

钙化血管平滑肌细胞肾上腺髓质素及其受体系统的基因表达上调

潘春水¹, 齐永芬^{1,2}, 王述姮², 赵晶², 卜定方¹, 李桂忠¹, 唐朝枢^{1,2}

(北京大学 1. 第一医院心血管所, 北京市 100034; 2. 医学部生理系, 北京市 100083)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管钙化与活性肽; 半定量逆转录聚合酶链反应; 血管平滑肌细胞; 肾上腺髓质素; 降钙素受体样受体; 受体活性修饰蛋白

[摘要] 探讨钙化的血管平滑肌细胞肾上腺髓质素生成和肾上腺髓质素受体系统—降钙素受体样受体和受体活性修饰蛋白基因表达的改变及其病理意义。采用 β -甘油磷酸盐诱导培养的大鼠血管平滑肌细胞钙化;放射免疫法测定血管平滑肌细胞分泌的肾上腺髓质素含量;半定量逆转录聚合酶链反应测定细胞肾上腺髓质素、降钙素受体样受体和受体活性修饰蛋白的 mRNA 水平;原子吸收分光光度计测定细胞钙含量;碱性磷酸酶试剂盒测定血管平滑肌细胞碱性磷酸酶活性; β 液体闪烁计数器测定 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 放射活性。结果发现,与非钙化血管平滑肌细胞比较,钙化血管平滑肌细胞内钙含量、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 摄入及碱性磷酸酶活性分别增加 118%、174% 和 7 倍($P < 0.01$);钙化细胞肾上腺髓质素分泌量增高 99%($P < 0.01$),肾上腺髓质素、降钙素受体样受体、受体活性修饰蛋白 2 和 3 的 mRNA 水平分别增加 78%、93.7%、91.8% 和 109.5%(P 均 < 0.01)。肾上腺髓质素与降钙素受体样受体、受体活性修饰蛋白 2 和 3 的 mRNA 水平呈正相关,其相关系数分别为 0.83、0.92 和 0.93(P 均 < 0.01)。结果提示,血管平滑肌细胞肾上腺髓质素旁分泌功能改变可能参与血管钙化的调节过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Upregulation of Gene Expression of Adrenomedullin and its Receptor System in Calcified Vascular Smooth Muscle Cells

PAN Chun-Shui¹, QI Yong-Fen^{1,2}, WANG Shu-Heng², ZHAO Jing², BU Ding-Fang¹, LI Gui-Zhong¹, and TANG Chao-Shu^{1,2}
(1. Institute of Cardiovascular Diseases, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034; 2. Department of Physiology and Pathophysiology, Health Science Center of Peking University, Beijing 100083, China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cells; Adrenomedullin; Calcitonin Receptor Like Receptor; Receptor Activity Modifying Proteins; Calcification; Semi-Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To explore the production of adrenomedullin (ADM), changes and significance of ADM, ADM receptor system-calcitonin receptor like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMP) mRNA in calcified vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Calcification of cultured rat VSMC was produced by incubation with β -glycerophosphate. Content of ADM released by VSMC was measured by radioimmunoassay (RIA). The amount of ADM, CRLR and RAMP mRNA was determined by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The intracellular calcium content, alkaline phosphatase activity and cellular $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake were determined. **Results** The content of calcium, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and alkaline phosphatase activity in calcified VSMC increased by 118%, 174% and 7-fold (all $P < 0.01$), respectively, compared with control VSMC. Content of ADM in medium increased by 99% ($P < 0.01$). Furthermore, it was found that the levels of ADM, CRLR, RAMP 2 and RAMP 3 mRNA in calcified cells were elevated by 78%, 93.7%, 91.8% and 109.5% (all $P < 0.01$), respectively, compared with control. The elevated levels of CRLR, RAMP 2 and RAMP 3 mRNA were positively correlated with ADM mRNA ($r = 0.83, 0.92$ and 0.93 , respectively, $P < 0.01$) in calcified VSMC. **Conclusion** Calcified VSMC generated an increased amount of ADM, up-regulated gene expressions of ADM, CRLR, RAMP 2 and RAMP 3, which suggested that changes of autocrine/paracrine function of vessel might be involved in the regulation of vascular calcification.

高血压、动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)、糖尿

病和肾病性血管病变时常存在不同程度的血管钙化现象,钙化血管舒张功能降低、僵硬性增加,促进血栓形成和动脉粥样斑块破裂,是心血管疾病的重要危险因素^[1,2]。但是血管钙化的发病机制目前尚未完全阐明。近年资料表明血管钙化是血管细胞发生骨发生样表型转换的主动调节过程^[3],但细胞表型

[收稿日期] 2003-09-21 [修回日期] 2004-01-30

[基金项目] 国家重大基础研究发展规划项目(C2000056905)资助

[作者简介] 潘春水,博士研究生,主要从事心血管活性肽和心血管疾病的发病机制的研究。齐永芬,副教授,主要从事心血管疾病发病与防治的基础研究与活性肽生物学效应的研究,E-mail 为 yongfenqi@163.com。唐朝枢,教授,博士研究生导师,“973”首席科学家,长期从事心血管疾病发病和防治的基础研究及心血管活性肽的研究。

转换的细胞分子机制远未阐明。心血管组织局部的旁/自分泌因子是循环稳态调节的重要因素,但钙化血管的旁/自分泌功能有何改变及其意义目前均不清楚。肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)是由血管内皮细胞和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)产生的可降低血压和抑制 VSMC 增殖的活性肽^[4]。我室观察到外源性 ADM 能有效地防治血管钙化^[5]。VSMC 富含 ADM 及其受体系统——降钙素受体样受体(calcitonin receptor-like receptor, CRLR)和受体活性修饰蛋白(receptor activity modifying proteins, RAMP)^[6]。但血管钙化过程中,血管内源性 ADM/ADM 受体途径的变化及其意义尚未完全阐明。本研究在 β 甘油磷酸盐诱导的钙化大鼠 VSMC 模型上观察钙化的 VSMC ADM 生成及其受体系统 mRNA 水平变化,以探讨钙化表型的血管细胞旁/自分泌功能改变特征及病理生理意义。

1 材料与方法

1.1 材料

肾上腺髓质素(ADM)放射免疫药盒购于美国 Phoenix Pharmaceuticals INC。 β -甘油磷酸盐、碱性磷酸酶试剂盒购于 Sigma 公司。 45 CaCl₂、Trizol 购自 GIBICO 公司,dNTP 购自 Clontech 公司,MMLV 逆转录酶、Taq 酶、RNasin 和 Oligo(dT)15 Primer 为 Promega 公司产品。余为市售分析纯。PCR 引物由赛百盛公司合成(表 1, Table 1)。

1.2 血管平滑肌细胞培养及钙化血管平滑肌细胞的制备

根据文献[7]方法无菌取大鼠胸主动脉,剥离血管外结缔组织。贴块法培养 VSMC^[8]。VSMC 置于含 20% 小牛血清的 DMEM 培养基中,37℃、95% 空气、5% CO₂ 的孵育箱中培养。实验用第 5~8 代细胞。取汇合状态的 VSMC,在含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中加入 10 mmol/L β -甘油磷酸盐和 10 mmol/L 丙酮酸钠,每两天换液一次,以制备钙化的 VSMC。培养 10 天后测定下述指标。对照组细胞单纯用含血清的 DMEM 培养基培养。

1.3 Von Kossa 染色

按文献[7]方法,将培养的细胞放入 10% 福尔马林中固定,4℃、45 min,用蒸馏水清洗,经 5% AgNO₃ 处理,在日光下照射 30 min 后,将玻片置于 5% 硫代硫酸钠溶液中 1 min,碱性品红返染。脱水、透明、封片,行光镜观察。

1.4 血管平滑肌细胞钙含量测定

按文献[7]方法收集细胞,用冷 PBS 洗 5 次,硝酸消化干燥后,用含 27 nmol/L KCl 和 25 μ mol/L LaCl₃ 的去离子水复溶,用原子吸收分光光度计测定 422.7 nm 下的吸收值。

1.5 45 Ca²⁺ 摄入测定

按文献[7]方法,细胞钙化处理结束前 24 h 加入 37 MBq/L 45 CaCl₂ 进行孵育,弃去上清,用 10% 高氯酸和 30% 过氧化氢 80℃ 孵育 60 min, β 液体闪烁计数器测定 45 Ca²⁺ 放射活性。

1.6 血管平滑肌细胞碱性磷酸酶活性测定

钙化培养结束后,用冷 PBS 洗涤细胞,用 200 μ L 细胞溶解缓冲液溶解细胞(1 mL MgCl₂ 含有 0.2% NP40),超声破碎细胞,每管加入 1 mL 反应液,在 37℃ 反应 30 min 后加入 1 mol/L NaOH 终止反应,在 405 nm 处测定溶液的吸光度值,按照碱性磷酸酶测定试剂盒说明用对硝基酚作标准计算碱性磷酸酶活性。以 30 min 内产生 1 nmol 的对硝基酚为一个碱性磷酸酶活性单位。

1.9 肾上腺髓质素的测定及鉴定

按照文献[9]方法收集细胞培养上清,加入 1 mmol/L 醋酸,沸水浴 10 min,过 Sep-Pak C18 柱,乙氰和三氟乙酸洗脱后用 100 μ L 放射免疫缓冲液复溶。按 ADM 放射免疫药盒说明书测定培养基中 ADM 含量。IC₅₀ 为 13~47 pg/管,与大鼠 ADM 交叉反应性为 100%,与大鼠肾上腺髓质素 N 端 20 肽、胰淀粉样多肽和内皮素的交叉反应性均为零。为了检测 VSMC 分泌的 ADM 特征,用反向高压液相法对培养基中 ADM 进行鉴定。培养基粗提液用 0%~60% 乙氰和 0.1% 三氟乙酸进行洗脱,根据洗脱峰的位置与标准肽的洗脱位置比较鉴定 ADM 的分子特征。

1.10 半定量逆转录聚合酶链反应

按照文献[10]用 Trizol 一步法提取 VSMC 总 RNA。MMLV 逆转录酶及 Oligo(dT)15 primer 逆转录成单链 cDNA。ADM mRNA 含量测定的 PCR 反应体积 25 μ L:cDNA 1 μ L,5 pmol/L ADM-S 及 ADM-A 引物 1 μ L,2.5 mmol/L dNTP 1 μ L,含 15 mmol/L MgCl₂ 的 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L,Taq DNA 聚合酶 1.25 单位,反应条件:95℃ 5 min \rightarrow 94℃ 30 s \rightarrow 61℃ 30 s \rightarrow 72℃ 40 s,热循环 30 次;72℃ 5 min。取 2 μ L PCR 产物,以 β -actin 上下游引物作 PCR,95℃ 5 min \rightarrow 94℃ 30 s \rightarrow 55℃ 30 s \rightarrow 72℃ 40 s,热循环 24 次。将两者 PCR 产物以 1.5% 琼脂糖电泳分离和溴乙锭染色后,用凝胶成像及定量扫描仪测得 446 bp 和 289 bp 两条带。ADM/ β -actin 的 mRNA 比值即为 ADM mRNA 的相对含量。重复 3 次独立试验。CRLR、RAMP 2 和

RAMP 3 mRNA 含量的测定与 ADM mRNA 含量的测定相似,PCR 反应条件见表 1(Table 1)。

表 1. 聚合酶链反应扩增的寡核苷酸引物

Table 1. Oligonucleotides used for the amplification

目的片段		引物序列	片段大小 (bp)	退火温度 (°C)	循环数
肾上腺髓质素	正链	5'-CTCGACACTTCTCGCAGTT-3'	446	61	30
	负链	5'-GCTGCAGCTGAGTGTGTCTG-3'			
降钙素受体样受体	正链	5'-CAACTGCTGGATCAGCTCAG-3'	446	55	32
	负链	5'-CATCGCTGATTGTTGACACC-3'			
受体活性修饰蛋白 2	正链	5'-TGAGGACAGCCITCTGTGC A-3'	371	55	30
	负链	5'-CATGGCCGTCTTTACTCC TG-3'			
受体活性修饰蛋白 3	正链	5'-CTTCTCCCTCTGTCTGCTGT-3'	416	57	30
	负链	5'-CACAGAAGCCGGTCAGTGT-3'			
β-actin	正链	5'-ATCTGG AC CAC ACC TTC-3'	289	55	24
	负链	5'-AGCCAG GTC CAG ACG CA-3'			

1.11 统计学分析

3 次独立实验,每次作平行管。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。部分结果以细胞蛋白量标化(考马斯亮蓝法蛋白定量)。Student's *t* 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 钙化血管平滑肌细胞指征

与非钙化 VSMC 相比,钙化 VSMC Von Kossa 染色见有大量棕黑色颗粒沉积(图 1, Figure 1)。VSMC 内钙含量、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 摄入及碱性磷酸酶活性分别增加 118%、174% 和 7 倍 ($P < 0.01$; 表 2, Table 2)。

表 2. 钙化血管平滑肌细胞的一般特征及培养基中肾上腺髓质素含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2. General index of calcified VSMC and ADM content in medium

指标	对照血管平滑肌细胞	钙化血管平滑肌细胞
钙摄入 (106 cpm/g)	32.2 ± 5.2	88.2 ± 10.2 ^a
钙含量 (μmol/g)	46.8 ± 7.2	102.2 ± 18.2 ^a
碱性磷酸酶活性 (ku/g)	74 ± 11	624 ± 84 ^a
肾上腺髓质素含量 (pmol/l.)	8.97 ± 0.61	17.82 ± 1.68 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 钙化血管平滑肌细胞肾上腺髓质素含量及其 mRNA 水平

钙化 VSMC ADM 分泌量较对照组高 99% (表 2,

Table 2)。分泌型 ADM 由 2 个峰组成,即一个高的主峰和一个低的小峰。且主峰的洗脱位置与合成的大鼠 ADM 的洗脱峰位置一致,说明所测得的 ADM 即为 VSMC 合成分泌的内源性 ADM (图 2, Figure 2)。ADM 的 PCR 产物 (446 bp) 酶切后得到 156 bp 和 290 bp 两条片段,证明所得 PCR 产物正确无误。钙化 VSMC ADM mRNA 含量较对照组高 78% ($P < 0.01$; 图 3 和表 3, Figure 3 and Table 3)。

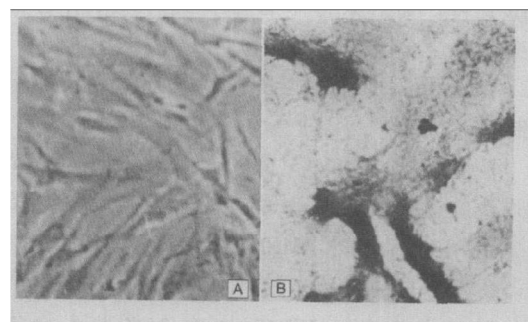


图 1. 血管平滑肌细胞 Von Kossa 染色 (20 × 10) A 为对照血管平滑肌细胞; B 为钙化血管平滑肌细胞。

Figure 1. Von Kossa staining VSMC

2.3 钙化血管平滑肌细胞降钙素受体样受体、受体活性修饰蛋白 2 和 3 mRNA 水平

钙化 VSMC CRLR、RAMP 2 和 RAMP 3 mRNA 水平分别较对照组增加 93.7%、91.8% 和 109.5% (P 均 < 0.01)。且 ADM 与 CRLR、RAMP 2 和 RAMP 3 mRNA 水平呈明显正相关,其相关系数分别为 0.83、0.92 和 0.93 (P 均 < 0.01 ; 表 3 和图 4, Table 3 and Figure 4)。

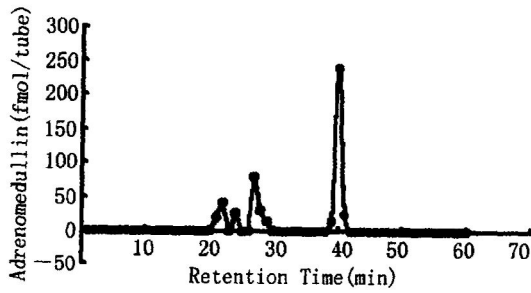


图 2. 放射免疫分析法测定培养基中肾上腺髓质素的反向高压液相特征

Figure 2. Reverse-phase HPLC of ADM in medium monitored by radioimmunoassay

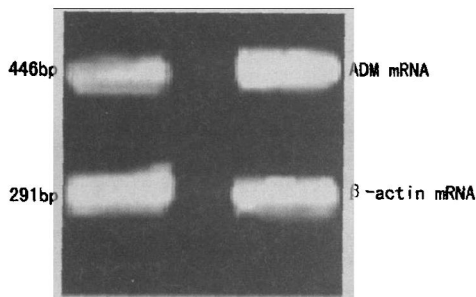


图 3. 大鼠钙化血管平滑肌细胞肾上腺髓质素 mRNA 表达的变化 1 为对照血管平滑肌细胞; 2 为钙化血管平滑肌细胞。

Figure 3. Changes of ADM mRNA in VSMC of rats

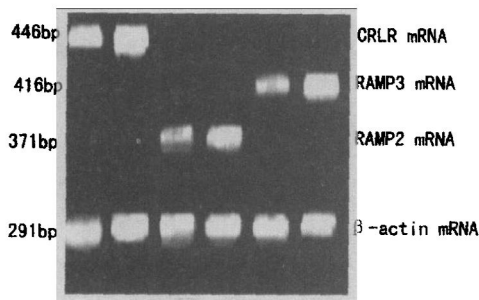


图 4. 大鼠钙化血管平滑肌细胞降钙素受体样受体、受体活性修饰蛋白 2 和 3 mRNA 表达的变化 1 为对照血管平滑肌细胞; 2 为钙化血管平滑肌细胞。

Figure 4. Changes of CRLR, RAMP 2 and RAMP 3 mRNA in calcified VSMC

3 讨论

血管钙化过程是类似于骨形成和骨质疏松发生的主动调节过程,血管细胞转变为成骨样细胞表型是血管钙化的细胞学基础^[11]。文献[5,12]报道,钙化血管内皮素和血管紧张素 II 表达增加,甲状旁腺激素相关肽、C 型利尿肽和内皮源舒张因子(NO 和 CO)生成减少,提示钙化血管细胞表型转变时其旁/

表 3. 血管平滑肌细胞肾上腺髓质素及其受体系统 mRNA 的相对含量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3. The relative amount of ADM and its receptor system mRNA

分组	对照血管平滑肌细胞	钙化血管平滑肌细胞
肾上腺髓质素	1.27 ± 0.14	2.25 ± 0.14 ^a
降钙素受体样受体	1.65 ± 0.17	4.13 ± 0.66 ^a
受体活性修饰蛋白 2	1.19 ± 0.17	2.97 ± 0.36 ^a
受体活性修饰蛋白 3	1.38 ± 0.16	3.44 ± 0.31 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

自分泌系统功能亦发生了改变。血管内膜、中膜和外膜均能生成 ADM。大量实验证实,ADM 是高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病中重要的内源性保护物质^[4,13]。但钙化血管 ADM 生成的变化及其功能意义目前尚不清楚。本文结果发现,血管平滑肌细胞钙含量、⁴⁵Ca²⁺ 摄入增多,碱性磷酸酶活性增高,Von Kossa 染色呈现典型钙结节,表明磷酸甘油诱导的血管平滑肌细胞具有钙化细胞的特征。由于血管平滑肌细胞不能贮存 ADM,血管平滑肌细胞合成的 ADM 分泌释放入培养基中,ADM 的分泌反映 ADM 在血管平滑肌细胞中的合成^[14]。本实验发现钙化血管平滑肌细胞分泌 ADM 的量较对照血管平滑肌细胞明显增高,ADM mRNA 含量亦明显增加,提示 ADM 基因表达上调可能是 ADM 生成增加的主要原因。文献[4]报道,导致 ADM 高表达的因素主要是通过蛋白激酶 C 途径激活 AP-2,促进 ADM 基因转录。血管平滑肌细胞钙化时 ADM 基因表达上调和蛋白合成释放增加是否亦通过蛋白激酶 C 途径实现还有待进一步研究。

文献报道小鼠和大鼠成骨细胞、软骨细胞及人的软骨细胞高表达 ADM 以及 CRLR、受体活性修饰蛋白 2 和受体活性修饰蛋白 3。体外实验表明 ADM 可以刺激成骨细胞的增殖和分化,促进破骨细胞的骨化和抗骨质疏松^[15]。外源性 ADM 可以对抗大鼠血管钙化,明显减轻血管钙化程度^[5]。

降钙素受体样受体(CRLR)表型受到受体活性修饰蛋白的调节,受体活性修饰蛋白家系包括受体活性修饰蛋白 1、受体活性修饰蛋白 2 和受体活性修饰蛋白 3 三个亚型。受体活性修饰蛋白 2 或受体活性修饰蛋白 3 与 CRLR 结合分别表现为 ADM 1 和 ADM 2 受体亚型,介导 ADM 的生物学效应^[6]。本实验观察到钙化血管平滑肌细胞的 CRLR、受体活性修饰蛋白 2 和受体活性修饰蛋白 3 mRNA 水平较非钙化血管平滑肌细胞明显增加,且 ADM 与 CRLR、受

体活性修饰蛋白 2 和受体活性修饰蛋白 3 mRNA 增高水平呈明显正相关,提示血管平滑肌细胞钙化时 ADM 及其受体系统基因表达上调,受体途径被激活。有报道血小板源生长因子 β 、内皮素 1 和地塞米松等可不同程度的调节 ADM 及其受体系统的表达^[16-18],疾病状态如高血压、充血性心力衰竭和阻塞性肾病时受体活性修饰蛋白 2、受体活性修饰蛋白 3 和 CRLR 基因表达明显上调,ADM 及其受体系统被激活,且对心血管系统起代偿性保护作用^[19-21]。本实验发现钙化细胞中 ADM 代偿性升高,其受体系统被激活在心血管系统钙化中也可能具有一定的保护作用。

心血管组织的钙化是心血管疾病致残、致死的主要原因,也是一个潜在的、可预防、逆转和调节的生物学过程。钙化血管舒张功能降低,僵硬性增强,血小板粘附聚集性增强,易形成血栓。高血压、动脉粥样硬化时心血管组织 ADM 含量升高具有重要的代偿意义。而且外源导入 ADM 基因可以明显降低高血压的发生^[22]。同时,ADM 又是循环系统功能稳态调节的重要因子。本实验发现钙化的血管平滑肌细胞 ADM 及其受体系统表达明显增加提示 ADM 作为内源性保护物质在心血管系统的钙稳态调节中可能具有重要作用。

[参考文献]

- [1] Iribarren C, Sidney S, Sternfeld B, Browner WS. Calcification of the aortic arch: risk factor and association with coronary heart disease, stroke, and peripheral vascular disease. *JAMA*, 2000, 88: 26-33
- [2] Christian RC, Fitzpatrick LA. Vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1999, 8 (4): 443-448
- [3] Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Shanahan C, Weissberg PL. Vascular and valvular calcification: recent advances. *Heart*, 2001, 85: 13-17
- [4] Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocrine review*, 2000, 21: 138-167
- [5] Zhang B, Tang C, Jiang Z, Qi Y, Pang Y, Du J, et al. Effects of adrenomedullin on vascular calcification in rats. *Zeitschrift Fur Kardiologie*, Band 91, Heft 7 2002.
- [6] 潘春水, 齐永芬, 唐朝枢. 受体表型调节蛋白——受体活性修饰蛋白.

•读者•作者•编者•

关于参考文献的更正

贵刊在第 11 卷第 7 期第 691~694 页发表的[高敏 C 反应蛋白与急性冠状动脉综合征相关的临床证据(作者:郑刚、张承宗,编辑:文玉珊)]一文中,引用了我的文章[调脂对急性冠状动脉综合征患者高敏 C 反应蛋白及 P 选择素的影响],但出现了参考文献序号和姓名张冠李戴的错误:(1)在 694 页参考文献号[20]应为序号[29](应把[20]文献与[29]文献对换——编者注);(2)在第 693 页右栏第 22 行“最近国内蒋利等”应为“最近国内吕以杰等”。

请贵刊在以后期刊中给予修正说明。

谢谢!

济南市中心医院心内科主任医师
吕以杰

- [7] Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi H, Mori H, et al. β -Glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15: 2 003-009
- [8] Campbell JH, Campbell GR. Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle. *Clin Sci*, 1993, 85: 501-512
- [9] Qi YF, BU DF, Niu DD, Shi YR, Wang SH, Pang YZ, et al. Effects of different peptide fragments derived from proadrenomedullin on gene expression of adrenomedullin gene. *Peptides*, 2002, 23: 1 141-147
- [10] 齐永芬, 牛大地, 王述娟, 卜定方, 石彦荣, 高霖, 唐朝枢. 钙化心肌细胞肾上腺髓质素和受体活性修饰蛋白 2 mRNA 含量的变化. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (5): 375-378
- [11] Proudfoot D, Shanahan CM, Weissberg PL. Vascular calcification: new insights into an old problem. *J Pathol*, 1998, 185: 1-3
- [12] 吴胜英, 张宝红, 蒋宏峰, 潘春水, 庞永政, 唐朝枢, 齐永芬. 血管钙化对血管组织内皮素表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (4): 277-282
- [13] Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 192: 553-560
- [14] Isumi Y, Shoji H, Sugo S, Tochimoto T, Yoshioka M, Kangawa K, et al. Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology*, 1998, 139: 838-846
- [15] Cornish J, Naot D, Reid IR. Adrenomedullin—a regulator of bone formation. *Regulatory Peptides*, 2003, 112: 79-86
- [16] Nowak W, Parameswaran N, Hall CS, Aiyar N, Sparks HV, Spielman WS, et al. Novel regulation of adrenomedullin receptor by PDGF: role of receptor activity modifying protein-3. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282: C1 322-331
- [17] Mishima K, Kato J, Kuwassako K. Effects of endothelin on adrenomedullin secretion and expression of adrenomedullin receptors in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287: 264-269
- [18] Frayon S, Cueille C, Gnidehou S, de Vernejoul MC, Ganel JM. Dexamethasone increases RAMP 1 and CRLR mRNA expressions in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 270: 1 063-067
- [19] Wang X, Nishikimi T, Akimoto K, Tadokoro K, Mori Y, Minamino N. Up-regulation of ligand, receptor system, and amidating activity of adrenomedullin in left ventricular hypertrophy of severely hypertensive rats: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and diuretic. *J Hypertens*, 2003, 21: 1 171-181
- [20] Totsune K, Takahashi K, Mackenzie HS, Murakami O, Arihara Z, Sone M, et al. Increased gene expression of adrenomedullin and adrenomedullin-receptor complexes, receptor-activity modifying protein (RAMP)2 and calcitonin-receptor-like receptor (CRLR) in the hearts of rats with congestive heart failure. *Clin Sci (Lond)*, 2000, 99: 541-546
- [21] Mukoyama M, Sugawara A, Nagae T, Mori K, Murabe H, Itoh H, et al. Role of adrenomedullin and its receptor system in renal pathophysiology. *Peptides*, 2001, 22: 1 925-931
- [22] Tsuruda T, Burnett JC. Adrenomedullin: An autocrine/paracrine factor for cardiorenal protection. *Circ Res*, 2002, 90: 625-627

(此文编辑 文玉珊)