

· 基础研究 ·

## Wnt信号通路分子在大鼠神经干细胞分化过程中的表达

张 建<sup>1</sup>, 顾 茵<sup>1</sup>, 罗学胜<sup>1</sup>, 陈 穗<sup>1</sup>, 杨 忠<sup>2\*</sup>, 李红丽<sup>2</sup>, 蔡文琴<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>解放军第113医院干部病房, 宁波 315040; <sup>2</sup>解放军第三军医大学组织学与胚胎学教研室, 重庆 400038)

**【摘要】目的** 观察Wnt信号通路主要分子[ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)和糖原合酶激酶-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )]在神经干细胞(NSCs)体系的表达及其在增殖和分化过程中的变化, 探讨其在神经干细胞分化中可能的调控作用。**方法** 采用原代培养方法, 自14~16d大鼠胚胎大脑皮质获得含大量细胞团的NSCs体系。应用含10%胎牛血清培养液诱导NSCs分化。Western印迹检测NSCs在加入胎牛血清12, 24, 48和72h后,  $\beta$ -catenin与GSK-3 $\beta$ 在分化过程中的动态变化。**结果** 免疫细胞化学染色显示NSCs细胞团及散在的单个细胞多呈巢蛋白(nestin)阳性, 显示NSCs分化过程中两者存在持续表达,  $\beta$ -catenin分子表达呈现逐渐减少趋势, 而GSK-3 $\beta$ 分子表达则呈现逐渐增加趋势。**结论** 提示Wnt信号通路与NSCs的增殖和分化过程密切相关, 呈现出由活跃到逐步抑制的过程, 为研究Wnt信号通路参与NSCs增殖分化调控的机制提供了载体。

**【关键词】** Wnt信号通路;  $\beta$ -连环蛋白; 糖原合酶激酶-3 $\beta$ ; 神经干细胞; 免疫细胞化学

**【中图分类号】** R322.81

**【文献标识码】** A

**【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2013.00235

## Expression profiles of Wnt signaling molecules in differentiation process of rat neural stem cells

ZHANG Jian<sup>1</sup>, GU Yin<sup>1</sup>, LUO Xue-Sheng<sup>1</sup>, CHEN Sui<sup>1</sup>, YANG Zhong<sup>2\*</sup>, LI Hong-Li<sup>2</sup>, CAI Wen-Qin<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Geriatrics, Chinese PLA Hospital No.113, Ningbo 315040, China; <sup>2</sup>Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**【Abstract】Objective** To determine the expression profiles of main molecules in Wnt signal pathway,  $\beta$ -catenin and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), in the proliferation and differentiation process of neural stem cells (NSCs), and to investigate the possible regulating role of these molecules in the process. **Methods** The NSCs were isolated and primarily cultured from rat fetus at an embryonic age of 14 to 16d according to reported methods. At 12 to 24h after cultured in the medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), the cells attached and grew gradually. Western blotting was used to measure the protein levels of  $\beta$ -catenin and GSK-3 $\beta$  in the cells treated in the FBS medium or control after 12, 24, 48 and 72 hours treatment. **Results** Immunofluorescence assay indicated that the cultured neurospheres or single cells were positive with nestin. Western blotting results revealed a continuous expression of  $\beta$ -catenin and GSK-3 $\beta$  in the differentiation of the cultured NSCs.  $\beta$ -catenin was in a gradual decreasing tendency, whereas GSK-3 $\beta$  showed an opposite change. **Conclusions** Wnt signaling pathway is involved in the proliferation and differentiation of NSCs, and is active first and then gradually inhibited. These confirm the NSCs biological property of the culturing cells and provide a model for studying the role of Wnt signaling molecules.

**【Key words】** Wnt signaling pathway;  $\beta$ -catenin; glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ; neural stem cells; immunocytochemistry

*This work was supported by the Starting Foundation for Talents Returning from Overseas of the Third Military Medical University.*

*Corresponding author: YANG Zhong, E-mail: yangzhong1999@163.com*

Wnt信号通路是细胞增殖分化的关键调控环节,  $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)是经典Wnt信号通路主要的胞浆内效应分子, 糖原合酶激酶-3 $\beta$ (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )主要作用是使游离的 $\beta$ -catenin磷酸化<sup>[1]</sup>。该通路广泛参与了包括细胞增

殖、细胞命运特化、细胞极性及细胞迁移等生物学过程, 在胚胎发育和肿瘤发生中有着重要作用<sup>[2]</sup>。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)作为神经系统组织细胞的前体, 有关其增殖分化过程分子机制的研究是近年神经科学领域备受关注的焦点<sup>[3]</sup>。目

前对Wnt信号通路在NSCs增殖、分化与细胞命运决定等过程中的作用,文献报道存在较大差异。在哺乳类神经系统,几年来Wnt信号通路对神经管和神经嵴细胞增殖、凋亡及命运决定的调控作用逐步受到关注<sup>[4]</sup>,如早期对神经管及神经嵴等的研究中提示Wnt信号分子能促进神经前体细胞的增殖与发生<sup>[5]</sup>。本研究旨在探讨Wnt信号通路分子在NSCs的增殖、分化和命运决定中究竟发挥何种作用,它们在不同发育阶段或不同的前体细胞类型中是否存在差异。此方面的研究不仅有助于阐明NSCs的增殖分化机制,还将有可能为维持NSCs原始增殖状态、阻止其分化提供新的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验用孕13~16d Wistar大鼠共18只,平均体质量( $350 \pm 20$ )g,由第三军医大学实验动物中心提供。

### 1.2 主要试剂及仪器

$\beta$ -catenin和GSK-3 $\beta$ 多克隆抗体(兔血清)为美国Santa Cruz公司产品,巢蛋白(nestin),胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP),神经丝(neurofilament)和微管相关蛋白(microtubule associated protein, MAP)一抗为美国Sigma公司生产的小鼠血清来源的单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG,购自武汉博士德公司,蛋白裂解液(RIPA, PMSF)购自上海申能博彩生物科技公司,DMEM/F12培养基购自于美国Gibco公司,优质胎牛血清购自于奥地利PAA公司,胰蛋白酶购自于美国Sigma公司。解剖显微镜为德国Leica仪器公司产品;高速台式离心机为Sartorius 1-15 Sigma,德国;液氮贮存罐为YDS-30-125,四川亚西机械厂;紫外分光光度仪为U-1800 HITACHI,日本;5%CO<sub>2</sub> 37℃培养孵箱为Series II 3111型,美国;超净工作台为Air Tech HS-1300-V,中国苏州;凝胶成像分析系统为SK 300,上海生物技术公司;数码摄像系统为OLYMPUS DP70,倒置相差显微镜为OLYMPUS IX51,倒置相差荧光显微镜为OLYMPUS IX70,均日本。

### 1.3 大鼠胚胎大脑皮层NSCs的分离培养

(1)取孕13~16d Wistar大鼠1只,1%的戊巴比妥钠30mg/kg腹腔注射麻醉后,碘酊和乙醇消毒腹部皮肤;(2)在准备室内用无菌手术剪依次剪开下腹部皮肤、肌肉和腹膜,暴露两侧子宫,顺子宫分离至子宫角处剪下,放入培养皿中,D-Hanks液中漂洗;(3)依次去掉子宫壁及胎膜,取胎鼠于75%的乙醇中浸泡进行皮肤消毒;(4)用眼科剪剪开头皮和颅骨,剥离

暴露出胎鼠大脑,取皮质组织;(5)在解剖显微镜下,去除脑膜,剪成约1.5mm×2.0mm×1.0mm大小的组织块,置于D-Hanks液中直接吹打成单细胞悬液,种植入50ml培养瓶中,每瓶细胞数约为 $1 \times 10^6$ 个。培养条件:DMEM/F12+20ml/L 50×B27+20ml/L bFGF, 37℃, 5%CO<sub>2</sub>。待原代神经细胞球(neurosphere)形成较多时(约4~5d)进行传代。本实验中主要使用第3代和第4代细胞,巢蛋白免疫荧光染色鉴定NSCs性状。同时用含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM/F12培养液对NSCs进行诱导分化,后分别以神经元和胶质细胞的特异标志物神经丝及GFAP抗体鉴定其多向分化潜能。

### 1.4 NSCs的传代培养

将培养的细胞集落收集入离心管中, 800~1000r/min离心2~5min, 弃上清液, 加入少量条件培养液, 用吸管反复吹打细胞集落, 尽量使其分散, 计数细胞后( $2 \times 10^6$ 个细胞/瓶)置入50ml培养瓶中, 加NSCs条件培养液6~7ml, 置37℃, 5%CO<sub>2</sub>条件下培养, 依据细胞生长快慢进行传代。在传代过程中, 尽量吹散, 但也不能过猛, 以免影响其克隆的生长。

### 1.5 NSCs免疫细胞化学鉴定

(1)将培养的干细胞团用4%多聚甲醛固定30min后涂在载玻片上, 在37℃孵箱中烘干;(2)0.01mol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)漂洗5min×3次, 0.3%TritonX-100, 室温20min, 兔抗巢蛋白IgG, 37℃孵育, 1h后转入4℃过夜;(3)0.01mol/L PBS漂洗5min×3次, FITC-抗兔IgG, 37℃, 2h;(4)0.01mol/L PBS漂洗5min×3次, 漂洗后甘油封片, 在荧光显微镜下观察。阴性对照:用0.01mol/L PBS或与二抗同种动物血清代替一抗进行, 其他步骤不变。

### 1.6 NSCs的分化

(1)设立NSCs对照组, 同时在NSCs培养瓶中加入含10%FBS清诱导其分化, 观察干细胞的变化;(2)分别于分化12, 24, 48和72h终止培养, 通过相差显微镜观察NSCs在分化过程中的形态变化, 同时成像;(3)收集NSCs以及诱导分化后12, 24, 48和72h一共5个时相点的细胞, 先将培养的细胞收集入离心管中, 800~1000r/min离心2~5min, 弃上清液;(4)再将收集了细胞的EP管置于液氮中冷冻5~10min;最后将细胞收集于1.5ml离心管(即EP管), 置-80℃冰箱中冷冻保存, 用于Western blotting实验中提取细胞蛋白。

### 1.7 Western blotting

(1)快速取所需组织, 液氮冷冻、研钵粉碎, 加入苯甲磺酰氟(PMSF, 每克组织30 $\mu$ l), 冰上孵育

30min; (2) 移入离心管, 4℃离心 (150 × *g*) 15min, 取上清; (3) 将0.5g/L标准蛋白溶液稀释为6个浓度, 以蛋白浓度为横坐标, 以吸光度值为纵坐标作曲线; (4) 考马斯亮蓝染色测定蛋白浓度, 取待测样品进行检测, 根据其吸光度值计算蛋白浓度; (5) 用图像分析软件对扫描结果进行分析, 得到平均吸光度值。(6) 每个样品取10μl蛋白质加入10μl上样缓冲液, 100℃一起煮沸5min, 进行定性SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳; (7) 然后移至PVDF膜上, 用含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液冲洗, 4℃孵育过夜; (8) PVDF膜在室温下与β-catenin抗体 (1:2000) 孵育1h, 漂洗后入生物素化二抗 (1:2000) 室温下孵育1h, 每次孵育之间均用TBST缓冲液冲洗3次, 每次10min; (9) 二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色, 扫描记录。

### 1.8 统计学处理

数据分析采用SPSS10.0统计软件包。计量资料的比较采用*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 NSCs的培养和鉴定

原代培养细胞在无血清的NSCs培养液中2~3d内部分死亡, 其余大部分逐步分裂形成多细胞的细胞团, 继续培养后细胞生长旺盛, 细胞团数目迅速增多增大, 成悬浮球团状生长, 无突起。克隆传代培养后也形成类似于原代的细胞团 (图1)。免疫细胞化学染色显示细胞团及散在的单个细胞多呈巢蛋白阳性 (图2)。血清诱导分化后NSCs团在12h内即贴壁并开始发出突起, 随后有细胞向外迁移, 2~3d内细胞突起即非常明显, 彼此连接形成网络, 越往后细胞分散越为明显 (图3)。分化的细胞形态多样, 通过细胞特异性抗原的免疫荧光鉴定, 部分细胞呈现GFAP阳性, 为星形胶质细胞, 部分呈现MAP2阳性, 为神经元。提示所得细胞为具有良好增殖能力和多向分化潜能的NSCs体系 (图4)。

分化后细胞大致有3种类型: (1) 具有数个粗大突起的星形胶质细胞样细胞, 胞体较宽大, 折光性弱; (2) 具有1~2个突起, 胞体呈圆形或椭圆形的神经元样细胞, 细胞较小, 突起短而少, 细胞分散排列, 折光性强; (3) 具有多个细长突起的少突胶质细胞样细胞, 细胞大小介于前二者之间。

### 2.2 NSCs分化过程中Wnt信号分子表达的动态变化

Western blotting结果显示, 在NSCs血清诱导分化12, 24, 48和72h各组中均存在着β-catenin和GSK-3β的持续表达, 随着NSCs分化时间的延长, β-catenin平均吸光度值呈现梯度减少, 表示β-catenin

量呈现梯度下降 ( $P < 0.05$ ; 图5)。从NSCs对照组开始, 随着NSCs分化时间的延长, GSK-3β平均吸光度值呈现梯度增加, 表示GSK-3β量呈现梯度增加 ( $P < 0.05$ ; 图6)。经统计学处理显示各组之间存在明显差异。实验结果表明, NSCs在加入10%FBS以后, 伴随NSCs的分化时间逐渐延长, β-catenin在NSCs分化细胞中的表达呈现梯度减少, 而GSK-3β在NSCs分化细胞中的表达呈现梯度增加。图7为β-catenin与GSK-3β两类分子动态变化趋势图。

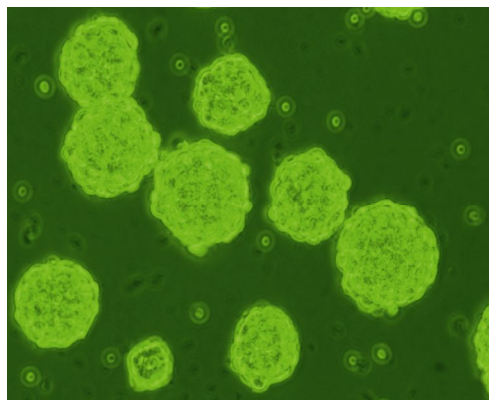


图1 培养3d悬浮生长的NSCs

Figure 1 Neural stem cells cultured for 3 days (×200)

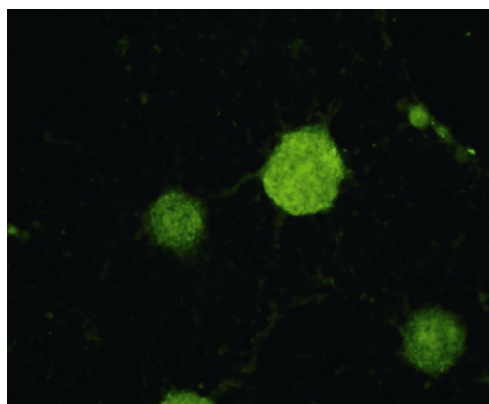


图2 NSCs的鉴定

Figure 2 Identification of neural stem cells by immunofluorescence technique using anti-nestin (FITC ×200)

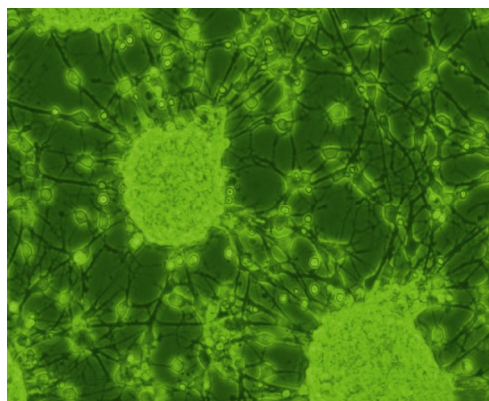


图3 FBS诱导分化2d的NSCs

Figure 3 Neural stem cells differentiated for 2 days using 10% fetal bovine serum (×200)

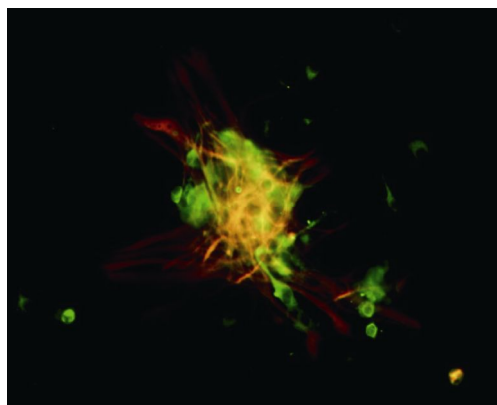


图4 诱导分化7d的NSCs的双标鉴定(Anti-MAP2 FITC/  
Anti-GFAP Cy3)

Figure 4 Double staining identification of neural stem cells after differentiation for 7 days using anti-MAP2 and anti-GFAP Cy3 (FITC  $\times$  200)

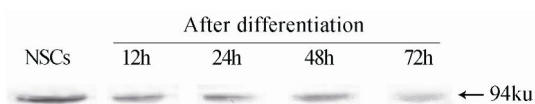


图5 加入10%胎牛血清后NSCs分化过程 $\beta$ -catenin的Western blotting分析

Figure 5 Western blotting analysis of dynamic changes of  $\beta$ -catenin in the differentiation of neural stem cells cultured in media containing 10% fetal bovine serum. Along with the extension of the time of differentiation, the level of  $\beta$ -catenin decreases gradually.

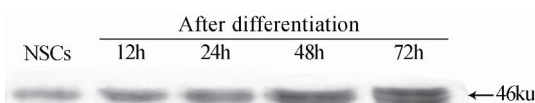


图6 加入10%胎牛血清后NSCs分化过程GSK-3 $\beta$ 的Western blotting分析

Figure 6 Western blotting analysis of dynamic changes of GSK-3 $\beta$  in the differentiation of NSCs cultured in media containing 10% FBS. Along with the extension of the time of differentiation, the level of GSK-3 $\beta$  increases gradually.

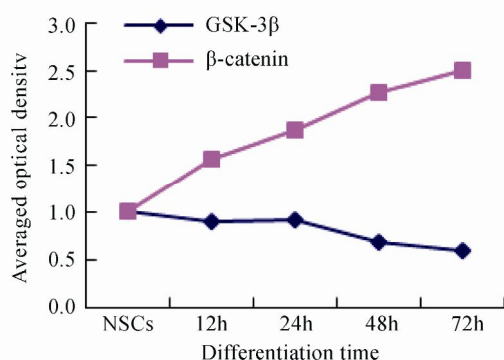


图7 NSCs诱导分化过程中不同时间相点GSK-3 $\beta$ 与 $\beta$ -catenin的表达  
Figure 7 Dynamic expression of  $\beta$ -catenin and GSK-3 $\beta$  during differentiation of cultured NSCs

### 3 讨论

近年来,对NSCs的研究已经成为神经科学领域的热点,尤其近年研究发现,NSCs不仅存在于胚胎神经组织,同样存在于成体的中枢神经系统<sup>[6]</sup>。人们希望通过阐明NSCs增殖分化的调控机制,使其定

向神经细胞分化,将有可能实现NSCs应用于中枢神经系统移植或替代治疗,以及发现调控神经发生等的手段<sup>[7]</sup>,也有可能为部分中枢神经系统疾病和中枢神经系统损伤等疾病的治疗带来希望。目前在NSCs分化调控机制的研究中已获得一些重要线索,如发现Notch蛋白的主要作用为抑制干细胞的神元方向分化,而促进向胶质细胞方向分化,bHLH基因家族对NSCs的作用与Notch蛋白正好相反<sup>[8]</sup>。我们在实验中从胎大鼠大脑皮质获得了NSCs,另外使用神经上皮细胞的特异性抗原巢蛋白的抗体来证明我们所分离的细胞为胚胎早期细胞。在利用10%FBS诱导以后,再使用星形胶质细胞的特异性抗体GFAP和神经元细胞的特异性抗体即MAP2,来证明所获得的细胞群可以分化为神经元和星形胶质细胞等多种神经系统的细胞。因此,本实验中分离的细胞群具有良好的增殖能力和多项分化的潜能,具备了NSCs的基本属性,是中枢神经系统的干细胞,为NSCs的定向分化提供了基础的实验资料。

目前,尽管关于Wnt蛋白在神经系统早期发育包括神经前体细胞增殖分化中的调控作用已有一系列的文献报道,但有关Wnt信号通路下游分子 $\beta$ -catenin和GSK-3 $\beta$ 等在NSCs增殖、分化与细胞命运决定等过程中的作用,文献报道存在较大差异。如有基于Wnt信号分子基因敲除的实验观察中显示,Wnt通路的激活即 $\beta$ -catenin信号分子的表达增强能促进NSCs的增殖并阻抑其分化<sup>[9]</sup>,而有在神经嵴细胞及皮质前体细胞的研究则认为Wnt信号分子主要是NSCs的一个分化诱导因子<sup>[10]</sup>。而在Holowacz等<sup>[11]</sup>的研究中发现,封闭了 $\beta$ -catenin基因的NSCs也保持着多向分化潜能,包括有能力可以克隆分化为神经元和神经胶质细胞。这一研究结果却表明, $\beta$ -catenin对于NSCs的增殖和分化不是必须的,但是对于神经前体细胞的黏附和存活是必须的。因此,在NSCs增殖和分化过程中,Wnt信号通路分子的表达和动态变化的研究非常有意义,在各种外源性因素和细胞因子的影响下,Wnt信号通路在NSCs的增殖和分化过程中,是部分参与、不参与或者是起决定性作用,对此值得进一步研究和探讨。

为了更好地阐明Wnt信号通路中 $\beta$ -catenin和GSK-3 $\beta$ 等调控分子在NSCs增殖分化过程中的作用,本实验通过建立离体的NSCs培养体系,首先应用含10%FBS培养液诱导NSCs分化,为探讨NSCs增殖和分化的机制提供了稳定的载体,其次观察了NSCs血清诱导分化过程中主要Wnt信号分子的动态表达变化。结果发现,随着NSCs分化的进行,

$\beta$ -catenin 表达量逐渐减少, 而 GSK-3 $\beta$  蛋白表达量逐渐增加; 显示了一个 Wnt 信号通路由活化状态逐步走向抑制的过程。也提示  $\beta$ -catenin, GSK-3 $\beta$  与 NSCs 增殖和分化存在着密切的关系, 它们可能是胚胎发育过程中 NSCs 增殖与分化的关键调控因子。有的研究显示脑神经营养因子对于离体的 NSCs 分化为神经元和少突胶质细胞的作用, 最可能就是通过激活 Wnt 信号通路<sup>[12]</sup>。巨细胞病毒的感染造成大鼠胚胎神经系统的畸形, 被证实显著地抑制 NSCs 的增殖与分化, 也是通过抑制 Wnt 信号通路的关键分子的表达来影响 NSCs 的分化<sup>[13]</sup>。这与我们的研究结果是相一致的, NSCs 的分化可能受到众多因素的影响, 但是各种神经营养因子、生长因子、细胞黏附因子和外源性因素在 NSCs 分化过程中通过激活 Wnt 信号通路的关键点究竟在哪里还有待于进一步的观察, 它的下游调控机制依然没有完全阐述。另外有必要在进一步干扰和封闭 Wnt 信号通路后, 进行流式细胞仪监测和计数以继续观察 NSCs 分化细胞数比例改变的情况, 以进一步论证相关的研究结果。

Lie 等<sup>[14]</sup>发现, 成年海马 NSCs 或者神经前体细胞均表达 Wnt 蛋白的受体 (Fz) 和相关信号通路的调控分子, 结合既往一系列研究, 显示 NSCs 具有接受 Wnt 信号分子调控的物质基础。血清诱导 NSCs 分化代表其逐步失去强大增殖能力与多向分化潜能, 基因水平可理解为部分基因的特异性关闭, 而另一些基因出现表达,  $\beta$ -catenin 和 GSK-3 $\beta$  在此分化过程的反相变化即符合这一原则。但血清诱导如何导致 GSK-3 $\beta$  表达的上调, 从而导致 Wnt 信号通路的主要胞浆内效应分子的抑制, 是否也经由 Fz 受体步骤, 还有待研究。总之, 结合其他的各项研究结果, 虽然有的研究认为 NSCs 的增殖和分化可能是通过 Notch 通路、STAT3 通路等信号通路在发挥调控作用, Wnt 信号通路仅对于 NSCs 的黏附作用是必须的。但是, 我们在研究中认为, Wnt 信号通路分子一直调控 NSCs 的功能和发育, 与 NSCs 的增殖和分化过程是密切相关的。如果能够激活 Wnt 信号通路的活动, 是否可以通过调控下游 Wnt 信号通路分子的表达来抑制神经发生的过程, 从而导致 NSCs 增殖的加强, 还需要以后的研究加以验证。

#### 【参考文献】

[1] Moon RT, Bowerman B, Boutros M, *et al.* The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin[J]. Science, 2002, 296(3): 1644-1646.  
[2] Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of Wnt signaling

pathways in higher vertebrates[J]. Curr Opin Genet Dev, 2001, 11(5): 547-553.  
[3] Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, *et al.* The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells[J]. Development, 2004, 131(12): 2791-2801.  
[4] Backman M, Machon O, Myglund L, *et al.* Effects of canonical Wnt signaling on dorso-ventral specification of the mouse telencephalon[J]. Dev Biol, 2005, 279(1): 155-168.  
[5] Kim S, Xu X, Hecht A, *et al.* Mediator is a transducer of Wnt/beta-catenin signaling[J]. J Biol Chem, 2006, 296(1): 1562-1570.  
[6] Sommer L, Ma Q, Anderson DJ. Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS[J]. Mol Cell Neurosci, 1996, 8(4): 221-241.  
[7] Ma Q, Sommer L, Cserjesi P, *et al.* Mash 1 and neurogenin 1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands[J]. J Neurosci, 1997, 17(10): 3644-3652.  
[8] Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, *et al.* Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate[J]. Neuron, 2001, 29(1): 45-55.  
[9] Kleber M, Lee HY, Wurdak H, *et al.* Neural crest stem cell maintenance by combinatorial Wnt and BMP signaling[J]. J Cell Biol, 2005, 169(2): 309-320.  
[10] Lee HY, 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.  
[11] Holowacz T, Huelsken J, Dufort D, *et al.* Neural stem cells are increased after loss of  $\beta$ -catenin, but neural progenitors undergo cell death[J]. Eur J Neurosci, 2011, 33(8): 1366-1375.  
[12] Chen BY, Wang X, Wang ZY, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor stimulates proliferation and differentiation of neural stem cells, possibly by triggering the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. J Neurosci Res, 2013, 91(1): 30-41.  
[13] Sun X, Guan Y, Li F, *et al.* Effects of rat cytomegalovirus on the nervous system of the early rat embryo[J]. Virol Sin, 2012, 27(4): 234-240.  
[14] Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, *et al.* Wnt Signalling regulates adult hippocampal neurogenesis[J]. Nature, 2005, 437 (7063): 1370-1375.

(编辑: 金美娜, 王雪萍)