

## 血清 BMP-2、BMP-4 检测在慢性肾脏病大鼠 主动脉钙化中的意义

魏晓, 侯静, 吴蔚桦, 刘琦, 李莹, 龚财判, 李丽, 欧三桃

(西南医科大学附属医院肾病内科, 四川省泸州市 646000)

[关键词] 慢性肾脏病; 血管钙化; 骨形态发生蛋白 2; 骨形态发生蛋白 4

[摘要] **目的** 建立慢性肾脏病(CKD)大鼠主动脉钙化模型,探讨血清骨形态发生蛋白 2(BMP-2)、骨形态发生蛋白 4(BMP-4)与主动脉钙化程度的相关性。**方法** 55 只 SD 大鼠随机分为对照组(20 只)和 CKD 组(35 只,由于预实验中 CKD 组大鼠后期存在死亡现象,为保证实验过程每个时间的实验样本量充足,因此 CKD 组样本量较对照组多),分别于第 2、4、6、8 周收集血液、尿液、主动脉、肾脏;肾脏 HE 染色评估肾脏病理改变;茜素红染色法、钙含量测定评估主动脉钙化程度;ELISA 测定大鼠血清 BMP-2、BMP-4 水平;免疫组织化学检测主动脉 BMP-2、BMP-4 蛋白表达。**结果** 与对照组各时间点相比,CKD 组大鼠 24 h 尿蛋白定量、血清尿素氮、肌酐、胱抑素 C 水平明显增加( $P<0.05$ )。肾脏 HE 染色显示,自第 2 周起,肾小管出现扩张,小管内棕黄色物质沉积,随时间进展,逐渐出现间质纤维化,肾小球部分萎缩,血管减少,炎性细胞浸润。茜素红染色随时间进展,第 8 周出现大量橘红色颗粒物沉积伴钙结节形成。CKD 组钙含量明显增加且与血清 BMP-2 ( $r=0.929, P<0.01$ ) 及 BMP-4 ( $r=0.702, P<0.01$ ) 明显正相关。同时,自模型成功建立第 4 周,主动脉 BMP-2、BMP-4 蛋白表达即明显增加。**结论** 血清 BMP-2、BMP-4 表达增加可作为 CKD 血管钙化的血清标志物。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Significance of serum BMP-2 and BMP-4 detection in aortic calcification in rats with chronic kidney disease

WEI Xiao, HOU Jing, WU Weihua, LIU Qi, LI Ying, GONG Caipan, LI Li, OU Santao

(Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[KEY WORDS] chronic kidney disease; vascular calcification; bone morphogenetic protein-2; bone morphogenetic protein-4

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association between serum bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) levels and the severity of vascular calcification in CKD rat model. **Methods** Fifty-five SD rats were randomly divided into control group ( $n=20$ ) and CKD group ( $n=35$ ). The rats were sacrificed at 2, 4, 6, 8 week respectively. The kidney and aortic pathologies were analyzed. Blood biochemical indicators, serum BMP-2 and BMP-4 levels, and aortic calcium content were determined. The expression levels of BMP-2, BMP-4 were examined by immunohistochemistry. **Results** Compared with control group, the CKD rats exhibited a significantly increase in 24 h urinary protein, serum urea nitrogen, creatinine and cystatin C ( $P<0.05$ ). Kidney HE staining showed that renal tubular expansion began to emerge since the second week, accompanying with brown yellow substance deposition, interstitial fibrosis, glomerular partial atrophy, and inflammatory cells infiltration. Alizarin red staining showed massive granular deposition and formation of calcified nodules in aorta at the 8th week. The aortic calcium content was significantly increased, which was positively correlated with serum BMP-2 ( $r=0.929, P<0.01$ ) and serum BMP-4 ( $r=0.702, P<0.01$ ) levels in CKD rats. The expression of BMP-2 and BMP-4 in aorta increased significantly after successful establishment of the model at the fourth week. **Conclusion** Elevated serum BMP-2 and BMP-4 levels may serve as serum markers for CKD vascular calcification.

[收稿日期] 2017-11-10

[修回日期] 2018-02-12

[作者简介] 魏晓,现工作于四川省成都市温江区人民医院,E-mail 为 757061143@qq.com。通信作者欧三桃,医学博士,教授,E-mail 为 ousantao@163.com。

血管钙化是慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 患者常见并发症<sup>[1]</sup>,也是 CKD 患者住院率和死亡率增加的重要原因,但目前临床上仍缺乏有效的早期防治措施<sup>[2]</sup>。目前,血管钙化被认为是血管平滑肌细胞正常收缩表型在多种危险因素作用下向成骨样细胞表型转分化的过程,多种信号通路及机制参与其中<sup>[3-4]</sup>。然而,骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 在该病理过程的发生发展中具有重要作用。BMP-2 和 BMP-4 为 BMP 同一亚组,均属于转化生长因子  $\beta$  超家族成员,两者不仅在成骨、骨折修复、胚胎形成、发育等多方面具有重要作用<sup>[5]</sup>,同时,在血管钙化过程中的表达也明显增加<sup>[6-8]</sup>。影像学研究发现血管钙化的 CKD 患者体内检测到血清 BMP-2、BMP-4 的水平较正常人群明显升高<sup>[9-11]</sup>,然而,血管钙化发生的较早阶段 BMP-2、BMP-4 与血管钙化的相关性并不清楚。因此,本研究通过建立 CKD 血管钙化动物模型,检测 CKD 主动脉钙化发生的不同时间点血清中 BMP-2、BMP-4 水平及与血管钙化的相关性,为临床寻找评估血管钙化的标志物。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

SPF 级雄性 SD 大鼠 55 只,体重 190~270 g,7~8 周龄,购自西南医科大学实验动物中心。动物使用许可证:SYXK(川)2013-065。腺嘌呤 (Sigma 公司);1.8%高磷饲料(北京科澳协力);2%茜素红溶液(北京索莱宝科技);钙含量测定试剂盒 (Sigma-Aldrich 公司);大鼠 BMP-2 ELISA 试剂盒、大鼠 BMP-4 ELISA 试剂盒 (R&D 公司);BMP-2 抗体、BMP-4 多克隆抗体、MGP 多克隆抗体 (Abcam 公司);BMPRIA 多克隆抗体 (Sigma 公司)。

### 1.2 CKD 血管钙化大鼠模型的制备及分组

55 只大鼠适应性喂养 10 天后,随机分为对照组 ( $n=20$  只) 和 CKD 组 ( $n=35$  只)。腺嘌呤溶于蒸馏水,制成混悬液,实验第 1~4 周,CKD 组每日定时给予 2.5%腺嘌呤混悬液 220 mg/(kg·d)灌胃,联合使用 1.8%高磷饲料喂养,第 5~8 周给予腺嘌呤混悬液隔日灌胃;对照组给予生理盐水 (10 mL/kg) 灌胃,普通大鼠饲料喂养。所有大鼠自由进食及饮水,光照时间明暗各半,室温 18℃~25℃。

### 1.3 标本采集及指标检测

实验第 2、4、6、8 周末,收集尿液检测 24 h 尿蛋白定量;各组随机选取大鼠,2%戊巴比妥钠腹腔注

射麻醉,腹主动脉采血,测定血尿素氮、肌酐、胱抑素 C、血钙、血磷;分离肾脏,置于 10%中性福尔马林液中固定,制成石蜡切片,肾脏 HE 染色,观察肾小球、肾小管、肾间质改变;分离主动脉,冰生理盐水冲洗干净,置于福尔马林液中固定,制备石蜡切片,用于茜素红染色及免疫组织化学检测;另一部分,置于提前加入 1 mL RNA 保护液的无酶 EP 管中,于冰箱 4℃过夜,-20℃冻存,剩余部分,-80℃冰箱保存,用于主动脉钙含量测定。

### 1.4 主动脉茜素红染色

主动脉固定、石蜡包埋、切片(切片厚度约为 4  $\mu\text{m}$ );60℃烤片 20 min,37℃过夜,二甲苯、酒精脱蜡、脱水;蒸馏水浸洗 3 次;加入 2%茜素红-Tris-HCl (pH8.3)溶液室温染色 30 min;蒸馏水浸洗 3~4 次;经酒精、二甲苯脱水、透明;封片,观察。

### 1.5 主动脉钙含量测定

取各组主动脉进行匀浆,留取上清液备用,按照试剂盒操作说明书,分别在空白孔、标准孔、测定孔加入去离子水、标准液、样本各 10  $\mu\text{L}$ ,各孔再分别加入工作液 I 250  $\mu\text{L}$ ,混匀,静置 5 min,酶标仪于波长 610 nm 测定各孔 OD 值。采用 BCA 蛋白定量测定法测定总蛋白浓度。组织中钙含量=(测定 OD 值-空白 OD 值)/(标准 OD 值-空白 OD 值) $\times$ 标准品浓度 $\div$ 待测样本蛋白浓度。

### 1.6 ELISA 测定血清 BMP-2、BMP-4 水平

按照试剂盒说明书进行操作:标准品稀释与加样;温育;配液洗涤;加酶;温育;洗涤;重复 5 次,拍干;显色:各孔先后加入显色剂,振荡混匀,37℃、避光 15 min;终止:各孔加入终止液;测定:450 nm 波长处测定各孔吸光度(OD 值)。根据标准物浓度和 OD 值计算标准曲线方程,再根据样品的 OD 值计算出样品浓度,乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度。

### 1.7 免疫组织化学检测主动脉 BMP-2、BMP-4 的蛋白表达

厚度为 4  $\mu\text{m}$  的石蜡切片,脱蜡至水,修复抗原;3% $\text{H}_2\text{O}_2$  灭活内源性过氧化物酶 10 min;山羊血清封闭非特异性抗原;滴加一抗,4℃过夜,PBS 液作阴性对照;次日 PBS 冲洗 3 次;滴加二抗,室温 20 min;PBS 冲洗 3 次;滴加辣根酶标记的链霉卵白素,室温 10 min;滴加显色液 (DAB);自来水冲洗;苏木精复染,脱水、透明;封片,显微镜下观察。

### 1.8 统计学分析

运用 SPSS 24.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间比较采用独立样本  $t$  检验;多样本均数比较采用单因素方差分析;两变量间的相关性采用

Pearson 相关分析。P<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠不同时间点 24 h 尿蛋白、尿素氮、肌酐、胱抑素 C 水平

与对照组各时间点相比,CKD 组大鼠 24 h 尿蛋白定量、血清尿素氮、肌酐及胱抑素 C 水平明显增加(P<0.01;图 1)。

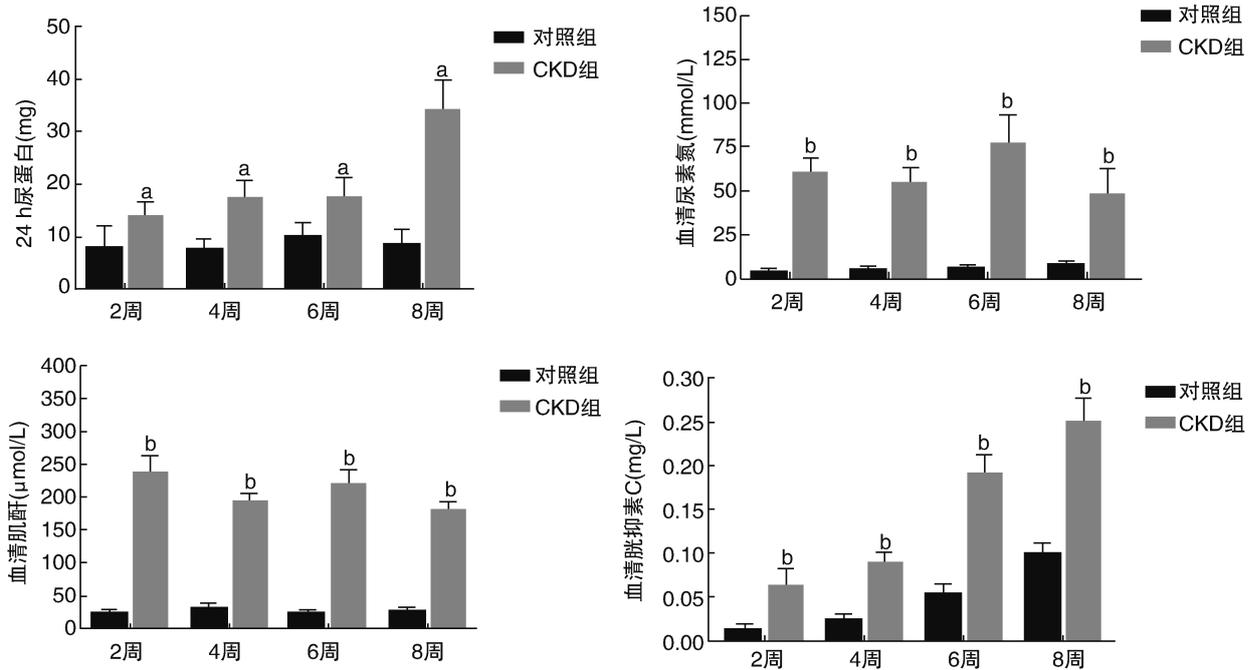


图 1. 各组大鼠不同时间点 24 h 尿蛋白、尿素氮、肌酐及胱抑素 C 水平 a 为 P<0.05,b 为 P<0.01,与对照组同一时间点比较。

Figure 1. The levels of 24 h urine protein, urea nitrogen, creatinine and cystatin C at different time points in each group

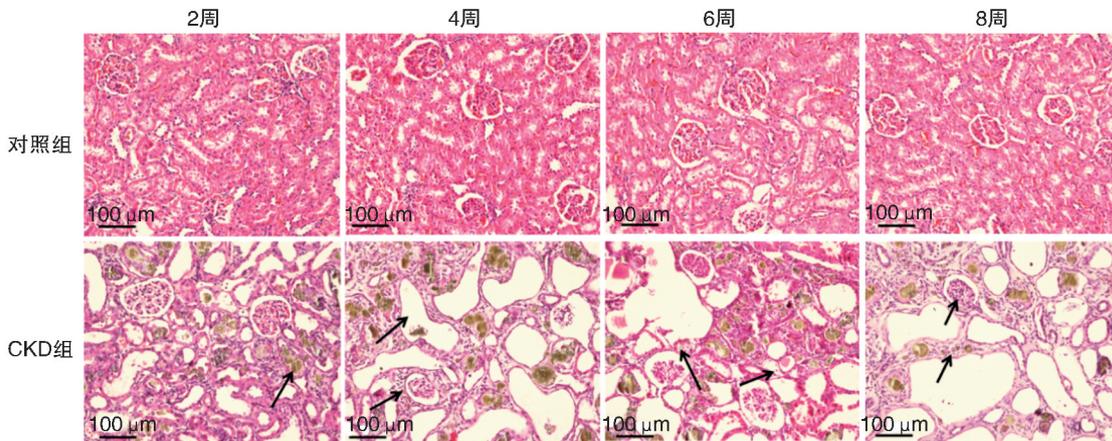


图 2. 各组大鼠不同时间点肾脏 HE 染色

Figure 2. Kidney HE staining at different time points in rats of each group

### 2.2 肾脏 HE 染色情况

对照组肾脏结构清楚,皮、髓质分界清晰,肾小球、肾小管及肾间质形态、结构均无明显异常。CKD 组肾组织自第 2 周末可见肾小管扩张,以近端小管为主,伴棕黄色物质沉积;随时间进展,第 4 周末近端、远端肾小管、肾小球囊腔扩张,棕黄色物质沉积增多,第 6 周、第 8 周末,肾脏结构紊乱,小管上皮细胞变性坏死,间质纤维化,血管减少,炎性细胞浸润,肾小球部分萎缩(图 2)。

### 2.3 主动脉茜素红染色情况

对照组大鼠各个时间点主动脉形态均正常,未

见橘红色物质沉积。CKD 组主动脉自第 4 周开始逐渐出现中膜平滑肌橘红色颗粒物沉积,伴平滑肌

纤维断裂,钙化结节处沉积更明显,且随时间进展,第6周、8周橘红色颗粒物沉积逐渐加重(图3)。

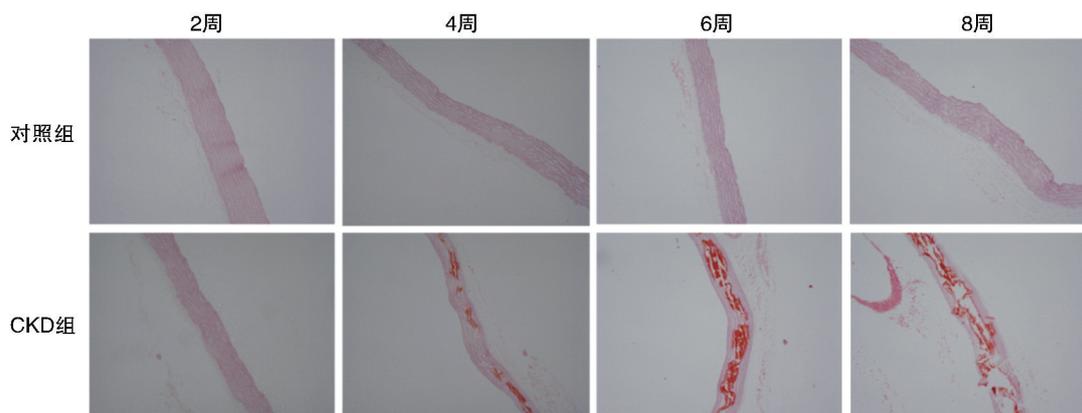


图3. 主动脉茜素红染色(100×)

Figure 3. Alizarin red staining of aorta(100×)

#### 2.4 主动脉钙含量

与对照组各时间点比较,CKD组大鼠主动脉钙含量均明显增加( $P<0.01$ ;表1)。

表1. 大鼠各时间点主动脉钙含量( $\bar{x}\pm s$ , mmol/g protein)

Table 1. The levels of calcium content of rat aorta at different time points( $\bar{x}\pm s$ , mmol/g protein)

时间	对照组( $n=5$ )	CKD组( $n=6$ )
2周	1.603±0.387	2.293±0.389
4周	2.134±0.229	2.699±0.247 <sup>a</sup>
6周	1.846±0.493	6.105±0.653 <sup>a</sup>
8周	2.099±0.146	5.406±0.389 <sup>a</sup>

a为 $P<0.01$ ,与对照组同一时间点比较。

#### 2.5 血清 BMP-2 和 BMP-4 水平

对照组大鼠血清 BMP-2、BMP-4 水平在各时间点无明显差异;自第4周起 CKD 组大鼠血清 BMP-2、BMP-4 水平明显增加,与对照组各时间点比较差异具有统计学意义( $P<0.05$ ;表2)。

#### 2.6 主动脉 BMP-2 和 BMP-4 的表达

对照组大鼠各时间点主动脉 BMP-2 在血管中膜平滑肌层几乎无表达,BMP-4 存在少量表达,随时间进展,表达无明显变化。CKD 组自第4周大鼠主动脉血管平滑肌层 BMP-2 的表达开始明显增加,胞质呈棕黄色,且随时间进展表达量逐渐增加,与对照组比较差异具有统计学差异( $P<0.05$ );而 BMP-4 在第4周表达量明显增加,第6周、第8周表达量较第4周有降低,但与对照组同时间点比较仍然明显增加( $P<0.05$ ;图4)。

#### 2.7 相关性分析

Pearson 相关分析显示,血清 BMP-2、BMP-4 水

平与大鼠主动脉钙含量均呈明显正相关( $r=0.929$ ,  $P<0.01$ ;  $r=0.702$ ,  $P<0.01$ )。

表2. 大鼠血清 BMP-2、BMP-4 水平( $\bar{x}\pm s$ ,  $\mu\text{g/L}$ )

Table 2. Serum levels of BMP-2 and BMP-4 in rats( $\bar{x}\pm s$ ,  $\mu\text{g/L}$ )

分组	时间	BMP-2	BMP-4
对照组 ( $n=5$ )	2周	3.37±0.27	0.41±0.049
	4周	3.41±0.34	0.44±0.049
	6周	3.51±0.31	0.43±0.032
	8周	3.57±0.10	0.42±0.018
CKD组 ( $n=6$ )	2周	4.56±0.38	0.50±0.033
	4周	6.11±0.42 <sup>b</sup>	0.79±0.045 <sup>a</sup>
	6周	6.96±0.18 <sup>b</sup>	0.66±0.029 <sup>a</sup>
	8周	7.77±0.44 <sup>b</sup>	0.58±0.027 <sup>a</sup>

a为 $P<0.05$ ,b为 $P<0.01$ ,与对照组各时间点比较。

### 3 讨论

血管钙化是 CKD 患者心血管疾病发病率和死亡率增加的重要危险因素<sup>[12-13]</sup>。然而,对于血管钙化的临床评估手段,包括 CT、X 线、心血管超声、脉搏波传导速度等,但均存在一定的局限性和各自的优缺点,尤其在早期检测中存在欠缺。因此,寻找早期便捷的检测方法,提前预知钙化的风险,对于血管钙化的防治具有重要意义。

CKD 患者在炎症、氧化应激、尿毒症毒素、高磷、甲状旁腺功能亢进、高钙等多种危险因素作用下,可能通过多种信号通路参与血管钙化的发生发展<sup>[14-16]</sup>。研究发现,血管钙化部位成骨调节蛋白 BMP-2、BMP-4 表达是增加的,因此,BMP-2、BMP-4

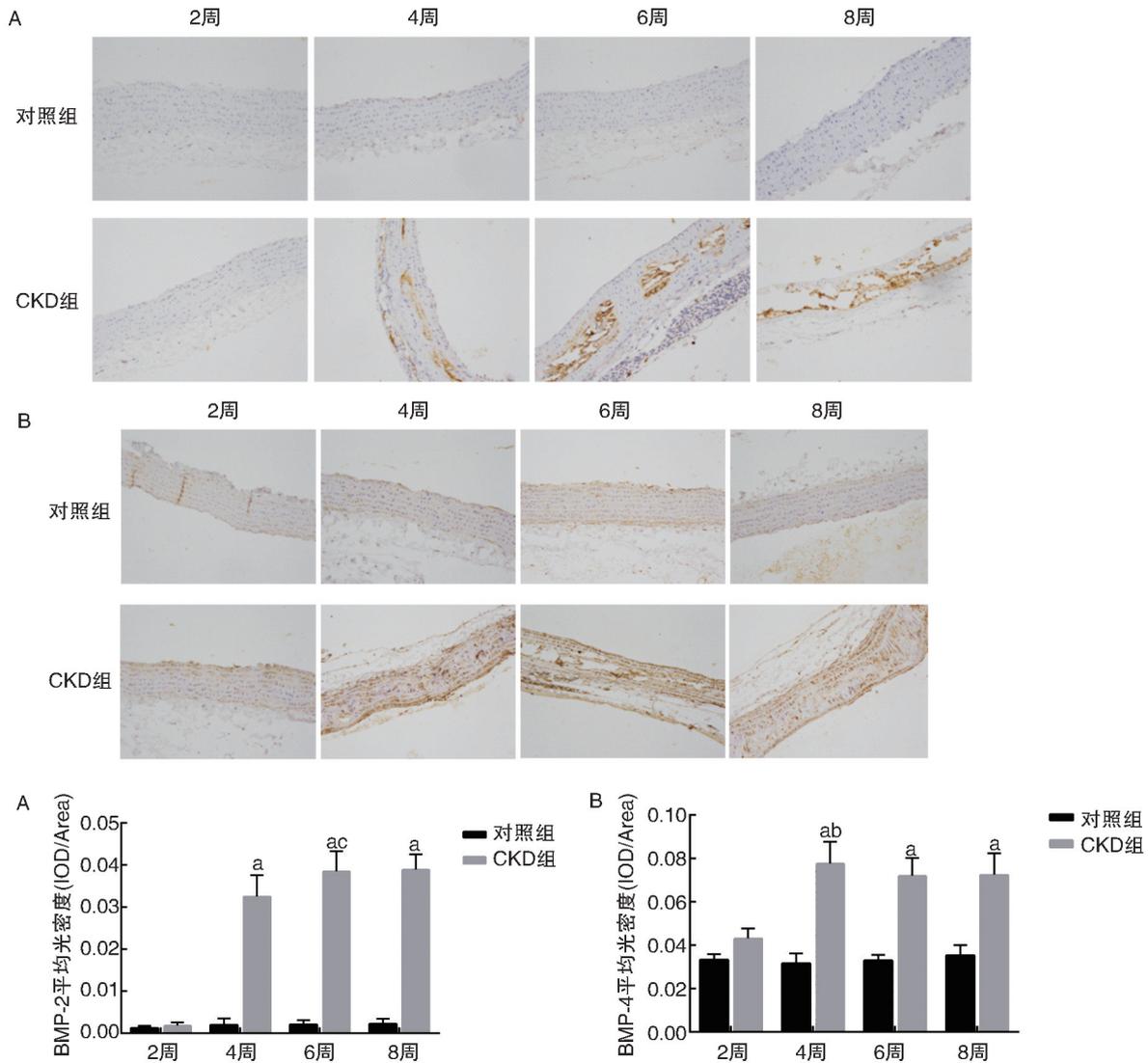


图 4. 不同时间点 BMP-2、BMP-4 的蛋白表达(200×) A 为 BMP-2 的表达,B 为 BMP-4 的表达;a 为  $P < 0.05$ ,与对照组各时间点比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 CKD 组第 2 周比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 CKD 组第 4 周比较。

Figure 4. Protein expression of BMP-2 and BMP-4 at different time points(200×)

可能参与血管钙化的发生发展过程<sup>[17-20]</sup>。然而,血管钙化早期是否亦存在血清 BMP-2、BMP-4 的表达增加,以及是否可作为血清标志物用于临床评估血管钙化的发生尚未完全清楚。因此,本研究通过检测 CKD 大鼠血管钙化早期血清 BMP-2、BMP-4 水平,旨在探究其预测早期血管钙化的意义。

本研究中,通过检测尿素氮、肌酐、胱抑素 C、24 h 尿蛋白等指标,结合肾脏 HE 染色证实 CKD 动物模型建立成功;同时,CKD 大鼠主动脉茜素红染色显示,中膜平滑肌层出现橘红色颗粒物沉积;钙含量较对照组明显增加,主动脉 BMP-2、BMP-4 蛋白等成骨标志物的表达明显增加;从多方面证实血管钙化的存在,表明 CKD 血管钙化模型制备成功。

本研究发现,CKD 组大鼠主动脉发生钙化的同

时,血清 BMP-2、BMP-4 水平自第 4 周开始各时间点均较对照组明显增加;且相关性分析显示,血清 BMP-2、BMP-4 水平与主动脉钙含量均呈正相关( $r = 0.929, P < 0.05; r = 0.702, P < 0.05$ )。此外,CKD 大鼠血管钙化过程中,血清 BMP-2、BMP-4 水平与主动脉 BMP-2 和 BMP-4 蛋白表达水平一致。Stahls 等<sup>[10]</sup>也发现,CKD 合并冠状动脉钙化的患者,其血清 BMP-4 的含量明显增高,且与冠状动脉钙化呈正相关。王冬梅等<sup>[9]</sup>也发现,CKD 5 期患者血清 BMP-2 含量与颈动脉钙化呈正相关。Rong 等<sup>[21]</sup>发现,CKD 患者血清 BMP-2 较对照组明显升高,可能通过 wnt/ $\beta$ -catenin 参与血管钙化的发生,与本研究结果一致。因此猜想,血清 BMP-2、BMP-4 升高的可能机制包括 CKD 患者,尤其是终末期 CKD 患者,

体内存在微炎症状态、氧化应激、炎症因子、钙磷代谢紊乱以及某些钙化促进因子的表达增加,钙化抑制因子的降低,均可能通过相关信号通路单独或共同刺激 BMP-2、BMP-4 的表达增加,参与血管钙化的发生;同时 BMP-2、BMP-4 亦可能作为钙化的启动子,促进成骨基质蛋白及相关因子的表达增加,参与血管钙化的发生发展,但具体机制需作进一步研究。

同时,本研究还发现,CKD 组主动脉 BMP-2 mRNA 和蛋白的表达量随时间延长逐渐增加;而 BMP-4 mRNA 和蛋白的表达量在第 4 周开始明显增加,第 6 周、第 8 周的表达量较第 4 周稍降低。这可能是由于血管钙化过程中 BMP-2、BMP-4 的拮抗剂 MGP 的表达量随时间增加,其抑制血管钙化的作用逐渐增强,导致 BMP-2、BMP-4 的表达量受到一定的抑制。同时结合血清 BMP-2、BMP-4 结果,我们推测,可能是由于 BMP-2 的成骨活性较强,而 BMP-4 的成骨活性相对较弱,从而出现 BMP-4 的表达受到抑制更明显;或可能由于 MGP 与 BMP-4 结合力更强,从而受到抑制更明显,但其具体机制需更深入的研究。

综上,血管钙化是 CKD 患者常见的临床并发症,是心血管事件发病率和死亡率增加的重要因素,而目前仍缺乏有效的诊治手段,因此针对血管钙化的早期诊断显得尤为重要。而 CKD 血管钙化发生过程中,血清 BMP-2、BMP-4 水平均明显增高,且与主动脉钙化程度明显相关,可能可作为临床上评估血管钙化的标志物,具有重要的临床价值。

#### [参考文献]

- [1] Benz K, Varga I, Neureiter D, et al. Vascular inflammation and media calcification are already present in early stages of chronic kidney disease[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2017, 27: 57-67.
- [2] Eckardt KU, Coresh J, Devuyst O, et al. Evolving importance of kidney disease: From subspecialty to global health burden[J]. *Lancet*, 2013, 382(9887): 158-169.
- [3] Arnaud J, Zaoui P, Carlier M C, et al. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 438: 401-414.
- [4] Leopold JA. Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2015, 25(4): 267-274.
- [5] Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction[J]. *J Biochem*, 2010, 147(1): 35-51.
- [6] Nigwekar SU, Jiramongkolchai P, Wunderer F, et al. Increased bone morphogenetic protein signaling in the cutaneous vasculature of patients with calciphylaxis[J]. *Am J Nephrol*, 2017, 46(5): 429-438.
- [7] Chen TC, Lin CT, Chien SJ, et al. Regulation of calcification in human aortic smooth muscle cells infected with high-glucose-treated

- porphyromonas gingivalis[J]. *J Cell Physiol*, 2017, DOI: 10.1002/jcp.26268.
- [8] Malhotra R, Burke MF, Martyn T, et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signal transduction prevents the medial vascular calcification associated with matrix Gla protein deficiency[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0117098.
- [9] 王冬梅, 王科, 方媛, 等. 慢性肾脏病 5 期患者血清 BMP-2 及 BMP-7 与颈动脉钙化的相关性研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(5): 762-764.
- [10] Stahls PF 3rd, Lightell DJ Jr, Moss SC, et al. Elevated serum bone morphogenetic protein 4 in patients with chronic kidney disease and coronary artery disease[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2013, 6(2): 232-238.
- [11] Buyukterzi Z, Can U, Alpaydin S, et al. Enhanced serum levels of matrix Gla protein and bone morphogenetic protein in acute coronary syndrome patients[J]. *J Clin Lab Anal*, 2017, DOI: 10.1002/jcla.22278.
- [12] Liabeuf S, Okazaki H, Desjardins L, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease: are biomarkers useful for probing the pathobiology and the health risks of this process in the clinical scenario[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29(7): 1275-1284.
- [13] 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.
- [14] Schlieper G, Schurgers L, Brandenburg V, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease: an update[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2016, 31(1): 31-39.
- [15] Agharazii M, St-Louis R, Gautier-Bastien A, et al. Inflammatory cytokines and reactive oxygen species as mediators of chronic kidney disease-related vascular calcification[J]. *Am J Hypertens*, 2015, 28(6): 746-755.
- [16] Torremadé Pascual N, Bozic Stanojevic M, Panizo García S, et al. Vascular calcification induce by chronic kidney disease is mediated by an increase of 1 $\alpha$ -hydroxylase expression in vascular smooth muscle cells[J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31(10): 1865-1876.
- [17] Zhao YG, Meng FX, Li BW, et al. Gelatinases promote calcification of vascular smooth muscle cells by up-regulating bone morphogenetic protein-2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470(2): 287-293.
- [18] Shi Y, Lu W, Hou Y, et al. Fibroblast growth factor 21 ameliorates vascular calcification by inhibiting osteogenic transition in vitamin D3 plus nicotine-treated rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(4): 2448-2455.
- [19] 覃春美, 吴蔚桦, 刘建, 等. 骨形态生成蛋白 2 信号通路介导的肾动脉钙化对糖尿病肾病进展的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2016, 32(3): 173-179.
- [20] Davenport C, Harper E, Forde H, et al. RANKL promotes osteoblastic activity in vascular smooth muscle cells by upregulating endothelial BMP-2 release[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 77: 171-180.
- [21] Rong S, Zhao X, Jin X, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease is induced by bone morphogenetic protein-2 via a mechanism involving the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(6): 2049-2060.

(此文编辑 文玉珊)