

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.14.006

RNA 干扰敲低 β -catenin 的表达对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖及凋亡的影响 *

荣媛 刘明华[△] 邓朝霞 任小宝 向强

(解放军第三军医大学西南医院急诊科 重庆 400038)

摘要 目的:探讨 β -catenin 对人瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblasts, KFB)增殖和凋亡的影响。**方法:**分别采用 Real-time PCR (RT-PCR)和 Western blot 检测正常组织和瘢痕疙瘩中 β -catenin 的 mRNA 及蛋白表达。将针对人 β -catenin 基因设计合成的 3 对特异性小干扰 RNA(siRNA)分别转染体外培养的人瘢痕疙瘩成纤维细胞,通过 RT-PCR 和 Western blot 筛选出干扰人瘢痕成纤维细胞 β -catenin 基因表达的最佳 siRNA。通过 siRNA 沉默 β -catenin 表达后,采用 MTT 法检测 KFB 的增殖情况,流式细胞仪检测细胞凋亡率。**结果:**瘢痕疙瘩成纤维细胞中 β -catenin 的表达较正常组织明显升高($P<0.05$)。通过转染 β -catenin siRNA 降低其表达后,成纤维细胞的增殖能力明显下降($P<0.05$),凋亡水平显著增高($P<0.05$)。**结论:**沉默 β -catenin 能够显著抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖并促进其凋亡。

关键词:瘢痕疙瘩; β -catenin; 增殖; 凋亡

中图分类号:R-33;R62;R619.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)14-2631-06

Effects of β -catenin on the Proliferation and Apoptosis of Keloid Fibroblast Cells*

RONG Yuan, LIU Ming-hua[△], DENG Zhao-xia, REN Xiao-bao, XIANG Qiang

(Department of emergency, Southwest Hospital in Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of β -catenin siRNA on the proliferation and apoptosis of keloid fibroblast cell. **Methods:** Real-time PCR and Western blot were performed to monitor the mRNA and protein expression of β -catenin in pathological scar tissue and adjacent normal tissue. Keloid fibroblast cell in vitro were transfected with 3 pairs of specific β -catenin small interfering RNA (siRNA), then Real-time PCR and Western blot were performed to identify the best siRNA. The proliferation and apoptosis of KFB transfected with β -catenin siRNA were detected by using MTT assay and flow cytometry. **Results:** The RT-PCR and Western blot assay results showed that the expression of β -catenin mRNA and protein in pathological scar tissue were significantly higher than those in the adjacent normal tissue ($P<0.05$). The β -catenin siRNA 2 remarkably inhibited the expression of β -catenin at mRNA and proteins in the Human keloid fibroblasts. Compared with the control group, cell proliferation was decreased and apoptotic rate were increased in β -catenin siRNA 2 group. **Conclusion:** Knockdown of β -catenin significantly decreased the proliferation and increased the apoptosis of KFB, which could inhibit the formation of pathological scar.

Key words: Keloid; β -catenin; Proliferation; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R62; R619.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)14-2631-06

前言

病理性瘢痕疙瘩是一种常见的皮肤纤维组织增生疾病,以胶原纤维等细胞外基质过度产生和沉积为特征^[1-3],临床上多见于烧伤以及各种创伤手术后的伤口恢复过程。构成瘢痕疙瘩组织的成纤维细胞具有过度增殖能力,且存在凋亡不足以及胶原蛋白异常合成,导致瘢痕疙瘩组织的无休止增生^[4-6]。因此,抑制瘢痕成纤维细胞增殖、诱导其凋亡可抑制瘢痕组织的增生,延缓病程发展,对病理性瘢痕疙瘩的治疗具有重要作用。

研究表明病理性瘢痕疙瘩组织中存在 Wnt/ β -catenin 信号同路的异常激活,提示 β -catenin 参与了病理性瘢痕疙瘩的发生^[7]。在肿瘤细胞中, β -catenin 的异常激活与细胞的异常增殖和凋亡联系紧密^[8,9]。有学者提出病理性瘢痕疙瘩组织可被视为一种良性皮肤纤维性肿瘤,因此具有类似肿瘤的生物特性^[10]。然而, β -catenin 在瘢痕疙瘩成纤维细胞中增殖和凋亡的作用目前尚不清楚。本研究通过探讨 β -catenin siRNA 对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖与凋亡的影响,以期阐明 β -catenin 信号通路在瘢痕疙瘩发病中的作用机制提供参考依据。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81071537)

作者简介:荣媛(1983-),女,主治医师,本科,主要从事急救、重症工作,电话:023-68773047

[△] 通讯作者:刘明华,医院急救部主任,主任医师,第三军医大学卫勤分队分类后送组组长;航天救援遂宁点支医院专家组组长,

E-mail: jybicu@sohu.com

(收稿日期:2017-12-28 接受日期:2018-01-23)

1 资料与方法

1.1 材料

M199 细胞培养基购自美国 GIBCO 公司; 多克隆兔抗人 β -catenin、Caspase-3 均购自美国 Abcam 公司; β -Actin 内参抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; Thermo26616 中分子量预染蛋白 Marker 购自美国 Thermo Fisher 公司; 超敏 E-CL 化学发光试剂盒(NCI4106)购自美国 Millipore 公司; 特优级胎牛血清(FBS)购自美国 GIBCO 公司; 组织及细胞 IP 裂解液(RIPA)及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自武汉碧云天生物技术有限公司; Trizol 试剂、逆转录试剂盒、SYBR Green 均购自日本 Takara 生物有限公司; 无 RNA 酶 DEPC 水购自 Invitrogen 公司; β -catenin siRNA 病毒委托于上海吉玛生物科技有限公司构建。

1.2 临床标本的收集

本研究临床标本的收集通过医院伦理委员会审批, 并在征求患者同意和签署知情同意书的前提下进行。本实验所有病例组的临床标本均来自西南医院整形外科 2015 年 7 月~2016 年 12 月行烧伤术后瘢痕疙瘩切除术的患者标本, 一共 12 例, 平均年龄为 17~59 岁。正常对照组的标本则取自于同期因其他疾病进行手术切除的手术标本周边的正常皮肤组织, 一共 12 例, 平均年龄为 16~62 岁。纳入本实验研究的组织标本主要取材于小腿部位皮肤(长约 0.5 cm, 宽约 0.5 cm)。病例组所取瘢痕疙瘩组织均由本院病理科医师进行病理鉴定确认。排除标准: 局部皮肤存在感染及难愈性溃疡, 各种免疫性、甲状腺疾病及内分泌系统疾病均排除在外。

1.3 原代瘢痕疙瘩成纤维细胞的提取

组织块贴壁法: 手术台上取下切除的瘢痕疙瘩组织, 在无菌条件下浸入 M199 细胞培养基中, 于超净台内取出, 使用预热的 PBS 将瘢痕疙瘩组织充分洗涤, 去除血液, 进行原代细胞提取实验: 随后使用眼科剪将瘢痕疙瘩组织剪成针尖大小(约为 1 mm³)的组织块, 接种于含 20% 胎牛血清的 M199 细胞培养液中, 置于饱和湿度、5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养。在接种 5~7 天后在组织块周围逐渐爬出长梭形、纺锤状的细胞即为成纤维细胞。见细胞爬出后 6~9 天移除组织块, 待细胞进一步生长至 90% 密度后用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代。将铺满培养皿的成纤维细胞用胰酶消化后进行传代。密切观察原代细胞的生长情况, 传代后扩增细胞量用于后续实验。

1.4 siRNA 转染

β -catenin siRNA 由广州锐博生物科技有限公司合成, 其序列如下: siRNA1: 正义 5'-CGUACUGCACUCCAAAUATT-3', 反义 5'-UAUUUGGAGUGCAGUAGCGTT-3', siRNA2: 正义 5'-GGCUAAUAGGUCUCGAGAU-3', 反义 5'-AUCUCGAGACCUAAUAGCCTT-3'; siRNA3: 正义 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 反义 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAT-3'。另外以一条无义干扰序列 NC siRNA 作为阴性对照组。转染 siRNA 实验分为空白对照组(细胞中除培养液外不加任何试剂)、阴性对照组(细胞中加入细胞培养液、 β -catenin-negative-siRNA、转染试剂)和干扰组(细胞中加入细胞培养液、siRNA1、2、3、转染试剂)。转染前 1 天, 将处于对数生长期第三代细胞的细胞按 2×10^5 个/孔的细胞量接种于 6 孔板中, 待其铺

壁达到 40%~50% 时, 根据转染试剂说明书的步骤进行下一步实验。转染完成后 6 小时进行换液, 更换完全培养基。随州放置于培养箱中继续培养 24 h 或 48 h, 并在荧光显微镜下观察细胞转染效率。

1.5 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

β -actin 引物序列: 上游 5'-CGGAGTCAACGGATTTG-GTCGTAT-3', 下游 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'; β -catenin 引物序列: 上游 5'-AGCTTCCAGACACGCTAT-CAT-3', 下游 5'-CGGTACAACGAGCTGTTTCTAC-3'。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 20 s, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 30 s, 待完成 32 各循环之后, 在 72 °C 条件下延伸 5 min, 扩增后的产物于 4 °C 保存, 随后转移至 -20 °C 冰箱长期保存。每组设置三个复孔, 以 2^{-ΔΔCT} 值对结果进行统计分析。

1.6 Western blot 检测

细胞处理完成后, 先弃去培养基, 用 PBS 将贴壁细胞洗涤两次, 用滤纸吸干残余液体。将 RIPA 细胞裂解液加入培养皿中, 用细胞刮子将细胞均匀刮下手机入 1.5 mL EP 管中。在冰上静置裂解 30 min, 期间在涡旋震荡器上充分混匀。裂解完成后 12 000 rpm 离心 5 min, 弃去管底沉淀, 将收集到的细胞总蛋白上清液置于 -20 °C 储存。使用 5X 蛋白上样缓冲液混匀蛋白上清液后于 95 °C 中加热 10 分钟, 待其充分变性。上机跑电泳, 随后转膜并置于 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h。封闭结束后使用 TBST 洗膜 5 min × 3 次, 随后将膜置于多克隆兔抗人的 β -catenin(浓度 1:1 000)、Cleaved Caspase-3(浓度 1:750)、多克隆兔抗人 β -actin(浓度 1:3000)中 4 °C 孵育过夜。次日, 洗膜 5 min × 3 次后, 置于辣根酶标记羊抗兔 IgG 中室温孵育 2 h。TBST 洗膜 5 min × 3 次后, 采用 ECL 化学发光法金鼎显影。应用 Quantity One 软件分析条带灰度值并作统计分析。

1.7 MTT 法检测细胞增殖率

应用 MTT 法检测 β -catenin siRNA 干扰后瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的影响。将转染 siRNA 后的细胞消化、重悬为单细胞悬液, 按照每孔 5×10^3 个的密度种于 96 孔板中, 同时每组设置 4 个复孔以消除人为误差。培养 0、24、48、72 h 后每孔加入 0.5 mg/mL MTT 10 μ L, 避光置于 37 °C 继续孵育 4 h。随后弃去培养液, 每孔加入 DMSO 溶液 150 μ L 并置于脱色摇床中振荡 5 min, 以充分溶解孔内结晶。随后使用酶标仪于 492 nm 波长测定 OD 值, 并进行相关统计分析。

1.8 Annexin V/PI 法检测细胞凋亡率

应用流式细胞术检测 β -catenin siRNA 干扰后瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的影响。将 β -catenin siRNA 转染至瘢痕疙瘩成纤维细胞后, 继续培养 24 h, 并设置空白对照组随后将不同分组的细胞使用胰酶消化、重悬, 并用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 1000 rpm 离心 5 min, 弃去上清。使用 400 μ L 试剂盒自带的 Binding Buffer 重悬细胞, 每管中依次加入 5 μ L Annexin V-FITC 染色液和 10 μ L PI 染色液, 混匀, 室温下静止孵育 15 min。流式细胞仪上机并分析结果。

1.9 统计学方法

本研究所有实验均采用 SPSS 19.0 进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本均数间的比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 β -catenin 在正常组织和瘢痕疙瘩中的表达比较

RT-PCR 和 Western blot 结果显示:与正常皮肤组织相比,

瘢痕疙瘩组织中 β -catenin mRNA 和蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)(图 1)。

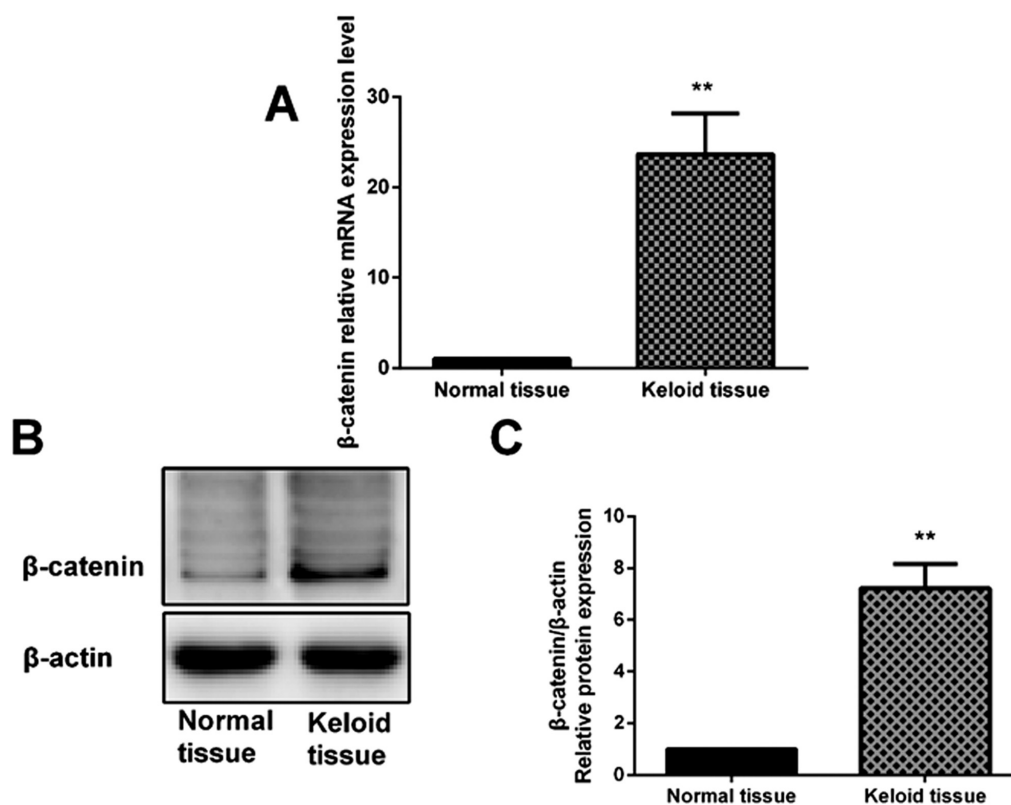


图 1 正常组织与瘢痕疙瘩组织中 β -catenin mRNA 和蛋白表达水平

A:正常组织与瘢痕疙瘩组织中 β -catenin mRNA 表达;B 和 C:正常组织与瘢痕疙瘩组织中 β -catenin 蛋白表达及统计;

Fig.1 The mRNA and protein expression level of β -catenin in normal tissue and keloid tissue

A: The expression level of β -catenin mRNA in normal tissue and keloid tissue; B and C: The qualified expression level of β -catenin protein in normal tissue and keloid tissue.

2.2 原代人瘢痕疙瘩成纤维细胞鉴定

倒置显微镜下观察结果显示人原代成纤维细胞形态学上呈长梭形,细胞首尾两端有细长的突起,中间部位宽大,呈现典型纺锤状。细胞核为卵圆形位于靠近胞质的中央,单个细胞之

间连接较为疏松。免疫荧光结果显示间质表型蛋白 Vimentin 在 95 % 的成纤维细胞中呈强阳性表达,提示我们所分离培养的原代细胞为瘢痕疙瘩成纤维细胞(图 2)。

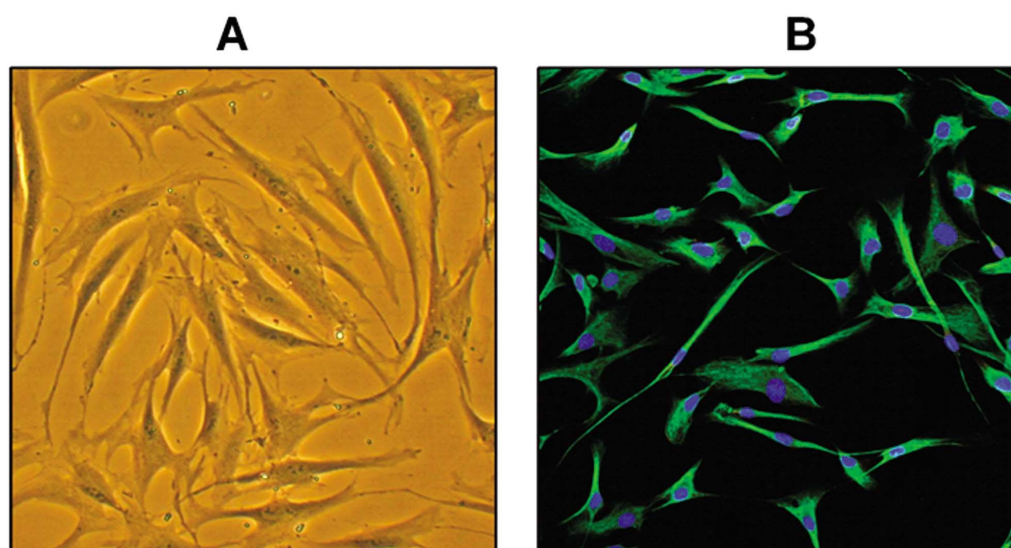


图 2 原代瘢痕疙瘩成纤维细胞鉴定

A:光镜下细胞形态;B:免疫荧光鉴定 Vimentin 表达。

Fig.2 Identification of primary human keloid fibroblast cell

A: Light-Microscopic Morphology of keloid fibroblast cell; B: immunofluorescence of Vimentin.

2.3 siRNA 转染率测定

转染阳性细胞胞质内可见大量绿色荧光, 转染效率高于90%(图 3)。

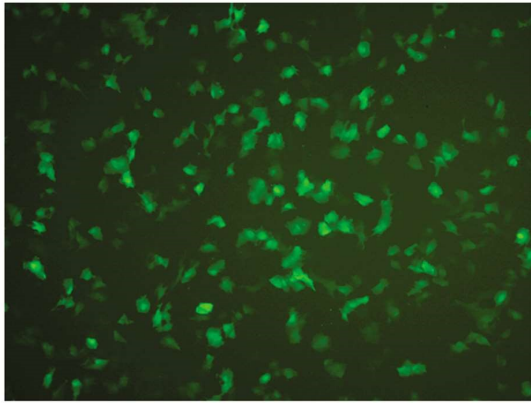


图 3 β-catenin siRNA 的转染效率

Fig.3 Transfection efficiency of β-catenin siRNA

2.4 β-catenin siRNA 效果的鉴定

RT-PCR 和 Western blot 结果显示合成的 3 条 β-catenin siRNA 均可以显著下调 β-catenin mRNA 和蛋白的表达, 其中 siRNA 2 的对 β-catenin 表达的抑制作用最为显著, 因此选用 siRNA2 用作后续实验。(图 4)。

2.5 β-catenin siRNA 对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的影响

我们进一步验证 β-catenin siRNA 对成纤维细胞体外增殖能力的影响。结果显示与空白对照组与转染空载 siRNA 组相比, 转染 β-catenin siRNA 的成纤维细胞增殖在 24、48、72 h 明显受到抑制, 差异具有显著性($P < 0.05$)(图 5)。

2.6 β-catenin siRNA 对瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡的影响

与空白对照组与转染空载 siRNA 组相比, 转染 β-catenin siRNA 的成纤维细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率均明显升高($P < 0.05$)(图 6)。

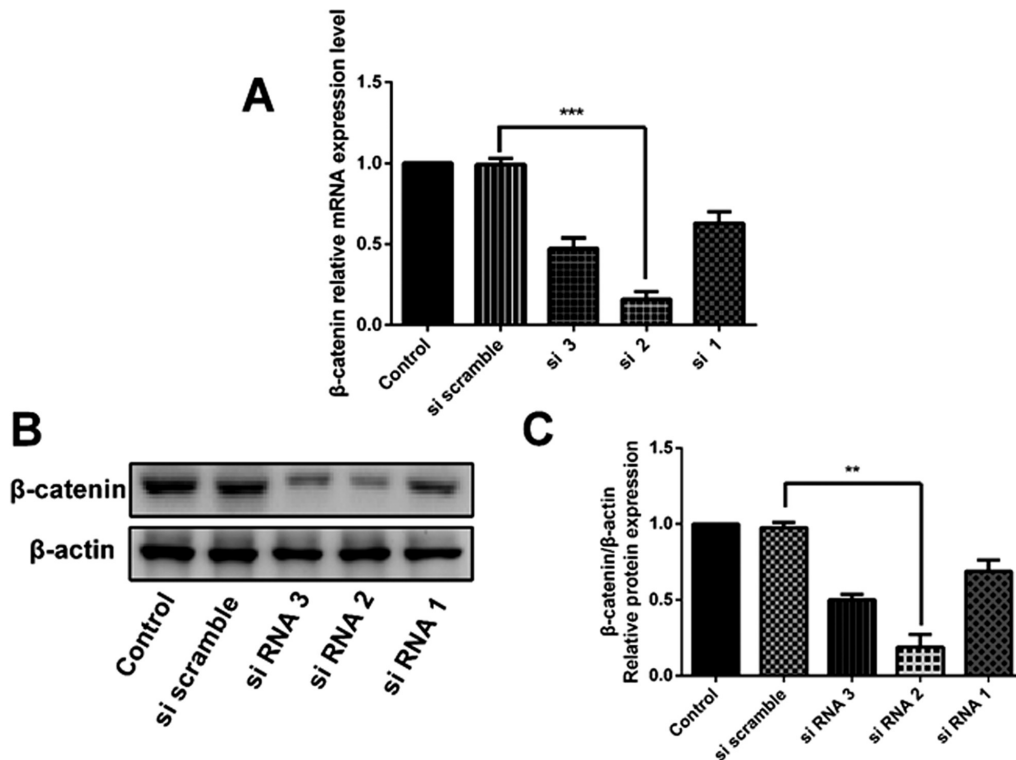


图 4 β-catenin siRNA 靶序列沉默效率鉴定

A: 不同 siRNA 对 β-catenin mRNA 的沉默效率; B 和 C: 不同 siRNA 对 β-catenin 蛋白的沉默效率及统计;

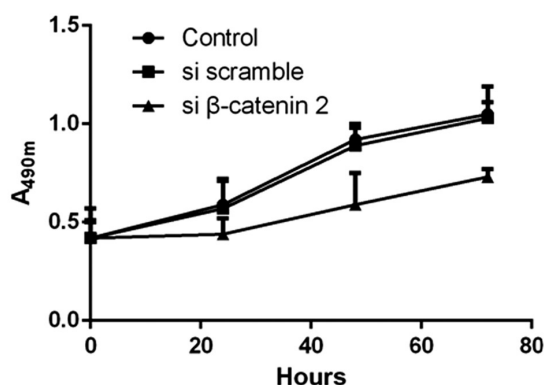
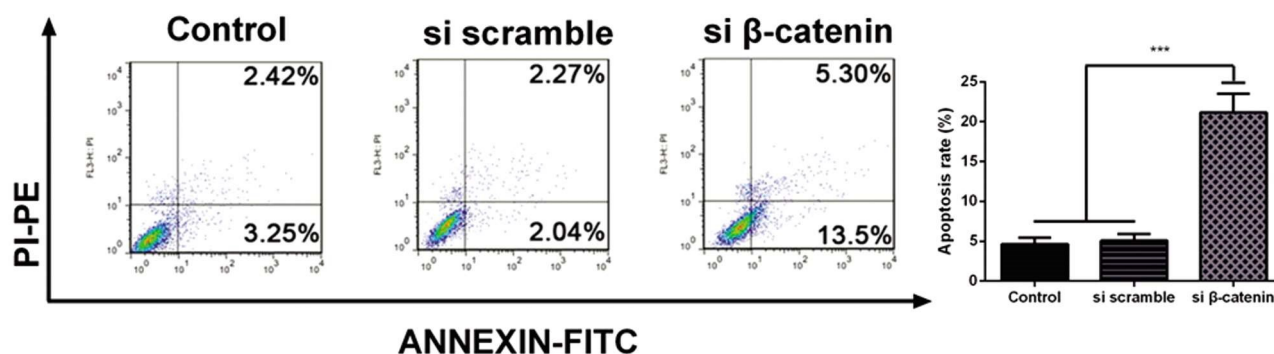
Fig.4 Identification of the silencing effect of different β-catenin siRNA

A: The silencing effect of different siRNA on β-catenin mRNA; B and C: The silencing effect of different siRNA on β-catenin protein.

3 讨论

瘢痕疙瘩是正常皮肤经历创伤后异常增殖形成一种特殊类型的瘢痕,其特征是大量瘢痕成纤维细胞增生和过度的胶原沉积,同时伴随成纤维细胞异常增殖、分泌、细胞分化与细胞凋亡过程紊乱。在人体创伤后组织修复以及瘢痕疙瘩形成过程中,成纤维细胞扮演重要角色,其与正常皮肤细胞相比具有更强的增殖能力以及抵抗凋亡能力,其功能状态是影响病理性瘢痕疙瘩发生、发展以及转归的主要因素之一^[11,12]。新近研究表明

细胞凋亡和增殖异常在病理性瘢痕疙瘩的形成中起着重要作用^[13,14]。学者推论在瘢痕疙瘩的发生与创伤修复过程中,成纤维细胞正常的程序性细胞死亡程序发生障碍使得细胞凋亡抵抗,进而出现成纤维细胞的异常增殖和大量胶原、细胞外基质分泌。近年来,随着细胞生物学和分子生物学在瘢痕疙瘩形成发展机制方面研究的深入,越来越多的研究表明多种信号通路的异常激活参与了瘢痕疙瘩的形成。其中,Wnt/β-catenin 信号通路的作用较为肯定和重要,其在瘢痕疙瘩发病中的作用引起学界广泛关注^[15]。

图5 siRNA 干扰 β -catenin 基因对瘢痕疙瘩纤维细胞增殖的影响Fig.5 The effect of β -catenin siRNA on the proliferation of keloid fibroblast cell图6 siRNA 干扰 β -catenin 基因对瘢痕疙瘩纤维细胞凋亡的影响Fig.6 The effect of β -catenin siRNA on the apoptosis of keloid fibroblast cell

蛋白激酶、Wnt 等信号通路也发挥不可或缺的作用^[24]。TGF- β 1 可通过 Smad3 和 p38-MAPK 途径诱导肥大性瘢痕以及瘢痕疙瘩组织中 β -catenin 介导的转录的激活,从而参与其发病过程^[7]。Igota 等发现在提取的人原代瘢痕疙瘩成纤维细胞中, Wnt5a mRNA、 β -catenin 的蛋白水平显著高于从正常皮肤中提取的人原代成纤维细胞^[15]。张凌峰等认为人体瘢痕疙瘩组织中 β -catenin 的异常激活能够调控下游 wnt 信号通路基因,从而促进瘢痕组织的生长^[16]。此外, β -catenin 信号通路在多种疾病的增殖与凋亡都产生影响^[25,26]。因此,我们推测 β -catenin 可能通过调控成纤维细胞的增殖与凋亡参与瘢痕疙瘩的发病。

在本研究中,我们建立体外瘢痕疙瘩成纤维细胞模型,通过使用特异性 siRNA 沉默 β -catenin 以观察其对成纤维细胞增殖与凋亡水平的影响,探讨 β -catenin 与瘢痕疙瘩发生之间的关系。研究结果显示与正常组织相比,瘢痕疙瘩组织中 β -catenin 表达显著升高,表明 Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活参与瘢痕疙瘩的发病。进一步采用 MTT 法来检测 β -catenin siRNA 对成纤维细胞增殖能力的影响,结果显示 β -catenin 表达下调显著降低成纤维细胞增殖能力,而其凋亡水平明显升高。这些结果提示 β -catenin 表达上调促进了瘢痕疙瘩的形成。

综上所述,瘢痕疙瘩组织中存在 β -catenin 呈异常高表达,可能他会促进成纤维细胞增殖并抑制其凋亡促进瘢痕疙瘩的形成。进一步深入研究 β -catenin 调控其增殖和凋亡的分子机制,可能会为瘢痕疙瘩的治疗提供一个新的靶点。

Wnt/ β -catenin 信号通路在多种组织胚胎如肺、肾脏、神经组织等的发育过程中扮演重要角色^[16-18],也是瘢痕疙瘩的形成过程中的关键调控因子。经典的 Wnt 信号通路通过抑制 GSK3 β 介导的磷酸化作用而阻止胞质内 β -catenin 降解,大量聚集的 β -catenin 随后入核,与下游启动子 TCF/LCF3 复合体结合,调控下游靶基因的转录表达^[19,20]。既往研究表明 Wnt/ β -catenin 信号转导通路在皮肤创面愈合过程中发挥重要作用,参与多种人类纤维化疾病的发病过程^[21,22]。此外, β -catenin 表达水平在人体烧伤后形成的瘢痕组织中也显著升高,有学者认为瘢痕组织中真皮的异常增生与 β -catenin 的异常激活密切相关,且真皮细胞在参与创面愈合的过程中也发挥重要作用^[23]。Li 等发现在多种皮肤伤口愈合过程中丝裂原活化

参考文献(References)

- [1] Beogo R, Guiebre Y M, Sereme M, et al. Keloid scars of the head and neck [J]. Revue de stomatologie et de chirurgie maxillo-faciale, 2012, 113(3): 179-183
- [2] He Y, Deng Z, Alghamdi M, et al. From genetics to epigenetics: new insights into keloid scarring[J]. Cell proliferation, 2017, 50(2): [Epub ahead of print]
- [3] Jumper N, Paus R, Bayat A. Functional histopathology of keloid disease[J]. Histology and histopathology, 2015, 30(9): 1033-1057
- [4] Mamalis A, Jagdeo J. Light-emitting diode-generated red light inhibits keloid fibroblast proliferation [J]. Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery, 2015, 41(1): 35-39
- [5] Wu Z Y, Lu L, Liang J, et al. Keloid microRNA expression analysis and the influence of miR-199a-5p on the proliferation of keloid fibroblasts [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(2): 2727-2738
- [6] Yun I S, Lee M H, Rah D K, et al. Heat Shock Protein 90 Inhibitor (17-AAG) Induces Apoptosis and Decreases Cell Migration/Motility of Keloid Fibroblasts[J]. Plastic and reconstructive surgery, 2015, 136(1): 44e-53e
- [7] Sato M. Upregulation of the Wnt/beta-catenin pathway induced by transforming growth factor-beta in hypertrophic scars and keloids [J]. Acta dermato-venereologica, 2006, 86(4): 300-307
- [8] He J, Huang Y, Weng J, et al. Specific Inhibition of beta-Catenin in Jeko-1 Mantle Cell Lymphoma Cell Line Decreases Proliferation and Induces Apoptosis [J]. Medical science monitor : international medi-

- cal journal of experimental and clinical research, 2015, 21(22):18-24
- [9] Leal L F, Bueno A C, Gomes D C, et al. Inhibition of the Tcf/beta-catenin complex increases apoptosis and impairs adrenocortical tumor cell proliferation and adrenal steroidogenesis [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (40): 43016-43032
- [10] Lamovec J, Gasljevic G. Keloid type of fibromatosis-like metaplastic carcinoma of the breast with transformation into biphasic tumour in recurrences and lymph node metastases [J]. *Histopathology*, 2010, 57 (2): 318-320
- [11] Doong H, Dissanayake S, Gowrishankar T R, et al. The 1996 Lindberg Award. Calcium antagonists alter cell shape and induce procollagenase synthesis in keloid and normal human dermal fibroblasts[J]. *The Journal of burn care & rehabilitation*, 1996, 17(6 Pt 1): 497-514
- [12] Philandrianos C, Kerfant N, Jaloux C, JR, et al. Clinical presentation, epidemiology, histology and pathogenesis [J]. *Annales de chirurgie plastique et esthetique*, 2016, 61(2): 128-135
- [13] Carantino I, Florescu I P, Carantino A. Overview about the keloid scars and the elaboration of a non-invasive, unconventional treatment [J]. *Journal of medicine and life*, 2010, 3(2): 122-127
- [14] Shih B, Garside E, McGrouther D A, et al. Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease [J]. *Wound repair and regeneration*, 2010, 18(2): 139-153
- [15] Igota S, Tosa M, Murakami M, et al. Identification and characterization of Wnt signaling pathway in keloid pathogenesis [J]. *International journal of medical sciences*, 2013, 10(4): 344-354
- [16] Monga S P. beta-Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148 (7): 1294-1310
- [17] Vilchez V, Turcios L, Marti F, et al. Targeting Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment [J]. *World journal of gastroenterology* : WJG, 2016, 22(2): 823-832
- [18] Yang Y, Yang J J, Tao H, et al. New perspectives on beta-catenin control of cell fate and proliferation in colon cancer [J]. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 2014, 74: 14-19
- [19] Cruciat C M. Casein kinase 1 and Wnt/beta-catenin signaling[J]. *Current opinion in cell biology*, 2014, 31: 46-55
- [20] Zhang K, Zhang J, Han L, et al. Wnt/beta-catenin signaling in glioma [J]. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 2012, 7(4): 740-749
- [21] Lam A P, Gottardi C J. beta-catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target [J]. *Current opinion in rheumatology*, 2011, 23(6): 562-567
- [22] Tao H, Yang J J, Shi K H, et al. Wnt signaling pathway in cardiac fibrosis: New insights and directions [J]. *Metabolism: clinical and experimental*, 2016, 65(2): 30-40
- [23] Sun X J, Wang Q, Guo B, et al. Identification of skin-related lncRNAs as potential biomarkers that involved in Wnt pathways in keloids [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(21): 34236-34244
- [24] Li P, He Q, Luo C, et al. Differentially expressed miRNAs in acute wound healing of the skin: a pilot study [J]. *Medicine*, 2015, 94(7): e458
- [25] Lin X, Zha Y, Zeng X Z, et al. Role of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in inducing apoptosis and renal fibrosis in 5/6-nephrectomized rats[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(6): 3575-3582
- [26] Li X, Zhang X, Liu X, et al. Caudatin induces cell apoptosis in gastric cancer cells through modulation of Wnt/beta-catenin signaling[J]. *Oncology reports*, 2013, 30(2): 677-684
- (上接第 2605 页)
- [22] 许赤,杨扬,易述红,等.稳定大鼠肝移植模型的规范及移植肝灌注方式比较[J].*南方医科大学学报*, 2006, 26(11): 1556-1558
Xu Chi, Yang Yang, Yi Shu-hong, et al. Standardization of rat stable orthotopic liver transplantation model and comparison of the effect of two liver graft perfusion methods [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2006, 26(11): 1556-1558
- [23] 陈强星,李坤,孔伟浩,等.单人直视下改良建立大鼠原位肝移植模型[J].*中华肝脏外科手术学电子杂志*, 2017, 6(2): 127-133
Chen Qiang-xing, Li Kun, Kong Wei-hao, et al. Modified approach for establishment of rat models with orthotopic liver transplantation under direct vision of single operator[J]. *Chin J Hepat Surg(Electronic Edition)*, 2017, 6(2): 127-133
- [24] Czigany Z, Iwasaki J, Yagi S, et al. Improving research practice in rat orthotopic and partial orthotopic liver transplantation: a review, recommendation, and publication guide [J]. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes*, 2015, 55(1-2): 119-138
- [25] Yu E, Ueta H, Kimura H, et al. Graft-versus-host disease following liver transplantation: development of a high-incidence rat model and a selective prevention method [J]. *Am J Transplant*, 2017, 17(4): 979-991
- [26] Ma B, Yang JY, Song WJ, et al. Combining Exosomes Derived from Immature DCs with donor antigen-specific treg cells induces tolerance in a rat liver allograft model[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32971
- [27] Tang J, Yang R, Lv L, et al. Transforming growth factor- β -expressing mesenchymal stem cells induce local tolerance in a rat liver transplantation model of acute rejection [J]. *Stem Cells*, 2016, 34 (11): 2681-2692
- [28] 白建华,陈刚,朱新锋,等.原位肝移植模型的建立技巧与改进[J].*中国组织工程研究*, 2015, 19(40): 6526-6530
Bai Jian-hua, Chen Gang, Zhu Xin-feng, et al. Techniques and improvements of establishing orthotopic liver transplantation rat models [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2015, 19(40): 6526-6530
- [29] Yoshimura N, Matsui S, Hamashima T, et al. The effects of perioperative portal venous inoculation with donor lymphocytes on renal allograft survival in the rat. I. specific prolongation of donor grafts and suppressor factor in the serum [J]. *Transplantation*, 1990, 49 (1): 167-71
- [30] 许永刚,翁明哲,徐军明,等.单人建立大鼠原位肝移植模型的手术体会[J].*现代生物医学进展*, 2012, 12(16): 3026-3028
Xu Yong-gang, Weng Ming-zhe, Xu Jun-ming, et al. Technique of orthotopic liver transplantation in rats operated by one person without surgical microscope [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12 (16): 3026-3028