

· 论著 ·

Notch2高表达可使人主动脉平滑肌细胞骨形态发生蛋白4表达增加促进钙化

顾秀莲¹ 敬梅² 樊济海¹ 巢胜吾¹ 李博¹ 王玲¹ 凌秋洋³

(1. 中国人民解放军海军特色医学中心心内科, 上海 200052; 2. 中国人民解放军海军特色医学中心干部科, 上海 200052; 3. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇四医院心内科, 江苏 无锡 214044)

【摘要】目的 观察并验证人主动脉平滑肌细胞(HASMC) Notch2蛋白表达的变化对其细胞钙化的影响, 并探讨其机制。**方法** 体外培养HASMC, 将其分为两组, 分别为正常对照组与诱导钙化组。前者常规培养, 后者在常规培养的基础上加用钙化诱导剂 β -甘油磷酸(5 mmol/L)、抗坏血酸(50 μ g/mL)和地塞米松(100 nmol/L), 两组细胞均培养7 d。另取上述方法诱导钙化的HASMC为钙化对照组, 再设钙化抑制组, 即在钙化对照组的基础上加入Notch特异性抑制剂 γ -内泌素酶抑制剂(50 μ mol/L), 两组细胞均培养7 d。四组均用白介素-6诱导细胞的炎症反应。采用免疫印迹法检测各组细胞内Notch2、磷酸化核转录因子STAT3(p-STAT3)和骨形态发生蛋白4(BMP-4)的蛋白表达水平; 酶联免疫法测定各组细胞培养上清液中BMP-4蛋白的含量; 逆转录-聚合酶链反应检测诱导钙化组和正常对照组中HASMC Notch2 mRNA的表达; 免疫荧光染色法观察钙化对照组与钙化抑制组中HASMC BMP-4蛋白的表达。**结果** (1) 诱导钙化组中HASMC Notch2、p-STAT3和BMP-4蛋白表达水平明显高于正常对照组($P < 0.05$); 诱导钙化组的培养液上清中BMP-4蛋白含量为(66.42 \pm 2.89) pg/mL, 明显高于正常对照组的(22.35 \pm 2.68) pg/mL($P < 0.05$); 诱导钙化组中HASMC Notch2 mRNA的表达明显高于正常对照组($P < 0.05$)。(2) 钙化抑制组中HASMC Notch2、p-STAT3和BMP-4蛋白的表达水平明显低于钙化对照组($P < 0.05$); 钙化抑制组培养液上清中BMP-4蛋白的含量为(22.34 \pm 3.82) pg/mL, 明显低于钙化对照组的(62.89 \pm 3.26) pg/mL($P < 0.05$)。免疫荧光染色显示钙化抑制组中HASMC BMP-4蛋白表达明显低于钙化对照组。**结论** 钙化的HASMC Notch2蛋白表达增高, 促进了BMP-4蛋白表达增加, 从而使HASMC发生成骨样改变, 使血管发生钙化, 这一机制可能与JAK-STAT3的活化有关。

【关键词】 人主动脉平滑肌细胞; Notch2; JAK-STAT3; 骨形态发生蛋白4

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2020.09.019

Over-expression of Notch2 Increases BMP-4 Expression and Promotes Calcification in Human Aortic Smooth Muscle Cells

GU Xiulian¹, JING Mei², FAN Jihai¹, CHAO Shengwu¹, LI Bo¹, WANG Ling¹, LING Qiuyang³

(1. Department of Cardiology, Naval Characteristic Medical Center of PLA, Shanghai 200052, China; 2. Department of Cadre, Naval Characteristic Medical Center of PLA, Shanghai 200052, China; 3. Department of Cardiology, The 904th Hospital of PLA, Wuxi 214044, Jiangsu, China)

【Abstract】Objective To observe the effect of Notch2 protein expression on calcification of human aortic smooth muscle cells(HASMC) and explore its mechanism. **Methods** HASMC was cultured in vitro and divided into two groups: normal control group and induced calcification group. The former were cultured in conventional media. The latter was supplemented with calcification inducers β -glycerophosphate (5 mmol/L), ascorbic acid (50 μ g/mL) and dexamethasone (100 nmol/L) on the basis of conventional culture. The cells of two group were cultured for 7 days. HASMC, which was induced calcification by the above-mentioned method, was taken as the calcification

基金项目: 江苏省青年医学重点人才培养(QNRC2016883)

通信作者: 凌秋洋, E-mail: lqy_doctor@163.com

control group, and the calcification inhibition group was set up, in which Notch specific inhibitor-endocrine enzyme inhibitor ($50 \mu\text{mol/L}$) was added to the calcification control group. Interleukin-6 was used to induce the inflammatory reaction of the cells in all four groups. The expression levels of Notch2, phosphorylated nuclear transcription factor STAT3(p-STAT3) and bone morphogenetic protein-4(BMP-4) were detected by Western blotting and BMP-4 protein was detected by ELISA in all groups. The expression of Notch2 mRNA was detected by RT-PCR in induced calcification group and control group, and the expression of HASMC BMP-4 protein was detected by immunofluorescence staining in calcification inhibition group and calcified control group. **Results** (1)The expression of Notch2, p-STAT3 and BMP-4 in induced calcification group is significantly higher than that of the control group($P < 0.05$). The expression of BMP-4 in the induced calcification group is (66.42 ± 2.89) pg/mL, which is significantly higher than that in control group[(22.35 ± 2.68) pg/mL]($P < 0.05$). Notch2 mRNA expression in induced calcification group is significantly higher than that in normal control group ($P < 0.05$). (2)The expression of Notch2, p-STAT3 and BMP4 protein in the calcification inhibition group was significantly lower than that in the calcification control group($P < 0.05$).The content of BMP-4 in supernatant of calcification inhibition group was (22.34 ± 3.82) pg/mL, which was significantly lower than that of calcification control group[(62.89 ± 3.26) pg/mL]($P < 0.05$). Immunofluorescence staining showed that BMP-4 protein expression was significantly lower in calcification inhibition group than that in calcified control group. **Conclusion** The increased expression of calcified HASMC Notch2 promotes the expression of BMP-4, which leads to osteogenic changes of HASMC and calcification of blood vessels. This mechanism may be related to the activation of JAK-STAT3.

【Key words】 Human aortic smooth muscle cells; Notch2; JAK-STAT3; Bone morphogenetic protein-4

血管钙化是动脉粥样硬化性疾病、高血压病、脑血管疾病和糖尿病等疾病普遍存在的共同的病理基础^[1]。主要表现为血管壁僵硬性增加和血管炎性反应增加,易导致心肌梗死、心室重塑和心力衰竭等疾病的发生,引发斑块不稳定和斑块破裂,是导致心脑血管疾病发病迅速和死亡率高的原因之一;血管钙化可作为检测动脉粥样硬化、脑血管疾病和外周血管疾病发病的重要标志分子^[2-3]。人主动脉平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cells, HASMC)的增殖、迁移以及表型转化是动脉粥样硬化性疾病发病的基础, HASMC的表型转化是近年来血管钙化性疾病的研究重点,是延缓上述疾病进展的关键靶点^[4-5]。

研究发现,多种细胞因子与活性氧可刺激HASMC增殖并向内膜移行^[6]。HASMC增殖及迁移的过程中可分泌骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP) 2/4,它们可诱导Msx2和Cbfa1在HASMC中高表达,而Msx2是成骨细胞形成及表达的必需成分,同时也在成骨细胞分化、软骨的形成与转化以及新生血管形成过程中具有重要的作用,参与血管的钙化^[7-8]。

Notch蛋白为一种跨膜蛋白受体,具有4种Notch受体(Notch1~4)和5种其配体(Delta-like 1、3、4和Jagged1~2)。Notch信号的产生是通过相邻细胞的Notch配体与受体相互作用,Notch蛋白经过剪切形成剪切体即胞内区域(NICD)释放入细胞质,NICD可进入细胞核与转录因子启动子结合蛋白(CSL)结合,形成NICD-CSL的形式,即转录激活复合物,发挥生物学作用^[9]。前期研究表明Notch1及Notch2信号转导通路在BMP诱导的心脏瓣膜钙化中起重要作用^[10-12]。因此,可

推断Notch1/2信号转导通路也参与了血管钙化的进程。

JAK-STAT3是一条多种细胞因子和生长因子共用的信号转导途径,其信号转导通路与炎症反应、细胞分化、表型转化和细胞凋亡等密切相关,其在HASMC的增殖、迁移、表型转化和炎症反应等多处发挥重要作用^[13]。有研究表明,JAK-STAT3可直接激活早期反应基因的转录,促转录激活复合物的形成,从而调控HASMC中信号的传导,阻断JAK-STAT3信号通路,转录激活复合物形成受阻,靶基因蛋白表达受到抑制,影响HASMC的增殖、迁移、表型转化及凋亡小体形成,减轻血管炎性反应,延缓血管钙化的进程^[14-15]。

1 材料与方法

1.1 材料

从ScienCell公司(美国)购买HASMC,并通过伦理委员会批准且通过国家相关生物制品进口审批。平滑肌细胞培养基(SMCM)从ScienCell公司(美国)进口。BMP-4 ELISA相关试剂盒由R&D公司(美国)进口。地塞米松磷酸钠、 β -甘油磷酸、L-抗坏血酸和重组型人白介素-6(IL-6)均从Sigma公司(美国)进口。Notch2、 γ -内分泌酶抑制剂(DAPT)、磷酸化核转录因子STAT3(p-STAT3)和BMP-4抗体从Abcam公司(英国)进口。蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和胰蛋白酶水解酶从罗氏公司(瑞士)进口。RNA分离试剂(Invitrogen Trizol)、逆转录试剂盒(TaKaRa)和聚合酶链式反应(PCR)相关试剂盒(TaKaRa)从宝生物工程(大连)有限公司(大连)购买,Notch2引物和 β -actin引物购自赛德德生物技术有限公司(苏州)。其他化学品和试剂从碧云天生物公司(上海)购买。

1.2 细胞培养、分组及其处理

取出干冰保存的细胞置于37℃水浴搅拌直至完全溶解, 转移2 mL冻存液于离心管, 慢慢加入8 mL培养基(SMCM), 1 000 r/min于4℃离心5 min。去除上清, 加入培养基3 mL并吹打, 测定细胞计数, 置于37℃、5% CO₂孵育箱培养, 每2~3 d更换培养液。取传代3~5代的HASMC, 以 1×10^5 /mL的密度种植于6孔板内, 每孔加入细胞培养基+10%胎牛血清(FBS)培养为正常细胞; 加入含0.1% FBS的细胞培养基, 100 nmol/L地塞米松(100 μL/孔), 50 μg/mL L-抗坏血酸(200 μL/孔), 5 mmol/L β-甘油磷酸(500 μL/孔)为钙化细胞, 隔2 d换液一次, 培养7 d。

1.3 Notch2的激活

细胞用重组型人IL-6[0.1 μg/mL(4 μL/孔)]刺激8~12 h以活化Notch2并使下游JAK-STAT3通路磷酸化, 检测p-STAT3和BMP-4的表达。为了确定Notch2在介导瓣膜钙化中的重要作用, 先用重组型人IL-6诱导细胞炎症反应, 再向培养基中加入Notch2特异性抑制剂DAPT(抑制Notch2转化为NICD)抑制Notch2的表达, 50 μmol/L(4 μL/孔), 检测Notch2、p-STAT3和BMP-4的表达。

1.4 Western blotting法检测Notch2、p-STAT3、BMP-4及内参(β-actin)蛋白的表达水平

测定前24 h将正常HASMC和钙化HASMC的培养液更换成不含血清的, 用平衡盐溶液磷酸盐缓冲溶液(NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、Na₂HPO₄·12H₂O 3.4 g和KH₂PO₄ 0.2 g, pH值为7.4)冲洗, 胰蛋白酶消化后收集细胞, 离心去除胰蛋白酶后加入细胞裂解液并震荡, 10 000 g离心5 min, 离心半径10 cm, 取上清液, 加入电泳上样缓冲液[100 mmol/L Tris-HCl(pH值为6.8)、200 mmol/L二硫苏糖醇、4%十二烷基硫酸钠、0.2%溴酚蓝和20%甘油]并煮沸, 再次离心。配制聚丙烯酰胺凝胶, 将待测样品加入样品槽内80 V电压电泳2 h后, 将凝胶内分离的蛋白转入聚偏氟乙烯膜(PVDF膜)上, 洗膜后进行曝光显影, 用Image J 10.0(Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Md)进行条带数据分析。

1.5 酶联免疫吸附试验测定分泌蛋白BMP-4

收集培养细胞上清标本, 按照试剂盒的操作步骤进行实验, 每组设3个复孔, 每孔加样本300 μL, 室温孵育2 h, 洗板3次, 每孔加300 μL BMP-4抗体, 避光室温孵育2 h, 洗板后加300 μL底物, 避光室温孵育30 min, 加入终止液, 30 min内使用全自动酶标仪(BIORAD680, Hercules, CA)在450 nm波长下进行读数并分析, 根据标准曲线, 计算分泌蛋白BMP-4的浓度。

1.6 BMP-4蛋白的表达采用免疫荧光染色

分别取分组为钙化抑制组的HASMC和钙化组的HASMC, 加入Triton100增加细胞通透性, 然后用4%多聚甲醛4℃固定后加入兔多克隆抗人BMP-4抗体过夜。用磷酸盐缓冲溶液洗涤后, 加入抗兔IgG的FITC-标记的二抗, 用DNA细胞核染料对细胞核进行染色, 最后用荧光显微镜进行观察分析。

1.7 RNA提取及实时定量PCR检测

收集细胞, Trizol提取细胞总RNA, 逆转录试剂盒操作步骤逆转录出cDNA, 以cDNA作为模板加入Notch2引物(5'-CAGGCGTCGCAGACAATGC-3'), 用RT-qPCR法测Notch2 mRNA的表达, β-actin作为内参。Notch2的扩增条件均为: 95℃预变性15 s, 95℃变性10 s, 60℃退火20 s, 72℃延伸15 s, 共40个循环, 对数据进行分析整理。

1.8 数据分析

统计分析运用SPSS 10.0软件, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 方差分析和t检验用来分析实验组与对照组间的差异, 采用双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

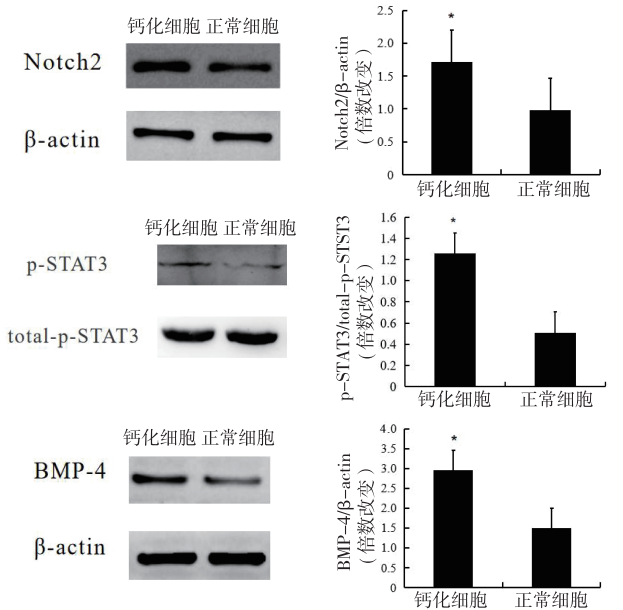
2.1 诱导钙化组中HASMC Notch2、p-STAT3和BMP-4蛋白高表达

正常对照组和诱导钙化组中HASMC Notch2、p-STAT3和BMP-4蛋白表达, 细胞培养上清液中BMP-4蛋白的含量, Notch2 mRNA的表达(图1~3): 向正常对照组和诱导钙化组两组HASMC中加入等量的重组型人IL-6(0.1 μg/mL)刺激12 h后, Western blotting法检测Notch2、p-STAT3和BMP-4蛋白的表达水平。由于BMP-4为细胞分泌蛋白, 采用ELISA法对其定量分析。采用RT-PCR检测两组细胞内Notch2 mRNA的表达。诱导钙化组中HASMC Notch2、p-STAT3和BMP-4蛋白表达水平明显高于正常对照组($P < 0.05$)。诱导钙化组的培养液上清中BMP-4蛋白含量为(66.42±2.89) pg/mL, 明显高于正常对照组的(22.35±2.68) pg/mL($P < 0.05$)。诱导钙化组中HASMC Notch2 mRNA的表达明显高于正常对照组($P < 0.05$)。

2.2 钙化抑制组中HASMC Notch2、p-STAT3和BMP-4蛋白表达均受抑制

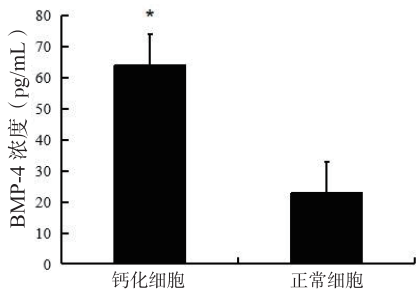
钙化对照组和钙化抑制组中HASMC Notch2、p-STAT3、BMP-4蛋白表达和细胞培养上清液中BMP-4蛋白的含量以及免疫荧光染色结果(图4~6): 钙化对照组及钙化抑制组两组HASMC中加入等量的重组型人IL-6(0.1 μg/mL), 12 h后Western blotting法检测Notch2、p-STAT3和BMP-4蛋白的表达水平。采用

ELISA法检测细胞上清液中BMP-4蛋白的含量。免疫荧光对两组细胞BMP-4蛋白进行荧光染色。钙化抑制组中HASMC Notch2、p-STAT3和BMP-4蛋白的表达水平明显低于钙化对照组 (P 均 <0.05)。钙化抑制组的培养液上清中BMP-4蛋白的含量为 (22.34 ± 3.82) pg/mL, 明显低于钙化对照组的 (62.89 ± 3.26) pg/mL (P 均 <0.05)。免疫荧光染色显示钙化抑制组中HASMC BMP-4蛋白表达明显低于钙化对照组。



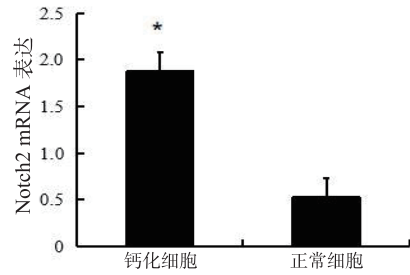
注: *表示与对照组比较, $P < 0.05$; t-p-STAT3: 总核转录因子STAT3。

图1 Western blotting法检测比较诱导钙化组和正常对照组HASMC Notch2、p-STAT3和BMP-4的蛋白表达水平 ($n=6$)



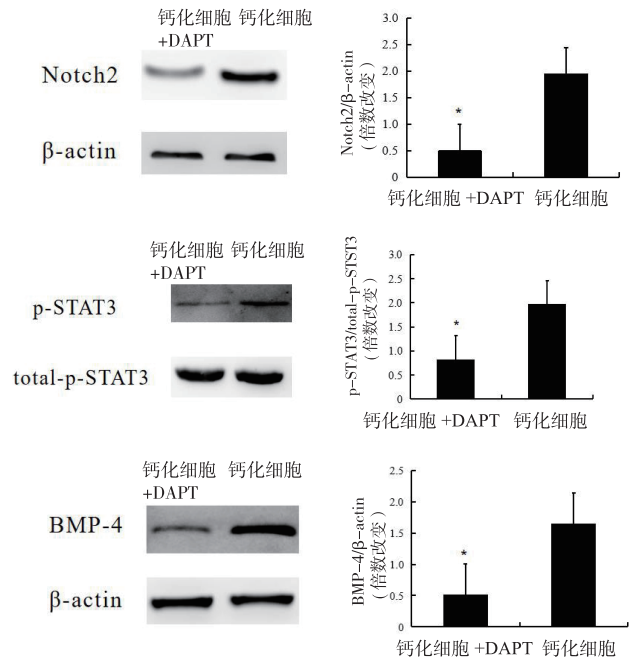
注: *表示与对照组比较, P 均 <0.05 。

图2 ELISA法检测诱导钙化组和正常对照组HASMC分泌蛋白BMP-4的表达 ($n=6$)



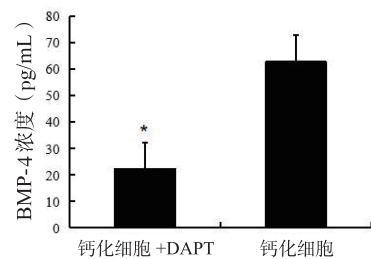
注: *表示与对照组比较, P 均 <0.05 。

图3 RT-PCR检测诱导钙化组和正常对照组HASMC Notch2 mRNA的表达 ($n=6$)



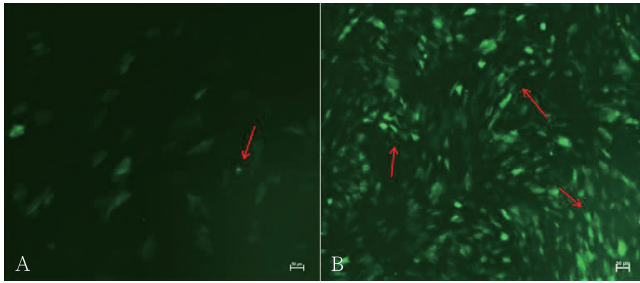
注: *表示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图4 Western blotting法检测比较钙化对照组和钙化抑制组HASMC Notch2、p-STAT和BMP-4的蛋白表达水平 ($n=6$)



注: *表示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图5 ELISA法检测钙化对照组和钙化抑制组HASMC分泌蛋白BMP-4的表达 ($n=6$)



注：A为钙化抑制组，较少BMP-4蛋白被染成绿色荧光；B为钙化对照组，大量分泌的BMP-4蛋白被染成绿色荧光（箭头所示）。

图6 钙化对照组和钙化抑制组HASMC分泌蛋白BMP-4
免疫荧光染色结果

3 讨论

血管钙化是心脑血管疾病发生的病理基础，是急性心血管事件发生的危险因素之一^[16]。目前研究表明，血管钙化和动脉粥样硬化的发生与环状RNA和长链非编码RNA等有密切联系^[17-18]。认为血管钙化是一个与成骨发育极其相似的主动性过程，受到环状RNA和长链非编码RNA等多因素调控^[19]。目前的研究表明HASMC的增殖、迁移、表型转化和炎症反应在血管钙化中可能起着重要的作用。HASMC的增殖、迁移和表型转化过程中释放多种生长因子和细胞因子，病理状态下还可分泌炎症因子和趋化因子等，其摄取脂质成为肌源性泡沫细胞，最终导致血管钙化^[20]。前期的研究发现，钙化的心脏瓣膜高表达Notch蛋白，并通过核因子 κ B途径加重其炎症反应，然而在HASMC中的研究甚少^[10-12]。本实验验证了炎症因子可激活Notch2蛋白，加强JAK-STAT3的磷酸化，促进HASMC分泌BMP-4，从而使HASMC向成骨细胞转化，加速血管钙化的进程。血管内皮细胞及血管平滑肌细胞受损后，导致HASMC处于病理状态，迁移和表型转化随之开始发生，HASMC的迁移和表型转化在血管炎症反应及血管钙化的发生中起着重要的病理作用^[21]。HASMC处于病理状态时，通过细胞信号转导最终到达细胞核内，诱导一系列与HASMC迁移和表型转化相关的基因表达，从而促进HASMC由内膜中层向内膜下迁移，并在内膜下进行分裂，分泌趋化因子，加重血管炎症反应^[22]。此外，BMP-4可通过加强氧化应激、内质网及线粒体应激来增加Runx2和Runx4的表达，Runx2与Runx4是调节成骨细胞比例和软骨细胞分化的核心转录因子，可进一步促进血管钙化的发生^[23]。

本实验研究JAK-STAT3通路与HASMC病理生理功能之间的关系，HASMC的增殖、迁移、表型转化和炎症反应为发病核心环节的血管炎症反应、血管重构和血管钙化等疾病提供了重要的实验基础和理论依据^[24]。随着对JAK-STAT3信号传导通路分子机制更深入的研究，JAK-STAT3信号传导通路有望成为与HASMC增殖、迁

移、表型转化和炎症反应致血管钙化等相关疾病的预防和治疗的靶点。

参考文献

- [1] Palit S, Kendrick J. Vascular calcification in chronic kidney disease: role of disordered mineral metabolism[J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(37):5829-5833.
- [2] Valdivielso JM. Vascular calcification: types and mechanisms [J]. *Nefrologia*, 2011, 31(2):142-147.
- [3] Bäck M, Hansson GK. Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12(4):199-211.
- [4] Park HJ, Kim MK, Kim Y, et al. Gastrin-releasing peptide promotes the migration of vascular smooth muscle cells through upregulation of matrix metalloproteinase-2 and -9[J]. *BMB Rep*, 2017, 50(12):628-633.
- [5] Li P, Li YL, Li ZY, et al. Cross talk between vascular smooth muscle cells and monocytes through interleukin-1 β /interleukin-18 signaling promotes vein graft thickening[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(9):2001-2011.
- [6] 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*, 2018, 233(6):4759-4769.
- [7] Kim K, Kim S, Moh SH, et al. Kaempferol inhibits vascular smooth muscle cell migration by modulating BMP-mediated miR-21 expression[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 407(1-2):143-149.
- [8] Cheng SL, Behrmann A, Shao JS, et al. Targeted reduction of vascular Msx1 and Msx2 mitigates arteriosclerotic calcification and aortic stiffness in LDLR-deficient mice fed diabetogenic diets[J]. *Diabetes*, 2014, 63(12):4326-4337.
- [9] Garg V, Muth AN, Ransom JF, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease[J]. *Nature*, 2005, 437(7056):270-274.
- [10] 凌秋洋, 刘洁, 徐佰达, 等. Notch1高表达可使钙化的人瓣膜间质细胞BMP-2/4表达增加[J]. *中华心血管病杂志*, 2016, 44(3):255-259.
- [11] 叶挺, 程治源, 凌秋洋, 等. Notch1蛋白在人心脏瓣膜间质细胞凋亡与钙化关系中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(2):122-128.
- [12] Cheng ZY, Ye T, Ling QY, et al. Parathyroid hormone promotes osteoblastic differentiation of endothelial cells via the extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and nuclear factor- κ B signaling pathways[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2):1754-1760.
- [13] Zhang L, Shao J, Zhou Y, et al. Inhibition of PDGF-BB-induced proliferation and migration in VSMCs by proanthocyanidin A2: involvement of KDR and Jak-2/STAT-3/cPLA2 signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98:847-855.
- [14] Ben P, Hu M, Wu H, et al. L-theanine down-regulates the JAK/STAT3 pathway to attenuate the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells induced by angiotensin II [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(11):1678-1684.
- [15] Tang X, Liu Y, Xiao Q, et al. Pathological cyclic strain promotes proliferation of vascular smooth muscle cells via the ACTH/ERK/STAT3 pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10):8260-8270.
- [16] Rogers MA, Aikawa E. Cardiovascular calcification: artificial intelligence and big data accelerate mechanistic discovery[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(5):261-274.
- [17] 石文坚, 花蕾, 孟洋光, 等. 环状RNA在动脉粥样硬化性心脏病中的研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2019, 40(9):1286-1289.
- [18] 李雪鹤, 李晓梅. 长链非编码RNA在急性心肌梗死发病中的研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2019, 40(9):1271-1274.
- [19] Durham AL, Speer MY, Scatena M, et al. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4):590-600.
- [20] Borland SJ, Morris TG, Borland SC, et al. Regulation of vascular smooth muscle

