

• 基础研究 •

SFRP1 通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路促进心肌细胞增殖的分子机制

福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院心内科 (福州 350001) 傅明炜 王热华 林 锋 郭延松

【摘要】 目的 探讨 SFRP1 是否通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路促进心肌细胞增殖。**方法** 选取 c57BL/6 雄性小鼠 18 只, 出生后 1 d、7 d 及 28 d 的 c57BL/6 小鼠各 6 只分为 3 组, 分离和提取心肌组织, 检测心肌组织中 SFRP1 的 mRNA 及蛋白表达水平。利用出生后 1 d 的乳鼠心脏培养小鼠原代心肌细胞, 予 SFRP1-shRNA 慢病毒转染细胞, 免疫荧光检测心肌细胞增殖标志物 Ki67 和 PH3 表达变化, Western blot 检测胞浆 β -catenin 蛋白表达变化。**结果** SFRP1 mRNA 和蛋白水平在小鼠出生后逐渐下降 ($P < 0.05$)。转染 SFRP1-shRNA 慢病毒后, SFRP1 蛋白表达水平均下降 ($P < 0.05$), 其中 shRNA-2 干扰效果最好。与空载组相比, shRNA 组细胞 Ki67 和 PH3 表达下降, 同时胞浆 β -catenin 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。**结论** SFRP1 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路促进心肌细胞增殖。

【关键词】 SFRP1; Wnt/ β -catenin; 心肌细胞; 细胞增殖

【中图分类号】 R541 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2022)06-0117-04

SFRP1 promotes cardiomyocyte proliferation by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway FU Mingwei, WANG Rehua, LIN Feng, GUO Yansong. Department of Cardiology, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China

【Abstract】 Objective To investigate whether SFRP1 promotes cardiomyocyte proliferation by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway. **Methods** Six c57BL/6 mice were selected which were 1/7/28-day old, respectively. The myocardial tissue was isolated and extracted, and the mRNA and protein expression levels of SFRP1 in myocardial tissue were detected. Primary mouse cardiomyocytes were cultured and identified from 1-day old mice. Cells were transfected with SFRP1-shRNA lentivirus. The expression proliferation markers of cardiomyocytes (Ki67, PH3) were detected by immunofluorescence, and the expression levels of β -catenin protein in cytoplasm was detected by WB. **Results** The mRNA and protein expression of SFRP1 decreased gradually after birth ($P < 0.05$). The expression levels of SFRP1 protein was decreased after transferred with SFRP1-shRNA lentivirus, and the interference effect of shRNA-2 was the best. Compared with vector group, the expression of Ki67 and PH3 were decreased in shRNA group, and the expression of β -catenin protein in cytoplasm was increased ($P < 0.01$). **Conclusion** SFRP1 promotes cardiomyocyte proliferation by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway.

【Key words】 SFRP1; Wnt/ β -catenin; cardiomyocyte; cell proliferation

急性心肌梗死是世界范围内发病率和死亡率较高的疾病之一。心肌梗死导致心肌细胞死亡, 随后出现心肌重构, 最终导致心力衰竭, 目前的临床治疗无法扭转心肌细胞数量减少的根本问题^[1]。研究表明, 原有的心肌细胞增殖是内源性心肌再生的主要来源^[2-3], 但心肌细胞增殖的具体分子机制尚不清楚。抑制 Wnt 信号通路, 可促进心肌细胞再生^[4], 内源性 Wnt 信号通路抑制分子可溶性卷曲相关蛋白 1 (SFRP1) 在多种心肌损伤模型中具有保护作用^[5-6], 但 SFRP1 是否与心肌细胞增殖有关, 目前尚不清楚。本研究通过 shRNA 敲低 SFRP1 表达, 探讨 SFRP1 促进心肌细胞增殖的 Wnt/ β -catenin 分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料: 选取 c57BL/6 雄性小鼠 18 只, 由福建医科大学实验动物中心提供 [生产许可证号: SCXK (闽) 2016-0002; 质量合格证号: 20180006018898]。选取出生后 1 d、7 d 及 28 d 的 c57BL/6 小鼠各 6 只, 采用超纯 RNA 提取试剂盒 (CW0581S, CWBIO), SYBR green 试剂盒

(A4004M, Lifeint)。相关的抗体包括: SFRP1 (df10172, Affinity); Ki67 (ab15580, abcam); PH3 (ab32388, abcam); β -catenin (ab32572, Abcam)。

1.2 方法:

1.2.1 新生小鼠心肌细胞原代培养: 刚出生小鼠在 75% 酒精中全身消毒, 无菌条件下迅速取出心脏, 放入预冷的 PBS 中, 去除表面残留的大血管和筋膜, 缓冲液反复漂洗去除残留的血液, 在冠状沟以下剪切靠心尖位置, 剪碎心肌组织至 0.5~1 mm³ 的小块, 将组织块转移至离心管中, 静置, 弃上清。予 0.25% 胰蛋白酶、0.1% II 型胶原酶室温下依次消化, 收集细胞并通过差速贴壁去除成纤维细胞, 以 5×10⁴ 个/cm² 密度培养。

1.2.2 SFRP1 慢病毒干扰: 携带 SFRP1-shRNA 慢病毒及相应的空载慢病毒购自吉凯基因 (GeneChem, 上海), 靶点序列分别是: 1) shRNA-1: 5'-GCTGAGAAGCCAACAGC-TACT-3'; 2) shRNA-2: 5'-GGAAGGCAACTCTGTGCA-TGT-3'; 3) shRNA-3: 5'-GCATTCTCCGGTCATATT-

CT-3'。用 qRT-PCR 和 Western blot 方法验证 SFRP1 的沉默效率。所有检测均在转染 72 h 后进行。

1.2.3 荧光定量 qRT-PCR: 根据超纯 RNA 提取试剂盒说明书, 用 trizol 试剂提取小鼠心肌组织的总 RNA。用 HiScript[®] II 逆转录酶将 mRNA 逆转录成 cDNA, 然后用 SYBR green 试剂盒配制成 20 μ L PCR 反应体系。SFRP1 (forward): CAACGTGGGCTACAAGAAGAT, SFRP1 (reverse): GGCCAGTAGAAGCCGAAGAAC; β -actin (forward): AGGGAAATCGTGCCTGAC, β -actin (reverse): CATACCCAAGAAGGAAGGCT。以 β -actin 作为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算基因 mRNA 的相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测蛋白的表达: 收集心肌组织或细胞, 用 RIPA 提取组织或细胞的总蛋白, 通过 BCA 方法测定样本蛋白浓度。将蛋白加入 10% SDS-PAGE 胶进行电泳, 后采用湿转法将蛋白转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入相应一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日加入二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜后 ECL 发光显影。用 Image J 软件分析处理 Western blot 条带。

1.2.5 免疫荧光: 原代心肌细胞予 4% 多聚甲醛固定后, 予 0.5% Triton X-100 打孔 5 min。5% BSA 固定 30 min 后, 加入一抗 Ki67 (1:200); PH3 (1:100), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日加入荧光二抗 IgG (1:200) 孵育 1 h 后, 予 DAPI 染核 10 min, 加入防荧光淬灭剂封片, 荧光显微镜下拍照。

1.3 统计学分析: 采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多个样本均数两两之间的比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

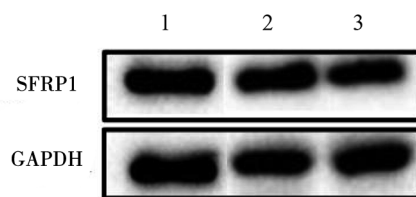
2.1 小鼠出生后 SFRP1 mRNA 及蛋白表达变化: SFRP1 mRNA 和蛋白表达水平在出生后 1 d 组的小鼠心肌组织中表达最高, 在 7 d 组和 28 d 组含量逐渐下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 小鼠出生后 SFRP1 mRNA 和蛋白表达变化

组别	SFRP1	
	mRNA	蛋白
1 d 组	1.00 \pm 0.07	0.97 \pm 0.01
7 d 组	0.54 \pm 0.11 *	0.69 \pm 0.05 *
28 d 组	0.10 \pm 0.02 * #	0.38 \pm 0.07 * #
F 值	101.6	104.8
P 值	0.000	0.000

注: 与 1 d 组相比, * $P < 0.05$; 与 7 d 组相比, # $P < 0.05$ 。

2.2 SFRP1-shRNA 慢病毒转染情况: 正常细胞组与空载组相比, SFRP1 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与空载组相比, 转染 SFRP1-shRNA 慢病毒的细胞 SFRP1 蛋白表达水平均下降 (P 均 < 0.05), 选取干扰效果最好的 shRNA-2 进行后续实验。见表 2、图 2。



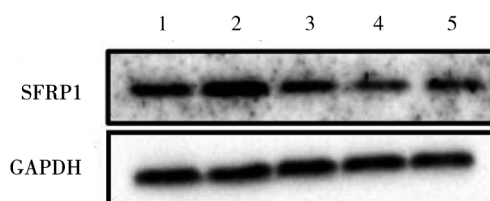
注: 1, 1 d 组; 2, 表示 7 d 组; 3, 表示 28 d 组。

图 1 Western blot 法检测小鼠出生后 SFRP1 蛋白电泳图

表 2 SFRP1-shRNA 慢病毒转染情况

组别	SFRP1
正常细胞组	1.29 \pm 0.07
空载组	1.27 \pm 0.01
shRNA-1	0.66 \pm 0.18 *
shRNA-2	0.37 \pm 0.11 *
shRNA-3	0.48 \pm 0.20 *
F 值	31.64
P 值	0.000

注: 与空载组相比, * $P < 0.05$ 。



注: 1, 正常细胞组; 2, 空载组; 3, shRNA-1 组; 4, shRNA-2 组; 5, shRNA-3 组。

图 2 Western blot 法检测转染 SFRP1-shRNA 慢病毒后 SFRP1 蛋白电泳图

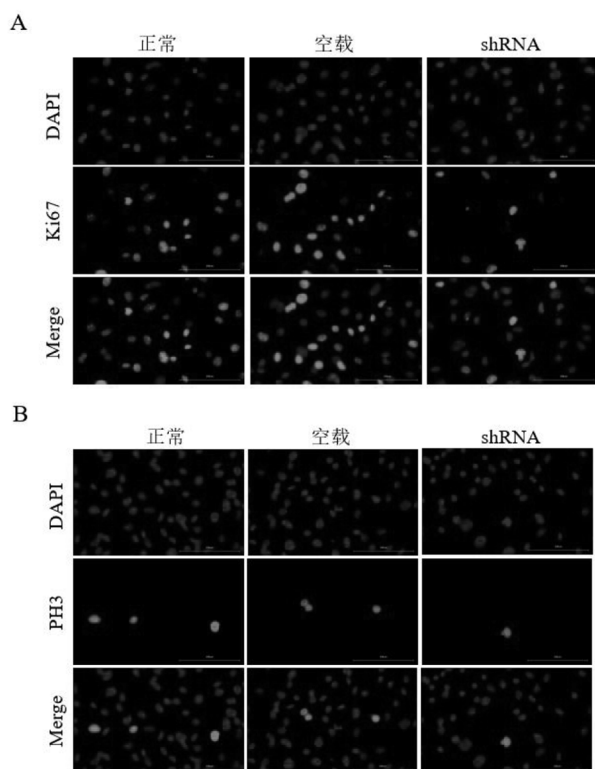
2.3 敲低 SFRP1 后 Ki67 和 PH3 的表达变化: 免疫荧光染色结果示, 与空载组细胞相比, SFRP1-shRNA 组细胞 Ki67 和 PH3 表达降低。见图 3。

2.4 敲低 SFRP1 后 SFRP1 及 β -catenin 的表达变化: 正常细胞组与空载组相比, SFRP1 和 β -catenin 蛋白表达水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与空载组细胞相比, SFRP1-shRNA 组细胞 SFRP1 蛋白表达下降 ($P < 0.05$), β -catenin 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。见表 3、图 4。

表 3 敲低 SFRP1 后 SFRP1 及 β -catenin 的表达变化

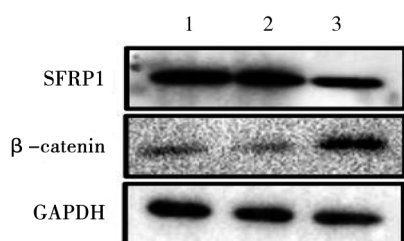
组别	SFRP1	β -catenin
正常细胞组	0.72 \pm 0.11	0.37 \pm 0.12
空载组	0.76 \pm 0.15	0.34 \pm 0.02
shRNA 组	0.11 \pm 0.01 *	0.81 \pm 0.14 *
F 值	35.69	17.73
P 值	0.000	0.003

注: 与空载组相比, * $P < 0.05$ 。



注：A，敲低 SFRP1、Ki67 的变化；B，敲低 SFRP1、PH3 的变化。

图 3 敲低 SFRP1 后 Ki67 和 PH3 的变化免疫荧光图



注：1，正常细胞组；2，空载组；3，shRNA 组。

图 4 Western blot 法检测敲低 SFRP1 及 β-catenin 蛋白电泳图

3 讨论

成年哺乳动物心肌细胞再生能力有限，研究报道成年小鼠心肌细胞离体共培养条件下的增殖比例为 7%，其再生来源主要为原有心肌细胞的增殖^[3]。研究显示哺乳动物心肌细胞的增殖能力在出生后极短时间内迅速降低。小鼠出生后 1~7 d，心肌细胞增殖能力较强，之后迅速下降，28 d 时增殖能力基本丧失^[7]。结合本文，小鼠出生后 SFRP1 mRNA 和蛋白表达水平下降，shRNA 敲低 SFRP1 表达，抑制心肌细胞增殖，同时胞浆 β-catenin 蛋白表达水平上升。提示 SFRP1 通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路促进心肌细胞增殖。

Wnt/β-catenin 信号通路在心脏发育和重构中发挥着非常重要的作用^[6]。既往研究发现作为抗肿瘤药物的多种 Wnt 小分子抑制剂 (Wnt-974、GNF-6231、CGX1321) 可以通过

促进心肌细胞的增殖来改善心肌梗后心肌重塑，但是因为它们具有明显的毒副作用，从而限制了使用^[8-9]。因此，寻找更安全的 Wnt 抑制剂成为心脏再生领域又一个重大课题。

SFRP1 与 Wnt/β-catenin 通路中的卷曲受体具有相似的富含半胱氨酸的结构域，它与循环中的 Wnt 配体竞争结合卷曲受体，使胞浆中 β-catenin 不能进入细胞核内激活 Tcf/Lef 转录因子，使目的基因的表达受到抑制。SFRP1 阻断 Wnt/β-catenin 信号向细胞内的转导，负向调控 Wnt/β-catenin 通路^[6]。研究发现，SFRP1 基因敲除小鼠与正常小鼠相比，心肌纤维化加重，心功能下降，心肌组织中 β-catenin 蛋白表达水平明显上升^[10]。新近有研究报道，在老年小鼠心肌梗死模型中，过表达 SFRP1 可以抑制心肌细胞凋亡，减轻心肌纤维化，改善心功能。同时，心肌组织中 β-catenin 蛋白表达水平明显降低^[5]。我们推测 SFRP1 对心肌梗死的保护作用，可能源于其促进心肌细胞的增殖，但是这些研究并未探讨 SFRP1 与心肌细胞增殖之间的关系，并未检测心肌细胞增殖标志物等。

既往研究报道，过表达 β-catenin 激活 Wnt/β-catenin 信号通路，导致扩张型心肌病的进展^[11]。与野生型小鼠相比，条件性 β-catenin 敲除小鼠在心梗 4 周后，心梗面积显著缩小，存活率明显改善。β-catenin 的敲除抑制 Wnt/β-catenin 信号通路，从而减轻左室重构，改善心功能^[12]。本研究敲低 SFRP1，抑制心肌细胞增殖，同时 β-catenin 的表达上升，提示 SFRP1 通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路促进心肌细胞增殖。

本研究尚存在一些不足：未在动物水平研究 SFRP1 对心肌细胞增殖的作用，后续将采用小鼠心肌梗死模型，通过注射重组 SFRP1 蛋白来进一步证实 SFRP1 促进心肌细胞增殖的作用；探讨 SFRP1 抑制 Wnt 信号通路时，除了检测 β-catenin 蛋白表达水平外，并未检测更多的 Wnt/β-catenin 信号通路下游分子 (如 Dvl-1、Wisp-1) 等的表达变化。

综上所述，SFRP1 通过抑制 Wnt/β-catenin 通路促进心肌细胞增殖，SFRP1 可能成为心脏再生领域一个新的治疗靶点。

参考文献

- [1] Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: the task force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. Eur Heart J, 2018, 39 (11): 119-177.
- [2] Bassat E, Mutlak Y E, Genzelinakh A, et al. The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice [J]. Nature, 2017, 547 (7662): 179-184.
- [3] Wang W E, Li L, Xia X, Fu W, et al. Dedifferentiation, proliferation and redifferentiation of adult mammalian cardiomyocytes after ischemic injury [J]. Circulation, 2017, 136 (9): 834-848.
- [4] Xie, S, Fu, W, Yu, G, et al. Discovering small molecules as Wnt inhibitors that promote heart regeneration and injury re-

- pair [J]. J Mol Cell Biol, 2020, 12 (1): 42-54.
- [5] Tao J, Wei X, Huang Y, et al. Sfrp1 protects against acute myocardial ischemia (AMI) injury in aged mice by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Journal of Cardiothoracic Surgery, 2021, 16 (1): 1-10.
- [6] Gibb N, Lavery D L, Hoppler S. Sfrp1 promotes cardio-myocyte differentiation in xenopus via negative-feedback regulation of Wnt signalling [J]. Development, 2013, 140 (7): 1537-1549.
- [7] Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, et al. Cardiomyocyte regeneration: A consensus statement [J]. Circulation, 2017, 136 (7): 1-7.
- [8] Bastakoty D, Saraswati S, Joshi P, et al. Temporary, systemic inhibition of the Wnt/ β -catenin promotes regenerative cardiac repair following myocardial infarct [J]. Cell Stem Cells Regen Med, 2016, 2 (2): 1-27.
- [9] Moon J, Zhou H, Zhang LS, et al. Blockade to pathological remodeling of infarcted heart tissue using a porcupine antagonist [J]. PNAS, 2017, 114 (7): 1649-1654.
- [10] Sklepiewicz P, Shiomi T, Kaur R, et al. Loss of secreted frizzled-related protein-1 leads to deterioration of cardiac function in mice and plays a role in human cardiomyopathy [J]. Circ Heart Fail, 2015, 8 (2): 362-372.
- [11] Bergmann M W. WNT signaling in adult cardiac hypertrophy and remodeling: lessons learned from cardiac development [J]. Circ Res, 2010, 107 (10): 1198-208.
- [12] Zelarayan L C, Noack C, Sekkali B, et al. Beta-Catenin downregulation attenuates ischemic cardiac remodeling through enhanced resident precursor cell differentiation [J]. PNAS, 2008, 105 (50): 19762-19767.

《福建医药杂志》征订启事

《福建医药杂志》是福建省卫生健康委员会主管、福建省医学会主办、福建省医学科学研究所承办的综合性医药学术期刊，着重报道本省医药卫生科研成果及防治疾病经验，反映其进展与水平，并为各级医药卫生技术人员提供学术交流园地；立足本省、面向全国，深受广大医务人员欢迎。从 1996 年以来相继荣获全国优秀科技期刊三等奖、福建省优秀期刊一等奖及华东地区优秀期刊奖；并成为美国《化学文摘》(CA) 收录期刊，中国学术期刊综合评价数据库来源期刊，中国期刊网、中国学术期刊光盘版入编期刊，万方数据资源系统数字化期刊群入网期刊，中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊。2001 年被国家新闻出版总署、国家科技部评为中国期刊方阵双效期刊。本刊主要栏目有科技创新、政策解读、继续教育、慢性非传染性疾病防控、影像学读片、学科年度进展、国外指南摘译、论著、临床研究、基础研究、综述、调查报告、医院管理、护理园地、基层医生园地等，是各级医药卫生技术人员的良师益友。

本刊为双月刊，国内外公开发行 (CN 35-1071/R, ISSN 1002-2600)，邮发代号 34-6，双月中旬出版。大 16 开本，每册定价 16 元，全年定价 96 元。欢迎广大读者到邮局订阅或直接汇款至本刊编辑部订阅。

通信地址：福建省福州市鼓楼区五四路 7 号《福建医药杂志》编辑部，邮编 350001

电话：0591-87516804；电子邮箱：fjyyzz@aliyun.com

投稿采编平台(官网)网址：www.fjyyzz.cn

微信公众号名称：福建医药杂志；微信号：fujianyiyaozazhi；微信二维码：



《福建医药杂志》编辑部