

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.01.003

文章编号: 1005-8982 (2019) 01-0015-08

蓬乱蛋白 2 干扰和过表达慢病毒载体的构建 及其在 hUVECs 中的表达 *

生欣, 王俊华, 刘月华, 郜双林, 谢夏丹, 范芳

(遵义医学院基础医学院 生物化学教研室, 贵州 遵义 563000)

摘要:目的 获得蓬乱蛋白 2 (DVL2) 基因干扰和过表达慢病毒表达系统, 并在人脐静脉内皮细胞中 (hUVECs) 稳定表达。**方法** ①聚合酶链反应扩增目的基因, 设计合成 shRNA, 以慢病毒表达质粒为基础构建 DVL2 干扰和过表达载体, 酶切电泳、实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 和测序技术鉴定载体构建是否成功; ②以 3 质粒系统在 HEK293T 细胞中包装病毒, 通过荧光显微镜观察计数并计算病毒滴度; 以嘌呤霉素筛选稳定转染的 hUVECs, 通过荧光显微镜观察计数获得转染效率。将感染好的细胞分为 BC 组 (hUVECs 空白对照)、NC 组 (HBLV-GFP-PURO 阴性对照)、干扰组 (pHB-shRNA-HDVL2) 及过表达组 (pHBLV-HDVL2)。③通过 qRT-PCR 与 Western blotting 检测分别从 mRNA 和蛋白表达水平验证目的基因的干扰和过表达水平。**结果** ①插入慢病毒表达载体的基因片段与目的基因的碱基序列完全一致。干扰序列峰形图为单峰, 无突变。②病毒包装后, NC 组、干扰组、过表达组滴度分别为 2×10^8 、 2×10^8 和 1×10^8 TU/ml, 感染人脐静脉内皮细胞的感染效率达 98%。③干扰组 DVL2 的表达较 BC 组降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 过表达组较 BC 组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中干扰效率为 61%, 蛋白质过表达水平为 BC 组的 2.7 倍。**结论** DVL2 基因干扰和过表达慢病毒载体构建成功, 并能够在原代 hUVECs 中稳定表达。

关键词: 蓬乱蛋白 2/Wnt 蛋白质类; 慢病毒载体; 内皮细胞; RNA 干扰; 过表达

中图分类号: R34

文献标识码: A

Construction of lentivirus vector of DVL2 in hUVECs*

Xin Sheng, Jun-hua Wang, Yue-hua Liu, Shuang-lin Gao, Xia-dan Xie, Fang Fan

(Department of Biochemistry, School of Basic Medical Sciences, Zunyi Medical University,
Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: Objective To obtain interference and overexpression of DVL2 through lentivirus, and its expression in hUVECs. **Methods** ShRNAs were designed and synthesized, and DVL2 interference and overexpression vectors were constructed based on lentivirus expression plasmids. PCR and sequencing techniques were utilized to confirm successful construction of vector. Three plasmids system were performed to package the virus in HEK293T cells. Virus titer was measured by fluorescence microscope. HUVECs transfected with virus were identified by Purinemycin. Transfection efficiency was measured by fluorescence microscope. Further, the interference and overexpression of the target gene was verified by qRT-PCR and WB. **Results** Electrophoretic and sequencing results showed that the gene fragment was successfully inserted into the lentivirus vector. The titer of NC, pHB-shRNA-HDVL2 and pHBLV-HDVL2 was 2×10^8 TU/ml, 2×10^8 TU/ml and 1×10^8 TU/ml, respectively. Infection efficiency was 98%. qRT-PCR and Western blotting confirmed stable expression of DVL2. Expression of DVL2 was decreased in interference group and increased significantly when compared with that in NC group ($P < 0.05$). Interference

收稿日期: 2018-05-09

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 31360278); 遵义医学院博士启动基金项目 (No: F566)

efficiency was 60%, and overexpression efficacy was 270% compared with control group. **Conclusions** Interfering and overexpression of DVL2 through lentivirus vector is constructed successfully in HUVECs.

Keywords: dishevelled 2/Wnt proteins; lentivirus vector; endothelial cells; RNA interference; overexpression

蓬乱蛋白 (Dishevelled, DVL) 是一类穿梭于胞质和细胞核的 Wnt 信号通路蛋白, 能够与多种蛋白相互作用, 将 Wnt 信号由膜受体 Frizzled 传递至下游组件^[1]。DVL 最早发现于果蝇体毛和翅毛异常定位表型中, 在进化上高度保守^[2]。目前在人类中已知的 DVL 有 3 个亚型 (DVL1, DVL2 和 DVL3), 均具有 3 个高度保守的结构域, 即 N-端的 DIX 结构域、内部的 PDZ 结构域和 C-端的 DEP 结构域^[3-4]。该蛋白不仅参与细胞的增殖、迁移和凋亡, 而且与胚胎发育、细胞极性、分化及肿瘤发生等过程相关^[5-6]。尽管通过结构域特征能够预测其功能, 但是该蛋白在不同组织和细胞中确切的生物学功能还不清楚^[7]。

近年来, 大量研究显示 Wnt 信号通路参与动脉粥样硬化的发生^[8-9]。Wnt5 α 能够通过经典 Wnt 信号通路引发内皮细胞炎症反应^[10-11], 且该通路过度激活能够导致平滑肌细胞增殖和血管内膜增厚^[12-13], 但有关 DVL 在该过程中的作用还未见报道。本课题组在动脉粥样硬化的体内外模型中观察到 DVL2 的异常表达, 然而, 其具体的作用机制还不清楚。相比常规的逆转录病毒和腺病毒表达系统, 慢病毒表达系统能够将病毒基因组整合到宿主基因组, 从而实现长时间稳定表达, 且具有能够感染非分裂期细胞、产生免疫反应小、可插入大片段外源基因等优点, 成为导入外源基因的有利工具, 并被广泛应用于各种细胞系、原代细胞和干细胞的基因过表达、RNA 干扰、microRNA 研究, 以及基因缺陷型动物模型复制等研究中^[14]。因此, 本研究拟构建 DVL2 的慢病毒干扰和过表达载体, 建立人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 的稳定表达株, 并在体外研究其对 DVL2 基因表达的影响, 以期为进一步探索 DVL2 在动脉粥样硬化发生早期的作用及其蛋白互作关系奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的慢病毒系统 pHBLV-CMV-MCS-3flag-EF1-ZsGreen-puro、pHB-U6-CMV-MCS-PGK-ZsGreen-puro、感受态 DH5 α 细胞均由遵义医学院基础医学院生物化学教研室保存, HUVECs、HEK 293T 细胞株和含有生长因子的内皮细胞专用培养基购自美

国典型培养物保藏中心 (ATCC), pSPAX2、pMD2G (美国 Addgene 公司), 转染试剂 Lipofectamine 2000、DMSO、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *BamH* I、T4 连接酶、质粒提取与纯化试剂盒 PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit、DNA Polymerase、DNA ladder、蛋白 Marker (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 载体回收试剂盒 MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (日本 TaKaRa 公司), 凝胶回收试剂盒、BCA 定量试剂盒 (北京天根生化科技有限公司), PCR 引物、琼脂糖、琼脂粉 (上海生工生物工程股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 h-DVL2CDS 区域的扩增 提取 HUVECs 细胞基因组 DNA, 设计正向引物 h-DVL2-Eco/Eco-F (5'-GGATCTATTTCGGTGAATTCGCCACCATGCGGGTAGCAGCACTG-3') 和反向引物 h-DVL2-Eco/Eco-R (5'-TCTAGAACTAGTCTCGAGCATAACATCCACAAAGAACTCGCT-3')。以基因组 DNA 为模板扩增合成目的基因 h-DVL2 的 CDS 区域, 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 20 s, 55℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 150 s, 共 27 个循环, 72℃ 继续延伸 10 min; PCR 产物电泳回收纯化, 测序分析。

1.2.2 干扰靶点设计和引物合成 以人 DVL2 基因的 mRNA 序列 (GeneBank Accession No.NM_004422.2) 根据 shRNA 设计原则设计 shRNA 靶序列和对照病毒载体 (见表 1、2)。合成引物, 分别稀释至 100 μ mol, 引物退火 (95℃ 10 min, 75℃ 10 min, 55℃ 10 min, 35℃ 10 min, 15℃ 10 min) 形成带黏性末端的双链片段, 退火处理后得到 shRNA 模板用于连接反应。

1.2.3 过表达和干扰表达载体的构建 分别用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切目的基因和慢病毒载体, 将目的基因与线性化慢病毒过表达载体 pHBLV-CMV-MCS-3flag-EF1-ZsGreen-puro 连接, 插入 MCS 区, 获得重组过表达质粒 pHBLV-HDVL2。将 shRNA 模板与线性化的慢病毒干扰载体 pHB-U6-CMV-MCS-PGK-ZsGreen-puro 连接, 插入 U6 启动子后, 获得重组干扰质粒 pHB-shRNA-HDVL2。分别转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 通过菌液 PCR 鉴定, 将阳性克隆菌液测序分析。

1.2.4 重组表达 h-DVL2 慢病毒在 HEK293T 细胞

表 1 靶向 DVL2 基因的 shRNA 寡核苷酸单链

引物名称	引物序列	长度 /bp
shRNA	正向: 5'-GATCCGAAATGAGCCCATCCAGCCAATTGATTCAAGAGATCAATTGGCTGGATGGGCTCATTCTTTTTC-3'	71
	反向: 5'-AATTGAAAAAAGAAATGAGCCCATCCAGCCAATTGATCTCTTGAATCAATTGGCTGGATGGGCTCATTTTCG-3'	71

表 2 对照病毒载体 siRNA 寡核苷酸单链

引物名称	引物序列	长度 /bp
siRNA	正向: 5'-GATCCGTTCTCCGAACGTGTCACGTAATTCAGAGA-3'	36
	反向: 5'-AATTGAAAAAATCTCCGAACGTGTCACGTAATCTCTTGAATTACGTGACACGTTCCGAGAACG-3'	64

中的包装和转染 采用 3 质粒系统进行病毒包装, 包括慢病毒穿梭质粒, 即已经制备的重组慢病毒质粒 pHBLV-HDVL2/pHB-shRNA-HDVL2, 2 种辅助包装原件质粒, 即 pSPAX2 和 pMD2G。采用高纯度无内毒素抽提 3 种质粒载体, 浓度达到 1 μg/μl, A260/280 在 1.7 ~ 1.8 用于病毒包装。以 Lipofectamine 2000 脂质体同时将 3 质粒系统转染 HEK293T 细胞, 转染后 6 h 更换含 10% FBS 的新鲜完全培养基。在 48 h 时, 收集 1 次培养基, 补入新鲜完全培养基后继续培养, 在 72 h 收集所有培养基, 离心去除细胞碎片, 收集病毒原液于超速离心管中, 4℃、22 006 r/min 离心 120 min, 分装病毒超离液, 置入 -80℃冰箱冷冻保存。

1.2.5 病毒滴度测定 HEK293T 细胞以 1×10⁵ 个/ml 的密度种 96 孔板, 100 μl/孔, 每个病毒准备 6 孔, 37℃, 5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱中培养过夜。将 10 μl 病毒液做 3 倍梯度稀释, 共 6 个稀释度, 分别加到对应的孔中, 并追加培养基至 100 μl; 48 h 后, 换液为 100 μl 含 1.5 μg/ml 嘌呤霉素的完全培养基; 24 h 后, 换完全培养基继续培养 6 h, 活细胞工作站观察荧光, 荧光百分比在 10% ~ 30% 的孔计算病毒滴度; 滴度 (TU/ml) = 细胞数 × 荧光百分比 × MOI × 病毒稀释倍数 × 10³。

1.2.6 慢病毒感染 hUVECs 以 1×10⁵ 个/ml 的密度接种 hUVECs 到 6 孔板, 细胞融合度在 50% ~ 70% 更换含有聚凝胺 (终浓度为 6 μg/ml) 的适应性培养基, 根据病毒滴度和细胞量加入相应体积的病毒原液; 感染后 24 h, 换无病毒的适应性培养基, 37℃继续培养 24 h 后, 活细胞工作站观察, 绝大部分细胞感染病毒以后, 利用嘌呤霉素抗性筛选掉未感染病毒的细胞; 换嘌呤霉素浓度为 8 μg/ml 的适应性培养基, 37℃培养 1 周, 直至没有感染病毒的细胞被嘌呤霉素杀光, 将嘌呤霉素浓度降低到 4 μg/ml 继续培养 1 周, 使细胞慢病毒感染稳定传代; 由于感染效率高, 稳定性好,

故不需要进行挑取单克隆操作, 将细胞扩大培养后即可正常使用。将感染好的细胞分为 BC 组 (hUVECs 空白对照)、NC 组 (HBLV-GFP-PURO 阴性对照)、干扰组 (pHB-shRNA-HDVL2) 及过表达组 (pHBLV-HDVL2)。

1.2.7 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 mRNA 相对表达量 参照试剂盒说明书, 分别以 RNAiso Plus 提取总 RNA, 以 Prime Script™ RT Master Mix 进行逆转录, 逆转录条件为: 37℃预反应 15 min; 85℃扩增 5 s。引物序列见表 3。参照 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒说明书, 进行 qRT-PCR 反应, 反应条件为: 95℃预变性 30 s; 95℃变性 5 s, 60℃退火 30 s。共 40 个循环。数据以 2^{-ΔΔCt} 进行计算。

表 3 qRT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列	长度 /bp	Tm 值 /℃
DVL2	正向: 5'-GCCTATCCAGGTTCTCTCTC-3'	20	57.53
	反向: 5'-AGAGCCAGTCAACCACATCC-3'	20	57.48
GAPDH	正向: 5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3'	20	55.19
	反向: 5'-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3'	18	55.58

1.2.8 Western blotting 检测蛋白的相对表达量 细胞消化裂解, 提取蛋白, 以 BCA 法进行蛋白定量, 以 5×蛋白 Loading buffer 按 4 : 1 充分混合, 100℃煮沸 10 min 变性蛋白。每孔按 BC 组、NC 组、干扰组、过表达组顺序各上 25 μg 蛋白样品溶液。80 V 恒压电泳, 200 mA 电转 120 min; 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 1×TBST, 清洗 6 次, 每次 5 min; 分别以兔抗人 DVL2 (1 : 1 000) 和小鼠抗人 GAPDH 一抗 (1 : 10 000) 4℃, 过夜孵育, 1×TBST 清洗; 分别以山羊抗兔和兔抗小鼠二抗 (1 : 3 000), 室温孵育 2 h, 1×TBST 清洗;

以 Chemi Doc™ touch imaging System (BIO-RAD) 检测蛋白条带 ECL 化学发光显色, 以 ImageLab 软件检测蛋白条带灰度值, 目的蛋白的相对含量 = 目的条带灰度值 / 对应 GAPDH 灰度值。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本比较采用单因素方差分析, 其两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。每组实验均重复 3 次, 每个样本每次检测做 3 个复孔。

2 结果

2.1 pHBLV-HDVL2 过表达慢病毒载体鉴定结果

将转化后的阳性克隆菌液进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可见整齐均一的条带 (见图 1A~

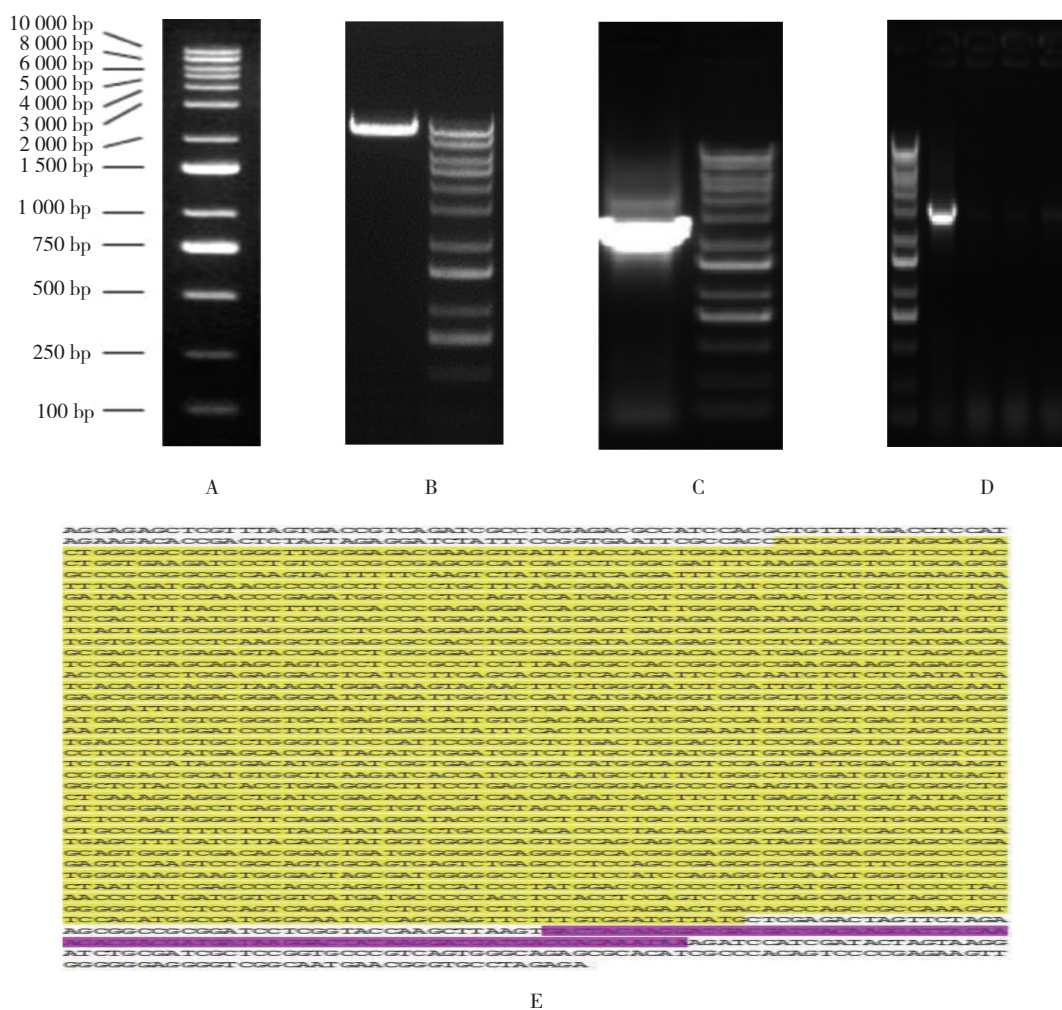
D), 对照 DNA Marker 进一步确定阳性克隆, 菌液送检进行测序鉴定, 结果显示插入序列与构建的目的片段碱基序列完全一致 (见图 1E), 质粒构建成功。

2.2 h-DVL2 shRNA 慢病毒载体鉴定结果

将构建的腺病毒干扰载体 pHB-shRNA-HDVL2 酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 (见图 2A、B), 胶回收。将重组的阳性克隆进行 PCR 扩增, 得单一产物, 将产物进行测序, 测序结果见图 2C。测序峰图 (见图 2D) 显示在测序结果的发夹结构中, 干扰序列正确。其干扰序列峰形图均为单峰, 无突变 pHB-shRNA-HDVL2 构建成功。

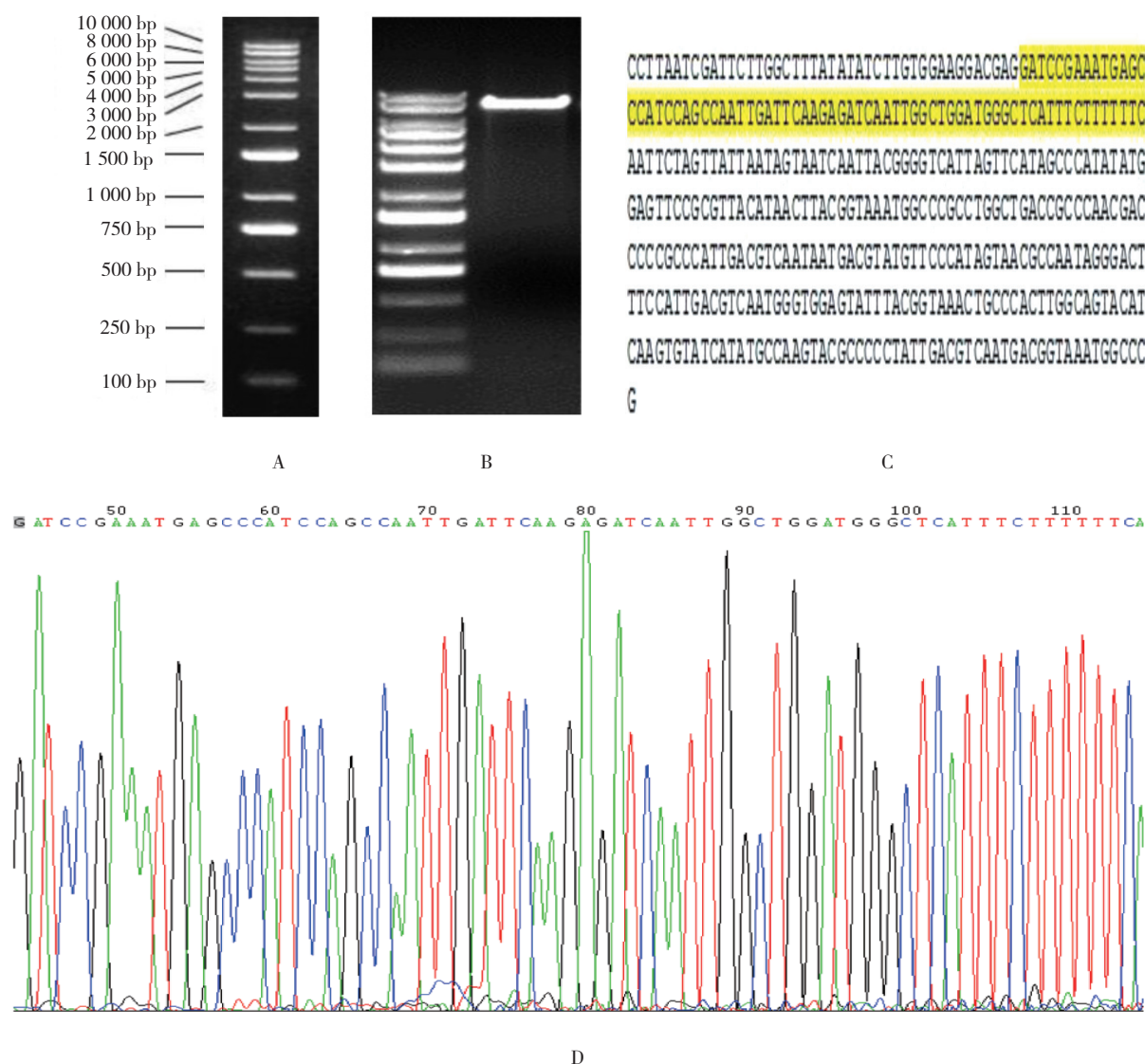
2.3 慢病毒载体的包装及滴度测定结果

慢病毒载体转染 HEK293T 细胞后, 荧光百分比在 10% ~ 30% 的孔计算病毒滴度 (见图 3), NC 组、干扰组、过表达组滴度分别为 2×10^8 、 2×10^8 和 1×10^8 TU/ml。



A: DNA Marker; B: 载体线性化电泳; C: PCR 扩增的 h-DVL2 序列; D: pHBLV-HDVL2 质粒; E: 测序结果 (黄色区域部分为目的序列, 紫色区域为 3 × flag 序列)

图 1 pHBLV-HDVL2 过表达载体的构建和测序结果



A: DNA Marker; B: 载体酶切电泳图; C: pHB-shRNA-HDVL2 干扰表达载体测序结果 (黄色区域部分为目的序列); D: pHB-shRNA-HDVL2 测序峰图

图 2 pHB-shRNA-HDVL2 shRNA 干扰表达载体的构建和测序结果

2.4 慢病毒感染 hUVECs 的感染率

慢病毒感染 hUVECs 后, 利用 puro+ 抗性基因, 加 puromycin 筛选掉未感染细胞。通过 Image J 分析得感染率 >98% (感染率 = 带荧光细胞数 / 细胞总数) (见图 4)。

2.5 DVL2 mRNA 和蛋白相对表达量比较

各组 DVL2 mRNA 相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较显示, NC 组中 DVL2 mRNA 相对表达量与 BC 组比较, 差异无统计学意义 ($t = 1.910$, $P = 0.129$); 干扰组 DVL2 mRNA 相对表达量较 BC 组降低 ($t = 28.369$, $P =$

0.000), 沉默效率为 67%; 过表达组中 DVL2 mRNA 相对表达量增加 ($t = -5.641$, $P = 0.005$), 过表达水平为 NC 组的 5.6 倍。

各组 DVL2 蛋白表达比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); BC 和 NC 组中可见 DVL2 条带较细, 而过表达组较粗。进一步两两比较显示, NC 组中 DVL2 蛋白表达较 BC 组差异无统计学意义 ($t = 0.031$, $P = 0.977$); 干扰组 DVL2 灰度较 BC 组降低 ($t = 37.025$, $P = 0.000$), 干扰效率为 61%; 过表达组中 DVL2 蛋白表达增加 ($t = -13.004$, $P = 0.000$), 表达水平为 BC 组的 2.7 倍。见图 5 和表 4。

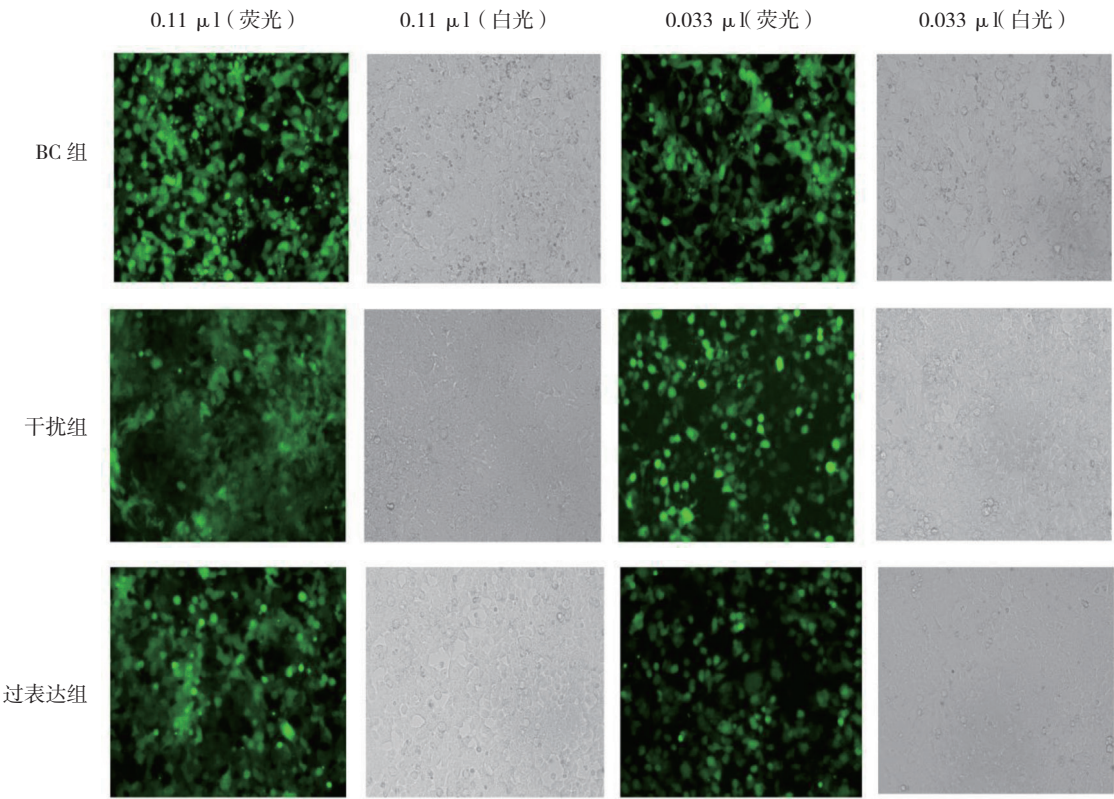


图 3 慢病毒滴度测定图 (×100)

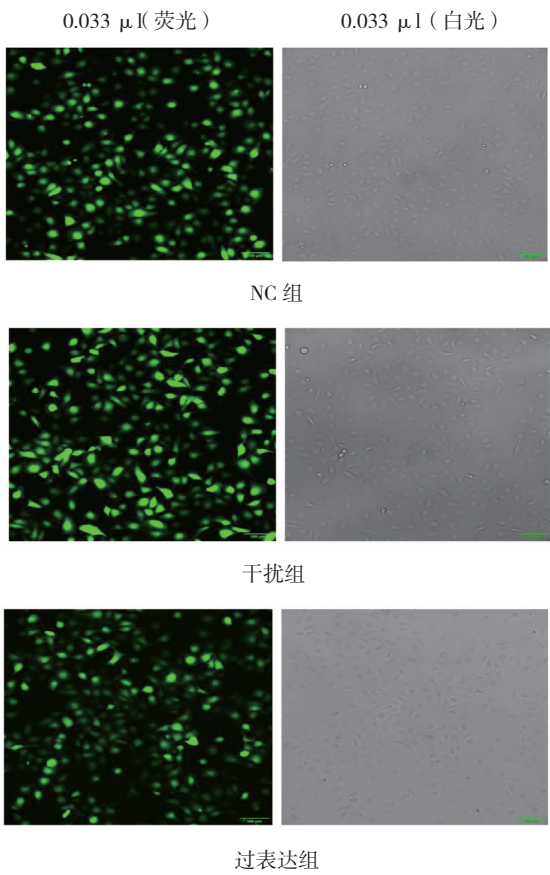
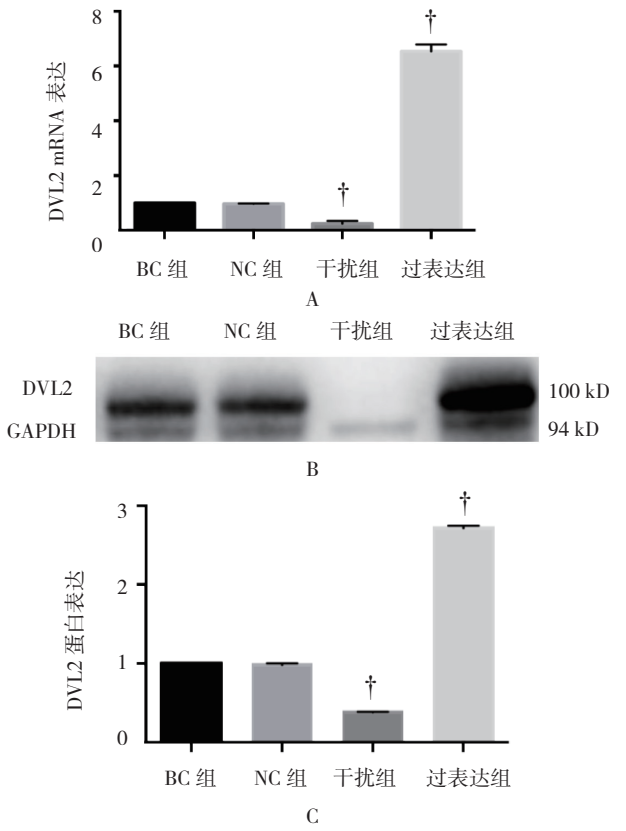


图 4 慢病毒感染 HUVECs 荧光鉴定图 (×100)



A: DVL2 mRNA 的相对表达量; B: DVL2 蛋白的表达; C: DVL2 蛋白表达水平。† 与 BC 组比较, $P<0.05$

图 5 各组 DVL2 mRNA 和蛋白表达比较

表 4 DVL2 mRNA 和蛋白表达比较
($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	DVL2 mRNA	DVL2 蛋白
BC 组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
NC 组	0.930 ± 0.005	0.987 ± 0.009
干扰组	0.301 ± 0.006 [†]	0.380 ± 0.004 [†]
过表达组	5.684 ± 0.043 [†]	2.726 ± 0.023 [†]
F 值	35.767	222.458
P 值	0.000	0.000

注: † 与 BC 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

本研究首先构建 DVL2 过表达和干扰慢病毒表达载体 pHBLV-HDVL2 和 pHB-shRNA-HDVL2, 即穿梭质粒, 酶切和测序结果显示质粒构建成功。进一步采用 3 质粒系统, 将表达载体和包装质粒 pSPAX2 和 pMD2G 共转染至 HEK293T 细胞中, 进行病毒包装形成具有感染能力的慢病毒颗粒。由于表达载体携带有 ZsGreen 绿色荧光蛋白基因, 较常规的 EGFP 荧光更为稳定, 通过荧光显微镜观察能够获得病毒包装的滴度和转染效率。原代细胞为较难转染的细胞, 本研究通过慢病毒表达系统, 能够将携带 DVL2 的过表达和干扰 shRNA 序列整合到原代 hUVECs 基因组中, 并通过 puromycin 筛选出稳定表达的细胞株, 获得较高的转染效率 (>98%)。与 BC 组比较, 过表达组的 DVL2 表达增加, 而干扰组的 DVL2 表达水平下调。可见, 本研究成功获得了 DVL2 的干扰和过表达慢病毒载体, 并能够在原代 hUVECs 细胞中稳定表达。

Wnt 信号通路是由分泌型糖蛋白 Wnt 激活的一系列信号通路, 包括经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路, 非经典的 Wnt/PCP 信号通路和 Wnt/ Ca^{2+} 信号通路^[15]。Wnt 信号通路与动脉粥样硬化密切相关。在临床报道中^[16], 经典 Wnt 信号通路受体低密度受体脂蛋白相关蛋白 6 (LRP6) 基因突变患者伴随动脉粥样硬化的风险更高, 而 LDLR^{-/-} 小鼠模型已经成为研究动脉粥样硬化的模式动物。经典 Wnt 信号通路配体 Wnt 5 α ^[17], 下游蛋白 β -catenin^[18] 及其通路抑制剂 DKK-1^[19] 均参与动脉粥样硬化的发生和动脉粥样斑块的维持。因此 Wnt/LRP6/ β -catenin 信号通路活性的改变已经成为动脉粥样硬化斑块形成的一大原因。而有报道显示, 非经典 Wnt/PCP 信号通路同样也与动脉粥样硬化

相关, 其下游 RoA/ROCK 也参与动脉粥样硬化早期的内皮细胞功能损伤和后期的斑块形成和破裂^[20]。DVL 作为 Wnt 信号通路的关键蛋白, 同时参与多条 Wnt 信号通路, 是一个关键的枢纽分子^[1]。在不同的 Wnt 信号通路中分别与不同的蛋白相互作用调控不同细胞活动。尽管 Wnt 信号通路与动脉粥样硬化的关系已经得到广泛的认可^[21-22], 然而, 有关 DVL 在动脉粥样硬化过程中的作用机制还清楚, 只有少量研究显示 DKK 通过激活 DVL1 参与血管内皮细胞迁移^[23-24], 也有研究猜测 DVL 可能通过 Wnt/PCP 信号通路改变血管内皮细胞的平面极性^[25]。然而, DVL 在动脉粥样硬化过程中通过与哪一些蛋白质结合, 以及通过哪一条 Wnt 信号通路调控内皮细胞功能, 并进一步参与动脉粥样硬化的发生还不清楚。此外, 相比 DVL1 和 DVL3, DVL2 的功能研究还较为缺乏, 因此, 成功构建 DVL2 干扰和过表达载体对于深入研究 DVL2 在动脉粥样硬化发生过程中的作用及其所涉及的 Wnt 通路蛋白具有重要的意义。

参 考 文 献:

[1] GAO C, CHEN Y G. Dishevelled: The hub of Wnt signaling[J]. Cellular Signalling, 2010, 22(5): 717-727.

[2] FAHMY O G, FAHMY M J. Differential gene response to mutagens in drosophila melanogaster[J]. Genetics, 1959, 44(6): 1149-1171.

[3] 但琼洁, 刘奕彤, 吴嘉伟, 等. Dvl2-DIX 结构域的 Site III 相关突变体结晶及其与 Ccd1-DIX 的共结晶 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(7): 59-66.

[4] GAMMONS M V, RENKO M, JOHNSON C M, et al. Wnt signalosome assembly by DEP domain swapping of Dishevelled[J]. Molecular Cell, 2016, 64(1): 92-104.

[5] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169(6): 985-999.

[6] WALLINGFORD J B, HABAS R. The developmental biology of dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity[J]. Development, 2005, 132(20): 4421-4436.

[7] MLODZIK M. The dishevelled protein family: still rather a mystery afterover 20 years of molecular studies[J]. Current Topics in Developmental Biology, 2016, 117: 75-91.

[8] MARINOU K, CHRISTODOULIDES C, ANTONIADES C, et al. Wnt signaling in cardiovascular physiology[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2012, 23(12): 628-636.

[9] PEREIRA C P, BACHLI E B, SCHOEDON G. The Wnt pathway: a macrophage effector molecule that triggers inflammation[J]. Current Atherosclerosis Reports, 2009, 11(3): 236-242.

[10] HOGAN N T, WHALEN M B, STOLZE L K, et al. Transcriptional networks specifying homeostatic and inflammatory programs of gene expression in human aortic endothelial cells[J]. Elife, 2017(6): e22536.

- [11] KREUGER J, PHILLIPSON M. Targeting vascular and leukocyte communication in angiogenesis, inflammation and fibrosis[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2016, 15(2): 125.
- [12] DIRENZO D M, CHAUDHARY M A, SHI X, et al. A crosstalk between TGF- β /Smad3 and Wnt/ β -catenin pathways promotes vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Cellular Signalling*, 2016, 28(5): 498-505.
- [13] TAKAHASHI J, ORCHOLSKI M, YUAN K, et al. PDGF-dependent β -catenin activation is associated with abnormal pulmonary artery smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension[J]. *FEBS Letters*, 2016, 590(1): 101-109.
- [14] DULL T, ZUFFEREY R, KELLY M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(11): 8463-8471.
- [15] BLANKETEIJN W M, HERMANS KCM. Wnt signaling in atherosclerosis[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2015, 763(Pt A): 122-130.
- [16] GO G. Low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) is a novel nutritional therapeutic target for hyperlipidemia, non-alcoholic fatty liver disease, and atherosclerosis[J]. *Nutrient*, 2015, 7(6): 4453-4464.
- [17] 张友明, 朱红涛. Wnt 信号通路与心血管疾病的研究进展 [J]. *国际心血管病杂志*, 2016, 43(5): 269-272.
- [18] 马守原, 姚树桐, 朱平, 等. Wnt/ β -catenin 通路在动脉粥样硬化发生发展中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(3): 564-568.
- [19] 丰凯成, 胡为民. DKK-1、GDF-15 与动脉粥样硬化的相关性研究进展 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(4): 378-382.
- [20] 张璐. Rho/Rock 信号通路对动脉粥样硬化脂质代谢的影响及调脂通脉颗粒干预机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [21] MATTHIJS B W, HERMANS K C. Wnt signaling in atherosclerosis[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2015, 763(Pt A): 122.
- [22] PAHNKE A, CONANT G, HUYER L D, et al. The role of Wnt regulation in heart development, cardiac repair and disease: A tissue engineering perspective[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2016, 473(3): 698-703.
- [23] YU B, KIECHL S, QI D, et al. A Cytokine-like protein DKK3 is atheroprotective[J]. *Circulation*, 2017, 136(11): 1022.
- [24] GUILLABERTGOURGUES A, JASPARDVINASSA B, BATS M L, et al. Kif26b controls endothelial cell polarity through the dishevelled/daam1-dependent planar cell polarity-signaling pathway[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2016, 27(6): 941-953.
- [25] DEJANA E, HIRSCHI K K, SIMONS M. The molecular basis of endothelial cell plasticity[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14361.

(王荣兵 编辑)