

Wnt 3a 在神经干细胞向多巴胺能神经元分化过程中作用的研究*

韩 姝 师 伟 李艳华 姚海雷 谢小燕 陈 琳
施双双 白慈贤 南 雪 闫 舫 王韞芳 裴雪涛**

(军事医学科学院野战输血研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850)

摘要 Wnt 信号在中枢神经系统发育过程中起重要的作用, 控制着细胞的生长及分化. Wnt3a 是 Wnt 家族的成员之一, 对神经干细胞的增殖及分化有一定的调控作用. 将重组 Wnt3a 腺病毒转入神经干细胞中, 研究 Wnt3a 在定向诱导神经干细胞向多巴胺能神经元分化过程中的作用. 将神经干细胞分为 4 组, 对照组(不加任何诱导因子组)、抗坏血酸诱导组(AA 组)、Wnt3a 重组腺病毒诱导组(Wnt3a 组)以及 Wnt3a 重组腺病毒加抗坏血酸诱导组(Wnt3a + AA 组). 结果显示, Wnt3a 组细胞中的多巴胺能神经元前体细胞特异性标志 Nurr1 表达量显著增多, Wnt3a + AA 组多巴胺能神经元明显多于 AA 组, 酪氨酸羟化酶(TH)在 mRNA 水平上的表达是 AA 组的 1.86 倍. 蛋白质印迹及免疫细胞化学染色显示, 各诱导组均有 TH 的表达, Wnt3a 组和 AA 组多巴胺能神经元阳性细胞数比例分别为 $(5.76 \pm 3.34)\%$ 和 $(37.42 \pm 2.54)\%$, 与 Wnt3a + AA 组 $(73.96 \pm 2.61)\%$ 比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 利用高效液相色谱法检测到诱导后的细胞可分泌多巴胺. 结果表明, Wnt3a 可促进神经干细胞向多巴胺能神经元前体细胞分化, 再通过抗坏血酸的诱导作用, 在体外可获得大量的多巴胺能神经元, 这些神经元有分泌多巴胺的功能.

关键词 Wnt3a, 神经干细胞, 分化, 多巴胺能神经元

学科分类号 Q71

细胞移植是治疗神经系统疾病的重要途径. 神经干细胞(neural stem cells, NSCs)具有自我复制和分化为各种类型神经细胞的特点, 可部分补偿损伤和丢失的细胞功能, 因此神经干细胞移植成为治疗帕金森病(Parkinson disease, PD)的重要手段之一. 但是在大量 NSCs 移植治疗 PD 的研究中发现, 移植后 NSCs 存活数量以及分化为多巴胺能神经元的数量很少, 这就提示具有多向分化能力的 NSCs 只依靠内部的分化信息决定其分化方向是远远不够的, 因此研究 NSCs 的体外定向诱导分化的因素和机制对细胞移植治疗帕金森病的应用尤为重要.

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^[1]. Wnt 家族的许多成员以不同的作用机制参与了中枢神经系统的发育, 对神经干细胞的增殖和分化均有促进作用. Wnt 信号通路中的成员之一 β -catenin 在转基因小鼠的神经上皮前体细胞稳定

表达. 在中脑中检测到 Wnt 家族成员分泌的糖蛋白表达, 它们调节前体细胞的扩增^[2]和神经元的分化^[3], 这表明, 在脑的发育中, Wnt 信号可通过促进细胞周期来扩增前体细胞的数目^[4]. Wnt3a 的过表达可增加脊髓中有丝分裂细胞的数目^[5]. 在体外神经干细胞培养过程中, 加入有活性的 Wnt3a 蛋白可减少神经球的形成, 促进神经干细胞向神经元及神经胶质细胞的分化^[6]. Wnt3a 蛋白在体外纯化过程中极易发生去棕榈酰化, 得到的蛋白质通常丧失活性和功能, 因此需要载体介导 Wnt3a 在细胞内表达. 腺病毒载体具有转染效率高、表达时间短、携带的功能基因在细胞内表达水平高的特点, 可用来

* 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2001CB509906, 2005CB522702)和国家高技术研究发展计划领域重大专项(863)资助项目(2005AA219010).

** 通讯联系人. Tel: 010-66932203, Fax: 010-68164807

E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2006-04-04, 接受日期: 2006-06-02

介导 Wnt3a 转入神经干细胞中, 使 Wnt3a 瞬时表达, 从而启动其信号通路中下游基因的表达, 诱导细胞发生增殖或分化. 本文用携带有 Wnt3a 基因的重组腺病毒转染 NSCs, 研究其在 NSCs 体外定向诱导分化过程中的作用.

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar 大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司; 培养基 DMEM/F12 和 B27 以及表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自 GIBCO 公司; 抗大鼠 Nestin 抗体、DAT 抗体、TH 抗体购自 Sigma 公司; 免疫组化试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司; 抗坏血酸(AA)、RNA 提取试剂及反转录试剂购自 Promega 公司.

1.2 神经干细胞培养与鉴定

Wistar 大鼠(E12.5d), 深度麻醉后颈椎断颈处死, 无菌条件下取出胎鼠, 显微镜下剥离胎脑, 取出中脑, 并用显微镊去除脑膜血管, 收集到的中脑组织剪为 1~2 mm³ 小组织块, 经 0.125% 胰酶消化和 DNase I 作用, 用 400 目的筛网过滤, 去除未被消化的组织, 吸管吹打形成单细胞悬液, 以 4×10⁵ 个/ml 种植于塑料培养瓶中, 培养液为含 DMEM/F12, 2% B27, EGF 20 μg/L, bFGF 10 μg/L, 青霉素 100 U/ml、链霉素 100 mg/L. 37℃ 5% CO₂ 孵箱培养, 待原代克隆出现后(约 7~10 天), 离心收集神经球, 经胰酶消化, 吸管吹打成单细胞悬液后, 以 1×10⁵ 个/ml 种植于新的培养液中, 每 7 天换液传代 1 次. 离心收集培养形成的神经球, 经甩片到多聚赖氨酸包被的玻片上, 干燥固定后进行巢蛋白表达的免疫细胞染色.

1.3 Wnt3a 重组腺病毒在 HEK293 细胞的扩增

Wnt3a 重组腺病毒构建过程参见文献[7]. Wnt3a 重组病毒感染 HEK293 细胞以获得大量病毒液. 3~4 天后用荧光显微镜观察 HEK293 细胞中绿色荧光蛋白 GFP 的表达, 待 HEK293 细胞发生完全细胞病变效应(CPE)后, 收取细胞, 在-70℃/37℃条件下反复冻融 3 次, 离心收集含病毒的上清液.

1.4 神经干细胞体外定向诱导分化

1.4.1 重组 Wnt3a 腺病毒感染神经干细胞. 新鲜传代的神经干细胞以 5×10⁵ 个/ml 接种于包被有多聚赖氨酸的培养瓶中, 贴壁培养 3 天后, 将重组的 Wnt3a 腺病毒感染神经干细胞, 再经 3 h 后更换培

养液为 DMEM/F12, 2% B27, 分别在 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 收集细胞, 做 RT-PCR, 进行 Nurr1 半定量测定.

1.4.2 神经干细胞体外定向诱导分化. 新鲜传代的神经干细胞以 5×10⁵ 个/ml 接种于包被有多聚赖氨酸的 24 孔板内, 1 ml/孔, 贴壁培养后, 感染重组 Wnt3a 腺病毒, 感染 3 天后更换培养液 DMEM/F12, 2% B27 并加入抗坏血酸, 其终浓度为 100 μmol/L, 3 天后半量换液, 第 6 天时终止诱导.

1.4.3 不同诱导条件下细胞分化比较. 新鲜传代的神经干细胞分为 4 组: 对照组, 抗坏血酸诱导组(AA 组), 转 Wnt3a 重组腺病毒组(Wnt3a 组), 及转 Wnt3a 重组腺病毒加抗坏血酸诱导组(Wnt3a + AA 组). 对 4 组诱导结果进行 RT-PCR, 免疫细胞化学, 蛋白质印迹及高效液相色谱检测.

1.5 RT-PCR 检测基因的表达

取不同组细胞(各 2×10⁶ 个/ml), 用 Trizol 试剂提取 RNA. 各取 2 μg RNA, 按 RNA PCR 试剂盒说明合成 cDNA, 鉴定 Nurr1、DAT、TH 基因的表达. 引物由上海生工生物技术公司合成, 以 β-actin 为内参. Nurr1 引物设计为: 上游, 5' CTTGTACCAAATGCCCCCTG 3'; 下游, 5' CATCGG-GCTATGCTGTACC 3', 58℃, 扩增片段 196 bp; DAT 引物设计为: 上游, 5' TGCTGGTCATTGTTCTGCTC 3'; 下游, 5' ATCCACACAGATGCCTCACCA 3', 58℃, 扩增片段 202 bp; TH 引物设计为: 上游, 5' CAGAGTCTCATCGAGGATGC 3'; 下游, 5' CTTGTCCTCTCTGGCACTGC 3', 52℃, 扩增片段为 376 bp.

1.6 免疫细胞化学检测

取不同诱导组细胞进行酪氨酸羟化酶(TH)和多巴胺递质转运子(DAT)的免疫细胞化学染色. 方法如下: 4%多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 冲洗, 0.3% Triton X-100 室温 10 min, 3% H₂O₂ 室温 10 min, PBS 冲洗, 山羊血清封闭 30 min, 一抗工作液, 4℃孵育过夜, 生物素标记二抗, 37℃, 30 min, DAB 显色 2~10 min, 蒸馏水充分冲洗, 重加 PBS, 显微镜下计数 TH 及 DAT 阳性细胞个数, 计数 5 个孔, 每孔随机取 3 个视野.

1.7 蛋白质印迹检测

分别收集不同诱导组细胞, 用放射性免疫沉淀裂解缓冲液(RIPA)裂解细胞, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 然后用半干式电转的方

法将蛋白质转移至 PVDF 膜, 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h, 加一抗 anti-TH, 4℃ 孵育过夜, 洗涤, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗, 37℃ 孵育 2 h, 加增强化学发光试剂于暗室自显影.

1.8 高效液相色谱 (HPLC-ECD) 检测细胞多巴胺的分泌量

分别收集不同诱导组的细胞及细胞培养上清. 细胞用放射性免疫沉淀裂解缓冲液 (RIPA) 裂解, 测定蛋白质浓度. 上清采用冷冻干燥法浓缩后, 加 200 μl PBS 溶解, 测定蛋白质浓度. 应用 HPLC-ECD 检测细胞内及释放到细胞外的 DA 含量.

1.9 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用析因设计的方差分析, 两两数据间比较用 q 检验. 全部数据采用 SAS 软件包进行统计.

2 结 果

2.1 神经干细胞培养与鉴定

原代培养的神经干细胞在无血清培养基中生长, 24 h 内可见细胞聚集现象, 部分细胞死亡, 第 2 天可见几个细胞形成的细胞团, 3~4 天可见到大于 10 个细胞的细胞团悬浮生长, 到 7~8 天时生长成为上百个细胞的集落. 神经球悬浮生长, 细胞形态规则, 无明显的突起 (图 1a), 单个原代细胞体外培养形成集落的能力为 0.5%~1.5%, 次代培养及以后的克隆过程中, 神经球的出现明显增加, 传代培养细胞形态无明显变化.

培养的神经干细胞在有多聚赖氨酸涂布的盖玻片上贴壁后, 进行巢蛋白的免疫细胞染色, 结果显示, 细胞表达巢蛋白阳性, 反复传代培养后的细胞克隆仍为巢蛋白表达阳性 (Nestin+) (图 1b).

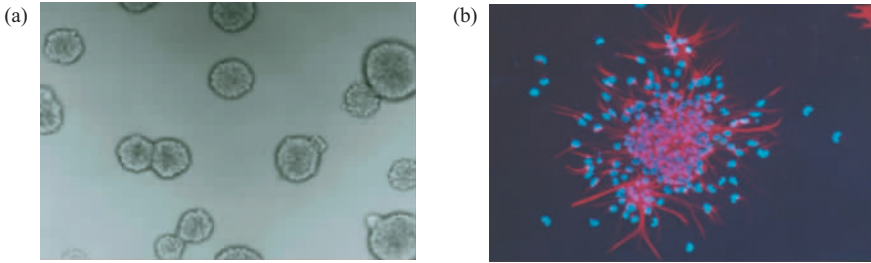


Fig. 1 Morphology of neural stem cells
(a) Neurospheres of neuronal stem cells P3, 100 x. (b) Nestin (red) and DAPI (blue) staining of neurospheres, 200 x .

2.2 Wnt3a 重组腺病毒在 HEK293 细胞的扩增

重组腺病毒毒液感染 HEK293 细胞, 荧光显微镜下可以看到细胞中有 GFP 蛋白表达. 将扩增的毒液感染新鲜传代的神经干细胞, 2 天后, 显微镜下可看到有 98% NSC 表达 GFP 蛋白.

2.3 Wnt3a 重组腺病毒对 NSCs 分化为多巴胺神经细胞的作用

2.3.1 Wnt3a 作用不同时间, 多巴胺能神经元前体细胞数量的变化. 选取传代培养 3 代后的神经干细胞, 用 Wnt3a 重组腺病毒对其感染, 24 h 开始有 Nurr1 的表达 (图 2a), 随着时间的延长表达量逐渐

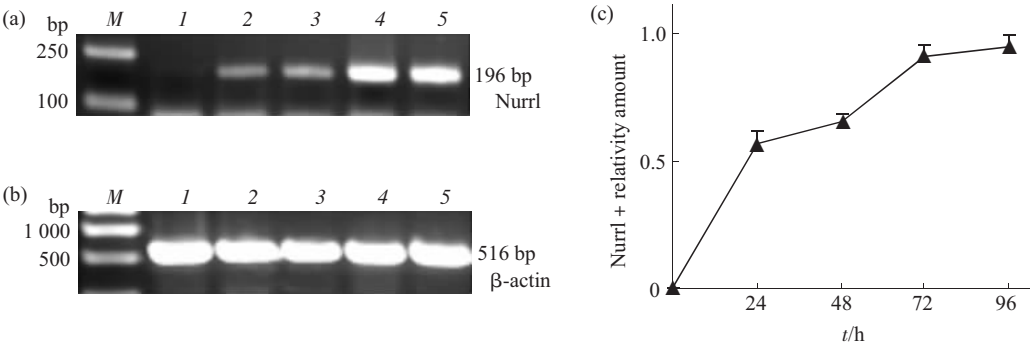


Fig. 2 The expression of Nurr1 (a) and β-actin (b) ; the relativity amount of Nurr1 expression (c)
M: Marker; I: 0 h; 2: 24 h; 3: 48 h; 4: 72 h; 5: 96 h.

增多(图 2c), 在 72 h Nurr1 急剧增多. 而在转染空的腺病毒载体中未检测到 Nurr1 的表达.

2.3.2 诱导后对多巴胺能神经元检测.

(a) 多巴胺能神经元特异性基因表达在转 Wnt3a 腺病毒 72 h 后, 多巴胺能神经元前体细胞增多, 此时加入 AA, 定向诱导其向多巴胺能神经元分化. 诱导结束后分别提取对照组, AA 诱导组,

Wnt3a 组, 及 Wnt3a + AA 组的 RNA, 进行酪氨酸羟化酶(TH) 的 RT-PCR 半定量检测. 检测结果显示: 对照组中 Nurr1 及 TH 均无表达, Wnt3a 组 Nurr1 表达量较多(图 3a), 而 TH 表达的量相对很少(图 3b); AA 诱导组中有少量 Nurr1 表达, TH 表达量相对较多; Wnt3a + AA 组中 TH 表达的量最多, 是 AA 诱导组的 1.86 倍(图 3e).

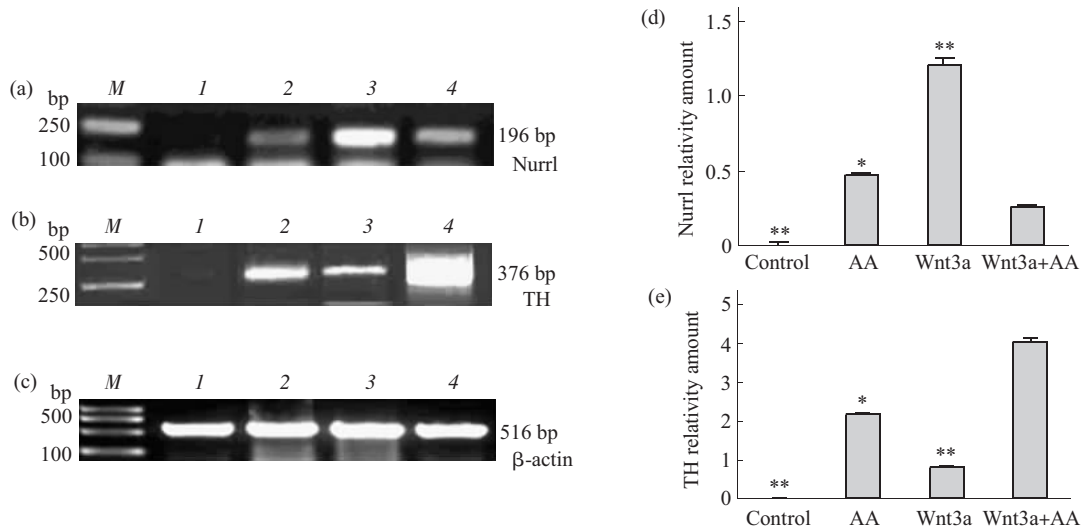


Fig. 3 RT-PCR of the different groups induced cells

(a) Nurr1. (b) TH. (c) β -actin. (d) Relativity amount of Nurr1. (e) Relativity amount of TH (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$). M: DL2000 DNA marker; 1: Control group; 2: AA group; 3: Wnt3a group; 4: Wnt3a+AA group.

(b) 多巴胺能神经元特异性蛋白的免疫细胞化学染色发现, 未经诱导的 NSCs 很少分化为 TH 表达阳性的细胞, 分化率为 $(0.7 \pm 0.3) \%$ (图 4a), AA 诱导能提高 TH 阳性表达的百分率, 可达 $(28.63 \pm 2.31) \%$ (图 4b), Wnt3a 组 TH 阳性表达的细胞百分率为 $(7.37 \pm 0.22) \%$ (图 4c), 而 Wnt3a+AA 组 TH 阳性表达的细胞百分率显著提高为 $(73.96 \pm 2.61) \%$ (图 4d), 是 AA 组的 2.58 倍 ($P < 0.05$). 同样, DAT 阳性表达的细胞百分率, 在 Wnt3a+AA 组也有明显的提高, 为 $(83.49 \pm 2.37) \%$ (图 4h), 是 AA 诱导组的 2.71 倍 ($P < 0.05$).

(c) 多巴胺能神经元特异性蛋白表达的蛋白质印迹结果发现, 各诱导组细胞在 62 ku 左右有明显的条带. 对照组不表达 TH, 在 AA 组、Wnt3a 组有 TH 的表达, 而在 Wnt3a + AA 组中 TH 的表达明显升高 (图 5).

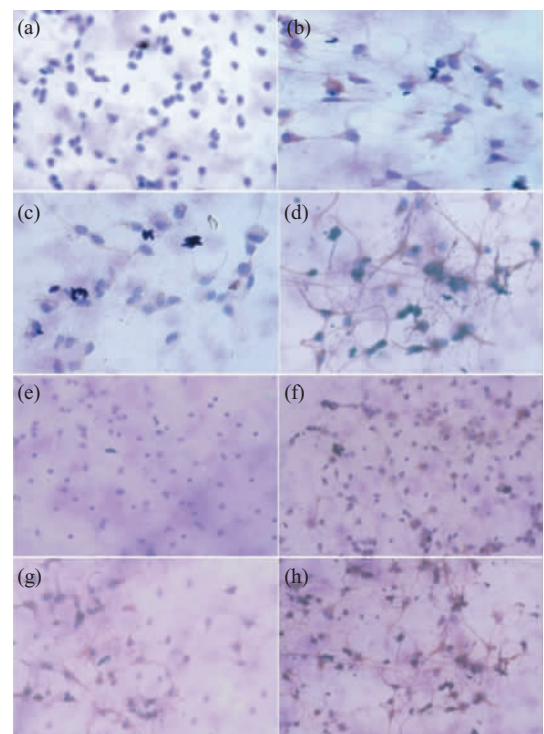


Fig. 4 Immunostaining of DA neuron-related protein, TH (a~d) or DAT (e~h)

There are different expressing amount in the control group (a, e), AA group (b, f), Wnt3a group (c, g), and Wnt3a+AA group (d, h).

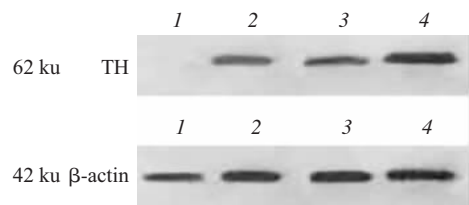


Fig. 5 Western blot of DA neuron-related protein TH
1: Control; 2: AA group; 3:Wnt3a group; 4: Wnt3a+AA group.

2.3.3 诱导后细胞分泌多巴胺的检测. 通过高效液相色谱的方法测定不同诱导条件下细胞多巴胺的分泌量. 对照组的细胞培养上清及细胞中均未检测到 DA; AA 诱导组和 Wnt3a 诱导组的细胞中, 每毫克总蛋白质中分别含 DA (0.931±0.22) ng 和 (0.315 ± 0.23) ng, 而细胞培养的上清中均未检测到 DA; Wnt3a + AA 组的细胞中, 每毫克总蛋白质中含 DA (0.972 ± 0.13) ng, 明显高于其他组 ($P < 0.05$), 而且上清中也检测到 DA, 每毫克总蛋白质中含 DA (2.386± 0.15) ng (表 1).

Table 1 The secret contents of DA in the different groups induced cells by HPLC

		(μg/g)
Group	Cell	Supernatant
control	0.000**	0.000**
AA	0.931 ± 0.220*	0.000**
Wnt3a	0.315 ± 0.230	0.000**
Wnt3a+AA	0.972 ± 0.130	2.386 ± 0.150

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with Wnt3a+AA group.

3 讨 论

Wnt 家族是一类分泌型的细胞信号传导蛋白, 其中的许多成员以不同的作用机制参与了中枢神经系统的发育过程, 对细胞的生长起到一定的调节作用. 从成体大鼠海马回中分离的前体祖细胞中有 Wnt 蛋白受体及其信号通路中一些分子的表达^[8], 这些分子在胚胎发育过程中也是神经干细胞的重要调节子^[9]. 在体外神经干细胞培养过程中, 加入有活性的 Wnt3a 可减少神经球的形成, 而促进神经干细胞向神经元及神经胶质细胞的分化. Wnt3a 的过表达增加了脊髓中有丝分裂细胞的数目. 这些实验表明, Wnt 信号在神经系统发育过程中起关键的作用^[10]. 在 Wnt 信号通路中, β-catenin 的稳定积累可促进中脑前体细胞向多巴胺能细胞的分化^[11]. 因

此我们在实验中采用腺病毒转染的方式引入 Wnt3a 基因, 研究 Wnt3a 在神经干细胞定向诱导分化过程中的作用.

在神经干细胞的培养过程中, 原代细胞可分化为较多 TH 表达阳性的细胞, 而传代后 TH 阳性比率大大降低, 到第 3 代时, TH 表达阳性的细胞很少, 几乎检测不到. NSCs 传代培养中 TH 表达阳性的细胞不断减少, 是无血清筛选培养基的作用, 因此实验中选取 3 代后的 NSCs 进行定向诱导分化, 以排除中脑本身多巴胺能神经元的影响. 用重组的 Wnt3a 腺病毒感染新鲜传代的 NSCs, 分别在不同的时间段收集细胞, 提取 RNA, 鉴定其完整性后, 进行 Nurr1 RT-PCR 半定量检测. Nurr1 是孤核受体家族成员, 在中枢神经系统内高表达, 与中脑多巴胺能神经元的发生、发育和存活密切相关^[12], 是多巴胺能神经元前体细胞的重要标志之一. 在感染 Wnt3a 腺病毒 24 h, Nurr1 表达量增高, 在 72 h Nurr1 表达量迅速加大. 表明感染 Wnt3a 腺病毒后, 多巴胺能前体细胞增多, 与先前报道一致^[13]. 细胞在转染 Wnt3a 重组腺病毒 72 h 后, 加入抗坏血酸 (AA), AA 是一种常用的抗氧化剂, 可定向诱导 NSCs 分化, 产生多巴胺能神经元^[14]. 实验结果表明, Wnt3a 组的 Nurr1 表达量显著高于其他各组, 但 TH 表达的量相对少, 免疫细胞化学染色 TH 阳性细胞比率达 (7.37 ± 0.22) %. Wnt3a + AA 组 RT-PCR 半定量检测, 产生的 TH 是单独加 AA 组的 1.86 倍. 免疫细胞化学染色 AA 组 TH 阳性细胞比率达 (28.63 ± 2.31) %, 而 Wnt3a + AA 组 TH 阳性细胞率达 (73.96 ± 2.61) %, 是 AA 诱导组的 2.58 倍. 蛋白质印迹检测同样也证明在 Wnt3a + AA 组 TH 蛋白表达量明显升高.

通过高效液相色谱法检测细胞多巴胺的分泌, 诱导组的细胞中均检测到多巴胺, 但含量不同. Wnt3a + AA 组明显高于其他两组, 而在细胞培养的上清中, 只有 Wnt3a + AA 组检测到多巴胺. 其原因可能是其他两组分泌到细胞外多巴胺的含量很少而未检测到. 研究结果表明, Wnt3a 在定向诱导 NSCs 向多巴胺能神经元分化过程中, 对 Nurr1 mRNA 的转录有促进作用, 即 Wnt3a 有促进神经干细胞向多巴胺能前体细胞分化的潜能, 再经 AA 诱导可获得高比例的 TH 阳性细胞数, 这些细胞有分泌多巴胺的功能.

近年来国内外有许多关于定向诱导 NSCs 向多巴胺能神经元分化的研究报道, 但采用 Wnt3a +

AA诱导 NSCs 分化还未见报道, 该方案获得的多巴胺能神经元比例高, 且诱导后的神经元可分泌多巴胺. 在以后的研究中, 我们将通过动物实验进一步验证, 经 Wnt3a 诱导体外可获得更多有功能的多巴胺能神经元. 我们的研究为获得足够的治疗 PD 多巴胺能神经元提供了新的思路, 对更好地发挥 NSCs 移植治疗 PD 的作用具有重要意义.

参 考 文 献

- 1 Reya T, Duncan A W, Ailles L, *et al.* A role for Wnt signaling in self-renewal of haematopoietic stem cell. *Nature*, 2003, **423** (6938): 409~414
- 2 Megason S G, McMahon A P. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development*, 2002, **129**(9): 2087~2098
- 3 Teo R, Mohrlen F, Plickert G, *et al.* An evolutionary conserved role of Wnt signaling in stem cell fate decision. *Developmental Biology*, 2006, **289** (1): 91~99
- 4 Dickinson M E, Krumlauf R, McMahon A P. Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development*, 1994, **120** (6): 1453~1471
- 5 Muroyama Y, Fujihara M, Ikeya M, *et al.* Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev*, 2002, **16** (5): 548~553
- 6 Muroyama Y, Kondoh H, Takada S. Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **313**(4): 915~921
- 7 师伟, 韩姝, 李艳华, 等. Wnt3a 转基因基质细胞的建立及其对脐血来源 CD34+造血干/祖细胞扩增作用的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (9): 835~841
- 8 Shi W, Han S, Li Y H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32** (9): 835~841
- 8 Lie D C, Colamarino S A, Song H J, *et al.* Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 2005, **437** (7063): 1370~1375
- 9 Klebe M, Sommer L. Wnt signalling and the regulation of stem cell function. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, **16** (6): 681~687
- 10 Ille F, Sommer L. Wnt signaling: multiple functions in neural development. *Cell Mol Life Sci*, 2005, **62** (10): 1100~1108
- 11 Castelo-Branco G, Rawal N, Arenas E. GSK-3 β inhibition/ β -catenin stabilization in ventral midbrain precursors increases differentiation into dopamine neurons. *J Cell Sci*, 2004, **117** (Pt24): 5731~5737
- 12 Chung S, Sonntag K C, Andersson T, *et al.* Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhanced differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci*, 2002, **16** (10): 1829~1838
- 13 Castelo-Branco G, Wagner J, Rodriguez F J, *et al.* Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (22): 12747~12752
- 14 Yan J, Studer L, McKay R D, *et al.* Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J Neurochem*, 2001, **76** (1): 307~311

Wnt3a is Important in The Differentiation From Neural Stem Cell Into Dopaminergic Neuron *In vitro**

HAN Shu, SHI Wei, LI Yan-Hua, YAO Hai-Lei, XIE Xiao-Yan, CHEN Lin,

SHI Shuang-Shuang, BAI Ci-Xian, NAN Xue, YAN Fang, WANG Yun-Fang, PEI Xue-Tao**

(Laboratory of Stem Cell Biology, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Military Medical Academy of Science, Beijing 100850, China)

Abstract Wnt signaling is implicated in the control of cell growth and differentiation during neural stem cell (CNS) development. Wnt3a, one of wnt gene family members, has effect on regeneration neurospheres and differentiation into neurons. Wnt3a inhibits regeneration of neurospheres, and promotes its differentiation. *In vitro* neurosphere was cultured in a serum-free defined medium DMEM/F12 supplemented with bFGF and EGF. Dissociated cells were plated onto poly-d-lysine-coated coverslips and propagated in medium containing recombinant Wnt3a-adenovirus. Plenty of Nurr1 were detected by RT-PCR after 3 days. Wnt3a combined AA would improve NSC differentiation into dopaminergic (DA) neuron. The quantity of DA neuron is obviously more than the AA alone group's. Moreover, the expression of TH mRNA is 1.86 fold in Wnt3a combined AA group. Induced cells were immunostained for TH and DAT. The proportion of TH-positive was $(37.42 \pm 2.54) \%$ ($P < 0.05$) in the AA group, accordingly in Wnt3a combined AA group it was $(73.96 \pm 2.61) \%$ ($P < 0.05$). These results indicate that Wnt3a promoted the proliferation of precursor cells expressing the orphan nuclear receptor-related factor 1 (Nurr1). Large numbers of DA neurons are obtained by adding AA in the culture of NSC modified Wnt3a *in vitro*. Therefore, the successful conversion of neural stem cells *in vitro* resulting in the desired dopaminergic neuronal phenotype, could provide a solution to the problem of limited availability for clinical surgical

transplantation therapies, which are currently in progress for the treatment of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease. These findings indicate that Wnt3a is key regulators of proliferation and differentiation of DA precursors.

Key words Wnt3a, neural stem cell, differentiation, dopaminergic (DA) neuron

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2001CB509906, 2005CB522702) and Hi-Tech Research and Development Program of China (2005AA219010).

**Corresponding author . Tel: 86-10-66932203, Fax: 86-10-68164807, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: April 4, 2006 Accepted: June 2, 2006