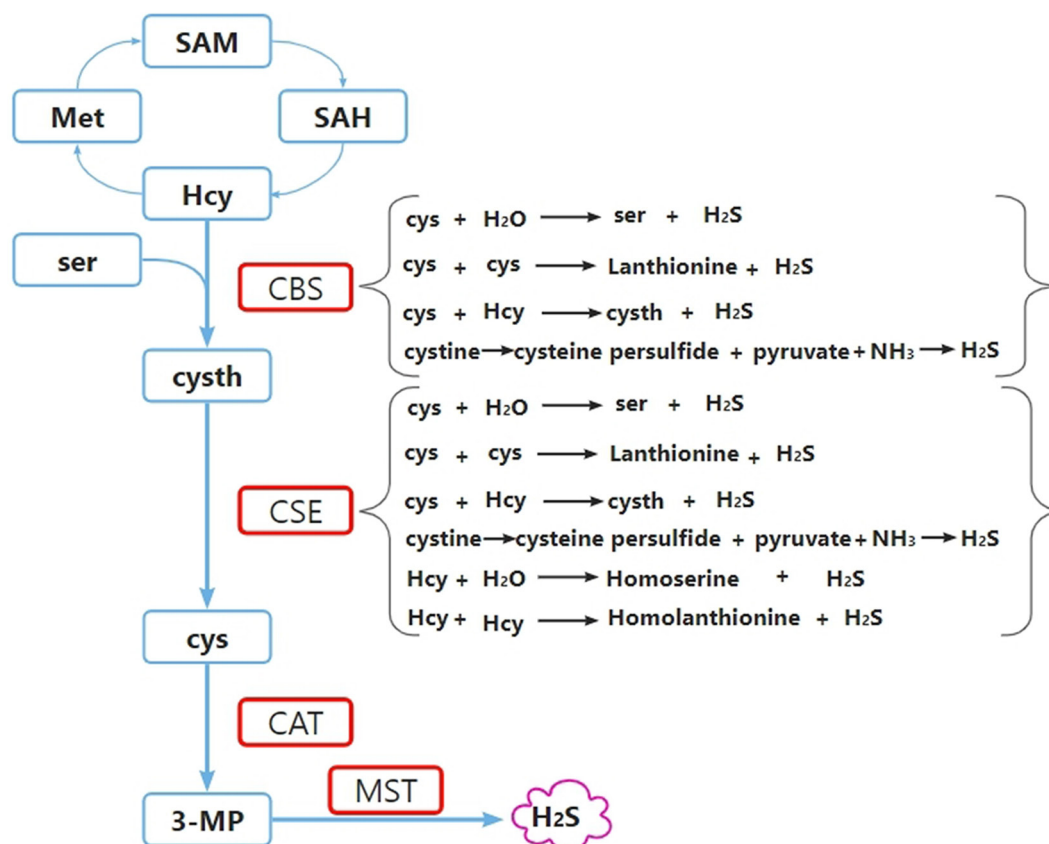


图 1. 硫化氢在哺乳动物中的生物合成途径

Fig. 1. Hydrogen sulfide (H₂S) biosynthetic pathways in mammals. Met is converted by methionine adenosyltransferase to SAM, which is used by methyltransferases in methylation reactions, generating SAH. SAH hydrolase then converts SAH into Hcy, which can either be converted back to Met through the remethylation cycle, or enter the transsulfuration branch. CBS converts Hcy and ser into cysth, which is taken up by CSE to generate Cys. H₂S is synthesized by CBS and CSE in several alternative reactions (in parentheses). Cys is converted by CAT into 3-MP, which is used by MST to synthesize H₂S. Met: methionine; SAM: S-adenosyl methionine; SAH: S-adenosylhomocysteine; Hcy: homocysteine; ser: serine; cysth: cystathionine; cys: cysteine; 3-MP: 3-mercaptopyruvate; CBS: cystathionine β-synthase; CSE: cystathionine γ-lyase; CAT: cysteine aminotransferase; MST: 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase.

底物，通过 α、γ 消除 (反应式：同型半胱氨酸 + H₂O → 高丝氨酸 + H₂S → α-酮丁酸盐 + NH₃) 或 γ 置换 (反应式：同型半胱氨酸 + 同型半胱氨酸 → 高羊毛氨酸 + H₂S) 生成 H₂S^[20]。

2.1.3 半胱氨酸转氨酶(cysteine aminotransferase, CAT)和3-巯基丙酮酸硫转移酶(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, MST)

MST 主要存在于线粒体内，最多表达于肾脏，其次是肝脏和心脏。MST 除了表达于心肌细胞、肝细胞、近端肾小管上皮细胞外，还在一些内分泌细胞中表达，如睾丸中的精管细胞和睾丸间质细胞胰腺中的胰岛和导管上皮细胞；肾上腺髓质和皮质细胞(束状带)^[21]。MST 与 CAT 共同作用生成 H₂S。

首先，CAT 催化 α-酮戊二酸和半胱氨酸生成 3-巯基丙酮酸和谷氨酸 (反应式：半胱氨酸 + α-酮戊二酸 → 3-巯基丙酮酸 + 谷氨酸)。其次，MST 与其 3-巯基丙酮酸底物之间的相互作用在 Cys248 处产生酶结合的半胱氨酸过硫化物中间体，并伴随着丙酮酸的释放 (反应式：3-巯基丙酮酸 + MST → MST 过硫化物中间体 + 丙酮酸)。最后，内源性还原剂硫氧还蛋白和二氢硫辛酸与 MST 过硫化物中间体结合产生 H₂S (反应式：MST 过硫化物中间体 + 还原硫氧还蛋白 → MST + 氧化硫氧还蛋白 + H₂S)^[22]。

2.2 H₂S 的合成途径：非酶促反应

非酶促反应途径合成 H₂S 只占 H₂S 生成的一小部分，主要包括膳食来源及胃肠道的细菌来源。

H₂S 和含硫的微量气体是在蛋白质发酵过程中由硫酸还原细菌产生的, 这些细菌可以还原硫酸盐和亚硫酸盐生成 H₂S^[23]。

2.3 H₂S 的分解途径

哺乳动物在维持体内 H₂S 的生理平衡时, 形成了 4 种途径进行分解代谢。(1) 氧化途径: H₂S 分解代谢的主要途径发生在线粒体中, 经氧化还原酶、S- 双加氧酶和 S- 转移酶氧化修饰将 H₂S 转化成硫代硫酸盐, 之后由氧化硫转移酶催化进一步转化为亚硫酸盐, 最终亚硫酸盐氧化酶在肝、肾中将亚硫酸盐氧化成硫酸盐而经尿排出^[24]; (2) 甲基化途径: 在细胞质中, H₂S 通过硫醇 S- 甲基转移酶催化的甲基化反应产生甲硫醇和二甲硫醚^[24]; (3) 清除途径: H₂S 与高铁血红蛋白结合生成含硫血红蛋白而被降解^[24]; (4) 排泄途径: 少量 H₂S 以气体形式由呼气排出^[25]。

3 H₂S 水平在 VC 的改变

H₂S 的水平在生成与代谢之间维持着动态平衡, 酶促反应相关的酶在其中发挥了最重要的作用。与正常大鼠相比, VC 大鼠血浆和主动脉 H₂S 含量分别降低 39% 和 57%, 主动脉 CSE 活性和 mRNA 水平降低 53% 和 76%, 并伴有收缩压、钙含量、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性及骨桥蛋白 mRNA 水平显著升高^[26]。与之相同的是, Wang 等发现糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 大鼠主动脉明显钙化, 并且动脉壁的 CSE 蛋白表达以及活性显著降低, 补充 NaHS 恢复 DN 大鼠 CSE 活性及其表达, 抑制平滑肌细胞成骨分化^[27]。然而, 另一项研究表明 5 期 CKD 患者血浆中 H₂S 浓度降低, 而血液透析则进一步降低了 H₂S 水平。但是 5 期 CKD 患者和对照组的 CSE mRNA 和蛋白表达没有统计学差异, 而通过胱硫氨酸消耗评估 CSE 酶活性却发现在两组之间存在差异, 表明晚期 CKD 患者 H₂S 减少是由于 CSE 活性降低所致, 而非 CSE 的表达水平^[28]。一项瓣膜钙化的研究表明, 与主动脉瓣关闭不全的瓣膜组织相比, 主动脉瓣狭窄伴钙化瓣膜组织中 H₂S 的生成减少, 但是其 CSE 的表达升高, 表明 CSE 活性和 / 或 H₂S 生物利用度的失衡可能会加剧瓣膜间质细胞 (valvular interstitial cells, VIC) 矿化的进程^[29]。总之, VC 发生时, H₂S 水平降低。但关于 H₂S 的降低原因及 CSE 的表达水平仍需要进一步实验证实。

4 H₂S 抑制 VC 形成的潜能

在不同 H₂S 的供体或是不同的 VC 诱导剂条件下, 众多研究均表明补充外源性 H₂S 能够缓解 VC 的发生和发展^[26–34], 并且在抑制体内 CBS/CSE 时, 可以通过减少内源性 H₂S 的水平加重 VC 的严重程度^[28, 29, 33]。

高磷是诱导 VC 发生的有效刺激物, Zawaczki 等在培养基中加入 H₂S 可以缓解高磷诱导血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 发生 VC, 并以剂量响应的方式抑制钙沉积、ALP 活性、骨钙素 (osteocalcin, OC) 表达及核心结合因子 α -1 的水平^[28]。Sikura 等在无机磷酸盐和氯化钙诱导 VIC 钙化模型中, 分别加入硫化物盐 (如 NaHS) 和新型的缓释硫化物供体 (如 AP72), 发现两种类型的供体均以剂量依赖性的方式降低钙的积累, 以及 OC 和 ALP 表达增加。其中 AP72 发挥效应的浓度最低为 20 μ mol/L^[29]。同样, 在离体条件下高磷刺激 *ApoE*^{-/-} 小鼠瓣膜组织中, 予以 AP72 处理可以明显减弱高磷所导致的钙化^[30]。

维生素 D₃ 和尼古丁处理弹性动脉发生钙化被认为是与人的年龄相关的血管病理的动脉钙化模型^[35]。Wu 等分别给予尼古丁诱导钙化大鼠 2.8 mol/kg NaHS (低剂量组) 和 14 mol/kg NaHS (高剂量组), 发现给予 NaHS 明显降低 VC 大鼠的血压 (NaHS 低、高剂量组分别降低 38% 和 30%)、钙含量 (NaHS 低、高剂量组分别降低 35% 和 84%)、ALP 活性 (NaHS 低、高剂量组分别降低 63% 和 46%) 及骨桥蛋白 mRNA 水平 (NaHS 低、高剂量组分别降低 74% 和 86%)^[26]。Yang 等在尼古丁钙化模型中加入 NaHS (56 μ mol/kg) 后, 不仅发现主动脉组织 ALP 活性和钙含量降低, 并且 VSMCs 成骨表型相关蛋白骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 和 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2) 蛋白水平较对照组下降, 表明 NaHS 可抑制 VSMCs 出现成骨转分化^[31]。

钙蛋白颗粒 (calcioprotein particles, CPPs) 是磷酸钙与血浆蛋白形成的复合物, 根据在血液中的存在形式分为原生 CPPs 和次生 CPPs, 原生 CPPs 是含无定形磷酸钙的球形纳米团聚体, 次级 CPPs 则是含结晶磷酸钙的梭形纳米团聚体^[36]。次级 CPPs 通过氧化应激和促炎作用诱导 VSMCs 钙化^[37–39], Aghagolzadeh 等用次生 CPPs 诱导 VSMCs 发生钙

化, 但当同时给予浓度为 100 mmol/L NaHS 时, 细胞钙沉积得到明显改善, 并且随着 NaHS 浓度的增加, 其缓解钙化的作用也越明显。但是当给予 NAHS 的浓度超过 300 mmol/L 时则会产生细胞毒性, 1 000 mmol/L NaHS 明显降低细胞活性^[32]。因此他们认为预防钙化效果最大, 同时细胞毒性最小的 NaHS 浓度为 300 mmol/L。

VC 同样常见于糖尿病患者, 高血糖与高磷一样可以使 VSMCs 发生成骨转分化^[40]。Zhou 等发现添加 NaHS (100 μ mol/L) 可以缓解高糖诱导的钙化改变, 如 ALP 升高, 钙沉积明显增多, 并且还可维持 VSMCs 收缩表型、抑制 VSMCs 成骨转分化^[33]。DN 是糖尿病患者主要并发症之一, 补充 H₂S 可以通过调节 DN 管周毛细血管的血流改善小管间质微循环^[19]。Wang 等^[27]进一步证明了 H₂S 可以预防 DN 动物模型 VC 的发生。应用 NaHS (每天 50 μ mol/kg) 8 周可显著减轻单次注射链脲佐菌素和含 0.75% 腺嘌呤的高脂饮食诱导的 DN 大鼠钙化, 降低主动脉钙磷含量、ALP 活性和钙沉积。此外 H₂S 还降低 DN 大鼠的血糖、肌酐和尿素氮水平^[27]。Sikura 等在高脂饮食诱导 *ApoE*^{-/-} 小鼠注射 AP72 (266 μ mol/kg) 可以缓解出现的主动脉瓣钙化结节以及细胞外基质的扩张, 从而维持了主动脉瓣 VIC 的表型, 此外还发现在钙化条件下单纯沉默 CSE 没有显著增加钙的积累, 这是因为内源性硫化物的产生通过 CBS 的表达得以补充。只有在 VIC 中同时沉默 CSE 和 CBS 后矿化才明显增加^[29]。

5 H₂S 缓解 VC 的作用机制

5.1 H₂S 抑制了磷的吸收

矿物质代谢异常被认为是 VC 重要的危险因素之一, 细胞外高磷已被广泛证实可诱导 VC 的发生^[41, 42], 这一过程主要依赖高磷环境增加成骨转录因子 Runx2 表达, 转录因子可进一步促进成骨和软骨生成蛋白 (如 OC、ALP 等) 介导的 VSMCs 成骨表型转变^[43]。Zavaczki 等发现 H₂S 以剂量响应的方式抑制了磷的吸收, 缓解钙沉积和 VSMCs 的成骨转分化, 分别在 50 mmol/L 和 100 mmol/L H₂S 浓度下呈现了显著和完全的抑制^[28]。高磷环境的形成依赖于钠依赖性磷酸盐共转运蛋白 (sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1) 的活性, Pit-1 活性增加有助于细胞对磷的摄取, 从而促进高磷环境的形成及 VC 的发生^[44]。在钙化培养基中观察到加入

H₂S 可以阻止 Pit-1 表达的增加^[28]。类似的, 与在对照培养基中培养的细胞相比, 在钙化培养基中培养的 VIC 细胞内磷水平显著升高, 给予 AP72 后可降低细胞内磷水平, 但是没有观察到 Pit-1 通道表达水平的显著改变^[29]。这些不同的实验结果可能与受试的细胞种类不同或翻译后修饰有关, 需要进一步实验去验证。

5.2 H₂S 诱导破骨细胞分化

目前认为 VC 的发生基础是收缩表型 VSMCs 转分化为可以发生钙沉积的成骨细胞表型的 VSMCs, 而由造血系的单核细胞前体分化而来的破骨细胞样细胞可以溶解矿化沉积^[45]。成骨样 VSMCs 能够抑制单核细胞 / 巨噬细胞体外分化成破骨细胞, 因此来自钙化动脉粥样硬化病变的成骨细胞样细胞增多, 破骨细胞样细胞的数量相对较少, 而这种不平衡有利于血管壁病理钙化过程的发生^[46]。破骨细胞分化因子核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) 对破骨细胞的生存和功能是必要和充分的, 经 RANKL 处理的单核 / 巨噬细胞可以分化为成熟的破骨细胞, 而缺乏 RANKL 表现功能性的破骨细胞减少^[47]。Kurabayashi 等在 RAW264.7 细胞中加入 100 ng/mL RANKL 诱导破骨细胞分化, 然后通过蛋白质组学技术及液相色谱串联质谱分析确定了一种新的破骨细胞调节因子 CSE^[48]。然后使用抑制剂减少 CSE 的表达及活性, 发现破骨细胞标记物的水平和破骨细胞的功能显著降低。此外, 加入 H₂S 供体 GYY4137 促进了 RANKL 诱导的破骨细胞分化, 并增加了破骨细胞的数量和功能, 表明 CSE 可能通过其产物 H₂S 调节破骨细胞的形成^[48]。因此 CSE/H₂S 参与调控破骨细胞分化, 并为平衡成骨样细胞与破骨细胞的数量提供可能, 可作为预防和治疗 VC 的新靶点。

5.3 H₂S 缓解内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)

内质网是细胞内最大的细胞器。任何干扰内质网功能的刺激 (如缺氧、营养缺乏、钙稳态紊乱等) 都可能导致未折叠或错误折叠的蛋白质在内质网中积累, 使内质网失去正常生理功能, 引发细胞一系列适应性调节反应, 导致 ERS^[49]。ERS 可以通过多种方式 (促进 VSMCs 凋亡, 抑制自噬等) 参与 VC 的发生和发展^[50, 51]。既往研究表明 H₂S 可能通过抑制 ERS 对心血管系统产生保护作用^[52, 53]。Yang 等发现相比于对照组, 尼古丁钙化模型大鼠

ERS 标记物 GRP78、活性 caspase-12 和 CHOP 蛋白水平均显著升高, 而添加 NaHS 可以使 ERS 标记物的水平下降^[31]。分别采用 ERS 诱导剂 Tm 和 ERS 抑制剂 PBA 验证 H₂S 是通过降低 ERS 改善 VC, 结果表明 Tm 能阻断 NaHS 治疗对尼古丁诱导大鼠 VC 的改善作用, 而 PBA 可以改善尼古丁诱导的大鼠 VC 的改变以及 ERS, 其效果与 NaHS 治疗相似^[31]。此外, Akt 信号通路的激活在抵消 ERS 方面起着至关重要的作用, 研究者发现添加 NaHS 显著逆转了尼古丁钙化模型大鼠中降低的 Akt 的蛋白水平, 认为 H₂S 通过激活 Akt 信号通路改善 ERS^[31]。同样, 长期慢性给予 NaHS (每天 56 $\mu\text{mol/kg}$, 连续 4 周) 不仅阻止了 VC 大鼠的 VSMCs 成骨表型转化和 ERS 激活, 降低 Ca²⁺ 含量和 ALP 活性, 而且可防止 VC 大鼠压力反射敏感性的损害, 改善心血管功能^[34]。以上研究结果表明 H₂S 可以缓解 ERS, 从而抑制 VC。

5.4 H₂S 抗氧化应激

氧化应激通常是指组织或细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生过度与抗氧化剂防御机制减少或活性减弱导致 ROS 的生成和清除之间失衡^[54]。氧化应激增加与 VC 的发生和发展密切相关^[55]。H₂S 已被证明可以减少促炎细胞因子、趋化因子和氧化应激^[16, 56]。Aghagolzadeh 等发现 NaHS 处理可以显著降低 VC 中升高的 H₂O₂ 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) mRNA 的水平 and 钙沉积, 说明 NaHS 在缓解 VC 中发挥了抗氧化作用与抗炎活性^[32]。差异表达基因分析结果显示在 NaHS 处理后, NAD(P)H 脱氢酶醌 1 (NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1, NQO1) 显著上调, 这是一种特征良好的抗氧化应激蛋白, 在 NaHS 处理后, NQO1 的 mRNA 和蛋白表达显著上调, 并且 NQO1 被沉默时, NaHS 失去了对 VSMCs 钙化的保护作用。上述实验验证了 H₂S 的抗 VC 特性是通过上调 NQO1 从而发挥抗氧化应激的作用^[32]。

5.5 H₂S 抗炎症

炎症在 VC 中扮演着极其重要的地位。炎症巨噬细胞可以分泌多种炎症因子如 TNF- α 、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β), 促进 VC 的发生, 钙化沉积物也会反过来诱发单核-巨噬细胞的促炎反应, 加速 VC 的进展^[57]。在钙化性主动脉瓣疾病中, 瓣膜组织的促炎细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 高表达。Éva Sikura 等发现腹腔注射 AP72 通过增加外源性

H₂S, 显著抑制 *ApoE*^{-/-} 小鼠高脂饮食后造成的主动脉搏增厚以及炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的高表达^[30]。此外, 在高磷培养下的 VIC 发生钙化时伴随着 IL-1 β 和 TNF- α 水平的升高。AP72 处理显著抑制细胞外基质中钙沉积的积累, 并伴随促炎细胞因子水平的降低。使用 siRNA 沉默 CSE/CBS 减少内源性 H₂S 的产生, 也会增强高磷诱导的 VIC 的炎症反应^[30]。核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的诱导是炎症反应的主要介质之一, 其激活是基于其核易位后促进促炎细胞因子表达, 如 IL-1 β 、TNF- α , 在钙化性主动脉瓣疾病的发生和发展中发挥重要作用^[58]。共聚焦显微镜和免疫荧光染色显示, 在普通培养基生长时 NF- κ B 位于细胞质中, 而予以磷刺激时, NF- κ B 从细胞质转位到细胞核。AP72 通过增加外源性 H₂S, 阻止了 NF- κ B 在含高磷情况下的核转位, 从而降低炎症水平。在体内实验显示, H₂S 可以阻止 *ApoE*^{-/-} 小鼠主动脉瓣钙化过程中 NF- κ B 和 Runx2 在 VIC 中表达上调和核共定位^[30]。综上, H₂S 可以通过 NF- κ B 信号通路减少促炎因子水平, 缓解 VC, 在 VC 的炎症和矿化之间建立了联系。

5.6 H₂S 改善细胞外基质

弹性蛋白是一种细胞外基质成分, 是主动脉壁中含量最丰富的蛋白质, 由血管中膜 VSMCs 合成和分泌, 参与组成弹性纤维来维持血管壁的机械和弹性完整性、VSMCs 表型和血管环境稳定性^[59]。在 CKD 或糖尿病中, 弹性蛋白丢失和弹性蛋白纤维破坏与动脉硬化和重构有关^[60, 61]。组织蛋白酶 S (cathepsin S, CAS) 会加重弹性蛋白丧失, 从而导致 VC 发生。Zhou 等发现抑制信号转导和转录激活因子-3 (signal transducer and activator of transcription-3, Stat3) 可以降低 CAS 的表达, 并改善弹性蛋白丢失所导致的 VC。而应用 NaHS 后则可以降低 Stat3 及 CAS 活性及其表达水平, 从而增加弹性蛋白表达, 缓解 VC^[33]。H₂S 最重要的生理效应的机制之一是翻译后修饰, 它可以与特定的半胱氨酸残基发生反应控制蛋白质的活性。这一反应表现在 H₂S 将半胱氨酸-SH (硫醇) 基团转化为-SSH (过硫) 基团^[62]。Stat3 通过半胱氨酸残基 (Cys259) 的链间二硫键桥接发生二聚化被激活^[63]。在 C259S 突变体中, Stat3 的过表达没有改变 CAS 蛋白和弹性蛋白水平, 并且 NaHS 不能诱导 C259S 突变的 Stat3 发生 S- 巯基化, 而这些诱导在野生型 Stat3 都能得到相应的反

应。S- 巯基化实验进一步证实 H_2S 可诱导 Cys259 发生 S- 巯基化, 损害 Stat3 二聚体的形成, 并使得高糖处理的 VC 作用减弱^[33]。 H_2S 可能发挥蛋白后修饰作用使 Cys259 发生 S- 巯基化来抑制 Stat3/CAS 信号通路, 使得弹性蛋白水平增加, 降低 VC 发生^[27, 33]。

5.7 H_2S 升高焦磷酸盐(pyrophosphate, PPi)

PPi 是一个通过抑制矿化结合初生的羟基磷灰石晶体来调节组织钙化的分子, 受膜外核苷酸焦磷酸酶 / 磷酸二酯酶 1 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1, ENPP1) 和锚蛋白 1 (Ankyrin G1, ANK1) 调控^[64]。ANK1 是一种可以转运 PPi 膜蛋白, 体外培养 ANK1 基因敲除小鼠的细胞可见细胞外

PPi 水平较低, 而 ANK1 基因过表达小鼠模型中细胞外 PPi 含量较高^[65]。ENPP 能水解 ATP 生成 PPi, ENPP 突变导致的功能丧失与婴儿期泛发性动脉钙化相关^[66]。Sikura 等发现人类心脏瓣膜组织样本中, 主动脉瓣狭窄伴钙化中的 ENPP 蛋白水平和 PPi 含量明显低于来自主动脉瓣关闭不全的瓣膜。体外钙化培养基诱导 VIC 钙化, 其 ENPP 的表达降低伴有 PPi 的含量减少, 而 ANK1 蛋白水平较正常对照无明显降低。当给予 AP72 后 PPi 生成显著增加, ENPP 和 ANK1 的表达明显升高, 并且降低了钙沉积、OC 和 ALP 表达水平^[29]。因此 AP72 升高了 VIC 的 ENPP 及 ANK1 表达水平, 增加 PPi 水平, 发挥抗钙化的效能。

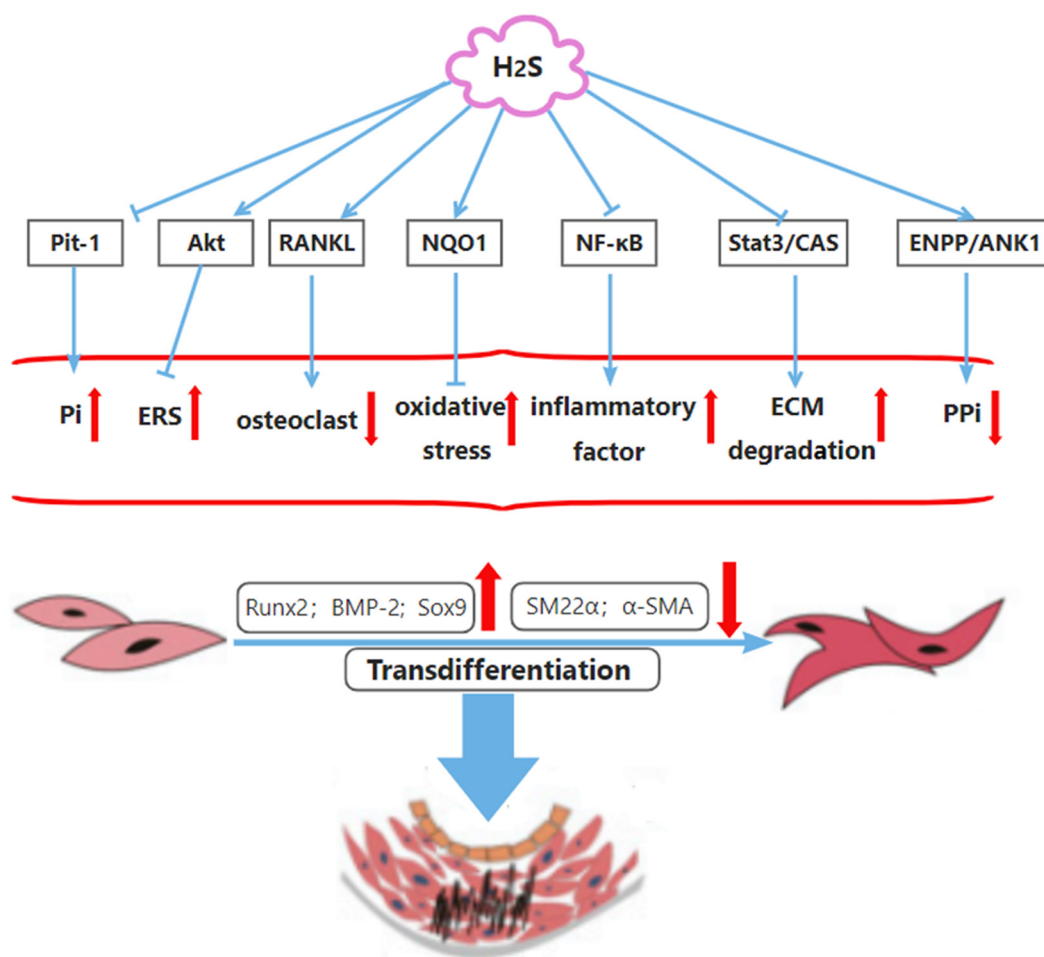


图 2. 硫化氢缓解血管钙化的作用机制

Fig. 2. Mechanisms underlying the effects of hydrogen sulfide (H_2S) on vascular calcification. Pit-1: sodium-dependent phosphate cotransporter; RANKL: receptor activator of NF- κ B ligand; NQO1: NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1; NF- κ B: nuclear factor- κ B; Stat3: signal transducer and activator of transcription-3; CAS: cathepsin S; ENPP1: ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1; ANK1: Ankyrin G1; ERS: endoplasmic reticulum stress; ECM: extracellular matrix; PPi: pyrophosphate; Runx2: Runt-related transcription factor 2; BMP-2: bone morphogenetic protein-2.

6 展望

VC 是糖尿病、CKD、及心血管疾病等患者中一种常见的病理过程，与死亡率高度相关。即便目前我们对 VC 的机制还不明确，但是矿物质紊乱、氧化应激、炎症等促进 VC 的发生和发展已是不争的事实。H₂S 目前作为一种气体信号分子在心血管生理和病理条件下发挥的作用日益被我们了解。VC 中的 H₂S 表达水平是下降的，并且补充 H₂S 供体或激活 H₂S 的关键酶可以对抗氧化应激、炎症、矿物质紊乱等，以此缓解 VC (图 2)。与此同时，我们也要避免过大剂量 H₂S 对细胞造成的毒副作用。未来探究 VC 中 H₂S 失调以及关键酶改变的潜在机制，寻求可靠 H₂S 供体及合适浓度并使酶促反应正常化对治疗 VC 有重要意义。

参考文献

- Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(7): 1453–1464.
- Lacolley P, Regnault V, Segers P, Laurent S. Vascular smooth muscle cells and arterial stiffening: relevance in development, aging, and disease. *Physiol Rev* 2017; 97(4): 1555–1617.
- Avogaro A, Fadini GP. Mechanisms of ectopic calcification: implications for diabetic vasculopathy. *Cardiovasc Diagn Ther* 2015; 5(5): 343–352.
- Fadini GP, Rattazzi M, Matsumoto T, Asahara T, Khosla S. Emerging role of circulating calcifying cells in the bone-vascular axis. *Circulation* 2012; 125(22): 2772–2781.
- Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP, Otto CM. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation* 2011; 124(16): 1783–1791.
- Desai MY, Cremer PC, Schoenhagen P. Thoracic aortic calcification: diagnostic, prognostic, and management considerations. *JACC Cardiovasc Imaging* 2018; 11(7): 1012–1026.
- Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Shimada K, Shimada Y, Fukuda D, Nakamura Y, Yamashita H, Yamagishi H, Takeuchi K, Naruko T, Haze K, Becker AE, Yoshikawa J, Ueda M. Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation* 2004; 110(22): 3424–3429.
- Wong KK, Thavornpattanapong P, Cheung SC, Sun Z, Tu J. Effect of calcification on the mechanical stability of plaque based on a three-dimensional carotid bifurcation model. *BMC Cardiovasc Disord* 2012; 12: 7.
- Holzappel GA, Mulvihill JJ, Cunnane EM, Walsh MT. Computational approaches for analyzing the mechanics of atherosclerotic plaques: a review. *J Biomech* 2014; 47(4): 859–869.
- Ryu J, Ahn Y, Kook H, Kim YK. The roles of non-coding RNAs in vascular calcification and opportunities as therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 2021; 218: 107675.
- Du JB (杜军保), Chen XB, Geng B, Jiang HF, Tang CS. Hydrogen sulfide as a messenger molecule in cardiovascular system. *J Peking Univ Health Sci* (北京大学学报医学版) 2002; 34(2): 187 (in Chinese).
- Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter. *FASEB J* 2002; 16(13): 1792–1798.
- Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev* 2012; 92(2): 791–896.
- Shefa U, Kim MS, Jeong NY, Jung J. Antioxidant and cell-signaling functions of hydrogen sulfide in the central nervous system. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 1873962.
- Saha S, Chakraborty PK, Xiong X, Dwivedi SK, Mustafi SB, Leigh NR, Ramchandran R, Mukherjee P, Bhattacharya R. Cystathionine β-synthase regulates endothelial function via protein S-sulfhydration. *FASEB J* 2016; 30(1): 441–456.
- Ueland PM, McCann A, Midttun Ø, Ulvik A. Inflammation, vitamin B6 and related pathways. *Mol Aspects Med* 2017; 53: 10–27.
- Giuffrè A, Vicente JB. Hydrogen sulfide biochemistry and interplay with other gaseous mediators in mammalian physiology. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 6290931.
- Chen X, Jhee KH, Kruger WD. Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *J Biol Chem* 2004; 279(50): 52082–52086.
- Yamamoto J, Sato W, Kosugi T, Yamamoto T, Kimura T, Taniguchi S, Kojima H, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Yuzawa Y, Niki I. Distribution of hydrogen sulfide (H₂S)-producing enzymes and the roles of the H₂S donor sodium hydrosulfide in diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 2013; 17(1): 32–40.
- Chiku T, Padovani D, Zhu W, Singh S, Vitvitsky V, Banerjee R. H₂S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* 2009; 284(17): 11601–11612.

- 21 Nagahara N. Multiple role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase: antioxidative function, H₂S and polysulfide production and possible SO production. *Br J Pharmacol* 2018; 175(4): 577–589.
- 22 Singh S, Banerjee R. PLP-dependent H₂S biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1814(11): 1518–1527.
- 23 Yao CK, Muir JG, Gibson PR. Review article: insights into colonic protein fermentation, its modulation and potential health implications. *Aliment Pharmacol Ther* 2016; 43(2): 181–196.
- 24 Wu D, Wang J, Li H, Xue M, Ji A, Li Y. Role of hydrogen sulfide in ischemia-reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 186908.
- 25 Insko MA, Deckwerth TL, Hill P, Toombs CF, Szabo C. Detection of exhaled hydrogen sulphide gas in rats exposed to intravenous sodium sulphide. *Br J Pharmacol* 2009; 157(6): 944–951.
- 26 Wu SY, Pan CS, Geng B, Zhao J, Yu F, Pang YZ, Tang CS, Qi YF. Hydrogen sulfide ameliorates vascular calcification induced by vitamin D₃ plus nicotine in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27(3): 299–306.
- 27 Wang FZ, Zhou H, Wang HY, Dai HB, Gao Q, Qian P, Zhou YB. Hydrogen sulfide prevents arterial medial calcification in rats with diabetic nephropathy. *BMC Cardiovasc Disord* 2021; 21(1): 495.
- 28 Zavaczki E, Jeney V, Agarwal A, Zarjou A, Oros M, Katkó M, Varga Z, Balla G, Balla J. Hydrogen sulfide inhibits the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 2011; 80(7): 731–739.
- 29 Sikura KÉ, Potor L, Szerafin T, Oros M, Nagy P, Méhes G, Hendrik Z, Zarjou A, Agarwal A, Posta N, Torregrossa R, Whiteman M, Fürtös I, Balla G, Balla J. Hydrogen sulfide inhibits calcification of heart valves; implications for calcific aortic valve disease. *Br J Pharmacol* 2020; 177(4): 793–809.
- 30 Éva Sikura K, Combi Z, Potor L, Szerafin T, Hendrik Z, Méhes G, Gergely P, Whiteman M, Beke L, Fürtös I, Balla G, Balla J. Hydrogen sulfide inhibits aortic valve calcification in heart via regulating RUNX2 by NF- κ B, a link between inflammation and mineralization. *J Adv Res* 2021; 27: 165–176.
- 31 Yang R, Teng X, Li H, Xue HM, Guo Q, Xiao L, Wu YM. Hydrogen sulfide improves vascular calcification in rats by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 9095242.
- 32 Aghagolzadeh P, Radpour R, Bachtler M, van Goor H, Smith ER, Lister A, Odermatt A, Feelisch M, Pasch A. Hydrogen sulfide attenuates calcification of vascular smooth muscle cells via KEAP1/NRF2/NQO1 activation. *Atherosclerosis* 2017; 265: 78–86.
- 33 Zhou YB, Zhou H, Li L, Kang Y, Cao X, Wu ZY, Ding L, Sethi G, Bian JS. Hydrogen sulfide prevents elastin loss and attenuates calcification induced by high glucose in smooth muscle cells through suppression of Stat3/Cathepsin S signaling pathway. *Int J Mol Sci* 2019; 20(17): 4202.
- 34 Li H, Teng X, Yang R, Guo Q, Xue H, Xiao L, Duan X, Tian D, Feng X, Wu Y. Hydrogen sulfide facilitates the impaired sensitivity of carotid sinus baroreflex in rats with vascular calcification. *Front Pharmacol* 2017; 8: 629.
- 35 Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Atkinson J. Aortic calcification produced by vitamin D₃ plus nicotine. *J Vasc Res* 1997; 34(5): 386–398.
- 36 Heiss A, Eckert T, Aretz A, Richtering W, van Dorp W, Schäfer C, Jahnke-Dechent W. Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *J Biol Chem* 2008; 283(21): 14815–14825.
- 37 Silaghi CN, Ilyés T, Van Ballegooijen AJ, Crăciun AM. Calciprotein particles and serum calcification propensity: hallmarks of vascular calcifications in patients with chronic kidney disease. *J Clin Med* 2020; 9(5): 1287.
- 38 Kutikhin AG, Feenstra L, Kostyunin AE, Yuzhalin AE, Hillebrands JL, Krenning G. Calciprotein particles: balancing mineral homeostasis and vascular pathology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021; 41(5): 1607–1624.
- 39 Aghagolzadeh P, Bachtler M, Bijarnia R, Jackson C, Smith ER, Odermatt A, Radpour R, Pasch A. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α . *Atherosclerosis* 2016; 251: 404–414.
- 40 Ishimura E, Okuno S, Taniwaki H, Kizu A, Tsuchida T, Shioi A, Shoji T, Tabata T, Inaba M, Nishizawa Y. Different risk factors for vascular calcification in end-stage renal disease between diabetics and nondiabetics: the respective importance of glycemic and phosphate control. *Kidney Blood Press Res* 2008; 31(1): 10–15.
- 41 Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(6): 1392–1401.
- 42 Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res* 2011; 109(6): 697–711.
- 43 Durham AL, Speer MY, Scatena M, Giachelli CM, Shanahan CM. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res* 2018; 114(4): 590–600.
- 44 Li X, Yang HY, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle

- cell calcification. *Circ Res* 2006; 98(7): 905–912.
- 45 Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Dunstan CR, Shah PK, Rajavashisth TB. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(20): 11201–11206.
 - 46 Massy ZA, Mentaverri R, Mozar A, Brazier M, Kamel S. The pathophysiology of vascular calcification: are osteoclast-like cells the missing link. *Diabetes Metab* 2008; 34 Suppl 1: S16–S20.
 - 47 Martin TJ, Sims NA. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev Endocr Metab Disord* 2015; 16(2): 131–139.
 - 48 Kurabayashi M. Hydrogen sulfide: a new regulator of osteoclastogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34(3): 471–473.
 - 49 Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol* 2015; 10: 173–194.
 - 50 Panda DK, Bai X, Sabbagh Y, Zhang Y, Zaun HC, Karellis A, Koromilas AE, Lipman ML, Karaplis AC. Defective interplay between mTORC1 activity and endoplasmic reticulum stress-unfolded protein response in uremic vascular calcification. *Am J Physiol Renal Physiol* 2018; 314(6): F1046–F1061.
 - 51 Shi Y, Wang S, Peng H, Lv Y, Li W, Cheng S, Liu J. Fibroblast growth factor 21 attenuates vascular calcification by alleviating endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in rats. *Int J Biol Sci* 2019; 15(1): 138–147.
 - 52 Barr LA, Shimizu Y, Lambert JP, Nicholson CK, Calvert JW. Hydrogen sulfide attenuates high fat diet-induced cardiac dysfunction via the suppression of endoplasmic reticulum stress. *Nitric Oxide* 2015; 46: 145–156.
 - 53 Wei H, Zhang R, Jin H, Liu D, Tang X, Tang C, Du J. Hydrogen sulfide attenuates hyperhomocysteinemia-induced cardiomyocytic endoplasmic reticulum stress in rats. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12(9): 1079–1091.
 - 54 Zhao MM, Xu MJ, Cai Y, Zhao G, Guan Y, Kong W, Tang C, Wang X. Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification *in vitro* and *in vivo*. *Kidney Int* 2011; 79(10): 1071–1079.
 - 55 Huang M, Zheng L, Xu H, Tang D, Lin L, Zhang J, Li C, Wang W, Yuan Q, Tao L, Ye Z. Oxidative stress contributes to vascular calcification in patients with chronic kidney disease. *J Mol Cell Cardiol* 2020; 138: 256–268.
 - 56 Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in the pathology of inflammation. *Scientifica (Cairo)* 2012; 2012: 159680.
 - 57 Nadra I, Mason JC, Philippidis P, Florey O, Smythe CD, McCarthy GM, Landis RC, Haskard DO. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification. *Circ Res* 2005; 96(12): 1248–1256.
 - 58 Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther* 2020; 5(1): 209.
 - 59 Dube P, DeRiso A, Patel M, Battepati D, Khatib-Shahidi B, Sharma H, Gupta R, Malhotra D, Dworkin L, Haller S, Kennedy D. Vascular calcification in chronic kidney disease: diversity in the vessel wall. *Biomedicines* 2021; 9(4): 404.
 - 60 Aikawa E, Aikawa M, Libby P, Figueiredo JL, Rusanescu G, Iwamoto Y, Fukuda D, Kohler RH, Shi GP, Jaffer FA, Weissleder R. Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation* 2009; 119(13): 1785–1794.
 - 61 Li WB, Zhao J, Liu L, Wang ZH, Han L, Zhong M, Zhang Y, Zhang W, Tang MX. Silencing of activin receptor-like kinase 7 alleviates aortic stiffness in type 2 diabetic rats. *Acta Diabetol* 2015; 52(4): 717–726.
 - 62 Yang CT, Devarie-Baez NO, Hamsath A, Fu XD, Xian M. S-Persulfidation: Chemistry, chemical biology, and significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2020; 33(15): 1092–1114.
 - 63 Li L, Shaw PE. A STAT3 dimer formed by inter-chain disulphide bridging during oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322(3): 1005–1011.
 - 64 Nitschke Y, Yan Y, Buers I, Kintziger K, Askew K, Rutsch F. ENPP1-Fc prevents neointima formation in generalized arterial calcification of infancy through the generation of AMP. *Exp Mol Med* 2018; 50(10): 1–12.
 - 65 Lomashvili KA, Narisawa S, Millán JL, O'Neill WC. Vascular calcification is dependent on plasma levels of pyrophosphate. *Kidney Int* 2014; 85(6): 1351–1356.
 - 66 Rutsch F, Böyer P, Nitschke Y, Ruf N, Lorenz-Depierreux B, Wittkamp T, Weissen-Plenz G, Fischer RJ, Mughal Z, Gregory JW, Davies JH, Loirat C, Strom TM, Schnabel D, Nürnberg P, Terkeltaub R; GACI Study Group. Hypophosphatemia, hyperphosphaturia, and bisphosphonate treatment are associated with survival beyond infancy in generalized arterial calcification of infancy. *Circ Cardiovasc Genet* 2008; 1(2): 133–140.