

肾素通过非血管紧张素Ⅱ途径促进大鼠血管平滑肌细胞钙化

王刚¹, 边云飞², 白瑞², 张娜娜¹, 肖传实¹

(1. 山西医科大学第一临床医学院心内科, 2. 山西医科大学第二临床医学院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 血管钙化; 肾素; 血管平滑肌细胞; 血管紧张素Ⅱ

[摘要] **目的** 探讨肾素通过非血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)途径对大鼠血管平滑肌细胞钙化的影响及其可能的分子机制。**方法** 采用组织块贴壁法培养原代大鼠主动脉平滑肌细胞,利用β-甘油磷酸钠联合丙酮酸钠制备血管平滑肌细胞钙化模型。细胞随机分为6组:空白对照组(予常规培养基)、钙化组(予钙化培养基)、钙化+AngⅡ受体阻断剂组(予钙化培养基,再予氯沙坦 10^{-6} mol/L和PD_{123,319} 10^{-5} mol/L分别阻断AngⅡ受体AT1、AT2)、钙化+肾素(10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} mmol/L)组(于钙化培养基中,先加入氯沙坦 10^{-6} mol/L和PD_{123,319} 10^{-5} mol/L,再分别予 10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} mmol/L肾素)。用Von Kossa染色鉴定钙化细胞,测定各组细胞中钙含量、碱性磷酸酶(ALP)活性判断钙化程度。用RT-PCR检测成骨细胞标志物核结合因子α1(Cbfa1)和转化生长因子β1(TGF-β1)mRNA表达,Western blot测定各组细胞Cbfa1蛋白含量。**结果** 与空白对照组相比,钙化组钙含量、ALP活性显著增加,Cbfa1和TGF-β1 mRNA及Cbfa1蛋白表达明显增加($P<0.01$)。与钙化组相比,钙化+AngⅡ受体阻断剂组对钙化的影响无统计学差异。与钙化+AngⅡ受体阻断剂组相比,钙化+肾素(10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} mmol/L)组呈剂量依赖地促进大鼠血管平滑肌细胞的钙含量、ALP活性,以及Cbfa1和TGF-β1 mRNA及Cbfa1蛋白表达($P<0.05$)。**结论** 肾素可通过非AngⅡ途径作用促进β-甘油磷酸钠诱导的血管平滑肌细胞钙化,其作用可能与TGF-β1、Cbfa1表达上调有关。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Renin Increases Calcification of Rat Vascular Smooth Muscle Cells Through Angiotensin Ⅱ

WANG Gang¹, BIAN Yun-Fei², BAI Rui², ZHANG Na-Na¹, and XIAO Chuan-Shi¹

(1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Vascular Calcification; Renin; Vascular Smooth Muscle Cell; Angiotensin Ⅱ

[ABSTRACT] **Aim** To explore the impact of renin through angiotensin Ⅱ-independent mechanisms on calcification of rat vascular smooth muscle cells in vitro, and its molecular mechanisms. **Methods** Primary cultured cells were obtained by tissue-piece inoculation. Calcification of cultured rat vascular smooth muscle cells was produced by incubation with β-glycerophosphate and sodium pyruvate. The vascular smooth muscle cells were divided into 6 groups: the blank control group (cultured in normal medium), the calcification group (incubated in calcified medium), the calcification + angiotensin Ⅱ receptor blocker group (cultured in calcified medium, giving Losartan 10^{-6} mol/L to block AT1 and PD_{123,319} 10^{-5} mol/L to block AT2), calcification + renin group (incubated in calcified medium, giving Losartan 10^{-6} mol/L and 10^{-5} mol/L PD123, 319, then added 10^{-10} , 10^{-9} , and 10^{-8} mmol/L renin). Calcification was confirmed by Von Kossa staining. Calcium content and alkaline phosphatase (ALP) activity were measured to estimate the extent of calcification. The mRNA expression of core binding factorα1 (Cbfa1) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) was measured by competitive quantitative RT-PCR. The expression of Cbfa1 protein content was measured by Western blot.

[收稿日期] 2013-01-21

[基金项目] 山西省回国留学人员科研资助项目(2011-110)

[作者简介] 王刚,硕士研究生,研究方向为冠心病基础与临床,E-mail为 sxlfwg@163.com。边云飞,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为冠心病基础与临床,E-mail为 yunfeibian@sina.com。通讯作者肖传实,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为冠心病基础与临床,E-mail为 ganxibaozhongxin@sina.com。

Results Compared with the blank control group, the calcium content and ALP activity of the calcification group increased significantly, as well as the mRNA expression of Cbfa1, TGF- β 1 and the expression of Cbfa1 protein increased significantly ($P < 0.01$). Compared with calcification group, calcification + angiotensin II receptor blocker group had no difference on calcification of vascular smooth muscle cells. Compared with calcification + angiotensin II receptor blocker group, intervention of rennin (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} mmol/L) in a dose-dependent manner further promoted the calcium content and the ALP activity of rat vascular smooth muscle cells, as well as the mRNA expression of Cbfa1, TGF- β 1 and Cbfa1 protein expression ($P < 0.05$). **Conclusions** Renin can promote β -glycerophosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells through angiotensin II-independent mechanisms, the mechanisms of renin promoted calcification of vascular smooth muscle cells through angiotensin II-independent way may be through promoting the expression of TGF- β 1, Cbfa1.

血管钙化是与临床心血管疾病密切相关的一种病理改变,与衰老、动脉粥样硬化性病变、糖尿病及终末期肾病等密切相关,可明显增加各种心血管事件的发生。近年研究表明血管钙化是类似骨组织形成的主动调节过程,血管钙化过程中伴有多种成骨细胞表型标记物表达增多,如碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素、核结合因子 α 1 (core binding factor α 1, Cbfa1) 及转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 等。血管组织局部的活性因子在血管钙化的发生和发展中具有重要的调节作用^[1]。研究证明,肾素通过非血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 途径作用可以引起血管收缩、纤维化、血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖、肥大等^[2],并且研究显示肾素通过非 Ang II 途径可促进动脉粥样硬化的发生^[3],但肾素通过非 Ang II 途径是否促进血管钙化目前尚无报道。本研究在体外 VSMC 钙化模型基础上,探讨肾素通过非 Ang II 途径对血管钙化的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

SD 大鼠由山西医科大学动物实验中心提供。 β -甘油磷酸钠(B-GP)和 PD_{123,319} (Sigma 公司),肾素(AnaSpec 公司),氯沙坦(Cayman Chemical 公司),DMEM 高糖型培养基(Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青公司),抗大鼠 Cbfa1 抗体(Santa 公司),特异性小鼠抗大鼠 SM α -actin 抗体、SP 免疫组化试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司),DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司),钙离子定量检测试剂盒和 ALP 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),余为市售分析纯。

1.2 VSMC 的培养及鉴定

采用组织块贴壁法培养原代大鼠主动脉平滑肌细胞,无菌取 150 g 左右 SD 雄性大鼠胸主动脉中

膜,剪成约 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 小块,贴于培养瓶壁,置于含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的孵箱中进行原代培养。选第 5 代细胞,用特异的 SM α -actin 免疫细胞化学染色进行细胞鉴定。

1.3 钙化 VSMC 的制备及分组

采用第 5~8 代细胞,接种于 6 孔培养板,分别进行下述实验。体外血管钙化模型的建立参照文献[4-6]进行:细胞在常规高糖型 DMEM 培养基中生长至汇合状态后,换为钙化培养基继续培养 14 天,每 2 天换液 1 次。钙化培养基在常规高糖型 DMEM 培养液基础上另含 10 mmol/L β -甘油磷酸(β -GP)、10 mmol/L 丙酮酸钠。实验分为 6 组:空白对照组(予常规 DMEM 培养基)、钙化组(予钙化培养基)、钙化 + AngII 受体阻断剂组(予钙化培养基,氯沙坦 10^{-6} mol/L 和 PD_{123,319} 10^{-5} mol/L 分别阻断 VSMC AngII 受体 AT1 和 AT2)、钙化 + 肾素(10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} mmol/L)组(于钙化培养基中,先加入氯沙坦 10^{-6} mol/L 和 PD_{123,319} 10^{-5} mol/L,30 min 后加入 10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} mmol/L 肾素)。每组设 4 个复孔,细胞每隔 2 天换液 1 次,连续培养 14 天。

1.4 钙化 VSMC 的 Von Kossa 染色

制备细胞爬片,4% 多聚甲醛在室温下固定 15 min,将玻片浸入 1% 硝酸银溶液,紫外线下照射 30 min 后放入 5% 硫代硫酸钠溶液中 1 min,1% 中性红返染 1 min。蒸馏水充分洗涤后脱水、透明、封片,行光镜观察,钙盐沉积处可被染为黑色。

1.5 钙含量测定

每孔细胞用 PBS 洗 2 次,0.6 N 盐酸 37 $^{\circ}$ C 脱钙 24 h,盐酸悬液中钙含量依照钙离子定量检测试剂盒以甲基百里香酚蓝比色法测定。脱钙之后的细胞用 PBS 洗 3 次,0.05 mol/L NaOH/0.1% SDS 溶解 30 min 后,提取胞浆蛋白,总蛋白量用 BCA 法蛋白分析试剂盒测定,钙含量用蛋白含量标化。细胞上清钙含量除以蛋白含量所得比值即为细胞层钙含量。

1.6 ALP 活性测定

用 PBS 缓冲液洗 2 次,加入适量 1% Triton X-100 生理盐水,4℃ 24 h,超声波处理 20 s 后反复吹打,使细胞充分破裂,离心后取上清依照 ALP 检测试剂盒以磷酸苯二钠法测量 ALP 活性。同时提取胞浆蛋白测定蛋白含量,用其校正细胞层 ALP 活性。

1.7 RT-PCR 检测 Cbfa1 和 TGFβ1 mRNA 表达

细胞总 RNA 提取采用 Trizol 一步法。引物序

表 1. Cafα1、TGF-β1 和 β-actin 的引物序列

Table 1. Primer sequence of Cafα1, TGF-β1 and β-actin

名 称	上游引物	下游引物	扩增片段
Cbfa1	5'-GAGCACAAACATGGCTGAGA-3'	5'-TGGAGATGTTGCTCTGTTTCG-3'	238 bp
TGF-β1	5'-CGCAACAACGCCATCTAT-3'	5'-CCAAGGTACGCCAGGAAT-3'	203 bp
β-actin	5'-GTCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3'	5'-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT-3'	184 bp

1.8 Western blot 检测 Cbfa1 蛋白表达

收集细胞,提取总蛋白,取各样本蛋白 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜,封闭后分别加入一抗孵育,洗膜后加入 HRP 标记的二抗孵育,充分洗涤后加入增强发光剂,曝光,洗片后扫描电泳条带进行光密度分析。

1.9 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 VSMC 的鉴定

贴壁的大鼠胸主动脉组织块在培养第 5 天左右可见边缘有少量细胞爬出,呈长梭形或多边形,胞质丰富,均质透明,核卵圆居中,以后逐渐生长汇合,于 10 ~ 14 天长满。倒置显微镜下观察,第 2 代细胞呈典型的“峰谷样”(图 1A)。第 5 代细胞 SMα-actin 免疫细胞化学染色可见细胞胞浆内 SMα-actin 丰富表达,细丝状沿细胞纵轴排列(图 1B),95% 细胞为阳性,纯度符合实验要求。

2.2 钙化 VSMC 形态学分析及 Von Kossa 染色情况

钙化组细胞形态由梭形转变为圆形或不规则形,细胞内颗粒增多、透明度下降,少数细胞胞质内出现空泡,少量细胞脱落死亡。细胞于第 4 天开始出现点状沉积物,并逐渐增多形成小片、小结,最终弥漫分布于细胞层。钙化组细胞培养 14 天,Von Kossa 染色可见黑色的沉积的钙盐(图 2)。

列参考文献设计,由上海 Sangon 生物技术公司合成(表 1)。目的基因扩增条件:Cbfa1 为 94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min;TGF-β1 为 94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min;β-actin 为 94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min,以 β-actin 作为内对照,计算相对含量。

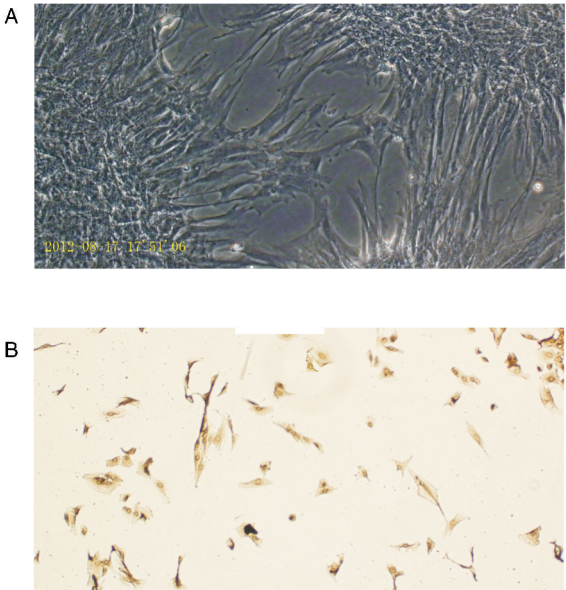


图 1. 原代培养大鼠血管平滑肌细胞形态学及免疫组织化学鉴定 A 为原代大鼠 VSMC 形态(×200),B 为大鼠 VSMC SMα-actin 免疫细胞化学染色(×100)。

Figure 1. Identification of primary cultured rat VSMCs



图 2. 钙化血管平滑肌细胞 Von Kossa 染色(×200)

Figure 2. Von Kossa staining with black speckles in multi-cellular nodules(×200)

2.3 VSMC 钙含量及 ALP 活性

与空白对照组相比,钙化组钙含量和 ALP 活性明显增高($P < 0.01$),提示钙化模型制备成功。与空白对照组相比,钙化 + AngII受体阻断剂组、钙化 + 肾素(10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} mmol/L)组钙含量和 ALP 活性明显增高($P < 0.01$)。与钙化组相比,钙化 + AngII受体阻断剂组钙含量和 ALP 活性无统计学差异,提示氯沙坦和 PD_{123,319}对血管钙化无明显影响。钙化 + 肾素(10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} mmol/L)组钙含量和 ALP 活性与钙化 + AngII受体阻断剂组相比呈剂量依赖性增高,提示肾素通过非 AngII途径呈剂量依赖性促进钙化 VSMC 钙含量、ALP 活性(表 2)。

2.4 Cbfa1 和 TGF-β1 mRNA 的表达

与空白对照组相比,钙化组、钙化 + Ang II 受体阻断剂组和钙化 + 肾素(10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} mmol/L)组 Cbfa1 和 TGF-β1 的 mRNA 表达显著增加($P < 0.01$)。与钙化组相比,钙化 + Ang II 受体阻断剂

组 Cbfa1 和 TGF-β1 的 mRNA 表达无统计学差异。与钙化 + Ang II 受体阻断剂组相比,钙化 + 肾素(10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} mmol/L)组 Cbfa1 和 TGF-β1 的 mRNA 表达显著增加,且呈现剂量依赖性($P < 0.05$;图 3)。

表 2. 各组细胞钙含量、ALP 活性比较($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)
Table 2. Comparison of the calcium and ALP in different groups

分 组	钙含量(μmol/g)	ALP 活性(kU/g)
空白对照组	47.75 ± 4.40	68.20 ± 3.31
钙化组	102.21 ± 6.58 ^a	548.67 ± 10.47 ^a
钙化 + Ang II 受体阻断剂组	97.73 ± 5.39 ^a	536.35 ± 14.48 ^a
钙化 + 肾素 10^{-10} mmol/L 组	118.06 ± 6.34 ^{ab}	611.97 ± 15.70 ^{ab}
钙化 + 肾素 10^{-9} mmol/L 组	139.65 ± 5.09 ^{ab}	725.85 ± 13.94 ^{ab}
钙化 + 肾素 10^{-8} mmol/L 组	155.20 ± 4.87 ^{ab}	831.33 ± 19.55 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$,与空白对照组相比;b 为 $P < 0.05$,与钙化 + Ang II 受体阻断剂组相比。

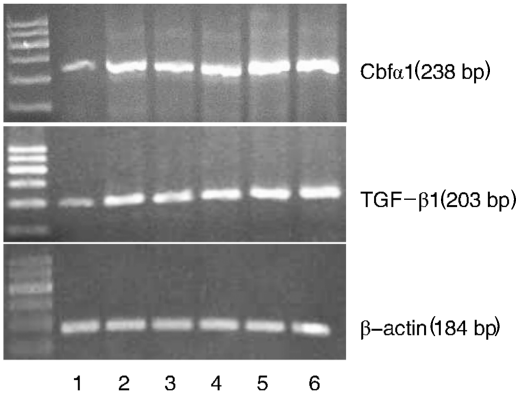
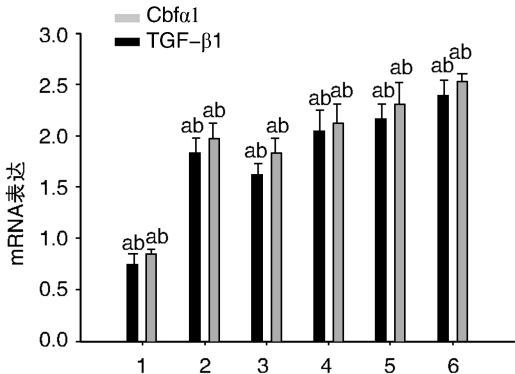


图 3. RT-PCR 检测细胞 Cbfa1 和 TGF-β1 的 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$, $n = 4$) 1 为空白对照组,2 为钙化组,3 为钙化 + Ang II 受体阻断剂组,4 为钙化 + 肾素 10^{-10} mmol/L 组,5 为钙化 + 肾素 10^{-9} mmol/L 组,6 为钙化 + 肾素 10^{-8} mmol/L 组。a 为 $P < 0.01$,与空白组对照相比;b 为 $P < 0.05$,与钙化 + Ang II 受体阻断剂组相比。

Figure 3. The mRNA expression of Cbfa1 and TGF-β1 detected by RT-PCR



2.5 Cbfa1 蛋白的表达

与空白对照组相比,钙化组、钙化 + Ang II 受体阻断剂组和钙化 + 肾素(10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} mmol/L)组 Cbfa1 蛋白的表达显著增加($P < 0.01$)。与钙化组相比,钙化 + Ang II 受体阻断剂组 Cbfa1 蛋白的表达无统计学差异。与钙化 + Ang II 受体阻断剂组相比,钙化 + 肾素(10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} mmol/L)组 Cbfa1 蛋白的表达明显增高,且呈剂量依赖性($P < 0.05$;图 4)。

3 讨 论

血管钙化是血管壁上钙盐过量沉积的异位钙

化现象,好发于大动脉或中动脉的内膜和中膜。VSMC 向成骨样细胞的转换是血管钙化的核心机制。血管组织局部旁分泌、自分泌和内分泌的活性因子在动脉粥样硬化、血管纤维化、血管钙化的发生和发展中起着极其重要的调节作用。其中肾素过去被认为是一个蛋白酶,除了促进血管紧张素 I 产生进而生成 Ang II,再通过 AT1、AT2 而产生生物学效应外,没有任何直接的生物学行为。新近研究发现肾素除了通过促进 Ang II 的生成而发挥生物学作用外,还可通过直接与肾素(原)受体结合通过非 Ang II 途径产生生物学效应。研究显示,在血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)和(或)AT1、AT2 受体阻断剂存在的情况下,肾素可通过非 Ang II 途径作用

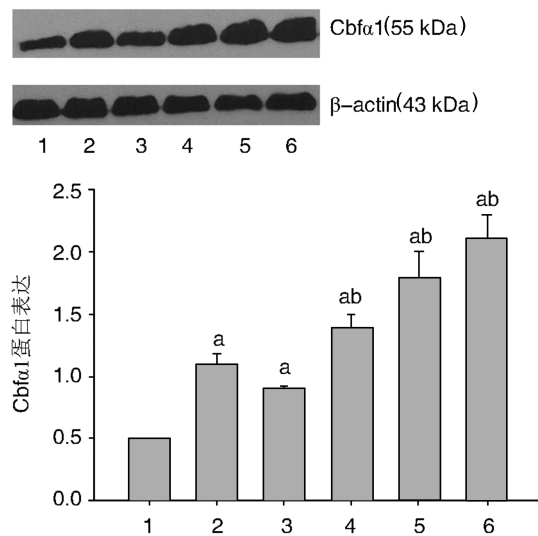


图 4. Western blot 检测细胞 Cbfa1 蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n = 4$)
1 为空白对照组,2 为钙化组,3 为钙化 + Ang II 受体阻断剂组,4 为钙化 + 肾素 10^{-10} mmol/L 组,5 为钙化 + 肾素 10^{-9} mmol/L 组,6 为钙化 + 肾素 10^{-8} mmol/L 组。a 为 $P < 0.01$,与空白组对照相比;b 为 $P < 0.05$,与钙化 + Ang II 受体阻断剂组相比。

Figure 4. The expression of Cbfa1 protein detected by Western blot

引起血管收缩、纤维化、VSMC 增殖、肥大等^[2,7]。有研究报道肾素通过非 Ang II 途径作用可激活 TGF- β 1 而产生生物学效应^[8], Melnyk 等^[3]报道肾素通过非 Ang II (TGF- β 依赖和非依赖)途径促进动脉粥样硬化,但肾素是否可通过非 Ang II 途径对血管钙化产生影响尚无报道。

有研究提示 TGF- β 1-Smads- Cbfa1 信号转导通路参与了 VSMC 成骨样分化的调节^[9]。而且研究还发现 TGF- β 1 可增加体外钙化模型中钙的沉积、ALP 的活性及骨钙素的分泌,该作用呈明显的时间依赖性,并持续整个钙化过程^[10]。Cbfa1 是成骨细胞表型标志物,调节骨细胞外基质蛋白表达,是成骨细胞分化和骨发育的关键基因之一^[11]。既然肾素通过非 Ang II 途径可影响 TGF- β 1 信号通路,因此我们设想肾素是否可通过非 Ang II 途径对血管钙化产生影响。

本研究首次在体外 β -甘油磷酸钠血管钙化模型基础上,使用氯沙坦和 PD_{123,319} 阻断 Ang II 的主要作用,对肾素通过非 Ang II 途径对血管钙化的影响进行了探讨。我们的研究结果显示,与钙化组相比,钙化 + Ang II 受体阻断剂组对 VSMC 钙含量和 ALP 活性以及 Cbfa1 和 TGF- β 1 表达无影响,提示氯沙坦和 PD_{123,319} 对血管钙化无影响。在 Ang II 受

体阻断剂存在的情况下,给予 10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} mmol/L 肾素干预,可呈剂量依赖性促进 β -甘油磷酸钠诱导的钙化 VSMC 钙含量及 ALP 活性,并使 VSMC 成骨细胞表型标志物 Cbfa1 的 mRNA 和蛋白表达增加,TGF- β 1 mRNA 表达增加。提示肾素可通过非 Ang II 途径促进 β -甘油磷酸钠诱导的 VSMC 成骨样分化及血管钙化。肾素通过非 Ang II 途径作用可能是血管钙化的促进因子,可能与 Cbfa1 及 TGF- β 1 表达上调有关,但其具体机制尚待进一步研究。

[参考文献]

[1] Sage AP, Tintut Y, Demer LL, et al. Regulatory mechanisms in vascular calcification [J]. Nat Rev Cardiol, 2010, 7 (9): 528-536.

[2] Nabi AH, Suzuki F. Biochemical properties of renin and prorenin binding to the (pro) renin receptor[J]. Hypertens Res, 2010, 33 (2): 91-97.

[3] Melnyk RA, Tam J, Boie Y, et al. Renin and prorenin activate pathways implicated in organ damage in human mesangial cells independent of angiotensin II production[J]. Am J Nephrol, 2009, 30 (3): 232-243.

[4] Bear M, Butcher M, Shaughnessy SG. Oxidized low-density lipoprotein acts synergistically with beta-glycerophosphate to induce osteoblast differentiation in primary cultures of vascular smooth muscle cells[J]. Cell Biochem, 2008, 105 (1): 185-193.

[5] 郭玲, 齐永芬. 大鼠在体钙化心血管和离体钙化平滑肌细胞模型的制备[J]. 北京大学学报(医学版), 2005, 37 (6): 656-658.

[6] 赵旭静, 边云飞, 肖传实, 等. 脂联素通过减轻内质网应激诱导的凋亡抑制心肌细胞钙化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (4): 321-326.

[7] 张娜娜, 边云飞, 肖传实, 等. 肾素-NADPH 氧化酶-活性氧通路对肾素(原)受体介导的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (3): 246.

[8] Huang Y, Wongamotham S, Kasting J, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor- β 1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms [J]. Kidney Int, 2006, 69 (1): 105-113.

[9] Liu Y, Shanahan CM. Signalling pathways and vascular calcification [J]. Fron Biosci, 2011, 1 (16): 1 302-314.

[10] Batenburg WW, Lu X, Leijten F, et al. Renin and prorenin-induced effects in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro) renin receptor: does (pro) renin -(pro) renin receptor interaction actually occur[J]. Hypertension, 2011, 58 (6): 1 111-119.

[11] Tanaka T, Sato H, Doi H, et al. Runx2 represses myocardin-mediated differentiation and facilitates osteogenic conversion of vascular smooth muscle cells[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28: 1 147-160.

(此文编辑 文玉珊)