

本文引用: 姜秀新, 袁珮栋, 陈昂, 等. 平滑肌 ZFP36 通过调控 Runx2 表达抑制血管钙化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(10): 841-848. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.10.002.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-10-0841-08

· 实验研究 ·

平滑肌 ZFP36 通过调控 Runx2 表达抑制血管钙化

姜秀新¹, 袁珮栋², 陈昂², 张文程²

山东大学齐鲁医院 1. 糖尿病与肥胖症外科重点实验室, 2. 心内科, 山东省济南市 250012

[摘要] [目的] 探究 RNA 结合蛋白锌指蛋白 36 (ZFP36) 在血管钙化中的作用及机制。[方法] 使用 ZFP36 过表达病毒和 siRNA 处理人主动脉平滑肌细胞并给予高磷刺激, 观察过表达或敲低 ZFP36 后对平滑肌细胞钙化的影响; RNA 免疫共沉淀和稳定性实验检测 Runx2 是否为 ZFP36 的靶基因; 制备平滑肌特异性 ZFP36 敲除小鼠, 利用维生素 D 诱导血管钙化, 使用茜素红和 Von Kossa 染色观察主动脉血管钙化情况, Western blot 检测 Runx2 蛋白的表达。[结果] ZFP36 在钙化刺激条件下表达升高。过表达 ZFP36 减轻高磷诱导的平滑肌细胞钙化状况, 而敲低 ZFP36 则加重钙化。ZFP36 可以结合 Runx2 mRNA 并促进其降解。在细胞水平, ZFP36 通过 Runx2 抑制平滑肌细胞钙化。在动物水平, 平滑肌敲除 ZFP36 加重了维生素 D 诱导的血管钙化。[结论] 平滑肌中 ZFP36 通过靶向 Runx2 mRNA 抑制其表达从而抑制血管钙化。

[关键词] 血管钙化; 平滑肌; 锌指蛋白 36; Runt 相关转录因子 2

[中图分类号] R54; R363

[文献标识码] A

ZFP36 in smooth muscle inhibits vascular calcification by regulating Runx2 expression

JIANG Xiuxin¹, YUAN Peidong², CHEN Ang², ZHANG Wencheng²

1. Key Laboratory of Diabetes and Obesity Surgery, 2. Department of Cardiology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role and mechanism of RNA binding protein zinc finger protein 36 (ZFP36) in vascular calcification. **Methods** Human aortic smooth muscle cells were infected with ZFP36-overexpressing virus or transfected with ZFP36 siRNA, followed by high phosphate stimulation to observe the effect of overexpression or knockdown of ZFP36 on smooth muscle cell calcification; RNA immunoprecipitation and stability experiments were used to detect whether Runx2 was the target gene of ZFP36; Smooth muscle specific ZFP36 knockout mice were generated and vitamin D was used to induce vascular calcification. Alizarin Red and Von Kossa staining were used to observe calcification of aortic vessels, and Western blot was used to detect Runx2 protein expression. **Results** ZFP36 expression was elevated under calcification-stimulating conditions. Overexpression of ZFP36 alleviated high phosphate-induced smooth muscle cell calcification, while knockdown of ZFP36 exacerbated calcification. ZFP36 could bind to Runx2 mRNA and promote its degradation. At the cellular level, ZFP36 could inhibit smooth muscle cell calcification via Runx2. At the animal level, knockout of ZFP36 in smooth muscle exacerbated vascular calcification induced by vitamin D. **Conclusion** ZFP36 inhibits vascular calcification by targeting Runx2 mRNA and suppressing its expression in smooth muscle cells.

[KEY WORDS] vascular calcification; smooth muscle; zinc finger protein 36; Runt-related transcription factor 2

血管钙化是一种发生在血管壁中钙盐沉积的病理过程, 也是成年人心血管疾病的重要风险因素之一^[1]。血管钙化发病机制复杂, 涉及血管细胞、

基质和钙盐之间的相互作用^[2]。平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 在血管钙化的病理过程中发挥着重要作用^[3], 其经历成骨样细胞转换的过

[收稿日期] 2025-03-19

[修回日期] 2025-09-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82470499, 82270457); 山东省自然科学基金项目(ZR2024ZD23)

[作者简介] 姜秀新, 硕士, 技术员, 研究方向为心血管代谢疾病, E-mail 为 201562097201@email.sdu.edu.cn。通信作者张文程, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的发病机制, E-mail 为 zhangwencheng@sdu.edu.cn。

程,表达一些骨相关蛋白质和转录因子,如碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、Runt 相关转录因子 2(Runt related transcription factor 2, Runx2)等^[4],这使得平滑肌细胞获得类似成骨细胞的特性,导致血管壁中钙盐沉积和基质的矿化^[5]。其中,Runx2 作为一个关键的调控因子,在平滑肌细胞成骨分化和血管钙化中发挥重要的作用,其表达与钙盐的沉积和血管壁的基质矿化呈正相关^[6]。目前,关于平滑肌细胞在血管钙化中的具体作用机制还需要进一步深入探究。

锌指蛋白 36(zinc finger protein 36, ZFP36)是一类 RNA 结合蛋白,在调控靶基因 mRNA 稳定性和表达方面起着重要作用^[7]。ZFP36 通过靶向特定的 mRNA 分子,特别是那些富含腺嘌呤(A)和尿嘧啶(U)序列(AU-rich 元件, AREs)的 mRNA,来降低其稳定性^[8]。我们课题组前期研究发现,ZFP36 在肥胖小鼠和肥胖患者的脂肪组织中表达降低,ZFP36 可特异性靶向 E3 泛素连接酶 RNF128 mRNA 降低其稳定性,导致 RNF128 蛋白水平降低,其底物 Sirt1 降解减少,从而促进脂解过程^[9];在平滑肌中,ZFP36 通过靶向降解 RGS2 mRNA,促进细胞内钙离子增加和平滑肌收缩,调控血压稳定^[10]。然而,平滑肌 ZFP36 在血管钙化中的作用还不清楚。本研究利用细胞和动物钙化模型,探究 ZFP36 在血管钙化中可能发挥的作用,进而为血管钙化的预防和治疗提供实验和理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞和试剂

人主动脉平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cell, HASMC)购自美国 iCell 公司。ZFP36 腺病毒和对照 GFP 腺病毒购自山东维真生物公司,ZFP36 siRNA 购自中国铂尚生物有限公司。RNA 免疫共沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)试剂盒购自 Millipore 公司。茜素红 S 染色液、Von Kossa 试剂盒购自索莱宝生物有限公司。钙含量检测试剂盒和 ALP 活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。Runx2 抗体购自英国 Abcam 公司,ZFP36、Flag 和 β -tubulin 抗体购自美国 Proteintech 公司。

1.2 细胞钙化模型制备

HASMC 生长在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,并置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中。利用高磷诱导钙

化时,使用含 2.6 mmol/L 的 Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 培养基培养 7 天,每两天更换一次。

1.3 动物钙化模型制备

平滑肌特异性 ZFP36 敲除(ZFP36^{SMKO})小鼠由 ZFP36^{fl/fl} 小鼠与 SM22-Cre 小鼠杂交制备而成^[9]。将 8~10 周龄的雄性对照(CTR)小鼠和 ZFP36^{SMKO} 小鼠给予皮下注射维生素 D(VitD, 500 000 IU/(kg·d) 4 天,以同样的注射位置皮下注射 5% 乙醇作为溶媒组(Vehicle)。定时监测小鼠的状态,第 10 天处死取材。实验动物均饲养在山东大学齐鲁医院心血管实验室 SPF 级动物房,温度保持在 24~26 °C,所有动物实验均得到山东大学齐鲁医院科研伦理委员会批准。

1.4 RNA 免疫共沉淀

使用 Millipore RIP 试剂盒进行操作,简要步骤如下:利用 RIP 裂解液裂解平滑肌细胞,然后将细胞裂解液与磁珠、IgG 或 ZFP36 抗体孵育过夜,再将混合物置于磁力架上,使磁珠吸附在管壁,吸去上清液,并洗涤多次,以去除未结合的杂质。向磁珠-免疫复合物中加入含有蛋白酶 K 的 RNA 洗脱缓冲液,以消化蛋白质,释放与蛋白结合的 RNA。RNA 纯化后,进行反转录及 PCR 反应。所用引物为 5'-GTCATGGCGGGTAACGATGA-3' 和 5'-TGAAACTCTT-GCCTCGTCCA-3'。

1.5 mRNA 稳定性实验

HASMC 感染 GFP 或 ZFP36 腺病毒 48 h 后,加入 5 mg/L 的放线菌素 D,分别在 0、1、2、4 h 提取细胞 RNA 并进行后续实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR),所用引物同 1.4。

1.6 茜素红和 Von Kossa 染色

细胞进行茜素红染色前先用多聚甲醛固定,再加入茜素红染液,避光染色 20 min, PBS 清洗后,拍照采集数据;组织切片染色前进行脱蜡复水,加上茜素红染液室温下避光染色 5 min,再脱水透明,封片拍照。此外,组织切片脱蜡复水后用移液枪滴入 Von Kossa 银溶液(1%),紫外灯照射 45 min,再滴加 5% 硫代硫酸钠溶液清洗,脱水透明,封片拍照。

1.7 Western blot 检测

配置蛋白裂解液(RIPA、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂比例为 100:1:1),提取血管组织和细胞蛋白,利用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。加入 5×loading buffer,于沸水中煮 10 min。上样蛋白,通过 SDS-PAGE 分离样品,并转印至 PVDF 上。经 5% 脱脂牛奶封闭后,孵育一抗及二抗,然后利用化学发

光系统进行显像并分析。

1.8 钙含量和 ALP 活性检测

细胞、组织或血清中钙含量使用钙测定试剂盒(C004-2-1,南京建成生物工程研究所)按照说明书进行测定,同时BCA试剂盒测定蛋白浓度,最后标准化为钙含量/蛋白浓度。同样,使用ALP活性试剂盒(A059-2,南京建成生物工程研究所)测定ALP活性。

1.9 统计学分析

所有数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。数据分析采用GraphPad Prism 8.0。所有数据都通过正态分布和方差齐性检验,两组间均数比较采用独立样本t检验,多组间均数比较使用one-way ANOVA检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ZFP36 在钙化刺激条件下表达升高

为了检测不同钙化条件下平滑肌细胞中ZFP36的表达情况,对HASC检测给予高磷、高糖、醛固酮刺激7天,发现ZFP36蛋白表达分别升高70.3%($P<0.01$)、43.7%($P<0.01$)和79.6%($P<0.01$;图1A),ZFP36 mRNA表达分别增加64.0%($P<0.05$)、44.2%($P<0.05$)和1.10倍($P<0.01$;图1B)。同样,Western blot和免疫组织化学染色结果显示,ZFP36蛋白在钙化小鼠的血管中表达分别升高1.03倍($P<0.05$)和1.32倍($P<0.01$;图1C和1D)。这些结果表明,ZFP36与钙化的发生密切相关,它可能在血管钙化的调控中发挥作用。

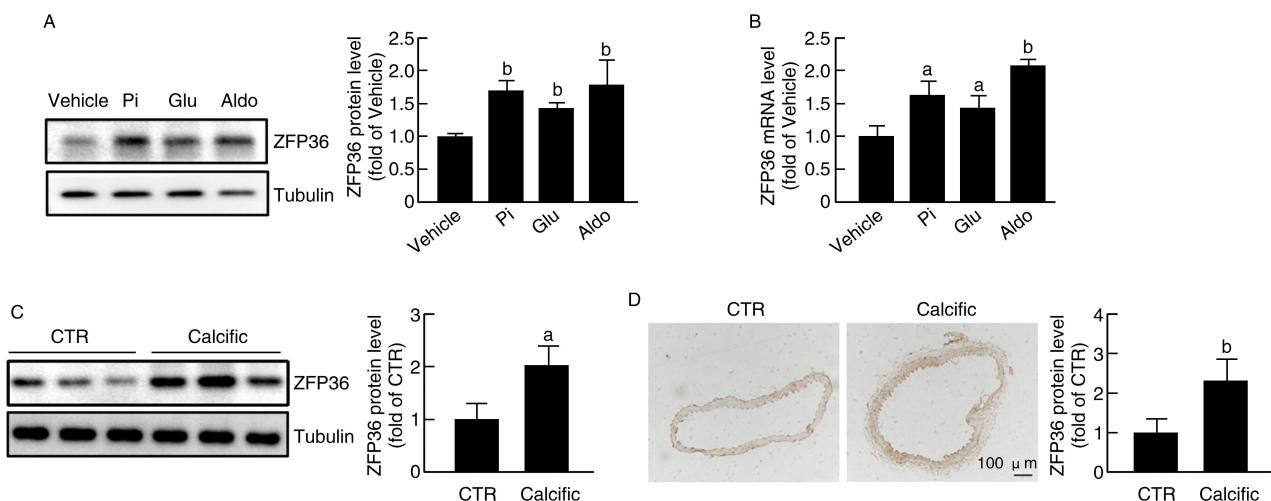


图 1. ZFP36 在钙化刺激条件下表达升高

A 为 Western blot 检测 HASC 给予高磷(2.6 mmol/L Pi)、高糖(0.25 mmol/L Glu)、醛固酮(100 μ mol/L Aldo)刺激 7 天后 ZFP36 蛋白表达水平($n=4$);B 为 RT-qPCR 检测 ZFP36 mRNA 水平($n=3$);C 为 Western blot 检测钙化小鼠血管中 ZFP36 蛋白水平($n=3$);D 为免疫组织化学染色检测 ZFP36 水平($n=4$)。a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与 Vehicle 或 CTR 组比较。

Figure 1. ZFP36 expression is increased under calcification-stimulating conditions

2.2 过表达 ZFP36 抑制高磷诱导的平滑肌细胞钙化

为了研究ZFP36在平滑肌细胞钙化中的作用,我们构建了ZFP36过表达腺病毒,通过Western blot检测其过表达水平(图2A)。将GFP对照腺病毒和ZFP36过表达腺病毒感染HASC,并高磷诱导7天。Western blot检测发现,过表达ZFP36后,Runx2蛋白表达下降19.5%($P<0.05$;图2B);茜素红染色表明过表达ZFP36使高磷诱导的钙化降低约34.6%($P<0.01$;图2C)。RT-qPCR证实,过表达ZFP36使Runx2 mRNA水平降低约48.6%($P<0.01$;图2D)。在钙化条件下,与对照组相

比,过表达ZFP36后细胞中的钙含量和ALP活性分别下降42.2%($P<0.01$)和25.9%($P<0.05$;图2E和2F)。因此,过表达ZFP36抑制高磷诱导的平滑肌细胞钙化。

2.3 敲低 ZFP36 加重高磷诱导的平滑肌细胞钙化

为了验证ZFP36敲低对平滑肌细胞钙化的影响,我们构建了ZFP36 siRNA,转染HASC后检测其敲低效率(图3A)。随后,加入高磷诱导钙化模型。ZFP36被敲低后,Runx2的蛋白水平增加15.0%($P<0.05$;图3B),茜素红染色显示钙化加重19.8%($P<0.05$;图3C)。同时,敲低ZFP36使Runx2的mRNA水平升高42.0%($P<0.01$;图3D)、

钙含量增加 1.68 倍 ($P<0.01$) 以及 ALP 活性增加 60.7% ($P<0.05$; 图 3E 和 3F)。因此, 敲低 ZFP36

后, 高磷诱导的平滑肌细胞钙化明显加重。

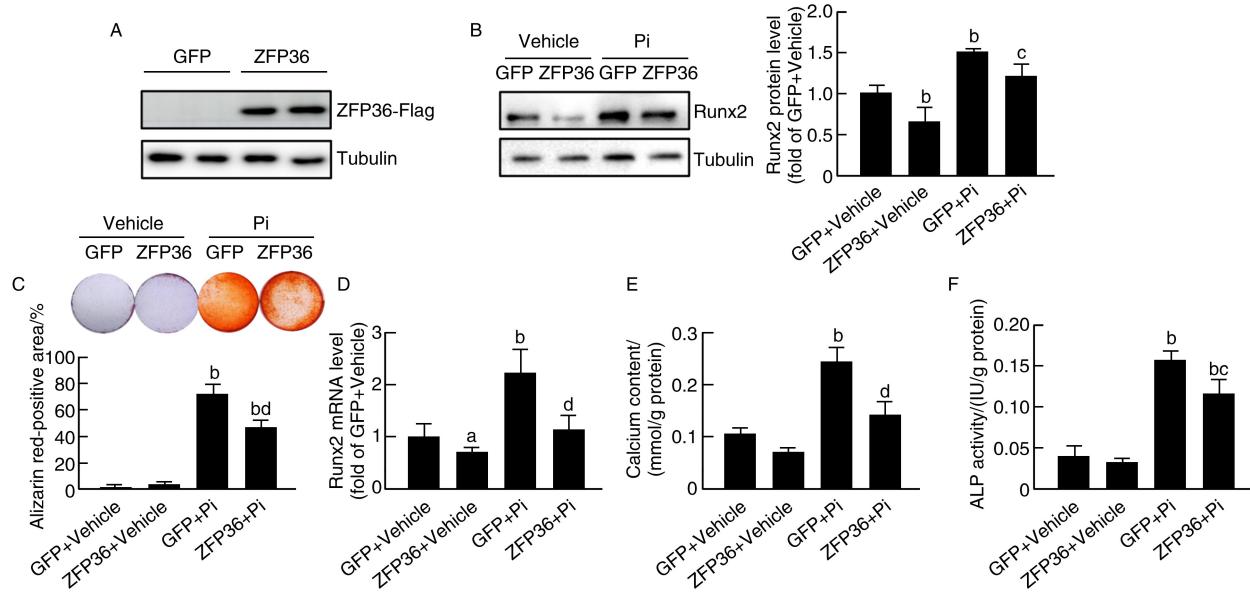


图 2. 过表达 ZFP36 抑制高磷诱导的平滑肌细胞钙化

A 为 Western blot 检测 ZFP36 表达; B 为 Western blot 检测 Runx2 蛋白表达 ($n=4$); C 为茜素红染色检测钙盐沉积 ($n=3$);

D 为 RT-qPCR 检测 Runx2 mRNA 表达 ($n=4$); E 为钙含量测定 ($n=3$); F 为 ALP 测定 ($n=3$)。

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 GFP+Vehicle 组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 GFP+Pi 组比较。

Figure 2. Overexpression of ZFP36 inhibits high phosphate-induced smooth muscle cell calcification

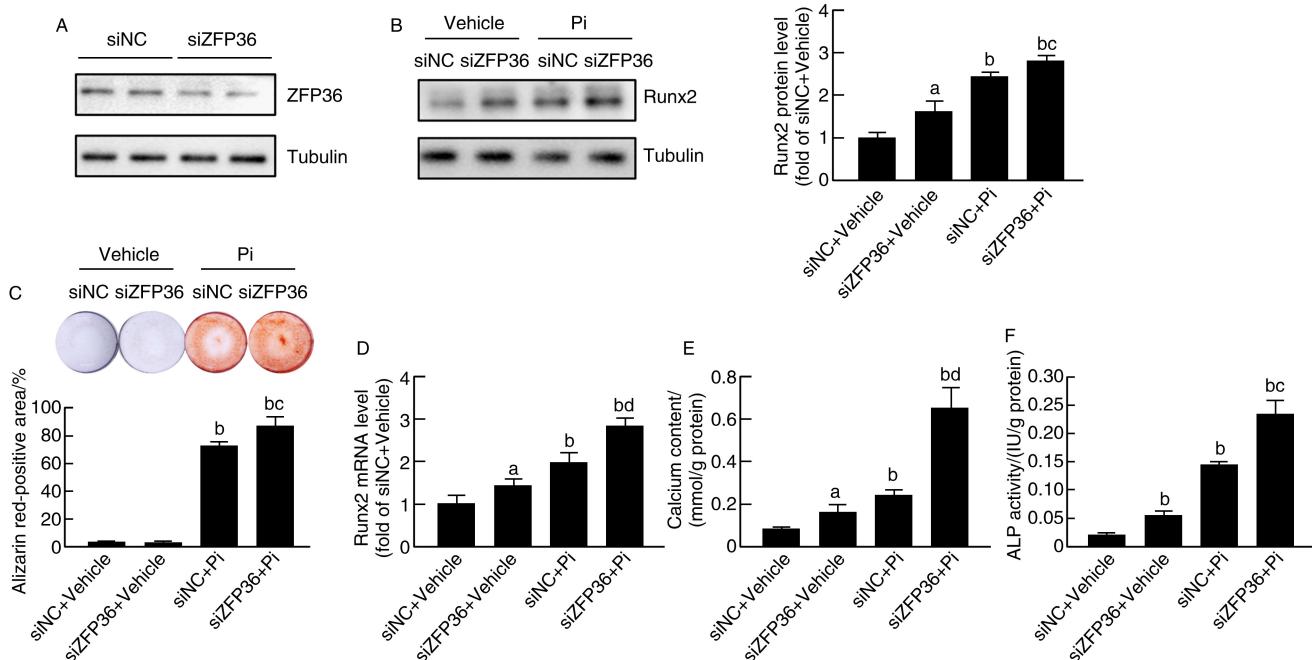


图 3. 敲低 ZFP36 加重高磷诱导的平滑肌细胞钙化

A 为 Western blot 检测 ZFP36 表达; B 为 Western blot 检测 Runx2 蛋白表达 ($n=4$); C 为茜素红染色检测钙盐沉积 ($n=3$);

D 为 RT-qPCR 检测 Runx2 mRNA 表达 ($n=3$); E 为钙含量测定 ($n=3$); F 为 ALP 活性测定 ($n=3$)。

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 siNC+Vehicle 组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 siNC+Pi 组比较。

Figure 3. Knockdown of ZFP36 exacerbates high phosphate-induced smooth muscle cell calcification

2.4 Runx2 是 ZFP36 调控的靶基因

为了探究 ZFP36 调控的靶基因, 我们从 RBPDB 数据库 (<http://rbpdb.ccbr.utoronto.ca>) 中预测到 Runx2 mRNA 可能与 ZFP36 结合。过表达 ZFP36 后, Runx2 蛋白被抑制(图 4A), Runx2 mRNA 水平降低 27.8% ($P<0.01$; 图 4B)。RNA 免疫共沉淀证实, ZFP36 可以与 Runx2 mRNA 相结合(图 4C)。mRNA 稳定性实验证实, 加入放线菌素 D 后 4 h, 过表达 ZFP36 导致 Runx2 mRNA 的稳定性下降 29.1% ($P<0.01$; 图 4D)。因此, Runx2 是 ZFP36 的下游靶基因。

2.5 ZFP36 通过 Runx2 抑制平滑肌细胞钙化

为了验证 ZFP36 是否通过 Runx2 调控平滑肌细胞钙化, 我们在 HASMC 中分别感染 GFP 对照病

毒、ZFP36 过表达病毒、Runx2 过表达病毒及 ZFP36+Runx2 共表达病毒, 并在高磷刺激条件下培养 7 天。Western blot 结果显示, 单独过表达 ZFP36 显著下调 Runx2 蛋白表达 29.7% ($P<0.05$), 而 ZFP36 与 Runx2 联合过表达后, 该抑制作用被逆转 31.8% ($P<0.05$; 图 5A)。相应地, 茜素红染色结果表明, ZFP36 过表达可使钙盐沉积减少 43.1% ($P<0.01$), 在此基础上过表达 Runx2 后钙盐沉积增加 116.4% ($P<0.01$; 图 5B)。此外, ZFP36 过表达导致细胞内钙含量和 ALP 活性分别下降 44.6% 和 50.1% ($P<0.01$), 在此基础上过表达 Runx2 后细胞内钙含量和 ALP 活性分别增加 111.9% 和 192.7% ($P<0.01$; 图 5C 和 5D)。因此, ZFP36 通过调控 Runx2 来抑制平滑肌细胞钙化。

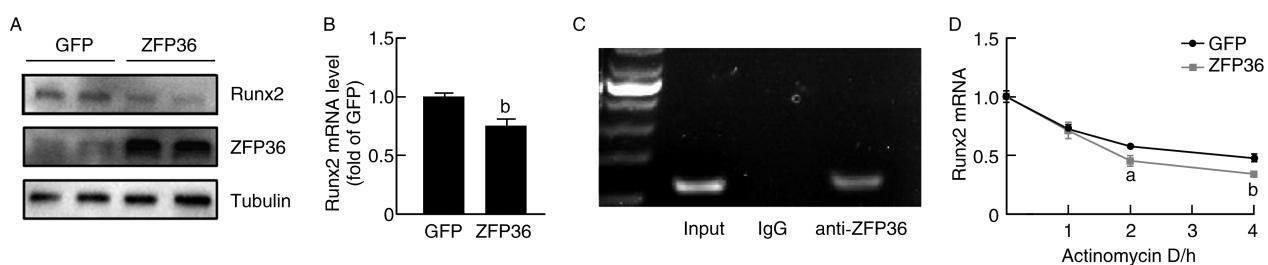


图 4. Runx2 是 ZFP36 调控的靶基因

A 为 Western blot 检测 Runx2 蛋白表达; B 为 RT-qPCR 检测 Runx2 mRNA 表达 ($n=3$); C 为 RNA 免疫共沉淀; D 为 mRNA 稳定性实验 ($n=4$)。a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 GFP 组比较。

Figure 4. Runx2 is the target gene regulated by ZFP36

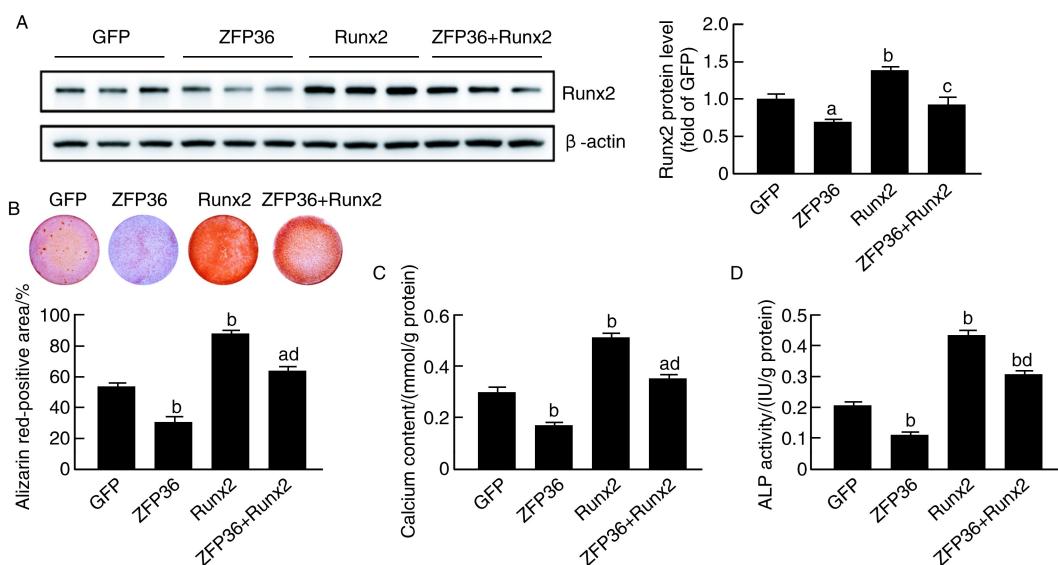


图 5. ZFP36 通过 Runx2 抑制平滑肌细胞钙化

A 为 Western blot 检测 Runx2 的表达 ($n=3$); B 为茜素红染色检测钙盐沉积 ($n=4$); C 为钙含量测定 ($n=4$); D 为 ALP 活性测定 ($n=4$)。a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 GFP 组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 ZFP36 组比较。

Figure 5. ZFP36 inhibits smooth muscle cell calcification via Runx2

2.6 平滑肌敲除 ZFP36 加重维生素 D 诱导的血管钙化

为了探究平滑肌 ZFP36 在动物血管钙化中的作用, 我们制备了 ZFP36 平滑肌特异性敲除 (ZFP36^{SMKO}) 小鼠, 并检测其敲除效率(图 6A 和 6B)。给予对照鼠和 ZFP36^{SMKO} 小鼠维生素 D 注射以进行血管钙化造模, 对两组小鼠血管进行切片并染色, 发现 ZFP36^{SMKO} 小鼠的血管茜素红染色和 Von Kossa 染色结果(钙盐沉积)比对照小鼠分别增

加 95.9% ($P<0.01$) 和 1.30 倍 ($P<0.01$, 图 6C 和 6D), 表明 ZFP36^{SMKO} 小鼠的血管钙化程度更加严重。同时, Western blot 结果显示, ZFP36^{SMKO} 小鼠血管中的 Runx2 蛋白增加 59.2% ($P<0.01$; 图 6E), 免疫组织化学染色也证实这一结果(图 6F)。此外, ZFP36^{SMKO} 小鼠的血清钙含量以及血管中的钙含量比对照小鼠分别增加 19.6% 和 53.3% ($P<0.01$; 图 6G 和 6H)。以上结果证明, 平滑肌敲除 ZFP36 明显加重维生素 D 诱导的血管钙化。

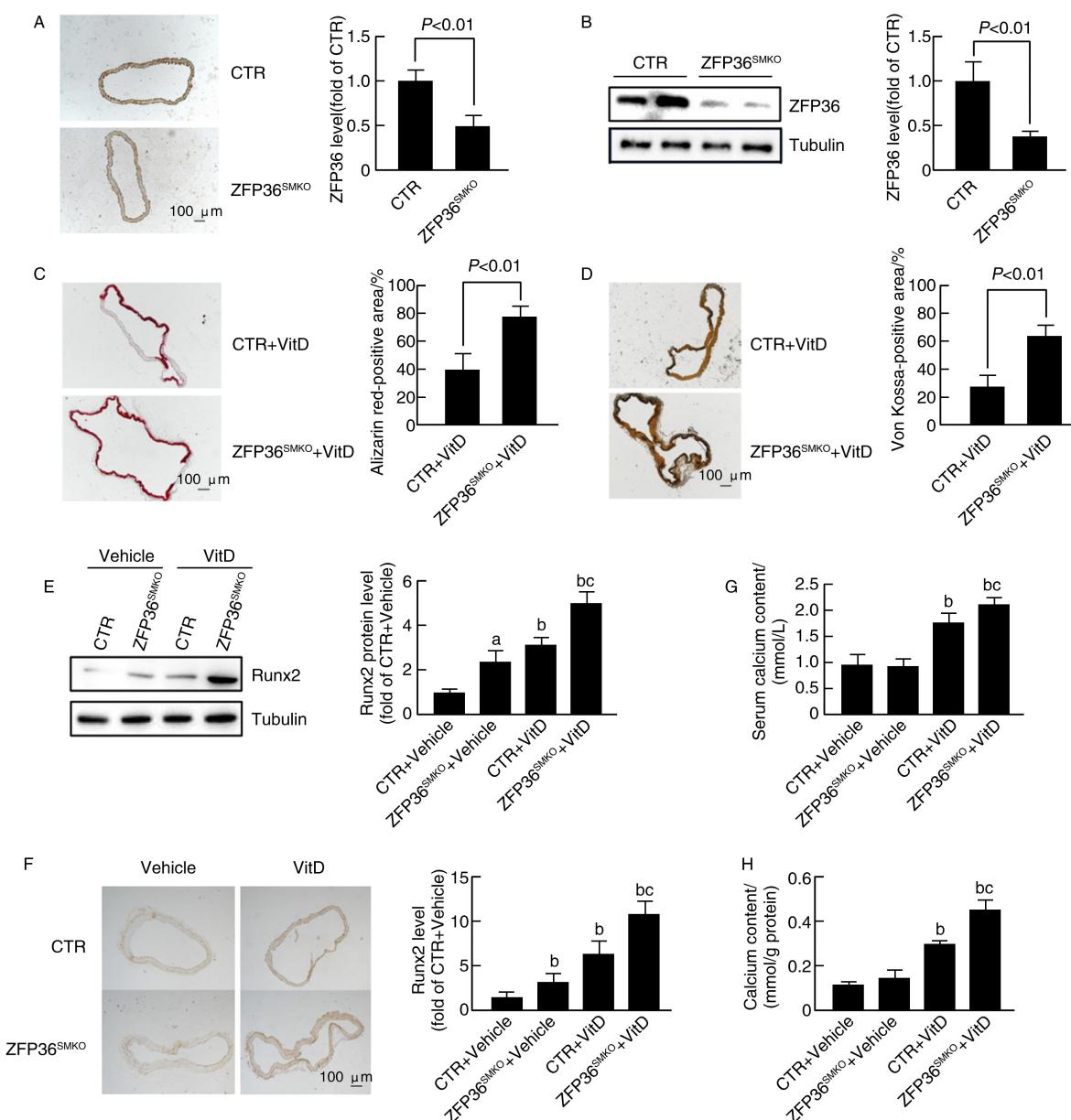


图 6. 平滑肌敲除 ZFP36 加重维生素 D 诱导的血管钙化

A 为免疫组织化学检测 ZFP36 表达($n=3$); B 为 Western blot 检测 ZFP36 蛋白水平($n=4$); C 为茜素红染色检测钙盐沉积($n=3$); D 为 Von Kossa 染色检测钙盐沉积($n=3$); E 为 Western blot 检测 Runx2 蛋白水平($n=3$); F 为免疫组织化学检测 Runx2 表达($n=5$); G 为血清钙离子检测($n=5$); H 为主动脉组织钙离子检测($n=5$)。

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 CTR+Vehicle 组比较; c 为 $P<0.01$, 与 CTR+VitD 组比较。

Figure 6. ZFP36 deficiency in smooth muscle exacerbates vitamin D-induced vascular calcification

3 讨 论

在本研究中我们发现,平滑肌中 ZFP36 在钙化条件下表达升高。体外实验中,过表达 ZFP36 减轻了高磷诱导的平滑肌细胞钙化,具体表现为 Runx2 蛋白水平降低,茜素红染色显示钙盐沉积面积减少,细胞内钙含量和 ALP 活性下降;相反,敲低 ZFP36 则加重了高磷诱导的平滑肌细胞钙化。在机制上,ZFP36 可以与 Runx2 的 mRNA 结合,降低其稳定性和蛋白合成。此外,ZFP36 通过 Runx2 抑制平滑肌细胞钙化。我们还制备了平滑肌特异性敲除 ZFP36 小鼠并诱导钙化模型来深入探究其对血管钙化的影响,发现与对照鼠相比,ZFP36^{SMKO} 小鼠钙化程度明显加重,Runx2 表达升高,茜素红和 Von Kossa 染色显示 ZFP36^{SMKO} 小鼠主动脉血管钙盐沉积增加。因此,ZFP36 通过靶向 Runx2 mRNA 促进其降解来抑制血管钙化过程。

RNA 结合蛋白有 2 000 多种,它们通过与 RNA 分子中特定的序列或结构相互作用,调控基因表达、RNA 的转运、翻译和降解等生物学过程^[11]。ZFP36 是其中一类 RNA 结合蛋白,可以与靶基因 mRNA 结合,降低其稳定性和蛋白表达。通过调节 mRNA 稳定性这一途径,ZFP36 在许多生理过程和疾病进展中发挥重要作用。例如,ZFP36 能够直接靶向降解炎症相关基因如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 的 mRNA^[12],也可通过降低 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) mRNA 稳定性^[13],极大减少炎症小体的激活,从而影响细胞对炎症刺激的反应。这对于维持免疫系统的平衡和防止过度炎症反应至关重要。此外,ZFP36 还参与细胞周期的调控,它通过与细胞周期相关的基因如细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 和细胞髓细胞瘤基因 (c-Myc) 的 mRNA 结合,影响细胞的增殖和分裂^[14]。在心血管疾病中,内皮细胞 ZFP36 通过抑制炎症从而延缓动脉粥样硬化的进展^[15]。ZFP36 还可以靶向线粒体复合物 I 中的 Ndufs1 和复合物 III 中的 Uqcrfs1,其缺失会导致小鼠出现缺铁性心脏功能障碍^[16]。本研究中,我们发现 ZFP36 参与血管钙化的调节,平滑肌特异性敲除 ZFP36 加重小鼠血管钙化,本研究进一步增加了我们对 ZFP36 生物学功能的认识。

血管钙化是心血管疾病普遍存在的病理表现,可导致血管壁僵硬度增加、顺应性降低,诱发斑块

破裂、血栓形成、心肌缺血、左心室肥厚和心力衰竭,已成为预测血管重构性疾病事件的重要生物标志物^[17]。平滑肌在正常生理条件下是保持血管结构和功能的关键细胞类型。然而,在一些病理状态下,如慢性炎症、代谢性疾病等,血管平滑肌细胞向成骨细胞发生表型转化,导致其参与到血管钙化的过程中^[18]。同时,平滑肌细胞能够分泌细胞外基质蛋白,例如胶原和弹性蛋白,为钙盐的沉积提供了合适的基质环境^[19]。此外,炎症反应也导致血管壁的损伤,从而促进钙盐的沉积^[20]。Runx2 在血管钙化中发挥重要作用,一方面 Runx2 可以与血清反应因子 (serum response factor, SRF) 直接结合,破坏 SRF/心肌素 (Myocd) 复合物的形成,从而抑制平滑肌收缩标志蛋白的表达;另一方面 Runx2 作为转录因子促进 ALP、骨桥蛋白等成骨相关基因的表达,从而促进平滑肌细胞的成骨分化^[21-22]。Runx2 自身的表达受到转录因子、DNA 甲基化、microRNA、可变剪接、磷酸化、乙酰化和泛素化等多方面调节^[23-24]。本研究发现,ZFP36 能够降低 Runx2 mRNA 的稳定性,通过减少 Runx2 的表达来发挥其作用,从而有效抑制血管钙化。我们的研究为 Runx2 表达提供了新的调控机制。

综上所述,我们通过运用平滑肌细胞钙化模型、平滑肌特异性 ZFP36 敲除小鼠及动物钙化模型等先进技术手段,深入探究了 RNA 结合蛋白 ZFP36 在血管钙化中的关键作用。在机制层面,ZFP36 通过降低 Runx2 mRNA 的稳定性和蛋白表达水平,有效抑制平滑肌细胞的成骨分化及血管钙化过程。该研究进一步揭示了血管钙化的发病机制,对于开发针对血管钙化相关疾病的药物及临床治疗策略具有重要的理论和实践转化价值。

[参考文献]

- [1] VALERO C, GONZÁLEZ MACÍAS J. Atherosclerosis, vascular calcification and osteoporosis [J]. Med Clin (Barc), 2025, 164(4): e13-e20.
- [2] SHENG Y, WEI H, LU S, et al. Alternative splicing of vascular calcification: insights, opportunities, and challenges [J]. Cell Signal, 2025, 127: 111626.
- [3] 陈诚, 张征, 彭瑜, 等. 血管平滑肌细胞表型的成骨转换与血管钙化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(7): 627-633.
- [4] CHEN C, ZHANG Z, PENG Y, et al. Osteogenic transition of vascular smooth muscle cells phenotype and vascular calcification [J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(7): 627-633.
- [5] ZHANG T, LI H, OUYANG C, et al. Liver kinase B1 in-

hibits smooth muscle calcification via high mobility group box 1 [J]. *Redox Biol*, 2021, 38: 101828.

[5] FURMANIK M, CHATROU M, VAN GORP R, et al. Reactive oxygen-forming Nox5 links vascular smooth muscle cell phenotypic switching and extracellular vesicle-mediated vascular calcification [J]. *Circ Res*, 2020, 127 (7): 911-927.

[6] SUN Y, BYON C H, YUAN K, et al. Smooth muscle cell-specific Runx2 deficiency inhibits vascular calcification [J]. *Circ Res*, 2012, 111(5): 543-552.

[7] BESTEHORN A, VON WIRÉN J, ZEILER C, et al. Cyttoplasmic mRNA decay controlling inflammatory gene expression is determined by pre-mRNA fate decision [J]. *Mol Cell*, 2025, 85(4): 742-755.

[8] ZHANG M, GUAN X, DONG Z, et al. Targeting ZFP36 to combat cardiac hypertrophy: insights into ferroptosis pathways [J]. *Clin Transl Med*, 2025, 15(3): e70247.

[9] HU Y, HAI J, TI Y, et al. Adipose ZFP36 protects against diet-induced obesity and insulin resistance [J]. *Metabolism*, 2025, 164: 156131.

[10] CUI X, WANG Y, LU H, et al. ZFP36 regulates vascular smooth muscle contraction and maintains blood pressure [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(3): e2408811.

[11] JUNGFLEISCH J, GEBAUER F. RNA-binding proteins as therapeutic targets in cancer [J]. *RNA Biol*, 2025, 22 (1): 1-8.

[12] MAKITA S, TAKATORI H, NAKAJIMA H. Post-transcriptional regulation of immune responses and inflammatory diseases by RNA-binding ZFP36 family proteins [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 711633.

[13] BERTESI M, FANTINI S, ALECCI C, et al. Promoter methylation leads to decreased ZFP36 expression and deregulated NLRP3 inflammasome activation in psoriatic fibroblasts [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 7: 579383.

[14] MARDEROSIAN M, SHARMA A, FUNK A P, et al. Tristetraprolin regulates cyclin D1 and c-Myc mRNA stability in response to rapamycin in an Akt-dependent manner via p38 MAPK signaling [J]. *Oncogene*, 2006, 25 (47): 6277-6290.

[15] ZHANG H, TAYLOR W R, JOSEPH G, et al. mRNA-binding protein ZFP36 is expressed in atherosclerotic lesions and reduces inflammation in aortic endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33 (6): 1212-1220.

[16] SATO T, CHANG H C, BAYEVA M, et al. mRNA-binding protein tristetraprolin is essential for cardiac response to iron deficiency by regulating mitochondrial function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(27): E6291-E6300.

[17] 王蕊, 柴三葆, 齐永芬. 内源性生物活性小分子与血管钙化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(1): 1-8.
WANG R, CHAI S B, QI Y F. Endogenous bioactive small molecules and vascular calcification [J]. *Chin J Arterioscler*, 2025, 33(1): 1-8.

[18] VILLA-BELLOSTA R. Vascular calcification: key roles of phosphate and pyrophosphate [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13536.

[19] ZHAO Y, SUN Z, LI L, et al. Role of collagen in vascular calcification [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2022, 80 (6): 769-778.

[20] BESSUEILLE L, MAGNE D. Inflammation: a culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(13): 2475-2489.

[21] TANAKA T, SATO H, DOI H, et al. Runx2 represses myocardin-mediated differentiation and facilitates osteogenic conversion of vascular smooth muscle cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(3): 1147-1160.

[22] WANG C, SHI Z, ZHANG Y, et al. CBF β promotes colorectal cancer progression through transcriptionally activating OPN, FAM129A, and UPP1 in a RUNX2-dependent manner [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(11): 3176-3192.

[23] WU W, GAO J, CHEN D, et al. Epithelial microRNA-30a-3p targets RUNX2/HMGB1 axis to suppress airway eosinophilic inflammation in asthma [J]. *Respir Res*, 2022, 23(1): 17.

[24] SHEN J, SHE W, ZHANG F, et al. YBX1 promotes the inclusion of RUNX2 alternative Exon 5 in dental pulp stem cells [J]. *Int J Stem Cells*, 2022, 15(3): 301-310.

(此文编辑 许雪梅)