

# 脊髓损伤后 Wnt-3a 表达对神经干细胞增殖的影响

才礼扬 赵斌 王栓科 王凯

**【摘要】 目的** 研究大鼠脊髓损伤后 Wnt-3a 信号蛋白表达及其对脊髓神经干细胞增殖的影响。**方法** 选用30只SD成年雌性大鼠,随机分为A组(正常对照组,  $n=5$ )和B组(脊髓损伤组,  $n=25$ )。A组不损伤脊髓,B组在大鼠  $T_{9-10}$  节段采用 Allen 打击法造成脊髓损伤,于造模后 1、3、7、14、28 d 取材。对距离损伤中心 5 mm 脊髓行免疫组化染色,检测和比较两组 Wnt-3a 表达动态变化及内源性神经干细胞增殖,并统计分析两者相关性。**结果** A组大鼠脊髓中央管周围和外周软膜仅有极少量 Wnt-3a 表达,BrdU 阳性细胞也不明显,白质中几乎没有。B组大鼠损伤 1 d 后脊髓中央管周围和外周软膜即有 BrdU 阳性细胞和 Wnt-3a 表达,3 d 后表达明显增多,7 d 后达到高峰,14 d 后逐渐下降,28 d 后仅有少量表达。统计软件分析显示 Wnt-3a 表达与 BrdU 表达具有相关性。**结论** 大鼠脊髓损伤后 Wnt-3a 表达增多,可能促进内源性神经干细胞增殖。

**【关键词】** 脊髓损伤; Wnt-3a; 神经干细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2011.02.021

**Effect of Wnt-3a on the proliferation of neural stem cells after spinal cord injury** CAI Li-yang, ZHAO Bin, WANG Shuan-ke, WANG Kai. Department of Orthopaedics, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of Wnt-3a on the proliferation of neural stem cells after spinal cord injury in rats. **Methods** Thirty Sprague-dawley (SD) female rats were randomly divided into two groups; the control group (group A,  $n=5$ ) and the injury group (group B,  $n=25$ ). The spinal cords of group A were not injured and the spinal cords of group B were injured by the Allen method. The spinal cord of models was took 1 d, 3 d, 7 d, 28 d after injury and stained them with method of immunohistochemistry. The expression of Wnt-3a was tested and the relativity between Wnt-3a and the proliferation of neural stem cells was analysed. **Results** We found that at the central canal and the outer circumference of the spinal cord of group A, there were little Wnt-3a proteins and BrdU positive cells. But at the central canal and the outer circumference of the spinal cord of group B, there were some Wnt-3a proteins and BrdU positive cells 1 day after injury and the expression increased obviously 3 days after injury. They reached the highest point or level 7 days after injury and declined gradually 14 days after injury, and leaved a little Wnt-3a proteins and BrdU positive cells 28 days after injury. There were positive relations between the expression of Wnt-3a proteins and BrdU positive cells though the analyse of statistic. **Conclusion** The expression of Wnt-3a proteins are enhanced after injury, which probably facilitate the proliferation of neural stem cells.

**【Key words】** Spinal cord injury; Wnt-3a; Neural stem cells

神经干细胞(NSC)是一类来源于神经系统,具有自我更新能力,能通过不对称分裂产生各种神经细胞的多功能干细胞。近年研究发现,神经干细胞在修复脊髓损伤过程中起着至关重要的作用。本实验以一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)作为神经干细胞增殖标记物,利用免疫组织化学技术研究 Wnt-3a 蛋白在脊髓损伤后神经干细胞增殖中的表达。

## 1 资料与方法

本实验取同龄成年雌性大鼠 30 只(甘肃中医学院动物实验中心提供),重量 180~250 g。实验材料包括 Wnt-3a 抗体(美国 Bioworld 公司),BrdU(美国 Sigma 公司),兔多克隆抗大鼠 Wnt-3a、兔单克隆抗大鼠 BrdU(武汉博士德生物公司),荧光显微镜(日本 Olympus 公司),Image-pro-plus 6.0 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司)。

### 1.1 动物模型制作与分组

大鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛(按 300 mg/kg)麻醉成功后,常规消毒铺巾,取后正中切口,逐层切开皮肤、皮下组织至脊柱,充分暴露  $T_{9-10}$  节段,用咬骨钳咬开椎板

至两侧关节突,充分暴露该段脊髓。A 组(正常对照组,  $n=5$ )彻底止血后逐层缝合切口;B 组(脊髓损伤组,  $n=25$ )采用 Allen 打击法,将 2 g 钢珠沿 12.5 cm 高的玻璃管坠落打击大鼠开放的  $T_{9-10}$  节段脊髓,成功后大鼠出现摆尾反射,双后肢瘫痪,彻底止血后逐层缝合切口。术后两组均给予 40 000 U 青霉素,每天 1 次,连续 3 天。B 组苏醒后每日膀胱按摩,挤压排尿 3 次,直至膀胱自主反射形成。

### 1.2 行为学检查

损伤后 1、3、7、14、28 d 对动物称重并进行行为学检查。采用 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 评分法,检测大鼠行为及肢体运动功能,观察伤后各时相点后肢活动、肌力等,以此评定脊髓损伤后运动功能恢复情况。

### 1.3 病理标本制备

将 10 mg/ml BrdU 溶于 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4),在大鼠处死前 5 d 经腹腔连续注射(10 mg/d)。A 组在损伤后 28 d, B 组在损伤后 1、3、7、14、28 d 分别用水合氯醛深度麻醉后,经左心室插管后剪开右心耳,用 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 300 ml 灌洗,待流出液体清亮后用 4% 多聚甲醛 200 ml 灌注固定,1 h 后以损伤段为中心切取长度为 2 cm 的脊髓标本,然后浸泡于 4% 多聚甲醛中固定 12 h。脊髓标本修剪平齐后用石蜡包埋,连续切片,制备 5  $\mu$ m 组织切片,分别采用链霉菌抗

基金项目:甘肃省自然科学基金(096RJZA078)

作者单位:730030, 兰州大学第二医院骨科

生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP)和免疫荧光法染色。

1.4 免疫组化 SP 法检测

将石蜡切片用二甲苯脱蜡,乙醇脱水;室温下3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>封闭内源性过氧化物酶 10 min,PBS 冲洗 3 次×10 min;修复抗原,将切片置于 0.01 M 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中煮沸 20 min 后冷却至室温,PBS 冲洗 3 次×10 min;在 37℃下用正常血清封闭 10 min,倾去勿洗;滴加一抗在 4℃冰箱孵育过夜,PBS 冲洗 3 次×10 min (PBS 替代一抗作阴性对照);滴加生物素化的二抗,37℃下置 30 min,PBS 冲洗 3 次×10 min;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液在 37℃下孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次×10 min;二氨基联苯胺(DAB)染色,自来水充分冲洗后苏木素复染,最后常规脱水、透明、干燥、封片。

1.5 免疫荧光法检测

将切片脱蜡脱水,过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,修复抗原,PBS 冲洗 3 次×10 min;用聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)对细胞破膜 15 min,牛血清白蛋白(BSA)封闭 30 min;用一抗冰箱 4℃孵育 48 h, PBS 漂洗 3 次×10 min,异硫氰酸荧光素(FITC)二抗冰箱 4℃孵育 4 h, PBS 漂洗 3 次×10 min,最后用甘油缓冲液(甘油:PBS = 1 : 1)封片。

1.6 统计学软件分析

用 SPSS13.0 统计学软件处理数据,结果用均数±标准

差( $\bar{x} \pm s$ ),组间比较采用方差分析,组内两两比较采用 *t* 检验,检验水平  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

损伤后 B 组大鼠出现不同程度的后肢肌力减退、行走缓慢、步态异常等运动功能障碍,两组比较的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

在 A 组脊髓组织中,Wnt-3a 几乎不表达(图 1)。B 组脊髓损伤后 1 d 可见脊髓中央管周围 Wnt-3a 表达阳性区域出现,脊髓灰白质内少量表达,表达也很分散;3 d 时 Wnt-3a 表达阳性区域面积达到高峰(图 2),直至 7 d 时仍维持在较高水平,之后逐渐减少,28 d 时仅见极少量阳性表达。

A 组大鼠脊髓组织外周及室管膜区域很少见有 BrdU 阳性细胞(图 3),而 B 组大鼠脊髓损伤部位在各时间点均有 BrdU 表达,脊髓损伤 1 d 后在损伤的脊髓组织周围及室管膜区可见少量 BrdU 阳性细胞,3 d 后阳性细胞增加,7 d 后阳性细胞数达到高峰(图 4),主要见于室管膜下并向脊髓中央延伸;然后 BrdU 阳性细胞开始逐步下降,至 28 d 时明显下降。

B 组大鼠脊髓损伤后脊髓室管膜区和灰白质区不同时间点 BrdU 和 Wnt-3a 阳性表达面积如表 2 所示。统计学分析显示 Wnt-3a 与 BrdU 蛋白呈直线相关(图 5, $r = 0.68, P < 0.01$ )。

表 1 大鼠脊髓损伤后 BBB 评分( $\bar{x} \pm s$ )

行为学检查	组别	n	脊髓损伤后时间(d)				
			1	3	7	14	28
BBB 评分	A 组	5	21	21	21	21	21
	B 组	25	0.60±0.55	1.80±0.37	5.20±0.84	8.80±0.84	10.60±0.90

表 2 B 组大鼠脊髓损伤后不同时间点 BrdU 与 Wnt-3a 阳性表达面积( $\bar{x} \pm s, n = 5, \mu\text{m}^2/\text{视野}$ )

	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
BrdU	407.89±19.07	578.31±26.64	869.72±28.75	737.80±26.12	460.07±36.60
Wnt-3a	326.01±21.19	683.89±21.78	614.56±19.43	499.50±17.26	305.83±20.56

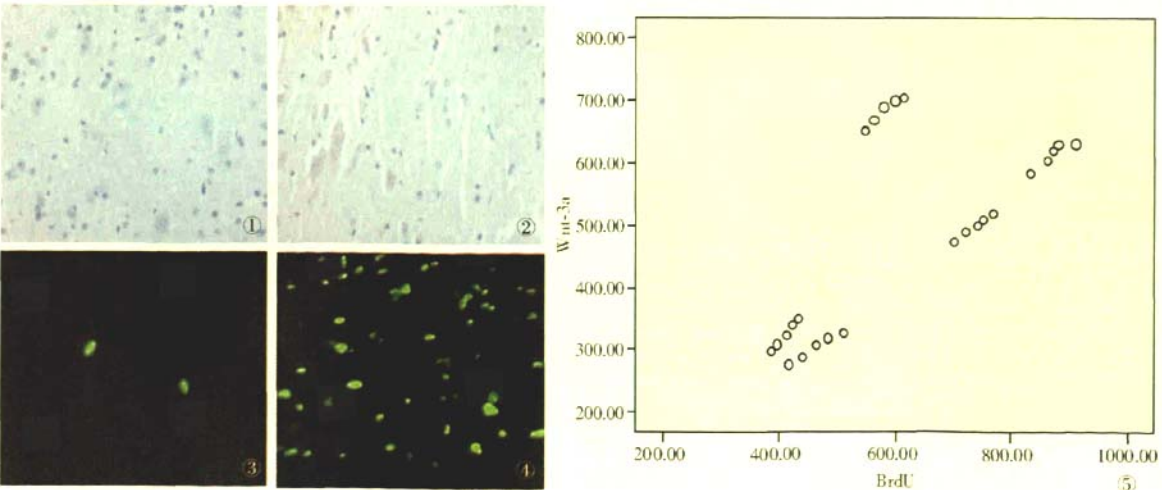


图 1 A 组脊髓组织中 Wnt-3a 几乎不表达(×200) 图 2 B 组脊髓损伤后 3 d Wnt-3a 表达的阳性区域面积达到高峰(×200) 图 3 A 组脊髓组织中很少有 BrdU 阳性细胞(×400) 图 4 B 组脊髓损伤后 7 d BrdU 阳性细胞数达到高峰(×400) 图 5 B 组脊髓损伤后 BrdU 与 Wnt-3a 阳性表达面积的关系( $\mu\text{m}^2/\text{视野}$ )

### 3 讨论

#### 3.1 神经干细胞与脊髓损伤

神经干细胞是具有分化为神经元细胞、星形胶质细胞及少突胶质细胞能力,能自我更新并足以提供大量脑组织细胞<sup>[1]</sup>。脊髓损伤时神经元损伤、坏死、轴突断裂、脱髓鞘化以及少突胶质细胞破坏,是造成脊髓传导功能障碍的直接原因,而神经元缺乏再生能力、脊髓自身对再生修复的抑制环境及后期的胶质瘢痕形成对轴突再生阻碍等,则是导致脊髓损伤不能自身修复的主要原因。针对以上机制,神经干细胞有希望从以下两方面修复脊髓功能:①细胞替代提供新的神经连接及再髓鞘化;②基因治疗支持损伤的神经元生存,对抗不利于修复的抑制环境,促进稳定机能的轴突再生和突触重新形成<sup>[2]</sup>。现今发现神经干细胞移植治疗脊髓损伤存在很多问题,主要是种子细胞来源较少,利用胚胎干细胞则不可避免地会遭到伦理道德的指责,另外由于长时间体外培养扩增和各种刺激因子的作用,神经干细胞的生物安全性也必须加以考虑。有研究<sup>[3]</sup>发现体外培养的神经干细胞出现基因异常,细胞增殖和分化的性状也发生改变,甚至具有致瘤性,故认为其安全性值得考虑。因此,诱导内源性神经干细胞治疗脊髓损伤成为目前研究热点。

#### 3.2 Wnt 信号表达对神经干细胞的影响

成年哺乳动物中枢神经系统中终身存在着处于静止状态的内源性神经干细胞,在某些因素作用下或受到损伤刺激时可被激活,并重新进入细胞增殖周期而进一步分化为神经细胞<sup>[4]</sup>。如何促进内源性神经干细胞增殖和分化,产生更多神经元以修复脊髓损伤,始终为世界性难题。现有研究证实神经干细胞增殖和分化,除受细胞因子和外周环境因素影响外,基因水平的调控也起到重要作用。其中 Wnt 信号转导是基因调控的重要组成。本实验就 Wnt-3a 信号蛋白对脊髓损伤后内源性神经干细胞增殖的影响进行研究。

Wnt 信号转导途径是传递生长刺激信号的通路,对多种生物胚胎体轴发育,特别是胚胎神经系统发育过程起重要作用。Wexler 等<sup>[5]</sup>研究发现 Wnt 信号转导途径通过调控内源性神经干细胞增殖和分化,影响神经系统发育和生长。Bonner 等<sup>[6]</sup>在斑马鱼胚胎中诱导分泌型 Wnt 信号抑制因子 Dickkopf1 (DKK1),结果显示表达 DKK1 的胚胎脊髓与同类相比明显小,说明增殖过程中有缺陷;免疫荧光法比较表达 DKK1 的胚胎有丝分裂指数与热休克刺激的无转基因对照组有丝分裂指数,发现在表达 DKK1 的胚胎背侧、中间和腹侧的有丝分裂指数分别下降 79%、60% 和 80%,说明 Wnt 信号在整个脊髓有促进细胞分裂的作用。Lie 等<sup>[7]</sup>报道显示,成年海马干细胞表达 Wnt 受体和信号组成成分,体内实验证实 Wnt 信号参与成年海马干细胞神经发生过程中神经元决定和神经元前体细胞定向增殖调控。其他大量实验也证实 Wnt 信号在内源性神经干细胞增殖、分化过程中的调控作用。Megason 等<sup>[8]</sup>研究发现 Wnt-1 与 Wnt-3a 不仅表现有丝分裂原作用,而且在脊髓背侧至腹侧方向上形

成有丝分裂原浓度梯度,在有丝分裂原浓度较高、Wnt 信号强的脊髓背侧表现为大量增殖,而在有丝分裂原浓度低、Wnt 信号较弱的脊髓腹侧则表现为大量分化。

健康成年哺乳动物中 Wnt 信号转导通路处于关闭状态,Wnt 基因在体内也几乎没有表达,但是受到某种刺激比如损伤时,其表达就会明显增多<sup>[9]</sup>。本实验结果显示 Wnt-3a 在正常脊髓中几乎没有表达,脊髓损伤后 1 d 开始表达,3 d 时表达达到峰值,7 d 后逐步开始下降,28 d 后几乎回复至原来状态。BrdU 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在细胞增殖周期的 S 期嵌入细胞核 DNA,因而可用于标记具有增殖活性的细胞<sup>[10]</sup>。本实验采用 BrdU 标记脊髓损伤后不同时间点增殖的内源性神经干细胞,结果发现脊髓损伤后 1 d BrdU 阳性细胞开始增多,7 d 后达到高峰,然后逐步下降,这说明脊髓损伤后内源性神经干细胞立刻开始增殖,1 周后达到顶峰,然后逐步下降。这与 Wnt 信号表达过程相类似,因此推测内源性神经干细胞的增殖可能与 Wnt 信号转导通路的激活和 Wnt-3a 表达有关。统计学分析发现,脊髓损伤后不同时间点 BrdU 阳性细胞表达面积与 Wnt-3a 阳性细胞表达面积具有高度相关性,因此认为脊髓损伤后 Wnt-3a 蛋白可能参与了内源性神经干细胞增殖,并且发挥了促进增殖的作用。

随着科学技术的发展,对 Wnt 信号转导途径的认识将逐步加深。有学者<sup>[11]</sup>研究发现,可应用全反式维甲酸诱导 Wnt-1 信号表达,使得内源性神经干细胞更多地转化为神经元细胞。如果能人为地控制神经干细胞的增殖与分化,这就为脊髓损伤治疗提供了一种全新的重要方法。

#### 参考文献

- McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*, 1997; 276(5309): 66-71
- Ourednik V, Ourednik J, Park KI, et al. Neural stem cells: a versatile tool for cell replacement and gene therapy in the central nervous system. *Clin Genet*, 1999; 56(4):267-278
- Galvin KA, Jones DG. Adult human neural stem cells for cell-replacement therapies in the central nervous system. *Med J Aust*, 2002; 177(6):316-318
- Munoz-Torres M, Alonso G, Raya MP. Calcitonin therapy in osteoporosis. *Treat Endocrinol*, 2004; 3(2):117-132
- Wexler EM, Geschwind DH, Palmer TD. Lithium regulates adult hippocampal progenitor development through canonical Wnt pathway activation. *Mol Psychiatry*, 2008; 13(3):285-292
- Bonner J, Gribble SL, Veien ES, et al. Proliferation and patterning are mediated independently in the dorsal spinal cord downstream of canonical Wnt signaling. *Dev Biol*, 2008; 313(1):398-407
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, et al. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 2005; 437(7063):1370-1375
- Megason SG, McMahon AP. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development*, 2002; 129(9):2087-2098
- Miyashita T, Koda M, Kitajo K, et al. Wnt-Ryk signaling mediates axon growth inhibition and limits functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 2009; 26(7):955-964
- Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW. Neural stem cells in the subventricular zone are resilient to hypoxia/ischemia whereas progenitors are vulnerable. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004; 24(7):814-825
- Zhong D, Kang M, Wang Q, et al. Effect of Wnt-1 on the process of inducing neural stem cells into neurons by all-trans-retinoic acid in vitro. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2009; 23(6):742-746

(收稿:2010-10-11; 修回:2010-11-26)

(本文编辑:晓雪)