

## Sortilin 在糖尿病血管钙化演进中的作用机制

孙振<sup>1</sup>, 李丽华<sup>2</sup>, 包正阳<sup>1</sup>, 严金川<sup>1</sup>, 宋娟<sup>1</sup>, 王小东<sup>1</sup>, 景乐乐<sup>1</sup>, 庞棋文<sup>1</sup>, 耿跃<sup>1</sup>, 张莉莉<sup>1</sup>, 王中群<sup>1</sup>  
(江苏大学附属医院 1.心内科, 2.病理科, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] 糖尿病; 血管钙化; 分梳蛋白

[摘要] **目的** 探究分梳蛋白(Sortilin)在糖尿病血管钙化中的作用机制。**方法** 选取2015年6月至2017年6月在江苏大学附属医院骨科因糖尿病足截肢治疗的患者30例,根据钙定量检测胫前动脉钙化情况并分为对照组(钙定量 $<2\ \mu\text{mol}/\text{mg}$ ,  $n=15$ )和钙化组(钙定量 $\geq 2\ \mu\text{mol}/\text{mg}$ ,  $n=15$ )。Western blot测定两组Sortilin水平,并对患者血清学及临床指标进行相关分析。基于人主动脉平滑肌细胞株(HA-VSMC)构建糖尿病血管钙化体外模型,利用茜素红染色检测钙化程度,Western blot检测该模型中Sortilin表达水平。而后用Sortilin及Sortilin中和性抗体处理该钙化模型,用钙盐染色和钙结节长径测定的方法显示Sortilin对于钙化模型的影响。**结果** 钙化组胫前动脉钙化是对照组的4.9倍,同时Sortilin表达量也增加3.92倍。用含有羧甲基赖氨酸(CML)和氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)的钙化培养液处理HA-VSMC后,钙化明显增加。在Sortilin重组蛋白刺激下,HA-VSMC钙化程度进一步加重,钙结节长径明显增加,同时组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP)表达水平也显著提高。**结论** Sortilin促进糖尿病血管钙化,并使其向大钙化发展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Mechanism of Sortilin in the progression of diabetic vascular calcification

SUN Zhen<sup>1</sup>, LI Lihua<sup>2</sup>, BAO Zhengyang<sup>1</sup>, YAN Jinchuan<sup>1</sup>, SONG Juan<sup>1</sup>, WANG Xiaodong<sup>1</sup>, JING Lele<sup>1</sup>, PANG Qiwen<sup>1</sup>, GENG Yue<sup>1</sup>, ZHANG Lili<sup>1</sup>, WANG Zhongqun<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] diabetes; vascular calcification; Sortilin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of Sortilin in diabetic vascular calcification. **Methods**

Thirty patients with diabetic foot amputation were enrolled from June 2015 to June 2017. The calcification of anterior tibial artery was measured by calcium quantification and divided into control group (calcium concentration $<2\ \mu\text{mol}/\text{mg}$ ,  $n=15$ ) and calcification group (calcium volume $\geq 2\ \mu\text{mol}/\text{mg}$ ,  $n=15$ ). Western blot was used to determine the expression of Sortilin in the two groups. And the serological and clinical indexes were also analyzed. The model of diabetic vascular calcification was established based on human aortic smooth muscle cell line (HA-VSMC). The degree of calcification was detected by alizarin red staining. The expression level of Sortilin in the model was detected by Western blot. The calcification model was then treated with Sortilin and Sortilin antibody, and the effect of Sortilin on the calcification model was shown by von Kossa staining, calcium quantification and calcium nodule diameter measurement. **Results** Calcification of the anterior tibial artery in the calcification group was 4.9 times that of the control group, and the expression level of Sortilin increased by 3.92 times. After treatment with calcified culture medium containing N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine (CML) and oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), HA-VSMC calcification increased significantly. The calcification of HA-VSMC was obviously increased under the stimulation of Sortilin recombinant protein, and the diameter of calcium nodules was also significantly increased. Meanwhile, tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) expression levels were also significantly increased. **Conclusion** Sortilin promotes the formation of diabetic vascular calcification and develops it

[收稿日期] 2017-10-23

[修回日期] 2018-04-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81770450和81370408);江苏省研究生科研创新计划项目(KYCX17\_1801);镇江市科技局社会发展项目(SH2016037和SH2017031)

[作者简介] 孙振,硕士研究生,主要研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床,E-mail为sunfy893@foxmail.com。通信作者王中群,博士,副研究员,博士研究生导师,主要研究方向为动脉粥样硬化基础与临床,E-mail为wangtsmc@aliyun.com。

into macrocalcification.

血管钙化是多种疾病的并发症<sup>[1-2]</sup>,会增加痴呆、中风、急性冠状动脉事件、肾功能不全和肢体缺血的风险,严重影响患者的生活质量<sup>[3-4]</sup>。从钙化类型来看,大钙化与稳定斑块有关,而微钙化( $<50\ \mu\text{m}$ )常表现为易损斑块,容易发生急性心血管事件<sup>[5]</sup>,因此研究血管钙化转归对于改善患者临床终末事件具有深远的意义。现有研究表明钙化是由成骨和破骨平衡被打破而引发,成骨产生钙沉积,破骨吸收钙沉积<sup>[6-8]</sup>,如果血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)发生完全成骨分化,则易形成大钙化;若 VSMC 的破骨介质增加,则易形成微钙化<sup>[9]</sup>,但其中确切的机制尚未完全清楚。组织非特异性碱性磷酸酶(tissue non-specific alkaline phosphatase, TNAP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)分别是成骨和破骨的标志物,两者在组织矿化过程中起着成骨和破骨的作用<sup>[6-7,10-11]</sup>。两种钙化类型中 TNAP 和 TRAP 是否发生变化,仍有待进一步探究。基因组学研究(genome-wide association study, GWAS)表明分拣蛋白(Sortilin)基因与心血管疾病有显著关联<sup>[12]</sup>,另有研究也显示 Sortilin 是糖尿病和脂质代谢的重要生物学指标,可以有效地反映机体代谢状况<sup>[13]</sup>。而 Sortilin 与糖尿病血管钙化的关系,当前的研究尚无法给出合理的解释。与此同时,本课题组搜集了糖尿病足患者截肢后的胫前动脉,并曾首次在国际上复制了糖尿病血管钙化体外模型<sup>[14-15]</sup>,借助上述工作基础,本研究从体内和体外两个方面探讨 Sortilin 在动脉粥样硬化斑块内钙化中的作用,为防治血管钙化提供新的思路。

## 1 资料和方法

### 1.1 材料

人主动脉平滑肌细胞株(HA-VSMC)购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清购自 Gibco 公司;ELISA 试剂盒、钙含量检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;anti-Sortilin 抗体、anti-TNAP 抗体和 anti-TRAP 抗体购自 Abcam (Cambridge, UK);anti- $\beta$ -actin 抗体和所有二抗购自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA);Sortilin 重组蛋白购自 R&D Systems (Minnesota, USA);茜素红染料购自北京索莱宝科技有限公司;DAB 染色试剂盒购自福州迈新。其他试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 研究对象

选取 2015 年 6 月至 2017 年 6 月在江苏大学附属医院骨科因糖尿病足行股骨中下 1/3 截肢治疗的患者共 30 例,患者无严重创伤或无恶性肿瘤史。截肢主要是由于感染、严重缺血、局部坏疽而致无法进行血运重建。根据下肢胫前动脉钙定量检测结果,将患者分为两组:对照组(钙定量 $<2\ \mu\text{mol}/\text{mg}$ )和钙化组(钙定量 $\geq 2\ \mu\text{mol}/\text{mg}$ ),每组 15 例。所有手术均经江苏大学附属医院伦理委员会批准,并按照制度进行。患者签署知情同意书及手术同意书,并报医务科备案。

### 1.3 血清 Sortilin 检测

收集受检者空腹静脉血,离心分离血清并于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存,使用 ELISA 检测人 Sortilin 胞外域(78-765)产生的多克隆抗体,按照 ELISA 试剂盒具体步骤进行操作。

### 1.4 细胞培养及体外钙化诱导

选用 HA-VSMC,在 $37\ ^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下将细胞培养于含有 $10\%\text{FBS}$ 、 $30\ \text{mg}/\text{L}$ 青霉素及 $100\ \text{mg}/\text{L}$ 的 DMEM 培养基中。诱导钙化培养基(OM)需补充 $2.5\ \text{mmol}/\text{L}$  $\beta$ -甘油磷酸酯和 $50\ \text{mg}/\text{L}$ 抗坏血酸,持续诱导 7 天。如前期研究<sup>[14]</sup>所述,为模拟糖尿病患者体内环境,在钙化诱导的 HA-VSMC 中加入 $50\ \text{mg}/\text{L}$ 氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)及 $10\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 羧甲基赖氨酸(N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine, CML)。然后通过以下培养基中培养细胞来研究 Sortilin 在 HA-VSMC 钙化中的作用:①OM+ox-LDL+CML 条件下钙化培养基;②在 OM+ox-LDL+CML 条件下,加入 Sortilin 重组蛋白( $10^{-2}\ \text{mg}/\text{L}$ );③在 OM+ox-LDL+CML 条件下,用 Sortilin 抗体( $1\ \text{mg}/\text{L}$ )处理含或不含 Sortilin( $10^{-2}\ \text{mg}/\text{L}$ )的钙化培养基。孵育 7 天后进行后述测量。

### 1.5 von Kossa 染色及茜素红 S 染色

对于 von Kossa 染色,用 $2\%$ 多聚甲醛固定细胞,去离子水洗涤后加入 $5\%$ 硝酸银,将细胞培养板置于太阳光下,直至其变为黑色。之后加入 $5\%$ 硫代硫酸钠溶液 $5\ \text{min}$ ,以除去未反应的银,中性品红复染 $3\ \text{min}$ 并置于光镜下观察。对于茜素红 S 染色,用 $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $4\%$ 多聚甲醛固定 $5\ \text{min}$ ,室温下用 $2\%$ 茜素红( $\text{pH}\ 4.2$ )染色 $5\ \text{min}$ ,再用去离子水充分淋洗。茜素红染色培养物用 $10\%$ 十六烷基吡啶氯化物萃取 $10\ \text{min}$ 。使用分光光度计在 $570\ \text{nm}$ 测定 OD 值。

## 1.6 钙含量测定

使用 0.6 mol/L HCl 溶液对烘干的动脉组织(约 10 mg)和细胞进行脱钙 24 h,收集上清液。使用邻甲酚酞法测量钙含量。并用 BCA 蛋白测定试剂盒测量蛋白质含量,并以蛋白含量标准化钙化量。

## 1.7 Western blot 检测

将细胞如上所述诱导培养至第 7 天,使用 RIPA 缓冲液制备细胞和组织裂解物。通过 SDS-PAGE 分离样品,转移到硝酸纤维素膜上,用 Sortilin 抗体、TNAP 抗体、TRAP 抗体和  $\beta$ -actin 抗体进行免疫印迹。按 1:5000 比例加入辣根过氧化物酶标记的二抗,37°C 孵育 1.5 h 后,通过 ECL 检测试剂盒的增强,采用 UVP 凝胶图像分析系统分析。

## 1.8 统计学分析

数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间比较使用 Student *t* 检验或单因素方差分析,相关分析采用 Pearson 相关性分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 糖尿病足截肢患者的基线资料

对照组和钙化组糖尿病足截肢患者在男女性别比例、平均年龄、BMI、吸烟史、高血压比例、空腹血糖(糖尿病患者强化胰岛素治疗后)、LDLC、总胆固醇、甘油三酯及 HDLC 等方面没有显著差异,而糖尿病病程存在显著差异。提示糖尿病截肢患者胫前动脉钙化程度可能随糖尿病病程增加而加重(表 1)。

表 1. 两组糖尿病足截肢患者的基线资料比较

Table 1. Comparison of baseline data of patients with diabetic foot amputation in the two groups

项目	对照组 (n=15)	钙化组 (n=15)	P 值
男/女(例)	9/6	10/5	>0.99
年龄(岁)	57±10	60±9	0.57
吸烟史(例)	7	9	>0.99
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	22.06±2.41	22.09±2.62	0.97
高血压(%)	33.33	40.00	>0.99
糖尿病病程(年)	6±2	15±4	<0.001
总胆固醇(mg/dL)	164.29±28.32	178.42±21.23	0.13
空腹血糖(mg/dL)	104.62±16.35	109.21±19.77	0.23
甘油三酯(mg/dL)	175.21±21.35	185.14±22.03	0.22
LDLC(mg/dL)	141.71±5.47	144.34±10.54	0.39
HDLC(mg/dL)	51.79±5.83	48.82±6.58	0.20

## 2.2 糖尿病足截肢患者胫前动脉钙化情况及 Sortilin 的表达

钙化组胫前动脉钙化是对照组的 4.9 倍( $0.890\pm 0.579\ \mu\text{mol}/\text{mg}$  比  $4.360\pm 1.267\ \mu\text{mol}/\text{mg}$ ,  $P<0.001$ ),同时 Western blot 结果显示,钙化组 Sortilin 的表达量比对照组提高 3.92 倍( $0.572\pm 0.043$  比  $0.146\pm 0.023$ ,  $P<0.001$ ;图 1)。由此可知,Sortilin 的表达随着钙化增加而增多。

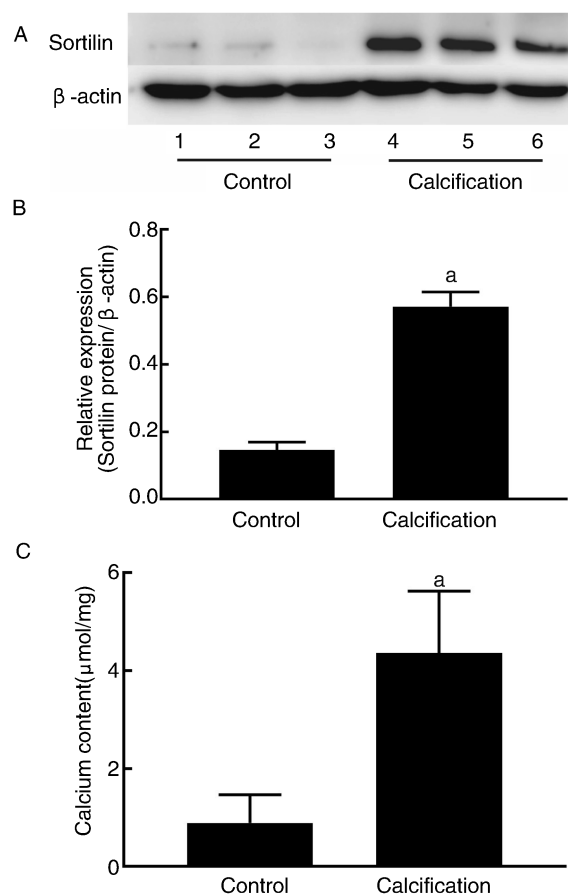


图 1. 糖尿病足截肢患者胫前动脉钙化情况及 Sortilin 的表达 A 为 Western blot 检测对照组和钙化组 Sortilin 的表达量,B 为相对吸光度值半定量分析,C 为对照组和钙化组胫前动脉钙定量分析。a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较。

Figure 1. Calcification of anterior tibial artery and expression of Sortilin in diabetic foot amputation patients

## 2.3 糖尿病足截肢患者血清 Sortilin 水平及与胫前动脉钙定量的相关性

ELISA 结果显示,血清 Sortilin 水平在钙化组是对照组的 2.87 倍( $P<0.05$ ;表 2)。Pearson 相关性分析显示,血清 Sortilin 水平与胫前动脉钙定量正相关( $r=0.8956$ , $P<0.001$ ;图 2)。

表 2. 糖尿病足截肢患者胫前动脉钙定量及血清 Sortilin 水平 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=15$ )

Table 2. Calcium quantification in anterior tibial artery and serum Sortilin level in patients with diabetic foot amputation ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=15$ )

指标	对照组	钙化组
Sortilin ( $\mu\text{g/L}$ )	18.320 $\pm$ 10.360	54.500 $\pm$ 15.510
钙定量 ( $\mu\text{mol/mg}$ )	0.890 $\pm$ 0.579	4.360 $\pm$ 1.267

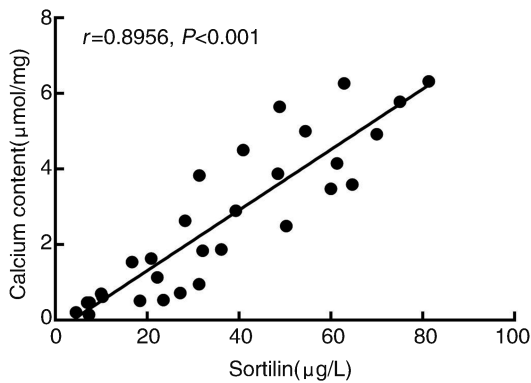


图 2. 血清 Sortilin 水平与胫前动脉钙定量的相关性分析  
Figure 2. Correlation between serum Sortilin level and calcium content in anterior tibial artery

2.4 CML 对 HA-VSMC 钙化及 Sortilin 表达的影响

茜素红 S 染色显示 CML 组较 ox-LDL 组和 OM 组钙化程度更重, 定量检测发现 CML 组钙化是 ox-LDL 组的 1.78 倍, 是 OM 组的 4.17 倍 (1.443 $\pm$ 0.057 比 0.812 $\pm$ 0.031,  $P<0.05$  和 1.443 $\pm$ 0.057 比 0.346 $\pm$

0.025,  $P<0.001$ ; 图 3A), 表明加入 CML 后, 钙沉积更多。Western blot 结果显示, 加入 CML 后随着钙化的加重, HA-VSMC 中 Sortilin 表达量显著升高 (0.863 $\pm$ 0.025 比 0.569 $\pm$ 0.024,  $P<0.05$  和 0.863 $\pm$ 0.025 比 0.376 $\pm$ 0.024,  $P<0.05$ ; 图 3B)。此结果与糖尿病足截肢患者胫前动脉检测结果一致。

2.5 Sortilin 在人主动脉平滑肌细胞钙化形成中的作用

von Kossa 染色及钙定量分析显示, 在对照组的基础上加入 Sortilin 重组蛋白 ( $10^{-2}$  mg/L) 后钙化明显增多 ( $P<0.05$ ); 若加入 Sortilin 抗体 (1 mg/L) 后钙化显著减少 ( $P<0.001$ )。以上结果说明 Sortilin 可促进钙化。同时也发现, Sortilin 组钙化结节长径明显增加, 分别为对照组和 anti-Sortilin 组的 3.14 倍和 8.68 倍 (89.352 $\pm$ 9.726  $\mu\text{m}$  比 28.443 $\pm$ 3.095  $\mu\text{m}$ ,  $P<0.05$ ; 89.352 $\pm$ 9.726  $\mu\text{m}$  比 10.289 $\pm$ 1.003  $\mu\text{m}$ ,  $P<0.05$ )。可见加入 Sortilin 后钙结节会增大, 形成大钙化, 而用抗体阻断 Sortilin 后钙结节会进一步变小。以上结果显示 Sortilin 可诱导钙化向大钙化的方向发展。本研究进一步测定 TNAP 和 TRAP 在不同钙化类型中的表达情况, 结果发现 TNAP 变化与钙定量结果及钙结节长径一致, Sortilin 组中表达量最高。TRAP 变化与此相反, 在 Sortilin 组表达量最低 (图 4)。综上, Sortilin 可能通过促进成骨分化并抑制破骨表达而使钙化向着大钙化方向演进。

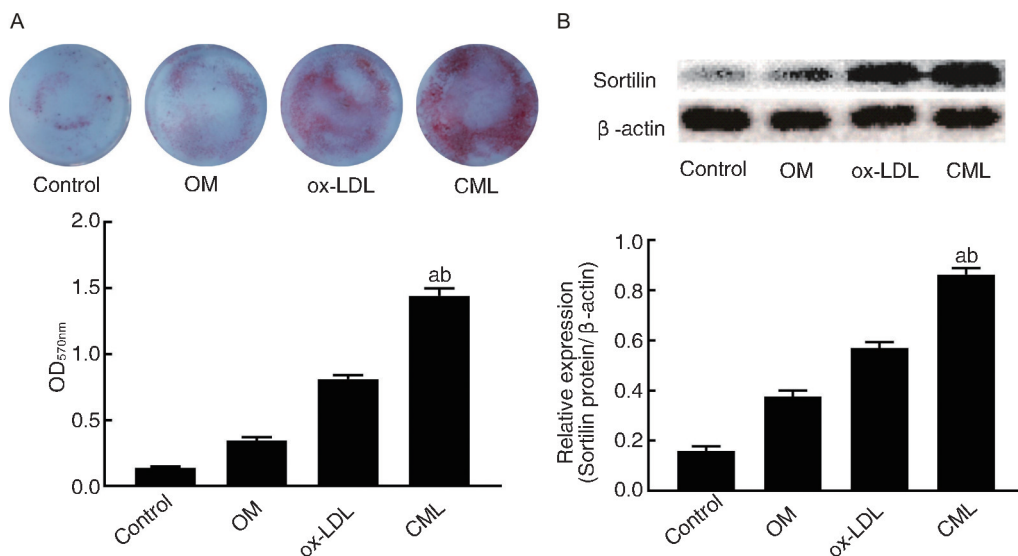
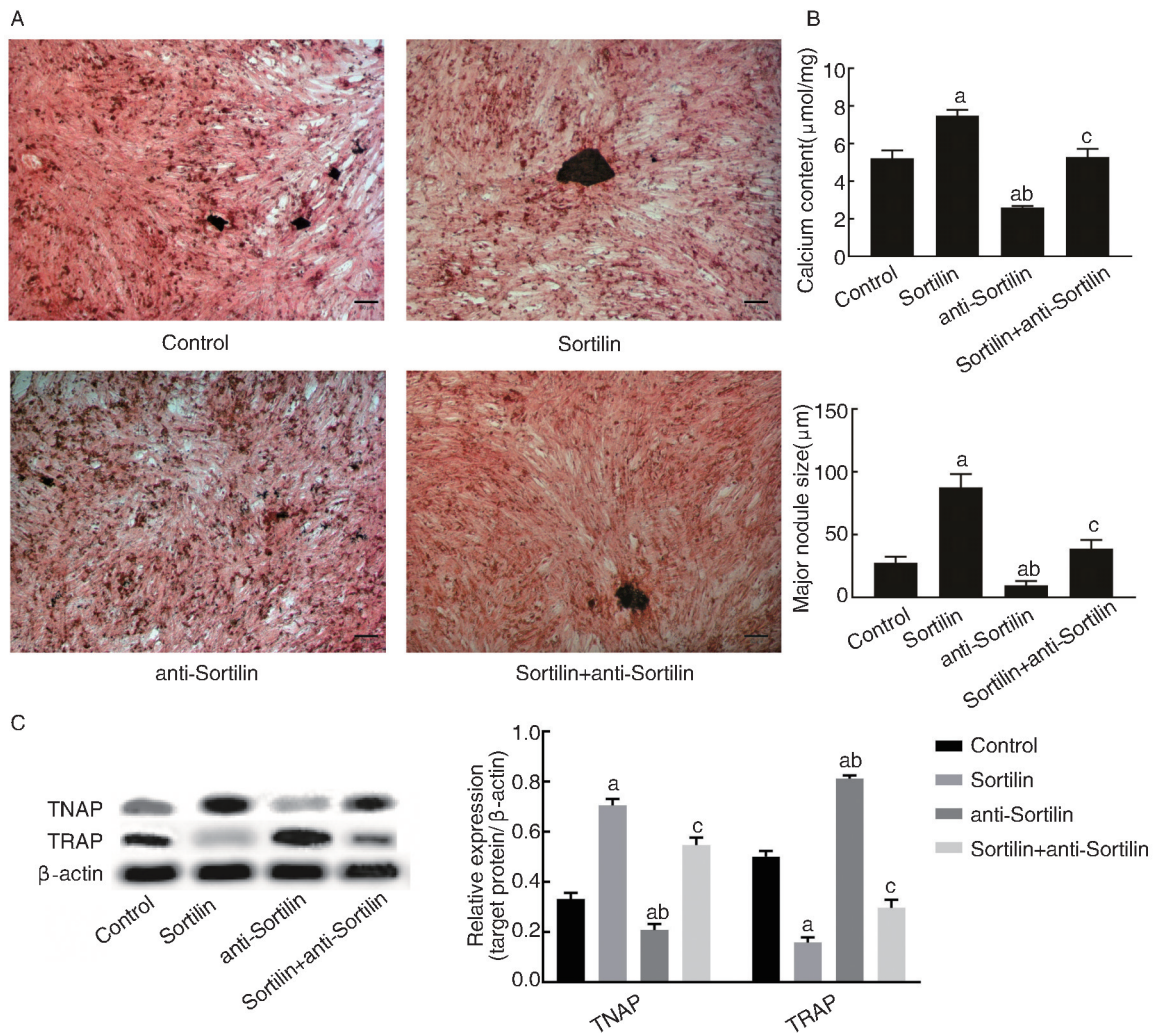


图 3. CML 对 HA-VSMC 钙化及 Sortilin 表达的影响 A 为茜素红 S 染色显示 HA-VSMC 钙化及其定量分析, 图中红色为钙沉积区; B 为 Western blot 检测 Sortilin 的表达量及相对吸光度定量分析。a 为  $P<0.05$ , 与 ox-LDL 组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 OM 组比较。

Figure 3. Effect of CML on HA-VSMC calcification and expression of Sortilin



**图 4. von Kossa 染色检测 HA-VSMC 钙化情况及 Western blot 检测 TNAP 和 TRAP 的表达** A 为 HA-VSMC 钙化情况,黑色为钙盐染色(放大倍数 100×,标尺 50 μm);B 为钙化类型分析,上图为各组钙定量,下图为钙结节长径测定;C 为 Western blot 检测成骨指标 TNAP 和破骨指标 TRAP 的表达量及其半定量分析。a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 Sortilin 组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 anti-Sortilin 组比较。  
**Figure 4. Von Kossa staining was used to detect HA-VSMC calcification and Western blot was used to detect the expression of TNAP and TRAP**

### 3 讨论

Sortilin 在多个细胞系起着调控蛋白质运输和调节分泌的作用<sup>[16-17]</sup>,GWAS 表明 Sortilin 相关基因 SORT1 与心血管疾病有关联<sup>[10]</sup>,还有研究指出 Sortilin 与脂代谢有密切关系<sup>[18]</sup>。此外,Goettsch 等<sup>[19]</sup>的研究指出,Sortilin 可以运输 TNAP 到细胞外囊泡中,进而促进血管钙化的进展。在促进钙化发展方面,该研究与本研究的结论一致。在钙化形态转归方面,本研究是在糖尿病的前提下,通过分析糖尿病足截肢患者胫前动脉和体外构建 HA-VSMC 糖尿病钙化模型来探究 Sortilin 在糖尿病血管钙化中的作用,而 Goettsch 等研究是在动脉粥样硬化的背景

下探讨 Sortilin 调控血管钙化的内在机制。两个研究互为补充,进一步拓展了 Sortilin 的功能。

有研究表明,血管钙化是血管微环境中成骨与破骨动态变迁的过程,成骨细胞负责钙基质沉积,破骨细胞负责钙基质吸收<sup>[20]</sup>。钙化分为大钙化和微钙化( $< 50 \mu\text{m}$ ),大钙化易致血管顺应性降低,晚期可导致心力衰竭,而微钙化是易损斑块的不良因素,与急性心血管事件关系密切<sup>[21]</sup>,因此研究钙化转归对于临床意义深远。本研究发现当 Sortilin 处理细胞后,钙化结节明显增大,呈现为大钙化形式,抑制 Sortilin,钙化趋向于弥漫点灶状,证明 Sortilin 是钙化转归的一个关键调控点,Sortilin 增加可使钙化向大钙化的方向发展。

为进一步探究 Sortilin 调控钙化转归的潜在机制,本研究选取了 TNAP 和 TRAP 两个指标。TNAP 可以水解 PPi 产生羟基磷灰石结晶所需的 Pi,胞外 Pi 不仅可以作为羟基磷灰石形成的底物,而且可以作为促进钙化基因表达程序的诱导剂<sup>[22]</sup>,是平滑肌细胞成骨样表型的特异性标记物。TRAP 是破骨样细胞的特异标记物,其可改变细胞周围微环境,抑制细胞成骨分化,对 TRAP 基因缺失小鼠的研究发现,小鼠各组织中矿化加重<sup>[12]</sup>,这一现象支持 TRAP 抑制成骨的理论。本研究中 Sortilin 能有效地促进 TNAP 表达并抑制 TRAP 表达,可见 Sortilin 可能通过增强细胞成骨分化并抑制破骨物质表达而促进钙化并使钙化向大钙化演进。本研究还发现,对照组与 Sortilin+anti-Sortilin 组,虽然两组钙定量结果无统计学意义,但是后者的钙结节尺寸却显著大于前者,由此推测可能还存在其他调控钙化转归的途径尚未被发现,后期我们还将从动物水平做进一步的研究。

综上所述,通过对糖尿病足截肢患者胫前动脉钙化的分析以及构建糖尿病血管钙化体外模型,我们发现 Sortilin 可以促进钙化,同时诱导钙化形态向大钙化方向发展。此次研究为糖尿病血管钙化临床预防、治疗及风险评估提供了理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Janssen R. Magnesium to counteract elastin degradation and vascular calcification in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Med Hypotheses*, 2017, 107: 74-77.
- [2] Wyatt CM, Druke TB. Vascular calcification in chronic kidney disease; here to stay[J]. *Kidney Int*, 2017, 92(2): 276-278.
- [3] Wollina U. Update on cutaneous calciphylaxis [J]. *Indian J Dermatol*, 2013, 58(2): 87-92.
- [4] Stabley JN, Towler DA. Arterial calcification in diabetes mellitus: preclinical models and translational implications [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(2): 205-217.
- [5] Nakahara T, Dweck MR, Narula N, et al. Coronary artery calcification; from mechanism to molecular imaging [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2017, 10(5): 582-593.
- [6] Nie B, Zhou SQ, Fang X, et al. The function and meaning of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand in arterial calcification[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2015, 35(5): 666-671.
- [7] Massy ZA, Mentaverri R, Mozar A, et al. The pathophysiology of vascular calcification; are osteoclast-like cells the missing link [J]. *Diabetes Metab*, 2008, 34(Suppl 1): S16-20.
- [8] Sheen CR, Kuss P, Narisawa S, et al. Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification[J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(5): 824-836.
- [9] Menini S, Iacobini C, Ricci C, et al. The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 100(3): 472-480.
- [10] Morisawa T, Nakagomi A, Kohashi K, et al. Serum tartrate-resistant acid phosphatase-5b levels are associated with the severity and extent of coronary atherosclerosis in patients with coronary artery disease [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2017, 24: 1058-1068.
- [11] Kaunitz JD, Yamaguchi DT. TNAP, TRAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 105(3): 655-662.
- [12] O'Donnell CJ, Kavousi M, Smith AV, et al. Genome-wide association study for coronary artery calcification with follow-up in myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2011, 124(25): 2855-2864.
- [13] Oh TJ, Ahn CH, Kim BR, et al. Circulating sortilin level as a potential biomarker for coronary atherosclerosis and diabetes mellitus [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2017, 16(1): 92-98.
- [14] Wang Z, Jiang Y, Liu N, et al. Advanced glycation end-product N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(2): 387-396.
- [15] Xu S, Ye F, Li L, et al. Ghrelin attenuates vascular calcification in diabetic patients with amputation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 1053-1064.
- [16] Nykjaer A, Willnow TE. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function [J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(4): 261-270.
- [17] Dal Farra C, Sarret P, Navarro V, et al. Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2001, 92(4): 503-509.
- [18] Patel KM, Strong A, Tohyama J, et al. Macrophage sortilin promotes LDL uptake, foam cell formation, and atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2015, 116(5): 789-796.
- [19] Goetsch C, Hutcheson JD, Aikawa M, et al. Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1323-1336.
- [20] Thompson B, Towler DA. Arterial calcification and bone physiology: role of the bone-vascular axis [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(9): 529-543.
- [21] Kolodgie FD, Yahagi K, Mori H, et al. High-risk carotid plaque: lessons learned from histopathology [J]. *Semin Vasc Surg*, 2017, 30(1): 31-43.
- [22] Martin S, Lin H, Ejimadu C, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase as a target of sFRP2 in cardiac fibroblasts [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 309(3): C139-147.

(此文编辑 文玉珊)