

# 阿伦膦酸钠对动脉钙化组织中骨保护素表达的影响

杨丽元, 管思明, 方欣

(华中科技大学附属协和医院老年科, 湖北省武汉市 430022)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉钙化; 骨保护素; 阿伦膦酸钠

[摘要] 目的 研究阿伦膦酸钠对大鼠主动脉骨保护素表达的影响并初步探讨其抑制动脉钙化的可能机制。

方法 4 周龄雄性 SD 大鼠 18 只随机分为正常组、钙化组和阿伦膦酸钠组, 钙化组和阿伦膦酸钠组分别给予皮下注射华法令(150 mg/kg, 2 次/天, 5 天)和维生素 D<sub>3</sub>[3 MU/(kg·d), 3 天]以制备大鼠动脉钙化模型。阿伦膦酸钠组在钙化模型制备前 4 天皮下注射阿伦膦酸钠 1 mg/(kg·d)。结果 阿伦膦酸钠组大鼠主动脉 Von Kossa 染色黑色深染结构减少; 阿伦膦酸钠组主动脉钙含量显著低于钙化组(67.33±19.86 μmol/g 比 114.3±23.23 μmol/g), 血管骨保护素 mRNA 的表达显著高于钙化组。免疫组织化学显示阿伦膦酸钠组血管骨保护素的表达较钙化组明显增加。结论 阿伦膦酸钠能增加血管钙化组织中骨保护素表达, 这可能是阿伦膦酸钠抑制动脉钙化的原因之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Effect of Alendronate on the Expression of Osteoprotegerin in Rats Calcified Aorta Tissue

YANG Li-Yuan, GUAN Si-Ming, and FANG Xin

(Department of Geriatrics, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

[KEY WORDS] Artery Calcification; Osteoprotegerin; Alendronate

[ABSTRACT] Aim To study the effect of alendronate on the expression of osteoprotegerin (OPG) in rat aorta, and investigate the possible mechanism of inhibiting artery calcification by alendronate. Methods Eighteen 4-week-old male SD rats

were randomly divided into the control group ( $n=6$ ), calcification group ( $n=6$ ) and alendronate group ( $n=6$ ). The later two groups were subcutaneously injected with warfarin (150 mg/kg per 12 hours for 5 days) and Vitamin D<sub>3</sub>[3 MU/(kg·d) for 3 days] to induce extensive calcification of the aorta. Alendronate group was treated with daily subcutaneous injection of alendronate 4 days before the first warfarin dose. The control group was given daily subcutaneous injection of 0.9% NaCl. Thoracic aortas were exercised for analysis of calcification and OPG expression using histomorphometry, spectrophotometer RT-PCR and immunohistochemistry. Results The large area of focal darkly stained regions by Von Kossa staining reduced obviously in alendronate group. The level of calcium content in aorta wall was significantly lower in the alendronate group than in the calcification group (67.33±19.86 μmol/g vs 114.3±23.23 μmol/g,  $P<0.05$ ). The relative content of OPG mRNA in aortic wall was higher in the alendronate group than in the calcification group ( $P<0.01$ ). The similar results was drawn by immunohistochemistry. OPG protein expression was similar to that for its mRNA expression. Conclusions Alendronate inhibited artery calcification by upregulating the expression of OPG.

动脉钙化常见于老年人及糖尿病、慢性肾功能不全和老年退行性瓣膜病患者。动脉钙化可导致血管壁弹性减退, 顺应性下降, 是影响冠心病预后的一个危险因素<sup>[1,2]</sup>。近年研究表明血管钙化是一种类似于骨和软骨形成的主动调节过程, 受到影响骨代谢的许多细胞因子复杂的调节<sup>[3]</sup>。骨保护素(osteoprotegerin, OPG)基因敲除(OPG<sup>-/-</sup>)小鼠在成熟前除了严重骨质疏松症(osteoporosis, OP)外, 还有主动脉和肾动脉钙化<sup>[4]</sup>, 用重组 OPG 预防治疗可防止骨质

疏松症和血管钙化的发生及逆转骨质疏松症<sup>[5]</sup>。临床观察也发现血管钙化和骨质疏松症往往同时出现, 即骨质疏松症患者经常存在动脉粥样硬化和血管钙化<sup>[6]</sup>。本研究旨在研究抑制破骨细胞功能的药物阿伦膦酸钠(alendronate, AL)对大鼠主动脉钙化血管组织中 OPG 表达的影响, 并初步探讨其抑制动脉钙化的可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物和试剂

健康 4 周龄雄性 SD 大鼠, 体重 200~250 g, 购自华中科技大学同济医学院动物实验中心。华法令、维生素 D<sub>3</sub> 和维生素 K<sub>1</sub> 注射液购自上海通用药

[收稿日期] 2007-12-03

[修回日期] 2008-07-05

[作者简介] 杨丽元, 硕士, 主要从事动脉粥样硬化研究, E-mail 为 yangliyuan99@163.com。管思明, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化机制研究。方欣, 博士, 主要从事动脉粥样硬化研究。

业有限公司;焦碳酸乙二酯(DEPC)、Trizol、二硫苏糖醇(DDT)、鼠白血病毒莫勒尼株(M-MLV)逆转录酶和OPG多克隆抗体购自武汉博士德公司;阿伦膦酸钠由默沙东制药有限公司惠赠。试剂配制:900 mg 华法令溶于30 mL 生理盐水中(30 g/L),溶解过程中加入数滴NaOH至华法令完全溶解,调整pH在8.0左右。配制的华法令溶液于4℃冰箱避光保存。50 mg 阿伦膦酸钠溶于20 mL 生理盐水中(2.5 g/L),并加入数滴NaOH至阿伦膦酸钠完全溶解,调整pH在7.4左右,于4℃冰箱避光保存。

## 1.2 血管钙化动物模型的制备及实验分组

根据文献[7]方法制备大鼠动脉钙化模型。标准饲料适应性喂养一周后分组,18只大鼠随机分组:正常对照组( $n=6$ )、钙化组( $n=6$ )和阿伦膦酸钠组( $n=6$ )。开始建立大鼠动脉钙化模型当天定为实验第0天,钙化组和阿伦膦酸钠组给予皮下注射华法令150 mg/kg,2次/天,持续5天,以及维生素D<sub>3</sub> 3 MU/(kg·d),持续3天。在钙化模型建立前4天开始,阿伦膦酸钠组给予阿伦膦酸钠1 mg/(kg·d)皮下注射,钙化组和正常对照组均给予等量生理盐水皮下注射,持续至实验第9天;在动脉钙化模型建立前2天,各组均给予维生素K<sub>1</sub> 15 mg/(kg·d)持续至实验第9天。实验第10天,所有大鼠颈椎脱臼法处死。取长约1 cm 胸主动脉,用10%中性福尔马林固定、石蜡包埋后制成经主动脉横径的石蜡切片。另取胸主动脉近端1 cm,用PBS冲掉残留动脉腔及表面的血液,迅速置于1.5 mL 经DEPC处理过的离心管中,-80℃冰箱冻存。

## 1.3 Von Kossa 染色

石蜡切片脱蜡至水,用蒸馏水冲洗片刻,加入50 g/L 硝酸银,置于太阳光下暴晒20~30 min,用蒸馏水冲洗后,加入中性红衬染片刻,用蒸馏水冲洗后,将切片烤干、透明、树胶封片。显微镜下观察动脉钙化情况。

## 1.4 组织钙沉积含量的测定

取胸主动脉约1 cm 于80℃烤干,组织称重,加入2 mol/L 浓硝酸,室温消化12~24 h,将消化管置于自控电热消化器上消化至酸全部挥发,冷却后用去离子水2 mL(含27 nmol/L KCl和27 μmol/L LaCl<sub>3</sub>)充分震荡溶解过夜。取1.5 mL 样品,加入1% SrCl<sub>2</sub> 150 μL,用原子吸收分光光度计测定422.7 nm 波长下各管吸光度值,自标准曲线上查出钙含量。

## 1.5 骨保护素 mRNA 含量的测定

取出冻存于-80℃冰箱中的离心管,向每一离

心管中加入1 mL Trizol 试剂,用匀浆器匀浆。逆转录后PCR反应检测OPG mRNA。PCR反应条件:93℃预变性1 min后,94℃变性30 s→52℃退火1 min→72℃延伸1 min,共30个循环,最后72℃延伸10 min。大鼠OPG引物序列参考文献[6]设计,由上海英骏生物技术有限公司合成。OPG上游为5'-AGT TTA TTT AAC AGA CTG CCA CCA G-3',下游为5'-GTA ATA AGA GGG CGA ATA GTA AGT A-3',内参GAPDH引物上游为5'-TCC CTC AAC ATT GTC AGC AA-3',下游为5'-AGC TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'。OPG和GAPDH扩增产物的大小分别为265 bp和309 bp。反应产物行1.5%琼脂糖凝胶电泳,对凝胶进行DNA光密度扫描,显色条带经图像分析系统检测其灰度值,与内参的比值为mRNA表达水平。

## 1.6 骨保护素蛋白表达的检测

切片脱蜡、水化,PBS洗两次,各5 min;用PBS配置新鲜的3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,室温封闭5~10 min,蒸馏水洗3次;用枸橼酸盐缓冲液微波抗原修复15 min,PBS洗5 min;滴加5% BSA 封闭液,室温20 min;滴加兔抗OPG(1:100)多克隆抗体,4℃过夜,PBS冲洗3次后,依次滴加生物素化羊抗兔IgG(二抗)、SABC复合物(三抗),分别于37℃孵育20 min。最后滴加二氨基联苯胺(DAB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显色液。蒸馏水充分冲洗、复染、封片、镜检。阴性对照以正常血清替代一抗。通过HPIAS-1000型全自动医学彩色图像分析软件进行图像分析,经标准灰度校正后,随机取5个视野,测定OPG平均光密度值。

## 1.7 统计学方法

应用SPSS12.0统计软件包进行统计分析。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间差异采用 $t$ 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 主动脉 Von Kossa 染色情况

钙化组主动脉中膜见局灶或成片状黑色深染结构,为钙化的主动脉;阿伦膦酸钠组可见黑色深染结构明显减少;正常对照组则无此变化(图1)。

## 2.2 大鼠主动脉壁钙含量

钙化组主动脉壁钙含量比对照组明显增加(114.31±23.23 μmol/g比12.83±2.31 μmol/g, $P < 0.01$ ),阿伦膦酸钠组主动脉壁钙含量(67.33±19.86 μmol/g)比钙化组明显减少( $P < 0.01$ )。

## 2.3 阿伦膦酸钠对骨保护素 mRNA 表达的影响

钙化组OPG mRNA的表达较对照组明显减少

( $P < 0.05$ ), 阿伦膦酸钠组 OPG mRNA 的表达较钙化组明显增加( $P < 0.05$ , 表 1 和图 2)。

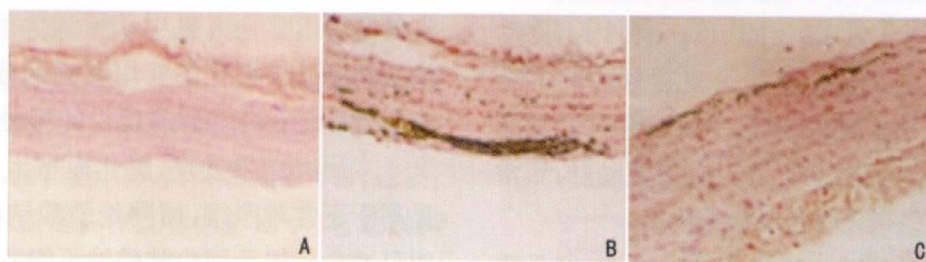


图 1. 主动脉 Von Kossa 染色( $\times 20$ ) A 为对照组, B 为钙化组, C 为阿伦膦酸钠组。

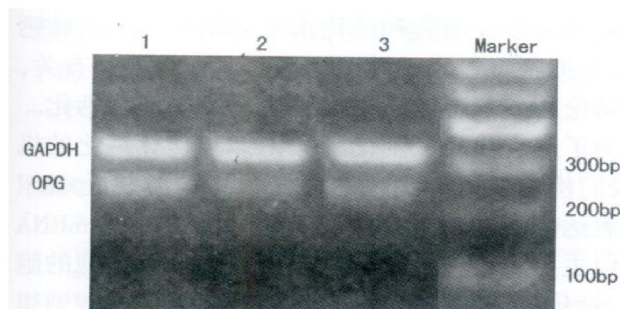


图 2. 大鼠主动脉骨保护素 mRNA 的表达 1 为对照组, 2 为钙化组, 3 为阿伦膦酸钠组。

#### 2.4 阿伦膦酸钠对骨保护素蛋白表达的影响

正常对照组有 OPG 表达, 表现为细胞质内呈现

棕黄色物质; 钙化组细胞质内棕黄色物质明显减淡, 着色区域明显减少; 与钙化组比较, 阿伦膦酸钠组细胞质内棕黄色物质染色加深, 区域增多。阿伦膦酸钠 OPG 蛋白的表达与钙化组相比差异显著( $P < 0.05$ , 表 1 和图 3)。

表 1. 骨保护素 mRNA 和蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| 分 组    | OPG mRNA           | OPG 蛋白                |
|--------|--------------------|-----------------------|
| 对照组    | $37.67 \pm 1.46$   | $0.3079 \pm 0.0867$   |
| 钙化组    | $33.73 \pm 1.38^a$ | $0.1711 \pm 0.0992^a$ |
| 阿伦膦酸钠组 | $36.27 \pm 0.57^b$ | $0.2924 \pm 0.0614^b$ |

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与钙化组比较。

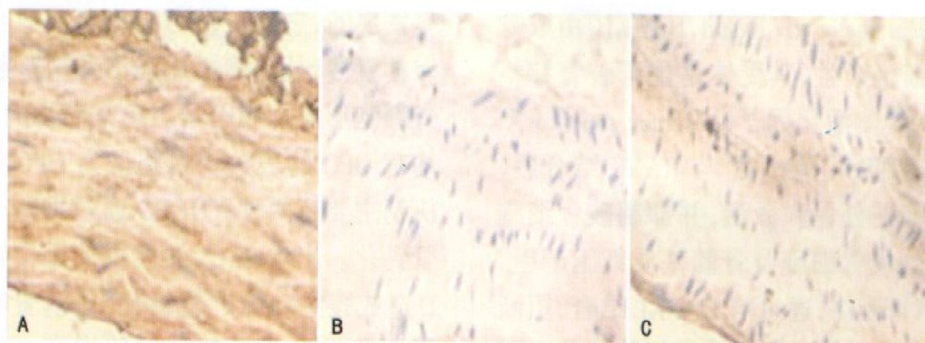


图 3. 大鼠主动脉骨保护素免疫组织化学染色( $\times 400$ ) A 为对照组, B 为钙化组, C 为阿伦膦酸钠组。

### 3 讨论

血管钙化是老年人单纯收缩期高血压、动脉粥样硬化、动脉硬化性肾病、糖尿病及骨质疏松等多种疾病的病理基础, 在临床上常见于冠心病、老年退行性心脏病、糖尿病及慢性肾功能不全患者。血管钙化是导致临床心血管事件(心肌梗死、血管成形术后内膜撕裂等)的重要危险因素。但血管钙化形成的具体机制尚不清楚。目前还没有特效药物来彻底预防或消除血管钙化的产生。因此探讨血管钙化的发病机制及其影响因素对降低心血管疾病的发病率及死亡率, 维护人群特别是老年人群生命健康具有特

殊重要的意义。

本研究采用 Price 等<sup>[7]</sup> 方案制备动脉中膜钙化模型。华法林和维生素 D<sub>3</sub> 合用诱导大鼠动脉钙化。主要是由于华法林能够影响维生素 K 依赖性谷氨酸  $\gamma$ -羧化、抑制  $\gamma$ -羧基谷氨酸(gamma-carboxyglutamic acid, Gla) 的形成, 从而阻碍了基质 Gla 蛋白(matrix Gla protein, MGP) 的正常羧化<sup>[8]</sup>。MGP 由动脉血管平滑肌细胞和巨噬细胞分泌, 是一种非常重要的血管钙化抑制蛋白<sup>[9]</sup>。此外大剂量的维生素 D<sub>3</sub> 刺激破骨细胞的功能而促进骨吸收维生素 D<sub>3</sub>, 使血浆钙含量增高而导致钙沉积在血管壁上。Price 等<sup>[7]</sup> 研究发现, 单独用华法林 150 mg/kg, 2 次/天, 大鼠 2

周以后出现动脉钙化,为有效防止华法林引起的出血,同时给予维生素 K<sub>1</sub> 15 mg/kg, 1 次/天皮下注射;而如果同时合用维生素 D<sub>3</sub> 3 MU/(kg·d), 3 天,则动脉钙化可在 1 周内出现。本研究也得到相同的结果。钙化模型组 Von Kossa 染色发现主动脉中膜有局灶或成片状黑色深染结构,为钙化的主动脉;正常对照组主动脉中膜则无黑色深染结构。

动脉钙化和骨质疏松症常常同时发生,即骨质疏松症患者经常同时存在动脉粥样硬化和动脉钙化,尤其多见于同时患有心脑血管疾病的老年患者、雌激素缺乏及自身免疫性疾病患者。多项研究显示骨质疏松症和动脉钙化间存在某种关联,如绝经后妇女在发生动脉粥样斑块钙化的同时发生骨量丢失<sup>[10]</sup>;外周动脉(颈动脉或下肢动脉)出现钙化者中 63% 伴有腰椎骨矿密度(bone mineral density, BMD)降低,93% 伴随近端股骨 BMD 降低<sup>[11]</sup>。最近的临床研究结果发现,动脉钙化与骨密度下降以及骨质疏松性骨折相关,而与年龄无关。提示无论是青年人还是老年人,检测到动脉钙化就意味发生骨质疏松症以及骨折的危险性增大<sup>[12]</sup>。这些研究结果提示有共同的因素参与了骨质疏松症和血管钙化的发生,目前认为这个共同的因素就是 RANKL/RANK/OPG 系统<sup>[13]</sup>。核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配基(receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand, RANKL)由成骨细胞及骨髓基质细胞产生,其受体是位于破骨细胞膜上的核因子  $\kappa$ B 受体活化因子(receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B, RANK)。RANKL 与 RANK 结合后,可以促进破骨细胞的分化和激活,并抑制破骨细胞凋亡。OPG 分子由成骨细胞及骨髓基质细胞产生,作为 RANKL 的诱饵受体,通过与 RANKL 结合,阻断 RANKL 与 RANK 结合,从而抑制破骨细胞分化和成熟。OPG 与血管钙化的关系首先是在 OPG 基因缺陷动物上发现的。敲除 OPG 基因的小鼠除了骨质疏松症的表现外,还可见到主动脉和肾动脉钙化<sup>[12]</sup>,用基因重组 OPG 治疗则可防止骨质疏松症和血管钙化的发生并可逆转骨质疏松症<sup>[3]</sup>。提示 OPG 在维持动脉正常结构中的重要作用,使 OPG 在预防血管异位钙化过程中的重要作用受到人们关注。

既然血管钙化和骨质疏松症有共同的发病机制,那么治疗骨质疏松症的药物是否也能治疗血管钙化呢?临床上用于治疗骨质疏松的药物阿伦磷酸钠为氨基二磷酸盐骨吸收抑制剂,与钙和羟基磷灰石有高度亲和力,因此能在骨组织蓄积。它结合在骨组织表面,被破骨细胞吞噬后,能诱发破骨细胞凋亡,抑制破骨细胞的功能。Paul 等<sup>[14]</sup>研究发现,阿

伦磷酸钠可以抑制动脉钙化,且其剂量与治疗骨质疏松症的剂量相同,但其具体机制尚不清楚。因此本研究通过建立大鼠主动脉钙化模型,观察阿伦磷酸钠抑制动脉钙化的作用及其部分相关机制,进一步明确动脉钙化和骨质疏松的相关性。

本研究结果发现,钙化模型组主动脉钙含量明显高于正常对照组,而阿伦磷酸钠组主动脉钙含量明显减少。提示阿伦磷酸钠可能通过在动脉壁影响钙代谢而抑制动脉钙化。李寰等<sup>[15]</sup>研究发现用阿伦磷酸钠可以在细胞和动物水平抑制大鼠主动脉钙化,并与抑制炎症因子肿瘤坏死因子  $\alpha$  的表达有关,说明阿伦磷酸钠可以通过多种途径抑制动脉钙化。

为了进一步研究阿伦磷酸钠抑制动脉钙化的机制,我们检测了阿伦磷酸钠对大鼠主动脉钙化组织 OPG 表达的影响。结果发现正常对照组 OPG mRNA 和蛋白主要表达于主动脉中层血管平滑肌细胞的胞质中,钙化模型组其表达明显减少,而阿伦磷酸钠组中的表达明显增多。提示阿伦磷酸钠抑制动脉钙化的作用与增加 OPG 的表达有关。张江蓉等<sup>[16]</sup>发现复方丹参滴丸通过减少 OPG 在血管中的表达而抑制血管钙化,并能将钙转移到骨骼刺激骨形成。因此 OPG 对血管的作用目前还不清楚。OPG 是 1997 年 Tsuda 等在人胚胎肺成纤维细胞 IMR90 的培养基里发现的,它是一种可以抑制破骨细胞形成的分泌型糖蛋白,是肿瘤坏死因子受体超家族成员,也称破骨细胞形成抑制因子。正常动物的主动脉及肾动脉均有 OPG 的表达。目前认为 OPG 抑制动脉钙化的机制主要有两种: OPG 通过抑制骨吸收而抑制血管钙化。出生 22 天的大鼠使用中毒剂量的维生素 D 造成腹主动脉严重钙化,血清骨吸收指标即 iv 型胶原交联 N-端肽较对照组增高 160%,如用维生素 D 4 天的同时加用 OPG 1 mg/d,可见动脉钙化明显减少,同时 iv 型胶原交联 N-端肽下降至对照组水平,且动脉血管壁的血钙、磷酸盐水平下降了 90%<sup>[17]</sup>。④OPG 直接作用于血管细胞,通过抑制细胞凋亡抑制血管钙化。在骨组织钙化过程中细胞凋亡是一个重要环节,血管钙化过程也是如此。胎鼠长骨皮质的钙化过程中有细胞坏死,而且对体外钙化的人血管平滑肌细胞钙化结节的透射电镜观察也发现结节内有大量的坏死细胞。OPG 是肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)的可溶性受体,可以直接结合 TRAIL,从而阻止后者与其受体结合产生的诱导细胞凋亡的作用,从而增强细胞存活。Schoppet 等<sup>[18]</sup>研究发现在血管钙化部位有增强的细胞凋亡,且血管中膜有

OPG 的免疫反应和 mRNA 的表达。已有研究发现 OPG 可能抑制内皮细胞凋亡。Pritzker 等<sup>[19]</sup>通过培养鼠主动脉内皮细胞发现,在骨桥蛋白  $\alpha v\beta_3$  存在的情况下,OPG mRNA 及蛋白水平上调且延长细胞存活时间。由此推测 OPG 很可能就是通过抑制 TRAIL 介导的血管细胞凋亡进而从而抑制血管疾病进展。目前研究认为 OPG 是一种血管保护因子,它通过抑制骨吸收及细胞凋亡抑制血管钙化。

总之,通过本研究表明阿伦膦酸钠能通过影响动脉壁局部钙代谢及增加血管钙化组织中 OPG 因子的表达等途径抑制动脉钙化。其具体机制仍需进一步的体内与体外研究加以阐明。

#### [参考文献]

- [1] Raggi P, Callister TQ, Covil B, et al. Identification of patients at increased risk of first unheralded acute myocardial infarction by electron-beam computed tomography [J]. *Circulation*, 2000, **101**: 850-855.
- [2] Raggi P, Covil B, Callister TQ. Use of electron beam tomography data to develop models for prediction of hard coronary events [J]. *Am Heart J*, 2002, **141**: 375-382.
- [3] Doherty TM, Detrano RC. Coronary arterial calcification as an active process: a new perspective on an old problem [J]. *Calcif Tissue Int*, 1994, **54**: 224-230.
- [4] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification [J]. *Genes Dev*, 1998, **12** (9): 1 260-268.
- [5] Min H, Morony S, Sarosi I, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis [J]. *Exp Med*, 2000, **192** (4): 463-474.
- [6] Hak AE, Pols HA, van Hemert AM, et al. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 1 926-931.
- [7] Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 317-327.
- [8] Danziger J. Vitamin K-dependent proteins, warfarin, and vascular calcification [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008, [Epub ahead of print].
- [9] Mori K, Shioi A, Jono S, et al. Expression of matrix Gla protein (MGP) in an vitro model of vascular calcification [J]. *FEBS Lett*, 1998, **433**: 19-22.
- [10] Farhat GN, Cauley JA, Matthews KA, et al. Volumetric BMD and vascular calcification in middle-aged women: the Study of Women's Health Across the Nation [J]. *Bone Miner Res*, 2006, **21** (12): 1 839-846.
- [11] Pennisi P, Signorelli SS, Riccobene S, et al. Low bone density and abnormal bone turnover in patients with atherosclerosis of peripheral vessel [J]. *Osteoporos Int*, 2004, **15**: 389-395.
- [12] Ishimura E, Shioi A. Mechanism of arterial calcification with regards to atherosclerotic calcification and medial artery calcification [J]. *Clin Calcium*, 2005, **15**: 137-142.
- [13] Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2007, **5**: 98-104.
- [14] Paul A, Samuel A, Matthew K, et al. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 817-824.
- [15] 李 寰, 贾国良, 王海昌, 等. 阿伦膦酸钠在大鼠动脉钙化中的作用 [J]. *中华内科杂志*, 2006, **45** (6): 489-492.
- [16] 张江蓉, 王一尘, 沈 丽, 等. 复方丹参滴丸抑制血管异位钙化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (5): 571-574.
- [17] Price P, June H, Buckley J, et al. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 1 610-616.
- [18] Schoppet M, Al-Fakhri N, Franke FE et al. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Monckeberg's sclerosis and atherosclerosis [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2004, **89**: 4 104-112.
- [19] Pritzker L, Scatena M, Giachelli C. The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival [J]. *Molec Biol Cell*, 2004, **15**: 2 834-841.

(此文编辑 文玉珊)