DOI:10.16016/j.1000-5404.201507087

β-catenin 基因对脊髓源性神经干细胞分化的作用

李 程,毕 杨,汪九龄,南国新 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所干细胞实验室,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地)

[摘要] **目的** 探讨 β-catenin 基因对脊髓源性神经干细胞(neural stem cells,NSCs)分化的作用。**方法** 分离 E14 胎鼠脊髓组织,单细胞克隆技术对其分离细胞扩增培养,免疫荧光对细胞进行鉴定。实验分为 3 组:单独培养的 NSCs(空白组)、感染空载 AdGFP 腺病毒的 NSCs(GFP 组)、感染 Adβ-catenin 腺病毒的 NSCs(β-catenin 组)。荧光显微镜观察细胞感染效率,RT-PCR 检测神经元特异烯醇化酶(NSE)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)mRNA 表达,免疫荧光检测神经元核蛋白(NeuN)、GFAP 的表达及定位,Western blot 检测 NeuN、GFAP 的表达。**结果** 胎鼠脊髓组织分离的细胞具有连续分化及克隆能力,形成少量细胞团,机械分离后细胞呈不规则球形;早期分离的大部分细胞 Nestin 抗原呈阳性;NSE mRNA 在 β-catenin 组显著高于空白组及 GFP 组,GFAP mRNA 表达均低于其他两组($P<0.05$);免疫荧光显示 β-catenin 组 NeuN 的表达水平显著高于空白组及 GFP 组($P<0.05$),主要定位于细胞核中,GFAP 的表达相对较低($P<0.05$);Western blot 检测显示 β-catenin 组的 NeuN 表达显著高于空白组及 GFP 组,而 GFAP 的表达低于其他两组($P<0.05$)。**结论** β-catenin 可促进脊髓源性 NSCs 向神经元分化。

[关键词] Wnt/β-catenin;脊髓;神经干细胞;细胞分化
[中图法分类号] R322.81; R329.24; R394.2 [文献标志码] A

Roles of β-catenin gene in differentiation of rat spinal cord derived neural stem cells

Li Cheng, Bi Yang, Wang Jiuling, Nan Guoxin (Laboratory of Stem Cells of Chongqing Pediatrics Institute, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Base for Child Development and Disorders, the Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of β-catenin gene in the differentiation of spinal cord derived neural stem cells. **Methods** After the spinal cord tissue was harvested from fetal rats at embryonic day 14, single cell cloning technique was used to separate and amplify neural stem cells (NSCs), which were identified with immunofluorescence assay. Then the cells were divided into 3 groups, that is, separately cultured NSCs (blank group), adenovirus vector AdGFP infected NSCs (GFP group), and Adβ-catenin adenovirus vector infected NSCs (β-catenin group). Cell infection efficiency was observed by fluorescence microscopy. The mRNA expression of neuron-specific enolase (NSE) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) was detected by RT-PCR, and the locations of neurons nucleoprotein (NeuN) and GFAP were observed by immunofluorescence assay. Western blotting was used to detect the protein expression of NeuN and GFAP. **Results** The cells derived from fetal rat spinal cord tissue had the ability of continuous differentiation and cloning, and started to form a small number of cell clusters. The cells were irregular in shape after mechanical separation. The majority of early separated cells were positive to Nestin antigen. The mRNA expression level of NSE was significantly higher in β-catenin group than blank group and GFP group ($P<0.05$), and that of GFAP was lower than the other 2 groups ($P<0.05$). Immunofluorescence assay

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81272172)
[通信作者] 南国新,E-mail:ngx1215@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151203.1310.015.html(2015-12-03)

showed that the expression of NeuN was significantly higher in β-catenin group than blank group and GFP group ($P<0.05$), and it was mainly located in the nuclei, but the expression of GFAP was lower ($P<0.05$). Western blot results showed that NeuN was highly expressed in β-catenin group than blank group and GFP group, but GFAP was lowly expressed in β-catenin group ($P<0.05$). **Conclusion** β-catenin promotes the differentiation of spinal cord derived NSCs into neuron.

[**Key words**] Wnt/β-catenin; spinal cord; neural stem cells; differentiation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81272172). Corresponding author: Nan Guoxin, E-mail: ngx1215@126.com

近年来干细胞移植技术已成为医学研究的热点,在帕金森病及阿尔茨海默病等[1-2]神经系统疾病的临床治疗中有着广泛的应用,然而在脊髓损伤等疾病的临床治疗研究进展缓慢。神经干细胞(neural stem cells,NSCs)[3]正常情况下大多向胶质细胞方向分化,极少数分化为神经元,这对神经系统损伤后功能的修复造成了很大的困难。Wnt 信号是生物进化上非常保守的形态发生信号,参与胚胎发生、细胞增殖与分化及器官再生等多种生理过程[4-5],其中 Wnt/β-catenin 信号通路是 Wnt 信号通路中最经典的信号通路,在哺乳动物中枢神经系统的发育过程中起着至关重要的作用[6]。目前,β-catenin 对 NSCs 分化作用的研究主要涉及脑源性 NSCs[7-9],而对脊髓来源 NSCs 的研究甚少。本研究探讨 β-catenin 对脊髓源性 NSCs 的分化作用,以期为脊髓损伤后的修复提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂

细胞培养基 DMEM/F12、胎牛血清、无血清培养添加剂 B27、Glu 和胰酶(Gibco 公司),bFGF 和 EGF(金斯瑞公司),抗巢蛋白(Nestin)抗体、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)抗体和神经核(nerve nuclei,NeuN)抗体(Abcam 公司),细胞裂解液和 RNA 提取试剂盒(百泰克公司),反转录试剂盒和 PCR Mix(天根公司)。

1.2 细胞和重组腺病毒

无菌条件取出 E14 的 CD1 胎鼠(重庆医科大学实验动物中心提供)脊髓,置于 PBS(pH 7.4)中漂洗,于解剖显微镜下剥去脊膜,用手术刀片将组织切碎,加入少量 DMEM/F12(1∶1)无血清培养基,经 200 目尼龙网滤过,1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞,之后将细胞吹打成单细胞悬液,于每培养瓶中(T75 培养瓶)接种 5×10^5 个细胞,使用含 B27 的 DMEM/F12(1∶1)无血清培养基,加用 bFGF(20 ng/mL),37 ℃ 5% CO_2 培养。待原代克隆形成后再次机械分离克隆制成单细胞悬液,每培养瓶中加入 5×10^4 个细胞,并换成 Neurobasal 培养基,加入胎牛血清(5%)、B27(2%)、Glu(1%)、bFGF(20 ng/mL)及 EGF(20 ng/mL),37 ℃ 5% CO_2 培养。每 4~5 天机械分离克隆传代 1 次,方法同前。人胚肾 HEK293 细胞、Adβ-catenin 重组腺病毒及 AdGFP 重组腺病毒均为本课题组保存。

1.3 重组腺病毒 Adβ-catenin 及 AdGFP 扩增

293 细胞接种于培养皿,细胞达 60%~80% 汇合时,加入病毒原液,24 h 后观察荧光表达,3~4 d 后约 90% 细胞表达荧光时离心收集细胞,经反复冻融 3 次后,高速离心收集上清液得到较高滴度的重组腺病毒,-80 ℃保存备用。

1.4 实验分组及处理

实验分 3 组:单独培养的 NSCs(空白组);GFP 组:将 NSCs 接种于培养皿中,细胞达 60% 左右融合时,加入适量 AdGFP 病毒原液,使其成为感染空载 AdGFP 腺病毒的 NSCs;β-catenin 组:将 NSCs 接种于培养皿中,细胞达 60% 左右融合时,加入适量 Adβ-catenin 病毒原液,使其成为感染 Adβ-catenin 腺病毒的 NSCs。NSCs 继续传代培养,24 h 后观察 GFP 组及 β-catenin 组荧光表达情况,补加相应腺病毒,达到 48 h 后观察荧光表达一致(感染率约 50%)。

1.5 RNA 提取及 RT-PCR 检测

参照 RNA 提取试剂盒提取处理 5 d 后的各组细胞 RNA,反转录合成 cDNA,以其为模板,特异扩增神经元特异烯醇化酶(NSE)的引物(正向:5′-AGCCCTCATCAGCTCAGGTA-3′,反向:5′-CTGAGCAATGTGGCGATAGA-3′,片段大小 184 bp)、GFAP 的引物(正向:5′-CACGAACGAGTCCCTAGAGC-3′,反向:5′-GTAGGTGGCGATCTCGATGT-3′,片段大小 196 bp),以及内参 β-actin 的引物(正向:5′-AGGGAAATCGTGCGTGAC-3′,反向:5′-CGCTCGTTGCCAATAGTGA-3′,片段大小 146 bp),进行降落聚合酶链式反应。PCR 产物经琼脂糖电泳后凝胶成像仪上观察拍照。

1.6 细胞免疫荧光检测

细胞分组处理后 5 d,细胞铺板,待细胞贴壁后弃培养基,多聚甲醛固定细胞 15 min,弃多聚甲醛,PBS 洗 3 次,每次 5 min,Triton 作用后,牛血清白蛋白封闭,一抗(1∶300)4 ℃孵育过夜,复温 1 h,回收一抗,PBS

洗3次,每次5 min,相应二抗(1∶1 000)室温下孵育1 h,回收二抗,PBS洗3次,每次5 min,DAPI染核5 min后,PBS洗3次,每次5 min,封片液封片,荧光显微镜下观察拍照。

1.7　总蛋白提取及Western blot检测

细胞分组处理后5 d,PBS洗2遍,细胞刮刮下细胞吸入1.5 mL无酶离心管,加入裂解液RIPA(提前加入终浓度为1 mmol/L的蛋白酶抑制剂PMSF)200 μL,冰上裂解30 min后,4 ℃、13 000 r/min离心5 min,吸取上清至1.5 mL无酶离心管中,BCA法检测蛋白浓度,10%分离胶、5%浓缩胶进行电泳,电泳后湿转法转膜,5%脱脂牛奶封闭1 h,一抗(1∶5 000)于4 ℃孵育过夜,复温1 h,回收一抗,TBST洗膜3次,二抗(1∶2 000)于室温孵育1 h,回收二抗,TBST洗膜3次,ECL发光试剂滴于膜上,置于发光成像仪上观察拍照。

1.8　统计学分析

每组实验重复3次,应用SPSS 19.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两组间比较采用LSD-t检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

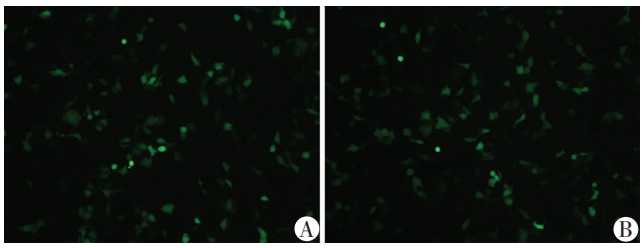
2　结果

2.1　胎鼠神经干细胞形态及鉴定

胎鼠脊髓中获得的原代细胞,经1.2中方法培养24 h,未见细胞克隆形成,2 d后可见少许克隆形成,培养5~6 d,可见细胞集落明显增大,以球型为主(图1A)。原代克隆经4~5次机械分离及传代培养后,更换为Neurobasal培养基培养,并加入胎牛血清、EGF、FGF、B27、Glu等因子,形成单细胞悬液,细胞贴壁生长(图1B),贴壁的细胞克隆经细胞免疫荧光检测,约90%细胞神经干细胞特征性标志物Nestin呈强阳性(图1C~E)。

2.2　AdGFP及Adβ-catenin腺病毒感染效率

NSCs经腺病毒感染后,生长状态良好。感染3 d,荧光显微镜观察细胞的荧光表达率均为60%左右(图2)。保证了后续实验结果的可信性及组间数据的可比性。

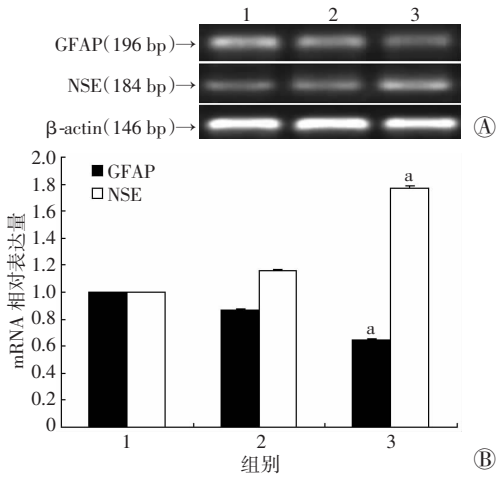


A:GFP组;B:β-catenin组

图2　荧光显微镜观察AdGFP及Adβ-catenin腺病毒感染NSCs　(×100)

2.3　RT-PCR检测各组细胞GFAP、NSE及β-catenin mRNA表达

RT-PCR检测结果显示,β-catenin组NSE mRNA表达水平显著高于空白组和GFP组,而GFAP mRNA表达均显著低于其他两组($P<0.05$,图3)。



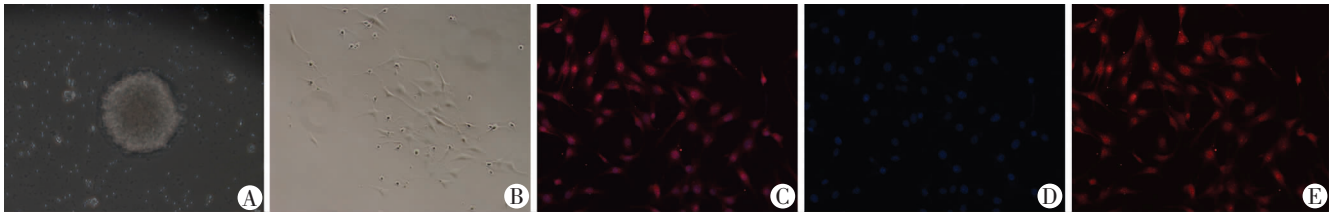
1:空白组;2:GFP组;3:β-catenin组

A:RT-PCR检测;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与空白组及GFP组比较

图3　不同处理组GFAP、NSE及Nestin mRNA表达

2.4　细胞免疫荧光检测各组细胞蛋白的表达及定位

感染AdGFP及Adβ-catenin腺病毒5 d后,GFAP细胞质与细胞核均有表达;β-catenin组的细胞阳性率显著低于空白组和GFP组(图4)。NeuN主要定位于细胞核内,β-catenin组阳性率显著高于其他两组($P<0.05$,图5、6)。



A:培养基中呈悬浮球形生长的克隆;B:贴壁生长的细胞克隆;C~E:克隆细胞呈Nestin阳性(C为融合图,D为DAPI,E为Nestin阳性细胞)

图1　分离的神经干细胞及Nestin免疫荧光鉴定　(×200)

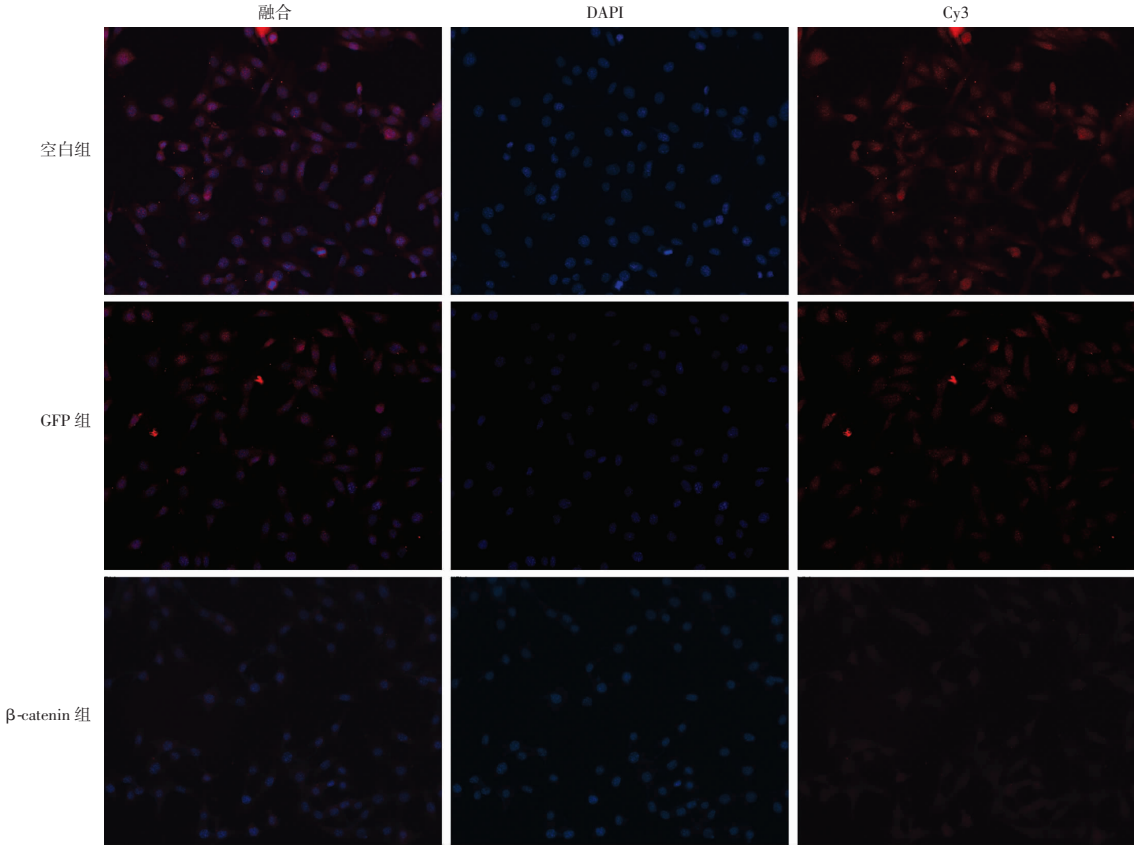


图 4　免疫荧光检测各组 GFAP 表达及定位　（×200）

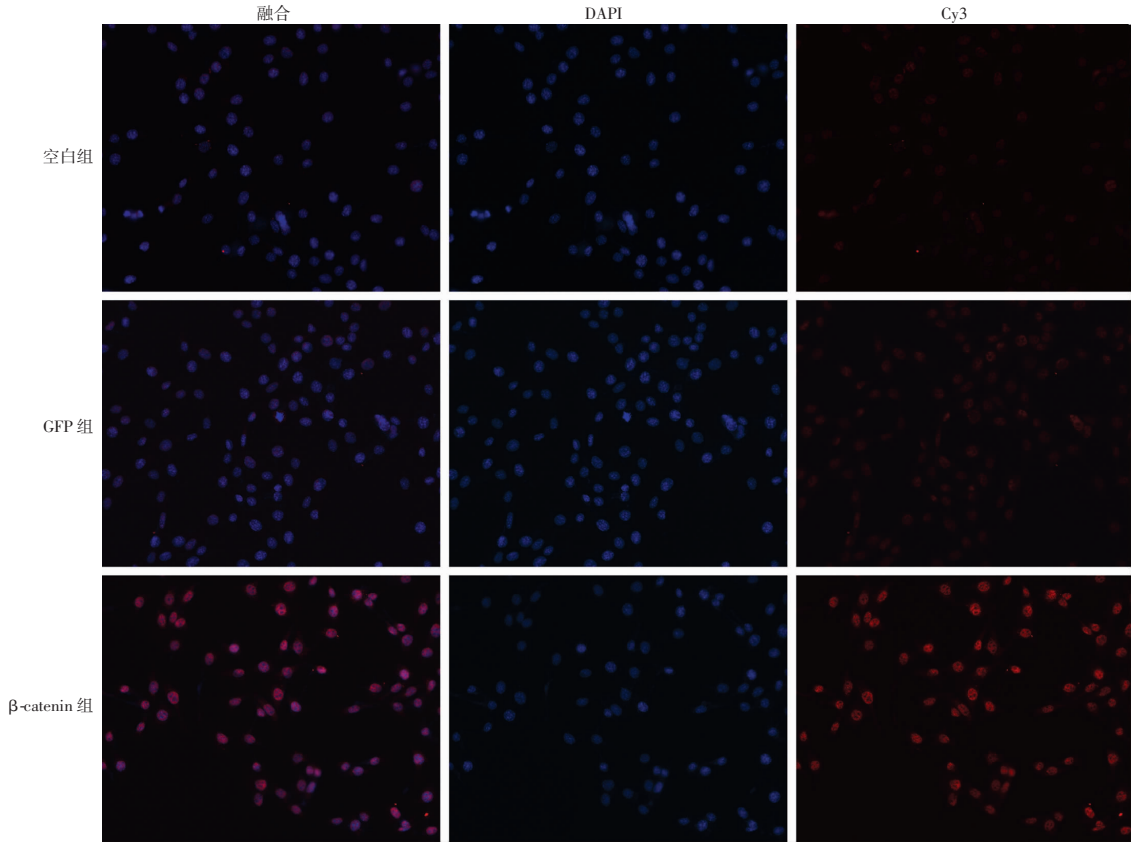
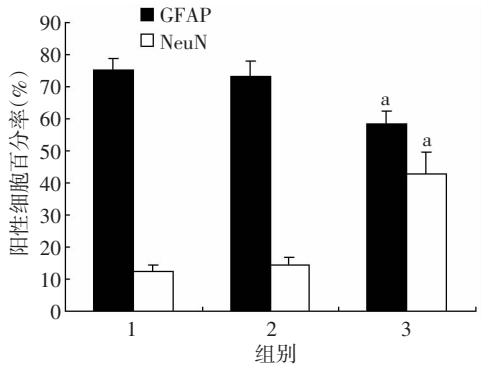


图 5　免疫荧光检测各组 NeuN 表达及定位　（×200）



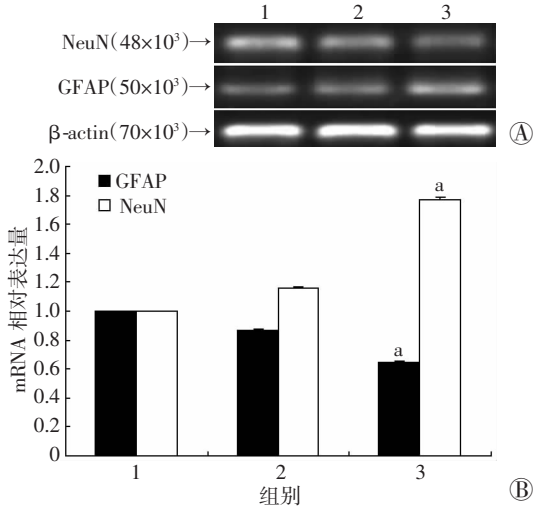
1:空白组;2:GFP 组;3:β-catenin 组

a:$P<0.05$,与空白组及 GFP 组比较

图 6　免疫荧光检测各组阳性细胞百分比

2.5　Western blot 检测各组细胞 NeuN 和 GFAP 的表达

Western blot 结果显示,Adβ-catenin 腺病毒感染 NSCs 后 NeuN 表达显著高于空白组和 GFP 组($P<0.05$),而 GFAP 表达水平则显著低于其他两组($P<0.05$,图 7)。



1:空白组;2:GFP 组;3:β-catenin 组

A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与空白组及 GFP 组比较

图 7　Western blot 检测不同处理组 GFAP、NeuN 的表达

3　讨论

近年来,干细胞作为治疗疾病的种子细胞在基础实验中取得了良好的治疗效果[10]。如 NSCs 在脑组织及脑血管再生等方面发挥了重要作用[11-12]。

Wnt 是一类通过自分泌或旁分泌发挥作用的分泌型糖蛋白,目前在哺乳动物中发现了 19 种 Wnt 蛋白[13]。β-catenin 是经典 Wnt 信号通路中的关键分子,不仅对组织创面有修复作用[14],还对动物的神经系统发育起着关键作用[15-16]。Inestrosa 等[17]发现 Wnt/β-catenin 信号可以促进多个脑区中 NSCs 的自我增殖,调节其向神经元方向分化。经 β-catenin 基因敲除的小鼠,其脑部存在明显发育缺陷,神经前体细胞出现增殖停滞,而过表达 β-catenin 基因的小鼠其脑内神经前体细胞数量明显增加[18]。目前关于 β-catenin 对脊髓来源 NSCs 分化的研究甚少。

本实验显示,通过酶消化法取材胎鼠脊髓的原代细胞,利用单细胞克隆技术扩增培养,细胞免疫荧光鉴定结果显示约 90% 细胞 Nestin 蛋白呈强阳性。Nestin 蛋白属于中间丝蛋白,特异性的表达于神经外胚层。感染 AdGFP 及 Adβ-catenin 腺病毒后荧光显微镜拍照显示感染情况可,感染效率一致。感染 5 d 后,RT-PCR、Western blot 及免疫荧光检测 NSCs 感染后细胞的分化情况。NSE 是由成熟神经元和神经元起源细胞持续表达的胞质蛋白,是一种脑特异性的糖酵解酶,在细胞内能量代谢中起着重要的作用。在发育过程中,NSE 的水平非常低,但在神经元形态和功能成熟过程中增加。GFAP 是最广泛使用的星形胶质细胞的标记之一。RT-PCR 结果显示 β-catenin 组中 GFAP mRNA 表达显著低于其他两组,而 NSE 的表达则显著增高,表明分离的 Nestin 阳性细胞为 NSCs,具有向神经元及星形胶质细胞分化的潜能。NeuN 作为神经元核蛋白,能够在脊椎动物的神经细胞中检测到,是一种能够识别神经元特异的核蛋白单克隆抗体产生的。免疫荧光结果显示 β-catenin 组细胞 NeuN 的表达较空白组及 GFP 组显著增高,主要表达在细胞核内,GFAP 相对其他两组降低,表面 β-catenin 可以促进 NSCs 向神经元及星形胶质细胞分化,而向神经元方向分化的细胞比例要大于星形胶质细胞。Western blot 结果显示 β-catenin 组细胞 NeuN 的表达较空白组及 GFP 组显著增高,GFAP 降低,也证实了脊髓源性 NSCs 有分化为神经元、星形胶质细胞的潜能,β-catenin 可以作为一种调节因子调控 NSCs 向神经元分化。

综上所述,Wnt/β-catenin 信号途径参与了 NSCs 向神经元细胞分化的过程。在体外细胞培养中,其对 NSCs 的分化起着至关重要的作用。当 Wnt 通路活化时,可激活细胞内的酪蛋白激酶 1ε(CKIε),使散乱蛋白磷酸化后释放 GBP,结合 β-catenin 上的 GSK3β,从而抑制 GSK3β 对 β-catenin 的磷酸化,未磷酸化的 β-catenin 被转运到核中,破坏淋巴增强因子及 T 细胞因子家族形成复合物,启动神经元分化相关靶基因的转录[19],调控 NSCs 向神经元方向分化。然而细胞分化

的调控是一个复杂的过程,涉及众多调控通路,信号通路对细胞增殖与分化的调控也同时存在不同的调控机制。因此,Wnt/β-catenin 信号途径对 NSCs 向神经元细胞分化的调控机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Lim D A, Huang Y C, Alvarez-Buylla A. The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies[J]. Neurosurg Clin N Am, 2007, 18(1): 81 - 92, ix. DOI: 10.1016/j.nec.2006.10.002

[2] Singh S, Mishra A, Shukla S. ALCAR Exerts Neuroprotective and Pro-Neurogenic Effects by Inhibition of Glial Activation and Oxidative Stress via Activation of the Wnt/β-Catenin Signaling in Parkinsonian Rats[J]. Mol Neurobiol, 2015: 1 - 16. DOI: 10.1007/s12035-015-9361-5

[3] Yuan T, Chen M. Neural Stem Cells[J]. Electronic J Biol, 2008, 4(2): 34 - 35.

[4] Croce J C, McClay D R. Evolution of the Wnt pathway[J]. Methods Mol Biol, 2008, 469: 3 - 18. DOI: 10.1007/978-1-60327-469-2_1

[5] Kim H, Kim S, Song Y, *et al*. Dual Function of Wnt Signaling during Neuronal Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells[J]. Stem Cells Int, 2015, 2015: 459301. DOI: 10.1155/2015/459301

[6] Lewis A E, Vasudevan H N, O'Neill A K, *et al*. The widely used Wnt1-Cre transgene causes developmental phenotypes by ectopic activation of Wnt signaling[J]. Dev Biol, 2013, 379(2): 229 - 234. DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.04.026

[7] Chen B Y, Wang X, Wang Z Y, *et al*. Brain-derived neurotrophic factor stimulates proliferation and differentiation of neural stem cells, possibly by triggering the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. J Neurosci Res, 2013, 91(1): 30 - 41. DOI: 10.1002/jnr.23138

[8] Braunschweig L, Meyer A K, Wagenfuhr L, *et al*. Oxygen regulates proliferation of neural stem cells through Wnt/β-catenin signalling[J]. Mol Cell Neurosci, 2015, 67: 84 - 92. DOI: 10.1016/j.mcn.2015.06.006

[9] Wang L, Liu Y, Li S, *et al*. Wnt signaling pathway participates in valproic acid-induced neuronal differentiation of neural stem cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(1): 578 - 585.

[10] Mimeault M, Batra S K. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications[J]. Stem Cell Rev, 2008, 4(1): 27 - 49. DOI: 10.1007/s12015-008-9008-2

[11] Makri G, Lavdas A A, Katsimpardi L, *et al*. Transplantation of embryonic neural stem/precursor cells overexpressing BM88/Cend1 enhances the generation of neuronal cells in the injured mouse cortex[J]. Stem Cells, 2010, 28(1): 127 - 139. DOI: 10.1002/stem.258

[12] Wu W, Chen X, Hu C, *et al*. Transplantation of neural stem cells expressing hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) improves behavioral recovery in a rat stroke model[J]. J Clin Neurosci, 2010, 17(1): 92 - 95. DOI: 10.1016/j.jocn.2009.03.039

[13] 曹旻. 神经发生中的 wnt 信号通路[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(2): 358 - 362. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2013.02.031

[14] 王钰, 龙爽, 谭力, 等. 粒细胞集落刺激因子激活 β-catenin 促进创面修复[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(16): 1648 - 1651. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201411088

[15] Ortega F, Gascon S, Masserdotti G, *et al*. Oligodendrogliogenic and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(6): 602 - 613. DOI: 10.1038/ncb2736

[16] 才礼扬, 赵斌, 王栓科, 等. 脊髓损伤后 Wnt-3a 表达对神经干细胞增殖的影响[J]. 国际骨科学杂志, 2011, 32(2): 129 - 131. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2011.02.021

[17] Inestrosa N C, Varela-Nallar L. Wnt signalling in neuronal differentiation and development[J]. Cell Tissue Res, 2015, 359(1): 215 - 223. DOI: 10.1007/s00441-014-1996-4

[18] 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.

[19] Kleber M, Lee H, Wurdak H, *et al*. Neural crest stem cell maintenance by combinatorial Wnt and BMP signaling[J]. J Cell Biol, 2005, 169(2): 309 - 320. DOI: 10.1083/jcb.200411095

(**收稿**:2015-07-16;**修回**:2015-08-19)

(编辑 龙 亮)