

全反式维甲酸促大鼠胚胎神经干细胞向神经元分化中 β 连环蛋白的表达及意义

钟德君¹, 康敏², 王高举¹, 王清¹, 王松¹

(1 泸州医学院附属医院脊柱外科; 2 消化内科 646000 四川省泸州市)

【摘要】目的:观察全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)在体外促进大鼠胚胎神经干细胞(neural stem cells, NSCs)分化为神经元过程中 β 连环蛋白(β -catenin)的表达情况,探讨其在 NSCs 分化中的意义。**方法:**取第 3 代大鼠胚胎 NSCs 体外培养,实验组加入 1.0 μ mol/L ATRA 诱导,分别于干预后 3、5、7、9d 采用免疫细胞化学染色、实时荧光定量 RT-PCR、Western blot 检测 β -catenin 的表达及变化情况,对照组不加 ATRA 培养,于相应时间点进行相同检测。比较两组各时间点 β -catenin 的表达量。**结果:**免疫细胞化学染色示实验组在培养 3~7d 时 β -catenin 表达逐渐增强($P<0.05$),7d 与 9d 差异无统计学意义($P>0.05$),实验组各时间点与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);实时荧光定量 RT-PCR 检测示 3~7d 时 β -catenin mRNA 相对表达量逐渐增加($P<0.05$),7d 与 9d 差异无统计学意义($P>0.05$),实验组各时间点与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);Western blot 印迹检测实验组细胞内 β -catenin 总蛋白、胞浆内 β -catenin 蛋白、胞核内 β -catenin 蛋白 3~7d 时表达量逐渐增加($P<0.05$),7d 与 9d 差异无统计学意义($P>0.05$)。细胞内 β -catenin 的总蛋白变化趋势与 RT-PCR 结果相似,且胞浆内 β -catenin 和胞核内 β -catenin 的蛋白表达量随时间增加而增加。**结论:**NSCs 分化为神经元的过程中,Wnt/ β -catenin 信号途径被激活,且 β -catenin 在细胞浆及细胞核内表达量均增多,与 NSCs 的分化成正调控,在细胞分化达到平衡状态时(7d~9d)表达量不再增加,表明 ATRA 促 NSCs 向神经元的分化与经典的 Wnt/ β -catenin 信号途径有关。

【关键词】神经干细胞;全反式维甲酸; β -catenin;分化;表达;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.04.11

中图分类号:Q813.1, Q257 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2010)-04-0305-06

Expression and significance of β -catenin during differentiation of rat embryonic neural stem cells induced by all-trans-retinoic acid into neurons in vitro/ZHONG Dejun, KANG Min, Wang Gaoju, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(4):305-340

【Abstract】Objective:To investigate the expression and significance of β -catenin during differentiation of rat embryonic neural stem cells(NSCs) induced by all-trans-retinoic acid(ATRA) into neurons in vitro.**Method:** NSCs at passage 3 were cultured in vitro. In experiment groups, NSCs at passage 3 were cultured with 1.0 μ mol/L ATRA in vitro, and expression of β -catenin was detected by immunocytochemistry staining, real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot at 3, 5, 7 and 9 days after inducing respectively. While in control group, no ATRA was added, β -catenin expression in two groups at each time point was tested.**Result:** Immunocytochemistry staining: little β -catenin protein expression was documented in control group, while in expression group, the β -catenin expression was noted gradually increasing in cytoplasm and nucleus after inducing 3~7d($P<0.05$), and the peak expression occurred at 7~9d after inducing, while no significant difference was noted between 7d and 9d ($P>0.05$). The β -catenin expression at each time point in experimental groups was higher than those in control groups ($P<0.05$). Real-time fluorescent quantitative PCR showed the relative expression of β -catenin mRNA gradually increasing in experimental groups, with significant difference noted at these groups ($P<0.05$), peak β -catenin mRNA expression occurred at 7~9d after inducing, while no significant difference was noted between 7d and 9d ($P>0.05$), and the relative β -catenin mRNA expression of at each

基金项目:泸州市重点科技计划项目(编号:2008-23-5),四川省卫生厅科研项目(编号:2008-527-080178)

第一作者简介:男(1974-),副教授,医学博士,研究方向:脊柱脊髓损伤

电话:(0830)3165441 E-mail:zdj_1974@163.com

time point in experimental groups was higher than those in control groups ($P < 0.05$). Western blot showed gradual raise of the total cell protein, cytoplasmic protein, nuclear protein in experimental groups, which showed significant difference ($P < 0.05$), the peak β -catenin mRNA expression occurred at 7–9d after inducing, while no significant difference was noted between 7d and 9d ($P > 0.05$), and the β -catenin protein expression at each time point in experimental groups was higher than those in control groups ($P < 0.05$). The overall trends of β -catenin protein showed similar result to the real-time fluorescence quantitative RT-PCR, which presented with increasing of expression of β -catenin in the cytoplasm and nucleus over time. **Conclusion:** With the induction of $1.0 \mu\text{mol/L}$ ATRA, Wnt/ β -catenin signaling pathway is activated, and β -catenin expression in the cytoplasm and nucleus increase over time, which has positive regulation with NSCs differentiation, after cell differentiation reach balance (7–9d), expression remain unchanged, which indicating the relationship of differentiation of ATRA-treated NSCs into neuron with classical Wnt/ β -catenin signaling pathway.

[Key words] Neural stem cells; All-trans-retinoic acid; β -catenin; Differentiation; Expression; Rat

[Author's address] Department of Spinal Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Sichuan, 646000, China

神经干细胞(NSCs)具有多向分化潜能、自我复制、高度增殖能力等特点,能分化为特定类型的神经元和神经胶质细胞,对神经发生、发育起重要作用^[1]。其增殖和分化受到自身基因调控和外来信号调控的共同作用,这些因素相互作用,构成复杂的调控系统。其中,经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路作为自身基因调控网络在胚胎诱导、细胞增殖、分化和极生化中扮演了重要角色^[2–3]。 β -catenin 是经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路重要的中心环节,激活与否决定着下游相关基因的调控。 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)在体外有明显促进 NSCs 分化为神经元的作用^[4]。本研究观察 ATRA 促进 NSCs 转化为神经元过程中 β -catenin mRNA 及蛋白水平表达的情况,探讨其在 NSCs 分化中的表达及意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂和仪器

孕 12~16d(平均 15d)SD 大鼠,由四川大学实验动物中心提供。全反式维甲酸(ATRA)、4',6-二脒基-2-苯吡啶盐酸(DAPI)(Sigma 公司,美国);DMEM/F12 (1:1)、B27 辅助生长因子、胎牛血清(FBS)(Gibco 公司,美国); β -catenin 小鼠抗大鼠多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国);抗神经元特异性烯醇化酶(NSE)兔多克隆抗体、FITC 标记羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司);TRITEC 标记抗兔 IgG (北京中山金桥);SP 超敏试剂盒(福州迈新生物技术公司);细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(中国碧云天公司);Trizol (MRC 公司,美国);RevertAid™ First Strand cD-

NA Synthesis Kit(MBI 公司,立陶宛)。水平或垂直电泳仪、Gel Doc 1000 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司,美国);FTC-2000 型荧光定量扩增仪(Funglyn Biotech 公司,加拿大);GeneAmp PCR System 9600 型 PCR 扩增仪(Perkin Elmer 公司,美国)。

1.2 鼠胚 NSCs 的分离、培养及鉴定

无菌手术取孕 12~16d SD 胎鼠,置入含有 D-Hanks 液的无菌培养皿内。将胎鼠置于解剖显微镜视野中央,经胚鼠头端矢状剪开,分离头部皮肤及未成形颅骨,获取鼠胚大脑皮质,立即放入另一预先置有 D-Hanks 液的无菌培养皿内。分离去除软脑膜和脉络丛组织,漂洗两次,用眼科剪剪成糜状,移至 10ml 离心管内,用 2.5g/L 胰蛋白酶+乙二胺四乙酸按 1:1 消化组织,吹打制作单细胞悬液,锥虫蓝染色法计数活细胞,按 1×10^5 个/L 的密度接种于 75ml 培养瓶,于 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱内培养,培养基成分为 DMEM/F12 (1:1)、2% B27、 $20 \mu\text{g/L}$ 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、 $20 \mu\text{g/L}$ 表皮生长因子(EGF)。每 2~3d 换半液,7~10d 后采用机械吹打法传代。将传 3 代后形成的神经球,接种到预先置有多聚赖氨酸包被的盖玻片 6 孔板中,使用含 bFGF 和 EGF 的 DMEM/F12(1:1)培养基,培养 7d 后行免疫化学染色,观察神经干细胞特异性抗原巢蛋白的表达情况。一抗为兔抗巢蛋白,用 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.4)代替一抗作为阴性对照。发现神经球逐渐贴壁,周围出现细小分支,表面分布有大小均匀、巢蛋白染色呈强阳性的细胞,证实为神经干细胞^[5]。

1.3 实验分组

取 P3 代 NSCs, 用含 5% FBS 的 DMEM/F12 培养基制成悬液, 调整细胞密度为 1×10^9 个/L, 接种至预先置有多聚赖氨酸包被的盖玻片的 6 孔板内, 分别加入 ATRA, 调整终浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ ^[5] 作为实验组, 以不加 ATRA 培养作为对照组, 每个时间点 6 个复孔, 在 5% CO_2 孵箱中培养使细胞贴附于盖玻片上, 于培养后 3、5、7、9d 进行观察, 并分别检测对照组和实验组的 β -catenin 表达量。

1.4 免疫细胞化学检测 β -catenin 的表达

在培养后 3、5、7、9d 各时间点取相应实验组和对照组的盖玻片上的细胞进行检测。吸除培养液, 用 0.01M 4°C PBS 冲洗, 冷丙酮室温下固定, 3%过氧化氢去离子水室温下孵育, 10%正常山羊血清封闭, 倾去血清, 勿洗, 滴加一抗 β -catenin 小鼠抗大鼠多克隆抗体 (1:50), 用 PBS 缓冲液 (0.01mol/L , pH 值 7.4) 代替一抗作为阴性对照, 4°C 冰箱过夜, 滴加二抗, 37°C 30min, 避光, 甘油封片。每组实验重复 6 次。实验结果采用双盲法, 由两名实验人员独立观察评定。阳性细胞判定标准: ①细胞结构清晰; ②阳性颗粒定位、定性好; ③着色明显高于背景。阴性对照采用 PBS 代替一抗染色。使用 Olympus 光学显微镜对细胞爬片观察, 用 SPOT Cool CCD 摄像头进行图像采集。观察不同时间点细胞爬片上细胞的胞浆或胞核内染色情况, 用 Image-Pro Plus 软件扫描做积分光密度 (IOD) 值半定量分析, 判定结果。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析 β -catenin mRNA 的表达

在培养后 3、5、7、9d 各时间点取相应实验组和对照组盖玻片上的细胞进行检测。将 6 孔板中的培养液吸尽, 洗涤细胞 2 次, 每孔加 Trizol 试剂 1ml, 静置冰上 5min, 加 $200 \mu\text{l}$ 氯仿, 振荡后室温放置 2~3min。 4°C 、12000r/min 离心 15min, 吸取上层液相, 加 $500 \mu\text{l}$ 异丙醇充分振荡, 冰上静置 10min, 4°C 下 12000r/min 离心 10min, 弃上清, 提取胶状沉淀。加 1ml 75%乙醇, 振荡混匀, 倒尽乙醇, 开盖干燥 RNA 片刻, 加入 $20 \mu\text{l}$ 焦炭酸二乙酯 (DEPC) 水, 充分溶解, 紫外分光光度仪测定样本 OD260/OD280 值, 比值在 1.8~2.0 范围内, 证明提取效果良好, 计算总 RNA 浓度, 并使其均一化。按照两步法进行 RT-PCR 反应。引物序列: β -

catenin 上游引物为 5'-AAGCTCATCATACTGGC-TAGT-3', 下游引物为 5'-CTTGCATTCCAC-CAGCTTCT-3', 扩增片段 160bp; GAPDH 上游引物为 5'-CCTCAAGATCATCAGCAAT-3', 下游引物为 5'-CCATCCACAGTCTTCTGGGT-3', 扩增片段 141bp。反应条件: $30 \mu\text{l}$ 反应体系, 37°C 逆转录 1h, 94°C 预变性 2min, 94°C 变性 20s, 53°C 退火 30s, 72°C 延伸 40s, 共 45 个循环; 最后 72°C 充分延伸 5min。设定无 cDNA 样品的空白管作阴性对照。读取 Ct 值 (热循环仪检测到反应体系中荧光信号的强度值), 目的基因的相对量为 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。每组重复 5 次。

1.6 Western blot 印迹检测 β -catenin 蛋白的表达

在培养后 3、5、7、9d 各时间点取相应实验组和对照组盖玻片上的细胞进行检测。细胞总蛋白提取: 吹打贴壁细胞, 离心收集, 吸尽上清, 加入细胞组织裂解液 1ml, 蛋白酶抑制剂各 $5 \mu\text{l}$, 冰浴, 14000r/min, 4°C 离心 25min, 吸取上清; 细胞浆蛋白与细胞核蛋白提取: 吹打贴壁细胞, 离心收集, 吸尽上清, 每 $20 \mu\text{l}$ 细胞沉淀加入 $200 \mu\text{l}$ 细胞浆蛋白抽提试剂, 高速剧烈振荡把细胞沉淀完全悬浮并分散开, 加细胞浆蛋白抽提试剂 $10 \mu\text{l}$, 剧烈振荡后立即吸取上清液, 即为抽提的细胞浆蛋白; 吸尽上清液, 沉淀加 $50 \mu\text{l}$ 细胞核蛋白抽提液, 剧烈振荡把细胞沉淀完全悬浮并分散开, 放回冰浴中, 每隔 1~2min 再剧烈振荡, 4°C 12000~16000r/min 离心, 立即吸取上清液, 即为抽提的细胞核蛋白。取样本 $100 \mu\text{l}$ 与相同体积上样缓冲液混匀, 取等量蛋白混悬液上样, SDS-PAGE 电泳, 转移至硝酸纤维素膜 (PVDF) 上。PVDF 室温振荡封闭 1h, 分别加入 β -catenin 抗体和 β -actin 抗体 4°C 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温振荡孵育 1h, 在 PVDF 膜上均匀涂抹化学发光底物, 保鲜膜覆盖于 PVDF 上, 摄 X 线片并洗片, 在凝胶成像分析系统中成像并测量特异性条带表达强度, 测同次电泳所得的 β -catenin 总蛋白、细胞浆蛋白及细胞核蛋白和 β -actin 条带灰度值的比值 ($\text{OD}_{\beta\text{-catenin}}/\text{OD}_{\beta\text{-actin}}$)。每组实验重复 3 次。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件包进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为有统计学

意义。

2 结果

2.1 免疫细胞化学染色检测结果

见图 1 和表 1。对照组围绕细胞膜有少量棕黄色染色,偶见胞膜下细线状棕黄色染色,随观察时间延长表达增强不明显。实验组可见棕黄色或棕褐色染色在细胞膜下及胞浆和胞核表达并明显增强,7~9d 表达最强,阳性细胞最多。实验组各时间点与对照组的 IOD 值相比,差异有统计学意义 ($P<0.05$);实验组 3~7d 的 IOD 值相比差异有统计学意义 ($P<0.05$),7d 与 9d 间差异无统计学意义 ($P>0.05$);对照组各时间点间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 实时荧光定量 PCR 分析结果

见表 2。实验组 3~7d 时 β -catenin mRNA 相

对表达量逐渐增加 ($P<0.05$),7d 与 9d 差异无统计学意义 ($P>0.05$),对照组各时间点 β -catenin mRNA 相对表达量低,实验组各时间点与对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$),对照组各时间点间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 Western blot 印迹检测结果

见图 2 和表 3。在约 92kD 处可见特异染色条带。对照组细胞内 β -catenin 总蛋白、胞浆内 β -catenin 蛋白、胞核内 β -catenin 蛋白表达量少,而实验组随干预时间延长,表达量逐渐增加,3~7d 各时间点间差异有统计学意义 ($P<0.05$),7d 与 9d 表达量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),实验组各时间点与对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$),对照组各时间点间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

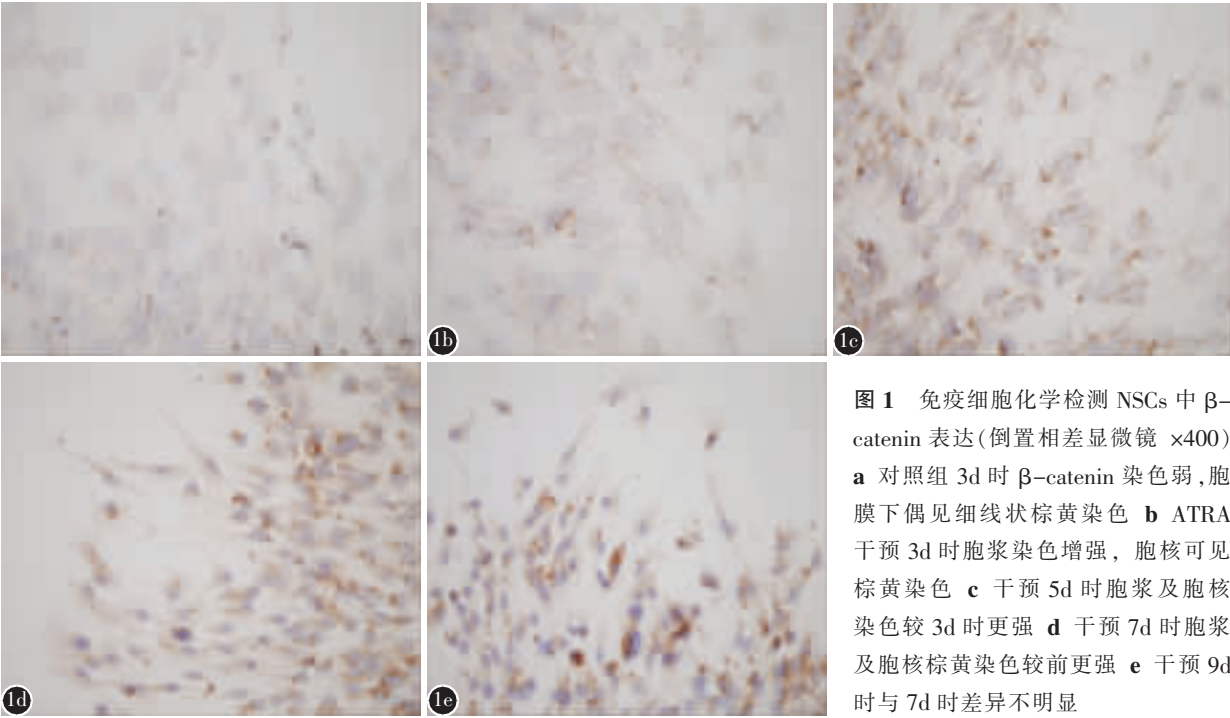


图 1 免疫细胞化学检测 NSCs 中 β -catenin 表达(倒置相差显微镜 $\times 400$)
a 对照组 3d 时 β -catenin 染色弱,胞膜下偶见细线状棕黄色染色 b ATRA 干预 3d 时胞浆染色增强,胞核可见棕黄染色 c 干预 5d 时胞浆及胞核染色较 3d 时更强 d 干预 7d 时胞浆及胞核棕黄染色较前更强 e 干预 9d 时与 7d 时差异不明显

表 1 两组不同时间点细胞中 β -catenin 积分光密度值
($n=6, \bar{x} \pm s$)

	对照组	实验组
3d	1412.22 $\pm$ 16.09	1573.14 $\pm$ 17.16 ^①
5d	1445.37 $\pm$ 16.13	1639.63 $\pm$ 17.69 ^{①②}
7d	1479.71 $\pm$ 16.65	1705.69 $\pm$ 19.04 ^{①②}
9d	1491.44 $\pm$ 16.91	1709.34 $\pm$ 19.10 ^{②③}

注:①与对照组相同时间点比较 $P<0.05$;②与同组前一时间点比较 $P<0.05$,③ $P>0.05$

表 2 两组不同时间点细胞中 β -catenin 的 mRNA 表达量(目的基因相对表达量= $2^{-\Delta\Delta Ct}$) ($n=5, \bar{x} \pm s$)

	对照组	实验组
3d	0.0132 $\pm$ 0.0096	0.1768 $\pm$ 0.0000 ^①
5d	0.0371 $\pm$ 0.0099	0.3500 $\pm$ 0.0369 ^{①②}
7d	0.0546 $\pm$ 0.0127	0.6657 $\pm$ 0.0926 ^{①②}
9d	0.652 $\pm$ 0.0135	0.6414 $\pm$ 0.0996 ^{①③}

注:①与对照组相同时间点比较 $P<0.05$;与同组前一时间点比较② $P<0.05$,③ $P>0.05$

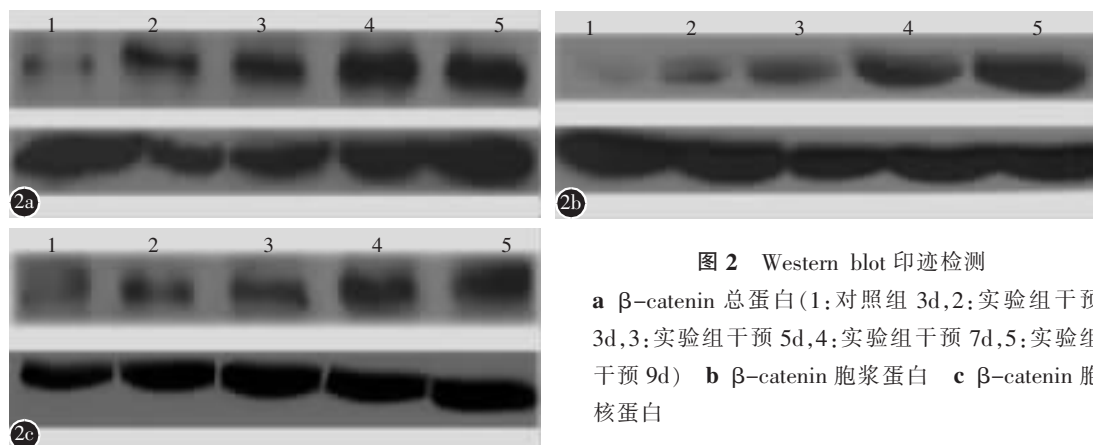


图 2 Western blot 印迹检测

a β -catenin 总蛋白 (1: 对照组 3d, 2: 实验组干预 3d, 3: 实验组干预 5d, 4: 实验组干预 7d, 5: 实验组干预 9d) b β -catenin 胞浆蛋白 c β -catenin 胞核蛋白

表 3 两组不同时间点 β -catenin 在细胞内、胞浆和胞核中的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

	对照组			实验组		
	总蛋白	胞浆蛋白	胞核蛋白	总蛋白	胞浆蛋白	胞核蛋白
3d	0.1793 $\pm$ 0.0157	0.1327 $\pm$ 0.0116	0.1621 $\pm$ 0.0135	0.3317 $\pm$ 0.0815 ^①	0.2794 $\pm$ 0.0413 ^①	0.2437 $\pm$ 0.0450 ^①
5d	0.2015 $\pm$ 0.0169	0.1559 $\pm$ 0.0276	0.1754 $\pm$ 0.0151	0.4259 $\pm$ 0.0327 ^{①②}	0.5132 $\pm$ 0.0526 ^{①②}	0.4647 $\pm$ 0.0445 ^{①②}
7d	0.2231 $\pm$ 0.0175	0.1721 $\pm$ 0.0304	0.1869 $\pm$ 0.0213	0.6543 $\pm$ 0.0354 ^{①②}	0.7354 $\pm$ 0.0311 ^{①②}	0.7287 $\pm$ 0.0436 ^{①②}
9d	0.2354 $\pm$ 0.0183	0.1779 $\pm$ 0.0311	0.1877 $\pm$ 0.0220	0.7110 $\pm$ 0.0475 ^{①③}	0.8159 $\pm$ 0.0235 ^{①③}	0.7311 $\pm$ 0.0421 ^{①③}

注: ①与对照组相同时间点比较 $P < 0.05$; 与实验组前一时间点比较 ② $P < 0.05$, ③ $P > 0.05$

3 讨论

NSCs 定向分化问题是目前 NSCs 研究的热点。决定其分化的因素主要包括细胞自身基因的调控和外来信号的共同作用。其中 Wnt/ β -catenin 信号途径是细胞自身基因调控的一种方式, 外来信号主要包括有丝分裂原(如 bFGF、EGF 等)、神经生长因子^[6]及化学物质(如维甲酸)^[7]等, 这些外来信号构成了 NSCs 分化的外部微环境。我们采用 1.0 μ mol/L ATRA 干预体外培养并纯化的鼠胚 NSCs, 发现分化的细胞比例明显增多^[4]。

近年来的研究显示, Wnt 在细胞内信号途径至少有 4 个分支, 其中经典的 Wnt/ β -catenin 信号途径参与调控所有的已确定的人类成体干细胞系统, 包括神经、皮肤、血液、肠和脑^[8]。Wnt/ β -catenin 信号途径通过在神经发生的早期调控神经干细胞的增殖和分化, 促进神经系统的发育。 β -catenin 在经典的 Wnt/ β -catenin 信号途径中起着重要作用。 β -catenin 是多功能蛋白, 分子量 92~97kD, 作用包括细胞-细胞粘附和信号转导。 β -catenin 通过其氨基末端在细胞表面与钙粘蛋白(cadherin)的胞浆部分结合, 调控细胞粘附, 同时, β -catenin 羧基端直接或间接地与几个特殊的染色质重构复合物相互作用^[9], 在 Wnt 信号途径的信号转导中起了重要作用。Wnt 途径中, β -

catenin 的降解起始于氨基末端区域的丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)的磷酸化。没有 Wnt 信号时, 使 β -catenin 磷酸化, 通过泛素化作用, 使 β -catenin 被蛋白酶降解(泛素-蛋白酶系统); 而有 Wnt 信号时抑制 CSK-3 β 对 β -catenin 的磷酸化, 导致 β -catenin 在胞浆内堆积^[10]。

在 ATRA 促 NSCs 分化的实验中, ATRA 能促使 NSCs 分化为神经元的比例增高, 在此过程中, 激活了 Wnt-1 基因, 且 Wnt-1 的表达在 NSCs 分化为神经元的早期明显增高, 表明 ATRA 促 NSCs 分化可能与激活了经典的 Wnt 信号途径有关^[11]。在对斑马鱼下丘脑神经发生的研究中发现, Wnt8a 和 Lef1 一起间接作用于依赖 β -catenin 的转录, 促使下丘脑后部的神经元分化, 而且这个保守的信号通路可以调控众多脊椎动物下丘脑的神经发生^[12]。将 Wnt3a 和 Wnt5a 转染到神经前体细胞内, 可以促进神经球的生长和分化为 MAP2 阳性的细胞, 减少 GFAP 阳性细胞的分化, 此时可以发现神经祖细胞内 β -catenin 的水平提高^[13]。在培养的鼠 E14.5 纹状体神经干细胞中通过转染逆转录病毒编码并标记的激活型 β -catenin, 表达 β -catenin, 在缺少 bFGF 信号的培养基中, 促进神经干细胞分化为神经元和星形胶质细胞, 抑制了少突胶质细胞分化, 但是, 在减弱 Wnt 信号后, 神经

元和星形胶质细胞分化减少,而少突胶质细胞分化增加^[14]。在维甲酸(RA)促进鼠癌胚细胞 P19 向神经元样细胞分化的实验中发现,Axin 通过下调 β -catenin 抑制 P19 分化为神经元^[15]。Hirabayashi 等^[16]发现,在鼠大脑皮层的神经干细胞培养中,过表达 Wnt7a 或稳定地产生 β -catenin 诱导了神经元分化,甚至在细胞自我更新的促进因子——成纤维细胞生长因子 2(FGF2)存在的情况下也是如此。此外,体外阻断 Wnt/ β -catenin 途径导致皮层神经干细胞的分化抑制,而且 β -catenin/TCF 复合物可以直接促进 Neurogenin1(Ngn1)的表达,从而促进皮层神经元的分化^[16]。我们的实验中,免疫细胞化学染色、实时荧光定量 PCR 结果表明,NSCs 在 ATRA 诱导的不同时间点, β -catenin 表达量逐渐增高,7~9d 时表达最强 ($P<0.05$),7d 与 9d 差别无统计学意义 ($P>0.05$);Western blot 检测可见细胞内 β -catenin 总蛋白、胞浆内 β -catenin 蛋白、胞核内 β -catenin 蛋白在对照组表达量少,随 ATRA 干预时间增加,表达量逐渐增加,差异有统计学意义 ($P<0.05$),7d 与 9d 时表达量相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。表明 NSCs 在 ATRA 作用下,激活了 Wnt/ β -catenin 信号途径, β -catenin 随着 Wnt 信号出现而减少磷酸化,并处于活化状态而在胞浆内堆积,逐渐进入细胞核内,促进下游靶基因的转录,但 7~9d 当分化达到平衡状态时,蛋白量表达增加不明显,因此 7~9d 比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

我们的研究提示,在 $1.0\mu\text{mol/L}$ ATRA 诱导下,NSCs 分化为神经元的过程中,Wnt/ β -catenin 信号途径被激活,且 β -catenin 在细胞浆及细胞核内表达量均增多,与 NSCs 的分化成正调控,表明 ATRA 促 NSCs 向神经元的分化与经典的 Wnt/ β -catenin 信号途径有关。

4 参考文献

- Watt FM, Hogan BL. Out of eden: stem cells and their niches [J]. Science, 2000, 287(5457): 1427-1430.
- Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators [J]. Oncogene, 2006, 25(57): 7469-7481.
- Hirsch C, Campano LM, Wöhrle S, et al. Canonical Wnt signaling transiently stimulates proliferation and enhances neurogenesis in neonatal neural progenitor cultures [J]. Exp Cell Res, 2007, 313(3): 572-587.
- 钟德君, 张德胜, 宋跃明. 全反式维甲酸对鼠胚神经干细胞增殖和分化的作用 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(2): 206-211.
- 钟德君, 张德胜, 宋跃明. 鼠胚神经干细胞体外培养方法的优化 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(50): 10088-10092.
- Doe CQ. Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation [J]. Development, 2008, 135(1): 1575-1587.
- Jacobs S, Lie DC, DeCicco KL. Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus [J]. PNAS, 2006, 103(10): 3902-3907.
- Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer [J]. Nature, 2005, 434(7035): 843-850.
- Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways [J]. Science, 2004, 303(5663): 1483-1487.
- Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin [J]. Curr Opin Genet Dev, 2006, 16(1): 51-59.
- 钟德君, 康敏, 王清, 等. Wnt-1 在全反式维甲酸促鼠胚神经干细胞向神经元分化中的作用 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(6): 43-47.
- Lee JE, Wu SF, Goering LM, et al. Canonical Wnt signaling through Lef1 is required for hypothalamic neurogenesis [J]. Development, 2006, 133(15): 4451-4461.
- Yu JM, Kim JH, Song GS, et al. Increase in proliferation and differentiation of neural progenitor cells isolated from postnatal and adult mice brain by Wnt-3a and Wnt-5a [J]. Mol Cell Biochem, 2006, 288(1-2): 17-28.
- Kasai M, Satoh K, Akiyama T. Wnt signaling regulates the sequential onset of neurogenesis and gliogenesis via induction of BMPs [J]. Genes Cells, 2005, 10(8): 777-783.
- Lyu J, Costantini F, Jho EH, et al. Ectopic expression of axin blocks neuronal differentiation of embryonic carcinoma P19 cells [J]. J Biol Chem, 2003, 278(15): 13487-13495.
- Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, et al. The Wnt/ β -catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells [J]. Development, 2004, 131(12): 2791-2801.
- Mak BC, Kenerson HL, Aicher LD, et al. Aberrant β -catenin signaling in tuberous sclerosis [J]. Am J Pathol, 2005, 167(1): 107-116.

(收稿日期: 2009-10-09 修回日期: 2010-01-21)

(英文编审 蒋欣/郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)

复方芪麝片对直立大鼠腰椎成骨作用的观察

卞 琴, 梁倩倩, 侯 炜, 卢 盛, 赵永见, 施 杞, 王拥军

(上海中医药大学附属龙华医院 上海中医药大学脊柱病研究所 200032 上海市徐汇区宛平南路 725 号)

【摘要】目的:观察复方芪麝片(FFQSP)对直立位大鼠腰椎骨形成的作用,探讨可能的作用机制。**方法:**90 只 SD 大鼠随机分为三大组,正常组不进行处理,普通饲养笼喂养;模型组和 FFQSP 组,建立长期直立位大鼠模型。每组再随机分为 5、7 和 9 个月组,FFQSP 组分别在造模后 4、6、8 个月开始应用 FFQSP(将片剂研磨溶于生理盐水)灌胃,连续灌胃 1 个月;模型组和正常组用同量生理盐水灌胃 1 个月。所有动物于相应时间点取整个腰椎进行检测,行 L5 椎体藏红-固绿染色及 I 型胶原(type I collagen, Col I)免疫组织化学染色,余下腰椎椎体应用实时荧光定量聚合酶链反应(real time reverse transcription polymerase chain reaction, real time RT-PCR)技术检测 I 型胶原 $\alpha 2$ (type I collagen $\alpha 2$, Col1 $\alpha 2$)、转化生长因子 $\beta 1$ (transform growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)和 runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)基因的表达。**结果:**藏红染色显示,与正常组比较,三个时间点模型组及 FFQSP 组椎体骨小梁均增加,FFQSP 组在 5 个月和 7 个月时较模型组略有增加;在 9 个月时较模型组略有减少。Col I 免疫组织化学染色显示三个时期模型组骨小梁阳性染色数目较正常组均增加,FFQSP 组骨小梁阳性染色范围较正常组、模型组均增加。Real time RT-PCR 示,与模型组比,5 个月 FFQSP 组 Col1 $\alpha 2$ 、TGF- $\beta 1$ 基因表达显著下调($P < 0.05$, $P < 0.01$),与正常组比,仅上调 Runx2 的表达($P < 0.01$)。7 个月 FFQSP 组 Col1 $\alpha 2$ 、TGF- $\beta 1$ 、Runx2 基因表达较正常组和模型组都显著上调。9 个月 FFQSP 组与模型组比较,Col1 $\alpha 2$ 基因表达显著下调($P < 0.05$),而 TGF- $\beta 1$ 和 Runx2 基因表达均显著上调($P < 0.05$);与正常组比,三个基因表达均显著上调($P < 0.01$)。**结论:**复方芪麝片对直立大鼠的椎体成骨有增强作用,以中后期(7 个月、9 个月)效应显著,其疗效可能与 TGF- $\beta 1$ 基因水平的上调有关。

【关键词】 复方芪麝片;腰椎;成骨;气血

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.04.12

中图分类号: R965, R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-04-0311-06

Effect of FU FANG Qi She Pian on bone formation of upright posture rats' vertebral/BIAN Qin, LIANG Qianqian, HOU Wei, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(4): 311~316

【Abstract】Objective: To investigate the effect and potential mechanism of Fu Fang Qi She Pian(FFQSP) on upright rats' lumbar vertebral bone formation. **Method:** Ninety SD rats were randomly divided into three groups. The rats in the normal control group were raised in normal cage with no intervention. The rats in untreated and FFQSP groups were induced to upright posture. Every group was randomly divided into three subgroups: 5 months, 7 months and 9 months group. Rats in FFQSP groups were gastroenterically administrated with FFQSP at 4, 6, 8 months for one month after surgery while those in model and control group were treated with normal saline. Ten rats were sacrificed at 5, 7 and 9 months after surgery and all lumbar vertebrae were harvested for detection. Safranin O/fast green staining and Col I immunohistostaining were performed on L5 vertebrae. Col1 $\alpha 2$, TGF- $\beta 1$ and Runx2 mRNA expression in other vertebrae were detected by real time reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). **Result:** Safranin O/Fast green staining showed bone trabecular density increased in untreated groups. BV/TV rate raised in 9 months of untreated group compared to normal control group, and it went up in 5, 7 months of FFQSP groups compared to untreated groups. Trabecular numbers increased in 5 and 9 months of untreated groups compared to those in the normal group when it increased in 5 and 7 months of FFQSP groups compared to those in untreated groups. Immunohistostaining showed in

基金资助: 国家杰出青年科学基金(No.30625043); 国家自然科学基金(No.30572398); 上海市优秀学科带头人计划(No.08XD1404000)

第一作者简介: 女(1980-), 实习研究员, 医学博士, 研究方向: 中医药防治骨退行性病变

电话: (021)54232325 E-mail: bianqin213@126.com

通讯作者: 王拥军