

· 论 著 ·

网膜素对成骨细胞向钙化血管平滑肌细胞分化的影响及其机理

袁妙兰 段新云 马育林*

南方医科大学附属小榄医院, 中山 528415

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 03-0269-06

摘要: **目的** 探讨网膜素对成骨细胞向钙化血管平滑肌细胞(CVSMCs)分化的影响。**方法** 网膜素处理 VSMCs 细胞,用茜素红 S 染色确定基质矿化范围,用 PCR 探测碱性磷酸酶(ALP)及骨钙素表达,免疫印迹分析 MAPK 和 Akt 活性。**结果** 网膜素剂量依耐性抑制 CVSMCs ALP 及骨钙素 mRNA 转录($P < 0.05$);与对照组比较,100 ng/ml,500 ng/ml 及 1000 ng/ml 网膜素分别降低茜素红染色 22%、41% 及 85% ($P < 0.05$);网膜素时间依耐性提高 CVSMCs Akt 活性($P < 0.05$),对 ERK、p38 及 JNK 无影响;网膜素对 VSMCs 细胞内 cAMP 生成无明显影响。细胞用 LY294002 或 HIMO 处理后,网膜素对 ALP 活性及基质矿化的影响被消除了。**结论** 本研究结果首次表明网膜素通过 PI3K/Akt 途径抑制成骨细胞分化为 CVSMCs,表明肥胖者网膜素降低会促进动脉钙化的发展,网膜素有抑制动脉钙化的作用。

关键词: 网膜素;成骨细胞;血管平滑肌细胞;钙化;磷脂酰肌醇 3-激酶

Effect and mechanism of omentin on the differentiation of osteoblasts into calcifying vascular smooth muscle cells

YUAN Miaolan, DUAN Xinyun, MA Yulin

Department of Endocrinology, the Affiliated Xiaolan Hospital of Southern Medical University, Zhongshan, 528415, China

Corresponding author: MA Yulin, Email: shupinma@yahoo.com.cn

Abstract: **Objective** To investigate the effect of omentin on the differentiation of osteoblasts into calcifying vascular smooth muscle cells (CVSMCs). **Methods** VSMCs were treated with omentin. The extent of matrix mineralization was determined using Alizarin red staining. The mRNA expression of alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin was assayed using real-time quantitative RT-PCR. The MAPK and Akt activation were detected using Western blot analysis. **Results** Omentin dose-dependently inhibited the expression of ALP and osteocalcin mRNA ($P < 0.05$). Compared with the control group, omentin of 100 ng/ml, 500 ng/ml, and 1000ng/ml decreased Alizarin Red S staining by 22%, 41%, and 85% respectively ($P < 0.05$). Omentin time-dependently increased the activity of Akt in CVSMCs ($P < 0.05$), but had no effect on the activity of ERK, p38, and JNK. It also had no effect on intracellular cAMP generation. Treatment of cells with LY294002 or HIMO abolished the inhibitory effect of omentin on ALP activity and the matrix mineralization. **Conclusion** The present results demonstrate for the first time that omentin can inhibit differentiation of osteoblasts CVSMCs into via PI3K/Akt signaling pathway, suggesting that the lower omentin levels in obese subjects contribute to the development of arterial calcification, and omentin plays a protective role against arterial calcification.

Key words: Omentin; Osteoblast; Vascular smooth muscle cells; Calcification; Phosphatidylinositol 3-kinase

脂肪组织被认为是代谢高度活跃的内分泌器官,除调节脂肪量和营养平衡外,还释放大脂肪因子调节能量平衡、血压、血糖及血脂代谢、神经内分泌功能、细胞活力、进食、生育、炎症以及心血管功

能^[1]。

网膜素是两个基因组编码、选择性在内脏脂肪组织表达的新脂肪因子,血液里浓度较高^[2],人血浆网膜素主要异构体网膜素-1 浓度是 100ng - 1μg/ml。肥胖者血网膜素-1 水平降低,与多个代谢综合征标志物相关,与脂联素及高密度脂蛋白(HDL)正相关,与体重指数(BMI)、腰围、胰岛素抵抗指数及

瘦素水平负相关^[3]。因此,对网膜素调控心血管疾病机理的研究有助于心血管疾病病理的深入探索。

血管钙化有严重的临床后果,包括一系列疾病,如动脉硬化、糖尿病、终末期肾病,并认为网膜素是心血管事件^[4]及外周动脉病变^[5]的独立预测因子。另外,血管钙化被认为是高度受调控的过程,在许多方面与骨代谢的调控相似。在血管钙化过程中,多种血管细胞(MCs、周细胞、成纤维细胞)转化成成骨细胞表型,血管平滑肌细胞(VSMCs)起主要作用^[4]。在体外,表型转变的VSMCs表达骨相关基因及蛋白,如ALP及骨钙素,能形成矿化结节。

最近资料支持PI3K/Akt有阻止CSMCCa钙化的作用^[6]。另外,体外实验表明重组网膜素增强脂肪细胞Akt磷酸化^[7],而且通过Akt促进神经干细胞生长^[8]。本研究的目的是验证网膜素调控成骨细胞向VSMCs转化的作用及其信号通路。

1 材料和方法

1.1 材料

抗鼠及抗兔IgG及辣根过氧化物酶偶联抗体购自Santa Cruz生物技术公司,重组人网膜素购于美国细胞科学公司,LY294002和HIMO购于美国Calbiochem公司,磷酸化的ERK1/2(p-ERK1/2),p-p38,p-JNK,p-Akt,ERK1/2,p38,JNK及Akt抗体均购自美国细胞信号公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:小段胸主动脉来自人心脏移植捐赠者,分离动脉平滑肌细胞亚群CVSMCs。本实验经中南大学伦理委员会授权。CVSMCs生长在Dulbecco改良的Eagle培养基(Sigma公司),含15%小牛血清,并添加了L-谷氨酰胺(2 mmol/L)、丙酮酸钠(1 mmol/L)、盘尼西林(100 U/ml)、链霉素(100 μg/ml),均购自Sigma公司。茜素红S染色前6天,加5 mmol/L磷酸甘油和4 mmol/L氯化钙以最大程度增加矿化。

1.2.2 实时定量PCR(RT-PCR)分析mRNA表达:RT-PCR用罗氏MLC型PCR仪,按照以前描述方法完成^[7,9]。用Trizol试剂(Gibco)提取培养细胞总RNA,加1.0 μg总RNA在反转录系统(Promega)进行反转录反应。在25 μl反应体内进行扩增反应,反应体内包含引物及SYBR Green PCR反应混合液(PE Applied Biosystems)。每一次扩增反应加1 μl cDNA。通过预实验对引物浓度进行优化。PCR引物序列如下:ALP: 5'-GACCTCCTCGGAAGA

CACTC-3'; ALP: 5'-AGGCCCATTGCCATACAG-3'; osteocalcin: 5'-GCAGAGTCCAGCAAAGGTG-3'; osteocalcin 反义核酸: 5'-GCTCCCAGCCATTGATACAG-3'; β-actin: 5'-CCCAGCCATGTACGTTGCTA-3'; β-actin 反义核酸: 5'-AGGGCATACCCCTCGTAGATG-3'。

每一扩增反应完成后,出现并行的三条测量曲线,每一个实验中每一份样品分析三次,每一实验至少重复2次,扩增数据用序列检测系统软件(PE Applied Biosystems)分析。用β-actin扩增对照的交叉阈值(Ct)标化测试Cr值,从而得到相对定量分析的结果,Ct结果用β-actin标化后以对照的百分数来表示。

1.2.3 ALP活性,骨钙素分泌分析:CVSMCs在24孔板培养。培养板用PBS洗涤三次,单层细胞移入裂解液(20 mM Tris 盐酸,150 mmol/L 氯化钠,1% Triton X-100,0.02% NaN₃,1 μg/ml 抑肽酶),裂解液匀浆用超声处理20秒。ALP活性用专用试剂盒(Sigma公司)测定,用放免法测定培养液中的骨钙素。

1.2.4 基质矿化测定:CVSMCs在24孔板内培养18天,用茜素红S染色确定基质矿化范围^[10]。在室温下,细胞用70%乙醇处理1小时,40 mmol/L 茜素红S染色10分钟。用PBS洗涤以除去非特异染色。十六烷基吡啶氯化物孵育15分钟后茜素红S染色从细胞基质释放出来,释放的染料量用分光光度计测量,结果标化为细胞总蛋白量。

1.2.5 免疫印迹分析MAPK和Akt活性:免疫印迹分析方法如前报道^[11]。处理后的细胞快速用含5 mmol/L EDTA及0.1 mmol/L 四氧嘧啶的冰PBS洗涤,然后在包含20 mmol/L Tris 盐酸(Ph7.5)、150 mmol/L 氯化钠,1% Triton X-100、10 mmol/L 10% 磷酸氢二钠、10% 甘油、2 mmol/L 四氧嘧啶、10 mmol/L 氟化钠、1 mmol/L ABSF、10 μg/ml 亮肽素和10 μg/ml 抑肽酶的裂解缓冲液里裂解。蛋白质浓度用Bradford蛋白分析系统测定,等量蛋白(50 μg/板)加载到7.5%聚丙烯酰胺凝胶,电泳后,SDS-PAGE分离的蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜,用2.5%脱脂牛奶在PBS里阻断,然后与p-ERK1/2、ERK1/2、p-p38、p38、p-JNK、JNK、p-Akt和Akt一抗一起孵育,最后用相应HRP偶联的二抗探测,印迹用ECL试剂盒处理并在X线胶卷曝光。

1.2.6 cAMP测定:CVSMCs在24孔板培养。用安慰剂、网膜素(1000 ng/ml)或TNF-α(100 ng/ml)孵育

30 分钟后,培养基通气。用三氯乙酸对细胞提取物进行沉淀后,用 cAMP 分析试剂盒测定 cAMP 浓度。

1.3 统计学分析

用 SPSS11.0 软件进行统计分析。结果用 $\bar{x} \pm S$ 表示,各组之间比较用 one-way ANOVA。所有体外实验均重复至少 3 次。

2 结果

2.1 网膜素对成骨细胞向 CVSMCs 分化的影响

分别用 100、500 及 1000 ng/ml 网膜素处理细胞 12、24、及 48 小时,RT-PCR 分析显示网膜素剂量依赖性抑制 CVSMCs ALP 及骨钙素的转录(图 1)。

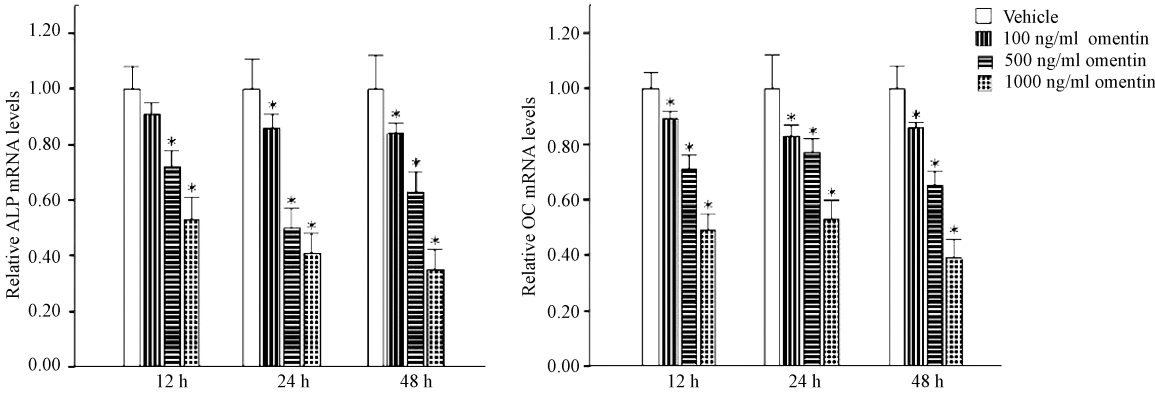


图 1 网膜素对 CVSMCs ALP 及骨钙素 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

注:结果以对照细胞的百分数表示,* $P < 0.05$,与安慰剂对照细胞比较有统计学差异。

Fig. 1 Effect of omentin on ALP and osteocalcin mRNA expression in CVSMCs ($\bar{x} \pm s$).

Note: Results are expressed as percents of control cells. The bars represent the mean $\pm$ SD ($n = 3$; * $P < 0.05$ versus vehicle-treated control cells).

网膜素 (100 - 1000 ng/ml) 剂量依赖性抑制 CVSMCs ALP 及骨钙素生成(图 2A,2B)。培养 12 -

48 小时结果显示 1000 ng/ml 网膜素时间依赖性抑制 CVSMCs 细胞 ALP 活血及骨钙素生成(图 2A,2B)。

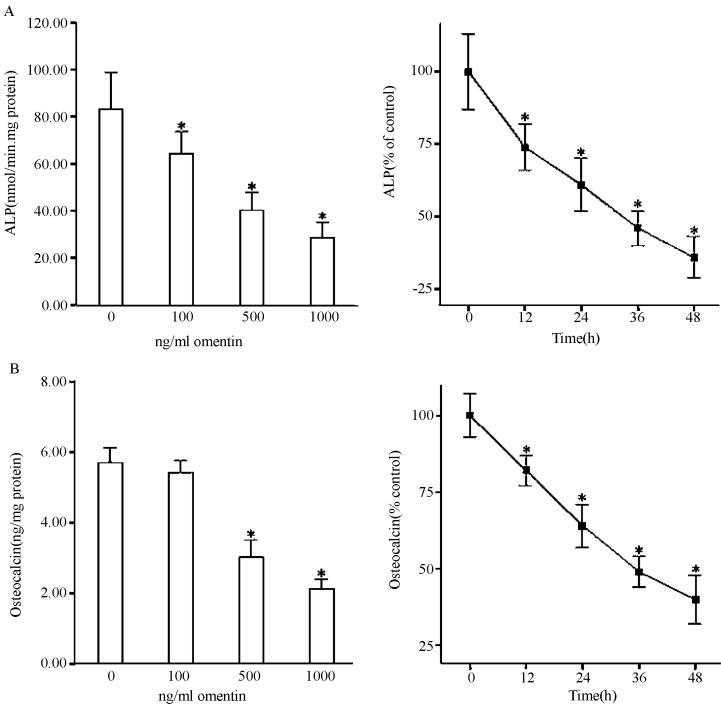


图 2 网膜素对 VSMCs ALP 活性及骨钙素分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$)

注:A: 在培养 CVSMCs,网膜素对 ALP 活性的影响呈剂量及时间依赖性, $n = 6$,* $P < 0.05$,与对照细胞比较有统计学差异;B: 在培养 CVSMCs,网膜素对骨钙素分泌的影响剂量及时间依赖性, $n = 6$,* $P < 0.05$,与对照细胞比较有统计学差异。

Fig. 2 Effect of omentin on ALP activity and osteocalcin secretion in VSMCs ($\bar{x} \pm s$).

Note: A: The dose and time response of omentin on ALP activity in cultured CVSMCs. $n = 6$; * $P < 0.05$; versus control. B: The dose and time response of omentin on osteocalcin secretion in cultured CVSMCs. Bar represents mean $\pm$ SD ($n = 6$; * $P < 0.05$; versus control).

另外,培养 18 天结果显示网膜素(100 – 1000 ng/ml)剂量依赖性抑制 CVSMCs 细胞基质矿化(图 3)。上部方块显示茜素红染色代表性的培养皿。我们观察到与对照组比较,100,500 及 1000 ng/ml 网膜素分别降低茜素红染色 22%,41% 及 85%。

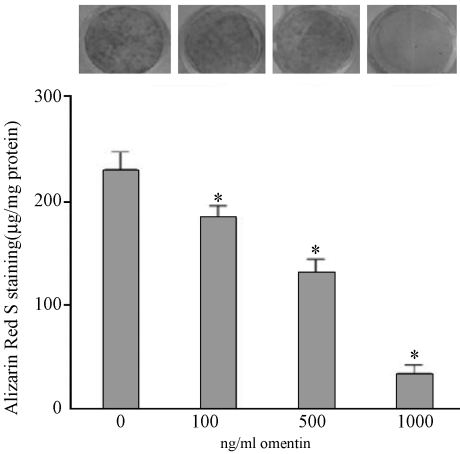


图 3 网膜素抑制 CVSMCs 基质矿化

注:上部方块:茜素红 S 的 24 孔板代表孔全景图;下部直方图:十六烷基吡啶氯化物提取的茜素红染料定量; $n = 4$; * $P < 0.05$: 与对照组比较差异有统计学意义。

Fig. 3 Omentin inhibited the matrix mineralization in CVSMCs
Note: Upper panel: the representative entire plate views of the Alizarin red S staining in 24-well plates. Lower panel: quantification of Alizarin red S staining via extraction with cetyl-pyridiniumchloride. $n = 4$; * $P < 0.05$; versus control.

细胞用 100 ng/mlTNF- α 处理 15 分钟作为阳性对照,1000 ng/ml 网膜素处理 5 – 60 分钟。蛋白质印迹分析发现,培养 5 分钟后网膜素提高 CVSMCs

Akt 活性,30 分钟及 60 分钟更明显,峰值出现在 30 分钟(图 4A)。结果显示网膜素对 ERK、p38 及 JNK 无影响(图 4B)。而 TNF- α 处理的细胞出现 p-ERK、p-p38 及 p-JNK 带(图 4B)。图 4C 示网膜素对 Akt 的作用被 PI3K 抑制剂 LY294002 或 Akt 抑制剂 HIMO 所抑制。

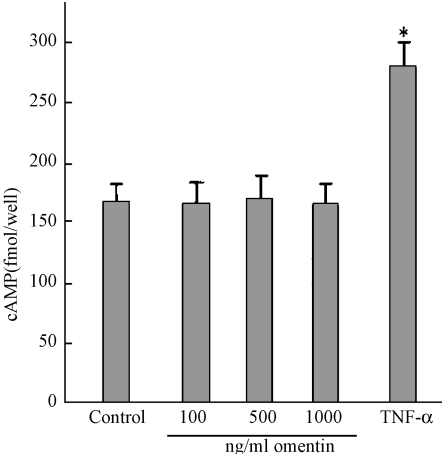


图 4 网膜素对 CVSMCs ERK、p38、JNK 和 Akt 活性的影响

Fig. 4 Effect of omentin on ERK, p38, JNK, and Akt activation in CVSMCs

2.2 网膜素对细胞内 cAMP 生成的影响

细胞用安慰剂、100 ng/mlTNF- α 或 100 – 1000 ng/ml 网膜素处理 30 分钟。图 5 显示网膜素对 VSMCs 细胞内 cAMP 生成无明显影响,而 TNF- α 处理的细胞内 cAMP 水平升高。

2.3 PI3K/Akt 对网膜素抑制骨形成的作用

细胞用 LY294002 或 HIMO 处理后,网膜素对 ALP 活性(图 6A)及基质矿化(图 6B)的影响被消除了,表明网膜素抑制成骨细胞向 CVSMCs 的分化通过 PI3K/Akt 信号通路。

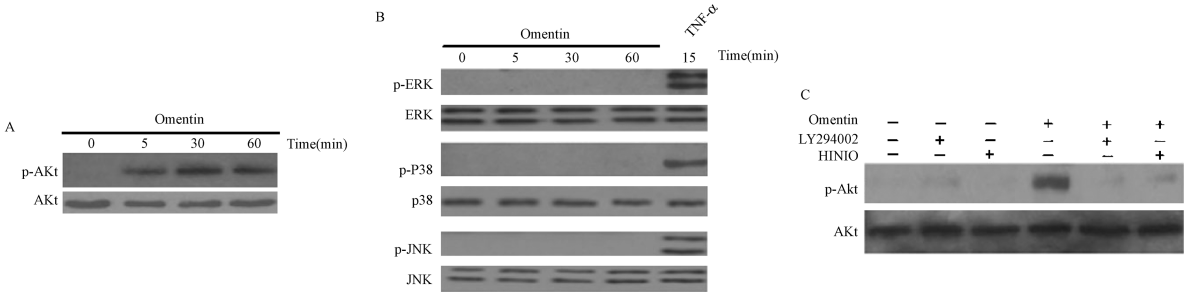


图 5 网膜素对 CVSMCs 细胞内 cAMP 量的影响($\bar{x} \pm s$)

注: * $P < 0.05$; 与对照组比较差异有统计学意义。

Fig. 5 Effect of omentin on intracellular cAMP level in CVSMCs ($\bar{x} \pm s$)

Note: * $P < 0.05$; versus control.

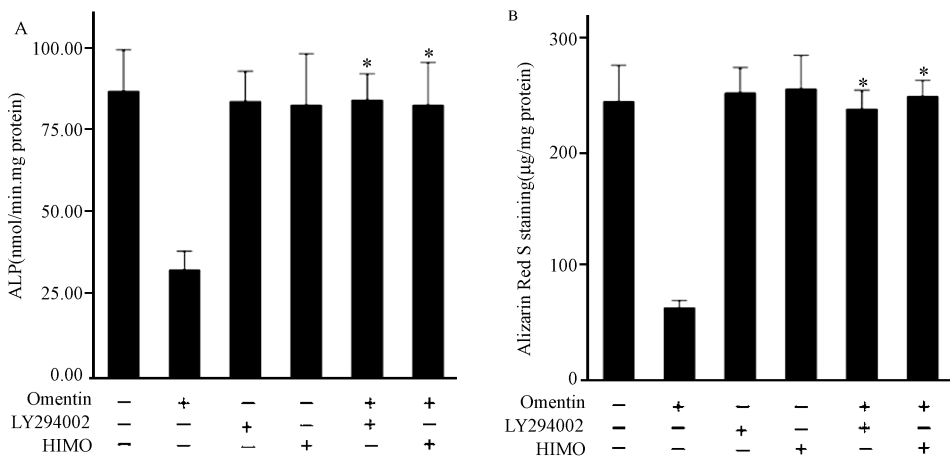


图 6 抑制 PI3K/Akt 对网膜素对成骨细胞向 CVSMCs 细胞分化的影响($\bar{x} \pm s$)
注:A: $n=6$, * $P<0.05$: 与网膜素处理对照细胞比较差异有统计学意义;B: $n=4$, * $P<0.05$: 与网膜素处理对照细胞比较差异有统计学意义。
Fig. 6 Effect of PI3K/Akt inhibition on inhibitory action of omentin in differentiation of CVSMCs by osteoblasts ($\bar{x} \pm s$).
Note: A: $n=6$; * $P<0.05$: versus omentin-treated control. B: $n=4$; * $P<0.05$: versus omentin-treated control.

3 讨论

网膜素最近确认为新的脂肪因子,在内脏脂肪高表达,血浆浓度高。然而,网膜素对 VSMCs 细胞的作用没有报道。最近报道表明生理浓度(100 – 1000 ng/ml)网膜素可抑制成骨细胞向 CVSMCs 细胞分化。网膜素抑制 CVSMCs 细胞的钙化作用似乎是通过增强 PI3K/Akt 信号通路。

就脂肪组织的区域分别来说,肥胖是一种异质性状态。腹型肥胖指大网膜及肠系膜脂肪堆积,外周型肥胖一般指皮下脂肪堆积。研究证明腹型肥胖者是心血管疾病高危人群,相关危险因子包括糖尿病、胰岛素抵抗、高血压、脂代谢紊乱^[12]。肥胖并发心血管疾病众所周知,但过去 20 年里对脂肪因子的广泛研究终于在肥胖及心血管疾病之间建立了可信的关联^[13]。因来源于大网膜脂肪组织的脂肪因子与心血管疾病相关^[14,15],新的大网膜脂肪因子如网膜素可能在心血管疾病的发生发展中起重要作用^[16]。

血浆网膜素及脂肪组织网膜素 mRNA 水平均与肥胖负相关,血浆网膜素与 BMI、腰围、瘦素、血糖胰岛素及胰岛素抵抗指数负相关^[17],与 HDL 正相关^[3],与脂联素相似,同属心血管保护脂肪因子。事实上,血脂联素水平与网膜素正相关^[18]。这一点很重要,因为脂联素和网膜素是迄今为止报道的两

个在肥胖者血浆水平唯一降低的脂肪因子^[3]。肥胖与脂联素及网膜素之间负相关的关系可能表明血网膜素及脂联素水平可以作为消瘦或抵抗肥胖及其不良后果的指标。

腹部脂肪沉积和动脉硬化均与心血管事件相关,表明两者之间有关联。多个研究发现内脏脂肪沉积与动脉硬化相关。交叉分析研究发现腹型肥胖是冠状动脉硬化的独立危险因子^[19],Conway 等发现冠状动脉钙化与内脏脂肪沉积正相关。在 1 型糖尿病及非糖尿病患者,血浆脂联素水平独立于其他心血管危险因子而与冠脉钙化相关。另外,最近一项研究发现脂联素对无机磷介导的 VSMCs 细胞凋亡和钙化有抑制作用^[20],网膜素还能抑制 TNF- α 介导的血管平滑肌损伤^[21]。在本研究,我们第一次发现网膜素能抑制成骨细胞向 CVSMCs 细胞分化。

为了深入阐述网膜素抑制成骨细胞向 CVSMCs 细胞分化的机理,我们对相关信号传导过程进行了探究。丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)和 PI3K/Akt 是众所周知的调控多数细胞增殖、凋亡和分化的重要因子。最近资料支持 PI3K/Akt 在抑制 VSMCs 细胞钙化中起决定重要^[6,22]。Radcliff 等揭示胰岛素样生长因子 1(IGF-1)通过 PI3K 信号通路抑制成骨细胞向 VSMCs 细胞分化及矿化。Son 等^[6]研究发现他汀类降脂药通过上调 Akt 磷酸化而抑制无机磷介导的 VSMCs 凋亡。Collect 等^[22]发现 Ax1 受体酪

氨基酸激酶通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制 VSMCs 矿盐沉积。另外,体外实验显示重组网膜素能激发脂肪细胞 Akt 信号通路^[7]。本研究结果揭示网膜素通过 PI3K/Akt 通路抑制成骨细胞向 CVSMCs 细胞分化。

因为 cAMP 通路促进成骨细胞向 CVSMCs 细胞分化,我们亦探究了 cAMP 通路是否参与网膜素信号。我们目前资料表明网膜素对 CVSMCs 细胞 cAMP 产生无影响,这表明 cAMP 通路没有参与网膜素调控成骨细胞向 CVSMCs 细胞分化的信号转导。

总之,我们结果表明网膜素通过 PI3K/Akt 信号通路抑制成骨细胞分化为 CVSMCs 细胞,这表明肥胖者(尤其是腹型肥胖)血网膜素降低会促进动脉钙化的发展,网膜素是动脉钙化的保护因子。

致谢:感谢谢辉博士对分子生物学实验的指导。

【参 考 文 献】

- [1] Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27:996-1003.
- [2] Yang RZ, Lee MJ, Hu H, et al. Identification of omentin as a novel eptot-specificdipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 290:E1253-E1261.
- [3] Moreno-Navarrete JM, Catala'n V, Ortega F, et al. Circulating omentin concentration increases after weight loss. *Nutr Metab (Lond)*, 2010, 7:27.
- [4] Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation*, 2008, 117:2938-2948.
- [5] Onur I, Oz F, Yildiz S, et al. A decreased serum omentin-1 level may be an independent risk factor for peripheral arterial disease. *Int Angiol*, 2014, 33:455-60.
- [6] Son BK, Kozaki K, Iijima K, et al. Gas6/Axl-PI3K/Akt pathway plays a central role in the effect of statins on inorganic phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, 2007, 556:1-8.
- [7] Xie H, Sun M, Liao XB, et al. Estrogen receptor-alpha36 mediates a bone-sparing effect of 17beta-estrodilol in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*, 2011, 26:156-168.
- [8] Zhao LR, Du YJ, Chen L, et al. Omentin-1 promotes the growth of neural stem cells via activation of Akt signaling. *Mol Med Rep*, 2014, [Epub ahead of print].
- [9] Xie H, Tang LL, Luo XH, et al. Suppressive effect of dexamethasone on TIMP-1 production involves murine osteoblastic MC3T3-E1 cell apoptosis. *Amino Acids*, 2010, 38:1145-1153.

- [10] Li H, Xie H, Liu W, et al. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest*, 2009, 119:3666-3677.
- [11] Liao XB, Peng YQ, Zhou XM, et al. Taurine restores Axl/Gas6 expression in vascular smooth muscle cell calcification model. *Amino Acids*, 2010, 39:375-383.
- [12] Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*, 2007, 116:39-48.
- [13] Despre s JP, Lemieux I. Abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Nature*, 2006, 444:881-887.
- [14] Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27:996-1003.
- [15] Gualillo O, Gonza'lez-Juanatey JR, Lago F. The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17:275-283.
- [16] Kadoglou NP, Tahmatzidis DK, Giannakoulas C, et al. Serum levels of novel adipokines, omentin-1 and chemerin, in patients with acute myocardial infarction: KOZANI STUDY. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2014, [Epub ahead of print].
- [17] Brandt B, Mazaki-Tovi S, Hemi R, et al. Omentin, an adipokine with insulin-sensitizing properties, is negatively associated with insulin resistance in normal gestation. *J Perinat Med*, 2014, [Epub ahead of print].
- [18] de Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ, et al. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes*, 2007, 56:1655-1661.
- [19] Allison MA, Michael Wright C. Body morphology differentially predicts coronary calcium. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004, 28:396-401.
- [20] Son BK, Akishita M, Iijima K, et al. Adiponectin antagonizes stimulatory effect of tumor necrosis factor-alpha on vascular smooth muscle cell calcification: regulation of growth arrest-specific gene 6-mediated survival pathway by adenosine 50-monophosphate-activated protein kinase. *Endocrinology*, 2008, 149:1646-1653.
- [21] Kazama K, Usui T, Okada M, et al. Omentin plays an anti-inflammatory role through inhibition of TNF-α-induced superoxide production in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, 2012, 686(1-3).
- [22] Collett GD, Sage AP, Kirton JP, et al. Axl/phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits mineral deposition by vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 2007, 100:502-509.

(收稿日期: 2014-11-20)