

当归多糖对衰老模型小鼠造血干细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

张岩岩, 李 静, 贾道勇, 张梦思, 夏婕妤, 景鹏伟, 宋小英, 王 璐, 王亚平, 顾恒伟*
重庆医科大学 干细胞与组织工程研究室, 组织学与胚胎学教研室, 重庆 400016

摘要: 目的 探讨当归多糖(ASP)对衰老小鼠造血干细胞(HSCs) Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。方法 6~8周雄性 C57BL/6J 小鼠 30 只, 随机分为对照组、模型组和 ASP 组, 每组 10 只。小鼠 sc D-半乳糖(D-Gal, 120 mg/kg), 每天 1 次, 连续 42 d, 复制衰老小鼠模型; ASP (200 mg/kg) 组 ip 给药, 连续 35 d。给药结束后第 2 天, 免疫磁珠分离 HSCs, 衰老半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色观察衰老 HSCs 百分率; 造血祖细胞混合集落(CFU-Mix)培养检测 HSCs 形成集落能力; 流式细胞术和激光共聚焦检测 HSCs 中活性氧(ROS)水平; Western blotting 检测 HSCs 胞质 β -catenin、胞核 β -catenin、GSK-3 β 、Phospho-GSK-3 β 和 TCF-4 蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 模型组 HSCs 的 SA- β -Gal 染色阳性百分率和 ROS 水平显著增加; 胞质 β -catenin、胞核 β -catenin、Phospho-GSK-3 β 和 TCF-4 蛋白表达上调; CFU-Mix 形成能力降低; GSK-3 β 蛋白表达下调。与模型组比较, ASP 能显著降低衰老 HSCs 的 SA- β -Gal 染色阳性百分率和 ROS 水平; 下调胞质 β -catenin、胞核 β -catenin、Phospho-GSK-3 β 和 TCF-4 蛋白表达; 提高 CFU-Mix 形成能力; 上调 GSK-3 β 蛋白表达。**结论** ASP 能延缓或拮抗 D-Gal 致小鼠 HSCs 衰老, 其机制可能与 ASP 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路过度激活有关。

关键词: 当归多糖; 造血干细胞; 衰老; Wnt/ β -catenin 信号通路; D-半乳糖

中图分类号: R329.2 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2015)14 - 2111 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.14.016

Effect of *Angelica sinensis* polysaccharide on Wnt/ β -catenin signaling pathway in hematopoietic stem cells of aging model mice

ZHANG Yan-yan, LI Jing, JIA Dao-yong, ZHANG Meng-si, XI Jie-yu, JING Peng-wei, SONG Xiao-ying, WANG Lu, WANG Ya-ping, GU Heng-wei

Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To explore the effects of *Angelica sinensis* polysaccharide (ASP) on Wnt/ β -catenin signaling pathway in hematopoietic stem cell (HSC) of aging model mice **Methods** Male Thirty C57BL/6J mice aging 6—8 weeks were randomly divided into normal group, aging model group, and ASP aging model group (ten in each group). After 2 d of finishing the treatment, magnetic activated cell sorting (MACS) were applied to the HSC from mouse bone marrow respectively. The ratio of the SA- β -Gal staining positive HSCs were counted; The capability of colony formation was examined by CFU-Mix cultivation; The distribution of ROS levels was analyzed by flow cytometry (FCM) and laser scanning confocal microscope assess; The content of advanced glycosylation end products (AGEs) was detected by Elisa; The proteins of β -catenin in cytoplasm, GSK-3 β in nucleus, Phospho-GSK-3 β , and TCF-4 were detected by Western blotting. **Results** Compared with the normal group, the percentage of SA- β -Gal, the product of ROS positive cells and AGEs in the aging model group were significantly increased; The expression of β -catenin in cytoplasm, β -catenin in nucleus, Phospho-GSK-3 β , and TCF-4 were evidently up-regulated; The colony formation of CFU-Mix was markedly decreased; The expression of GSK-3 β was evidently down-regulated. Compared with the aging model group, in ASP aging model group, the percentage of SA- β -Gal, the product of ROS positive cells, and AGEs were significantly decreased; The expression of β -catenin in cytoplasm and nucleus, Phospho-GSK-3 β , and TCF-4 were evidently down-regulated; The colony formation of CFU-Mix was markedly increased; The expression of GSK-3 β was evidently

收稿日期: 2014-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173398)

作者简介: 张岩岩(1988—), 女, 硕士在读, 研究方向为造血干细胞衰老。Tel: 13657617631 E-mail: yan2007220370@163.com

*通信作者 顾恒伟, 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为造血干细胞衰老。Tel: (023)68485968 E-mail: 715341442@qq.com

up-regulated. **Conclusion** ASP can protect HSC from aging by antagonizing *D*-galactose, and the mechanism may be ASP inhibiting the excessive activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: *Angelica sinensis* polysaccharide; hematopoietic stem cell; aging; Wnt/ β -catenin signaling pathway; *D*-galactose

造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 是所有血细胞的始祖细胞, 具有自我更新和多向分化的能力。研究证明^[1], HSCs 衰老可导致机体造血功能和免疫功能的衰退、肿瘤发生率增加、组织器官损伤难以修复, 可见如何延缓 HSCs 衰老已经成为老年医学的重点关注课题。当归多糖 (*Angelica sinensis* polysaccharide, ASP) 是中医临床“补血、活血”要药当归的重要有效成分^[2-3], 对 HSCs 的增殖分化有重要调控作用^[4]。本课题组研究表明, ASP 可通过抑制氧化应激损伤^[5]、调节细胞周期调控基因及蛋白表达^[6]和抑制端粒 DNA 损伤及提高端粒酶活性有效延缓 HSCs 衰老, 但 ASP 对 HSCs 衰老的信号途径调控还不清楚。实验证明, Wnt/ β -catenin 信号通路在 HSCs 衰老的调控中起着极为重要作用^[7-8], ASP 能否影响该通路延缓 HSCs 衰老尚未阐明。本研究采用 *D*-半乳糖 (*D*-Gal) 复制衰老小鼠模型, 观察 ASP 对衰老小鼠 HSCs 的 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响, 探讨 ASP 调控 HSCs 衰老的信号调控机制, 为寻找延缓 HSCs 衰老的天然药物提供理论和实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

雄性 C57BL/6J 小鼠, 体质量 19~21 g, 6~8 周龄, 购买自重庆市医学实验动物中心, 合格证号为 SCXK 渝 2007-0001。

1.2 药品与试剂

ASP (批号为 CY130421, 质量分数 $\geq 95\%$, 甘肃岷县当归提取) 购自陕西慈缘生物技术有限公司; 衰老相关 β -半乳糖苷酶 (SA- β -Gal) 染色试剂盒、活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); 甲基纤维素半固体培养基 (Stem Cell Technologies 公司); 鼠淋巴细胞分离液 (Axis-Shield 公司); β -链蛋白 (β -catenin)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、磷酸化糖原合成酶激酶-3 β (Phospho-GSK-3 β)、T 细胞因子 4 (TCF-4) 兔抗鼠单克隆抗体 (Cell Signaling 公司); 山羊抗兔抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司); ECL 发光试剂盒 (Pierce 公司)。

1.3 仪器

流式细胞仪 (BD 公司); 倒置相差荧光显微

镜 (NIKON 公司); 荧光定量 PCR 仪 (BioRad 公司); 凝胶成像系统 (BioRad 公司); 酶标仪 (TECAN 公司); MiniMACS 磁珠分选系统 (Miltenyi Biotech 公司)。

2 方法

2.1 小鼠衰老模型制备与分组处理

小鼠随机分为对照组、模型组和 ASP 组, 每组 10 只。按文献方法制备小鼠衰老模型^[9]: 模型组和 ASP 组小鼠 sc *D*-Gal (120 mg/kg), 每天 1 次, 连续 42 d; 对照组小鼠 sc 生理盐水 0.2 mL/只, 每天 1 次, 连续 42 d。ASP 组在衰老模型复制同时, 第 8 天起 ip 给予 ASP (200 mg/kg^[6]), 每天 1 次, 连续 35 d; 对照组和模型组小鼠 ip 等体积生理盐水。模型复制结束第 2 天进行相关检测。

2.2 HSCs 分离与纯化

按本课题组前期建立的方法分选 HSCs^[10], 即脱颈处死各组小鼠, 无菌条件下取出股骨及胫骨, IMDM 培养液冲出骨髓细胞, 通过 4 号针头制备单细胞悬液。淋巴细胞分离液与细胞悬液按 5:2 的比例 2 000 $\times g$ 离心 20 min, 分离骨髓单个核细胞。采用 HSCs 最常见标志物干细胞抗原 (Sca-1) 运用免疫磁珠法分选 HSCs。

2.3 SA- β -Gal 染色检测骨髓衰老 HSCs

收集各组 HSCs, 按照 SA- β -Gal 染色试剂盒操作方法操作染色检测骨髓衰老 HSCs, 即在 37 $^{\circ}C$ 、无 CO₂ 条件下孵育染色细胞 12 h, 制备离心甩片 (每片 1×10^4 个细胞), 每张甩片随机计数 400 个细胞, 计算阳性细胞的百分率。

2.4 混合集落形成单位 (CFU-Mix) 检测

收集各组 HSCs 1×10^4 个, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 加入混合集落培养基 0.5 mL 充分混匀, 接种于 24 孔板, 每组设 3 个复孔。在 5% CO₂、37 $^{\circ}C$ 培养箱中孵育 7~10 d, 根据 1×10^4 个 HSCs 形成的 CFU-Mix 数量检测各组 HSCs 多向分化能力。

2.5 免疫荧光检测细胞内 ROS 水平

收集各组 HSCs, PBS 洗涤后离心重悬细胞, 装载 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 探针, 37 $^{\circ}C$ 孵育 20 min, 无血清培养液洗涤 3 次, 流式细胞仪 525 nm 处检测荧光, ROS 水平以 2',7'-二氯荧

光素 (DCF) 的平均荧光强度表示, 并在激光共聚焦扫描显微镜下观察和照相记录。

2.6 Western blotting 检测胞质 β -catenin 及胞核 β -catenin、GSK-3 β 、Phospho-GSK-3 β 、TCF-4 蛋白表达

收集各组 HSCs, PBS 洗涤, 蛋白裂解液裂解提取蛋白, BCA 法测定细胞总蛋白浓度, 均衡每组蛋白浓度后用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移蛋白质至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 兔抗鼠胞质 β -catenin, 胞核 β -catenin、GSK-3 β 、Phospho-GSK-3 β 和 TCF-4 单克隆抗体 (1:2 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜, HRP 标记的二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, 洗膜, ECL 显示结果。采用 Quantity-One 软件进行半定量分析, 用目的条带的光密度值与 β -actin 条带的光密度值的比值来反映目的蛋白表达的相对量, β -actin 为内参照。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对衰老模型小鼠 SA- β -Gal 染色阳性 HSCs 的影响

SA- β -Gal 染色结果显示, 阳性细胞胞质呈蓝色,

阴性细胞不着色。模型组与对照组比较, SA- β -Gal 染色阳性的 HSCs 百分率显著增加 ($P < 0.01$); ASP 组与模型组比较, SA- β -Gal 染色阳性的 HSCs 百分率显著降低 ($P < 0.05$), 见表 1 和图 1。

3.2 对衰老小鼠 HSCs 形成 CFU-Mix 的影响

模型组与对照组比较 HSCs 形成的 CFU-Mix 数量显著降低, 且每个集落细胞数量少 ($P < 0.01$); ASP 组与模型组比较 HSCs 形成 CFU-Mix 数量增加 ($P < 0.05$), 见表 1 和图 2。

3.3 对衰老小鼠 HSCs 产生的 ROS 水平的影响

模型组与对照组比较 HSCs 内 ROS 水平显著增加 ($P < 0.01$), 激光共聚焦扫描显微镜下显示模型组绿色荧光强度明显增强; ASP 组与模型组比较衰老小鼠 HSCs 内 ROS 水平显著降低 ($P < 0.01$), 绿色荧光强度明显减弱。见表 1 和图 3。

3.4 对衰老小鼠 HSCs 表达 β -catenin、GSK-3 β 、Phospho-GSK-3 β 和 TCF-4 蛋白的影响

模型组较对照组, 胞质 β -catenin 表达量增加 ($P < 0.05$), 而胞核 β -catenin 蛋白表达量增加明显 ($P < 0.01$); 模型组 Phospho-GSK-3 β 和 TCF-4 蛋白表达量较对照组明显增加 ($P < 0.05$); 模型组 GSK-3 β 蛋白表达量较对照组明显减少 ($P < 0.05$)。ASP 组与模型组比较 β -catenin、Phospho-GSK-3 β 和 TCF-4 蛋白表达量均减少 ($P < 0.05$); 而 GSK-3 β 蛋白表达量增加 ($P < 0.05$)。见图 4。

表 1 ASP 对衰老小鼠 SA- β -Gal 染色阳性 HSCs 百分率、形成 CFU-Mix 数量及 HSCs 产生 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Effect of ASP on ratio of SA- β -Gal staining positive HSCs, formation of CFU-Mix in HSCs, and level of ROS in HSCs of aging model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mg·kg ⁻¹)	SA- β -Gal 染色阳性 HSCs 百分率/%	形成 CFU-Mix 数量(1×10^4 HSCs)	ROS (DCF 平均荧光强度)
对照	—	7.73 \pm 2.52	14.85 \pm 2.01	75.63 \pm 4.69
模型	—	46.29 \pm 3.59**	7.03 \pm 3.15**	148.27 \pm 9.41**
ASP	200	33.97 \pm 5.73 [#]	9.14 \pm 2.24 [#]	107.63 \pm 6.94 ^{##}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$
^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

研究表明, 衰老机体的造血系统基本成分虽然得以维持, 但 HSCs 的功能和数量却逐渐降低, 其衰老与机体的衰老有着密切的联系^[11-15]。HSCs 衰老将导致机体造血功能和免疫功能的衰退、肿瘤发生率增加, 并导致机体重要脏器结构与功能的衰退。最近本课题组研究证明^[5-6], ASP 是当归中重要的抗衰老有效成分, 能延缓 HSCs 衰老, 但其机制并不十分

清楚。本实验采用 D-Gal 复制小鼠衰老模型, 研究 ASP 对衰老 HSCs Wnt/ β -catenin 信号通路的调控, 旨在探讨 ASP 延缓 HSCs 衰老的可能机制, 为寻找延缓 HSCs 衰老的天然药物提供理论和实验依据。

建立衰老模型是研究衰老生物学机制的重要前提, D-Gal 致衰老模型是目前公认的氧化损伤衰老动物模型。SA- β -Gal 染色是鉴定细胞衰老的重要生物学标志, 且该染色法仅会染色衰老细胞, 而衰老前

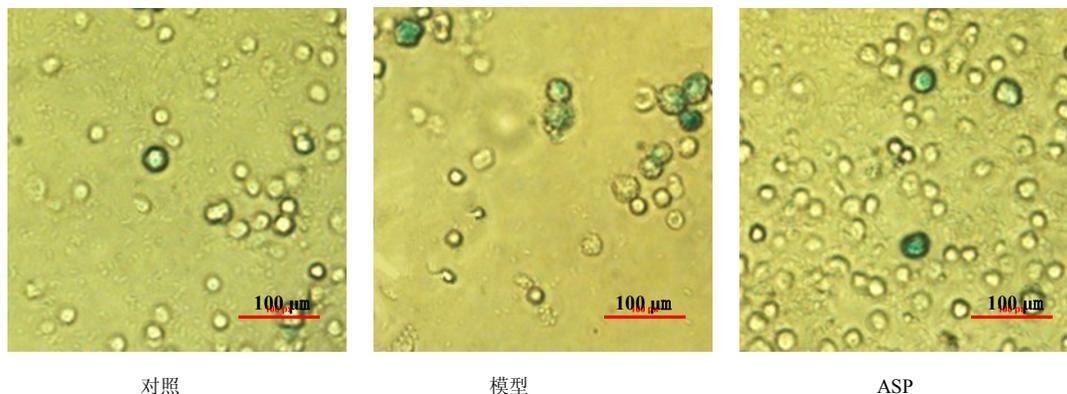


图 1 ASP 对衰老小鼠 SA-β-Gal 染色阳性 HSCs 百分率的影响

Fig. 1 Effect of ASP on SA-β-Gal staining positive HSCs of aging mice

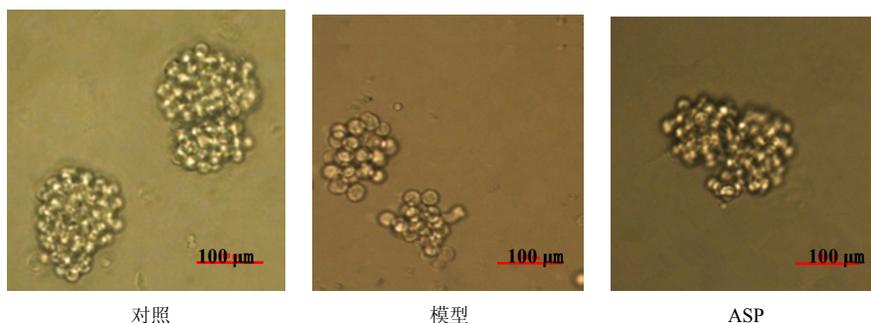


图 2 ASP 对衰老小鼠 HSCs 形成 CFU-Mix 能力的影响

Fig. 2 Effect of ASP on formation of CFU-Mix in HSCs of aging mice

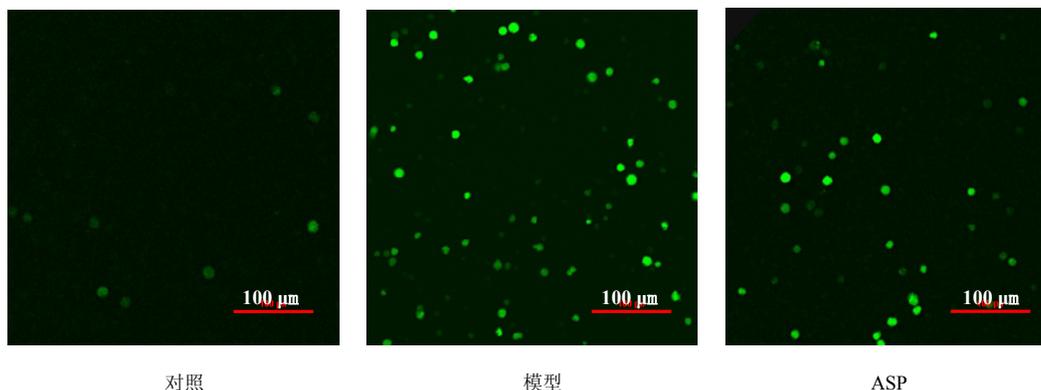


图 3 激光共聚焦显微镜观察 HSCs 产生 ROS 水平

Fig. 3 Production of ROS in HSCs by laser scanning confocal microscope assess

细胞、静止期细胞以及肿瘤细胞都不会着色，其实验结果较可靠，不易被其他杂系细胞所干扰^[16]。ROS 是细胞代谢过程中产生的活性氧簇的总称，衰老细胞由于其线粒体功能的减弱，线粒体清除氧自由基能力下降，可造成细胞内 ROS 的聚集，因此 ROS 水平升高是衰老细胞的重要生化表现^[17]。本研究采用 D-Gal 连续 sc 小鼠 42 d 成功建立衰老动物模型^[9]。实验结果表明，与对照组比较，模型组 HSCs 的 SA-β-Gal 染色阳性百分率、ROS 增加，CFU-Mix

形成能力下降，这符合 HSCs 衰老的相关生物学特征，表现为细胞的自我更新和多向分化能力衰退。衰老模型小鼠给予 ASP 后，与模型组比较，ASP 能显著降低衰老小鼠 HSCs 的 SA-β-Gal 染色阳性百分率、ROS 水平，提高 CFU-Mix 形成能力。以上结果说明 ASP 可以拮抗 D-Gal 对小鼠 HSCs 致衰老作用，其机制可能与抗氧化损伤有关，提示 ASP 可以用临床防治骨髓造血功能衰竭。

Wnt/β-catenin 信号通路在干细胞衰老过程中发

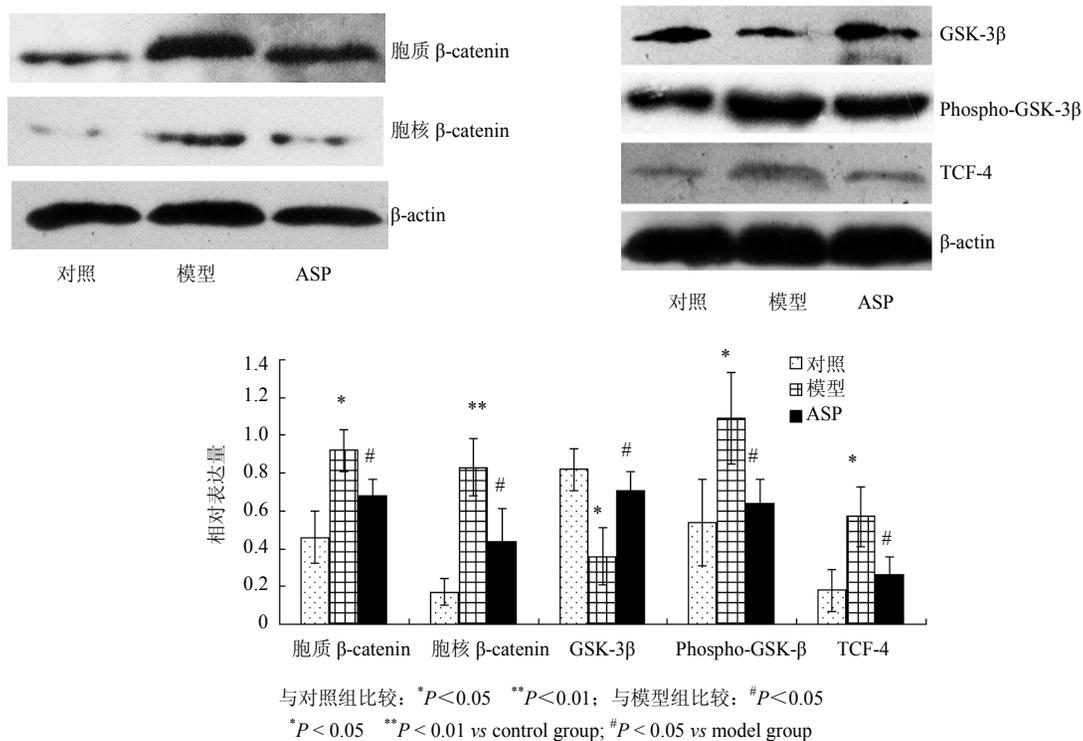


图4 ASP对衰老小鼠HSCs β-catenin、GSK-3β、Phospho-GSK-3β和TCF-4蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of ASP on protein expression of β-catenin, GSK-3β, Phospho-GSK-3β, and TCF-4 in HSCs of aging mice

挥重要的调控作用^[18-19]。Wnt/β-catenin 信号通路是一条非常复杂的信号通路，众多信号分子参与其中，这些信号分子又可以和其他信号通路存在联系，所以仅仅在转录复合物水平检测并不能准确反映该通路激活水平，本实验通过检测其关键信号分子的表达，探讨 ASP 对 Wnt/β-catenin 信号通路的影响。β-catenin 是 Wnt/β-catenin 信号通路的枢纽性信号分子^[20]，其表达水平是检测 Wnt/β-catenin 信号通路激活水平的常用指标之一。本研究结果表明，模型组较对照组 β-catenin 表达强度明显增强，且模型组 HSCs 核内 β-catenin 聚集现象。而 ASP 组 HSCs 胞质、胞内 β-catenin 表达强度普遍减弱。GSK-3β 是 Wnt/β-catenin 信号通路的重要负性调节因子，其参与形成的降解复合物可直接通过磷酸化 β-catenin 促进 β-catenin 的降解^[21]。Western blotting 检测结果显示模型组细胞内 GSK-3β 表达强度较对照组显著减弱，而 Phospho-GSK-3β 表达强度较对照组显著增强。当 GSK-3β 等降解复合物形成障碍时，β-catenin 的磷酸化受到抑制，最终引起 β-catenin 在细胞质内聚集。当 β-catenin 聚集达到一定量时，可向细胞核内移位。β-catenin 与细胞核内的 TCF/LEF 形成转录复合物，该复合物作为转录激活因子可引

起 Wnt/β-catenin 信号通路的靶基因表达，从而发挥调控作用^[22]。Western blotting 检测结果显示模型组细胞内 TCF-4 表达强度较对照组显著增强。以上实验结果提示，ASP 对 HSCs 内 Wnt/β-catenin 信号通路的作用是全方位的，可抑制 D-Gal 所致 Wnt/β-catenin 信号通路过度激活而诱导的 HSCs 衰老，这可能是 ASP 拮抗小鼠 HSCs 衰老的机制之一。

综上所述，ASP 具有拮抗 D-Gal 所致的小鼠 HSCs 衰老的作用，其机制与抑制 Wnt/β-catenin 信号通路过度激活有关。提示 ASP 可以用于延缓干细胞衰老及老年相关性疾病的防治。

参考文献

- [1] 李德冠, 孟爱民. 造血干细胞衰老机制研究明 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(6): 701-704.
- [2] 李成鹏, 刘俊, 贾道勇, 等. 当归多糖诱导人白血病干细胞衰老与调控端粒系统机制的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2364-2369.
- [3] 徐春燕, 贾道勇, 景鹏伟, 等. 当归多糖与阿糖胞苷联合注射对人白血病模型小鼠骨髓单核细胞的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3418-3423.
- [4] 胡晶, 冯敏, 吴宏, 等. 当归多糖动员的造血干/祖细胞移植重建小鼠造血功能的研究 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(23): 2236-2239.

- [5] 张先平, 王乾兴, 王亚平, 等. 当归多糖抑制氧化损伤延缓造血干细胞衰老 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(3): 407-412.
- [6] 张先平, 王乾兴, 王亚平, 等. 当归多糖对小鼠衰老造血干细胞细胞周期蛋白的调控 [J]. 基础医学与临床, 2013, 33(3): 320-324.
- [7] Krstetter P, Alderson K, Porse B T, *et al.* Activation of the canonical Wnt Pathway Leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage Differentiation block [J]. *Nat Immunol*, 2006, 301(7): 1048-1056.
- [8] Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, *et al.* Hematopoietic stem cell and Multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation [J]. *Nat Immunol*, 2006, 329(7): 1037-1047.
- [9] Song X, Bao M, Li D, Li Y M. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model [J]. *Mech Aging Dev*, 1999, 108(7): 239-251.
- [10] 耿珊, 张琛, 王亚平, 等. 免疫磁性活化细胞分选方法优化及纯化后细胞的生物学特性检测 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(7): 752-754.
- [11] Bryder D, Rossi D J, Weissman I L. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell [J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(5): 338-346.
- [12] Dykstra B, de Haan G. Hematopoietic stem cell aging and self renewal [J]. *Cell Tissue Res*, 2008, 331(8): 91-101.
- [13] Beerman I, Maloney W J, Weissmann I L, *et al.* Stem cells and the aging hematopoietic system [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 212(2): 500-506.
- [14] Pearce D, Bonnet D. Ageing within the hematopoietic stem cell compartment [J]. *Mech Ageing Dev*, 2009, 130(6): 54-57.
- [15] Chambers S M, Shaw C A, Gatz C, *et al.* Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation [J]. *PLoS Biol*, 2007, 175(5): 198-201.
- [16] 王亚平, 吴宏, 王建伟, 等. 造血干细胞生物学及其研究方法 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [17] Page M M, Robb E L, Salway K D, *et al.* Mitochondrial redox metabolism: Aging, Longevity and dietary effects [J]. *Mech Dev*, 2010, 131(4): 242-252.
- [18] Carlson M E, Silva H S, Conboy I M. Aging of signal transduction pathways, and pathology [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(9): 1951-1961.
- [19] Cairney C J, Sanguinetti G, Ranghini E, *et al.* A systems biology approach to down syndrome: identification of Notch/Wnt dysregulation in a model of stem cells aging [J]. *Biochim Biophys*, 2009, 1792(4): 353-363.
- [20] Hooeboom D, Burgering B M. Should I stay or should I go: beta-catenin decides under stress [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 63-74.
- [21] Rayasam G, Tulasi V K, Sodhi R, *et al.* Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake [J]. *Brit J Pharmacol*, 2009, 156(6): 885-895.
- [22] Eisenberg L M, Eisenberg C A. Wnt signal transduction and the formation of the myocardium [J]. *Dev Biol*, 2006, 293(2): 305-315.