

Wnt 信号通路在动脉粥样硬化及血管钙化中的研究进展

李敏^{1,2}, 朱奕^{1,2}, 方丽娟^{1,2}, 程守全^{1,2}, 刘乃丰²

(1. 东南大学医学院, 2. 东南大学附属中大医院心血管内科, 江苏省南京市 210009)

[关键词] Wnt 信号通路; 心血管疾病; 动脉粥样硬化; 血管钙化

[摘要] Wnt 信号调控胚胎发育过程的多种生物学行为, 包括细胞增殖、凋亡、细胞极性和器官发生, 在胚胎发育过程起着重要作用。而在成人中, 该信号处于沉默状态。最近证据表明, Wnt 信号通路在许多生物学过程和疾病中被重新激活, 参与代谢、炎症、肿瘤等疾病的发生, 调节骨稳态, 促进成骨细胞分化, 诱导骨生成, 并与动脉粥样硬化和血管钙化的发展进程密切相关。本文重点就 Wnt 信号通路的激活在内皮功能障碍、炎症反应、平滑肌细胞增殖及促进动脉粥样硬化和血管钙化等方面的作用进行综述。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

Research progress of Wnt signaling pathway in atherosclerosis and vascular calcification

LI Min^{1,2}, ZHU Yi^{1,2}, FANG Lijuan^{1,2}, CHENG Shouquan^{1,2}, LIU Naifeng²

(1. School of Medicine, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China; 2. Department of Cardiology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

[KEY WORDS] Wnt signaling pathway; cardiovascular disease; atherosclerosis; vascular calcification

[ABSTRACT] Wnt signaling pathway regulates a variety of biological behaviors during embryonic development, including cell proliferation, apoptosis, cell polarity and organogenesis, and plays an important role in embryonic development. In an adult, it is thought to be silent. However, recent evidences show that Wnt signaling is reactivated in many biological processes and disease. It is involved in metabolism, inflammation, tumor and other diseases. Meanwhile, the signaling pathway regulates bone homeostasis, promotes osteoblast differentiation, induces bone formation, and is closely related to the development of atherosclerosis and vascular calcification. This review focuses on the effects of continuous activation of this signaling in endothelial dysfunction, inflammation, smooth muscle cell proliferation, and promotion of atherosclerosis and vascular calcification.

1 Wnt 信号通路概述

Wnt 家族是一组进化保守, 由 19 种基因编码的富含半胱氨酸的分泌型糖蛋白。Wnt 基因于 1982 年由 Nusse 等人在小鼠体内发现^[1]。随后在黑腹果蝇体内发现了同源序列, 被正式命名为 Wnt 基因^[2]。Wnt 信号分为经典和非经典两种形式。

经典的 Wnt 信号由 Wnt 蛋白控制关键效应因子 β -catenin 触发, 因此, 经典通路亦称为 Wnt/ β -catenin 信号通路。该信号通路的激活主要有三个步骤: Wnt 信号膜内传递、细胞质内 β -catenin 的稳定和细胞核内 Wnt 靶基因的激活^[3]。当 Wnt 信号

缺失时, 由散粒蛋白 (dishevelled, DVL)、轴蛋白 (axin)、腺瘤性结肠息肉病蛋白 (adenomatous polyposis coli, APC)、糖原合酶激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK-3) 和酪蛋白激酶 1 (casein kinase 1, CK1) 组成的蛋白复合体使 β -catenin 磷酸化, 磷酸化的 β -catenin 被泛素化标记, 由蛋白酶体降解, 阻止内部信号的传递^[4]。相反, 当 Wnt 配体存在时, 它与细胞表面的卷曲蛋白 (frizzled, FZD) 和低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (low-density lipoprotein (LDL)-receptor-related protein 5 and 6, LRP5/6) 受体结合, 招募 DVL 和 Axin-GSK3 β -APC-CK1 复合体, 抑制 β -catenin 磷酸化, 导致 β -catenin 在细胞质

[收稿日期] 2020-12-21

[修回日期] 2021-05-27

[基金项目] 国家自然科学基金(81770451)

[作者简介] 李敏, 博士研究生, 研究方向为血管钙化发病机制, E-mail 为 1406593240@qq.com。通信作者刘乃丰, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血管钙化及动脉粥样硬化发病机制, E-mail 为 liunf@seu.edu.cn。

内蓄积并核内转移,随后 β -catenin 与 T 细胞因子/淋巴细胞增强因子 (T-cell factors/lymphoid enhancing factor, TCF/LEF) 结合并激活靶基因的表达(图 1)^[3],如生存素(survivin)、胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1)、细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)、原癌基因 c-Myc、过氧化物酶体增殖物激活受体 δ (peroxisome proliferator-activated receptor delta, PPAR δ) 以及一些细胞外基质成分^[5-6]。一些可溶性抑制剂,包括 Dickkopf(DKK)、可溶性卷曲蛋白(secreted frizzled-related protein, SFRP)、卷曲蛋白 B 和 Wnt 抑制剂蛋白可与 FZD、LRP5/6 结合抑制该信号的传递^[5,7]。相反,顶板特异性脊椎蛋白(roof plate-specific spondins)和 Norrie 疾病蛋白通过与 FZD 及共受体 LRP5/6 的结合,作为典型的 Wnt 激动剂^[8-9]。

非经典的 Wnt 信号是不依赖于 β -catenin 的通路,Wnt 配体可与 FZD 受体或受体酪氨酸激酶样孤儿受体 2(receptor tyrosine kinase-like orphan receptor

2, ROR2) 结合^[6],主要有 Wnt/ Ca^{2+} 依赖途径和平面细胞极性途径(planar cell polarity pathway, PCP) 两种(图 1)。Wnt/ Ca^{2+} 途径的激活, G 蛋白(G-protein) 作用于磷脂酶 C(phospholipase C, PLC) 诱导细胞内钙的释放,进而激活钙敏感蛋白——蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC) 和钙/钙调蛋白激酶 II(calcium and calmodulin dependent kinase II, CAMKII)。这些共效应激酶会触发活化 T 细胞的核因子和活化 B 细胞的轻链增强子(nuclear factor- κ B, NF- κ B), 导致下游调控基因的转录^[10]。PCP 通路有两种激活途径, DVL 触发小 GTP 酶 Rho 和 GTP 酶 Rac, Rho 在 Damm1 的作用下活化并激活 Rho-相关激酶(Rho-associated kinase, ROCK), Rac 不依赖 Damm1 而激活下游的 Jun 氨基末端激酶(Jun N-terminal kinase, JNK)^[11]。该通路在维持上皮细胞顶-基底侧极性、调节细胞骨架重组等方面发挥重要的作用。FZD 和 DVL 的突变会导致上皮结构的紊乱^[12]。但目前对于 DVL 如何调控两种通路的转换,仍尚未完全阐明。

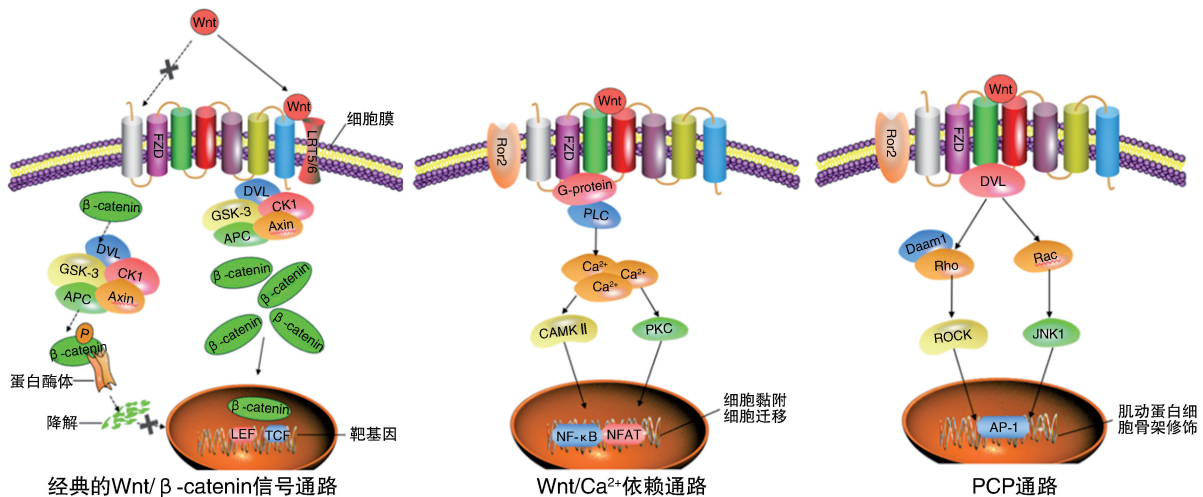


图 1. Wnt 信号通路

Figure 1. Wnt signaling pathway

2 Wnt 信号在动脉粥样硬化中的作用

Wnt 信号与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 的发生发展直接相关。内皮细胞(endothelial cell, EC) 功能障碍是 As 发生发展的关键^[13]。脉管系统血流紊乱可引起 EC 损伤,尤其在分支区域。损伤的 EC 驱动促 As 微环境的形成^[14]。在 As 早期, Wnt5a 诱导单层 EC 通透性增加^[15]。Wnt5a 配体以 NF- κ B 依赖的方式激活 Wnt/ Ca^{2+} 途径上调炎症基因的表达^[16],导致炎性细胞因子的释放和内皮功能

障碍。内皮功能障碍和炎症是 As 发展的早期事件。且经典 Wnt/ β -catenin 的激活使单核细胞对血管 EC 的黏附作用增强,随后单核细胞迁移至内皮下吞噬脂质,形成 As 特有的泡沫细胞(图 2)。其中, Wnt 共受体 LRP5 参与了脂质摄取、巨噬细胞分化和迁移过程^[17]。聚集的低密度脂蛋白诱导 LRP5 转录。沉默 LRP5 可显著减少巨噬细胞内脂质沉积以及巨噬细胞向泡沫细胞的转化^[18]。此外,巨噬细胞富集区域存在高水平的 Wnt5a,通过与 FZD5 相互作用,加速炎症反应。相反, Wnt3a 可通过抑制 GSK3 β 和

NF-κB 途经发挥抗炎作用^[19]。

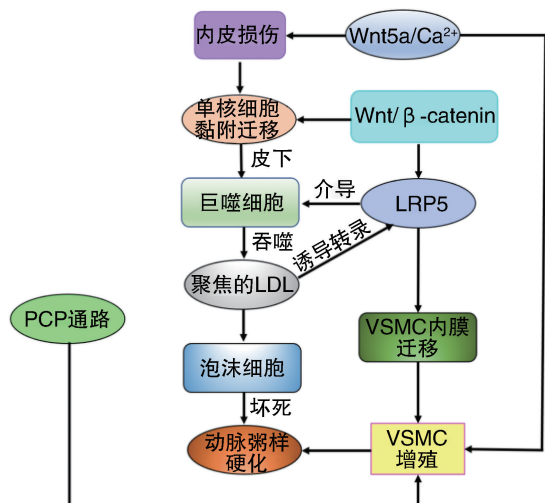


图 2. Wnt 信号在 As 中的作用
Figure 2. Effect of Wnt signaling in As

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 从中膜向内膜的迁移是 As 斑块形成的标志之一^[20]。静止状态下的 VSMC 由复杂的机制激活, 从收缩型向合成型转变, 其特征是细胞外基质的产生增加和收缩蛋白表达的减少。上调 Wnt2 和 Wnt3a 促进 VSMC 向内膜迁移^[21-22]。其次, Wnt 还参与了 VSMC 的增殖, 并导致血管再狭窄过程。Wnt1 和 Wnt3a 诱导经典的 Wnt/β-catenin 信号^[23-24], 通过转录因子 TCF4 上调促增殖基因 Cyclin D1 表达, 进而降低了细胞周期抑制剂 p21 的水平^[25]。进一步还发现 VSMC 增殖的内源性激活剂 Wnt4^[26]。过表达 Wnt/FZD 拮抗剂 SFRP (FrzA 和 FZD-1) 或 LRP 和 TCF 的显性失活则抑制了 Cyclin D1 的表达, 缩短了细胞存活周期^[27]。经典 Wnt 信号传导的关键步骤是 β-catenin 核内集聚。其中, IL-18 对 VSMC 增殖和管腔再狭窄的影响, 是与 Akt 相互作用, 使 GSK-3β 磷酸化失活^[28], 而 miR-210 则抑制了 APC 的活性^[29]。提示功能性 Wnt 受体复合物在调节 VSMC 增殖和导致血管再狭窄中的重要性。在非经典途径中, CaMK II 介导了 VSMC 的增殖, 在 As 斑块稳定区高表达。As 病变中, 巨噬细胞在管壁的累积会减少 VSMC 的增殖, 同时释放基质降解酶, 削弱纤维帽的厚度, 导致斑块破裂和急性冠状动脉事件的发生。CaMK II 通过调控巨噬细胞和 VSMC 之间的平衡来控制斑块的进展^[30]。此外, 在球囊诱导的血管壁损伤中, 还发现了 NFATc1 或 JNK 的激活对 VSMC 增殖的影响 (图 2)^[24]。上述研究表明 Wnt

信号通路贯穿于 As 发生发展的整个过程, 靶向该信号通路的调控是延缓 As 进展的关键。

3 Wnt 信号与血管钙化

血管钙化是 As 病情进展的另一重要特征^[31]。骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 与成骨细胞发生密切相关。在 As 进程中, 活化的内皮和血管成纤维细胞是 BMP-2 等分子产生的主要来源。氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 启动免疫应答, 引起管壁炎症反应, 进而促进 TNF-α 和 BMP-2 的表达。高表达的 BMP-2 引起血管钙化的发生^[32]。其中, BMP-2 通过上调成骨转录因子 Msx2, 促进多种 Wnt 配体 (如 Wnt3a、Wnt7a) 的产生, 减少了内源性抑制剂 DKK1 的生成, 导致 Wnt 信号通路的增强^[33]; 增强的 Wnt 信号驱动成骨程序促进血管钙化。同样, 在人 As 钙化部位, 升高的骨特异性蛋白骨钙素 (osteocalcin) 也激活了 Wnt 信号通路, 促进核内成骨转录因子 Runx2 的表达^[34]。据此提示氧化还原信号及 Wnt 信号通路在介导血管钙化中发挥重要作用。在高脂饮食或糖尿病中, 炎症反应和氧化应激增强, BMP-2-Msx2-Wnt 信号的促成骨作用更明显^[35-36]。此外, 晚期糖基化终产物及其受体也增强了 Wnt 信号的激活和 VSMC 成骨分化及钙化 (图 3)^[37]。

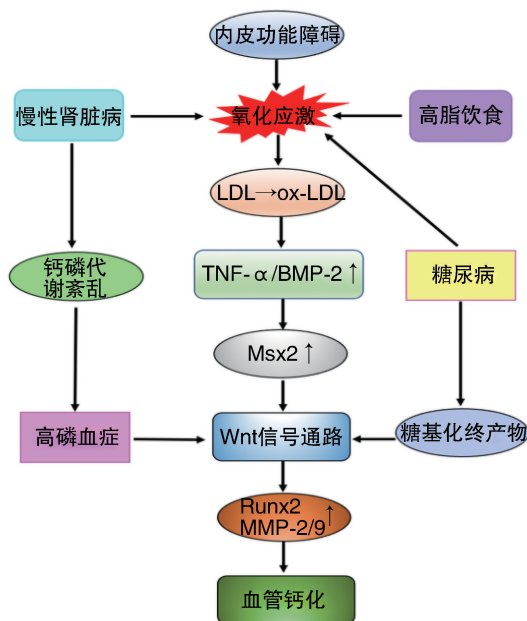


图 3. Wnt 信号在血管钙化的作用
Figure 3. Effect of Wnt signaling in vascular calcification

血管钙化是慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 常见并发症, 与心血管事件发生和死亡率的增加有关。CKD 中也有 Wnt 信号的参与。透析患者中 Wnt 抑制剂硬化蛋白水平与主动脉和冠状动脉钙化程度密切相关^[38]。与此一致的是, Wnt5a、Wnt5b 和 Wnt11 在主动脉瓣钙化部位的表达水平明显高于非钙化部位^[39]。一方面, 与 CKD 患者中钙磷代谢紊乱, 高磷酸盐诱导 VSMC 中 Wnt/ β -catenin 信号的激活和下游骨相关转录因子 Runx2 的表达增加有关^[34]。另一方面, 这类人群的肾脏清除率降低, 体内多种有毒物质蓄积, 活性氧产生增加, 导致 Mx2/TNF 水平升高^[40], 介导 Wnt 信号的激活^[41]。激活的 Wnt 通路不但促进了成骨转录因子 Runx2 的表达, 还诱导了基质金属蛋白酶 2/9 (matrix metalloproteinase-2/9, MMP-2/9) 的产生, 驱动 As 和钙化的发生 (图 3)。Wnt 相关配体抑制剂则显著抑制了 VSMC 钙化^[42]。

总之, Wnt 信号参与心血管疾病进展的整个过程, 包括内皮功能紊乱、炎症反应、脂质浸润、VSMC 的增殖和管壁钙化等多个方面。不同 Wnt 信号之间也存在相互作用。当合并有糖尿病、CKD 等多种疾病时, 相互作用机制更为复杂。深入探讨 Wnt 信号与疾病间的关系具有重要的意义。

[参考文献]

- [1] NUSSE R, VARMUS H E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome[J]. *Cell*, 1982, 31(1): 99-109.
- [2] RIJSEWIJK F, SCHUERMAN M, WAGENAAR E, et al. The drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless [J]. *Cell*, 1987, 50(4): 649-657.
- [3] SUN X, PENG X, CAO Y, et al. ADNP promotes neural differentiation by modulating Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2984.
- [4] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-999.
- [5] WM B. Interventions in Wnt signaling to induce cardiomyocyte proliferation: crosstalk with other pathways[J]. *Mol Pharmacol*, 2020, 97(2): 90-101.
- [6] BADIMON L, BORRELL-PAGES M. Wnt signaling in the vessel wall [J]. *Curr Opin Hematol*, 2017, 24(3): 230-239.
- [7] PARK H B, KIM J W, BAEK K H. Regulation of Wnt signaling through ubiquitination and deubiquitination in cancers [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3904.
- [8] JACKSON H, GRANGER D, JONES G, et al. Novel bis-specific domain antibody to LRP6 inhibits Wnt and r-spondin ligand-induced Wnt signaling and tumor growth [J]. *Mol Cancer Res*, 2016, 14(9): 859-868.
- [9] ZEILBECK L F, MÜLLER B B, LEOPOLD S A, et al. Norrin mediates angiogenic properties via the induction of insulin-like growth factor-1[J]. *Exp Eye Res*, 2016, 145: 317-326.
- [10] GONG B, SHEN W, XIAO W, et al. The Sec14-like phosphatidylinositol transfer proteins Sec14L3/Sec14L2 act as GTPase proteins to mediate Wnt/ Ca^{2+} signaling[J]. *Elife*, 2017, 6: e26362.
- [11] VLADAR E K, KÖNIGSHOFF M. Noncanonical Wnt planar cell polarity signaling in lung development and disease [J]. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48(1): 231-243.
- [12] CARVAJAL-GONZALEZ J M, ROMAN A C, MLODZIK M. Positioning of centrioles is a conserved readout of Frizzled planar cell polarity signalling [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11135.
- [13] 李红蓉, 刘红利, 马柳一. 动脉粥样硬化进程中单核/巨噬细胞的行为变化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(12): 1291-1296.
- [14] WOLF D, LEY K. Immunity and inflammation in atherosclerosis[J]. *Herz*, 2019, 44(2): 107-120.
- [15] MATTHIJS BLANKESTEIJN W, HERMANS K C. Wnt signaling in atherosclerosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 763(Pt A): 122-130.
- [16] GAY A, TOWLER D A. Wnt signaling in cardiovascular disease: opportunities and challenges[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2017, 28(5): 387-396.
- [17] BADIMON L, LUQUERO A, CRESPO J, et al. PCSK9 and LRP5 in macrophage lipid internalization and inflammation[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(9): 2054-2068.
- [18] VALLÉE A, VALLÉE J N, LECARPENTIER Y. Metabolic reprogramming in atherosclerosis: Opposed interplay between the canonical Wnt/ β -catenin pathway and PPAR γ [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 133: 36-46.
- [19] SCHAALE K, NEUMANN J, SCHNEIDER D, et al. Wnt signaling in macrophages: augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses[J]. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(6/7): 553-559.
- [20] 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]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4): 590-600.
- [21] WILLIAMS H, MILL C A, MONK B A, et al. Wnt2 and WISP-1/CCN4 induce intimal thickening via promotion of smooth muscle cell migration [J]. *Arterioscler Thromb*

- Vasc Biol, 2016, 36(7): 1417-1424.
- [22] WU X, WANG J, JIANG H, et al. Wnt3a activates β 1-integrin and regulates migration and adhesion of vascular smooth muscle cells[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(4): 1159-1164.
- [23] ZHUANG Y, MAO J Q, YU M, et al. Hyperlipidemia induces vascular smooth muscle cell proliferation involving Wnt/ β -catenin signaling [J]. Cell Biol Int, 2016, 40(2): 121-130.
- [24] FOULQUIER S, DASKALOPOULOS E P, LLURI G, et al. Wnt signaling in cardiac and vascular disease [J]. Pharmacol Rev, 2018, 70(1): 68-141.
- [25] KIM J, KIM J, KIM D W, et al. Wnt5a induces endothelial inflammation via beta-catenin-independent signaling [J]. J Immunol, 2010, 185(2): 1274-1282.
- [26] BROWN B A, WILLIAMS H, BOND A R, et al. Carotid artery ligation induced intimal thickening and proliferation is unaffected by ageing [J]. J Cell Commun Signal, 2018, 12(3): 529-537.
- [27] LABBÉ P, THORIN E. Therapeutic targeting of LRP6 in cardiovascular diseases: challenging but not Wnt-Possible! [J]. Can J Cardiol, 2019, 35(11): 1567-1575.
- [28] YAN D Y, TANG J, CHEN L, et al. Imperatorin promotes osteogenesis and suppresses osteoclast by activating Akt/GSK3 β / β -catenin pathways[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(3): 2330-2341.
- [29] REDDY V S, VALENTE A J, DELAFONTAINE P, et al. Interleukin-18/Wnt1-inducible signaling pathway protein-1 signaling mediates human saphenous vein smooth muscle cell proliferation [J]. J Cell Physiol, 2011, 226(12): 3303-3315.
- [30] MAIONE A S, CIPOLLETTA E, SORRIENTO D, et al. Cellular subtype expression and activation of CaMK II regulate the fate of atherosclerotic plaque [J]. Atherosclerosis, 2017, 256: 53-61.
- [31] 孙学娇, 刘乃丰. 关注糖尿病与血管钙化的共同发病机制和临床意义 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(2): 169-174.
- [32] YANG P, TRONCONE L, AUGUR Z M, et al. The role of bone morphogenetic protein signaling in vascular calcification [J]. Bone, 2020, 141: 115542.
- [33] SHAO J S, CHENG S L, PINGSTERHAUS J M, et al. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals [J]. J Clin Invest, 2005, 115(5): 1210-1220.
- [34] CAI T, SUN D, DUAN Y, et al. Wnt/ β -catenin signaling promotes VSMCs to osteogenic transdifferentiation and calcification through directly modulating Runx2 gene expression [J]. Exp Cell Res, 2016, 345(2): 206-217.
- [35] SHAO J S, ALY Z A, LAI C F, et al. Vascular BMP Msx2 Wnt signaling and oxidative stress in arterial calcification [J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1117: 40-50.
- [36] 谈君, 任晓妹, 刘乃丰. 糖尿病大鼠钙化血管中 Msx2 和 Wnt3a 的表达 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(3): 173-176.
- [37] LIU Y, WM W, ZHANG X L, et al. AGE/RAGE promotes the calcification of human aortic smooth muscle cells via the Wnt/ β -catenin axis [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(11): 4644-4656.
- [38] YANG C Y, CHANG Z F, CHAU Y P, et al. Circulating Wnt/ β -catenin signalling inhibitors and uraemic vascular calcifications [J]. Nephrol Dial Transplant, 2015, 30(8): 1356-1363.
- [39] ALBANESE I, YU B, AL-KINDI H, et al. Role of non-canonical Wnt signaling pathway in human aortic valve calcification [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(3): 543-552.
- [40] SCHUNK S J, 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.
- [41] ZHANG H, CHEN J, SHEN Z, et al. Indoxyl sulfate accelerates vascular smooth muscle cell calcification via microRNA-29b dependent regulation of Wnt/ β -catenin signaling [J]. Toxicol Lett, 2017, 284: 29-36.
- [42] LIAO R, WANG L, LI J, et al. Vascular calcification is associated with Wnt-signaling pathway and blood pressure variability in chronic kidney disease rats [J]. Nephrology (Carlton), 2020, 25(3): 264-272.
- (此文编辑 秦旭平)