

内质网应激与自噬的交互作用对血管钙化的影响

李艳青², 付佳³, 李彤⁴, 任阳阳⁴, 许椅鑫⁴, 辛庆杰³, 董建龙¹, 杨锐¹, 武宇明¹, 滕旭^{1,5}

(1.河北医科大学生理教研室,河北省石家庄市 050017;2.河北省中医院妇科,河北省石家庄市 050011;

3.河北医科大学临床医学专业,河北省石家庄市 050017;4.河北医科大学公共卫生专业,

河北省石家庄市 050017;5.河北省实验动物重点实验室,河北省石家庄市 050017)

[关键词] 血管钙化; 平滑肌细胞表型转化; 内质网应激; 自噬

[摘要] **目的** 证实内质网应激(ERS)和自噬的交互作用对血管钙化(VC)的影响。**方法** 维生素 D₃ 肌注和尼古丁灌胃制备大鼠在体血管钙化模型,取主动脉行茜素红染色和钙含量检测,Western blot 检测相关蛋白的表达水平。**结果** 与对照组相比,钙化组大鼠主动脉管壁钙沉积显著增加,血管平滑肌细胞(VSMC)收缩表型标志蛋白 SM-22 α 和 Calponin 表达显著降低,而成骨细胞样表型标志蛋白骨形态发生蛋白 2(BMP-2)和 Runx 相关转录因子 2(RUNX2)表达显著升高,ERS 标志蛋白葡萄糖调节蛋白(GRP78)和 C/EBP 同源蛋白(CHOP)以及自噬标志蛋白轻链 3(LC3 II)和 Beclin-1 表达显著升高。钙化大鼠应用 ERS 激动剂衣霉素[10 μ g/(kg·d)]可进一步增加血管壁钙沉积及 BMP-2 和 RUNX2 表达水平,而 SM-22 α 和 Calponin 表达进一步减少,GRP78 和 CHOP 以及 LC3 II 和 Beclin-1 表达水平进一步增加。钙化大鼠应用自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤[10 mg/(kg·d)]可降低 LC3 II 和 Beclin-1 水平,同时 GRP78 和 CHOP 表达升高,增加血管壁钙沉积及 BMP-2 和 RUNX2 表达水平,降低 SM-22 α 和 Calponin 表达。**结论** 内质网应激与自噬的交互作用影响血管钙化的发展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The effect of interplay between endoplasmic reticulum stress and autophagy on vascular calcification

LI Yanqing², FU Jia³, LI Tong⁴, REN Yangyang⁴, XU Yixin⁴, XIN Qingjie³, DONG Jianlong¹, YANG Rui¹, WU Yuming¹, TENG Xu^{1,5}

(1. Department of Physiology, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017; 2. Department of Gynecology, Hebei Hospital of Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei 050011; 3. Clinical Medicine Major, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017; 4. Public Health Major, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017; 5. Hebei Key Lab of Laboratory Animal Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017, China)

[KEY WORDS] vascular calcification; transdifferentiation of vascular smooth muscle cells; endoplasmic reticulum stress; autophagy

[ABSTRACT] **Aim** To determine the effect of interplay between endoplasmic reticulum stress (ERS) and autophagy on vascular calcification (VC). **Methods** VC model in rats was induced by vitamin D₃ plus nicotine. The deposition of calcium in aorta was determined by alizarin red staining and assessment of calcium content. The protein levels in aorta were measured by Western blot. **Results** Compared with control group, deposition of calcium in aorta was increased in VC group. The protein levels of SM-22 α and calponin in calcified vessels were decreased, whereas that of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and RUNX2 was increased. ERS and autophagy was activated in calcified aorta, shown by increased levels of glucose regulated protein (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP), LC3 II and Beclin-1. Tunicamycin (10 μ g/kg per day), an ERS inducer exacerbated VC and transdifferentiation of vascular smooth muscle

[收稿日期] 2018-08-15

[修回日期] 2018-09-20

[基金项目] 国家自然科学基金(81770499);河北省自然科学基金(H2016206264);大学生创新创业训练计划(USIP2017017,国家级)

[作者简介] 李艳青,硕士,副主任医师,研究方向为内质网应激在疾病发生发展中的作用,E-mail 为 liyanqing81@163.com。付佳为本文共同第一作者。通信作者滕旭,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向为血管钙化的发生机制及其神经体液调控,E-mail 为 tengxu78@163.com。

cells from contracted-like to osteoblasts-like phenotype. It also promoted ERS and autophagy. 3-methyladenine (10 mg/kg per day), an autophagy inhibitor prevented stimulation of autophagy, but promoted ERS activation in calcified aorta, while it also exaggerated VC and transdifferentiation of vascular smooth muscle cells. **Conclusion** The interplay between ERS and autophagy plays an important role in progression of VC.

血管钙化(vascular calcification, VC)是指钙盐在血管壁的异位沉积,可分为内膜钙化和中膜钙化。中膜钙化是高血压、肾病、糖尿病和衰老等导致血管病变的共同病理基础,是心脑血管事件发生和预后的独立危险因素^[1]。近年的研究显示,血管钙化并不是钙盐的被动沉积,而是类似于骨形成的主动地可调控、可逆转的病理过程。其中,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)由收缩表型向成骨细胞样表型的转化在血管钙化的发生发展过程中发挥重要作用,但是其机制目前尚未完全阐明^[2-3]。

已有研究显示内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)参与了VSMC表型转化和血管钙化^[4-7]。ERS可能通过两方面参与血管钙化,一是引起细胞凋亡促进血管钙化,二是引起VSMC表型转化促进血管钙化,而且第二条机制可能发挥更大的作用^[7-11]。内源性的神经^[12]和体液调控机制^[13-15]可通过调节ERS进而影响血管钙化,其他一些因素或者干预措施,例如慢性间歇性低压低氧、高同型半胱氨酸血症等也可通过调控ERS影响血管钙化的发生发展^[16-17]。

自噬在血管生理和病理生理过程中的作用也逐渐成为研究的热点^[18]。人钙化主动脉瓣膜细胞、动物实验和细胞实验均证实钙化的组织和VSMC的自噬水平显著升高,而增加的自噬水平具有对抗血管钙化的作用^[19-21]。很多血管保护性因素也通过促进自噬水平改善血管钙化程度^[22-24]。

ERS可引起自噬激活;而自噬的激活有助于清除未折叠或者错误折叠的蛋白质,恢复内质网稳态,减轻ERS^[19,25-26]。但是,ERS和自噬的交互作用对血管钙化的影响还未阐明。在慢性肾脏疾病诱导的小鼠血管钙化模型中,ERS可抑制雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)通路导致蛋白质翻译合成减少,有助于恢复内质网稳态^[27]。考虑到mTORC1通路在自噬的调控中同样发挥着重要作用,因此,我们提出假设ERS的激活可促进自噬的发生,通过负反馈作用恢复内质网稳态,进而影响血管钙化的发生发展。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

实验选用180~200 g无特定病原体级雄性SD大鼠,由河北医科大学实验动物中心提供,动物饲养和实验程序按中国动物管理条例(中华人民共和国卫生部2001年第55号文件)规定的动物实验标准执行,并经河北医科大学实验伦理委员会批准同意。常规条件下饲养,室内温度22~24℃,相对湿度40%~60%,每天光线照射12 h,自由进食和饮水,实验操作前12 h禁食,自由饮水。

维生素D₃(vitamin D₃, VitD₃)注射液购自华晟科技动物药品厂(哈尔滨);尼古丁、衣霉素(tunicamycin, Tm)和3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)(Sigma, USA);平滑肌22α(smooth muscle 22α, SM-22α, 1:2000)、钙结合蛋白(calponin, 1:1000)、骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2, 1:1000)、Runt相关转录因子2(runt-related transcription factor 2, RUNX2, 1:500)、葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78 kDa, GRP78, 1:2000)、CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP, 1:1000)、轻链3(light chain 3, LC3, 1:500)和Beclin-1(1:1000)抗体(Abcam, USA);β-肌动蛋白(β-actin)抗体和二抗(Santa Cruz, USA);其他常用试剂均为市售分析纯试剂。

1.2 动物模型制备和实验分组

尼古丁灌胃加VitD₃肌注制备血管钙化动物模型^[28]。第1天上午8点给予大鼠肌注VitD₃(300000 U/kg)和尼古丁(25 mg/kg,混入花生油2 mL中)灌胃,晚上8点再灌胃1次;第2天上午8点再次肌注VitD₃1次。常规饲养4周后大鼠腹腔注射乌拉坦(1 g/kg)麻醉,取主动脉进行相关指标检测。

(1)钙化血管ERS和自噬激活程度实验:将20只大鼠随机分为对照组和钙化组,钙化组制备大鼠血管钙化模型,对照组使用花生油灌胃和VitD₃溶剂肌注;(2)ERS对血管钙化和自噬的影响实验:将20只大鼠随机分为两组,钙化组和Tm组,Tm组自模型制备第2天开始给予ERS诱导剂衣霉素(10 μg/kg,1次/天,连续4周,腹腔注射),钙化组每天腹腔注射生理盐水;(3)自噬对血管钙化和ERS的

影响实验:将 20 只大鼠随机分为钙化组和 3-MA 组,3-MA 组自模型制备第 2 天开始给予自噬抑制剂 3-MA(10 mg/kg,1 次/天,连续 4 周,腹腔注射),钙化组每天腹腔注射生理盐水。

1.3 主动脉茜素红染色

取约 0.5 cm 长主动脉组织 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水处理后,浸入 1% 茜素红溶液(pH 4.2)5 min,染色后快速浸入丙酮 20 次和丙酮-二甲苯(1:1)液,二甲苯透明,封片后显微镜下观察,阳性反应呈橘红-红色。

1.4 主动脉钙含量测定

取主动脉(约 10 mg)烘干称取干重后,使用 0.6 mol/L HCl 溶液对烘干的动脉组织进行脱钙 24 h,收集上清液后,使用邻甲酚酞法试剂盒(南京建成生物工程研究所,南京)检测组织钙含量,最终结果表示为 mmol/g 干重。

1.5 Western blot

取主动脉约 50 mg 加入 500 μ L 高强度 RIPA 裂解液(南京建成生物工程研究所)匀浆后,4 $^{\circ}$ C 12000 r/min 离心 10 min 取上清液。BCA 法检测上清液中蛋白含量。SDS-PAGE 电泳后转膜,1% 牛血清白蛋白封闭,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗常温孵育 1 h 后,以化学发光法显色发光。蛋白含量以目的蛋

白条带灰度值和 β -actin 条带灰度值比值表示。

1.6 统计学分析

计量资料使用 Kolmogorov-Smirnov 检验进行正态分布检验,符合正态分布的数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 Student *t* 检验;非正态分布数据使用中位数(四分位数间距)表示,两组间比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 钙化血管组织 ERS 和自噬激活

茜素红染色结果显示,对照组大鼠血管壁中膜纤维排列规则,无断裂和增粗,无红色钙盐沉积,钙化组大鼠主动脉管壁中膜纤维排列紊乱,有断裂和增粗以及红色钙盐沉积(图 1A)。钙含量检测结果显示,钙化组大鼠血管组织钙含量较对照组大鼠显著升高($P < 0.05$,图 1B)。Western blot 结果显示,钙化组大鼠 VSMC 收缩表型标志蛋白 SM-22 α 和 Calponin 较对照组显著降低,而成骨细胞样表型标志蛋白 BMP-2 和 RUNX2 显著升高($P < 0.05$,图 1C-G)。钙化组大鼠主动脉管壁 ERS 标志蛋白 GRP78 和 CHOP,以及自噬标志蛋白 LC3 II 和 Beclin-1 的表达水平均较对照组显著升高($P < 0.05$,图 2)。

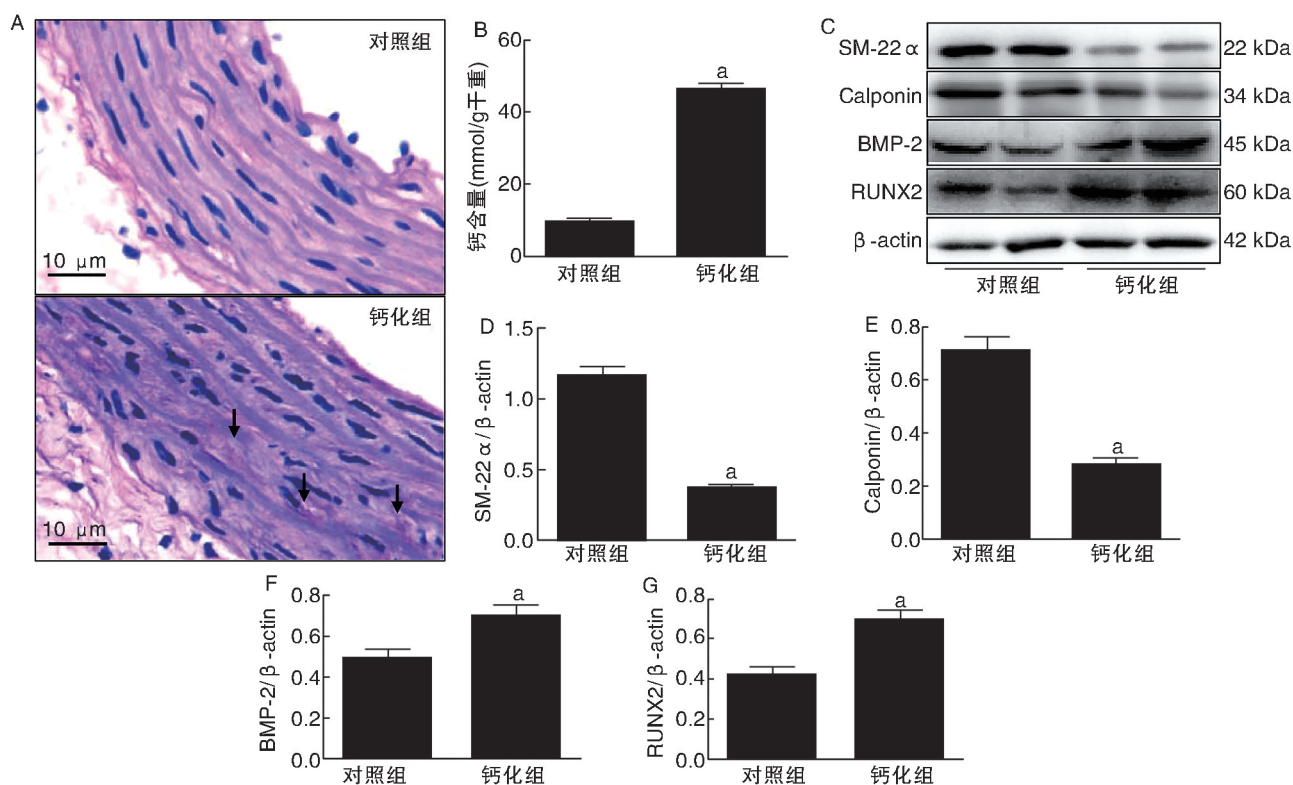


图 1. 钙化大鼠一般指标 A 为茜素红染色;B 为主动脉钙含量;C 为 Western blot 测定 VSMC 表型转化蛋白表达;D-G 为 SM-22 α 、Calponin、BMP-2 和 RUNX2 蛋白表达定量分析。a 为 $P < 0.05$,与对照组比较。

Figure 1. The general characters of rats with VC

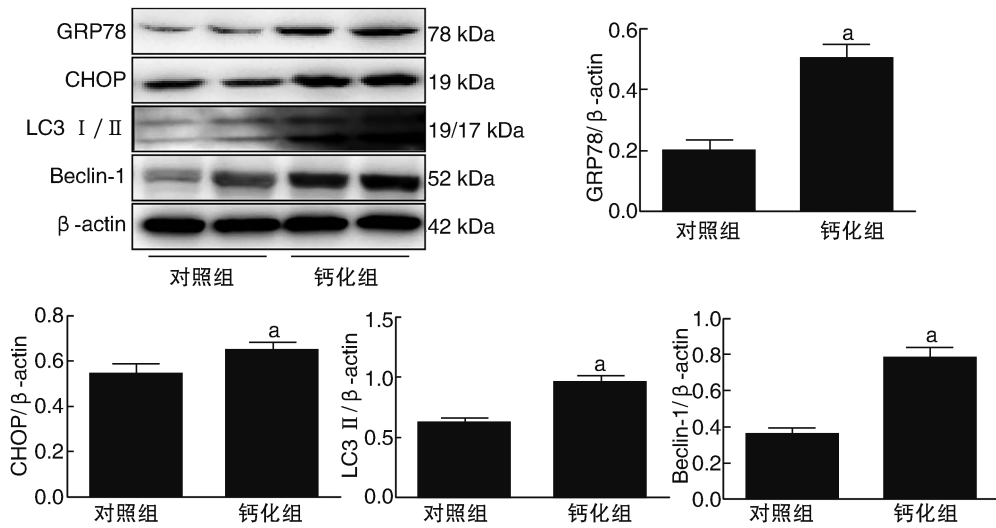


图 2. 钙化大鼠主动脉 ERS 和自噬标志蛋白表达 a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 2. Protein levels of ERS and autophagy-associated marker

2.2 ERS 激动剂 Tm 可加重血管钙化和自噬程度

茜素红染色结果显示, 钙化组大鼠主动脉管壁中膜纤维排列紊乱, 有断裂和增粗以及红色钙盐沉积, Tm 组大鼠主动脉管壁结构改变和红色钙盐沉积更加明显 (图 3A)。钙含量检测结果显示, Tm 组大鼠血管组织钙含量较钙化组大鼠进一步升高 ($P < 0.05$, 图 3B)。Western blot 结果显示, Tm 组大鼠

VSMC 收缩表型标志蛋白 SM-22 α 和 Calponin 较钙化组进一步降低, 而成骨细胞样表型标志蛋白 BMP-2 和 RUNX2 进一步升高 ($P < 0.05$, 图 3C-G)。Tm 组大鼠主动脉管壁 ERS 标志蛋白 GRP78 和 CHOP, 以及自噬标志蛋白 LC3 II 和 Beclin-1 的表达水平均较钙化组进一步升高 ($P < 0.05$, 图 4)。

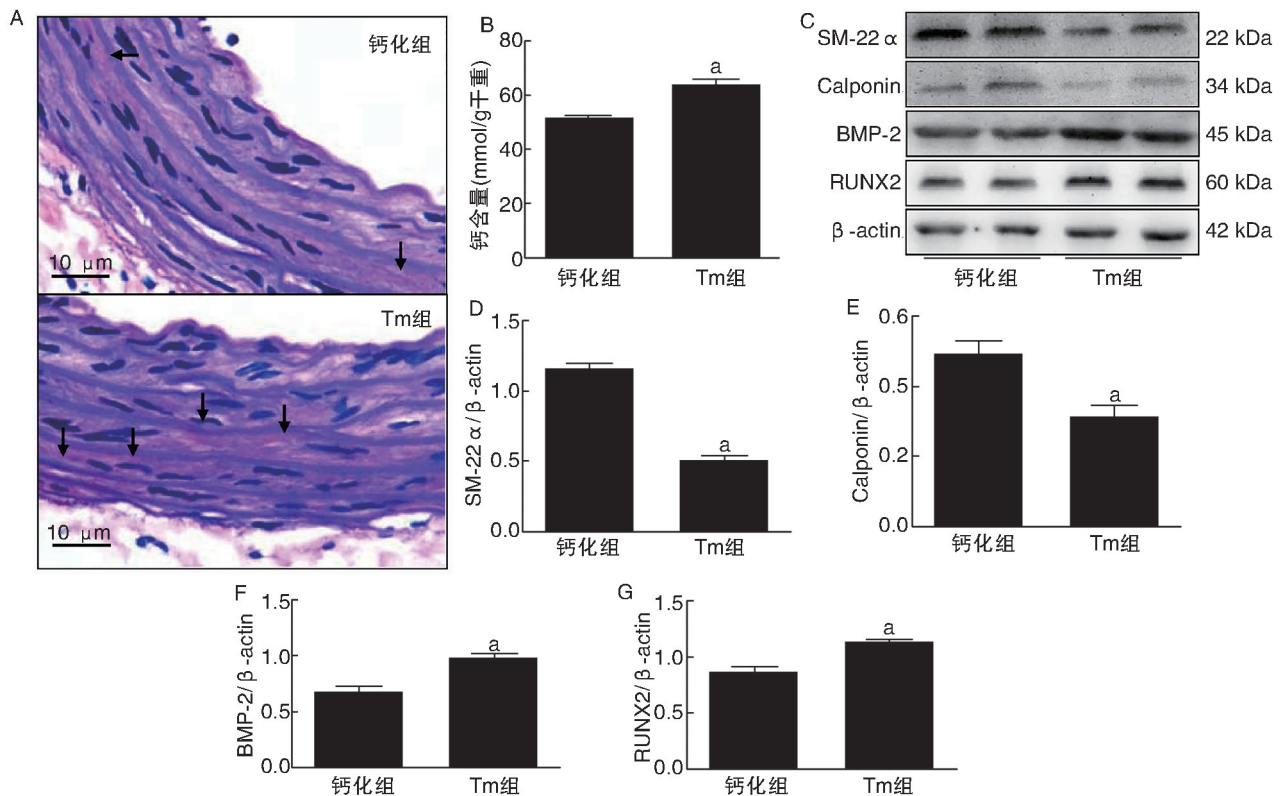


图 3. ERS 激动剂 Tm 加重血管钙化和平滑肌细胞表型转化 A 为茜素红染色, B 为主动脉钙含量; C 为 Western blot 测定 VSMC 表型转化蛋白表达; D-G 为 SM-22 α , Calponin, BMP-2 和 RUNX2 蛋白表达定量分析。a 为 $P < 0.05$, 与钙化组比较。

Figure 3. ERS agonist Tm promoted VC and transdifferentiation of VSMC

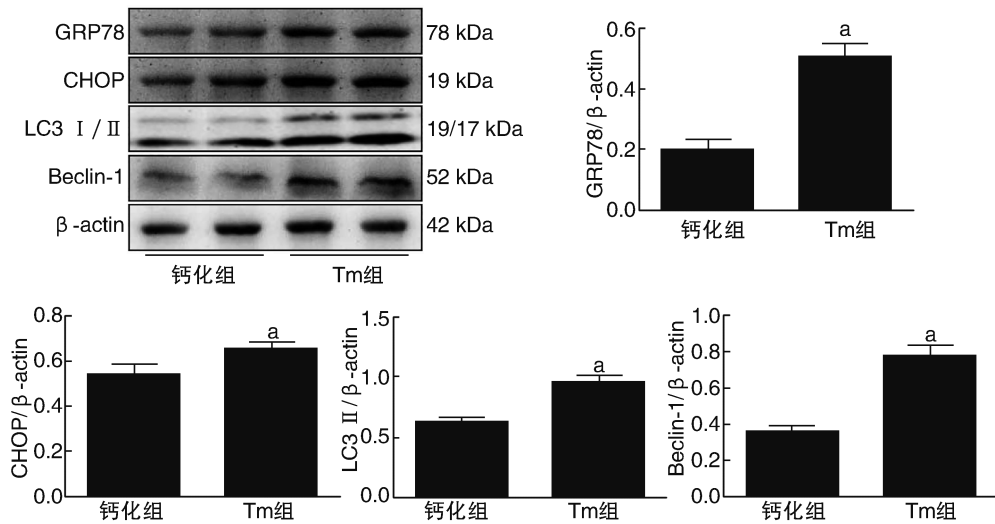


图 4. ERS 激动剂 Tm 促进钙化血管 ERS 和自噬标志蛋白表达水平 a 为 $P < 0.05$, 与钙化组比较。

Figure 4. ERS agonist Tm promoted the protein expression of ERS and autophagic markers in calcified aorta

2.3 自噬抑制剂 3-MA 可加重血管钙化和 ERS 程度

茜素红染色结果显示,钙化组大鼠主动脉管壁中膜纤维排列紊乱,有断裂和增粗以及红色钙盐沉积,3-MA 组大鼠主动脉管壁结构改变和红色钙盐沉积更加明显(图 5A)。钙含量检测结果显示,3-MA 组大鼠血管组织钙含量较钙化组大鼠进一步升高($P < 0.05$,图 5B)。Western blot 结果显示,3-MA

组大鼠 VSMC 收缩表型标志蛋白 SM-22 α 和 Calponin 较钙化组进一步降低,而成骨细胞样表型标志蛋白 BMP-2 和 RUNX2 进一步升高($P < 0.05$,图 5C-G)。3-MA 组大鼠主动脉管壁 ERS 标志蛋白 GRP78 和 CHOP 较钙化组进一步升高,而自噬标志蛋白 LC3 II 和 Beclin-1 的表达水平均较钙化组显著降低($P < 0.05$,图 6)。

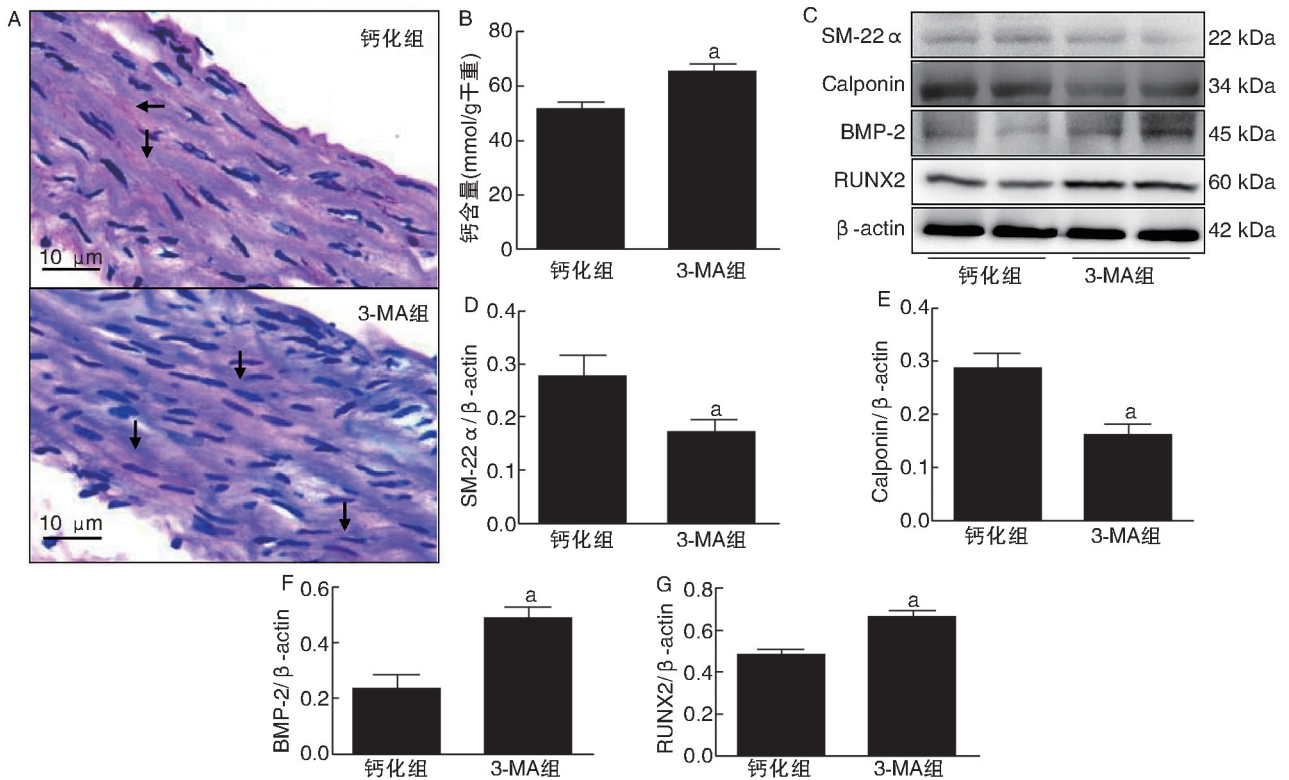


图 5. 自噬抑制剂 3-MA 加重血管钙化和平滑肌细胞表型转化 A 为茜素红染色,B 为主动脉钙含量;C 为 Western blot 测定 VSMC 表型转化蛋白表达;D-G 为 SM-22 α 、Calponin、BMP-2 和 RUNX2 蛋白表达定量分析。a 为 $P < 0.05$, 与钙化组比较。

Figure 5. Autophagy inhibitor 3-MA promoted VC and transdifferentiation of VSMC

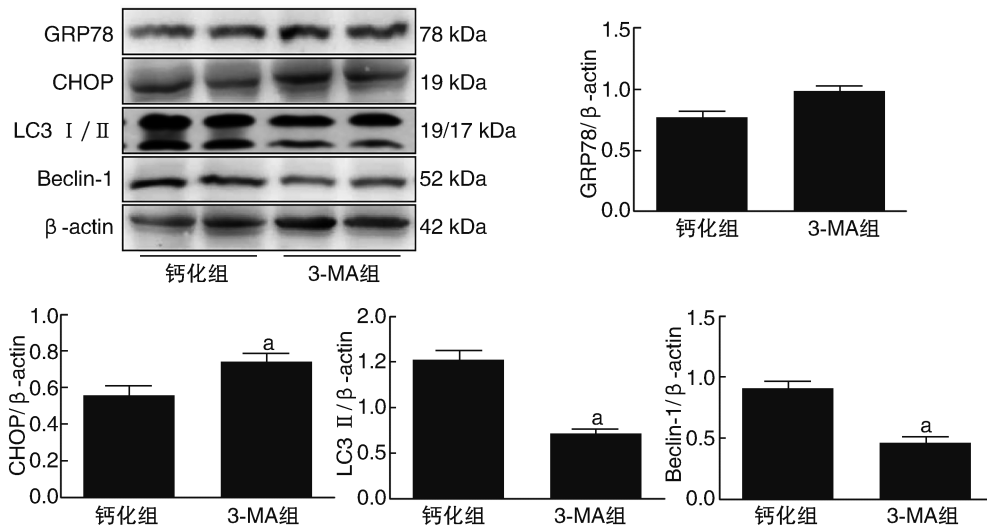


图 6. 自噬抑制剂 3-MA 影响钙化血管自噬标志蛋白和 ERS 标志蛋白表达水平

Figure 6. Autophagy inhibitor 3-MA stimulated ERS while inhibited autophagy in calcified aorta

3 讨论

本研究结果发现钙化组大鼠主动脉管壁钙盐沉积增加, VSMC 收缩表型标志蛋白表达降低, 而成骨细胞样表型标志蛋白表达升高, 同时 ERS 和自噬标志蛋白表达升高。ERS 激动剂可进一步加重钙化大鼠血管壁钙盐沉积和 VSMC 表型转化, 进一步增加 ERS 和自噬标志蛋白表达水平。而自噬抑制剂也可进一步加重钙化大鼠血管壁钙盐沉积、VSMC 表型转化和 ERS 标志蛋白表达水平, 但自噬标志蛋白表达水平降低。

近年研究表明, 血管钙化不是钙盐被动沉积于血管壁, 而是类似于骨发生的高度可调控的主动过程, 其中 VSMC 由收缩表型向成骨细胞样表型的转化发挥重要作用^[1-2]。我们的研究结果显示, 主动脉管壁不但有钙盐沉积, 而且 VSMC 收缩表型标志蛋白 SM-22 α 和 Calponin 表达降低, 伴有成骨细胞样表型标志蛋白 BMP-2 和 RUNX2 的表达升高, 提示钙化 VSMC 由收缩表型转化为成骨细胞样表型。

钙化血管不但有 ERS 的激活, 而且 ERS 在调控 VSMC 表型转化中发挥重要作用, 具有促进 VSMC 由收缩表型转化为成骨细胞样表型的作用, 进而促进血管钙化的发生发展^[7-11]。我们通过 Western blot 检测血管壁 ERS 标志蛋白 GRP78 和 CHOP 发现, 钙化血管 GRP78 和 CHOP 的表达水平显著升高, 证实钙化血管具有 ERS 的激活。应用内质网应激诱导剂 Tm 可进一步增加 GRP78 和 CHOP 表达水平, 同时使血管壁 VSMC 表型转化和钙盐沉积进一步加

重, 提示 ERS 的激活可通过调控 VSMC 表型转化促进血管钙化发生发展。因此, 调控 ERS 可能成为防治血管钙化的重要靶点。

血管组织自噬水平的增加可通过减少细胞外基质囊泡分泌和 Klotho 通路改善血管钙化^[20-21]。除单独改善血管钙化外, 自噬与 ERS 的交互作用也可能参与到血管钙化的调控中。ERS 可激活自噬, 我们的研究结果显示应用 ERS 激动剂 Tm 可使自噬标志蛋白的表达水平显著增加。而自噬作为 ERS 的下游, 可通过降解错误折叠或者未折叠的蛋白质, 减轻内质网负担, 以负反馈调节方式维持内质网稳态, 减轻 ERS 对组织细胞造成的损伤。应用雷帕霉素激活自噬可减轻慢性肾脏疾病小鼠主动脉 ERS 的激活和钙化程度^[27]。我们的实验结果同样显示, 应用 3-MA 抑制自噬后, 钙化血管的 ERS 程度进一步增加, 同时 VSMC 表型转化和钙化程度相应加重。提示自噬和 ERS 的交互作用在血管钙化的发生发展过程中发挥重要作用。

综上所述, 血管钙化过程中 ERS 的激活可增加自噬水平, 以负反馈调节的方式维持内质网稳态, 以减轻 ERS 和钙化程度。ERS 和自噬的交互作用在血管钙化的发生发展过程中发挥重要的调控作用, 有可能为血管钙化的防治提供新的策略。

[参考文献]

- [1] Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives [J]. Eur Heart J, 2014, 35(23): 1515-1525.
- [2] Wu M, Rementer C, Giachelli CM. Vascular calcification:

- an update on mechanisms and challenges in treatment[J]. *Calcif Tissue Int*, 2013, 93(4): 365-373.
- [3] 齐永芬. 关注血管钙化的基础和临床研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(5): 433-436.
- [4] Furmanik M, Shanahan CM. Endoplasmic reticulum stress in arterial smooth muscle cells; a novel regulator of vascular disease[J]. *Curr Cardiol Rev*, 2017, 13(2): 94-105.
- [5] Duan X, Zhou Y, Teng X, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in vascular calcification [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 387(4): 694-699.
- [6] Masuda M, Ting TC, Levi M, et al. Activating transcription factor 4 regulates stearate-induced vascular calcification[J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(8): 1543-1552.
- [7] Duan XH, Chang JR, Zhang J, et al. Activating transcription factor 4 is involved in endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis contributing to vascular calcification [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(9): 1132-1144.
- [8] Masuda M, Miyazaki-Anzai S, Levi M, et al. PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP signaling contributes to TNF α -induced vascular calcification[J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(5): e000238.
- [9] Miyazaki-Anzai S, Masuda M, Demos-Davies KM, et al. Endoplasmic reticulum stress effector CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) regulates chronic kidney disease-induced vascular calcification[J]. *J Am Heart Assoc*, 2014, 3(3): e000949.
- [10] Zhu Q, Guo R, Liu C, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis contributing to high glucose-induced vascular smooth muscle cell calcification [J]. *J Vasc Res*, 2015, 52(2): 291-298.
- [11] Furmanik M, Shanahan CM. ER stress regulates alkaline phosphatase gene expression in vascular smooth muscle cells via an ATF4-dependent mechanism [J]. *BMC Res Notes*, 2018, 11(1): 483.
- [12] Hao W, Yang R, Yang Y, et al. Stellate ganglion block ameliorates vascular calcification by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *Life Sci*, 2018, 193: 1-8.
- [13] Chang JR, Duan XH, Zhang BH, et al. Intermedin1-53 attenuates vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting endoplasmic reticulum stress via cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A pathway [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2013, 238(10): 1136-1146.
- [14] Yang R, Teng X, Li H, et al. Hydrogen sulfide improves vascular calcification in rats by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016(2): 9095242.
- [15] Liu Y, Lin F, Fu Y, et al. Cortistatin inhibits calcification of vascular smooth muscle cells by depressing osteoblastic differentiation and endoplasmic reticulum stress [J]. *Amino Acids*, 2016, 48(11): 2671-2681.
- [16] 李艳青, 杨锐, 金胜, 等. 慢性间歇性低氧抑制内质网应激改善大鼠血管钙化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(5): 443-447.
- [17] 侯跃龙, 陆薇薇, 张金胜, 等. 同型半胱氨酸通过内质网应激反应促进大鼠血管平滑肌细胞钙化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(5): 437-442.
- [18] Nussenzweig SC, Verma S, Finkel T. The role of autophagy in vascular biology[J]. *Circ Res*, 2015, 116(3): 480-488.
- [19] Smith M, Wilkinson S. ER homeostasis and autophagy [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 625-635.
- [20] Dai XY, Zhao MM, Cai Y, et al. Phosphate-induced autophagy counteracts vascular calcification by reducing matrix vesicle release [J]. *Kidney Int*, 2013, 83(6): 1042-1051.
- [21] Zhao Y, Zhao MM, Cai Y, et al. Mammalian target of rapamycin signaling inhibition ameliorates vascular calcification via Klotho upregulation[J]. *Kidney Int*, 2015, 88(4): 711-721.
- [22] Liu D, Cui W, Liu B, et al. Atorvastatin protects vascular smooth muscle cells from TGF- β 1-stimulated calcification by inducing autophagy via suppression of the β -catenin pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(1): 129-141.
- [23] Yao L, Wang J, Tian BY, et al. Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway prevents hyperphosphatemia-induced vascular calcification by inducing autophagy in renal vascular smooth muscle cells[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(12): 4708-4715.
- [24] Peng YQ, Xiong D, Lin X, et al. Oestrogen inhibits arterial calcification by promoting autophagy [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3549.
- [25] 姚树桐, 秦树存. 自噬与内质网应激的相互关系及其在动脉粥样硬化发展和防治中的作用[J]. *生理学报*, 2017, 69(4): 515-521.
- [26] Zhang C, Syed TW, Liu R, et al. Role of endoplasmic reticulum stress, autophagy, and inflammation in cardiovascular disease [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 4: 29.
- [27] Panda DK, Bai X, Sabbagh Y, et al. Defective interplay between mTORC1 activity and endoplasmic reticulum stress-unfolded protein response in uremic vascular calcification [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 314(6): F1046-F1061.
- [28] Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idijouadiene I, et al. Aortic calcification produced by vitamin D3 plus nicotine [J]. *J Vasc Res*, 1997, 34(5): 386-388.
- (此文编辑 许雪梅)