

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.01.017

维生素 D 缺乏促进 CVD 患者血管钙化的机制研究

朱欣然, 张爽, 段亚君

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:为探究维生素 D 缺乏对血管钙化(vascular calcification, VC)的作用机制,文章对心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)患者的血清学指标进行临床研究分析,发现血清维生素 D、纤维母细胞生长因子 23(fibroblast growth factor 23, FGF23)、Klotho 水平均与血管钙化相关;采用 HASMC 细胞构建钙化模型,在去除或回补维生素 D 的条件下,观察钙化相关分子在蛋白和 mRNA 水平的表达情况。结果表明,维生素 D 缺乏会引起循环系统、血管组织、肾脏组织中 Klotho 水平下降,导致 FGF23-Klotho 轴紊乱,从而产生 FGF23 抵抗,抑制 FGF23 对磷酸盐的代谢过程,导致体内磷酸盐代谢紊乱,加速血管钙化的发生发展。

关键词:维生素 D; FGF23-Klotho 轴; 血管钙化(VC); 心血管疾病(CVD); FGF23 抵抗

中图分类号:R977.24 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2025)01-0112-08

An investigation into the mechanism by which vitamin D deficiency promotes vascular calcification in CVD patients

ZHU Xinran, ZHANG Shuang, DUAN Yajun

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: In order to investigate the mechanism of vitamin D deficiency on vascular calcification(VC), this paper analyzed the serological indexes of cardiovascular disease(CVD) patients and found that serum vitamin D, fibroblast growth factor 23(FGF23) and Klotho levels were associated with VC. The HASMC cells were used to construct a calcification model, and under the condition of removing or supplementing vitamin D, calcification-related molecules were observed at the protein and mRNA levels. The results showed that vitamin D deficiency caused a decrease in Klotho levels in the circulatory system, vascular tissues, and kidney tissues, resulting in disruption of the FGF23-Klotho axis, which led to FGF23 resistance, inhibiting the metabolic process of phosphate by FGF23, leading to disruption of phosphate metabolism *in vivo* and accelerating the development of VC.

Key words: vitamin D; FGF23-Klotho axis; vascular calcification(VC); cardiovascular disease(CVD); FGF23 resistance

0 引言

维生素 D 缺乏症是一个全球性的公共卫生问题^[1-2]。据统计,全世界分别约有 30% 的儿童和 60% 的成人缺乏维生素 D^[3]。维生素 D 缺乏不仅会导致儿童佝偻病,还会诱发和加剧成人骨

质疏松症,并导致骨软化症。此外,维生素 D 缺乏症还大大增加心血管疾病、癌症、多发性硬化症、类风湿性关节炎和 I 型糖尿病等的发病风险^[4]。在美国进行的一项国家健康和营养检查调查显示,与维生素 D 水平较高的人相比,维生素 D 缺乏(即 25(OH)D 质量浓度低于 20 ng/mL)

收稿日期:2022-08-23;修回日期:2022-12-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(82173807);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(JZ2021HGTA0127)

作者简介:朱欣然(1998—),女,安徽合肥人,合肥工业大学硕士生;

段亚君(1981—),女,黑龙江鸡西人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师,通信作者, E-mail: yajunduan@qq.com.

的人具有更高的冠心病、心绞痛、心肌梗死、心衰以及周围血管疾病等发生率^[5]。

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是心脏和血管疾病的统称,主要包括冠心病、脑血管疾病 (例如中风)、周围动脉血管疾病、先天性心脏病、深静脉血栓和肺栓塞等疾病。心血管疾病是一种世界性的流行病,被认为是全球导致死亡的主要原因之一,其发病率在全球范围内呈上升趋势。

血管钙化 (vascular calcification, VC) 是指骨外矿物质在血管内壁沉积产生斑块,导致血管失去弹性。钙化的斑块易引起管腔狭窄,是心血管事件致死的一个重要危险因素^[6]。体内钙盐、磷酸盐稳态、矿物质平衡以及维生素 D 稳态被认为是导致血管钙化进展的主要原因^[7]。磷酸盐在 VC 的病理生理学中起重要作用^[8],血管钙化的发生和进展机制与生理性骨形成现象相似^[9],高磷酸盐上调垂体特异性转录因子 1 (Pit1) 以提高细胞内无机磷酸盐 (Pi) 水平,诱导 RUNT 相关的转录因子 2 (RUNX2),增强了血管平滑肌细胞的成骨过渡^[10]。磷酸盐调控的细胞内信号传导包括 Wnt/ β -连环蛋白、蛋白激酶 B (PKB 或 Akt)、核因子- κ B (NF- κ B) 以及血清和糖皮质激素诱导的激酶 1 (SGK1)^[11-12]。

此外,表观遗传也可影响钙化过程中细胞内信号传导^[13]。衰老可以通过骨诱导信号传导、炎症细胞因子和氧化应激等影响钙化^[14-15]。在一定条件下,内皮细胞通过内皮-间充质转化、细胞因子分泌、细胞外囊泡合成、血管生成调节和血流动力学参与血管钙化^[16]。矿物质稳态的破坏和高磷酸盐水平被认为是慢性肾病中 VC 的主要决定因素。最近研究发现,SLC7A11/谷胱甘肽 (GSH)/谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 轴的抑制触发血管平滑肌细胞的铁死亡,促进慢性肾脏病的血管钙化^[17]。

纤维母细胞生长因子 23 (fibroblast growth factor 23, FGF23) 是一种重要的内分泌磷稳态调节因子,同时是体内维生素 D 代谢的关键调节因子,通过调节钙、磷与维生素 D 的相互作用来维持矿物质代谢的平衡^[18-19],其通过与受体细胞的 FGFR1c/ α -Klotho 受体复合物结合从而将信号进一步传导至胞内。维生素 D 在肝细胞内通过 C-25 位羟化形成 25(OH)D,经由 1, α -羟化酶和 24-羟化酶生成活性产物 1,25(OH)₂D₃, FGF23 还可以通过抑制 1, α -羟化酶的活性刺激 1,

25(OH)₂D₃ 的生成以及同时增加 24-羟化酶的活性抑制 1,25(OH)₂D₃ 的生成这 2 种方式共同发挥降低 1,25(OH)₂D₃ 水平的作用^[20]。25(OH)D 作为血清中多种维生素 D 代谢产物中含量最多且最稳定的一种,其循环含量高、半衰期长^[21],因此是衡量维生素 D 营养状态的最稳定指标。

Klotho 是一类分子量为 130 kDa 的跨膜蛋白,分泌入血和尿液的 Klotho 蛋白主要存在膜型和分泌型 2 种。膜型 Klotho 蛋白是 FGF23 的协同受体,可促进肾脏磷的排泄和抑制活性维生素 D 的合成^[22]。Klotho 蛋白的缺乏会造成严重的肾损害和纤维化,加速血管钙化,而其过度表达会抑制血管钙化^[23]。

前期研究发现,维生素 D 缺乏与血管钙化有关,FGF23-Klotho 通路参与体内维生素 D 代谢,然而,维生素 D 缺乏是否通过影响 FGF23-Klotho 通路进而参与血管钙化的发病过程仍未知,因此,本文拟从临床分析入手,结合体外实验对上述问题进行研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究纳入 161 例临床诊断为心血管疾病的住院患者 (中位年龄为 62 岁),收集了所有参与者的年龄、性别、身高、体质量、身体质量指数、收缩压、舒张压、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、空腹血糖、血红蛋白、吸烟状况和用药情况的临床信息。患有 I 型糖尿病、妊娠期糖尿病、其他特殊类型糖尿病、每周饮酒量 (男性饮酒量大于或等于 140 g; 女性饮酒量大于或等于 70 g)、病毒性肝炎、自身免疫性肝病、肾功能不全、甲状腺功能减退或甲亢、急性感染、严重心血管疾病、严重脑血管疾病、恶性肿瘤和精神疾病的患者被排除在研究之外。此外,目前正在使用已知的影响维生素 D 代谢的药物 (包括糖皮质激素和钙/维生素 D 补充剂) 的个体也被排除在研究之外。所有参与者在参与之前都提供了书面知情同意。

1.2 主要仪器

酶标仪 (美国 Bio Tek 公司); 凝胶成像仪 (上海勤翔科学仪器有限公司); LightCycler96 实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (瑞士 Roche 公司)。

1.3 药品和试剂

人 Klotho ELISA 检测试剂盒、人 FGF23

ELISA 检测试剂盒均购于合肥优普特公司;维生素 D 受体 (VDR) 的 siRNA 购于金唯智 (GENEWIZ) 生物科技有限公司;兔抗-Runx2、兔抗- β -actin、鼠抗-GAPDH 均购于武汉 Abclonal 公司;兔抗-Klotho、FGFR1、VDR 均购于 Affinity 公司; Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、茜素红均购于国药集团化学试剂有限公司;VitaminD₃ 购于 MCE;Lipofectamine[®] RNAi MAX 转染试剂 (Cat #: 13778150)、炭剥离血清 (Cat #: 12676-011) 均购于 Invitrogen;DMEM 培养基 (Cat #: 06-1055-57-1A)、胎牛血清 (Cat #: FBS04-010-1A) 均购于 Biological Industries;逆转录试剂盒 (Cat #: R123-01)、AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Cat #: Q111-02) 均购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.4 细胞培养

人主动脉平滑肌细胞 (human aortic smooth muscle cells, HASMC) 在含 5% CO_2 、37 °C 的恒温细胞培养箱中培养,并在含有 10% FBS、50 mg/mL 青霉素/链霉素的培养基中生长。当细胞汇合度为 70%~80% 时,改用含 3 mmol/L 磷酸盐 ($n(\text{Na}_2\text{HPO}_4) : n(\text{NaH}_2\text{PO}_4) = 1 : 1$) 的平滑肌细胞钙化培养液培养,每 2 d 更换 1 次培养基。由于胎牛血清中含有活性维生素 D,所有涉及维生素 D 的实验都使用炭剥离血清。

2 实验方法

2.1 目的基因蛋白表达的检测

实验使用含有蛋白酶抑制剂 (PMSF 和 Cocktail) 的细胞裂解液,于摇床上冰浴裂解,收集裂解液,于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,小心收集上清并转移至新的 EP 管中,即为细胞总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白质量浓度,蛋白定量和变性后采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 变性电泳、转膜、室温封闭、一抗孵育、二抗孵育后经 ECL 显色,用化学发光成像分析系统进行曝光成像,并对条带进行分析和处理。

2.2 目的基因 mRNA 表达的检测

收集培养的 HASMC 细胞在 RNA 提取试剂中裂解以提取总 RNA,然后采用逆转录试剂盒将总 RNA 合成 cDNA,用 SYBR green PCR master mix 和相应引物进行实时定量 PCR 检测相应基因 mRNA 表达。本实验所用引物序列见表 1 所列。

表 1 引物序列

引物	引物方向	引物序列
FGFR1	F	GCCAGACAACCTGCCTTATR
	R	CACGTATACTCCCCTGCGTC
VDR	F	TGGAGACTTTGACCGAACGR
	R	GTAGGTGGGGTCGTAGGTCT
Klotho	F	GCGTCCATCTGGGATACGTTR
	R	TCGCGGAAGACGTTGTTGTA
BMP2	F	AGGAGGCAAAGAAAAGGAACGGACR
	R	GGAAGCAGCAACGCTAGAAGACAG
RUNX2	F	GCAAGGTTCAACGATCTGAGATTR
	R	AAGACGGTTATGGTCAAGGTGAAA
β -actin	F	CTGGAACGGTGAAGGTGACAR
	R	AAGGGACTTCTGTAACAATGCA

2.3 VDR siRNA 转染

当细胞汇合度达 50% 时,采用 Opti-MEM I 还原血清培养基培养。使用 Lipofectamine[®] RNAi MAX 转染试剂将培养在 6 孔板上的 HASMC 细胞 (用于 western blot 或实时荧光定量 PCR 检测) 按标准浓度进行转染,转染时间为 24 h。24 h 后更换为完全培养基 (含 2% FBS、1% 双抗的 DMEM 培养基),继续稳定培养 24 h 后进行后续处理。

2.4 茜素红染色

茜素红染色液能够与钙盐形成红色螯合物,常被用于检测细胞或组织中的钙盐沉积。茜素红染料用醋酸调节 pH 值至 4.0,细胞用 4% 多聚甲醛固定 45 min 后加入茜素红,室温染色 30 min,并用酸性 PBS (pH 值为 4.0) 洗去浮色,染色结果在蔡司显微镜下观察并用拍摄,定性确定钙盐沉积情况。完成后将细胞在 0.1 mol/L 盐酸中脱钙,取上清液在 405 nm 吸收峰处比色测定,定量分析钙盐沉积变化情况。

2.5 统计分析

统计分析使用 SPSS 20.0 软件和 GraphPad Prism 7.0 软件进行。所有数据均至少重复 3 次。所有的数据均进行正态性检验和方差分析,多组样本均数比较用单因素方差分析 (one way ANOVA),两两比较方差齐时采用 q 检验,方差不齐用 Tamhane's T2 法。用卡方检验分析维生素 D 水平在是否患钙化上的构成比差异,采用 Logistic 回归分析确定与钙化相关的多个因素。采用多元线性回归分析确定与钙化独立相关的因素。所有 P 值均为双尾分布, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 研究对象的临床特征及指标分析

25(OH)D 是反映人体维生素 D 营养状态的重要指标,2011 年内分泌学会依据 25(OH)D 水平,将 25(OH)D 质量浓度低于 20 ng/mL 定义为维生素 D 缺乏,即 III 组;质量浓度高于 30 ng/mL 定义为维生素 D 充足,即 I 组;质量浓度介于两者之间定义为维生素 D 不足^[24],即 II 组。依据维

生素 D 水平将 161 例心血管疾病患者分类,对其相关指标进行正态分布检验,正态分布数据用 5% 修整。

不同维生素 D 水平下患者临床参数及具有显著性的临床指标见表 2 所列。由表 2 可知,不同维生素 D 水平下,血清高密度脂蛋白胆固醇、空腹血糖以及糖化血红蛋白均表现出不同程度的显著性差异(与 I 组相比, * $P < 0.05$; 与 II 组相比, # $P < 0.05$)。

表 2 不同维生素 D 水平下患者临床指标参数

临床指标	I 组	II 组	III 组
人数	63	27	71
钙化人数	8	22	23
年龄	64	61	60
体质量/kg	67.50±13.37	68.96±9.99	65.82±9.69
身高/cm	165.25±7.64	163.53±7.96	162.40±8.62
高压/mmHg	130.62±15.27	136.09±22.17	136.22±16.56
低压/mmHg	82.27±11.89	83.63±10.95	82.79±10.12
身体质量指数/(kg/m ²)	24.84±5.35	25.67±3.36	24.94±4.09
吸烟人数	12	7	20
c(总胆固醇)/(mmol/L)	4.32±0.92	4.15±1.21	4.24±0.97
c(低密度脂蛋白胆固醇)/(mmol/L)	2.38±0.70	2.28±0.94	2.17±0.73
c(高密度脂蛋白胆固醇)/(mmol/L)	1.13±0.22	0.98±0.17	1.15±0.28*#
c(甘油三酯)/(mmol/L)	1.25±0.72	1.51±0.75	1.19±1.24
c(空腹血糖)/(mmol/L)	4.98±0.98	4.98±0.70*	4.74±0.54
c(糖化血红蛋白)/(mmol/L)	5.70±0.49	6.10±0.65	5.75±3.40*#

3.2 钙化的潜在影响因素

在本次研究人群中,血清中 FGF23 水平为 1 994.45 pg/mL,范围为 882.01~3 693.01 pg/mL,血清中 Klotho 水平为 155.39 pg/mL,范围为 42.44~372.63 pg/mL,患者血清 Klotho 水平和 FGF23 水平如图 1 所示。

从图 1 可以看出,钙化患者与非钙化患者的血清中 FGF23、Klotho 水平均存在显著性差异。

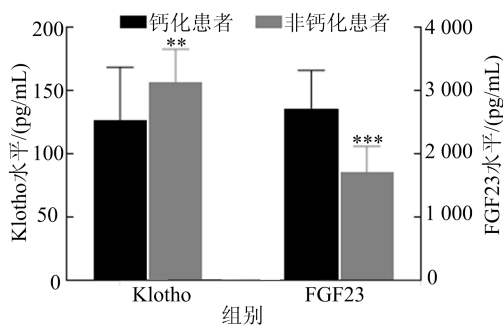


图 1 钙化患者与非钙化患者血清中 Klotho、FGF23 水平

将不同水平的维生素 D 质量浓度与是否发生钙化进行卡方检验,依据 Pearson 卡方值及

P 值判断其是否存在显著性差异,可知维生素 D 水平与钙化的发生存在负相关性($P < 0.01$)。采用 Logistic 回归分析确定与钙化相关的因素,分析结果见表 3 所列,回归分析中显著的指标则为钙化发生的独立影响因素。

表 3 钙化 Logistic 回归分析结果

因素	回归系数	显著性	优势比	95%置信区间	
				下限	上限
Klotho 水平	0.039		1.040	1.017	1.063
维生素 D 水平	-0.174	0.002	0.840	0.753	0.938
FGF23 水平	0.008	0	1.008	1.004	1.012
常量	-19.974	0.001	0		

综上,血清维生素 D、FGF23、Klotho 水平显著影响钙化发生。此外,由表 3 可知,维生素 D 的影响因素为 -0.174,显示维生素 D 是发生钙化的独立负向影响因素(优势比为 0.840,95%置信区间为 0.753~0.938),意味着维生素 D 水平越低,发生钙化的可能性越高。

3.3 HASMC 细胞钙化的诱导因素

文献[25]研究表明,在钙化的血管样品中 FGF23 和钙化标志基因 *RUNX2* 的表达水平均明显升高,而本研究通过对临床样本的分析发现,高磷酸盐水平与钙化程度、FGF23 等指标之间存在正相关性,因此通过高磷酸盐诱导的方法模拟血清中高磷酸盐水平对 HASMC 细胞的影响,采用 western blot 检测对照组(NC),在钙化培养基中培养 4 d 的高磷酸诱导模型组(PI)(作用浓度为 3 mmol/L),转染 VDR siRNA 抑制维生素 D 信号通路组(SI)及造模转染共处理组(SP)的相关蛋白的表达情况(与对照组相比, * $P < 0.05$ 、* * $P < 0.01$ 、* * * $P < 0.001$),western blot 检测结果如图 2 所示。由图 2a 可知,高磷酸盐诱导下 *RUNX2* 表达显著升高,同时 *Klotho* 表达水平显著降低。

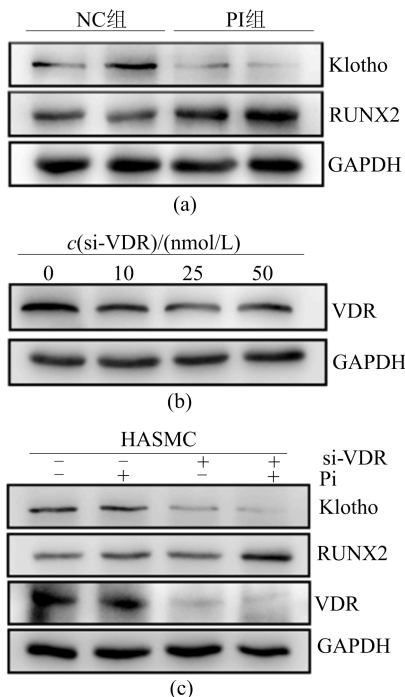


图 2 HASMC 不同处理后蛋白的表达量

在体内,维生素 D 需结合 VDR 发挥其生物学效果。为排除培养基中维生素 D 对细胞的影响,本文采用炭剥离血清培养 HASMC,同时转染 VDR siRNA 抑制维生素 D 信号通路。由图 2b 可知,VDR siRNA 在细胞中的最佳作用浓度为 25 nmol/L。由图 2c 可知,VDR 敲低后 *RUNX2* 表达上调,*Klotho* 表达下调,该结果与高磷酸盐诱导一致。同样,HASMC 在 VDR siRNA 和高磷酸盐同时处理后,*RUNX2* 上调更加显著。实时荧光定量 PCR 和茜素红染色结果如图 3、图 4 所示。

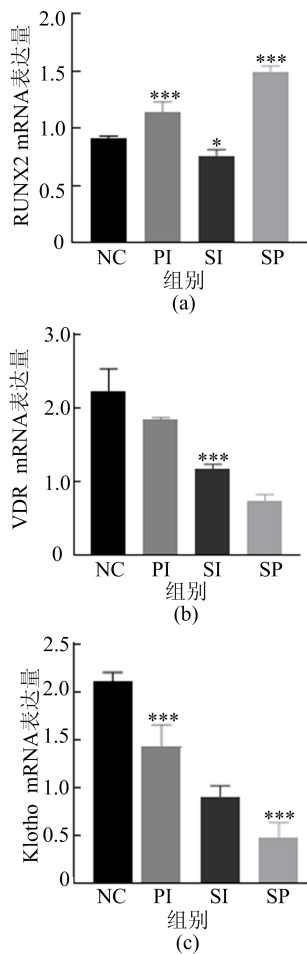


图 3 HASMC 不同处理后蛋白 mRNA 表达量

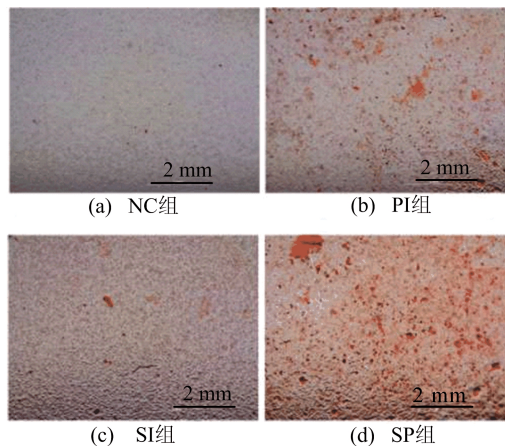


图 4 HASMC 茜素红染色结果

由图 3、图 4 可知,高磷酸盐诱导可以增加 *RUNX2* 的表达,降低 *Klotho* 的表达,共处理后效果加剧。结果表明,维生素 D 缺乏加剧高磷酸盐诱导的 HASMC 细胞钙化的发生,并且与 *Klotho* 有关。

3.4 FGF23-Klotho 作用机制

为探究补充维生素 D 能否改善细胞钙化程度,本文采用 HASMC 细胞进行维生素 D 的回补

实验,设置对照组 NC、转染 VDR siRNA 的 SI 组、补充维生素 D 的 VD 组、敲低和回补共处理的 SD 组(与 NC 组相比, * $P < 0.05$ 、* * $P < 0.01$ 、* * * $P < 0.001$),不同处理后的 western blot 检测和实时荧光定量 PCR 结果如图 5、图 6 所示。

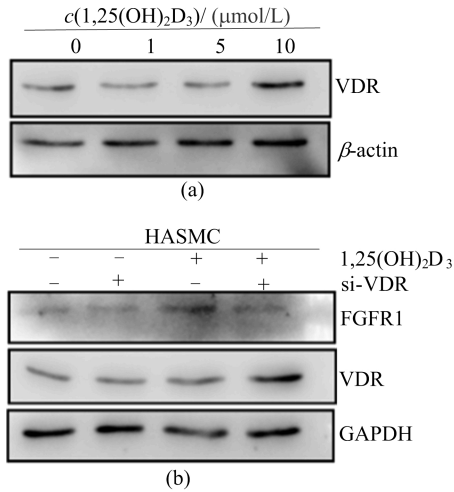


图 5 补充维生素 D 后 VDR、FGFR1 蛋白表达量

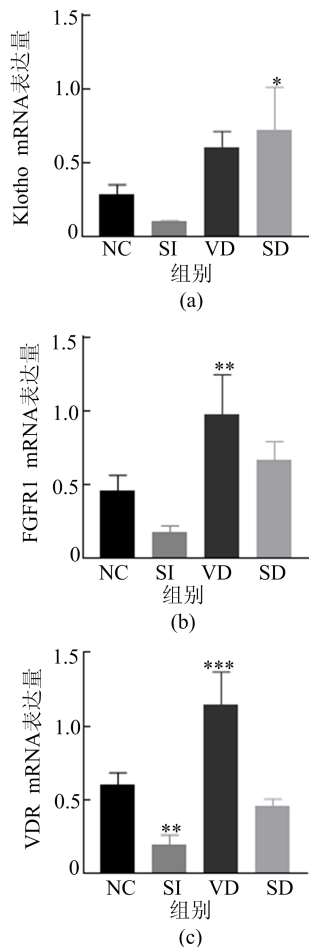


图 6 补充维生素 D 后蛋白 mRNA 表达量

由图 5、图 6 可知,向无维生素 D 的培养基中加入 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($10 \mu\text{mol/L}$) 后, Klotho 和 VDR 表达水平均显著上调,补充 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可有效地提高血清 $25(\text{OH})\text{D}$ 水平。据此推测,维生素 D 质量浓度充足的情况下, Klotho 大大增加了 FGF23 与 FGFR 的亲和力^[26], FGF23 与 Klotho-FGFR 复合物结合,可激活下游信号通路^[27],共同维持体内钙磷平衡,进而阻止了钙化的发生。

综上,当体内的维生素 D 处于正常水平时,维生素 D 与 FGF23-Klotho 轴共同调节体内磷酸盐代谢,防止血管钙化的发生;当体内缺乏维生素 D 时, Klotho 水平下降, FGF23-Klotho 轴紊乱,从而产生 FGF23 抵抗,抑制 FGF23 对磷酸盐的代谢过程,导致体内磷酸盐代谢紊乱,加速血管钙化的发生。

4 讨 论

血管钙化是导致患者发生心血管不良事件的重要因素之一,维生素 D 缺乏与血管钙化有关,但维生素 D 参与血管钙化的机制尚不明确。本研究发现,与正常心血管病患者相比,伴有钙化的心血管疾病患者血清 FGF23 水平明显升高,同时血清 $25(\text{OH})\text{D}$ 水平明显较低,而高的 FGF23 血清水平会导致维生素 D 合成的减少^[28]。维生素 D 不仅能增加肠道对钙和磷酸盐的吸收,还能促进其肾脏重吸收,导致血清中钙和磷酸盐水平升高,较高的磷酸盐浓度会抑制维生素 D 的激活并刺激甲状旁腺激素(PTH)^[29]的释放。

维生素 D 稳态对心血管健康的影响,还可能与参与者的整体健康状态、生活方式、身体组成成分等相关因素有关。血清钙、磷、PTH、维生素 D 水平的紊乱以及它们对骨转换、矿化和骨骼外钙化的影响,可能会导致肾性骨营养不良^[30]。低维生素 D 状态可能与慢性和急性不良健康结局的风险增加相关^[31],本文发现维生素 D 与 FGF23-Klotho 轴共同影响血管钙化的发生,为今后维生素 D 缺乏和心血管疾病的研究提供新方向。

本研究也存在一些局限性,所采纳的临床数据没有明确记录阳光照射、运动状态等,而这些是影响血清维生素 D 水平的重要因素,在未来的研究中需要相应的数据来进一步证实 FGF23-Klotho、维生素 D 与血管钙化之间的关联;此外,对于研究者钙化水平的分析不够详细,在未来的研究中,需采用更具体的技术来区分钙化程度。

[参 考 文 献]

- [1] SACHECK J, GOODMAN E, CHUI K, et al. Vitamin D deficiency, adiposity, and cardiometabolic risk in urban school-children[J]. *Journal of Pediatric Psychology*, 2011, 159: 945-950.
- [2] GANJI V, ZHANG X, TANGPRICHA V. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and prevalence estimates of hypovitaminosis D in the U. S. population based on assay adjusted data[J]. *Journal of Nutrition*, 2012, 142(3): 498-507.
- [3] DALY R M, GAGNON C, LU Z X, et al. Prevalence of vitamin D deficiency and its determinants in Australian adults aged 25 years and older; a national, population-based study [J]. *Clinical Endocrinol*, 2012, 77: 26-35.
- [4] HOLICK M F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 80(Suppl6): 1678-1688.
- [5] KENFRICK J, TARGHER G, SMITS G, et al. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is independently associated with cardiovascular disease in the Third National Health and Nutrition Examination Survey [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 205(1): 255-260.
- [6] WU M, REMENTER C, GIACHELLI C M. Vascular calcification; an update on mechanisms and challenges in treatment [J]. *Calcified Tissue International*, 2013, 93 (4): 365-373.
- [7] DURHAM A L, SPEER M Y, SCATENA M, et al. Role of smooth muscle cells in vascular calcification; implications in atherosclerosis and arterial stiffness [J]. *Cardiovascular Research*, 2018, 114(4): 590-600.
- [8] COZZOLINO M, ICERI P, GALASSI A, et al. The key role of phosphate on vascular calcification [J]. *Toxins*, 2019, 11(4): 213.
- [9] THOMPSON B, TOWLER D A. Arterial calcification and bone physiology; role of the bone-vascular axis [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2012, 8: 529-543.
- [10] CHAVKIN N W, CHIA J J, CROUTHAMEL M H, et al. Phosphate uptake-independent signaling functions of the type III sodium-dependent phosphate transporter, PiT-1, in vascular smooth muscle cells [J]. *Experimental Cell Research*, 2015, 333: 39-48.
- [11] VOELKL J, LUONG T T, TUFFAHA R, et al. SGK1 induces vascular smooth muscle cell calcification through NF- κ B signaling [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2018, 128: 3024-3040.
- [12] LEE H L, WOO K M, RYOO H M, et al. Tumor necrosis factor- α increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 391: 1087-1092.
- [13] HAN J, LI H L, ZHANG L L, et al. Role of endothelial cells in vascular calcification [J]. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2022, 9: 895005.
- [14] WEN C, YANG X, YAN Z, et al. Nalp3 inflammasome is activated and required for vascular smooth muscle cell calcification [J]. *International Journal of Cardiology*, 2013, 168: 2242-2247.
- [15] ZHOU S, CAI B, ZHANG Z, et al. CDKN2B methylation and aortic arch calcification in patients with ischemic stroke [J]. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 2017, 24: 609-620.
- [16] CHENG Y, NI L H, ZHANG C J, et al. Vascular calcification; new insights into endothelial cells [J]. *Microvascular Research*, 2021, 134: 104105.
- [17] YE Y Z, CHEN A, LI L, et al. Repression of the antiporter SLC7A11/glutathione/glutathione peroxidase 4 axis drives ferroptosis of vascular smooth muscle cells to facilitate vascular calcification [J]. *Kidney International*, 2022, 102(6): 1259-1275.
- [18] VOGT I, HAFFNER D, NESTLER M L. FGF23 and phosphate-cardiovascular toxins in CKD [J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(11): 647.
- [19] HU M C, SHI M J, CHO H J, et al. Klotho and phosphate are modulators of pathologic uremic cardiorenal remodeling [J]. *Journal of The American Society of Nephrology*, 2015, 26(6): 1290-1302.
- [20] FAKHAR M, RASHID S. Targeted inhibition of Klotho binding to fibroblast growth factor 23 prevents hypophosphatemia [J]. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 2017, 75: 9-19.
- [21] LIM K, HAMANO T, THADHANI R. Vitamin D and calcimimetics in cardiovascular disease [J]. *Seminars in Nephrology*, 2018, 38(3): 251-266.
- [22] MUNOZ J R, RODELO C, PENDON M V, et al. Klotho/FGF23 and Wnt signaling as important players in the comorbidities associated with chronic kidney disease [J]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12(3): 185.
- [23] VAHED S Z, NIKASA P, ARDALAN M. Klotho and renal fibrosis [J]. *Nephro Urology Monthly*, 2013, 5(5): 946-948.
- [24] GUTIERREZ O M. Fibroblast growth factor 23, klotho and disordered mineral metabolism in chronic kidney disease; unraveling the intricate tapestry of events and implications for therapy [J]. *Journal of Renal Nutrition*, 2013, 23(3): 250-254.
- [25] HAUSSLER M R, LIVINGSTON S, SABIR Z L, et al. Vitamin D receptor mediates a myriad of biological actions dependent on its 1, 25-Dihydroxyvitamin D ligand; distinct regulatory themes revealed by induction of Klotho and Fibroblast growth factor-23 [J]. *Journal of Bone and Mineral Research Plus*, 2020, 5(1): e10432.
- [26] DONATE-CORREA J, MARTÍN-NÚÑEZ E, HERNAÚNDEZ-CARBALLO C, et al. Fibroblast growth factor 23 expression in human calcified vascular tissues [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(18): 7899-7913.

[参 考 文 献]

- [1] 廖世文. 膨胀土与铁路工程[M]. 北京: 中国铁道出版社, 1984:9-11.
- [2] 刘特洪. 工程建设中的膨胀土问题[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1997:25-26.
- [3] 张向东, 任昆. 冻融循环下煤渣改良土的强度及屈服特性[J]. 煤炭学报, 2018, 43(12):3371-3378.
- [4] ZAMAN M M, NAJI K N. Effect of freeze-thaw cycles on class C fly ash stabilized aggregate base[C]//Proceedings of the 82nd Annual Meeting of Transportation Research Board (TRB). [S. l. : s. n.], 2003:14-15.
- [5] 胡晓军, 吴延枝. 膨胀土改良技术研究综述[J]. 合肥学院学报(自然科学版), 2014, 24(4):80-85.
- [6] 唐东旗, 姚秀芳, 王晓岗, 等. 石灰改性膨胀土冻融循环的强度效应研究[J]. 许昌学院学报(自然科学版), 2022, 41(2):91-94.
- [7] 杨俊, 刘世宣, 张国栋. 冻融循环对风化砂改良膨胀土收缩变形影响研究[J]. 水力发电学报, 2016, 35(2):75-81.
- [8] 郝雅芬. 冻融循环下赤泥-钢渣改性水泥土力学性能劣化的试验研究[D]. 太原: 太原理工大学, 2020.
- [9] 宋爱苹, 张亚飞. 冻融条件下水泥土及掺粉煤灰水泥土的强度特性[J]. 中外公路, 2017, 37(3):221-223.
- [10] MAJED M A, NABIL M A, MOUSA F A. Influence of heat treatment on the behavior of clayey soils[J]. Applied Clay Science, 2001, 20(3):129-135.
- [11] 秦亚婷, 彭同江, 孙红娟, 等. 高温处理对钠化膨润土蒙脱石结构变化的影响[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2021, 58(3):159-164.
- [12] 曾召田, 邵捷昇, 莫红艳, 等. 高温状态下受热时间对膨润土物性指标的影响[J]. 防灾减灾工程学报, 2021, 41(3):463-469.
- [13] 蒋银强. 微波加热对膨胀土性质影响的试验研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2021.
- [14] WANG D, MA W, NIU Y, et al. Effects of cyclic freezing and thawing on mechanical properties of qinghai-tibet clay[J]. Cold Regions Science and Technology, 2007, 48(1):34-43.
- [15] 常丹, 刘建坤, 李旭, 等. 冻融循环对青藏粉砂土力学性质影响的试验研究[J]. 岩石力学与工程学报, 2014, 33(7):1496-1502.
- [16] 许雷, 刘斯宏, 鲁洋, 等. 冻融循环下膨胀土物理力学特性研究[J]. 岩土力学, 2016, 37(2):167-174.
- [17] 严浩然, 王伟, 王林霞, 等. 冻融循环下纳米黏土改性滨海水泥土的微观结构[J]. 科学技术与工程, 2021, 21(11):4562-4569.
- [18] 苗得雨, 白晓红. 基于 Matlab 的土体 SEM 图像处理[J]. 水文地质工程地质, 2014, 41(6):141-146.
- [19] 中华人民共和国住房和城乡建设部. 土工试验方法标准: GB/T 50123—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019:185-189.
- [20] VIKLANDER P P. permeability and volumc changes in till due to cyclic frezc thaw[J]. Canadian Geotechnical Journal, 1998, 35(3):471-477.
- [21] ANDERSLAND O B. Frozen ground engineering[M]. New York: Chapman Hall, 2003:54-60.
- [22] 张泽, 马巍, 齐吉琳. 冻融循环作用下土体结构演化规律及其工程性质改变机理[J]. 吉林大学学报(地球科学版), 2013, 43(6):1904-1914.
- [23] 王晓燕, 姚志华, 党发宁, 等. 裂隙膨胀土微观结构演化试验[J]. 农业工程学报, 2016, 32(3):92-100.
- [24] 谈云志, 吴翩, 付伟, 等. 改良粉土强度的冻融循环效应与微观机制[J]. 岩土力学, 2013, 34(10):2827-2834.
- [25] LEE W, BOHRA N C, ALTSCHAEFFL A G. Resilient modulus of cohesive soils[J]. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, 1997, 123(2):131-136.
- [26] 张先伟, 孔令伟, 郭爱国, 等. 基于 SEM 和 MIP 试验结构性黏土压缩过程中微观孔隙的变化规律[J]. 岩石力学与工程学报, 2012, 31(2):406-412.

(责任编辑 闫杏丽)

(上接第 118 页)

- [27] PASAOGLU O T, SENELMIS A, HELVACI O, et al. FGF23, α -Klotho and vitamin D mediated calcium-phosphate metabolism in haemodialysis patients[J]. Journal of Medical Biochemistry, 2021, 40(2):160-166.
- [28] AKIMBEKOV N S, DIGEL I, SHERELKHAN D K, et al. Vitamin D and phosphate interactions in health and disease [M]//Phosphate metabolism from physiology to toxicity. [S. l.]: Springer, 2022:37-46.
- [29] NAKATANI T, OHNISHI M, RAZZAQUE M S. Inactivation of klotho function induces hyperphosphatemia even in presence of high serum fibroblast growth factor 23 levels in a genetically engineered hypophosphatemic (Hyp) mouse model [J]. The FASEB Journal, 2009, 23:3702-3711.
- [30] MARTIN A, DAVID V. Transcriptomics: a solution for renal osteodystrophy? [J]. Current Osteoporosis Reports, 2020, 18(3):254-261.
- [31] KURO O M. Phosphate as a pathogen of arteriosclerosis and aging[J]. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 2021, 28(3):203-213.

(责任编辑 闫杏丽)