

康婷,陈波,欧三桃. 慢性肾脏病血管钙化大鼠血清炎症因子抗体芯片检测及分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 9-15.

Kang T, Chen B, Ou ST. Antibody microarray analysis of serum inflammatory cytokines in rats with chronic renal disease vascular calcification [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 9-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.01.002

慢性肾脏病血管钙化大鼠血清炎症因子抗体芯片检测及分析

康 婷¹, 陈 波², 欧三桃^{1*}

(1. 西南医科大学附属医院肾病内科, 四川 泸州 646000;
2. 西南医科大学附属医院中西医结合研究中心, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 应用抗体芯片技术检测慢性肾脏病(chronic renal disease, CKD)血管钙化大鼠模型血清中的炎症细胞因子水平,并探讨炎症与血管钙化之间的关系。**方法** 30 只 SD 雄性大鼠分成对照组和模型组,每组 15 只。模型组大鼠联合腺嘌呤灌胃和阿霉素尾静脉注射建立大鼠慢性肾脏病血管钙化模型;对照组大鼠给予相应的生理盐水处理。给药 28 d 后取材检测肾功能、电解质等生化指标,天狼猩红染色法检测肾纤维化病变,HE 染色检测血管病理改变,von Kossa 染色法检测血管钙化程度,免疫组织化学染色法检测平滑肌肌动蛋白 α (α -SMA) 及 Runt 相关转录因子 2(Runx2)表达。细胞因子抗体芯片检测两组大鼠血清中 27 种细胞因子水平的变化。**结果** 模型组大鼠血肌酐、尿素氮及钙磷水平升高;天狼猩红染色显示模型组大鼠肾有明显的纤维化病变;HE 染色显示主动脉中膜有弹性纤维断裂;von Kossa 染色显示模型组大鼠主动脉中膜层有大量黑色颗粒沉积;免疫组织化学染色显示模型组较对照组 α -SMA 表达减少而 Runx2 表达增多。抗体芯片结果显示模型组 CINC、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-6、MCP-1、ICAM-1、TIMP-1、L-selectin、IL-2 及 IL-10 较对照组均有不同程度的升高,而 IL-4、IL-13、fractalkine、IL-1 β 、TNF- α 较对照组降低。**结论** 慢性肾脏病血管钙化大鼠发生了明显的炎症反应失衡,其中致炎因子占主导作用。

【关键词】 慢性肾脏病;血管钙化;细胞因子抗体芯片;炎症;大鼠
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 01-0009-07

Antibody microarray analysis of serum inflammatory cytokines in rats with chronic renal disease vascular calcification

KANG Ting¹, CHEN Bo², OU Santao^{1*}

(1. Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.
2. Research Center of Integrated Chinese and Western Medicine, Affiliated Traditional Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To detect and analyze the expressions of serum inflammatory factors in chronic renal disease (CKD) rats with vascular calcification by antibody microarrays. **Methods** Thirty SD male rats were randomly divided into control and model groups. The model group was treated with adenine gavage and adriamycin caudal intravenous

[基金项目] 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17PJ053)。
[作者简介] 康婷(1993—),女,硕士研究生,研究方向:慢性肾脏病血管钙化。E-mail: 409875863@qq.com
[通信作者] 欧三桃(1976—),女,博士,研究方向:慢性肾脏病血管病变。E-mail: ousantao@163.com

injection to establish a model of CKD with vascular calcification, while the control group was given corresponding saline treatment. Twenty-eight days after administration, the levels of serum creatinine, urea nitrogen, blood calcium and blood phosphorus were measured. Sirius red staining, HE and von Kossa staining were used to detect morphological changes in renal and aortic tissues. Immunohistochemical staining was used to detect the expressions and distributions of α -smooth muscle actin (α -SMA) and Runt related transcription factor 2 (Runx2) in the aorta. Antibody microarray was used to detect 27 inflammatory cytokines in serum samples from the two groups. **Results** Compared with the control group, serum creatinine, urea nitrogen, calcium, and phosphorus levels were increased. Sirius red staining showed marked renal fibrosis, and HE and von Kossa staining showed elastic fiber rupture and calcium deposition in aortic media. Immunohistochemical staining showed that the expression of α -SMA was decreased and that of Runx2 was increased in the model group compared with the control group. Antibody microarray results showed that compared with the control group, the levels of CINC, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-6, MCP-1, ICAM-1, TIMP-1, L-selectin, IL-2 and IL-10 were increased by different degrees from those in the control group, while IL-4, IL-13, fractalkine, IL-1 β and TNF- α were lower than in the control group. **Conclusions** There is a significant imbalance in the levels of inflammatory factors in CKD rats with vascular calcification, in which proinflammatory factors play a leading role.

[Keywords] chronic kidney disease (CKD); vascular calcification; cytokine antibody microarray; inflammation; rat

心血管事件是慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 患者的首要死亡原因, 血管钙化是心血管事件的基本病变。近年来认为 CKD 中的血管钙化不再仅仅是血清钙磷水平上升后沉积在血管壁的被动过程, 而是一个平滑肌细胞向成骨样细胞表型转化的主动过程。既往研究表明, 系统性及局部炎症在 CKD 血管钙化发生发展中起着重要的作用, CKD 患者不仅可以出现系统性炎症因子如 CRP、IL-6 的表达升高, 在冠状动脉钙化斑块中也发现局部促炎系统及促成骨分化的分子表达增加如 CD40、CD154、SATB2、galectin-3 以及巨噬细胞等^[1]。此外, Benz 等^[2]认为钙化血管的局部微炎症不依赖于血清钙磷水平的变化, 有研究发现炎症细胞因子对血管平滑肌细胞的成骨细胞样分化起着重要作用, 尤其可以通过影响 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2) 的表达从而调节血管钙化^[3], 但目前大多数研究只是针对单一炎症因子的检测及研究。近年来血清炎症因子抗体芯片的问世可以实现同步、高通量地检测血清中多项炎症因子水平的变化。常用来诱导大鼠慢性肾脏病血管钙化方法主要有单纯腺嘌呤、维生素 D3 联合尼古丁或华法林、5/6 肾切除等, 但往往存在耗时久, 成本高, 成模率低, 死亡率高的风险, 阿霉素肾病模型是经典的模拟人类肾小球疾病模型之一^[4]。因此本研究拟通过联合腺嘌呤灌胃和阿霉素尾静脉注射造慢性肾脏病血管钙化模型, 采用血清细胞因子抗体芯片技术, 观察和检测 CKD 血管钙化大鼠血清中多种炎症细胞因子水平的变化, 并

探讨这些细胞因子与血管钙化的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄 SD 雄性大鼠 30 只, 体重 250 ~ 280 g, 购自西南医科大学城北校区动物中心 [SCXK (川) 2013-17], 于西南医科大学城北校区动物房饲养并取材 [SYXK (川) 2013-065], 相对湿度 70%, 环境温度 (24 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$, 光照 12 h/12 h 明暗交替, 每笼 5 只饲养, 并按照 3R 原则给人以人道的关怀。福利伦理审查证号: 20180306114。

1.2 主要试剂与仪器

腺嘌呤 (货号 V900471, 批号 XWBC5614 V, 规格 100 g, Sigma); 阿霉素 (规格 10 mg, 海正辉瑞制药有限公司); α -SMA 抗体 (货号 BS70000, 批号 AAD44161, 规格 50 μL , Bioworld); Runx2 抗体 (货号 sc-101145, 批号 A2918, 规格 50 μL , Santa Cruz); 免疫组化试剂盒 (货号 SP-0023, 批号 AH03014880; 及货号 SP-0024, 批号 AG08074831, 北京博奥森生物技术有限公司); Raybiotech 试剂盒 (上海华盈生物医药科技有限公司提供); GSR-CYT-3-1 芯片 (Raybiotech, 美国)。自动生化分析仪 (美国 Beckman); 石蜡切片机 (Finesse ME+, Thermo); 倒置相差显微镜 (Nikon)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及建模

30 只 SD 雄性大鼠, 适应环境 1 周后给药。按随机数字表法分为两组: 对照组 ($n = 15$) 和模型组

($n=15$)。模型组:按照每只大鼠 3.0 mg/kg 的剂量尾静脉注射阿霉素,仅在造模第 1 天给予阿霉素,同时按照 150 mg/(kg·d) 的剂量灌胃腺嘌呤混悬液,持续 28 d。对照组仅给予同等相应体积的生理盐水尾静脉注射及灌胃,持续 28 d。

1.3.2 组织取材与血液、尿液留取

在造模第 29 天取材,用生理盐水配成 1%戊巴比妥钠,按照 40 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉大鼠,打开腹腔后下腔静脉取血,以 3500 r/min 的转速,离心 10 min 后取血清,每管 500 μ L 分装后,部分血清用于测定肾功及电解质;部分用于做抗体芯片,剩余血清-80℃冰箱冻存。取双肾,迅速置于预冷的 PBS 中,剥除肾筋膜后,一部分置于 4%的多聚甲醛中,做常规石蜡包埋、切片,供病理和免疫组化检查,另一部份置于-80℃冰箱中备用。沿着心脏动脉弓向下逐渐游离胸腹主动脉,部分用于石蜡包埋切片,部分冻存于-80℃冰箱。

1.3.3 大鼠肾功、血钙及血磷的检测

采用自动生化分析仪检测血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血清肌酐(serum creatinine, SCr)、血钙及血磷。

1.3.4 HE 染色

常规脱蜡复水,苏木素染 5 min 后水洗,1%盐酸酒精分色 2 s 后水洗,0.5%氨水返蓝 1 min 后水洗,75%乙醇 2 s,1%伊红 30 s 后水洗,脱水透明封片。

1.3.5 von Kossa 染色

常规脱蜡水化,1%硝酸银溶液处理,紫外线照射 20 min,蒸馏水洗 1 min,5%硫代硫酸钠溶液处理 2 min,核固红复染 5 min,常规脱水,透明,封片。黑色染色为阳性。

1.3.6 免疫组化检测 α -SMA 及 Runx2 表达及分布

60℃孵箱烤片,常规脱蜡水化,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,抗原修复,蒸馏水浸泡 5 min,3% H_2O_2 去离子水孵育 15 min,正常山羊血清室温封闭 20 min。滴加一抗,4℃过夜,PBS 洗 3 min $\times$ 3 次。滴加二抗,37℃孵育 20 min,PBS 洗 3 min $\times$ 3 次。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃孵育 20 min,PBS 洗 3 min $\times$ 3 次,新鲜配置的 DAB 显色液,显微镜下观察显色情况,棕黄色或棕褐色为阳性表达。自来水充分冲洗,苏木素复染 20 s,脱水,透明,封片。

1.3.7 天狼星红染色

常规脱蜡复水,天狼猩红染液滴染 2 h,水洗,苏木素染核 5 min,水洗,脱水透明封片。

1.3.8 抗体芯片检测

根据 Raybiotech 试剂盒及标准操作流程进行芯片检测,共检测 27 种细胞因子,芯片上每种抗体设置 4 次技术重复。对扫描获取的芯片图像,使用 GenePix Pro 6.0 软件读取原始数据,包括荧光信号、背景等,数据分析时首先计算 4 次重复的均值,以此作为每种因子的信号值,然后以阳性参照进行样本间信号值的归一化,最后使用归一化后的数据进行浓度定量。

1.4 统计学方法

用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。计量资料用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 大鼠肾功及血钙、血磷指标变化

模型组大鼠 BUN、SCr、血钙、血磷均高于对照组,且差异均有显著性($P<0.05$;表 1)。

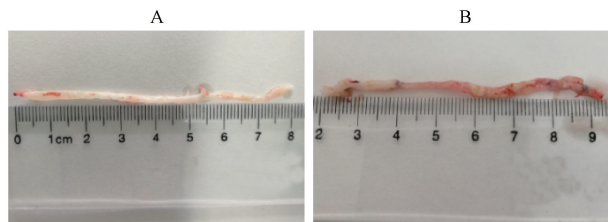
表 1 两组大鼠血生化指标
Table 1 Blood biochemical indexes of the two groups

指标 Indices	对照组 Control group	模型组 Model group
尿素氮(mmol/L) Urea nitrogen	3.06 $\pm$ 0.37	45.55 $\pm$ 11.72 **
血清肌酐(μ mol/L) Serum creatinine	12.66 $\pm$ 6.05	223.00 $\pm$ 58.82 **
磷(mmol/L) Phosphorus	1.54 $\pm$ 0.47	4.38 $\pm$ 1.32 **
钙(mmol/L) Calcium	1.72 $\pm$ 0.47	2.46 $\pm$ 0.12 *

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$.

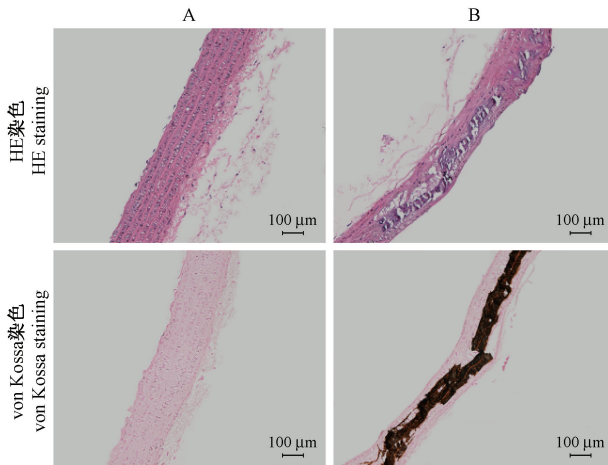
2.2 大鼠主动脉钙化情况

肉眼观察,可见对照组大鼠主动脉光滑、柔软,富有弹性;模型组大鼠主动脉可见明显的白色钙化结节,呈现出软骨状,血管壁僵硬(图 1)。HE 染色结果显示:对照组血管分层明显,弹性纤维连续,血管壁完整;模型组血管中膜层有明显的弹性纤维断裂,结构紊乱,血管壁完整性破坏。von Kossa 染色结果显示:对照组血管无黑色染色,模型组血管中膜层可见明显广泛、连续分布的黑色颗粒沉积,血管壁外膜层及内膜层未见黑色颗粒沉积,界限分明,即表明血管中膜层大量钙化结节形成,同时伴有明显的弹性纤维断裂,血管壁完整性破坏(图 2)。



注:A:对照组;B:模型组。
图 1 两组大鼠主动脉大体形态比较
Note. A: Control group; B: Model group.

Figure 1 Comparison of gross morphology of the in aortas two groups



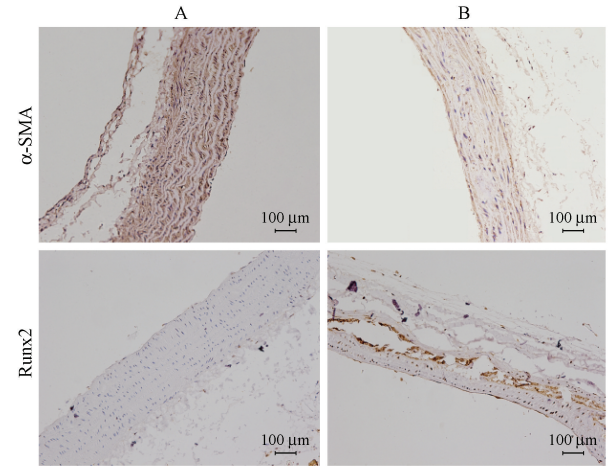
注:A:对照组;B:模型组。
图 2 两组大鼠主动脉钙化情况比较(× 200)
Note. A: Control group; B: Model group.

Figure 2 Comparison of aortic calcification in the two groups

2.3 大鼠主动脉成骨样分化形成

免疫组织化学结果显示:对照组大鼠主动脉上大量表达 α -SMA, 呈现广泛均匀分布的棕黄色颗粒,模型组大鼠主动脉上 α -SMA 表达较对照组明显减少,颜色变淡;与之相反 Runx2 在模型组大鼠主

动脉壁中膜层表达较多,呈现明显分布的棕黄色颗粒,而对照组大鼠主动脉壁几乎无表达(图 3)。

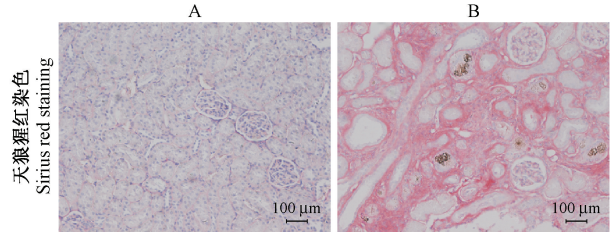


注:A:对照组;B:模型组。
图 3 两组大鼠主动脉免疫组化染色(× 200)
Note. A: Control group; B: Model group.

Figure 3 Immunohistochemical staining of the aorta in two groups

2.4 大鼠肾病理改变

天狼猩红染色结果显示:对照组肾小球及肾间质未见明显红色染色,肾小管排列紧密,分布均匀;模型组肾间质及肾小球囊壁周胶原纤维增加,纤维化十分明显(红色部分),肾小球及肾小管管腔扩张,肾小管上皮细胞部分坏死伴管腔内有棕褐色的针状尿酸盐结晶沉积(图 4)。

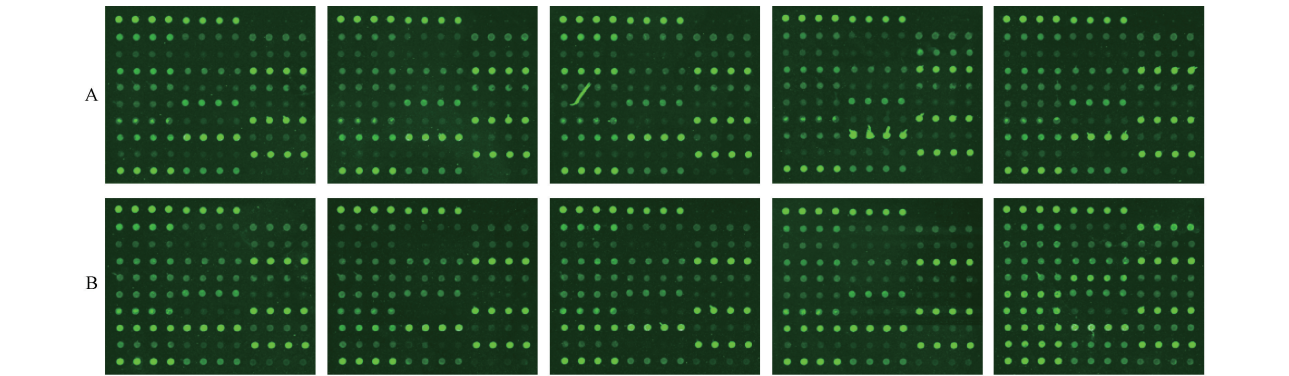


注:A:对照组;B:模型组。
图 4 两组大鼠肾病理比较(× 200)
Note. A: Control group; B: Model group.

Figure 4 Comparison of the pathological changes in renal tissues of the two groups

2.5 血清抗体芯片分析结果

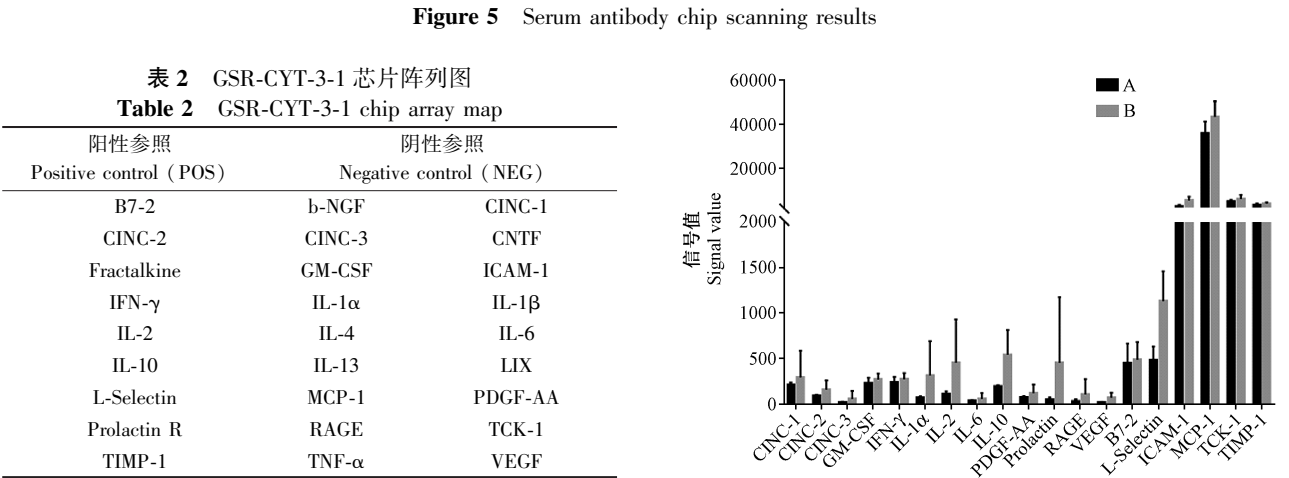
与对照组相比,模型组血清中 27 种细胞因子水平表达的荧光信号发生显著变化(表 2,图 5)。浓度定量分析显示:与对照组相比,慢性肾脏病血管钙化大鼠的血清中炎症因子失衡,促炎因子较抗炎因子明显增加,其中大部分促炎因子如细胞因子诱导中性粒细胞化学趋化因子(cytokine induced neutrophils chemical chemokines, CINC)、 γ 干扰素



注:A:对照组;B:模型组。

图 5 血清抗体芯片扫描结果

Note. A: Control group; B: Model group.



注:A:对照组;B:模型组。

图 6 模型组较对照组表达上升的细胞因子

Note. A: Control group; B: Model group.

Figure 6 Increased cytokine expressions in the model group compared with the control group

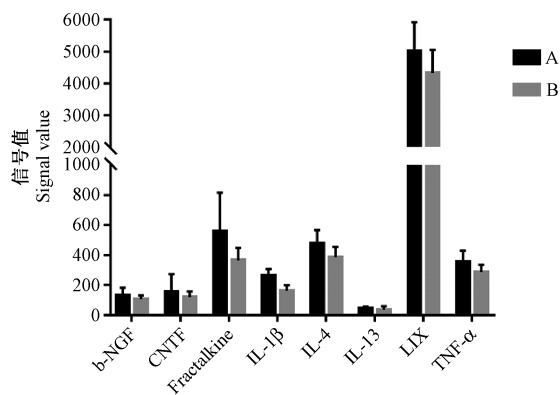
(interferon- γ , IFN- γ)、白介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、基质金属蛋白酶-1 抑制剂 (matrix metalloproteinase-1 inhibitor, TIMP-1)、L-选择素 (L-selectin) 及三个抗炎因子如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、白介素-2 (interleukin-2, IL-2)、白介素-10(interleukin-10, IL-10) 表达显著上调,而抗炎因子如白介素-4 (interleukin-4, IL-4)、白介素-13 (interleukin-13, IL-13) 和促炎因子如趋化因子 (fractalkine)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 有所下降(图 6,图 7)。

3 讨论

慢性肾脏病 (CKD) 患者并发血管钙化不仅导致肾功能进一步减退,还会减少血管顺应性、影响冠状动脉灌注、损害左心室舒张功能。流行病学研

究表明 80% 的 CKD 5 期患者存在冠状动脉钙化,50% 的患者冠状动脉钙化积分 (Agaston 评分) > 400,提示高风险心血管事件^[5]。对未透析的 3~5 期 CKD 患者的一项研究发现血管钙化和严重血管钙化的发生率分别高达 79% 和 47%^[6]。CKD 患者并发血管钙化机制非常复杂,而反映早期血管钙化的血清学指标及治疗方法的局限等共同增加了血管钙化的风险。目前国内外很多学者认为炎症可能通过直接或间接的方式参与血管钙化的形成与发展,但仅仅检测了单一或少量的炎性因子,且具体机制尚不明确。

本研究通过给予大鼠 150 mg/(kg·d) 腺嘌呤混悬液连续灌胃 28 d 联合首次尾静脉注射 3.0 mg/kg 阿霉素,从而造成免疫、代谢复合致病因素所致的肾小球、肾小管复合损伤的慢性肾脏病并发血管钙



注:A:对照组;B:模型组。

图7 模型组较对照组表达下降的细胞因子

Note. A: Control group; B: Model group.

Figure 7 Reduced cytokine expressions in the model group compared with the control group

化的动物模型,与人类慢性肾脏病的临床表现及病理过程相似。血清学指标显示模型组大鼠有明显的肌酐及尿素氮升高($P < 0.01$),同时伴有高磷血症($P < 0.01$)及高钙血症($P < 0.05$),肾狼猩红染色显示模型组大鼠肾间质及肾小球囊壁有显著的肾纤维化病变,以上结果均表明与对照组比较,模型组大鼠已出现严重的慢性肾损害。血管 von Kossa 染色结果显示模型组血管壁中膜弹力层较正常组有明显的线性沉积的钙结节形成,与既往研究认为 CKD 主要发生中膜钙化相一致^[7]。Runx2 是成骨细胞分化的关键转录因子,与血管钙化形成紧密相关,目前在正常人群、CKD 患者、动物实验以及体外实验都得到了验证^[8]。本研究的血管免疫组化结果也显示模型组较对照组大鼠血管壁中膜层钙化特异标志物 Runx2 表达明显增加,而血管平滑肌细胞特异标志物 α -SMA 表达下降,表明在血管钙化的过程中血管平滑肌细胞已发生成骨样细胞的表型转换,提示慢性肾脏病血管钙化大鼠模型建立成功。

细胞因子是炎症疾病重要的调节剂,近年来研究表明炎症对血管钙化的致病机制起着重要作用,多种促炎因子包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 是血管钙化的关键刺激因素^[9]。细胞因子抗体芯片是一项快速发展的新技术,可以同时检测多个细胞因子,研究疾病相关的细胞因子表达谱,具有高通量、高特异性、高灵敏度、样品消耗少的特点^[10]。因此本研究利用抗体芯片技术观察 CKD 并发血管钙化大鼠血清中炎症因子水平表达差异,更加全面地了解炎症因子与血管钙化的相关性。芯片分析结果显示,

模型组的大鼠血清中大部分细胞因子表达增加,其中促炎因子 CINC、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-6、MCP-1、ICAM-1、TIMP-1、L-selectin 及部分抗炎因子 GM-CSF、IL-2、IL-10 较对照组均有不同程度的升高,抗炎因子 IL-4、IL-13 及促炎因子 fractalkine、IL-1 β 、TNF- α 较对照组降低。促炎因子的大量增加说明血管钙化过程中发生了炎症反应,而重要的抗炎因子 IL-2、IL-10 的显著上升说明炎症反应启动了抗炎机制,进而导致炎症因子 fractalkine、IL-1 β 、TNF- α 降低,抗炎因子和促炎因子的相互对抗使平衡被打破,致炎因子起到主导作用,抗炎因子作用被削弱,引发血管钙化。慢性炎症是异常软组织钙化的中心因素,通常认为血管慢性炎症与动脉粥样硬化钙化相关^[11]。动脉粥样硬化钙化主要发生在内膜层,而本研究观察到 CKD 并血管钙化主要发生在中膜层,提示炎症可能还与中膜钙化相关。Agharazii 等^[12]在 CKD 并发血管钙化大鼠模型中发现血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化同时,血清促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达也明显增加。而本研究模型组 IL-6 上升,IL-1 β 和 TNF- α 降低,除了抗炎因子的抑制作用,可能也与血管钙化的时间段有关,其机制还有待进一步研究。MCP-1 是一种单核细胞趋化因子,多项研究表明,血管钙化伴随有血清 MCP-1 水平增加以及钙化血管组织 MCP-1 受体上调, MCP-1 还可影响 Runx2 的表达,促进血管钙化的发生^[13-15],本研究也发现模型组较对照组血清中 MCP-1 明显增多,说明 MCP-1 作为一种促钙化因子主要与血管平滑肌细胞表型变化相关。最新研究也发现临床终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)患者血清 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)水平增高组与对照组相比,动脉血管中 TNF- α 和 MCP-1 表达增加,即表明系统性炎症状态与局部血管炎症相关,同时发现炎症可以通过激活 mTORC1 通路诱导血管收缩表型向成骨表型转化从而加剧血管钙化的进程^[16]。Willy 等^[17]发现临床 CKD 血液透析患者可以通过改善透析膜增强透析,清除血清中分子的促炎因子如 IL-6、TNF- α 等从而减轻血管钙化;类似地,通过选择性药物抑制透析患者血清中的 IL-1、TNF- α 、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)可以防止间充质干细胞向成骨细胞表型转换并显著降低钙沉积^[18],因此减少血清中促炎因子水平可能会限制血管钙化的进展,本研究只检测了 CKD 血管钙化模型中血清炎

症因子的水平变化,还需采取干预系统性炎症的措施以进一步探索防治血管钙化的新方法。

综上所述,通过腺嘌呤联合阿霉素可以快速、成功地制造慢性肾脏病并血管钙化的动物模型。血清抗体芯片分析发现慢性肾脏病血管钙化大鼠存在严重的炎症反应,可能与 Runx2 的激活有关,促进了血管钙化的形成,但还需进一步通过血管的局部炎症反应及炎症因子受体的检测明确其相关性。炎症反应的激活也提示我们对血管钙化的检测倾向于增强或不仅仅局限于传统危险因素,控制炎症反应有助于慢性肾脏病血管钙化的防治。

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] Benz K, Hilgers KF, Daniel C, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease: the role of inflammation [J]. *Int J Nephrol*, 2018, 2018: 4310379.
- [3] Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(7): 1453-1464.
- [4] 曹欢, 刘芳, 白晓红, 等. 肾复康 VI 号方对阿霉素肾病大鼠模型肾小球电荷屏障的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(8): 70-76.
- [5] Malluche HH, Blomquist G, Monier-Faugere MC, et al. High parathyroid hormone level and osteoporosis predict progression of coronary artery calcification in patients on dialysis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(10): 2534-2544.
- [6] Górriz JL, Molina P, Cerverón MJ, et al. Vascular calcification in patients with nondialysis CKD over 3 years [J]. *Clin J Am Soc Nephro*, 2015, 10(4): 654-666.
- [7] Goodman WG, London G, Amann K, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease [J]. *Am J Kidney Dis*, 2004, 43(3): 572-579.
- [8] Moe SM, Chen NX. Pathophysiology of vascular calcification in

- chronic kidney disease [J]. *Circ Res*, 2004, 95(6): 560-567.
- [9] Ye Y, Bian W, Fu F, et al. Selenoprotein S inhibits inflammation-induced vascular smooth muscle cell calcification [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2018, 23(5): 739-751.
- [10] 赵玉辉, 贾智艳, 包红梅. 抗体芯片技术研究进展 [J]. *国际免疫学杂志*, 2010, 33(3): 196-199.
- [11] Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(4): 715-723.
- [12] 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.
- [13] 张旭升, 周小欧, 黄战军, 等. 大鼠血管钙化模型炎症因子及其受体的表达 [J]. *岭南心血管病杂志*, 2013, 19(3): 341-345.
- [14] Guerrero F, Montes de Oca A, Aguilera-Tejero E, et al. The effect of vitamin D derivatives on vascular calcification associated with inflammation [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(6): 2206-2212.
- [15] 赵安菊, 黄颂敏, 欧三桃, 等. Cbfa-1 和 MCP-1 在 DN 大鼠肾内小动脉中表达意义及相关性研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(33): 4109-4113.
- [16] Liu J, Zhu W, Jiang CM, et al. Activation of the mTORC1 pathway by inflammation contributes to vascular calcification in patients with end-stage renal disease [J]. *J Nephrol*, 2018; 1-10.
- [17] Willy K, Girndt M, Voelkl J, et al. Expanded haemodialysis therapy of chronic haemodialysis patients prevents calcification and apoptosis of vascular smooth muscle cells *in vitro* [J]. *Blood Purif*, 2018, 45(1-3): 131-138.
- [18] Hegner B, Schaub T, Janke D, et al. Targeting proinflammatory cytokines ameliorates calcifying phenotype conversion of vascular progenitors under uremic conditions *in vitro* [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12087.

[收稿日期] 2018-08-27