

慢性肾衰竭大鼠主动脉弹性功能与血管基质金属蛋白酶 2 表达及钙化间的关系

张俊霞, 徐金升, 朱荣芳, 白亚玲, 张胜雷, 崔立文, 张慧然, 周薇

(河北医科大学第四医院肾内科, 河北省石家庄市 050011)

[关键词] 慢性肾衰竭; 血管钙化; 脉搏波速率; 基质金属蛋白酶 2; 核心结合因子 $\alpha 1$

[摘要] 目的 探讨主动脉基质金属蛋白酶 2(MMP-2)在慢性肾衰竭大鼠主动脉弹性功能变化中的作用及机制。方法 将 20 只大鼠随机分为正常对照组、慢性肾衰竭组、慢性肾衰竭血管钙化组。8 周造模成功后测量大鼠主动脉脉搏波传导速度(PWV),分别用逆转录-聚合酶链反应和免疫组织化学方法检测大鼠主动脉核心结合因子 $\alpha 1$ (Cbf $\alpha 1$)及 MMP-2 mRNA 和蛋白的表达。EVG 染色方法检测主动脉弹性纤维的改变。结果 慢性肾衰竭血管钙化组 PWV 值和主动脉 Cbf $\alpha 1$ 、MMP-2 的 mRNA 及蛋白表达均高于慢性肾衰竭组及正常对照组($P < 0.05$),PWV 与主动脉 MMP-2 表达呈正相关($r = 0.754, P = 0.02$)。结论 慢性肾衰竭大鼠血管弹性功能下降的可能机制之一是血管壁 MMP-2 表达升高导致弹性蛋白降解,同时后期的血管钙化也参与其中。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Association Between Aortic Matrix Metalloproteinase-2 and Vascular Stiffness in Uremic Rats

ZHANG Jun-Xia, XU Jin-Sheng, ZHU Rong-Fang, BAI Ya-Ling, ZHANG Sheng-Lei, CUI Li-Wen, ZHANG Hui-Ran, and ZHOU Wei

(Department of Nephrology, The Forth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

[KEY WORDS] Chronic Renal Failure; Vascular Calcification; Pulse Wave Velocity; Matrix Metalloproteinase-2; Core Binding Factor Alpha 1

[ABSTRACT] **Aim** To explore the relationship between uremia rats aortic stiffness and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in aorta and the mechanism involved. **Methods** 20 rats were divided into three groups randomly, as normal control group, chronic renal failure group and chronic kidney failure group with vascular calcification. Normal control group (methyl cellulose), chronic renal failure group (methyl cellulose + adenine sulphate), chronic renal failure group with vascular calcification (adenine sulphate + calcitriol). The aortic pulse wave velocity (PWV) was measured after 8 weeks, expression of core binding factor alpha 1 (Cbf $\alpha 1$) and MMP-2 mRNA were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and MMP-2 protein was detected by immunohistochemistry. Von Kossa was used to test the calcification of aorta and quantified by aortic calcium content. The alteration of aortic stiffness was tested by Elastica Van Gieson (EVG). **Results** Aortic PWV, expression of aorta Cbf $\alpha 1$, MMP-2 mRNA and protein, aortic calcium content in chronic renal failure group with vascular calcification are all higher than those in chronic renal failure group ($P < 0.05$). Aortic PWV, expression of aorta Cbf $\alpha 1$, MMP-2 mRNA and protein in chronic renal failure group are higher than those in normal control group ($P < 0.05$). Aortic PWV shows a positive correlation to the expression of MMP-2 in aorta ($r = 0.754, P = 0.02$). **Conclusion** One of the mechanisms of decreased vascular elasticity function in rats with chronic kidney disease is elastin degradation caused by increasing expression of MMP-2 in the artery wall, while the late vascular calcification is also involved.

[收稿日期] 2013-07-05

[基金项目] 河北省自然科学基金(H2012206157)

[作者简介] 张俊霞,医学硕士,副主任医师,研究方向为慢性肾脏病血管钙化机制,E-mail 为 sun6025@sina.com。通讯作者徐金升,医学博士,主任医师,研究方向为慢性肾脏病血管钙化机制,E-mail 为 xjs5766@126.com。白亚玲,医学博士,主任医师,研究方向为慢性肾脏病血管钙化机制,E-mail 为 snbyl@163.com。

心血管疾病(cardiovascular disease,CVD)是慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)特别是终末期肾病(end stage renal disease,ESRD)患者最常见并发症和首位致死原因,心血管事件占慢性肾脏病患者全因死亡的50%^[1],其发病率高出普通人群20~30倍^[2]。CKD患者发生致死或非致死性心血管事件的危险远超过肾病进展的危险^[3]。CKD患者的心血管疾病是一个多因素、多阶段、多机制参与的病理过程,但年龄、吸烟、肥胖、精神紧张等传统危险因素已不能完全解释CKD患者心血管疾病的高发性。研究显示,CKD患者除存在上述传统危险因素外,还存在各种水、电解质、酸碱紊乱和血管僵硬增加等非传统危险因素,其中血管僵硬增加在CKD患者心血管事件发生中起着重要的作用^[4]。近年研究显示,弹性蛋白代谢紊乱所致的细胞外基质重塑是影响血管僵硬增加的重要因素。弹性蛋白代谢过程涉及到多种蛋白酶,如组织蛋白酶S、基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2,MMP-2),其中MMP-2在弹性蛋白的代谢过程中起着重要作用。推测血管壁MMP-2表达的变化在血管僵硬增加中可能也起着重要作用。鉴于此,我们通过建立慢性肾衰竭大鼠模型并借助脉搏波传导速度(pulse wave velocity,PWV)可早期、特异、灵敏的测定血管僵硬度的优势,分析大鼠主动脉血管弹性功能与主动脉MMP-2表达变化之间的关系,并对其机制进行部分探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD大鼠,雄性,7周龄,购自河北医科大学实验动物中心,合格证号:1211050。

1.2 主要试剂、仪器

甲基纤维素、硫酸腺嘌呤(美国Sigma公司);骨化三醇胶丸(上海罗氏有限公司);RNA提取试剂盒、RNA反转录试剂盒(美国Thermo公司);核心结合因子 $\alpha 1$ (core binding factor alpha 1,Cbfa1)免疫组织化学试剂盒(美国Abcam公司);MMP-2免疫组织化学试剂盒(中国博士德公司);鼠SP法免疫组织化学试剂盒、兔SP法免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥公司);钙含量测定试剂盒(北京中生北控公司)。酶标仪(美国Gene公司)。

1.3 分组及造模

将20只健康雄性SD大鼠,适应性喂养1周后进入实验。将大鼠随机分为3组,即正常对照组(6只)、慢性肾衰竭组(7只)、慢性肾衰竭血管钙化组(7

只)。正常对照组给予1.5%甲基纤维素按6 $\mu\text{L/g}$ 在1~3周每天灌胃,在4~8周隔日灌胃;慢性肾衰竭组1~3周给予硫酸腺嘌呤悬浊液(硫酸腺嘌呤溶于1.5%甲基纤维素中制成100 g/L的悬浊液)按6 $\mu\text{L/g}$ 每天灌胃,4~8周给予1.5%甲基纤维素按6 $\mu\text{L/g}$ 隔日灌胃;慢性肾衰竭血管钙化组1~3周给予100 g/L的硫酸腺嘌呤悬浊液按6 $\mu\text{L/g}$ 每天灌胃,4~8周给予骨化三醇胶丸按0.2 ng/g隔日灌胃。

1.4 主动脉PWV的测定及动脉血管标本的采集

实验8周末,用2%戊巴比妥钠按45 $\mu\text{g/g}$ 麻醉大鼠,暴露颈动脉及股动脉,全身肝素化后插入导管(腰椎麻醉导管),用多导电生理仪测量波形后,解剖大鼠,测定两导管尖端间的距离,计算PWV值。快速取大鼠胸主动脉置于冻存管中,液氮罐中保存,留取做PCR;留取部分腹主动脉做病理染色。剩余腹主动脉烤干至质量不再改变,测量钙含量。

1.5 血管Von Kossa染色

血管组织进行石蜡包埋、切片,行常规脱蜡、脱水后浸入5%硝酸银溶液中,日光照射60 min,再用5%硫代硫酸钠溶液处理5 min定影,然后依次用碱性品红复染,经脱水、透明、封片,在光镜下观察。

1.6 动脉血管标本染色

分别用EVG(Elastica Van Gieson)染色和Von Kossa染色法测定主动脉弹性纤维变化及主动脉钙化的情况。用免疫组织化学SP法检测主动脉MMP-2、Cbfa1表达的情况。图像分析采用Image-Proplus 6.0图像分析软件,随机选取5个视野,计算阳性表达部位的积分光密度(integral optical density,IOD), $\text{IOD} = \text{密度}(\text{meD}/1) \times \text{面积}$,计算均值及标准差。

1.7 RT-PCR法检测血管组织中Cbfa1及MMP-2 mRNA表达

采用RNA分离试剂盒Trizol提取并纯化组织总RNA。Cbfa1引物序列:正义:5'-CCGCACGA-CAACCGCACCAT-3',反义:5'-CGCTCCGGCCCA-CAAATCTC-3';MMP-2引物序列:正义:5'-GGA-CAGTGACACCACGTGACA-3',反义:5'-ACTCATTC-CCTGCGAAGAACA-3'。PCR反应在ABI5700型PCR仪上进行,反应程序为:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,55℃退火30 s,延伸Cbfa1 72℃、MMP-2 60℃ 45 s,35个循环,最后于72℃延伸10 min。取PCR产物,行琼脂糖凝胶电泳。

1.8 血管钙含量的测定

参照文献[5]方法,将主动脉组织(约10 mg)于80℃彻底烤干,加入至1 mmol/L盐酸中消化过夜;

取消化的上清,用钙含量测定试剂盒(邻甲酚酞络合酮比色法)按照说明书方法操作,用酶标仪在 600 nm 波长下测定吸光度值;从标准曲线上查出钙含量,并换算成 mg/g 干重组织。

1.9 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐且正态分布多个样本均数的比较采用单向 ANOVA 检验,用 SNK(Student-Newman-Keuls)检验作多组间均数两两比较,相关分析符合双变量正态分布的作 Pearson 积差相关分析,余者采用秩和检验和 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

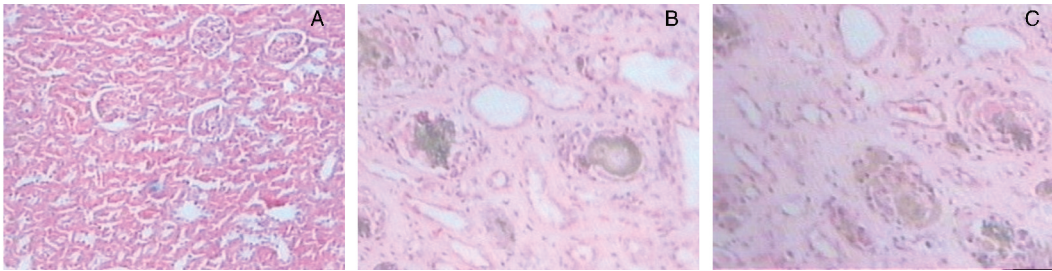


图 1. 大鼠肾脏 HE 染色 A 为正常对照组(×100),B 为慢性肾衰竭组(×400),C 为慢性肾衰竭血管钙化组(×400)。

Figure 1. Representative microphotographs of HE staining of the kidney from rats

表 1. 血清肌酐及尿素氮情况($\bar{x} \pm s$)
Table 1. Serum SCr and BUN ($\bar{x} \pm s$)

分 组	肌酐(μmol/L)	尿素氮(mmol/L)
正常对照组	32.00 ± 2.00	7.10 ± 0.43
慢性肾衰竭组	82.30 ± 4.73 ^a	18.10 ± 1.60 ^a
慢性肾衰竭血管钙化组	87.60 ± 3.18 ^a	19.00 ± 1.78 ^a

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较。

2.3 主动脉弹性功能的改变

与正常对照组比较,慢性肾衰竭组、慢性肾衰竭血管钙化组主动脉 PWV 值均明显升高($P < 0.05$);与慢性肾衰竭组比较,慢性肾衰竭血管钙化组主动脉 PWV 值明显升高($P < 0.05$)(表 2)。

表 2. 主动脉 PWV 及钙含量的情况($\bar{x} \pm s$)
Table 2. Aortic PWV and calcium content($\bar{x} \pm s$)

分 组	PWV 值(m/s)	主动脉钙含量(mg/g 干组织)
正常对照组	2.870 ± 0.006	6.46 ± 2.14
慢性肾衰竭组	5.900 ± 0.022 ^a	7.17 ± 2.54
慢性肾衰竭血管钙化组	9.032 ± 0.041 ^{ab}	16.88 ± 6.40 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与慢性肾衰竭组比较。

2 结 果

2.1 大鼠肾脏 HE 染色

HE 染色结果,正常对照组肾小球结构正常,慢性肾衰竭组和慢性肾衰竭血管钙化组显示肾小球硬化(图 1)。

2.2 血肌酐、尿素氮水平

与正常对照组比较,慢性肾衰竭组、慢性肾衰竭血管钙化组血清肌酐(serum creatinine, SCr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)明显升高($P < 0.05$);与慢性肾衰竭组比较,慢性肾衰竭血管钙化组血肌酐无明显变化($P > 0.05$)(表 1)。

2.4 主动脉弹性纤维 EVG 染色

与正常对照组比较,慢性肾衰竭组、慢性肾衰竭血管钙化组主动脉弹性纤维变直,弹性纤维间的微纤维减少;与慢性肾衰竭组比较,慢性肾衰竭血管钙化组主动脉弹性纤维数量明显较少,钙化处发生断裂(图 2)。

2.5 Cbfα1 及 MMP-2 在主动脉的表达情况

与正常对照组比较,慢性肾衰竭组、慢性肾衰竭血管钙化组主动脉 Cbfα1 及 MMP-2 mRNA 的表达均明显升高($P < 0.05$);与慢性肾衰竭组比较,慢性肾衰竭血管钙化组主动脉 Cbfα1 及 MMP-2 mRNA 的表达明显升高($P < 0.05$)。与正常对照组比较,慢性肾衰竭组、慢性肾衰竭血管钙化组主动脉 MMP-2 蛋白的表达明显升高($P < 0.05$),与慢性肾衰竭组相比,慢性肾衰竭血管钙化组主动脉 MMP-2 蛋白的表达明显升高($P < 0.05$)(图 3~6)。

2.6 主动脉钙化的改变

Von Kossa 染色发现慢性肾衰竭血管钙化组发生明显的主动脉钙化,但是慢性肾衰竭组、正常对照组均未发生主动脉钙化(图 7)。与正常对照组相比,慢性肾衰竭组主动脉钙含量无明显升高($P > 0.05$),慢性肾衰竭血管钙化组主动脉钙含量显著升高($P < 0.05$)(表 2)。

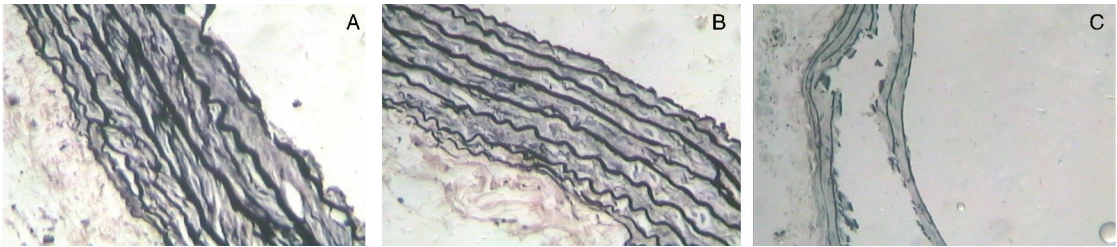


图 2. 大鼠主动脉弹性纤维 EVG 染色 (×400) A 为正常对照组, B 为慢性肾衰竭组, C 为慢性肾衰竭血管钙化组。

Figure 2. Representative microphotographs of EVG staining of the aortas from rats (×400)

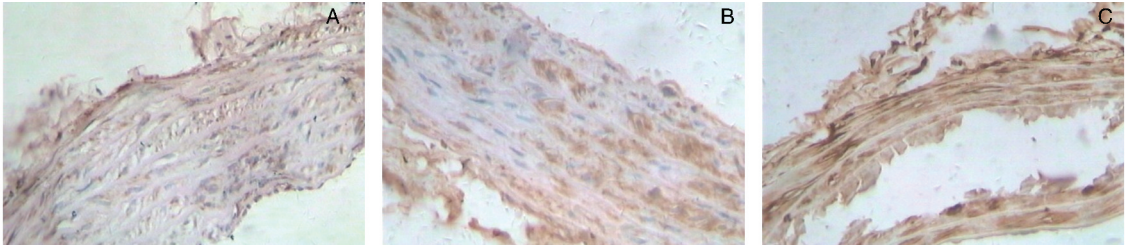


图 3. 大鼠主动脉 Cbfa1 免疫组织化学染色 (×400) A 为正常对照组, B 为慢性肾衰竭组, C 为慢性肾衰竭血管钙化组。慢性肾衰竭组较正常对照组表达量高, 慢性肾衰竭血管钙化组较慢性肾衰竭组表达量高。

Figure 3. Representative microphotographs of immunohistochemical staining of Cbfa1 of the aortas from rats (×400)

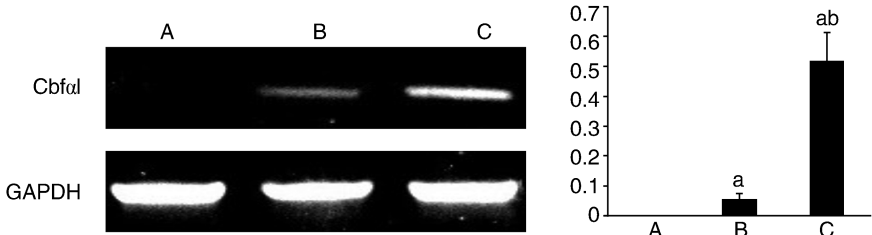


图 4. 大鼠主动脉 Cbfa1 mRNA 表达和 Cbfa1 mRNA 表达的统计结果 A 为正常对照组, B 为慢性肾衰竭组, C 为慢性肾衰竭血管钙化组。a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与慢性肾衰竭组比较。

Figure 4. Representative real time PCR experiments to assay Cbfa1 mRNA expression and statistical analysis of Cbfa1 mRNA expression

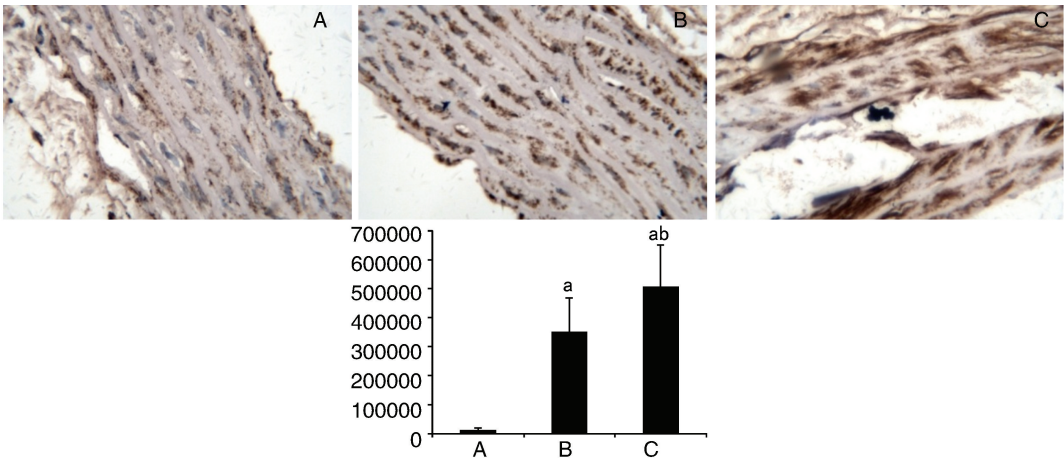


图 5. 大鼠主动脉 MMP-2 免疫组织化学染色和 MMP-2 免疫组织化学染色统计结果 (×400) A 为正常对照组, B 为慢性肾衰竭组, C 为慢性肾衰竭血管钙化组。a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与慢性肾衰竭组比较。

Figure 5. Representative microphotographs of immunohistochemical staining of MMP-2 of the aortas from rats and statistical analysis of MMP-2 protein expression (×400)

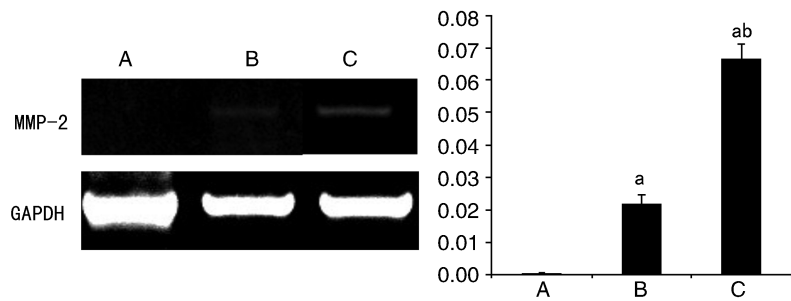


图 6. 大鼠主动脉 MMP-2 mRNA 表达和 MMP-2 mRNA 表达的统计结果 A 为正常对照组, B 为慢性肾衰竭组, C 为慢性肾衰竭血管钙化组。a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与慢性肾衰竭组比较。

Figure 6. Representative real time PCR experiments to assay MMP-2 mRNA expression and statistical analysis of MMP-2 mRNA expression



图 7. 大鼠主动脉 Von Kossa 染色 ($\times 400$) A 为正常对照组, B 为慢性肾衰竭组, C 为慢性肾衰竭血管钙化组。

Figure 7. Representative microphotographs of Von Kossa staining of the aortas from rats ($\times 400$)

2.7 主动脉 PWV 改变与 MMP-2 及钙含量的关系

相关分析显示, 主动脉 PWV 与主动脉钙含量呈正相关 ($r = 0.736, P = 0.03$); 主动脉 PWV 与主动脉 MMP-2 蛋白表达呈正相关 ($r = 0.754, P = 0.02$); 主动脉 MMP-2 mRNA 与主动脉 Cbfa1 mRNA 表达呈正相关 ($r = 0.924, P = 0.000$)。

3 讨论

生理情况下, 主动脉等大动脉的管壁较厚, 含有丰富的弹性纤维, 具有良好的可扩张性和弹性。近年发现, CKD 患者普遍存在着血管弹性功能的降低, 且与心血管疾病的发病有密切关系^[6,7]。本研究以慢性肾衰竭大鼠模型为实验对象, 观察 CKD 对血管弹性功能的影响, 结果显示: 与正常对照组比较, 慢性肾衰竭组和慢性肾衰竭血管钙化组大鼠主动脉的弹性功能明显降低, 提示 CKD 是影响血管弹性功能的因素。本研究结果与 Ng、Yan 等人结果相似^[8,9]。

弹性蛋白在维持血管弹性中起着关键作用, 约占弹性动脉干重的 40%, 其与胶原纤维共同存在于血管壁, 以维持血管正常的结构和功能。弹性蛋白包括 90% 的弹性纤维和 10% 的微纤维糖蛋白类, 如微纤维蛋白和微纤维丝相关的糖蛋白类等, 弹性纤维

是弹性蛋白发挥生理作用的基本形态基础。MMP 作为弹性蛋白内肽酶家族的成员之一, 能够依赖锌离子降解弹性纤维等细胞外基质成分^[10]。MMP 是一类蛋白质大分子, 凭借其改变机体组织结构的能力, 广泛参与胚胎形成、骨再建、心室重构和血管重构等生理和病理过程。MMP 分为 6 类, 其中 IV 型胶原酶为其中重要的一类, 它主要有两种形式, 一种被糖化, 即 MMP-9, 另一种非糖化, 即 MMP-2。其中 MMP-9 主要参与动脉粥样硬化的形成^[11,12]。本研究发现, 随着肾衰竭的发生, 主动脉弹性功能逐渐降低, 同一部位主动脉的 MMP-2 mRNA 及蛋白表达升高, 并随着 MMP-2 蛋白表达的升高, 主动脉相应部位弹性纤维变细, 甚至发生断裂。同时主动脉 MMP-2 蛋白的表达与 PWV 的增快呈正相关。提示慢性肾衰竭后血管弹性功能降低的原因可能是肾衰竭环境引起血管壁 MMP-2 表达增加, 导致弹性纤维降解所致。但构成肾衰竭环境的具体毒素成分有待于进一步研究。

影响血管弹性功能的因素多而复杂, 如年龄^[13]、传统的心血管危险因素^[14]、血肌酐^[15,16]均影响血管弹性功能, 其中血管钙化也是影响血管弹性功能的一个重要因素。越来越多的临床研究资料^[17,18]显示, 血管钙化在慢性肾衰竭患者中非常普

遍。本研究在慢性肾衰竭大鼠模型上观察的结果显示:慢性肾衰竭血管钙化组,随着主动脉钙含量的增加,血管弹性功能逐渐降低。单纯慢性肾衰竭组大鼠主动脉钙含量较正常对照组虽有升高,但差异无统计学意义。以上结果提示慢性肾衰竭早期的血管弹性功能降低可能主要是通过 MMP-2 降解弹性纤维来实现的,但随着慢性肾衰竭时间的延长,钙磷代谢紊乱所致的血管钙化逐渐出现,进一步增加了血管的僵硬,降低了血管的弹性功能。本研究还发现随着 MMP-2 表达的增加, Cbfa1 表达增加,二者表达呈正相关。Cbfa1 是平滑肌细胞发生表型转化的标志物^[19],提示慢性肾衰竭大鼠主动脉的平滑肌细胞发生了表型转化,但其具体机制目前尚不清楚,有待于进一步研究,可能是 MMP-2 降解弹性纤维,其降解产物与血管平滑肌细胞表面受体结合促进血管平滑肌细胞发生表型转化^[20],发生成骨表型转化后 MMP-2 表达进一步增加^[20],形成恶性循环,导致钙化不可逆。

总之,本研究证实,在慢性肾衰竭大鼠模型中血管弹性功能随着肾脏病的进展而逐渐下降;其可能机制之一是血管壁 MMP-2 表达升高致使弹性蛋白降解,同时后期的血管钙化也参与其中。

[参考文献]

[1] Shan A, Zhou C, He Y, et al. Expression of both matrix metalloproteinase-2 and its tissue inhibitor-2 in tunica media of radial artery in uremic patients [J]. *Ren Fail*, 2013, 35(1): 37-42.

[2] Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system [J]. *Circulation*, 2007, 116(1): 85-97.

[3] McCullough PA, Jurkovic CT, Pergola PE, et al. Independent components of chronic kidney disease as a cardiovascular risk state: results from the kidney early evaluation program (KEEP) [J]. *Arch Intern Med*, 2007, 167(11): 1 122-129.

[4] Temmar M, Liabeuf S, Renard C, et al. Pulse wave velocity and vascular calcification at different stages of chronic kidney disease [J]. *J Hypertens*, 2010, 28(1): 163-169.

[5] Sutliff RL, Walp ER, El-Ali AM, et al. Effect of medial calcification on vascular function in uremia [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 301(1): F78-F83.

[6] Nitta K, Akiba T, Uchida K, et al. Left ventricular hypertrophy is associated with arterial stiffness and vascular calcification in hemodialysis patients [J]. *Hypertens Res*, 2004, 27(1): 47-52.

[7] Covic A, Kanbay M, Voroneanu L, et al. Vascular calcifi-

cation in chronic kidney disease [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010, 119(3): 111-121.

[8] Ng K, Hildreth CM, Phillips JK, et al. Aortic stiffness is associated with vascular calcification and remodeling in a chronic kidney disease rat model [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 300(6): F1 431-436.

[9] Yan TK, Lin S, Jia JY, et al. The histological changes in radial artery in uremia and their effects on arterial stiffness [J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2010, 49(7): 577-581.

[10] Smith ER, Tomlinson LA, Ford ML, et al. Elastin degradation is associated with progressive aortic stiffening and all-cause mortality in predialysis chronic kidney disease [J]. *Hypertension*, 2012, 59(5): 973-978.

[11] 李 晶, 裘毅钢, 张 蓉, 等. 炎症因子在人动脉粥样硬化组织的表达分析 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2012, 4(3): 215-217.

[12] 徐娅楠, 赵亚珍, 浦 奎. 冠心病患者血浆 Rantes 及 MMP-9 水平及与冠状动脉狭窄的相关性研究 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2011, 3(5): 365-367.

[13] Stepan J, Barodka V, Berkowitz DE, et al. Vascular stiffness and increased pulse pressure in the aging cardiovascular system [J]. *Cardiol Res Pract*, 2011, 2011: 263 585.

[14] Nitta K. Vascular calcification in patients with chronic kidney disease [J]. *Ther Apher Dial*, 2011, 15(6): 513-521.

[15] Benetos A, Adamopoulos C, Bureau JM, et al. Determinants of accelerated progression of arterial stiffness in normotensive subjects and in treated hypertensive subjects over a 6-year period [J]. *Circulation*, 2002, 105(10): 1 202-207.

[16] Schillaci G, Pirro M, Mannarino MR, et al. Relation between renal function within the normal range and central and peripheral arterial stiffness in hypertension [J]. *Hypertension*, 2006, 48(4): 616-621.

[17] Ballanti P, Silvestrini G, Pisanò S, et al. Medial artery calcification of uremic patients: a histological, histochemical and ultrastructural study [J]. *Histol Histopathol*, 2011, 26(2): 191-200.

[18] Wang M, Wang M, Gan LY, et al. Vascular calcification in maintenance hemodialysis patients [J]. *Blood Purif*, 2009, 28(1): 15-20.

[19] Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(7): 1 453-464.

[20] Pai AS, Giachelli CM. Matrix remodeling in vascular calcification associated with chronic kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(10): 1 637-640.

(此文编辑 曾学清)