

论著

文章编号:1000-5404(2013)08-0702-05

Wnt7a 基因对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及向神经元样细胞分化的影响

周长立,任先军,蒋涛,王开见,阴洪 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

[摘要] **目的** 研究 Wnt7a 基因过表达对大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)增殖和向神经元样细胞分化的影响。**方法** 构建 Wnt7a 腺病毒,利用病毒感染 MSCs,MTT 法检测 Wnt7a 基因腺病毒感染前后 MSCs 增殖情况,Western blot 检测细胞质和细胞核中 β -catenin 及 CyclinD1 表达的变化,比较诱导后向神经元样细胞的分化率。**结果** 与对照组细胞相比,Wnt7a 腺病毒感染组细胞增殖能力明显增强($P < 0.05$);细胞质和细胞核中 β -catenin 蛋白表达量均明显增加($P < 0.05$);CyclinD1 的蛋白表达量也明显增加($P < 0.05$);诱导后向神经元样细胞分化率明显提高。**结论** Wnt7a 蛋白表达上调,可能通过提高 β -catenin 和 CyclinD1 表达来促进 MSCs 细胞增殖,Wnt7a 蛋白同时促进 MSCs 向神经元样细胞的诱导分化。

[关键词] 腺病毒载体;骨髓间充质干细胞;Wnt7a 基因

[中图分类号] R329.28;R394.33;R394.2

[文献标志码] A

Wnt7a gene stimulates mesenchymal stem cell proliferation and differentiation into neuron-like cells

Zhou Changli, Ren Xianjun, Jiang Tao, Wang Kaijian, Yin Hong (Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of up-regulation of Wnt7a on mesenchymal stem cells (MSCs) proliferation and differentiation into neuron-like cells. **Methods** An adenovirus vector expressing Wnt7a protein was constructed, and then MSCs were transfected with the recombinant vector. MSCs proliferation was detected by MTT assay, and the protein expression of cytoplasmic β -catenin, nuclear β -catenin and CyclinD1 was detected by Western blotting. The rates of MSCs differentiating into neuron-like cells were compared after transfection. **Results** Compared with the control MSCs, the MSCs transfected with Wnt7a recombinant adenovirus vector exhibited an increase in cell proliferation, and the protein expression of cytoplasmic β -catenin, nuclear β -catenin and CyclinD1 significantly increased ($P < 0.05$). The rate of neuron-like cells in the MSCs transfected with Wnt7a recombinant adenovirus vectors was significantly higher than that in the control group and the non-transfection group ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of Wnt7a protein promotes MSCs proliferation through up-regulating β -catenin and CyclinD1 expression, and stimulates MSCs differentiation into neuron-like cells, which provides further foundation for the therapy for spine cord injury.

[Key words] adenovirus vector; mesenchymal stem cells; Wnt7a gene

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271362), the National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (31000438) and the Key Project of "Twelfth Five-year Plan" for Medical Science and Technology of PLA (BWS11C040). Corresponding author: Ren Xianjun, E-mail: ren_xianjun@sina.com

目前,脊髓损伤后治疗依然存在重重困难,主要是神经组织自身修复能力有限。胚胎干细胞和神经干细胞可以作为种子细胞修复神经组织,然而其来源有限,

并且其获取受伦理道德的制约。近年来,具有多向分化潜能的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)由于易于获取而被广泛应用于细胞移植损伤修复,但是脊髓损伤区营养因子分泌缺乏、诱导环境条件不足,导致修复效果不理想。因此,保持 MSCs 的长期存活、提高其向神经元细胞分化率非常重要。研究证明,Wnt 信号在神经发展、轴突和突触生长中发挥着重要作用。Ciani 和其他学者^[1-3]初步研究发现 Wnt7a

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271362);国家自然科学基金青年科学基金(31000438);全军医学科技“十二五”科研重点项目(BWS11C040)

[通信作者] 任先军, E-mail: ren_xianjun@sina.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121229.1008.004.html> (2012-12-29)

能够诱导轴突延伸和分支,对促进神经前体细胞向神经元方向分化有重要作用。本实验拟通过构建 Wnt7a 腺病毒表达载体转染 MSCs,研究 Wnt7a 对 MSCs 增殖及向神经元样细胞分化的影响,以期为临床应用 MSCs 治疗脊髓损伤提供初步的实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

胎牛血清和 DMEM 购自美国 HyClone 公司,CD34、CD44、CD45 和 CD90 流式抗体购自美国 BD 公司,Taq 酶和 dNTP、DH5 感受态细胞、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和 DL2000 DNA Marker 均购自大连 TaKaRa 公司,EcoR I、T₄ DNA ligase 和 T₄ DNA ligase buffer 购自美国 NEB 公司,质粒小抽试剂盒购自 Promega(北京)公司,小鼠抗 GFP 一抗购自美国 CST 公司,山羊抗体小鼠 IgG 二抗购自美国 Santa Cruz 公司,腺病毒滴度测定试剂盒购自上海生博医学生物科技有限公司,TT 试剂盒购自碧云天,小鼠抗大鼠 CyclinD1 单克隆抗体、兔抗大鼠 β -catenin 多克隆抗体、小鼠抗大鼠 β -actin 单克隆抗体和兔抗大鼠 β -Tubulin 均购自美国 Santa Cruz 公司,兔抗大鼠 NSE 多克隆抗体和山羊抗兔 ChromoTM IgG(H+L)二抗购自美国 Abcam 公司。

1.2 大鼠 MSCs 的分离、培养与鉴定

取出生 3 周的 SD 雄性大鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),经颈椎脱臼法处死后,用 750 mL/L 酒精浸泡 5 min,然后在无菌条件下取出双侧股骨和胫骨,用 5 mL 注射器吸取 L-DMEM 完全培养液反复冲洗骨髓腔,将骨髓腔内的骨髓冲出至无菌平皿中,用 200 目筛网过滤后制成细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液重新悬浮沉淀的细胞,吹散后计数,将细胞稀释后按 1×10^4 /cm 接种于 25 cm² 塑料培养瓶,置于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中,24 h 后首次换液,换液前用 0.01 mol/L 的 PBS 轻轻冲洗培养细胞的表面,去除未贴壁的细胞,后期每隔 3 天换液 1 次,并于相差显微镜下观察细胞的形态及生长情况。选用生长良好的第 4 代细胞,待细胞在培养瓶中的覆盖率达到 80% 时消化细胞制备成单细胞悬液,每个样品约 3×10^5 个细胞。500 \times g 离心 5 min,以 500 μ L PBS 重悬。将重悬后的细胞悬液转移至流式检测管中,分别加入 CD34、CD44、CD45、CD90 抗体 5 μ L。4 °C 避光孵育 30 min。加入 500 μ L PBS,500 \times g 离心 5 min,弃上清。加入 300 μ L PBS,混匀后用流式细胞仪检测,然后利用 Cell Quest 软件进行分析。

1.3 Wnt7a 腺病毒表达载体构建

1.3.1 Wnt7a 基因扩增 Wnt7a 基因模板由上海捷瑞生物工程科技有限公司直接合成,利用 PCR 进行基因扩增。Wnt7a -EcoR I 上游:5'-CTCAAGCTTCGAATTCGCCACCATGACCCG-AAAGCGCG-3', Wnt7a-EcoR I 下游:5'-CCATGTTGCGGAATTC-CTTGACGTATACATCTCTGTGC-3'。反应体系由 5 \times buffer (Mg^{2+}) 10 μ L、dNTP(各 2.5 mol/L) 4 μ L、Primer(+) (10 μ mol/L) 1 μ L、Primer(-) (10 μ mol/L) 1 μ L、Wnt7a 基因模板 1 μ L、PrimeSTAR 0.5 μ L、H₂O 32.5 μ L 等组成。循环条件:98 °C 热启动 5 min,98 °C 变性 10 s,55 °C 复性 15 s,72 °C 延伸

1 min,30 个循环,最后 72 °C 聚合 10 min,预期获得 1 085 bp 片段。
1.3.2 Wnt7a 腺病毒质粒构建和病毒包装 用 EcoR I 酶切 pAV-MCMV-EGFP-3FLAG 腺病毒质粒,酶切后电泳回收约 4.8 kb 的载体片段。然后以胶回收后的 Wnt7a 基因片段 40 ng/ μ L 5 μ L、线性化的 pAV-MCMV-EGFP-3FLAG 表达载体 40 ng/ μ L 5 μ L、10 \times Reaction buffer 2 μ L、10 \times BSA(500 μ g/mL) 2 μ L、In-Fusion Enzyme 0.5 μ L、ddH₂O 5.5 μ L 组成的反应体系于 37 °C 孵育 15 min,再在 50 °C 孵育 15 min,立刻转化大肠杆菌感受态细胞。挑取平板上长出的转化子重悬于 10 μ L LB 培养液中,从中取 1 μ L 做模板进行菌落 PCR 鉴定。上游:5'-GTA-TAAGAGGCGCGACCAG-3',下游:5'-CGTCGCCCTCCAGCTCCGACCAG-3'。反应体系由 10 \times buffer(含 Mg^{2+}) 2 μ L、dNTPs (2.5 mmol/L) 1.6 μ L、Primer(+) 0.8 μ L、Primer(-) 0.8 μ L、Template 1 μ L、Taq 聚合酶 0.1 μ L、ddH₂O 等组成。循环条件:94 °C 热启动 5 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 1.5 min,30 个循环,最后 72 °C 聚合 10 min。最终阳性克隆得到 1 226 bp 的片段,阴性克隆得到 167 bp 的片段,最后将阳性克隆送华大基因测序。抽提测序正确的表达质粒后转染 293T 细胞,Western blot 检测细胞中 Wnt7a 基因的表达情况,初步判断腺病毒质粒中 Wnt7a 蛋白表达是否正常。取转染 72 h 后的 293 细胞约 5×10^6 个,以 RIPA buffer 蛋白裂解液裂解,测定蛋白浓度,于 -70 °C 冻存。细胞总蛋白每泳道上样 20 μ g,混合样品缓冲液 5 μ L,100 °C 加热 5 min,10% SDS 凝胶电泳,半干法转膜 120 min,以含 5% 胎牛血清的 TBST 室温封闭 1 h,一抗采用 EGFP 抗体,于 4 °C 孵育过夜,二抗 37 °C 2 h,ECL 显影。将挑选出的阳性 pAV-MCMV-EGFP-3FLAG 腺病毒质粒与辅助包装质粒共转 293 细胞,6 h 更换培养基,次日再换液 1 次,此后每 3 天换液 1 次,7 ~ 15 d 出现病毒空斑,等待病变后纯化,测定滴度。

1.4 MTT 检测 MSCs 细胞 Wnt7a 腺病毒感染前后的增殖状态

将 MSCs 细胞配成 1.8×10^5 /mL 的细胞悬液,待铺板,按 40% 的融合度接种到 24 孔板,每孔铺 500 μ L,16 h 后按 MOI = 80 感染 Wnt7a 腺病毒和对照腺病毒,感染 6 h 后换液,隔 48 h 后观察荧光情况,选择感染效率在 70% 以上的细胞进行后续 MTT 实验。分 3 组:MSCs、MSCs + 对照病毒组、MSCs + Wnt7a 病毒组,每组检测 4 个时间点:1、2、3、4 d,每个时间点重复 3 次,每组细胞配成 2.0×10^4 /mL 的细胞悬液,每孔铺 100 μ L,铺 2 块 96 孔板。在 570 nm 波长处检测各样本光密度值 [$D(570)$],并绘制成生长曲线。

1.5 Western blot 检测 Wnt7a 表达腺病毒感染 MSCs 后 Wnt7a、 β -catenin 和 CyclinD1 的表达

实验分 3 个组:MSCs 组、MSCs + 对照病毒组、MSCs + Wnt7a 腺病毒组,取感染后 4 d 的细胞进行实验。操作方法同 1.3.2。

1.6 MSCs 细胞向神经元样细胞诱导分化

取第 5 代 MSCs 细胞,按 40% 的融合度接种到 24 孔板,第 2 天进行腺病毒感染,将实验细胞分成 3 组:MSCs 组、MSCs + 对照病毒组、MSCs + Wnt7a 腺病毒组,待细胞融合率达到 80% 后,进行诱导实验。加入足够的神经元诱导 DMEM/低糖 +

20% FBS液,于37℃、5% CO₂的培养箱中培养24 h后换液,每孔加入1 mL DMEM/低糖+10 ng/mL bFGF培养过夜,换液后每孔加入1 mL DMEM/低糖+200 μmol/L BHA液,诱导5 h,吸走诱导液,加入300 μL/孔的4%多聚甲醛固定25 min,待用。

1.7 免疫荧光检测 MSCs 细胞向神经元样细胞诱导后 NSE 蛋白表达

将实验细胞分成3组:MSCs组、MSCs+对照病毒组、MSCs+Wnt7a腺病毒组,细胞用PBS清洗2次,0.1%的Triton X-100-PBS透化细胞,1% BSA/10%的正常山羊血清/0.3 mol/L甘氨酸封闭非特异性蛋白,细胞用兔抗大鼠NSE多克隆抗体(Abcam公司,货号ab53025,1 μg/mL)4℃孵育过夜。山羊抗兔Chromo™ IgG(H+L)二抗(Abcam公司,货号ab60315,1:1 000),作用1 h,最后用1.43 μmol/L的DAPI染细胞核,封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.8 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件,多组间均值比较采用随机区组设计资料单因素方差分析,重复测量数据用一般线性模型的Repeated Measures过程实现重复测量资料的方差分析,并用Multivariate过程实现组间的两两比较。

2 结果

2.1 细胞形态观察

倒置显微镜下观察原代(图1A)和第1代MSCs(图1B)第7天生长状况良好,融合率达90%,形态呈梭形或多角形漩涡状排列。

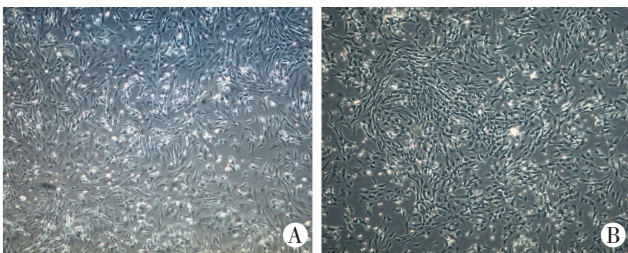


图1 倒置显微镜观察原代(A)和第1代(B)MSCs形态(×50)

2.2 体外培养的 MSCs 表面标志蛋白流式鉴定

CD34、CD45阴性表达分别为1.87%、0.49%,CD44、CD90阳性表达分别为87.79%、85.42%,基本鉴定为MSCs细胞。

2.3 大鼠 Wnt7a 基因 PCR 扩增

PCR法扩增Wnt7a基因CDS,获得1 085 bp片段(图2),与预期片段大小基本相符。

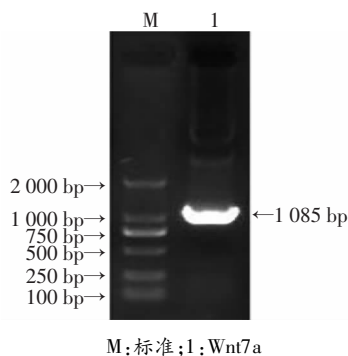
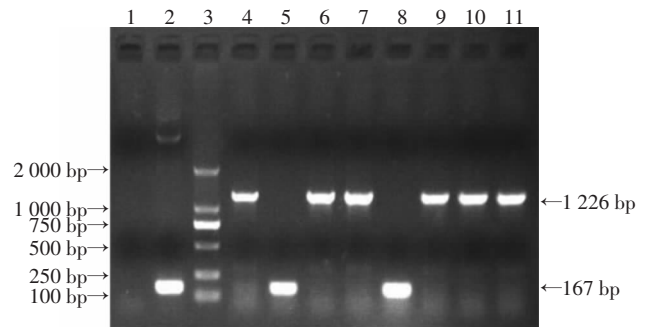


图2 Wnt7a CDS区PCR扩增结果

2.4 Wnt7a 表达质粒的鉴定

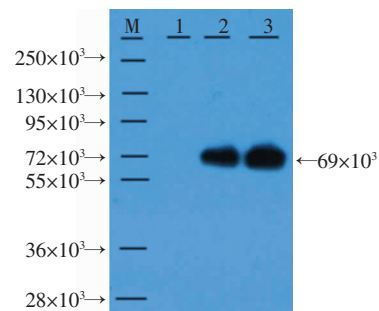
2.4.1 PCR法测定Wnt7a表达质粒的阳性克隆 阳性克隆得到1 226 bp的片段,阴性克隆得到167 bp的片段,PCR鉴定结果与理论值相符(图3),测序结果与设计序列完全一致。



1:阴性对照(ddH₂O);2:空载体;3:DL2000 DNA标准;4~11:挑取的8个转化子

图3 Wnt7a腺病毒质粒的PCR鉴定结果

2.4.2 Western blot法鉴定Wnt7a表达质粒 Wnt7a基因过表达腺病毒载体质粒转染293细胞后,通过Western blot检测Wnt7a蛋白表达情况。表达克隆中插入目的基因片段大小为1 050 bp,可以观察到略小于72×10³处有阳性条带,其大小和Wnt7a-GFP-Flag融合蛋白(69×10³)相吻合。因此,Wnt7a过表达质粒表达正常,质粒构建成功(图4)。



M:标准;1:293细胞(未转染组);2:293细胞+Wnt7a质粒;3:293细胞+Wnt7a质粒

图4 Western blot检测Wnt7a蛋白表达

2.4.3 病毒滴度测定 通过试剂盒测定对照腺病毒的滴度是7.8×10¹⁰ vp/mL,Wnt7a过表达病毒的滴度是1.3×10¹⁰ vp/mL。

2.5 腺病毒感染大鼠 MSCs 的最佳 MOI

荧光显微镜下观察发现构建的对照腺病毒在MOI=80时感染效果最好,Wnt7a过表达病毒在MOI=100时感染效果最好(图5)。

2.6 MTT 检测 Wnt7a 过表达对 MSCs 细胞增殖的影响

MTT实验结果显示,在第1、2天,MSCs+Wnt7a腺病毒组细胞D(570)值与MSCs+对照病毒组细胞、MSCs组细胞相比均没有差异,MSCs+对照病毒组细胞和MSCs组细胞相比也没有差异。在第3、4天,MSCs+Wnt7a腺病毒组细胞D(570)值与MSCs+对照病毒组细胞、MSCs组细胞相比均有差异(P<0.05)。在第5天,MSCs+Wnt7a腺病毒组细胞D(570)值与MSCs+对照病毒组细胞、MSCs组细胞相比均有差异(P<0.01)。说明,在第1、2天,MSCs感染Wnt7a腺病毒组细胞增

殖速度与感染对照病毒组细胞、MSCs 组细胞没有明显差异;在第3~5天, MSCs 感染 Wnt7a 腺病毒组细胞增殖速度与感染对照病毒组细胞、MSC 组细胞有明显差异,推测 Wnt7a 对大鼠 MSCs 有明显的促进作用。见图6。

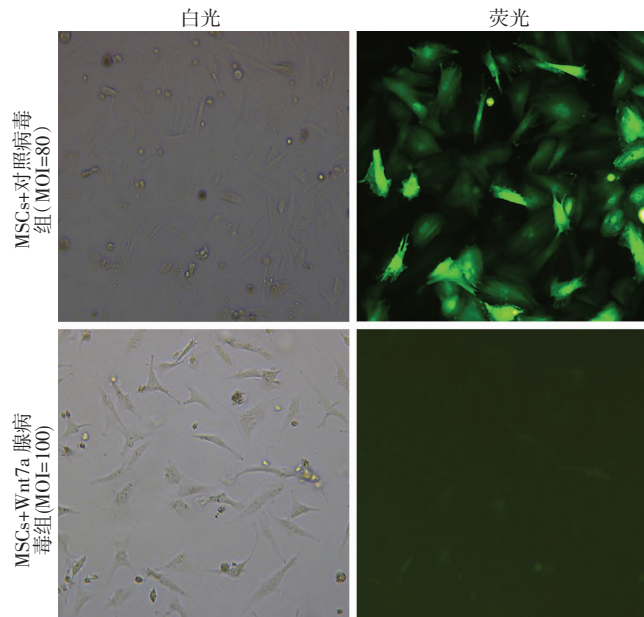
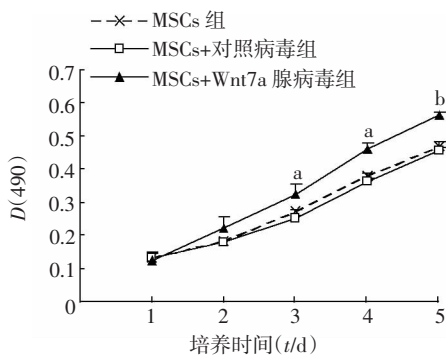


图5 腺病毒感染 MSCs 最佳 MOI 筛选 (×200)



a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 MSCs + 对照病毒组及 MSCs 组细胞比较

图6 Wnt7a 感染 MSCs 后不同时间增殖曲线

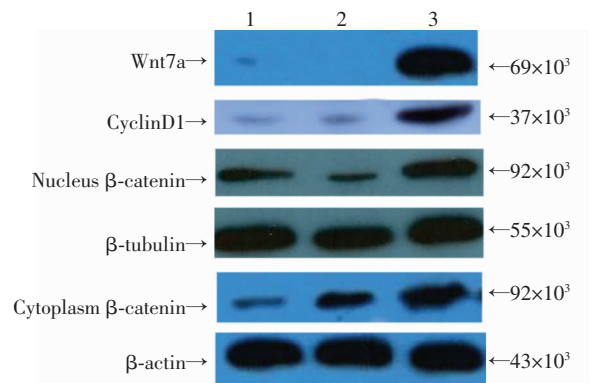
2.7 Western blot 检测 MSCs 感染 Wnt7a 后 β -catenin 和 CyclinD1 的表达

Wnt7a 腺病毒感染大鼠 MSCs 后, CyclinD1 蛋白、细胞质中 β -catenin 蛋白和细胞核中 β -catenin 蛋白表达与感染对照病毒的 MSCs 组相比分别增加 2.1、1.5、1.7 倍, 均有显著差异 ($P < 0.05$); 感染对照病毒的 MSCs 与单纯的 MSCs 相比上述蛋白的表达没有差异 ($P > 0.05$, 图7)。提示, Wnt7a 蛋白过表达后提高 CyclinD1 蛋白、细胞质中 β -catenin 蛋白和细胞核中 β -catenin 蛋白表达, 可能激活了经典的 Wnt/ β -catenin 通路。

2.8 免疫荧光检测 MSCs 感染 Wnt7a 后向神经元样细胞分化

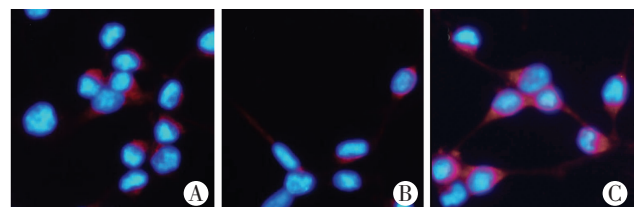
3 组细胞经过诱导后均可见神经元标记蛋白 NSE 的表达 (图8), 但是 3 组的诱导分化率不同, 单纯的 MSCs 组细胞向神经元样细胞诱导率在 45% 左右, 感染对照病毒 MSCs 细胞向神经元样细胞诱导率在 40% 左右, 感染 Wnt7a 腺病毒 MSCs 组细

胞向神经元样细胞诱导率在 67% 左右。感染 Wnt7a 腺病毒 MSCs 组细胞与感染对照病毒 MSCs 细胞相比存在明显差异 ($P < 0.05$), 感染对照病毒组 MSCs 细胞与纯 MSCs 组细胞相比没有差异 ($P > 0.05$)。



1: MSCs; 2: MSCs + 对照病毒; 3: MSCs + Wnt7a 腺病毒

图7 Western blot 检测 Wnt7a 过表达后大鼠 MSCs 中 Wnt7a、 β -catenin、CyclinD1 的表达



A: MSCs 组; B: MSCs + 对照病毒组; C: MSCs + Wnt7a 腺病毒组; 红色: NSE 染色阳性; 蓝色: DAPI 染色

图8 MSCs 向神经元样细胞诱导分化后 NSE 免疫荧光染色观察 (×200)

3 讨论

MSCs 由于取材方便、无异体移植排斥且能定向分化为神经元而被用作治疗脊髓损伤的种子细胞。但脊髓损伤后局部组织细胞变性坏死等复杂生理变化使得损伤区域缺乏必需的神经营养因子来促进移植的种子细胞向神经元方向分化, 并且移植种子细胞存活率低, 影响了细胞移植治疗脊髓损伤的效果^[2-4]。如能提高种子细胞的生长状态和定向分化的比例, 将能极大改善移植治疗的效果。由于 MSCs 有多种标记物, 具有非单一性的特点, 鉴定困难。目前普遍认为 MSCs 表面不表达 CD14、CD34 及 CD45, 而表达 CD44、CD90、CD106 等标志, 本实验选取其中 4 种抗原对 MSCs 进行初步鉴定^[5]。Le-Grand 等^[6]发现, 过表达 Wnt7a 可以通过促进卫星干细胞增殖和延伸来增强肌肉的再生。初步研究^[7-9]发现 Wnt7a 能够诱导轴突延伸和分支, 对促进神经前体细胞向神经元方向分化有重要作用。因此, 本研究构建 Wnt7a 表达腺病毒, 探索其对大鼠 MSCs 增殖和向神经元样细胞诱导分化的影响。本结果显示构建的 Wnt7a 表达腺病毒能够正常表达,

并能在大鼠 MSCs 中正常表达。对照病毒在 MSCs 中的荧光较强, Wnt7a 腺病毒在 MSCs 中的荧光较弱, 微弱的荧光可能是由于在载体构建过程中 Wnt7a 和 EGFP 两个蛋白融合在一起, 在后期蛋白翻译后形成高级结构的过程中 Wnt7a 对 EGFP 有一定的影响, 得出病毒的感染效率在 70% 以上, 为后期研究 Wnt7a 的功能提供了便利工具。

本研究用 Wnt7a 表达腺病毒感染大鼠 MSCs 后, 利用 MTT 法检测 Wnt7a 对 MSCs 增殖的影响。MTT 结果显示, 在第 1、2 天, MSCs + Wnt7a 腺病毒组细胞与感染对照病毒组、MSC 组细胞相比没有明显差异 ($P > 0.05$); 在第 3 ~ 5 天, MSCs 感染 Wnt7a 腺病毒组细胞与感染对照病毒组、MSC 组细胞相比有明显差异 ($P < 0.05$)。说明, Wnt7a 对大鼠 MSCs 增殖有明显的促进作用。与 Le-Grand 等^[6] 发现过表达 Wnt7a 可以促进卫星干细胞增殖的结果相符。Lyu 等^[10] 发现, Wnt7a 可以通过诱导 β -catenin 的积累, 激活 Rac 和 β -catenin, 启动角膜上皮细胞的增殖, 从而增强创伤愈合。本研究通过 Western blot 检测了 Wnt7a 在 MSCs 中过表达前后细胞质和细胞核中 β -catenin 的表达。Wnt7a 腺病毒感染大鼠 MSCs 后, 细胞质中 β -catenin 蛋白和细胞核中 β -catenin 蛋白表达与感染对照病毒的 MSCs 组相比均大量增加, 这与 Qu 等^[11] 在神经干细胞和 Karow 等^[12] 在小鼠 MSCs 中获得的结果一致, Wnt7a 能够通过增加 β -catenin 蛋白的积累和活性, 同时增强下游 CyclinD1 表达, 提高干细胞的增殖。本研究也检测到 Wnt7a 腺病毒感染大鼠 MSCs 后 CyclinD1 蛋白表达增加。而 Zhang 等^[13] 在传代次数较多的大鼠 MSCs 中发现细胞质中 β -catenin 蛋白和细胞核中 β -catenin 蛋白表达较传代次数较少的大鼠 MSCs 中相应蛋白表达增加, 并且发现这些细胞的增殖能力要比传代次数较少的细胞增殖能力弱, 这与我们检测到的 Wnt7a 增加细胞增殖能力的现象有不同, 需要进一步研究。

研究^[14-15] 发现 Wnt7a 通过自分泌或旁分泌作用与位于细胞膜上的受体相结合, 调节靶基因的表达, 对促进神经前体细胞向神经元方向分化和极性形成均有重要作用。本研究通过免疫荧光检测 MSCs 感染 Wnt7a 腺病毒前后向神经元样细胞分化的转化率, 发现过表达 Wnt7a 后向神经元样细胞的转化率明显提高, 为后期作为种子细胞进行动物脊髓损伤修复实验提供了理论基础。

综上所述, 感染了 Wnt7a 腺病毒的大鼠 MSCs 可以提高细胞的增殖、增加向神经元样细胞的转化率, 为后期进行动物实验的深入研究提供初步基础。但是 Wnt7a 增强细胞增殖和提高向神经样细胞的转化率的

机制尚不清楚, 需要深入研究。

参考文献:

- [1] Ciani L, Boyle K A, Dickins E, *et al.* Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108(26): 10732 - 10737.
- [2] Pisati F, Bossolasco P, Meregalli M, *et al.* Induction of neurotrophin expression *via* human adult mesenchymal stem cells: implication for cell therapy in neurodegenerative diseases [J]. *Cell Transplant*, 2007, 16(1): 41 - 55.
- [3] Hofstetter C P, Schwarz E J, Hess D. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(4): 2199 - 2204.
- [4] Kang S K, Jun E S, Bae Y C, *et al.* Interactions between human adipose stromal cells and mouse neural stem cells *in vitro* [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2003, 145(1): 141 - 149.
- [5] Chen S L, Fang W W, Ye F, *et al.* Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction [J]. *Am J Cardiol*, 2004, 94(1): 92 - 95.
- [6] Le-Grand F, Jones A E, Seale V, *et al.* Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 535 - 547.
- [7] Cerpa W, Godoy J A, Alfaro I, *et al.* Wnt-7a modulates the synaptic vesicle cycle and synaptic transmission in hippocampal neurons [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(9): 5918 - 5927.
- [8] Farias G G, Valles A S, Colombres M, *et al.* Wnt-7a induces presynaptic colocalization of alpha 7-nicotinic acetylcholine receptors and adenomatous polyposis coli in hippocampal neurons [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(20): 5313 - 5325.
- [9] Sahores M, Gibb A, Salinas P C. Frizzled-5, a receptor for the synaptic organizer Wnt7a, regulates activity-mediated synaptogenesis [J]. *Development*, 2010, 137(13): 2215 - 2225.
- [10] Lyu J, Joo C K. Wnt-7a up-regulates matrix metalloproteinase-12 expression and promotes cell proliferation in corneal epithelial cells during wound healing [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(22): 21653 - 21660.
- [11] Qu Q, Sun G, Li W, *et al.* Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(1): 31 - 40.
- [12] Karow M, Popp T, Egea V, *et al.* Wnt signalling in mouse mesenchymal stem cells; impact on proliferation, invasion and MMP expression [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8B): 2506 - 2520.
- [13] Zhang D Y, Wang H J, Tan Y Z. Wnt/ β -catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through the DNA damage response and the p53/p21 pathway [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21397.
- [14] Willert K, Brown J D, Danenberg E, *et al.* Wnt proteins lipid-modified and can act as stem cell growth factors [J]. *Nature*, 2003, 423(6938): 448 - 452.
- [15] Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, *et al.* The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells [J]. *Development*, 2004, 131(12): 2791 - 2801.

(收稿:2012-10-25;修回:2012-12-03)

(编辑 龙亮)