

## 人 SMOC1 重组腺病毒载体的构建及其在主动脉瓣间质细胞中的表达

赵 蓉,王 惠,杨 杨,李名鹏,孔祥清,孙 伟\*

(南京医科大学第一附属医院心内科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:** 利用 AdEasy™ vector system 构建携带人 SMOC1 基因的重组腺病毒表达载体, 感染人主动脉瓣间质细胞(hAVICs)并检测外源性 SMOC1 在细胞中的表达和对细胞增殖的影响。**方法:** 用 PCR 的方法扩增 SMOC1 cDNA, 将其克隆到 pGEM-T Easy 载体中并测序鉴定。经 Not I 和 Xho I 双酶切后接入 pShuttle-CMV 穿梭载体, 构建重组腺病毒的穿梭质粒 pShuttle-CMV-SMOC1。将经 Pme I 线性化的 pShuttle-CMV 穿梭载体与 pAdEasy™ DNA 电穿孔共转化 BJ5183 重组细菌, 获取重组腺病毒质粒 pAdEasy-SMOC1, 再将经 Pac I 线性化的重组病毒骨架质粒转染 HEK293A 包装细胞, 包装并扩增重组腺病毒(Ad-SMOC1)。用 Ad-SMOC1 感染 hAVICs, 以 Western blot 法和免疫荧光染色法检测重组 SMOC1 在 hAVICs 中的表达与定位, 用 MTS 法检测 SMOC1 对主动脉瓣间质细胞增殖的影响。**结果:** 成功构建并包装表达 SMOC1 蛋白的重组腺病毒, 该重组腺病毒在体外能有效感染 hAVICs 并高表达 SMOC1 蛋白, 且其介导表达的 SMOC1 蛋白主要定位于 hAVICs 的胞浆和胞膜上, MTS 分析表明重组 SMOC1 能够显著促进主动脉瓣间质细胞的增殖。**结论:** 成功地构建了携带人 SMOC1 基因的重组腺病毒, 并证实 SMOC1 具有促进增殖的作用。本研究为进一步研究 SMOC1 在瓣膜间质细胞中的作用奠定了实验基础。

**[关键词]** SMOC1; 腺病毒; 人主动脉瓣间质细胞

**[中图分类号]** R392.12

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)12-1635-06

## Construction of recombinant human SMOC1 gene adenovirus vector and its expression in human aortic valve interstitial cells

ZHAO Rong, WANG Hui, YANG Yang, LI Ming-peng, KONG Xiang-qing, SUN Wei\*

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct a recombinant adenovirus vector containing SMOC1 gene and to identify its expression in cultured human aortic valve interstitial cells (hAVICs) and effects on cell proliferation. **Methods:** The SMOC1 gene was amplified by PCR and inserted into pGEM-T Easy vector and sequenced. Double digested with Not I and Xho I, SMOC1 gene was inserted into pShuttle-CMV vector. This recombinant plasmid was linearized by Pme I and electronically transfected into BJ5183 germs to get the recombinant adenovirus vector (pAdEasy-SMOC1). Then the recombinant adenovirus expressing SMOC1 (Ad-SMOC1) was obtained by packaging in HEK293 A cells. After infecting hAVICs by Ad-SMOC1, the expression of recombinant SMOC1 was detected by Western blot and Immunofluorescence. The proliferation of hAVICs infected with Ad-SMOC1 was measured by MTS assay. **Results:** The recombinant adenovirus Ad-SMOC1 was successfully generated, which could effectively infect hAVICs and increase SMOC1 protein levels in hAVICs. Besides this, exogenous expressed SMOC1 was mainly located at the cytoplasm and membrane of hAVICs. MTS assay showed that recombinant SMOC1 promoted the proliferation of hAVICs. **Conclusion:** The bioactive recombinant adenovirus Ad-SMOC1 has been successfully constructed and recombinant SMOC1 promotes cell proliferation. This study laid a foundation for further research of the function of SMOC1 in hAVICs.

**[Key words]** SPARC related modular calcium binding 1 (SMOC1); adenovirus; human aortic valve interstitial cells (hAVICs)

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1635-1640]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81270298)

\*通讯作者, E-mail: weisun7919@yahoo.com

SMOC1 (SPARC related modular calcium binding 1) 是一个具有胞外钙离子结合区域 (EC domain) 的分泌性蛋白<sup>[1]</sup>, 它在许多组织广泛表达, 包括心脏<sup>[2]</sup>。目前 SMOC1 的功能研究还较少, 现有研究发现 SMOC1 可有类似于 BMP 拮抗剂的作用<sup>[3]</sup>, 促进转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 介导的促纤维化作用<sup>[4]</sup>, 同时参与成骨细胞分化过程的调节<sup>[5]</sup>, 此外在脑肿瘤中 SMOC1 高表达, 并与腱糖蛋白-C (tenascin-C) 相互作用<sup>[6]</sup>。最新研究发现, SMOC1 在视神经及肢体发育中起重要作用, 其突变与瓦尔敦堡无眼畸形综合征密切相关, 而机制尚不清楚, 推测可能与其抑制 BMP2 信号通路的作用相关<sup>[7-9]</sup>。既往研究表明, 主动脉瓣钙化性疾病的发生与 BMP2 信号通路密切相关, 在钙化性病变更主动脉瓣组织中磷酸化的 smad1/5 显著上调<sup>[10]</sup>, 所以推测 SMOC1 作为 BMP2 的抑制因子, 可能参与主动脉瓣钙化病变过程, 发挥延缓瓣膜钙化的作用。为了研究这一假说, 本研究建立了高效表达 SMOC1 基因的病毒表达系统, 并在人主动脉瓣间质细胞 (human aortic valvular interstitial cells, hAVICs) 中的检测了其表达效率和对 hAVICs 增殖作用的影响, 为进一步研究 SMOC1 蛋白的功能奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

腺病毒基因组质粒 AdEasy™、穿梭质粒 pShuttle-CMV、BJ5183 菌株 (Qbiogene 公司, 美国)。HEK 293A 细胞和 hAVICs 为本室保存。pGEM-T Easy 载体、T4 DNA 连接酶 (Promega 公司, 美国)。LA Taq DNA 聚合酶、内切酶 *Not* I 和 *Xho* I 及  $\lambda$ -EcoT14 I digest DNA Marker (TaKaRa 公司, 日本)。内切酶 *Pme* I、*Pac* I (NEB 公司, 美国)。Lipofectamine 2000 阳离子脂质体转染试剂 (Invitrogen 公司, 美国)。BioSpin 胶回收试剂盒 (BioFlux 公司, 日本)。质粒提取试剂盒 (北京天根科技公司)。Trans2K Plus DNA Marker (南京百斯凯科技有限公司)。预染蛋白 Marker (Fermentas 公司, 美国)。SMOC1 cDNA (Genecopoeia 公司, 美国)。DNA 测序由南京金斯瑞生物科技提供。SMOC1 抗体 (Abnova 公司, 台湾)。Flag(M2) 抗体 (Sigma 公司, 德国)。GAPDH 抗体 (上海康成公司)。HRP 标记的羊抗鼠二抗 (上海优宁维公司)。Cy3 标记的兔抗鼠荧光二抗 (Jackson 公司, 美国)。DMEM、胎牛血清及青/链霉素 (Hyclone 公司, 美国)。细胞增殖 MTS 检测试剂盒 (G3580,

Promega 公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 人 SMOC1 基因的克隆与穿梭载体构建

根据 GenBank 中人 SMOC1 基因序列 (NM\_022137) 设计了一对 SMOC1 基因全长引物 (南京金斯瑞生物科技公司合成)。上游引物的序列为: 5'-AAAAGTACTTGGCACCATGCTGCCCGC-3'; 下游引物的序列为 5'-CCGCTCGAGGACGAGGCGTCCTTCTTTGC-3'。其中上游和下游引物分别引入了 *Sca* I 和 *Xho* I 的酶切位点 (划线部分)。采用上下游引物, 以 SMOC1 cDNA 克隆质粒作为模板进行 PCR。将胶回收的目的片段通过 T/A 连接直接连入 pGEM-T Easy 载体, 构建重组克隆质粒 pGEM-SMOC1 载体, 用 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定并送公司测序。用 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切 pGEM-SMOC1 载体, 获得的目的基因片段连入 pShuttle-CMV 的相应酶切位点, 构建重组腺病毒穿梭质粒 pShuttle-CMV-SMOC1, 经 PCR 鉴定。

#### 1.2.2 人 SMOC1 重组腺病毒质粒的构建

*Pme* I 酶切重组 pShuttle-CMV-SMOC1, 用胶回收试剂盒回收线性化的重组体。采用 Bio-Rad 公司提供的操作说明, 将线性重组体与 pAdEasy™ DNA 在 1 700 V、200  $\Omega$ 、25  $\mu$ F 条件下, 电穿孔共转化 BJ5183 感受态细胞。抽提重组 pAdEasy 质粒, *Pac* I 酶切鉴定重组质粒, 琼脂糖凝胶电泳分析酶切图谱, 证实 SMOC1 基因正确重组入腺病毒载体。将阳性克隆转化至 DH5 $\alpha$  中进行大量扩增, 抽提制备大量 pAdEasy-SMOC1 DNA。

#### 1.2.3 重组腺病毒 Ad-SMOC1 的获得、鉴定及扩增

*Pac* I 酶切 pAdEasy-SMOC1 质粒过夜, 琼脂糖凝胶电泳确定酶切完全, DNA 定量测定线性 DNA 浓度。酚氯仿法抽提纯化回收线性化 DNA。按每 60 mm 平皿 6  $\mu$ g 质粒用 Lipofectamine 2000 阳离子脂质体转染到 HEK293A 细胞里。培养细胞 10~14 d, 发现细胞变圆并部分脱落时, 收集上清和细胞, 反复冻融 3 次, 裂解释放病毒。以病毒悬液为模板, 用 PCR 检测其中是否有 SMOC1 片段。将鉴定好的腺病毒感染 HEK293A 细胞。在 3~5 d 出现细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE), 等大部分细胞出现 CPE 后收集细胞和培养上清。采用 IC<sub>50</sub> 组织半感染法测定所获得病毒的滴度。

#### 1.2.4 Western blot 检测重组 SMOC1 蛋白的表达

以感染浓度为 20 mol/L 的 Ad-SMOC1 感染人主动脉瓣间质细胞 (hAVICs), 72 h 后用细胞裂解液

于冰上裂解细胞,4℃高速离心收集蛋白裂解液。按照 Thermo 蛋白浓度测定试剂盒的操作测定蛋白浓度,根据浓度计算出相应的总蛋白含量。将定量后的蛋白裂解液加上样缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上,鼠抗人 SMOC1 抗体作为一抗(使用浓度 1:1 000),以 HRP 标记的羊抗鼠抗体为二抗(使用浓度 1:5 000),采用化学发光法检测重组腺病毒介导的 SMOC1 蛋白在 hAVICs 中表达。

### 1.2.5 免疫荧光检测重组 SMOC1 蛋白在 hAVICs 的细胞亚定位

hAVICs 制备成单细胞悬液后,接种到载玻片,放置于 37℃,5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养并感染 Ad-SMOC1 后,以 4%多聚甲醛固定 10 min,PBS 漂洗 3 遍,0.5% 曲拉通 X-100(Triton-X 100)处理 10 min,10%山羊血清封闭 1 h,一抗(鼠抗 Flag 抗体 1:200)4℃孵育过夜。用 PBS 漂洗后,二抗(Cy3 标记的兔抗鼠荧光抗体 1:200)室温避光孵育 2 h,PBS 漂洗,核染色采用 DAPI(1:1 000)复染细胞核 30 min,用激光共聚焦显微镜观察并拍照。

### 1.2.6 细胞增殖活性检测

重组 SMOC1 蛋白对 hAVICs 增殖活性的影响用细胞增殖 MTS 试剂盒评估,具体操作按照说明书进行,简略如下:收集 hAVICs 细胞计数后,以 100 μl/孔(细胞密度 3×10<sup>4</sup> 个/ml)将细胞接种于 96 孔细胞培养板内,复孔 5 个。培养板放置于 37℃,5%CO<sub>2</sub> 培养

箱中培养,第 2 天感染 Ad-SMOC1 后,放于细胞培养箱中继续培养。于 6 h、2、5、7、9 和 11,每孔分别滴加 20 μl MTS 试剂于细胞培养箱中孵育 3 h,在酶标仪上读取吸光值(490 nm 波长)。

### 1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5.0 和 SPSS17.0 软件进行统计分析和图表制作,计量数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 进行描述。组间比较采用独立样本 *t* 检验和方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

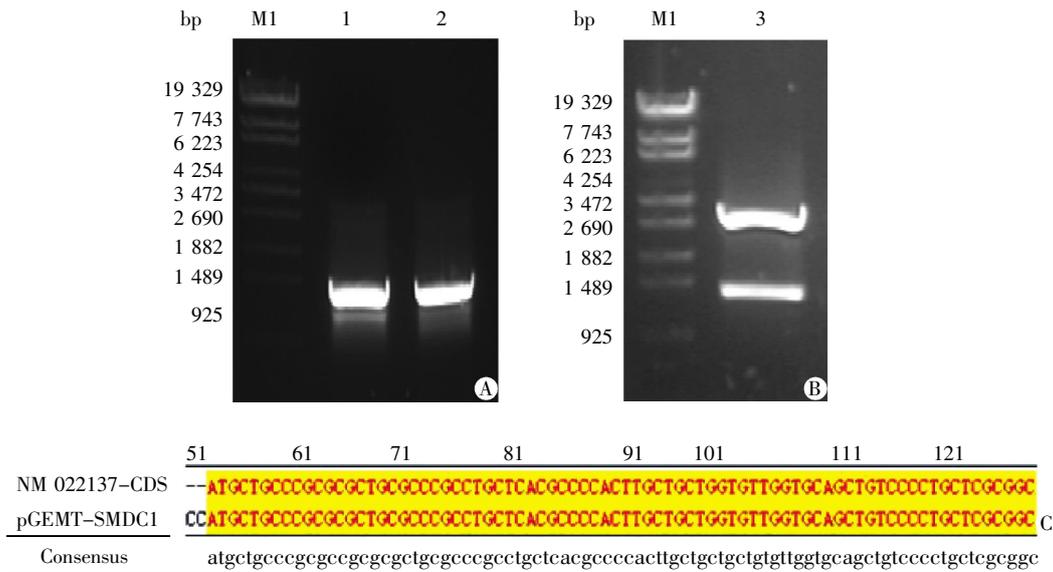
## 2 结 果

### 2.1 人 SMOC1 基因的克隆及 pGEM-SMOC1 载体的构建

以 SMOC1 cDNA clone 质粒为模版,PCR 扩增 SMOC1 目的基因片段。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析,可见 1 条 1 300 bp 左右的条带,大小与人 SMOC1 基因一致(图 1A)。然后将胶回收的 PCR 产物连入 pGEM-T Easy 载体,构建 pGEM-SMOC1 载体。重组质粒 pGEMT-SMOC1 经双酶切及测序鉴定,酶切结果符合预期结果(图 1B),且序列分析结果显示,插入片段与 GenBank(NM\_022137)报告完全一致(图 1C)。上述结果提示人 SMOC1 基因已经成功克隆入 pGEM-T Easy 载体。

### 2.2 SMOC1 穿梭载体及重组腺病毒质粒的构建

用 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切 pGEMT-SMOC1 载



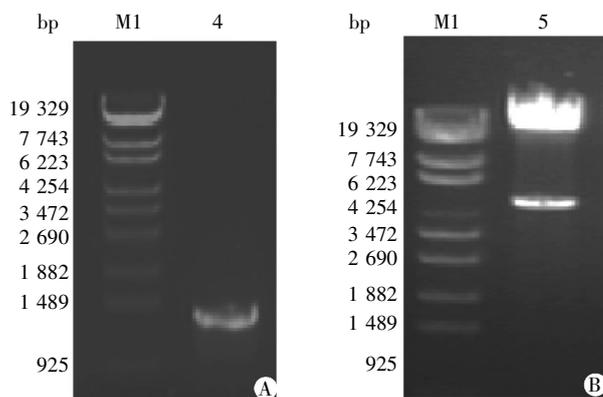
A: 人 SMOC1 基因 PCR 产物电泳分析;B:pGEMT-SMOC1 经 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定;C:pGEMT-SMOC1 测序结果。M1: $\lambda$ -*Eco*T14 I digest DNA Marker;1:SMOC1 基因;2:SMOC1 cDNA 阳性对照;3:pGEMT-SMOC1 双酶切产物。

图 1 人 SMOC1 基因的克隆及 pGEM-SMOC1 载体的构建

Figure 1 Clone of human SMOC1 gene and construction of pGEM-SMOC1 vector

体,琼脂糖电泳后胶回收大小为1300 bp左右的片段,连入pShuttle-CMV的相应酶切位点,获得穿梭载体pShuttle-CMV-SMOC1,该载体中在SMOC1基因末端带有Flag标签序列。经PCR鉴定,产物琼脂糖凝胶电泳可见大小为1300 bp左右的目的基因片段(图2A),这说明pShuttle-CMV-SMOC1载体构建

成功。然后将重组穿梭质粒pShuttle-CMV-SMOC1用Pme I酶切线性化,与pAdEasy™共同转入BJ5183感受态细胞,通过细菌内同源重组产生腺病毒质粒Ad-SMOC1。经Pac I酶切可见4500 bp左右片段(图2B),这证明携带目的基因的穿梭质粒已经整合到腺病毒的基因组中,重组腺病毒质粒构建成功。



A.:pGEMT-SMOC1的PCR鉴定;B:重组腺病毒质粒pAdEasy-SMOC1的酶切鉴定。M1: $\lambda$ -EcoT14 I digest DNA Marker;4:pShuttle-CMV-SMOC1的PCR产物;5:pAdEasy-SMOC1经Pac I酶切的产物。

图2 穿梭载体pShuttle-CMV-SMOC1及重组腺病毒质粒pAdEasy-SMOC1的构建

Figure 2 Construction of pShuttle-CMV-SMOC1 vector and pAdEasy-SMOC1 vector

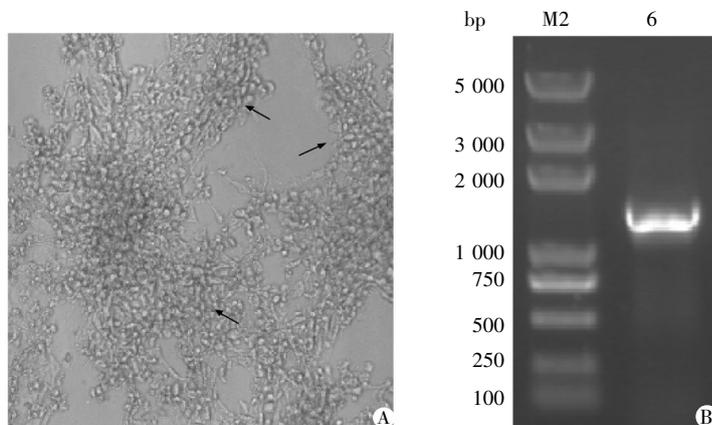
### 2.3 重组腺病毒 Ad-SMOC1 的制备及鉴定

经线性化的重组腺病毒载体以Lipofectamine 2000脂质体转染HEK293A细胞,从第10天开始出现细胞病理效应(CPE),主要表现为细胞变大、变圆并成串脱落(图3A),收获并裂解细胞,得到重组腺病毒。以上述制备的重组腺病毒Ad-SMOC1悬液为模板扩增出SMOC1基因序列,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,可见扩增出1300 bp左右的目的基因片段(图3B),提示重组腺病毒Ad-SMOC1制备成功。

### 2.4 重组SMOC1蛋白在主动脉瓣间质细胞的表达

### 与定位

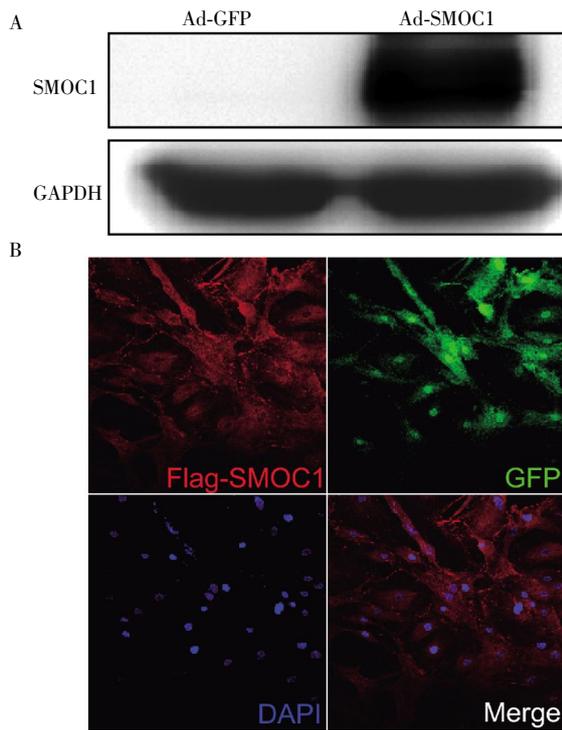
以Ad-SMOC1重组腺病毒感染hAVICs,Ad-GFP腺病毒感染hAVICs作为阴性对照。Western blot检测显示重组腺病毒介导的SMOC1蛋白在hAVICs中高效表达,而在对照组细胞无SMOC1蛋白的表达(图4A)。这说明,构建的Ad-SMOC1病毒能够在宿主细胞hAVICs高效表达SMOC1。此外免疫荧光结果显示重组的SMOC1蛋白主要分布在hAVICs的胞膜和胞浆中,在细胞核中不表达(图4B)。



A:重组腺病毒引起HEK293A细胞病变( $\times 100$ );B:腺病毒悬液PCR扩增产物电泳结果;M2:Trans2K Plus DNA Marker;6:SMOC1基因。

图3 重组腺病毒 Ad-SMOC1 的制备及鉴定

Figure 3 Preparation and identification of recombinant adenovirus (Ad-SMOC1)



A: Western blot 检测显示腺病毒介导的 SMOC1 在 hAVICs 中高效表达;B:免疫荧光检测显示重组 SMOC1 蛋白定位于 hAVICs 的胞膜和胞浆( $\times 200$ )。

图 4 重组 SMOC1 蛋白在 hAVICs 的表达与定位

Figure 4 Expression and location of recombinant SMOC1 in hAVICs

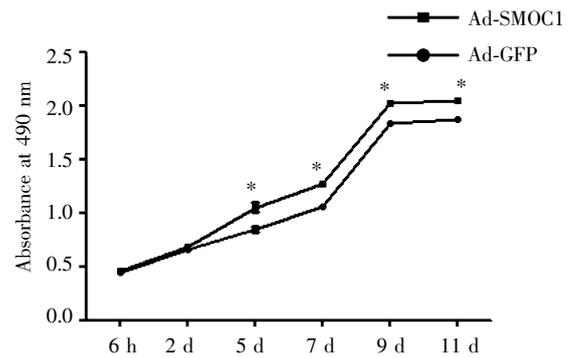
### 2.5 重组 SMOC1 蛋白促进主动脉瓣间质细胞增殖

以 Ad-SMOC1 重组腺病毒和 Ad-GFP 腺病毒分别感染 hAVICs 后,于感染后 6 h、2 d、5、7、9 和 11 d 用 MTS 法检测活细胞数目。结果显示自第 5 天开始,SMOC1 表达组细胞数显著高于对照组 ( $n = 5, P < 0.05$ , 图 5), 表明重组 SMOC1 蛋白能够显著促进 hAVICs 的增殖。

### 3 讨论

钙化性主动脉瓣狭窄 (calcific aortic valve stenosis, CAS) 是老年人最常见的心脏瓣膜疾病,其发病机制过去一直被认为是退行性钙磷沉积的过程。近年来多项研究表明 CAS 是一个主动性、进展性的调控过程,涉及炎症浸润,脂质沉积,血管新生,胞外基质重构及最终的钙化形成等<sup>[11]</sup>。而瓣膜组织参与这一过程的主要效应细胞是心脏瓣膜组织的主要细胞成分——瓣膜间质细胞,它是一种类似于成纤维细胞和成肌纤维细胞的混合细胞<sup>[12]</sup>。

SMOC1 是在许多组织都广泛表达的一种分泌性蛋白,且在小鼠胚胎发育第 12 天,可见其在主动



Ad-SMOC1 转染细胞后第 5 天开始,SMOC1 组细胞数量显著增加(两组比较,  $*P < 0.05$ )。

图 5 重组 SMOC1 促进 hAVICs 增殖

Figure 5 Recombinant SMOC1 promotes hAVICs proliferation

脉的基底膜区域广泛表达<sup>[2]</sup>,而本课题组前期研究发现 SMOC1 在正常人主动脉瓣基底膜中和病变瓣膜组织中均有表达 (未发表数据)。SMOC1 包含的 EC domain 与酸性富含胱氨酸分泌型蛋白 (SPARC) 和骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 的 EC domain 是高度保守且同源的。已报道 SPARC 参与调节细胞基质相互作用,特别是在骨矿化、组织修复和血管新生中起主要作用<sup>[13]</sup>,而 Steitz 等<sup>[14]</sup>发现 OPN 是异位钙化的天然抑制因子,这提示 SMOC1 可能有抑制异位钙化的作用。此外 Thomas 等<sup>[3]</sup>发现 SMOC1 有抑制 BMP2 信号通路的作用,而在钙化性主动脉瓣中 BMP2 介导的 smad1/5 的磷酸化明显上调,这提示 SMOC1 作为 BMP2 的抑制因子,可能在主动脉瓣瓣膜钙化病过程中起保护作用,延缓瓣膜的钙化。

在本研究中,利用 AdEasy™ 腺病毒表达系统构建了可以在主动脉瓣间质细胞中高效表达的 SMOC1 的重组腺病毒 Ad-SMOC1。利用 Western blot 和免疫染色法非常清晰地观察到外源性过表达的 SMOC1 蛋白在瓣膜间质细胞中的表达丰度,提示该表达载体非常适合应用于主动脉瓣间质细胞的研究,为后续的研究提供了有力的实验工具。另外本研究发现,重组的 SMOC1 蛋白能够显著促进主动脉瓣间质细胞的增殖,提示 SMOC1 可能通过调控细胞增殖参与瓣膜病过程中的组织修复与重构,但其具体机制尚有待进一步研究。总之,本研究将为探索 SMOC1 对主动脉瓣间质细胞的调控作用及其在钙化性瓣膜疾病中的作用奠定了基础。

### [参考文献]

[1] Vannahme C, Smyth N, Miosge N, et al. Characterization of SMOC-1, a novel modular calcium-binding protein in basement membranes [J]. J Biol Chem, 2002, 277(41):

- 37977-37986
- [2] Gersdorff N, Muller M, Schall A, et al. Secreted modular calcium-binding protein-1 localization during mouse embryogenesis[J]. *Histochem Cell Biol*, 2006, 126(6): 705-712
- [3] Thomas JT, Canelos P, Luyten FP, et al. Xenopus SMOC-1 Inhibits bone morphogenetic protein signaling downstream of receptor binding and is essential for postgastrulation development in Xenopus [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(28): 18994-19005
- [4] Dreieicher E, Beck KF, Lazaroski S, et al. Nitric oxide inhibits glomerular TGF-beta signaling via SMOC-1 [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(9): 1963-1974
- [5] Choi YA, Lim J, Kim KM, et al. Secretome analysis of human BMSCs and identification of SMOC1 as an important ECM protein in osteoblast differentiation [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(6): 2946-2956
- [6] Brellier F, Ruggiero S, Zwolanek D, et al. SMOC1 is a tenascin-C interacting protein over-expressed in brain tumors [J]. *Matrix Biol*, 2011, 30(3): 225-233
- [7] Abouzeid H, Boisset G, Favez T, et al. Mutations in the SPARC-related modular calcium-binding protein 1 gene, SMOC1, cause waardenburg ano-phthalmia syndrome [J]. *Am J Hum Genet*, 2011, 88(1): 92-98
- [8] Okada I, Hamanoue H, Terada K, et al. SMOC1 is essential for ocular and limb development in humans and mice [J]. *Am J Hum Genet*, 2011, 88(1): 30-41
- [9] Rainger J, van Beuseko E, Ramsay JK, et al. Loss of the BMP antagonist, SMOC-1, causes Ophthalmo-Acromelic (Waardenburg Anophthalmia) syndrome in humans and mice [J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(7): e1002114
- [10] Wirrig EE, Hinton RB, Yutzey KE, et al. Differential expression of cartilage and bone-related proteins in pediatric and adult diseased aortic valves [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(3): 561-569
- [11] Rajamannan NM, Bonow RO, Rahimtoola SH, et al. Calcific aortic stenosis; an update [J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007, 4(5): 254-262
- [12] Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI, et al. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(5): 1407-1418
- [13] McCurdy S, Baicu CF, Heymans S, et al. Cardiac extracellular matrix remodeling: fibrillar collagens and secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(3): 544-549
- [14] Steitz SA, Speer MY, McKee MD, et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(6): 2035-2046

[收稿日期] 2012-09-13