

# 循环微小 RNA-204 水平与糖尿病人群冠状动脉钙化相关性分析

裴昱强, 丁耀东, 王睿, 梁静, 刘晓丽, 申华, 葛海龙

(首都医科大学附属北京安贞医院心内科, 北京市 100029)

[关键词] 微小 RNA-204; 冠状动脉钙化; 糖尿病; 糖化血红蛋白

[摘要] **目的** 探讨糖尿病患者血浆循环微小 RNA-204(microRNA-204)水平与冠状动脉 CT 血管成像(CCTA)钙化积分(CACS)的相关性。**方法** 横断面分析 2017 年 1 月至 2018 年 12 月在北京安贞医院确诊并行冠状动脉 CTA 的糖尿病患者 179 例,经 CACS 评估冠状动脉钙化(CAC)的严重程度,将患者分为冠状动脉钙化组(CACS>10,99 例)及非钙化组(CACS≤10,80 例)。从中选取匹配的 5 例钙化组(CACS>10)和 5 例非钙化组(CACS≤10)的患者,使用 microRNA 微阵列分析其血浆 microRNA 水平。为了验证微阵列分析的结果,使用 qRT-PCR 对两组 microRNA-204 定量检测,进行单变量线性回归评估 microRNA-204 水平与 CACS 之间的潜在相关性。通过 ROC 曲线分析,评估 microRNA-204 的潜在诊断能力。**结果** 两组患者在空腹血糖(FPG)、糖化血红蛋白(HbA1c)方面比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。microRNA 微阵列分析得到钙化组较非钙化组 microRNA-204 表达水平显著下降。经 qRT-PCR 进一步印证了钙化组血浆中 microRNA-204 显著下调( $P<0.05$ )。通过单变量线性回归分析显示,钙化组血浆循环 microRNA-204 水平与反应冠状动脉钙化严重程度的 CACS 呈负相关。ROC 曲线显示,microRNA-204 预测糖尿病患者发生冠状动脉钙化的曲线下面积为 0.948 7(0.919 1~0.978 2, $P<0.0001$ ),诊断临界值为 21.3,敏感度为 96.3%,特异度为 79.6%。**结论** 钙化组患者血浆中 microRNA-204 表达水平显著下降,而反映冠状动脉钙化严重程度的 CACS 与 microRNA-204 之间存在负相关,可能对进一步验证人血浆 microRNA-204 水平宏观反映糖尿病患者是否存在冠状动脉钙化有重要意义。microRNA-204 可能是诊断冠状动脉钙化的新型生物标志物。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Correlation between circulating microRNA-204 level and coronary artery calcification in patients with diabetes

PEI Yuqiang, DING Yaodong, WANG Rui, LIANG Jing, LIU Xiaoli, SHEN Hua, GE Hailong

(Department of Cardiology, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] microRNA-204; coronary artery calcification; diabetes mellitus; glycosylated hemoglobin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the correlation between circulating microRNA-204 levels and coronary CT angiography (CTA) calcification score(CACS) in patients with diabetes. **Methods** Clinical data from 179 patients diagnosed with diabetes who underwent coronary CT angiography in our hospital from January 2017 to December 2018, were cross-section analyzed. Patients were divided into moderate to severe calcification group(CACS>10, 99 cases) and non-or minimal calcification group (CACS≤10, 80 cases). Five patients with coronary artery calcification (CAC) (CACS>10) and 5 patients with non-CAC (CACS≤10) were selected for microRNA microarray analysis of plasma microRNAs. Two groups of microRNA-204 were quantified by using qRT-PCR and univariate linear regression was performed to assess the potential correlation between microRNA-204 levels and CACS. The potential diagnostic ability of microRNA-204 was assessed by ROC curve analysis. **Results** There was significant difference in fasting plasma glucose (FPG), glycosylated hemoglobin (HbA1c) between two groups ( $P<0.05$ ). MicroRNA microarray analysis showed a significant decrease in microRNA-204 expression levels in the CAC group compared with the non-CAC group. MicroRNA-204 was significantly down-regulated in the moderate-to-severe calcification group by qRT-PCR ( $P<0.05$ ). Univariate linear re-

[收稿日期] 2019-07-26

[修回日期] 2019-09-17

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81573744,81973841)

[作者简介] 裴昱强,硕士研究生,研究方向为冠状动脉介入治疗及机制,E-mail 为 peiyuqiang666@163.com。通信作者葛海龙,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为冠心病基础研究与诊疗,E-mail 为 gehailong@126.com。

gression analysis showed that circulating microRNA-204 levels in moderate to severe calcification group were negatively correlated with CACS, which reflected the severity of coronary artery calcification. The ROC curve showed that the area under the curve of microRNA-204 levels predicting vascular calcification of patients with diabetes was 0.948 7 (0.919 1 ~ 0.978 2,  $P < 0.0001$ ) and the diagnostic threshold was 21.3, the sensitivity was 96.3%, the specificity was 79.6%.

**Conclusion** The expression level of microRNA-204 in plasma of CAC patients decreased significantly, but there was a negative correlation between the severity of CAC and microRNA-204, which may be of great significance to further verify that the level of microRNA-204 in human plasma macroscopically reflects the severity of CAC in patients with diabetes mellitus. MicroRNA-204 may be a new biomarker for the diagnosis of coronary artery calcification.

血管钙化 (vascular calcification, VC) 是动脉粥样硬化、高血压、糖尿病血管病变、慢性肾病等多种疾病共同的病理基础,其中冠状动脉钙化 (coronary artery calcification, CAC) 是心血管高死亡率的重要因素之一,被认为是预测发生动脉粥样硬化心血管事件的危险因素和重要指标<sup>[1-2]</sup>。因此,冠状动脉钙化是冠心病防治的焦点与难点,延缓甚至逆转血管钙化进程是心血管疾病治疗及预后的关键。

血管钙化的机制至今尚未完全明确,近来研究表明,血管钙化的中心环节是血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 向成骨细胞表型转化的复杂、可调控过程<sup>[3-4]</sup>。microRNA 是一种大小长约 19~23 个核苷酸的内源性表达的非编码小 RNA,它通过促进 mRNA 的降解或抑制其翻译来抑制蛋白质的编码基因。近来研究显示 microRNA 通过调控参与成骨分化的 BMP2/Smad/Runx2 等重要信号转导通路中的靶标蛋白而在血管钙化发生发展过程中发挥重要作用。有研究发现在小鼠中 microRNA-204 能下调 BMP2 表达,抑制血管平滑肌细胞向成骨化表型转换,从而负性调控血管钙化的发生<sup>[5]</sup>。然而其在临床实践中的意义尚不清楚。

中国成年人糖尿病患病率高达 11.6%,且其中 80% 的糖尿病患者最终死于心血管并发症,然而单纯降血糖治疗心血管事件获益不明显。在糖尿病患者中血管钙化不仅广泛存在,其作为常见的病理表现严重危害患者健康<sup>[6]</sup>,现已证明 microRNA 不仅在糖尿病患者中有差异表达<sup>[7]</sup>,且有近 80% 异常表达的 microRNA 在血糖控制后仍然表达异常。本研究选取糖尿病人群,探究 microRNA-204 是否可能成为反映糖尿病患者冠状动脉钙化程度的循环生物标记物,其对预防和治疗与血管钙化相关的心血管疾病有着重要的意义。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

横断面分析 2017 年 1 月至 2018 年 12 月在首

都医科大学附属安贞医院收治的已行冠状动脉 CT 血管成像 (CCTA) 检查的 179 例诊断为糖尿病患者的临床资料和冠状动脉 CT 血管成像钙化积分 (CACS) 结果。其中男 110 例,女 69 例,男:女 = 1:0.63;年龄 35~81 岁,平均 (60.7±10.2) 岁;伴有吸烟史者 79 例;伴有高血压史者 65 例。糖尿病诊断标准:参考世界卫生组织 (WHO) 1999 年糖尿病诊断标准。研究对象的纳入标准:(1)符合糖尿病诊断标准的患者;(2)年龄 35~75 岁;(3)首都医科大学附属北京安贞医院伦理委员会通过并签署知情同意书。研究对象的排除标准包括:(1)严重感染;(2)自身免疫性疾病;(3)合并 I 型糖尿病、高血压 3 级、严重瓣膜性心脏病、严重心功能不全 (EF < 35%);(4)合并严重肝、肾、造血系统、神经系统等原发性疾病及精神病、恶性肿瘤患者;(5)拒绝签署知情同意书,或估计依从性较差,参加其他临床试验及临床资料不全的患者;(6)妊娠期或哺乳期妇女。全部病例由首都医科大学附属北京安贞医院医学伦理委员会审批通过。

### 1.2 分组方法

经 CCTA 证实分组为糖尿病血管钙化组 (CACS > 10, 99 例) 及非钙化的对照组 (CACS ≤ 10, 80 例)。从中选取 5 例冠状动脉钙化 (CACS > 10) 和 5 例无冠状动脉钙化 (CACS ≤ 10) 的患者,使用 microRNA 微阵列分析其血浆 microRNA 水平。

### 1.3 检查方法及 CACS 的获取

采用 Siemens Somatom Definition AS 128 层螺旋 CT 完成。扫描前按标准位置放置心电图导线,正常显示心率后进行定位扫描。扫描时嘱患者屏气,扫描时间为 6~10 s。检查前 3 min 舌下含服 0.5 mg 硝酸甘油,扩张冠状动脉以更清晰显影。所有检查者控制心率为 75 次/分以下。指导患者屏气,并做好解释工作缓解患者紧张情绪。检查范围包括整个心脏,从气管分叉下方至膈肌。采用双筒高压注射器,采用回顾性心电门控心脏扫描模式,首先以 4.5~5.5 mL/s 的流率注射对比剂,具体采用碘帕醇

(370 mgI/mL), 注射总量 1.0 mL/kg。然后, 对比剂注射完毕后随即同速率注射生理盐水 30 mL。采用人工智能触发(触发阈值设置在 100 Hu)。扫描延迟平均时间约 6 s。检查完毕, 所有检查者原始图像均传至 Syngo. via 进行后处理, 筛选图像最佳者对冠状动脉进行图像后处理包括容积再现(VR)、最大密度投影(MIP)、曲面重组(CPR)等。根据 1990 年 Agatston 等<sup>[8]</sup>提出钙化积分计算标准, 选取 CT 值 130 Hu 为阈值, 根据钙化的面积及体积计算出钙化积分, 然后标出各个冠状动脉分支的钙化区域, 自动得出各个冠状动脉分支的钙化积分及总体钙化积分。

#### 1.4 样品制备和 RNA 提取

入选者均于空腹 12 h 后分别采集静脉血 10 mL (前 2 mL 弃去), 至含柠檬酸钠的 CTAD 真空管 (100 mmol/L), 抗凝血在 20 °C、10 μg/L PGI<sub>2</sub> 存在的条件下离心 20 min, 分离上清, 采用 Trizol 试剂盒提取总 RNA (Invitrogen), Rneasy 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化。

#### 1.5 microRNA 微阵列芯片实验

(1) microRNA 标记。(2) microRNA 微阵列杂交: 将 90 μL 杂交液、12.5 μL 标记产物、77.5 μL 无核酸酶的缓冲液加至 PCR 管中混合, 95 °C 孵育 2 min 冰浴 2 min。芯片杂交仪于 42 °C 过夜杂交, 杂交后使用芯片洗干仪进行清洗。(3) 芯片扫描和数据分析: Axon Gene Pix4000B 扫描芯片提取原始图片, 将图像转化为基于荧光强度的数字信号, Axon Gene PixproV6.0 读取图像资料, 随后进行数据分析和处理, 以校正后的两个样品间杂交信号强度比值 >2 或 <0.5 表示两组间 microRNA 表达差异有统计学意义。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 microRNA-204 水平。qRT-PCR 采用罗氏公司的 Fast Start Universal SYBR Green 于 ABI7300 进行产物扩增, 扩增采用两步法, 第一步 95 °C 10 min, 第二步循环 40 次: 95 °C 15 s、60 °C 1 min。miRNA 采用 U6 作为内参。qRT-PCR 特异引物序列为: mmu-miR-204-5pRT: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGGCATA-3', mmu-miR-204-5pF: 5'-GCAGTTCCCTTTGTCATCCT-3'; Hu-U6-2QF: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3', 5'-AACGCTTCCGAATTTGCGT-3'; 用 ΔΔCt 法表示 microRNA-204 的相对表达水平。

#### 1.6 统计学分析

使用 SPSS22.0 软件进行统计学分析。计数资料以率或构成比表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验。计量

资料采用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 行正态性和方差齐性检验, 采用 *t* 检验比较两组连续变量。单变量线性回归分析用于比较血浆 microRNA-204 和钙化积分, 并计算 Pearson 相关系数以评估数据之间的相关性, 采用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线评价 microRNA-204 潜在诊断冠状动脉钙化的价值。采用双侧检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般资料比较

两组患者在空腹血糖 (fast plasma glucose, FPG)、糖化血红蛋白 (glycosylated hemoglobin, HbA1c) 及高密度脂蛋白胆固醇 (density lipoprotein cholesterol, HDLC) 方面比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 1)。非钙化组的患者表现出较低的 FPG 及 HbA1c。两组之间的血压、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 无明显统计学差异 ( $P > 0.05$ , 表 1)。

表 1. 两组患者一般资料比较

Table 1. Comparison of the general data between the two groups

一般资料	非钙化组 (n=80)	钙化组 (n=99)	P 值
年龄 (岁)	61.0±10.7	60.0±9.7	0.283
男性 [例 (%)]	53 (66.2)	58 (58.6)	0.360
高血压 [例 (%)]	28 (35.0)	37 (37.4)	0.757
吸烟史 [例 (%)]	34 (42.5)	45 (45.4)	0.808
体质指数 (kg/m <sup>2</sup> )	25.7±2.5	25.8±3.0	0.653
FPG (mmol/L)	6.4±1.0	9.0±2.5	<0.001
HbA1c (%)	6.4±0.4	7.3±0.5	<0.001
收缩压 (mmHg)	128±15	129±15	0.688
舒张压 (mmHg)	78±10	76±10	0.247
TG (mmol/L)	2.07±1.68	2.17±1.87	0.724
TC (mmol/L)	4.09±1.08	4.14±1.08	0.740
HDLC (mmol/L)	1.22±0.67	1.07±0.29	0.049
LDLC (mmol/L)	2.41±0.95	2.46±0.76	0.700
肌酐 (μmol/L)	73.1±24.7	80.5±67.4	0.345
射血分数 (%)	61±14	63±6	0.171
阿司匹林 [例 (%)]	33 (41.2)	38 (38.4)	0.933
β受体阻滞剂 [例 (%)]	30 (37.5)	45 (45.4)	0.148
ACEI/ARB [例 (%)]	23 (28.8)	29 (29.3)	0.497
他汀类 [例 (%)]	33 (41.2)	33 (33.3)	0.480

## 2.2 具有冠状动脉钙化的个体血浆中 microRNA 的表达谱

为了探究钙化组的个体中 microRNA 水平的差异表达,我们从中挑选非冠状动脉钙化(CACS $\leq$ 10,  $n=5$ )和冠状动脉钙化(CACS $>$ 10,  $n=5$ )共 10 名患者(年龄、性别、糖尿病病史相匹配)进行微阵列谱分析,比较两组各 5 例患者血浆 microRNA 的表达水平。循环 microRNA-204 的表达水平在钙化组与非钙化组之间有显著差异,如图 1 中热图所示。在微阵列上检测到钙化组相较于非钙化组有 microRNA-204 的差异表达( $P<0.05$ ),钙化组 microRNA-204 表达下调。钙化组 microRNA-204 的水平较非钙化组显著降低。

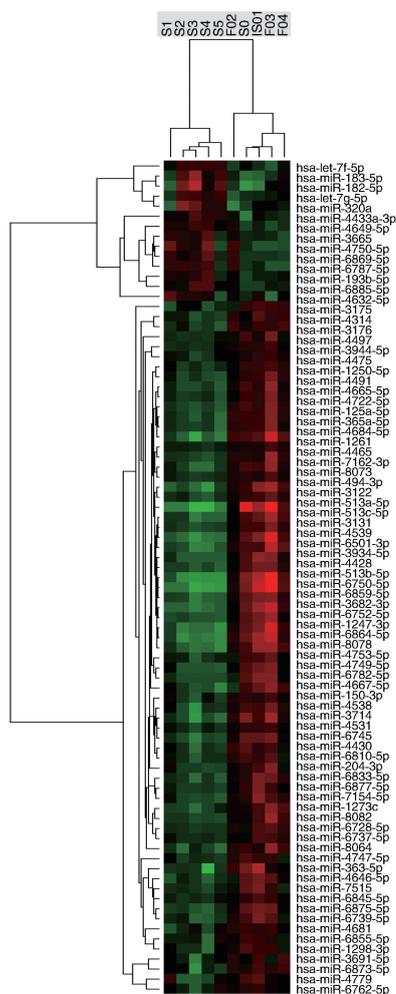


图 1. 钙化组( $n=5$ )与非钙化组( $n=5$ )患者血浆 microRNA 微阵列表达数据热图

Figure 1. Heat map of microRNA microarray expression data from plasma samples of individuals with ( $n=5$ ) and without ( $n=5$ ) coronary artery calcification

## 2.3 microRNA qRT-PCR 结果分析

为了确认 microRNA 微阵列的分析结果,通过

qRT-PCR 分析了钙化组及非钙化组患者血浆 microRNA-204 的水平,结果发现与 microRNA 微阵列谱分析结果一致,与非钙化组相比,钙化组患者中 microRNA-204 的水平降低( $P<0.05$ ;图 2)。

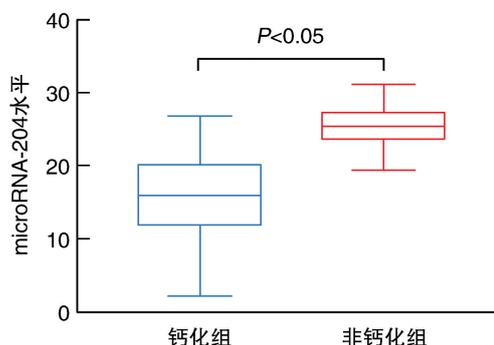


图 2. qRT-PCR 进一步验证 microRNA 微阵列得出的结果  
Figure 2. Validation of microRNA microarray data by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction

## 2.4 microRNA-204 水平与冠状动脉钙化积分的相关性

对 CACS 与 microRNA-204 进行相关性分析发现,患者 CACS 与血浆 microRNA-204 之间呈负相关( $r=-0.8264$ ,  $P<0.0001$ ;图 3)。ROC 分析结果显示, microRNA-204 的 AUC 为 0.9487 (0.9191 ~ 0.9782,  $P<0.0001$ ),诊断临界值为 21.3, 敏感度为 96.3%, 特异度为 79.6%;其次 HbA1c 的 AUC 为 0.9138 ( $P<0.0001$ ;图 4、图 5 和表 2)。

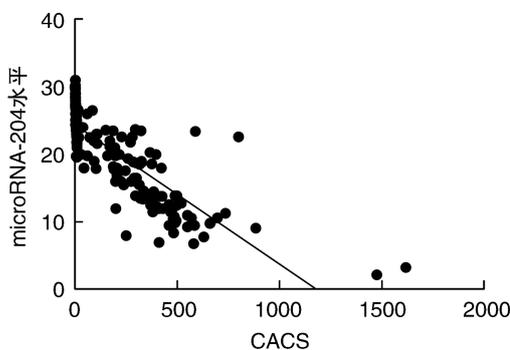


图 3. microRNA-204 与冠状动脉钙化积分的相关性分析  
Figure 3. Correlation between microRNA-204 and coronary artery calcification score

## 3 讨论

本研究探讨了糖尿病人群血浆循环 microRNA-204 与冠状动脉钙化的关联及其临床意义。microRNA

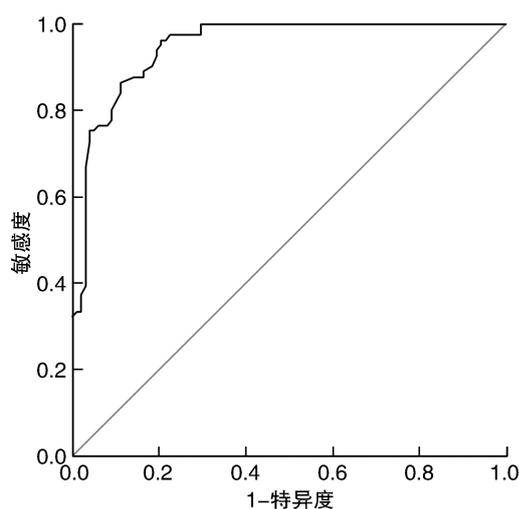


图4. 循环 microRNA-204 诊断动脉钙化的 ROC 曲线  
Figure 4. ROC curve of circulating microRNA-204 for diagnosis of arterial calcification

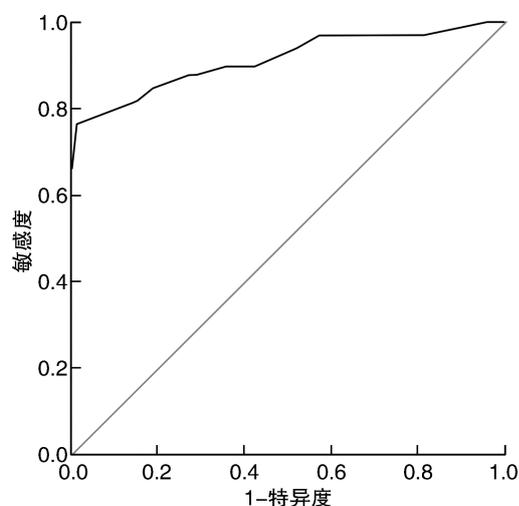


图5. 血浆 HbA1c 对血管钙化诊断价值的 ROC 曲线  
Figure 5. ROC curve of plasma HbA1c for diagnosis of arterial calcification

表2. 钙化组显著下降的循环 microRNA-204 及血浆 HbA1c 水平曲线下面积对比

Table 2. Area comparison of circulating microRNA-204 and HbA1c levels in the calcification group

参数	microRNA-204	HbA1c
AUC	0.9487	0.9138
95%CI	0.9191 ~ 0.9782	0.8712 ~ 0.9563
P 值	<0.0001	<0.0001

微阵列显示在 CACS>10 的患者中有 microRNA-204 的下调,并通过 qRT-PCR 进一步验证了在钙化患者中 microRNA-204 表达水平显著下调,最终在 CACS

与 microRNA-204 之间发现显著的负相关,结合 ROC 分析结果显示 microRNA-204 在检测糖尿病患者是否存在冠状动脉钙化方面具有临床意义。microRNA-204 可能成为诊断糖尿病冠状动脉血管钙化的新型生物标志物。

研究已证明冠状动脉钙化是心血管高死亡率的独立危险因素。反映冠状动脉钙化严重程度的 CACS 积分区间在 11 ~ 100、101 ~ 299、300 ~ 399、400 ~ 699、700 ~ 999 和 >1 000 中,冠状动脉钙化的相对风险比与 CACS 为 0 相比分别增加 2.2 倍、4.5 倍、6.4 倍、9.2 倍、10.4 倍和 12.5 倍。而  $0 < \text{CACS} < 10$  与 CACS=0 相比无明显统计学差异<sup>[9]</sup>。且有研究指出 CACS<10 的患者 10 年心血管事件发生率明显低于 CACS>10 的人群<sup>[10]</sup>。尽管血管钙化最常见于慢性肾病和糖尿病,但单纯患有冠状动脉粥样硬化的患者也可出现冠状动脉钙化,并通过组织病理学和血管内研究证实冠状动脉钙化与动脉粥样硬化严重程度之间密切相关。因此近年来通过多探测器计算机断层扫描(MDCT)的冠状动脉钙化积分已成为检测冠状动脉疾病钙化程度及评估冠状动脉粥样硬化斑块负荷程度的常用且重要的诊断技术<sup>[11]</sup>。目前,microRNA 在肿瘤、免疫学和心血管疾病等医学领域已成为诊断和预后标志物<sup>[12]</sup>,但血管钙化的机制仍未明确。有研究指出斑块微环境中的慢性炎症是冠状动脉钙化发病的重要因素。斑块内的巨噬细胞、淋巴细胞和树突状细胞分泌细胞因子,如肿瘤坏死因子,可激活 Msx2-Wnt 信号传导通路,从而导致  $\beta$ -连环蛋白的积累和成骨分化的增强<sup>[13]</sup>。促氧化剂过氧化氢可以通过上调成骨转录因子 Runx2,促进血管平滑肌细胞向成骨细胞转分化<sup>[14]</sup>。脂质过氧化产物如氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)也可诱导成骨介导和凋亡介导的血管平滑肌细胞钙化<sup>[15]</sup>。另外多种代谢因子如焦磷酸和尿酸盐晶体、维生素 D 以及葡萄糖也可引起血管钙化<sup>[16]</sup>。

目前有实验结果显示 microRNA-204 通过抑制靶基因 Runx2 通路中的靶标蛋白而在血管钙化发生发展过程中发挥重要调控作用,microRNA-204 同样也是一种重要的血管内皮细胞功能调节因子。这一发现对预防和治疗多种与血管钙化相关的心血管疾病具有广泛的意义<sup>[5]</sup>。然而其临床意义还有待证实,本研究结果将使我们更好地了解 microRNA 在血管钙化中的功能及其体内机制,并开发针对心血管疾病治疗的特定基因靶点制备靶向药物。

本研究尚有一定局限性:首先,本研究为单中心横断面研究,入选患者样本量较少,可能对结果有一定的影响;其次,本研究还探讨了血浆 HbA1c 对此类患者冠状动脉钙化程度的预测价值。与既往研究结果一致<sup>[17]</sup>,HbA1c 水平不仅可以反映冠状动脉病变的严重程度,我们的数据还表明,HbA1c 水平对冠状动脉钙化同样具有较高的预测价值。但由于本研究样本量较少,且中国糖尿病患者血糖控制情况并不理想,患者本身依从性较差,因此结论还需多中心大规模试验的进一步证实。

总之,microRNA 在许多生理及病理生理过程中起着至关重要的作用。循环 microRNA 已被确定为各种生理和病理过程的生物标志物。且 microRNA 微阵列及 qRT-PCR 技术的开展为 microRNA 的检测与定量提供了有效又便捷的方法。甚至已经有人提出,循环 microRNA 生物标志物的检测程序将比传统蛋白质组生物标志物测定更有效。冠状动脉钙化与动脉粥样硬化密切相关,早期发现冠状动脉钙化对于鉴别亚临床动脉粥样硬化和预测冠状动脉疾病的风险非常重要。通过探究冠状动脉钙化的特异性循环 microRNA,我们将提供一种检测冠状动脉钙化严重程度的新方法,此外,本研究的结果还强调了进一步了解循环 microRNA 在冠状动脉钙化过程和进展中的作用。然而限于研究样本数量,还应进一步更大规模研究证实。

#### [参考文献]

- [1] 王中群,戴俏武,邵晨,等. 血管钙化的骨调控机制新进展[J]. 中华心血管病杂志, 2017, 45(1): 78-80.
- [2] Shaw LJ, Giambrone AE, Blaha MJ, et al. Long-term prognosis after coronary artery calcification testing in asymptomatic patients[J]. *Ann Intern Med*, 2015, 163(1): 14-21.
- [3] Liberman M, Pesaro AEP, Luciana Simão Carmo, et al. Vascular calcification: pathophysiology and clinical implications [J]. *Einstein*, 2013. DOI: 10.1590/S1679-45082013000300021.
- [4] Shroff R, Long DA, Shanahan C. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(2): 179-189.
- [5] Cui RR, Li SJ, Liu LJ, et al. MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 96(2): 320-329.
- [6] 马文琦,刘乃丰. 糖尿病与血管钙化的基础与临床 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(5): 453-457.
- [7] Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2013, 9(9): 513-521.
- [8] Agatston A. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1990. DOI: 10.1016/0735-1097(90)90282-T.
- [9] Budoff MJ, Shaw LJ, Liu ST, et al. Long-term prognosis associated with coronary calcification: observations from a registry of 25,253 patients[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(18): 1860-1870.
- [10] Joshi PH, Blaha MJ, Budoff MJ, et al. Abstract 11701: the ten year prognostic value of zero and minimal coronary artery calcium: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA)[J]. *Circulation*, 2014, 130(61): A11701.
- [11] Malguria N, Zimmerman S, Fishman EK. Coronary artery calcium scoring: current status and review of literature [J]. *J Comput Assist Tomogr*, 2018, 42(6): 887-897.
- [12] Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(4): 462-469.
- [13] Al-Aly Z, Shao JS, Lai CF, et al. Aortic Msx2-Wnt calcification cascade is regulated by tnfr-α dependent signals in diabetic LDLR<sup>-/-</sup> mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(12): 2589-2596.
- [14] Byon CH, Javed A, Dai Q, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(22): 15319-15327.
- [15] Nadra I, Mason JC, Philippidis P, et al. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? [J]. *Circ Res*, 2005, 96(12): 1248-1256.
- [16] Price PA, June HH, Buckley JR, et al. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(10): 1610-1616.
- [17] Hong LF, Li XL, Guo YL, et al. Glycosylated hemoglobin A1c as a marker predicting the severity of coronary artery disease and early outcome in patients with stable angina[J]. *Lipids Health Dis*, 2014. DOI: 10.1186/1476-511X-13-89.

(此文编辑 许雪梅)