

# 鹿茸再生及其分子调节机理研究进展

刘振,赵海平,杨春,褚文辉,王大涛,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:**鹿茸是唯一可以周期性完全再生的哺乳动物器官,这种再生起源于骨膜干细胞。鹿茸再生伴随着皮肤、血管和神经的快速生成,而且多种多肽和生长因子参与其中,组成了一系列复杂而精密的信号调控通路。作者综述了鹿茸再生过程的组织学及分子信号通路研究现状,以信号转导通路为研究重点揭示鹿茸再生之谜,为更好地了解哺乳动物器官再生机制提供参考。

**关键词:**鹿茸再生;形态组织学;信号通路;生长调控

**中图分类号:**S856.4<sup>+</sup>2

**文献标识码:**A

**文章编号:**1671-7236(2013)02-0050-03

近年来,再生生物学研究结果表明鹿茸是唯一能够完全再生的哺乳动物附属器官(Li等,2003)。鹿茸最初由额外脊上的生茸骨膜(antlerogenic periosteum, AP)增殖分化而来,即初角茸,翌年,初角茸脱落并留下永久性骨质残桩——角柄,以后鹿茸都从角柄上年周期性再生。Li等(2000,2001)和 Kierdorf等(2007)研究结果表明,鹿茸的形成与再生是基于干细胞的生长过程。鹿茸再生过程受到睾酮、表皮生长因子、胰岛素样生长因子等刺激因子的影响,并且多条信号通路参与和相互协调。通过多年对鹿茸研究发现,每年约有300多万角柄骨膜细胞(pedicle periosteum, PPCs)参与鹿茸再生过程,在60 d内可以形成10 kg的鹿茸组织(Li等,2006),另外,鹿茸干细胞快速增殖分化,其本身未发生癌变。所以,以鹿茸为载体,探究其在形成再生过程中的分子调控机理,期望解决疾病和肢体再生等一系列临床医学重大难题。

## 1 鹿茸再生过程

鹿茸每年从角柄上再生,鹿茸再生过程分5个阶段:脱落前期、脱落期、伤口愈合早期、伤口愈合后期和鹿茸再生早期、主干和眉枝形成期(Lincoln, 1992)。春天,鹿角从角柄上脱落形成伤口,伤口快速愈合。伤口愈合过程中,鹿茸开始从角柄残桩远心端的角柄骨膜和皮肤交汇处再生。位于角柄前后部的角柄骨膜增殖分化形成前后生长中心,未来分别形成眉枝和主干。晚春和夏季是鹿茸的快速生长期。研究结果显示,梅花鹿的鹿茸生长速度能达到

12.5 mm/d(Li等,1988),马鹿的甚至可达27.5 mm/d(Goss等,1970)。到了秋季,鹿茸生长减缓,开始骨化,茸皮开始脱落。冬天,鹿角紧紧的附着在角柄上。翌年春天,鹿角脱落并触发新一轮的鹿茸再生。

## 2 鹿茸再生的组织学

鹿茸最初是由生茸骨膜生长发育而来,生茸骨膜只是额外脊上一个暂时性组织,一旦形成角柄,生茸骨膜就不复存在,以后鹿茸每年基于角柄骨膜周期性再生(Li等,2001)。Li等(2010)研究结果发现,生茸骨膜、表皮及部分真皮是鹿茸形成的必要条件,只有皮下疏松结缔组织被压缩到一定程度时鹿茸才能形成,同时骨膜细胞层释放调节因子透过结缔组织诱导头皮向茸皮的转换,最后,被激活的真皮细胞通过自分泌和(或)旁分泌对表皮细胞发挥作用,头皮就转化成了茸皮(Rendl等,2008)。鹿茸形成除了头皮向茸皮的转变,还伴随着血管和神经的形成与快速生长,Clark等(2006)研究结果发现,鹿茸血管的生成过程是由不同的组织结构控制的,鹿茸生长顶端形成软骨和血管的细胞具有空间差异,推测在前软骨区存在特异性的血管生长调控因子。通过进一步研究,Suttie等(1991)和Li等(1993)发现额颞和眼窝上三叉神经衍生出的角柄感觉神经是每年鹿茸神经再生的基础。

## 3 分子生物学方面的研究

**3.1 鹿茸生长阶段的内在因子** 鹿茸形成与再生过程受到很多激素和生长因子的调节,人们首先发现鹿茸的生长与体内睾酮的水平密切相关,春天血液中睾酮含量下降,鹿角脱落,鹿茸开始再生;夏季睾酮含量维持低水平,鹿茸快速生长;秋季睾酮含量急速增加,鹿茸骨化,褪掉茸皮;冬季睾酮处于高水平,鹿角紧紧附于角柄上;直到次年睾酮水平下降触发新一轮鹿茸再生。若在鹿茸快速生长期将鹿去势,鹿茸生长期延

收稿日期:2012-08-02

作者简介:刘振(1987—),男,山东人,硕士,研究方向:特种经济动物饲养。

通信作者:李春义。E-mail: Chunyi.li@agresearch.co.nz

基金项目:973前期研究专项(2011CB111500);吉林省自然科学基金(20101575)。

长,且不会骨化(Suttie等,1991;Li等,1988)。Li等(2001)研究结果发现性激素并不能够直接促使生茸骨膜细胞的有丝分裂;Sadighi等(2001)研究证明胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor,IGF)是刺激鹿茸生长的主要生长因子。近年相继分离出多种对鹿茸生长发育有影响的细胞因子,如表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF),其能促进细胞快速分裂。Ko等(1986)从鹿茸中半纯化EGF证明,鹿茸皮层是颌下腺EGF合成的最初部位;江润祥等(1987)发现EGF的受体主要存在于鹿茸表皮层,但睾酮能促进EGF的合成调节机制还不甚明了(王秋玉等,2000)。IGF包括胰岛素样生长因子-I(IGF-I)和胰岛素样生长因子-II(IGF-II),具有促进细胞增殖、分化和控制鹿茸生长发育的作用。Price等(2004)证实IGF-I和IGF-II在鹿茸组织内都有表达。Suttie等(1991)发现鹿茸顶部非骨化部分存在大量的IGF及其受体。IGF的合成、释放和活性与动物的营养状况直接相关。Suttie等(1991)发现能量缺乏或饥饿时候IGF-I浓度降低;李光玉等(2005)研究证实,营养状况可以影响IGF的水平,从而影响角柄和鹿茸的生长发育。除了IGF和EGF以外还有很多特殊蛋白多肽存在。聂毅磊(2002)分离纯化出可促进神经纤维生长的多肽;Zhang等(1992)在鲜鹿茸中分离出可以促进软骨、成骨细胞增殖的多肽;Weng等(2001,2002)分离出可以促进原代细胞分裂且明显抑制白细胞介素-1(IL-1)和IL-6合成的单体多肽;徐代勋(2011)在角柄的骨膜远端1/3(致敏区)和近端2/3(休眠区)研究发现了6种蛋白与鹿茸再生密切相关,参与了鹿茸再生的相关信号转导与分子调控。

**3.2 转导通路对鹿茸细胞的调节** Li等(2012)研究结果发现,PI3K/AKT通路和MAPK通路在AP和PP中普遍存在。PI3K/AKT是多种信号转导途径的共同通路,其经磷酸化过程激活后,便可对下游蛋白进行调节,最终抑制细胞凋亡。MAPK信号通路可以降低细胞黏附,促进细胞转移,且还通过P38-P53-P21通路调节细胞的分裂或凋亡,MAPK可以上调血管内皮生长因子(VEGF)的表达,刺激新血管的形成。但是在两种干细胞中起主要作用的信号通路不尽相同,AP中主要信号通路是PI3K/AKT、14-3-3、基于Rho的肌动蛋白调控和ERK/MAPK通路;PP中起主要作用的调控通路是肌动蛋白骨架通路、ERK/MAPK、P38/MAPK和PI3K/

AKT通路。Li等(2012)研究结果发现,SPARC和S100A4只在AP中大量表达,在PP和FP细胞没有表达。S100A4蛋白与钙离子结合后激活并与相应靶蛋白结合,在细胞黏附、运动、侵袭、细胞分裂、存活中发挥重要作用(Donato等,2001);Ambartsumian等(2005)研究结果发现,S100A4可以促进血管的生成;王大涛等(2011)已经初步证实鹿茸中该蛋白具有促进血管形成作用。SPARC称作骨连接蛋白或基底膜40蛋白,该蛋白是一种多功能蛋白,由3个独立模块结构组成,具有调节骨骼生长、细胞增殖、分化,抗细胞黏附,抑制细胞对某些生长因子反应等功能(Rotllant等,2008)。Li等(2012)发现相对于AP和FP细胞,IL-8、ANXA2和CFL1只在PP中表达。IL-8是一种炎性细胞因子,能够促进血管再生和细胞快速增殖(Rosenkilde等,2004)。Li等(2012)推测正是因为IL-8通过PI3K/AKT通路上调MYC的表达促使PP快速增殖,才能让有限的PP细胞在60d内长成10kg重的鹿茸。研究结果发现ANXA2同样能够上调MYC的表达,调节细胞的增殖(Filipenko等,2004)。鹿茸再生需要PP细胞迁移至鹿茸生长顶端形成间充质层,此时CFL1、GSN、CALD1等在肌动蛋白骨架通路中被上调,调节PP细胞的定向迁移(Li等,2012)。近年来研究结果表明cofilin(CFL)的活化使肌动蛋白链延长产生新的倒钩末端,并确定细胞运动的精确方向(Hitch等,2006)。

鹿茸每年的快速再生源于间充质细胞的快速增殖分化。Mount等(2006)研究结果发现,经典wnt通路调节间充质细胞的凋亡、生长和分化,且 $\beta$ -catenin对间充质细胞群体积的维持有重要的作用,抑制wnt通路会促使细胞凋亡和分化。wnt通路还抑制早期间充质细胞和软骨细胞的分化,但是具体调节机理还需进一步研究。

#### 4 展望

鹿茸形成过程中,生茸骨膜仅存在于初角茸形成之前的生茸区,且角柄骨膜也仅仅是很小的一部分区域,不能满足大量的试验研究。目前研究都以体外培养AP、PP等细胞为主,然而体外培养所建立的微环境是否会改变鹿茸干细胞蛋白的表达仍然未知。Li等(2009a,2009b)已经采用异种嫁接的方式利用裸鼠研究鹿茸再生机理的可行性,但是还会受到物种间组织排异和物种间调节因子差异等影响。为了避免上述问题的发生,可以基于AP、PP的干细胞特性,建立AP、PP细胞与上皮细胞培养

的微环境,体外培植出完整的鹿茸,就可以解决试验季节性限制,研究成本较高,以及器官再生、器官移植排斥等问题,也为医治组织器官缺陷提供了可能。总之,鹿茸作为哺乳动物中可以年周期性完全再生的器官,其再生的调控机制还未了解,假如鹿茸再生过程中蛋白多肽和转导通路的分子调节机制得以揭示,对于治疗人类癌症、诱使肢体再生、解决器官移植等疾病缺陷有着重要的意义。

## 参 考 文 献

- 王大涛,赵海平,褚文辉,等. 梅花鹿 S100A4 基因的克隆及融合蛋白的表达[J]. 兽类学报, 2011, 31(1): 103~107.
- 王秋玉, 王本祥. 论鹿茸生长因子[J]. 中医学报, 2000(6): 10~11.
- 江润祥, 高锦明, 叶大同, 等. 鹿茸表皮生长因子[J]. 动物学报, 1987, 33(4): 301~308.
- 李光玉. 梅花鹿、马鹿营养、血液 IGF1 浓度及鹿茸生长规律研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2005.
- 赵东, 邢秀梅, 杨福合. 梅花鹿鹿茸总蛋白提取方法对双向电泳图谱的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(7): 25~28.
- 徐代勋. 梅花鹿鹿茸角柄骨膜不同部位差异蛋白的筛选[D]. 镇江: 江苏科技大学, 2011.
- 聂毅磊. 鹿茸中神经生长因子的分离纯化和表征[M]. 福州: 福州大学, 2002.
- Adams J L. Innervation and blood supply of the antler pedicle of the red deer[J]. New Zealand Veterinary Journal, 1979, 27(10): 200~201.
- Ambartsumian N, Grigorian M, Lukanidin E. Genetically modified mouse models to study the role of metastasis-promoting S100A4 (mts1) protein in metastatic mammary cancer[J]. J Dairy Res, 2005, 72: 27~33.
- Clark D E, Li C, Wang W, et al. Vascular localization and proliferation in the growing tip of the deer antler[J]. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2006, 288(9): 973~981.
- Donato R. S100: A multigenic family of calcium modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2001, 33: 637~668.
- Filipenko N R, MacLeod T J, Yoon C S, et al. Annexin A2 is a novel RNA-binding protein[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 8723~8731.
- Gao Z G, 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.
- Goss R J. Section III basic sciences and pathology 24 problems of antlerogenesis[J]. Clin Orthopaedics and Related Research, 1970, 69: 227~238.
- Hitchcock-Degregori S E. Chemotaxis: Cofilin in the driver's seat[J]. Curr Biol, 2006, 16(24): R1030~R1032.
- Kierdorf U, Kierdorf H, Szuwart T. Deer antler regeneration: cells, concepts, and controversies[J]. J Morphol, 2007, 268(8): 726~738.
- Ko K M, Yip T T, Tsao S W, et al. Epidermal growth factor from deer (*Cervus elaphus*) submaxillary gland and velvet antler [J]. Gen Comp Endocrinol, 1986, 63(3): 431~440.
- Li C, Sheard P W, Corson I D, et al. Pedicle and antler development following sectioning of the sensory nerves to the antlerogenic region of red deer (*Cervus elaphus*) [J]. J Exp Zool, 1993 (267): 188~197.
- Li C, Liu Z, Zhao S. Variation of testosterone and estradiol levels in plasma during each developmental stage of sika deer antler [J]. Acta Theriol Sin, 1988, 8(3): 224~231.
- Li C, Suttie J M. Deer antlerogenic periosteum: A piece of post-natally retained embryonic tissue[J]. Anat Embryol, 2001, 204: 375~388.
- Li C, Littlejohn R P, Corson I D, et al. Effects of testosterone on pedicle formation and its transformation to antler in castrated male, freemartin and normal female red deer (*Cervus elaphus*) [J]. Gen Comp Endocrinology, 2003, 131(1): 21~31.
- Li C, Yang F H, Sheppard A. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration-insights from studying annual renewal of deer antler [J]. Current Stem Cell Research & Therapy, 2009a, 4(3): 237~251.
- Li C, Gao X, Yang F, et al. Development of a nude mouse model for the study of antlerogenesis mechanism of tissue interaction and ossification pathway[J]. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 2009b, 312(2): 118~135.
- Li C. Exploration of the mechanism underlying neogenesis and regeneration of postnatal mammalian skin: Deer antler velvet[J]. Nova Science Publishers Inc, 2010, 16(11~12): 1~19.
- Li C, Harper A, Puddick J, et al. Proteomes and signalling pathways of antler stem cells[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30026.
- Lincoln G A. Biology of antlers[J]. Journal Zoology, 1992, 226: 517~528.
- Mount J G, Muzylak M, Allen S, et al. Evidence that the canonical wnt signaling pathway regulates deer antler regeneration [J]. Developmental Dynamics, 2006, 235: 1390~1399.
- Price J, Allen S. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers[J]. Philosophical Trans R Soc Lond B Biology Science, 2004, 259(1445): 809~815.
- Rendl M, Polak L, Fuchs E. BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties[J]. Genes & Development, 2008, 22: 543~557.
- Rosenkilde M M, Schwartz T W. The chemokine system a major regulator of angiogenesis in health and disease [J]. Apmis, 2004, 112: 481~495.
- Rotllant J, Liu D, Yan Y L, et al. Sparc (Osteonectin) functions in morphogenesis of the pharyngeal skeleton and inner ear [J]. Matrix Biol, 2008, 27: 561~572.
- Sadighi M. Effect of insulin-like growth factor (IGF-1) and IGF-1 on the growth of antler cells *in vitro* [J]. J Endocrinol, 1994, 143(3): 461~469.
- Suttie J M, Fennessy P F, Crosbie S F, et al. Temporal changes in LH and testosterone and their relationship with the first antler in red deer (*Cervus elaphus*) stags from 3 to 15 months of age[J]. J Endocrinol, 1991, 131(3): 467~474.
- Suttie J M, White R G, Breier B H, et al. Photoperiod associated changes in insulin like growth factor-1 in Reindeer[J]. Endocrinology Printed in USA, 1991, 129(2): 679~682.

# 禽呼肠孤病毒与禽白血病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立及应用

马超英

(青海省海西州乌兰县铜普兽医站,青海海西 817000)

**摘要:**根据 GenBank 中禽呼肠孤病毒(ARV)、禽白血病毒(ALV)基因序列,设计 2 对引物,在建立鉴别各病毒单项 RT-PCR 技术的基础上,优化双重 RT-PCR 反应条件,建立 2 种病毒的双重 RT-PCR。对同一样品中的 ARV、ALV 核酸模板进行双重 RT-PCR 扩增,结果可同时扩增 ARV 485 bp、ALV 673 bp 的特异性片段,而对其他 5 种禽病病原的 PCR 扩增结果均为阴性。敏感性试验结果表明,该双重 RT-PCR 技术能检出 10 pg 的 ALV 和 10 pg 的 ARV 模板。用 31 份临床病料对本研究双重 RT-PCR 技术和单项 RT-PCR 技术进行对比验证,结果显示,两者的总符合率为 100%。结果表明建立的双重 RT-PCR 检测方法,具有特异、快速、准确的特点,可用于对这 2 种病毒的同时检测和鉴别诊断。

**关键词:**双重聚合酶链反应;禽呼肠孤病毒;禽白血病毒

中图分类号:Q78

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2013)02-0053-04

中国雏鸡和青年鸡群中,由网状内皮增生病毒(REV)、禽传染性贫血病毒(CIAV)、禽呼肠孤病毒(ARV)、鸡白血病毒(ALV)等不同的免疫抑制性病毒多重感染诱发的免疫抑制性疾病越来越常见,造成的经济损失日趋严重(殷震等,1997;崔治中,2001)。鸡群的免疫抑制性病毒多重感染不仅影

响鸡群的生产性能,更易导致多种其他不同的细菌性和病毒性继发性感染,且易造成对特定疫苗免疫反应的抑制作用(崔治中,2007;胡北侠等,2009;Saif,2005)。禽呼肠病毒(avian reovirus, ARV)是呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属的成员,无囊膜,双股的 RNA 病毒,可感染鸡、火鸡、鸭、鹅及其他野鸟等多种禽类(谢芝勋等,2001;Benavente 等,2007;毕研丽等,2012)。禽白血病毒(avian leukosis virus, ALV)多发生于性成熟前后的肉种鸡,主要引

收稿日期:2012-06-15

作者简介:马超英(1970—),男,青海人,学士,兽医师,研究方向:动物疫病防治。

- 35 Weng L, Zhou Q L, Wang B X, et al. A new polypeptide promoting epidermal cells and chondrocytes proliferation from *Cervus elaphus* Linnaeus[J]. Chinese Pharmaceutical, 2001, 36 (12):913~917.
- 36 Weng L, Zhou Q L, Wang B X, et al. A novel polypeptide from *Cervus elaphus* Linnaeus[J]. Chin Chemical Letters, 2002, 13

(2): 147~150.

- 37 Zhang Z Q, Zhang Y, Wang B X, et al. Purification and partial characterization of anti-inflammatory peptide from pilose antler of *Cervus nippon* Temminck[J]. Yao Xue Xue Bao, 1992, 27 (5): 321~324.

## Research Progress on Antler Regeneration and its Molecular Regulate

LIU Zhen, ZHAO Hai-ping, YANG Chun, CHU Wen-hui, WANG Da-tao, LI Chun-yi

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

**Abstract:**Deer antlers, derivatives of periosteum cells, are the only mammalian appendages capable of full renewal in yearly cycle. Antler regeneration along with the rapid generation of skin, blood vessels and nerves, and a variety of peptides and growth factors are involved, all of that are regulated by a series of complex and sophisticated signal pathways. This paper summarizes the histological progress of antler regeneration and the present research status of signaling pathways thereof, with a focus on signal transduction pathways to reveal the mystery of antler regeneration, with the aim to gain a better understanding of the mechanism of mammalian organ regeneration.

**Key words:**antler regeneration;morphology and histology;signal pathway;growth regulation