

Wnt/ β -catenin 信号通路介导红景天苷诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞定向分化研究

郭超¹ 刘润¹ 赵红斌² 秦冠华¹

摘要 **目的** 探讨红景天苷诱导小鼠骨髓间充质干细胞(mesenchyma stem cells, MSCs)向神经细胞定向分化的分子机制。**方法** 以小鼠 MSCs 系 D1 细胞为研究对象,实验分为阴性对照组(完全培养液)、阳性对照组(含 1 mmol/L β -巯基乙醇)、红景天苷组(20 mg/L 红景天苷)和阻断组(20 ng/mL DKK1); 1×10^4 个/孔细胞接种于 6 孔板 24 h 后分组,荧光免疫化学方法观察阴性对照组、阳性对照组和红景天苷组中 β -链蛋白(β -catenin)的表达;RT-PCR 法检测阴性对照组、阳性对照组、红景天苷组中神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、抗微管蛋白(beta 3 class III tubulin, β -tubulin III)、孤儿核受体相关因子 1 (nuclear receptor related factor1, Nurr1)、神经胶质原纤维酸性蛋白质(glial fibrillary acidic protein, GFAP) mRNA 和阻断组 Wnt3a、 β -catenin、低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 (low-density lipoprotein receptor-related protein6, LRP6)、轴蛋白(Axin) mRNA 的表达;Western blot 分析阴性对照组、阳性对照组和红景天苷组中 β -catenin 和 NSE 蛋白的表达。利用胞外 Ca^{2+} 螯合剂乙二醇双四乙酸[EGTA(胞外 Ca^{2+} 螯合剂)]、细胞膜 Ca^{2+} 通道阻断剂硝苯地平(Nifedipine 细胞膜 Ca^{2+} 通道阻断剂)和 LY294002 (IP₃Ks 特异抑制剂)分别阻断细胞不同 Ca^{2+} 信号阻断剂,RT-PCR 检测红景天苷组和阻断组中 Wnt3a、LRP-6、Axin、糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase, GSK-3) 和 β -catenin mRNA 的表达;Western blot 法分析 β -catenin 蛋白的表达。**结果** 与阳性对照组比较,红景天苷组 β -catenin 为强阳性表达,Wnt3a、 β -catenin、LRP6、Axin mRNA 表达明显上调($P < 0.01$);NSE、 β -tubulin III、Nurr1 mRNA 和 NSE 蛋白表达上调($P < 0.01$);与阳性对照组和红景天苷组比较,阻断组 β -catenin、NSE、Nurr1 和 β -tubulin III mRNA 表达降低, β -catenin 和 NSE 蛋白表达下调($P < 0.01$)。与红景天苷组比较,尼莫地平组、EGTA、LY294002 组 Wnt3a、LRP-6、 β -catenin 和 Axin mRNA 及蛋白表达降低, β -catenin 蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 红景天苷通过 Wnt/ β -catenin 和 Ca^{2+} 信号通路影响 MSCs 向神经细胞定向分化。

关键词 红景天苷;骨髓间充质干细胞;Wnt/ β -catenin 信号通路;神经细胞

Wnt/ β -catenin Signal Pathway Mediated Salidroside Induced Directional Differentiation from Mouse Mesenchymal Stem Cells to Nerve Cells GUO Chao¹, LIU Run¹, ZHAO Hong-bin², and QIN Guan-hua¹ Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou (730000), China; 2 Institute of Orthopedics, General Hospital of Lanzhou Military Command of the PLA, Lanzhou (730050), China

ABSTRACT **Objective** To explore the molecule mechanism of Salidroside inducing directional differentiation of mouse mesenchymal stem cells (MSCs) into neuronal cells. **Methods** The mouse multipotent mesenchymal precursor cell line (D1) was taken as the objective. Cultured MSCs were divided into the negative control group (complete culture solution), the positive control group (containing 1 mmol/L β -mercaptoethanol), the Salidroside induced group (20 mg/L Salidroside), and the blocked group (20 ng/ml DKK1, a special inhibitor of Wnt/ β -catenin signal pathway). All cells were inoculated in a 6-well plate

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81073156)

作者单位:1.甘肃中医学院基础医学院组织胚胎学教研室(兰州 730000);2.兰州军区兰州总医院骨科研究所(兰州 730050)

通讯作者:赵红斌, Tel: 0931-8994602, E-mail: zhao761032@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.03.0349

(1×10^4 cells/cm²) and grouped for 24 h. The expression of β -catenin was detected by fluorescence immunohistochemistry in the negative control group, the positive control group, and the Salidroside induced group. The expression of neuron-specific enolase (NSE), β -tubulin III, nuclear receptor related factor 1 (Nurr1), glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA, Wnt3a, β -catenin, low-density lipoprotein receptor-related protein6 (LRP6), Axin mRNA were detected using reverse transcription PCR (RT-PCR). The expression of β -catenin and NSE protein were analyzed by Western blot in the negative control group, the positive control group, and the Salidroside induced group. Ca²⁺ chelating agents (EGTA), L-type Ca²⁺ channel blocker (Nifedipine), and IP₃Ks special inhibitor (LY294002) were used to block Ca²⁺ signal pathway respectively. The expression of Wnt3a, LRP-6, Axin, glycogen synthase kinase (GSK-3), and β -catenin mRNA were detected by RT-PCR. The β -catenin protein expression was analyzed using Western blot. Results Compared with the positive control group, β -catenin protein was strong positively expressed; the expression of Wnt3a, β -catenin, LRP6, Axin, NSE, β -tubulin III, Nurr1 mRNA, and NSE protein were obviously up-regulated in the Salidroside induced group ($P < 0.01$). Compared with the positive control group and the Salidroside induced group, β -catenin, NSE, Nurr1, and β -tubulin III mRNA expression decreased; β -catenin and NSE protein expression were also down-regulated in the blocked group ($P < 0.01$). Compared with the Salidroside induced group, the expression of Wnt3a, LRP-6, β -catenin, and Axin mRNA were down-regulated in the Ca²⁺ signal blocked group and the salidroside induced group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Conclusion Salidroside affected directional differentiation of MSCs into neuronal cells through Wnt/ β -catenin and Ca²⁺ signal pathway.

KEYWORDS Salidroside; mesenchymal stem cell; Wnt/ β -catenin signal pathway; neuron cell

利用我国传统中药复合物或单体诱导骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 分化为神经细胞已有大量研究报道^[1], 中药作为 MSCs 的诱导剂具有潜在应用价值。红景天苷是传统藏药红景天的主要功效成分, 具有显著的抗氧化功能并对神经细胞起保护作用。红景天苷性能稳定、结构相对简单且易溶于水, 具有良好的理化性能^[4]。本课题组前期研究表明, 红景天苷能诱导 MSCs 定向分化为神经细胞^[3], 但其分子机制尚不清楚, 本实验以 Wnt/ β -catenin 信号通路为研究对象, 探讨红景天苷诱导 MSCs 向神经细胞定向分化的分子机制, 以期为进一步筛选有效中药单体干细胞诱导剂及干细胞治疗神经损伤提供科学依据。

材料与方法

1 细胞株 小鼠骨髓间充质干细胞系 (D1 细胞) 购自美国 ATCC 公司, 序列号: CRL-10915。

2 药物、试剂及仪器 D/F12 培养基 (GIBCO 公司, 美国); 胎牛血清、 β -巯基乙醇 (西安舟鼎国生物公司); 红景天苷 (Salidroside) 标准品 (中国药品生物制品检定所); TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司, 美国, 批号: 14105); PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒 (大连宝生物公司, 批号: DRR014A); 兔抗小鼠神经元特异性烯醇化酶 (neuron specific enolase, NSE, 批号:

ab53025)、 β -actin (ab3280, 单克隆抗体 (Abcam 公司, 英国); DKK1 (Wnt/ β -catenin 信号通路特异性阻断剂, Sigma 公司, 美国, 批号: SAB1404944); 兔抗小鼠 β -链蛋白 (β -catenin) 多克隆抗体 (Abcam 公司, 英国, 批号: ab32572); 尼莫地平 (批号: 和光纯业工业株式会社, 日本, 批号: 244-598-3), 乙二醇二乙醚二胺四乙酸 [Glycol-bis-(2-aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid, EGTA, 批号: 24894367], LY294002 (MFCD00270881, Sigma 公司, 美国); 电泳槽、电转仪 (Bio-Rad 公司, 美国); PCR 扩增仪 (Long Gene 公司, 美国, 批号: MG96G); CO₂ 恒温培养箱 (Sanyo 公司, 日本); 低温高速离心机 (Eppendorf 公司, 德国)。

3 D1 细胞培养 D1 细胞加入含 10% 胎牛血清的 D/F12 完全培养液, 置 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养, 每周更换 2 次培养液。

4 检测指标及方法

4.1 各组 Wnt/ β -catenin 通路相关因子蛋白及 mRNA 表达比较 实验分为 3 组: 空白对照组 (细胞完全培养液培养)、阳性对照组 (含 1 mmol/L β -巯基乙醇)、红景天苷组 (20 mg/L 红景天苷^[4])。待 80% 细胞达到融合状态时进行相应组同步实验, 细胞作用 24 h 后, 利用 RT-PCR 方法检测 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键信号因子 Wnt_{3a}、低密度脂蛋白受体

相关蛋白 6 (low density lipoprotein receptor-related protein 6, LRP-6)、轴蛋白 (Axin)、糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase, GSK-3 β) 和 β -catenin mRNA 的表达 mRNA 表达; Western blot 方法检测 β -catenin 蛋白表达。

4.2 各组神经元细胞相关标志蛋白分子 mRNA 及 β -catenin、NSE 蛋白表达比较 实验分为 4 组: 空白对照组 (细胞完全培养液培养)、阳性对照组 (含 1 mmol/L β -巯基乙醇)、红景天苷组 (20 mg/L 红景天苷^[4]) 和阻断组 (20 ng/mL DKK1), 阻断组 DKK1 作用细胞 30 min 后, 与阳性对照组和红景天苷组同时加入诱导剂作用细胞 24 h 后, 利用 RT-PCR 方法检测神经元细胞标志分子 NSE、抗微管蛋白 (β -tubulin III)、孤核受体相关因子 1 (nuclear receptor related factor 1, Nurr1)、神经胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP); Western blot 方法检测 NSE 和 β -catenin 蛋白表达。

4.3 各 Ca²⁺ 信号阻断组 Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子蛋白及 mRNA 表达比较 实验分为 4 组: 红景天苷组 (20 mg/L 红景天苷)、EGTA (5 mmol/mL, 胞外 Ca²⁺ 螯合剂) 组、尼莫地平 (10 μ mol/mL, 细胞膜 Ca²⁺ 通道阻断剂) 组和 LY294002 (10 μ mol/mL, IP₃K 特异阻断) 组。待 80% 细胞达到融合状态时加入不同 Ca²⁺ 阻断剂作用细胞 30 min 后, 每组再同时加入 20 mg/L 红景天苷作用 24 h 后, 利用 RT-PCR 方法分别检测细胞诱导前后 Wnt3a、LRP-6、Axin、GSK-3 β 和 β -catenin mRNA 的表达; Western blot 方法检测 β -catenin 蛋白的表达。

4.4 免疫荧光化学检测 β -catenin D1 细胞 (1 \times 10⁴ 个/mL) 接种于 6 孔板中预先用鼠尾胶原包被的盖玻片 24 h 后, 实验分为空白对照组、阳性对照组和对红景天苷组, 细胞分别作用 24 h 后, 10% 福尔马林 4 $^{\circ}$ C 固定细胞 24 h。免疫荧光化学方法参照说明书操作, 其中兔抗小鼠 β -catenin 一抗稀释度为 1:2 000; FITC 标记的羊抗兔二抗稀释度为 1:1 000。

4.5 RT-PCR 检测 Wnt/ β -catenin 通路相关因子和神经元细胞相关标志分子 mRNA 表达 利用 TRIzol 试剂提取实验方法 4.2 和 4.3 中细胞 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 纯度和浓度, 取 2 μ g 总 RNA, PrimeScript signal pathway RT-PCR 试剂盒

合成 cDNA, 反应体系 20 μ L, 反应条件: 65 $^{\circ}$ C, 5 min; 42 $^{\circ}$ C, 30 min; 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 4 $^{\circ}$ C, 5 min。采用两步法进行 PCR 扩增, 反应体系 25 μ L, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性; 94 $^{\circ}$ C 45 s; 引物序列及退火温度 (表 1) 45 s; 72 $^{\circ}$ C 45 s; 30 个循环; 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物, 紫外透射仪观察成像。

表 1 RT-PCR 引物及反应条件

| 基因 | 引物序列 | 产物大小 (bp) | 退火温度 ($^{\circ}$ C) |
|----------------------|--------------------------------|-----------|----------------------|
| Wnt3a | F: 5'-AACTGGCAGGACTTTCTCAA-3' | 387 | 61.5 |
| | R: 5'-GGATTCGTTCCCTTTCTCTA-3' | | |
| LRP-6 | F: 5'-CCCGTGTGCTCAGAGTCTCA-3' | 368 | 61.5 |
| | R: 5'-GTCTCCCGTCTCCCTTCAT-3' | | |
| Axin | F: 5'-CTTCTCATCTTTTCATCCA-3' | 479 | 61.5 |
| | R: 5'-TTCCTCAAATACCACACCAC-3' | | |
| GSK-3 β | F: 5'-TAGGAACACCAACAAGGGAG-3' | 330 | 59 |
| | R: 5'-GAGCATGTGGAGGGATAAGG-3' | | |
| β -catenin | F: 5'-ACCCATCTCTCTTCGTCCT-3' | 354 | 59 |
| | R: 5'-CCCTCCTAACAGCCTCACTT-3' | | |
| NSE | F: 5'-CTATCGCCACATTGCTCAG-3' | 218 | 52.5 |
| | R: 5'-CCTTGCCATACTTGCTCTTG-3' | | |
| β -tubulin III | F: 5'-GCGATGAGCAGGCATAGAC-3' | 442 | 61.5 |
| | R: 5'-GAAGGCACCACGCTGAAGGT-3' | | |
| Nurr1 | F: 5'-GCGCAGGTGCAAAAAACGC-3' | 427 | 61.5 |
| | R: 5'-CAGGTCAGCAAAGCCAGGGAT-3' | | |
| GFAP | F: 5'-ACGACTATCGCCGCCAACTG-3' | 410 | 61.5 |
| | R: 5'-ACCTCACCATCCCGCATCTC-3' | | |
| GAPDH | F: 5'-CACCACCAACTGCTTAGC-3' | 333 | 52.5 |
| | R: 5'-TTCACCACCTTCTTGATGTC-3' | | |

4.6 Western blot 检测 NSE 及 β -catenin 蛋白 0.25% 胰酶消化实验方法 4.2 和 4.3 中细胞, 4 $^{\circ}$ C 预冷的 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 加入细胞裂解液 2 mL, 反复吹打使其充分裂解后, 移入 1.5 mL 离心管, 超声作用 10 s \times 3 次, 冰上孵育 15 min。12 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 收集上清, 测定蛋白浓度。每组取 5 μ g 蛋白, 12% SDS-PAGE 分离蛋白, 运用电转移法将蛋白质条带转移至 PVDF 膜。2% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加一抗 (兔抗小鼠 β -actin, 1:500; 兔抗小鼠 NSE, 1:1 000; 兔抗小鼠 β -catenin, 1:2 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜后加 HRP 标记的羊抗兔二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 化学发光法 ECM 显影并拍照。

5 统计学方法 Western blot 结果应用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行累计光密度检测, 采用 SPSS 13.0 统计软件, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组内比较单因素方差分析, 组间比较 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 Wnt/ β -catenin 通路相关因子蛋白及 mRNA 表达比较(图 1-3,表 2) 与阳性对照组比较,红景天苷组 β -catenin 为强阳性表达。RT-PCR 结果显示,与阳性对照组比较,红景天苷组作用细胞 2 h 时 Wnt3a mRNA 表达丰度显著上调,随后表达水平下调; β -catenin、LRP6、Axin mRNA 的表达丰度明显上调。Western blot 结果表明,与阳性对照组比较,红景天苷组 β -catenin 蛋白的表达水平显著上调($P < 0.01$);与空白对照组比较,阳性对照组 β -catenin 蛋白的水平上调($P < 0.05$)。

表 2 各组 β -catenin 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | β -catenin |
|------|---|------------------------------|
| 空白对照 | 3 | 0.001 \pm 0.001 |
| 阳性对照 | 3 | 0.195 \pm 0.007* |
| 红景天苷 | 3 | 0.625 \pm 0.022** Δ |

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.01$

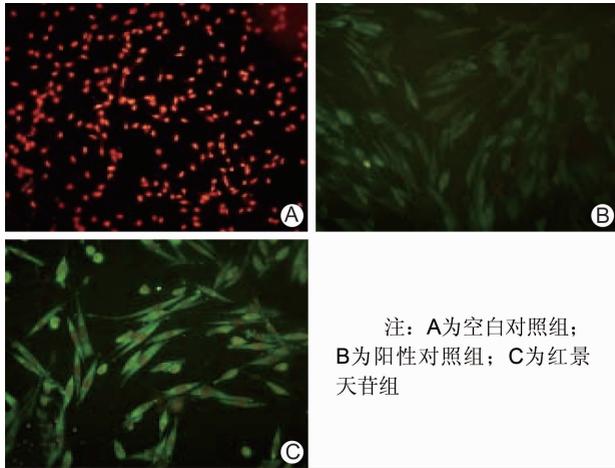
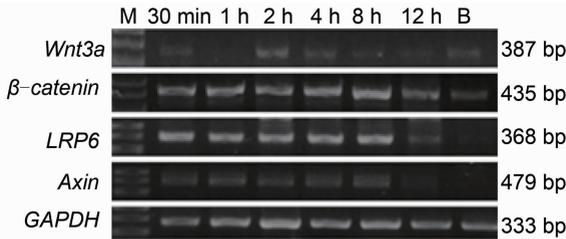


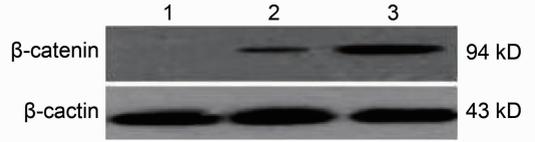
图 1 各组 β -catenin 表达 ($\times 20$)



注: M 为相对标准分子量;B 为 β - 巯基乙醇

图 2 红景天苷组 Wnt/ β -catenin 信号通路的相关因子 mRNA 表达

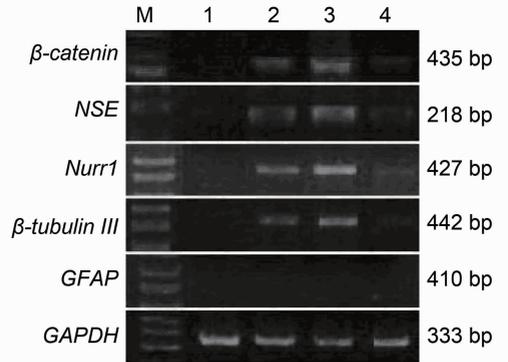
2 各组神经元细胞相关标志蛋白分子 mRNA 及 β -catenin、NSE 蛋白表达比较(图 4、5,表 3) 与阳性对照组比较,红景天苷组 NSE、 β -tubulin III 和



注:1 为空白对照组;2 为阳性对照组;3 为红景天苷组

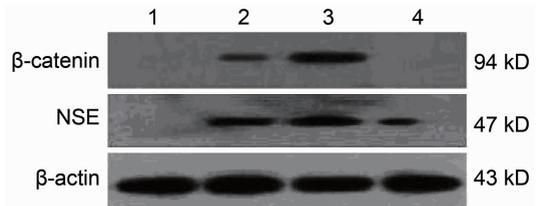
图 3 各组 β -catenin 蛋白表达

Nurr1 mRNA 表达上调;不同组间 GFAP mRNA 为低丰度表达;与红景天苷组比较,阻断组中 DKK1 特异性阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路后, β -catenin、NSE、Nurr1 和 β -tubulin III mRNA 表达丰度明显降低($P < 0.01$)。Western blot 结果显示,与红景天苷组比较,阻断组 β -catenin 蛋白的表达完全被抑制,NSE 蛋白的表达水平呈抑制趋势($P < 0.01$)。



注:1 为空白对照组;2 为阳性对照组;3 为红景天苷组;4 为阻断组

图 4 各组 β -catenin、NSE、Nurr1、 β -tubulin III 及 GFAP mRNA



注:1 为空白对照组;2 为阳性对照组;3 为红景天苷组;4 为阻断组

图 5 各组 NSE 及 β -catenin 蛋白表达

表 3 各组 NSE 及 β -catenin 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | β -catenin | NSE |
|------|---|------------------------------|------------------------------|
| 空白对照 | 3 | 0.002 \pm 0.001 | 0.571 \pm 0.043 |
| 阳性对照 | 3 | 0.139 \pm 0.012* Δ | 0.447 \pm 0.042** Δ |
| 红景天苷 | 3 | 0.557 \pm 0.025** Δ | 0.506 \pm 0.056** Δ |
| 阻断 | 3 | 0.011 \pm 0.002* | 0.188 \pm 0.018* |

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与阻断组比较, $\Delta P < 0.05$

3 各 Ca^{2+} 信号阻断组 Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子蛋白及 mRNA 表达比较(图 6、7,表 4) RT-PCR结果显示,与红景天苷组比较,EGTA 组 Wnt3a、LRP-6、 β -catenin 和 Axin mRNA 表达水平下调;尼莫地平组 Wnt3a、LRP-6、 β -catenin mRNA 表达水平明显下调;LY294002 组 Wnt3a、LRP-6、 β -catenin 和 Axin mRNA 的表达呈完全被抑制趋势。Western blot 结果显示,与红景天苷组比较,尼莫地平组、EGTA、LY294002 组 β -catenin 蛋白表达降低($P < 0.01, P < 0.05$)。

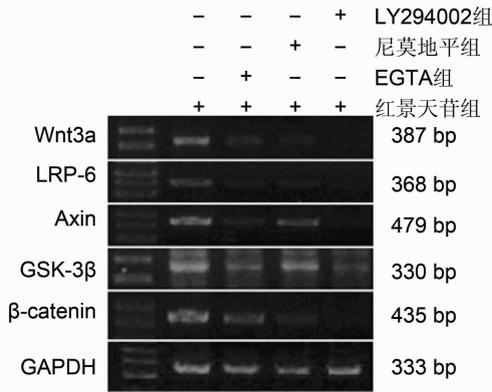


图 6 各 Ca^{2+} 信号阻断组 Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子 mRNA 表达

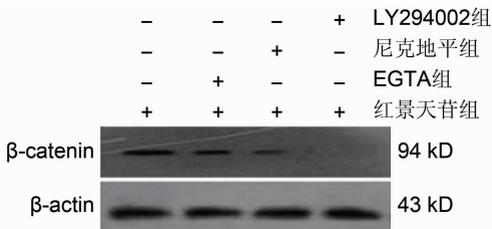


图 7 各 Ca^{2+} 信号阻断组 β -catenin 蛋白表达

表 4 各 Ca^{2+} 信号阻断组 β -catenin 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | β -catenin |
|----------|---|------------------|
| 红景天苷 | 3 | 0.740 ± 0.043 |
| EGTA | 3 | 0.591 ± 0.012* |
| 尼莫地平 | 3 | 0.273 ± 0.025* |
| LY294002 | 3 | 0.006 ± 0.005** |

注:与红景天苷组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

讨 论

Wnt/ β -catenin 信号传导通路是一条保守的信号通路,在调控细胞的生长、迁移和分化中发挥关键作用^[5]。 β -catenin 是经典 Wnt 信号通路的关键分子,参与多种细胞因子相互作用,激活靶基因的表达^[6]。

Wnt3a 是 wnt 家族的成员之一,对细胞的增殖及分化有一定的调控作用,Wnt3a 和 LRP6 的表达是 Wnt/ β -catenin 途径活化的起始信号^[7],Axin 起支架蛋白的作用,可使 GSK-3 β 靠拢 β -catenin 而促进 β -catenin 磷酸化,加速 β -catenin 的降解,Axin 也是 Wnt/ β -catenin 细胞信号传导通路发挥效应的中间蛋白,它的高表达促进了 Wnt 信号的传递^[8,9]。NSE 是神经元和神经内分泌细胞所特有的一种酸性蛋白酶,作为成熟神经细胞的标志分子;Nurr1 是一种转录因子,它可以促进神经细胞相关基因的表达并能维持其表型; β -tubulin III 是一种与神经细胞分化相关的微管蛋白,它是神经元细胞骨架重要的组成成分,与神经突生长和迁移有关^[10];GFAP 为神经胶质细胞的标志分子^[11]。

本研究结果显示,红景天苷诱导 MSCs 向神经细胞定向分化过程中能激活 Wnt/ β -catenin 通路相关信号分子的表达;荧光免疫化学和 Western blot 检测结果进一步证实,红景天苷诱导后 β -catenin 蛋白的表达水平显著上调。本实验选用 β -巯基乙醇作为阳性对照基于 β -巯基乙醇是目前研究报道中最常用的干细胞向神经细胞定向分化的诱导剂,具有良好的诱导效果和实验可比性。有研究报道 Axin 在神经细胞中高表达,在神经组织的分化中起到了重要作用^[12],红景天苷组中 Axin 和 GSK-3 β 的表达增高,进一步证实了 Wnt 信号存在时 Axin 和 GSK-3 β 可以抑制磷酸化的 β -catenin 被降解。Wnt/ β -catenin 信号通路的激活是否影响 MSCs 向神经细胞定向分化,通过利用 Wnt/ β -catenin 信号通路的特异阻断剂 DKK1 阻断该信号通路,发现能抑制红景天苷诱导 MSCs 向神经细胞定向分化。根据以上结果由此推断,红景天苷作用于 MSCs 后,激活 Wnt/ β -catenin 信号通路使 β -catenin 蛋白高表达并聚集后转移至胞核,诱导 MSCs 表达与神经细胞相关的基因和蛋白,促进 MSCs 向神经细胞定向分化。

红景天苷具有 Ca^{2+} 拮抗剂的作用,红景天苷通过影响 Ca^{2+} 对 Wnt/ β -catenin 信号通路产生何种影响^[13]。本研究利用不同的 Ca^{2+} 信号阻断剂,研究红景天苷与 Ca^{2+} 信号对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响,结果表明,阻断胞外 Ca^{2+} 和细胞膜 Ca^{2+} 通道,抑制红景天苷对 Wnt/ β -catenin 信号通路相关信号分子基因及蛋白的表达;当阻断 PI₃K 信号通路后,能完全阻断红景天苷促进 Wnt/ β -catenin 信号通路相关信号分子基因及蛋白的表达。由此可见,细胞内外 Ca^{2+} 的变化影响 Wnt/ β -catenin 信号通路传导红景天苷生物

学信号, Wnt/ β -catenin 信号的激活协同红景天苷诱导 MSCs 向神经细胞定向分化。阻断胞内钙库 Ca^{2+} 的释放能完全抑制红景天苷 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化作用,可能是红景天苷生物学信号的传导与非经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路有关,非经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路与细胞内 Ca^{2+} 信号有关。经典的 Wnt/ β -catenin 信号和非经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路可能存在着交叉信号,红景天苷有可能同时影响上述两种信号决定 MSCs 的分化方向,其具体的分子机制还有待下一步研究阐明。

综上所述,本研究结果表明,红景天苷能诱导 MSCs 向神经细胞定向分化,在其定向分化的过程中红景天苷能激活 Wnt/ β -catenin 通路, Ca^{2+} 信号对红景天苷激活 Wnt/ β -catenin 信号通路具有协同作用,红景天苷通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路影响 MSCs 向神经细胞定向分化,Wnt/ β -catenin 信号通路是传导红景天苷生物学信号的重要途径之一。由于 Wnt/ β -catenin 信号通路与其他信号通路存在交叉信号,由于时间和经费所限未能进行相关的研究,在今后的研究中对其进行研究可能对进一步阐明红景天苷对干细胞的诱导功能具有重要的价值和潜在的临床意义。

参 考 文 献

- [1] 项鹏,夏文杰,王连荣,等.丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元样细胞[J].中山医科大学报,2001,22(5):321-324.
- [2] Ma L, Cai DL, Li HX, et al. Protective effects of salidroside on oxidative damage in fatigue mice [J]. J Chin Integr Med, 2009, 7(3): 237-241.
- [3] 裴晶晶,吴润,赵红斌,等. Ca^{2+} 信号介导红景天苷促进小鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞的定向分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(10):1808-1812.
- [4] Zhao HB, Ma H, Ha XQ, et al. Salidroside induces rat mesenchymal stem cells to differentiate into dopaminergic neurons [J]. Cell Biol Int, 2014, 38(4): 462-471.
- [5] De Boer J, Wang HJ, Van Blitterswijk CA. Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. Tissue Eng, 2004, 10(3-4): 393-401.
- [6] Zecher D, Fujita Y, Hülsken J, et al. Beta-catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system [J]. Dev Biol, 2003, 258(2): 406-418.
- [7] Doronin S, Shumay E, Wang HY, et al. Lithium suppresses signaling and induces rapid sequestration of beta2-adrenergic receptors [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288(1): 151-155.
- [8] Pelkmans L, Fava E, Grabner H, et al. Genome-wide analysis of human kinases in clathrin and caveolae/raft-mediated endocytosis [J]. Nature, 2005, 436(7047): 78-86.
- [9] Ling L, Nurcombe V, Cool SM, et al. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells [J]. Gene, 2009, 433(1-2): 1-7.
- [10] Shakhbazov AV, Goncharova NV, Kosmacheva SM, et al. Plasticity of human mesenchymal stem cell phenotype and expression profile under neurogenic conditions [J]. Bull Exp Biol Med, 2009, 147(4): 513-516.
- [11] Liu Y, Zhang YD. Study of the effect on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by ganglioside into neural cells [J]. Clin Neurol, 2009, 22(2): 124-126.
- [12] Moon RT, Bowerman B, Boutros M, et al. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin [J]. Science, 2002, 296(5573): 1644-1646.
- [13] Toledo EM, Colombres M, Inestrosa NC. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation [J]. Progr Neurobiol, 2008, 86(3): 281-296.

(收稿:2013-03-05 修回:2014-07-21)