

# Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在慢性肾脏病血管钙化中作用的研究进展

邓 岱 刘文虎

**摘要** 慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)患者血管钙化(vascular calcification, VC)的发生率高、危害性大,具体发病机制仍未明确。近期研究发现 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路参与 VC 的发生与发展,与慢性肾脏病矿物质和骨异常(chronic kidney disease-mineral and bone disorder, CKD-MBD)的骨-血管轴密切相关,并且在 CKD 病程中的调节出现异常,本文就 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在慢性肾脏病血管钙化中作用的研究进展做一综述。

**关键词** Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路;血管钙化;慢性肾脏病

**中图分类号** R692.5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.044

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)已成为世界性的公共卫生问题,心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)仍是 CKD 患者首要死亡危险因素,其中血管钙化(vascular calcification, VC)是心血管疾病和死亡相关的重要独立危险因素<sup>[1-3]</sup>。对于 VC 病理生理过程的认识已经不再是钙、磷简单地被动沉积到心血管组织,越来越多的研究表明 VC 与骨形成相似,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)在钙化刺激因素作用下逐渐丧失原有肌源性标志,转而表达成骨分化指标<sup>[4-8]</sup>。钙磷代谢紊乱、炎症状态、尿毒症毒素蓄积等血管微环境使 CKD 患者 VC 的发病机制更为复杂,其确切机制尚不明确。近年来, Wnt 信号通路在 VC 中的作用及调控机制受到越来越多的重视,它可能参与 CKD 患者的骨-血管轴代谢而影响 VC。本文就 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在 CKD 患者 VC 中的作用做一综述,分析其调控 VC 的可能机制,以期有助于发现防治 CKD 血管钙化的新方向和新策略

## 一、Wnt 信号通路的概述

1. Wnt 信号通路组成: Wnt 家族是一组富含半胱氨酸的分泌型糖基化蛋白质,细胞表达的 Wnt 受体包括卷曲受体(frizzled receptor, Fz)和辅助受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6(low-density lipoprotein

receptor related protein5/6, LRP5/6)。Wnt 配体可以通过旁分泌和自分泌方式激活多种细胞内信号途径,包括经典的 Wnt 信号途径(即 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号途径)和非经典 Wnt 信号途径。

2. 经典 Wnt 信号通路: 目前认为经典 Wnt 信号通路主要由细胞外配体(Wnt)、跨膜受体(Fz)、胞质蛋白  $\beta$ -catenin 及核内转录因子 T 细胞因子(T cell factor, TCF)等蛋白构成, Wnt 蛋白与细胞膜上的 Fz 和 LRP5/6 结合而激活下游信号,通过向细胞膜募集 Axin 而使与  $\beta$ -catenin 结合的 Axin-GSK-3 $\beta$ -CK1-APC 复合体被破坏,游离出未磷酸的  $\beta$ -catenin,当细胞质内  $\beta$ -catenin 达到一定浓度时,则进入细胞核与 LEF/TCF 转录因子相结合,激活其下游靶基因。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的调控异常,与动脉粥样硬化、心肌肥厚、心力衰竭和血管发育与再生等密切相关<sup>[9,10]</sup>。近期研究发现 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在血管钙化的发病过程中亦发挥重要作用。

3. Wnt 信号通路抑制剂: 与血管钙化相关的 Wnt 信号通路抑制剂主要有分泌卷曲蛋白(sereted frizzled related proteins, Sfrps), dickkopf(DKK), Wnt 蛋白抑制因子-1(Wnt inhibitory factor-1, WIF-1)和 Sclerostin。Sfrps 最初被认为是阻止 Wnt 结合到 Fz 的清除剂,而近期研究提示 Sfrps 可直接结合 Fz 的 CRD 引起受体激活<sup>[11]</sup>。内源性抑制剂如 DKK 家族成员 DKK-1,作为负反馈的一部分,可通过抑制 Wnts 与 LRP5/6 的相互作用拮抗经典通路。

## 二、Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路与 CKD 血管钙化

1. Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路与高磷介导的血管

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81300607);北京市科技计划项目(D131100004713001)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京友谊医院肾内科、首都医科大学肾病学系

通讯作者:刘文虎,电子邮箱:liuwenhu2013@163.com

钙化:高磷血症是CKD,尤其是维持性血液透析(maintenance hemodialysis, MHD)和腹膜透析(peritoneal dialysis, PD)患者最重要的心血管事件预测因子之一<sup>[12]</sup>。体内研究显示,肾衰竭动物模型的高磷血症与VC密切相关<sup>[13]</sup>;体外研究也证实无机磷可以介导VSMCs钙化<sup>[14]</sup>。但高磷介导VC的分子机制目前尚未完全阐明。Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在动脉粥样硬化的发生和发展中发挥重要作用,它也可以通过激活成骨标志的表达而促进VC<sup>[15]</sup>。高磷刺激可使VSMCs丢失原有特征标志物 $\alpha$ -SMA,反而增加成骨指标RUNX2、OPN和ALP的表达。此外,Na-Pi双向转运子PIT1也被发现涉及VC过程<sup>[16]</sup>。在无机磷介导VC的机制中,Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路被证实参与其中<sup>[17]</sup>。

以 $\beta$ -甘油磷酸( $\beta$ -GP)为有机高磷环境培养的大鼠VSMCs钙化模型显示激活的Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径参与VSMCs的钙化和成骨转分化<sup>[18]</sup>;无机磷刺激牛VSMCs钙化模型中,过表达糖原合成酶-3 $\beta$ (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ),可使成骨转分化基因表达下调、钙沉积减轻,表明经典的Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径参与高磷介导的VC的发病过程<sup>[19]</sup>。与之相似,Yao等<sup>[20]</sup>运用针对TOP/FOP-Flash荧光素酶报告系统证明了在高浓度无机磷介导的大鼠VSMCs钙化过程中Wnt/ $\beta$ -catenin通路被激活,同时发现了高磷抑制 $\beta$ -catenin的Ser33/31/Thr41残基位点磷酸化。沉默VSMCs的 $\beta$ -catenin后,细胞的钙沉积以及钙化、成骨标志物表达水平均下降。高磷刺激激活 $\beta$ -catenin后通过结合TCF位点增加了PIT1基因转录和蛋白表达,这些激活效应均可被 $\beta$ -catenin小干扰RNA(siRNA)反转,提示高磷活化PIT1是依赖于Wnt/ $\beta$ -catenin途径的。另有研究发现无机磷还能够诱导人VSMCs的 $\beta$ -catenin活化转位到细胞核内,促进诸如cyclin D1等靶基因表达,进而增加促钙化因子表达,导致VSMCs发生钙化<sup>[21]</sup>。来源于啮齿类动物、牛以及人的VSMCs实验数据证实,Wnt信号通路在高磷介导的血管钙化发病中发挥重要的作用。

基于体外高磷介导VSMCs钙化的研究,以高腺嘌呤低蛋白饮食喂养的尿毒症大鼠模型,影像学证实主动脉钙化形成,免疫组织化学和RT-PCR提示了钙化的主动脉组织的软骨化成骨的标志物表达增加,而成骨表型的标志物成骨相关转录因子,LRP-6和 $\beta$ -catenin表达却降低。细胞与动物层面的研究结

果差异仍需更多关于血管钙化中Wnt/ $\beta$ -catenin作用机制的体内研究来解释。

2. Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路与其他因素所致CKD血管钙化:在慢性肾脏病矿物质和骨异常(chronic kidney disease-mineral and bone disorder, CKD-MBD)过程中,VC的危险因素除了首当其冲的高磷血症,新近研究提示还有许多磷相关或非相关的因素促进了血管钙化。骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)作为重要的成骨分化指标之一,已被研究证实可独立调节VSMCs成骨转分化和VC的形成。CKD相关研究显示BMP2在高磷环境介导的VSMCs钙沉积模型中表达增加,并且CKD患者的血清BMP2水平也高于正常人群<sup>[22]</sup>。进一步研究提示,CKD的炎症状态可通过氧化应激刺激内皮细胞释放BMP2促进VSMCs成骨转分化,尿毒症血清BMP2水平浓度的升高也可直接上调VSMCs的Runx2而促进钙化。近期关于BMP2介导VC的机制研究发现,内源性BMP2增加了VSMCs的 $\beta$ -catenin水平并促进成骨转分化,而沉默 $\beta$ -catenin可反转BMP2引起的VSMCs凋亡和成骨转分化,说明BMP2诱导VSMCs的成骨转分化是通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路激活介导的<sup>[22]</sup>。

### 三、Wnt信号通路的抑制与CKD血管钙化

1. Sclerostin:最近发现了一种新的参与骨-血管轴代谢的蛋白——sclerostin,它是一种糖蛋白(22kDa),由SOST基因产生,出生后只局限于骨细胞、软骨细胞和牙骨质细胞,sclerostin通过拮抗成骨细胞经典Wnt信号通路调节骨量,部分下调骨形成。Sclerostin可被骨细胞分泌后通过骨小管到达骨表面,在骨表面和LRP5/6受体结合,与Sfrps及Wnt信号一起抑制共区域化,减少成骨细胞生成和骨形成,促进成骨细胞凋亡。另外,它被分泌进入血液循环后作为内分泌激素也可抑制Wnt通路减少成骨细胞的分化及功能,它还在血管钙化部位表达,发挥旁分泌作用,可能具有限制血管钙化的作用。动脉是人体内第2大容易发生钙化的部位,Wnt信号参与了血管中层钙化和主动脉瓣钙化,sclerostin也表达于血管钙化部位及血管平滑肌细胞。CKD相关研究显示,肾功能轻度下降时[34ml/(min·1.73m<sup>2</sup>)],sclerostin与VC呈正相关,而多变量分析却是低水平血清sclerostin与VC相关<sup>[23]</sup>。Brandenburg等<sup>[24]</sup>研究67名MHD患者发现血清sclerostin水平和主动脉心瓣膜钙化疾病正相关;最近Pelletier等首次发现了MHD患

者血清 sclerostin 水平与 VC 独立正相关。

CKD 病程中的 sclerostin 水平异常机制仍不明确,有研究显示血清 sclerostin 水平可独立于年龄随 eGFR 下降而进行性增高<sup>[25]</sup>。Sabbagh 等<sup>[26]</sup>发现骨表达 sclerostin 明显升高与肾功能损伤程度密切相关,CKD 早期小鼠的骨 SOSTmRNA 表达就已升高,甚至在血清 PTH 升高之前,而在 CKD 后期表达下降,HD 患者骨细胞 sclerostin 的表达也低于透析前患者。这些数据提示在 CKD 不同阶段, sclerostin 代谢可能不同。然而,由骨分泌入血的 sclerostin,是否与系统性血管钙化激活相关或 sclerostin 局部作用于骨细胞(再吸收激活、基质酸化、成骨细胞分泌)来影响骨释放其他系统性激素如骨钙素来调控血管钙化仍不清楚。除了骨细胞产生的 sclerostin,尚有生物学证据支持局部血管能够产生 sclerostin 并发挥功能。Shao 等<sup>[17]</sup>的研究均发现钙化病理状态下的动脉血管壁表达了 sclerostin,进一步研究显示 sclerostin 确实在 VSMCs 转分化过程中上调,小鼠中层钙化模型中表达也增加。此外,来自 15 例 MHD 患者移植动脉瓣膜的分析显示局部钙化邻近区域 sclerostin 表达升高 sclerostin 可能是动脉钙化过程中局部调节剂,循环与局部 sclerostin 改变对于 VC 的影响仍需进一步的研究明确。

2. DKK-1: DKK-1 是另一种与 LRPR5/6 结合而发挥抑制经典 Wnt 途径的抑制剂,在 CKD-MBD 病程中除了骨细胞的分泌,肾脏也是循环 DKK-1 的重要来源,它对于 VC 的影响更为复杂。体外实验结果表明 DKK-1 可抑制高磷介导的 VSMCs 成骨转分化和钙化<sup>[21]</sup>。然而新近研究的 CKD2 糖尿病小鼠模型提示大量的肾脏来源的 Wnt 抑制剂导致循环 DKK-1 水平明显,给予单克隆抗体中和 DKK-1,可以刺激骨形成,矫正骨质疏松,防止 CKD 的血管钙化。进一步分析显示中和 DKK-1,抑制了主动脉中层成骨转分化指标 Runx2 的表达,增加了  $\alpha$ -SM 平滑肌标志物,恢复 Klotho 表达,中和 DKK-1 降低了血浆 sclerostin,却没有影响升高的 FGF23。磷结合剂恢复了血浆 FGF23 水平但对血管钙化和骨质疏松无影响。于是,研究提出联合 DKK-1 抗体和磷结合剂可全面治疗 CKD-MBD。

DKK-1 抗体对于 VC 的恢复和保护机制可能涉及机制如下:①DKK1 抗体增加了血管局部 Klotho 水平,在内皮细胞水平提供保护 VC 的可能;②DKK1 抗体阻止动脉表达 Runx2 这一重要的成骨转分化指标;

③抗体抑制 CKD2 期小鼠动脉 ALP 的升高,继而降低血管焦磷酸盐,后者对于 CKD 血管钙化抑制。在 CKD-MBD 的骨血管轴中,DKK1 中和也阻止了肾性骨营养不良的进展,一方面可能是直接减小了 DKK-1 抑制骨骼 Wnt 激活,另一方面可能是 DKK-1 中和影响了骨来源的 sclerostin——一种强烈的骨形成抑制剂。研究数据显示,中和 DKK-1 确实减少了循环 sclerostin 水平,与其他研究结果一致。DKK-1 究竟是直接对 VC 发挥作用、是否存在剂量依赖效应以及它与 sclerostin 的相互联系等都还需要进一步研究来明确。

3. 其他通过 Wnt 信号抑制影响 CKD 钙化的因素:在 CKD 的降磷治疗中,某些磷结合剂本身即具有减轻血管钙化的作用,临床研究显示,含镁的磷结合剂对控制血磷是有效的。体外实验研究显示,高浓度镁(2~3mmol/L)可能防止钙化,动物体内研究也提示应用含镁磷结合剂治疗可减轻 VC。然而,治疗研究中所用镁浓度远高于应用含镁结合剂患者血清镁浓度,而且镁影响 VC 的具体机制尚不清楚。除了镁能够破坏羟磷灰石晶体生长,阻断 VSMC 的镁通道可抑制成骨基因表达,细胞外略高浓度镁可以通过下调 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路减少高磷培养环境中 VSMCs 钙化和成骨转分化,当膜上镁转运体(2-APB)被失活后这一作用消失。

其他领域的新研究也逐渐影响着 VC 的防治, Lee 等<sup>[18]</sup>以  $\beta$ -GP 介导大鼠 VSMCs 钙化模型,研究 IL-24 对钙化的作用, Von Kossa 染色和钙含量分析发现  $\beta$ -GP 干预的细胞钙化增加,IL-24 干预能减轻钙化,并以中和抗体确立了 IL-24 作用的特异性。进一步研究其机制发现,  $\beta$ -GP 可促进 Wnt1 和 Wnt7a 表达,下调 GSK-3 $\beta$  磷酸化活性而使胞质  $\beta$ -catenin 聚集,继而转移入核内激活 TCF/LEF 转录,IL-24 可抑制  $\beta$ -GP 对 Wnt/ $\beta$ -catenin 途径的激活,提示 IL-24 对 VSMCs 钙化抑制作用与 Wnt/ $\beta$ -catenin 途径失活相关。

#### 四、展 望

CKD 血管钙化的发病机制众多,上述研究支持了 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的异常激活与 VC 的相关性,然而目前研究对于 Wnt 信号在 CKD 血管钙化中发挥的全面而具体的作用和机制仍不清楚,是否涉及除经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路以外的非经典 Wnt 信号通路、各种 Wnt 抑制剂在局部和循环中水平及意义等方面都还需要进一步研究明确,这些机制将

为CKD血管钙化的预防及其治疗提供新的靶点。

参考文献

- 1 Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R, *et al.* The burden of kidney disease: improving global outcomes [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(4): 1310 - 1314
- 2 Zhang S, Fantozzi I, Tigno DD, *et al.* Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(3): L740 - L754
- 3 Chen NX, O'Neill KD, Chen X, *et al.* Annexin - mediated matrix vesicle calcification in vascular smooth muscle cells [J]. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(11): 1798 - 1805
- 4 Furmanik M, Shanahan C. Er stress in vascular calcification [J]. *Heart*, 2013, 99 (Suppl 2): A101 - 102
- 5 Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of multifaceted disease [J]. *Circulation*, 2008, 117(22): 2938 - 2948
- 6 Zhu D, Mackenzie NC, Millan JL, *et al.* The appearance and modulation of osteocyte marker expression during calcification of vascular smooth muscle cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19595
- 7 Villa - Bellosta R, Wang X, Millan JL, *et al.* Extracellular pyrophosphate metabolism and calcification in vascular smooth muscle [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(1): H61 - H68
- 8 Cheng SL, Shao JS, Behrmann A, *et al.* Dkk1 and Msx2 - Wnt7b signaling reciprocally regulate the endothelial - mesenchymal transition in aortic endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(7): 1679 - 1689
- 9 Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more [J]. *Circ Res*, 2010, 106(12): 1798 - 1806
- 10 Tsaousi A, Mill C, George SJ. The Wnt pathways in vascular disease: lessons from vascular development [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2011, 22(5): 350 - 357
- 11 Schulte G, Bryja V. The Frizzled family of unconventional G - protein - coupled receptors [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28(10): 518 - 525
- 12 Palmer SC, Hayen A, Macaskill P, *et al.* Serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and risks of death and cardiovascular disease in individuals with chronic kidney disease: a systematic review and meta - analysis [J]. *JAMA*, 2011, 305(11): 1119 - 1127
- 13 El - Abbadi MM, Pai AS, Leaf EM, *et al.* Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor - 23, and osteopontin [J]. *Kidney Int*, 2009, 75(12): 1297 - 1307
- 14 Giachelli CM, Jono S, Shioi A, *et al.* Vascular calcification and inorganic phosphate [J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 38(Suppl 1): S34 -

S37

- 15 Shao JS, Aly ZA, Lai CF, *et al.* Vascular Bmp Msx2 Wnt signaling and oxidative stress in arterial calcification [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1117: 40 - 50.
- 16 Lau WL, Festing MH, Giachelli CM. Phosphate and vascular calcification: emerging role of the sodium - dependent phosphate co - transporter PiT - 1 [J]. *Thromb Haemost*, 2010, 104(3): 464 - 470
- 17 Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, *et al.* Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(5): 1210 - 1220
- 18 Lee KM, Kang HA, Park M, *et al.* Interleukin - 24 attenuates  $\beta$  - glycerophosphate - induced calcification of vascular smooth muscle cells by inhibiting apoptosis, the expression of calcification and osteoblastic markers, and the Wnt/ $\beta$  - catenin pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 428(1): 50 - 55
- 19 Shalhoub V, Shatzen E, Henley C, *et al.* Calcification inhibitors and Wnt signaling proteins are implicated in bovine artery smooth muscle cell calcification in the presence of phosphate and vitamin D sterols [J]. *Calcif Tissue Int*, 2006, 79(6): 431 - 442
- 20 Yao L, Sun YT, Sun W, *et al.* High phosphorus level leads to aortic calcification via  $\beta$  - catenin in chronic kidney disease [J]. *Am J Nephrol*, 2015, 41(1): 28 - 36
- 21 Martinez - Moreno JM, Muñoz - Castañeda JR, Herencia C, *et al.* In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate - induced Wnt/ $\beta$  - catenin activation [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(8): F1136 - 1144
- 22 Rong S, Zhao X, Jin X, *et al.* Vascular calcification in chronic kidney disease is induced by bone morphogenetic protein - 2 via a mechanism involving the Wnt/ $\beta$  - catenin pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(6): 2049 - 2060
- 23 Claes KJ, Viaene L, Heye S, *et al.* Sclerostin: Another vascular calcification inhibitor? [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(8): 3221 - 3228
- 24 Brandenburg VM, Kramann R, Koos R, *et al.* Relationship between sclerostin and cardiovascular calcification in hemodialysis patients: a cross - sectional study [J]. *BMC Nephrol*, 2013, 14: 219
- 25 Pelletier S, Dubourg L, Carlier MC, *et al.* The relation between renal function and serum sclerostin in adult patients with CKD [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2013, 8(5): 819 - 823
- 26 Sabbagh Y, Gracioli FG, O'Brien S, *et al.* Repression of osteocyte Wnt/ $\beta$  - catenin signaling is an early event in the progression of renal osteodystrophy [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(8): 1757 - 1772

(收稿日期: 2015 - 06 - 17)

(修回日期: 2015 - 06 - 18)