

# CHIR99021 和 Wnt3a 在小鼠胚胎干细胞 向心肌细胞分化中的作用

邹传德 杨谋广 王爱玲<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路激活剂 CHIR99021 和 Wnt3a 在小鼠胚胎干细胞 (mESCs) 向心肌细胞分化中的作用。方法 采用悬浮一步培养法形成拟胚体 (EBs) 在 EBs 形成后第 2 天至第 5 天分别加入 CHIR99021、Wnt3a 命名为 CHIR99021 组及 Wnt3a 组 将自动分化的 EBs 作为对照组。用免疫荧光法检测心肌特异性蛋白肌球蛋白重链 ( $\alpha$ -MHC)、肌钙蛋白 T (cTNT) 及膜联蛋白 43 (CX43) 的表达。用 qRT-PCR 检测中胚层标志基因 *Brachyury*、心肌前体细胞标志基因 *Nkx2.5*、心肌细胞特异性标志基因  $\alpha$ -MHC、*cTnT* 和 *Cx43* mRNA 的表达。用 Western blot 法检测  $\alpha$ -MHC、cTNT 和 CX43 蛋白表达。结果 免疫荧光法提示各组 mESCs 能够向心肌细胞分化。在 CHIR99021 和 Wnt3a 诱导分化过程中, *Brachyury* 在分化第 7 天达高峰; *Nkx2.5*、 $\alpha$ -MHC、*cTnT* 和 *Cx43* 的 mRNA 表达量随着分化时间的延长而逐渐增加 第 15 天增加最为明显 且 CHIR99021 组和 Wnt3a 组高于对照组; CHIR99021 组优于 Wnt3a 组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。Western blot 检测结果显示 CHIR99021 组和 Wnt3a 组  $\alpha$ -MHC、cTNT 和 CX43 蛋白表达量明显高于对照组, CHIR99021 组高于 Wnt3a 组。结论 CHIR99021 和 Wnt3a 在分化早期阶段通过活化 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可促进 mESCs 心肌细胞分化 且 CHIR99021 促心肌分化作用优于 Wnt3a。

**关键词** CHIR99021; Wnt3a; 小鼠胚胎干细胞; 心肌细胞

中图分类号 R 349.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0073-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.015

急性心肌梗死是最常见的心血管疾病,其发病率和死亡率逐年增加,并有年轻化趋势,严重危害人群健康<sup>[1]</sup>。常用药物、心血管介入、心外科搭桥手术等改善了冠心病心肌梗死患者临床症状和预后。但已梗死心肌细胞不能再生,功能性心肌细胞的丧失可引起患者心功能不全,严重影响急性心肌梗死患者长期预后。大量研究<sup>[2-3]</sup>表明,干细胞在冠心

病心肌梗死的治疗中具有重要作用,可以促进急性心梗后心肌功能的修复,故干细胞移植治疗冠心病心肌梗死具有很好的临床应用前景。但是干细胞向心肌细胞分化的效率较低,在一定程度上限制了干细胞的临床前期研究。鉴于此,该课题主要探讨如何提高干细胞向心肌细胞的分化效率。

有研究<sup>[4]</sup>表明,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 向中胚层和神经细胞分化中起着重要的作用。CHIR99021 和 Wnt3a 可通过不同机制活化 Wnt 信号通路, CHIR99021<sup>[5]</sup> 通过抑制糖原合酶激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3) 来激活 Wnt 信号通路, Wnt3a<sup>[6]</sup> 结合到小鼠胚胎干细胞 (mouse embryonic stem cells, mESCs) 膜 Frizzled 受体及低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6, 进而激活 Wnt 信号通路。该研究在 mESCs 分化环境中, 拟胚体形成后第 2 天至第 5 天加入 CHIR99021、Wnt3a, 在分化早期活化 Wnt 信号通路以观察两者在 mESCs 心肌细胞分化的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系** 第 9 代小鼠胚胎干细胞 46C, 为美国南加州大学再生医学及干细胞研究中心应其龙教授赠送。

**1.1.2 主要试剂和仪器** 白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factors, LIF)、CHIR99021、Wnt3a、特级胎牛血清 (美国 Peprotech 公司); DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); 非必需氨基酸、青/链霉素、L-谷氨酰胺、 $\beta$  巯基乙醇、0.1% 明胶、胰蛋白酶 (美国 Sigma 公司); TRIzol 试剂 (美国 ThermoFisher 公司); 抗  $\alpha$ -TUBULIN 抗体、抗  $\alpha$ -MHC 抗体、抗 cTNT 抗体、抗 CX43 抗体 (英国 Abcam 公司); 羊抗鼠/兔 IgG 二抗 (美国 Peprotech 公司); Alexafluor 488 标记羊抗兔/鼠 IgG (北京碧云天生物公司); RNA 逆转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒 (北京全式金生物公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 ThermoFisher 公司); 激光共

2016-09-09 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目 (编号: KJ2015ZD24)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院心血管内科, 合肥 230022

作者简介: 邹传德, 男, 硕士研究生;

王爱玲, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wal@ah.edu.cn

聚焦显微镜、DMIL 相差显微镜(德国 Leica 公司);超纯水制备机、RT-PCR 仪、多功能酶标仪(美国 ThermoFisher 公司)。

1.2 方法

1.2.1 mESCs 培养及传代 mESCs 复苏后接种至 0.1% 明胶预处理的 6 孔板,加入 mESCs 培养基,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,待细胞生长到 70% ~ 80% 融合时进行传代。mESCs 培养基中含有胎牛血清(15%)、β-巯基乙醇(0.1 mmol/L)、链霉素(50 μg/ml)、青霉素(50 U/ml)、谷氨酰胺(2 mm/L)、非必需氨基酸(0.1 mm/L)。向 mESCs 培养基中加入 1 000 U/ml LIF 以维持小鼠胚胎干细胞的自我更新。

1.2.2 mESCs 的分化 采用悬浮一步培养法形成拟胚体(embryonic bodies, EBs),设有对照组、CHIR99021 组和 Wnt3a 组。取对数生长期的 46C 细胞,PBS 液洗涤 2 次后,加入含有 EDTA 的胰酶消化制成单细胞悬液,于倒置显微镜下计数,将初始密度为 1 × 10<sup>7</sup> 个 46C 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿中进行悬浮培养,其中每皿含 10 ml 去除 LIF 的 mESCs 培养基。然后置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,每天吹吸 EBs 2 次以保证其悬浮状态,每隔 1 d 换液 1 次。于第 2 天 CHIR99021 组加入 1 μmol/L 的 CHIR99021,Wnt3a 组加入 100 ng/ml 的 Wnt3a,对照组自然培养;第 5 天撤出 CHIR99021、Wnt3a<sup>[7]</sup>。各组分别于第 7 天将含有 EBs 的培养液置于 15 ml 离心管中自然沉淀,然后接种于预先用 0.1% 明胶包被的 6 孔板中贴壁培养。

1.2.3 总 RNA 的提取 收集 mESCs 及各组第 5、7、10、15 天的分化 EBs,然后向各个样品中加入 500 μl 的 TRIzol 试剂,充分混匀后静置 2 ~ 3 min,再加入 100 μl 的氯仿,用螺旋震动器震动混匀 10 ~ 15 s,静置 2 ~ 3 min,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,小心收集上清液,加入 250 μl 的异丙醇,轻轻混匀后,室温放置 10 min,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,见管底有白色沉淀,弃上清液,加入 250 μl 的 75% 乙醇洗涤沉淀,再 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min,弃 75% 乙醇,自然晾干,加入适量的 RNase-free Water,测浓度,备用。

1.2.4 总 RNA 的逆转录及 qRT-PCR 根据 RNA 逆转录试剂盒说明书,加总 RNA 1 μg、5 × TransScript<sup>®</sup> II All-in-one SuperMix 4 μl、gDNA Remover 1 μl、RNase-free Water 至 20 μl,将上述混合物置于 42 °C 温水孵育 15 min,然后 80 °C 加热 5 s,冷却后备

用。将上述得到的 cDNA 稀释 5 倍,根据 qRT-PCR 试剂盒说明书,将 cDNA 1 μl、Forward Primer (4 μmol/L)0.5 μl、Reverse Primer (4 μmol/L)0.5 μl、2 × TransScript<sup>®</sup> Tip Green qPCRSuperMix 5 μl、RNase-free Water 3 μl,共 10 μl 体系,94 °C 30 s、94 °C 5 s、60 °C 30 s,共 40 个循环。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名	引物序列(5'→3')
Brachyury	F: GAACCTCGGATTACATCGTGAGA R: ATCAAGGAAGGCTTTAGCAAATGGG
Nkx2.5	F: CAAGTGTCTCTCTGCTTTCC R: GGCTTTGTCAGCTCCACT
α-MHC	F: TGGTACCAACAACCCATACGACT R: TGTCAGCTTGTAGACACCAGCCTT
cTnT	F: CAACATGATGCACTTTGGAGGGT R: TCGCAGAACGTTGATTTCTGATT
Cx43	F: ACAGCGGTTGAGTCAGCTTG R: GAGAGATGGGAAGGACTTGT
GAPDH	F: AACTTTGGCATTGTGGAAGG R: CACATTGGGGCTAGGAACAC

F: 上游引物;R: 下游引物

1.2.5 免疫细胞化学染色 各组 EBs 贴壁培养 8 d 后用 PBS 洗涤 2 次,加入 4% 多聚甲醛固定 20 min,弃 4% 多聚甲醛后用 PBS 洗涤 2 次,然后加入 PBS-BSA(5% BSA,0.2% TritonX-100),置于 37 °C 温箱孵育至少 1 h;弃 PBS-BSA,PBS 洗涤 2 次,加入含抗 α-MHC 抗体、抗 cTnT 抗体或抗 CX43 抗体的 PBS-BSA(1:200)孵育 4 °C 过夜。然后 PBS-BSA 洗涤 3 次,每次 2 min,加入含二抗的 PBS-BSA(1:1 000),再加入 Hoechst 染料(DAPI,1:5 000),锡箔纸包裹置于 37 °C 温箱孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,每次 3 min,置于激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.6 Western blot 法检测心肌特异性蛋白的表达 收集第 15 天 EBs,向样品中加入 RIPA 裂解液 300 μl 和蛋白酶抑制剂(1:100)在冰上裂解 3 min,用酶标仪检测各样品蛋白浓度后加入上样缓冲液(1:5),100 °C 水浴变性至少 10 min,10% SDS-PAGE 电泳,恒流 400 mA,1.5 h,转至 PVDF 膜,室温封闭 3 h,加入抗 α-MHC 抗体(1:1 000)、抗 cTnT 抗体(1:1 000)、抗 CX43 抗体(1:1 000)或抗 α-TUBULIN 抗体(1:1 000),4 °C 过夜,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育 2 h,ECL 涂于 PVDF 膜,曝光并采集图像。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差

分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠胚胎干细胞的生长及拟胚体的形成** 小鼠胚胎干细胞 46C 可以在含有 LIF 的培养基中保持自我更新状态,呈簇生长,类似球形,边缘整齐,呈簇生长的细胞排列紧密,界限和形态难以分清。46C 细胞长满培养皿后胰酶消化并计数,将  $1 \times 10^7$  个细胞置于含 10 ml 无 LIF 的培养液中,拟胚体形成后 7 d 进行贴壁培养,见图 1。

**2.2 小鼠胚胎干细胞向心肌细胞分化的鉴定** 在拟胚体形成后第 15 天进行免疫荧光检查,结果显示成熟心肌细胞标志物心肌肌球蛋白重链 ( $\alpha$ -myosin heavy chain,  $\alpha$ -MHC)、心肌肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTNT) 和膜联蛋白 43 (connexin-43, CX43) 表达阳性,见图 2。

**2.3 CHIR99021 可以更有效地促进小鼠胚胎干细胞心肌细胞分化** mESCs 在体外能够分化为各种特异性体细胞,其中最重要的分化类型是心肌细胞,可以通过检测心肌细胞特异性标志物来证实 ESCs 向心肌细胞分化。研究显示对照组、CHIR99021 组、

Wnt3a 组 *Brachyury* 在分化第 7 天达高峰,随后逐渐降低(图 3A)。随着分化的进展,心肌前体细胞标志物 *Nkx2.5* mRNA 表达量逐渐增加,第 15 天增加最为明显(图 3B);此外,心肌细胞特异性标志物  $\alpha$ -MHC、cTnT、Cx43 mRNA 表达量也逐渐增加,第 15

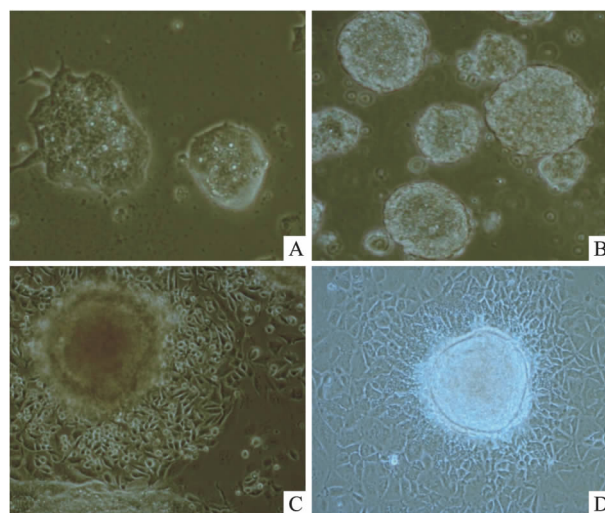


图 1 46C 细胞的生长及拟胚体的形成  $\times 100$

A: 小鼠胚胎干细胞 46C 的正常生长状态;B: 贴壁前第 5 天拟胚体的生长状态;C、D: 贴壁后第 10、15 天拟胚体的生长状态

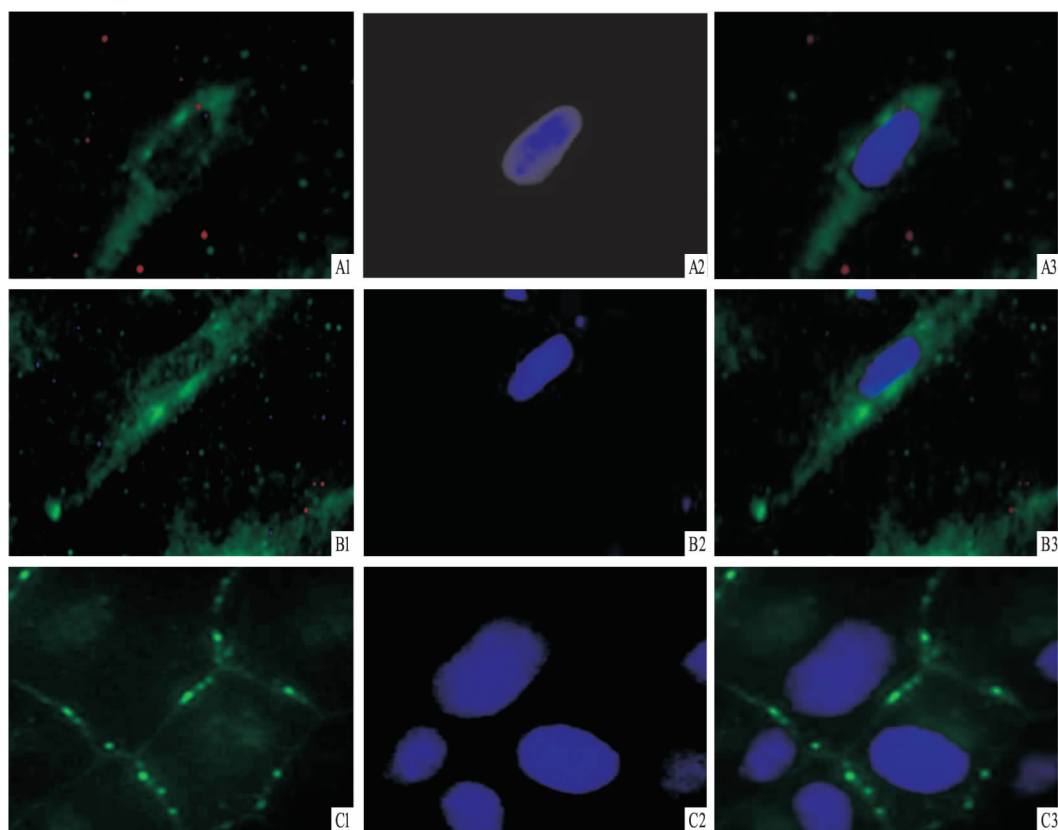
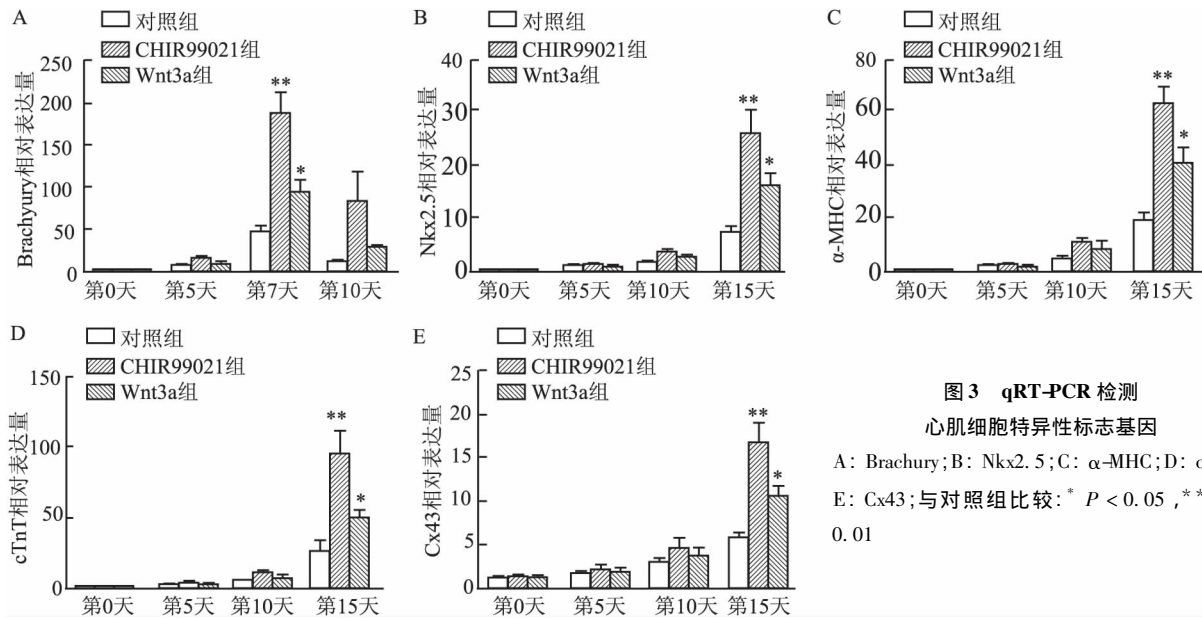


图 2 免疫荧光法检测心肌细胞特异性标志物  $\times 100$

A1:  $\alpha$ -MHC 标记心肌细胞;B1: cTNT 标记心肌细胞;C1: CX43 标记心肌细胞;A2、B2、C2: Hoechst33258 标记细胞核;A3、B3、C3: 合成图像



天增加最为明显(图 3C ~ E)。同时,本研究利用 Western blot 法检测 α-MHC、cTnT 和 CX43 蛋白表达(图 4A ~ C)。上述研究结果表明 CHIR99021 和 Wnt3a 在分化早期激活 Wnt/β-catenin 信号通路可促进小鼠胚胎干细胞向心肌细胞的分化,其中 CHIR99021 促心肌分化作用优于 Wnt3a。

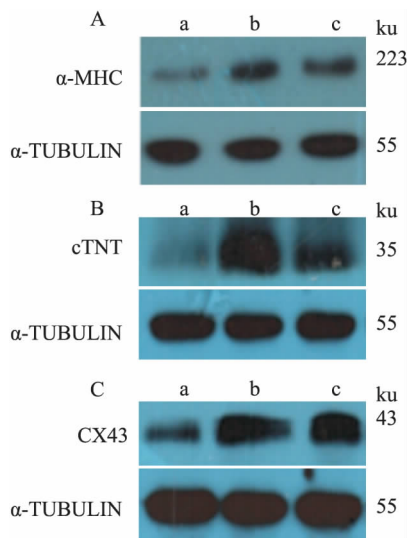


图 4 Western blot 检测心肌细胞特异性标志蛋白  
a:对照组;b:CHIR99021 组;c:Wnt3a 组

### 3 讨论

ESCs 来源于着床前的囊胚,具有自我更新能力及多向分化潜能<sup>[8]</sup>。包括 LIF 在内的内源性信号分子以及 WNT 蛋白在保持胚胎干细胞自我更新和分

化潜能的平衡中发挥着重要作用<sup>[9-10]</sup>。本实验中 mESCs 的自我更新无需饲养层细胞,能够在含有 LIF 的培养基中保持自我更新的状态<sup>[11]</sup>。从培养基中撤离 LIF 以营造 ESCs 分化环境,mESCs 能够自动分化为 3 个胚层细胞。本实验采用悬浮一步培养法形成 EBs,将第 7 天 EBs 贴壁培养至第 15 天,行免疫荧光检测 mESCs 是否向心肌细胞分化,结果显示心肌细胞标志性蛋白 α-MHC 和 cTnT 在细胞质中表达,而 CX43 表达于心肌细胞膜,三者均呈绿色荧光,蓝色荧光为细胞核。免疫荧光结果提示 mESCs 能够向心肌细胞分化。关于如何更好的促进 ESCs 向心肌细胞的分化,本研究进一步分析不同 Wnt 信号通路激活剂在心肌细胞分化中的作用。

在经典 Wnt/β-catenin 信号通路中,Wnt 配体结合到 ESCs 细胞膜 Frizzled 受体和 LRP5/6 共受体以招募细胞质中蓬乱蛋白,随后蓬乱蛋白降解由 APC、CK1、GSK3 及 Axin 构成的 β-catenin 降解复合物<sup>[12]</sup>,故 β-catenin 能够在细胞质中蓄积,并定位于细胞核。核内 β-catenin 与 TCF/LEF 转录子结合并启动 Wnt 信号通路靶基因的表达<sup>[13]</sup>。GSK3 抑制剂 CHIR99021 可通过抑制 GSK3 的活性,从而抑制 β-catenin 降解复合物的形成,使 β-catenin 在细胞质中大量积聚,活化 Wnt 信号通路。Wnt3a 作为 Wnt 信号通路的配体,结合 ESCs 细胞膜 Frizzled 受体及 LRP5/6 共受体,激活 Wnt/β-catenin 信号通路。Ueno et al<sup>[7]</sup> 研究表明,在胚胎干细胞分化早期激活 Wnt 信号通路能够诱导中胚层的形成及促进心肌细胞的分化。本实验采用 CHIR99021 和 Wnt3a 在分

化早期激活 Wnt 信号通路,观察两者对 mESCs 向心肌细胞分化的作用,并分析哪种激活剂促心肌分化作用更强。

在 EBs 形成后第 2 天至第 5 天分别加入 CHIR99021 和 Wnt3a,在分化早期阶段激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,然后在 EBs 形成后第 5、7、10、15 天分别提取各组总 RNA 和蛋白,随后进行 qRT-PCR 及 Western blot 分析,观察两者在心肌分化中的作用。Brachyury 的 mRNA 表达量在分化第 7 天达高峰,随后逐渐下降;随着分化时间的延长,Nkx2.5、 $\alpha$ -MHC、cTnT、Cx43 的 mRNA 表达量逐渐增加,第 15 天时各标志基因表达量明显升高。随后运用 Western blot 法分析第 15 天心肌特异性蛋白  $\alpha$ -MHC、cTnT 和 CX43 的蛋白表达量。研究结果表明 CHIR99021 和 Wnt3a 都可促进小鼠胚胎干细胞向心肌细胞的分化,且 CHIR99021 的作用优于 Wnt3a。考虑到两者生物学作用的不同,本研究推测 CHIR99021<sup>[5]</sup> 能够渗入拟胚体内,可更好地活化 Wnt 信号通路,然而 Wnt3a<sup>[7]</sup> 则较少渗入拟胚体,从而引起两者在心肌细胞分化中作用的差异。

综上所述,mESCs 能够向心肌细胞分化;利用 CHIR99021 和 Wnt3a 在分化早期阶段活化 Wnt 信号通路,均可促进 mESC 心肌细胞分化,且 CHIR99021 促心肌分化作用优于 Wnt3a。此外,相对于 Wnt3a,CHIR99021 的市场价格较为便宜,故课题组认为 CHIR99021 是一种性价比高的促心肌分化诱导剂。

### 参考文献

- [1] Mozaffarian D, Benjamin E J, Go A S, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update: A Report From the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2014, 131(4):29–322.
- [2] Brehm M, Strauer B E. Addendum: Stem cell therapy in postinfarction chronic coronary heart disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2016, 13(4):244.
- [3] Singla D K. Stem cells and exosomes in cardiac repair [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016, 27:19–23.
- [4] Lyashenko N, Winter M, Migliorini D, et al. Differential requirement for the dual functions of  $\beta$ -catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(7):753–61.
- [5] Naujok O, Lentjes J, Diekmann U, et al. Cytotoxicity and activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in mouse embryonic stem cells treated with four GSK3 inhibitors [J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7:273.
- [6] Schwarz-Romond T, Metcalfe C, Bienz M. Dynamic recruitment of axin by dishevelled protein assemblies [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(pt14):2402–12.
- [7] Ueno S, Weidinger G, Osugi T, et al. Biphasic role for Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(23):9685–90.
- [8] Smith A G. Embryo-derived stem cells: of mice and men [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17:435–62.
- [9] Loh K M, Lim B, Ang L T. Exonoplures: molecular designs for embryonic pluripotency [J]. *Physiol Rev*, 2015, 95(1):245–95.
- [10] Okita K, Yamanaka S. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2006, 1(1):103–11.
- [11] Williams R L, Hilton D J, Pease S, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells [J]. *Nature*, 1988, 336(6200):684–7.
- [12] Schwarz-Romond T, Metcalfe C, Bienz M. Dynamic recruitment of axin by dishevelled protein assemblies [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(14):2402–12.
- [13] Archbold H C, Yang Y X, Chen L, et al. How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012, 204(1):74–109.

## Effects of CHIR99021 and Wnt3a on cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells

Zou Chuande, Yang Mouguang, Wang Ailing

(Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the effects of CHIR99021 and Wnt3a, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway activators, on cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells (mESCs). **Methods** The embryonic bodies (EBs) were formed through suspension culture method, CHIR99021 or Wnt3a was added into differentiated medium from day 2 to 5, named CHIR99021 group or Wnt3a group, respectively. In addition, there was a control group in which EBs were automatically differentiated. The expression levels of *Brachyury*, the mesoderm specific target gene, and *Nkx2.5*, cardiac-precursor marker, as well as the transcripts of cardiomyocyte markers,  $\alpha$ -myosin heavy

## EV71 型手足口病患儿外周血树突状细胞及 细胞因子产生的调节机制研究

高 勇<sup>1,2</sup> 徐元宏<sup>1</sup> 陈晓枫<sup>3</sup> 辛克峰<sup>3</sup> 袁子清<sup>3</sup> 郑美娟<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨肠道病毒 EV71 型感染对树突状细胞 (DC) 成熟凋亡、DC 中信号传导通路激活、细胞因子释放的作用机制。方法 收集肠道病毒 EV71 型感染患儿 40 例, 分为 20 例轻症型组及 20 例重症型组, 正常对照组儿童 20 例。流式细胞仪检测各组儿童外周血 DC 表面标志分子 CD11c、CD86、CD80 和 CD83 表达的百分比; 采用 Western blot 法检测 DC 中 MAPK 信号传导通路分子磷酸化水平; ELISA 法检测同期血清中细胞因子的水平。结果 随着 EV71 感染程度的加深, 外周血 DC 中标志着细胞成熟的表面标志分子水平均有增加, CD83 及 CD80 尤为显著; MAPK 信号传导通路的活化程度逐渐加强; 细胞因子水平的表达显著升高。结论 EV71 感染可促进树突状细胞成熟凋亡、激活 MAPK 信号传导通路并增加细胞因子的释放, MAPK 信号传导通路在 EV71 感染的 DC 中发挥显著调控作用。

**关键词** 肠道病毒 EV71; 树突状细胞; MAPK 信号传导通路; 细胞因子

中图分类号 R 466.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0078-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.016

肠道病毒 71 型 (Enteroviruses71, EV71) 是儿童手足口病的主要致病病原体<sup>[1]</sup>, 其感染人数逐年上升。EV71 感染所致手足口病起病紧急、进展迅速<sup>[2]</sup> 轻度感染患儿预后良好, 重度感染患儿多伴随脑膜炎及神经源性肺水肿等并发症且致残致死率高<sup>[3]</sup>。目前针对该类手足口病尚未有确切安全的疫苗及特效药物, 故而患儿的早期诊断治疗显得尤为重要。研究<sup>[4]</sup>显示 EV71 可使感染患儿机体免疫系统紊乱, 并通过感染树突状细胞 (dendritic cells, DC) 导致细胞因子表达水平改变。目前国内外尚未有与检测 EV71 感染手足口病患者体内 DC 分泌的细胞因子及 DC 中丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 信号传导通路调节等相关的研究。该研究通过分析被 EV71 感染后呈现出不同临床表现的儿童外周血中 DC 表面标志表达的百分比变化、DC 中 MAPK 信号传导通路激活状况及细胞因子水平变化情况, 以期对 EV71 型手足

2016-09-09 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2011A181)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 安徽医科大学阜阳传染病临床学院, 阜阳市第二人民医院检验科, 阜阳 236015

<sup>3</sup> 安徽医科大学阜阳传染病临床学院, 阜阳市第二人民医院感染科, 阜阳 236015

作者简介: 高 勇, 男, 副主任技师, 硕士研究生;

徐元宏, 男, 主任技师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xy-hong1964@163.com

chain ( $\alpha$ -MHC), cardiac troponin T (cTnT) and connexin-43 (Cx43) were analyzed through quantitative RT-PCR. Besides, the cardiac-specific proteins including  $\alpha$ -MHC, cTnT and CX43 were detected by immunofluorescence and Western blot. **Results** The mESCs in every group did differentiate into cardiomyocytes. The expression of Brachyury was substantially augmented by treatment with CHIR99021 and Wnt3a, showing a peak of expression at day 7. Similarly, CHIR99021 and Wnt3a dramatically increased the expression levels of Nkx2.5,  $\alpha$ -MHC, cTnT and Cx43 with the time of differentiation, with the expression of target genes in CHIR99021 group and Wnt3a group was greater than that in the control group and CHIR99021 group was higher than Wnt3a group at day 15 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Western blot analysis suggested that the expressions of  $\alpha$ -MHC, cTnT and CX43 in CHIR99021 group and Wnt3a group were greater than those in the control group, and CHIR99021 group was higher than Wnt3a group at day 15. **Conclusion** Both CHIR99021 and Wnt3a could improve cardiogenesis from mESCs through activate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway at the early stage of differentiation while the former is better than the latter.

**Key words** CHIR99021; Wnt3a; mouse embryonic stem cells; cardiomyocytes