

血管钙化中成骨样细胞来源及其转化的研究进展

严泽振 综述, 沈玲红, 何奔 审校

(上海交通大学医学院附属仁济医院心内科, 上海市 200127)

[关键词] 血管钙化; 血管平滑肌细胞; 钙化血管细胞; 周细胞; 间充质干细胞

[摘要] 血管钙化是一种多因素介导、主动、可逆的调节过程, 涉及多种细胞因子及信号通路。血管钙化的本质是多种血管细胞成分向成骨样细胞表型转化, 最终导致管壁增厚、管腔狭窄和血管硬化重塑。目前研究表明, 血管平滑肌细胞、钙化血管细胞、周细胞以及血管壁内的间充质干细胞都具有向成骨样细胞表型转化的潜能。成骨样细胞的来源及其转化和促血管钙化机制已成为这一领域的重大研究课题。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

Research progress of the origin of osteoblast-like cells and phenotypic transition in vascular calcification

YAN Ze-Zhen, SHEN Ling-Hong, HE Ben

(Department of Cardiology, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China)

[KEY WORDS] Vascular calcification; Vascular smooth muscle cells; Calcifying vascular cells; Pericytes; Mesenchymal stem cells

[ABSTRACT] Vascular calcification is a multi-factor mediated, reversible and active regulation process. It involves a large number of cytokines and signaling pathways. The essence of vascular calcification is an osteoblastic phenotypic shift in some vascular cell types, resulting in vascular wall thickening, lumen stenosis and vascular remodeling. Recent studies have showed that several kinds of vascular cells including vascular smooth muscle cells, calcifying vascular cells, pericytes and mesenchymal stem cells in vascular walls have the potential to differentiate into osteoblast-like phenotype. Therefore, it is important to study the origin of the osteoblast-like cells and the modulation of phenotypic transition related to the vascular calcification.

血管钙化常见于高血压、糖尿病、动脉粥样硬化、慢性肾病以及衰老等慢性病或老年病, 是磷酸钙结晶以羟磷灰石的形式在心血管组织中的异位沉积。最近认为血管钙化是一种类似于骨和软骨生理性矿化的、主动的、可逆的、多种细胞因子介导的调节过程。研究显示, 在钙化的血管壁有成骨细胞、软骨细胞表型的存在, 血管钙化是成骨样细胞在原位发生的一个主动骨形成过程^[1]。关于该类细胞的起源, 除了目前最受认可的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 表型的转化, 钙化血管细胞 (calcifying vascular cell, CVC)、周细胞 (pericyte, PC) 和血管壁内的间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 都具有向成骨样细胞表型转

化的潜能。一旦骨软骨表型细胞出现, 钙化就可在细胞外基质中进行。现将血管钙化中成骨样细胞的来源及其转化的研究现状作一综述。

1 VSMC

VSMC 表型转换在血管钙化中发挥重要作用。基础状态呈收缩表型的 VSMC 受到损伤或诱导时可去分化或者转化为增殖合成表型。在动脉粥样硬化病变进展为纤维钙化斑块时, VSMC 发生迁移增殖, 粗面内质网增加, 产生大量的细胞外基质, 同时可表达某些成骨分化的标记物, 如骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、核结合因

[收稿日期] 2017-02-17

[修回日期] 2017-05-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81370399 和 91539106)

[作者简介] 严泽振, 住院医师, 心内科在读博士, 主要从事心血管疾病相关研究, E-mail 为 jimmy8040@sjtu.edu.cn。通讯作者沈玲红, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病临床及基础相关研究, E-mail 为 rjshenlinghong@126.com。

子 α 亚单位 1 (core-binding factor- α 1, Cbfa-1)、成骨特异性转录因子 Osterix 和 msh 同源异型盒基因 2 (msh homeobox-2, MSX-2)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 以及骨钙素 (osteocalcin, OCN) 等^[2]。伴随着成骨样细胞的转化, 收缩型 VSMC 的特有标记 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和平滑肌 22 α (smooth muscle 22 α , SM22 α) 则出现下调。体外实验也已证实, VSMC 可分别在高磷、高糖、氧化应激、炎症因子、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、25-羟化胆固醇以及氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 等条件刺激下转化为具有合成和分泌功能的成骨样细胞表型^[3-4]。Sage 等^[5]发现高磷培养基培养小鼠 VSMC 24 h 显著诱导 BMP-2 和 OPN 的表达, 7 天后 BMP-2 的表达更显著, 同时伴有 Osterix 表达增加。现在认为血管钙化起始于 VSMC 向成骨样细胞转化时释放的基质囊泡 (matrix vesicle, MV)。MV 是一种细胞外 100 ~ 700 nm 大小的膜包裹结构, 富含多种磷脂和蛋白, 具有富集钙离子和磷酸盐形成羟基磷灰石晶体的作用。MV 释放进入胞外基质后, 与胶原蛋白连接, 继而在胞外环境的调节下不断生长形成矿化结节。VSMC 表型转化过程复杂, 机制尚未完全阐明, 现有证据表明其受多条信号转导通路的调节, 包括丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 通路、PI3K/AKT 通路以及 cAMP/PKA 通路等。此外, 有学者近期报道 TLR4/NF- κ B 信号通路在调节 ox-LDL 诱导的 VSMC 成骨转化过程中发挥重要作用^[3]。

最近研究表明细胞凋亡、自噬和衰老均可能参与 VSMC 钙化。VSMC 来源的凋亡小体类似于 MV, 具有浓缩钙质使之成为磷灰石晶体钙的成核结构而促进血管钙化。TNF 样凋亡弱诱导剂 (TNF-like weak inducer of apoptosis, TWEAK) 及其受体 Fn14 通过经典和非经典的 NF- κ B 途径加速高磷诱导的人 VSMC 成骨样细胞转化^[6]。而 Lee 等^[7]使用 IL-24 通过 Wnt/ β -catenin 途径抑制细胞凋亡显著减少 β -甘油磷酸诱导的 VSMC 钙化。适度增强自噬可以抑制 VSMC 钙化。Dai 等^[8]发现高磷培养基诱导 VSMC 发生钙化的同时可以诱导自噬, 伴有自噬体标志物 LC3 II 增加。该研究显示自噬抑制剂-甲基腺嘌呤或自噬蛋白 5 基因的敲除使 VSMC ALP 表达上升, MV 产生增加; 而自噬诱导剂丙戊酸能明显改善钙化情况。由于肌动蛋白细胞骨架参与成骨样细胞 MV 的释放, 尽管缺乏自噬对细胞骨架影响的

直接证据, 自噬抑制剂可能通过调节细胞骨架促进 ALP 加载和 MV 释放, 从而加重血管钙化^[9]。此外, 衰老的 VSMC 表现出一种成骨样细胞表型, 通过对衰老的 VSMC 进行微阵列分析得出基因调节的差别与血管钙化有关, 这些基因包括 MGP、BMP-2、OPG 和 OPN 等。Wang 等^[10]最近报道一种血管细胞外基质蛋白—软骨寡聚基质蛋白能延缓 VSMC 衰老, 可能在防止血管钙化方面有潜在的作用。

2 CVC

CVC 主要位于血管中膜和内膜, 具有成骨样细胞特点: 即质膜上表达 ALP, 分泌 I 型胶原、OPN、OCN 和骨连接素 (osteonectin, ON)。有研究显示 CVC 可能具有类似骨髓间充质细胞的多分化潜能, 可向软骨、平滑肌和基质细胞转化^[11]。目前多数学者认为 CVC 是 VSMC 亚群, 占 VSMC 数量的 20% ~ 30%。与普通 VSMC 不同的是, 不需要高磷、高脂及氧化应激等外界条件刺激, 体外培养 CVC 可自发形成矿盐沉积和结节。这些钙化结节与骨组织有很多共性, 与动脉粥样硬化斑块和主动脉瓣膜结节也具有形态学及组织学上的类似性。同时这些钙化结节形成的点状或直径约 500 μ m 隆起的空间分布受 TGF- β 和 25-羟化胆固醇的影响, 在缺乏聚集素 ApoJ 或者存在 forskolin 情况下结节模式会破坏^[12]。基于以上特点, CVC 成为血管钙化机制研究的常用细胞模型。

高磷、高脂、过氧化氢、血管紧张素 II 或 BMP-2 等条件刺激可以促使 CVC 向成骨样细胞转化, 而骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)、基质 Gla 蛋白 (matrix Gla protein, MGP)、骨形态发生蛋白 7 (bone morphogenetic protein-7, BMP-7) 等则可抑制上述表型转化^[13]。研究发现胰岛素样生长因子 I (insulin-like growth factor-I, IGF-I) 可通过 MAPK 和 PI3K 通路抑制 CVC 的成骨样细胞分化, 降低 ALP 表达, 并减少钙质沉积^[14]。氯化镧可以阻断过氧化氢诱导的 CVC 成骨转化作用。Ting 等^[15]报道激活胆汁酸受体 (farnesoid X receptor, FXR) 可以阻止牛 CVC 的矿质沉积, 而激活肝 X 受体 (liver X receptor, LXR) 或者腺病毒 VP16-LXR 转染使其过表达, 则可加重 CVC 的矿质沉积。同时发现硬脂酸较其他脂肪酸更易导致 CVC 的钙化。

3 PC

PC 是位于血管壁的一种星形多能细胞。既往

认为 PC 主要分布于全身毛细血管和微血管的管壁,近来发现 PC 也分布于大血管的内膜下层,包绕内皮细胞,形成不同的接触关系,在调节血流、免疫防御、维持血管稳定等多方面起重要作用^[16]。PC 作为一种原始前期细胞,在不同的条件下可分化为成骨细胞、巨噬细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、软骨细胞和 VSMC 等^[17]。PC 分子标记物繁多,常见有 CD146、PDGFR- β 、RGS-5、NG2、CD13、 α -SMA 等,但特异性不强,如 CD146、PDGFR- β 、 α -SMA 可分别依次表达于内皮细胞、成纤维细胞和收缩型 VSMC^[18]。此外,PC 分子标记物可随组织定位及分化方向而改变,如分布于微动脉和毛细血管的 PC 表达 NG2,而分布于微静脉的 PC 则不表达 NG2^[19]。静止期 PC 表达 3G5,而受 ox-LDL 激活的 PC 3G5 表达下降,2A7 表达上升,提示 PC 表型转化^[18]。因此,鉴别 PC 需要联合运用包括多重标记、高分辨率激光共聚焦显微镜等在内的多种方法。关于 PC 的来源及分化至今仍存在诸多争议,有的认为 PC 为 SMVC 的一种特殊类型,也有的因为其超微结构与 MSC 类似而认为其与 MSC 存在关联,但多数学者认为,PC 起源于中胚层,是一群成分复杂、具有组织特异性的多能干细胞^[20]。

PC 在一定条件下分化为成骨细胞,分泌 I 型胶原、OPN、MGP 和 OCN 等,形成大量钙化结节。在裸鼠,注入扩散盒的 PC 形成了包括骨、软骨、矿化软骨、纤维软骨等在内的多种骨骼组织。在动脉粥样硬化病灶内该类细胞的激活可能是动脉壁骨祖细胞的一个来源。Kirton 等^[21]研究表明地塞米松能够下调钙化抑制分子并且加速微血管 PC 的成骨分化。在动脉纤维钙化斑块中,摄取大量脂质的 PC 体积增大,并丢失细胞黏附分子 Connexin 43,从而破坏内膜下细胞连接网络。与此同时,ox-LDL 刺激 PC 高表达 T-钙黏蛋白,干扰胞内正常信号通路,如激活 ERK1/2 酪氨酸激酶以及 NF- κ B 核转移,并通过 Wnt/ β -catenin 途径阻断 PC 向脂肪细胞分化,而促使其向软骨样细胞分化,引起细胞外黏多糖积聚;TGF- β 可以增强上述作用效果^[22]。Davaine 等^[23]研究 43 例人股动脉钙化标本,发现伴有骨样化生的 28 例标本中 CD146⁺ 和 NG2⁺ 的 PC 明显增加,且伴有 OPG 表达的升高,而 VSMC、内皮细胞和巨噬细胞无改变,体外实验认为 OPG/RANKL/RANK 途径介导 PC 向成骨样细胞分化,并通过抑制 CD14⁺ 细胞向破骨细胞样细胞分化而促使钙化加重。

4 血管壁 MSC

MSC 首先于 1974 年由 Friedenstein 等在骨髓组织中分离得到。目前明确在骨髓、脂肪、胎盘、脉管系统、脑组织等多种组织中存在 MSC。不同组织来源的 MSC 有着相似的行为学表现,能够在特定的条件下分化为骨、软骨、脂肪、平滑肌等组织。目前发现血管壁 MSC 主要有 Sca-1、CD133、CD34、Flt-1、KDR、c-kit、CD45、CD14、Notch-1、PDGFR- β 等分子标记物,但特异性不强^[24]。血管 MSC 多数处于静止状态,当局部受损或者发生病变时,可被迅速激活并招募至病灶,参与血管损伤修复或者斑块形成、血管钙化等病理过程,但具体分子机制尚不明确^[25]。TGF- β 、胶原基质蛋白以及整联蛋白等可促使血管 MSC 向 VSMC 分化^[26]。最新研究显示活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)可能在调节血管 MSC 的自我更新和分化中发挥重要作用。激活的血管 MSC ROS 表达较静止时下降。磷脂酶 a2g7 (phospholipase A2 group 7, Pla2g7) 通过易化内源性 ROS 的产生而调节血管 MSC 的分化。实验提示,阻断 Pla2g7 使 ROS 产生减少,将促使 MSC 向合成型 VSMC 分化^[27]。

近年来血管 MSC 与血管钙化的相关研究日益受到重视。有学者发现,血管外膜是 MSC 的“储备池”,且在滋养血管附近聚集着更多的 MSC,可能与滋养血管为 MSC 提供营养和生长因子有关^[28-29]。值得注意的是,出现在 ApoE^{-/-} 和 LDLR^{-/-} 高脂血症小鼠主动脉外膜的 Sca-1⁺ 细胞群可向成骨样细胞分化。研究表明,BMP-2 可诱导血管 MSC 成骨分化,形成的结节类似于钙化粥样斑块,且稳定性易受 ox-LDL 影响^[30]。Kramann 等^[31] 最新发现位于小鼠血管外膜的 MSC 的标记物 Gli1。Gli1⁺ 细胞同时表达 CD34、Sca-1 和 PDGFR- β ,在血管损伤时移位至内膜和中膜,并分化为成骨样细胞介导血管钙化的发生;而敲除 Gli1 基因能显著降低 ApoE^{-/-} 慢性肾功能衰竭小鼠的血管钙化水平。随后进一步对尸检获得的人体主动脉标本研究发现,尿毒症患者 Gli1⁺ 细胞主要位于血管的钙化中层病灶内,而非尿毒症患者的 Gli1⁺ 细胞则主要位于动脉外膜,提示 Gli1⁺ 细胞可从外膜移位至中膜参与血管钙化的发生^[32]。为了观察微环境对血管 MSC 成骨能力的影响,Leszczynska 等^[33] 分离 ApoE^{-/-} 动脉硬化小鼠和 C57BL/6 野生型小鼠的血管 MSC 进行培养,经过胶原黏多糖的预处理后,分别注入两组小鼠的皮下,发现来源于动脉硬化小鼠的 MSC 在两组小鼠皮下

均形成骨样组织,但在前者形成更多骨样组织,提示体内钙化微环境将促使 MSC 分化为成骨软骨细胞。来源于野生型小鼠的 MSC,如无成骨培养基预处理,注入两组小鼠皮下,均无新生骨形成。另外发现炎症因子 IL-6 可通过 RANKL/RANK 信号通路促使 MSC 向成骨软骨细胞分化。

综上所述,血管细胞成分向成骨样细胞表型转化是血管钙化的关键,涉及氧化应激、代谢异常、信号通路等多种复杂的病理生理过程。近来有研究显示骨髓来源的 MSC 也可能具备成骨分化潜能^[34-35]。成骨样细胞来源的多样性,给转化机制相关研究以及血管钙化临床干预带来困难。然而,目前除了 VSMC,其他血管细胞成分所知不多,特别是 PC 和 MSC 的生物学特性、两者的关系,以及如何分离纯化扩增更有特异性的 PC 和 MSC 等一系列问题,仍有待深入研究。研究并阐明血管钙化的细胞表型转化机制,不仅对血管生物学的发展具有重要的理论意义,而且为临床预防和干预血管钙化提供可能的靶点,具有潜在的指导价值。

[参考文献]

- [1] Fukagawa M, Kazama JJ. The making of a bone in blood vessels: from the soft shell to the hard bone [J]. *Kidney Int*, 2007, 72(5): 533-534.
- [2] Liu J, Xiao X, Shen Y, et al. MicroRNA-32 promotes calcification in vascular smooth muscle cells: Implications as a novel marker for coronary artery calcification [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174138.
- [3] Song Y, Hou M, Li Z, et al. TLR4/NF- κ B/ceramide signaling contributes to ox-LDL-induced calcification of human vascular smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 794: 45-51.
- [4] Raghuraman G, Hsiung J, Zuniga MC, et al. Eotaxin augments calcification in vascular smooth muscle cells [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(3): 647-654.
- [5] Sage AP, Lu J, Tintut Y, et al. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro [J]. *Kidney Int*, 2011, 79(4): 414-422.
- [6] Hénaut L, Sanz AB, Martin-Sanchez D, et al. TWEAK favors phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells through canonical and non-canonical activation of NF- κ B [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2305.
- [7] Lee KM, Kang HA, Park M, et al. Interleukin-24 attenuates β -glycerophosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells by inhibiting apoptosis, the expression of calcification and osteoblastic markers, and the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 428(1): 50-55.
- [8] 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): 1 042-051.
- [9] Mostowy S, Cossart P. Autophagy and the cytoskeleton: new links revealed by intracellular pathogens [J]. *Autophagy*, 2011, 7(7): 780-782.
- [10] Wang M, Fu Y, Gao C, et al. Cartilage oligomeric matrix protein prevents vascular aging and vascular smooth muscle cells senescence [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(2): 1 006-013.
- [11] Hruska KA. Vascular smooth muscle cells in the pathogenesis of vascular calcification [J]. *Circ Res*, 2009, 104(6): 710-711.
- [12] Sun C, Liang C, Ren Y, et al. Advanced glycation end products depress function of endothelial progenitor cells via p38 and ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(1): 42-49.
- [13] Kang YH, Jin JS, Yi DW, et al. Bone morphogenetic protein-7 inhibits vascular calcification induced by high vitamin D in mice [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2010, 221(4): 299-307.
- [14] Radcliff K, Tang TB, Lim J, et al. Insulin-like growth factor-I regulates proliferation and osteoblastic differentiation of calcifying vascular cells via extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways [J]. *Circ Res*, 2005, 96(4): 398-400.
- [15] Ting TC, Miyazaki-Anzai S, Masuda M, et al. Increased lipogenesis and stearate accelerate vascular calcification in calcifying vascular cells [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 23 938-949.
- [16] Ivanova EA, Orekhov AN. Cellular model of atherosclerosis based on pluripotent vascular wall pericytes [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 7321404.
- [17] Avolio E, Rodriguez-Arabaolaza I, Spencer HL, et al. Expansion and characterization of neonatal cardiac pericytes provides a novel cellular option for tissue engineering in congenital heart disease [J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(6): e002043.
- [18] Gökçınar-Yageci B, Uçkan-çetinkaya D, Çelebi-Saltik B. Pericytes: properties, function and applications in tissue engineering [J]. *Stem Cell Rev*, 2015, 11(4): 549-559.
- [19] Crisan M, Chen CW, Corselli M, et al. Perivascular multipotent progenitor cells in human organs [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1176: 118-123.
- [20] Ferland-McCollough D, Slater S, Richard J, et al. Pericytes, an overlooked player in vascular pathobiology [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 171: 30-42.

- [21] Kirton JP, Wilkinson FL, Canfield AE, et al. Dexamethasone downregulates calcification-inhibitor molecules and accelerates osteogenic differentiation of vascular pericytes: implications for vascular calcification[J]. *Circ Res*, 2006, 98(10): 1 264-272.
- [22] Kirton JP, Crofts NJ, George SJ, et al. Wnt/beta-catenin signaling stimulates chondrogenic and inhibits adipogenic differentiation of pericytes: potential relevance to vascular disease[J]. *Circ Res*, 2007, 101(6): 581-589.
- [23] Davaine JM, Quillard T, Chatelais M, et al. Bone like arterial calcification in femoral atherosclerotic lesions: prevalence and role of osteoprotegerin and pericytes[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2016, 51(2): 259-267.
- [24] Orlandi A. The contribution of resident vascular stem cells to arterial pathology[J]. *Int J Stem Cells*, 2015, 8(1): 9-17.
- [25] Leach DF, Nagarkatti M, Nagarkatti P, et al. Functional states of resident vascular stem cells and vascular remodeling[J]. *Front Biol (Beijing)*, 2015, 10(5): 387-397.
- [26] Chen Y, Wong MM, Campagnolo P, et al. Adventitial stem cells in vein grafts display multilineage potential that contributes to neointimal formation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(8): 1 844-851.
- [27] Song H, Wang H, Wu W, et al. Inhibitory role of reactive oxygen species in the differentiation of multipotent vascular stem cells into vascular smooth muscle cells in rats: a novel aspect of traditional culture of rat aortic smooth muscle cells[J]. *Cell Tissue Res*, 2015, 362(1): 97-113.
- [28] Majesky MW, Dong XR, Hoglund V, et al. The adventitia: a progenitor cell niche for the vessel wall. *Cells*[J]. *Cells Tissues Organs*, 2012, 195(1-2): 73-81.
- [29] Kawabe J, Hasebe N. Role of the vasa vasorum and vascular resident stem cells in atherosclerosis[J]. *BioMed Res Int*, 2014, 2014: 701571.
- [30] Li R, Mittelstein D, Lee J, et al. A dynamic model of calcific nodule destabilization in response to monocyte- and oxidized lipid-induced matrix metalloproteinases[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 302(4): C658-665.
- [31] Kramann R, Schneider RK, DiRocco DP, et al. Perivascular Gli1⁺ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(1): 51-66.
- [32] Kramann R, Goettsch C, Wongboonsin J, et al. Adventitial MSC-like cells are progenitors of vascular smooth muscle cells and drive vascular calcification in chronic kidney disease[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(5): 628-642.
- [33] Leszczynska A, O'Doherty A, Farrell E, et al. Differentiation of vascular stem cells contributes to ectopic calcification of atherosclerotic plaque[J]. *Stem Cells*, 2016, 34(4): 913-923.
- [34] Wang W, Li C, Pang L, et al. Mesenchymal stem cells recruited by active TGFbeta contribute to osteogenic vascular calcification[J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(12): 1 392-404.
- [35] Murakami J, Ishii M, Suehiro F, et al. Vascular endothelial growth factor-C induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through the ERK and RUNX2 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(3): 710-718.

(此文编辑 文玉珊)