

分泌型卷曲相关蛋白重组腺病毒载体对小鼠肝纤维化的抑制作用

毕婉蓉, 杨长青, 邢海林

毕婉蓉, 同济大学附属同济医院分院消化科 上海市 200092
杨长青, 同济大学附属同济医院消化内科 上海市 200065
邢海林, 同济大学附属同济医院普外科 上海市 200065
毕婉蓉, 副主任医师, 主要从事肝纤维化的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 8107034
上海市同济医院横向基金资助项目, No. HX1401
作者贡献分布: 毕婉蓉与杨长青对此文所作贡献均等; 此课题由毕婉蓉与杨长青设计; 研究过程由毕婉蓉与邢海林操作完成; 研究所用新试剂与分析工具由杨长青提供; 数据分析由毕婉蓉完成; 本论文写作由毕婉蓉完成。
通讯作者: 杨长青, 教授, 主任医师, 博士生导师, 200065, 上海市普陀区新村路389号, 同济大学附属同济医院消化内科。
cqyang@tongji.edu.cn
电话: 021-65981346
收稿日期: 2014-08-06 修回日期: 2014-08-22
接受日期: 2014-09-03 在线出版日期: 2014-10-18

Transfection with recombinant adenovirus vector expressing secreted frizzled related protein inhibits liver fibrosis in mice

Wan-Rong Bi, Chang-Qing Yang, Hai-Lin Xing

Wan-Rong Bi, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200092, China
Chang-Qing Yang, Department of Internal Medicine, Tongji Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200065, China
Hai-Lin Xing, Department of General Surgery, Tongji Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200065, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 8107034; Shanghai Tongji Hospital Fund, No. HX1401
Correspondence to: Chang-Qing Yang, Professor, Chief Physician, Department of Internal Medicine, Tongji Hospital Affiliated to Tongji University, 389 Xincun Road, Putuo District, Shanghai 200065, China. cqyang@tongji.edu.cn
Received: 2014-08-06 Revised: 2014-08-22
Accepted: 2014-09-03 Published online: 2014-10-18

Abstract

AIM: To construct a recombinant adenovirus vector expressing secreted frizzled related protein (SFRP), and to assess the inhibitory effect of SFRP overexpression on experimental hepatic fibrosis (HF) in mice.

METHODS: Liposome-mediated transfection was used to introduce recombinant adenovirus pAd-Track-PPAR γ 2-CMV carrying the *SFRP5* gene into liver cells from mice with CCl₄ induced HF to obtain recombinant adenovirus infected HF cells. Western blot, immunofluorescence microscopy and confocal laser microscopy were used to analyze the inhibitory effect of SFRP overexpression on experimental HF.

RESULTS: Cells infected with the recombinant adenovirus vector had higher expression of SFRP5 protein. Double immunofluorescence showed SFRP5 over expression inhibited the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and fibroblast-specific protein-1 (FSP-1) in liver cells. Pathological examination revealed that SFRP5 over expression significantly reduced the occurrence of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in liver cells (SFRP group *vs* control group, $P < 0.05$).

CONCLUSION: We have successfully constructed a recombinant adenovirus containing the *SFRP5* gene, and it can effectively increase the expression of *SFRP5* gene in mouse HF cells, thereby inhibiting the occurrence of EMT and HF.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Adenovirus; Hepatic fibrosis; Secreted frizzled related protein

Bi WR, Yang CQ, Xing HL. Transfection with recombinant adenovirus vector expressing secreted frizzled related protein inhibits liver fibrosis in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(29): 4379-4385 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4379.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i29.4379>

摘要

目的: 成功构建携带分泌型卷曲相关蛋白

背景资料
分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled related protein, SFRP)家族成员陆续在非洲爪蟾或其他个体如小鼠、人和鸡等物种中被发现和分离出来, 分别命名为SFRP1-5, 也被定义为凋亡相关蛋白(secreted apoptosis-related proteins, SARPs), 1997年首次克隆获得人的SARF1、SARF2、SARF3基因。我国目前对上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)诱导慢性肝病肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)发病机制进行了较多研究, 但是否SFRP参与EMT, 以及与HF是否相关, 国内外尚无报道。

同行评议者
高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝胆胰内科

研发前沿
随着对实验动物模型的观察越来越深入,发现EMT在HF中有重要作用,阻断甚至逆转EMT可为HF的治疗提供新的思路。SFRP是否参与HF时EMT逆转为本课题研究内容之一。

(secreted frizzled related protein, *SFRP*)基因的腺病毒载体,并探讨SFRP对实验性小鼠肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)的抑制作用。

方法:用脂质体转染法将重组腺病毒pAd-Track-PPAR γ 2-CMV和*SFRP5*基因共转染CCl $_4$ 诱导小鼠HF模型肝细胞,成功构建的重组腺病毒Ad-SFRP5感染HF细胞。采用Western blot、免疫荧光显微镜及激光共聚焦定位分析观察Ad-SFRP5抑制HF作用。

结果:感染的重组腺病毒载体在小鼠HF细胞中有较高的SFRP5蛋白的稳定表达。免疫双荧光显示Ad-SFRP5抑制HF小鼠肝细胞 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和成纤维细胞特异蛋白-1(fibroblast-specific protein-1, FSP-1)的表达。病理检测支持Ad-SFRP5抑制HF小鼠肝细胞上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)的发生(SFRP5处理组与正常对照组相比, $P < 0.05$)。

结论:我们成功构建含有小鼠*SFRP5*基因的重组腺病毒,他可有效提高小鼠HF细胞中*SFRP5*基因的表达水平,并可抑制EMT程序,从而抑制HF。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词:腺病毒;肝纤维化;分泌型卷曲相关蛋白

核心提示:本实验利用pAd-Easy腺病毒载体系统,通过PCR扩增分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled related protein, *SFRP*)基因,克隆到腺病毒载体pAd-Easy共转染肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)细胞,构建携带*SFRP5*基因的重组腺病毒,在体外感染小鼠HF细胞,以观察*SFRP5*基因表达情况以及对HF的抑制现象。

毕婉蓉, 杨长青, 邢海林. 分泌型卷曲相关蛋白重组腺病毒载体对小鼠肝纤维化的抑制作用. 世界华人消化杂志 2014; 22(29): 4379-4385 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4379.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i29.4379>

0 引言

分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled related protein, SFRP)家族成员陆续在非洲爪蟾或其他个体如小鼠、人和鸡等物种中被发现和分离出来,分别命名为SFRP1-5^[1],也被定义为凋亡相关蛋白(secreted apoptosis-related proteins,

SARPs)^[2],1997年首次克隆获得人的*SARPI*、*SARP2*、*SARP3*基因^[3]。我国目前对上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)诱导慢性肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)发病机制进行了较多研究,但是否SFRP参与EMT,以及HF是否相关,国内外尚无报道。本实验利用pAd-Easy腺病毒载体系统^[4],通过PCR扩增*SFRP5*基因,克隆到腺病毒载体pAd-Easy共转染HF细胞,构建携带*SFRP5*基因的重组腺病毒,在体外感染小鼠HF细胞,以观察*SFRP5*基因表达情况以及对HF的抑制现象。这将对于我们了解HF生理病理过程的发生机制,为该病诊断治疗提供策略和思路具有重要意义。

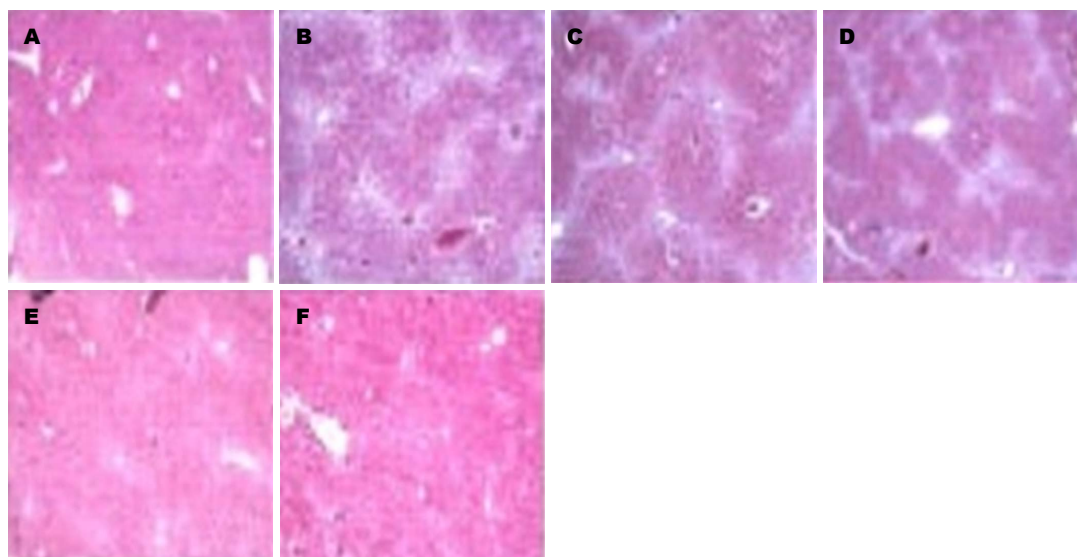
1 材料和方法

1.1 材料 SPF级健康SD δ 小鼠50只,体质量90 g \pm 10 g。购自及饲养于同济大学动物实验中心。动物合格证号: SCXK(粤)2004A084; pGBKT-SFRP5质粒(Takara公司,美国)感受态菌株; RPMI-1640培养基胎牛血清(Hyclon公司,美国);限制性核酸内切酶、T4 DNA连接酶、T4 DNA聚合酶、pMD18-T载体、DNA Marker DL2000、DNA Marker DL15000(Takara公司,美国); Lipofectamine2000、TRIzol及RT-PCR试剂(Invitrogen公司,美国);逆转录试剂盒(Fermentas公司,美国);兔抗人SFRP5多克隆抗体(CST公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 肝细胞分离与培养:分离制备SD小鼠原代肝细胞,参照改良的Seglen胶原酶灌注法^[5],并在分离方法上进一步改进:用0.05%胶原酶IV液灌注,完整切下肝脏并置其于37 $^{\circ}$ C恒温箱内消化至肝脏表面出现裂隙,加入一定量的4 $^{\circ}$ C高糖及胰岛素混合的DMEM液,将获得的肝细胞用含10%胎牛血清的新鲜F12培养液制成肝细胞悬液,用0.4%台盼兰染色计算细胞产量和存活率。传一代肝细胞按 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种,培养7 d后,用鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体, SABC法免疫细胞化学染色检测细胞纯度。肝细胞按 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种在100 mL培养瓶中,采用含10%FCS、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的DMEM培养液,在37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO $_2$ 、饱和湿度的恒温培养箱中培养。

1.2.2 SFRP5编码序列的扩增:采用Primer6.0软件设计扩增小鼠*SFRP5*基因氨基酸区域编码序



相关报道
SFRP5与HF之间的相互作用, 未见报道. 故深入研究SFRP5的生物学功能, 将为治疗慢性肝脏疾病提供新的机会.

图1 CCl₄诱导的小鼠0、8、12、16 wk时及12、16 wk时体外Ad-SFRP5抑制肝纤维化病理分级表现及半定量分析(Massion染色×200). A-D: CCl₄ 0、8、12、16 wk时诱导肝纤维化情况; E, F: SFRP5 12、16 wk时抑制肝纤维化情况.

列的特异性引物, 并在引物5'端引入保护性碱基和限制性酶切位点, 上游引物序列为: 5'-AA-GATCTTGCTGCAGGGCCCTG-3', 下游引物序列为: 5'-TGTCGACTAGCACTGCAGCTTGC-GGA-3', 以pGBKT-SFRP5质粒为模板进行PCR扩增.

1.2.3 SFRP5重组腺病毒表达载体的构建: 将扩增SFRP5产物克隆入pMD19-T载体, *Bgl* II和*Sal* I双酶切和PCR鉴定确认获得阳性重组克隆, 进而将SFRP5片段亚克隆至pAdTrack-CMV载体, *Bgl* II和*Sal* I双酶切鉴定并经测序确认获得阳性重组克隆, 10 mg pAdTrack-CMV-SFRP5重组质粒与0.1 mg骨架质粒pAd-Easy-1在感受态细胞BJ5183菌中进行同源重组, *Pac* I酶切鉴定阳性重组子, 再转化DH5 α 菌中扩增, 命名为Ad-SFRP5.

1.2.4 SFRP5重组腺病毒的包装与制备: 按照Lipofectamine2000试剂盒说明书, 取10 mg *Pac* I酶切线性化的Ad-SFRP5转染HF细胞, 免疫荧光显微镜观察, 根据绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)细胞病变效应判断病毒产生, 扩增腺病毒, 按组织半数感染量(tissue culture infective dose, TCID₅₀)法测定病毒滴度.

1.2.5 SFRP5重组腺病毒感染HF细胞: HF细胞在150 mL/L DMEM中培养24 h, 将Ad-SFRP5纯化病毒按其TCID₅₀值加入到细胞培养基中, 每15 min轻摇1次, 共4次, 4 h后换液.

1.2.6 免疫荧光染色: 膜通透处理: 0.1% Triton

X-100/PBS室温5 min; 5%-10%的山羊/驴血清及5%BSA封闭; 一抗孵育, 将组织标本同时用将兔抗FSP-1的Ab和小鼠抗 α -SMA的Ab混合在一起加到切片上, 覆盖, 4℃过夜; 二抗孵育, 加入生物素化的羊抗兔IgG. 所用LSCM型号为Bio-Rad MRC-1024, FITC的激发波长为488 nm. 用于图象采集的显微镜物镜为Plan-Neofluar 40×油浸镜, 数值孔径(numerical aperture, NA)为1.3, 扫描所用的激发值依据样本的不同可以在共聚焦系统提供的梯级值中选择.

统计学处理 全部调查结果及实验数据输入Excel数据库, 应用SPSS17.0软件, 计量资料以mean±SD表示, 均数比较两组间采用*t*检验、多组间比较采用方差分析; 计数资料组间频率比较用Fisher双侧确切检验; 频率变化趋势用 χ^2 检验. *P*<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 SFRP5重组腺病毒的成功构建及鉴定 用脂质体转染HF细胞有大量GFP表达, 并可见细胞变圆呈串珠样聚集, 裂解粗提物中提取重组病毒DNA, 病理Massion染色鉴定证实重组质粒在HF细胞转染成功(图1).

2.2 Ad-SFRP5抑制HF病理表现 Massion染色显示CCl₄诱导的HF小鼠0、8、12、16 wk时具有典型的HF病理分级表现. 体外Ad-SFRP5干扰时, 在12、16 wk时出现抑制HF病理表现(图1).

2.3 Ad-SFRP5抑制EMT 免疫双荧光检测对照

创新盘点
研究的重点在于不同SFRPs对Wnt信号的影响, 对HF时EMT有否相关性, 以及不同浓度下的双向反应及可能存在的剂量关系, 从而寻找抗HF的新措施。

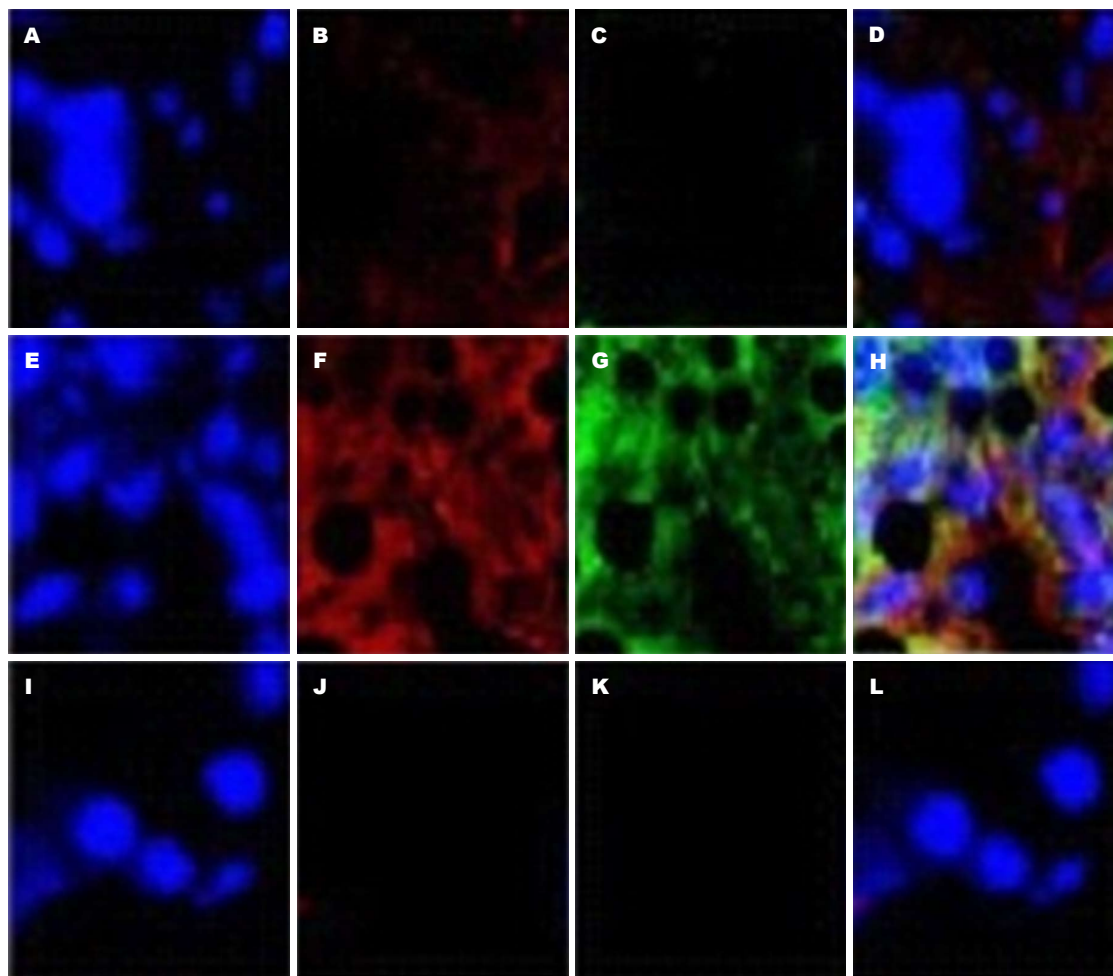


图2 免疫双荧光检测对照组、HF组及Ad-SFRP5组 α -SMA及FSP-1的表达($\times 400$)。A, E, I: 对照组、HF组及Ad-SFRP5组空白荧光图; B, F, J: 对照组、HF组及Ad-SFRP5组 α -SMA免疫荧光图; C, G, K: 对照组、HF组及Ad-SFRP5组FSP-1免疫荧光图; D, H, L: 空白、 α -SMA及FSP-1表达的Merge图。HF: 肝纤维化; α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白。

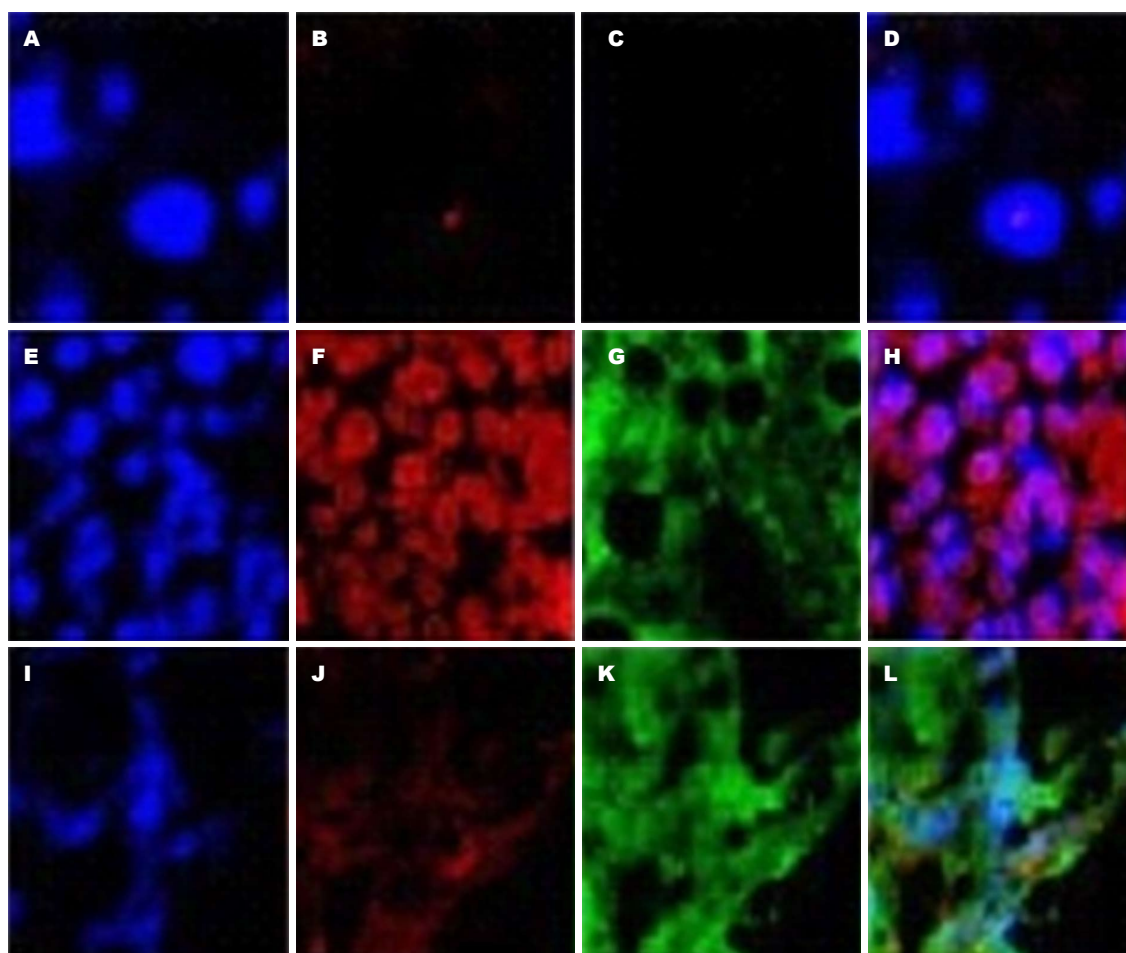
组、HF组及Ad-SFRP5组 α -SMA及FSP-1的表达显示HF组 α -SMA及FSP-1(EMT的标志物)表达增加, 而Ad-SFRP5组 α -SMA及FSP-1的表达明显减少, 半定量分析有统计学意义(图2)。同时免疫双荧光检测Ad-SFRP5在CCl₄诱导的HF小鼠8、16 wk时Ad-SFRP5对 α -SMA有明显抑制, 半定量分析有统计学意义(图3)。

3 讨论

我国是一个肝脏疾病的高发国家, 每年因HF以致发展成肝硬化给社会带来巨大的损失^[6], 目前仍缺乏有效的防治措施。HF是肝脏对慢性损伤的一种修复反应, 以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝内过多沉积为特征^[7]。HF为一动态过程, 属可逆性病变^[8]。因此阻断、抑制或逆转HF是治疗慢性肝病的一个重要目标^[9]。随着对实验动物模型观察越来越深入, 发现EMT在HF中有重要作用^[10], 阻断甚至逆转EMT可为

HF的治疗提供新的思路。SFRP是否参与HF时EMT逆转为本课题内容之一。

对Wnt信号与其他信号在EMT过程中的相互作用研究让我们更加全面了解EMT复杂性的同时还发现有些信号分子可以作为靶点来调节Wnt信号^[11]。本课题组对有关Wnt拮抗剂SFRP及其与HF关系的研究有了新的思路。SFRP类和DKK类是Wnt两大拮抗剂^[12]。前者包含SFRPs家族、WIF-1和Cerberus^[13], 可直接连接在Wnt蛋白上, 从而改变Wnt连接Wnt受体复合物的能力^[14]; 后者包含某些DKK家族蛋白^[15], 可结合Wnt受体复合物上的LRP5/6, 从而阻止Wnt信号的转导^[16]。SFRPs家族成员的结构虽然基本相似, 但所起的作用可能具有极大的差异性^[17], SFRPs家族成员不总是Wnt的拮抗剂^[18]。最近的研究发现, 低密度脂蛋白和WIF-1可与SFRPs协同作用而共同调控Wnt信号通路^[19], 这提示SFRPs家族对Wnt的调控活



同行评价
本研究设计合理,
方法科学, 结果可
靠, 具有较强的学
术价值。

图 3 免疫双荧光检测Ad-SFRP5在CCl₄诱导的HF小鼠0、8、16 wk时Ad-SFRP5对 α -SMA的抑制($\times 400$)。A, E, I: CCl₄诱导0、8、16 wk时空白荧光图; B, F, J: CCl₄诱导0、8、16 wk时 α -SMA的表达免疫荧光图; C, G, K: CCl₄诱导0、8、16 wk时Ad-SFRP5对 α -SMA表达的抑制; D, H, L: 空白、 α -SMA及Ad-SFRP5对 α -SMA表达抑制的Merge图。 α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白。

动并非单独存在, 其作用机制可能非常复杂。同时SFRPs之间的相反效应也可能影响Wnt表达^[20]。因此, 研究的重点在于不同SFRPs对Wnt信号的影响, 对HF时EMT与否相关性, 以及不同浓度下的双向反应及可能存在的剂量关系, 从而寻找抗HF的新措施。

SFRPs家族根据序列同源性分为3个亚群, 第1亚群^[21]: SFRP1(Fr α 、Fr β 、SARP2), SFRP2(SDF5、SARP1), SFRP5(SARP3); 第2亚群^[22]: SFRP3(Fz、Frzb、Frtiz)和SFRP4; 第3亚群^[23]: Sizzled、Sizzled2和Crescent。最近研究^[24]表明SFRP5是一种脂肪细胞因子, 前体脂肪细胞分化成熟过程中被强烈诱导表达; 其也可通过阻断脂肪组织Wnt信号通路, 促进脂肪细胞分化, 增加饮食诱导的肥胖^[25], SFRP5表达水平与肥胖和糖尿病相关^[26], 通过减弱非经典Wnt信号转导通路而减轻机体胰岛素抵抗^[27]。但SFRP5与HF之间的相互作用, 未见报道。故深入研究SFRP5

的生物学功能, 将为治疗慢性肝脏疾病提供新的机会。

SFRP5可能通过结构上有同源性的CRD与Wnt信号的特异性受体Fz竞争性结合, 发挥调控Wnt信号通路的作用^[28]。当SFRP5启动子发生甲基化进而诱导SFRP5基因沉默, 将导致Wnt信号异常表达^[29]。本课题组前期实验已经证明了Wnt信号传导机制参与了肝细胞EMT的诱导过程, 是HF发生EMT时的主要诱因之一。由于EMT在HF的发展过程中扮演重要角色^[30], 阻断甚至逆转EMT可为HF的治疗提供新的思路, 通过SFRP5调节Wnt信号通路, 可能成为抗HF的新方法。而且SFRP5有调控细胞凋亡的功能, 可能通过抑制Wnt3A信号通路调控细胞凋亡^[31]。

本研究构建SFRP5重组腺病毒载体, 在HF细胞中表达包装纯化病毒后成功构建了携带SFRP5重组腺病毒并且初步研究结果表明该重组病毒在体外能有效感染小鼠HF细胞, 受感

染细胞能高效稳定的表达重组蛋白, 免疫双荧光显示Ad-SFRP5抑制HF小鼠肝细胞 α -SMA和FSP-1的表达, 从而逆转EMT, 抑制HF. 病理检测支持Ad-SFRP5抑制HF小鼠肝细胞EMT的发生. 本研究说明SFRP5可能作为Wnt信号通路的抑制剂, 可通过调控Wnt信号转导通路参与EMT的逆转过程, 进一步抑制HF.

本课题组对有关Wnt拮抗剂SFRP5及其与HF关系的研究有了新的思路. 探讨SFRP5对HF肝细胞凋亡、增殖及分化的调节作用, 及对HF肝细胞功能的影响和机制的研究, 并对SFRP5参与调控HF过程中EMT的Wnt信号途径进行验证. 希望能够初步明确SFRP5在HF肝细胞表达的作用及相关机制, 为HF的形成和防治提供新的思路.

4 参考文献

- Ehrlund A, Mejhert N, Lorente-Cebrián S, Aström G, Dahlman I, Laurencikiene J, Rydén M. Characterization of the Wnt inhibitors secreted frizzled-related proteins (SFRPs) in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: E503-E508 [PMID: 23393180 DOI: 10.1210/jc.2012-3416]
- Kim BK, Yoon SK. Expression of sfrp2 is increased in catagen of hair follicles and inhibits keratinocyte proliferation. *Ann Dermatol* 2014; 26: 79-87 [PMID: 24648690 DOI: 10.5021/ad.2014.26.1.79]
- Mastri M, Shah Z, Hsieh K, Wang X, Wooldridge B, Martin S, Suzuki G, Lee T. Secreted Frizzled-related protein 2 as a target in antifibrotic therapeutic intervention. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014; 306: C531-C539 [PMID: 24336656 DOI: 10.1152/ajp-cell.00238.2013]
- Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007; 282: 23337-23347 [PMID: 17562716 DOI: 10.1371/journal.pone.0085906]
- Firincieli D, Boissan M, Chignard N. Epithelial-mesenchymal transition in the liver. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; 34: 523-528 [PMID: 20615641 DOI: 10.1016/j.gcb.2010.04.017]
- Varatharajulu R, Garige M, Leckey LC, Arellanes-Robledo J, Reyes-Gordillo K, Shah R, Lakshman MR. Adverse signaling of scavenger receptor class B1 and PGC1s in alcoholic hepatosteatosis and steatohepatitis and protection by betaine in rat. *Am J Pathol* 2014; 184: 2035-2044 [PMID: 24814604 DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.03.005]
- Kmieć Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001; 161: III-XIII, 1-151 [PMID: 11729749]
- Flehmig G, Scholz M, Klötting N, Fasshauer M, Tönjes A, Stumvoll M, Youn BS, Blüher M. Identification of adipokine clusters related to parameters of fat mass, insulin sensitivity and inflammation. *PLoS One* 2014; 9: e99785 [PMID: 24968098 DOI: 10.1371/journal.pone.0099785]
- Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Pérez-Hernández AI, Gurbindo J, Ramírez B, Méndez-Giménez L, Rotellar F, Valentí V, Moncada R, Martí P, Sola I, Silva C, Salvador J, Frühbeck G. Activation of noncanonical Wnt signaling through WNT5A in visceral adipose tissue of obese subjects is related to inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: E1407-E1417 [PMID: 24840810 DOI: 10.1210/jc.2014-1191]
- Gerdes S, Laudes M, Neumann K, Baurecht H, Mrowietz U. Wnt5a--a potential factor linking psoriasis to metabolic complications. *Exp Dermatol* 2014; 23: 438-440 [PMID: 24750404 DOI: 10.1111/exd.12413]
- Ge WS, Wang YJ, Wu JX, Fan JG, Chen YW, Zhu L. β -catenin is overexpressed in hepatic fibrosis and blockage of Wnt/ β -catenin signaling inhibits hepatic stellate cell activation. *Mol Med Rep* 2014; 9: 2145-2151 [PMID: 24691643 DOI: 10.3892/mmr.2014.2099]
- MadanKumar P, NaveenKumar P, Manikandan S, Devaraj H, NiranjaliDevaraj S. Morin ameliorates chemically induced liver fibrosis in vivo and inhibits stellate cell proliferation in vitro by suppressing Wnt/ β -catenin signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014; 277: 210-220 [PMID: 24657339 DOI: 10.1016/j.taap.2014.03.008]
- Jian YC, Wang JJ, Dong S, Hu JW, Hu LJ, Yang GM, Zheng YX, Xiong WJ. Wnt-induced secreted protein 1/CCN4 in liver fibrosis both in vitro and in vivo. *Clin Lab* 2014; 60: 29-35 [PMID: 24600972]
- Sun X, He Y, Ma TT, Huang C, Zhang L, Li J. Participation of miR-200a in TGF- β 1-mediated hepatic stellate cell activation. *Mol Cell Biochem* 2014; 388: 11-23 [PMID: 24242045]
- Miao CG, Yang YY, He X, Huang C, Huang Y, Zhang L, Lv XW, Jin Y, Li J. Wnt signaling in liver fibrosis: progress, challenges and potential directions. *Biochimie* 2013; 95: 2326-2335 [PMID: 24036368]
- Arellanes-Robledo J, Reyes-Gordillo K, Shah R, Domínguez-Rosales JA, Hernández-Nazara ZH, Ramirez F, Rojkind M, Lakshman MR. Fibrogenic actions of acetaldehyde are β -catenin dependent but Wingless independent: a critical role of nucleoredoxin and reactive oxygen species in human hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 1487-1496 [PMID: 23880292]
- Shih YL, Hsieh CB, Yan MD, Tsao CM, Hsieh TY, Liu CH, Lin YW. Frequent concomitant epigenetic silencing of SOX1 and secreted frizzled-related proteins (SFRPs) in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 551-559 [PMID: 23215838 DOI: 10.1111/jgh.12078]
- Reyes-Gordillo K, Shah R, Arellanes-Robledo J, Hernández-Nazara Z, Rincón-Sánchez AR, Inagaki Y, Rojkind M, Lakshman MR. Mechanisms of action of acetaldehyde in the up-regulation of the human α 2(I) collagen gene in hepatic stellate cells: key roles of Ski, SMAD3, SMAD4, and SMAD7. *Am J Pathol* 2014; 184: 1458-1467 [PMID: 24641900 DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.01.020]
- Shah R, Reyes-Gordillo K, Arellanes-Robledo J, Lechuga CG, Hernández-Nazara Z, Cotty A, Rojkind M, Lakshman MR. TGF- β 1 up-regulates the expression of PDGF- β receptor mRNA and induces a delayed PI3K-, AKT-, and p70(S6K)-dependent

- proliferative response in activated hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2013; 37: 1838-1848 [PMID: 23895226 DOI: 10.1111/acer.12167]
- 20 Awuah PK, Rhieu BH, Singh S, Misse A, Monga SP. β -Catenin loss in hepatocytes promotes hepatocellular cancer after diethylnitrosamine and phenobarbital administration to mice. *PLoS One* 2012; 7: e39771 [PMID: 22761897 DOI: 10.1371/journal.pone.0039771]
- 21 Fontenot E, Rossi E, Mumper R, Snyder S, Siamakpour-Reihani S, Ma P, Hilliard E, Bone B, Ketelsen D, Santos C, Patterson C, Klauber-DeMore N. A novel monoclonal antibody to secreted frizzled-related protein 2 inhibits tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2013; 12: 685-695 [PMID: 23604067 DOI: 10.1158/1535-7163]
- 22 Xavier CP, Melikova M, Chuman Y, Üren A, Baljinyam B, Rubin JS. Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/ β -catenin signaling. *Cell Signal* 2014; 26: 94-101 [PMID: 24080158 DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.09.016]
- 23 Saito T, Mitomi H, Imamhasan A, Hayashi T, Mitani K, Takahashi M, Kajiyama Y, Yao T. Downregulation of sFRP-2 by epigenetic silencing activates the β -catenin/Wnt signaling pathway in esophageal basaloid squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2014; 464: 135-143 [PMID: 24464051 DOI: 10.1007/s00428-014-1538-1]
- 24 Li X, Lu P, Li B, Zhang W, Luo K. Effects of iodine-125 seeds on the methylation of SFRP2 and P16 in colorectal cancer. *Exp Ther Med* 2013; 6: 1225-1228 [PMID: 24223648]
- 25 Lee DO, Kim H, Ku SY, Kim SH, Kim JG. Association between polymorphisms in sclerostin, dickkopfs and secreted frizzled-related protein genes and bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Gynecol Obstet Invest* 2014; 77: 186-193 [PMID: 24662300 DOI: 10.1159/000358389]
- 26 Lopez-Mejia IC, de Toledo M, Chavey C, Lapasset L, Cavelier P, Lopez-Herrera C, Chebli K, Fort P, Beranger G, Fajas L, Amri EZ, Casas F, Tazi J. Antagonistic functions of LMNA isoforms in energy expenditure and lifespan. *EMBO Rep* 2014; 15: 529-539 [PMID: 24639560 DOI: 10.1002/embr.201338126]
- 27 Prats-Puig A, Soriano-Rodríguez P, Carreras-Badosa G, Riera-Pérez E, Ros-Miquel M, Gomila-Borja A, de Zegher F, Ibáñez L, Bassols J, López-Bermejo A. Balanced duo of anti-inflammatory SFRP5 and proinflammatory WNT5A in children. *Pediatr Res* 2014; 75: 793-797 [PMID: 24603290 DOI: 10.1038/pr.2014.29]
- 28 Chu DT, Malinowska E, Gawronska-Kozak B, Kozak LP. Expression of adipocyte biomarkers in a primary cell culture models reflects pre-weaning adipobiology. *J Biol Chem* 2014; 289: 18478-18488 [PMID: 24808178 DOI: 10.1074/jbc.M114.555821]
- 29 Kwon YJ, Lee SW, Park YB, Lee SK, Park MC. Secreted frizzled-related protein 5 suppresses inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through down-regulation of c-Jun N-terminal kinase. *Rheumatology (Oxford)* 2014; 53: 1704-1711 [PMID: 24764263 DOI: 10.1093/rheumatology/keu167]
- 30 Bi WR, Yang CQ, Shi Q. Transforming growth factor- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition in hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology* 2012; 59: 1960-1963 [PMID: 22369740 DOI: 10.5754/hge11750]
- 31 Peng C, Xiao X, Kang B, He S, Li J. Serum secreted frizzled-related protein 5 levels differentially decrease in patients with hepatitis B virus-associated chronic infection and hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 2014; 8: 1340-1344 [PMID: 25120720 DOI: 10.1007/s13277-014-1767-6]

编辑 郭鹏 电编 都珍珍

