

激活 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制猪 AMSCs 向脂肪细胞分化

李惠侠^{1,2}, 罗肖¹, 刘荣鑫¹, 杨映娟¹, 杨公社^{1*}

(1. 西北农林科技大学动物科技学院 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100;

2. 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘要: 本研究以猪脂肪间充质干细胞(AMSCs)为材料,通过 LiCl 对 AMSCs 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路第二信使 β -联蛋白(β -catenin)的稳定作用,探讨体外激活 Wnt/ β -catenin 信号通路对猪 AMSCs 向脂肪细胞分化的作用及其初步机制。应用细胞免疫化学染色鉴定 AMSCs 细胞表面分子 CD44 和 CD105 的表达;油红 O 染色法检测 AMSCs 成脂分化潜能;采用半定量 RT-PCR 及 Western blot 等技术分析 Wnt/ β -catenin 通路各因子及脂肪细胞分化转录因子的表达。结果显示,猪 AMSCs 表达 CD44 和 CD105,并具有多向分化潜能;25 mmol·L⁻¹ 的 LiCl 处理 AMSCs 后,细胞中 β -catenin 蛋白表达明显增强;激活 Wnt/ β -catenin 信号通路后,猪 AMSCs 在成脂诱导剂作用下向脂肪细胞分化的数目减少、细胞内甘油三酯含量降低,脂肪细胞分化转录因子 C/EBP α 和 PPAR γ 的表达受到抑制。以上结果表明,激活 Wnt/ β -catenin 信号通路能明显抑制猪 AMSCs 向脂肪细胞分化,其抑制作用可能是通过下调脂肪细胞分化转录因子 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达来实现的。

关键词: Wnt/ β -catenin 信号通路;LiCl;脂肪间充质干细胞;脂肪细胞;分化

中图分类号:S813.3;Q254

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2010)12-1523-06

Activation of Wnt/ β -catenin Signaling Pathway Inhibits the Adipogenic Differentiation of Porcine Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells

LI Hui-xia^{1,2}, LUO Xiao¹, LIU Rong-xin¹, YANG Ying-juan¹, YANG Gong-she^{1*}

(1. *Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China*; 2. *College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*)

Abstract: To investigate the effects and molecular mechanisms of Wnt/ β -catenin signaling pathway in the adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells (AMSCs), the porcine AMSCs was established, and the Wnt/ β -catenin signaling pathway was activated by regulation of the pathway's second messenger β -catenin. The expression level of CD44 and CD105 of porcine AMSCs cells was evaluated by cellular immunochemistry technique. The adipogenic differentiation of AMSCs was analyzed by Oil red O staining. The expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway factors and the adipogenic transcription factors were checked by semi-quantitative RT-PCR and Western blot analysis. The results showed that the porcine AMSCs expressed of CD44 and CD105, and they have multiple differentiation potential. Wnt/ β -catenin signaling pathway was activated by stabilization of cytoplasmic β -catenin with continuous treatment AMSCs by 25 mmol·L⁻¹ LiCl. The number of adipocytes, and the content of triglyceride decreased during adipogenic induction differentiation of porcine AMSCs. In addition, the adipogenic transcrip-

收稿日期:2010-05-24

基金项目:国家自然科学基金(30871787;31000994)项目资助

作者简介:李惠侠(1978-),女,陕西咸阳市人,博士,主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: lihuixia@njau.edu.cn

* 通讯作者:杨公社, E-mail: gsyang999@hotmail.com

tion factors of CCAAT/enhancer-binding protein- α (C/EBP α) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) were repressed in the presence of LiCl. Taken together, the result indicated that activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibits the adipogenic differentiation of porcine AMSCs, and its inhibition may due to reduce the expression of C/EBP α and PPAR γ .

Key words: Wnt/ β -catenin signaling pathway; LiCl; adipose-derived mesenchymal stem cells; adipocyte; differentiation

Wnt/ β -catenin 是近年来新发现的调节脂肪细胞分化的重要信号通路, β -联蛋白(β -catenin)作为第二信使在此通路中起关键作用。LiCl 是 Wnt/ β -catenin 信号通路中的激活剂^[1-2],其作用机制是:Li 离子是糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)的抑制剂^[3]。生理条件下,Wnt/ β -catenin 信号通路在动物体内不活化,Wnt 与细胞表面特异性受体卷曲蛋白(Frizzled, Frz),低密度脂蛋白 5/6(low density lipoprotein5/6, LDL5/6)不能结合形成复合物,细胞内有活性的 GSK-3 β 不断的磷酸化细胞内的 β -catenin 蛋白,从而使 β -catenin 降解,不能进入细胞核内和转录因子结合^[4]。当加入 LiCl,LiCl 可以在生理条件下抑制 GSK-3 β 活性,继而拮抗 GSK-3 β 对 β -catenin 的磷酸化、降解作用,使胞质内 β -catenin 含量积聚并释放至核内,同核内转录因子淋巴样增强因子-1(lymphoid enhancement factor-1, LEF-1)/T-细胞因子(T-cell factor, TCF)家族相连接,启动下游靶基因的转录和表达,从而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,并行使其生物学功能。

动物脂肪的形成最终以充满脂滴的成熟脂肪细胞为标志,但成熟脂肪细胞最初来源于中胚层多潜能间充质干细胞^[5]。虽然本实验室前面的研究发现 Wnt/ β -catenin 信号通路各因子在猪脂肪形成的早期高表达^[6],但在生理状态下,细胞外的 Wnt 蛋白不会与细胞膜上的受体结合,因此 Wnt/ β -catenin 信号通路不会被激活。为了研究 Wnt/ β -catenin 信号通路在猪 AMSCs 定向脂肪细胞分化中的作用,本试验将分离的猪 AMSCs 置于成脂诱导剂中培养,并以 Wnt/ β -catenin 信号通路中的特异性激活剂 LiCl 来持续处理细胞,在 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活的条件下,研究 Wnt/ β -catenin 信号通路对猪 AMSC 成脂分化的影响及其作用机制,进一步明确调节脂肪细胞分化的信号通路及重要因子。同时,为调控动物胴体肌肉和脂肪组织的比例,改善肉质提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试验动物 1~3 日龄健康无病仔猪(长白),购于陕西杨凌光明猪场。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM /F12 培养基和 I 型胶原酶购自 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;牛血清白蛋白购自 Amersco 公司;胰岛素(insulin)、氢化可的松(hydrocortisone)、转铁蛋白(transferrin)、LiCl(No: L9650)、 β -catenin 抗体(No: C 2206)、油红 O 均购自 Sigma 公司;PPAR γ 抗体、 β -actin 抗体、羊抗兔 IgG-FITC 二抗、辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG 二抗购自 Santa Cruz 公司;C/EBP α (No:BA0669)购自武汉博士德公司;TRIzol 总 RNA 提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶、反转录试剂盒、D2000 marker 购自 Invitrogen 公司。

REVOC CO₂ 细胞培养箱;Olympus IX71 倒置相差显微镜、NIKON Microscope Digital Camera Model DP71 显微镜成像系统及荧光显微镜(日本 NIKON);Bio-Rad PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 猪 AMSCs 分离、培养及纯化和多向分化潜能鉴定 1~3 d 健康仔猪心脏放血致死,酒精棉球局部消毒,切开颈部和背部皮肤,取皮下脂肪组织,剪去可见的血管和结缔组织,用含青、链霉素的 PBS 缓冲液冲洗 3 次;将脂肪组织剪成 1 mm³ 的组织块,加入 I 型胶原酶消化液消化 90 min (37 °C 水浴锅中振荡),消化结束后用等体积的完全培养液中和消化液,100 和 25 μ m 的双层尼龙筛过滤,1 500 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,以去除悬浮的脂肪细胞及脂滴;弃上清液,加入红细胞裂解液,吹打均匀,室温静置 10 min,1 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,弃上清液,加入无血清培养液,吹打均匀,1 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,弃上清液,加入完全培养基,吹打均匀,按 5 \times 10⁴ 个 \cdot mL⁻¹ 的密度将细胞接种于未使用过的 6 孔培养板中,在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培

养;根据 AMSCs 比前体脂肪细胞、内皮细胞等贴壁速度快的特性,12 h 后除去未贴壁的细胞,贴壁的细胞大部分即为 AMSCs。

当细胞生长至汇合后,细胞稀释 2~3 倍再传至培养皿中,在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度 CO₂ 培养箱中培养。此后每隔 2~3 d 换一次完全培养液。至细胞汇合并铺满整个培养皿后,重复上述操作,传代纯化 AMSCs。

1.2.2 细胞免疫化学检测 AMSCs 细胞表面标志

选择生长良好的传代细胞,用胰酶消化液 37 °C 消化 3~5 min,制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 2.0×10^5 个 \cdot mL⁻¹,接种于 96 孔板,每孔内预先放置 1~2 块处理好的细胞玻璃爬片。将接种好的培养皿放入 37 °C、5% CO₂、饱和湿度 CO₂ 培养箱内培养。在倒置显微镜下,每天观察细胞生长情况,取出细胞生长良好,且细胞密度适中的细胞玻璃爬片,用 4% 多聚甲醛固定 15 min。之后参考 SABC 试剂盒说明进行抗 CD34、CD44 和 CD105 免疫细胞化学染色,用 DAB 显色。

1.2.3 激活剂 LiCl 处理细胞 用 10% FBS DMEM/F12 培养液培养猪 AMSCs,待细胞生长至汇合后(第 0 天),用含 25 mmol \cdot L⁻¹ LiCl 的成脂诱导液培养 3 d,然后置于含 25 mmol \cdot L⁻¹ LiCl 的维持培养液中培养至 2 周,阳性对照组细胞用含 25 mmol \cdot L⁻¹ NaCl 处理,其他条件同 LiCl 处理组,并设阴性对照组(未经任何因子(LiCl 或 NaCl)处理的细胞)。

1.2.4 半定量逆转录聚合酶链反应(SqRT-PCR)

取 5 μ g 总 RNA,根据反转录试剂盒说明以随机六聚体为引物合成 cDNA 第一链。取 2 μ L 合成的 cDNA 在 50 μ L 体系中进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 1 min,55~60 °C 55 s,72 °C 延伸 1 min(各基因的循环数参考文献[7]);72 °C 延伸 10 min。反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,Dolphin-DOC 凝胶成像系统分析图像。结果以相同起始量的 β -actin 进行校正,并以特异基因与 β -actin 电泳带相对吸光度的比值表示。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达 分别收集各组细胞,用细胞裂解液提取总蛋白,经 100 °C 10 min 变性后,取 50 μ g 蛋白样品经 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后被电转移到硝酸纤维素膜上。脱脂奶粉于室温封闭 1 h 后,用一抗体孵育 4 °C 过夜,然后用标记过氧化物酶抗兔 IgG 抗体室温孵育 2 h。使用化学发光法 X 光胶片感光。

1.2.6 油红 O 染色化学比色试验 用 PBS 洗涤细胞 2 次,10% 甲醛固定 30 min,PBS 洗 2 次,0.5% 油红 O 染色 20 min,PBS 洗 3 次,37 °C 下干燥细胞,显微镜下观察,细胞内脂质呈红色。每孔加 2 000 μ L 的 100% 异丙醇,振荡萃取 10 min,紫外分光光度计在 500 nm 下以空白对照调零,测各孔光密度值(OD)。

1.2.7 统计学处理 所有试验均重复 3 次,试验所得数据以平均值 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm SE$) 表示,采用 SPSS13.0 统计分析软件中的 One-way ANOVA 进行方差分析和显著性检验,当 $P < 0.05$ 时,表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 猪 AMSCs 培养特性及多向分化潜能鉴定结果

经胶原酶消化后的细胞,接种后 6 h 开始出现成纤维细胞样形态细胞散在贴壁,未贴壁细胞为球形或圆形。将未贴壁的细胞吸出接种到另一培养皿中,让贴壁细胞生长。第 3~5 天,贴壁细胞数量迅速增加,呈簇状增生灶。第 7~8 天贴壁细胞生长即可达 80%~90% 融合。原代培养 10~12 d 可达致密层,14 d 左右即可形成致密单层,细胞紧密排列成漩涡状、辐射状,有一定的方向性,细胞形态为典型梭形。

将纯化后的第 5 代细胞进行 CD44、CD105 和 CD34 免疫组织化学染色。结果显示,95% 的细胞 CD44 和 CD105 呈阳性表达,而不表达 CD34(图 1)。

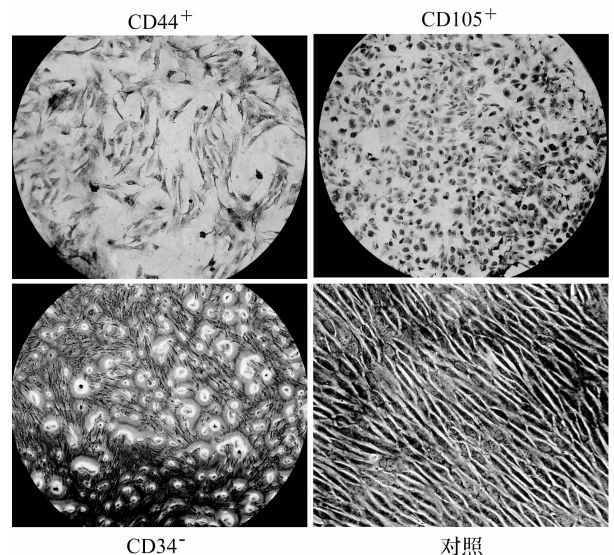


图 1 免疫组化检测 AMSCs 细胞表面标记结果(100 \times)
Fig. 1 The results of cells stained with cellular immunocytochemistry technique(100 \times)

在培养的不同时间分别进行细胞形态观察并检测各组标志基因。结果表明:猪 AMSCs 诱导可向成骨细胞、脂肪细胞、骨骼肌细胞等细胞分化^[8]并表达各自的标志基因^[7]。

以上结果均证明分离的细胞为具有多向分化潜能的猪 AMSCs 细胞。

2.2 LiCl 对猪 AMSCs 细胞内 β -catenin 蛋白表达的影响

LiCl 处理 48 h 后,取长满细胞的处理组和对照组细胞爬片,进行 β -catenin 间接荧光细胞免疫化学染色。同时采用 Western blot 和 SqRT-PCR 方法检测细胞内 β -catenin 蛋白及 mRNA 的表达情况。Western blot 结果显示处理组 β -catenin 蛋白表达量增加(图 2),而 SqRT-PCR 检测细胞内 β -catenin mRNA 与对照组没有明显差异($P > 0.05$)(图 3), β -catenin 间接荧光免疫组织化学染色也证实 LiCl 处理后细胞内 β -catenin 蛋白分布比对照组明显增强。说明 Wnt/ β -catenin 通路的激活剂 LiCl 稳定和增加了猪 AMSCs 内 β -catenin 蛋白,从而激活了 Wnt/ β -catenin 信号通路。并且这种稳定方式是从蛋白水平上进行的,而不是在转录水平。

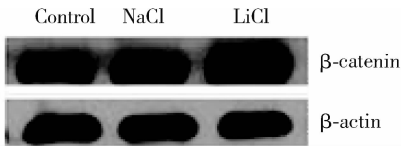


图 2 Western blot 分析 β -catenin 表达

Fig. 2 The expression of β -catenin in porcine AMSCs detected by Western blot

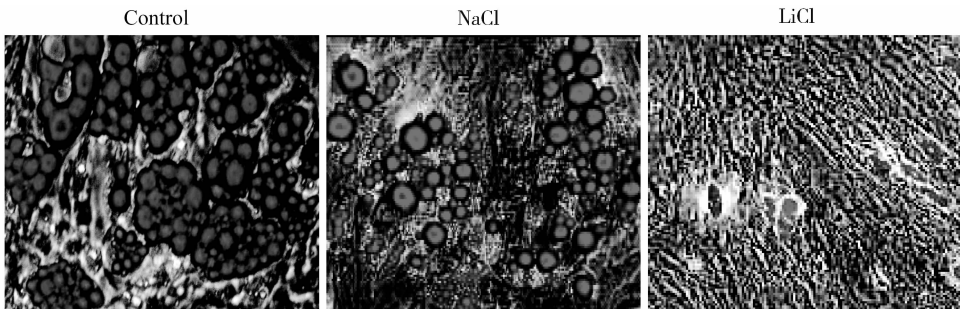
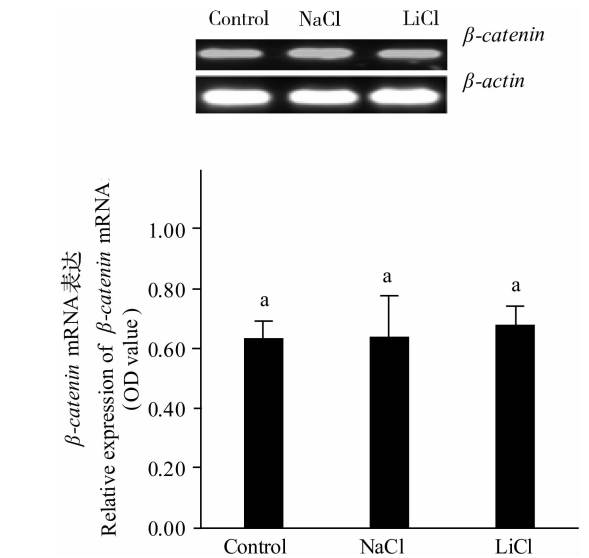


图 4 LiCl 处理细胞后油红 O 染色法检测细胞内脂肪(200 \times)

Fig. 4 Fat droplets in cells stained by Oil red O staining after LiCl treatment(200 \times)

2.4 LiCl 处理过程中脂肪转录因子表达下调

在成脂诱导过程中,即在 LiCl 处理的第 0, 2, 4, 8, 14 天,用 SqRT-PCR 检测脂肪细胞分化过程中转



不同字母表示差异显著($P < 0.05$),图 5 同

Different letters indicate the statistical difference ($P < 0.05$). The same as Figure 5

图 3 SqRT-PCR 分析 β -catenin mRNA 表达

Fig. 3 SqRT-PCR analysis of β -catenin mRNA expression

2.3 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 AMSCs 向脂肪细胞分化

LiCl 处理第 14 天,用油红 O 染色法和油红 O 染色提取法检测脂肪细胞分化情况。结果:油红 O 染色法和油红 O 染色提取法均显示,LiCl 处理组脂肪细胞数目明显减少(图 4),脂肪含量相应降低(图 5),说明 LiCl 抑制了猪 AMSCs 向脂肪细胞的分化。

录因子 $C/EBP\alpha$ 和 $PPAR\gamma$ 等 mRNA 表达情况。在处理的第 14 天,Western blot 检测 β -catenin、 $C/EBP\alpha$ 和 $PPAR\gamma$ 的蛋白表达。结果显示,处理组

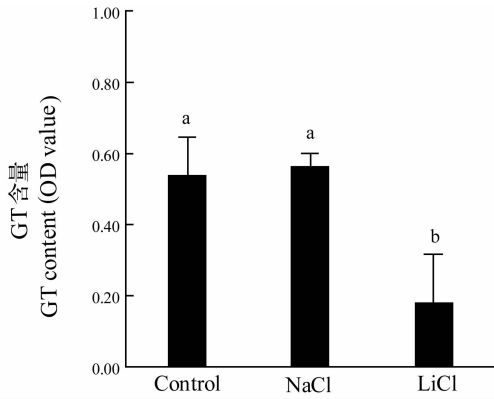
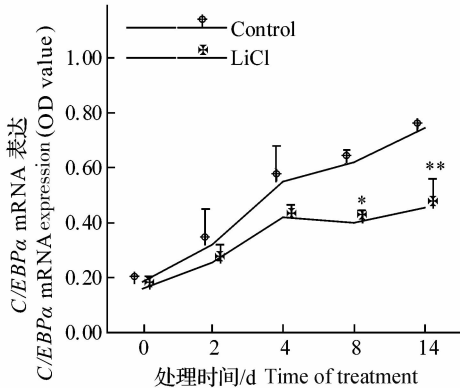
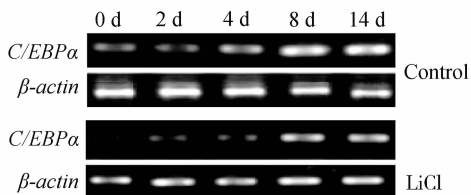


图 5 LiCl 处理细胞后油红 O 染色提取法检测细胞甘油三酯含量

Fig. 5 TG content in cells detected by Oil red O staining extraction after LiCl treatment



同一分化时间,与对照组相比,*表示差异显著($P < 0.05$);**表示差异极显著($P < 0.01$)

Single asterisk indicates a statistical difference ($P < 0.05$), and double asterisks indicate a statistical difference ($P < 0.01$) when compared with control at the same time of differentiation

图 7 LiCl 处理后检测脂肪细胞分化过程中转录因子 C/EBPα,PPARγ mRNA 表达变化

Fig. 7 SqRT-PCR analysis of C/EBPα, PPARγ mRNA expression after LiCl treatment

C/EBPα 和 PPARγ 蛋白(图 6)及 mRNA 表达与对照组相比均明显下调(图 6、图 7)。

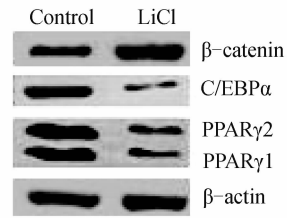
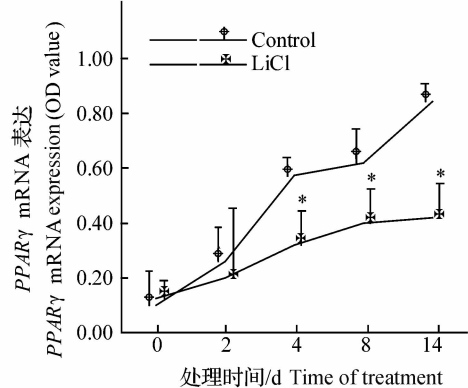
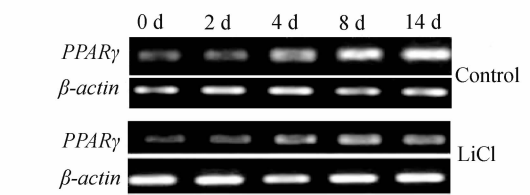


图 6 LiCl 处理后 β -catenin、C/EBPα 和 PPARγ 蛋白表达

Fig. 6 The protein expression of β -catenin, C/EBPα and PPARγ after LiCl treatment



3 讨论

脂肪细胞起源于中胚层多潜能干细胞,其分化主要经历了 2 个阶段:第一阶段为多潜能干细胞定向分化为无脂滴的纤维状前体脂肪细胞;第二阶段,纤维状的前体脂肪细胞终末分化为可贮存脂滴的成熟脂肪细胞,其中,第一阶段的定向对于成脂分化起着决定性作用。因而,间充质干细胞如何定向分化为前体脂肪细胞是脂肪细胞分化的起点,也是目前新的研究热点。体外分离的间充质干细胞有骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、肌卫

星细胞和 AMSCs 等。Vertino 等^[9]在肌卫星细胞中通过抑制 GSK3β 活性或者超表达 Wnt10b 来激活 Wnt/ β -catenin 信号,可导致生脂基因表达抑制,而肌细胞分化潜能增加。抑制 Wnt 信号也可引起体外培养的肌细胞向脂肪细胞转分化。小剂量的 Wnt 激活剂可扩增未分化的 MSCs,大剂量的 Wnt 可增加碱性磷酸酶的表达,抑制 MSCs 向脂肪细胞分化,表明其有抑制脂肪形成、促进成骨的作用^[10-11]。本试验以新的猪成体干细胞 AMSCs 为研究对象,用 LiCl 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路后发现,猪 AMSCs 向脂肪细胞分化的能力受到抑制,而

向成骨细胞分化的能力增强,与在其他成体干细胞中的研究结果相似。

2007年,Kang等人^[12]在具有双向潜能的ST2细胞系中通过转染 β -catenin的超表达载体短暂激活Wnt/ β -catenin信号通路后,发现能够快速抑制C/EBP α 和PPAR γ 的表达,同时,ST2细胞向脂肪细胞分化的能力受到阻碍;而通过超表达C/EBP α 或者PPAR γ 后可以挽救这种抑脂分化作用,从而提出C/EBP α 和PPAR γ 可能是Wnt/ β -catenin信号通路抑制成脂分化的机制。同年,Kawai等^[13]研究表明,用Wnt3a条件培养基通过抑制PPAR γ 而抑制了C/EBP β/δ 诱导的3T3-L1的分化,同时,Wnt3a条件培养基削弱了C/EBP α 和PPAR γ 的表达。该研究组还用LRP6缺失的小鼠胚胎成纤维细胞作为细胞材料进行了研究,发现Lrp6缺失的小鼠胚胎成纤维细胞表现瞬时成脂分化能力增强,并拮抗了Wnt3a条件培养基的抑脂作用。提出C/EBP α 和PPAR γ 是Wnt/LRP6/ β -catenin信号通路调控成脂分化的机制。本试验显示:激活Wnt/ β -catenin信号通路下调了脂肪细胞分化的关键转录因子C/EBP α 和PPAR γ 的表达来实现其抑制成脂分化的,而其他转录因子如C/EBP β 和C/EBP δ 并未受到影响^[7],表明C/EBP α 和PPAR γ 是Wnt/ β -catenin信号通路调控AMSCs定向分化的主要机制,但Wnt/ β -catenin与C/EBP α 和PPAR γ 间的具体作用方式需要深入研究。

4 结 论

综上所述,本研究在体外分离获得猪AMSCs的基础上,用Wnt/ β -catenin信号通路的激活剂LiCl来持续处理细胞,结果LiCl激活了细胞内Wnt/ β -catenin信号通路;激活Wnt/ β -catenin信号通路后将AMSCs细胞置于成脂诱导剂中诱导培养14d后,发现处理组脂肪细胞数目明显减少,细胞内甘油三酯含量显著降低,说明激活Wnt/ β -catenin信号通路抑制了猪AMSCs向脂肪细胞的分化能力,同时,控制脂肪形成的关键转录因子C/EBP α 和PPAR γ 表达明显下调。上述结果表明,激活Wnt/ β -catenin信号通路抑制猪AMSCs向脂肪细胞分化,其抑制作用至少部分是通过下调脂肪细胞分化转录因子PPAR γ 和C/EBP α 的表达来实现的。

参考文献:

[1] ROSS S E, HEMATI N, LONGO K A, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling[J]. *Science*,

2000, 289(5481): 950-953.

- [2] BENNETT C N, ROSS S E, LONGO K A, et al. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(34):30998-31004.
- [3] STAMBOLIC V, RUEL L, WOODGETT J R. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells[J]. *Curr Biol*, 1996, 6(12):1664-1668.
- [4] ANTON R, KESTLER H A, KÜHL M. Beta-catenin signaling contributes to stemness and regulates early differentiation in murine embryonic stem cells[J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(27):5247-5254.
- [5] ROSEN E D, MACDOUGALD O A. Adipocyte differentiation from the inside out[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(12): 885-896.
- [6] 罗 肖, 李惠侠, 杨公社. 猪脂肪组织发育过程中Wnt/ β -catenin信号通路相关基因及脂肪转录因子的时序表达[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(5):746-753.
- [7] 李惠侠. Wnt/ β -catenin信号通路在猪ADSCs向脂肪细胞分化中的作用及机理研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2008.
- [8] LI H X, LUO X, LIU R X, et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling on the adipogenic differentiation potential of adipose-derived porcine mesenchymal stem cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 291:116-124.
- [9] VERTINO A M, TAYLOR-JONES J M, LONGO K A, et al. Wnt10b deficiency promotes coexpression of myogenic and adipogenic programs in myoblasts[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(4): 2039-2048.
- [10] REYA T, DUNCAN A W, AILLES L, et al. A role for Wnt signaling in self renewal of haematopoietic stem cells[J]. *Nature*, 2003, 423: 409-414.
- [11] DE BOER J, WANG H J, VAN BLITTERSWIJK C. Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *Tissue Eng*, 2004, 10(3-4): 393-401.
- [12] KANG S, BENNETT C N, GERIN I, et al. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(19): 14515-14524.
- [13] KAWAI M, MUSHIAKE S, BESSHO K, et al. Wnt/Lrp/beta-catenin signaling suppresses adipogenesis by inhibiting mutual activation of PPARgamma and C/EBPalpha[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363(2): 276-282.

(编辑 郭云雁)