

Wnt/ β -catenin 信号通路在大鼠 BMSCs 神经分化中的作用研究

何丁文^{1,2} 殷明¹ 鄢亚华³ 周荣平¹ 魏强强^{1,2} 殷嫦嫦^{3*}

(1 南昌大学第二附属医院 南昌 330006 2 南昌大学研究生院医学部 南昌 330006 3 九江学院 九江 332000)

摘要 目的: 研究 Wnt/ β -catenin 信号通路在大鼠 BMSCs 神经分化中的作用, 探讨应用 EGF、bFGF 诱导 BMSCs 神经分化的可能信号分子机制。方法 采用全骨髓贴壁法体外分离纯化大鼠 BMSCs。第 3 代 BMSCs 分别给予 20ng/ml 碱性成纤维生长因子(bFGF)和(或)20ng/ml 表皮生长因子(EGF)在含 10ml/L(1%)胎牛血清(FBS)的 DMDM/F-12 培养基中诱导, 倒置相差显微镜观察其形态变化, 免疫组织化学法检测细胞内神经元特异性烯醇化酶(NSE)及胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达, RT-PCR 检测其 β -catenin、BDNF、GDNF、nestin 基因 mRNA 的变化。结果 诱导 7d 后 bFGF 和 EGF + bFGF 组细胞变圆, 向四周伸出多个明显突起, 部分突起间存在连接, 而 EGF 组、空白组变化不明显; 免疫组化染色示 EGF 组 GFAP 阳性率高于 NSE, 而 bFGF 和 EGF + bFGF 组 NSE 阳性率高于 GFAP。EGF + bFGF 组 NSE、GFAP 阳性率最高, bFGF 组次之, 与空白组、EGF 组比较差异均有统计学意义($P < 0.0042$); RT-PCR 示 nestin 在 bFGF 和 EGF + bFGF 组较其他组显著增高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); β -catenin、BDNF 在 EGF 组、bFGF 组、EGF + bFGF 组显著高于空白组, 且各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); GDNF 在 bFGF 组、EGF + bFGF 组显著高于其他组, 且 bFGF 组高于 EGF + bFGF 组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 bFGF、EGF 可诱导大鼠 BMSCs 向神经细胞分化, 分化过程中 β -catenin、BDNF、GDNF 基因表达增高, Wnt/ β -catenin 信号通路可能在 BMSCs 向神经分化过程中起重要作用。

关键词 bFGF EGF BMSCs 神经分化 Wnt/ β -catenin

中图分类号 R318.08

骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是一种成体干细胞, 具有强大的自我增殖能力和多向分化潜能。近年研究表明 BMSCs 不仅可定向分化成成骨细胞、成软骨、成脂肪细胞等中胚层细胞, 在特定条件下还可向外胚层神经元样细胞、星形胶质样细胞和少突胶质样细胞分化^[1], 是细胞移植和组织工程研究的理想种子细胞, 为保证其安全性及临床有效应用, 需了解其增殖分化的确切机制。本研究采用 bFGF 和 EGF 诱导 BMSCs 定向分化为神经细胞, 并研究诱导后 β -catenin、BDNF、GDNF、nestin 的表达变化,

以期从细胞分化和信号通路两方面为 BMSCs 神经分化机制及应用细胞移植治疗神经系统疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 4 周龄大健康清洁级 SD 大鼠 1 只, 体重约 40g, 购自南昌大学医学院实验动物科学部。

1.1.2 主要试剂、仪器 DMEM/F-12 培养基购自 Hyclone 公司, 胎牛血清购自 Gibco 公司, 胰蛋白酶购自 Solarbio 公司, 碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)购自 Peprotech 公司, 兔抗大鼠胶质纤维酸

收稿日期: 2012-10-11 修回日期: 2013-01-26

* 江西省科技支撑计划项目(20111BBG70022-2)

** 通讯作者, 电子信箱: yinchangchang112@163.com

性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)多克隆抗体购自 Peprotech 公司,兔抗神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)多克隆抗体购自 PL Laboratories 公司, Triton-X100 购自 AMRESCO 公司,即用型 SABC 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, DAB 显色试剂盒、HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司, GREENspin 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司, PCR 试剂盒、DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司, 琼脂糖、50 × TAE、EB、乙二胺四乙酸钠(EDTA-Na₂)购自 Solarbio 公司, β-巯基乙醇购自北京华迈科生物技术有限责任公司, 30% 过氧化氢、无水乙醇、多聚甲醛购自广州化学试剂厂。超净工作台购自苏州净化设备有限公司, 移液器购自 BIOHIT 公司, CDI-165M 三气细胞培养箱、BIO-BEST200E 凝胶成像系统购自 SIM 公司, TS100-F 倒置相差显微镜购自 Nikon 公司, PCR 仪购自 BIO-RAD 公司, 水平电泳仪购自北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 的分离、培养 采用全骨髓贴壁法分离培养 BMSCs。颈椎脱臼法处死 SD 大鼠, 75% 乙醇浸泡 30min 消毒, 于无菌条件下取出双侧股骨、胫骨、肱骨, 置于无菌 PBS 液中清洗表面软组织, 显露骨髓腔, 5ml 注射器吸取 PBS 冲洗骨髓腔, 收集冲洗液, 1 000r/min 离心 5min, 弃上清, 加入含 10% FBS 的 DMEM/F-12 重悬细胞后接种于塑料培养瓶, 72h 后全量换液祛除未贴壁细胞, 每隔 2~3d 换液 1 次, 待贴壁细胞融合达 90% 时按 1:2 或 1:3 传代, 反复贴壁纯化, 在 DMEM/F-12 中传代至第 3 代。倒置相差显微镜观察细胞形态变化并拍照。

1.2.2 BMSCs 向神经分化 取第 3 代 BMSCs 消化后按 1.5×10^5 /ml 接种至 24 孔或 6 孔板, 24h 后吸去原培养基, 按下面分组加入诱导液进行诱导: (1) 空白组: 每孔加不含生长因子的含 1% FBS 的 DMEM/F-12 培养液; (2) EGF 组: 每孔加含 20ng/ml EGF 及 1% FBS 的 DMEM/F-12 培养液; (3) bFGF 组: 每孔加含 20ng/ml bFGF 及 1% FBS 的 DMEM/F-12 培养液; (4) EGF + bFGF 组: 每孔加含 20ng/ml EGF、20ng/ml bFGF 及 1% FBS 的 DMEM/F-12 培养液。共诱导 7d, 每 3d 换液 1 次。倒置相差显微镜观察细胞形态变化并拍照。

1.2.3 神经标志物的免疫组织化学染色 诱导 7d 后

的细胞用 40g/L 的多聚甲醛固定 30min, 依次用 PBS 漂洗 3 次、0.3% (体积分数) Triton X-100 处理 20min、0.3% (体积分数) H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶 10min, 经 5% (质量浓度) 牛血清白蛋白(BSA)封闭 20min 后分别滴加一抗 NSE 抗体(1:100)、GFAP 抗体(1:50), 空白对照组将上述抗体换为 PBS 液, 之后置于湿盒中 4℃ 过夜后滴加通用型生物素化山羊抗兔二抗, 室温孵育 20min, PBS 漂洗 3 次, 滴加试剂 SABC 孵育 20min, PBS 漂洗 3 次后用 DAB 法显色及苏木精复染(具体步骤按试剂盒说明书进行)。染色后显微镜下每组随机选择 10 个视野, 计算阳性细胞比例并拍照。

1.2.4 RT-PCR 检测其 mRNA 变化 诱导培养 7d 后按 RNA 快速提取试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA, 采用两步法 RT-PCR: 以 Olig(dT) 为引物, 以 M-MLV 反转录合成 cDNA, 逆转录为 cDNA 后行 PCR 扩增, PCR 反应体系: cDNA 0.5μl, 上下游引物各 1μl, Mix 12.5μl, ddH₂O 10μl, 总体积 25μl。扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳 20~25min, BIO-BEST200E 凝胶成像系统照相, Image J 软件进行灰度分析。目的基因引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 引物系列及产物大小见表 1。检测的目的基因包括 β-catenin、脑源性神经营养因子(BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、巢蛋白(nestin)。

1.3 统计学分析

数据由第一作者采用 SPSS19.0 统计软件包进行分析, 计数资料两两样本间率的比较采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。计量资料结果以均数 ± 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Scheffe 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 BMSCs 体外分离培养

原代培养 24h 后见少量圆形贴壁细胞, 3d 全量换液后见较多贴壁细胞, 呈圆形、短梭形, 成簇缓慢生长(图 1a); 第 7d 见细胞以典型的长梭形为主(图 1b), 约 2 周细胞融合可达 80%~90%(图 1c); 第 1、2 代培养可见少量杂细胞(图 1d、1e), 经反复换液、传代至第 3、4 代时细胞形态大致呈单一的长梭形或扁平形, 呈鱼群样、漩涡样及栅栏样紧密排列生长(图 1f)。

2.2 BMSCs 神经分化及神经标志的免疫组织化学染色

诱导 7d 后 bFGF 和 EGF + bFGF 组神经样细胞明

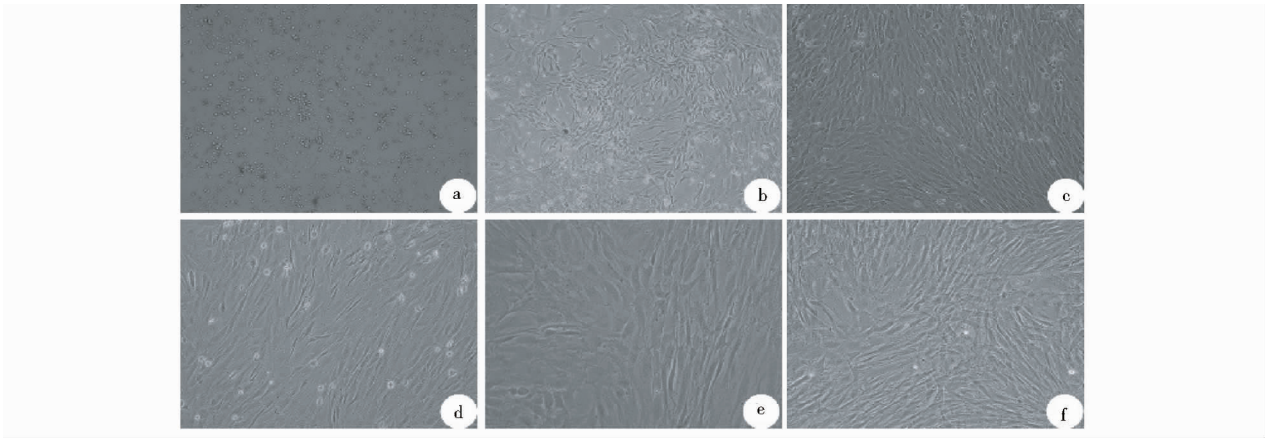


图 1 细胞形态学观察(×100)

Fig.1 Cellular morphology observation(×100)

(a) Primary BMSCs cultured for 3 days (b) Primary BMSCs cultured for 7 days (c) Primary BMSCs cultured for 12 days (d) BMSCs at passage 1 cultured for 3 days (e) BMSCs at passage 2 cultured for 3 days (f) BMSCs at passage 3 cultured for 3 days

表 1 RT-PCR 引物序列及产物大小

Table1 RT-PCR primer sequence of target gene and product size

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	产物大小(bp) Product size(bp)
β -catenin	上游 5'-CTGCTGACAGGGAGGACATT-3'	442
	下游 5'-TGCACAAACAGTGAATGGT-3'	
GDNF	上游 5'-TGCCCGAAGATTATCCTGAC-3'	264
	下游 5'-TCAGTTCCTCCTTCCTTTTCG-3'	
BDNF	上游 5'-GCGGCAGATAAAAAGACTGC-3'	238
	下游 5'-GCAGCCTTCCTTCGTGAAC-3'	
nestin	上游 5'-ACCCGCTACAGGACTCTGTG-3'	456
	下游 5'-AATCCCCATCTACCCCACTC-3'	
GAPDH	上游 5'-ATGGGAAGCTGGTCATCAAC-3'	440
	下游 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'	

显多于 EGF 组,胞体为圆形或椭圆形,简单的双极和复杂的多极细胞均可见,胞体向四周伸出明显突起,部分细胞有多个突起且突起末端发出分支,少数细胞相邻的突起间存在连接(图 2a-c)。空白组罕见类似细胞。免疫组化染色示 EGF 组 GFAP 阳性率高于 NSE,而 bFGF 和 EGF + bFGF 组 NSE 阳性率高于 GFAP(图 2d-i),空白组、EGF 组、bFGF 组及 EGF + bFGF 组的 NSE 阳性率分别为 6.52%,9.33%,40.00%,50.75%,GFAP 阳性率分别为 5.79%,19.28%,31.02%,41.13%(图 3);EGF + bFGF 组 NSE 阳性率最高,与空白组、EGF 组、bFGF 组比较差异有统计学意义($P < 0.0042$),bFGF 组与空白组、EGF 组比较差异有统计学意义($P < 0.0042$),而空白组与 EGF 组比较差异无统计学意义($P > 0.0042$);GFAP 阳性率亦是 EGF + bFGF 组最高,与空白组、EGF 组、bFGF 组比较差异有

统计学意义($P < 0.0042$),bFGF 组与空白组、EGF 组比较及空白组与 EGF 组比较差异有统计学意义($P < 0.0042$)。

2.3 RT-PCR 检测结果

成神经分化相关指标 nestin 在 bFGF 组、EGF + bFGF 组较空白组及 EGF 组显著增高,EGF 组低于空白组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),bFGF 组与 EGF + bFGF 组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。信号通路相关指标 β -catenin、BDNF 在各组呈递增趋势,EGF 组、bFGF 组、EGF + bFGF 组显著高于空白组差异有统计学意义($P < 0.05$),且 EGF 组、bFGF 组及 EGF + bFGF 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$);GDNF 在 bFGF 组、EGF + bFGF 组显著高于空白和 EGF 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),bFGF 组及 EGF + bFGF 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),空白组和 EGF

组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)(图4及表2)。

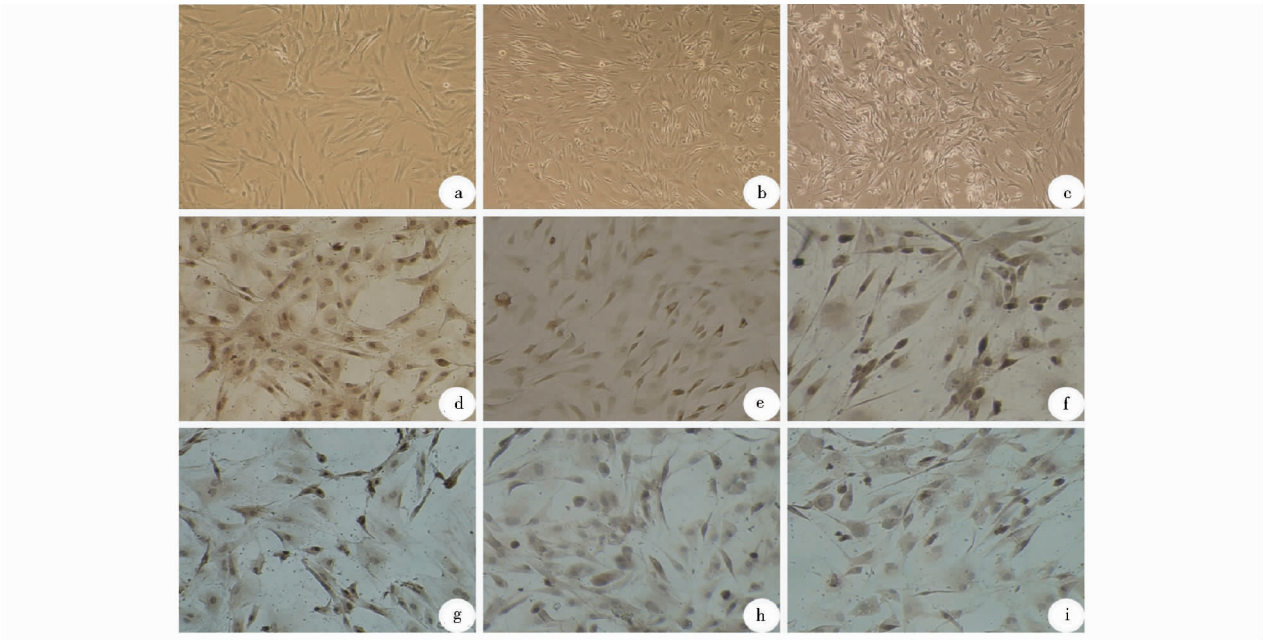


图2 诱导后细胞形态及免疫组织化学染色

Fig.2 Cell morphology and immunohistochemistry after induction

(a)Group EGF of BMSCs induced for 7 days(×100) (b) Group bFGF of BMSCs induced for 7 days(×100) (c) Group EGF + bFGF of BMSCs induced for 7 days(×100) (d) NSE immunohistochemical results of Group EGF of BMSCs induced for 7 days(×200) (e) NSE immunohistochemical results of Group bFGF of BMSCs induced for 7 days(×200) (f) NSE immunohistochemical results of Group EGF + bFGF of BMSCs induced for 7 days(×200) (g) GFAP immunohistochemical results of Group EGF of BMSCs induced for 7 days(×200) (h) GFAP immunohistochemical results of Group bFGF of BMSCs induced for 7 days(×200) (i) GFAP immunohistochemical results of Group EGF + bFGF of BMSCs induced for 7 days(×200)

表2 诱导7d 各组相关基因 mRNA 相对表达水平($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Relative expression of related mRNA in each group at 7 days after induction ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	β -catenin	GDNF	BDNF	nestin
空白组	0.27 ± 0.04	0.43 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.46 ± 0.02
EGF 组	$0.64 \pm 0.05^{1)}$	0.49 ± 0.01	$0.37 \pm 0.00^{1)}$	$0.17 \pm 0.01^{1)}$
bFGF 组	$0.97 \pm 0.02^{1)2)}$	$0.94 \pm 0.04^{1)2)}$	$0.70 \pm 0.01^{1)2)}$	$0.79 \pm 0.04^{1)2)}$
EGF + bFGF 组	$1.09 \pm 0.02^{1)2)3)}$	$0.87 \pm 0.02^{1)2)3)}$	$0.87 \pm 0.02^{1)2)3)}$	$0.78 \pm 0.03^{1)2)}$

1) Compared with group Blank, $P<0.05$; 2) Compared with group EGF, $P<0.05$; 3) Compared with group EGF, $P<0.05$

3 讨 论

1968 年 Friedenstein^[2]首次分离并描述了 BMSCs 的特性,根据其特性其他研究者从人、大鼠、小鼠、兔及猴子等动物分离出了 BMSCs^[3],所得到的 BMSCs 具备以下特性:(1)呈典型的纤维样细胞形态;(2)在标准培养条件下,必须喜塑料贴壁;(3)必须表达骨髓基质表面分子 CD73、CD90、CD105,而不表达造血或内皮细胞表面分子 CD34、CD45、CD14、CD11b、CD79 或者 CD19 和 HLA-DR 表面分子;(4)必须具备多向分化潜能,能在体

外分化为成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞等^[4-5]。本实验采用 Friedenstein 的全骨髓贴壁法分离培养 BMSCs,在塑料培养瓶中第 3、4 代 BMSCs 呈典型的长梭形,呈鱼群样、漩涡样及栅栏样紧密排列。bFGF 联合 EGF 诱导 BMSCs 培养 7 天后发现 bFGF 和 EGF + bFGF 组细胞胞体为圆形,简单的双极和复杂的多极细胞均可见,胞体向四周伸出明显突起,部分细胞有多个突起且突起末端发出分支,部分突起间存在连接;实验组 NSE、GFAP 表达增高,EGF + bFGF 组 NSE、GFAP 阳性率最高,bFGF 组次之,EGF 组 GFAP 阳性率高于 NSE,而

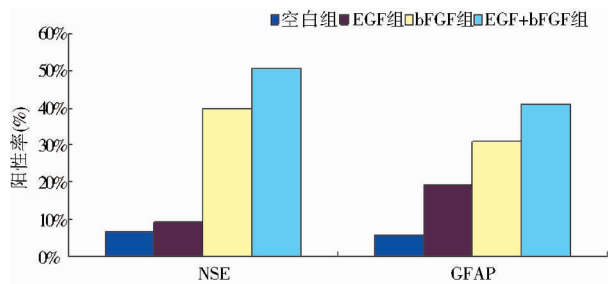


图3 各组 NSE、GFAP 阳性率比较

Fig. 3 Rates of NSE and GFAP positive cells in each group

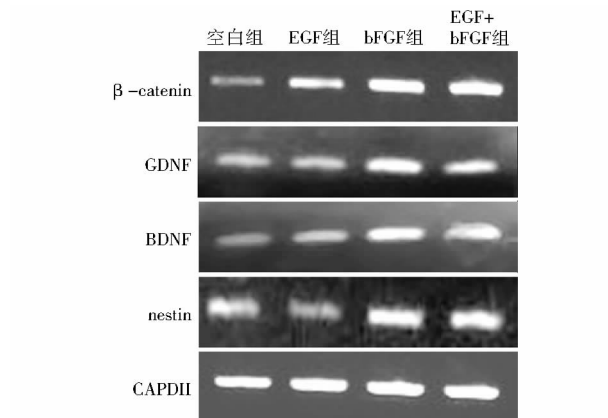


图4 相关基因 mRNA 表达水平电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of related mRNA expression

bFGF 和 EGF + bFGF 组 NSE 阳性率高于 GFAP; nestin mRNA 在 bFGF 和 EGF + bFGF 组较其他组显著增高。NSE、GFAP 分别为成熟神经元、星形胶质细胞的特异性标记物^[6], 而 nestin 则是神经干细胞标志物^[7]。说明全骨髓贴壁法成功分离出 BMSCs, BMSCs 在该诱导条件下定向分化为神经细胞。

随着对干细胞向神经分化分子机制研究的不断深入,人们对古老的 Wnt 信号通路干细胞向神经分化中的作用开始产生了浓厚的兴趣。目前已经阐明的 Wnt 信号转导途径有 4 条,但研究最多的是经典 Wnt 信号通路-Wnt/ β -catenin 信号通路,经典 Wnt 信号通路由胞外的具有干细胞生长因子作用的 Wnts 蛋白、膜受体、 β -catenin 以及下游的靶基因组成,其中 β -catenin 是该信号通路中的关键蛋白,胞浆内 β -catenin 的数量和状态直接决定 Wnt 信号通路的功能状态。周围细胞分泌的 Wnts 蛋白如 Wnt1、2、3、5、6、10 等结合于细胞膜 Frizzled 受体,促进细胞内 Axin2/GSK3 β /APC 复合物去磷酸化降解,释放出游离 β -catenin,大量的 β -catenin

在胞浆内聚集形成核内外浓度差,促使 β -catenin 向胞核内转移,与核内转录因子 TCF 结合,诱导下游目的基因 *Cyclin D1*、*c-myc*、*CD44* 等的转录和翻译,从而产生靶细胞的增殖、分化等一系列生物学效应^[5,8]。Wnt 信号促进多巴胺能细胞分化和神经再生,并在多巴胺能神经元发育过程中起重要作用,经典 Wnt/ β -catenin 信号通路在调控中脑神经干细胞、多巴胺能神经前体细胞的增殖分化中起主要作用,Wnt/ β -catenin 信号分子参与体内多巴胺能神经再生和有功能的多巴胺能神经元形成多个重要阶段^[9]。David 等^[10]在研究 Wnt-3a、Wnt-3 调控脊髓神经前体细胞增殖和神经分化过程中发现 Wnt-3a 促进脊髓神经前体细胞持续增殖并抑制细胞周期依赖性蛋白激酶抑制剂的表达,而 Wnt-3 促进脊髓神经前体细胞短暂增殖并通过 Wnt/ β -catenin 信号增加神经再生,但二者都通过 β -catenin 和 TCF4 依赖的转录促进髓神经前体细胞源性神经元轴突生长。Wislet 等^[11]研究分离培养的 BMSCs 可塑性时发现与小脑颗粒神经元共培养的 nestin 阳性 BMSCs 呈神经元样形态且 Wnts 信号受体蛋白 FZD1、FZD2 及 FZD5 表达增加。

胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF) 属于转化生长因子家族,是目前发现的多巴胺能神经元特异性最强的营养因子,也是运动神经元营养因子。有利于发育中和成熟的多巴胺能神经元的存活和轴突延伸,并能促进神经前体细胞分化为神经元样细胞^[12];对神经损伤修复具有重要作用,提高损伤后的神经元存活^[13],并能促进损伤的周围神经再生^[14]。有研究表明 GDNF 能诱导 BMSCs 向肠神经细胞分化,分化后的细胞 GDNF 表达增强^[15]。脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是神经营养因子家族成员,促进周围及中枢神经细胞存活、生长、发育及功能维持,调节神经元轴突、树突的生长,调控中枢神经系统突触的形成与神经递质的释放^[16-17]。Chen 等^[18]的研究发现 BDNF 能有效促进神经干细胞向神经元和少突胶质细胞分化,并促进神经元突起延伸,分化过程中 Wnt1 和游离 β -catenin 分子表达增加,而这些促进效应可被 Wnt 信号通路特异性阻滞剂 IWR1 显著抑制,说明 BDNF 在体外可能通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路引起神经干细胞增殖、分化。生长因子 bFGF、EGF 作为诱导剂在神经分化过程中作用不同,EGF 主要促进神经前体细胞向胶质细胞分化,而 bFGF 则对神经前体细胞向神经元和胶质细

胞分化均有促进作用^[19]。Ohinata 等^[20]的研究发现 bFGF、EGF 通过骨形态蛋白等途径增加外胚层来源的神经前体细胞中的 β -catenin, β -catenin 作为 Wnt 信号通路关键分子调控核内成神经基因的表达, 从而影响神经前体细胞的增殖和分化。

本实验在 1% 胎牛血清条件下采用 bFGF 联合 EGF 诱导 BMSCs 向神经分化, 分化过程中 β -catenin、BDNF、GDNF 基因表达增高, 尤以 bFGF 和 EGF + bFGF 组最为明显, 与形态学及免疫组化结果基本一致。由此我们推断 Wnt/ β -catenin 信号通路可能在 BMSCs 向神经分化过程中起重要作用, 该通路可能通过以下机制引起神经分化: bFGF、EGF 作用于细胞表面受体并通过某种细胞内信号转导途径激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, β -catenin 调控核内成神经基因的表达, 引起 BMSCs 向神经细胞分化, 分化过程中 BDNF、GDNF 表达增高, BDNF、GDNF 促进周围细胞分化并分泌 Wnts 蛋白或直接激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 BMSCs 向神经分化。虽然有证据表明 bFGF、EGF、BDNF、GDNF 及 β -catenin 在 BMSCs 分化过程中存在关联, 但确切机制不清楚, 需进一步研究。

参考文献

- [1] Ma K, Fox L, Shi G, Generation of neural stem cell-like cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Neurol Res*, 2011, 33(10):1083-1093.
- [2] Friedenstein A J, Gorskaja J F, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976, 4(5):267-274.
- [3] Poliseti N, Chaitanya V G, Babu P P, et al. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *Neurol India*, 2010, 58(2):201-208.
- [5] Zhu H, Guo Z K, Jiang X X, et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc*, 2010, 5(3):550-60.
- [5] Chen B Y, Wang X, Chen L W, et al. Molecular targeting regulation of proliferation and differentiation of the bone marrow-derived mesenchymal stem cells or mesenchymal stromal cells. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(4):561-571.
- [6] Tao H, Rao R, Ma D D. Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition. *Dev Growth Differ*, 2005, 47(6):423-433.
- [7] Rezaei M, Karbalaie K, Tanhaie S, et al. bone morphogenetic protein-4 influences neural differentiation of induced mouse mesenchymal stem cells. *Cell Journal*, 2011, 12(4):511-516.
- [8] Lai S L, Chien A J, Moon R T. Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis. *Cell Res*, 2009, 19(5):532-545.
- [9] Tang M, Miyamoto Y, Huang E J. Multiple roles of beta-catenin in controlling the neurogenic niche for midbrain dopamine neurons. *Development*, 2009, 136(12):2027-2038.
- [10] David M D, Cantí C, Herreros J. Wnt-3a and Wnt-3 differently stimulate proliferation and neurogenesis of spinal neural precursors and promote neurite outgrowth by canonical signaling. *J Neurosci Res*, 2010, 88(14):3011-3023.
- [11] Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, et al. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells*, 2005, 23(3):392-402.
- [12] 陈丹丹, 付文玉, 庄文欣, 等. 多种细胞因子诱导大鼠间充质干细胞向多巴胺能神经元分化. *解剖学杂志*, 2011, 34(5):584-587.
- Chen D D, Fu W Y, Zhuang W X, et al. Some cytokines induce rat bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into dopaminergic neurons in vitro. *Chinese Journal of Anatomy*, 2011, 34(5):584-587.
- [13] Brunet N, Tarabal O, Portero-Otín M, et al. Survival and death of mature avian motoneurons in organotypic slice culture: trophic requirements for survival and different types of degeneration. *J Comp Neurol*, 2007, 501(5):669-690.
- [14] Li Q, Ping P, Jiang H, et al. Nerve conduit filled with GDNF gene-modified Schwann cells enhances regeneration of the peripheral nerve. *Microsurgery*, 2006, 26(2):116-121.
- [15] 吴晓娟, 魏明发, 柴成伟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外向肠神经细胞分化及胶质细胞源神经营养因子表达的变化. *中华小儿外科杂志*, 2010, 31(8):607-611.
- Wu X J, Wei M F, Chai CH W, et al. Differentiation of rat bone marrow stromal cells into enteric neurons and expression change of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Chinese Journal of Pediatric Surgery*, 2010, 31(8):607-611.
- [16] Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, et al. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science*, 2008, 319(5870):1683-1687.
- [17] Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*, 2010, 70(5):304-322.
- [18] 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 Neurosci Res*, 2012, 91(1):30-41.
- [19] Sanalkumar R, Vidyanand S, Lalitha Indulekha C, et al. Neuronal

vs. Glial Fate of Embryonic Stem Cell-Derived Neural Progenitors (ES-NPs) is Determined by FGF2/EGF During Proliferation. J Mol Neurosci, 2010,42(1):17-27.

[20] Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, et al. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. Cell, 2009,137(3):571-584.

Wnt/ β -catenin Signaling Pathway In Neuronal Differentiation of Rat BMSCs

HE Ding-wen^{1,2} YIN Ming¹ WU Ya-hua³ ZHOU Rong-ping¹ WEI Qiang-qiang^{1,2} YIN Chang-chang³

(1 The Second Affiliated Hospital Of NanChang University, Nanchang 330006, China)

(2 Nanchang University Graduate School of Medicine, Nanchang 330006, China 3 JiuJiang University, Jiujiang 332000, China)

Abstract Objective To study the role of Wnt / β -catenin signaling pathway in neural differentiation of rat BMSCs, Explore possible signal molecular mechanism in application of EGF and bFGF induce BMSCs to neuronal differentiation. Methods BMSCs were harvested by the whole bone marrow adherence method, BMSCs at passage 3 were respectively treated with 20ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) and 20ng/ml epidermal growth factor (EGF) in containing 10ml / L (1%) fetal bovine serum (FBS) DMDM/F-12 medium. Then the cellular morphology was observed under inverted phase contrast microscope. At 7days after induction, Immunohistochemical staining was used to detect neuron specific enolase(NSE) and collagen fibre acidic protein (GFAP), and RT-PCR to detect expression of β -catenin, BDNF, GDNF, nestin genes. Results At 7days after induction, BMSCs in group bFGF and EGF + bFGF become round, extend multiple distinct processes around and have connections among some processes, but group EGF and control did not change significantly. Immunohistochemical staining show GFAP positive rate higher than NSE in group EGF, but in group bFGF and EGF + bFGF NSE positive rate higher than GFAP. NSE and GFAP positive rate is highest in group EGF + bFGF, group bFGF is followed, compare With blank group and group EGF, the differences were statistically significant ($P < 0.0042$). RT-PCR show mRNA expression of nestin in group bFGF and EGF + bFGF were significantly higher than other groups ($P < 0.05$); β -catenin, BDNF in group EGF, bFGF and EGF + bFGF were significantly higher than blank group and differences among these three groups were significant ($P < 0.05$). GDNF in group bFGF and EGF + bFGF were significantly higher than other groups and group bFGF was significantly higher than group EGF + bFGF ($P < 0.05$). Conclusion bFGF and EGF are able to induce differentiation of BMSCs into neural cells, the genes of β -catenin, BDNF and GDNF increase expression during differentiation. Wnt / β -catenin signaling pathway may play a important role in neural differentiation of rat BMSCs.

Key words bFGF EGF BMSCs Neural differentiation Wnt/ β -catenin