

·基础研究·

分泌型卷曲相关蛋白1通过Wnt/ β -catenin 通路抑制血管平滑肌细胞钙化

罗文君¹, 刘灿昭^{1,2}, 王先宝¹

(1. 南方医科大学珠江医院心脏中心实验室心血管内科, 广东广州 510280; 2. 南方医科大学珠江医院转化医学研究中心, 广东广州 510280)

摘要:【目的】探讨分泌型卷曲相关蛋白1(SFRP1)通过Wnt/ β -catenin通路对血管平滑肌细胞成骨分化的影响。【方法】使用原代人主动脉血管平滑肌细胞,转染SFRP1小干扰RNA(siSFRP1)敲低SFRP1在人血管平滑肌细胞表达,转染慢病毒Lenti-Sfrp1过表达SFRP1,使用3 mmol/L的磷酸二氢钠(Pi)刺激构建细胞血管钙化模型。体内实验采用维生素D₃(VD₃)构建急性血管钙化模型,腹腔注射SFRP1抑制剂WAY316606(0.5 mg/kg, 7 d),Micro-CT检测小鼠主动脉钙化程度。Western blot检测成骨分化指标RUNX2、BMP2,血管平滑肌细胞收缩标志SM22 α ,Wnt信号通路 β -catenin蛋白水平表达。钙含量检测与茜素红染色评估血管钙化严重程度,研究SFRP1对血管平滑肌钙化的影响。【结果】在原代人血管平滑肌细胞钙化模型与急性血管钙化模型中,SFRP1蛋白水平表达明显下调(0.30 \pm 0.02, $P=0.02$; 0.15 \pm 0.03, $P=0.04$)。使用小分子干扰RNA敲低SFRP1,明显上调RUNX2表达(2.91 \pm 0.38, $P<0.05$),下调SM22 α 表达(0.48 \pm 0.08, $P<0.05$),同时激活Wnt/ β -catenin信号通路(2.01 \pm 0.11, $P=0.003$)。体内实验使用SFRP1抑制剂加重小鼠主动脉钙化,上调BMP2与 β -catenin表达(3.11 \pm 0.55, $P=0.04$; 3.97 \pm 0.44, $P=0.03$)。使用慢病毒过表达SFRP1,明显下调RUNX2(1.34 \pm 0.04, $P=0.02$)与 β -catenin表达(1.06 \pm 0.06, $P=0.04$),上调SM22 α 表达(0.74 \pm 0.03, $P=0.03$)。茜素红染色定量与钙含量检测显示过表达SFRP1抑制血管平滑肌细胞钙化(1.36 \pm 0.08, $P=0.0006$; 1.51 \pm 0.03, $P=0.0021$)。【结论】SFRP1通过抑制Wnt/ β -catenin通路减轻血管平滑肌细胞成骨分化。

关键词:分泌型卷曲相关蛋白1;Wnt/ β -catenin信号通路;血管平滑肌细胞;成骨分化;血管钙化

中图分类号:R543

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2025)05-0816-10

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2025.0511

SFRP1 Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Calcification Via the Wnt/ β -catenin Signaling Pathway

LUO Wenjun¹, LIU Canzhao^{1,2}, WANG Xianbao¹

(1. Department of Cardiology, Laboratory of Heart Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 2. Center for Translational Medicine Research, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China)

Correspondence to: WANG Xianbao; E-mail: wxb2007wxb@126.com

Abstract:【Objective】To investigate the effect of secreted frizzled related protein 1 (SFRP1) via Wnt/ β -catenin signaling pathway on calcification of vascular smooth muscle cell.【Methods】Primary human aortic vascular smooth muscle cells were transfected with SFRP1-specific small interfering RNA (siSFRP1) to knock down SFRP1 expression, transfected with lentiviral vector Lenti-Sfrp1 to overexpress SFRP1, and stimulated with 3 mmol/L sodium dihydrogen

收稿日期:2025-06-26

录用日期:2025-08-17

基金项目:广东省自然科学基金(2021A1515011097)

作者简介:罗文君,第一作者,研究方向:血管钙化,E-mail:april99728@163.com;王先宝,通信作者,主任医师,E-mail:wxb2007wxb@126.com

phosphate (Pi) to establish a cellular vascular calcification model. *In vivo*, a mouse model of acute vascular calcification was established using vitamin D₃ (VD₃) treatment. The SFRP1 inhibitor WAY-316606 was administered intraperitoneally (0.5 mg/kg daily for 7 days). Aortic calcification was quantified by micro-computed tomography (micro-CT). Western blot analysis was performed to detect the expression of osteogenic differentiation markers (RUNX2 and BMP2), vascular smooth muscle cell contractile marker SM22 α , and β -catenin protein in the Wnt signaling pathway. The severity of vascular calcification was evaluated through calcium content measurement and Alizarin Red staining. These approaches were employed to investigate the effect of SFRP1 on VSMC calcification.【Results】In the primary human vascular smooth muscle cell calcification model and the acute vascular calcification model, the expression of SFRP1 protein was significantly down-regulated (0.30 ± 0.02 , $P = 0.02$; 0.15 ± 0.03 , $P = 0.04$). The expression of RUNX2 (2.91 ± 0.38 , $P < 0.05$) was significantly up-regulated and SM22 α (0.48 ± 0.08 , $P < 0.05$) were significantly down-regulated by small interfering RNA (siRNA), whereas the Wnt/ β -catenin signaling pathway was also significantly activated (2.01 ± 0.11 , $P = 0.003$). *In vivo*, inhibition of SFRP1 exacerbated aortic calcification and significantly up-regulated the expression of BMP2 (3.11 ± 0.55 , $P = 0.04$) and β -catenin (3.97 ± 0.44 , $P = 0.03$). Lentiviral overexpression of SFRP1 significantly downregulated RUNX2 (1.34 ± 0.04 , $P = 0.02$) and β -catenin (1.06 ± 0.06 , $P = 0.04$) expression, while upregulating SM22 α (0.74 ± 0.03 , $P = 0.03$). Quantitative alizarin red staining and calcium content assays demonstrated that SFRP1 overexpression significantly inhibited vascular smooth muscle cell calcification (1.36 ± 0.08 , $P = 0.0006$; 1.51 ± 0.03 , $P = 0.0021$).【Conclusion】SFRP1 attenuates vascular smooth muscle cell calcification via the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: secreted frizzled related protein 1; Wnt/ β -catenin signaling pathway; vascular smooth muscle cells; osteogenic differentiation; vascular calcification

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2025, 46(5): 816-825]

血管钙化是矿物质异常沉积于血管壁的一种病理现象,也是增加慢性肾脏疾病患者心血管疾病死亡风险的独立危险因素^[1-2]。研究证实慢性肾脏疾病血管钙化主要发生于血管中膜,以血管中膜的血管平滑肌细胞的主动成骨样分化为主^[3]。因而,血管钙化是慢性肾脏疾病患者治疗过程中不可忽视的重要环节。分泌型卷曲相关蛋白1(secreted frizzled related protein 1, SFRP1)与Wnt配体竞争性结合,从而抑制Wnt/ β -catenin信号通路^[4]。Wnt/ β -catenin信号通路是调节机体生长发育的关键信号通路^[5-6],也可调控血管平滑肌细胞成骨样分化及血管钙化^[7-8]。而SFRP1作为调节Wnt信号的重要分子,在心血管领域发挥着保护作用^[9],研究表明SFRP1可抑制Wnt/ β -catenin信号通路,从而促进血管平滑肌细胞增殖调节血管新生^[10-11],但目前其在血管钙化的作用尚未阐明。因此,本研究通过构建细胞血管钙化模型,使用小分子干扰RNA,过表达慢病毒,药理学抑制剂WAY-316606等多种手段探究SFRP1是否通过Wnt/ β -catenin信号通路参与调控血管平滑肌细胞成骨样分化的过程,为血管钙化治疗提供新的依据。

1 材料与方 法

1.1 动物

本研究的所有动物实验经南方医科大学珠江医院动物伦理委员会批准(批准号:LAEC-2025-127),并按照《国际动物生物医学研究指导原则》进行相关实验。本研究选用的8周龄雄性C57BL/6野生型小鼠品系均购自珠海百试通生物科技有限公司,许可证号SCXK(粤)2025-0051。所有小鼠均饲养于南方医科大学珠江医院实验动物中心。饲养条件为:SPF级动物房,每笼5只小鼠,专人喂养。室温(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(60 ± 10)%,模拟正常昼夜生物节律。

1.2 材料

原代人主动脉血管平滑肌细胞购自百菱生物(HUM-iCell-c010),磷酸二氢钠(Sigma),SFRP1抗体(Selleck, F1142),RUNX2抗体(Abcam, ab76956),BMP2抗体(Abcam, ab214821), β -catenin抗体(Abcam, ab32572),SM22 α 抗体(Proteintech, 10 493-1), β -actin抗体(Proteintech, 66 009-1),DMEM高糖培养基(Gibco),非必需氨基

酸 NEAA (Gibco), L-谷氨酰胺 (Gibco), Opti-MEM (Gibco), Western blot 发光试剂盒 (Millipore), RT-qPCR 引物 (天一辉远生物), 人种属 SFRP1 siRNA 与阴性对照 (锐博生物), 钙检测试剂盒 (雷根生物), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天), 茜素红染色液 (碧云天), lipo3000 (诺维赞), WAY-316606 (MCE), Vitamin D₃ (MCE), PEI (MCE), DAPI 染料 (碧云天)。

1.3 细胞培养

采用含 100 mL/L 胎牛血清 (FBS)、10 mL/L 抗生素、10 mL/L NEAA、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM 高糖培养基, 在 37 °C 体积分数 5%CO₂ 细胞培养箱中培养人血管平滑肌细胞, 细胞密度约 80% 时, 可建立钙化模型。使用含 50 mL/L FBS、10 mL/L 抗生素、10 mL/L NEAA、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM 高糖培养基, 3 mmol/L 的磷酸二氢钠 (Pi) 刺激 7~14 d, 隔天细胞换液, 7~14 d 收取样品。

1.4 小干扰 RNA 细胞转染

细胞密度约 70% 时, 可转染 siRNA。对照组与敲低组使用 Opti-MEM 与 lipo3000 分别转染 siNC 与 siSFRP1 于人血管平滑肌细胞中, 放入 37 °C 体积分数 5%CO₂ 细胞培养箱中。6 h 后将优化培养基换成 100 mL/L 完全培养基。48 h 后可提取细胞蛋白用于敲低效率验证。

1.5 慢病毒包装与浓缩

使用 8 μg 质粒、6 μg PSMAX2 质粒、2 μg PMD2G 质粒以及 30 μL PEI 混合物转染 HEK293T 细胞, 转染 8 h 后更换新鲜的 100 mL/L FBS 的 DMEM 培养基, 在转染 48 h 和 72 h 收取上清, 获取的病毒上清通过 0.45 mm 醋酸纤维过滤器过滤后与 PEG8000 浓缩液在 4 °C 摇床慢摇 12 h, 3 000×g 离心 10 min, 去除上清后使用 100 μL PBS 重悬病毒沉淀, 得到慢病毒浓缩液用于后续过表达实验。

1.6 茜素红染色与定量

倒置显微镜下观察细胞钙化情况, 达到钙化标准后从细胞间取出细胞样品至实验台。使用无菌 PBS 轻柔清洗细胞面 3 次, 40 g/L PFA 固定细胞形态, 避光环境下加入 20 g/L 茜素红染色液 (pH=4.2), 室温孵育 10 min。无菌去离子水多次清洗细胞面, 至去离子水变澄清为止。吸干残余水分, 大体拍照后置于倒置显微镜下拍细胞局部图。细胞

样品中加入甲酸并充分浸润细胞面, 加至 96 孔板中, 设置一个复孔。405 nm 处检测吸光度, 记录读数, 将剩余甲酸回收至危化品处理处。

1.7 实时荧光定量 PCR 反应

使用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 用于从人血管平滑肌细胞中提取总 RNA, TAKARA 混型定量用逆转录试剂盒将 RNA 逆转为 cDNA。采用 ABI 实时荧光定量反应 PCR 仪、TAKARA 荧光定量 PCR 反应试剂盒、目的基因引物检测 cDNA 中目的基因表达。本研究根据检测目的基因的 CT 值使用相对定量表达分析法进行计算。相关引物序列如下: *RUNX2* 上游 5'-CACAAGTGCGGTGCAAACCTT-3' 和下游 5'-TGACTCTGTTGCTCTCGGTG-3'; *β-actin* 上游 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' 和下游 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'; *SPP1* 上游 5'-TGAAACTGTGCCAGCCAAAC-3' 和下游 5'-AGTCTAATTGCAGTGACCCCC-3'; *β-catenin* 上游 5'-CCTGTTCCCCTGAGGGTATT-3' 和下游 5'-ATTCCTGCTGGTGGCTTGT-3'。

1.8 蛋白免疫印迹试验

蛋白裂解液处理细胞后, 4 °C 下 13 500×g 离心 15 min 取上清。按 BCA 试剂盒说明书定量 20 μg 蛋白。10%SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质, 将凝胶蛋白质转移至 0.22 μm 的 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温孵育 2 h 去除膜上的非特异性结合。1:1 000 一抗孵育 4 °C 过夜, 使目的蛋白与一抗充分结合。1:2 000 二抗室温孵育 1.5 h。洗膜后使用增强化学发光法置于化学发光仪中曝光, 保存曝光图像。

1.9 钙含量检测

本研究采用钙含量检测试剂盒 (邻甲酚酞络合铜比色法) 检测细胞相对钙含量。避光环境配制钙含量检测试剂, 显色剂 B: 显色剂 C=1:1, 4 °C 下蛋白 850×g 低速离心 10 min 后取上清加入显色剂, 室温孵育 10 min。575 nm 处检测吸光度, 记录读数。同时剩余蛋白 4 °C 下 13 500×g 离心 15 min 后进行 BCA 定量, 记录蛋白浓度, 以便后续计算钙含量。

1.10 免疫荧光染色

按照 1×10⁵ 个细胞种植到共聚焦小皿中, 加入 Lenti-Vector 或 Lenti-Sfrp1 慢病毒, 加入钙化培养基培养 7 d。使用 PBS 清洗 3 次, 使用 40 g/L 多聚甲

醛固定 10 min,再次使用 PBS 清洗 3 次。使用 1 g/L Triton-X、50 g/L BSA、100 mL/L 驴血清的 PBS 封闭液室温封闭 1 h。使用 β -catenin (Abcam, 1:100) 4 °C 孵育过夜。次日使用 PBST 清洗 3 次后,使用荧光二抗 1:200 室温孵育 1 h,再次 PBST 清洗 3 次后,使用 DAPI 染料室温染色 15 min,使用 PBST 清洗 3 次后加入封片剂用于后续共聚焦荧光显微镜拍照分析。

1.11 维生素 D₃ 诱导血管钙化模型与 WAY-316606 的给药

本研究对 8 周龄雄性小鼠给予 5×10^5 U/kg 维生素 D₃ 皮下注射 3 d,在第 7 天处死小鼠并分离主动脉,用于蛋白免疫印迹实验。WAY-316606 使用生理盐水溶解,在皮下注射维生素 D₃ 同时腹腔注射给药,给药浓度参考已有文献为 0.5 mg/kg,每天给药共 7 d。在维生素 D₃ 造模第 7 天时使用小动物 micro-CT 成像系统检测小鼠体内主动脉钙化情况,并处死小鼠分离主动脉用于蛋白免疫印迹实验。

1.12 统计方法

本研究所有实验采用随机对照的设计均使用生物学重复 3 次。使用 GraphPad Prism 7.0 软件,两组数据之间的比较进行 *t* 检验统计分析,两组以上的比较进行单因素方差分析,并结合 Tukey 法进行两两比较,数据以 $\bar{x} \pm s$ 方式表示。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SFRP1 在血管平滑肌细胞成骨分化中表达下调

为了探讨 SFRP1 在血管钙化中的作用,本研究使用 3 mmol/L 的 Pi 刺激人主动脉血管平滑肌细胞 (human aortic vascular smooth muscle cells, HASMCs) 构建细胞血管钙化模型。茜素红染色显示, Pi 组明显形成钙化结节 (图 1A)。Western blot 结果显示,相较于 Ctrl 组, Pi 刺激能显著增强成骨标志物 RUNX2 和 BMP2 的表达 (1.71 ± 0.17 比 1.00 ± 0.15 , $t=3.251$, $P=0.03$; 1.66 ± 0.13 比 1.00 ± 0.06 , $t=4.464$, $P=0.01$; 图 1B-C), SFRP1 蛋白水平表达显著下调 (0.35 ± 0.02 比 1.00 ± 0.17 , $t=3.741$, $P=0.02$; 图 1B-C)。进一步使用 VD₃ 构建小鼠急性血管钙化模型,结果显示成骨标志物 BMP2 上调,而 SFRP1 表达显著下调

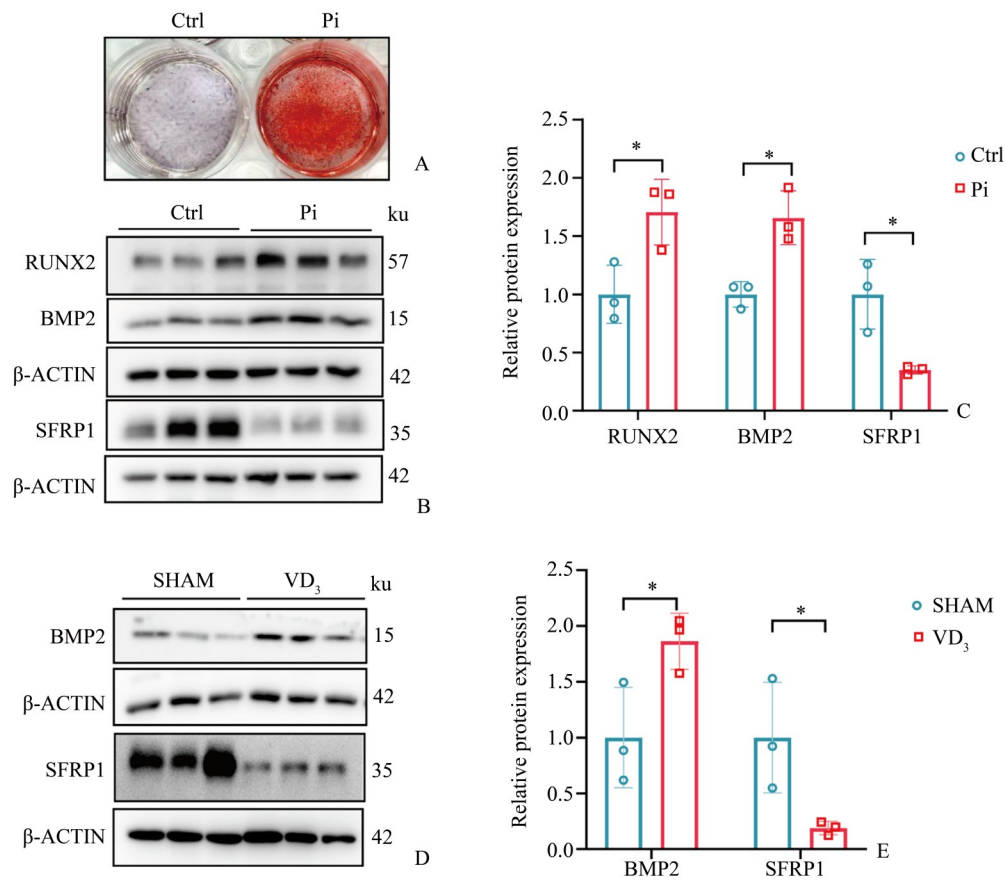
(1.86 ± 0.15 比 1.00 ± 0.26 , $t=2.903$, $P < 0.05$; 0.19 ± 0.03 比 1.00 ± 0.29 , $t=2.821$, $P=0.04$; 图 1D-E)。

2.2 SFRP1 敲低加重血管平滑肌细胞钙化形成

为了验证 SFRP1 在血管平滑肌细胞成骨分化过程的作用,我们使用小干扰 RNA (siRNA) 在体外敲低 SFRP1。Western blot 检测证明小干扰 RNA 敲低 SFRP1 效率 (0.40 ± 0.03 比 1.00 ± 0.07 , $t=8.274$, $P=0.0012$; 图 2A-B)。使用 siSFRP1 能显著增加 Pi 诱导的血管平滑肌细胞钙化结节形成 (图 2C), 茜素红定量分析示 siSFRP1 组相对于 siNC 组, 钙化面积明显增多, 方差分析显示 4 组间差异有统计学意义 ($F=570.3$, $P < 0.0001$; 5.09 ± 0.10 比 4.16 ± 0.14 ; 图 2D)。在钙化刺激下, siSFRP1 组比 siNC 组钙含量显著增高 ($F=26.89$, $P=0.0002$; 4.55 ± 0.41 比 2.70 ± 0.52 , $P=0.02$; 图 2E)。使用 Western blot 检测敲低 SFRP1 对成骨标志物和血管平滑肌细胞收缩型标志物的影响, 结果显示敲低 SFRP1 能显著降低血管平滑肌收缩标记物 SM22 α 的表达并且能显著增加成骨标志物 RUNX2 的表达 ($F=8.406$, $P=0.0074$; 0.48 ± 0.08 比 0.87 ± 0.14 , $P < 0.05$; 2.91 ± 0.38 比 2.38 ± 0.17 , $P < 0.05$; 图 2F-G), 表明敲低 SFRP1 促进血管平滑肌的成骨分化。而 RT-qPCR 检测也同样显示, 在 Pi 刺激下, 与 siNC 组相比, siSFRP1 组能显著上调成骨标志物 RUNX2、SPP1 的 mRNA 水平 ($F=13.33$, $P=0.002$; 14.74 ± 3.66 比 1.53 ± 0.11 , $P=0.0042$; $F=4.780$, $P=0.03$; 3.36 ± 1.02 比 1.35 ± 0.14 , $P < 0.05$; 图 2H)。以上体外实验结果均表明敲低 SFRP1 促进血管平滑肌细胞钙化。

2.3 SFRP1 药理学抑制剂 WAY-316606 加重小鼠主动脉钙化

为了进一步验证 SFRP1 在血管钙化中的作用, 本研究采用药理学干预方法, 通过腹腔注射 WAY-316606 特异性抑制 SFRP1 表达, 同时建立 VD₃ 诱导的小鼠急性血管钙化模型。Micro-CT 影像学分析显示, 与 VD₃ 组比, VD₃+WAY-316606 组小鼠呈现更严重的主动脉钙化 (图 3A)。Western blot 检测分析表明, 药理学抑制 SFRP1 显著上调小鼠主动脉组织中成骨标志物 BMP2 的表达水平 ($F=10.71$, $P=0.001$; 3.11 ± 0.55 比 1.63 ± 0.15 , $P=0.04$; 图 3B-C)。钙含量定量分析结果与影像学表现一致, 显示 VD₃+WAY-316606 联合处理组小鼠主动脉组织的



A: Representative images of alizarin red staining in calcified HASMCs. B-C: Representative Western blot analysis and quantification of osteogenic markers (RUNX2, BMP2) and SFRP1 in HASMCs treated with or without Pi(3 mmol/L) for 7 days. D-E: Representative Western blot images and quantitative analysis of BMP2 and SFRP1 expression in aortas of mice receiving vehicle or VD₃ injection. $n=3$, $*P < 0.05$.

图1 SFRP1在血管平滑肌细胞成骨分化中表达下调

Fig. 1 SFRP1 expression decreases during osteogenic differentiation in VSMCs

钙沉积量较单纯 VD₃ 处理组显著增加 ($F=36.15$, $P=0.0004$; 3.36 ± 0.14 比 2.08 ± 0.31 , $P=0.0088$; 图 3D)。这一发现进一步证实了 SFRP1 功能抑制会加剧血管钙化进程。

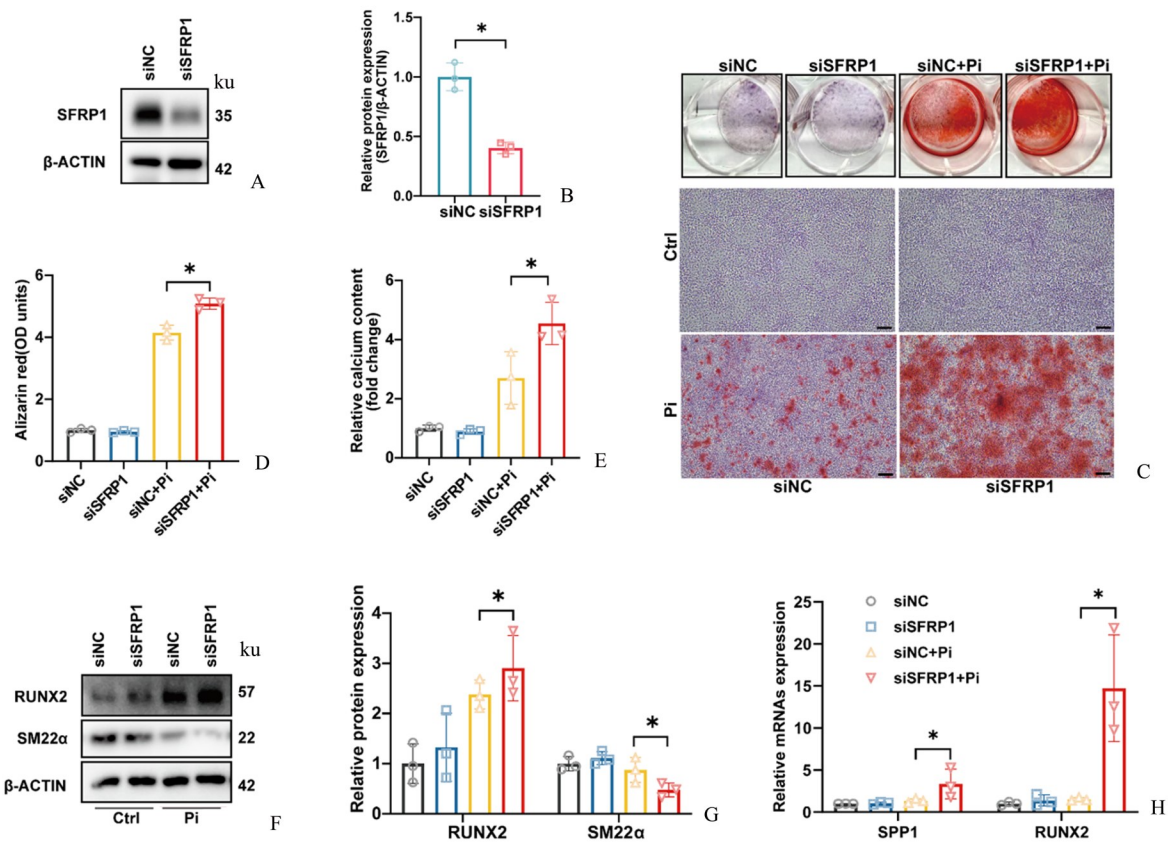
2.4 SFRP1 过表达抑制人血管平滑肌细胞成骨分化

为探究 SFRP1 对 HASMCs 成骨分化的抑制作用,本研究通过慢病毒 Lenti-Sfrp1 转染实现 SFRP1 过表达。Western blot 分析证实转染后过表达效率 ($t=4.777$, 2.96 ± 0.37 比 1.00 ± 0.17 , $P=0.0088$; 图 4A-B)。在钙化培养基诱导下,茜素红染色显示, Lenti-Sfrp1 组较 Lenti-Vector 组钙化结节减少 ($F=30.73$, $P<0.0001$; 1.36 ± 0.08 比 2.99 ± 0.33 , $P=0.0006$; 图 4C-D), 钙含量也显著下调 ($F=31.40$, $P<0.0001$; 1.51 ± 0.03 比 2.58 ± 0.26 , $P=0.0021$; 图 4E)。Western blot 分析表明,与 Lenti-Vector+Pi 组相比, Lenti-

Sfrp1+Pi 组成骨标志物 RUNX2 水平下调 ($F=13.17$, $P=0.0018$; 1.34 ± 0.04 比 2.05 ± 0.23 , $P=0.02$; 图 4F-G), 而 VSMCs 收缩标志物 SM22 α 上调 ($F=21.71$, $P=0.0003$; 0.74 ± 0.03 比 0.45 ± 0.05 , $P=0.03$; 图 4F-G)。提示 SFRP1 抑制血管平滑肌细胞成骨分化。

2.5 SFRP1 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控血管钙化

为了明确 SFRP1 是否通过 β -catenin 调控血管钙化, Western blot 检测了 β -catenin 的表达, 结果显示钙化 HASMCs 敲低 SFRP1 后能显著上调 β -catenin 的表达 ($F=33.39$, $P<0.0001$; 2.01 ± 0.11 比 1.41 ± 0.06 , $P=0.003$; 图 5A-B), RT-qPCR 也呈现同样的上调趋势 ($F=97.22$, $P<0.0001$; 3.29 ± 0.14 比 1.57 ± 0.07 , $P<0.0001$; 图 5C)。在体实验使用 SFRP1 药理学抑制剂 WAY-316606, 结果显示



A–B: Representative Western blot and quantification analysis of SFRP1 expression in HASMCs transfected with siNC or siSFRP1. C–D: Representative images and quantitative analysis of alizarin red staining showing calcium nodule formation in HASMCs transfected with siNC or siSFRP1, with or without Pi stimulation. Scale bar=200 μ m. E: Quantification of calcium content of HASMCs. F–G: Representative Western blot images and quantitative analysis of RUNX2 and SM22 α expression in HASMCs transfected with either siNC or siSFRP1, with or without Pi stimulation. H: RT-qPCR analysis of osteogenic markers RUNX2 and SPP1 in HASMCs transfected with siNC or siSFRP1, with or without Pi stimulation $n=3, *P < 0.05$.

图2 SFRP1敲低加重人血管平滑肌细胞钙化

Fig. 2 Knockdown of SFRP1 exacerbated vascular smooth muscle cell calcification.

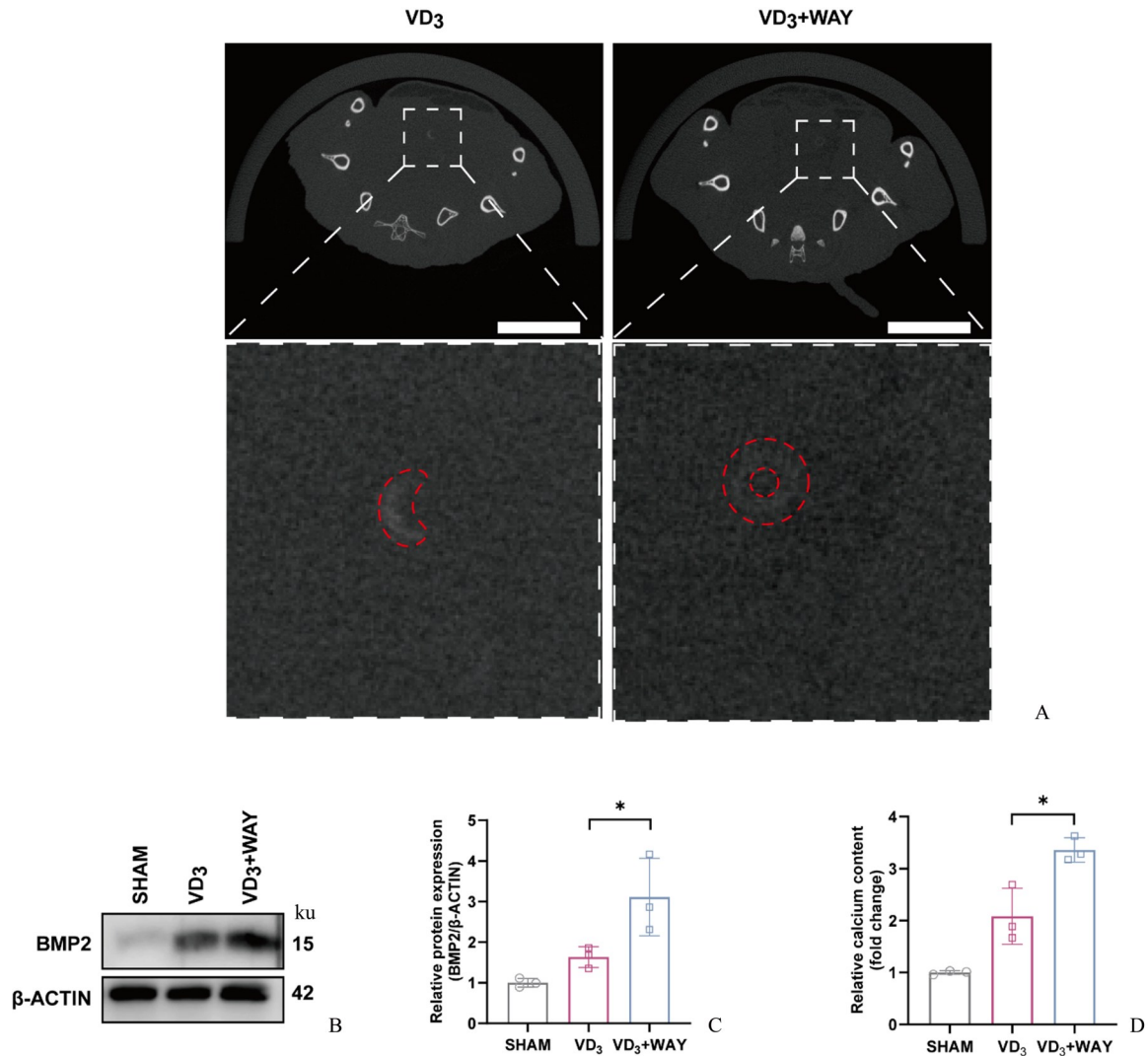
WAY-316606和VD₃联合用药组的 β -catenin表达水平显著高于VD₃组($F=24.58, P=0.0013$; 3.97 ± 0.44 比 $2.45\pm 0.25, P=0.03$;图5D–E)。而在钙化HASMCs使用Lenti-Sfrp1过表达SFRP1则能显著降低 β -catenin表达水平($F=8.455, P=0.007$; 1.06 ± 0.06 比 $1.60\pm 0.17, P=0.04$;图5F–G)。免疫荧光染色检测 β -catenin核内表达水平,显示过表达SFRP1能显著减少 β -catenin表达与细胞核定位(图5H)。以上结果揭示SFRP1通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路参与血管平滑肌细胞成骨分化,延缓血管钙化进程。

3 讨论

慢性肾脏病血管钙化目前临床上治疗手段有

限,亟需阐明血管钙化的分子机制,寻找新的预防与治疗靶点。本研究首次揭示了SFRP1在血管钙化中表达下调,SFRP1通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路显著抑制血管平滑肌细胞成骨分化。这一发现为血管钙化的防治提供了新的思路。

慢性肾脏疾病血管钙化病理过程复杂且影响因素多样,因而缺少真正有效的防治靶点^[12–13]。Wnt/ β -catenin信号通路是调控骨形成^[14]、成骨分化^[15]及动脉硬化^[16]的核心通路,其通过关键效应分子 β -catenin调控成骨细胞分化^[17]。在血管系统中,该通路的异常激活可驱动血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMCs)向成骨样细胞分化,研究已经证实该通路是血管钙化的重要机制^[18–19]。研究发现SFRP1在胚胎血管形成的早期阶段以及成人动脉和毛细血管的内皮中强烈表达,



A: Representative micro-CT images showing aortic calcification in VD₃-treated and VD₃+WAY-316606-treated mice. Scale bar=1 cm. B-C: Representative Western blot images and quantitative analysis of BMP2 expression in aortic tissues from sham, VD₃-treated and VD₃+WAY-316606-treated mice. D: Quantitative analysis of relative calcium deposition in aortic tissues across the three experimental groups. $n=3$, $*P < 0.05$.

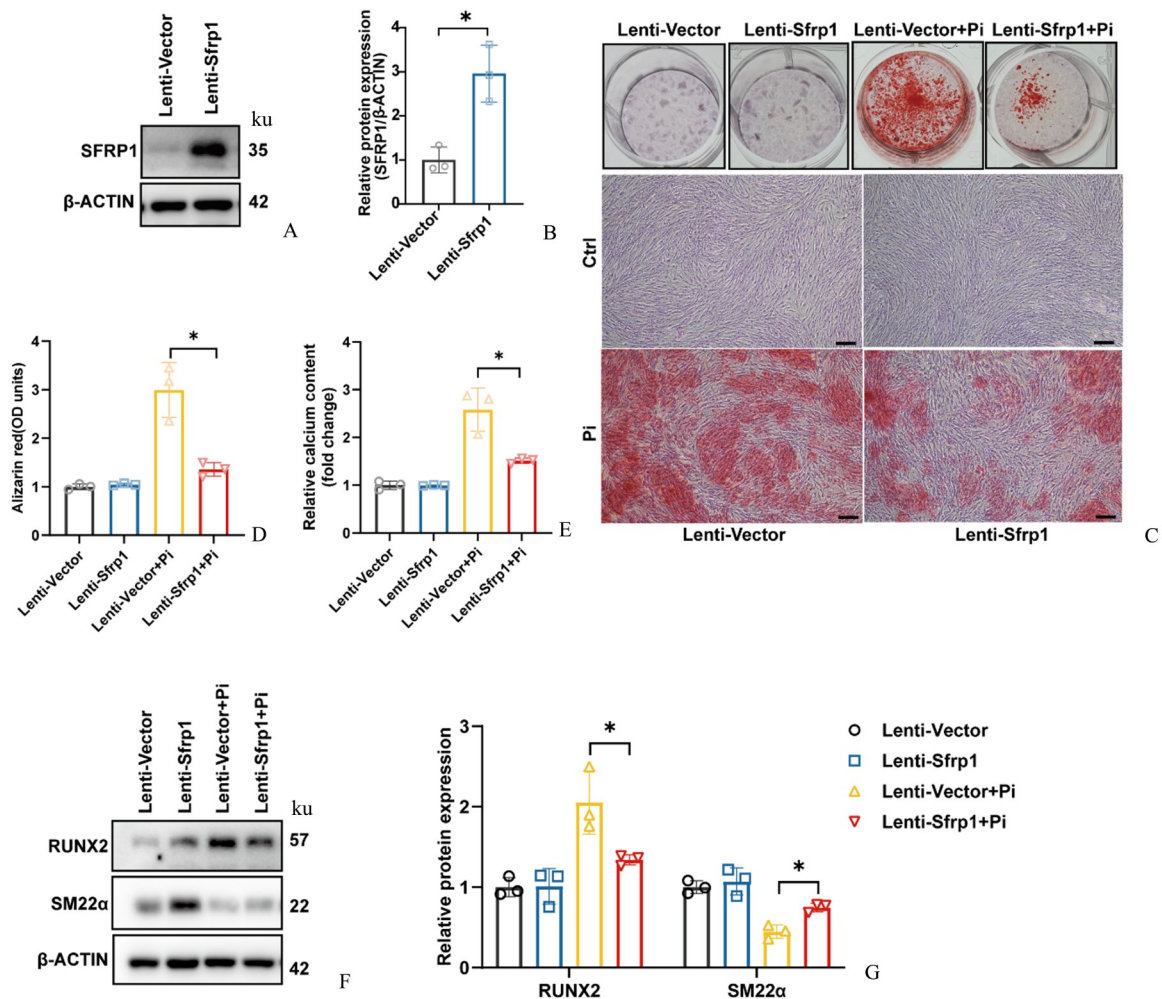
图3 SFRP1抑制剂WAY-316606加重VD₃诱导小鼠主动脉钙化
Fig. 3 WAY-316606 (SFRP1 inhibitor) aggravated VD₃-induced aortic calcification

并调节血管细胞增殖^[10],此外,在小鼠心梗模型与肌肉缺血模型中过表达SFRP1,均促进血管新生^[9-11]。表明SFRP1是调节VSMCs功能的重要效应分子。

而本研究发现,在高磷酸盐诱导的人血管平滑肌细胞成骨分化模型以及维生素D₃诱导的小鼠血管钙化模型中,SFRP1表达均显著下调。通过小分子干扰RNA敲低SFRP1表达证实,HASMCs敲低SFRP1上调成骨标志RUNX2表达,下调VSMCs收缩型标志物SM22 α 表达,同时显著增加 β -catenin的表达。而在HASMCs使用慢病毒过表达SFRP1,

结果显示过表达SFRP1下调RUNX2表达、上调SM22 α 表达,同时抑制 β -catenin的表达。基于以上结果,本研究推测SFRP1可能作为Wnt/ β -catenin信号通路的负调控因子参与VSMCs钙化。

WAY-316606作为SFRP1的抑制剂,先前研究报道其具有两面性作用,在治疗骨质疏松^[20]、脊髓损伤后的神经修复^[21]、脱发^[22]等具有保护作用,但在肿瘤耐药领域中,WAY-316606作为SFRP1的抑制剂能激活Wnt信号通路促进肿瘤耐药^[23]。而在血管钙化中WAY-316606的作用仍未被揭示,本研究采用了维生素D₃诱导的小鼠血管钙化模型,模



A: Representative Western blot showing SFRP1 protein levels in HASMCs transduced with Lenti-Vector (control) or Lenti-SFRP1. B: Quantification of SFRP1 expression normalized to β -actin. C-D: Representative images of alizarin red staining and corresponding quantitative analysis demonstrate calcium nodule formation in HASMCs transduced with Lenti-Vector or Lenti-SFRP1, cultured with or without Pi stimulation. Scale bar = 200 μ m. E: Quantification of calcium content of HASMCs. F-G: Representative Western blot images and quantitative analysis of RUNX2 and SM22 α expression in HASMCs transfected with Lenti-Vector or Lenti-SFRP1, cultured with or without Pi stimulation. $n=3$, $P < 0.05$.

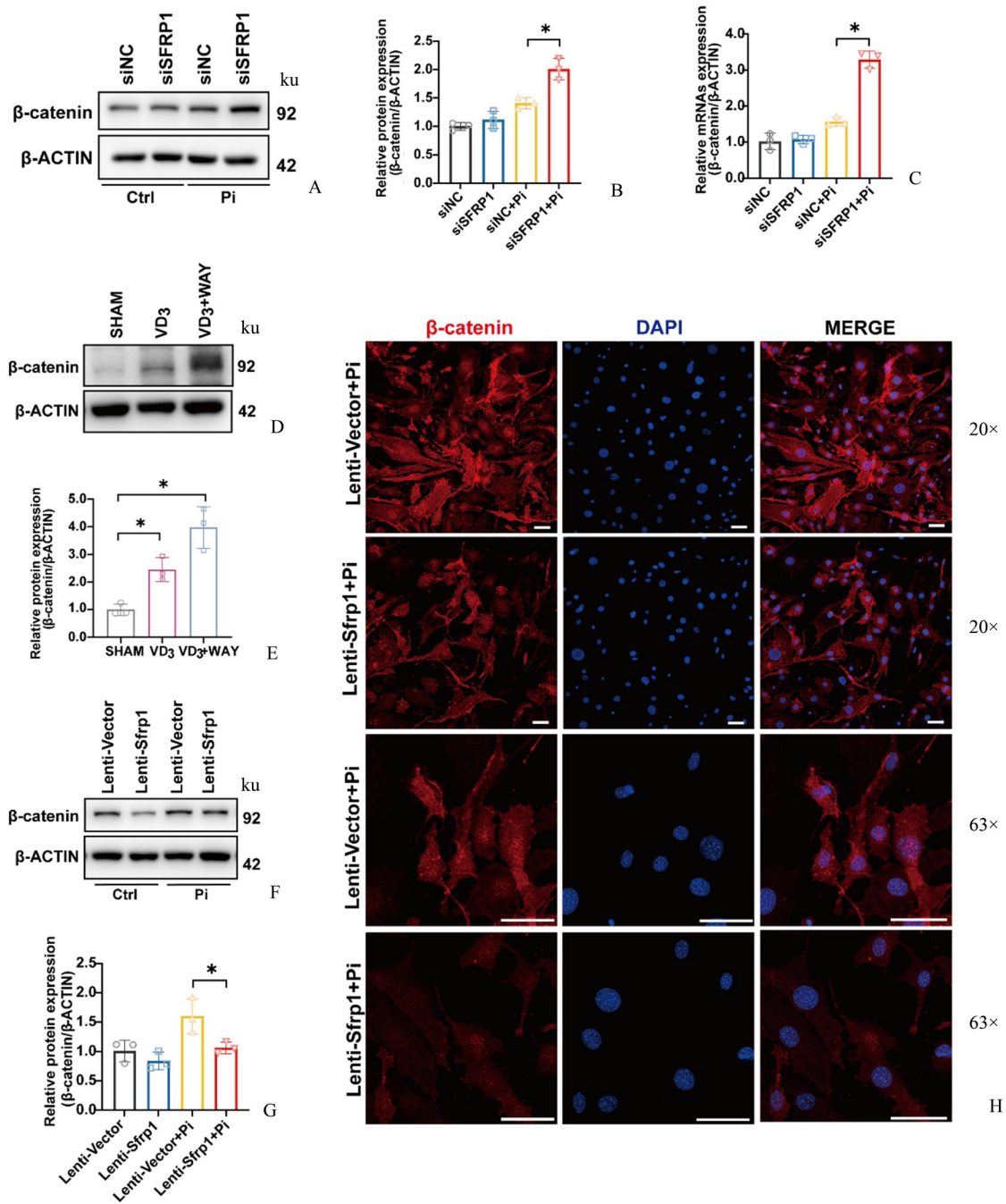
图4 SFRP1过表达抑制人血管平滑肌细胞钙化

Fig. 4 SFRP1 overexpression inhibited phosphate-induced calcification in HASMCs

拟在体血管钙化,同时进行腹腔注射WAY-316606,结果显示WAY-316606能促进维生素D₃诱导的小鼠主动脉钙化,同时促进 β -catenin的表达,进一步表明SFRP1在血管钙化中的重要作用。而临床使用WAY-316606类药物治疗疾病时也应考虑血管钙化的潜在风险。

综上所述,本研究不仅揭示SFRP1对血管钙化的作用机制,为SFRP1治疗血管钙化提供更全面的

证据,也为开发针对Wnt/ β -catenin信号通路的靶向治疗策略奠定了重要基础。但本研究也存在一些局限性:首先,动物模型未能完全模拟慢性肾脏病患者复杂的代谢紊乱状态,未来研究将使用建立更接近临床的慢性肾脏疾病血管钙化动物模型,而SFRP1分泌蛋白能否作为慢性肾脏疾病血管钙化患者预测标记物也有待探究;其次,SFRP1调控 β -catenin的具体分子机制仍需深入解析。



A-B: Representative Western blot images and quantitative analysis of β -catenin expression in HASMCs transfected with either siNC or siSFRP1, with or without Pi stimulation. C: Quantitative RT-PCR of β -catenin in HASMCs with siSFRP1 or siNC, with or without Pi stimulation. D-E: Representative Western blot images and quantitative analysis of β -catenin expression in aortic tissues from sham, VD₃-treated, and VD₃+WAY-316606-treated mice. F-G: Representative Western blot images and quantitative analysis of β -catenin expression in HASMCs transfected with Lenti-Vector or Lenti-SFRP1, cultured with or without Pi stimulation. $n=3$, $*P < 0.05$. H: Representative confocal immunofluorescence images of β -catenin (red) and DAPI (blue) in HASMCs treated with Lenti-Vector or Lenti-SFRP1, cultured with Pi stimulation. Scale bar=50 μ m.

图5 SFRP1通过Wnt/ β -catenin信号通路调控血管钙化

Fig. 5 SFRP1 regulated vascular calcification via the Wnt/ β -catenin signaling pathway

参考文献

- [1] Onnis C, Virmani R, Kawai K, et al. Coronary artery calcification: current concepts and clinical implications [J]. *Circulation*, 2024, 149(3):251–266.
- [2] Boutouyrie P, Chowienczyk P, Humphrey JD, et al. Arterial stiffness and cardiovascular risk in hypertension [J]. *Circ Res*, 2021, 128(7):864–886.
- [3] 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.
- [4] Mayr CH, Sengupta A, Asgharpour S, et al. Sfrp1 inhibits lung fibroblast invasion during transition to injury-induced myofibroblasts [J]. *Eur Respir J*, 2024, 63(2): 2301326.
- [5] Liu J, Xiao Q, Xiao J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):3.
- [6] Selvaggi F, Catalano T, Lattanzio R, et al. *Wingless/It*/ β -catenin signaling in liver metastasis from colorectal cancer: a focus on biological mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *World J Gastroenterol*, 2023, 29(18):2764–2783.
- [7] Schunk SJ, Floege J, Fliser D, et al. WNT- β -catenin signalling – a versatile player in kidney injury and repair [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(3):172–184.
- [8] Rutkovskiy A, Malashicheva A, Sullivan G, et al. Valve Interstitial cells: the key to understanding the pathophysiology of heart valve calcification [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(9): 23.
- [9] Barandon L, Couffignal T, Ezan J, et al. Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA [J]. *Circulation*, 2003, 108(18):2282–2289.
- [10] Dufourcq P, Couffignal T, Ezan J, et al. FrzA, a secreted frizzled related protein, induced angiogenic response [J]. *Circulation*, 2002, 106(24):3097–3103.
- [11] Ezan J, Leroux L, Barandon L, et al. FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 63(4):731–738.
- [12] Jankowski J, Floege J, Fliser D, et al. Cardiovascular disease in chronic kidney disease: pathophysiological insights and therapeutic options [J]. *Circulation*, 2021, 143(11): 1157–1172.
- [13] Lee S J, Lee I, Jeon J. Vascular calcification—new insights into its mechanism [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8):2685.
- [14] Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, et al. The regulation of bone metabolism and disorders by Wnt signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5525.
- [15] Zheng X, Wang Y, Zhu N, et al. Downregulation of GNAS inhibits osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells and promotes osteoporosis through the Wnt pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(6):2886–2892.
- [16] Kong P, Cui Z, Huang X, et al. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):131.
- [17] Baron R, Kneissel M. Wnt signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments [J]. *Nat Med*, 2013, 19(2):179–192.
- [18] Bundy K, Boone J, Simpson C L. Wnt signaling in vascular calcification [J]. *front cardiovasc med*, 2021, 8:708470.
- [19] 何虎强,朱俊龙,李勤,等.补骨脂酚启动自噬减轻 β -GP诱导的小鼠主动脉中膜钙化 [J]. *重庆医科大学学报*, 2023, 48(7):784–792.
- He HQ, Zhu JL, Li Q, et al. Bakuchiol initiates autophagy to reduce β -phosphoglycerol-induced calcification of mouse vascular smooth muscle cells [J]. *J Chongqing Med Univ*, 2023, 48(7):784–792.
- [20] Ma Q, Wang S, Xie Z, et al. The sfrp1 inhibitor WAY-316606 attenuates osteoclastogenesis through dual modulation of canonical Wnt signaling [J]. *J Bone Miner Res*, 2022, 37(1):152–166.
- [21] Zhao X, Lu X, Li K, et al. Double crosslinked biomimetic composite hydrogels containing topographical cues and WAY-316606 induce neural tissue regeneration and functional recovery after spinal cord injury [J]. *Bioact Mater*, 2023, 24: 331–345.
- [22] Hawkshaw NJ, Hardman JA, Haslam IS, et al. Identifying novel strategies for treating human hair loss disorders: cyclosporine a suppresses the Wnt inhibitor, sfrp1, in the dermal papilla of human scalp hair follicles [J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(5):e2003705.
- [23] Hu X, Liu Y, Shen H, et al. MTF2 facilitates the advancement of osteosarcoma through mediating EZH2/SFRP1/Wnt signaling [J]. *J Orthop Surg Res*, 2024, 19(1):467.

(编辑 孙慧兰)