

ZNRF3 在类风湿关节炎滑膜组织与细胞表达及意义

许静¹, 梁翼¹, 杨茂益¹, 李强²

(四川省骨科医院, 四川 成都 610041 1 风湿骨关节病科; 2 膝关节运动损伤科)

[摘要] 目的 分析锌指环指蛋白 3(ZNRF3)在类风湿关节炎(RA)滑膜组织和细胞中表达及其与疾病发生的关系。方法 选择 2018 年 3 月—2020 年 3 月我院收治的一侧 RA 膝关节病变病人 20 例,根据病人病灶位置分为观察组(RA 侧)与对照组(C 侧),收集两组滑膜组织、成纤维样滑膜细胞(FLS)并鉴定滑膜细胞,分别采用实时定量聚合酶链反应(qPCR)和 Western blot 方法检测两组滑膜组织和 FLS 中 ZNRF3 的 mRNA 和蛋白表达。结果 RA 病人观察组的免疫组化评分、滑膜组织中 ZNRF3 的 mRNA 和蛋白表达均明显高于对照组,差异均有统计学意义($t=8.963\sim 105.292, P<0.05$);RA 侧 FLS 中 ZNRF3 的 mRNA 和蛋白表达明显高于 C 侧 FLS,差异均有统计学意义($t=43.330, 62.721, P<0.05$)。结论 RA 病人病变侧滑膜组织和 FLS 中的 ZNRF3 表达量明显升高,可能与 Wnt 信号通路过度激活诱导 ZNRF3 生成增加,以及负反馈调节 Wnt 通路活性有关。

[关键词] 关节炎, 类风湿; 锌指环指蛋白 3; 滑膜; 滑膜细胞; Wnt 信号通路

[中图分类号] R593.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2021)05-0697-06

doi:10.11712/jms.2096-5532.2021.57.175

[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]



[网络出版] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1517.R.20211029.1732.004.html>; 2021-11-01 15:55:01

ZINC AND RING FINGER 3 EXPRESSION IN SYNOVIAL TISSUES AND CELLS OF RHEUMATOID ARTHRITIS AND ITS RELATIONSHIP WITH DISEASE OCCURRENCE XU Jing, LIANG Yi, YANG Maoyi, LI Qiang (Department of Rheumatology and Osteoarthritis, Sichuan Orthopedic Hospital, Chengdu 610041, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate zinc and ring finger 3 expression in synovial tissues and cells of rheumatoid arthritis (RA) and its relationship with disease occurrence. **Methods** A total of 20 RA patients with unilateral knee joint disease in our hospital from March 2018 to March 2020 were selected, and classified into lesion side (Lesion) and control side (C). The synovial tissues and fiber-like synovial cells (FLS) were collected, and synovial cells were identified. Then the expression of ZNRF3 in synovial tissues and FLS was analyzed. **Results** The expression of synovial ZNRF3 in the immunohistochemical, qPCR and WB results of Lesion group was significantly higher than that of C group ($t=8.963-105.292, P<0.05$). The expression of ZNRF3 of Lesion-FLS in qPCR and WB results was significantly higher than that of C-FLS ($t=43.330, 62.721; P<0.05$). **Conclusion** The high expression of ZNRF3 in synovial tissues and FLS of the affected side of RA patients is speculated to be related to the increased production of ZNRF3 caused by over-activation of Wnt signaling pathway, which can be improved through the negative feedback regulation of Wnt pathway activity.

[KEY WORDS] arthritis, rheumatoid; zinc and ring finger 3; synovial membrane; synoviocytes; Wnt signaling pathway

类风湿关节炎(RA)是人体关节滑膜病变出现的慢性炎症反应,导致病人出现不同程度关节破坏的疾病^[1-2]。目前我国 RA 患病率为 0.42%,病程越长病人致残率越高,其中病程超过 15 年者致残率可高达 61.3%^[3-4]。既往资料显示,成纤维样滑膜细胞(FLS)在 RA 病人中呈病态上升,而其凋亡下降,形成血管翳侵蚀软骨,最终导致关节功能障碍甚至丧失,严重影响病人身心健康及生活质量^[5-6]。在 RA 中,激活 FLS 由多信号通路决定,而 Wnt 信号通路

具有重要性,被认为参与了 RA 发生发展^[6-7]。锌指环指蛋白 3(ZNRF3)是一种 Wnt 通路调控蛋白,可经泛素化降解细胞膜表面 Wnt 蛋白受体卷曲蛋白,从而对 Wnt 信号通路活性产生抑制作用^[8-9]。目前关于 ZNRF3 的研究主要集中于肿瘤细胞中,对 RA 研究较少。本研究探讨 ZNRF3 在 RA 病人滑膜组织及细胞中表达,并分析其与疾病发生的关系。现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 对象选择 2018 年 3 月—2020 年 3 月,选择我院收治一侧 RA 膝关节病变病人 20 例,男 6 例,

[收稿日期] 2021-01-25; **[修订日期]** 2021-09-27

[基金项目] 四川省中医药管理局科学技术研究项目(2021-MS349)

[第一作者] 许静(1983-),男,硕士,主治医师。

[通信作者] 梁翼(1963-),女,主任医师。E-mail:29861972@qq.com。

女 14 例,年龄(44.32±9.65)岁。红细胞沉降率为(39.84±16.56) mm/1 h, C 反应蛋白为(20.42±12.65)mg/L。根据病人病灶组织位置分为观察组(病变侧,RA 侧)与对照组(正常侧,C 侧)。纳入标准:①符合《2018 中国类风湿关节炎诊疗指南》中相关诊断标准^[10];②临床资料完整;③正常组织侧滑膜组织及检测部位无外伤,无其他炎症性疾病或一侧关节慢性疾病。排除标准:①其他肌肉骨骼疾病者;②合并重要脏器疾病者。本研究通过我院医学伦理委员会批准,所有病人及家属均知情同意。

1.1.2 主要试剂与仪器 包括免疫组化、实时定量聚合酶链反应(qPCR)、Western blot 方法的主要试剂与仪器。仪器:Rigel S2 流式细胞仪(上海睿钰生物科技有限公司),微量分光光度仪(美国哈希,DR 6000 型),光学显微镜(奥林巴斯,CX43 型),PCR 仪(美国罗氏,LC480 型)。试剂:Anti-ZNRF3 一抗(上海瑞齐生物技术有限公司),ZNRF3 二抗(微蒙上海生物科技有限公司),CD29、CD90 抗体(英国 BioLegend 公司),Vimentin、CD68 一抗(美国 Santa Cruz 公司),Ⅱ型胶原酶(美国 Sigma 公司),TRIzol 试剂(赛默飞世尔科技中国有限公司),RT Master Mix 试剂盒(上海力敏实业有限公司),GAPDH 一抗(武汉赛维尔公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 标本收集与处理 采用膝关节穿刺术收集 RA 病人两侧滑膜。将滑膜组织置入含体积分数为 0.10 双抗磷酸盐缓冲液(PBS)的离心管中(存放冰盒)送检。在生物安全柜中采用体积分数 0.10 的 PBS 清洗标本,并分离标本上血管和脂肪组织。将处理后标本分 3 份:第 1 份用于多聚甲醛固定;第 2 份处理成小块,放入冻存管中置液氮罐内 10 min,再置入-80℃冰箱中备用;第 3 份放入新培养皿中,用于提取 FLS。

1.2.2 苏木精-伊红(HE)染色及评分 RA 滑膜常规进行 HE 染色后,采用光学显微镜观察 RA 滑膜病理变化并记录。滑膜 HE 染色评分标准见表 1。

1.2.3 免疫组化染色 按照文献方法^[11]进行免疫组化染色。采用光镜高倍视野观察细胞改变。免疫组化染色半定量评分标准^[12]如下。阳性细胞百分比评分:0 分,无阳性细胞;1 分,阳性细胞<25%;2 分,阳性细胞 25%~50%;3 分,阳性细胞 51%~75%;4 分,阳性细胞>75%。阳性细胞染色强弱评分:0 分,无着色;1 分,淡黄色;2 分,棕黄色;3 分,棕

褐色。

1.2.4 FLS 分离与培养及细胞鉴定 FLS 分离及培养参考文献方法^[13]进行。细胞鉴定采用 PBS 清洗第 3 代冻存 FLS 共 2 次,胰蛋白酶消化后终止消化。1 200 r/min 离心 5 min,去培养基、PBS 清洗。加 1 mL 单细胞悬液,并加 CD90、CD29 抗体行免疫荧光染色,设阴性对照。避光孵育 20 min,用 PBS 清洗,加缓冲重悬液,采用 Rigel S2 流式细胞仪进行检测。

1.2.5 qPCR 检测 提取细胞 RNA 后去培养基, PBS 清洗后在培养板中滴入 500 μL 的 RA₂ 液混匀,吹打细胞移至内套管内。以 12 000 r/min 离心 1 min,去外套管中液体,内套管内滴 500 μL 洗脱液;重复操作 1 次。弃外套管,将内套管移入新 EP 管内,在膜中央加入洗脱液 30 μL,室温下静置后以 12 000 r/min 离心 1 min,获取细胞总 RNA。取 100 mg 组织剪碎研磨,加入 1 mL 的 TRIzol 震荡 30 s,室温放置至组织裂解。以 8 500 r/min 离心 5 min 取上清液,加氯仿 200 μL,震荡 30 s,室温放置;再离心 15 min 取上清液,加等量异丙醇,室温静置 10 min,再离心 10 min,弃上清液,加 500 μL 体积分数 0.75 的乙醇,离心 5 min;重复此操作。将沉淀存放室温晾干,加 10~20 μL 的 DEPC 液溶解 RNA 后,提取组织 RNA。应用微量分光光度仪分别检测细胞和组织 RNA 浓度。使用 RT Master Mix 试剂盒,反转录 cDNA 保存于-20℃冰箱中备用。qPCR 反应采用两步法进行:①预变,195℃条件下持续 30 s;②PCR,40、90℃条件下进行 5 s 反应或 60℃条件下进行 30 s 反应。qPCR 反应体系按照试剂盒说明配制,所用引物及其序列见表 2。

表 1 RA 滑膜染色评分标准

病理变化	0	1	2	3(分)
炎性细胞浸润	无浸润	散浸润	较密集浸润	大量弥漫浸润
滑膜细胞增生	增生 1~2 层	增生 3~4 层	增生 5~7 层	增生>7 层
纤维组织增生	无增生	少量增生	中量增生	大量增生
新血管生成	无新生	少量新生	中量新生	大量新生

表 2 qPCR 扩增引物及其序列

名称	方向	序列(5'→3')
β-actin	F	CATGAGA AGTATGACA A CAGCCT
	R	AGTCTTCCACGATACCAA AGT
ZNRF3	F	GGACCCGAAACCATGCCTC
	R	TCTGCACCCTTCACATACACC

1.2.6 Western blot 方法 细胞、组织蛋白提取后

备用。取电泳缓冲液粉,参照说明书溶解于 1 L 纯水内制成电泳缓冲液。200 A 电泳 90 min 转膜后,取出膜用 50 g/L 脱脂牛奶室温封闭 2 h。加入一抗(1 : 2 000 GAPDH 抗体,1 : 1 000 ZNRF3 抗体)4 ℃冰箱摇床上摇动孵育 10 h。次日洗膜 3 次,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1 : 2 000),室温孵育 2 h,再洗膜 3 次。取 ECL 试剂 A、B 底物液 1 : 1 混匀,将冲洗后的膜置入避光反应后进行显影。使用 Adobe Photoshop 测量各条带灰度值,采用相对灰度值表示蛋白表达量。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析。计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两侧滑膜组织 HE 染色评分比较

观察组炎性细胞浸润、纤维组织增生、滑膜细胞增生和新生血管形成等评分均高于对照组,差异均有统计学意义($t = 54.243 \sim 98.522, P < 0.05$)。见表 3 和图 1。

表 3 病人两侧 HE 染色评分比较($n = 20$,分, $\bar{x} \pm s$)

组别	炎性细胞浸润	纤维组织增生	滑膜细胞增生	新生血管形成
对照组	1.27±0.47	0.57±0.48	0.41±0.38	0.34±0.31
观察组	2.81±0.39*	2.02±0.48*	2.71±0.67*	2.27±0.52*

与对照组比较,* $t = 54.243 \sim 98.522, P < 0.05$ 。

2.2 FLS 细胞形态观察

本研究观察到 FLS 细胞核呈卵圆形,位于细胞中部,细胞形态呈梭形、星形和纺锤状,边界清晰,周围见聚集性分泌物,还混杂卵圆形巨噬样滑膜细胞(MLS)。细胞传至第 3 代,MLS 分裂、增殖作用丧失,其后 FLS、RA-FLS、C-FLS 细胞形态相似。从

原代 FLS 细胞图可见观察组(图 2a、b)生长速度较对照组(图 2c、d)增快。

2.3 FLS 细胞鉴定

本研究的细胞检测抗体为 CD90、CD29,用于第 3 代 RA-FLS、C-FLS 细胞鉴定,若两者阳性率超过 90%,则表示提取细胞为纯化 FLS。本文检测结果表明,CD90、CD29 两者阳性率为 93.19%,提示提取细胞为纯化 FLS。见图 3。

2.4 ZNRF3 在病人两侧滑膜组织表达比较

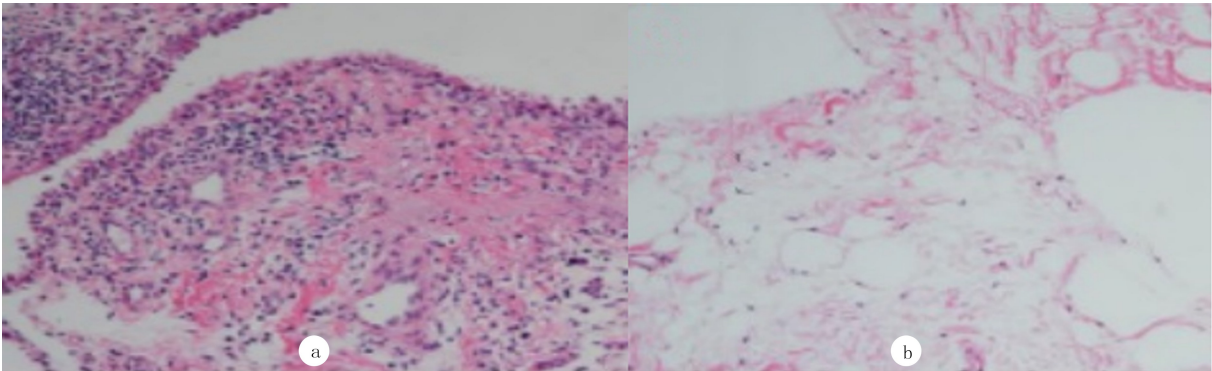
ZNRF3 在观察组的免疫组化评分、mRNA 和蛋白表达均明显高于对照组,差异均有统计学意义($t = 8.963 \sim 105.292, P < 0.05$)。见表 4 和图 4。

2.5 ZNRF3 在病人两侧滑膜 FLS 细胞中的分布与表达

免疫荧光法检测结果显示,ZNRF3(荧光绿)在 RA-FLS 和 C-FLS 的质膜、细胞质均有表达,但 RA-FLS 的荧光明显强于 C-FLS。见图 5。qPCR 和 Western blot 检测结果表明,ZNRF3 在 RA-FLS 的 mRNA 和蛋白表达量均明显高于 C-FLS,差异均有统计学意义($t = 43.330、62.721, P < 0.05$)。见表 5 和图 6。

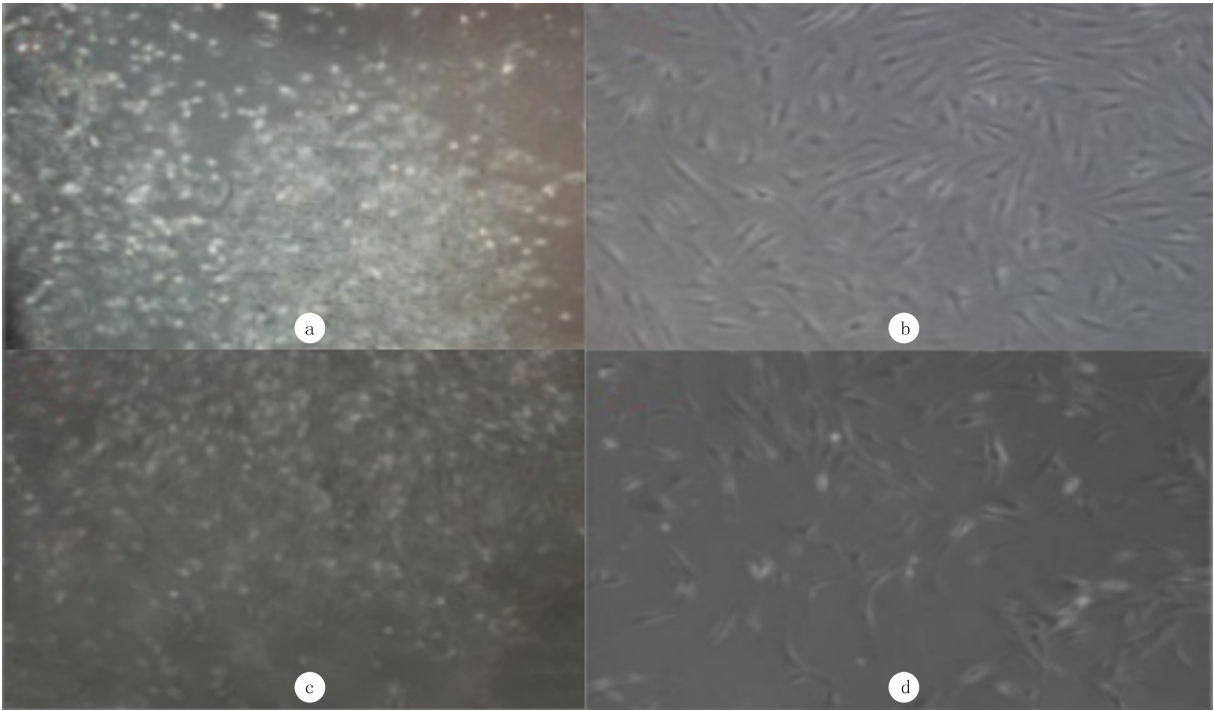
3 讨 论

ZNRF3 是一种调控蛋白,其细胞外结构与 R 脊柱蛋白相互作用,与富含亮氨酸的 G 蛋白偶联受体生成复合物,致使 ZNRF3 自动膜清除、泛素化,使胞膜表面卷曲受体蛋白稳定,维持 Wnt 信号活性通路;细胞表面 ZNRF3 结合巢乱蛋白某区,识别 Wnt 巢乱蛋白,诱导该蛋白泛素化降解,从而抑制 Wnt 信号通路^[14-16]。有学者认为,ZNRF3 对 Wnt/ β -catenin、Wnt/PCP 信号通路呈负性调控性^[17]。目前关于 ZNRF 的研究以肿瘤为主。已有学者指



a、b 分别为 RA 患病侧和对照侧滑膜。HE 染色,200 倍。

图 1 RA 病人两侧滑膜组织 HE 染色



a、b 为 RA 病人患病侧 FLS 细胞,c、d 为病人对照侧原代 FLS 细胞。免疫组化染色,400 倍。

图 2 FLS 细胞形态观察

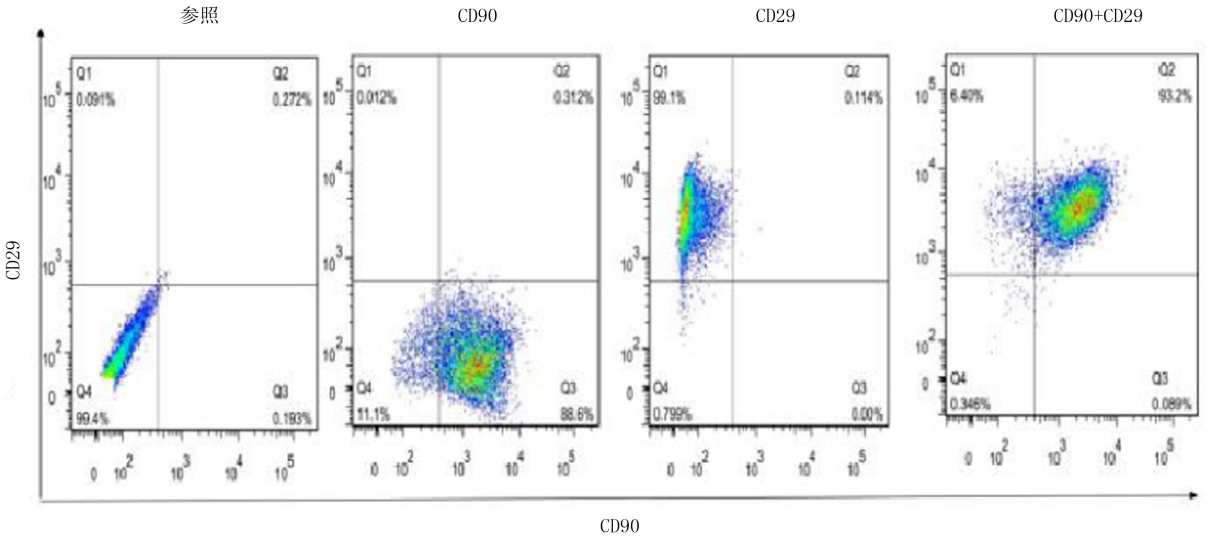


图 3 FLS 流式细胞检测

表 4 ZNRF3 在病人两侧滑膜组织表达比较($n=20, \bar{x} \pm s$)

组别	免疫组化评分	mRNA	蛋白
对照组	1.52 ± 0.89	0.0032 ± 0.0010	0.0002 ± 0.0010
观察组	$4.10 \pm 1.56^*$	$0.0055 \pm 0.0020^*$	$0.0083 \pm 0.0030^*$

与对照组比较, $*t=8.963 \sim 105.292, P<0.05$ 。

表 5 ZNRF3 在病人两侧滑膜 FLS 细胞中的表达($n=20, \bar{x} \pm s$)

组别	mRNA	蛋白
对照组	0.03 ± 0.01	0.0002 ± 0.0001
观察组	0.07 ± 0.02	0.0050 ± 0.0020

与对照组比较, $*t=43.330, 62.721, P<0.05$ 。

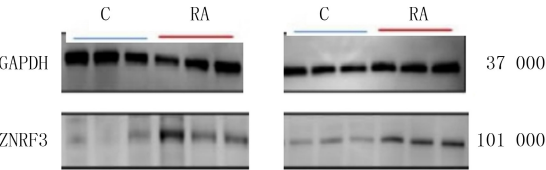
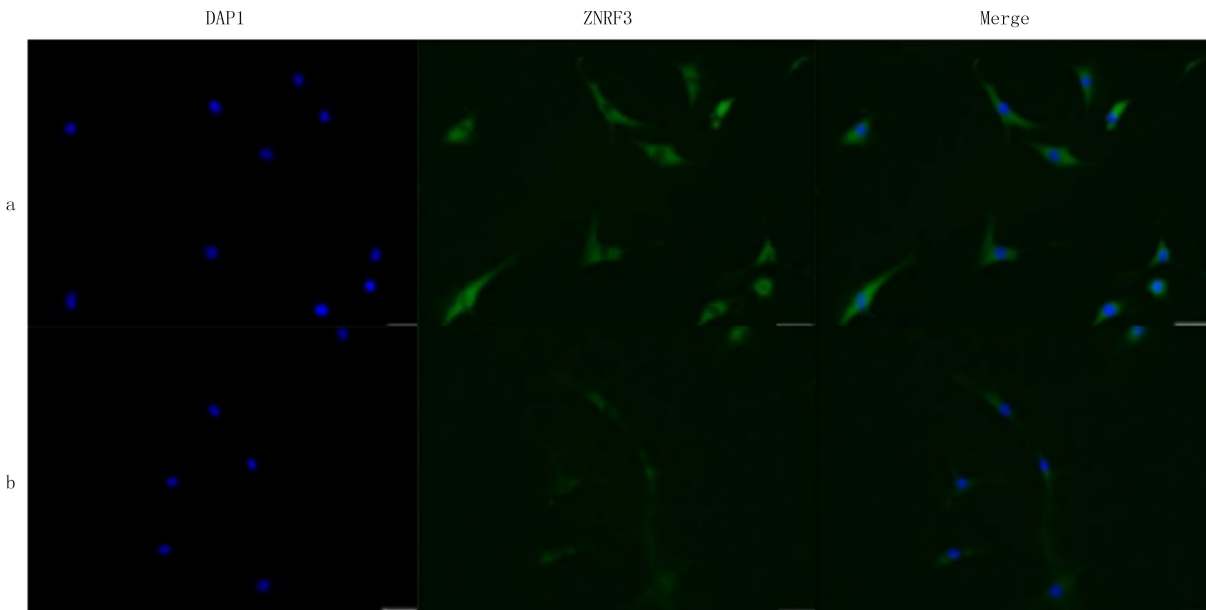


图 4 Western blot 检测 ZNRF3 蛋白在病人两侧滑膜组织表达

出,在肿瘤疾病中 R-spondin-ZNRF3 板块常发生突变^[18]。有研究表明,ZNRF3 对 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控属负性,其在肿瘤组织中表达不尽相同^[19]。有学者对乳头状甲状腺癌组织与正常甲状



a:RA-FLS;b:C-FLS。DAPI:4,6-二脒基-2-苯基吲哚染色;Merge 方法:重叠。免疫荧光染色,400 倍。

图 5 滑膜 FLS 的免疫荧光检测

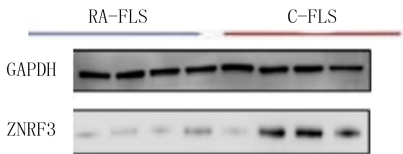


图 6 Western blot 检测 ZNRF3 蛋白在 RA-FLS 和 C-FLS 表达

腺组织的研究结果显示,ZNRF3 在乳头状甲状腺癌组织内呈下调,且与其分化等级呈负相关^[20-21]。而 ZNRF3 在原发性结直肠癌表达上调^[22]。ZNRF3 在骨关节的研究有待明确,但考虑 RA 病变与 Wnt 信号通路存在联系,推测 ZNRF3 可能与 RA 病变的发生发展有关。

本研究对膝关节 RA 病人的 RA 侧与 C 侧滑膜组织、细胞采用免疫组化、qRCR 和 Westen blot 法研究显示,病人 RA 侧滑膜组织中 ZNRF3 表达高于 C 侧。相关研究已表明,RA 侧 Wnt 信号通路与其组织发病有关;在 RA 侧组织、FLS 中, β -catenin 表达上调,表示 Wnt 通路过度激活,并抑制 RA 侧的成骨细胞^[23-25]。由此推测,ZNRF3 在 RA 侧滑膜组织中表达增高与 Wnt 信号通路在滑膜炎中过度激活相关,ZNRF3 在 RA 发病中可抑制被过度激活的 Wnt 通路,而且呈负增长表达^[26-27]。进一步分析 ZNRF3 在 RA 发病中的作用,采用酶消化从滑膜组织中分离原代 FLS 细胞,使用 II 型胶原酶将组织离散成单个细胞,并用含 FBS 培养基培养数天,使细胞贴壁达 80%~90%^[28-30]。本文光镜下观察显示,经 HE 染色的 RA 侧滑膜组织明显增生,细胞

层数增加,并见大量炎性细胞浸润滑膜间质中,且伴大量新生血管生成,部分组织中见淋巴滤泡形成、间质纤维化。本文应用流式细胞检测术、免疫荧光检测对第 3 代细胞进行鉴定,并观察 ZNRF3 在 FLS 中的表达,结果显示,RA-FLS 和 C-FLS 中 ZNRF3 均定位于细胞质和质膜,RA-FLS 中 ZNRF3 表达明显增高,而 C-FLS 中无明显表达,qRCR 与 Westen blot 检测结果也相同。上述结果均提示,激活 Wnt 信号通路后可诱导 ZNRF3 生成并在细胞核外分泌,从而调控 Wnt 信号通路活性。

总而言之,RA 病人病变侧滑膜组织、FLS 中的 ZNRF3 表达量升高,推测与 Wnt 信号通路过度激活诱导 ZNRF3 生成增加有关,而 ZNRF3 高表达可负反馈调节 Wnt 通路活性。

[参考文献]

[1] 李凌汉,麦培根,陈宝红. 雷公藤多甙联合免疫抑制剂治疗类风湿关节炎疗效及对炎性因子的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2017,26(10):1088-1090.

[2] 邵克忠,陈利民,李素蘋,等. 超声造影在类风湿关节炎腕关节活动期病变中的诊断价值[J]. 中华全科医学, 2018,16(6): 980-982,1035.

[3] 蔡辉,张群燕,郭郡浩,等. 类风湿关节炎患者外周血血浆中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-10 的表达及临床意义[J]. 中华中医药学刊, 2017,35(3):519-521.

[4] 刘洋,曹玲,张朝霞. 流式细胞 CD64 检测在鉴别类风湿关节炎合并感染中的意义[J]. 检验医学与临床, 2018,15(19):2872-2875.

[5] PARK S, CUI J, YU W S, et al. Differential activities and mechanisms of the four R-spondins in potentiating Wnt/ β -catenin signaling[J]. J Biol Chem, 2018,293(25):9759-9769.

[6] 赵紫琴,徐瑾,王瑞琳,等. 类风湿性关节炎滑膜组织中 NLRP3 炎性小体及下游因子 IL-1 β /IL-18 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2019,35(5):534-538.

[7] 李春龙,周洁,曹炬,等. IL-27 诱导人成纤维样滑膜细胞产生 IL-6 的免疫机制[J]. 重庆医科大学学报, 2018,43(6):824-828.

[8] 梁菁菁,肖涟波,陈勇,等. 环指蛋白 43 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞基质金属蛋白酶的影响[J]. 中华风湿病学杂志, 2019,23(4):217-219,C1.

[9] 朱林波,李鹏飞,张鹏斌,等. 环指蛋白 43 基因在肿瘤中的表达[J]. 中华全科医学, 2020,18(2):136-138.

[10] 中华医学会风湿病学分会. 2018 中国类风湿关节炎诊疗指南[J]. 中华内科杂志, 2018,57(4):242-251.

[11] 王曦晖,薛成,周凉仙,等. Netrin-1 在类风湿关节炎滑膜组织中的表达及作用研究[J]. 中国骨与关节杂志, 2020,9(2):114-118.

[12] 马雅茹,阿艳妮,张丽芳,等. 联合应用 P16/Ki-67 免疫组化染色对 CIN 分级诊断的影响及其与宫颈 HPV 感染的相关性分析[J]. 中国性科学, 2018,27(10):94-98.

[13] 黄宪章,王前,郑磊,等. 人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞培养及生物学特性研究[J]. 南方医科大学学报, 2009,29(3):462-465.

[14] HAO H X, XIE Y, ZHANG Y, et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner [J]. Nature, 2012,485(7397):195-200.

[15] SZENKER-RAVI E, ALTUNOGLU U, LEUSHACKE M, et al. Author Correction: RSPO2 inhibition of RNF43 and ZNRF3 governs limb development independently of LGR4/5/6 [J]. Nature, 2018,561(7722):E7.

[16] HARRIS A, SIGGERS P, CORROCHANO S, et al. ZNRF3 functions in mammalian sex determination by inhibiting canonical WNT signaling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018,115(21):5474-5479.

[17] CHANG L S, KIM M, GLINKA A, et al. The tumor suppressor PTPRK promotes ZNRF3 internalization and is required for Wnt inhibition in the Spemann organizer[J]. Elife, 2020,9: e51248.

[18] BASHAM K J, RODRIGUEZ S, TURCU A F, et al. A ZNRF3-dependent Wnt/ β -catenin signaling gradient is required for adrenal homeostasis[J]. Genes Dev, 2019,33(3/4):209-220.

[19] 刘立,盖金娜,尹作文,等. 趋化因子 CXCL5 调控 NF- κ B 与 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制肿瘤免疫促进胃癌的机制研究[J]. 肿瘤防治研究, 2020,47(5):340-345.

[20] 邱旺旺,杨治力,阎钧,等. ZNRF3 在甲状腺肿瘤组织中的表达以及在甲状腺癌细胞中的功能研究[J]. 国际肿瘤学杂志, 2016,43(4):246-249.

[21] LIANG J J, LI H R, CHEN Y, et al. ZNRF3 regulates collagen-induced arthritis through NF- κ B and Wnt pathways[J]. Inflammation, 2020,43(3):1077-1087.

[22] 李建华,田勇,李俊. LncRNA-POU3F3 在甲状腺癌组织中的表达情况及对预后的预测价值[J]. 中华地方病学杂志, 2021,40(7):540-544.

[23] 李正萍,袁慧慧. Wnt 信号通路及其在类风湿性关节炎中的作用进展[J]. 中国医药导报, 2019,16(36):29-32.

[24] BOND C E, MCKEONE D M, KALIMUTHO M, et al. RNF43 and ZNRF3 are commonly altered in serrated pathway colorectal tumorigenesis[J]. Oncotarget, 2016,7(43):70589-70600.

[25] 王凡,刘林,高维强. 前列腺癌细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路激活可增强细胞干性[J]. 肿瘤, 2019,39(7):525-533,567.

[26] BRONDANI V B, LACOMBE A M F, MARIANI B M P, et al. Low protein expression of both ATRX and ZNRF3 as novel negative prognostic markers of adult adrenocortical carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2021,22(3):1238.

[27] PAČÍKOVÁ P, RADASZKIEWICZ T W, POTĚIL D, et al. Roles of individual human Dishevelled paralogs in the Wnt signalling pathways[J]. Cell Signal, 2021,85(6):110058.

[28] SZENKER-RAVI E, ALTUNOGLU U, LEUSHACKE M, et al. RSPO2 inhibition of RNF43 and ZNRF3 governs limb development independently of LGR4/5/6[J]. Nature, 2018,557(7706):564-569

[29] COLOZZA G, KOO B K. Ub and Dub of RNF43/ZNRF3 in the WNT signalling pathway[J]. EMBO Rep, 2021,22(5): e52970.

[30] WANG Z W, WANG Y L, MA X L, et al. RSPO2 silence inhibits tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma by ZNRF3/Hedgehog-Gli1 signal pathway[J]. Life Sci, 2021,282(2):119817.

(本文编辑 于国艺)

医学学术论文引言的写作

引言是论文主体部分最前面的一段小短文,主要是起提纲挈领的作用,让读者了解本文研究的目的、范围和结果等信息,以引导读者阅读。引言的主要内容包括立题的缘由、背景和依据,研究方法和预期目的,以及本文创新价值和意义等。其叙述顺序如下。①缘由:提出一个问题(想到或遇到的);②背景:交代有关研究的历史和现状;③方法:用什么方法进行研究;④目的:达到什么目的。要求重点突出,评价客观,少用套话,勿与摘要雷同,首尾呼应。篇幅一般以 200~300 字为宜,不宜把引言写成小综述。