

百草枯对人胚胎神经干细胞分化过程中 Wnt 通路分子表达的影响

窦婷婷, 常秀丽, 吕文, 周志俊

摘要: [目的] 通过对神经干细胞 Wnt 信号通路中关键分子 β -catenin/DVL2 基因表达的研究, 探讨百草枯对分化中的神经干细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。[方法] 以人胚胎神经干细胞为研究对象, 观察体外诱导分化情况, 并采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定不同浓度百草枯对细胞活力的影响, 选取未观察到细胞毒性的浓度为 0.10、1.00、10.00 $\mu\text{mol/L}$ 的百草枯染毒, 在分化 2、4、8、12 d 利用实时荧光定量多链聚合反应技术检测 Wnt 信号通路关键分子 β -catenin 和 DVL2 mRNA 的表达情况。[结果] 百草枯在 100.00 $\mu\text{mol/L}$ 时可明显抑制细胞活力 ($P < 0.01$)。百草枯在神经干细胞分化期 2、8、12 d 明显下调 β -catenin mRNA 的表达, 除 10.00 $\mu\text{mol/L}$ 染毒组在分化期 8 d 以外, 其余各剂量组与对照组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。百草枯在神经干细胞分化期 2、12 d DVL2 mRNA 的表达明显下调, 除 0.10 $\mu\text{mol/L}$ 染毒组在分化期 12 d 该基因 mRNA 表达升高外, 其余各剂量组与对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。在分化期 4 d DVL2 mRNA 的表达明显上升, 各剂量组与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。[结论] 百草枯抑制 Wnt 信号通路中关键分子 β -catenin 和 DVL2 基因 mRNA 的表达, 最终可影响神经干细胞的分化过程。

关键词: 神经干细胞; 百草枯; 分化; Wnt 通路

Effects of Paraquat on Expression of Wnt Signaling Molecules in Differentiation of Human Embryonic Neural Stem Cells DOU Ting-ting, CHANG Xiu-li, LÜ Wen, ZHOU Zhi-jun (School of Public Health/Key Lab of Public Health Safety of Ministry of Education/WHO Collaborating Center for Occupational Health, Fudan University, Shanghai 200032, China). Address correspondence to ZHOU Zhi-jun, E-mail: zjzhou@shmu.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the effect of paraquat (PQ) on the gene expression of critical molecules, β -catenin and DVL2, in Wnt signaling pathway during differentiation process of neural stem cells. [Methods] Using the ReNeCell CX cell model, the differentiation induced *in vivo* was observed. After treatment with various concentrations of PQ, cell viability was measured by tetrazolium (MTT) assay. After the cells exposed with non-cytotoxic concentrations of 0.00, 0.10, 1.00, and 10.00 $\mu\text{mol/L}$ PQ, real-time reverse transcription-polymerase chain reaction was adopted to detect mRNA expressions of β -catenin and DVL2 on 2, 4, 8, and 12 d of differentiation. [Results] The cell viability was significantly inhibited after administered with 100.00 $\mu\text{mol/L}$ of PQ ($P < 0.01$). PQ significantly down-regulated β -catenin mRNA expressions on 2, 8, and 12 d of differentiation ($P < 0.01$) though no obvious changes were observed between the 10.00 $\mu\text{mol/L}$ group and the control group on 8 d of differentiation. In addition, PQ significantly down-regulated DVL2 mRNA expressions on 2 d and 12 d of differentiation compared to the control group ($P < 0.01$) though DVL2 mRNA expression increased at 0.10 $\mu\text{mol/L}$ after 12 d of differentiation. But the DVL2 mRNA expressions significantly increased on 4 d of differentiation ($P < 0.01$). [Conclusion] PQ can suppress key factors β -catenin and DVL2 in Wnt signaling, which could affect differentiation of human neural stem cells.

Key Words: neural stem cell; paraquat; differentiation; Wnt pathway

百草枯(paraquat, PQ), 是一种除草剂和脱叶剂, 由于其低选择性和高效性在全球广泛使用。近年发现

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 81072324); 上海自然科学基金项目(编号: 10ZR1401700)

[作者简介] 窦婷婷(1987—), 女, 硕士生; 研究方向: 劳动卫生; E-mail: 10211020059@fudan.edu.cn

[通信作者] 周志俊教授, E-mail: zjzhou@shmu.edu.cn

[作者单位] 复旦大学公共卫生学院/教育部公共卫生安全实验室/WHO 职业卫生合作中心, 上海 200032

长期接触百草枯可引起包括帕金森综合症(Parkinson's disease, PD)、阿尔兹海默症在内的中枢神经系统病变。流行病学研究表明, 暴露于除草剂的人群 PD 发病率显著高于普通人群^[1]。神经系统的正常发育是其行使神经功能的先决条件。处于发育期的大脑更易受到环境中神经毒物的攻击, 产生严重且不可逆的神经发育毒性^[2]。新生期的 C57BL/6J 小鼠暴露于大剂量的百草枯, 成年后小鼠出现类似于 PD 的行为表现, 黑

质纹状体也发生相应的生化病理改变^[3]。在出生前、后给予一定剂量的锰都会显著增加小鼠对PQ神经毒性的易感性，导致黑质纹状体中多巴胺及其代谢产物和多巴胺能神经元数目的减少^[4]。体外实验研究发现，PQ可以抑制小鼠神经干细胞的增殖^[5]。PQ也可以干扰神经前体细胞的分化过程，上调神经前体细胞标志物巢蛋白的表达，下调神经元标志物神经丝蛋白68(NF-68)、神经丝蛋白200(NF-200)以及N-甲基-D-天冬氨酸受体和γ-氨基丁酸受体的表达^[6]。

体外神经干细胞(NSCs)模型具有自我更新与分化能力，可在一定程度上模拟胚胎神经发育过程，其用于研究神经发育毒性作用也越来越受到关注。本次研究采用的人胚胎神经干细胞系是一类永生化的人类神经祖细胞系，在神经因子的作用下可维持其增殖功能，去除生长因子后可分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞^[7]。Wnt家族是一类分泌型的细胞信号传导蛋白，可以通过复杂的信号传递通路调控胚胎的早期发育，而且对细胞的分化、增殖及生长也有重要的调节作用^[8]。经典的Wnt信号传导通路有配体(Wnt家族分子)、跨膜受体[卷曲蛋白(Frizzled)家族分子和低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)-5/6]、胞浆调节蛋白[β-连环蛋白(β-catenin)、蓬乱蛋白(DVL2)、轴素糖原合成酶(AxinGSK-3β)等]和核内转录因子[T细胞因子/淋巴增强因子1(TCF/LEF1)家族]组成。β-catenin是Wnt经典途径中的关键分子，经典的Wnt信号通路也称为Wnt/β-catenin信号通路，参与发育过程中细胞的增殖与分化的调节，可以促进NSCs的分化，尤其是向神经元方向分化^[9]。DVL2是细胞内重要的拮抗降解类蛋白，在调节β-catenin的活性中发挥重要作用。本研究拟以永生化的人胚胎神经干细胞系(ReNcell CX细胞)为研究对象，观察PQ染毒对NSCs分化过程中Wnt信号通路中参与中枢神经系统发育的关键分子β-catenin和DVL2基因mRNA表达的变化，为进一步探讨PQ对神经发育过程及导致成年后神经发育异常的分子机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

PQ(分析纯，美国Sigma公司)；四甲基偶氮唑盐(MTT，美国Sigma公司)；ReNcell CX细胞、ReNcell维持培养基、Accutase消化酶(美国Millipore公司)；

人重组表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、人重组碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(美国PeproTech公司)；DMEM/F12培养基(美国Gibco公司)；层粘连蛋白(美国Invitrogen公司)；Tripure(美国Roche公司)；逆转录(RT)试剂盒(加拿大Fermentas公司)；RealMasterMix(SYBR Green染料)、Rnase A贮存液(天根生化科技有限公司)；无RNA酶水(碧云天生物技术研究所)；二甲基亚砜(DMSO)、96孔板(美国Costar公司)；倒置显微镜(型号CK40，日本Olympus公司)；血细胞计数板、Elx-800酶标仪(美国Bio-Tek公司)。

1.2 细胞培养

将层粘连蛋白解冻，用DMEM/F12稀释至20 μg/mL，取6.5 mL加入直径为10 cm的细胞培养皿中，37℃，5%CO₂包被至少4 h。在维持培养基中加入bFGF(20 ng/mL)和EGF(20 ng/mL)制备完全培养基。细胞复苏之前，吸去培养皿中包被的层粘连蛋白，用硝酸盐缓冲液冲洗后加入约9 mL完全培养基。

将盛有ReNcell CX细胞的小瓶从液氮中移出，37℃水浴解冻，解冻中轻微摇动。严密监测直到细胞完全解冻为止。将解冻后的细胞移至盛有9 mL维持培养基的15 mL离心管中，1000 × g离心5 min后移除上清液，加入2 mL完全培养基后轻轻吹打使细胞悬浮，将细胞(约1 × 10⁶个)接种到预先装有9 mL完全培养基的细胞培养皿中，37℃，5%CO₂饱和湿度细胞培养箱中培养，每日更换新鲜的细胞培养基。

待细胞融合至80%左右时，吸去细胞培养基，用硝酸盐缓冲液轻微漂洗细胞后加入Accutase酶在37℃条件下消化3 min，随即加入维持培养基终止消化。将细胞转移至15 mL离心管中，1000 r/min离心3 min(离心半径6 cm)，弃上清，加入完全培养基，吹打成细胞悬液后按照1:2比例接种至新的经层粘连蛋白包被的细胞培养皿中。

1.3 细胞体外诱导分化及分化细胞免疫荧光鉴定

取对数生长期细胞，用Accutase酶进行消化，重悬细胞调节细胞密度种板。调整活细胞密度为5 × 10⁵个/mL，200 μL/孔接种于层粘连蛋白包被的6孔板中，并添加完全培养基至每孔体积2 mL。次日更换为不添加EGF和bFGF的维持培养基隔天换液至等12 d。吸去细胞培养基，用硝酸盐缓冲剂轻洗细胞3次，免疫染色固定液室温固定10 min；免疫染色洗涤液漂洗5 min × 3次；10%羊血清室温封闭4 h；滴加1:200

稀释的 β -III 微管蛋白 (β -tubulin III) 和纤维酸性蛋白 (GFAP) 抗体 4℃ 过夜, 免疫染色洗涤液漂洗 5 min × 3 次; 滴加 1:400 荧光二抗室温避光孵育 4 h; 免疫染色洗涤液漂洗 5 min × 3 次; 4, 6-联脒-2-苯基吲哚 (DAPI) 室温孵育 2 min; 免疫染色洗涤液漂洗 5 min × 3 次; 置于倒置荧光显微镜下观察拍照。

1.4 细胞染毒及细胞活力测定 (MTT 法)

取对数生长期细胞, 用 Accutase 酶进行消化, 重悬细胞调节细胞密度种板。调整活细胞密度为 1×10^5 个/mL, $100 \mu\text{L}$ /孔接种于层粘连蛋白包被过的 96 孔板中, 24 h 后吸去培养基, 加入 PQ 染毒液, 并每孔补充完全培养基 $100 \mu\text{L}$, 调整 PQ 的终浓度为 0.00、0.10、1.00、10.00、 $100.00 \mu\text{mol/L}$, 每组设 3 个复孔。 37°C 、饱和湿度和 $5\% \text{CO}_2$ 培养 20 h 后, 每孔加入 $20 \mu\text{L}$ MTT, 继续孵育 4 h, 在酶标仪 490 nm 波长下测定光密度值, 并计算细胞活力 (cell viability)。次日更换为不添加 EGF 和 bFGF 的维持培养基和用维持培养基配制的 PQ 染毒液, 调整 PQ 终浓度为不引起细胞活力下降的剂量 0.00、0.10、1.00、10.00 $\mu\text{mol/L}$, 隔天更换培养基, 维持培养基中 PQ 的浓度在 0.00、0.10、1.00、 $10.00 \mu\text{mol/L}$ 。分别于染毒后第 2、4、8、12 d 用 Tripure 裂解收获细胞。每个剂量组每个时间点设 3 个复孔。

1.5 实时荧光定量 - 聚合酶链反应 (PCR)

采用 Tripure 一步法提取细胞总 RNA, RT-PCR 试剂盒逆转录得到 cDNA。取 $1 \mu\text{L}$ 逆转录得到的 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 扩增。选择 β -actin 为内参基因, 目的基因引物序列来自基因数据库, 引物序列为 β -actin 正向: CTCCCATCCTGGCCTCGCTGT; 反向: GCTGTCACCTCACCGTTCC; DVL2 正向: TCC ATACGGACATGGCATCGGT; 反向: CGTGATGGTAGA GCCAGTCAAC; β -catenin 正向: GTGTGGCGACATA TGCAGCT; 反向: CAAGATCAGCAGTCTCATTC。均由上海生工生物工程有限公司合成。融解曲线鉴定产物特异性, 每个样品重复测定 3 次。反应体系如下: 2 × AB soluteTM qRCP SYBR Green Mix $5 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 $0.25 \mu\text{L}$, cDNA $1 \mu\text{L}$, 水 $3.5 \mu\text{L}$ 。扩增条件为 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 15 s, 60°C 退火延伸 60 s, 共 40 个循环。将对照组 mRNA 水平设为 1。

1.6 统计分析

由 Excel 2007 录入数据, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析; 方差齐时用 LSD-t 法检验, 不齐者用 Dunnett's t 检验作两两比较。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表

示。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ReNcell CX 细胞诱导分化

图 1 为诱导分化 12 d 后 ReNcell CX 细胞形态学观察 ($200\times$, 光镜)。发现更换不含 EGF 和 bFGF 的维持培养基后, 部分细胞死亡, 存活细胞逐渐出现分化, 胞质突出, 核胞质比变小, 折光性良好。图 1 均可见有一个或两个长突起的神经元样细胞, 细胞核呈圆形或者椭圆形; 以及少数散在的具有多个分支突起的少突胶质细胞; 图 1A 还可见胞体较大, 突起多且粗长的星形胶质细胞。但较之原代培养细胞, ReNcell CX 细胞分化后形态学变化并不十分明显。图 2 为分化细胞免疫荧光鉴定结果, 图 2A 可见神经元细胞标志蛋白 β -tubulin III 表达阳性, 图 2B 可见星形胶质细胞标志蛋白 GFAP 表达阳性。

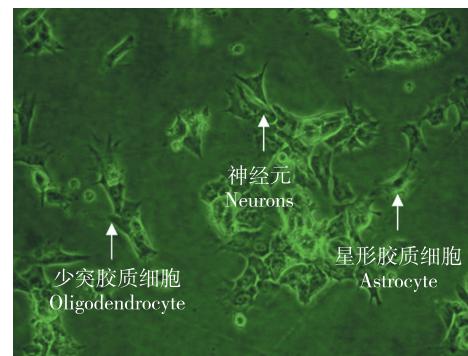
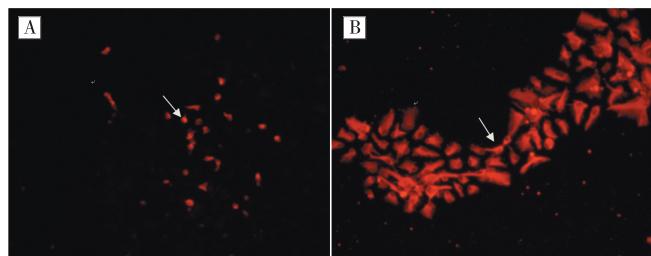


图 1 分化 12 d 的 ReNcell CX 细胞 ($200\times$)

Figure 1 ReNcell CX after differentiation for 12 days



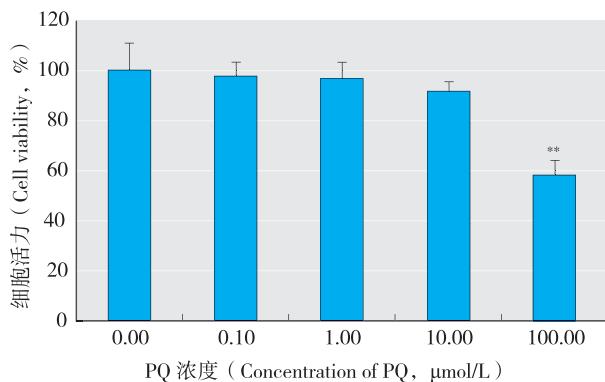
[注] A 为 β -tubulin III 表达阳性细胞 (A shows β -tubulin III-positive cells); B 为 GFAP 表达阳性细胞 (B shows GFAP-positive cells)。

图 2 分化后 ReNcell CX 细胞的免疫荧光染色 ($200\times$)

Figure 2 Immunocytofluorescence staining results in ReNcell CX after differentiation

2.2 细胞活力测定

不同浓度 PQ 染毒处理细胞 24 h 后, 细胞活力的变化情况见图 3。当染毒浓度为 $100.00 \mu\text{mol/L}$ 时, 对 ReNcell CX 细胞增殖出现明显的抑制作用。



[注] **: 与 0.00 $\mu\text{mol/L}$ 组相比 (Compared with 0.00 $\mu\text{mol/L}$ group), $P < 0.01$ 。

图3 不同浓度PQ染毒24 h后细胞活力

Figure 3 Cell viability after 24 h treatment with various concentrations of PQ

2.3 PQ对ReNcell CX细胞 β -catenin和DVL2 mRNA的表达的影响

由表1可见, NSCs在分化2 d时, β -catenin mRNA表达随PQ浓度升高明显下降, 在0.10 $\mu\text{mol/L}$ 时与对照组相比, 差异即有统计学意义。分化4 d时, β -catenin mRNA表达在各剂量组与对照组相比, 差异均无统计学意义。分化8 d时, β -catenin mRNA表达随PQ浓度先下降后升高, 在0.10 $\mu\text{mol/L}$ 及1.00 $\mu\text{mol/L}$ 组间与对照组相比, 差异具有统计学意义。分化12 d时, β -catenin mRNA表达均明显下降, 与对照组相比, 差异具有统计学意义。 β -catenin mRNA表达在整个分化期大致出现先下降再上升随后下降的趋势。

表1 PQ染毒后不同分化期 β -catenin mRNA的表达变化

Table 1 β -catenin mRNA expression with various concentrations

PQ treatment in cell differentiation

浓度($\mu\text{mol/L}$)	2 d	4 d	8 d	12 d
0.00	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.06
0.10	0.66 ± 0.15**	0.85 ± 0.16	0.81 ± 0.07**	0.40 ± 0.08**
1.00	0.35 ± 0.04**	1.22 ± 0.10	0.66 ± 0.15**	0.56 ± 0.22**
10.00	0.36 ± 0.12**	1.09 ± 0.21	1.09 ± 0.10	0.35 ± 0.10**

[注] **: 与 0.00 $\mu\text{mol/L}$ 组相比 (Compared with the 0.00 $\mu\text{mol/L}$ group), $P < 0.01$ 。

由表2可见, NSCs在分化2 d时, DVL2 mRNA在0.10 $\mu\text{mol/L}$ 时即出现明显下降, 3个剂量组与对照组相比, 差异均有统计学意义。在分化4 d时, DVL2 mRNA水平在3个剂量组均明显升高; 分化8 d时, 回落至正常水平; 分化12 d时, 随PQ浓度先上升后下降, 与对照组相比均具有统计学意义。DVL2 mRNA表达在整个分化期大致出现先下降再上升随后下降的

趋势, 与 β -catenin mRNA的表达相符。

表2 PQ染毒后不同分化期DVL2 mRNA的表达变化

Table 2 DVL2 mRNA expression with various concentrations

浓度($\mu\text{mol/L}$)	2 d	4 d	8 d	12 d
0.00	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.11
0.10	0.57 ± 0.13**	1.80 ± 0.16**	1.02 ± 0.06	1.98 ± 0.08**
1.00	0.60 ± 0.18**	2.10 ± 0.10**	1.03 ± 0.10	0.49 ± 0.12**
10.00	0.51 ± 0.11**	1.94 ± 0.10**	1.06 ± 0.09	0.14 ± 0.04**

[注] **: 与 0.00 $\mu\text{mol/L}$ 组相比 (Compared with the 0.00 $\mu\text{mol/L}$ group), $P < 0.01$ 。

3 讨论

Wnt信号通路参与对神经前体细胞增殖、分化的调控, 在大脑皮层模式建立、神经元迁移、树突轴突形态发生中发挥重要作用^[10]。MAZEMONDET等^[11]动态的观察了人类神经祖细胞在分化过程中Wnt/ β -catenin信号通路中各分子基因的表达情况。其中DVL2和 β -catenin作为Wnt经典途径中的关键分子, 参与了Wnt通路对神经干细胞分化的调控。

DVL2作为拮抗 β -catenin降解的家族成员, 其表达水平的下降可以导致GSK-3 β 磷酸化程度降低, 从而促进 β -catenin的降解, 使其丧失对下游LEF/TCF、c-myc等基因表达的调控能力。有研究证实, Wnt/ β -catenin信号通路可以通过抑制GSK-3 β 的作用促进NSCs向神经元的分化, 激活 β -catenin下游靶基因的转录^[12]。本次研究发现, 在分化早期, PQ染毒组DVL2 mRNA的表达受到抑制, 而在中期有所恢复, 但在分化末期仍旧低于对照组水平, DVL2表达水平的下降可能导致细胞内 β -catenin水平下降, 进而影响其对下游基因的调控。

在早期的NSCs中 β -catenin作为一种有丝分裂促进剂, 可以导致胚胎发育早期NSCs的过度增殖, 特异性的抑制 β -catenin会导致大脑皮层NSCs过早的退出细胞周期, 进入分化状态, 但稳定表达的 β -catenin在发育早期阶段不能诱导皮层NSCs向神经元的分化, 而在晚期的细胞中则作为分化因子, 导致细胞周期停止并促进分化。在向神经元分化的过程中, 胞浆中 β -catenin表达水平升高, 抑制 β -catenin的表达可以抑制NSCs向神经元的分化。 β -catenin基因突变可以导致感觉神经元的大量缺失^[13]。本次研究发现, 在分化早期, PQ染毒组 β -catenin mRNA的表达受到抑制, 而在中期有所恢复, 但在分化末期仍旧低于对照组水平, 与DVL2 mRNA的表达变化相一致, 提示PQ在

分化早期可通过抑制 β -catenin 和 DVL2 mRNA 的表达促进 NSCs 由增殖状态转为分化状态, 这与 PQ 可抑制 NSCs 增殖结果相一致。但由于 β -catenin 在 NSCs 分化中早期并不会诱导其向神经元方向分化, 故在分化中期未观察到 PQ 致 β -catenin 表达下降。在分化晚期则通过抑制 β -catenin 和 DVL2 阻止 NSCs 向神经元方向分化。但是有研究表明, Wnt3a 的增加可促进 NSCs 向神经元方向的分化, 而单纯的 β -catenin 过度表达则无影响^[14], 提示 Wnt 信号通路中有可不依赖 β -catenin 的机制调控分化。同时, TANG 等^[15]发现 β -catenin 可通过影响神经池的极性以及放射状胶质细胞的完整性影响其向多巴胺神经元的转化及迁移, 而 β -catenin 介导信号通路促进祖细胞向多巴胺神经元的分化。证明 β -catenin 对多巴胺神经元产生的影响贯穿于整个过程。这些也将为我们将来进一步研究 PQ 对 Wnt 信号通路的影响提供了参考。

本次研究采用人胚胎神经干细胞体外模型, 发现, PQ 可通过下调 Wnt 信号通路中关键分子 β -catenin 和 DVL2 的表达的途径对人类神经祖细胞的分化产生影响。除此之外, Wnt 信号通路尚有非经典的 Wnt/Ca²⁺ 途径及经 JunN- 末端激酶 (JNK) 传导的平面细胞极性 (planar cell polarity) 途径, 三种途径互相协作, 共同完成对 NSCs 分化的调控。因此, PQ 对 Wnt 信号通路的影响以及进而对分化结局的影响机制尚有待进一步研究。

· 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。 ·

参考文献:

- [1] SEMCHUK KM, LOVE EJ, LEE R G. Parkinsons-disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals [J]. Neurology, 1992, 42(7): 1328-1335.
- [2] LABIE D. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals [J]. M S-Med Sci, 2007, 23(10): 868-872.
- [3] 丁正同, 任惠民, 蒋雨平, 等. 百草枯对小鼠黑质纹状体多巴胺能系统的影响 [J]. 复旦学报: 医学科学版, 2001(1): 28-31.
- [4] CORY-SLECHTA DA, THIRUCHELVAM M, BARLOW BK, et al. Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype [J]. Environ Health Perspect, 2005, 113(9): 1263-1270.
- [5] 吕文, 常秀丽, 吴庆, 等. 百草枯对体外培养小鼠胚胎神经干细胞增殖的影响 [J]. 环境与职业医学, 2011, 132(1): 25-28.
- [6] HOGBERG HT, KINSNER-OVASKAINEN A, HARTUNG T, et al. Gene expression as a sensitive endpoint to evaluate cell differentiation and maturation of the developing central nervous system in primary cultures of rat cerebellar granule cells (CGCs) exposed to pesticides [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 235(3): 268-286.
- [7] DONATO R, MILJAN EA, HINES SJ, et al. Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines [J]. BMC Neurosci, 2007, 8: 36.
- [8] REYA T, DUNCAN A W, AILLES L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells [J]. Nature, 2003, 423(6938): 409-414.
- [9] BUZANSKA L, STACHOWIAK E, STACHOWIAK M, et al. Neural stem cell line derived from human umbilical cord blood-morphological and functional properties [J]. J Neurochem, 2003, 85(S2): 33-33.
- [10] FUENTE-FERNANDEZ R F, CALNE D B. Evidence for environmental causation of Parkinson's disease [J]. Parkinsonism Relat Disord, 2002, 8(4): 235-241.
- [11] MAZEMONDET O, HUBNER R, FRAHM J, et al. Quantitative and kinetic profile of Wnt/ β -catenin signaling components during human neural progenitor cell differentiation [J]. Cell Mol Biol Lett 2011, 16(4): 515-538.
- [12] HAYDEN M A, AKONG K, PEIFER M, et al. Novel roles for APC family members and Wingless/Wnt signaling during Drosophila brain development [J]. Dev Biol, 2007, 305(1): 358-376.
- [13] LEE H Y, KLEBER M, HARI L, et al. Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells [J]. Science, 2004, 303(5660): 1020-1023.
- [14] HUBNER R, SCHMOLE A C, LIEDMANN A, et al. Differentiation of human neural progenitor cells regulated by Wnt-3a [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 400(3): 358-362.
- [15] TANG M, MIYAMOTO Y, HUANG E J, et al. Multiple roles of beta-catenin in controlling the neurogenic niche for midbrain dopamine neurons [J]. Development, 2009, 136(12): 2027-2038.

(收稿日期: 2013-02-21)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 洪琪; 校对: 王晓宇)