

## 糖尿病大鼠钙化血管中 M<sub>sx2</sub>和 W<sub>nt3a</sub>的表达

谈君<sup>1,2</sup>, 任晓妹<sup>1</sup>, 刘乃丰<sup>1</sup>

(1. 东南大学临床医学院 心血管病研究所, 江苏省南京市 210009)

2. 无锡市人民医院 超声心动图室, 江苏省无锡市 214023)

[关键词] 糖尿病; 血管钙化; M<sub>sx2</sub> W<sub>nt3a</sub>

[摘要] 目的 研究糖尿病对血管钙化的影响及 M<sub>sx2</sub>和 W<sub>nt3a</sub>基因在钙化血管中的表达变化。方法 将 48 只雄性 Wistar 大鼠随机分为四组: 维生素 D3 和尼古丁诱导的单纯血管钙化组 (n=12)、链脲佐菌素诱导的单纯糖尿病组 (n=12)、链脲佐菌素联合维生素 D3 和尼古丁诱导的糖尿病合并血管钙化组 (n=12) 和正常雄性 Wistar 大鼠为正常对照组 (n=12)。测定大鼠血糖、血清胰岛素、总胆固醇和甘油三酯水平, 以血管 von Kossa 染色、血管钙含量和碱性磷酸酶活性作为判断血管钙化程度的指标, 测定大鼠血管中 M<sub>sx2</sub>和 W<sub>nt3a</sub>mRNA 的表达。结果 与正常对照组相比, 单纯血管钙化组大鼠血管中 M<sub>sx2</sub>和 W<sub>nt3a</sub>mRNA 相对表达量有所升高 (P<0.05), 但血管钙含量和碱性磷酸酶活性无明显变化。与正常对照组及单纯血管钙化组相比, 糖尿病合并血管钙化组大鼠的血管中, 可见沿中膜弹性层内广泛分布的钙盐沉积, 大鼠血管中钙含量和碱性磷酸酶活性以及血管内 M<sub>sx2</sub>和 W<sub>nt3a</sub>mRNA 相对表达量明显增高 (P<0.05)。结论 糖尿病可以明显加速血管钙化的发生和发展。在糖尿病大鼠钙化血管中, 骨形成过程中的转录因子 M<sub>sx2</sub>和 W<sub>nt3a</sub>表达增高, 提示血管钙化是一个类似于骨形成的过程, M<sub>sx2</sub>和 W<sub>nt3a</sub>参与血管钙化病变的发生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Upregulation of M<sub>sx2</sub> and W<sub>nt3a</sub> in Calcified Artery of Diabetic Rat

TAN Jun<sup>1,2</sup>, REN Xiaomei<sup>1</sup>, and LIU Naifeng<sup>1</sup>

(1. Institute for Cardiovascular Medicine, School of Clinical Medicine, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China; 2. Department of Echocardiography, Wuxi People's Hospital, Wuxi, Jiangsu 214023, China)

[KEY WORDS] Diabetes Mellitus; Vascular Calcification; M<sub>sx2</sub> W<sub>nt3a</sub>

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of diabetes on rat vascular calcification and the expression of M<sub>sx2</sub> and W<sub>nt3a</sub>mRNA in calcified artery of diabetic rat. **Methods** 48 male Wistar rats were randomly divided into 4 groups: vitamin D3 and nicotine (VDN) group (n=12) undergoing vitamin D3 and nicotine treatment and diabetes mellitus (DM) group (n=12) undergoing injection of streptozotocin (STZ) to induce diabetes and diabetes mellitus & vitamin D3 and nicotine (DM + VDN) group (n=12) undergoing injection of STZ and vitamin D3 and nicotine treatment. Another 12 rats were used as normal controls (CON group, n=12). Measurements of metabolic parameters (glucose, insulin, total cholesterol and triglyceride) were performed. von Kossa calcium stain, aortic calcium content and alkaline phosphatase (ALP) activity were used as indicators to determine the extent of vascular calcification. Real-time PCR was performed to detect the expression of M<sub>sx2</sub> and W<sub>nt3a</sub>mRNA. **Results** Compared with CON group, four weeks of vitamin D3 and nicotine treatment alone increased the expression of M<sub>sx2</sub> and W<sub>nt3a</sub>mRNA in aorta slightly (P<0.05), but there were no significant differences in aortic calcium content or ALP activity. In the DM + VDN group, calcium deposition in aorta, aortic calcium content, ALP activity and expression of M<sub>sx2</sub> and W<sub>nt3a</sub>mRNA in artery increased significantly compared with CON group and VDN group (P<0.05). **Conclusion** Diabetes may accelerate vascular calcification. Bone-associated transcript factors M<sub>sx2</sub> and W<sub>nt3a</sub> are up-regulated in calcified artery of diabetic rat. It suggests that vascular calcification is a process similar to bone formation, and M<sub>sx2</sub> and W<sub>nt3a</sub> may involve in the occurrence of vascular calcification.

糖尿病患者常见血管钙化发生, Cetin 等<sup>[1]</sup>对 55 名糖尿病患者进行了 3 年随访, 发现糖尿病合并

心血管钙化的发生率是非糖尿病的 4 倍。糖尿病患者血管钙化常表现为动脉粥样硬化斑块中钙化灶和血管中膜钙化并存, 是预测心血管事件的独立危险因素<sup>[2]</sup>。血管钙化会导致血管僵硬增高和顺应性下降, 进而导致心脏做功、脉搏压和脉搏波速度增加, 最终引起血管膨胀受损, 左心室肥厚和冠状动脉灌注减少<sup>[3]</sup>。但糖尿病血管钙化的发生机制目

[收稿日期] 2009-12-25 [修回日期] 2010-02-19

[基金项目] 国家自然科学基金 (30840042)

[作者简介] 谈君, 硕士研究生, 医师, 研究方向为血管钙化的分子生物学机制, E-mail 为 tj0510@163.com。任晓妹, 博士, 副主任医师, 研究方向为血管钙化的分子生物学机制。通信作者刘乃丰, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病预防机制的研究, E-mail 为 liunf\_2006@126.com。

前还不十分清楚。本实验通过建立糖尿病合并血管钙化的大鼠模型,观察糖尿病对血管钙化的影响以及骨转录因子 *Mx2* 和 *Wnt3a* 在钙化血管中的表达变化,进一步探讨糖尿病血管钙化的发生机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ)、维生素 D<sub>3</sub>、尼古丁、钙检测试剂盒和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性检测试剂盒 (美国 Sigma 公司); 血脂比色法检测试剂盒 (英国 Randox 公司); 血清胰岛素放免法检测试剂盒 (美国 Linco Research 公司); BCA 试剂盒 (美国 Pierce 公司); Trizol (美国 Invitrogen 公司); PrimeScript RT reagent 试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq PCR 试剂盒 (大连 Takara 公司); 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 动物模型制备及标本留取

6周龄雄性 Wistar 大鼠 (体重 160~180 g, 48 只) 购自上海实验动物中心, SPF 级。适应性喂养 1 周后, 将 48 只大鼠随机分成 4 组, 每组 12 只: 正常对照组、单纯血管钙化组 (VDN 组)、单纯糖尿病组 (DM 组) 和糖尿病合并血管钙化组 (DM + VDN 组)。给予 DM 组和 DM + VDN 组大鼠高脂饲料 (50% 碳水化合物, 20% 猪油, 10% 豆油, 11% 蛋白质, 2.5% 胆固醇, 6.5% 纤维和其他物质) 喂养 8 周, 予正常对照组和 VDN 组大鼠普通饲料喂养 8 周。于实验第 8 周末, 予 DM 组和 DM + VDN 组大鼠, 按 25 mg/kg 一次性腹腔注射 STZ (临用前将 STZ 溶于 0.5 mmol/L、pH 4.5 的柠檬酸钠溶液里), 予正常对照组和 VDN 组大鼠等量柠檬酸钠溶液腹腔注射。72 h 后连续检测空腹血糖 (大鼠尾静脉测血糖, 美国强生血糖检测仪) 和尿糖水平 3 次。以空腹血糖  $\geq 16.7$  mmol/L, 尿糖 +++ ~ ++++, 确定为 2 型糖尿病模型造模成功。于实验第 9 周末参照 Niedemoffer 等<sup>[4]</sup>的方法制备钙化模型, 予 VDN 组和 DM + VDN 组大鼠上午 8:00 给予维生素 D<sub>3</sub> (300 ku/kg) 肌肉注射, 尼古丁溶于花生油 (浓度 25 mg/kg) 按 5 mL/kg 灌胃, 晚上 20:00 给予尼古丁重复灌胃一次。正常对照组和 DM 组大鼠分别给予等量生理盐水肌注和单纯花生油灌胃处理。继续予 DM 组和 DM + VDN 组大鼠高脂饲料喂养, 予正常对照组和 VDN 组大鼠普通饲料喂养。实验期间大鼠自由饮水。于实验第 13 周末, 禁食 12 h 后,

注射过量戊巴比妥 (50 mg/kg) 麻醉大鼠, 经心脏采血留取血标本, 摘取胸主动脉用生理盐水冲洗后, 称重, 分成若干段, 部分于液氮中冻存, 部分放于 10% 福尔马林溶液中固定后, 制备成石蜡包块。

### 1.3 生物化学指标检测

葡萄糖氧化酶法检测血糖水平。血脂比色法试剂盒检测血清总胆固醇 (TC) 和甘油三酯 (TG) 含量。血清胰岛素水平利用放免试剂盒检测。所有操作重复三次。

### 1.4 血管 von Kossa 染色检测血管中钙盐的沉积

取已制备的大鼠胸主动脉段石蜡包块, 制作 6  $\mu$ m 厚切片, 常规脱蜡、脱水。浸入 5% (质量分数) 硝酸银溶液, 在日光下照射 30 min 后, 用蒸馏水清洗数遍后, 将切片置于 5% (质量分数) 硫代硫酸钠溶液中 5 min, 伊红染色。脱水、透明、封片, 光镜观察, 拍照。

### 1.5 钙含量和碱性磷酸酶活性检测

参照文献 [5] 报道分析主动脉中的钙含量。取主动脉组织 (约 10 mg) 于 55 °C 彻底烘干, 加入 10% 甲酸 (按 30 mL/g 组织干重), 4 °C 过夜。按钙检测试剂盒说明书操作, 利用比色法检测血管组织中的钙含量。取 -80 °C 贮存的主动脉组织, 加入磷酸盐缓冲液后制备匀浆, 12 000  $\times$  g 离心 10 min, 上清液利用 BCA 试剂盒进行蛋白定量检测。按 ALP 测定试剂盒说明书检测血管组织中 ALP 活性。用对硝基酚作标准曲线, 以 ku/g 蛋白来表示 ALP 活性。

### 1.6 实时定量 PCR 检测 *Mx2* 和 *Wnt3a* mRNA 的表达

利用 Trizol 提取大鼠血管组织中的总 RNA, 按照 PrimeScript RT reagent 试剂盒说明书, 逆转录合成 cDNA。按照 SYBR Premix Ex Taq PCR 试剂盒说明书进行实时定量 PCR, 所用 RealTime PCR 扩增仪为 LineGene (Bioer, 杭州博日), *Mx2* 上游引物为 5'-CCT TCC CTA TCA ACT CCC-3', 下游引物为 5'-TAC ATG CCA TAT CCC ACC-3'; *Wnt3a* 上游引物为 5'-GTG GTC GCA GCC TGA CTT-3', 下游引物为 5'-GCT CTG TGG GCA CCT TGA-3'; GAPDH 上游引物为 5'-TAT GAT GAC ATC AAG AAG GTG G-3', 下游引物为 5'-CAC CAC CCT GTT GCT GTA-3'; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s 循环 36 次。实验结果使用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法分析<sup>[6]</sup>。

### 1.7 统计学处理

结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 ANOVA 单因素方差分析作统计学处理, 组间比较用 SNK 法检验。

## 2 结果

### 2.1 生物化学指标

与正常对照组和 VDN 组大鼠相比, DM 组和 DM + VDN 组大鼠空腹血糖水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 但体重和血清胰岛素水平则明显下降 ( $P < 0.05$ )。而与 DM 组比较, DM + VDN 组大鼠的这种变化更加显著 ( $P < 0.05$ )。与正常对照组比较, VDN 组大鼠上述指标则无明显变化。各组大鼠血清 TC 和 TG 水平差异无显著性 (表 1)。

表 1 各组大鼠一般生物化学代谢指标 ( $n = 12$ )

生物化学指标	正常对照组	VDN 组	DM 组	DM + VDN 组
体重 (g)	521 ± 5	530 ± 5	463 ± 6 <sup>a</sup>	434 ± 7 <sup>a</sup>
血糖 (mmol/L)	5.71 ± 0.85	6.70 ± 0.80	17.24 ± 0.55 <sup>a</sup>	27.82 ± 3.61 <sup>ab</sup>
胰岛素 (μg/L)	0.68 ± 0.04	0.66 ± 0.05	0.47 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.04 <sup>ab</sup>
TC (mmol/L)	1.79 ± 0.08	1.81 ± 0.47	2.21 ± 0.39	2.08 ± 0.51
TG (mmol/L)	0.48 ± 0.18	0.48 ± 0.11	0.59 ± 0.13	0.60 ± 0.15

a 为  $P < 0.05$  与正常对照组和 VDN 组比较; b 为  $P < 0.05$  与 DM 组比较。

### 2.2 血管 von Kossa 染色观察钙盐沉积

在正常对照组、DM 组和 VDN 组大鼠血管中未见明显钙盐沉积, 而在 DM + VDN 组大鼠的血管中, 可见沿中膜弹力层内广泛分布的黑褐色钙盐沉积 (图 1)。

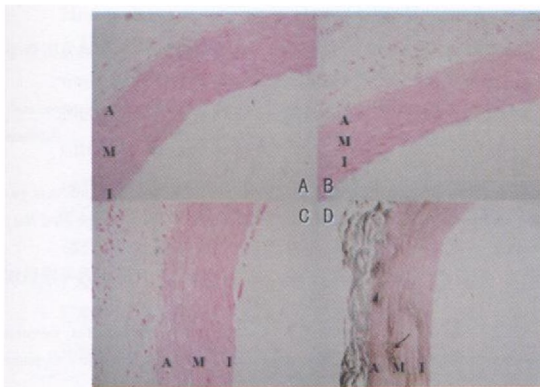


图 1 各组大鼠血管 von Kossa 染色结果 ( $\times 40$ ) A 为正常对照组, B 为 DM 组, C 为 VDN 组, D 为 DM + VDN 组; 箭头所指处为黑色钙盐沉积。

### 2.3 钙含量和碱性磷酸酶活性

VDN 组大鼠血管中的钙含量和 ALP 活性有所升高, 分别为正常对照组的 1.26 倍和 1.25 倍, 但未达统计学意义 ( $P > 0.05$ )。而 DM 组大鼠血管中的钙含量和 ALP 活性与正常对照组相比, 无明显变化。DM + VDN 组大鼠血管中钙含量和 ALP 活性显著升高, 分别为正常对照组的 3.5 倍和 2.42 倍, VDN 组的 2.77 倍和 1.83 倍, DM 组的 3.42 倍和

2.29 倍 ( $P < 0.05$  表 2)。

### 2.4 $M_{sx2}$ 和 $W_{nt3a}$ mRNA 的表达变化

DM + VDN 组大鼠血管中  $M_{sx2}$  和  $W_{nt3a}$  mRNA 相对表达量明显上升, 分别为正常对照组的 2.67 倍和 6.33 倍 ( $P < 0.05$ ), 为 DM 组的 2.54 倍和 6.09 倍 ( $P < 0.05$ )。VDN 组大鼠血管中  $M_{sx2}$  和  $W_{nt3a}$  mRNA 相对表达量也有所升高, 分别为正常对照组的 1.45 倍和 1.5 倍 ( $P < 0.05$ )。与正常对照组相比, DM 组血管中  $M_{sx2}$  和  $W_{nt3a}$  mRNA 相对表达量无明显变化 (表 3)。

表 2 各组大鼠血管钙含量和碱性磷酸酶活性 ( $n = 12$ )

分 组	钙含量 (mg/g)	ALP 活性 (kU/g)
正常对照组	0.42 ± 0.05	241.62 ± 19.22
VDN 组	0.53 ± 0.01	302.39 ± 46.92
DM 组	0.43 ± 0.11	255.07 ± 25.00
DM + VDN 组	1.47 ± 0.21 <sup>a</sup>	584.83 ± 55.05 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$  与其它三组比较。

表 3 各组大鼠血管中  $M_{sx2}$  和  $W_{nt3a}$  mRNA 的相对表达量

分 组	n	$M_{sx2}$	$W_{nt3a}$
正常对照组	12	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
VDN 组	12	1.45 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.05 <sup>a</sup>
DM 组	12	1.05 ± 0.06	1.04 ± 0.20
DM + VDN 组	12	2.67 ± 0.29 <sup>ab</sup>	6.33 ± 0.65 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$  与正常对照组和 DM 组比; b 为  $P < 0.01$  与 VDN 组比。

## 3 讨论

血管钙化是指血管壁细胞在各种刺激因素作用下向具有成骨细胞样表型分化, 导致大量钙盐在血管壁上沉积的一个病理过程, 它与包括动脉粥样硬化性血管病变、糖尿病、终末期肾病、高血压病等临床心血管疾病密切相关<sup>[7,8]</sup>。血管钙化的发生机制十分复杂, 可能有若干个不同、但又相互联系的作用机制引起血管钙化的发生和发展。目前有学者提出了 4 个血管钙化形成的不同机制<sup>[9]</sup>, 但糖尿病血管钙化的机制还不清楚。

本研究结果显示, 在糖尿病基础上再加用维生素 D3 和尼古丁处理 (DM + VDN 组) 4 周后, 大鼠血管中膜有沿弹力层分布的弥漫性钙盐沉积, 同时血管中钙含量和 ALP 活性明显高于正常对照组。而仅使用维生素 D3 和尼古丁干预 (VDN 组) 4 周, 未引起明显的血管钙化病变, 血管钙含量和 ALP 活性与正常对照组相比也无明显变化。本实验中, 单

纯的链脲佐菌素处理 (DM 组) 未引起明显的血管钙化病变发生, 考虑可能是因为实验周期较短, 糖尿病病程只有 5 周。王英等<sup>[10]</sup>发现, 延长糖尿病病程, 大鼠血管中钙含量明显升高。

糖尿病可引起患者体内多种代谢紊乱, 如高血糖、胰岛素抵抗、血脂紊乱、晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products AGE) 形成、氧化应激和组织低氧等, 体内的代谢紊乱会导致大量炎症介质如肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), 白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1) 和 IL-6 等表达, 进而引起血管的管壁细胞, 包括血管平滑肌细胞、成肌纤维细胞、管周细胞等向成骨样或成软骨样细胞表型转变, 诱导异位骨形成, 最终发展为血管钙化病变。细胞水平的研究发现, 与糖尿病相关的 AGE 可促进微血管周细胞<sup>[11]</sup>及血管平滑肌细胞<sup>[12-13]</sup>钙化, 而胰岛素则可减缓血管平滑肌细胞的钙化<sup>[14]</sup>。本实验结果从动物水平表明, 糖尿病可以加速血管钙化的发生和发展, 糖尿病患者体内慢性持续性的血糖增高可能是血管钙化发生的高危因素。

为进一步探讨血管钙化的发生机制, 本实验还观察了骨转录因子 Msx2 和 Wnt3a 在钙化血管中的表达变化。Msx2 是同源基因 Msh 家族成员, 是骨形成蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 下游的一个转录因子, 可被 BMP-2 诱导产生, 在骨形成和成骨细胞分化过程中发挥重要作用, 主要调控膜内成骨的发生, 其下游蛋白产物包括碱性磷酸酶、骨钙素和 I 型胶原, 这些蛋白产物不仅是成骨细胞转分化的标志, 而且是钙化的调节因子<sup>[15]</sup>。同时 Msx2 可上调多种 Wnt 配基的表达, 增强经典的 Wnt/ $\beta$  连环蛋白信号通路<sup>[16]</sup>。Wnt 蛋白是一类分泌性的富含半胱氨酸的糖基化蛋白, 可在多种细胞中表达, 包括神经元、星形胶质细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞及心内膜细胞等。Wnt/ $\beta$  连环蛋白信号经典通路可通过抑制间质细胞向脂肪细胞和软骨细胞, 促进向成骨细胞分化、增殖及矿物质沉积, 进一步促进骨形成<sup>[17]</sup>。最近研究结果<sup>[18-19]</sup>显示, Msx2 可通过 Wnt/ $\beta$  连环蛋白信号经典通路调节成肌纤维细胞向成骨样细胞表型分化。本研究结果显示, 在 VDN 组大鼠血管中虽然血管钙含量和 ALP 活性升高不明显, 但 Msx2 和 Wnt3a mRNA 相对表达量则有所升高。而在 DM + VDN 组大鼠血管中升高更为明显。这一结果提示, Msx2 和 Wnt3a 可能参与血管钙化的发生和发展。同时也提示, 糖尿病患

者的血管钙化病变可能是由于体内的高血糖刺激 Msx2 和 Wnt3a 表达增加而导致的。

我们的动物实验结果表明, 糖尿病可以明显加速血管钙化的发生和发展。在糖尿病大鼠钙化血管中, 骨形成过程中的转录因子 Msx2 和 Wnt3a 表达增高, 提示血管钙化是一个类似于骨形成的过程, Msx2 和 Wnt3a 参与血管钙化病变的发生。

#### [参考文献]

- [1] Cetin M, Cetin R, Taner N, et al. Prevalence of breast arterial calcification in hypertensive patients [J]. *Clin Radiol* 2004 **59**: 92-95
- [2] Anand DV, Mchb EL, Darko D, et al. Determinants of progression of coronary artery calcification in type 2 diabetes [J]. *J Am Coll Cardiol* 2007 **50**: 2218-2225
- [3] Guerin AP, London GM, Marchais SJ, et al. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease [J]. *Nephrol Dial Transplant* 2000 **15**: 1014-1021
- [4] Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Ijdouadiene I, et al. Aortic calcification produced by vitamin D3 plus nicotine [J]. *J Vasc Res* 1997 **34**: 386-398
- [5] Bouvet C, Peeters W, Moreau S, et al. A new rat model of diabetic macrovascular complication [J]. *Cardiovasc Res* 2007 **73**: 504-511
- [6] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. *Methods* 2001 **25**: 402-408
- [7] Huska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification [J]. *Circ Res* 2005 **97**: 105-114
- [8] Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 **24**: 1161-1170
- [9] Speer MY, Giachelli CM. Regulation of cardiovascular calcification [J]. *Cardiovasc Pathol* 2004 **13**: 63-70
- [10] 王英, 刘惠兰, 安娜. 2型糖尿病大鼠模型血管钙化及相关因素分析 [J]. 首都医科大学学报, 2009 **2**: 227-230
- [11] Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, et al. Advanced glycation end-products accelerate calcification in microvascular pericytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 **258**: 353-357
- [12] Ren XM, Shao H, Liu NF, et al. Advanced glycation end-products enhance calcification in vascular smooth muscle cells [J]. *J Int Med Res* 2009 **37**: 847-854
- [13] 任晓妹, 刘乃丰, 郭秀芳, 等. 糖基化终产物促进大鼠血管平滑肌细胞钙化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009 **17** (8): 639-642
- [14] Wang C, Sorribas V, Shama G, et al. Insulin attenuates vascular smooth muscle calcification but increase vascular smooth muscle cell phosphate transport [J]. *Atherosclerosis* 2007 **195**: e65-e75
- [15] Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification pathobiological mechanisms and clinical implications [J]. *Circ Res* 2006 **99**: 1044-1059
- [16] Mao B, Wu W, Davidson G, et al. Krömmen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *Nature* 2002 **417**: 664-667
- [17] Krishnan V, Bryant HU, MacDougall OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling [J]. *J Clin Invest* 2006 **116**: 1202-209
- [18] Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, et al. Msx2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors [J]. *J Biol Chem*, 2003 **278**: 45969-977
- [19] Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus M, et al. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals [J]. *J Clin Invest* 2005 **115**: 1210-220

(此文编辑 许雪梅)