

鹿茸干细胞与鹿茸再生

魏明立,褚文辉,赵海平,李春义*

(中国农业科学院特产研究所 吉林省特种经济动物分子生物学重点实验室,吉林 吉林 132109)

摘要 :鹿茸是唯一能够完全再生的哺乳动物器官,因而成为良好的生物医学研究模型。研究发现,鹿茸的再生是一个基于干细胞的过程,其内在的生长机制和调控模式对再生医学等研究领域具有重大的意义。本文对鹿茸的组织学、形态学及鹿茸干细胞的发现/鉴定进行了总结,进而探讨了鹿茸干细胞内与再生相关的基因。

关键词 :鹿茸;鹿茸干细胞;鹿茸再生

中图分类号 :Q954.61

文献标识码 :A

Antler Stem Cells and Antler Regeneration

WEI Ming-li, CHU Wen-hui, ZHAO Hai-ping, LI Chun-yi*

(Jilin Provincial Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals, Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, CAAS, Jilin 132109, China)

Abstract :Antler is the unique mammalian organ that can regenerate completely, so it is a very good biomedical research model. The studies find that antler regeneration is a stem cell-based process and that its inner mechanism and regulatory mode of antler growth is of great significance for us to research the area of regeneration medicine. The article summarizes the histology and morphology of velvet antler, then reviews the discovery and identification of antler stem cells, and last further discusses the related genes of antler regeneration in the antler stem cells.

Key words :Antler; Antler stem cells; Antler regeneration

1 鹿茸的形态学与组织学

1.1 鹿茸的形态学

鹿茸是唯一能够完全再生的哺乳动物器官,每年周期性地脱落、完全再生,并且具有明显的季节性。鹿茸是鹿头部角柄上的附属器官,并不是直接从鹿头上长出来的。角柄也不是与生俱来的,当鹿将要进入青春期时才开始萌发^[1]。早春,新生的鹿茸从角柄顶端上长出来,在其表面包裹着一层柔软的毛

皮—茸皮,晚春和夏季是鹿茸的快速生长期。鹿茸的生长速度在哺乳动物中是不可思议的,梅花鹿的鹿茸生长速度能达到 12.5mm/d^[2],马鹿的可达到 27.5mm/d^[3];秋天,鹿茸生长结束。紧接着,鹿茸快速钙化,茸皮开始脱落;冬天,裸露的骨质鹿角已经形成,这种状况一直持续到来年的春天。骨质鹿角脱落,触发新一轮的鹿茸再生^[4]。通常第 1 年长出的鹿茸只有主干没有眉枝,即初角茸。而后,逐年复杂化并且增大,直到壮年期趋于稳定。然后,随着茸鹿的衰老,鹿茸逐渐变

收稿日期 2010- 11- 21

基金项目 :吉林省自然科学基金(20101575)

作者简介 :魏明立(1988-),男,山东聊城市人,在读硕士,从事鹿茸生物学研究。

*通讯作者 :李春义, E-mail:chunyi.li@agresearch.co.nz

小和简单^[5]。

鹿茸的生长周期大约为1年。其中,鹿茸脱落前期和再生早期的研究意义最为重大。因此,研究者针对这一时期鹿茸生长的研究最为透彻。为了方便研究,这段时期被人为地划分为5个阶段:脱落前、脱落期、伤口愈合早期、伤口愈合晚期和鹿茸再生早期、主干和眉枝的形成期^[6-8]。

通过对鹿茸脱落前期和再生早期不同阶段的角柄/鹿茸采样并进行观察,我们可以得到如下结果。脱落前:骨质鹿角与角柄紧密相连。脱落前夕,角柄远端皮肤肿胀并带有光泽。从鹿角/角柄连接处的纵面上看,角柄呈粉红色且密度小,而鹿角呈白色且密度较高。随着鹿角脱落期的临近,一条环状裂缝出现在茸骨近端。脱落期:鹿角脱落后,角柄残基表面立即出血,愈合的角柄皮肤向中心延伸。一圈无毛的皮肤覆盖着脱落面中心凹陷的骨质部分。伤口愈合早期:断面出血处很快变得干燥并形成结痂,角柄皮肤在结痂之下进一步向中心延伸。伤口愈合晚期和鹿茸再生早期:结痂逐渐变小。此时在纵向上,我们可观察到2个肉眼可辨的月牙状突起,一个在前部,一个在后部。随着伤口的愈合,前后突起变得更大更清晰。主干和眉枝形成期:主干和眉枝分别由后/前突起部分形成。同时,结痂脱落,其下的伤疤就暴露出来。鹿茸再生初始阶段,主干和眉枝长度相近,所以早期的鹿茸呈鞍状,即二杠茸^[9]。而后的2个月内鹿茸的生长逐渐趋于完全^[4]。

1.2 鹿茸的组织学

我们对不同阶段的鹿茸样品进行了采集及组织学处理、观察,发现其不同阶段的组织学特征^[10,11]。

脱落前:角柄远端表皮直接与角柄骨膜(pedicle periosteum, PP)相连。鹿角/角柄连接处的皮肤内有厚壁血管和神经束,其中神经束被一层厚的鞘膜或包膜所包裹。随着脱落时间的临近,过渡区的空隙增大变得明显。位于脱落线附近的骨小梁,两侧密集排列着活跃的破骨细胞。角柄远端的骨膜被紧紧束缚在骨小梁上,这种骨膜的细胞层与纤维层之间有清晰的界限,这一点与普通骨膜不一样。角柄皮肤的真皮网状层内可发现几个大的动脉、静脉和神经。

脱落期:鹿角脱落后,角柄远端的皮肤与骨膜组织立即向内延伸。上皮细胞增生并伴有毛囊的形成。脱落面附近的骨小梁被结缔组织破坏,有时在脱落

面会发现一层纤维细胞。角柄残基表面上,密集排列着大量的破骨细胞,它们使粗糙的脱落面变得光滑。

伤口愈合早期:鹿茸脱落后的1d~2d内,可发现一层肉芽组织覆盖在角柄残基的骨质上。肉芽组织下有许多刚形成的细长骨小梁。有趣的是,外围的骨小梁都面向中心并在表皮内侧形成“舌”样结构。大部分的“舌”样结构向着特定的角度伸展,以确保愈合的表皮牢牢地固定在下方的结缔组织上。

伤口愈合晚期和鹿茸再生早期:前后生长中心的顶部被一层增生的骨膜/软骨膜所覆盖。该膜外部是纤维层,内部为细胞层,其内的间质细胞分化为骨/软骨组织,这样就形成了软骨细胞“岛”群。在角柄残基中心,纤细的新生骨小梁与原来粗的骨小梁连在一起。不久,在骨小梁上软骨膜之下形成了连续软骨柱。远端,细长的骨小梁与血管组织并入一起。血管层内,血管和神经非常密集。伤口愈合结束时,角柄的表皮再生基本完成。表皮很薄且没有毛囊和皮脂腺,其下有肉芽组织。在其内部,最早形成的软骨区域,组织开始重建,形成软骨群。随着生长中心软骨组织的连续形成,新的茸芽开始突出来。

主干和眉枝的形成:生长中心的组织快速增生,使前后生长点越来越高。其中主干生长中心的间质层、前软骨层和过渡层分别比在眉枝生长中心的厚得多。两个生长中心之间的结痂之下,骨小梁仍存在^[12]。

2 鹿茸干细胞的发现与鉴定

再生在动物研究中可分为4类:生理性再生、伤口愈合、代偿性再生和割处再生^[12]。几乎所有的动物都具备前三项能力,只有少数种类能够割处再生。根据定义,鹿茸的周期性生长属于割处再生。对于割处再生的研究起始于低等脊椎动物,其中典型的例子是蝾螈的肢体再生。蝾螈的肢体再生是一种基于芽基的过程^[13]。过去的研究中,鹿茸再生也一度被认为是基于芽基的再生^[7,14],或者说早期的鹿茸再生萌发了一个芽基^[15,16]。尽管如此,这些观点一直没有得到实验证实。近年来,我们发现鹿茸再生与蝾螈的肢体再生有很大区别。鹿茸再生过程中没有锥形细胞团的形成,而锥形细胞团的形成是基于芽基再生的典型特征^[17]。后来,通过组织学和形态学的观察,我们发现鹿茸的再生是由早期形成的生长中心驱动的,该中心上增生的软骨膜是由PP细胞增殖分化而来。角柄皮肤只是在伤口愈合时期起到一定作用。而

伤口愈合晚期和鹿茸前后生长中心的建立在时间上存在相当大的重叠^[11]。因此,我们可以断定鹿茸再生萌芽不是来源于角柄皮肤而是角柄骨膜。由于角柄骨膜是由最初的生茸区骨膜(anterogenic periosteum, AP)直接衍生而来^[9],所以,我们推测鹿茸再生是一个基于干细胞的过程,这种干细胞被称为鹿茸干细胞,即 AP/PP 细胞。为了验证上述的推论,科研工作者付出了大量的努力。将 AP 从未来的生茸区取出移植到鹿的前腿或前额上,发现在这些部位长出了类似于角柄和鹿茸的突起甚至形成了完整的二杠茸,而在原来的位置再没有能长出角柄和鹿茸^[18-20]。将一小块 AP 移植到裸鼠的头部的皮下也能得到类似的结果^[21]。利用 LacZ 基因对 AP 细胞进行遗传标记,可以发现构成角柄和鹿茸的内部的所有类型的细胞均由 AP 细胞增生分化而来,即角柄及鹿茸均来源于生茸区骨膜^[18]。AP 是一种暂时性组织,第 1 次生茸结束后就再也分辨不出来。在其原来的位置却留下了一个永久性骨质残桩即角柄,以后周期性地鹿茸再生便在角柄远端进行。毫无疑问,角柄是鹿茸再生的组织基础,但是不是角柄中所有组织都参与了鹿茸的再生,骨质、骨膜及皮肤在鹿茸再生中各自扮演了什么角色?形态学及组织学的观察并不能对这一问题给出确切的答案。因此,一个巧妙的实验被提了出来,完全剔除 PP 组织后观察其后鹿茸的再生情况,发现该角柄不能再生出鹿茸,而对照组却长出了完整的二杠茸。部分剔除 PP,发现早期鹿茸再生发生在角柄远端 PP 与其上皮肤的交汇处。因此,排除了鹿茸骨质参与鹿茸再生的可能^[22]。物理性隔离皮肤及骨膜组织,发现并不影响鹿茸的生成,实验组长出了无皮的血痂茸,剥开血痂发现该茸长出了类似二杠的结构^[23]。上述实验说明了 2 个问题:①AP 有着令人惊奇的自我分化能力,能够支持一个复杂器官鹿茸的完全生成,很可能预示着它是一种残留的胚胎组织;②PP 是 AP 的直接衍生物,其内包含了完整的鹿茸再生信息,正是该组织决定了每年的周期性鹿茸再生。

如上文所述,AP 和 PP 细胞显示出了令人惊异的扩增潜能,能支持鹿一生的季节性鹿茸再生。但 AP 组织却只有 2.5cm 左右宽、2.5~3.0mm 厚,其内包涵了大约 500 万个细胞。在每年 60d 的生茸期内,AP 细胞提供了 300 万左右的 PP 细胞。如此小的组

织、如此少的细胞,却生产了大约 10kg 的鹿茸组织,而且这个过程是每年重复的^[24]。因此,AP、PP 细胞明显具有很强的自我更新能力,这种能力是一般成体细胞所不具备的。所以,AP、PP 是否为成体干细胞,就还需要验证它们是否表达干细胞标记物及其是否具有多重分化潜能。

目前,特异抗原、基因及酶的表达已经被广泛应用于干细胞的鉴定^[25]。CD9 是胚胎干细胞(ESCs)细胞表面抗原。AP、PP 细胞均表达相当水平的 CD9,这已经被证实。“多潜能基因”Pou 区域家族成员中 Oct4 和 Nanog 基因在 AP 及 PP 细胞中均有表达,它们被认为用以维持特定的干细胞表型^[24]。另外,这 2 种细胞内的端粒酶及 Nucleostemin 蛋白的活性都比较高。端粒酶能提高细胞的自我更新能力^[26],Nucleostemin 的表达与干细胞增殖及蝶螈的芽基再生形成有关^[27,28]。在 PP 及 AP 细胞中发现的这些标记物的范围及性质充分表明了这 2 种细胞是成体器官中的特异性干细胞,而且能够在鹿的一生中一直保持胚胎特性[MSOffice1]。

根据定义可知,干细胞具有分化为一定数目特定类型细胞的能力。AP 及 PP 细胞的分化潜能已经得到了深入研究。这 2 种细胞在体外培养时,在微粒体培养体系及分别添加地塞米松和抗坏血酸的培养液中都能分化为软骨细胞及成骨细胞^[29,30]。因为软骨和骨是角柄及鹿茸中最重要的 2 个组成部分,所以这个结果进一步证明了鹿茸的发生/再生是由 AP/PP 组织引起的,鹿茸的再生过程是基于干细胞的,和蝶螈的肢体再生区别开来。有趣地是,当在 AP 及 PP 的培养基中添加亚油酸或者在 AP 细胞培养基中添加兔血清时,它们都会分化为脂肪细胞。通过与 C2C12 肌肉祖细胞系进行共培养,我们能够将 AP 细胞成功诱导为多核的肌肉前体细胞。在培养基中添加半乳糖凝集素-1 也能够达到相同的效果。当 AP 细胞被培养在能够促进神经元分化的 N2 培养基时,它能够分化为四周有类似神经轴突结构的神经元细胞^[29]。总而言之,这些证据充分表明鹿茸干细胞尤其是 AP 细胞具有广泛的分化潜能。

3 探索鹿茸干细胞内与鹿茸再生相关的基因

鹿茸拥有惊人的生长速度,这是什么因素引起的?它又是如何进行调节的?这些问题激起了人们极大的兴趣。近年来,随着分子生物学的发展,这些问

题的探索日益深入。研究者们开始在分子水平上研究鹿茸快速生长的机制。然而,由于无法对不同的组织层进行采样,导致这类研究一直受到束缚。为了方便研究,科研工作者提出了各种各样的方法,包括根据距离远近划分、根据血管多寡划分、根据切面颜色划分等^[31-33]。不过,这些方法偏向于主观判断,并且缺乏可比性。为解决此问题,一种辨别鹿茸尖部不同组织层的标准化程序被提出来。该程序通过对收集的未染色组织进行形态观察标记,从而区分不同的组织层,并且被组织学和 Northern 杂交所证实^[34]。

目前,关于鹿茸再生基因的研究尚在探索中。通过消减抑制杂交可以发现,A49、A39、A44 基因在鹿茸尖部组织不同的区域表达程度不同^[34]。近年来,Harper 等^[35]报道 S100A4 基因只在 AP 组织并不在 PP 组织和脸部骨膜组织中表达。在老鼠和人的乳腺癌细胞实验中,S100A4 基因的表达水平与乳腺癌细胞的转移侵袭能力呈正相关^[36-37]。近期研究发现,S100A4 蛋白有促进血管生成的作用^[38]。鹿茸令人惊异的生长速度在其它正常组织中是不可能的,只有癌组织才具有如此快速的生长能力。鉴于癌细胞中 S100A4 的重要作用,我们猜测鹿茸干细胞中是否也具有相同或类似的基因,控制着鹿茸的生长。通过原位杂交和免疫组织化学技术发现,马鹿茸中 Matrilins 基因在间充质、前软骨和软骨区的表达具有时空特异性^[39]。在对人健康的第 3 磨牙的研究中发现,Matrilin-4 在成牙本质细胞中表达,而在牙髓细胞中不表达^[40]。所以它的表达被认为可能促进了牙髓干细胞向牙本质细胞的分化。类似的案例还有 Lgals1、Pou5F1、Nanog、Sox2、Myc 等等。这些基因在鹿茸中的研究还不透彻。它们在鹿茸中所起的作用是否和在其它动物或人中的一致或类似,它们是否是鹿茸能够再生的主要因素,有待进一步研究。

4 结论

作为一种名贵的中药材,鹿茸有补肾壮阳、生精益血、补髓健骨、延缓衰老和增强免疫功能的作用^[41]。因而,生产上人们致力于品种的选育以获取更多的鹿茸。但是,鹿茸的另一个非常重要的作用即作为一种良好的生物模型更应受到关注。因为,鹿茸再生是独一无二的,这种现象的深入研究将带给我们更多的启示^[4]。如果能了解鹿茸再生,将对人们研究干细胞和再生医学领域产生极大的帮助,使肢体再生成

为可能,就可能为器官的治疗提供新的方法^[42]。鹿茸干细胞的激活与终止受哪些因素的影响?鹿茸干细胞中的基因的表达是如何调控的?鹿茸是如何实现快速增长的?鹿茸的再生机制如何?这些问题都有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Fennessy PF, Suttie JM. Antler growth: nutritional and endocrine factors[C]// Fennessy PF, Drew KR. Biology of deer production. Wellington: Royal Society of New Zealand, 1985:239-250.
- [2] Gao Z, Li C. The study on the relationship between antler's growth rate, relative bone mass and circulation testosterone, estradiol, AKP in sika deer [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 1988,19(30):224-231.
- [3] Goss R J. Problems of antlerogenesis [M]. New York: Clin Orthopaed, 1970,69:227-238.
- [4] Li C. Development of deer antler model for biomedical research [J]. Recent Adv Res Updates, 2003,4:256-274.
- [5] Heintz E. Les Cervides villafranchiens de France et d'Espagne[J]. Memoires du Museum national d'Histoire naturelle, 1970,22(1-2): 291-302.
- [6] Lincoln G. Biology of antlers [M]. London: J Zool Lond, 1992.
- [7] Goss RJ. Deer antlers. Regeneration, function and evolution[M]. New York: Academic Press, 1983.
- [8] Zhao D (ed.). Textbook of deer farming [M]. Beijing: Chinese Press of Forestry, 1986.
- [9] Li C, Suttie JM, Clark DE. Morphological observation of antler regeneration in red deer (Cervus elaphus)[J]. J Morphol, 2004, 262:731-740.
- [10] Li C, Suttie JM. Light microscopic studies of pedicle and early first antler development in red deer (Cervus elaphus)[J]. Anat Rec, 1994,239:198-215.
- [11] 李春义,赵世臻,等.梅花鹿茸组织结构研究[J].特产研究, 1989,2:1-4.
- [12] Li C, Suttie JM, Clark DE. Histological examination of antler regeneration in red deer (Cervus elaphus)[J]. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2005,282(2):163-174.
- [13] Goss RJ. Prospects of regeneration in man[J]. Clin Orthopaed Relat Res, 1980,151:270-282.
- [14] Allen SP, Maden M, Price JS. A role for retinoic acid in regulating the regeneration of deer antlers [J]. Dev Biol, 2002,251:409-423.
- [15] Goss RJ. Future directions in antler research[J]. Anat Rec, 1995, 241:291-302.
- [16] Li C, Suttie JM. Tissue collection methods for antler research

- [J]. Eur J Morphol, 2003, 41: 23-30.
- [17] Goss RJ. Principles of regeneration [M]. New York: Academic Press, 1969.
- [18] Li C, Suttie JM. Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue [J]. Anat Embryol (Berl), 2001, 204(5): 375-388.
- [19] Hartwig H, Schrüdde J. Experimentelle Untersuchungen zur Bildung der primären Stirnauswuchse beim Reh (*Capreolus capreolus* L.) [J]. Z Jagdwiss, 1974, 20: 1-13.
- [20] Goss RJ, Powel RS. Induction of deer antlers by transplanted periosteum. I. Graft size and shape [J]. J Exp Zool, 1985, 235(3): 359-373.
- [21] Li C, Harris AJ, et al. Tissue interactions and antlerogenesis: new findings revealed by a xenograft approach [J]. J Exp Zool, 2001, 290(1): 18-30.
- [22] Li C, Mackintosh CG, Martin SK, et al. Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum deletion [J]. Cell Tissue Res, 2007, 328: 65-75.
- [23] Li C, Yang F, Li G, et al. Antler regeneration: a dependent process of stem tissue primed via interaction with its enveloping skin [J]. J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol, 2007, 307(2): 95-105.
- [24] Li C, Yang F, Allan Sheppard. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration- insights from studying annual renewal of deer antlers [J]. Current Stem Cell Research & Therapy, 2009, 4: 237-251.
- [25] Bhattacharya B, Miura T, Brandenberger R, et al. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature [J]. Blood, 2004, 103(8): 2956-2964.
- [26] Yang C, Przyborski S, Cooke MJ, et al. A key role for telomerase reverse transcriptase unit in modulating human embryonic stem cell proliferation, cell cycle dynamics, and in vitro differentiation [J]. Stem Cells, 2008, 26(4): 850-863.
- [27] Beekman C, Nichane M, De Clercq S, et al. Evolutionarily conserved role of nucleostemin: controlling proliferation of stem/progenitor cells during early vertebrate development [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(24): 9291-9301.
- [28] Maki N, Takechi K, Sano S, et al. Rapid accumulation of nucleostemin in nucleus during newt regeneration [J]. Dev Dyn, 2007, 236(4): 941-950.
- [29] Berg DK, Li C, Asher G, et al. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny [J]. Biol Reprod, 2007, 77(3): 384-394.
- [30] Li C, Suttie JM, Clark DE. Deer antler regeneration: A system which allows the full regeneration of mammalian appendages [C]// Suttie JM, Haines SR, Li C, Eds. Advances in Antler Science and Product Technology. Mosgiel, New Zealand: Taieri Print Ltd, 2004: 1-10.
- [31] Sadighi M, Haines SR, Skottner A, et al. Effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II on the growth of antler cells in vitro [J]. J Endocrinol, 1994, 143: 461-469.
- [32] Price JS, Oyajobi BO, Oreffo ROC, et al. Cells cultured from the growing tip of red deer antler express alkaline phosphatase and proliferate in response to insulin-like growth factor-I [J]. J Endocrinol, 1994, 143: 9-16.
- [33] Francis SM, Suttie JM. Detection of growth factors and protooncogene mRNA in the growing tip of red deer (*Cervus elaphus*) antler using reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. J Exp Zool, 1998, 281: 36-42.
- [34] Li C, Clark DE, et al. Sampling technique to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery [J]. Anat Rec, 2002, 268(2): 125-130.
- [35] Harper A, Wang W, Li C. Identifying ligands for S100A4 and galectin 1 in antler stem cells [C]// Arcus V. 2009 Queenstown Molecular Biology Meetings. Queenstown: New Zealand, 2009: 35.
- [36] Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, et al. Isolation and characterization of a gene specially expressed in different metastatic cells and whose gene product has a high degree of homology to Ca²⁺-binding protein family [J]. Genes Dev, 1989, 3: 1086.
- [37] Pedrocchi M, Schafer BW, Muller H, et al. Expression of Ca²⁺-binding proteins of the S100 family in malignant human breast cancer cells and biopsy samples [J]. Int J Cancer, 1994, 57: 684.
- [38] Sherbet GV, Lakshmi MS. S100A4 (MTS1) calcium binding protein in cancer growth, invasion and metastasis [J]. Anticancer Res, 1998, 18(4A): 2415-2421.
- [39] Shi S, Cheng X, Wang J, et al. RhBMP-2 microspheres-loaded chitosan/collagen scaffold enhanced osseointegration: an experiment in dog [J]. J Biomater Appl, 2009, 23(4): 331-346.
- [40] Park EJ, Kim ES, Weber HP, et al. Improved bone healing by angiogenic factor-enriched platelet-rich plasma and its synergistic enhancement by bone morphogenetic protein-2 [J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2008, 23(5): 818-826.
- [41] 陈张勇. 鹿茸的药用价值及真伪鉴别 [J]. 药学服务, 2007, 8: 23-26.
- [42] Price JS, Allen S, Faucheux C, et al. Deer antlers: A zoological curiosity or the key to understanding organ regeneration in mammals? [J]. J Anat, 2005, 207(5): 603-618.