

补肾活血方通过调节 BMP-2/Runx2/Osterix 信号通路抑制慢性肾衰竭大鼠血管钙化的实验研究

柳诗意¹ 张 宁¹ 孟祥飞¹ 刘世巍¹ 朱宏伟² 李兰芳³ 张春玲⁴

摘要 **目的** 观察补肾活血方对慢性肾衰竭大鼠血管钙化(vascular calcification, VC)的 BMP-2/Runx2/Osterix 信号通路作用,探讨其可能的作用机制。**方法** 将 30 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组与中药组,每组 10 只。模型组与中药组大鼠实验第 1~4 周给予 250 mg/kg 腺嘌呤混悬液灌胃及含 1.8% 高磷饲料每日 1 次喂养,第 5~8 周腺嘌呤改为隔日灌胃。中药组同时按 55 g/(kg·d) 剂量给予补肾活血方灌胃治疗,每日 1 次。正常组灌胃等量生理盐水。共给药 8 周。HE 染色观察肾组织变化,茜素红染色观察主动脉钙化结节情况,腹主动脉取血检测血清钙(Ca)、磷(P)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、全段甲状旁腺激素(iPTH),Western blot 法检测骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein, BMP-2)及其下游调节因子即核心结合因子(Runt related transcription factor, Runx2)、成骨细胞特异性转录因子(Osterix)蛋白的表达。**结果** HE 染色观察提示:与正常组比较,模型组肾小球结构紊乱,肾小管扩张积水,腔内有炎性细胞的浸润,肾小管内棕褐色结晶沉积,肾脏间质纤维化,肾脏血管明显减少;与模型组比较,中药组正常肾小球数目增多,肾小管扩张程度降低,炎性细胞数量下降,腺嘌呤结晶减少。茜素红染色观察提示:与正常组比较,模型组主动脉出现钙化结节,广泛红色颗粒物沉着;与模型组比较,中药组钙化结节减少。与正常组比较,模型组大鼠血 P、Scr、BUN、iPTH 水平明显升高,血 Ca 水平明显下降, BMP-2、Runx2、Osterix 蛋白表达亦增高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,中药组血清 P、Scr、BUN、iPTH 水平明显下降,血 Ca 水平明显升高, BMP-2、Runx2、Osterix 蛋白表达均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 补肾活血方能够改善慢性肾衰竭大鼠肾功能和钙磷代谢,改善肾脏组织学结果,下调 BMP-2/Runx2/Osterix 信号通路在慢性肾衰竭 VC 中的表达,这可能是其抑制慢性肾衰竭 VC 的作用机制之一。

关键词 慢性肾衰竭;补肾活血方;血管钙化;骨形态发生蛋白-2;核心结合因子;成骨细胞特异性转录因子

Bushen Huoxue Recipe Inhibited Vascular Calcification in Chronic Renal Failure Rats by Regulating BMP-2/Runx2/Osterix Signal Pathway LIU Shi-yi¹, ZHANG Ning¹, MENG Xiang-fei¹, LIU Shi-wei¹, ZHU Hong-wei², LI Lan-fang³, and ZHANG Chun-ling⁴ 1 Department of Nephropathy, Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100102); 2 Department of Pathology, Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100102); 3 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700); 4 Department of Clinics, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Bushen Huoxue Recipe (BHR) on inhibiting vascular calcification (VC) in chronic renal failure (CRF) rats by regulating BMP-2/Runx2/Osterix signal pathway, and to explore its possible mechanism. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into the normal group, the model group, and the BHR group, 10 in each group. Rats in the model group and the BHR group were administered with 250 mg/kg adenine suspension by gastrogavage and fed with 1.8%

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81273747);中国中医科学院博士研究生创新人才培养基金资助项目(No. CX201506)

作者单位:1.中国中医科学院望京医院肾病内分泌科(北京 100102);2.中国中医科学院望京医院病理科(北京 100102);3.中国中医科学院中药研究所(北京 100700);4.中国中医科学院西苑医院门诊部(北京 100091)

通讯作者:张 宁, Tel:010-84739029, E-mail:znice3927@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.03.0327

high phosphorus forage, once per day in the first 4 weeks, and then gastric administration of adenine suspension was changed to once per two days in the following 5–8 weeks. Rats in the BHR group were administered with BHR at the daily dose of 55 g/kg by gastrogavage in the first 8 weeks, once per day. Equal volume of normal saline was given to rats in the normal group by gastrogavage for 8 weeks. Histological changes in renal tissue and aorta VC were observed by HE staining and alizarin red staining respectively. Levels of calcium (Ca), phosphorus (P), serum creatinine (Cr), blood urea nitrogen (BUN), and intact parathyroid hormone (iPTH) in serum were detected. Protein expression levels of bone morphogenetic protein (BMP-2), Runt related transcription factor (Runx2), and Osterix were detected by Western blot. Results HE staining showed that compared with the normal group, disordered glomerular structure, tubular ectasia and dropsy, intracavitary inflammatory cell infiltration, dark brown crystal deposition in kidney tubules, renal interstitial fibrosis, and decreased number of renal blood vessels in the model group. Compared with the model group, normal glomerular numbers increased more, reduced degree of tubular ectasia, decreased number of inflammatory cells, and reduced adenine crystal deposition in the BHR group. Alizarin red staining showed that compared with the normal group, calcified nodes could be found in the model group, with extensive deposition of red particle in aorta. Compared with the model group, calcified nodes were reduced in the BHR group. Compared with normal group, serum levels of P, SCr, BUN, and iPTH significantly increased, serum Ca level significantly decreased, protein expressions of BMP-2, Runx2, Osterix also increased in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, serum levels of P, SCr, BUN, and iPTH levels significantly decreased, serum Ca level significantly increased, protein expressions of BMP-2, Runx2, Osterix also decreased in the BHD group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion BHD could improve renal function, Ca-P metabolism, and renal histological changes in CHF rats, down-regulate the expression level of BMP-2/Runx2/Osterix signal pathway in vascular calcification of CRF, which might be one of the mechanisms for inhibiting VC in CHF.

KEYWORDS chronic renal failure; vascular calcification; bone morphogenetic protein-2; Runt related transcription factor2; Osterix

血管钙化(vascular calcification, VC)是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)特别是终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)患者严重并发症之一,是导致其发生心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)而致死的主要原因^[1]。其典型表现为发生在血管壁、心肌、动脉瓣的钙磷沉积^[1]。CKD 患者由于后期骨和矿物质代谢的失衡,常伴有加速的血管中膜和内膜钙化,且在透析患者上述钙化加速进展^[2]。有研究表明, ESRD 患者 VC 的出现及其程度可以独立预测 CVD 及其病死率^[3]。因此,探讨 CKD 患者的 VC 发病机制对于降低其 CVD 事件的发病率及病死率极其重要。相关研究表明, VC 是一个由能够获得、分化成骨样细胞表型并合成矿化调节蛋白(如骨钙蛋白、骨桥蛋白等)的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)所介导的主动调节过程,与成骨的矿化过程相似^[4]。正常骨骼形成所必需的骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)及其下游调节因子即核心结合因子 2(Runt related transcription factor2, Runx2)、成骨细胞特异性转录因子(Osterix)

在其中发挥重要作用。补肾活血方为中国中医科学院望京医院肾病科张宁主任医师临床经验用方,前期研究发现,其能显著改善 CKD 患者骨代谢异常及长期维持性血液透析肾性骨病患者的中医证候^[5,6];体内与体外实验也发现,该方能够改善慢性肾衰竭大鼠的钙磷代谢及骨代谢,促进人甲状旁腺激素(human parathyroid hormone, hPTH)干预下小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖及分化^[7]。本实验从 BMP-2/Runx2/Osterix 信号通路入手,探讨补肾活血方治疗慢性肾衰竭后期 VC 的作用机制。

材料与方法

1 动物 30 只健康 SD 雄性大鼠, SPF 级, 体重(220 ± 10) g, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心, 许可证号: SCXK-(军)-2007-004。饲养于中国中医科学院基础理论研究所动物实验室。

2 药物 补肾活血方:熟地黄 10 g 补骨脂 10 g 生黄芪 15 g 丹参 10 g 当归 15 g 酒制大黄 5 g 仙灵脾 10 g, 水煎、过滤、浓缩为 3 g/mL 的生药。

3 试剂与仪器 腺嘌呤(BR 沃凯),购自国药集团化学试剂有限公司,批号:20140317。高磷饲料:含磷 1.8%,定制自北京科澳协力饲料有限公司。兔抗鼠 BMP-2、Runx2、Osterix 均购美国 Abcom 公司,批号分别为:(ab6285、ab76956、ab187158);山羊抗兔二抗购自北京康为世纪生物科技有限公司,批号为:cw0103。GDS-8000 型凝胶成像分析仪,美国 UVP 公司。茜素红染料购自北京索莱宝科技有限公司,规格:25 g/瓶,批号:G8550,用 Tris-HCl 将其配制成 0.1%茜素红-Tris-HCl(pH 8.3)溶液。

4 分组及模型制备方法 30 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组及中药组,每组 10 只。慢性肾衰竭 VC 模型制备方法,参照参考文献[8,9]并加以改良:实验第 1~4 周,模型组大鼠按 250 mg/kg 剂量每日 1 次给予腺嘌呤混悬液灌胃及含 1.8%高磷饲料喂养;第 5~8 周腺嘌呤改为隔日灌胃。在造模过程中中药组同时按 55 g/(kg·d)剂量给予补肾活血方灌胃治疗,每日 1 次。大鼠中药给药剂量按照成人-大鼠体表面积换算(1:6.25)后,按临床成人用量的 4 倍给药。正常组灌胃等量生理盐水。共给药 8 周。造模给药过程中正常组大鼠未出现死亡,模型组 2 只大鼠因灌胃中操作不当,误插入气管死亡。中药组死亡 2 只,由灌胃手法操作不当造成。动物死亡率 13.3%。

5 检测指标及方法

5.1 肾脏组织学病理检测 剥离肾组织,用于肾脏组织学病理检测。观察各组肾组织外观,随后常规石蜡切片,切片厚度约为 3 μm ,HE 染色,观察肾小球、肾小管及肾间质的改变。

5.2 主动脉茜素红法钙盐染色 每组随机选取 5 只大鼠,用于主动脉茜素红染色。剥离胸主动脉,经固定、石蜡包埋、切片(切片厚度约为 3 μm)、脱蜡后,石蜡切片脱蜡至水洗,蒸馏水洗数次;加入 1%茜素红-Tris-HCl(pH 8.3)液染色 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min;蒸馏水冲洗;常规脱水透明,中性树胶封固。显微镜下观察钙化结节形成情况。

5.3 生化学指标检测 所有大鼠均行腹主动脉取血 10 mL,全自动生化仪测定血钙(Ca)、血磷(P)、血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、血清全段甲状旁腺激素(iPTH)水平,由中国中医科学院望京医院检验科完成。

5.4 Western blot 法检测 BMP-2、Runx2、Osterix 蛋白表达 每组随机选取 3 只大鼠主动脉用于 Western blot 检测。称取主动脉组织 50 mg 加入 500 μL 裂解液中。匀浆器匀浆 13 000 r/s 匀浆 3 次

每次 10 s。冰上孵育 20 min,离心机 10 000 r/min,20 min。取上清液分装备用。总蛋白定量:按说明书配制标准品,稀释液用生理盐水。根据样品及标准品数量配置 BCA 工作液,每孔加 200 μL 。将样品及标准品分别加入到 96 孔板内,混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。冷却至室温,酶标仪测定光密度(optical density,OD)值。绘制标准曲线,计算样品中的蛋白浓度。制备上样样品:将 SDS-PAGE 上样缓冲液与蛋白样品按照 1:4 的比例混匀。沸水煮 5 min。冷却后,离心 3 000 r/min,30 min。电泳:制备 12%浓度的分离胶。调整上样孔,将样品加入样品槽内。电泳,浓缩胶 90 V 分离胶 120 V。转膜:小心打开玻璃板,除去浓缩胶,剥离下分离胶。将剪好的滤纸及 NC 膜按从负极到正极(三层滤纸-样品胶-NC 膜-三层滤纸)的顺序放好。插上电极,300 mA 30 min。丽春红染色观察条带。抗体检测:封闭 1 h,分别加入 BMP-2、Runx2、Osterix 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,TBST 每次 10 min,共 4 次,加入二抗室温 50 min,TBST 每次 10 min,共 6 次;加入 ECL 孵育 1 min;暗室曝光、显影、定影,凝胶图像分析系统观察,扫描胶片,分析目标条带的分子量和精光密度值。

6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 检验,组间两两比较用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 动物一般情况观察 正常组大鼠精神良好,活动正常,毛色光泽。模型组大鼠毛色枯槁、散乱竖起,脱毛,懒动,排尿明显增多,体重逐渐下降,精神较差。中药组大鼠毛发色泽及精神状态较模型组好。

2 3 组大鼠肾脏组织病理学结果比较(图 1) 正常组肾脏外观大小适中,颜色褐红,表面光滑。模型组肾脏肥大,颜色苍白,表面凹凸不平。中药组肾脏外观较模型组红润,表面较光滑。光镜下正常组肾小球数目正常,未见纤维化及新月体等病变,肾小管上皮完好,未见变性、坏死及管型,肾间质未见炎症细胞浸润及纤维化。模型组肾小球结构紊乱,肾小管扩张积水,腔内有炎症细胞的浸润,肾小管内棕褐色结晶沉积,肾脏间质纤维化,肾脏血管明显减少。与模型组比较,中药组正常肾小球数目较多,肾小管扩张程度降低,炎症细胞数量下降,腺嘌呤结晶减少。

3 3 组大鼠主动脉病理学结果比较(图 2) 光镜下正常组血管结构正常。模型组经茜素红染色后可

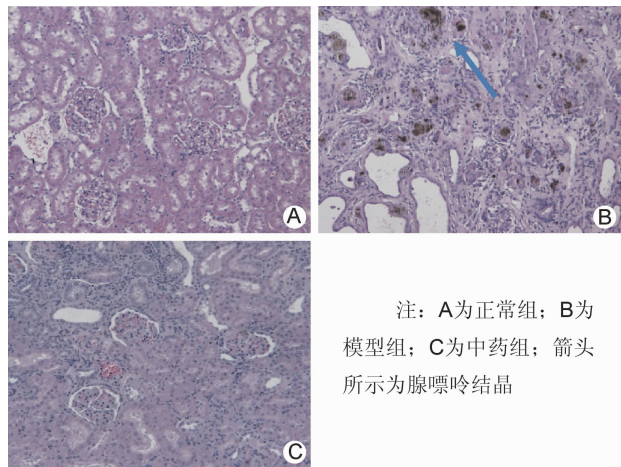


图 1 3 组大鼠肾脏组织病理学结果(HE, ×200)

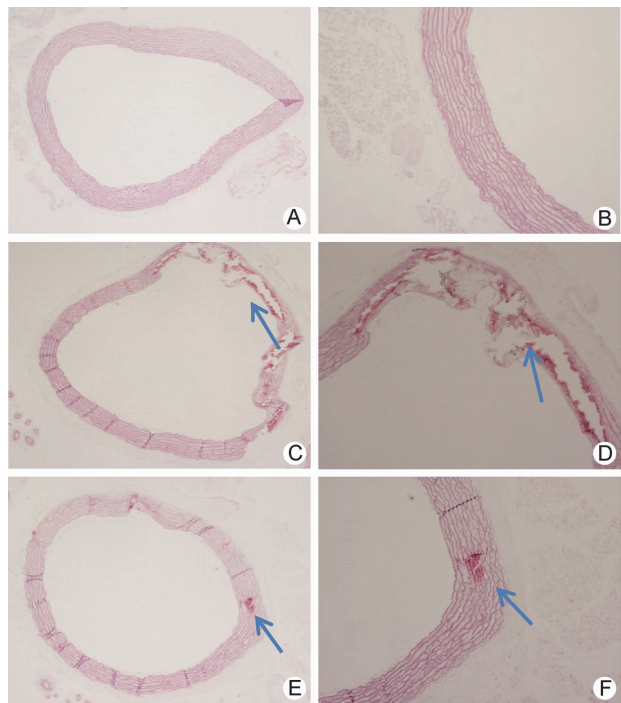


图 2 3 组大鼠主动脉病理学结果比较
(茜素红法钙盐染色)

见动脉中膜明显的钙化结节呈连续性线性分布,为广泛红色颗粒物沉着。中药组钙化结节明显减轻。

4 3 组大鼠生化指标结果比较(表 1) 与正常组比较,模型组大鼠血 P、SCr、BUN、iPTH 水平均明显升高($P < 0.01$),血 Ca 水平明显下降($P < 0.01$)。与模型组比较,中药组血 P、SCr、BUN、iPTH 水平均明显下降,血 Ca 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

5 3 组大鼠 BMP-2、Runx2、Osterix 蛋白表达结果比较(图 3) 与正常组比较,模型组 BMP-2、Runx2、Osterix 蛋白精光密度值相对表达量均增高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,中药组 BMP-2、Runx2、Osterix 蛋白精光密度值相对表达量均有所降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

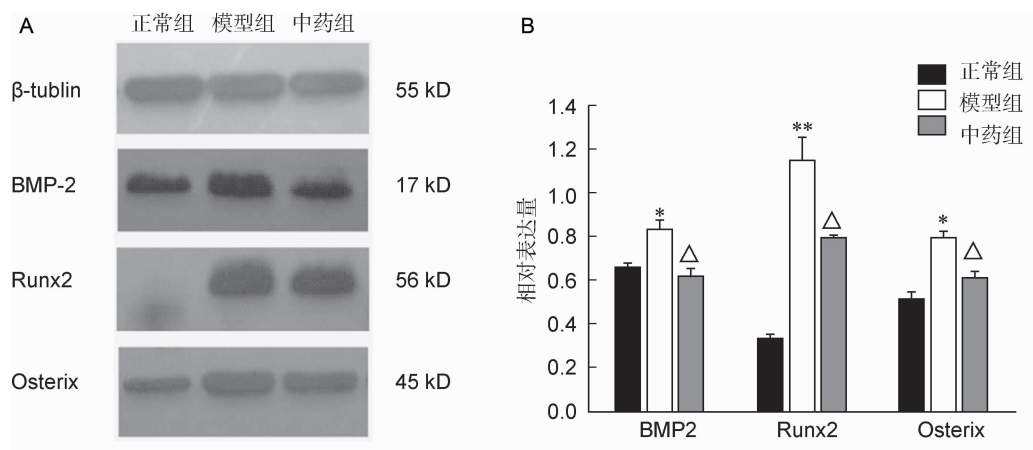
CKD 是严重危害人类健康的常见病,已成为全球公共健康问题。流行病学资料显示,CVD 是 CKD 最常见的严重并发症之一^[3]。其中,广泛发生于 CKD 患者中的 VC,是导致其 CVD 发病率和病死率显著增加的重要原因^[10]。有研究表明,伴有动脉粥样硬化或中膜钙化的 ERSD 患者 5 年存活率低于 50%,而同期无显著动脉钙化的人群 5 年存活率却达 90%^[11]。VC 主要表现为血管局部钙磷沉积的增加、基质囊泡的出现、细胞内碱性磷酸酶活性增加,以及细胞外非胶原基质蛋白如骨形态发生蛋白、骨桥蛋白等成骨样细胞表型的特征^[12],钙化物质呈连续性线性分布,并弥散分布于整条动脉,导致血管顺应性降低,血流动力学异常,最终引起脉压增加,左心室肥大和心肌缺血。

BMP 属于 TGF-β 超家族成员,在异位钙化的形成与发展中发挥了重要作用。其中 BMP-2 是促进骨形成和诱导成骨细胞分化最重要的细胞外信号分子之一,自身具有巨大的启动骨形成的能力^[13]。BMP-2 能够以时间和剂量依赖方式增加磷的摄取而促进钙化^[14]。BMP-2 能够促进 Smads 磷酸化,进而使其由细胞质进入细胞核内,并通过调节各种目的基因如 ALP、Runx2 和骨钙素等基因表达,使 VSMCs 向成骨样细胞表型转化^[14,15]。Runx2 即核心结合因子(Cbfa1),被认为是成骨细胞分化过程中的最早标记

表 1 3 组大鼠生化指标结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P (mmol/L)	Ca (mmol/L)	SCr (μmol/L)	BUN (mmol/L)	iPTH (pg/mL)
正常	10	2.840 ± 0.324	2.400 ± 0.020	30.633 ± 1.656	7.667 ± 0.513	0.720 ± 0.342
模型	8	6.438 ± 1.336 *	1.896 ± 0.355 *	255.500 ± 74.499 *	50.225 ± 9.115 *	29.160 ± 15.310 *
中药	8	3.495 ± 0.558 ^{△△}	2.626 ± 0.158 ^{△△}	97.200 ± 30.309 ^{△△}	25.163 ± 6.709 ^{△△}	17.722 ± 8.601 [△]

注:与正常组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$



注:A 为 3 组大鼠 BMP-2、Runx2、Osterix 蛋白电泳图;B 为 3 组大鼠 BMP-2、Runx2、Osterix 蛋白表达比较;与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图 3 3 组大鼠 BMP-2、Runx2、Osterix 蛋白表达结果比较

物,是成骨细胞分化、骨基质基因表达和随后骨矿化所必须的成骨细胞特异性转录因子,能直接调节骨基质主要成分的表达,包括 I 型胶原、骨钙素和骨桥蛋白^[16]。它的异常表达与 VC 发生和进展关系密切,实验研究常将其作为 VC 早期评价指标。敲除 Runx2 的 VSMCs 可抑制成骨样表型转化和基质矿化^[17,18]。Osterix 是成骨细胞特异性转录因子,在成骨细胞分化过程中受 BMP-2 正性调节,作为 Runx2 的下游基因发挥作用^[19]。

目前中医学对 VC 的研究较少。笔者认为,VC 和 CKD 矿物质代谢异常 (chronic kidney disease-mineral and bone disorder, CKD-MBD) 均为慢性肾功能衰竭的并发症,即慢性肾衰竭患者在骨、矿物质代谢异常的同时发生了 VC,其存在共同的中医学病机特点为脾肾亏虚,瘀血浊毒内蕴。中医学理论认为,慢性肾衰竭属于“关格”范畴,指各种慢性肾脏疾患发展到后期所导致脾肾亏虚、脏腑功能受损,浊邪壅盛,弥漫三焦的病证。其病机特点为本虚标实,虚实夹杂。笔者认为,CKD-MBD 的发病是在关格本虚标实的基础上,由于肾虚精亏,髓海不足,以致骨失所养;另一方面,浊毒弥漫,损伤筋骨、血脉。由于久病必瘀,又有瘀毒互结,闭阻骨络的病机存在,遂成骨痛、骨痿诸症。而关于 VC 在传统中医学理论中并没有专门的论述,但根据其临床表现及疾病转归 (动脉硬化、高血压病、冠状动脉粥样硬化性心脏病等),笔者认为 VC 可归于中医学的“胸痹”、“脉痹”等范畴。其发病机制与 CKD-MBD 有异曲同工处。浊毒弥漫,瘀血阻滞,瘀毒互结,痹阻血脉的病机存在,遂成“胸痹”、“脉痹”诸症。可见在 VC 的病机中同样存在因虚致瘀,因虚生

毒,瘀血浊毒交阻的证候特征。补肾活血方主要由仙灵脾、补骨脂、熟地黄、黄芪、丹参、当归、酒制大黄等组成,其中仙灵脾、补骨脂、熟地黄温润之品填精生髓,阴阳同调,补肾壮骨;丹参、当归养血活血;酒制大黄泄浊排毒又可去瘀生新,合方具有温肾阳、益精血、祛瘀泄浊之功。本实验中发现该方能够显著改善 CKD 中 VC 大鼠的肾功能,其中 SCr、BUN 水平明显下降,且明显改善了慢性肾衰竭后期所出现的高磷、低钙血症及继发性甲状旁腺功能亢进症。肾脏组织病理学发现,补肾活血方使慢性肾衰竭模型大鼠损伤的肾小球数目减少,肾小管扩张程度减轻,炎症细胞浸润减少,间质纤维化程度均有所减轻,提示补肾活血方对于改善慢性肾衰竭肾脏组织病理变化有一定作用。同时,中药组主动脉钙化结节发生程度较模型组明显减轻,提示补肾活血方可以在一定程度上抑制 VC 的进展。同时,BMP-2 蛋白表达下调,从而直接引起其下游蛋白 Runx2、Osterix 表达减弱,继而引起骨基质主要成分的表达下降,使得 VSMCs 向成骨样细胞转化和基质矿化的过程受到抑制,从而延缓了 VC 的进展,这可能为补肾活血方抑制 VC 的机制。

综上所述,补肾活血方能够改善 CKD 后期 VC 大鼠的肾脏功能及病理改变,降低主动脉钙含量,下调 BMP-2/Runx2/Osterix 蛋白信号通路表达,从而发挥抑制 VC 的作用。由于 VC 发病机制复杂,对于补肾活血方抑制 VC 的具体作用机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] Hruska KA. Vascular smooth muscle in the pathogenesis of vascular calcification [J]. Circ Res,

- 2009, 104(6): 710–711.
- [2] Bellasi A, Kooienga L, Block GA, et al. How long is the warranty period for nil or low coronary artery calcium in patients new to hemodialysis [J]. *J Nephrol*, 2009, 22(2): 255–262.
- [3] Blacher J, Guérin AP, Pannier B, et al. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease [J]. *Hypertension*, 2001, 38(4): 938–942.
- [4] Giachelli CM, Speer MY, Li X, et al. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin [J]. *Circ Res*, 2005, 96(7): 717–722.
- [5] 石玥, 张宁, 刘世巍, 等. 补肾活血法治疗肾性骨病 60 例观察 [J]. *北京中医药大学学报*, 2010, 33(11): 782–785.
- [6] 刘世巍, 张宁, 李同侠, 等. 补肾活血法干预长期维持性血液透析肾性骨病患者中医证候的研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2012, 35(11): 786–790.
- [7] 林越, 张宁, 刘世巍, 等. 补肾活血方对 hPTH(1–34) 干预下小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖及分化的影响 [J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2012, 6(11): 3065–3068.
- [8] Tamagaki K, Yuan Q, Ohkawa H, et al. Hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21(3): 651–659.
- [9] 董艳. 肾小球凋亡指数评估腺嘌呤灌胃制备大鼠慢性肾衰竭模型最佳剂量的比较研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2010.
- [10] Kumar S, Bogle R, Banerjee D. Why do young people with chronic kidney disease die early [J]. *World J Nephrol*, 2014, 3(4): 143–155.
- [11] London GM, Guérin AP, Marchais SJ, et al. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(9): 1731–1740.
- [12] Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, et al. Arterial calcification: A review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy [J]. *Med Res Rev*, 2001, 21(4): 274–301.
- [13] Shimizu T, Tanaka T, Iso T, et al. Notch signaling pathway enhances bone morphogenetic protein 2 (BMP2) responsiveness of Msx2 gene to induce osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(21): 19138–19148.
- [14] Li X, Yang HY, Giachelli CM. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 199(2): 271–277.
- [15] Onishi M, Fujita Y, Yoshikawa H, et al. Inhibition of Rac1 promotes BMP-2-induced osteoblastic differentiation [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 27(4): e698.
- [16] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation [J]. *Cell*, 1997, 89(5): 747–754.
- [17] Speer MY, Li X, Hiremath PG, et al. Runx2/Cbfa1, but not loss of myocardin, is required for smooth muscle cell lineage reprogramming toward osteochondrogenesis [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(4): 935–947.
- [18] Tanaka T, Sato H, Doi H, et al. Runx2 represses myocardin-mediated differentiation and facilitates osteogenic conversion of vascular smooth muscle [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(3): 1147–1160.
- [19] Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, et al. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(43): 29119–29125.

(收稿: 2015–08–18 修回: 2015–12–28)