

间歇性碱刺激对高磷诱导的大鼠血管环钙化的影响及可能机制

田恬, 徐金升, 白亚玲, 张俊霞, 崔立文, 张胜雷

(河北医科大学第四医院肾内科, 河北省石家庄市 050011)

[关键词] 间歇性碱刺激; 血管环钙化; L 型钙通道 β_3 亚基; 血管平滑肌细胞; 表型转化; 维持性血液透析

[摘要] **目的** 探讨间歇性碱刺激对高磷诱导的大鼠胸主动脉血管环钙化的影响及可能机制。**方法** 体外分离大鼠胸主动脉血管环, 将其随机分为正常对照组、高磷组(含 10 mmol/L β -甘油磷酸的培养基)和间歇性碱刺激组(在高磷培养基的基础上调整 pH 值为 7.7)。干预 14 天后, 采用免疫组织化学方法检测 L 型钙通道(LTCC) β_3 亚基、Runx2 相关转录因子 2(Runx2)和平滑肌蛋白 22 α (SM22 α)的表达情况; 采用硝酸银染色法和钙含量测定法检测血管环钙化程度。**结果** 与正常对照组相比, 高磷组的钙含量、Runx2 和 LTCC β_3 亚基表达水平平均增加($P<0.001$); 与高磷组相比, 间歇性碱刺激组的钙含量、Runx2 和 LTCC β_3 亚基表达水平均有显著增加($P<0.001$)。同时, 高磷组棕黑色钙化结节较正常对照组增多, 间歇性碱刺激组棕黑色钙化结节较高磷组增多。与正常对照组相比, 高磷组的 SM22 α 表达水平下降($P<0.001$); 与高磷组相比, 间歇性碱刺激组的 SM22 α 表达水平显著下降($P<0.001$)。相关性分析显示, LTCC β_3 亚基与 Runx2 蛋白表达呈正相关($r=0.740, P=0.002$), 与 SM22 α 蛋白表达呈负相关($r=-0.670, P=0.006$)。**结论** 间歇性碱刺激可以促进高磷诱导的大鼠胸主动脉血管环钙化, 其可能通过上调 LTCC β_3 亚基表达, 促进血管平滑肌细胞向成骨/成软骨表型转化, 进而促进血管环钙化的发生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of intermittent alkaline stimulation on aortic ring calcification in rat induced by high phosphorus and its mechanism

TIAN Tian, XU Jin-Sheng, BAI Ya-Ling, ZHANG Jun-Xia, CUI Li-Wen, ZHANG Sheng-Lei

(Department of Nephrology, the Forth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

[KEY WORDS] Intermittent alkaline stimulation; Aortic ring calcification; L-type calcium channels β_3 subunit; Vascular smooth muscle cell; Phenotypic transformation; Maintenance hemodialysis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of intermittent alkaline stimulation on vascular ring calcification from the thoracic aorta of rats induced by high phosphorus and the possible mechanism. **Methods** Aortic rings were isolated from rat thoracic aorta and cultured in vitro, and randomly divided into three groups: control group, high phosphorus group (containing 10 mmol/L β -glycerol phosphate medium) and intermittent alkaline stimulation group (adjusting pH to 7.7 on the basis of high phosphorus medium). After 14 days of intervention, the expressions of L-type calcium channels (LTCC) β_3 subunit, runt-related transcription factor 2 (Runx2) and smooth muscle protein 22 α (SM22 α) were detected by immunohistochemical method. The degree of vascular ring calcification was detected by silver nitrate staining and calcium content test. **Results** Compared with control group, calcium content, the expressions of Runx2 and LTCC β_3 were significantly increased in high phosphorus group ($P<0.001$). Compared with high phosphorus group, calcium content, the expressions of Runx2 and LTCC β_3 were significantly increased in intermittent alkaline stimulation group ($P<0.001$). At the same time, the number of brown and black calcified nodules in high phosphorus group was higher than that in control group, and the number of brown and black calcified nodules in intermittent alkaline stimulation group was higher than that

[收稿日期] 2016-06-14

[修回日期] 2016-09-05

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(2012206157); 河北省科技计划项目(16397733D、20150351、20150310)

[作者简介] 田恬, 硕士研究生, 研究方向为维持性血液透析患者血管钙化机制研究, E-mail 为 370231482@qq.com。通讯作者徐金升, 博士, 主任医师, 研究方向为维持性血液透析患者血管钙化机制研究, E-mail 为 xjs5766@126.com。

in high phosphorus group. Compared with control group, the expression of SM22 α was significantly decreased in high phosphorus group ($P<0.001$). Compared with high phosphorus group, the expression of SM22 α was significantly decreased in intermittent alkaline stimulation group ($P<0.001$). Correlation analysis showed that the expression of LTCC β_3 was positively correlated with Runx2 protein expression ($r = 0.704, P = 0.002$) and negatively correlated with SM22 α protein expression ($r = -0.670, P = 0.006$). **Conclusion** Intermittent alkaline stimulation can promote high phosphorus induced vascular ring calcification from the thoracic aorta of rats. Its mechanism may be upregulation of LTCC β_3 protein expression, enhancing the transformation of vascular smooth muscle cells into osteogenesis/chondrogenesis phenotype, and then promoting the occurrence of vascular ring calcification.

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是维持性血液透析 (maintenance hemodialysis, MHD) 患者的常见并发症,也是 MHD 患者的主要死亡原因之一,而血管钙化是其中最常见的病理表现,血管钙化导致的死亡率约占 MHD 患者总病死率的 30% 左右^[1]。研究表明,血管钙化是一个与骨形成类似的调控的主动过程。中膜钙化是 MHD 患者血管钙化的主要类型,血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 作为血管中膜的重要成分,在血管钙化发生、发展过程中起重要作用。其中, VSMC 由收缩表型向成骨细胞样表型转化在血管钙化的发生发展中发挥了重要作用^[2]。由于 MHD 患者每周需进行 3 次透析,使得患者体内 pH 值发生规律性变化。前人^[3-4] 及本课题组前期的研究^[5] 均发现,酸性环境抑制血管钙化,碱性环境促进血管钙化。然而,间歇性碱刺激对血管钙化的影响及可能的机制尚未完全明确,因此本研究将通过模拟 MHD 患者体内特有的 pH 变化规律,探讨间歇性碱刺激对大鼠胸主动脉血管环钙化的影响及可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

5~8 周龄健康雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 体重 200~250 g, 清洁级, 由河北医科大学实验动物中心提供 (合格证编号: 1305090)。

1.2 主要仪器和试剂

倒置相差显微镜 (LH50A 型, 日本 Olympus 公司); 细胞成像多功能检测系统 (CYTATION3 型, 美国 Biotek 公司); 酸度计 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); β -甘油磷酸 (美国 Sigma 公司); 鼠抗鼠 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2) 单克隆抗体 (英国 Abcame 公司); 兔抗鼠 β_3 单克隆抗体 (以色列 Alomone 公司); 鼠抗兔平滑肌蛋白 22 α (smooth muscle protein

22 α , SM22 α) 单克隆抗体 (英国 Abcame 公司); SP 免疫组织化学试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 钙含量测定试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司)。

1.3 大鼠离体血管环培养及实验分组

SD 雄性大鼠 200~250 g, 给予腹腔内注射苯巴比妥钠 (150 mg/kg) 麻醉, 麻醉成功后, 固定于缓冲间内的手术台上, 75% 酒精消毒胸腹部区域。无菌条件下取出胸主动脉 (主动脉弓到肾动脉), 放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷 0.01 mmol/L PBS (含 100 kU/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素, pH7.2) 中, 移至超净台中充分漂洗。小心剥掉外膜和内膜, 之后将血管切成 2~3 mm 血管环, 分别置于含 10% 胎牛血清培养基和高磷培养基 (含 10 mmol/L β -甘油磷酸) 中培养, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱内 (湿度 100%)。将大鼠离体血管环随机分为正常对照组、高磷组及间歇性碱刺激组。正常对照组采用含 10% 胎牛血清培养基培养, 高磷组采用高磷培养基 (含 10 mmol/L β -甘油磷酸) 培养, 间歇性碱刺激组在高磷培养基的基础上再加入 7.4% NaHCO₃ 调整 pH 值为 7.7, 隔 1 天给予 pH7.7 的碱刺激 4 h。MTT 实验监测血管环的活力。刺激 14 天后, 检测各组 L 型钙通道 (L-type calcium channels, LTCC) β_3 亚基、Runx2 和 SM22 α 的表达情况, 以及钙化情况。

1.4 大鼠血管环钙含量测定

取新鲜胸主动脉约 10 mg 烤干称重, 置于 0.6 mmol/L 盐酸中 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化过夜, 取上清液用邻甲酚酞络合酮比色法测定钙含量, 酶标仪在 600 nm 处检测吸光度值, 最终计算出每克血管组织中的钙含量, 以 mg/g 为单位。

1.5 大鼠血管环 Von Kossa 染色

将干预后的大鼠血管环标本轻轻漂洗, 放入 10% 中性甲醛中固定 24 h, 乙醇梯度脱水, 石蜡垂直定向包埋, 4 μm 厚度连续切片, Von Kossa 染色: 常规脱蜡、脱水后拨片滴加 5% 硝酸银溶液中, 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,经脱水、透明、封片,于光镜下观察血管钙化情况,钙盐沉积处被染为黑褐色。

1.6 免疫组织化学染色分析

免疫组织化学染色检测血管 LTCCβ₃亚基、Runx2 和 SM22α 表达:取石蜡切片(3 μm)常规脱蜡至水,用 乙二胺四乙酸高压锅煮沸抗原修复 10 min,3% H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶 20 min,山羊血清 37℃ 封闭 45 min 后,甩掉封闭液,滴加一抗:LTCCβ₃亚基(1 : 50)、Runx2(1 : 100)、SM22α(1 : 100),放入 4℃ 过夜;滴加第 2 代生物素标记的二抗工作液,37℃ 温箱内孵育 30 min;再滴加辣根过氧化物酶标记链酶卵白素工作液,37℃ 温箱内孵育 30 min,DAB 显色 45 s,显微镜下观察,蒸馏水终止反应,苏木素复染,明显棕黄色颗粒为阳性,不着色为阴性。随机选取 5 个高倍视野,依据文献[6]评分标准进行评分,染色强度与阳性细胞积分相加得到免疫反应积分(immunoreactive score,IRS),大于 3 分为阳性。

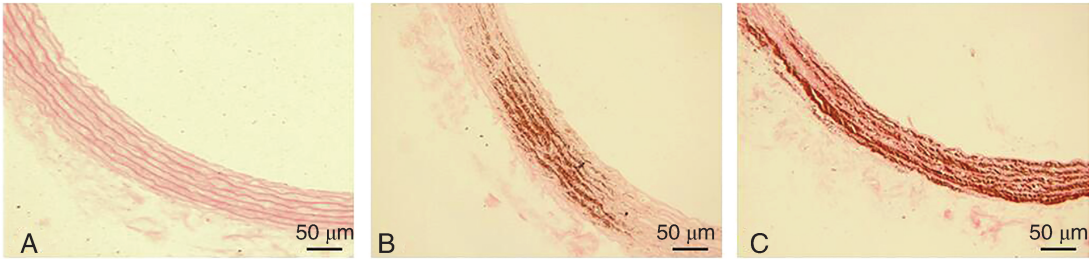


图 1. 各组大鼠血管环 Von Kossa 染色(200×) A 为正常对照组,B 为高磷组,C 为间歇性碱刺激组。

Figure 1. Von Kossa staining of the rats aortic rings in each group(200×)

表 1. 各组大鼠主动脉血管环钙含量(n=5)

Table 1. Calcium content of the rats aortic rings in each group(n=5)

分 组	14 天钙含量(mg/g 蛋白)
正常对照组	4.38±0.91
高磷组	9.57±1.12 ^a
间歇性碱刺激组	14.69±1.46 ^{ab}
F 值	18.84
P 值	<0.001

a 为 P<0.001,与正常对照组比较;b 为 P<0.001,与高磷组比较。

2.2 间歇性碱刺激对高磷诱导血管环 Runx2 和 SM22α 表达的影响

免疫组织化学结果显示,3 组大鼠血管环 Runx2 表达水平比较,差异有统计学意义(P<0.001);与正常对照组相比,高磷组 Runx2 表达水平增高(P<0.001);与高磷组相比,间歇性碱刺激组 Runx2 表达

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,符合正态分布的计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析;相关分析中,双变量采用 Pearson 检验。*P*<0.001 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 间歇性碱刺激对高磷诱导血管环钙化的影响

血管环 Von Kossa 染色结果显示,与正常对照组相比,高磷组棕黑色钙化结节明显增多;与高磷组相比,间歇性碱刺激组棕黑色钙化结节明显增多(图 1)。血管环钙含量测定结果显示:3 组大鼠血管环钙含量比较,差异有统计学意义(*P*<0.001);与正常对照组相比,高磷组钙含量增加(*P*<0.001);与高磷组相比,间歇性碱刺激组钙含量明显增加(*P*<0.001;表 1)。

水平明显增高(*P*<0.001;表 2、图 2)。3 组大鼠血管环 SM22α 表达水平比较,差异有统计学意义(*P*<0.001);与正常对照组相比,高磷组 SM22α 表达水平降低(*P*<0.001);与高磷组相比,间歇性碱刺激组 SM22α 表达水平明显降低(*P*<0.001;表 2、图 3)。

表 2. 各组大鼠血管环目的因子免疫组织化学积分(n=5)

Table 2. Immunohistochemical scores of the rats aortic rings in each group(n=5)

分 组	Runx2	SM22α	LTCCβ ₃
正常对照组	2.11±0.25	8.10±0.84	1.42±0.30
高磷组	4.24±0.48 ^a	4.86±0.75 ^a	3.93±0.63 ^a
间歇性碱刺激组	7.89±0.89 ^{ab}	1.72±0.35 ^{ab}	7.22±0.88 ^{ab}
F 值	23.43	21.82	19.89
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

a 为 P<0.001,与正常对照组比较;b 为 P<0.001,与高磷组比较。

2.3 间歇性碱刺激对高磷诱导血管环 LTCCβ₃ 亚基表达的影响

免疫组织化学结果显示,3 组大鼠血管环 LTCCβ₃ 亚基表达水平比较,差异有统计学意义 ($P<0.001$);与正常对照组相比,高磷组 LTCCβ₃ 亚基表达水平增高 ($P<0.001$);与高磷组相比,间歇性碱刺激组 LTCCβ₃ 亚基表达水平明显增高 ($P<0.001$;表

2、图 4)。

2.4 LTCCβ₃ 亚基与 Runx2、SM22α 免疫组织化学评分之间的相关关系

相关性分析结果显示,LTCCβ₃ 亚基与 Runx2 蛋白表达呈正相关 ($r=0.740, P=0.002$;图 5),LTCCβ₃ 亚基与 SM22α 蛋白表达呈负相关 ($r=-0.670, P=0.006$;图 5)。

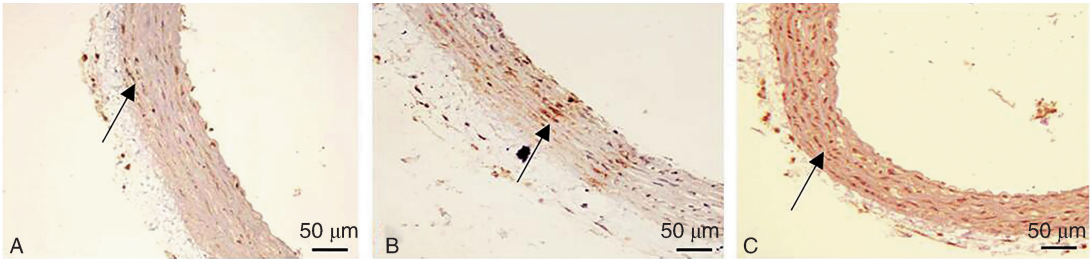


图 2. 各组大鼠血管环 Runx2 表达情况 (200×) A 为正常对照组,B 为高磷组,C 为间歇性碱刺激组。

Figure 2. The expression of Runx2 protein of the rats aortic rings in each group(200×)

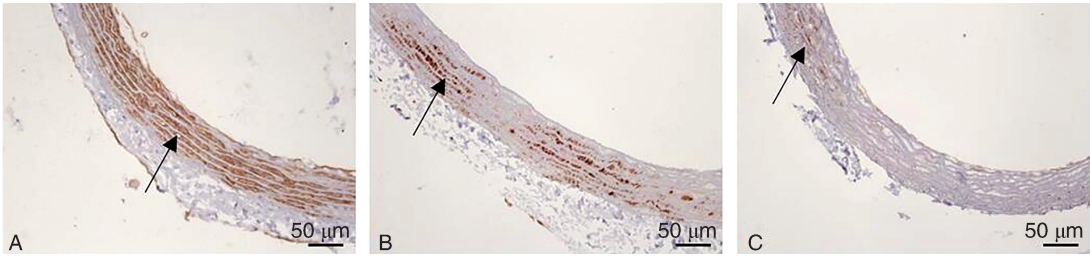


图 3. 各组大鼠血管环 SM22α 表达情况 (200×) A 为正常对照组,B 为高磷组,C 为间歇性碱刺激组。

Figure 3. The expression of SM22α protein of the rats aortic rings in each group(200×)

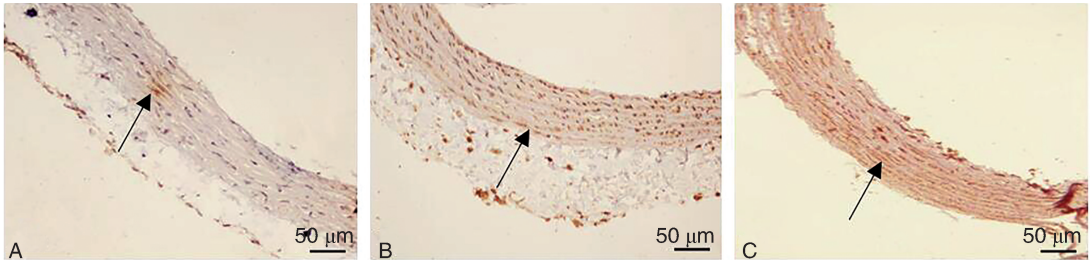


图 4. 各组大鼠血管环 LTCCβ₃ 表达情况 (200×) A 为正常对照组,B 为高磷组,C 为间歇性碱刺激组。

Figure 4. The expression of LTCCβ₃ protein of the rats aortic rings in each group(200×)

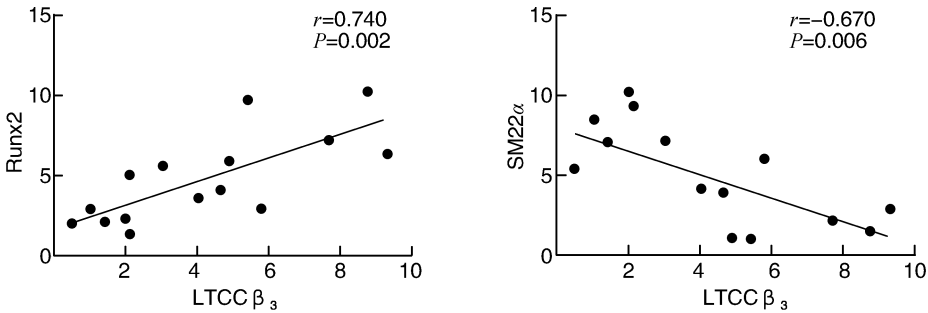


图 5. LTCCβ₃ 与 Runx2、SM22α 免疫组织化学积分的相关分析

Figure 5. Correlation analysis between LTCCβ₃ and immunohistochemistry scores of Runx2, SM22α

3 讨论

MHD 患者普遍存在血管钙化,而血管钙化与 CVD 密切相关,CVD 是 MHD 患者的主要死因。MHD 患者由于行规律性血液透析治疗,使其体内 pH 呈规律性变化。血透开始时,由于此时体内 HCO_3^- 水平较低,透析液中的 HCO_3^- 进入体内较快,因此,在透析过程中,MHD 患者会暂时性的处于碱负荷状态。随后由于内源性酸的不断产生以及体液潴留的增加,血液 pH 又逐渐下降,至下次透析前达到最低点。常规透析液的碳酸氢盐浓度为 35 ~ 40 mmol/L,导致患者透后血液 pH 为 7.50 ~ 7.52^[7-8]。近年来,有研究表明^[4],碱性环境可促进血管钙化。VSMC 生存环境中磷浓度增加,可以促进 VSMC 向成骨细胞转化,是研究动脉中膜钙化机制的理想的离体细胞模型。我们通过隔天给予高磷+pH7.7 培养基干预来模拟 MHD 患者每周 3 次血液透析时体内短暂的碱性环境,使大鼠血管环暴露在高浓度碱性环境下。本研究使用无机磷干预组织,诱导钙化模型,并通过体外培养大鼠胸主动脉血管环,进一步探讨间歇性碱刺激对大鼠血管环钙化的影响及可能机制。

VSMC 是一种非终末分化细胞,具有多项分化潜能,能够向成骨/骨髓间充质干细胞转化。近年来的研究表明^[9],在一些因子如骨形成蛋白 2、转化生长因子 β_1 、血管紧张素 II、 β -磷酸甘油钠、地塞米松、高钙、无机磷等刺激下,促进 VSMC 向成骨细胞转化,导致动脉中膜钙化。VSMC 向成骨细胞的表型转化是引起血管钙化的重要机制之一。Runx2 是成骨细胞发生和分化的特异性转录因子,参与调控下游的骨基质和骨胶原等的产生,在成骨细胞的分化和骨形成的过程中发挥了重要作用,也是 VSMC 向成骨细胞转化过程中的一个重要的早期标志物^[10]。SM22 α 是 VSMC 中的骨架蛋白,在调节细胞形态和维持细胞舒缩运动等方面发挥着重要的作用,因而成为收缩型 VSMC 经典的标志性蛋白分子。研究表明,在高磷诱导的钙化血管环中,Runx2 表达增加,而 VSMC 表型标志基因 SM22 α 则随着高磷刺激时间的延长而逐渐下降。在本实验中,与正常对照组相比,高磷组 Runx2 表达水平增加,SM22 α 表达水平降低;与高磷组相比,间歇性碱刺激组 Runx2 表达水平增加,SM22 α 表达水平降低。

L 型钙通道是 VSMC 上重要的电压门控钙通道,是介导钙离子内流入 VSMC 的主要途径,血管平滑肌 L 型钙通道主要由 $\alpha_1\text{C}$ 、 α_2/δ_1 、 γ 及 β 亚基组

成。目前已知 β_3 亚基是 VSMC 上主要的亚型,通过与 $\alpha_1\text{C}$ 亚单位相互作用调节内向钙离子电流。有研究表明,增加 LTCC β_3 亚基的表达水平可以显著增加钙离子内流入 VSMC^[11],而细胞外钙离子内流入细胞后,可以通过调控钙离子下游目的基因转录,上调 Runx2 的表达^[12]。本课题组前期研究也发现^[13],LTCC β_3 亚基在 VSMC 向成骨/成软骨细胞转化中发挥重要作用。在本实验中,与正常对照组相比,高磷组 LTCC β_3 亚基表达水平增加;与高磷组相比,间歇性碱刺激组 LTCC β_3 亚基表达水平增加。同时,相关性分析结果显示,LTCC β_3 亚基表达增高与 VSMC 发生表型转化具有相关性。

总之,我们通过体外实验发现,间歇性碱刺激能够促进高磷诱导的大鼠血管环钙化,其可能是通过促进 LTCC β_3 亚基表达增加,进而上调 Runx2 表达、下调 SM22 α 表达,促进 VSMC 向成骨样表型转化来实现的。但本研究仅限于体外实验,而其在体内实验中是否一致,尚有待进一步设计动物实验及临床试验观察间歇性 pH 变化对血管钙化的影响,以期为 MHD 患者临床心血管事件的防治提供新视角。

[参考文献]

- [1] Kraus MA, Kalra PA, Hunter J, et al. The prevalence of vascular calcification in patients with end-stage renal disease on hemodialysis: a cross-sectional observational study[J]. Ther Adv Chronic Dis, 2015, 6(3): 84-96.
 - [2] Quarles LD. Reducing cardiovascular mortality in chronic kidney disease: something borrowed, something new[J]. J Clin Invest, 2013, 123(2): 542-543.
 - [3] Mendoza FJ, Lopez I, Montes de Oca A, et al. Metabolic acidosis inhibits soft tissue calcification in uremic rats[J]. Kidney Int, 2008, 73(4): 407-414.
 - [4] de Solis AJ, Gonzales-Pacheco FR, Deudero JJ, et al. Alkalinization potentiates vascular calcium deposition in an uremic milieu[J]. J Nephrol, 2009, 22(5): 647-653.
 - [5] 常立欣,徐金升,杨 硕,等.碱性环境和高磷条件下大鼠胸主动脉平滑肌细胞成骨样表型转化中钙激活钾通道 mRNA 的表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(5): 457-462.
 - [6] Zhang L, Mai HM, Zheng J, et al. Propranolol inhibits angiogenesis via down-regulating the expression of vascular endothelial growth factor in hemangioma derived stem cell[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(1): 48-55.
 - [7] Ahmad S, Pagel M, Vizzo J, et al. Effect of the normalization of acid-base balance on postdialysis plasma bicarbonate[J]. Trans Am Soc Artif Intern Organs, 1980, 26(26): 318-321.
- (下转第 829 页)

lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: The Framingham Study [J]. *Am J Med*, 1977, 62 (5): 707-714.

[8] 陈志杰. 绝经前后女性冠心病患者危险因素与冠状动脉病变特点的分析 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014; 11-12.

[9] 王金丽. 未绝经女性冠心病的危险因素和冠脉病变分析 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2013; 9-10.

[10] Meyer MR, Barton M. Estrogens and coronary artery disease: new clinical perspectives [J]. *Adv Pharmacol*, 2016, 77: 307-360.

[11] Yan L, Cao X, Zeng S, et al. Associations of proteins relevant MAPK signaling pathway (p38MAPK-1, HIF-1 and HO-1) with coronary lesion characteristics and prognosis of peri-menopausal women [J]. *Lipids Health Dis*, 2016, 15(1): 187.

[12] 何文斌. 雌激素与女性冠心病患者血脂及冠脉病变程度相关性研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2013; 20-21.

[13] 李广红, 侯丽君, 王辉, 等. 绝经后女性 2 型糖尿病患者血清雌激素的临床意义 [J]. 泰山医学院学报, 2015, 36(2): 147-149.

[14] Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, et al. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17 beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(33): 25 781-790.

[15] 曾哲, 许曼燕, 孟令英, 等. 绝经后高血压患者雌激素水平与血压昼夜节律变化及血管内皮功能的相关性 [J]. *中国临床研究*, 2016, 29(8): 1 062-066.

[16] 徐瑞霞, 李莎, 郭远林, 等. 高密度脂蛋白颗粒与稳定型冠心病的相关性研究 [J]. *中国循环杂志*, 2013, 28(5): 352-355.

[17] Rizzo M, Berneis K, Corrado E, et al. The significance of low density lipoproteins size in vascular diseases [J]. *Int Angiol*, 2006, 25(1): 4-9.

[18] Ai M, Otokozawa S, Asztalos BF, et al. Small dense LDL cholesterol and coronary heart disease: results from the Framingham Offspring Study [J]. *Clin Chem*, 2010, 56 (6): 967-976.

(此文编辑 曾学清)

(上接第 795 页)

[8] Williams AJ, Dittmer ID, McArley A, et al. High bicarbonate dialysate in haemodialysis patients: effects on acidosis and nutritional status [J]. *Nephrol Dialysis Transpl*, 1997, 12(12): 2 633-637.

[9] Chen NX, Duan D, O'Neill KD, et al. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21(12): 3 435-442.

[10] Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(23): 1 515-525.

[11] Dawson TF, Boone AN, Senatore A, et al. Gene splicing of an invertebrate beta subunit (LCavbeta) in the N-terminal and HOOK domains and its regulation of LCav1 and LCav2 calcium channels [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e92 941.

[12] Eapen A, Kulkarni R, Ravindran S, et al. Dentin phosphophoryn activates Smad protein signaling through Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II in undifferentiated mesenchymal cells [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(12): 8 585-595.

[13] 李同妙, 徐金升, 冯雨, 等. 维拉帕米通过阻断钙离子内流抑制血管平滑肌细胞钙化研究 [J]. *中国全科医学*, 2015, 18(27): 3 294-299.

(此文编辑 曾学清)