

过氧化体增殖物激活型受体 γ 抑制转化生长因子 $\beta 1$ 诱导的血管平滑肌细胞钙化

王亚萍, 何胜虎

(扬州大学临床医学院 江苏省苏北人民医院心内科, 江苏省扬州市 225001)

[关键词] 血管平滑肌细胞; 转化生长因子 $\beta 1$; 血管钙化; 过氧化体增殖物激活型受体 γ

[摘要] **目的** 探讨过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ) 对转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 诱导的大鼠主动脉血管平滑肌细胞 (VSMC) 钙化的作用。**方法** 体外培养大鼠主动脉 VSMC, 先分为正常对照组、不同浓度 TGF- $\beta 1$ 组 (1、2、4、8 $\mu\text{g/L}$), 观察 TGF- $\beta 1$ 对 VSMC 的影响; 再分为正常对照组、钙化组 (TGF- $\beta 1$ 4 $\mu\text{g/L}$)、罗格列酮 (RSG, 20 $\mu\text{mol/L}$) 组、钙化+罗格列酮 (RSG, 20 $\mu\text{mol/L}$) 组, 观察 PPAR γ 激动剂罗格列酮对 VSMC 钙化后的作用, 对细胞进行钙含量和碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测, 茜素红 S 染色检测钙化结节的形成情况, Western blot 检测 VSMC 标志物 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、PPAR γ 、成骨样细胞标志物 Runt 相关转录因子 2 (Runx2) 的蛋白表达情况。**结果** 与正常对照组相比, TGF- $\beta 1$ 处理后的 VSMC 钙盐沉积和 ALP 活性明显升高 ($P < 0.05$), 且 TGF- $\beta 1$ 浓度为 4 $\mu\text{g/L}$ 时作用最明显, 成骨样细胞标志物 Runx2 表达明显升高 ($P < 0.05$), 同时平滑肌细胞标志物 α -SMA 表达减少 ($P < 0.05$)。而加入罗格列酮后, VSMC 的钙盐沉积和 ALP 活性明显降低 ($P < 0.05$), α -SMA、PPAR γ 表达明显上升 ($P < 0.05$), 相反, Runx2 的表达则明显受到抑制 ($P < 0.05$)。**结论** TGF- $\beta 1$ 可以诱导 VSMC 向成骨样细胞分化和钙化, 而 PPAR γ 激动剂罗格列酮可以抑制 TGF- $\beta 1$ 诱导下 VSMC 钙化的发生。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

Peroxisome proliferator-activated receptor γ inhibits TGF- $\beta 1$ -induced calcification of vascular smooth muscle cells

WANG Yaping, HE Shenghu

(Department of Cardiology, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou, Jiangsu 225001, China)

[KEY WORDS] vascular smooth muscle cells; transforming growth factor- $\beta 1$; vascular calcification; peroxisome proliferators activated receptor γ

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of peroxisome proliferators activated receptor γ (PPAR γ) on the calcification of rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$).

Methods Rat aortic vascular smooth muscle cells were cultured in vitro and divided into normal control group and different concentrations of TGF- $\beta 1$ group (1 $\mu\text{g/L}$, 2 $\mu\text{g/L}$, 4 $\mu\text{g/L}$, 8 $\mu\text{g/L}$). Then they were divided into normal control group, calcification group (TGF- $\beta 1$ 4 $\mu\text{g/L}$), rosiglitazone group (RSG, 20 $\mu\text{mol/L}$), and calcification+rosiglitazone (RSG, 20 $\mu\text{mol/L}$) group. The effects of agonist RSG on calcification of VSMC, calcium content and alkaline phosphatase (ALP) activity were detected in the cells, alizarin red S staining was used to detect the formation of calcified nodules, and Western blot was used to detect vascular smooth muscle cells marker α -smooth muscle actin (α -SMA), PPAR γ , protein expression of osteoblast-like marker Runt-related transcription factor (Runx2). **Results** Compared with the normal control group, calcium deposition and ALP activity of VSMC treated with TGF- $\beta 1$ were significantly increased ($P < 0.05$), and the effect was most obvious when TGF- $\beta 1$ concentration was 4 $\mu\text{g/L}$. And Runx2 expression of osteoblast-like cell was significantly increased ($P < 0.05$), while α -SMA expression of smooth muscle cell markers was decreased ($P < 0.05$). Whereas calcium sulfate deposition and ALP activity of VSMC were significantly decreased ($P < 0.05$), α -SMA and PPAR γ expression was significantly increased after RSG was added ($P < 0.05$), on the contrary, Runx2 expression was sig-

[收稿日期] 2018-10-09

[修回日期] 2018-10-31

[作者简介] 王亚萍, 硕士研究生, 医师, 研究方向为冠心病防治, E-mail 为 631158435@qq.com。通信作者何胜虎, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病介入性诊断与治疗, E-mail 为 yzhshys@163.com。

nificantly inhibited ($P < 0.05$). **Conclusion** TGF- β 1 can induce differentiation and calcification of VSMC into osteoblast-like cells, and TGF- β 1-induced calcification of VSMC can be inhibited by PPAR γ agonist RSG.

血管钙化以往指的是羟基磷灰石沉积在血管壁的过程,越来越多的证据显示这是一个高度调控、类似于骨形成的过程。在许多疾病比如糖尿病、慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)、动脉粥样硬化、心脏瓣膜疾病和高血压疾病中血管钙化普遍存在,在一项回顾性研究中发现,伴有 CKD 的糖尿病患者发生冠状动脉钙化和心血管事件的概率更高,进展更快且范围更加广泛^[1]。血管钙化与心血管疾病的发生发展息息相关,诱导血管钙化的因素有很多,其中转化生长因子超家族^[2]包括转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)、激活素和抑制素等,它们在不同的生物过程中发挥着不同的作用,其中 TGF- β 和 BMP 在心血管疾病中被广泛研究,目前还没有很好的方法预防血管钙化的发生,因此探索血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)钙化的发生机制和干预措施显得尤为重要。

过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferators activated receptor γ , PPAR γ)是一类核受体转录因子,并受其配体的激活,可以发挥转录调控的作用^[3],罗格列酮(rosiglitazone, RSG)是 PPAR γ 的合成配体,与 PPAR γ 的特异性结合能力强,是 PPAR γ 特有的激动剂。已有研究发现 PPAR γ 在心血管系统中起着很重要的作用^[4],但其是否在 TGF- β 1 诱导的血管钙化中扮演着重要的角色还未阐明,本研究在 TGF- β 1 诱导的血管钙化模型基础上,旨在探讨 PPAR γ 激动剂罗格列酮对血管钙化的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

大鼠主动脉 VSMC 株购自美国 ATCC 细胞库; DMEM 高糖培养基购自美国 HyClone 公司;胰酶购自美国 GIBCO 公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司;TGF- β 1 购自美国 PeproTech 公司;茜素红 S 染色液购自 Solarbio 公司;钙检测试剂盒和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测试剂盒购自南京建成生物公司;罗格列酮购自 Solarbio 公司; α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、成骨样细胞标志物 Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor2, Runx2)、PPAR γ 抗

体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;GAPDH 抗体购自 Abclonal 公司。

1.2 VSMC 培养与分组

复苏冻存的 VSMC 用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 高糖培养基在 37 °C、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中培养,当细胞汇合至 80% 左右时用 0.25% 胰酶消化传代。(1)VSMC 钙化模型的建立:将细胞以每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板,待其贴壁汇合至 80% 左右时,无血清饥饿 24 h,加入不同浓度的 TGF- β 1 (1、2、4、8 μ g/L) 干预 4 天,每 2 天更换一次培养基,确定合适的 TGF- β 1 干预浓度。(2)实验分组:照前述方法将细胞种于 6 孔板,然后分别取 6 孔板中正常培养的 VSMC 随机分为 4 组:①正常对照组:只有培养基;②钙化组:培养基含 4 μ g/L TGF- β 1;③钙化+RSG 组:培养基含 4 μ g/L TGF- β 1 和 20 μ mol/L 罗格列酮;④RSG 组:培养基含 20 μ mol/L 罗格列酮。钙化+RSG 组中罗格列酮在钙化诱导的前一天预孵 24 h 后与钙化培养基同时干预细胞,各组实验分别重复 3 次。

1.3 细胞钙化检测

1.3.1 茜素红 S 染色 干预后的细胞用 4 °C 预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,每孔 1 mL 的多聚甲醛室温固定 25 min,再用 4 °C 预冷的 PBS 液清洗 3 次后,每孔加 1% 茜素红 S (pH4.2) 染色液 1 mL,室温染色 30 min 后,用预冷的 PBS 液清洗 3 遍后置于倒置显微镜下观察,橘红色结节表示钙化结节阳性染色。

1.3.2 细胞钙含量检测 干预后的细胞弃培养液,用预冷的 PBS 液洗涤 3 次,每孔加入适量 0.6 mol/L HCl 4 °C 孵育 24 h 脱钙,收集上清按照钙含量检测试剂盒测定钙含量,剩余细胞用 PBS 液洗涤 3 次后加入 1 mol/L NaOH/0.1% SDS 裂解细胞 30 min 后提取细胞总蛋白,用 BCA 法测定每孔蛋白含量。并用蛋白含量标准化钙含量。

1.3.3 ALP 活性测定 干预后的细胞弃培养液后用 4 °C 预冷 PBS 液洗涤 3 次,每孔加入 200 μ L 细胞裂解液,冰上裂解 30 min 后用细胞刮收取细胞,离心后收集上清,按照 ALP 检测试剂盒测定 ALP 活性,并按 BCA 法测定细胞蛋白浓度,最后用蛋白含量进行标化。

1.4 Western blot 检测

将 VSMC 以每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板,

按上述分组条件培养干预后,弃培养液,PBS液洗涤3次,每孔加入200 μL 裂解液,冰上裂解30 min后,用细胞刮收取细胞,12000 $\times\text{g}$ 离心15 min收集上清液,用BCA法进行蛋白定量,计算各样本上样量。10%SDS凝胶按每孔50 μg 上样,浓缩胶80 V,分离胶120 V电泳,转膜100 V 90 min,5%脱脂奶粉封闭2 h,分别加入 $\alpha\text{-SMA}$ (1:1000稀释)、PPAR γ (1:500稀释)、Runx2(1:1000稀释)和GAPDH(1:5000稀释)抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST洗膜15 min \times 3次,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000稀释)室温孵育2 h,TBST洗膜15 min \times 3次,加入ECL发光液于Bio-Rad成像仪显影。用Image J软件分析条带灰度值,并用GAPDH作为内参,计算二者比值得到蛋白的相对表达量,进行统计学分析。

1.5 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件进行分析,正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,实验重复3次, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β 1对VSMC钙化和ALP活性的影响

茜素红S染色结果显示,在显微镜下观察正常对照组未见明显钙化结节;与正常对照组相比,不同浓度TGF- β 1组,随着浓度的升高,钙化结节数量

增加越明显(图1)。与茜素红S染色结果基本一致,钙含量检测结果显示,与正常对照组相比,TGF- β 1能使VSMC钙含量明显增加且呈浓度依赖性($P < 0.05$)(图2)。另外与正常对照组相比,ALP活性随着TGF- β 1浓度的升高不断升高($P < 0.05$)(图2),而且在4 $\mu\text{g/L}$ 浓度时ALP活性最强,故后续实验TGF- β 1作用浓度选择4 $\mu\text{g/L}$ 。

2.2 PPAR γ 激动剂罗格列酮对TGF- β 1诱导的VSMC钙化和ALP活性的影响

镜下茜素红S染色可见,与正常对照组相比,钙化组钙化结节明显增多;与钙化组相比,钙化+RSG组钙化结节明显减少(图3A)。同样钙含量检测结果显示,与正常对照组相比,钙化组钙含量升高明显;与钙化组相比,钙化+RSG组的钙含量明显下降($P < 0.05$;图3B)。ALP活性检测结果与上述结果基本一致,与正常对照组相比,钙化组ALP活性升高明显;与钙化组相比,钙化+RSG组ALP活性明显下降($P < 0.05$;图3C)。

2.3 罗格列酮对 $\alpha\text{-SMA}$ 、PPAR γ 和Runx2蛋白表达的影响

Western blot检测结果显示,与正常对照组相比,钙化组平滑肌细胞标志物 $\alpha\text{-SMA}$ 和PPAR γ 的表达下降($P < 0.05$),成骨样细胞标志物Runx2表达升高($P < 0.05$);与钙化组相比,钙化+RSG组 $\alpha\text{-SMA}$ 和PPAR γ 的表达明显上调($P < 0.05$),同时Runx2的表达明显下调($P < 0.05$;图4)。

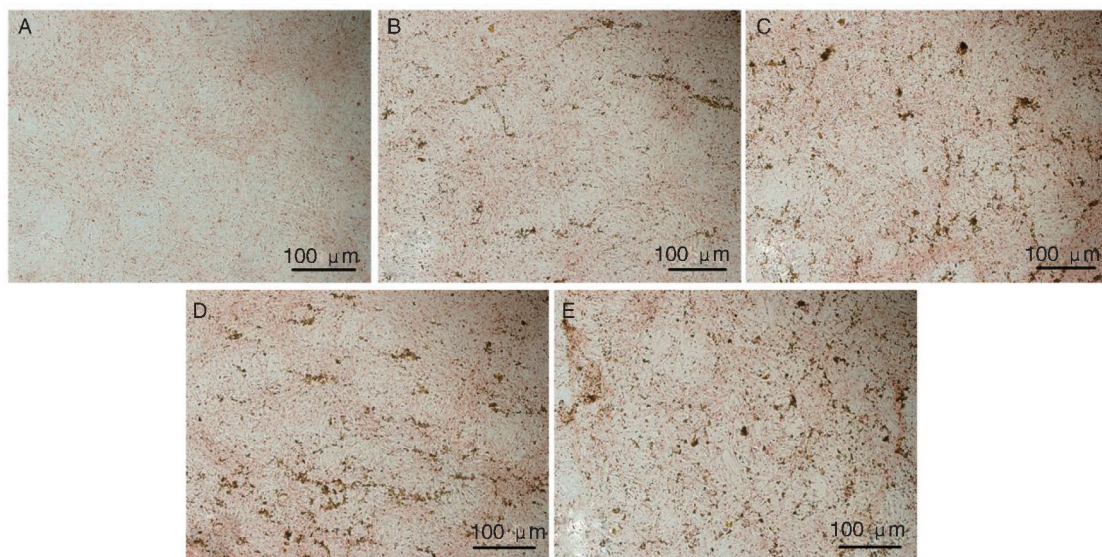


图1. 茜素红S染色法检测各组VSMC钙化结节形成 A为正常对照组,B为1 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1组,C为2 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1组,D为4 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1组,E为8 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1组。

Figure 1. Alizarin red S staining was used to detect calcification in VSMC of each group

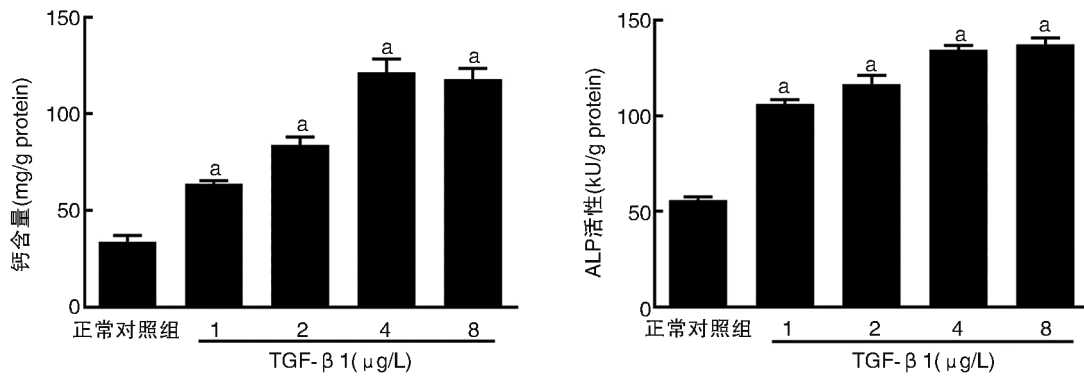


图 2. TGF-β1 诱导下 VSMC 钙含量和 ALP 活性检测结果 a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

Figure 2. Detection of calcium content and ALP activity in VSMC induced by TGF-β1

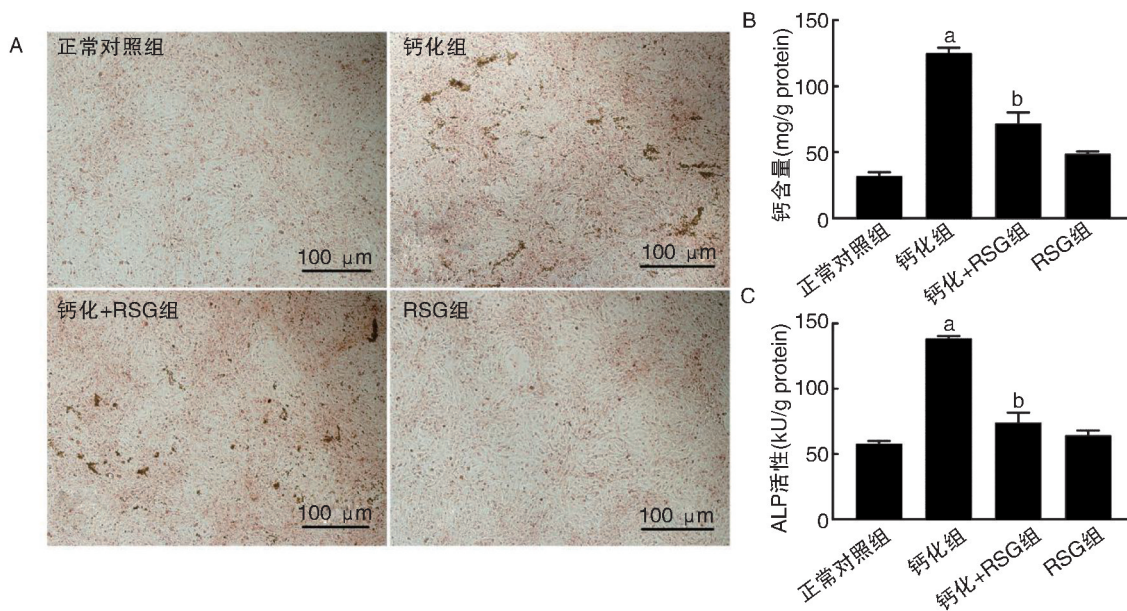


图 3. 罗格列酮干预下各组 VSMC 钙化指标的检测情况 A 为茜素红 S 染色结果; B 为钙含量检测结果; C 为 ALP 活性检测结果。a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与钙化组比较。

Figure 3. Detection of calcification under RSG intervention in VSMC of each group

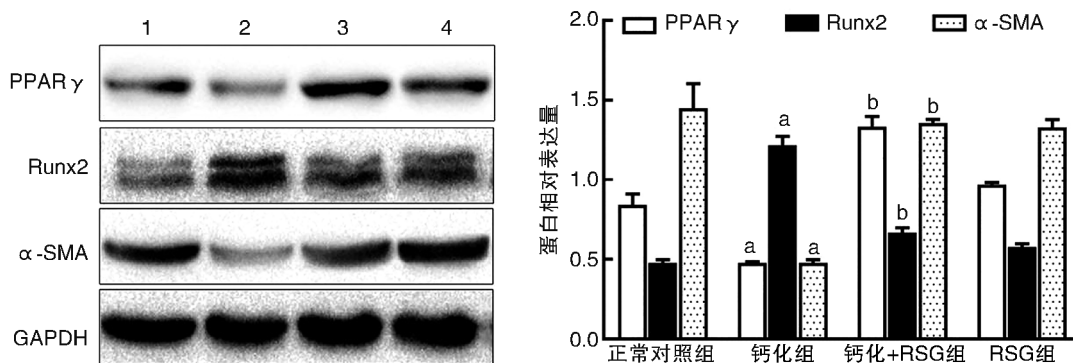


图 4. Western blot 检测各组 VSMC 相关蛋白的表达情况 1 为正常对照组, 2 为钙化组, 3 为钙化+RSG 组, 4 为 RSG 组。a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与钙化组比较。

1 为正常对照组, 2 为钙化组, 3 为钙化+RSG 组, 4 为 RSG 组。a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与钙化组比较。

Figure 4. Western blot analysis of the expression of related proteins in VSMC of each group

3 讨论

血管钙化大致可以分为内膜钙化和中膜钙化,内膜钙化往往与动脉粥样硬化伴随发生,而动脉粥样硬化最常见的危险因素主要是高胆固醇血症,与其相关的治疗最重要的就是生活方式的改变,比如增加运动量、控制体质量、低脂低盐饮食、戒烟、减少酒精的摄入、保证充足的睡眠等等,而中膜钙化主要发生在CKD患者中,此类患者的主要危险因素是高磷酸血症,主要通过透析的方法来降低血磷的浓度,目前还不能通过控制饮食和其他有效的药物治疗来控制^[5]。在CKD患者中,血管钙化的发生增加了心血管疾病的发生率,尿毒症的环境是加速血管钙化的一个重要因素,张东雪等^[6]发现干扰赖氨酸甲基转移酶SET8的表达能促进VSMC钙化,提示SET8有可能参与调节血管钙化,未来可能成为治疗血管钙化的靶点。当然血管钙化还可以发生于心脏瓣膜疾病中,任瞳等^[7]用高脂兔模型再现了早期钙化性主动脉瓣疾病的病理进展过程,发现阿托伐他汀还可通过抗炎作用抑制钙化性主动脉瓣疾病的进程。血管钙化^[8]的发生与许多因素都有关,比如遗传因素、钙磷超载、基质囊泡的产生、钙化抑制剂的失活^[9]、激素调节紊乱^[10]等,这是一个极其复杂的过程。现有的预防血管钙化的方法有限,因此,迫切需要研究新的治疗方法或手段控制和预防血管钙化的发生和发展。

研究发现^[11]TGF- β 1是细胞转化和细胞外基质沉积的关键调节器,而且是骨诱导物因子和骨细胞功能的主要调节剂,在高磷环境下诱导VSMC表型转换中发现TGF- β 1可上调成骨细胞表达,比如特异性转录因子核心结合因子(core-binding factor α 1, Cbfa1)和成骨分子,证实TGF- β 1的上调对骨基质的产生是必要的,而不是依赖于钙沉积的增加。Bezley等^[12]发现在基质GLA蛋白(matrix gla protein, MGP)缺失的钙化主动脉中Wnt16的表达下降,提示Wnt16可能具有拮抗VSMC钙化的作用,接着在野生型(MGP^{+/+})小鼠的主动脉组织中发现TGF- β 1产生减少导致Wnt16表达增加,从而使Notch信号活动稳定能够维持VSMC收缩表型,而在MGP敲除(MGP^{-/-})小鼠的主动脉中,TGF- β 1的表达升高,Wnt16下调并抑制Notch信号导致VSMC向分泌型转换,证实Wnt16具有减弱TGF- β 1诱导的VSMC钙化的作用,也间接证明了TGF- β 1具有诱导VSMC钙化的作用。Borland等^[13]发现TGF- β 信号通路能调节VSMC矿化的过程,当用 β -甘油磷酸与外源性

TGF- β 一起共培养时,发现TGF- β 能显著增加 β -甘油磷酸诱导的VSMC矿化,使用TGF- β 信号传导受体(TGF β R1)激酶抑制剂SB431542后,可以使VSMC矿化显著减少。另有研究发现^[14]阿伐他汀通过抑制 β -catenin信号通路减轻TGF- β 诱导的VSMC钙化作用,这与本研究基本一致。本研究以大鼠主动脉VSMC为实验对象,证实了VSMC在TGF- β 诱导下,逐渐失去其收缩表型,向成骨样细胞表型转换,与此同时,茜素红S染色也观察到了明显钙化结节的产生。

PPAR属于配体激活的转录因子核超家族,PPAR γ 功能的破坏会导致血管发生病理改变、脂质代谢紊乱和胰岛素抵抗性。PPAR γ 参与几种与血压调节有关的信号通路。首先,它通过PI3K/Akt/eNOS或MAPK/ET-1途径影响胰岛素信号通路和血管内皮功能障碍调节信号的表达或磷酸化分子。其次,它可以调节肾素血管紧张素的基因表达系统-级联蛋白,其可能会抑制动脉粥样硬化和高血压的进展。第三,它通过PPAR或间接激活核因子E2相关因子2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)可以直接调节氧化应激反应。在糖尿病、高血压或代谢综合征等疾病中,PPAR γ 也起着很重要的调节作用^[15]。另有研究发现^[16]PPAR对心血管功能的调节和抗动脉粥样硬化作用是毋庸置疑的,PPAR γ 激动剂可以抑制ERK/MAPK信号通路和阻断VSMC从G1期向S期分化从而阻止VSMC的生长和迁移起到抗动脉粥样硬化作用。但由于PPAR γ 激动剂的副作用,比如体质量增加,体液滞留和骨折的发生^[4],因此还需要进一步的研究。Klotho基因最初被认为是一个衰老抑制基因,现已发现与血管钙化也有关系,Cheng等^[17]研究发现高磷诱导VSMC钙化后,PPAR γ 的表达下调,使用PPAR γ 激动剂罗格列酮后发现可以抑制血管钙化,证实PPAR γ 是通过激活Klotho来调节VSMC钙化的,使用PPAR γ 抑制剂GW9662后能阻断它抑制钙化的作用。Zhou等^[18]发现用高糖诱导VSMC钙化后,使用PPAR γ 配体曲格列酮和罗格列酮后,能够降低ALP的活性,下调Cbfa1、骨钙素和骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)的表达,上调钙化抑制剂MGP的表达,从而减轻血管的钙化,使用PPAR γ 特异性拮抗剂GW9662完全消除了罗格列酮的作用和曲格列酮对Cbfa1和MGP表达的影响,抑制了其对于血管钙化的保护作用,证明配体的作用完全是由PPAR γ 介导的。以上研究足以说明PPAR γ 在心血管疾病和血管钙化中发挥着

不可忽视的作用,但其在 TGF- β 1 诱导的 VSMC 成骨分化中是否也发挥着很重要的作用还不得而知,有待于更深入的研究。我们的研究发现加入 PPAR γ 激动剂罗格列酮预孵育后,再次观察 TGF- β 1 对 VSMC 钙化的作用,结果显示罗格列酮预孵育的 VSMC 中 Runx2 蛋白的表达明显下降,明显抑制其钙化的发生,提示 PPAR γ 在血管钙化中确实发挥着很大的作用。当然本研究还有些许不足,体外 TGF- β 1 诱导的 VSMC 钙化模型并不能完全模拟体内血管钙化的条件。

综上所述,本研究验证了 TGF- β 1 可诱导 VSMC 向成骨样细胞分化,并进一步研究了 PPAR γ 激动剂罗格列酮对 VSMC 钙化的作用,发现罗格列酮对血管钙化能起到一定的保护作用,或许在不久的将来罗格列酮可以成为血管钙化干预的靶点,但其具体的保护机制尚不清楚,这将是今后研究工作的重点。

[参考文献]

- [1] Russo D, Morrone LF, Imbriaco M, et al. Coronary artery calcification and outcomes in diabetic patients with and without chronic kidney disease [J]. *Blood Purif*, 2013, 36(1): 17-20.
- [2] Tang Y, Yang X, Friesel R E, et al. Mechanisms of TGF-beta-induced differentiation in human vascular smooth muscle cells [J]. *J Vasc Res*, 2011, 48(6): 485-494.
- [3] Sharma S, Barton J, Rafikov R, et al. Chronic inhibition of PPAR-gamma signaling induces endothelial dysfunction in the juvenile lamb [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2013, 26(2): 271-280.
- [4] Maccallini C, Mollica A, Amoroso R. The positive regulation of eNOS signaling by PPAR agonists in cardiovascular diseases [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2017, 17(4): 273-281.
- [5] Shigematsu T, Sonou T, Ohya M, et al. Preventive strategies for vascular calcification in patients with chronic kidney disease [J]. *Contrib Nephrol*, 2017, 189: 169-177.
- [6] 张东雪, 李同妙, 高少辉, 等. 干扰 SET8 调节血管平滑肌细胞增殖、凋亡促进血管钙化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(1): 41-45.
- [7] 任瞳, 李继勇, 张健群, 等. 阿托伐他汀对兔主动脉瓣钙化性病变炎症反应影响的研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2018, 37(4): 364-368.
- [8] Shroff R, Long DA, Shanahan C. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(2): 179-189.
- [9] Leopold JA. Vascular calcification: mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2015, 25(4): 267-274.
- [10] Hou YC, Liu WC, Zheng CM, et al. Role of vitamin D in uremic vascular calcification [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 2803579.
- [11] Wang N, Wang X, Xing C, et al. Role of TGF-beta1 in bone matrix production in vascular smooth muscle cells induced by a high-phosphate environment [J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2010, 115(3): e60-68.
- [12] Beazley KE, Nurminsky D, Lima F, et al. Wnt16 attenuates TGF beta-induced chondrogenic transformation in vascular smooth muscle [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(3): 573-579.
- [13] Borland SJ, Morris TG, Borland SC, et al. Regulation of vascular smooth muscle cell calcification by syndecan-4/FGF-2/PKC alpha signalling and cross-talk with TGF beta [J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(13): 1639-1652.
- [14] Liu D, Cui W, Liu B, et al. Atorvastatin protects vascular smooth muscle cells from TGF-beta1-stimulated calcification by inducing autophagy via suppression of the beta-catenin pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(1): 129-141.
- [15] Chandra M, Miriyala S, Panchatcharam M. PPAR γ and its role in cardiovascular diseases [J]. *PPAR Res*, 2017, 2017: 6404638.
- [16] Ajith TA, Jayakumar TG. Peroxisome proliferator-activated receptors in cardiac energy metabolism and cardiovascular disease [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2016, 43(7): 649-658.
- [17] Cheng L, Zhang L, Yang J, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits vascular calcification by upregulating Klotho [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(2): 467-474.
- [18] Zhou YB, Zhang J, Peng DQ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands retard cultured vascular smooth muscle cells calcification induced by high glucose [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 66(3): 421-429.

(此文编辑 许雪梅)