

酸性环境对慢性肾功能衰竭大鼠血管中膜钙化的影响及其机制

张胜雷, 徐金升, 郭利萍, 白亚玲, 张俊霞, 崔立文, 张慧然

(河北医科大学第四医院肾内科, 河北省石家庄市 050011)

[关键词] 酸性环境; 血管钙化; 慢性肾功能衰竭; BMP-2 信号通路

[摘要] **目的** 探讨酸性环境对慢性肾功能衰竭大鼠血管中膜钙化的影响及可能的作用机制。**方法** 体内实验:将雄性 SD 大鼠随机分为对照组、肾功能衰竭组、血管钙化组和酸干预组,造模成功后采用 von Kossa 染色和邻甲酚酞络合酮比色法测定大鼠胸主动脉血管钙化情况。体外实验:分离培养 SD 大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞(VSMC),随机分为正常对照组、高磷组、酸干预组和抑制剂组(BMP 信号通路抑制剂 Noggin),采用茜素红染色和邻甲酚酞络合酮比色法检测细胞钙化情况,酶联免疫吸附法检测细胞碱性磷酸酶(ALP)活性,RT-PCR 和 Western blot 检测细胞 BMP-2、Smad1、Runx2 的表达情况。**结果** 体内实验:成功制备了慢性肾功能衰竭大鼠血管钙化模型;与血管钙化组相比,酸干预组大鼠血管钙盐沉积明显减轻($P<0.05$)。体外实验:与正常对照组相比,高磷组细胞钙盐沉积明显增加($P<0.05$),ALP 活性和 Runx2 表达均增高($P<0.05$);与高磷组相比,酸干预组细胞钙盐沉积减少($P<0.05$),ALP 活性、Runx2、BMP-2 和 Smad1 表达均降低($P<0.05$);与高磷组相比,抑制剂组细胞钙盐沉积和 Runx2 表达均降低($P<0.05$)。**结论** 酸性环境可以抑制慢性肾功能衰竭大鼠血管中膜钙化的发生,其可能的机制之一是通过 BMP-2 信号通路抑制了 VSMC 成骨/成软骨样表型转化来实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect and Mechanism of Acid Environment on Media Vascular Calcification in Rats with Chronic Renal Failure

ZHANG Sheng-Lei, XU Jin-Sheng, GUO Li-Ping, BAI Ya-Ling, ZHANG Jun-Xia, CUI Li-Wen, and ZHANG Hui-Ran
(Department of Nephrology, the Forth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

[KEY WORDS] Acid Environment; Vascular Calcification; Chronic Renal Failure; BMP-2 Signaling Pathway

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect and mechanism of acid environment on media vascular calcification of chronic renal failure rats. **Methods** In vivo experiment: healthy male SD rats were randomly divided into control group, renal failure group, vascular calcification group and acid intervention group, calcification was measured by Alizarin red staining and enzyme linked immunosorbent assay. In vitro experiment: vascular smooth muscle cells (VSMC) were primarily cultured in vitro and randomly divided into control group, high phosphorus group, acid intervention group and inhibitor group, calcium deposition and ALP activity were measured by Alizarin red staining, quantification of calcium and enzyme linked immunosorbent assay, the expression of BMP-2, Smad1 and Runx2 was detected by RT-PCR and Western blot. **Results** In vivo experiment: the vascular calcification model of rats with chronic renal failure was successfully prepared. Compared with vascular calcification group, calcium deposition in acid intervention group decreased ($P<0.05$). In vitro experiment: compared with control group, calcium deposition, alkaline phosphatase (ALP) activity and the expression of Runx2 in high phosphorus group increased ($P<0.05$). Compared with high phosphorus group, calcium deposition, ALP activity and the expression of Runx-2, BMP-2 and Smad1 in acid intervention group decreased ($P<0.05$). Compared with high phosphorus group, calcium deposition and the expression of Runx2 in inhibitor group also decreased ($P<0.05$). **Conclusions** Acid environment can inhibit the occurrence of vascular calcification in chronic renal failure rats, the mechanism was presumably that vascular smooth muscle cells osteogenesis/chondrogenesis-like phenotypic trans-

[收稿日期] 2016-03-17

[修回日期] 2016-05-11

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目(H2012206157)

[作者简介] 张胜雷, 硕士, 主治医师, 研究方向为慢性肾脏病血管钙化, E-mail 为 lei06352511@126.com。通讯作者徐金升, 博士, 主任医师, 研究方向为慢性肾脏病血管钙化, E-mail 为 xjs5766@126.com。郭利萍, 硕士研究生, 研究方向为慢性肾脏病血管钙化, E-mail 为 mailglp@163.com。

formation was inhibited by BMP-2 signaling pathway.

血管钙化是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)患者常见的病理生理现象,是导致其心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)发病率和死亡率显著增加的重要危险因素^[1]。因此,充分认识、早期预防和发现血管钙化,对降低 CKD 患者 CVD 死亡率、提高生存质量有重要的临床意义。代谢性酸中毒是 CKD 患者常见的并发症,对骨代谢有一定影响。以往研究已证实,酸性环境可以通过调节成骨细胞和破骨细胞功能而促进骨溶解,抑制骨形成^[2]。而 CKD 患者的血管钙化类似骨发育过程,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)成骨/成软骨样表型转化是其重要机制之一^[3]。因此推测,酸性环境是否可以通过影响 VSMC 表型转化来影响血管钙化。为此,本研究以慢性肾功能衰竭大鼠血管钙化模型和体外培养的大鼠 VSMC 为研究对象,分别从体内和体外实验探讨酸性环境对慢性肾功能衰竭大鼠血管中膜钙化的影响,并进一步探讨其可能的发生机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

26 只 5 周龄清洁级健康雄性 SD 大鼠(河北医科大学实验动物中心,动物合格证标号为 1305090)在屏障环境中饲养,取其中 6 只大鼠,采用组织块贴壁法进行胸主动脉 VSMC 原代培养。

1.2 主要试剂和仪器

DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); β -甘油磷酸(美国 Sigma 公司);Noggin(美国 Peprotech 公司);PCR 引物(上海英潍捷基公司);鼠抗鼠 Runx2 单克隆抗体(英国 ABCAM 公司);兔抗鼠 BMP-2 多克隆抗体(美国 Bioworld 公司);SP 免疫组化试剂盒、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(上海博海生物工程开发有限公司);钙测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司);RNA 逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(南京建成生物工程研究所);倒置相差显微镜 LH50A 型(日本 Olympus 公司);酶标仪(美国 Biotek 公司);PCR 仪(美国 ABI 公司);酸度计(北京赛多利斯科学仪器有限公司);Unicel Dxc800 全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特公司)。

1.3 实验分组及模型构建

1.3.1 体内实验 用 5/6 肾切除术构建大鼠慢性肾功能衰竭模型,骨化三醇灌胃诱导大鼠血管钙化,饲喂氯化铵构建大鼠慢性代谢性酸中毒模型^[4]。将 26 只大鼠按随机数字表法分为四组:对照组($n=6$)、肾功能衰竭组($n=6$)、血管钙化组($n=7$)、酸干预组($n=7$)。肾功能衰竭组、血管钙化组、酸干预组均行 5/6 肾切除术,即先切除大鼠左肾上下极,剩余 1/3 肾组织,5 天后结扎固定右肾蒂,摘除右肾;对照组只做肾周筋膜分离,5 天后继续下一步实验。实验过程中肾功能衰竭组、酸干预组各有 1 只大鼠死亡,血管钙化组有 2 只大鼠死亡。各组随机抽取 5 只大鼠,对照组、肾功能衰竭组给予 1.5% 甲基纤维素 6 mL/(kg·d)灌胃,血管钙化组、酸干预组给予骨化三醇 600 ng/(kg·d)溶于 1.5% 甲基纤维素,6 mL/(kg·d)灌胃,酸干预组饲喂 0.28 mmol/L 氯化铵(去离子水配制),其余各组饲喂去离子水,共 20 天。腹主动脉穿刺采血,检测血肌酐、尿素氮水平,血气分析仪检测动脉血 pH 值和 HCO_3^- 含量。取胸主动脉用于组织学观察和钙含量测定。

1.3.2 体外实验 大鼠胸主动脉 VSMC 原代培养及鉴定参照本实验室前期实验^[5],第 4 代细胞进行实验干预,10 mmol/L β -甘油磷酸诱导 VSMC 钙化。将 VSMC 按随机数字表法分为四组:正常对照组用含 10% 胎牛血清培养基培养,调整 pH 值为 7.4;高磷组在 10% 胎牛血清培养基中加入 10 mmol/L β -甘油磷酸,调整 pH 值为 7.4;酸干预组采用高磷培养基,调整 pH 值为 7.1;抑制剂组在高磷培养基中加入 200 $\mu\text{g/L}$ Noggin,调整 pH 值为 7.4。使用 1 mol/L HCl 和 7.4% NaHCO_3 调整培养基 pH 值,每 24 h 换液一次,刺激 4 天后,各组细胞进行 RNA 及蛋白水平检测,刺激 14 天后进行钙化检测。

1.4 大鼠血管标本的采集与处理

2%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉大鼠,暴露胸腹主动脉。腹主动脉穿刺取血,应用血气分析仪检测动脉血 pH 值、 HCO_3^- 浓度,全自动生化分析仪检测血肌酐、尿素氮水平。取胸主动脉全段,上段组织保存于液氮中用于钙含量检测,下段组织用 10% 甲醛固定后石蜡包埋行 von Kossa 染色。

1.5 大鼠血管标本病理组织学检测

1.5.1 von Kossa 染色 常规脱蜡、脱水后玻片滴加 5% 硝酸银溶液,紫外光照射 60 min,再用 5% 硫

代硫酸钠溶液定影,碱性品红复染,依次经脱水、透明、封片后,于光镜下观察血管钙化情况。

1.5.2 钙含量测定 新鲜胸主动脉烤干后称重,置于 0.6 mmol/L 盐酸中 37℃ 过夜,取上清液用钙测定试剂盒拟合标准曲线,酶标仪于 600 nm 处测量吸光度值,计算出每克血管组织中的钙含量。

1.6 大鼠 VSMC 钙化检测

1.6.1 茜素红染色 取第 3 代细胞接种于 12 孔板内,每组设 3 个复孔,各组细胞给予不同刺激因素 14 天后,弃上清,用 95% 乙醇于 37℃ 温箱中固定 30 min,弃乙醇,再加入茜素红染液 (0.1%, pH8.3) 于 37℃ 温箱中放置 30 min 进行钙化染色,倒置显微镜下观察染色情况。钙盐沉积为橘红色。

1.6.2 钙含量测定 取第 3 代细胞接种于 12 孔板内,每组设 3 个复孔,各组细胞给予不同刺激因素 14 天后,用 0.6 mmol/L 盐酸脱钙过夜,取上清液用钙测定试剂盒测定细胞钙含量,脱钙后细胞用 0.1 mol/L NaOH 和 0.1% SDS 溶解 30 min,取上清液用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定细胞蛋白含量。

1.7 大鼠 VSMC ALP 活性测定

取第 3 代细胞接种于 12 孔板内,每组设 3 个复孔,各组细胞给予不同刺激因素 14 天后,加入 0.1% Triton-X100,置 4℃ 环境中 24 h,然后反复吹打裂解细胞,取上清液按试剂盒说明书进行操作,于酶标仪 520 nm 波长处测定结果。

1.8 RT-PCR 检测 VSMC 目的基因的表达

提取干预 4 天的各组细胞 mRNA,测定 BMP-2、Smad1 和 Runx2 基因的表达。PCR 引物由 Primer 5.0 软件设计,引物序列见表 1。实验均重复 3 次。

1.9 Western blot 检测 VSMC 目的蛋白的表达

取干预 4 天的各组细胞,分别提取细胞及上清液中总蛋白,BCA 法进行蛋白定量,SDS-PAGE 分离,转膜、封闭,加一抗 (GAPDH 为 1 : 10000,Runx2 为 1 : 100,BMP-2 为 1 : 500) 稀释液,4℃ 孵育过夜。

洗膜,加入荧光二抗稀释液 (1 : 400),室温下孵育 1 h,用免疫荧光成像系统显色。实验重复 3 次。

1.10 统计学分析

符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 S-N-K 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1. 各目的基因引物序列

Table 1. Gene primer sequences

基因	序列	产物长度
Runx2	上游 5'-CCGCACGACAACCGCACCAT-3'	289 bp
	下游 5'-CGCTCCGGCCACAAATCTC-3'	
BMP-2	上游 5'-ACTCGAAATTCCTCCGTGACC-3'	106 bp
	下游 5'-CCACTTCCACCACGAATCCA-3'	
Smad1	上游 5'-GGTGACTGGGAACGGATCG-3'	144 bp
	下游 5'-TGCTCTTCGGTTCGGAAGG-3'	
GAPDH	上游 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTG-3'	496 bp
	下游 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	

2 结 果

2.1 酸性环境对慢性肾功能衰竭大鼠胸主动脉钙化的影响

与对照组相比,肾功能衰竭组、血管钙化组及酸干预组大鼠血肌酐和尿素氮水平均明显增高 ($P < 0.05$);与对照组、肾功能衰竭组和血管钙化组相比,酸干预组大鼠动脉血 pH 值和 HCO_3^- 浓度均下降 ($P < 0.05$;表 2)。von Kossa 染色显示,血管钙化组大鼠胸主动脉中膜有大量棕黑色钙盐沉积,但对照组、肾功能衰竭组和酸干预组大鼠胸主动脉均未发现棕黑色钙盐沉积 (图 1)。与对照组和肾功能衰竭组相比,血管钙化组大鼠胸主动脉钙含量明显增高 ($P < 0.05$);与血管钙化组相比,酸干预组大鼠胸主动脉钙含量明显降低 ($P < 0.05$;表 2)。

表 2. 各组大鼠动脉血 pH 值、 HCO_3^- 浓度、血肌酐和尿素氮水平及胸主动脉钙含量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2. Arterial blood pH value, HCO_3^- concentration, serum creatinine and urea nitrogen levels and calcium content of rat thoracic aorta in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分 组	动脉血 pH 值	动脉血 HCO_3^- (mmol/L)	肌酐 (mg/dL)	尿素氮 (mmol/L)	胸主动脉钙含量 (mg/g)
对照组	7.446±0.016	23.40±2.26	26.40±1.82	5.74±1.05	2.87±0.71
肾功能衰竭组	7.460±0.040	22.74±1.56	64.60±2.88 ^a	11.20±0.76 ^a	2.99±0.40
血管钙化组	7.455±0.036	23.50±3.81	56.80±1.92 ^a	10.12±0.69 ^a	10.68±1.31 ^{ab}
酸干预组	7.129±0.178 ^{abc}	12.42±5.74 ^{abc}	57.20±9.18 ^a	11.26±1.58 ^a	4.63±0.68 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与肾功能衰竭组比较;c 为 $P < 0.05$,与血管钙化组比较。

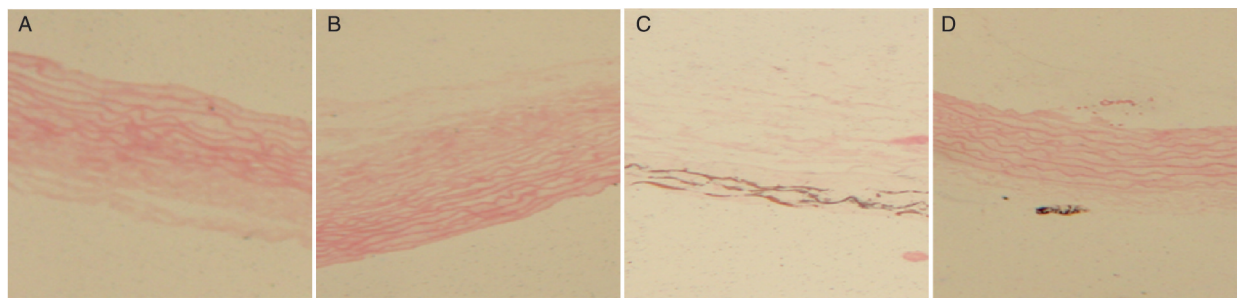


图 1. 各组大鼠胸主动脉 von Kossa 染色 (200×) A 为对照组, B 为肾功能衰竭组, C 为血管钙化组, D 为酸干预组。
Figure 1. von Kossa staining of rat thoracic aorta in each group (200×)

2.2 酸性环境对高磷诱导的大鼠 VSMC 钙化和 ALP 活性的影响

茜素红染色显示,高磷组细胞橘红色矿化结节明显多于正常对照组;与高磷组相比,酸干预组和抑制剂组细胞橘红色矿化结节明显减少(图 2)。与

正常对照组相比,高磷组细胞钙含量明显增多,ALP 活性明显增强 ($P<0.05$);与高磷组相比,酸干预组和抑制剂组细胞钙含量明显减少,ALP 活性明显降低 ($P<0.05$;表 3)。

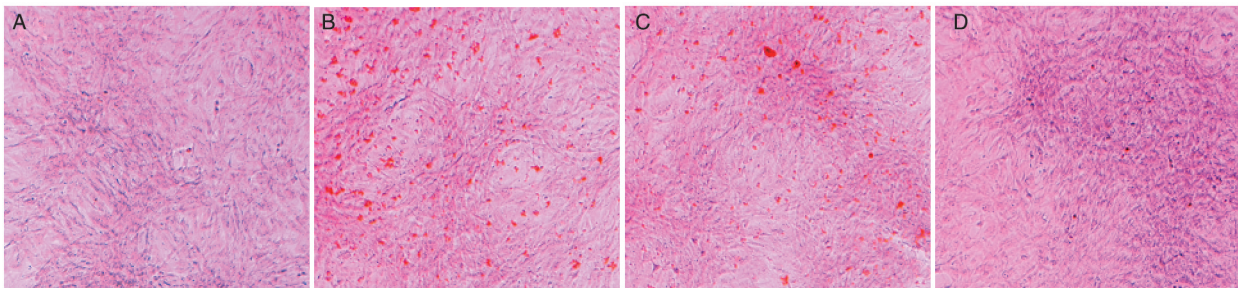


图 2. 各组大鼠 VSMC 茜素红染色 (100×) A 为正常对照组, B 为高磷组, C 为酸干预组, D 为抑制剂组。
Figure 2. Alizarin red staining of rat VSMC in each group (100×)

表 3. 各组大鼠 VSMC 碱性磷酸酶活性及钙含量 ($\bar{x}\pm s, n=9$)
Table 3. ALP activity and calcium content of VSMC in each group ($\bar{x}\pm s, n=9$)

分 组	ALP 活性 (U/g 蛋白)	钙含量 (mg/g 蛋白)
正常对照组	22.09±4.28	21.39±3.93
高磷组	93.91±7.94 ^a	86.15±7.59 ^a
酸干预组	54.58±7.73 ^{ab}	58.36±8.03 ^{ab}
抑制剂组	38.05±6.64 ^{abc}	45.01±6.87 ^{abc}

a 为 $P<0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P<0.05$,与高磷组比较;c 为 $P<0.05$,与酸干预组比较。

2.3 酸性环境对高磷诱导的大鼠 VSMC BMP-2、Smad1 和 Runx2 表达的影响

与正常对照组相比,高磷组 BMP-2、Smad1 和 Runx2 mRNA 表达明显增加 ($P<0.05$);与高磷组相比,酸干预组 BMP-2、Smad1 和 Runx2 mRNA 表达减少 ($P<0.05$)。BMP-2 和 Runx2 蛋白与其 mRNA 的表达结果一致(图 3)。

2.4 Noggin 对高磷诱导的大鼠 VSMC Smad1 和 Runx2 表达的影响

与正常对照组相比,高磷组 Smad1 和 Runx2 mRNA 表达增加 ($P<0.05$);与高磷组比较,加入 Noggin 后 Smad1 和 Runx2 mRNA 表达均有所下降 ($P<0.05$)。Runx2 蛋白与 mRNA 表达结果一致(图 4)。

3 讨 论

CKD 患者存在广泛的血管钙化,尤其是 CKD 4~5 期患者 80%有主动脉钙化,其钙化的严重程度可作为心血管事件的预警指标^[6]。CKD 患者的血管钙化主要表现为中膜钙化,VSMC 是血管中膜的主要成分,其具有成骨/成软骨样表型转化的能力,可以表达包括骨保护蛋白、骨桥蛋白、ALP、Runx2、MSX2 等多种骨基质蛋白和骨调节因子^[7]。因此,目前认为动脉钙化的过程类似于骨形成过程^[8]。以往研究已证实,酸性环境可以增加破骨细胞活性,

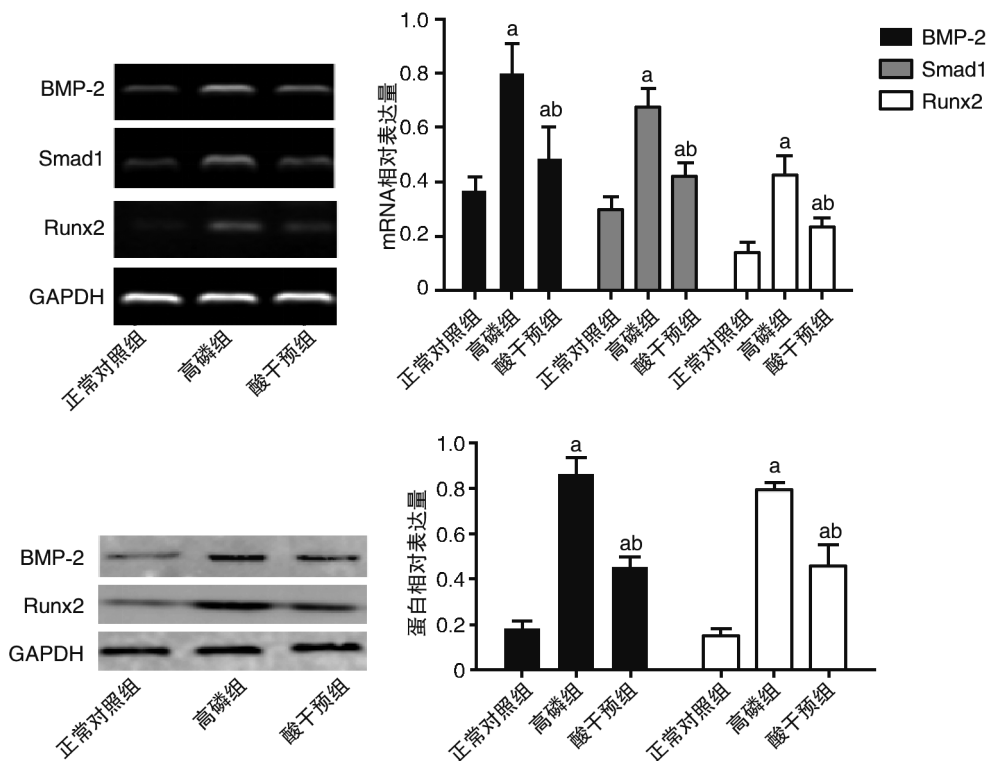


图 3. 各组大鼠 VSMC BMP-2、Smad1 和 Runx2 的表达 a 为 $P<0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与高磷组比较。
Figure 3. The expression of BMP-2, Smad1 and Runx2 in VSMC of rats in each group

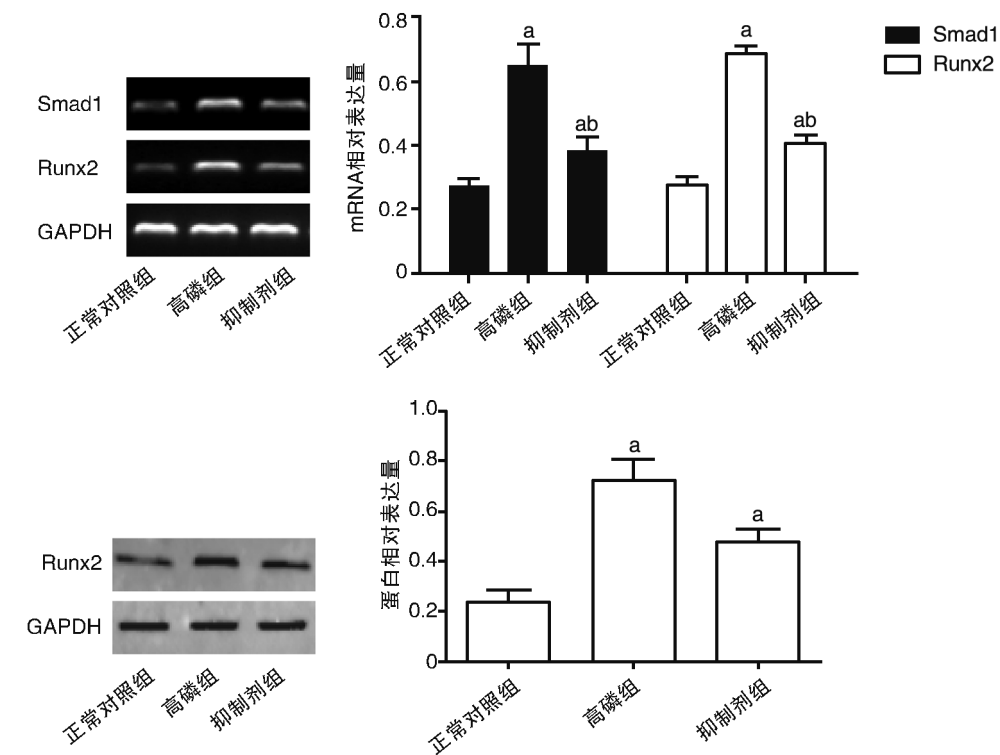


图 4. Noggin 对各组大鼠 VSMC Smad1 和 Runx2 表达的影响 a 为 $P<0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与高磷组比较。
Figure 4. Effect of Noggin on the expression of Smad1 and Runx2 in VSMC of rats in each group

降低成骨细胞活性,进而促进骨溶解。据此,我们推测酸性环境对骨组织的影响是否可以类推到对血管钙化的作用,即酸性环境是否可以通过抑制

VSMC 成骨/成软骨样表型转化而抑制血管中膜钙化。

本研究在体内和体外实验分别检测了大鼠胸

主动脉和 VSMC 钙盐沉积情况,结果发现酸性环境可以抑制大鼠胸主动脉中膜钙化的发生以及 VSMC 钙盐的沉积。Runx2 是成骨细胞发生和分化的特异性转录因子之一,能特异性识别成骨基因启动子中的特异性顺势作用元件,引起相应骨基质蛋白的表达,在成骨细胞分化及骨形成过程中起关键调控作用,是 VSMC 成骨/成软骨样表型转化早期标志蛋白之一^[9]。ALP 是成骨细胞功能性表型标记物之一,是 VSMC 发生表型转化的早期标志物^[10]。为了探究酸性环境是否通过抑制 VSMC 表型转化而抑制血管中膜钙化,本实验检测了 VSMC 中 Runx2 的表达及 ALP 活性,结果发现,高磷上调 Runx2 的表达及 ALP 活性,经酸干预后 Runx2 的表达及 ALP 活性均降低。提示酸性环境通过抑制 VSMC 向成骨/成软骨样表型转化而抑制血管中膜钙化。

BMP-2 是重要的骨形成调节因子,可刺激间充质干细胞向成骨细胞分化,并促进成骨细胞分化为骨细胞,同时在 VSMC 表型转化中起重要作用^[11]。BMP-2 与细胞膜表面受体结合,磷酸化下游的 R-Smad(Smad1、Smad5 和 Smad8),细胞质中磷酸化的 R-Smad 与 Smad4 结合形成转录复合物,进入核内上调 Runx2、Osterix 等成骨特异性转录因子的表达,进一步促进血管钙化的发生^[12-13]。那么 BMP-2 信号通路在高磷诱导的 VSMC 表型转化中是否起作用,为此,检测了高磷培养基中加入 BMP-2 信号通路抑制剂 Noggin 后 Smad1 和 Runx2 的表达情况。结果发现,高磷促进 BMP-2、Smad1 和 Runx2 的表达,加入 Noggin 后 Smad1 和 Runx2 的表达均降低,提示 BMP-2 信号通路参与了高磷诱导的 VSMC 表型转化。为进一步探究酸性环境是否通过 BMP-2 信号通路抑制高磷诱导的 VSMC 表型转化,检测了酸干预组 BMP-2、Smad1 和 Runx2 的表达,结果发现酸性环境下 BMP-2、Smad1 和 Runx2 的表达均降低,提示 BMP-2 信号通路参与了酸性环境抑制高磷诱导的 VSMC 表型转化。

综上所述,本研究从体内和体外实验均发现酸性环境可以抑制大鼠胸主动脉血管中膜钙化,这种作用可能是通过调节 BMP-2 信号通路相关基因的表达来下调 Runx2 的表达,进而抑制 VSMC 成骨/成软骨样表型转化而实现的,提示 BMP-2 信号通路参与了酸性环境抑制高磷诱导的 VSMC 表型转化及钙化过程。以上实验结果进一步验证了酸性环境与血管钙化相关,适度的酸性环境可能会抑制血管

钙化的发生,为临床预防和治疗血管钙化提供新的实验依据。但本研究仅限于动物和细胞实验,酸性环境对人体的影响是复杂的,适度的酸性环境是否会降低 CKD 患者血管钙化及心血管事件的死亡率还有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Roman-Garcia P, Rodriguez-Garcia M, Cabezas-Rodriguez I, et al. Vascular calcification in patients with chronic kidney disease: types, clinical impact and pathogenesis[J]. Med Princ Pract, 2011, 20 (3): 203-212.
- [2] Takeuchi S, Hirukawa K, Togari A. Acidosis inhibits mineralization in human osteoblasts [J]. Calcif Tissue Int, 2013, 93 (3): 233-240.
- [3] Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, et al. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate[J]. Circ Res, 2011, 109 (6): 697-711.
- [4] Mendoza FJ, Lopez I, Montes DOA, et al. Metabolic acidosis inhibits soft tissue calcification in uremic rats[J]. Kidney Int, 2008, 73 (4): 407-414.
- [5] 白亚玲,徐金升,石博,等.高磷刺激大鼠血管平滑肌细胞后 Cbfa1 及 Sox9 基因动态变化的研究[J].临床心血管病杂志, 2014, 30 (6): 542-545.
- [6] Palioan NJ, Giachelli CM. A current understanding of vascular calcification in CKD [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 307 (8): 891-900.
- [7] Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34 (4): 715-723.
- [8] Duer MJ, Frisic T, Proudfoot D, et al. Mineral surface in calcified plaque is like that of bone: further evidence for regulated mineralization [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28 (11): 2030-2034.
- [9] Kurabayashi M. Vascular calcification-pathological mechanism and clinical application-role of vascular smooth muscle cells in vascular calcification[J]. Clin Calcium, 2015, 25(5): 661-669.
- [10] Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives[J]. Eur Heart J, 2014, 35 (23): 1515-1525.
- [11] Sun P, Wang J, Zheng Y, et al. BMP-2/7 heterodimer is a stronger inducer of bone regeneration in peri-implant bone defects model than BMP2 or BMP7 homodimer [J]. Dent Mater J, 2012, 31 (2): 239-248.
- [12] Cai J, Pardali E, Sanchez-Duffhues G, et al. BMP signaling in vascular diseases[J]. FEBS Lett, 2012, 586 (14): 1993-2002.
- [13] Balderman JA, Lee HY, Mahoney CE, et al. Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification [J]. J Am Heart Assoc, 2012, 1 (6): e003905.

(此文编辑 文玉珊)