

网络出版时间:2024-05-06 14:29:36 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240429.1132.010

过表达 sFRP3 对小鼠原代心肌成纤维细胞活化增殖的影响

江舜祥¹, 涂彬¹, 宋凯¹, 何缓缓¹, 陶辉², 曹炜¹

摘要 目的 探讨 Wnt 信号通路调控剂分泌型卷曲相关蛋白 3 (sFRP3) 在小鼠心肌成纤维细胞 (CFs) 活化增殖中的作用。方法 购入 1~3 d 的小鼠乳鼠, 行手术对心脏取材, 消化后分离 CFs 进行培养。细胞贴壁生长后使用转化生长因子 (TGF- β 1) 刺激构建 CFs 活化增殖模型; 确认模型构建成功后分别向实验组和对照组细胞转染 sFRP3 过表达质粒和空载质粒 24~48 h。通过 Western blot、qRT-PCR 的方法在分子层面对 sFRP3、Periostin (POSTN)、I 型胶原 (Collagen I) 和增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达进行检测; 使用 MTT 法、CCK-8 法和 EdU 染色法检测细胞增殖能力的改变。结果 在 TGF- β 1 刺激构建的 CFs 活化增殖模型中, 相较于对照

组, 模型组 sFRP3 蛋白及 mRNA 表达下降, 活化增殖相关蛋白 PCNA、POSTN 和 Collagen I 表达上调。另外, 在质粒转染 sFRP3 过表达组的 CFs 中, PCNA、POSTN 和 Collagen I 蛋白及 mRNA 表达相较于空载组下降。MTT、CCK-8 与 EdU 实验表明, 质粒转染 sFRP3 过表达组的 CFs 增殖活性较空载组明显下降。结论 过表达 sFRP3 明显抑制 CFs 活化增殖, 提示 sFRP3 可能是参与调控 CFs 活化增殖的关键基因。

关键词 sFRP3; 心肌成纤维细胞; 心肌纤维化; 活化; 增殖

中图分类号 R 331.3; R 322.1; R 361

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)05-0809-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.010

2024-02-20 接收

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划项目 (编号: 202104j0702-0037); 安徽省高校优秀青年科研项目 (编号: 2023AH-030116); 安徽高校自然科学研究项目 (编号: KJ2021A0313)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院胸外科, 合肥 230601

² 安徽医科大学第二附属医院麻醉与围手术期医学科, 合肥 230601

作者简介: 江舜祥, 男, 硕士研究生;

曹炜, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 13514964858@qq.com

心肌纤维化是一种慢性间质性心脏病, 它几乎发生在所有形式的心脏病终末期, 同时它也是各类心血管疾病的共同病理生理过程的一种^[1]; 过度的心肌纤维化可引起心肌收缩力改变等一系列心脏功能改变^[2]。心肌纤维化主要是以心肌成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFs) 的过度增殖及细胞外基质的过度累积作为病理学特征^[3-4]; CFs 作为这一过程的靶细胞, 其活化增殖过程一直是近些年来深入研究心肌纤维化过程中的重点^[5]。

group, the expression of miR-20a-5p, the levels of IL-1 β and IL-6, OD₄₅₀ value, EdU positive cell rate, scratch healing rate, and the expression of CyclinD1 and MMP-9 proteins in the TNF- α group increased, the expression of TIMP2 protein decreased ($P < 0.05$); compared with the TNF- α group, the expression of miR-20a-5p, the levels of IL-1 β and IL-6, OD₄₅₀ value, EdU positive cell rate, scratch healing rate, and CyclinD1 and MMP-9 proteins expression decreased, the expression of TIMP2 protein increased in salidroside group ($P < 0.05$); compared with the TNF- α group and inhibitor NC group, the expression of miR-20a-5p, the levels of IL-1 β and IL-6, OD₄₅₀ value, EdU positive cell rate, scratch healing rate, and the expression of CyclinD1 and MMP-9 proteins in the miR-20a-5p inhibitor group decreased, the expression of TIMP2 protein increased ($P < 0.05$); compared with the salidroside group and the salidroside + mimic NC group, the expression of miR-20a-5p, the levels of IL-1 β and IL-6, OD₄₅₀ value, EdU positive cell rate, scratch healing rate, and the expression of CyclinD1 and MMP-9 proteins in the salidroside + miR-20a-5p mimic group increased, the expression of TIMP2 protein decreased ($P < 0.05$). There was a targeted regulatory relationship between miR-20a-5p and TIMP2. **Conclusion** Salidroside may inhibit TNF- α -induced HFLS-RA cell proliferation, migration and inflammatory response by regulating miR-20a-5p/TIMP2.

Key words salidroside; miR-20a-5p; tissue inhibitor of metalloproteinase-2; rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocyte; proliferation; migration

Wnt 信号转导通路是近年来被证实的与心肌纤维化和 CFs 活化增殖密切相关的通路之一^[6], Wnt 蛋白则是影响细胞增殖及表型转化的重要信号分子^[7];而作为在分子结构上与 Wnt 蛋白胞膜受体有着相类似结构域的分泌型卷曲相关蛋白 3 (secreted frizzled-related protein 3, sFRP3), 常被视为 Wnt 信号通路的调控剂^[8]。有研究^[9]表明, sFRP3 可以通过拮抗 Wnt 信号通路对部分肿瘤细胞的增殖迁移产生影响, 然而未见有关 sFRP3 是否影响 CFs 活化增殖过程的研究。该研究应用转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 刺激构建 CFs 活化增殖模型, 过表达 sFRP3 质粒转染 CFs 后, 检测模型分子水平及细胞增殖功能发生的变化, 探究 sFRP3 在 CFs 活化增殖中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 从安徽医科大学实验动物中心购入 50 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠乳鼠 (雄性, 1 ~ 3 d, 1.8 ~ 3.0 g), 用以完成 CFs 的提取分离及培养。

1.1.2 实验试剂 II 型胶原酶购自上海麦克林公司; 胎牛血清、DMEM 高糖培养基购自美国 Gibco 公司; 胰蛋白酶购自加拿大 WISENT 公司; TGF- β 1 购自美国 Peprotech 公司; TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录和 RT-qPCR 试剂盒购自长沙艾克瑞公司; 蛋白酶抑制剂 PMSF、细胞裂解液 RIPA、蛋白浓度测定 BCA 试剂盒均购自上海碧云天公司; MTT 试剂盒、CCK-8 试剂盒均购自合肥白鲨公司; EdU 细胞增殖检测试剂盒购自广州锐博公司; β -actin (66009-1-Ig)、sFRP3 (67081-1-Ig)、POSTN (66491-1-Ig)、I 型胶原 (Collagen I) (66761-1-Ig)、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) (10205-2-AP) 一抗抗体均购自武汉 Proteintech 公司; 兔源及鼠源二抗均购自美国 Abcam 公司; 相关 qPCR 引物由上海生工合成提供 (表 1)。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列 (5'-3')
sFRP3	F: TGCGAGCCCATCTCTCATCAA
	R: TCCATAGGAAATCCGCTCCG'
PCNA	F: CCTGTGCAAAGAATGGGGTG
	R: TCTCTATGGTTACCGCCTCC
POSTN	F: GAAGTGATCCACGGAGAGCC'
	R: CCTCCTGTGGAAATCCTGCT
Collagen I	F: CGATGGATTCCCGTTTCGAGT
	R: GAGGCCTCGCTGGACATTAG

1.2 方法

1.2.1 CFs 的提取分离与培养 将购入的乳鼠用酒精棉球仔细消毒体表 3 次后置于细胞台, 使用高压灭菌后的手术器械逐层对乳鼠胸腔解剖直至暴露心脏。将心底部大血管游离并结扎后小心剪下乳鼠心脏, 使用预冷的无菌 PBS 清洗心脏表面及心腔内残余的血液, 使用精细程度较高的眼科剪将心脏组织破碎成直径约 1 mm 的小块, 加入提前准备好的消化液 (2 ml 胰蛋白酶与 1 ml II 型胶原酶的混合物) 后使用 37 °C 恒温水浴锅对心脏组织进行消化, 时长约 15 min; 对含有心脏组织的消化液使用 200 目滤网进行过滤, 最后向滤液中滴加含有血清的培养基终止其消化。1 400 r/min 离心 6 min 弃去上清液, 使用适量的培养基将离心管中的细胞重悬, 转移至细胞培养瓶中进行培养。依据差速贴壁原理, 对培养 2.5 h 的细胞进行换液, 此时贴壁的细胞即为 CFs。

1.2.2 TGF- β 1 刺激 CFs 活化 将细胞培养瓶中的 CFs 消化后接种于无菌 6 孔细胞培养板中, 培养 3 h 细胞完全贴壁后, 使用含有浓度为 5 ng/ml 的 TGF- β 1 的培养基对实验组进行换液培养 24 h。

1.2.3 CFs 转染 完成 TGF- β 1 对 CFs 的刺激活化后, 对细胞进行消化处理, 使用细胞计数仪对模型组细胞准确计数, 将细胞等量的接种于 6 孔细胞培养板中; 观察细胞密度约占 50% 时对质粒过表达组进行转染, 质粒空载组行相应的阴性处理。等待转染试剂处理细胞 24 h 后对各组细胞进行换液, 48 h 后将细胞应用于进一步实验。

1.2.4 实验分组 TGF- β 1 刺激 CFs 活化增殖模型分组, 对照组 (Control 组): 不进行任何处理; 模型组 (TGF- β 1 组): TGF- β 1 刺激 CFs 24 h。

过表达 sFRP3 质粒转染 CFs 分组, 对照组 (TGF- β 1 组): TGF- β 1 刺激 CFs 24 h 后使用正常培养基换液; 质粒空载组 (TGF- β 1 + Vector 组): TGF- β 1 刺激 CFs 24 h 后转染空载质粒; 质粒过表达组 (TGF- β 1 + OE-sFRP3 组): TGF- β 1 刺激 CFs 24 h 后转染 sFRP3 过表达质粒。

1.2.5 细胞总 RNA 提取和逆转录 将细胞培养液弃去, 使用预冷的 PBS 清洗细胞 3 次; 使用购入的 TRIzol 对细胞总 RNA 进行抽提。随后根据逆转录试剂盒说明书将 RNA 进行逆转录为 cDNA。

1.2.6 RT-qPCR 检测 各组 sFRP3、PCNA、POSTN 和 Collagen I 的 mRNA 表达 取各组 cDNA, 根据试剂盒的说明配制反应体系并使用 RT-qPCR 仪进行扩

增。将 GAPDH 作为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算各组 mRNA 的相对表达量。

1.2.7 Western blot 检测各组 sFRP3、PCNA、POSTN 和 Collagen I 的蛋白表达 收集各组细胞标本,使用混合了 PMSF 的 RIPA 对细胞进行裂解处理,获取总蛋白后使用蛋白浓度测定试剂盒对各组蛋白进行定量,并统一稀释浓度至 $2.0 \sim 2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。加入合适体积的上样缓冲液后将蛋白置于 100°C 的金属加热架加热 10 min 。完成变性的蛋白用于后续实验: SDS-PAGE 电泳、转膜、快速封闭液封闭 20 min 、TBST 清洗、 4°C 孵育目的蛋白一抗过夜(一抗工作液浓度根据抗体公司提供的最适浓度决定)、TBST 清洗、室温孵育二抗 90 min 、再次 TBST 清洗后使用 ECL 法对条带进行显影。对显影结果使用 Image J 进行定量分析,通过灰度值的差异计算各蛋白的相对表达量。

1.2.8 MTT 法检测 CFs 增殖情况 消化重悬处于对数生长期的各组细胞,并对细胞进行计数;将细胞接种于 96 孔板中,接种数量为 $4\,000$ 个/孔,每孔使用培养基补足至 $100 \mu\text{l}$,每组接种 6 孔,随后将培养板置于培养箱中培养 3 h ;向每孔中加入 $20 \mu\text{l}$ MTT 试剂,敲打培养板使试剂充分混匀,在培养箱中孵育 4 h 后,使用酶标仪对各孔 490 nm 波长处的吸光度进行测定。

1.2.9 CCK-8 法检测 CFs 增殖情况 消化重悬处于对数生长期的各组细胞,并对细胞进行计数;将细胞接种于 96 孔板中,接种数量为 $2\,000$ 个/孔,每孔使用培养基补足至 $100 \mu\text{l}$,每组接种 6 孔,随后将培养板置于培养箱中培养 3 h ;向每孔中加入 $10 \mu\text{l}$ CCK-8 试剂,敲打培养板使试剂充分混匀,在培养箱中孵育 4 h 后,使用酶标仪对各孔 450 nm 波长处的吸光度进行测定。

1.2.10 EdU 染色检测 CFs 增殖活性 消化重悬处于对数生长期的各组细胞,并对细胞进行计数;将细

胞以每孔 $8\,000$ 个的数量接种于 24 孔板的细胞爬片上,加入 EdU 试剂孵育 2 h 后使用无菌 PBS 清洗细胞;在室温下使用多聚甲醛对细胞进行 1 h 的固定,随后加入甘氨酸液体中和并清洗细胞;渗透剂对细胞膜进行通透后加入 $300 \mu\text{l}$ 提前配制的 EdU 染色液,在室温慢摇床孵育 30 min ;再次清洗加入 Hoechst 33342 对细胞核进行着色,随后将爬片取出,完成封片。随后上机拍照,观察阳性细胞所占总细胞百分数。

1.3 统计学处理 所有数据采用 GraphPad Prism 9.0 进行分析。采用 t 检验及单因素方差分析比较不同组之间的数据,并在必要时使用 Wilcoxon 检验以保证数据处理的科学性。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有实验均独立重复 3 次以上。

2 结果

2.1 TGF- β 1 刺激 CFs 构建细胞活化模型 使用 TGF- β 1 作用于细胞 24 h 后,提取细胞总蛋白及总 RNA 进行相关实验。如图 1A 所示,RT-qPCR 检测证实模型组 PCNA、POSTN 和 Collagen I 的 mRNA 相对表达量较空白对照组上升,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);使用 Western blot 的方法对两组 CFs 活化增殖相关蛋白 PCNA、心肌纤维化相关标志物 POSTN 和 Collagen I 的含量进行检测,结果见图 1B,发现模型组 PCNA、POSTN 和 Collagen I 的蛋白表达量较对照组明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。sFRP3 的 mRNA (Control 组: 1.00 ± 0.066 vs TGF- β 1 组: 0.49 ± 0.035 , $P < 0.05$, $F = 4.481$) 和蛋白表达水平 (Control 组: 1.00 ± 0.085 vs TGF- β 1 组: 0.51 ± 0.059 , $P < 0.05$, $F = 6.314$) 在模型组上均出现了降低的现象,差异有统计学意义。实验显示 TGF- β 1 刺激成功构建了 CFs 活化模型,活化的 CFs 中 sFRP3 表达下降。提示 sFRP3 可能在 CFs 活化过程中发挥作用。

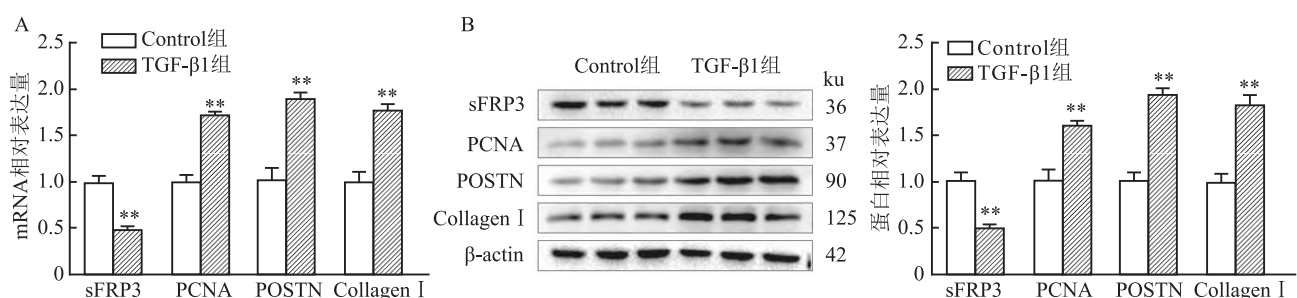


图1 TGF- β 1 处理后相关基因在蛋白及 mRNA 水平中的表达差异($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

A: RT-qPCR 法检测各组 mRNA 水平变化; B: Western blot 法检测各组蛋白表达水平变化;与 Control 组比较: ** $P < 0.01$

2.2 MTT 法及 CCK-8 法检测 CFs 模型组增殖能力 如图2所示,在经过 TGF- β 1 处理后,心肌纤维化模型组细胞增殖能力相较于对照组上升,差异有统计学意义(MTT, Control 组: 0.76 ± 0.078 vs TGF- β 1 组: 0.95 ± 0.125 , $P < 0.05$, $F = 2.591$; CCK-8, Control 组: 0.82 ± 0.077 vs TGF- β 1 组: 1.23 ± 1.119 , $P < 0.05$, $F = 2.383$)。

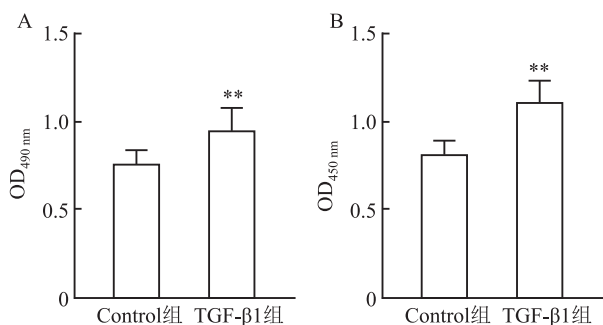


图2 在 TGF- β 1 刺激后应用 MTT 和 CCK-8 法检测细胞增殖活性($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: MTT 法检测细胞增殖活性; B: CCK-8 法检测细胞增殖活性; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 转染 sFRP3 过表达质粒后 CFs 活化增殖相关分子的表达变化 对完成转染的细胞进行 Western blot 实验检测 sFRP3 的蛋白表达差异,结果见图3A,质粒过表达组 sFRP3 的蛋白表达量较质粒空载组明显增加,证实 sFRP3 过表达质粒转染成功。进一步检测各组 PCNA、POSTN 和 Collagen I 的蛋白表达差异,结果提示,相较于质粒空载组,质粒过表达组增殖及纤维化相关分子的表达均出现了明显的下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。另外,通过使用 RT-qPCR 检测相关 mRNA 的方法,见图3B,对比于空载组,模型组 sFRP3 mRNA 的相对表达量出现了上调趋势,同时 PCNA、POSTN 及 Collagen I 的 mRNA 表达出现下调,差异有统计学意义($P <$

0.05)。对照组与质粒空载组之间的差异无统计学意义。实验表明过表达 sFRP3 能有效抑制 CFs 的活化与增殖。

2.4 过表达 sFRP3 后 CFs 的增殖能力变化 使用 MTT 法及 CCK-8 法对各组细胞增殖能力进行检测,结果显示,质粒过表达组细胞出现了不同程度的吸光度下降的情况,说明在过表达 sFRP3 后,CFs 的增殖能力出现了下降,差异有统计学意义(MTT, TGF- β 1 + Vector 组: 1.06 ± 0.093 vs TGF- β 1 + OE-sFRP3 组: 0.74 ± 0.066 , $P < 0.05$, $F = 1.973$; CCK-8, TGF- β 1 + Vector 组: 1.12 ± 0.106 vs TGF- β 1 + OE-sFRP3 组: 0.95 ± 0.089 , $P < 0.05$, $F = 2.584$)。同时,对照组与质粒空载组之间吸光度的差异无统计学意义。见图4A和4B。另外,如图4C所示,EdU 染色实验显示,质粒转染组 CFs 的 EdU 着色阳性细胞占比相较于空载组明显下降,即质粒转染组 CFs 的增殖能力出现了下降,差异有统计学意义(TGF- β 1 + Vector: 23.83 ± 2.927 vs TGF- β 1 + OE-sFRP3: 12.33 ± 2.026 , $P < 0.01$, $F = 2.008$)。对照组与质粒空载组之间的 EdU 着色阳性细胞占比差异无统计学意义。实验表明过表达 sFRP3 能有效抑制 CFs 的增殖。

3 讨论

心肌纤维化是各种心脏病终末期的特征性变化,在心血管疾病领域仍然是一个具有挑战性的问题,发现新靶点、提供新思路是近年来针对心肌纤维化基础研究的重中之重。CFs 的增殖在其发病机制中起着重要作用。因此,深入探究 CFs 的活化与增殖过程及揭示相关的分子机制对指导临床诊治有着重要意义。其中,Wnt 信号通路是近年来被证实与 CFs 增殖及表型转化密切相关的信号通路之一,Wnt 蛋白则是控制细胞增殖及表型转化的关键信号分

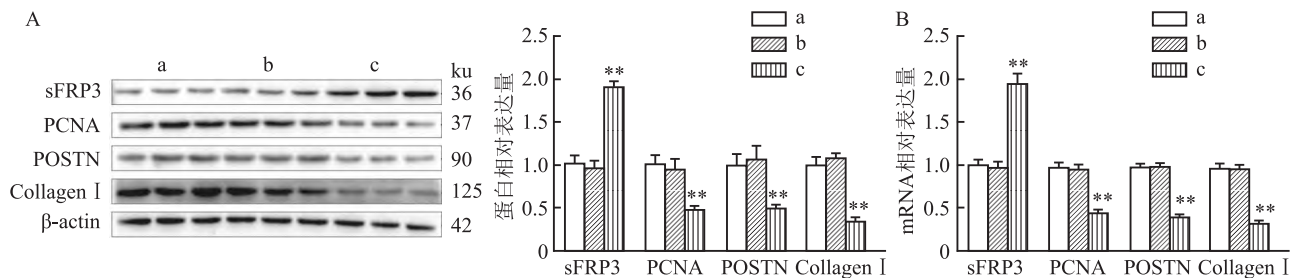


图3 质粒过表达 sFRP3 后相关基因在蛋白及 mRNA 水平中的表达差异($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: Western blot 检测蛋白表达水平变化; B: RT-qPCR 检测 mRNA 水平变化; a: TGF- β 1 组; b: TGF- β 1 + Vector 组; c: TGF- β 1 + OE-sFRP3 组; 与 TGF- β 1 + Vector 组比较: ** $P < 0.01$

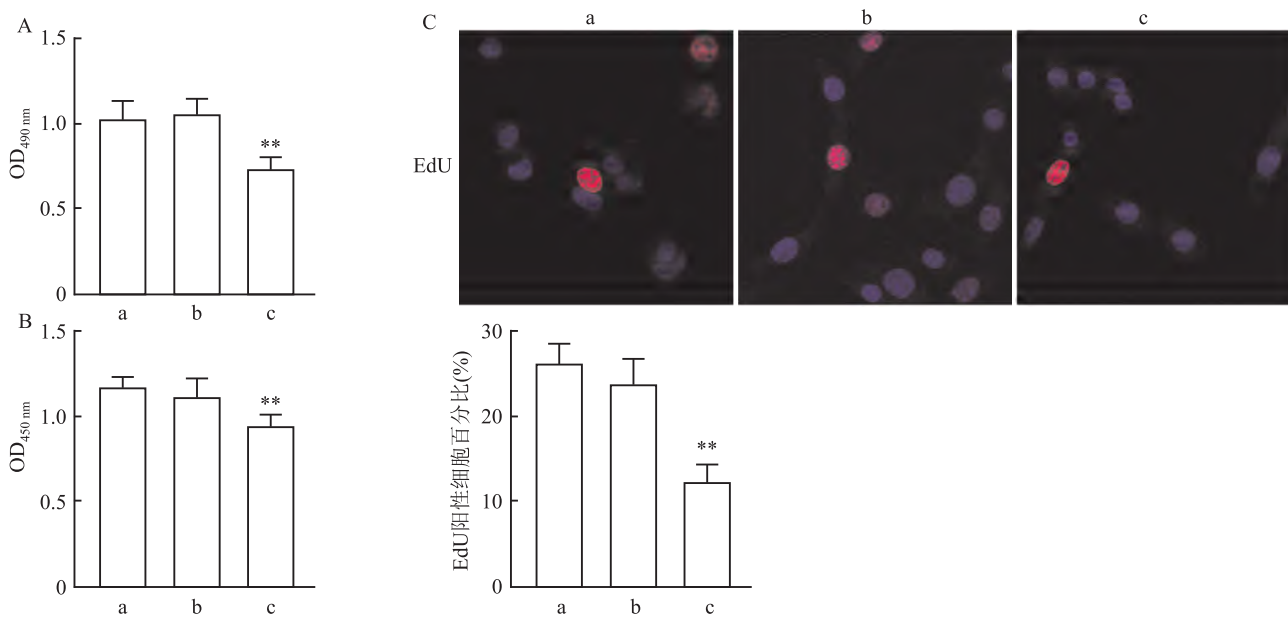


图4 质粒过表达 sFRP3 后检测细胞增殖活性($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: MTT 法检测过表达 sFRP3 后 CFs 增殖活性的改变; B: CCK-8 法检测过表达 sFRP3 后 CFs 增殖活性的改变; C: EdU 染色检测过表达 sFRP3 后 CFs 增殖活性的改变 $\times 200$; a: TGF- β 1 组; b: TGF- β 1 + Vector 组; c: TGF- β 1 + OE-sFRP3 组; 与 TGF- β 1 + Vector 组比较: ** $P < 0.01$

子。Wnt 信号通路激活的标志是 β 连环蛋白 (β -catenin) 在细胞质中大量聚集^[10]。sFRP3 是属于 sFRP 家族一种蛋白质,这个家族的成员在细胞信号传导和生长发育过程中发挥重要作用。sFRP3 作为 Wnt 信号通路的一种经典调节蛋白,其功能主要是对 Wnt 信号通路的调控。sFRP3 含有一个与细胞膜上 Wnt 蛋白受体相类似的结构域,但其因为缺少 7 次跨膜域,可竞争性结合 Wnt 蛋白,从而拮抗 Wnt 信号^[11]。现已有文献^[12]报道,在胃肠道肿瘤和肺部癌症等研究中 sFRP3 的低表达与肿瘤预后相关;另外,有报道^[13]称 sFRP3 的表达与心功能衰竭存在一定相关性。但目前尚不明确 sFRP3 对 CFs 活化增殖过程有何影响,故设计该实验探究 sFRP3 在调控 CFs 活化增殖中的作用。

在该研究中,实验通过使用 5 ng/ml 的 TGF- β 1 完成 CFs 的体外活化,成功构建了体外 CFs 活化增殖模型。使用 Western blot 和 RT-qPCR 检测模型分子层面可能存在的差异。结果显示,相较于对照组,模型组 CFs 增殖相关蛋白 PCNA 及纤维化相关蛋白 POSTN 和 Collagen I 的表达明显上调,而 sFRP3 的表达出现明显下降,这提示 sFRP3 可能参与了 CFs 活化增殖过程。这一现象与 sFRP3 在部分肿瘤细胞中的低表达有着一定程度的相似性。为了进一步探究 sFRP3 可能发挥的作用,该实验使用 sFRP3 过表达质粒转染 CFs,进而观察转染后 CFs 分子水平

及细胞增殖能力发生的变化。在确认转染成功后,该实验显示过表达组 CFs 活化增殖及纤维相关指标在蛋白及转录水平均出现了不同程度的下调,通过 MTT、CCK-8 和 EdU 实验显示,过表达组 CFs 的增殖活力明显被抑制。结合上述实验,该研究表明 sFRP3 调控了 CFs 的增殖过程,并且可能是影响增殖的关键因素之一。

该研究利用构建心肌纤维化体外细胞模型的实验方法来探究 sFRP3 作为心肌纤维化过程中可能有效的新型调节剂的作用,强调其作为预防心肌纤维化的保护剂的潜力。从机制上讲,该研究推断作为 Wnt 信号通路的调控剂,sFRP3 的过表达将导致 CFs 中 Wnt 信号通路的部分沉默,从而抑制心肌纤维化的发生发展。该研究结果为治疗心脏纤维化提供了创新策略。

参考文献

- [1] Kurose H. Cardiac fibrosis and fibroblasts [J]. Cells, 2021, 10 (7):1716.
- [2] Frangogiannis N G. Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities [J]. Mol Aspects Med, 2019, 65: 70 - 99.
- [3] Hortells L, Johansen A K Z, Yutzey K E. Cardiac fibroblasts and the extracellular matrix in regenerative and nonregenerative hearts [J]. J Cardiovasc Dev Dis, 2019, 6(3):29.
- [4] Czubryt M P, Hale T M. Cardiac fibrosis: Pathobiology and therapeutic targets [J]. Cell Signal, 2021, 85: 110066.

- [5] Hall C, Gehmlich K, Denning C, et al. Complex relationship between cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in health and disease [J]. *J Am Heart Assoc*, 2021, 10(5): e019338.
- [6] Akoumianakis I, Polkinghorne M, Antoniadou C. Non-canonical WNT signalling in cardiovascular disease: Mechanisms and therapeutic implications [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2022, 19(12): 783 – 97.
- [7] Nayakanti S R, Friedrich A, Sarode P, et al. Targeting Wnt- β -Catenin-FOSL signaling ameliorates right ventricular remodeling [J]. *Circ Res*, 2023, 132(11): 1468 – 85.
- [8] Wang Z, Li Z, Ji H. Direct targeting of β -catenin in the Wnt signaling pathway: Current progress and perspectives [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(4): 2109 – 29.
- [9] Fang L, Gao C, Bai R X, et al. Overexpressed sFRP3 exerts an inhibitory effect on hepatocellular carcinoma *via* inactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Cancer Gene Ther*, 2021, 28(7 – 8): 875 – 91.
- [10] Chen X, Yao N, Mao Y, et al. Activation of the Wnt/ β -catenin/CYP1B1 pathway alleviates oxidative stress and protects the blood-brain barrier under cerebral ischemia/reperfusion conditions [J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19(7): 1541 – 7.
- [11] Sremac M, Paic F, Grubelic Ravic K, et al. Aberrant expression of SFRP1, SFRP3, DVL2 and DVL3 Wnt signaling pathway components in diffuse gastric carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2021, 22(6): 822.
- [12] Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 165.
- [13] Gu Y, Ding Y, Zhang X, et al. Secreted frizzled-related protein 3 alleviated cardiac remodeling induced by angiotensin II *via* inhibiting oxidative stress and apoptosis in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 934: 175303.

Effects of sFRP3 overexpression on the activation and proliferation of murine cardiac fibroblasts

Jiang Shunxiang¹, Tu Bin¹, Song Kai¹, He Huanhuan¹, Tao Hui², Cao Wei¹

(¹*Dept of Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;*

²*Dept of Anesthesiology and Perioperative Medicine, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)*

Abstract Objective To explore the role of secreted frizzled-related protein 3 (sFRP3), a regulator of the Wnt signaling pathway, in the activation and proliferation of murine cardiac fibroblasts (CFs). **Methods** Neonatal mice aged 1 – 3 days were obtained for surgical procedures to collect heart tissues. After digestion, CFs were isolated and cultured. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) stimulation was used to induce activation and proliferation in CFs after they adhered to the culture dish. Once the model was confirmed, experimental and control groups were transfected with sFRP3 overexpression plasmids and empty plasmids for 24 – 48 hours. Expression levels of sFRP3, Periostin (POSTN), Type I collagen (Collagen I), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were assessed at the molecular level using Western blot and qRT-PCR. Changes in cell proliferation capacity were examined using MTT, CCK-8, and EdU staining methods. **Results** In the TGF- β 1-induced activation and proliferation model of CFs, compared to the control group, the model group exhibited decreased expression of sFRP3 protein and mRNA, while the expression of activation and proliferation-related proteins PCNA, POSTN, and Collagen I was upregulated. Furthermore, in CFs overexpressing sFRP3 through plasmid transfection, the protein and mRNA expression of PCNA, POSTN, and Collagen I decreased compared to the empty vector group. MTT, CCK-8, and EdU experiments indicated a significant decrease in the proliferative activity of CFs in the sFRP3 overexpression group compared to the empty vector group. **Conclusion** Overexpression of sFRP3 markedly inhibits the activation and proliferation of CFs, suggesting that sFRP3 may be a key gene involved in the regulation of CF activation and proliferation.

Key words sFRP3; cardiac fibroblasts; cardiac fibrosis; activation; proliferation