

高龄大鼠血管钙化及血管壁骨桥蛋白、骨钙素表达的研究

刘菊菊, 李书国*, 邓娟娟, 叶明, 张丹, 彭燕, 朱正庭

(三峡大学第一临床医学院 & 宜昌市中心人民医院老年病科, 湖北 宜昌 443003)

【摘要】 目的 研究高龄大鼠血管钙化的发生情况, 以及骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨钙素(osteocalcin, OC)在高龄大鼠动脉血管壁表达的变化。**方法** 选择 20 只 20 月龄的 SD 大鼠为实验组, 20 只 3 月龄的 SD 大鼠为对照组, 取大鼠的主动脉条、心脏和肾组织备检。HE 染色观察血管形态, Von Kossa 染色判断钙盐沉积程度, 免疫组化和蛋白质印迹法(Western-blot)测定血管壁 OPN、OC 的表达情况。**结果** 实验组大鼠血管平滑肌细胞排列紊乱, 中膜层厚度增加, 弹力板断裂, 血管纤维化程度增高; 对照组大鼠血管内膜内皮细胞、血管平滑肌细胞排列整齐, 弹力板完整。实验组大鼠的大动脉和微小动脉内均可见钙盐沉积, 对照组动脉未见钙盐沉积。实验组大鼠血管壁 OPN、OC 的表达较对照组明显上调($P < 0.05$)。**结论** 血管中膜钙化可能是血管老化的病理表现, 血管钙化的形成可能与骨形成相关蛋白 OPN 和 OC 的表达上调有关。

【关键词】 血管钙化; 血管老化; 骨桥蛋白; 骨钙素

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)09-0054-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.09.010

Research on the vascular calcification and the expressions of osteopontin and osteocalcin in the arterial wall of aged rats

LIU Ju-ju, LI Shu-guo*, DENG Juan-juan, YE Ming, ZHANG Dan, PENG Yan, ZHU Zheng-ting

(Department of Geriatrics, The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University & Yichang Central People's Hospital, Yichang, 43003, China)

【Abstract】 Objective This study was designed to investigate the morphology of vascular calcification in aged rats and the expressions of osteopontin and osteocalcin in the arterial wall of old rats. **Methods** 20 20-month-old SD rats were recruited in experimental group and 20 3-month-old SD rats were recruited in control group. Aorta, heart and kidney of the rats were collected for assay. HE staining and Von Kossa staining were used to determine the vascular calcification. The expressions of OPN and OC in vascular wall were tested by Immuno-histochemistry and Western-blot. **Results** In the experimental group, vascular smooth muscle cells are disordered arrangement, thickness of membrane layer is increased, elastic plate fracture and the vascular fibrosis is increased. In the control group, vascular endothelial cells and smooth muscle cells are arranged in neat, elastic plate is complete. In the experimental group, the large artery and small artery were observed the calcium salt deposits. In the control group, arteries were not observed calcium salt deposits. Compared with the control group, the expressions of OPN and OC were significantly increased in the experimental group ($P <$

[作者简介] 刘菊菊(1991-), 女, 硕士研究生, 专业: 内科学。E-mail: 286051889@qq.com。

[通讯作者] 李书国(1969-), 男, 硕士生导师, E-mail: alener508@126.com。

0.05)。 **Conclusions** Vascular medial calcification may be pathological features of vascular aging. Vascular calcification may be related with the up-regulated expression of bone-associated protein OPN and OC.

【Key words】 Vascular calcification; Vascular aging; Osteopontin; Osteocalcin

随着人口老龄化的发展,血管老化的形成机制及血管老化相关疾病的防治正在成为人们研究的热点。血管钙化是动脉粥样硬化、高血压、糖尿病、慢性肾脏病和衰老等病理状态的共同表现^[1]。它的主要特征是动脉壁弹性降低和血流阻滞,最终可导致缺血性心脏病和脑卒中,是心脑血管疾病高发病率和死亡的重要原因之一。目前研究表明血管钙化是一个与骨发育相似的主动的、高度可调的病理生理过程^[2]。研究表明,衰老的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)向成骨样细胞表型转换在年龄相关的血管钙化中起重要作用^[3]。通过对衰老的微阵列分析得出基因调节的差别与血管钙化有关,这些基因包括基质 Gla 蛋白,骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2),骨保护素(osteoprotegerin, OPG),I 型胶原及骨桥蛋白(osteopontin, OPN),骨钙素(osteocalcin, OC)等^[4]。本项研究拟观察自然衰老大鼠血管的钙化情况,通过检测大鼠血管壁 OPN 和 OC 表达,探讨 OPN 和 OC 与大鼠衰老以及钙化的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 月龄健康雄性 SD 大鼠共 20 只,体重 230 ~ 250 g;20 月龄高龄雄性大鼠 20 只,体重 750 ~ 900 g,由三峡大学医学院实验动物中心[SYXK(鄂)2011-0061][SCXK(鄂)2011-0012]提供,符合国家医学动物使用标准[动物许可证号:42010200000381]。饲养条件:温度(24 ± 2)℃,湿度 50% ~ 70%,采用 12 h:12 h 昼夜间断照明;大鼠自由进水,普通饮食,并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂

Von kossa 染色试剂盒(谷歌生物技术有限公司);OPN 多克隆抗体(福州迈新);OC 多克隆抗体(SANTA CRUZ 生物技术公司);SP 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒(福州迈新)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组、标本收集与处理

青年大鼠为对照组,高龄大鼠为实验组。给予普通饲料喂养 2 周后,腹腔注射 10% 水合氯醛(0.3

~ 0.4 mL/100g)麻醉大鼠。无菌条件下剪开胸、腹腔,采用 4% 的多聚甲醛灌注。灌注完成之后小心剥离出完整的主动脉(从主动脉根部至髂总动脉分叉处),并取下大鼠的心脏和肾脏放入 4% 多聚甲醛溶液中备检,常规石蜡包埋;一部分主动脉直接置于 -80℃ 冰箱保存,以供 Western-blot 检测。

1.3.2 标本组织的病理形态学观察

1.3.2.1 苏木精 — 伊红染色(HE 染色)

取出各组石蜡包埋切片,①二甲苯脱蜡和梯度乙醇脱水:二甲苯 I 20 min → 二甲苯 II 15 min → 二甲苯 III 10 min → 无水乙醇 I 5 min → 无水乙醇 II 3 min → 95% 酒精 1 min → 90% 酒精 1 min → 80% 酒精 1 min → 70% 酒精 1 min;②染色:苏木精染核 7 min → 自来水洗 2 min;③分化和漂洗:1% 盐酸酒精 2 ~ 5 s → 自来水洗 5 ~ 7 min;④复染:1% 水溶性伊红 2 ~ 4 min → 自来水洗 1 min;⑤脱水和透明:95% 酒精 1 min → 无水乙醇 I 1 min → 无水乙醇 II 2 min → 二甲苯 II 2 min;⑥封片:切片风干后中性树脂胶封片,显微镜下观察。

1.3.2.2 冯库萨染色(Von Kossa 染色)

首先石蜡切片脱蜡脱水;之后在良好的日光下或紫外灯下用 2% 硝酸银浸染 20 ~ 60 min;随后蒸馏水洗 5 min;然后用 5% 的硫代硫酸钠水溶液处理 2 min;之后用自来水洗 5 min;然后再用 0.1% 核固红染液复染 2 ~ 3 min;之后蒸馏水洗 5 ~ 10 s;最后无水乙醇脱水,二甲苯透明,风干后中性树脂胶封片,显微镜下观察。

1.3.3 标本组织的免疫组织化学染色

取大鼠组织进行石蜡切片后,采用免疫组织化学三步法,OPN 抗体为工作液、OC 抗体采取 1:30 稀释。整个过程按照试剂盒说明书进行。依次对切片进行脱蜡、梯度酒精水化、抗原修复、血清封闭、一抗孵育、二抗标记、DAB 显色、苏木素复染、脱水、透明、干燥、封片等主要步骤。每批免疫组化均设有 PBS 代替的阴性对照。

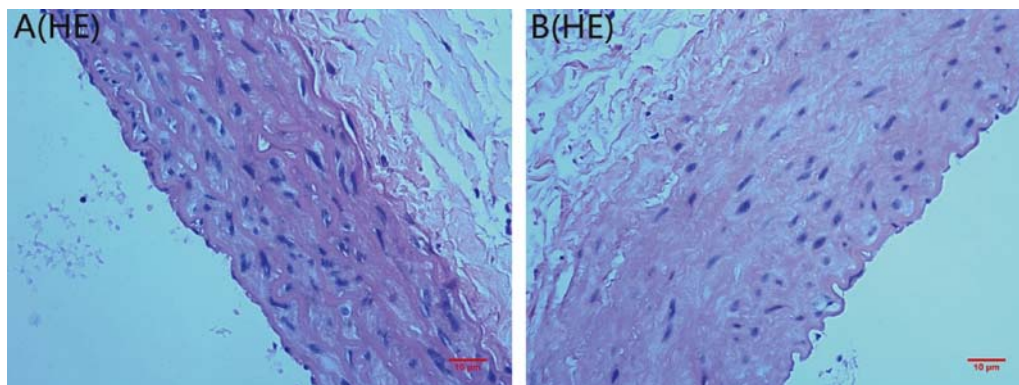
1.3.4 Western-blot

将主动脉剪碎后置于玻璃匀浆器中,每 20 mg 组织加入 150 ~ 250 μL RIPA 裂解液。充分裂解后,按 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定组织总蛋白含量。取适量各组总蛋白样品与 5 × Sample Buffer 混匀,

100℃煮沸 5 min,按蛋白定量 25 μg/孔上样,进行电泳、转膜、丽春红染色、封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAB 显影。胶片风干后经电脑成像系统获取蛋白条带图像,以内参 β-actin 的蛋白条带灰度值作为对照,分析 OPN、OC 表达的相对量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS20.0 软件进行数据处理,采用卡方(χ^2)检验和 Spearman 相关分析作统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



注:(A)对照组;(B)实验组。

图1 各组大鼠主动脉 HE 染色($\times 40$, bar = 10 μm)

Note. (A) control group; (B) experimental group.

Fig.1 HE staining of rat's thoracic aorta

2.2 Von Kossa 染色评估血管钙化

各组大鼠的标本经 Von Kossa 染色后,若有钙盐沉积,则该区域呈黑褐色,背景呈红色。青年组大鼠血管未见明显钙盐沉积,核染为粉红色(如图 2-A1, A2, A3);高龄组大鼠主动脉、冠状动脉和肾脏内的微小动脉均可见大量明显的黑色钙盐沉积(如图 2-B1, B2, B3)。

2.3 各实验组大鼠标本 OPN 免疫组化结果

OPN 可表达于不同动物的不同组织中,在正常的骨组织和肾组织中均有表达,但正常的血管中 OPN 基本不表达或表达甚微,而在钙化的血管中 OPN 的表达则会明显增加,主要位于细胞质或细胞核。本实验免疫组化结果显示,OPN 在青年大鼠的胸主动脉、冠状动脉和肾脏中的小动脉呈弱阳性表达(如图 3-A1, A2, A3);在高龄大鼠的胸主动脉,冠状动脉和肾脏的微小血管中均呈强阳性表达,可见血管壁的中膜和外膜处有大量棕黄色物质沉积(如图 3-B1, B2, B3)。

2.4 各组大鼠标本 OC 免疫组化结果

OC 是由成骨细胞和类似成骨细胞的钙化血管细胞分泌的蛋白。本实验免疫组化结果显示,实验

2 结果

2.1 组织病理形态学观察

HE 染色光镜观察,可见血管的基本结构。对照组血管内皮细胞、血管平滑肌细胞排列整齐,弹力板完整、无断裂(如图 1-A);实验组血管内皮细胞脱落,VSMCs 增殖、排列紊乱、并向内膜迁移,中膜厚度增加,弹力板断裂(如图 1-B)。

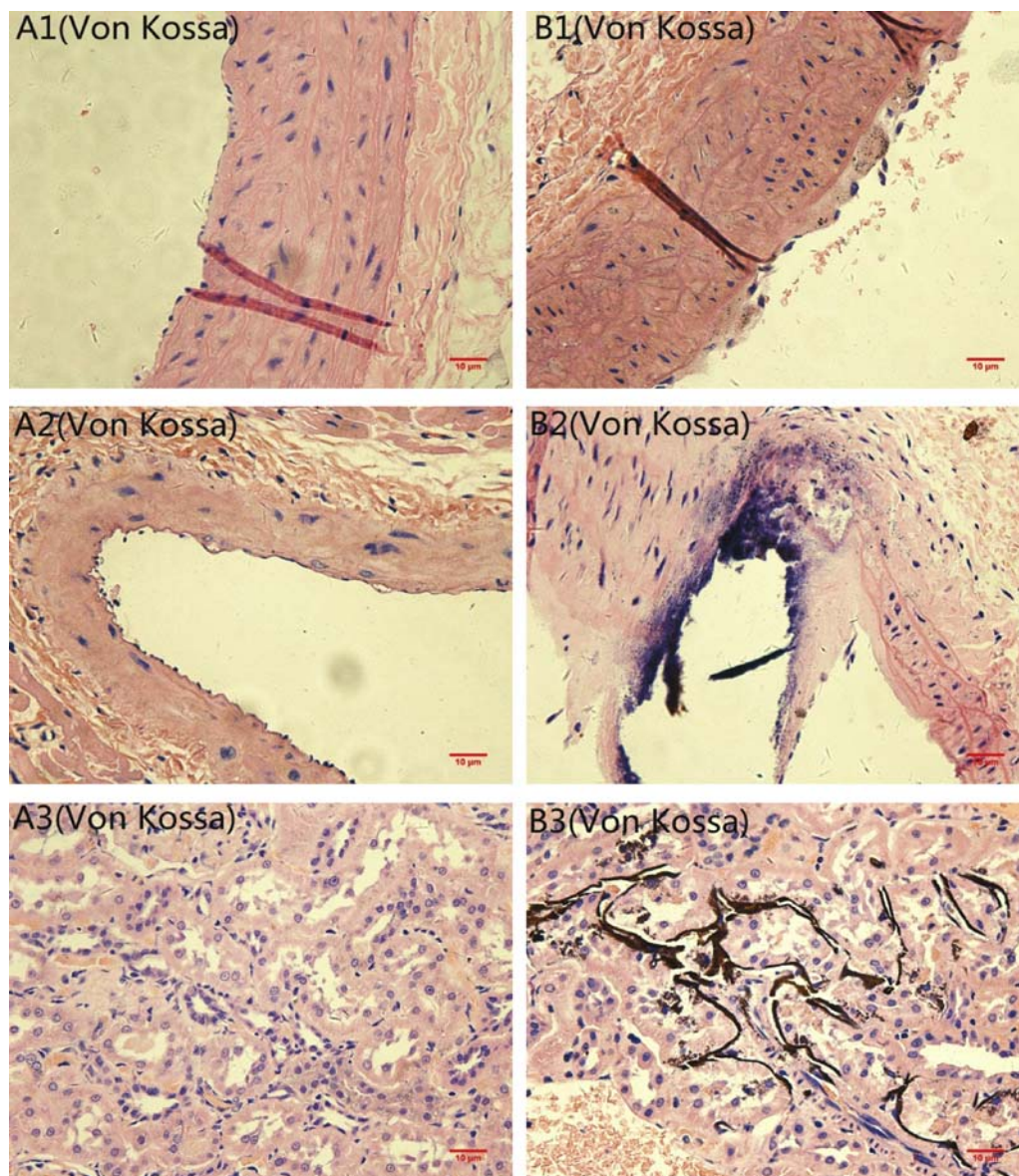
组胸主动脉、心脏和肾脏的血管壁上 VSMCs 包浆内出现明显的棕黄色颗粒(如图 4-B1, B2, B3),而对照组大鼠极少见(如图 4-A1, A2, A3)。

2.5 各组大鼠动脉 OPN、OC Western-blot 检测结果

用 Western-blot 检测各组大鼠主动脉组织 OPN 和 OC 蛋白的表达水平,用电脑成像系统观察蛋白条带,以内参 β-actin 条带的灰度值作为对照,分析蛋白表达的相对量,结果如下图 5 所示。实验组大鼠主动脉 OPN 和 OC 蛋白的表达量较对照组明显升高,其差异有统计学意义。

2.6 统计学分析

采用 Spearman 分析血管组织中 OPN 和 OC 蛋白表达的相关性得, $r = 0.641$, $P < 0.01$,即高龄大鼠血管壁 OPN 和 OC 表达同时增加有相关性。采用 χ^2 检验分析 OPN 和 OC 的表达与血管钙化的关系,OPN 与血管钙化的 χ^2 值为 17.128, $P < 0.05$;OC 与血管钙化的 χ^2 值为 14.169, $P < 0.05$,可见高龄大鼠血管壁钙化与 OPN 和 OC 的表达增加有关。



注: (A) 对照组; (B) 实验组; (1) 胸主动脉; (2) 冠状动脉; (3) 微动脉。

图 2 各组标本 Von Kossa 染色 ($\times 40$, bar = 10 μm)

Note. (A) control group; (B) experimental group; (1) thoracic aorta; (2) coronary; (3) arterioles.

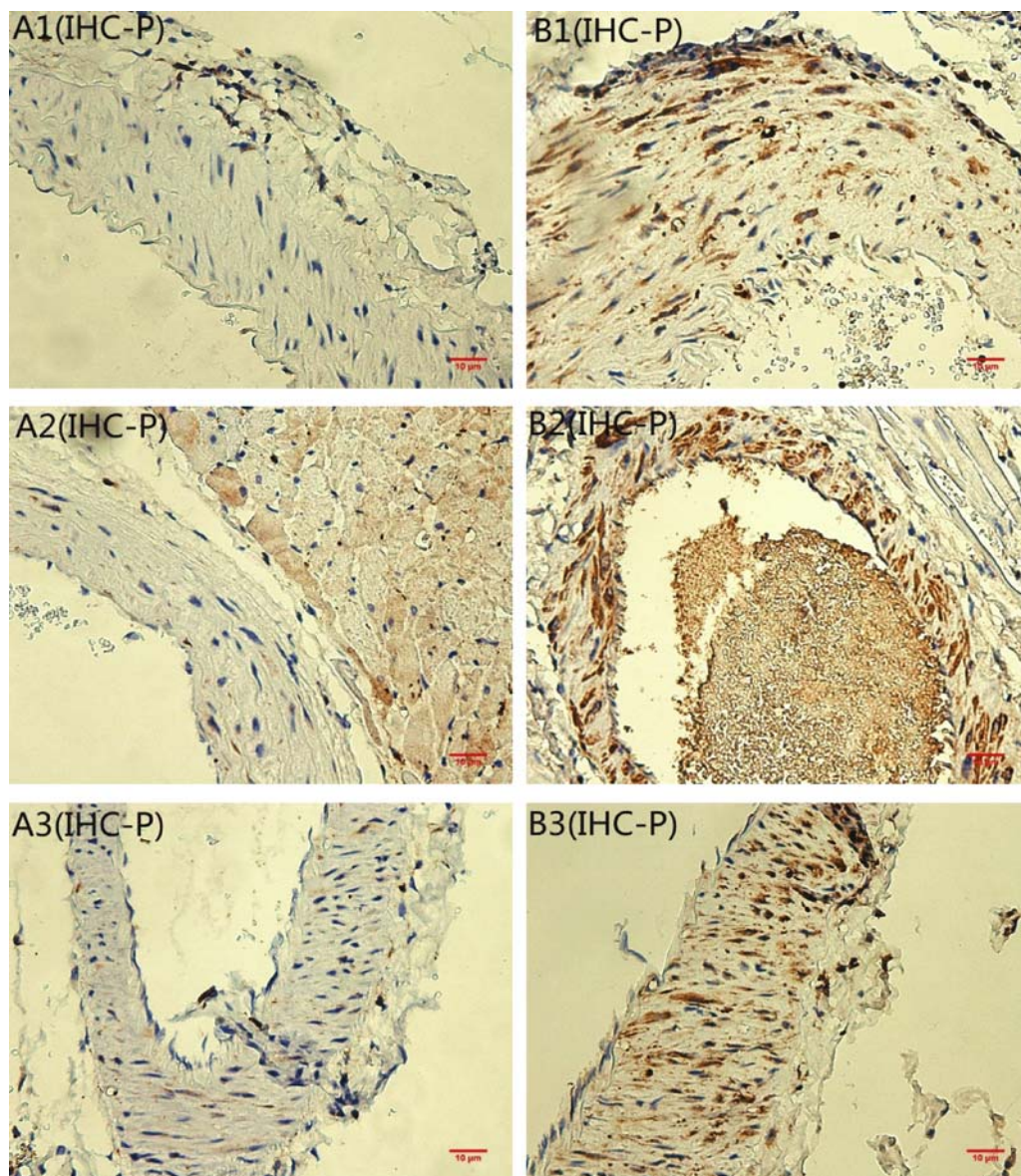
Fig. 2 Von Kossa staining of the specimens

3 讨论

引起生物体衰老的原因几乎涉及到每一个细胞和生物学过程。Lopez-Otin 等^[5]总结认为个体衰老可能与: 基因损伤应答改变、端粒丢失、基因调节改变、蛋白质平衡失调、营养信号通路改变、线粒体功能紊乱、细胞衰老、干细胞损耗以及炎症等过程相关。随着年龄的增长, 这些因素相继发生作用, 器官和细胞老化程序进展。血管作为机体的主要器官之一, 其衰老过程亦是整个机体衰老过程的关键因素。血管老化时心血管疾病危险因素增加, 发

病率和死亡率增高, 血管钙化的发生率也逐渐增加。

通过 HE 染色发现, 青年组大鼠血管壁内膜较薄, 中膜 VSMCs 排列规则, 结构完整; 高龄大鼠的血管壁较青年大鼠而言其中膜明显增厚, VSMCs 增生、排列紊乱并向内膜迁移, 弹力板有断裂, 还可见内皮细胞部分脱落。这提示年龄的增加会导致大鼠的动脉发生老化。VSMCs 是组成血管中膜的主要细胞, 其主要功能是维持血管张力, VSMCs 的异常增殖和迁移是血管老化的主要病理变化^[6]。VSMCs 的增殖与迁移受到多种生长刺激因子和抑制因子的双重调节, 在正常情况下 VSMCs 的增殖与



注: (A) 对照组; (B) 实验组; (1) 胸主动脉; (2) 冠状动脉; (3) 微动脉。

图 3 各组 OPN 免疫组化染色 ($\times 40$, bar = 10 μm)

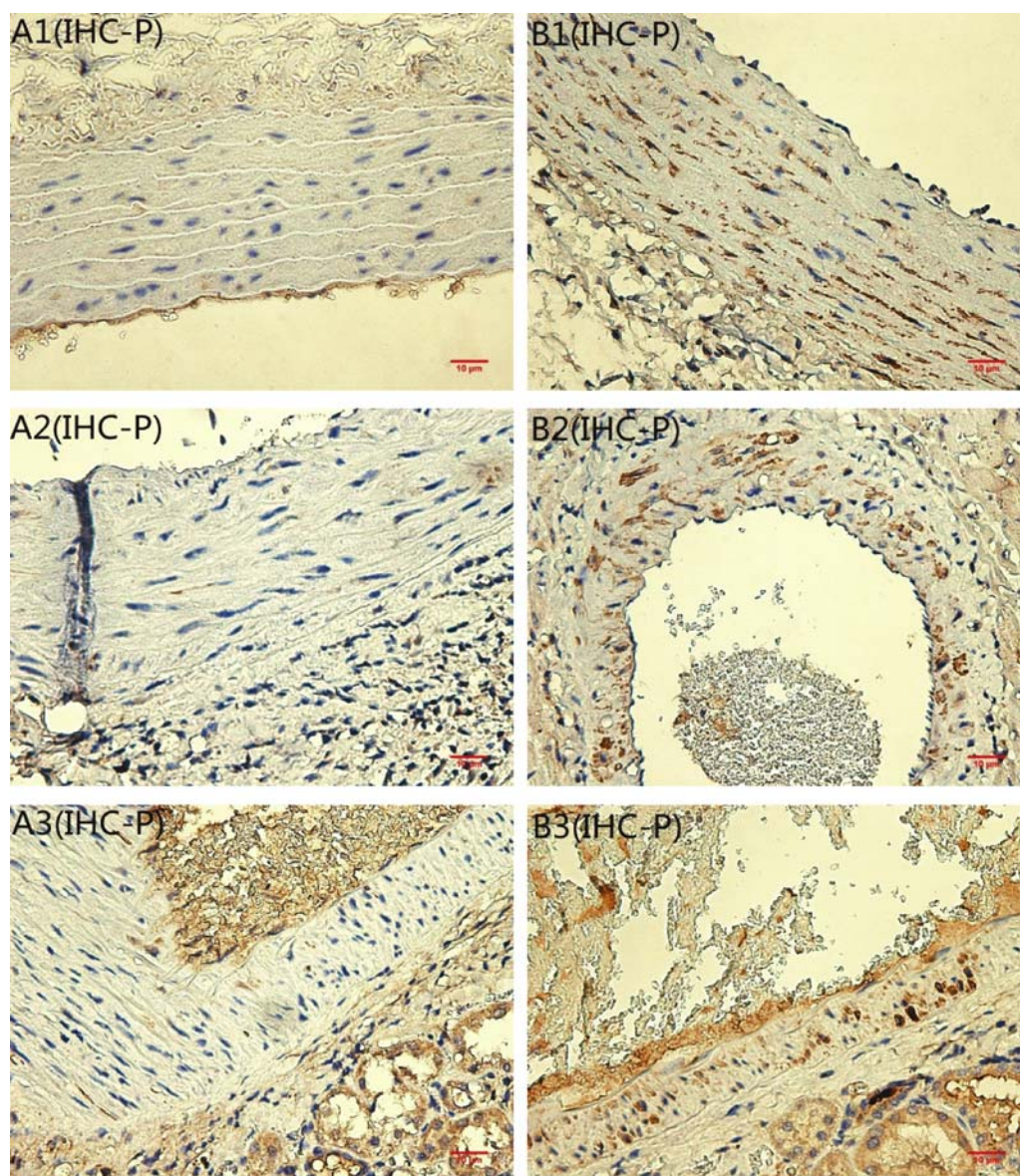
Note. (A) control group; (B) experimental group; (1) thoracic aorta; (2) coronary; (3) arterioles.

Fig. 3 OPN immunohistochemical staining of the thoracic aorta

凋亡维持平衡,血管老化时某些细胞因子通过刺激信号转导网络使维持这一平衡的基因表达发生异常改变,VSMCs 的增殖失控。生玉平等^[7]通过对大鼠主动脉衰老进程的比较蛋白质组学研究发现老年组与成年组相比较,有 49 个差异蛋白点,其中有 17 个蛋白的差异在 1.5 倍以上,其中包含 Profilin-1 和 PrelaminA。Profilin-1 是一种低分子量的肌动蛋白结合蛋白,能够参与调控肌动蛋白的聚合-解聚平衡,在血管细胞增殖及重塑中有着极为重要的作用。有研究表明^[8],Profilin-1 能够通过激活丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路,参与血管老化过

程。在老龄大鼠血管中,Profilin-1 表达水平上调,激活 MAPK,活化的 MAPK 可激活转录因子,增加 VSMCs 的 DNA 合成,促进其增殖、迁移,以及向成骨细胞转化。Warren DT 等^[9]研究发现,PrelaminA 在细胞内的大量堆积会破坏了核染色体和 DNA 损伤修复途径,干扰了细胞核的空间划分,进而促进了 VSMCs 的衰老。

我们通过 Von Kossa 染色发现,老龄大鼠的大动脉(见图-2B1)和微小动脉(见图-2B2)均有钙化,可见血管钙化与血管老化一样是系统性的过程,这可能与血管老化时,衰老的 VSMCs 向成骨细胞表型



注: (A) 对照组; (B) 实验组; (1) 胸主动脉; (2) 冠状动脉; (3) 微动脉。

图 4 各组 OC 免疫组化染色 ($\times 40$, bar = 10 μm)

Note. (A) control group; (B) experimental group; (1) thoracic aorta; (2) coronary; (3) arterioles.

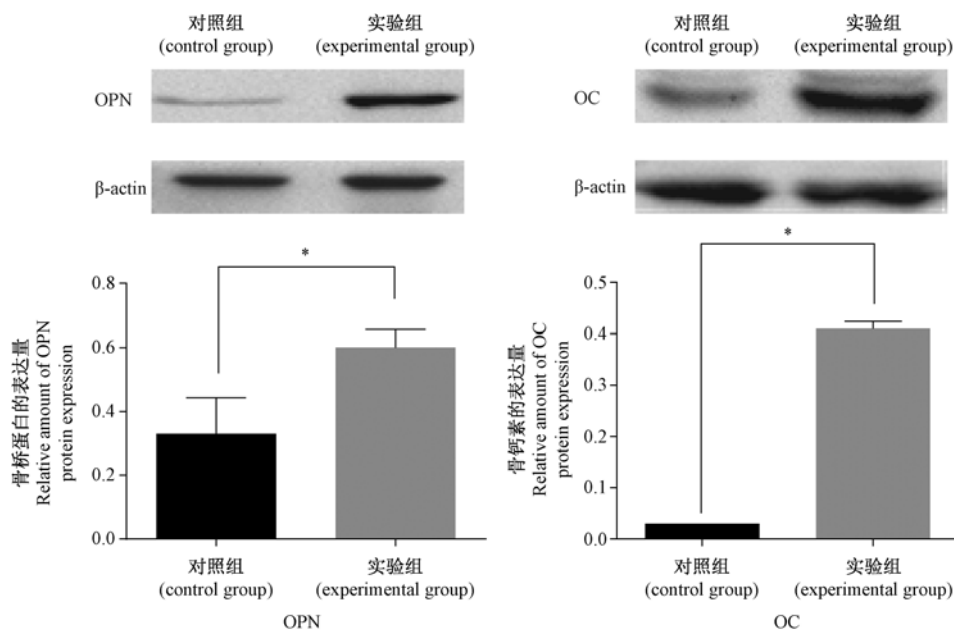
Fig. 4 OC immunohistochemical staining of thoracic aorta

转化有关。Johnson RC 等^[3]研究发现, VSMCs 衰老时向成骨细胞表型转换在年龄相关的血管钙化中起着重要作用。该研究通过对衰老的血管平滑肌细胞和年轻的血管平滑肌细胞对比研究发现, 在成骨细胞中高表达的基因如: 核心结合蛋白因子 2 (runt-related transcription factor-2, RUNX-2), 碱性磷酸酶 (ALP) 和 I 型胶原等均在衰老的 VSMCs 中高表达。

OC 是构成骨基质的重要成分之一, 绝大部分 OC 是由成骨细胞和类似成骨细胞的钙化血管细胞分泌的, 是成骨细胞最终分化的特异性标志^[10]。有

研究显示^[11], OC 的表达在成骨细胞的表型发育过程中呈阶段特异性, 只有在成骨细胞成熟的最后一个阶段, 即基质矿化期开始之后, OC 基因才被诱导表达。本研究的免疫组化结果显示在老龄大鼠的血管中 OC 的表达较青年大鼠而言明显上调, 这进一步说明在血管老化的过程中 VSMCs 确实会向成骨细胞分化, 并且非常成熟。OC 与羟基磷灰石有很高的结合力^[12], 这说明它能够促进血管钙化。

多项研究显示^[13,14], OPN 是骨形成过程中重要的细胞因子, 也是血管钙化的标志性蛋白。OPN 是一种磷酸糖蛋白粘附分子, 主要存在于富含矿物的



注: * $P < 0.05$, 与对照比较。

图5 各组大鼠胸主动脉 OPN 和 OC Western blot 检测结果

Note. * $P < 0.05$, compared with the control group.

Fig. 5 OPN and OC Western blot results of thoracic aorta

牙齿和骨骼中,它可与破骨细胞表面的整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体相结合,使局部的微环境酸化,矿物质溶解,进而抑制羟基磷灰石结晶的生长。有研究发现^[15], OPN 可以通过其精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列与羟基磷灰石晶体表面结合阻止其增大,进而抑制血管钙化的形成。体外实验研究表明^[16],成骨细胞中 OPN mRNA 水平随着钙化的进展而进一步升高。Hofbauer 等^[17]通过对 OPN -/- MGP -/- 和 OPN +/+ MGP -/- 的小鼠对比研究发现,OPN -/- MGP -/- 小鼠模型的钙化速度加快了,由此证明了 OPN 可以抑制血管钙化。在本研究发现,高龄大鼠的血管中 OPN 表达明显上调,这可能是由于血管老化引起血管钙化的正反馈作用,具体机制有待进一步研究。

综上所述,通过对高龄大鼠血管钙化以及相关蛋白的研究发现:高龄大鼠的血管壁中膜厚度增加, VSMCs 增生、排列紊乱并向内膜迁移,血管纤维化程度增高;血管老化时, VSMCs 发生增殖、迁移及向成骨细胞转化, OC 的表达上调,促进血管中膜钙化;老化的血管的钙化可以促进钙化抑制因子 OPN 的表达。

参考文献:

- [1] Adam Harvey, Montezano AC, Touyz RM. Vascular biology of ageing—Implications in hypertension [J]. Journal of Molecular

and Cellular Cardiology, 2015, 83(6):112–121.

- [2] Leopold JA. Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification [J]. Trends Cardiovasc Med, 2015, 24(4):267–274.
- [3] Nakano-Kurimoto R, Ikeda K, Uraoka M, et al. Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition [J]. Am J Physiol Heart CircPhysiol, 2009, 297(5):1673–1684.
- [4] Lau WL, Festing MH, Giachelli CM. Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1 [J]. Thromb Haemost, 2010, 104(3):464–470.
- [5] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging [J]. Cell, 2013, 153(6):1194–1217.
- [6] 陶丽丽. 益气活血中药延缓增龄与高血压所致血管老化的机制研究[D]. 中国中医科学院, 2011.
- [7] 生玉平. 大鼠主动脉衰老进程的比较蛋白质组学研究[D]. 山东大学, 2013.
- [8] Evans NJ, Walker JW. Endothelin-1 mobilizes profilin-1-bound PIP2 in cardiac muscle [J]. ExpBiol Med (Maywood), 2006, 231:882–887.
- [9] Warren DT, Shanahan CM. Defective DNA-damage repair induced by nuclear lamina dysfunction is a key mediator of smooth muscle cell aging [J]. BiochemSoc Trans, 2012, 39:1780–1785.
- [10] Qiao W, Chen L, Zhang M, et al. MicroRNA-205 regulates the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells [J]. Cell PhysiolBiochem, 2014, 33(6):1945–1953.

(下转第 68 页)

明显减少,心功能得到显著提升。

氧化应激是压力负荷型心力衰竭的重要机制,SOD 是人体内主要的抗氧化酶,可清除自由基,其酶活性值的高低反映机体的抗氧化防御水平^[13],在本研究中,心衰组和假手术组相比,SOD 值明显下降,提示心衰大鼠机体的抗氧化能力明显不足,而经过利拉鲁肽治疗,SOD 值又明显回升,说明利拉鲁肽能够增强机体的抗氧化能力。

BNP 是用来评价心力衰竭程度及预后状况的神经激素标记物,由心肌细胞分泌,有报道慢性心衰患者血浆 BNP 浓度比正常人高,而且与心力衰竭的严重程度呈正相关^[14]。本研究表明,在大鼠心功能不全时,由于心室超负荷、心肌重构、肾素血管紧张素系统激活,BNP 值显著增高,利拉鲁肽治疗后,随着心功能的改善 BNP 值明显下降。MDA 是生物膜中不饱和脂肪酸发生了脂质过氧化性反应的最终产物,其浓度可间接反映细胞和组织功能损伤的严重程度。本实验结果利拉鲁肽组的 MDA 值低于心衰组,差异并不显著,提示利拉鲁肽并不是主要通过调节 MDA 含量来发挥抗心衰作用的。

总之,利拉鲁肽可以改善心衰大鼠左心室的收缩和舒张功能,减轻心肌细胞的损伤,其机制可能与抗氧化作用相关,具体机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Nauck M, Frid A, Hermansen K, *et al.* Efficacy and safety comparison of liraglutide, glimepiride, and placebo, all in combination with metformin, in type 2 diabetes: the LEAD (liraglutide effect and action in diabetes) - 2 study [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(1): 84 - 90.
- [2] Liu J, Liu Y, Chen L, *et al.* Glucagon-like peptide-1 analog liraglutide protects against diabetic cardiomyopathy by the inhibition of the endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *J*

Diabetes Res. 2013, 2013(5): 1 - 8.

- [3] Okerson T, Yan P, Stonehouse A, *et al.* Effects of exenatide on systolic blood pressure in subjects with type 2 diabetes [J]. *Am J Hypertens*, 2010, 23(3): 334 - 339.
- [4] Timmers L, Henfiques JP, de Kleijn DP, *et al.* Exenatide infarct size and improves cardiac function in a porcine model of ischemia and reperfusion injury [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 53(6): 501 - 510.
- [5] Zhao T, Parikh P, Bhashyam S, *et al.* Direct effects of glucagon-like peptide-1 on myocardial contractility and glucose uptake in normal and postischemic isolated rat hearts [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 317(3): 1106 - 1113.
- [6] Conrad CH, Brooks WW, Robinson KG, *et al.* Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure [J]. *Am J Physiol*, 1991, 260 (1 Pt 2): H136 - 145.
- [7] 王艳飞,任越,曹雪滨,等. 改良慢性压力超负荷大鼠模型的对比研究 [J]. *医学研究与教育*, 2010, 27(6): 25 - 27.
- [8] 王晨阳,孙卫卫,徐鹏,等. 红景天苷对慢性心力衰竭大鼠肠系膜动脉舒缩作用的影响 [J]. *解放军医药杂志*, 2014, 26(11): 11 - 13.
- [9] 程向娟,王雄,滕晓焕. 利拉鲁肽可对抗大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(3): 259 - 263.
- [10] 高妍. 利拉鲁肽对心血管系统的保护作用 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2013, 29(10): 10b1 - 10b4.
- [11] Noyan-Ashraf MH, Momen MA, Ban K, *et al.* GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice [J]. *Diabetes*, 2009, 58(4): 975 - 983.
- [12] 曾山,周欣,涂悦,等. 压力容导管系统评价卒中易感性自发性高血压大鼠左心室功能的意义 [J]. *中华高血压杂志*, 2008, 16(8): 737 - 741.
- [13] 刘颖,谭波宇. 乌头提取物对心衰大鼠抗氧化能力的研究 [J]. *安徽医药*, 2015, 19(9): 1661 - 1664.
- [14] 张胜叶,黄晏,赵乾,等. 外源 Apelin-13 对大鼠阿霉素心力衰竭模型的影响与一氧化碳途径的关系 [J]. *中华中老年心脑血管病杂志*, 2011, 13(5): 452 - 455.

[修回日期]2016-03-20

(上接第 60 页)

- [11] Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation [J]. *FASEBJ*, 1990, 4(13): 3111 - 3123.
- [12] 李琳琳,冯淑芝. 骨钙素在动脉粥样硬化形成中的作用研究进展 [J]. *医学综述*, 2015, (11): 1942 - 1945.
- [13] Wolak T. Osteopontin - a multi-modal marker and mediator in atherosclerotic wvascular disease. [J]. *Atherosclerosis*. 2014, 236(2): 327 - 337.
- [14] Scialla JJ, Kao WH, Crainiceanu C, *et al.* Biomarkers of vascular calcification and mortality in patients with ESRD [J]. *Clin J Am SocNephrol*, 2014, 9(4): 745 - 755.
- [15] Yamaguchi A, Akashi T. Vascular calcification; mutual interaction

between bone and blood vessel [J]. *Clin Calcium*, 2010, 20(11): 1669 - 1676.

- [16] Bishop E, Theophilus EH, Fearon IM. In vitro and clinical studies examining the expression of osteopontin in cigarette smoke exposed endothelial cells and cigarettes smokers [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2012, 12: 75.
- [17] Hofbauer LC, Brueck CC, Shanahan CM, *et al.* Vascular calcification and osteoporosis: from clinical observation towards molecular understanding [J]. *OsteoporosInt*, 2007, 18(3): 251 - 259.

[修回日期]2016-03-07