



鹿茸完全再生机制研究进展

李春义*

中国农业科学院 特产研究所/特种经济动物分子生物学国家重点实验室, 长春 130000

*通讯作者, lichunyi1959@163.com

摘 要 鹿茸每年从角柄残桩上完全再生,是目前发现的唯一能够完全再生的哺乳动物器官,是研究自然界哺乳动物肢体/附属器官完全再生问题的理想模型。研究显示,鹿茸芽基来源于角柄骨膜细胞的增殖与分化。角柄骨膜细胞可以表达多种胚胎干细胞标记物并且能够在离体情况下被诱导分化成多种体细胞,为鹿茸干细胞。鹿茸干细胞只有与紧密包裹的角柄皮肤细胞建立起相互作用后才能发起鹿茸的再生。鹿茸早期的再生过程在组织学上与小鼠(*Mus musculus*)断肢伤口愈合过程相似,区别在于角柄骨膜细胞与长骨骨膜细胞的增殖潜能。有效提高小鼠断肢长骨骨膜细胞的增殖潜能,使之接近角柄骨膜细胞,或许可以实现哺乳动物的肢体部分完全再生。本文综述了鹿茸各组织再生和鹿茸干细胞的研究进展,比较了鹿茸再生与蝾螈(*Notophthalmus viridescens*)肢体再生的异同并且对鹿茸再生模型到临床应用提出了展望。本文为解决人类(*Homo sapiens*)断指和断肢再生提供了理论依据。

关键词 鹿茸,再生,角柄,骨膜,干细胞

中图分类号 S825 文献标识码 A

Progress on the Mechanism Underlying Full Regeneration of Mammalian Organ Deer Antlers

LI Chun-Yi*

State Key Lab for Molecular Biology of Special Animals, Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130000, China

*Corresponding author, lichunyi1959@163.com

Abstract Deer antlers are the only mammalian organs that can fully grow back once lost from their pedicles, the permanent bony protuberances. Studies have demonstrated that it is the proliferation and differentiation of pedicle periosteal cells (PPCs) that give rise to the antler blastema, from which antler regeneration takes place. PPCs express key embryonic stem cell markers and can be induced to differentiate into multiple cell lineages *in vitro*, so are called antler stem cells. Further studies have found that PPCs can initiate antler regeneration only when they have interacted with the pedicle skin. Histologically, the process of early antler regeneration resembles that of healing of a mouse (*Mus musculus*) leg stump wound. However what sets these two apart is the difference in proliferation potential between the PPCs and the periosteal cells of the mouse long bone. We believe that if we can impart a greater proliferation potential to the long bone periosteal cells, we might be able to achieve the dream of regenerating limbs in mammals including humans. This article has reviewed the progress on histogenesis of antler regeneration including the inner and outer tissue components and antler stem cell research, made comparison between regenerations of deer antlers and newt limbs and identified their

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(No. 2011AA100603)、国家自然科学基金项目(No. 31170950)、吉林省重点科技攻关项目(No. 2015020407NY)和吉林省自然科学基金项目(No. 20140101139JC)

收稿日期: 2016-08-26 接受日期: 2016-09-26

similarities and differences, pointed out the future direction toward the possible use in clinics, and provides new way of thinking for how to ultimately solve the problem of human limb regeneration.

Keywords Antler, Regeneration, Pedicle, Periosteum, Stem cells

在雄性激素的调控下鹿角每年都会周期性脱落与再生。大多数鹿(*Cervidae*)种,上一年完全骨化的鹿角在春天从骨桩-角柄上脱落,角柄残桩伤口愈合,新茸由愈合处开始再生;夏天鹿茸进入快速生长期,之后开始钙化;完全钙化以后,茸皮血液供应停止,干枯的茸皮在夏末或秋季脱落;坚硬鹿角做为雄鹿发情期(交配季节)争偶的武器;冬季完全骨化的鹿角贴附于活组织的角柄上,并在来年春天脱落,从而激发新一轮的鹿茸再生(Goss, 1983; Fennessy, Suttie, 1985; Li et al., 2004)(图1)。

实现肢体/附属器官的完全再生(切割处再生),是现代再生医学“皇冠上的明珠”(Goss, 1983; Stocum, 2001)。现阶段有关割处再生的认知主要来源于低等脊椎动物(Gardiner et al., 2002),尤其是两栖动物(有尾目与无尾目)的研究,而缺乏适宜的哺乳动物肢体/附属器官再生模型。要实现人类(*Homo sapiens*)的断指、断肢再生,哺乳动物模型的选择至关重要。

鹿茸是目前所发现的唯一能够完全再生的哺乳动物器官,是研究自然界哺乳动物肢体/附属器官

完全再生问题的理想模型(Goss, 1990; Li, 2009)。本文综述了鹿茸内、外组织发生和再生的组织学过程,所依赖的干细胞组织基础,鹿茸干细胞的定性,鹿茸干细胞与其微环境的相互作用机制、干细胞依赖性与基芽依赖性割处再生的比较,以及应用鹿茸再生模型到临床以解决人类断肢和断指再生的展望。以期为解决人类断肢和断指提供理论依据。

1 鹿茸的再生依赖于角柄骨膜(PP)

基于组织学实验, Wislocki (1942) 和 Goss (1970, 1980)认为角柄皮肤的真皮是鹿茸再生的主要细胞来源,即再生的鹿茸是真皮的衍生物。Goss (1995)认为“作为一种组织学上复杂的结构(表皮,真皮,软骨,骨,血管和神经),鹿茸再生必然由多种组织参与”。而最近的研究证实了再生鹿茸是角柄骨膜(pedicle periosteum, PP)的衍生物(Kierdorf et al., 2003; Li et al., 2004, 2005; Li et al., 2007a)。再生鹿茸由内部(软骨和骨)和外部(皮肤,血管和神经)组织构成(Goss, 1983; Li, 1997; Li, Suttie, 2012)。



图1 鹿茸再生周期

Figure 1 Antler regeneration cycle

1.1 鹿茸内部组织(软骨和骨)的再生

鹿茸内部组织的再生已经研究的比较清楚(Goss, 1961; Kierdorf et al., 2003; Li et al., 2005; Li et al., 2007a; Li et al., 2014)。鹿角脱落后,角柄残桩脱落面中心区域立即由一层具有光泽的“皮肤环”所包绕。组织学研究表明,位于光泽皮肤环下面的PP细胞同时被激活,PP开始增厚,在伤口愈合后期,由增厚的远端PP形成前后两个新月形的生长中心,这两个中心分别形成了鹿茸眉枝和主干的中心。由此可见,PP细胞的增殖和分化形成了再生鹿茸的内部组织结构(Li et al., 2005)。

Li等(2007a)先后进行了一系列实验证明了PP是鹿茸内部组织再生的基础。角柄残桩主要由骨、骨膜和皮肤3个部分的组织构成。实验一:在鹿茸再生前,用手术的方法剔除了整个角柄上的PP组织,结果发现,在缺失PP组织的角柄上没能再生出鹿茸,而对照侧角柄却再生出了一个3杈鹿茸。因此,推断PP是鹿茸再生的组织基础。实验二:实验中只剔除了角柄远端1/3的PP组织,这样剩余PP组织的末端位于角柄躯干上,而这一位置远离了鹿茸的再生位点(即角柄顶端),观察鹿茸再生是否会从这一特殊位点发起?结果发现,新生茸芽从位于角柄躯干上的PP末端长出。该实验完全排除了角柄骨质参与鹿茸再生的可能性,表明角柄骨质的存在不是鹿茸再生的必要条件。实验三:在鹿茸再生前,将一个不透性的薄膜由角柄顶端插入在PP与角柄皮肤之间。结果发现,由于被薄膜分隔,角柄皮肤没能参与鹿茸的再生,在角柄的PP和骨质侧发起了鹿茸再生,这一系列实验证明了PP就是发起鹿茸内部组织再生的基础。

1.2 鹿茸皮肤组织的再生

角柄皮肤是典型的头皮类型,鹿茸的皮肤不是角柄皮肤简单地延伸,而是一种特殊类型的皮肤。与角柄皮肤相比,茸皮具有更厚的表皮、缺少皮下疏松结缔组织层,但能够发起新毛囊的生长。此外茸皮有肥大多叶的皮脂腺,但缺乏竖毛肌和汗腺(Billingham et al., 1959; Goss, 1964; Bubenik, 1993; Li, Suttie, 2000; Li, 2010)。

茸皮的再生始于鹿角脱落后远端角柄皮肤伤口的愈合。伤口愈合是一个自然过程,用以恢复受损的皮肤(Goss, 1980; Goad et al., 1996)。在角柄顶端伤口愈合的过程中,当愈合的角柄皮肤由四周经

过PP末端向伤口中央区迁移时,愈合皮肤的类型开始由头皮转变成了茸皮。这说明PP组织与迁移的皮肤之间发生了相互作用(可能有信使分子的传递)(Li, 2010)。之后,由PP细胞增生形成的前后2个生长中心不断增大,覆盖于每个中心上的皮肤向上向外推开,与此同时扩张的皮肤已经具有了茸皮的特性。由此可见,快速分裂繁殖的PP组织细胞参与的化学诱导与机械刺激导致了茸皮的再生:化学诱导诱导皮肤类型由头皮转化为茸皮,机械刺激刺激了茸皮的快速生长(Li, 1997, 2010)。Li等(2007b)的插膜实验验证了这一结论,通过插膜将角柄骨膜的化学诱导与源于生长中心的机械刺激有效地区分开来,在缺乏机械刺激的情况下,由化学诱导形成的茸皮没能进一步生长。目前,虽然还没有机械刺激导致茸皮快速生长的实验证据,但在临床上,获得新皮肤的最有效的做法是使用机械牵拉来刺激新皮肤的生长(Austad, Rose, 1982; Timmenga et al., 1989; Brandy, 1991)。由此可以推测是机械刺激导致了茸皮的快速生长。

1.3 鹿茸血管组织的再生

与角柄中的动脉相比,鹿茸的动脉有非常厚的管壁和非常小的管腔(Waldo et al., 1949; Goss, 1983; Clark et al., 2006)。角柄与鹿茸的血管主要分布于骨膜和皮肤之间(Li, 1997)。组织解剖发现,角柄中的血管更贴近皮肤一侧(Clark et al., 2006; Li et al., 2014),因此在通过插膜实验将PP与角柄皮肤隔离时,主要血管都被分在了皮肤一侧(Li et al., 2007b),与角柄皮肤一样,在插膜实验中由于与骨膜的分离(被分到皮肤侧),角柄血管没能出现再生(Li et al., 2007b)。因此,与角柄皮肤一样,角柄血管的再生也是由PP产生的化学诱导与机械刺激而实现的。化学诱导的作用已通过鸡(*Gallus gallus*)胚尿囊绒毛膜的实验得到了验证(Li, 2009)。在绒毛膜上经过PP组织的血管能够被显著地吸引。机械刺激的作用现在虽没有直接的实验证据证明,但间接的研究表明,在受到机械牵拉时,体血管能够被很大程度的拉伸而不出现结构性的损伤(Fink, 1999)。在生理学上通过机械牵拉可使血管延长是一个普遍现象,由此可以推断在高强度的机械张力下角柄/鹿茸血管出现快速的生长。鹿茸血管的生长速度至少是体血管最佳拉伸度的20倍,可见鹿茸血管的拉伸度并非寻常(Li et al., 1999)。

1.4 鹿茸神经组织的再生

鹿茸的神经由角柄组织中的感觉神经轴突断端再生(Wislocki, Singer, 1946; Adams, 1979; Clark et al., 2006)。茸皮脱落后,感觉神经轴突断端在角柄的血管层保持休眠状态,等待春天的再生信号。在鹿茸、角柄中神经与血管并行(Wislocki, Singer, 1946; Li et al., 2007b),在插膜实验中,当薄膜将皮肤与PP分开时,主要的角柄神经也同时被分离在了角柄皮肤一端(Li et al., 2007b)。与血管和茸皮一样,鹿茸神经的再生也可能是通过PP产生的化学诱导和机械刺激而实现的。体外实验支持了化学诱导的作用这一假说(Li et al., 2014)。实验中,将PP衍生组织的提取物添加在人神经瘤母细胞(SK-N-SH)的培养液中,结果发现,该提取物能够有效的刺激该细胞的分化,使之长出大量神经轴突、形成像蜘蛛网样的网络。目前还没有支持后者机械张力导致鹿茸神经快速伸长的直接实验证据。但经典的研究表明,机械张力是刺激神经轴突快速生长和长时间延伸最有效的方式。并且这些神经的轴突束在极端拉伸的状态下仍能维持结构和功能的完整性(Pfister et al., 2004)。

综上所述,鹿茸再生是一个基于单一细胞类型(即PP细胞)的过程,在这一过程中,PP细胞的快速分裂和分化生成了再生鹿茸的软骨和骨(内部组织);与PP或PP衍生组织形成紧密相贴,从而建立相互作用是鹿茸茸皮、血管和神经(外部组织)再生的先决条件。其中的这一紧密相贴可能是有利于化学信号在PP与外部组织间的传递与交换,并将这些外部的角柄组织转变成相应的鹿茸组织(化学诱导)。与此同时,由PP衍生组织的快速生长增大所产生的机械张力导致了外部组织的快速延伸和扩展(机械刺激)。

2 鹿茸再生干细胞的定性

能够自我更新并有多重分化潜能是干细胞标志性特征(Bhattacharya et al., 2004)。研究发现PP细胞具有很强的增殖能力(Goss, 1983; Li et al., 2004),并且具有多重分化潜能(Berg et al., 2007; Li, 2009),因此被定义为鹿茸干细胞。

2.1 PP细胞的自我更新

PP细胞具有很强的增殖能力。角柄虽然是一个永久性的骨桩,但它每年都会随着每一次鹿茸的

再生和脱落而缩短(Goss, 1983; Li et al., 2004)。经计算得出每年大约有330万个角柄远端的PP细胞参与每次鹿茸的再生过程,在60 d内可再生出重达10 kg的鹿茸组织(Li, 2009)。

2.2 PP细胞的干细胞标记物

特异抗原、基因和酶类的表达被广泛用于干细胞的鉴定(Bhattacharya et al., 2004)。胚胎干细胞表达细胞表面抗原CD9。发现PP细胞表达高丰度的CD9抗原。主要的胚胎干细胞“多能基因”是SOX2、NANOG和POU家族的OCT4(Ginis et al., 2004),在PP细胞中也检测到了这几个基因的表达(Li, 2009)。最近,Rolf等(2012)也证实了在PP细胞中OCT4的表达。另外,在PP细胞中也发现了端粒酶表达活性和核干因子的增高。端粒酶活性与细胞的自我更新能力紧密相关(Yang et al., 2008),这正好解释了为什么极少数的PP细胞能在短时间内生成巨大的鹿茸组织团。核干因子的表达与干细胞增殖(Yang et al., 2008)和蝾螈(*Notophthalmus viridescens*)肢体再生(Maki et al., 2007)有关。在PP细胞中表达这些标记物都说明PP细胞不仅是一种具有组织特异的成体干细胞,而且在动物体一生中始终保留了胚胎干细胞的特性。

2.3 PP细胞的多分化潜能

作为干细胞还必须能够分化成多种不同的细胞类型。PP细胞具有多重分化潜能,在体外能够被诱导分化成软骨和骨细胞,PP细胞还能被诱导分化成脂肪细胞(Berg et al., 2007; Li, 2009);最近,还成功诱导PP细胞分化成了神经样细胞和肌肉细胞(Li et al., 2014)。因此,PP细胞真正属于“干细胞”的范畴,是鹿茸再生的组织细胞基础。

3 再生茸芽与经典再生芽基的比较

低等脊椎动物肢体在再生过程中首先要形成芽基,蝾螈的肢体再生是最经典的基于芽基的割处再生(Kierdorf et al., 2007)。Goss (1995)认为鹿茸具有与这些动物相同的再生机制。由于芽基的形成是经典割处再生的标志,因此这一再生模式又被称为“基于芽基”的过程。传统意义上的芽基被定义为由截肢后残桩断面多种已分化的细胞去分化后形成的锥形细胞团(Meschaks, Nordkvist, 1962; Goss, 1983; Mescher, 1996)。

根据鹿茸的“坐殿”现象(上一年鹿角没能及时脱落,这一年新生的鹿茸组织将未脱落鹿角包裹的现象)(Kierdorf, Kierdorf, 1992)和组织学的研究发现(Li et al., 2004, 2005),一些研究者对早期的茸芽是否属于典型的芽基提出了质疑。前文中的2个实验:即在鹿茸发起前,部分或全部切除PP(Li et al., 2007a)和在PP与角柄皮肤之间插膜(Li et al., 2007b),证明PP正是发起鹿茸再生不可或缺的组织。因此早期鹿茸再生所形成的茸芽不是主要来源于角柄残桩上各种组织去分化的细胞,而是来源于单一细胞(PP细胞)的直接分裂和分化。由此可见茸芽并不符合定义中所描述的经典芽基的特征。本文综合比较了鹿茸再生与蝾螈肢体再生的异同(Li, Suttie, 1994; Kierdorf et al., 2007)。

在形态学上再生茸芽的顶端是平的或凹的(Li et al., 2004),而再生芽基是凸的或锥形(Wallace, 1981)。伤口愈合是发起蝾螈肢体再生的前提(Tsonis, 2000),而鹿茸再生甚至当伤口皮肤不参与愈合过程时也能发生(Li et al., 2007b)。蝾螈再生芽基的形成需要神经的参与(Mescher, 1996),而茸芽的形成不受神经支配的影响(Wislocki, Singer, 1946; Li et al., 1993; Suttie et al., 1995b)。蝾螈芽基的形成需要残肢断面所有类型的细胞参与来完成肢体的再生(Mescher, 1996);而鹿茸再生是通过单一PP细胞的增殖与分化来实现的(Li et al., 2007a)。蝾螈残桩的伤口愈合是一个无疤愈合过程(Wallace, 1981);而鹿茸再生会在伤口愈合处留下一个疤痕,尽管有时可能不是很明显(Li, 2009)。蝾螈的再生芽基是无血管的(Mescher, 1996);而早期再生茸芽含有丰富的血管(Li et al., 2004)。蝾螈断肢芽基均匀分布着分裂细胞(Wallace, 1981);而早期茸芽中分裂细胞的分布却具有典型的局部性,主要在间充质层的组织和前软骨区的血管壁中(Li et al., 2005)。基底膜是位于皮肤真皮和表皮之间的一层很薄的组织,蝾螈再生芽基形成过程中缺少这层膜,而角柄残桩愈合的皮肤中却可检测到完好的基底膜(Li et al., 2004)。

Guo等(2015)通过检测鹿茸干细胞的细胞周期发现,大部分PP细胞停留在G0/1期,而以前的研究发现在具有再生或部分再生能力的蝾螈、两栖动物(Stocum, 2011)、哺乳动物肝脏(Michalopoulos, De-Frances, 1997)以及MRL小鼠(*Mus musculus*)(Murphy, Roths, 1979)(一种具有部分再生能力的小鼠)等的器官再生过程中,G2/M期滞留是再生细胞的

一种独特的细胞周期表型。与G0/1期相比,细胞大部分积累在G2/M期说明细胞增殖速率加强,而快速的细胞增殖又是再生所必须的(Bedelbaeva et al., 2010)。但与此同时由于G2/M是细胞周期中最后一个的检查点,因此也可能带来生长失控、转变成癌细胞的危险。PP细胞拥有再生的潜能并且同时还表现正常的细胞周期表型,即G0/1期细胞的积累(Li et al., 2014)。因此鹿茸不仅是哺乳动物唯一的割处再生研究模型,而且可能还是一种安全的割处再生的研究模型,揭示其机制可能为安全实现人类的断指和断肢再生做出贡献。

以上比较表明,再生茸芽从本质上有别于低等脊椎动物的再生芽基。而最近的一些研究报道重新定义了再生“芽基”,即再生芽基的形成也可能是基于干细胞的,而不仅仅是像经典的定义那样只来源于已分化细胞的去分化过程(Gargioli, Slack, 2004; Brockes, Kumar, 2008; Bely, Sikes, 2010),Bely和Sikes(2010)认为“芽基发起于未分化细胞的增殖,这些未分化细胞要么来源于去分化细胞,要么来源于干细胞”。基于这一新的定义,早期再生茸芽可顺理成章地被归于“芽基”范畴。

4 基于去分化与基于干细胞的再生比较

尽管“芽基”这一术语被重新定义(Wallace, 1981; Goss, 1995; Mescher, 1996; Tsonis, 2000),但基于细胞去分化的芽基与基于干细胞的芽基是否具有相同的再生能力?目前尚未可知。对相关文献的综述比较表明,干细胞或基于干细胞的过程更倾向于简单结构的再生,而基于去分化的过程则更倾向于复杂结构的再生,如器官或附属器官的再生。

每天血管或表皮细胞耗损的生理性再生,以及肾脏或肝脏切除后的补偿性再生都属于基于干细胞或祖细胞再生的典型例子(Goss, 1983; Stocum, 2002)。有尾目两栖类动物的四肢和其他身体复杂结构的再生主要是基于成体细胞去分化的过程(Goss, 1983; Stocum, 2002; Carlen, 2007)。一种合理的解释是,通过细胞去分化过程的再生是按照失去器官的蓝图先形成其雏形,这个雏形器官中可能包括了关节等复杂结构,然后进一步生长发育直到恢复到失掉器官的原来尺寸。与之相比,基于干细胞过程的再生是通过残存干细胞的快速分裂、分化,在原有的基础上不断加大组织量,最终补偿失

去的结构和功能,或者只有功能补偿。因此,就这种再生过程形成形态和结构复杂的器官或附属器官是非常困难的。

鹿茸是在形态和组织学上都复杂的哺乳动物附属器官,但其再生却是基于干细胞的过程。编码鹿茸形状(种属特异性)蓝图的密码是在鹿茸的再生过程中被逐渐破译和解码的(Zhao et al, 2015)。尽管鹿茸具有再生能力,但其是否能够再生出关节和肌肉目前还不清楚,因为鹿茸中没有这些组织结构,也许这正是反映了这一类型再生的局限性。

5 鹿茸再生过程中的局部因子和组织间的互作

上世纪末鹿茸研究的重点已从内分泌调控逐步转变到了对信号因子和组织互作的研究上。(Bubenik, 1982; Goss, 1983; Sadighi et al., 1994; Suttie et al., 1995a)。前期的研究发现,雄性激素(例如睾酮)的变化控制鹿茸的生长周期;而生长因子如(insulin-like growth factor 1, IGF1)的变化刺激鹿茸的生长发育(Li et al, 2009)。本文在这里着重讨论在鹿茸干细胞与邻近细胞以及细胞外基质之间互作在鹿茸发生和再生上的潜在意义。

5.1 局部因子对鹿茸再生的影响

Li等(2012)通过2D电泳与IPA(ingenuity pathway analysis)信号通路分析的方式第一次研究了PP与鹿脸部骨膜(facial periosteum, FP)间差异蛋白的表达情况。结果发现,有98种蛋白在PP中过表达,在这些过表达的蛋白中, Galectin-1, gelsolin-1 和 COL6A1 分别上调20、10和10倍。Galectin-1是一种据有多功能的碳水化合物结合蛋白,存在于细胞和胞外间质(extracellular matrix, ECM)中,能够调节免疫反应(Liu, 2000),调控再生骨骼肌中肌小管的生长(Kami, Senba, 2005),并能促进多种神经组织的生长(Horie et al., 1999)。通过IPA分析发现在PP细胞中 Galectin-1 与 Nanog, MYC, MYCN 相互作用。Gelsolin-1能够在高钙离子情况下结合并切断肌动蛋白微丝使其由凝胶态转变为溶胶态(Ono, 2007)。因此 Gelsolin-1 的功能主要与细胞运动有关。这可能解释了在鹿茸早期再生的芽基形成阶段,PP细胞能够向心迁移最后形成顶端间充质层的现象。COL6A1是一种胞外蛋白,由TGFB1(trans-

forming growth factor beta 1)调控通过SMAD3上调(Verrecchia et al., 2001),在ECM重塑中起作用,但其在鹿茸再生中的作用尚无人研究报道。

通过IPA分析在PP细胞中发现了两条主导的信号通路,即PI3K/AKT(phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B)和MAPK(mitogen-activated protein kinase)(Li, Sutties, 2012)。进一步的研究证明,这两条通路在维持干细胞的自我更新和多分化潜能上起着重要作用(Burdon et al., 2002)。Mount等(2006)通过研究早期鹿茸再生芽基时发现,经典Wnt信号通路的主要因子 β -catenin主要存在于鹿茸生长中心间充质层的增殖细胞中,这表明经典Wnt信号通路参与了早期鹿茸芽基的生长。与此相一致的是,前期研究中也发现经典的Wnt信号通路在两栖动物肢体再生的芽基形成与生长中起重要作用(Stoick-Cooper et al., 2007)。因此鹿茸再生的不同阶段可能由不同的信号通路所主导与调控。

5.2 组织间互作对鹿茸再生的影响

Li等(2003)首次提出了不同组织间的互相作用在鹿茸再生中起着不可或缺的作用。在组织取材过程中,注意到沿着角柄主干的长轴,角柄皮肤与PP组织之间结合的紧密程度是不同的。角柄近端约2/3的皮肤与PP组织疏松连接,而角柄远端1/3的皮肤与PP组织紧密相贴。这一现象提示鹿茸再生的发起可能需要PP与其上所覆盖的皮肤首先进行相互作用,而紧密相贴是建立这种相互作用的先决条件。因此,推测与角柄近端疏松连接的区域相比,远端紧密相贴的区域可能已经具备了发起鹿茸再生的条件,因此称角柄远端1/3区段为“致敏区”,而近端2/3区段为“休眠区”。

插膜实验验证了这一假说, Li等(2007b)人工制作了两种不同的角柄残桩:一种是从角柄与鹿茸的连接处锯掉其上的鹿茸(即保留全长的角柄),二是从角柄近端休眠区与远端致敏区的交界处锯掉致敏区的角柄和所附带的鹿茸(即只保留角柄休眠区段)。之后将不透性薄膜插入每种角柄残桩的PP与皮肤之间,使两种组织得到有效隔离。结果第一种类型的角柄残桩再生出了鹿茸,但所再生的鹿茸没有皮肤包裹(与PP隔离后皮肤没能参与鹿茸的再生过程)。与之相比,第二种类型的角柄残桩却没能再生出鹿茸。插膜实验表明建立PP与其上所覆盖皮肤间的相互作用是发起鹿茸再生的前提条件。

最近特种动物分子生物学国家重点实验室正在进行一系列实验用以揭示PP组织由休眠状态到致敏状态过程的内在分子机制。在转录水平上,致敏区PP组织中,包括胚胎的附属器官或肢体形态发生、血管和神经的发育、伤口愈合以及细胞分化负调控过程相关的基因显著上调;而与免疫相关的基因都表现了显著下调。这些基因的表达模式可能为鹿茸干细胞发起鹿茸的再生提供了一个适宜的微环境。在转录后水平上,在致敏区PP相对休眠区PP组织高表达的miRNAs中有两个应当被关注:miR-296和let-7系列(let-7a/b/c/f/i/j)(Ba et al., 2016)。MiR-296仅在胚胎干细胞中表达,其靶目标是转录因子Nanog(Houbaviy et al., 2003),而在蛋白质组学实验中检测到了PP细胞中有Nanog的表达(Li, Suttie, 2012)。因此,miR-296可能是通过激活PP细胞增殖从而在发起鹿茸再生中起重要作用。let-7a和let-7f调控IGF-1R的表达(Hu et al., 2014),而IGF-1是刺激鹿茸生长的重要的因子(Suttie et al., 1985)。因此,LET-7系列miRNA有可能参与了发起鹿茸再生的正调控。在表观遗传学水平上,发现致敏区PP不论组织还是细胞的全基因组DNA甲基化水平都显著低于休眠区PP(Yang et al., 2016)。这一发现首次将DNA甲基化程度与器官再生联系到了一起。

综上所述,发起鹿茸再生的鹿茸干细胞的激活是一个需要在多个水平上调控的复杂过程。睾酮浓度的下降和胰岛素样生长因子的上升触发了鹿茸再生。这些内分泌因子是通过直接或间接的通路来调节局部因子从而在鹿茸再生上发挥作用的;这些因子通过激活致敏区PP细胞的增殖来激活鹿茸再生芽基的形成。

6 鹿茸是独特的哺乳动物附属器官再生模型

研究鹿茸再生的重要目的之一是了解其是否能够作为一个独特的器官再生模型为人类健康服务。随着生物的进化,脊椎动物已经丧失了器官再生的能力(Wallace, 1981)。Neufeld (1985)从组织学上对小鼠断肢残桩的伤口愈合过程进行了详细的研究和报道,鹿茸的早期再生与小鼠断肢残桩的伤口愈合过程非常相似:1)残桩上伤口的愈合都伴随着整层皮肤参与以及疤痕的形成(Li et al., 2004);2)角柄残桩和小鼠断肢远端长骨的骨膜细胞都同时

被激活而进入快速增殖模式,并分化形成软骨;3)大量的软骨在两种残桩远端周围形成,而在断面上却只有少量软骨的形成(图7)。这两个过程中最显著的不同就是骨膜细胞的增殖潜能。在小鼠断肢愈合过程中,当新形成的少量软骨密封了断肢长骨的断面后骨膜细胞增殖就停止了,之后新形成的软骨很快通过重塑变成了骨。在鹿茸再生过程中,PP细胞一直持续分裂和分化,形成软骨组织直到完成整个鹿茸的再生。

鹿茸的完全再生依赖于PP细胞的存在。鹿茸内部组织软骨和骨的再生直接由PP细胞的增殖和分化而完成(Li et al., 2005; Li et al., 2007a);鹿茸的外部组织皮肤、血管和神经的再生通过接受PP细胞的化学诱导和机械刺激所实现(Li et al., 2005; Li et al., 2007a)。通过比较发现,哺乳动物如小鼠的断肢不具备再生出丢失器官,哪怕部分器官的能力,这是因为长骨骨膜细胞增殖潜能极为有限。如果能够通过去分化、重编程(Takahashi, Yamanaka, 2006)或转分化(Thorel et al., 2010)的方法来增强这些骨膜细胞的增殖潜能,使其接近或达到与PP细胞类似的能力,那就有望实现人类的断指、断肢的再生。事实上,有时在截肢后会出现长骨断端超长生长的现象(Firth et al., 2011),这一现象大部分都发生在12岁以下儿童身上,而从没有在骨骼成熟后的成年人身上发生。这可能提示儿童断肢长骨骨膜细胞还拥有部分的增殖能力,所以导致断肢长骨的进一步生长。如果能够适当的调控长骨骨膜细胞的再生能力,断肢长骨就有可能继续生长,而不仅仅是停留在伤口愈合的层面上。

7 总结与展望

综上所述,鹿茸作为唯一的能够完全再生的哺乳动物附属器官,提供了新的再生研究模型,对其再生机制的深入研究将为快速发展的再生医学提供独特的、有价值的治疗视角。要想提高断肢长骨骨膜细胞增殖潜力的途径很多,比如利用引入转录因子的方法将其反分化然后再分化或直接转分化成角柄骨膜样细胞,但这个途径需要知道角柄骨膜细胞的特殊标记物,鉴别这些标记物是实施这个途径的前提;另外,也可以通过直接局部或系统施以角柄骨膜细胞途径来增强长骨断端的再生能力,但实施前需要检测角柄骨膜细胞的免疫原性。

参考文献

- Adams J L. 1979. Innervation and blood supply of the antler pedicle of the red deer[J]. New Zealand Veterinary Journal, 27(10): 200-201.
- Austad E D, Rose G L. 1982. A self-inflating tissue expander [J]. Plastic and Reconstructive Surgery, 70(5): 588-594.
- Ba H X, Wang D T, Li C Y. 2016. MicroRNA profiling of antler stem cells in potentiated and dormant states and their potential roles in antler regeneration[J]. Molecular Genetics and Genomics, 291(2): 943-955.
- Bedelbaeva K, Snyder A, Gourevitch D, et al. 2010. Lack of *p21* expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 107(13): 5845-5850.
- Bely A E, Sikes J M. 2010. Latent regeneration abilities persist following recent evolutionary loss in asexual annelids [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 107(4): 1464-1469.
- Berg D K, Li C, Asher G, et al. 2007. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny[J]. Biology of Reproduction, 77(3): 384-394.
- Bhattacharya B, Miura T, Brandenberger R, et al. 2004. Gene expression in human embryonic stem cell lines: Unique molecular signature[J]. Blood, 103(8): 2956-2964.
- Billingham R E, Mangold R, Silvers K. 1959. The neogenesis of skin in the antlers of deer[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 83(12): 491-498.
- Brandy D A. 1991. A special tissue expander in combination with extensive scalp-lifting[J]. Aesthetic Plastic Surgery, 15(4): 349-354.
- Brookes J P, Kumar A. 2008. Comparative aspects of animal regeneration[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 24: 525-549.
- Bubenik G A. 1982. Endocrine regulation of the antler cycle [C]//In: Brown R D, editor. Antler Development in Cervidae. Caesar Kleberg Wildl. Res. Inst., Kingsville, TX. pp. 73-107.
- Bubenik G A. 1993. Morphological differences in the antler velvet of cervidae[C]//In: Ohtaishi N, Sheng H L, editors. Deer of China. Shanghai, China: Elsevier. pp. 56-64.
- Burdon T, Smith A, Savatier P. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells[J]. Trends in Cell Biology, 12(9): 432-438.
- Carlen B. 2007. Principles of Regenerative Biology[M]. New York: Academic Press.
- Clark D E, Lord E A, Suttie J M. 2006. Expression of *VEGF* and pleiotrophin in deer antler[J]. The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 288(12): 1281-1293.
- Fennessy P F, Suttie J M. 1985. Antler growth: Nutritional and endocrine factors[C]//In: Fennessy PF, Drew KR, editors. Biology of Deer Production. New Zealand: Royal Soc. New Zealand. p 239-250.
- Fink B. 1999. Behavior of soft tissue structures in surgical leg lengthening[J]. Orthopade, 28: 1007-1014.
- Firth GB, Masquijo J J, Kontio K. 2011. Transtibial Ertl amputation for children and adolescents: A case series and literature review[J]. Journal of Children's Orthopaedics, 5: 357-362.
- Gardiner D M, Endo T, Bryant S V. 2002. The molecular basis of amphibian limb regeneration: Integrating the old with the new[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 13(5): 345-352.
- Gargioli C, Slack J M. 2004. Cell lineage tracing during *Xenopus* tail regeneration[J]. Development, 131(11): 2669-2679.
- Ginis I, Luo Y, Miura T, et al. 2004. Differences between human and mouse embryonic stem cells[J]. Developmental Biology, 269(2): 360-380.
- Goad D L, Rubin J, Wang H, et al. 1996. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I [J]. Endocrinology, 137(6): 2262-2268.
- Goss R J. 1961. Experimental investigations of morphogenesis in the growing antler[J]. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 9: 342-354.
- Goss R J. 1964. The role of skin in antler regeneration[C]//In: Montagna W, Billingham RE, editors. Advances in Biology of Skin. Wound Healing. New York: Pergamon Press. pp. 194-207.
- Goss R J. 1970. Problems of antlerogenesis[J]. Clinical Orthopaedics and Related Research, 69: 227-238.
- Goss R J. 1980. Prospects of regeneration in man[J]. Clinical Orthopaedics and Related Research, 151: 270-282.
- Goss R J. 1983. Deer Antlers. Regeneration, Function and Evolution[M]. New York, NY: Academic Press, pp. 5-10.
- Goss R J. 1990. Of antlers and embryos[C]//In: Bubenik G, Bubenik A, editors. Horns, Pronghorns, and Antlers. New York: Springer-Verlag. pp. 299-312.
- Goss R J. 1995. Future directions in antler research[J]. The Anatomical Record, 241(3): 291-302.
- Guo Q, Wang D, Liu Z et al. 2015. Effects of *p21* gene down-

- regulation through rnaï on antler stem cells *in vitro*[J]. PLoS One, 10(8): e0134268.
- Horie H, Inagaki Y, Sohma Y, et al. 1999. Galectin-1 regulates initial axonal growth in peripheral nerves after axotomy [J]. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 19(22): 9964-9974.
- Houbaviy H B, Murray M F, Sharp P A. 2003. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs[J]. Developmental Cell, 5 (2): 351-358.
- Hu W, Li T, Wu L, et al. 2014. Identification of microRNA-18a as a novel regulator of the insulin-like growth factor-1 in the proliferation and regeneration of deer antler[J]. Biotechnology Letters, 36(4): 703-710.
- Kami K, Senba E. 2005. Galectin-1 is a novel factor that regulates myotube growth in regenerating skeletal muscles [J]. Current Drug Targets, 6(4): 395-405.
- Kierdorf H, Kierdorf U. 1992. State of determination of the antlerogenic tissues with special reference to double-head formation[C]//In: Brown R, editor. The Biology of Deer. New York: Springer-Verlag. pp. 525-531.
- Kierdorf U, Kierdorf H, Szuwart T. 2007. Deer antler regeneration: Cells, concepts, and controversies[J]. Journal of Morphology, 268(8): 726-738.
- Kierdorf U, Stoffels E, Stoffels D, et al. 2003. Histological studies of bone formation during pedicle restoration and early antler regeneration in roe deer and fallow deer[J]. The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 273(2): 741-751.
- Li C. 1997. Studies of pedicle and first antler development in red deer (*Cervus elaphus*)[D]. Thesis for Ph.D., University of Otago, Supervise: Dr Jimmy Suttie and Proffessor John Harris
- Li C. 2009. Annual antler renewal: A unique case of stem cell-based mammalian organ regeneration[C]//In: Arcus V, editor. 19th Annual Queenstown Molecular Biology Meeting. Queenstown. pp. 38.
- Li C. 2010. Exploration of the mechanism underlying neogenesis and regeneration of postnatal mammalian skin-deer antler velvet[J]. International Journal of Medical and Biological Frontiers, 16(11/12): 1-19.
- Li C, Clark D E, Suttie J M. 2003. Deer pedicle height, tissue interactions and antler evolution[J]. Deer, 12(6): 333-338.
- Li C, Harper A, Puddick J, et al. 2012. Proteomes and signalling pathways of antler stem cells[J]. PLoS One, 7: e30026.
- Li C, Littlejohn R P, Suttie J M. 1999. Effects of insulin-like growth factor 1 and testosterone on the proliferation of antlerogenic cells *in vitro*[J]. The Journal of Experimental Zoology, 284(1): 82-90.
- Li C, Mackintosh C G, Martin S K, et al. 2007a. Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum deletion[J]. Cell and Tissue Research, 328 (1): 65-75.
- Li C, Sheard P W, Corson I D, et al. 1993. Pedicle and antler development following sectioning of the sensory nerves to the antlerogenic region of red deer (*Cervus elaphus*)[J]. The Journal of Experimental Zoology, 267(2): 188-197.
- Li C, Suttie J. 2000. Histological studies of pedicle skin formation and its transformation to antler velvet in red deer (*Cervus elaphus*)[J]. The Anatomical Record, 260(1): 62-71.
- Li C, Suttie J. 2012. Morphogenetic aspects of deer antler development[J]. Frontiers in Bioscience (Elite Edition), 4 (1): 1836-1842.
- Li C, Suttie J M. 1994. Light microscopic studies of pedicle and early first antler development in red deer (*Cervus elaphus*)[J]. The Anatomical Record, 239(2): 198-215.
- Li C, Suttie J M, Clark D E. 2004. Morphological observation of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*) [J]. Journal of Morphology, 262(3): 731-740.
- Li C, Suttie J M, Clark D E. 2005. Histological examination of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*)[J]. The anatomical record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 282(2): 163-174.
- Li C, Yang F, Li G, et al., 2007b. Antler regeneration: A dependent process of stem tissue primed via interaction with its enveloping skin[J]. Journal of Experimental Zoology Part A, Ecological Genetics and Physiology, 307 (2): 95-105.
- Li C, Zhao H, Liu Z, et al. 2014. Deer antler-a novel model for studying organ regeneration in mammals[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 56 (12): 111-122.
- Liu F T. 2000. Galectins: A new family of regulators of inflammation[J]. Clinical Immunology: The Official Journal of the Clinical Immunology Society. 97(2): 79-88.
- Maki N, Takechi K, Sano S, et al. 2007. Rapid accumulation of nucleostemin in nucleolus during newt regeneration[J]. Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 236(4): 941-950.
- Meschaks P, Nordkvist M. 1962. On the sexual cycle in the reindeer male[J]. Acta veterinaria Scandinavica, 3: 151-162.
- Mescher A. 1996. The cellular basis of limb regeneration in urodeles[J]. The International Journal of Developmental

- Biology, 40(4): 785-795.
- Michalopoulos G K, De Frances M C. 1997. Liver regeneration[J]. Science, 276: 60-66.
- Mount J, Muzylak M, Allen S, et al. 2006. Antlers may regenerate from persistent neural crest like stem cells[C]//In: Bartos L, Dusek A, Kotrba R, Bartosova-Vichova J, editors. Advances in Deer Biology. Prague. pp. 161.
- Murphy E D, Roths J B. 1979. A Y chromosome associated factor in strain BXSB producing accelerated autoimmunity and lymphoproliferation[J]. Arthritis and Rheumatism, 22(11):1188-1194.
- Neufeld D A. 1985. Bone healing after amputation of mouse digits and new limbs: Implications for induced regeneration in mammals[J]. The Anatomical Record, 211(2):156-165.
- Ono S. 2007. Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics[J]. International Review of Cytology, 258: 1-82.
- Pfister B J, Iwata A, Meaney D F, et al. 2004. Extreme stretch growth of integrated axons[J]. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 24(36): 7978-7983.
- Rolf H J, Niebert S, Niebert M, et al. 2012. Intercellular transport of Oct4 in mammalian cells: A basic principle to expand a stem cell niche?[J]. PLoS One 7:e32287.
- Sadighi M, Haines SR, Skottner A, et al. 1994. Effects of insulin-like growth factor- I (IGF- I) and IGF- II on the growth of antler cells *in vitro*[J]. The Journal of Endocrinology, 143(3): 461-469.
- Stocum D L. 2001. Stem cells in regenerative biology and medicine[J]. Wound Repair Regen, 9(6): 429-442.
- Stocum D L. 2002. Regenerative biology and medicine[J]. Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions, 2 (3): 270-273.
- Stocum D L. 2011. The role of peripheral nerves in urodele limb regeneration[J]. The European Journal of Neuroscience, 34(6): 908-916.
- Stoick-Cooper C L, Weidinger G, Riehle K J, et al. 2007. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration[J]. Development, 134(4): 479-489.
- Suttie J M, Fennessy P F, Lapwood K R, et al. 1995a. Role of steroids in antler growth of red deer stags[J]. The Journal of Experimental Zoology, 271(2): 120-130.
- Suttie J M, Gluckman P D, Butler J H, et al. 1985. Insulin-like growth factor 1 (IGF- 1) antler-stimulating hormone?[J] Endocrinology, 116(2): 846-848.
- Suttie J M, Li C, Sheard P W, et al. 1995b. Effects of unilateral cranial sympathectomy either alone or with sensory nerve sectioning on pedicle growth in red deer (*Cervus elaphus*) [J]. The Journal of Experimental Zoology, 271 (2): 131-138.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 126(4): 663-676.
- Thorel F, Nepote V, Avril I, et al. 2010. Conversion of adult pancreatic alpha- cells to beta- cells after extreme beta-cell loss[J]. Nature, 464(7292): 1149-1154.
- Timmenga E J, Schoorl R, Bos J D, et al. 1989. An improved model for tissue expansion and flap research in the rabbit [J]. British Journal of Plastic Surgery, 42(3): 301-305.
- Tsonis P A. 2000. Regeneration in vertebrates[J]. Developmental Biology, 221(2): 273-284.
- Verrecchia F, Vindevoghel L, Lechleider R J, et al. 2001. Smad3/AP-1 interactions control transcriptional responses to TGF-beta in a promoter-specific manner[J]. Oncogene, 20(26): 3332-3340.
- Waldo C, Wislocki G, Fawcett D. 1949. Observations on the blood supply of growing antlers[J]. The American Journal of Anatomy, 84(1): 27-61.
- Wallace H. 1981. Vertebrate Limb Regeneration[M]. Chichester: John Wiley & Sons.
- Wislocki G B. 1942. Studies on the growth of deer antlers. I. On the structure and histogenesis of the antlers of the Virginia deer (*Odocoileus virginianus borealis*) [J]. Developmental Dynamics, 71(3): 371-451.
- Wislocki G B, Singer M. 1946. The occurrence and function of nerves in the growing antlers of deer[J]. Journal of Comparative Neurology, 85(1): 1-19.
- Yang C, Lu X, Sun H, et al. 2016. Analysis of genomewide DNA methylation reveals differences in DNA methylation levels between dormant and naturally as well as artificially potentiated pedicle periosteum of sika deer (*Cervus nippon*) [J]. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 326(6): 375-383.
- Yang C, Przyborski S, Cooke M J, et al. 2008. 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, 26(4): 850-863.
- Zhao H, Liu Z, Chu W, et al. 2015. Organ morphogenesis, bioelectricity and organ morphogenetic model in mammals-deer antler[J]. Animal Production Science, 56(6): 946-952.

(责任编辑 王晓平)