

## 血管钙化的表观遗传调控

钟 慧<sup>1</sup>, 王苏樱<sup>2</sup>, 李带瑛<sup>2</sup>, 陈洁仪<sup>2</sup>, 陈佳欣<sup>1</sup>, 谭 笑<sup>1</sup>, 虞红娇<sup>2</sup>, 高 军<sup>3</sup>, 朱东兴<sup>1</sup>

(1. 广州医科大学基础医学院基础医学研究中心, 2. 广州医科大学生命科学院, 广东省广州市 511436;

3. 广州医科大学附属第六医院, 广东省清远市 511518)

[专家简介] 朱东兴, 博士, 广州医科大学基础医学院教授, 博士研究生导师。2013 年毕业于英国爱丁堡大学罗斯林研究所, 获博士学位; 2013—2017 年分别在爱丁堡大学罗斯林研究所和纽卡斯尔大学医学院遗传医学研究所从事博士后研究; 2017 年全职回国, 受聘广州医科大学基础医学院南山学者副教授, 硕士研究生导师; 2020 年 3 月获聘广州医科大学基础医学院南山学者特聘教授, 博士研究生导师。主要从事钙化性心血管疾病发病机制研究, 近年来主持国家自然科学基金、广东省自然科学基金等多项科研项目, 目前已在 *Cardiovascular Research*、*Journal of Biological Chemistry* 等国际知名刊物上以通信作者等身份发表论文 20 余篇, 他引次数总计 600 次以上。

[关键词] 血管钙化; 表观遗传调控; 血管平滑肌细胞; 成骨分化

[摘要] 血管钙化是慢性肾病、糖尿病、高血压和动脉粥样硬化等疾病共同存在的血管病变, 其是上述疾病患者心血管事件显著上升的重要危险因素。目前尚无有效药物可以预防或者逆转血管钙化。既往研究表明, 血管钙化是一个主动的、可调控的、细胞介导的病理过程, 高度类似于骨发生和骨代谢。血管平滑肌细胞向成骨样细胞转分化是血管钙化发生的关键机制。目前的研究表明, 多种表观遗传调控途径参与血管钙化的病理进程。本文主要从 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA 这三个层面综述血管钙化的表观遗传调控机制。靶向表观遗传调控因子有望为防治血管钙化提供新的策略。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A



### Epigenetic regulation of vascular calcification

ZHONG Hui<sup>1</sup>, WANG Suying<sup>2</sup>, LI Daiying<sup>2</sup>, CHEN Jieyi<sup>2</sup>, CHEN Jiaxin<sup>1</sup>, TAN Xiao<sup>1</sup>, YU Hongjiao<sup>2</sup>, GAO Jun<sup>3</sup>, ZHU Dongxing<sup>1</sup>

(1. Biomedical Research Center, Basic Medical School, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 511436, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 511436, China; 3. The Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan, Guangdong 511518, China)

[KEY WORDS] vascular calcification; epigenetic regulation; vascular smooth muscle cells; osteogenic transition

[ABSTRACT] Vascular calcification is a common clinical complication in patients with chronic kidney disease, diabetes, hypertension and atherosclerosis. It is a significant risk factor for future cardiovascular events in these patients.

There are currently no effective medications to slow or reverse the progression of vascular calcification. It has been previously reported that vascular calcification is an actively cellular-mediated pathological process, which shares many similarities to that of bone formation and bone metabolisms. The osteogenic transition of vascular smooth muscle cells plays an important role in vascular calcification. Recently, epigenetic regulators have emerged as key mediators of vascular calcification. This review summarizes our current understanding of epigenetic regulators such as DNA methylation, histone modification and non-coding RNAs in the pathogenesis of vascular calcification. Targeting epigenetic regulators may represent a novel strategy to treat vascular calcification.

[收稿日期] 2021-05-11

[修回日期] 2021-07-06

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81800428); 广州市羊城学者科研项目(202032768); 广东省自然科学基金博士启动项目(2018A030310178); 广东省教育厅特色创新项目(2017KTSCX158); 广州市科技计划项目(201904010289)

[作者简介] 钟慧, 硕士研究生, 研究方向为血管钙化, E-mail 为 Zhonghuiyary@163.com。通信作者朱东兴, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为钙化性心血管疾病, E-mail 为 dongxing.zhu@gzhmu.edu.cn。

血管钙化(vascular calcification, VC)指的是磷酸钙盐以羟基磷灰石为主要形式在血管壁中的异常沉积,它是慢性肾病、动脉粥样硬化、糖尿病等共同存在的血管病变<sup>[1]</sup>。研究表明,血管钙化是心血管事件发生的重要独立危险因素,与上述患者心血管疾病的发病率和死亡率密切相关<sup>[2]</sup>。血管钙化主要分为血管内膜钙化和中膜钙化。血管内膜钙化常见于动脉粥样硬化患者的血管内膜,与动脉粥样硬化斑块的稳定性显著相关,而血管中膜钙化则常发生于慢性肾病、糖尿病、高血压等患者的血管中膜,可引起血管的僵硬性增加、顺应性下降,从而增加心血管疾病的风险<sup>[3]</sup>。目前尚无有效药物可以预防或者逆转血管钙化。因此,深入研究血管钙化的发病机制,发现防治血管钙化的潜在药物靶点和新型干预策略,对于降低慢性肾病、动脉粥样硬化和糖尿病等患者的心血管死亡率具有十分重要的意义。

既往认为,血管钙化是磷酸钙盐在血管壁中的被动沉积,而近年来的研究则表明,血管钙化是一个由细胞介导的、主动的、可调控的病理过程,其高度类似于骨发育和骨代谢过程<sup>[4]</sup>。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)是构成血管壁的主要细胞成分。在血管钙化发生过程中, VSMC 中收缩型标志物如平滑肌 22 $\alpha$  (smooth muscle 22 $\alpha$ , SM22 $\alpha$ )、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)等表达量显著降低,而成骨样标志物如 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2)、骨形成蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、骨钙素等表达量显著上升<sup>[5]</sup>。后续研究证实,在 VSMC 中特异性过表达成骨基因 Runx2 和 BMP-2 可显著促进血管钙化的发生<sup>[6-7]</sup>。这些研究表明, VSMC 向成骨样细胞转分化在血管钙化发生过程中具有重要作用。此外, VSMC 的衰老、VSMC 释放的凋亡小体和基质囊泡、钙化抑制因子与促进因子失衡等均参与了血管钙化的病理进程<sup>[8-11]</sup>。

表观遗传调控指的是在 DNA 序列不变的情况下基因表达发生的可遗传性改变。目前已知的表观遗传调控的主要机制包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA。大量研究证实,表观遗传调控因子在肿瘤、心血管疾病、自身免疫性疾病和神经系统疾病等多种疾病中发挥着重要作用。近年来,越来越多的研究表明表观遗传调控在多个层面参与血管钙化的病理进程。本文将围绕 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA 这三种主要的表观遗传调

控机制来探讨表观遗传调控在血管钙化病理进程中的重要作用。

## 1 DNA 甲基化与血管钙化

DNA 甲基化是表观遗传修饰的重要方式之一,与基因表达、染色质修饰、基因组印迹、基因沉默等在内的多种遗传事件有关。近年来, DNA 甲基化在血管钙化进程中的作用日益受到关注。DNA 甲基化酶抑制剂 5-aza-2'-deoxycytidine 可显著降低血管钙化关键调控基因碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)启动子区域的甲基化水平,上调 ALP 的表达,继而促进高磷诱导的 VSMC 钙化<sup>[12]</sup>。此外,在急性动脉损伤、慢性肾功能衰竭、动脉粥样斑块等动脉僵硬模型中, DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 的表达水平显著降低。进一步的实验发现,抑制 DNMT1 的表达在体内显著增加动脉硬化,并促进 VSMC 钙化和向成骨样细胞转分化<sup>[13]</sup>。

Klotho 不仅是一种抗衰老基因,对肾脏也有重要的保护作用。Klotho 基因缺失与慢性肾病和血管钙化的发生显著相关。硫酸吡啶酚处理显著增强 Klotho 基因启动子区域的甲基化水平,下调 Klotho 基因表达,从而促进慢性肾病血管钙化进展<sup>[14]</sup>。在比较了 324 例缺血性中风患者后, Zhou 等<sup>[15]</sup>发现周期素依赖性激酶抑制因子 2B (cyclin dependent kinase inhibitor 2B, CDKN2B) 启动子区域的甲基化水平与主动脉弓钙化程度显著相关。在高磷诱导的 VSMC 体外钙化过程中, DNA 甲基转移酶 DNMT3a 表达显著上调,继而增加 miR-204 启动子区域的甲基化水平并下调其表达,且 DNMT3a 是 miR-204 的直接靶基因<sup>[16]</sup>。该研究团队进一步发现,在钙化的 VSMC 和动脉血管中, miR-34b 表达量下调与 DNMT3a 介导的位于 miR-34b 上游 DNA 区域的 CpG 位点高甲基化水平有关。miR-34b 通过直接靶向调控 Notch1 的表达抑制血管钙化<sup>[17]</sup>。Dritsoula 等<sup>[18]</sup>对慢性肾病患者的动脉血管和正常血管进行了全基因组甲基化分析,发现了 319 个甲基化区域的甲基化水平存在显著差异。信号通路分析表明,上述甲基化水平存在差异的区域主要与调控胚胎及血管发育的基因及转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 和成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 信号通路有关。上述系列研究表明, DNA 甲基化是慢性肾病患者血管钙化的重要调控因子。

## 2 组蛋白修饰与血管钙化

组蛋白是存在于真核生物细胞内染色体上与DNA结合的碱性蛋白质,对维持染色体的结构和功能起重要作用。组蛋白乙酰化修饰是组蛋白修饰的一种重要方式,主要发生在组蛋白H3、H4的N端比较保守的赖氨酸位置上,由组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)共同催化完成,协同控制染色质组蛋白的乙酰化程度,使染色质结构发生动态变化,从而调控基因转录和DNA损伤修复等<sup>[19]</sup>。根据细胞内定位不同,HAT可分为A型和B型。A型HAT定位于细胞核,主要参与调控基因转录,包括5种亚型:MYST、GANT、p300/CBP、核受体辅活化因子和基础转录因子<sup>[20]</sup>。B型HAT定位于细胞质中,目前仅有少量成员被发现,主要包括HAT1和HAT4。B型HAT主要是乙酰化游离组蛋白和细胞质中的底物,调控其蛋白结构和功能<sup>[20]</sup>。p300/CBP是当前研究最为深入的HAT,其通过支架、桥接或者激活内源性HAT作为转录辅激活因子以调控基因表达<sup>[21]</sup>。研究发现,p300/CBP可与Runx2直接相互作用,增强Runx2与Osteocalcin启动子的结合能力,从而促进成骨细胞的成骨作用<sup>[22]</sup>。p300/CBP抑制剂C646显著下调组蛋白H3和H4的乙酰化水平和成骨基因Runx2、Osteocalcin和ALP的表达,从而抑制主动脉瓣钙化<sup>[23-24]</sup>。这些研究提示,组蛋白乙酰化修饰在血管钙化病理进程中具有重要的调控作用。

HDAC的主要功能是促进组蛋白的去乙酰化,降低组蛋白乙酰化水平,使组蛋白与DNA紧密结合,导致染色质结构致密卷曲,从而抑制基因转录<sup>[25]</sup>。然而,越来越多的研究发现HDAC也能促进大量非组蛋白发生去乙酰化,进而影响其蛋白稳定性和生物学功能。哺乳类动物的HDAC可以分为四类:I类HDAC包括HDAC1、HDAC2、HDAC3和HDAC8,在人体的组织和细胞中广泛表达,主要存在于细胞核中;II类HDAC主要有HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9和HDAC10,在组织中特异性表达;III类HDAC包含一系列沉默信息调节因子(silent information regulator, Sirt),它们的去乙酰化酶活性则需要辅助因子辅酶I( $\text{NAD}^+$ )的激活,可被烟酰胺(nicotinamide, NAM)抑制;IV类HDAC为一个孤立的HDAC11。I、II、IV类HDAC的去乙酰化酶活性都依赖其 $\text{Zn}^{2+}$ 结构域,对曲古抑

菌素A(trichostatin A, TSA)敏感<sup>[26]</sup>。

目前HDAC在血管钙化进程中的作用和机制尚不完全清楚,其很有可能作为转录抑制因子调控下游靶基因表达,从而参与血管钙化病理进程。研究发现, $\text{Zn}^{2+}$ 依赖型的HDAC泛抑制剂TSA通过上调ALP的表达促进高磷诱导的VSMC钙化<sup>[27]</sup>。我们团队近期发现 $\text{Zn}^{2+}$ 处理可剂量依赖性抑制瓣膜间质细胞钙化,这可能与 $\text{Zn}^{2+}$ 依赖型的HDAC被激活相关<sup>[28]</sup>。值得注意的是,HDAC各成员调控的下游靶基因不同,发挥功能的作用方式也不相同。因此,HDAC各家族成员在血管钙化进程中也发挥着不同的作用。有文献报道,HDAC1蛋白水平在钙化的VSMC和小鼠血管中表达量显著降低<sup>[29]</sup>。HDAC抑制剂TSA处理或在VSMC中特异性敲除HDAC1均显著促进高剂量Vitamin D3诱导的血管钙化<sup>[29]</sup>。与之相反,HDAC4则被证实能促进血管钙化的发生,这主要依赖于HDAC4从细胞核向细胞质中的转移。在细胞质中,HDAC4通过与细胞骨架相关蛋白ENIGMA直接相互作用促进血管钙化<sup>[30]</sup>。Malhotra等和我们团队近期相继报道了HDAC9在血管钙化中的重要作用<sup>[31-32]</sup>。当前关于HDAC与血管钙化的研究相对集中于 $\text{Zn}^{2+}$ 依赖型HDAC,而 $\text{NAD}^+$ 依赖型的Sirtuin在血管钙化中的研究则相对较少,仅有少量文献报道了Sirt1对血管钙化的抑制作用<sup>[8,33]</sup>。Sirtuin其他家族成员是否参与了血管钙化的病理进程及其具体分子机制仍有待于进一步研究。

## 3 非编码RNA与血管钙化

研究表明,非编码RNA具有重要的生物学功能,在细胞增殖、迁移、凋亡等基本生命活动及肿瘤、心血管疾病等病理进程中发挥着关键作用<sup>[34]</sup>。根据其长度大小和结构不同,非编码RNA可大致分为长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)、短链非编码RNA和环状RNA(circular RNA, circRNA)<sup>[34]</sup>。近年来,lncRNA、microRNA和circRNA在血管钙化中的重要作用被相继发现。

microRNA是目前血管钙化领域研究最为深入的非编码RNA,越来越多的microRNA被发现能抑制血管钙化的病理进程。文献报道,miR-29a/b通过靶向调控含血小板凝血酶敏感蛋白的解聚蛋白样金属蛋白酶7(A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7, ADAMS-7)的表达抑制



血管钙化的发生<sup>[35]</sup>。Zhang 等<sup>[36]</sup>研究发现过表达 miR-29b 下调 Wnt7b/ $\beta$ -catenin 信号通路,从而抑制硫酸吡哆酚诱导的 VSMC 成骨样分化和血管钙化。此外,miR-30 家族的多个成员包括 miR-30a、miR-30b、miR-30c、miR-30d 和 miR-30e 均被发现具有抑制血管钙化的作用。Vasuri 等<sup>[37]</sup>通过 microRNA 基因芯片和荧光定量 PCR 分析发现,在人钙化的动脉粥样斑块突出结节区域 miR-30a-5p 和 miR-30d 的表达量显著上升,且其表达量与成骨样特异性标志物 Runx2 和 Sox9 mRNA 的表达量呈负相关。Balderman 等<sup>[38]</sup>研究发现,BMP-2 通过下调 miR-30b 和 miR-30c 促进其靶基因 Runx2 和 Sox9 的表达,从而加速 VSMC 体外钙化。Xu 等<sup>[39]</sup>发现 miR-30b 也可通过调控 mTOR 信号通路和细胞自噬延缓血管钙化。另有研究发现,miR-34b/c 通过调控 SATB2/Runx2 通路抑制醛固酮诱导的 VSMC 体外钙化<sup>[40]</sup>。Ding 等<sup>[41]</sup>研究发现,miR-30e 靶向调控 IGF2 抑制骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC) 和 VSMC 向成骨样细胞转分化,从而延缓血管钙化。文献报道,miR-125b 下调成骨样分化关键基因 Osterix 的表达以抑制 VSMC 体外钙化,并且血清中 miR-125b 表达水平可用来预测血管钙化的严重程度<sup>[42-43]</sup>。miR-133a、miR-211、miR-135a、miR-141、miR-204 和 miR-205 等相继被发现可直接下调成骨样分化关键调控因子 Runx2、BMP-2、ALP 和 Osteocalcin 的表达,从而抑制 VSMC 向成骨样细胞转分化和体外钙化<sup>[44-48]</sup>。

另一方面, microRNA 也可促进血管钙化的发生。和前文所述不同,也有研究表明 miR-29 通过下调其靶基因弹性蛋白 Elastin 的表达促进 VSMC 体外钙化<sup>[49]</sup>。与此一致, Panizo 等<sup>[50]</sup>研究发现,过表达 miR-29b 促进高磷诱导的 VSMC 体外钙化。miR-29 家族成员在血管钙化进程中相互矛盾的研究结果可能是因为所用的血管钙化的细胞和动物模型不同引起的,也表明 microRNA 调控血管钙化发病机制的复杂性。Gui 等<sup>[51]</sup>发现, miR-135a \*、miR-712 \*、miR-714 和 miR-762 直接靶向抑制钙输出蛋白钠钙交换体 1 (sodium/calcium exchange member 1, NCX1)、质膜钙泵异构体 1 (plasma membrane calcium pump isoform 1, PMCA1) 和钠/钾/钙交换蛋白 4 (sodium/potassium/calcium exchange member 4, NCKX4) 的表达,从而促进高磷高钙诱导的 VSMC 体外钙化。Liu 等<sup>[52]</sup>发现, miR-32 激活磷脂酰肌醇激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 信号通路抑制磷脂酶和张力蛋白同源物 PTEN 的表达,从而

促进 OPG 敲除小鼠血管成骨样基因 Runx2 等的表达和血管钙化。如前文所述, miR-34b/c 抑制血管钙化进程,而 miR-34a 则被发现可通过下调 Sirt1 和 AXL 受体酪氨酸激酶的表达抑制细胞增殖并促进细胞衰老,进而加剧血管钙化<sup>[53]</sup>。此外, miR-128-3p、miR-324-3p、miR-3960 和 miR-2861 对血管钙化的促进作用也相继被发现<sup>[54-56]</sup>。

lncRNA 对血管钙化也有较重要的调控作用。HOTAIR 是目前研究最为深入的 lncRNA。研究发现,抑制 HOTAIR 可促进人瓣膜间质细胞中钙化相关基因如 BMP-2 和 ALP 的表达,且 HOTAIR 的表达水平受 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路调控<sup>[57]</sup>。Hadji 等<sup>[58]</sup>研究发现, lncRNA H19 在钙化性主动脉瓣疾病过程中显著上调,敲低 H19 通过调控 Notch 信号通路抑制人瓣膜间质细胞的成骨样分化和体外钙化。Yu 等<sup>[59]</sup>研究表明, lncRNA TUG1 可作为 miR-204-5p 的海绵体,上调 Runx2 的表达,从而促进瓣膜间质细胞的成骨样分化和体外钙化。Lin 等<sup>[60]</sup>研究发现, lncRNA-ES3 可作为 miR-34c-5p 的海绵体,促进钙化相关基因如 Runx2 和 ALP 的表达及细胞衰老标志物如 p16 和 p21 的表达,从而加剧高糖诱导的 VSMC 体外钙化。Jeong 等<sup>[61]</sup>发现, lncRNA Lrrc75a-as1 可抑制高磷诱导的 VSMC 向成骨样细胞转分化和体外钙化。

目前仅有少量研究报道了 circRNA 在血管钙化中的作用。Chen 等<sup>[62]</sup>对人钙化性主动脉瓣疾病临床标本进行了高通量 RNA 测序,发现了 1 412 个主动脉瓣特异性 circRNA。进一步的生物信息学分析发现,这些 circRNA 拥有丰富的 microRNA 和 RNA 结合蛋白作用位点,提示其可能通过转录后调控机制参与钙化性主动脉瓣疾病的病理进程。Ryu 等<sup>[63]</sup>通过高磷诱导的 VSMC 钙化模型,采用高通量 RNA 测序,筛选并鉴定了在 VSMC 体外钙化过程中差异表达的 circRNA,其中 circSamd4a 表达显著下调。进一步研究发现, circSamd4a 作为 miR-125a-3p 和 miR-483-5p 的海绵体抑制高磷诱导的 VSMC 体外钙化。

#### 4 总结和展望

近年来,血管钙化的表观遗传调控机制取得了突飞猛进的进展。然而,血管钙化的表观遗传调控研究目前还限于细胞和动物模型,这些发现在人体中的适用性还需进一步研究。随着高通量 DNA 甲基化测序、单细胞测序及生物信息学的发展,未来

需要在全基因组水平深入研究在血管钙化进展过程中 DNA 甲基化水平发生改变的规律,发现与血管钙化相关的特定甲基化生物标记,这对深入理解 DNA 甲基化调控血管钙化进程的具体机制,开发新的血管钙化诊断策略以及发现新的防治血管钙化的潜在药物靶点都具有重要的意义。目前关于 circRNA 与血管钙化的报道相对较少,进一步的研究将有望发现新的调控血管钙化的 circRNA 及其作用机制。此外,表观遗传调控的复杂性与精细性可能远超目前所发现的内容,随着单细胞测序等高通量测序技术和生物信息学的发展,未来研究需从单细胞层面揭示血管钙化的表观调控模式,从而更精准的发现血管钙化的诊断标志物和治疗靶点。

#### [参考文献]

- [1] 冉茂霞, 欧三桃. HIF-1 $\alpha$  与血管钙化关系的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(12): 1216-1220.
- [2] CHEN J, BUDOFF M J, REILLY M P, et al. Coronary artery calcification and risk of cardiovascular disease and death among patients with chronic kidney disease[J]. JAMA Cardiol, 2017, 2(6): 635-643.
- [3] LI W, SU S, CHEN J, et al. Emerging roles of fibroblasts in cardiovascular calcification[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(4): 1808-1816.
- [4] 王中群, 孙振. 防治血管钙化, 依然任重道远[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(12): 1189-1193.
- [5] SHIOI A, IKARI Y. Plaque calcification during atherosclerosis progression and regression[J]. J Atheroscler Thromb, 2018, 25(4): 294-303.
- [6] RAAZ U, SCHELLINGER I N, CHERNOGUBOVA E, et al. Transcription factor Runx2 promotes aortic fibrosis and stiffness in type 2 diabetes mellitus[J]. Circ Res, 2015, 117(6): 513-524.
- [7] YANG P, TRONCONE L, AUGUR Z M, et al. The role of bone morphogenetic protein signaling in vascular calcification[J]. Bone, 2020, 141: 115542.
- [8] WU C M, ZHENG L, WANG Q, et al. The emerging role of cell senescence in atherosclerosis[J]. Clin Chem Lab Med, 2020, 59(1): 27-38.
- [9] BÄCK M, ARANYI T, CANCELA M L, et al. Endogenous calcification inhibitors in the prevention of vascular calcification: a consensus statement from the COST action EuroSoft-CalcNet[J]. Front Cardiovasc Med, 2018, 5: 196.
- [10] CHEN Y T, YUAN H X, OU Z J, et al. Microparticles (exosomes) and atherosclerosis[J]. Curr Atheroscler Rep, 2020, 22(6): 23.
- [11] LIU Y H, KONG W. The mechanisms of medial vascular calcification[J]. Sheng Li Xue Bao, 2016, 68(5): 592-610.
- [12] AZECHI T, SATO F, SUDO R, et al. 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, facilitates the inorganic phosphorus-induced mineralization of vascular smooth muscle cells[J]. J Atheroscler Thromb, 2014, 21(5): 463-476.
- [13] XIE S, ZHANG T, WANG J, et al. Matrix stiffness determines the phenotype of vascular smooth muscle cell in vitro and in vivo: role of DNA methyltransferase 1[J]. Biomaterials, 2018, 155: 203-216.
- [14] CHEN J, ZHANG X Y, ZHANG H, et al. Indoxyl sulfate enhance the hypermethylation of Klotho and promote the process of vascular calcification in chronic kidney disease[J]. Int J Biol Sci, 2016, 12(10): 1236-1246.
- [15] ZHOU S, CAI B, ZHANG Z, et al. CDKN2B methylation and aortic arch calcification in patients with ischemic stroke[J]. J Atheroscler Thromb, 2017, 24(6): 609-620.
- [16] LIN X, XU F, CUI R R, et al. Arterial calcification is regulated via an miR-204/DNMT3a regulatory circuit both in vitro and in female mice[J]. Endocrinology, 2018, 159(8): 2905-2916.
- [17] LIN X, LI F, XU F, et al. Aberration methylation of miR-34b was involved in regulating vascular calcification by targeting Notch1[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(10): 3182-3197.
- [18] DRITSOUA A, KISLIKOVA M, OOMATIA A, et al. Epigenome-wide methylation profile of chronic kidney disease-derived arterial DNA uncovers novel pathways in disease-associated cardiovascular pathology[J]. Epigenetics, 2021, 16(7): 718-728.
- [19] ZHOU B, MARGARITI A, ZENG L, et al. Role of histone deacetylases in vascular cell homeostasis and arteriosclerosis[J]. Cardiovasc Res, 2011, 90(3): 413-420.
- [20] TRISCIOGLIO D, DI M M, DEL BUFALO D. Emerging role of histone acetyltransferase in stem cells and cancer[J]. Stem Cells Int, 2018: 8908751.
- [21] CHAN H M, LA THANGUE N B. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds[J]. J Cell Sci, 2001, 114(13): 2363-2373.
- [22] SIERRA J, VILLAGRA A, PAREDES R, et al. Regulation of the bone-specific osteocalcin gene by p300 requires Runx2/Cbfa1 and the vitamin D3 receptor but not p300 intrinsic histone acetyltransferase activity[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(9): 3339-3351.
- [23] GU J, LU Y, DENG M Q, et al. Inhibition of acetylation of histones 3 and 4 attenuates aortic valve calcification[J]. Exp Mol Med, 2019, 51(7): 79.
- [24] LI S J, KAO Y H, CHUNG C C, et al. Activated p300 acetyltransferase activity modulates aortic valvular calcifi-

- cation with osteogenic transdifferentiation and downregulation of Klotho[J]. *Int J Cardiol*, 2017, 232: 271-279.
- [25] OLZSCHA H, SHEIKH S, LA THANGUE N B. Deacetylation of chromatin and gene expression regulation: a new target for epigenetic therapy[J]. *Crit Rev Oncog*, 2015, 20(1/2): 1-17.
- [26] YIEW K H, CHATTERJEE T K, HUI D Y, et al. Histone deacetylases and cardiometabolic diseases[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(9): 1914-1919.
- [27] AZECHI T, KANEHIRA D, KOBAYASHI T, et al. Trichostatin A, an HDAC class I/II inhibitor, promotes pi-induced vascular calcification via up-regulation of the expression of alkaline phosphatase[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2013, 20(6): 538-547.
- [28] CHEN Z, GORDILLO-MARTINEZ F, JIANG L, et al. Zinc ameliorates human aortic valve calcification through GPR39 mediated ERK1/2 signalling pathway[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(3): 820-835.
- [29] KWON D H, EOM G H, KO J H, et al. MDM2 E3 ligase-mediated ubiquitination and degradation of HDAC1 in vascular calcification[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10492.
- [30] ABEND A, SHKEDI O, FERTOUK M, et al. Salt-inducible kinase induces cytoplasmic histone deacetylase 4 to promote vascular calcification[J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(7): 1166-1185.
- [31] MALHOTRA R, MAUER A C, LINO C C, et al. HDAC9 is implicated in atherosclerotic aortic calcification and affects vascular smooth muscle cell phenotype[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(11): 1580-1587.
- [32] HE P, YU H, JIANG L, et al. Hdac9 inhibits medial artery calcification through down-regulation of Osterix[J]. *Vascul Pharmacol*, 2020, 132: 106775.
- [33] BARTOLI-LEONARD F, WILKINSON F L, SCHIRO A, et al. Loss of SIRT1 in diabetes accelerates DNA damage-induced vascular calcification[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(3): 836-849.
- [34] ADAMS B D, PARSONS C, WALKER L, et al. Targeting noncoding RNAs in disease[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(3): 761-771.
- [35] DU Y, GAO C, LIU Z, et al. Upregulation of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7 by miR-29 repression mediates vascular smooth muscle calcification[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(11): 2580-2588.
- [36] ZHANG H, CHEN J, SHEN Z, et al. Indoxyl sulfate accelerates vascular smooth muscle cell calcification via microRNA-29b dependent regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *Toxicol Lett*, 2017, 284: 29-36.
- [37] VASURI F, CIAVARELLA C, FITTIPALDI S, et al. Different histological types of active intraplaque calcification underlie alternative miRNA-mRNA axes in carotid atherosclerotic disease[J]. *Virchows Arch*, 2020, 476(2): 307-316.
- [38] BALDERMAN J A, LEE H Y, MAHONEY C E, et al. Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification[J]. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(6): e003905.
- [39] XU T H, QIU X B, SHENG Z T, et al. Restoration of microRNA-30b expression alleviates vascular calcification through the mTOR signaling pathway and autophagy[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 14306-14318.
- [40] HAO J B, ZHANG L, CONG G T, et al. MicroRNA-34b/c inhibits aldosterone-induced vascular smooth muscle cell calcification via a SATB2/Runx2 pathway[J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 366(3): 733-746.
- [41] DING W, LI J, SINGH J, et al. miR-30e targets IGF2-regulated osteogenesis in bone marrow-derived mesenchymal stem cells, aortic smooth muscle cells, and ApoE<sup>-/-</sup> mice[J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 106(1): 131-142.
- [42] GOETTSCHE C, RAUNER M, PACYNA N, et al. miR-125b regulates calcification of vascular smooth muscle cells[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(4): 1594-1600.
- [43] CHAO C T, LIU Y P, SU S F, et al. Circulating microRNA-125b predicts the presence and progression of uremic vascular calcification[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(7): 1402-1414.
- [44] LIAO X B, ZHANG Z Y, YUAN K, et al. miR-133a modulates osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(9): 3344-3352.
- [45] LIN L, HE Y, XI B L, et al. miR-135a suppresses calcification in senescent VSMC by regulating KLF4/STAT3 pathway[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2016, 14(2): 211-218.
- [46] ITOH T, NOZAWA Y, AKAO Y. MicroRNA-141 and -200a are involved in bone morphogenetic protein-2-induced mouse pre-osteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(29): 19272-19279.
- [47] CUI R R, LI S J, LIU L J, et al. MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 96(2): 320-329.
- [48] QIAO W, CHEN L, ZHANG M. MicroRNA-205 regulates the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(6): 1945-1953.
- [49] SUDO R, SATO F, AZECHI T, et al. miR-29-mediated elastin down-regulation contributes to inorganic phosphorus-induced osteoblastic differentiation in vascular smooth muscle

- cells[J]. *Genes Cells*, 2015, 20(12): 1077-1087.
- [50] PANIZO S, NAVES-DÍAZ M, CARRILLO-LÓPEZ N, et al. MicroRNAs 29b, 133b, and 211 regulate vascular smooth muscle calcification mediated by high phosphorus [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(3): 824-834.
- [51] GUI T, ZHOU G, SUN Y, et al. MicroRNAs that target  $\text{Ca}^{2+}$  transporters are involved in vascular smooth muscle cell calcification[J]. *Lab Invest*, 2012, 92(9): 1250-1259.
- [52] LIU J, XIAO X, SHEN Y, et al. MicroRNA-32 promotes calcification in vascular smooth muscle cells: implications as a novel marker for coronary artery calcification [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174138.
- [53] BADI I, MANCINELLI L, POLIZZOTTO A, et al. miR-34a promotes vascular smooth muscle cell calcification by downregulating SIRT1 (Sirtuin 1) and Axl (AXL receptor tyrosine kinase) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(9): 2079-2090.
- [54] WANG X Y, ZHANG X Z, LI F, et al. miR-128-3p accelerates cardiovascular calcification and insulin resistance through ISL1-dependent Wnt pathway in type 2 diabetes mellitus rats[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 4997-5010.
- [55] PAN W, LIANG J, TANG H, et al. Differentially expressed microRNA profiles in exosomes from vascular smooth muscle cells associated with coronary artery calcification[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 118: 105645.
- [56] XIA Z Y, HU Y, XIE P L, et al. Runx2/miR-3960/miR-2861 positive feedback loop is responsible for osteogenic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells [J]. *Biomed Res Int*, 2015: 624037.
- [57] CARRION K, DYQ J, PATEL V, et al. The long non-coding HOTAIR is modulated by cyclic stretch and Wnt/ $\beta$ -Catenin in human aortic valve cells and is a novel repressor of calcification genes [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96577.
- [58] HADJI F, BOULANGER M C, GUAY S, et al. Altered DNA methylation of long noncoding RNA H19 in calcific aortic valve disease promotes mineralization by silencing NOTCH1[J]. *Circulation*, 2016, 134(23): 1848-1862.
- [59] YU C, LI L, XIE F, et al. LncRNA TUG1 sponges miR-204-5p to promote osteoblast differentiation through upregulating Runx2 in aortic valve calcification[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(1): 168-179.
- [60] LIN X, ZHAN J K, JY Z, et al. lncRNA-ES3/miR-34c-5p/BMF axis is involved in regulating high-glucose-induced calcification/senescence of VSMC [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(2): 523-535.
- [61] JEONG G, KWON D H, SHIN S, et al. Long noncoding RNAs in vascular smooth muscle cells regulate vascular calcification[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5848.
- [62] CHEN J, WANG J, JIANG Y, et al. Identification of circular RNAs in human aortic valves [J]. *Gene*, 2018, 642: 135-144.
- [63] RYU J, KWON D H, CHOE N, et al. Characterization of circular RNAs in vascular smooth muscle cells with vascular calcification[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 31-41.
- (此文编辑 文玉珊)