

Wnt/ β -catenin 信号通路对小鼠海马神经干细胞的影响

张先虎 朱俊德 龙婷婷 王俊婕 康朝胜

摘要 目的 探讨小鼠海马神经干细胞(NSCs) 的体外培养及 Wnt/ β -catenin 信号通路激活剂 Wnt3a 对体外培养 NSCs 增殖和分化的影响, 以期对脑血管与神经系统疾病的预防与治疗提供新的思路。方法 通过无血清悬浮培养法获得新生 24 h 小鼠海马 NSCs, 光镜观察 NSCs 的形态变化, 免疫化学染色法鉴定。将 NSCs 分为正常对照组(sham 组)、Wnt3a 低剂量组(10 μ g/ml)、Wnt3a 中剂量组(25 μ g/ml) 和 Wnt3a 高剂量组(50 μ g/ml)。CCK-8 法检测各组 NSCs 增殖活力; 流式细胞仪检测各组 NSCs 的细胞周期; Western blot 法检测各组中神经元特异烯醇化酶(NSE) 与胶质纤维酸性蛋白(GFAP) 的表达变化。结果 成功分离、培养小鼠海马 NSCs, 光镜下呈典型细胞球, 巢蛋白(Nestin) 阳性。免疫荧光检测显示, NSCs 经诱导分化为 NSE 和 GFAP 阳性细胞。CCK-8 法检测表明, 与 sham 组比较, 随着 Wnt3a 浓度的增加, 相应的培养组细胞在 450 nm 处吸光度值增加, NSCs 的增殖活力增加, 其促进作用呈剂量依赖性($P < 0.05$)。流式细胞仪检测显示, 与 sham 组比较, 随着 Wnt3a 浓度的增加, 相应的培养组细胞所处 G1 期比例降低, (S + G2) 期比例升高, NSCs 的增殖速率提高($P < 0.05$)。Western blot 显示, 与 sham 组比较, Wnt3a 低、中和高剂量组的 NSE 蛋白相对表达量提高($P < 0.05$) , 而 GFAP 蛋白相对表达量降低($P < 0.05$)。结论 体外成功培养 NSCs; Wnt3a 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路可调控 NSCs 的增殖, 促进其向神经元方向分化, 抑制其向星形胶质细胞方向分化。

关键词 神经干细胞; Wnt/ β -catenin 信号通路; Wnt3a; 增殖; 分化

中图分类号 R 329. 2. 1

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2019) 01 - 0044 - 06
doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2019. 01. 009

我国每年死于脑血管和神经系统疾病的患者约

2018 - 08 - 30 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81660243); 贵州省科技厅社会发展科技计划项目(编号: 黔科合 SY 字[2015]3041 号); 贵州省科技厅与贵州医科大学联合项目(编号: 黔科合 LG 字[2012]028 号)

作者单位: 贵州医科大学基础医学院人体解剖学教研室, 贵阳 550025

作者简介: 张先虎, 男, 硕士研究生;

朱俊德, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: jdzhu73@126.com

130 万, 在我国致死和致残原因中均名列第一^[1]。因此, 如何治愈或延缓脑血管和神经系统病变成为亟需解决的问题。神经干细胞(neural stem cells, NSCs) 是来源于中枢神经系统的多能干细胞, 可以分化为神经元、胶质细胞等多种神经细胞^[2]。NSCs 可为神经损伤的修复提供源源不断的原材料, 但是其发挥修复损伤的调控机制仍不是十分清楚。Wnt/ β -catenin 信号通路是神经发育过程中的一条基本通路, 可调控 NSCs 细胞周期的进程, 促使 NSCs 增殖, 但是其对 NSCs 分化方向的影响却没有达成共识^[3-4]。该实验通过研究 Wnt3a 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路后对小鼠海马源性 NSCs 的增殖与分化的影响, 寻找调控 NSCs 增殖和分化的关键因素, 以期对神经系统疾病的预防与治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 随机选取 20 只新生 24 h 昆明种小鼠(体质量 2 ~ 3 g), 清洁级, 合格证号: SCXK(黔)[2018-0001], 由贵州医科大学实验动物中心提供, 实验过程中对动物处理严格执行动物伦理学标准。DMEM/F12(1 : 1) 培养基与 B27 复合物购自美国 Gibco 公司; 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)、Wnt3a 蛋白购自美国 Peprotech 公司; 胎牛血清(FBS)、多聚赖氨酸购自美国 Sigma 公司; 磷酸盐缓冲液(PBS)、0. 25% TRYp-sin/EDTA、青霉素 - 链霉素溶液购自美国 Hyclone 公司; 巢蛋白(Nestin)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、鼠单克隆 5-溴-2-脱氧尿核苷(Brd U)、鼠单克隆神经元特异烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、兔抗鼠单克隆巢蛋白(Nestin) 与兔 IgG SABC-FITC 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物公司; 4', 6-二脒-2-苯基吲哚溶液(DAPI)、抗荧光淬灭封片剂购自北京 Solarbio 公司; 25 cm² 细胞培养瓶、6 孔板、15 ml 离心管购自无锡耐思生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 NSCs 分离及培养 新生 24 h 昆明种小鼠断头处死, 无菌条件下冰上取出双侧大脑, 放入盛有 4 °C PBS 溶液培养皿中漂洗, 然后分离海马组织, 仔细剥离脑膜及血管将海马组织剪碎至 2.0 mm 左右, 加入 0.25% Trypsin/EDTA 2.0 ml, 37 °C 消化后用枪头轻柔吹打至乳糜状, 加入 10% FBS 终止消化。300 目筛网滤过后成细胞悬液, 细胞悬液用 PBS 溶液清洗一次后加入 NSCs 完全培养基 (DMEM/F12、20 ng/ml bFGF、20 ng/ml EGF、20 ng/ml B27、100 U/ml 青霉素、100 µg/ml 链霉素), 以细胞浓度为 1×10^6 /ml 接种于 25 cm² 细胞培养瓶。37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 每 2~3 d 半量换液一次, 6~7 d 传代。

1.2.2 NSCs 传代培养 无菌条件下将细胞悬液转移至离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液, 加入 0.05% Trypsin/EDTA 复合消化酶 500 µl, 37 °C 消化后用枪头轻柔吹打 20 次, 加入 2.0 ml PBS 稀释消化酶, 1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液, 加入 NSCs 完全培养基重悬细胞, 调整细胞浓度为 1×10^6 /ml。

1.2.3 NSCs 诱导分化 预先将 6 孔板以多聚赖氨酸包被。取培养 3 d 的 NSCs 悬液 2.0 ml, 1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液, 分别以 NSCs 培养基、NSCs 分化培养基 (DMEM/F12、20 ng/ml B27、10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 µg/ml 链霉素) 2.0 ml 重悬, 接种至 6 孔板, 每组 2 个孔加入并标记。37 °C、5% CO₂ 条件下培养 2 d 后, 行免疫荧光鉴定。

1.2.4 NSCs 及分化细胞免疫荧光鉴定 取出 6 孔板, 吸出上清液, 经清洗、4% 多聚甲醛固定、0.1% Triton X-100 通透、3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶后滴加正常山羊血清封闭液 (1:10), 室温封闭, 20 min, 甩干, 不洗。分别滴加 Nestin、NSE、GFAP 单克隆抗体 (1:100), 对照组不加一抗, 用 0.01 mol/L PBS 代替; 湿盒中 4 °C 过夜孵育后 PBS 清洗。分别滴加生物素标记小鼠 IgG (1:100)、羊抗鼠 IgG (1:100), 37 °C 孵育 30 min, PBS 清洗。滴加 SABC-FITC (1:100), 37 °C 孵育 30 min, PBS 清洗。加入 DAPI 进行细胞核染色, 室温避光孵育 5~10 min, PBS 清洗 (500 µl/孔 × 5 min × 3 次)。加入抗荧光淬灭封片剂, 荧光显微镜下观察。

1.2.5 NSCs 的 Wnt3a 处理及分组 将传代 2~3 次所得 NSCs 分为正常对照组 (sham 组) 与 Wnt3a 组, Wnt3a 组再分为 Wnt3a 低剂量组 (10 µg/ml)、Wnt3a 中剂量组 (25 µg/ml) 和 Wnt3a 高剂量组 (50

µg/ml)。

1.2.6 CCK-8 检测 将各组处理后的神经球制成 NSCs 单细胞悬液, 以 2×10^4 /孔的密度种植于 96 孔板内, 96 孔板的周围一圈加无菌 PBS 培养液 (因为周围一圈最容易蒸发, 添加水可缓解蒸发)。按实验顺序在每孔中加入 100.0 µl 相应组别的培养基, 培养 48 h, 同时设立仅加培养基但不含 NSCs 的孔作为空白对照。培养结束后, 每孔内加入浓度 10% 的 10.0 µl CCK-8 溶液, 37 °C 孵育 6 h。用全波长酶标仪在 450 nm 处检测吸光度 (OD) 值。每组细胞设置 3 个复孔, 每个实验重复 3 次。结果判定: OD 值与培养体系中所含的活细胞数成正比, OD 值越大代表培养体系中的细胞数量越多, 因此相同的培养时间内, OD 值越大说明细胞增殖的越多, 增殖的能力越强。

1.2.7 流式细胞仪检测 将上述分组处理后的 NSCs 培养 48 h; 收集细胞后用 PBS 洗涤细胞一次 (离心 2 000 r/min, 5 min), 收集细胞并调整细胞浓度为 1.0×10^6 /ml, 取 1.0 ml 单细胞悬液; 制备的单细胞悬液离心后, 去除上清液, 在细胞中加入体积分数为 75% 冷乙醇 500 µl 固定 (4 °C 过夜), 染色前用 PBS 洗去固定液, 细胞悬液用 200 目筛网过滤一次; 加入 100 µl RNase A 37 °C 水浴 30 min; 再加入 400 µl PI 染色混匀, 4 °C 避光 30 min; 上机检测, 记录激发波长 488 nm 处红色荧光; 流式细胞术分析。

1.2.8 Western blot 检测 将上述分组处理后的 NSCs 培养 48 h 后置于 6 孔培养板中诱导贴壁, 经过自然分化 6 d 后, 将所得细胞进行裂解、离心提取蛋白, BCA 蛋白定量后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和转膜, 用溶于 TBST 的 5% 脱脂牛奶进行封闭, 室温孵育 1 h 后, 加入 GFAP、NSE 单克隆抗体 (1:100), 室温孵育 1 h, 置于 4 °C 环境中过夜, 过夜后室温下复温 30~60 min, 然后用 TBST 洗涤, 随即加入相应二抗 (1:200), 室温孵育 1 h, 孵育完成后用 TBST 洗涤。加入曝光液后, 拍照分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量数据资料先进行正态分布检验, 符合正态分布者, 两组间比较采用独立 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCs 原代培养结果 完整分离出新生 24 h 小鼠海马组织, 见图 1; 原代细胞培养 1 d 后可见部分无突起、折光性良好的“满天星”样的悬浮细胞,

见图 2A; 2~3 d 后可见由不同数目细胞组成的、大小不等的细胞球,形态规则,细胞的折光性强,悬浮稳定,呈“桑葚”状,见图 2B; 5~7 d 后可见大量神经细胞球,部分神经细胞球可见中心折光性减弱,如“黑帽”样,见图 2C,此时位于内部的细胞大量坏死,细胞悬浮稳定性下降,开始出现贴壁分化的现象。



图 1 新生 24 h 小鼠海马组织

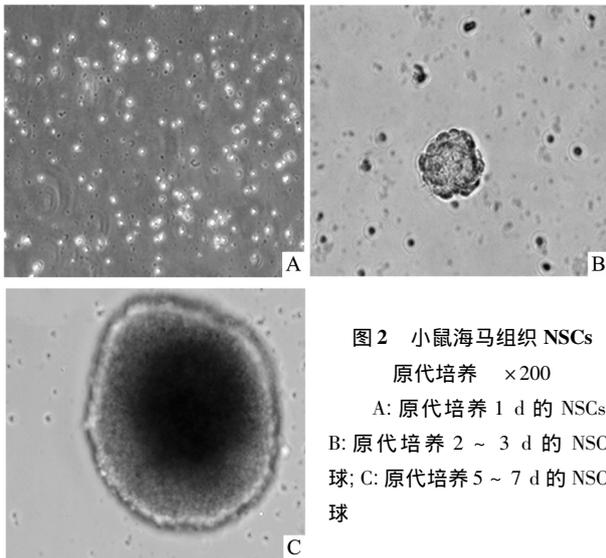


图 2 小鼠海马组织 NSCs 原代培养 ×200
A: 原代培养 1 d 的 NSCs;
B: 原代培养 2~3 d 的 NSCs 球;
C: 原代培养 5~7 d 的 NSCs 球

2.2 免疫荧光检测结果 原代培养的小鼠海马干细胞 Nestin 染色阳性,并且聚集而成球形,见图 3A。NSCs 贴壁后 12~24 h 出现以 NSCs 为中心向外周的细胞迁移,呈“齿轮”状;迁移的细胞突起增多,胞体增大,见图 3B。神经元诱导培养基培养 2 d 的 NSCs 经 NSE 免疫荧光检测,可见到胞体呈圆形,周围有短突起样的神经元,见图 3C。NSCs 经 GFAP 免疫荧光检测可见到具有较长突起的星形样胶质细胞,部分交织成网状,见图 3D。

2.3 CCK-8 法检测结果 NSCs 不同处理组培养

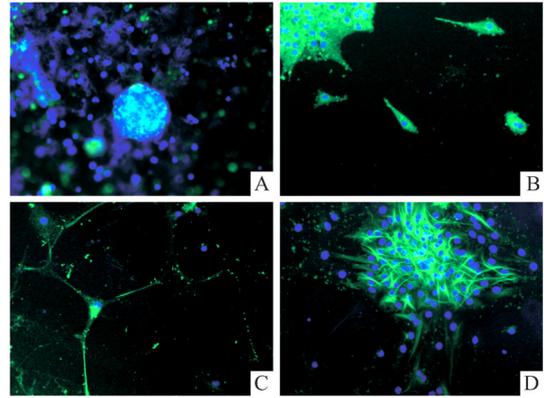


图 3 NSCs 及分化细胞的免疫荧光法鉴定结果 ×200
A: NSCs 球, Nestin 染色; B: NSCs 球出现细胞迁移, Nestin 染色;
C: 神经元, NSE 染色; D: 星形胶质细胞, GFAP 染色

48 h 后细胞增殖活力结果见图 4。与 sham 组比较, Wnt3a 低剂量组在 450 nm 处的 OD 值增加,差异有统计学意义 ($t = 4.576, F = 1.445, P < 0.01$); 与 Wnt3a 低剂量组相比, Wnt3a 中剂量组在 450 nm 处的 OD 值增加,差异有统计学意义 ($t = 2.628, F = 2.089, P < 0.05$); 与 Wnt3a 中剂量组相比, Wnt3a 高剂量组在 450 nm 处的 OD 值增加,差异有统计学意义 ($t = 6.364, F = 2.770, P < 0.01$)。

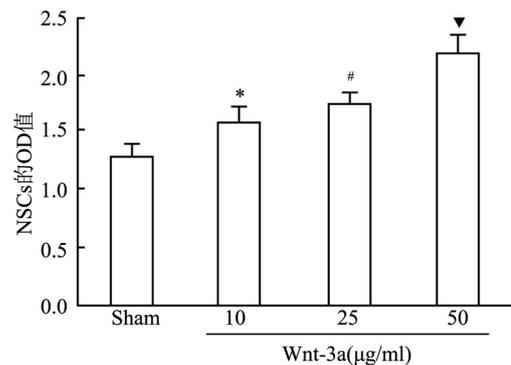


图 4 各组 NSCs 的 CCK-8 值 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

与 Sham 组比较: * $P < 0.01$; 与 Wnt3a 低剂量组比较: # $P < 0.05$; 与 Wnt3a 中剂量组比较: $P < 0.01$

2.4 流式细胞仪检测结果 NSCs 不同处理组培养 48 h 后细胞周期见图 5A~5D。与 sham 组比较, Wnt3a 低剂量组细胞所处 G_1 期比例降低,差异有统计学意义 ($t = 2.706, F = 3.840, P < 0.05$); 与 Wnt3a 低剂量组相比, Wnt3a 中剂量组细胞所处 G_1 期比例降低,差异有统计学意义 ($t = 2.519, F = 1.024, P < 0.05$); 与 Wnt3a 中剂量组相比, Wnt3a 高剂量组细胞所处 G_1 期比例降低,差异有统计学意义 ($t = 2.682, F = 2.680, P < 0.05$)。与 sham 组比

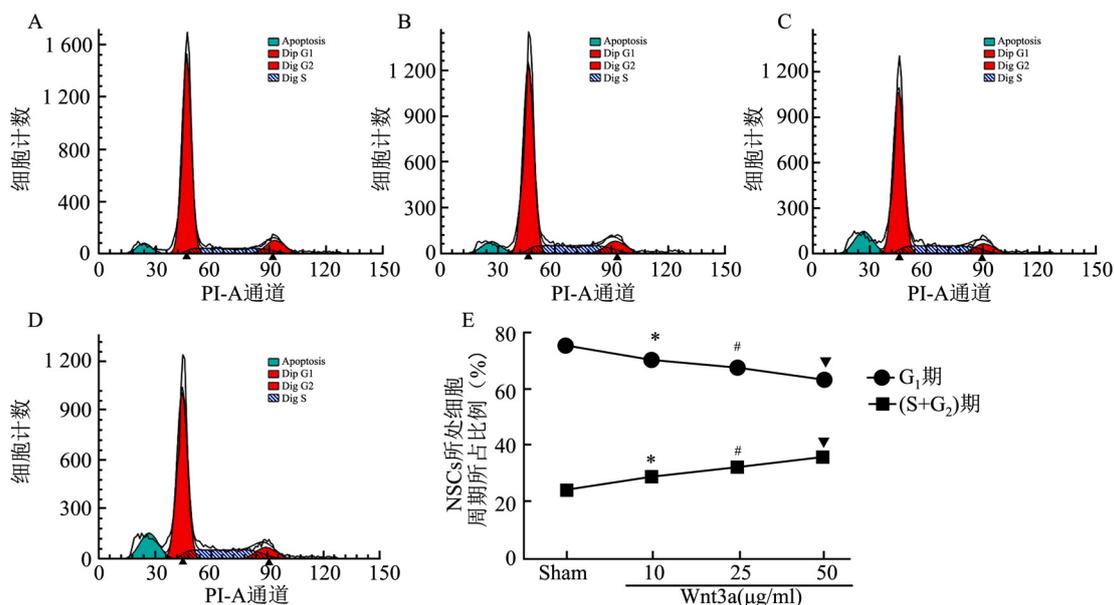


图5 流式细胞仪检测 Wnt3a 对 NSCs 周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

A: 正常对照组 (sham 组); B: Wnt3a 低剂量组; C: Wnt3a 中剂量组; D: Wnt3a 高剂量组; E: G₁ 期和 (S + G₂) 期的变化; 与 Sham 组比较:

* $P < 0.05$; 与 Wnt3a 低剂量组比较: # $P < 0.05$; 与 Wnt3a 中剂量组比较: $P < 0.05$

较, Wnt3a 低剂量组细胞所处 (S + G₂) 期比例增加, 差异有统计学意义 ($t = 2.812, F = 3.490, P < 0.05$); 与 Wnt3a 低剂量组相比, Wnt3a 中剂量组细胞所处 (S + G₂) 期比例增加, 差异有统计学意义 ($t = 2.789, F = 1.440, P < 0.05$); 与 Wnt3a 中剂量组相比, Wnt3a 高剂量组细胞所处 (S + G₂) 期比例增加, 差异有统计学意义 ($t = 2.459, F = 1.432, P < 0.05$)。见图 5E。

2.5 Western blot 法检测结果 与 sham 组比较, Wnt3a 低剂量组 NSE 蛋白相对表达量增加, 差异有统计学意义 ($t = 7.343, F = 1.136, P < 0.01$); 与 Wnt3a 低剂量组相比, Wnt3a 中剂量组 NSE 蛋白相对表达量增加, 差异有统计学意义 ($t = 11.59, F = 1.417, P < 0.001$); 与 Wnt3a 中剂量组相比, Wnt3a 高剂量组 NSE 蛋白相对表达量增加, 差异有统计学意义 ($t = 5.005, F = 1.235, P < 0.01$)。见图 6B。与 sham 组比较, Wnt3a 低剂量组 GFAP 蛋白相对表达量降低, 差异有统计学意义 ($t = 4.070, F = 2.136, P < 0.01$); 与 Wnt3a 低剂量组相比, Wnt3a 中剂量组 GFAP 蛋白相对表达量降低, 差异有统计学意义 ($t = 2.488, F = 4.259, P < 0.05$); 与 Wnt3a 中剂量组相比, Wnt3a 高剂量组 GFAP 蛋白相对表达量降低, 差异有统计学意义 ($t = 76.03, F = 4.413, P < 0.01$)。见图 6。

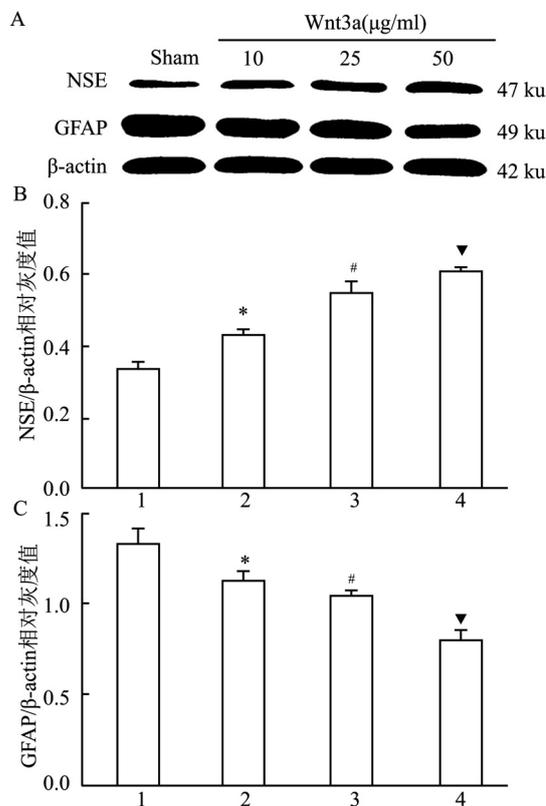


图6 Western blot 检测 Wnt3a 对 NSCs 分化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

A: 各组 NSE、GFAP 蛋白表达变化; B: NSE/β-actin 相对灰度值比较; C: GFAP/β-actin 相对灰度值比较; 1: sham 组 2: Wnt3a 低剂量组 3: Wnt3a 中剂量组 4: Wnt3a 高剂量组; 与 sham 组比较: * $P < 0.01$; 与 Wnt3a 低剂量组比较: # $P < 0.001$; 与 Wnt3a 中剂量组比较: $P < 0.01$

3 讨论

NSCs 是一类表达特殊标志蛋白 Nestin, 具有自我更新能力、多向分化潜能、低免疫源性等基本特征的神经祖细胞^[5-6]。在哺乳动物中, NSCs 主要存在于侧脑室的室管膜下区和海马齿状回的颗粒下层两个部位^[7]。NSCs 可以不断增殖并迁移至神经系统的不同部位, 分化为不同类型的神经元或神经胶质细胞, 构成神经系统的各种结构。NSCs 的增殖和分化有利于神经系统的生长、发育和修复, 这为神经系统的病变提供了有效的治疗思路^[8]。如何获得稳定成熟的 NSCs, 成为研究 NSCs 需要解决的首要问题。本实验中观察到自小鼠海马分离的细胞在无血清培养基中大部分逐渐死亡、贴壁, 少量悬浮生长, 经 2~3 d 可形成稳定的细胞球, 经免疫荧光检测 Nestin 染色阳性, 证明是 NSCs。NSCs 培养 5~7 d 后即可传代, 传代 3~4 次即可见到纯度较高的 NSCs。在本实验中, 对所得 NSCs 进行一定的诱导, 显示 NSCs 可分化为表达 NSE 的神经元和表达 GFAP 的星形胶质细胞。

Wnt3a 由 352 个氨基酸组成, 是 Wnt (Wingless-related MMTV integration site) 基因家族成员中最早表达的一种蛋白, 也是最重要的一种蛋白, 在整个中枢神经系统发育的过程中持续表达。Wnt3a 主要通过激活经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路表达作用。Wnt3a 与细胞膜上的受体 Frizzled (Fz) 和共受体低密度受体相关蛋白-6 (Lrp6) 结合, 促使下游胞质调节蛋白糖原合成酶激酶失活, 胞质内 β -catenin 数量增多并进入细胞核, 后者达到一定水平后进入细胞核, 在胞核中 β -catenin 与转录因子家族 TCF (T cell factor) /LEF (Lymphoid Enhancer Factor) 形成复合体诱导靶基因的转录和表达, 从而产生靶细胞的增殖、分化等一系列生物学效应^[9]。

Wnt/ β -catenin 信号通路对 NSCs 的增殖具有明显作用。体内研究^[10]显示创伤性脑损伤后 Wnt3a 和 β -catenin 蛋白在损伤侧皮层和海马区的含量增加, 这说明 Wnt3a 通过经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路促进神经细胞的增殖, 从而修复损伤的神经组织。体外实验也表明 Wnt3a 的表达上调时 NSCs 的增殖能力显著提高^[11]。本实验结果显示, 不同处理组培养 NSCs 48 h 后, 与 sham 组比较, 随着 Wnt3a 浓度的增加, NSCs 相应的在 450 nm 处 OD 值增加; 所处 G1 期比例降低, (S+G2) 期比例升高; 这表明 Wnt/ β -catenin 信号通路激活后 NSCs 大量进入细胞周

期, 蛋白质合成增加, 物质代谢活跃, 处于分裂期的细胞比例提高, 增殖能力越强。

Wnt/ β -catenin 信号通路对 NSCs 的定向分化具有明显的调控作用, 但是对于具体的分化方向目前还没有统一的认识。有研究^[12-13]表明, 在体外胚胎大鼠海马 NSCs 培养实验中, 在培养基中添加 Wnt3a 蛋白, 同样可增加分化神经元的数量, 而减少星形胶质细胞分化的数量。还有研究^[14]显示, 在体外 NSCs 培养过程中, 加入 Wnt3a 蛋白可促进 NSCs 向神经元及星形胶质细胞的分化。但是还有一部分研究^[15]表明 Wnt3a 在调节 NSCs 增殖的同时, 将促进胶质细胞分化的增多, 并降低神经元分化的比例, 同时通过抑制 Wnt3a 信号通路的表达将有效增强 NSCs 向神经元分化的比例。在本研究中, 不同处理组培养 NSCs 48 h 后, 用 Western blot 法检测不同组别的 NSE 和 GFAP 的表达量, 与 sham 组比较, Wnt3a 组的 NSE 蛋白相对表达量明显提高, GFAP 蛋白相对表达量明显降低。这表明 Wnt3a 可促进 NSCs 向神经元的分化, 抑制对星形胶质细胞方向的分化, 而且这一作用随着 Wnt3a 含量的提高而加强。

综上所述, 本实验成功获得新生 24 h 小鼠海马的 NSCs, 并可稳定传代; Wnt/ β -catenin 信号通路激活后促进 NSCs 增殖以及向神经元的分化, 这为 NSCs 应用于神经系统疾病的预防与治疗提供了理论依据。

参考文献

- [1] 王拥军. 中国脑血管病防治面临的特殊问题[J]. 科学通报, 2016, 61(18): 2020-6.
- [2] Petersen E D, Zenchak J R, Lössia O V, et al. Neural stem cells derived directly from adipose tissue[J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(9): 637-47.
- [3] Song Y, Liu X, Feng X, et al. NRPI accelerates odontoblast differentiation of dental pulp stem cells through classical Wnt/ β -Catenin signaling[J]. *Cell Reprogram*, 2017, 19(5): 324-30.
- [4] Schneider R, Koop B, Schröter F, et al. Activation of Wnt signaling promotes hippocampal neurogenesis in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11(1): 53.
- [5] Kriska J, Honsa P, Dzamba D, et al. Manipulating Wnt signaling at different subcellular levels affects the fate of neonatal neural-stem/progenitor cells[J]. *Brain Res* 2016, 1651: 73-87.
- [6] 李小波, 张辉, 王少滨, 等. 促红细胞生成素对脊髓源性神经干细胞分化能力的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(1): 14-7.
- [7] Merson T D, Bourne J A. Endogenous neurogenesis following is-

- chaemic brain injury: insights for therapeutic strategies[J]. *Int J Biochem Cell Biol* ,2014 ,56: 4 - 19.
- [8] Singh S , Mishra A , Srivastava N ,et al. MK-801 (Dizocilpine) regulates multiple steps of adult hippocampal neurogenesis and alters psychological symptoms via Wnt/ β -catenin signaling in parkinsonian rats[J]. *ACS Chem Neurosci* 2017 8(3) :592 - 605.
- [9] Narendra Talabattula V A ,Morgan P ,Frech M J , et al. Non-canonical pathway induced by Wnt3a regulates β -catenin via Pyk2 in differentiating human neural progenitor cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,2017 491(1) :40 - 6.
- [10] 李娟,饶维,吴颜艳,等.创伤性颅脑伤后小鼠皮层和海马 Wnt3a 和 β -catenin 的表达变化[J]. *国际神经病学神经外科学杂志* 2017 44(2) : 171 - 5.
- [11] Du Y , Zhang S , Yu T ,et al. Wnt3a is critical for endothelial progenitor cell-mediated neural stem cell proliferation and differentiation[J]. *Mol Med Rep* ,2016 14(3) :2473 - 82.
- [12] Gan X , Zhang X , Cheng Z , et al. Toxoplasma gondii inhibits differentiation of C17.2 neural stem cells through Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2016 , 473 (1) : 187 - 93.
- [13] 王永志,陈二涛,高丰厚,等. Wnt3a 影响神经干细胞分化的体外研究[J]. *中国临床神经外科杂志* 2012 17(9) : 535 - 8.
- [14] Muroyama Y ,Kondoh H ,Takada S. Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture [J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,2004 ,313(4) : 915 - 21.
- [15] Wexler E M , Paucer A , Kornblum H I , et al. Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency[J]. *Stem Cells* , 2009 27(5) : 1130 - 41.

Effect of Wnt/ β -catenin signaling pathway on neural stem cells of hippocampus in mice

Zhang Xianhu , Zhu Junde , Long Tingting , et al

(Dept of Anatomy , School of Basic Medicine , Guizhou Medical University , Guiyang 550025)

Abstract Objective To investigate the culture of neural stem cells(NSCs) from mouse hippocampus *in vitro* and the effect of Wnt3a-activated Wnt/ β -catenin signaling pathway on NSCs , in order to provide a new strategy for the prevention and treatment of cerebrovascular and neurological diseases. **Methods** The NSCs were primarily cultured from newborn 24 h mouse hippocampus by serum-free suspension culture. The morphological changes of NSCs were observed by light microscope and identified by immunochemical staining. Then the NSCs were divided into the sham group , Wnt3a low-dose group (10 μ g/ml) , Wnt3a middle-dose group (25 μ g/ml) and Wnt3a high-dose group (50 μ g/ml) . The viability of NSCs in each group was detected by CCK-8 assay; the flow cytometry was used to detect the cell cycle of NSCs in each group; the expression of NSE and GFAP proteins of NSCs were detected by Western blot in each group. **Results** NSCs of mouse hippocampus were successfully isolated and cultured. These NSCs appear as cell spheres under light microscopy and express Nestin. NSCs were induced to differentiate into NSE and GFAP positive cells by immunofluorescence detection. Compared with the sham group , the 450 nm absorbance of the cultured cells increased with the increase of Wnt3a concentration , it showed a dose-dependent relationship($P < 0.05$) . Compared with the sham group , the proportion of cultured cells in the G1 and (S + G2) phases were decreased with the increase of Wnt3a concentration ($P < 0.05$) . The relative expression of NSE protein in Wnt3a low-dose group ,Wnt3a mid-dose group and Wnt3a high-dose group were significantly higher than that in sham group ($P < 0.05$) , but the relative expression of GFAP protein was significantly lower than that in sham group ($P < 0.05$) . **Conclusion** NSCs were successfully isolated and cultured , Wnt3a could significantly enhance the proliferation of NSCs , promote its differentiation into neurons and inhibit its differentiation into astrocytes by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words neural stem cells; Wnt/ β -catenin signaling pathway; Wnt3a; proliferation; differentiation