

基础研究

大鼠脊髓损伤后内源性神经干细胞增殖
过程中 Wnt-1 的表达

徐启飞, 周初松, 靳安民, 兰小勇, 吕志德

(南方医科大学珠江医院骨科中心 510282 广州市)

【摘要】目的:探讨大鼠脊髓损伤后信号蛋白 Wnt-1 的表达及其与脊髓内源性神经干细胞(ENSCs)早期增殖的关系。**方法:**30 只 Wister 成年大鼠,随机分为正常对照组(A 组, $n=5$)和损伤组(B 组, $n=25$)。A 组不损伤脊髓, B 组在大鼠 T10 采用经典 Allen's 打击法($25\text{g}\cdot\text{cm}$)造成脊髓损伤,于造模后 1d、3d、1 周、2 周、4 周进行取材,对距离损伤中心 5mm 的脊髓行免疫组化染色,检测 ENSCs 的增殖及 Wnt-1 蛋白表达的动态变化,与 A 组比较,并统计分析二者之间的相关性。**结果:**30 只大鼠均进入结果分析。A 组脊髓在中央管周围、外周软膜可见极少数 BrdU/Nestin 阳性细胞,白质中几乎没有。B 组中 BrdU/Nestin 阳性细胞于损伤后 24h 表达于室管膜以及软膜,灰质和白质亦有少量表达,3d 时明显增多,1 周达到高峰 ($P<0.05$),2 周开始逐渐下降,4 周时仍可见少量 BrdU/Nestin 阳性细胞。B 组各时间点与 A 组比较差异有显著性意义 ($P<0.05$)。B 组大鼠各时间点均有 Wnt-1 蛋白的表达,损伤后第 1 天开始表达,3d 达到高峰,直至脊髓损伤后 2 周 Wnt-1 都维持在较高的表达水平。Wnt-1 蛋白的表达与 Nestin 的表达具有相关性($r=0.893, P<0.05$)。**结论:**大鼠脊髓损伤后信号蛋白 Wnt-1 表达增加,其可能与大鼠 ENSCs 的早期增殖有关。

【关键词】脊髓损伤; Wnt-1; 内源性神经干细胞; Wnt 信号通路

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2009.02.14

中图分类号: R682.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2009)-02-0138-05

Expression of Wnt-1 in the proliferation process of endogenous neural stem cells after spinal cord injury in rats/XU Qifei, ZHOU Chusong, JIN Anmin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19(2): 138~142

【Abstract】 Objective: To investigate the expression of Wnt-1 in the earlier proliferation process of endogenous neural stem cell (ENSC) after spinal cord injury in rats. **Method:** 30 Wister rats were randomly divided into two groups, the normal control group (group A, $n=5$) and the spinal cord injury group (group B, $n=25$), the spinal cord injury were made at T10 level by Allen's method in group B. The rats were killed at 1d, 3d, 1, 2 and 4 weeks after the injury, the expression of Wnt-1 and the proliferation of ENSCs were analyzed in the samples by immunohistochemistry, which were harvested 5mm to the injury center of the spinal cord both cephalad and caudally. The statistical analysis was used to evaluate the correlation between the expression of Wnt-1 and the proliferation of ENSCs. **Result:** All 30 rats were involved in the result analysis. It was showed that BrdU/Nestin positive cells presented in every spinal cord injury group. The BrdU/Nestin positive cells began to increase on the first day after SCI and increased noticeably. On the 3rd day, it reached the peak on the 7th day, and gradually reduced on the 14th and 28th days. There were significantly differences in BrdU/Nestin positive cell between normal control group and SCI group ($P<0.05$). Wnt-1 positive cells expressed in every SCI group. It was showed a little expression of Wnt-1 positive cell on the first day after SCI. The level of Wnt-1 protein in NSCs increased significantly, peaked at 3 days and remained at high levels until 14 days after SCI. The level of nestin protein was closely correlated with the level of Wnt-1 protein ($r=0.893, P<0.05$). **Conclusion:** SCI can promote the proliferation of ENSCs in rats, which is correlated with the activation of Wnt signaling pathway.

【Key words】 Spinal cord injury; Wnt-1; Endogenous neural stem cells; Rat; Wnt signal pathway

第一作者简介: 男(1981-), 在读硕士, 研究方向: 脊髓损伤与修复

电话: (020)62782571 E-mail: qifeixudactor@yahoo.com.cn

通讯作者: 周初松

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Zhujiang Hospital of Nanfang Medical University, Guangzhou, 510282, China

近年来许多研究发现,在成年哺乳类动物包括人类在内的中枢神经系统中存在具有自我更新和分化潜能的神经干细胞(NSCs)。正常情况下这些 NSCs 处于静止状态,在损伤、缺血等刺激因素作用下其可以被激活,发生增殖、迁移、分化等一系列变化来替代坏死的神经细胞,修复损伤、恢复神经功能。但正常状况下这些激活的 NSCs 增殖能力非常有限,无法满足神经再生或修复的需要。因此探讨和明确内源性 NSCs(ENSCs)的分化、增殖机制从而促进其大量增殖就显得尤为重要。本实验分别以 5-溴脱氧尿嘧啶(5-bromodeoxyuridine, BrdU)和巢蛋白(neuroepithelial stem protein, Nestin)作为 NSCs 的增生标记物,利用免疫组化染色技术探讨大鼠脊髓损伤后 ENSCs 增殖过程中 Wnt-1 信号蛋白的表达情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

30 只 Wister 成年雌性大鼠(南方医科大学动物实验中心提供),体重 240~250g,随机分为正常对照组(A 组, $n=5$)和损伤组(B 组, $n=25$)。B 组按取材时间不同分为 1d、3d、1 周、2 周、4 周 5 个时间点,每个时间点 5 只。

1.2 主要试剂及仪器

磷酸盐缓冲液(PBS,武汉博士德生物工程有限公司)、BrdU(美国 Sigma 公司)、小鼠抗大鼠 BrdU 单克隆抗体(Santa Cruz)、小鼠抗大鼠 Nestin 单克隆抗体(Santa Cruz)、山羊抗大鼠 Wnt-1(Santa Cruz)、PV6003 两步法检测试剂盒(北京中杉金桥)、SP9000 通用型 SP 检测试剂盒(河北博海生物工程有限公司)、Kit29999 免疫组化双染试剂盒(福州迈新生物技术公司)、全自动照相装置(TE20002U 型, Nikon)、数字信号采集分析系统(AXIOV2MRC 型, ZEISS)。

1.3 动物模型制备

大鼠用 0.15% 的水合氯醛腹腔注射(300mg/kg)麻醉成功后,俯卧位固定在手术台上,仔细定位。消毒术区皮肤,于腰背部行正中入路,无菌条件下逐层切开皮肤、皮下组织至脊柱,充分暴露 T9~T11 节段,用手外科持针器咬开椎板至两侧关节突,充分暴露 T9~T11 节段脊髓。A 组彻

底止血后关闭切口;B 组采用 Allen^[1]重物坠落法,将 10g 砝码由 25mm 高度沿玻璃管坠落打击大鼠开放的 T10 节段脊髓,大鼠出现摆尾反射、双后肢及躯体回缩扑动后双后肢瘫痪,彻底止血后逐层缝合肌肉、皮肤。各组于术后 1h 经腹腔给予 2 万单位/kg 青霉素,2 次/d,连续 3d。饲养于配有空调的专用室,自由饮食。B 组麻醉苏醒后 BBB 评分 0 分则表明造模成功,每日膀胱区按压排尿 3 次至大鼠反射性膀胱形成。

1.4 运动评分

采用 BBB 运动评分法每天对各组动物进行评分至相应时间点。将大鼠放入一开口盆(底部为带条纹的地板),轻敲盆壁,使其爬行,每次 3min,通过观察动物的臀、膝、踝关节、行走、躯干运动及其协调情况进行打分,完全截瘫为 0 分,正常为 21 分。

1.5 组织标本的采集

将 BrdU 溶于生理盐水中配制成 1% 的溶液。在各时间点大鼠处死前 12h 腹腔注射 50mg/kg BrdU,每 4h 1 次,共 3 次,最后一次注射后 4h 处死动物。采用 4% 多聚甲醛灌注处死大鼠,在距损伤中心 5 μ m 的头侧和尾侧进行取材,梯度脱水,石蜡包埋。制备 5 μ m 厚组织切片备用。

1.6 组织学观察

每只动物随机取 3 张轮廓完整的切片用蒸馏水洗 1min;苏木素染 10min;水洗片刻;1%盐酸酒精浸泡 2~3min 返蓝;再水洗 10min 以上;伊红复染 3~5min;酒精梯度脱水,中性树胶封片。

1.7 免疫组化染色

每只动物随机取 5 张轮廓完整的石蜡切片脱蜡至水,微波修复抗原,加入 2M HCl 37 $^{\circ}$ C、30min,0.04%胃蛋白酶 37 $^{\circ}$ C、20min,行 DNA 变性后,用过氧化氢酶室温下阻断内源性过氧化物酶 10min,5% BSA 血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 30min,除去血清,加 BrdU 一抗(1:400)4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 冲洗,依次加入生物素标记的二抗、链霉素抗生素-碱性磷酸酶溶液,各于室温下孵育 10min,每步间均用 PBS 冲洗 3 次,除去 PBS,滴加 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸/氮蓝四唑(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium chloride, BCIP/NBT)显色液,显微镜下观察 10~30min,阳性显色为蓝黑

色。用 PBS 冲洗,双染增强剂室温下孵育 10min,血清封闭 30min,加 Nestin (1:500)4℃过夜,PBS 冲洗 3 次,加入二抗,室温下孵育 10min,PBS 冲洗后加入链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液,室温下 10min,PBS 冲洗后加入新鲜配制的 3-氨基-9-乙基咔唑(3-amino-9-ethyl-carbazole,AEC)溶液,显微镜下观察 5~10min,阳性显色为红色,用自来水冲洗,水性封片剂封片。分别用(streptavidin-peroxidase,SP)及 Powervision 二步法测定 Nestin、Wnt-1 在脊髓组织中的表达,DAB 显色,阳性为棕黄色。采用公司提供的阳性对照,阴性对照用 0.01mol/L 的 PBS 代替一抗。

1.8 图像分析

采用相差倒置显微镜及全自动照相装置和数字信号采集分析系统对组织切片进行图像分析,以细胞内棕黄色、蓝黑色和红色颗粒者为阳性。分析项目包括在 10×40 倍显微镜下对阳性细胞进行细胞计数和半定量分析,并计算 Nestin 和 Wnt-1 阳性表达面积。

1.9 统计学处理

用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析,组内两两比较采用 *t* 检验,检验水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

25 只建模成功大鼠均进入最终结果分析。

A 组大鼠 BBB 评分为 21 分,B 组脊髓损伤后大鼠双后肢功能丧失,肌力下降为 0,双后肢拖地爬行,随着时间的延长,评分逐渐升高。脊髓损伤后 7d,动物出现下肢牵拉刺激后挛缩反应,后肢关节可有活动;14d 时后肢功能明显恢复;28d 时偶尔可负重站立,但不能持续足底站立,无前后肢协调运动。各时间点 BBB 评分见表 1。

组织学检查 A 组大鼠脊髓组织结构整齐,灰白质界限清楚(图 1,后插页 IV)。B 组脊髓损伤后 1d 可见邻近损伤处灰白质灶状出血,大量白细胞、巨噬细胞浸润,部分神经细胞体积增大,损伤后 3d 时部分脊髓组织结构紊乱、轮廓不清(图 2,后插页 IV);7d 时神经细胞变性加重,部分神经细胞崩解,胶质细胞增生明显;14d 时可见脊髓灰质及周边白质有大的液化空洞,可见坏死崩解组织碎片(图 3,后插页 IV),灰质内神经细胞数量明显减少,见少量核固缩的神经细胞;损伤后 28d,可

见脊髓变细,开始出现空泡,瘢痕增生明显。

免疫组化检测,A 组可见脊髓外周及室管膜区域极少数细胞呈 BrdU/Nestin 阳性,排列稀疏,灰白质中几乎无 BrdU/Nestin 阳性细胞(图 4,后插页 IV)。B 组脊髓损伤后 1d 可见部分 BrdU/Nestin 阳性细胞,主要见于损伤脊髓组织周围及室管膜区,灰质和白质中出现散在点片状和丝状表达;3d 时阳性细胞增加;1 周后 BrdU/Nestin 阳性细胞数达到高峰(图 5,后插页 IV),与其他时间点比较差异具有显著性,阳性细胞主要见于室管膜下以及环绕脊髓的软膜,并向脊髓中央延伸。2 周开始下降,4 周明显下降,各时间点阳性细胞数与 A 组比较均有显著性差异(表 2, $P<0.05$)。

A 组中仅见微量的 Nestin 表达(图 6,后插页 IV)。B 组在损伤后 1d 可见少量 Nestin 表达,7d 可见较多量 Nestin 阳性表达(图 7,后插页 IV),主要分布于室管膜周围区域及灰质中,Nestin 表达阳性的树状突起延伸至灰质,在灰质中的表达主要分布于神经元附近和血管周围,个别细胞形态类似星形胶质细胞,同时在灰质偶见少量类似神经元样 Nestin 阳性细胞。2 周时开始逐渐减少,4 周时 Nestin 阳性细胞明显减少。A 组脊髓组织内 Wnt-1 无明显表达(图 8,后插页 IV)。B 组各时间点脊髓损伤部位均有 Wnt-1 的表达。脊髓损伤后 1d 可见脊髓中央管周围及外膜 Wnt-1 表达阳性区域的出现,脊髓灰白质内少量表达,较为分散。至 3d 时阳性区域的面积达高峰,1 周时维持在较高水平(图 9,后插页 IV),之后逐渐减少,4 周时仅见极少量 Wnt-1 阳性表达。

图像分析系统检测 Wnt-1 与 Nestin 阳性表达区域面积见表 3。直线相关分析发现 Wnt-1 与 Nestin 蛋白成直线相关(图 10, $r=0.89$, $P<0.01$)。

表 1 两组大鼠不同时间点的 BBB 评分 ($\bar{x} \pm s$)

	1d	3d	1周	2周	4周
A组	21	—	—	—	—
B组	0.60±0.55	1.20±0.84	3.60±1.14	7.60±1.14	9.00±1.17

表 2 两组大鼠在脊髓室管膜区和灰白质区 BrdU/Nestin 阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$, 个/视野)

	1d	3d	1周	2周	4周
A组	2.0±1.22	—	—	—	—
B组	4.2±1.30 ^①	11.2±1.92 ^①	23.4±5.31 ^①	14.0±1.58 ^①	7.4±1.17 ^①

注:①与 A 组比较 $P<0.05$

表 3 损伤组(B 组)大鼠脊髓损伤后不同时间点脊髓室管膜区和灰白质区 Nestin 和 Wnt-1 阳性表达的面积

 $(\bar{x} \pm s, n=5, \mu\text{m}^2/\text{视野})$

组别	1d	3d	1周	2周	4周
Nestin	406.77±23.68	578.79±32.97	869.33±39.54	764.09±33.54	587.02±47.07
Wnt-1	326.00±25.94	679.18±26.03	608.88±22.93	497.77±22.17	363.82±24.64

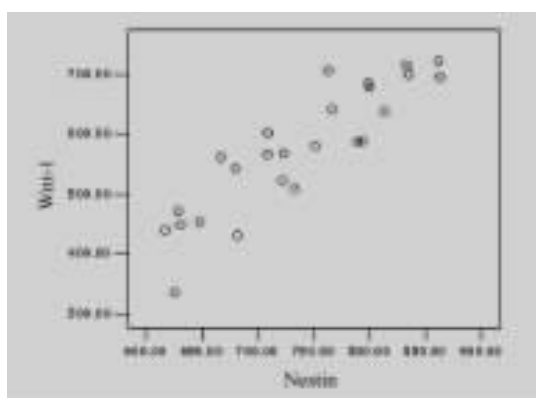


图 9 SCI 后 Nestin 与 Wnt-1 蛋白表达阳性区域面积的关系

3 讨论

NSCs是一种具有自我复制和向神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞分化并提供大量神经组织细胞的多潜能干细胞。NSCs的这些特性为包括脊髓损伤在内的中枢神经系统疾病的治疗带来了美好前景。研究已经证实在成年哺乳动物的大脑皮层、海马齿状回、室管膜下层、纹状体、脊髓中央管室管膜区都有 NSCs 的存在^[3]。目前,用 NSCs 治疗脊髓损伤主要存在两种策略:移植外源性 NSCs 的“替代治疗”策略及激活内源性 NSCs 的“补充治疗”策略。与外源性 NSCs 相比,内源性 NSCs 有其特有的优势^[4]。

成年哺乳动物中枢神经系统终生保留有处于“静止”状态的 NSCs,在某些因素作用下或者受损伤刺激时可被激活,重新进入细胞增殖周期前进一步分化为特定功能的神经细胞^[5]。在本研究中,大鼠脊髓损伤后,脊髓内 Nestin 阳性细胞数随着时间的延长出现增加、达到高峰、下降的变化过程,说明脊髓损伤可激活 ENSCs 使其增殖,但这种状态下 ENSCs 增殖能力和修复作用十分有限。所以,想要用激活 ENSCs 的“补充治疗”策略在治疗神经系统疾病方面发挥更大的作用,促进 ENSCs 增殖并向需要的方向分化是取得突破的关键。本研究对脊髓损伤后激活的 ENSCs 增殖分化机制进行了初步探讨。

Wnt 信号通路在生物发育、细胞转运、肿瘤

形成及细胞凋亡等生命过程中发挥着重要作用,其异常活化与多种肿瘤的发生和进展有着密切的关系。近年的研究发现它在 ENSCs 的增殖、分化调控上也有着重要的作用,Wnt 信号通路对 ENSCs 的作用受到广泛的关注^[6,7]。

Lie 等^[8]发现成年大鼠海马区 NSCs 或者前体细胞均表达 Wnt 蛋白的受体(Fz)和相关信号通路的调控分子,结合既往一系列研究^[9,10],显示 NSCs 具有接受 Wnt 信号调控的物质基础。大量的实验也证实了 Wnt 在 ENSCs/神经前体细胞增殖、分化过程中的调控作用。如 Megason 等^[11]在 2002 年研究发现 Wnt-1 与 Wnt-3a 不仅表现有丝分裂原作用,而且在脊髓背侧至腹侧方向上形成有丝分裂原浓度梯度,在有丝分裂原浓度较高、Wnt 信号强的脊髓背侧表现为大量增殖,而在有丝分裂原浓度低、Wnt 信号较弱的脊髓腹侧则表现为大量分化。邢雪松等^[12]认为 Wnt-1 时间依赖性的表达与海马缺血损伤后 ENSCs 的增殖分化相吻合,说明 Wnt-1 在 ENSCs 的早期增殖分化中起重要调控作用。但脊髓损伤后 ENSCs 激活的同时是否伴有 Wnt-1 的表达,以及 Wnt 信号通路是否参与 NSCs 增殖尚不清楚。

BrdU 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在细胞增殖周期的 S 期嵌入细胞核的 DNA,因而可用于标记具有增殖活性的细胞^[13]。Nestin 是一种中间丝蛋白,存在于神经上皮前体细胞^[14]和成年哺乳动物多能干前体细胞^[15],是 NSCs 的常用标志物。本研究采用 BrdU/Nestin 双重标记脊髓损伤后不同时间点增殖的 ENSCs。发现脊髓损伤后 1d 就可见 BrdU/Nestin 阳性细胞的增加,1 周时这一变化达到高峰,2 周、4 周开始逐渐下降,这说明脊髓损伤后即刻 ENSCs 被激活开始增殖,数量逐渐达到高峰,后又逐渐下降的过程。与 Nestin 蛋白的表达情况相同。同时研究也发现在正常脊髓中极少表达的 Wnt-1 在脊髓损伤后 1d 也开始少量表达,脊髓损伤后 3d 时表达面积达到高峰,1 周时仍维持在较高水平,之后迅速减少。我们推测脊髓损伤后 ENSCs 的增殖可能与 Wnt 信号途径的

活化及 Wnt-1 的表达有关。直线回归法分析脊髓损伤后不同时间点 Nestin 蛋白表达阳性区域面积与 Wnt-1 蛋白表达阳性区域面积的相关性, 结果发现两者呈高度相关, 这说明脊髓损伤后 ENSCs 的增殖可能与 Wnt-1 蛋白的表达相关。我们认为在 SCI 后 ENSCs 激活增殖过程中 Wnt/ β -连环蛋白信号通路可能发挥着重要的调节作用, Wnt-1 的表达可能促进了 ENSCs 的增殖。

在成年哺乳动物中 Wnt 基因多处于一种相对静止状态, Wnt 信号通路也处于关闭状态。本实验结果显示, Wnt-1 在正常组织中极少表达, 脊髓损伤后 3d 表达最强, 其后随时间延长, Wnt-1 表达逐渐减少。伴随着这一过程脊髓 ENSCs 也出现起始增殖、大量增殖、增殖减少这一系列变化。我们推测, 脊髓损伤后 Wnt-1 逐渐启动表达, 从而开启处于“关闭”状态的 Wnt 信号通路, 从而激活静止的 ENSCs, 促进其增殖。随着修复的进行, Wnt-1 表达逐渐减少, Wnt 信号通路的效应也逐渐减弱, 增殖的 ENSCs 开始进入分化阶段。本实验结果表明, Wnt-1 在脊髓损伤后 ENSCs 早期增殖中发挥着重要的调控作用, Wnt 信号通路激活可能参与脊髓损伤后 ENSCs 自发增殖过程。

伴随着分子生物学技术的发展, 对 NSCs 增殖分化机制的研究也逐步加深。如果能实现人为地定向调控 NSCs 的增殖分化, 可为脊髓损伤后不同的病理变化阶段采取相应的治疗策略提供指导^[16]。急性期通过控制信号蛋白分子的表达, 减少神经细胞的凋亡和细胞毒性物质的产生; 急性期后激活 ENSCs, 使其大量增殖、迁移并按机体生理需要的比例向神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞方向分化, 最大程度上利用 NSCs 的生物潜能^[17,18], 从而使激活 ENSCs 的“补充治疗”策略在脊髓损伤的治疗上发挥作用。

4 参考文献

- Allen AR, MacPhail RC. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fractured is location of spinal column [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1991, 57(7): 878-880.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-12.
- Weiss S, Dunne C, Hewson J, et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spine cord and ventricular neuroaxis [J]. J Neurosci, 1996, 16(23): 7599-7609.
- 蒋海山, 陆兵勋. 内源性神经干细胞与缺血性脑损伤[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2003, 11(3): 209-211.
- Munoz-Torres M, Alonso G, Raya MP. Calcitonin therapy in osteoporosis [J]. Treat Endocrinol, 2004, 3(2): 117-132.
- Machon O, Backman M, Machonova O, et al. A dynamic gradient of Wnt signaling controls initiation of neurogenesis in the mammalian cortex and cellular specification in the hippocampus [J]. Dev Biol, 2007, 311(1): 223-237.
- Wexler EM, Geschwind DH, Palmer TD. Lithium regulates adult hippocampal progenitor development through canonical Wnt pathway activation [J]. Mol Psychiatry, 2008, 13(3): 285-292.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, et al. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis [J]. Nature, 2005, 437(7063): 1370-1375.
- Zechner D, Fujita Y, Hülsken J, et al. β -Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system [J]. Dev Biol, 2003, 258(2): 406-418.
- Muroyama Y, Kondoh H, Takada S. Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(4): 915-921.
- Megason SG, McMahon AP. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS [J]. Development, 2002, 129(9): 2087-2098.
- 邢雪松, 吕威力. wnt-1 在大鼠缺血再灌注海马组织内源性神经干细胞早期增殖分化中的作用 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 3(11): 412-414.
- Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW. Neural stem cells in the subventricular zone are resilient to hypoxia/ischemia whereas progenitors are vulnerable [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(7): 814-825.
- Cattaneo E, McKay R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor [J]. Nature, 1990, 347(6295): 762-765.
- Gritti A, Parati EA, Cova L, et al. Multipotent stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor [J]. Neurosci, 1996, 16(3): 1091-1100.
- Derksen PW, Tjin E, Meijer HP, et al. Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(16): 6122-6127.
- Cheng L, Lai MD, Sanderson JE, et al. Enhanced fusion of myoblasts with myofibers for efficient gene delivery induced by a partially purified protein fraction from rat muscle extract [J]. Arch Biochem Biophys, 2005, 441(2): 141-150.
- Li G, Peng H, Corsi K, et al. Differential effect of BMP4 on NIH/3T3 and C2C12 cells: implications for endochondral bone formation [J]. Bone Miner Res, 2005, 20(9): 1611-1623.

(收稿日期: 2008-08-29 修回日期: 2008-09-22)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)