

吡格列酮对糖尿病大鼠血管钙化的影响及机制

车星星, 边云飞, 卫娜, 王泽慧, 肖传实

(山西医科大学第二医院, 山西省太原市 030001)

[关键词] 血管钙化; 糖尿病; 吡格列酮; 骨保护素

[摘要] **目的** 研究吡格列酮对糖尿病大鼠血管钙化的影响及其可能机制。**方法** 将 36 只 SD 雄性大鼠随机平均分为 6 组: 对照组、糖尿病组、钙化组、糖尿病 + 钙化组、钙化 + 吡格列酮组、糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组; 建立大鼠血管钙化模型(维生素 D3 + 华法林)和糖尿病模型(链尿佐菌素); 并对血管组织进行 Von Kossa 染色、钙含量和碱性磷酸酶活性检测, qRT-PCR 检测 mRNA 表达, 免疫组织化学法检测骨保护素蛋白表达。**结果** 钙化组血管平滑肌细胞及其间质内有大量黑色颗粒沉积; 糖尿病 + 钙化组较糖尿病组和钙化组血管组织钙含量、碱性磷酸酶活性分别升高 3.63 倍、1.35 倍和 3.69 倍、1.30 倍($P < 0.05$), 骨保护素 mRNA 含量及其蛋白表达降低($P < 0.05$); 糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组较糖尿病 + 钙化组钙含量、碱性磷酸酶活性分别下调 13.70%、18.04% ($P < 0.05$), 骨保护素 mRNA 含量及其蛋白表达升高($P < 0.05$)。**结论** 吡格列酮可以减轻血管钙化程度并上调骨保护素 mRNA 含量及蛋白表达, 骨保护素可能是抑制血管钙化主要因素之一。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effect and Mechanism of Pioglitazone on Vascular Calcification in Diabetic Rats

CHE Xing-Xing, BIAN Yun-Fei, WEI Na, WANG Ze-Hui, and XIAO Chuan-Shi

(The Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Vascular Calcification; Diabetes; Pioglitazone; Osteoprotegerin

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect and mechanism of pioglitazone on vascular calcification (VC) in diabetic rats. **Methods** Rat model of vascular calcification and diabetes (DM) was established by injection of vitamin D3 plus warfarin and streptozocin (STZ). Thirty six ten-week-old male SD rats were randomly divided into six groups: control group, DM group, VC group, VC + DM group, VC + PIO group, VC + DM + PIO group. Calcification was confirmed by Von Kossa staining, and calcium content and alkaline phosphatase (ALP) activity of the vascular tissue were measured. The expression of osteoprotegerin (OPG) mRNA and protein were examined by qRT-PCR and immunohistochemistry.

Results Massive black granules were observed in the vascular smooth muscle cells and interstitial tissue by Von Kossa staining in VC group and VC + DM group. Calcium content and ALP activity of VC + DM group were 3.63 times and 1.35 times higher than DM group, and 3.69 times and 1.30 times ($P < 0.05$) higher than VC group, but the expression of OPG mRNA and protein were reduced ($P < 0.05$). Calcium content and ALP activity of VC + DM + PIO group decreased 13.70% and 18.04% than VC + DM group ($P < 0.05$), but the expression of OPG mRNA and protein increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Pioglitazone can reduce the degree of vascular calcification and increase the expression of OPG mRNA and protein. OPG is likely to be one of the main factors of inhibiting vascular calcification.

血管钙化是发生于大中动脉血管壁钙盐的过度沉积的异位钙化现象, 是动脉粥样硬化、糖尿病、高血压病、慢性肾功能不全等多种疾病的共同病理生理基础^[1]。糖尿病是中重度血管钙化独立的危险因素^[2]。糖尿病患者心血管疾病的发生率、病死率以及血管钙

化的发生率均明显高于普通人群^[3]。最近研究显示, 血管钙化的早期过程是与骨发育过程相似的可预防、可逆转、可调控的主动生物学过程^[4]。使骨骼中钙向动脉壁转移的最重要的影响因素是体内的骨保护素 (osteoprotegerin, OPG), OPG 基因敲除小鼠在成熟前

[收稿日期] 2012-01-05

[作者简介] 车星星, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 xingxingche@163.com。边云飞, 博士, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 yunfeibian@sina.com。通讯作者肖传实, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 ganxibaozhongxin@sina.com。

除了存在严重骨质疏松症外,还存在主动脉和肾动脉钙化^[5],用基因重组 OPG 治疗可防止骨质疏松症和血管钙化的发生并逆转骨质疏松症^[6]。本研究拟用华法林和维生素 D3 诱导大鼠血管钙化模型,初步探索吡格列酮对糖尿病大鼠血管钙化的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

健康 10 周龄 SD 大鼠 36 只,清洁型,体重 200 ~ 250 g,由山西医科大学动物实验中心提供(批号为 SCXK(晋)2009-0001)。华法林购于上海信宜药厂有限公司,维生素 K1 购于上海第一生化药业有限公司,维生素 D3 购自上海通用药业有限公司,链尿佐菌素(STZ)干粉购于美国 Sigma 公司;骨保护素一抗(羊抗鼠)、二抗(羊抗兔)及封闭液购自北京博奥森公司;反转录及 PCR 试剂购自 TAKARA 公司,其余试剂均为市售分析纯;碱性磷酸酶(ALP)活性测定试剂盒、钙离子测定试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购自南京建成科技有限公司。

1.2 实验分组及糖尿病模型、血管钙化模型的制备

标准饲料适应性喂养 1 周后随机平均分为 6 组,每组 6 只:对照组、糖尿病组、钙化组、糖尿病 + 钙化组、钙化 + 吡格列酮组、糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组。

以开始建立糖尿病大鼠模型当天定为实验的第 1 天。糖尿病组、糖尿病 + 钙化组和糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组大鼠按 60 mg/kg 腹腔注射含有 STZ 的枸橼酸三钠-枸橼酸缓冲液制备 1 型糖尿病模型,对照组、钙化组和钙化 + 吡格列酮组腹腔注射相应体积的无菌枸橼酸三钠-枸橼酸缓冲液,第 4 天开始采用血糖仪测定各组大鼠尾静脉血糖值,以血糖 ≥ 16.7 mmol/L 作为 1 型糖尿病模型建立成功的标准。

根据 Price 等^[7]报道的方法制备大鼠血管钙化模型,钙化组、糖尿病 + 钙化组、钙化 + 吡格列酮组、糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组给予皮下注射华法林 15 mg/kg,每天 2 次,持续 5 天,以及维生素 D3 30 万 U/kg,每天一次,持续 3 天,为防止华法林引起出血,第 3 天开始注射维生素 K1 15 mg/kg,每天一次,持续 6 天,其余各组用等量生理盐水替代注射,第 9 天大鼠血管钙化模型建成;钙化 + 吡格列酮组、糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组大鼠从第 10 天开始予吡格列酮 15 mg/kg 灌胃,每天一次,依血糖情况调

整剂量,控制血糖到正常范围,持续 3 周,其余各组用等量生理盐水替代。

各组动物常规饲养,定期称体重以调整用药量,实验第 30 天用 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,取长 10 mm 左右胸主动脉,去除外膜脂肪组织后用 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋后切片,其余胸主动脉用去离子水冲掉残存在动脉腔及表面血液,迅速置于干净 EP 管中, -70℃ 冰箱冻存,按不同的检测要求处理进行检测。

1.3 Von Kossa 染色

石蜡切片脱蜡至水,2% 硝酸银水溶液浸染,良好的太阳光下照射 30 min,蒸馏水冲洗 3 min,3% 硫代硫酸钠水溶液浸染 5 min,再次用蒸馏水冲洗 3 min,5% 碱性品红复染 2 min,经脱水、透明、树胶封片。显微镜下观察动脉钙化。

1.4 胸主动脉钙沉积含量测定

取约 10 mg 胸主动脉用 4℃ 的去离子水冲洗,在 60℃ 的恒温箱中烤至恒重,加入 65% 的浓硝酸 4 mL,72% 的高氯酸 1 mL,室温消化 12 h 后,将消化管放于自控电热消化器上,120℃ 消化至酸全部挥发,管底析出白色结晶,冷却后加入去离子水,定容至 5 mL,按照钙离子测定试剂盒说明书,采用钙离子在碱性溶液中与甲基百里香酚蓝结合,生成蓝色络合物,通过比色与同样处理的钙标准液进行比较,可计算出胸主动脉组织钙的含量($\mu\text{mol/gropt}$)。

1.5 胸主动脉碱性磷酸酶活性的测定

取约 10 mg 胸主动脉,以等渗 PBS 制备组织匀浆,4℃ 8000 r/min 离心 10 min,吸取上清液;考马斯亮蓝法进行蛋白含量测定;按照 ALP 测定试剂盒说明书,由于 ALP 在碱性环境下,分解磷酸苯二钠,产生游离酚和磷酸,酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉作用,经铁氰化钾氧化形成红色醌衍生物,根据红色深浅可以测定酶活力的高低(U/gropt)。

1.6 实时定量 PCR 测定骨保护素 mRNA 含量

依据文献检索及 Primer 5.0 软件对 OPG 引物及内参 GAPDH 引物进行设计并验证,由上海生工生物有限公司进行合成。OPG 上游引物为 5'-GAA TGG TCA CTG GGC TGT TT-3',下游引物为 5'-GAG GAA GGA AAG GGC CTA TG-3';内参 GAPDH 上游引物为 5'-TGA ACG GGA AGC TCA CTG G-3',下游引物为 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。取出 -70℃ 冰箱冻存各组血管组织,提取总 RNA 并检测其含量及质量,逆转录成 cDNA 后进行目的基因扩增。反应体系 20 μL ,反应条件为 95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 30 s,共 40 个循环,使用 ABI prism7000 荧

光定量 PCR 分析仪进行扩增及定量分析。反应结束,确认 PCR 的扩增曲线和溶解曲线,各组 PCR 均重复 3 次。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行 mRNA 相对定量分析。

1.7 骨保护素蛋白表达的检测

石蜡切片脱蜡、梯度水化处理;用 3% H_2O_2 消除内源性过氧化物酶 15 min,抗原修复;用 EDTA (pH = 9.0) 高压锅煮沸热修复 2.5 min, PBS 洗 3 次,各 3 min;山羊血清封闭液 (1:10) 封闭 10 min;甩掉封闭液,滴加一抗:兔抗鼠 OPG (1:200) 多克隆 IgG, 4℃ 过夜;PBS 洗 3 次,各 3 min,滴加辣根过氧化物酶标记二抗:山羊抗兔 IgG (1:300), 37℃ 湿盒孵育 30 min;DAB 液显色,根据显色深浅决定显色时间,蒸馏水终止反应,苏木素复染、脱水封片、镜检。镜检结果细胞内有明显棕黄色颗粒为阳性,不着色为阴性,阴性对照以正常血清替代一抗。Image-Pro Plus 6.0 病理图像分析软件进行图像分析,设定标准灰度,随机取 6 个不重叠的表达阳性视野,测定免疫组织化学切片 OPG 平均光密度值。

1.8 统计学分析

应用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间差异采用 One-Way ANOVA 比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胸主动脉 Von Kossa 染色情况

对照组和糖尿病组未见钙质沉积;钙化组血管中膜可见黑色颗粒的钙质沉积。钙化 + 吡格列酮组较钙化组钙质沉积无明显差别;糖尿病 + 钙化组血管中膜可见广泛的钙质沉积,部分中膜弹力纤维素乱、断裂,较钙化组钙质沉积加重 (图 1)。

2.2 胸主动脉钙沉积含量的变化情况

糖尿病组血管组织钙含量比对照组升高 17.19%,但两组差异无统计学意义;钙化组较对照组升高 3.14 倍 ($P < 0.05$),糖尿病 + 钙化组钙含量较糖尿病组和钙化组分别升高 3.63 倍和 1.35 倍 ($P < 0.05$),钙化 + 吡格列酮组钙含量与钙化组差异无显著性,糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组钙含量较糖尿病 + 钙化组下降 13.70% ($P < 0.05$),差异有统计学意义 (表 1)。

2.3 胸主动脉碱性磷酸酶活性变化情况

糖尿病组和钙化组血管组织 ALP 活性较对照组升高 1.45 倍和 4.12 倍,差异有统计学意义 ($P <$

0.05);糖尿病 + 钙化组 ALP 活性较糖尿病组和钙化组升高 3.69 倍和 1.30 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);钙化 + 吡格列酮组 ALP 活性较钙化组降低 5.14%,但差异无统计学意义;糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组 ALP 活性较糖尿病 + 钙化组降低 18.04% ($P < 0.05$),差异有显著性 (表 1)。

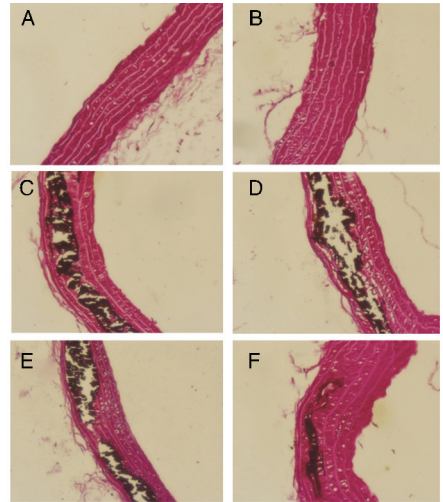


图 1. 大鼠血管组织 Von Kossa 染色图片 A 为对照组, B 为糖尿病组, C 为钙化组, D 为糖尿病 + 钙化组, E 为钙化 + 吡格列酮组, F 为糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组。

Figure 1. The pictures of rat blood vessels in different groups by Von Kossa staining

表 1. 大鼠血管钙含量及碱性磷酸酶活性变化

Table 1. The levels of calcium content, activity of ALP in different groups

分 组	钙含量 ($\mu\text{mol/gropt}$)	ALP 活性 (U/gropt)
对照组	18.27 \pm 1.36	18.83 \pm 1.48
糖尿病组	21.41 \pm 2.55	27.28 \pm 5.08 ^a
钙化组	57.37 \pm 5.25 ^a	77.60 \pm 7.11 ^a
糖尿病 + 钙化组	77.71 \pm 6.42 ^{bc}	100.73 \pm 7.27 ^{bc}
钙化 + 吡格列酮组	56.46 \pm 6.07 ^a	73.61 \pm 5.20 ^a
糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组	67.06 \pm 2.41 ^d	82.56 \pm 9.11 ^d

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与钙化组比较; c 为 $P < 0.05$, 与糖尿病组比较; d 为 $P < 0.05$, 与钙化 + 吡格列酮组比较。

2.4 吡格列酮对骨保护素 mRNA 表达的影响

糖尿病组和钙化组血管组织 OPG mRNA 含量较对照组减低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);糖尿病 + 钙化组血管组织 OPG mRNA 含量最低,与糖尿病组和钙化组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组血管组织 OPG

mRNA 含量较糖尿病 + 钙化组有所增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 钙化 + 吡格列酮组血管组织 OPG mRNA 含量与钙化组相比差异无统计学意义 (表 2)。

2.5 吡格列酮对骨保护素蛋白表达的影响

对照组 OPG 表达最高, 细胞质内呈现棕黄色物质; 糖尿病组、钙化组、糖尿病 + 钙化组着色区域面积明显减少, 细胞质内棕黄色物质变淡, OPG 平均光密度差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组血管组织 OPG 表达较糖尿病 + 钙化组着色区域有所增加 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义 (表 2 和图 2)。

表 2. 吡格列酮对骨保护素 mRNA 和蛋白表达的影响

Table 2. Effect of pioglitazone on expression of OPG mRNA and protein

分 组	mRNA	蛋白
对照组	1.00	0.5210 ± 0.0667
糖尿病组	0.88 ± 0.02 ^a	0.4314 ± 0.1415 ^a
钙化组	0.42 ± 0.02 ^a	0.2833 ± 0.1139 ^a
糖尿病 + 钙化组	0.23 ± 0.09 ^{bc}	0.1603 ± 0.0476 ^{bc}
钙化 + 吡格列酮组	0.42 ± 0.05 ^a	0.2937 ± 0.0655 ^a
糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组	0.39 ± 0.03 ^d	0.2536 ± 0.0955 ^d

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与钙化组比较; c 为 $P < 0.05$, 与糖尿病组比较; d 为 $P < 0.05$, 与钙化 + 吡格列酮组比较。

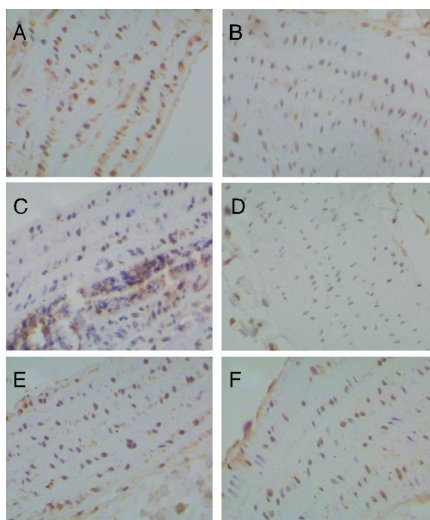


图 2. 免疫组织化学染色检测大鼠血管组织骨保护素蛋白表达 A 为对照组, B 为糖尿病组, C 为钙化组, D 为糖尿病 + 钙化组, E 为钙化 + 吡格列酮组, F 为糖尿病 + 钙化 + 吡格列酮组。

Figure 2. OPG protein expression of rat blood vessels was measured by immunohistochemical staining

3 讨 论

血管钙化增加血管的硬度, 降低血管顺应性, 增加了血管成形术中斑块和血管破裂的风险, 是影响冠心病发生、发展及预后的危险因素^[8]。本实验采用 Price 等^[7]报道的方法制备大鼠血管钙化模型, 为降低华法林对大鼠致死率, 调整剂量为 15 mg/kg, 每天 2 次。华法林通过拮抗维生素 K1 而抑制羧化基质 Gla 蛋白的生物合成发挥其致动脉钙化的作用。维生素 D3 诱导血管钙化的作用与其升高血钙有关, 其血管钙化效应与血清钙水平呈正相关^[9]。

血管钙化主要表现为钙磷产物在动脉壁的细胞间和细胞内的聚集, 细胞外的钙磷升高诱导血管平滑肌细胞向成骨细胞样表型转化。骨和软骨钙化形成的最初位点是称为基质小泡的细胞产物, 基质小泡^[10]是细胞外的一种膜包裹结构, 在钙化的动脉中可见相似的结构。Proudfoot 等^[11]研究发现基质小泡来源于血管平滑肌细胞衍生的凋亡小体。ALP 是钙盐沉积过程中重要的酶, ALP 可水解磷酸酯键而提高磷酸根浓度, 为羟磷灰石结晶形成提供底物, 还可以水解焦磷酸盐, 解除后者对磷酸钙生成的抑制, 是血管钙化形成过程中的重要环节。

血管钙化主要发生在动脉中层, OPG 失活将加快动脉粥样硬化进展^[12], 冠状动脉平滑肌细胞有丰富的 OPG mRNA 及蛋白表达, OPG 可能抑制破骨细胞 (OC) 分化、活化、成熟。OPG 是细胞核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 的诱导受体, RANK 是一种肿瘤坏死因子受体蛋白, 位于破骨前体细胞上, 能被 RANKL 识别, 各种刺激骨吸收的因子作用于成骨细胞, 诱导其膜上表达 RANKL, RANKL 再与破骨细胞上的 RANK 结合, 通过 c-Jun N-末端激酶 (JNK) 信号传导通路、核因子 κ B 途径、Akt 途径等介导破骨细胞的成熟。OPG 是 RANKL 的诱饵受体, 通过竞争结合 RANKL, 减少 RANKL 与破骨细胞表面核因子 κ B 受体活化因子 (RANK) 结合, 抑制破骨细胞的活化成熟, 抑制骨吸收, 增加骨量而减少血管钙化。OPG 还可影响 OC 的存活, 通过直接减少 OC 数量来抑制溶骨作用; 还可通过抑制细胞凋亡, 降低血钙而减轻血管钙化。细胞凋亡是血管钙化的一个重要环节, Son 等^[13]的研究证实他汀类药物通过抑制细胞凋亡而抑制血管钙化。Schoppert 等^[14]研究发现在血管钙化部位有增强的细胞凋亡, 血管中膜有 OPG 的免疫反应和 mRNA 的表达。OPG 是凋亡诱骗受体, 通过抑制 TRAIL 介导细胞凋

亡而阻止钙化。

糖尿病患者发生血管钙化的指数明显高于普通人群,钙化的形成主要与高糖血症、高胰岛素血症、氧化应激、细胞凋亡、脂质紊乱、炎症等诱导血管平滑肌细胞向成骨细胞样表型转化。吡格列酮是人工合成型PPAP γ 的高度亲和性配体激动剂,属噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂,可以改善代谢和胰岛素抵抗用以治疗糖尿病。本研究发现,钙化组、糖尿病+钙化组胸主动脉钙含量、ALP活性明显高于对照组,OPG mRNA含量及蛋白表达降低,钙化+吡格列酮组与钙化组比较无明显差异,但糖尿病+钙化+吡格列酮组较糖尿病+钙化组的钙含量、ALP活性下降,且OPG mRNA及蛋白表达上调。提示吡格列酮可能通过降糖效应,增加胰岛素敏感性,减小高糖作用引起血管病变。多种组织细胞可表达PPAP γ ,如脂肪组织、肝脏、心脏、肾脏、内皮细胞、血管平滑肌细胞、巨噬细胞和T细胞,吡格列酮激活PPAP γ 后,改善氧化应激、保护内皮细胞、减少炎症、抑制平滑肌细胞增殖等作用减轻血管钙化^[15]。总之,糖尿病状态下血管钙化的发生是复杂的、多因素作用的过程,OPG作为血管钙化重要的保护因素之一,尽管其抑制血管钙化具体机制仍未阐明,但随着研究的进一步深入,其对血管钙化的预测、治疗及预后判断将具有重大意义。

[参考文献]

- [1] Hofbauer LC, Hofbauer AE. Taking the message to the nucleus: MAD protein as a mediator of bone morphogenetic signaling[J]. *Eur J Endocrinol*, 1996, 135(6): 654-655.
- [2] 王宓,王梅,甘良英,等. 血液透析患者血浆胎球蛋白A水平及其与血管钙化的关系[J]. *中国血液净化*, 2007, 6(5): 263-266.
- [3] Taniwaki H, Ishimura E, Tabata T, et al. Aortic calcification in haemodialysis patients with diabetes mellitus[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20(11): 2472-478.
- [4] Tintut Y, Dmer LL. Recent advances in multifactorial regulation of vascular calcification[J]. *Curr Opin Lipidol*,

2001, 12(5): 555-600.

- [5] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification[J]. *Genes Dev*, 1998, 12(9): 1260-268.
- [6] 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.
- [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(2): 317-327.
- [8] Zhang BH, Wu SY, Pang YZ, et al. Effects of L-arginine and nitric oxide inhibitor on vascular calcification in rats[J]. *Med Sci Clin*, 2003, 23(6): 599-602.
- [9] 段晓辉,齐永芬,唐朝枢. 血管钙化动物模型的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(2): 153-157.
- [10] Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles[J]. *Clin Orthop*, 1995, 314: 266-280.
- [11] Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. The role of apoptosis in the initiation of vascular calcification[J]. *Z Kardiol*, 2001, 90(suppl3): 43-46.
- [12] Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, et al. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE^{-/-}mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(9): 2117-124.
- [13] Son BK, Kozaki K, Iijima K, et al. Statins protect human aortic smooth muscle cells from inorganic phosphate induced calcification by restoring Gas6-Axl survival pathway[J]. *Circ Res*, 2006, 98(8): 1024-031.
- [14] Schoppert 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(8): 4104-112.
- [15] 李蓉,蔡辉. 吡格列酮抗动脉粥样硬化作用的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(9): 785-790.

(此文编辑 许雪梅)