论著

文章编号:1000-5404(2008)17-1604-03

基因芯片分析 Wnt 刺激后小鼠多潜能分化干细胞 C3H10T1/2 的差异基因表达

朱 丹[1],谢 鹏[1],康 权[2],黄 文[1],曾志磊[1],牟 君[1],魏有东[1],陈 晓[1],彭 丹[1],刘庆军[1] (重庆医科大学:[1]附属第一医院神经内科,重庆 400016,[2]附属儿童医院小儿外科,重庆 400014)

摘 要:目的 探讨 Wnt 信号传导系统对诱导干细胞向神经系统分化的基因表达的影响。方法 采用最新的含有 22 000 多个已知基因及 EST 克隆的小鼠基因芯片 U74Av2,检测了 Wnt 刺激后的小鼠多潜能分化干细胞 C3H10T1/2 中目标基因表达的变化,并进行实时定量 PCR,验证了基因芯片结果。结果 Wnt 刺激后小鼠多潜能分化干细胞 C3H10T1/2 中 Wnt 信号传导系统各主要组成基因表达有不同程度增加,对干细胞向神经系统发育有潜在调节作用的基因表达也有增加或减少。结论 表达谱芯片分析成功筛选出 Wnt 刺激引起表达改变且可能与神经发生有关的基因。

关键词:Wnt 信号传导系统;神经系统发育;基因芯片;干细胞
中图法分类号:R329.2;R394-33;R394.3 文献标识码:A

Screening differently expressed genes of mouse stem cells C3H10T1/2 after Wnt3A adenovirus infection: a result with cDNA microarray assay

ZHU Dan[1], XIE Peng[1], KANG Quan[2], HUANG Wen[1], ZENG Zhi-lei[1], MU Jun[1], WEI You-dong[1], CHEN Xiao[1], PENG Dan[1], LIU Qing-jun[1] ([1]Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Chongqing 400016; [2]Department of Pediatric Surgery, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To explore the effect of Wnt signaling pathway on neural differentiation of stem cells. Methods Multiple target genes were analyzed in mouse stem cells C3H10T1/2 by mouse gene chip U74Av2, a novel microarray possessed over 22 000 target genes. Real time PCR was applied for the validation of microarray result. Results The expression of major components of Wnt signaling pathway was increased to various extent. The expression of some potential genes related to neurogenesis increased, the others decreased. Conclusion With cDNA microarray technology, specific genes related to neurogenesis were screened successfully, the expression of which were regulated by Wnt in mouse stem cells C3H10T1/2.

Key words: Wnt signaling pathway; neurogenesis; microarray; stem cell

Wnt 信号传导系统是调控细胞生长增殖的关键途径,可以通过复杂的信号传递通路调控胚胎的早期发育,而且对细胞的分化、增殖及生长也有重要的调节作用[1]。近年来,Wnt 信号系统在哺乳动物神经系统中的调控作用已受到广泛关注,但其对干细胞分化有无影响及其可能的作用机制目前仍然不清楚。cDNA 芯片技术为研究 Wnt 信号传导系统在神经系统发育过程中的基因表达谱及各阶段的关键基因提供了强有力的工具。本研究采用目前最新的 cDNA 表达阵列技术,对 Wnt 刺激下的小鼠多潜能分化干细胞 C3H10T1/2 中 22 000 多个基因表达的变化情况进行检测,并对 Wnt 信号传导系统调控小鼠多潜能分化干细胞分化成神经细胞的可能机制进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠多潜能分化细胞 C3H101/2,购自 ATCC,美国芝加哥大学分子肿瘤研究室保存;含 Wnt3A 的重组腺病毒(Ad5-Wnt3A,含绿色荧光蛋白 GFP)及 GFP 病毒(Ad5-GFP,作为对照)由重庆医科大学附属儿童医院外科研究室惠赠;细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 均购自 Invitrogen 公司;含约22 000个已知基因及 EST 克隆的鼠基因芯片 U74Av2 购自 Affymetrix,由美国芝加哥大学遗传研究室提供。

1.2 方法

1.2.1 Ad5-Wnt3A 及 Ad5-GFP 感染小鼠多潜能分化干细胞 C3H101/2 小鼠多潜能分化细胞 C3H101/2 培养于含 10% 胎牛血清,1% PBS,1% L-GLu 的 BMEM 培养液中,37 ℃、5% CO_2 条件下培养至细胞 50% ~ 70% 融合状态下加入 Ad5-Wnt3A 及 Ad5-GFP 病毒各 10 μl,37 ℃、5% CO_2 条件下培养 30 h,荧光显微镜下观察感染效率。

基金项目:国家自然科学基金(30370500)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30370500)
作者简介:朱 丹,女,重庆市人,博士研究生,主要从事神经干细胞和感染等方面的研究。电话:(023)60563869,E-mail:zhudan825@126.com
通信作者:谢 鹏,电话:(023)68485490,E-mail:xiepeng58@21cn.com
收稿日期:2007-09-14;修回日期:2007-12-26

1.2.2　RNA 提取、纯度及完整性测定　　病毒感染后 30 h，用 RNA 收集试剂盒提取 Wnt3A 组及 GFP 组细胞总 RNA，按说明书操作；RNA 样品于 BECKMAN 多功能分光光度计行纯度分析；MOPS/Formaldehyde 琼脂糖凝胶检验 28、18S 条带完整性。

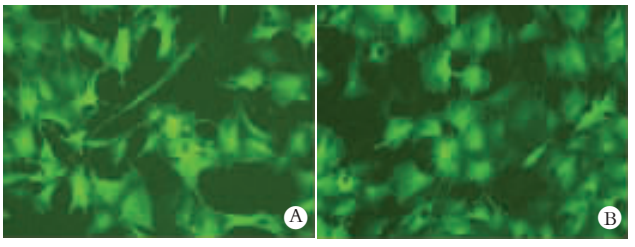
1.2.3　基因芯片杂交及杂交图像分析　　常规方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化，采用小鼠基因芯片（U_{74} Av2）与合成的 cDNA 进行杂交；基因芯片杂交结果的图像及数据分析采用 Affymetrix Microarray Suite Version 5.0（MAS 5.0）软件。以上基因芯片杂交分析由美国芝加哥大学遗传研究室完成。

1.2.4　实时定量 PCR（Real-Time PCR）证实基因芯片结果　　选取基因芯片结果中结缔组织生长因子（connective tissue growth factor，CTGF）和富含半胱氨酸蛋白 61（angiogenic factor cysteine-rich 61，Cyr61/CCN1）2 个基因进行实时定量 PCR 分析。以 Wnt3A 组及 GFP 组细胞总 RNA 的 cDNA 为模板，设计并合成两基因的引物，进行实时定量 PCR 扩增。Cyr61/CCN1 基因上游引物 5′-GGATGAATGGTGCCTTGC-3′，下游引物 5′-GTCCACATCAGCCCCTTG-3′，扩增产物为鼠 Cyr61/ CCN1 基因 3′端约 120 bp 的片段。根据 Real-Time PCR 反应试剂盒 Dynamo SYBR Green qPCR kit（MJ Research Inc）说明书操作。反应条件：94 ℃ 2 min；92 ℃ 20 s，57 ℃ 30 s，72 ℃ 20 s，共 30 次循环。

2　结果

2.1　Ad5-Wnt3A 及 Ad5-GFP 病毒感染效率

Ad5-Wnt3A 及 Ad5-GFP 病毒感染 C3H101/2 细胞后，在荧光显微镜下观察，计算其感染复数（MOI）为 1～5，细胞感染率均达到 90% 以上，见图 1。

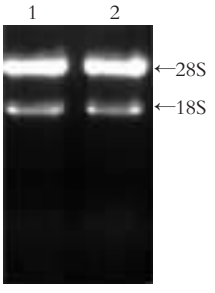


A：Ad-GFP；B：Ad-Wnt3a

图 1　Ad5-Wnt3A 及 Ad5-GFP 病毒感染 C3H101/2 细胞　（荧光显微镜 ×40）

2.2　细胞总 RNA 纯度、完整性测定

样本 RNA 的 $D(260)/D(280)$ 比值为 1.8～2.0。提取的总 RNA 经 MOPS/Formaldehyde 琼脂糖凝胶电泳后可看到清晰的 18S 和 28S 条带，二者含量比值为 2∶1，提示 RNA 没有降解，完整性良好。

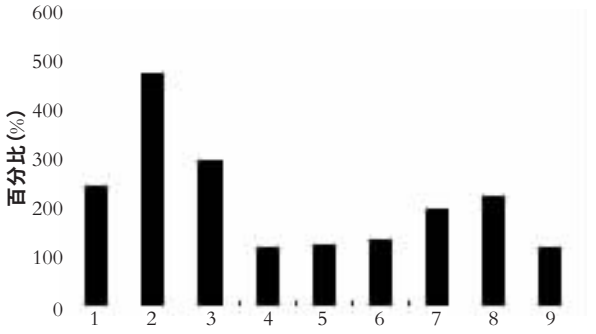


1：GFP　2：Wnt3A

图 2　RNA 电泳结果

2.3　基因芯片杂交分析结果

2.3.1　Wnt 信号传导系统相关基因表达结果　　Wnt 信号传导系统自身组成基因如 Frizzled、Beta-Catenin、LRP5、Dishevelled、Axin 等在 Wnt 刺激下基因表达的改变见图 3。



1：Catenin beta；2：Frizzled 7；3：Frizzled 1；4：LRP5；5：Dishevelled；6：Axin；7：GSK3-Beta；8：C-myc；9：Akt

图 3　Wnt 刺激后 Wnt 信号系统组成基因表达变化

2.3.2　Wnt 信号传导系统刺激后神经系统发育相关基因表达变化　　Wnt 刺激后，与神经系统发育相关基因均有不同程度改变。与 GFP 组相比，表达改变最为明显的基因见表 1。

表 1　Wnt 刺激后表达变化程度较大的部分神经发育相关基因

基因名称	缩写	改变倍数
aryl-hydrocarbon receptor	Ahr	26.112 83
cadherin 17	Cdh17	25.882 72
protease，serine，11	Prss11	18.338 93
plasminogen activator	Plat	6.9335 39
tolloid-like	Tll	6.231 138
SLIT2	Slit2	5.277 301
nuclear protein 1	Nupr1	4.884 241
platelet-derived growth factor，C	Pdgfc	4.322 984
tumor necrosis factor induced protein 6	Tnfip6	4.246 819
tight junction protein 1	Tjp	4.148 292
zinc finger protein ZAC1	Zac1	−16.095 6
ceruloplasmin	Cp	−13.575 7
membrane metallo endopeptidase	Mme	−9.671 5
kit ligand	Kitl	−8.071 8
secreted frizzled-related sequence protein 2	Sfrp2	−7.435 91
angiopoietin	Agpt	−7.211 56
secreted phosphoprotein 1	Spp1	−4.702 01
runt related transcription factor 1	Runx1	−4.669 23
early B-cell factor	Ebf	−4.449 26
transcription factor 3	Tcf3	−2.619 88

2.4　Real-Time PCR 证实基因芯片结果

随机选取基因芯片结果中 CTGF 和 CCN1 进行实时定量 PCR 分析。两基因在芯片结果中表达分别上调约 13 倍及 4 倍。实时定量 PCR 结果显示两基因表达上调约 16 倍及 6 倍，与基因芯片结果基本一致。

3　讨论

基因芯片具有高通量的特点，适用于分析人类基因组计划的海量基因序列信息[2]。基因表达谱芯片技术是通过将大量的基因特异的探针或其 cDNA 片段固定在一块固相载体上，与待测样品杂交后用激光共

聚焦荧光检测系统进行扫描、检测，获得大量有价值的生命信息。本研究采用最新 cDNA 表达阵列技术，使用含有 22 000 多个已知基因及 EST 克隆的小鼠基因芯片 U74Av2，检测了 Wnt 信号传导系统表达增强时其对干细胞向神经系统分化基因的影响。

Wnt 信号传导系统对哺乳类神经系统发生具有决定性的调控作用[3,4]。Wnt 信号途径组成成分直接调控端脑的形成，以及在脑发育过程中前脑的形成[5]。β-catenin 能控制神经前体细胞的生长以及细胞增殖与分化的平衡[6]，Fz3、LRP6 等可诱导神经嵴的发生，干扰它们的表达也同样影响神经嵴的正常发育分化[7]。而目前关于 Frizzled7、Frizzled1、LRP5 等 Wnt 系统组成基因在神经系统发育中的作用研究很少，与干细胞向神经系统分化的关系待进一步研究。本实验利用基因芯片技术对 Wnt 刺激鼠多能干细胞后 Wnt 信号途径的成分检测结果发现 Wnt 信号途径的许多成分均有明显的表达上调，如 β-catenin、Frizzled7、Frizzled1、LRP5、Dishevelled、Axin 和 GSK-3β 等，提示 Wnt 刺激可激活 Wnt 信号途径，可能在干细胞的增殖分化过程中起作用。

Wnt 信号系统激活的下游目标基因是否对神经系统的发育有重要作用也开始逐渐成为研究的对象，Moriguchi 等[8] 发现 Wnt 信号途径也可以通过保护蛋白激酶 B（Akt）来促进神经细胞细胞的分化和存活。本实验结果显示，Wnt 刺激后，其下游基因的表达有不同程度的改变，其中包含很多与神经系统有关的基因，涉及神经系统发育、神经元存活、神经毒性等方面。

基因芯片结果分析显示，aryl-hydrocarbon 受体（aryl-hydrocarbon receptor，Ahr），钙粘蛋白 17（cadherin 17）和丝氨酸蛋白酶 11（protease serine 11）等基因表达增加较多。Ahr 可参与介导 TCDD 导致的与认知及运动障碍有关的神经行为异常的神经毒性作用[9]；cadherin 17 干扰船坞蛋白 Cas-介导的信号合成，并在小脑神经发育颗粒细胞表面信号合成中扮演一定角色[10]。Protease serine 11 是一种组织激肽释放酶，能附着于激肽原底物，产生有效扩张血管的激肽。在缺血性脑卒中导致的脑损伤中可起到抗炎抗氧化保护作用，与减少神经胶质细胞凋亡，炎症细胞浸润，促进血管发生及神经发生有关[11]。表达下调较明显的基因有锌指蛋白 1（zinc finger protein，ZAC1），铜蓝蛋白（ceruloplasmin，Cp），膜金属肽内切酶（membrane metalloendopeptidase）等。ZAC1 在胚胎发育的神经外胚层及中胚层的发育中扮演着重要角色[12]。Cp 是人体重要的亚铁氧化酶，在脑内铜蓝蛋白有促进脑神经细胞铁的释放和摄取作用，维持神经元正常活性；脑内 Cp 表达异常可能与某些神经退行性疾病有关[13]。膜金属肽内切酶可编码、转录与学习记忆、血管发生及神经发生有关基因[14]。

我们的结果表明细胞内 Wnt 蛋白的表达可对 Wnt 信号系统的相关基因进行调控，引起的生物过程涉及神经系统发育、神经元存活、神经毒性等生物过程。本结果为深入了解 Wnt 信号系统的生物学功能、对细胞内复杂的信号通路的调节及其在神经分化机制等研究中提供了重要的线索。

参考文献：

[1] Reya T, Duncan A W, Ailles L, *et al*. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells [J]. Nature, 2003, 423 (6938): 409 - 414.

[2] Fodor S P, Read J L, Pirrung M C, *et al*. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis [J]. Science, 1991, 251 (4995): 767 - 773.

[3] Kiecher C, Niehrs C. A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in Xenopus [J]. Development, 2001, 128 (21): 4189 - 4201.

[4] Michiue T, Fukui A, Yukita A, *et al*. XIdax, an inhibitor of the canonical Wnt pathway, is required for anterior neural structure formation in Xenopus [J]. Dev Dyn, 2004, 203 (1): 79 - 90.

[5] Chizhikov V V, Millen K J. Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system [J]. Dev Biol, 2005, 277 (2): 287 - 295.

[6] Zechner D, Fujita Y, Hulsken J, *et al*. Beta-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.

[7] Wu J, Saint-Jeannet J P, Klein P S. Wnt-frizzled signaling in neural crest formation [J]. Trends Neurosci, 2003, 26 (1): 40 - 45.

[8] Moriguchi T, Kawachi K, Kamakura S, *et al*. Distinct domains of mouse dishevelled are responsible for the c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation and the axis formation in vertebrates [J]. J Biol Chem, 1999, 274 (43): 30957 - 30962.

[9] Williamson M A, Gasiewicz T A, Opanashuk L A. Aryl hydrocarbon receptor expression and activity in cerebellar granule neuroblasts: implications for development and dioxin neurotoxicity [J]. Toxicol Sci, 2005, 83 (2): 340 - 348.

[10] Huang J, Sakai R, Furuichi T. The docking protein Cas links tyrosine phosphorylation signaling to elongation of cerebellar granule cell axons [J]. Mol Biol Cell, 2006, 17 (7): 3187 - 3196.

[11] Chao J, Chao L. Experimental therapy with tissue kallikrein against cerebral ischemia [J]. Front Biosci, 2006, 11: 1323 - 1327.

[12] Valente T, Junyent F, Auladell C. Zac1 is expressed in progenitor/stem cells of the neuroectoderm and mesoderm during embryogenesis: differential phenotype of the Zac1-expressing cells during development [J]. Dev Dyn, 2005, 233 (2): 667 - 679.

[13] Glezer I, Chernomoretz A, David S, *et al*. Genes involved in the balance between neuronal survival and death during inflammation [J]. PLoS ONE, 2007, 2 (3): e310.

[14] Lazarov O, Robinson J, Tang Y P, *et al*. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice [J]. Cell, 2005, 120 (5): 701 - 713.

（编辑 陈聪连）