



IGF1对生长30d鹿茸的体外培养鹿茸生长中心干细胞的影响

冯海华¹, 赵丽红¹, 闭兴明¹, 李光凤¹, 岳占碰¹, 李春义², 邓旭明¹

(¹ 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; ² 新西兰 INVERMAY 农业研究中心, Mosgiel, 新西兰 50034)

摘要: 【研究目的】利用细胞培养技术, 探讨胰岛素样生长因子(IGF1)对生长30d的鹿茸体外培养不同代数梅花鹿鹿茸生长中心干细胞(鹿茸干细胞)的影响; 【方法】原代分离、培养生长30d的鹿茸的梅花鹿鹿茸干细胞, 将第2代、5代、8代鹿茸干细胞经含有不同浓度的IGF1(0, 1, 3, 和10 nM)作用后, 在培养24 h后用³H-胸腺嘧啶核苷测定法检测每分钟衰变数(DPM)值; 【结果】取材于生长30d鹿茸的干细胞, 全部IGF1处理组(1, 3, 10nM)都显著高于对照组(0nM)($p<0.01$)。3个不同浓度IGF1处理组的平均值和最高值都是离体培养2代的细胞最低(分别为2987和3743 DPM/mg蛋白), 而培养5代的细胞最高(分别为10320和12180 DPM/mg蛋白), 第8代的细胞又开始下降(分别为8754和11568 DPM/mg蛋白); 【结论】IGF1能够促进鹿茸干细胞分裂增殖, 生长30d鹿茸的干细胞在离体培养, 不同培养时期的鹿茸干细胞对IGF1刺激的敏感度不同。

关键词: IGF1; 鹿茸; 干细胞; 梅花鹿

中图分类号: Q78, S852.65 **文献标识码:** A

Effects of Insulin-Like Growth Factor 1 on the Proliferation of Antler Organic Center Stem Cells at 30 days Growing Period of Antler in Vitro

Feng Haihua¹, Zhao Lihong¹, Bi Xingming¹, Li Guangfeng¹, Yue Zhanpeng¹, Li Chunyi², Deng Xuming¹

(¹College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062;

²AgResearch Limited Invermay Agricultural Centre Puddle Alley, Mosgiel, New Zealand, Private Bag 50034)

Abstract: 【OBJECTIVE】Using cell culture techniques to investigate the effects of insulin-like growth factor 1 (IGF1) on the proliferation of antler organic center stem cells (antler stem cells) from various passages at 30 days growing period of antler in vitro; 【METHOD】Antler stem cells were isolated from sika deer antler of growing 30 day and cultured. The second, fifth and eighth population cells were incubated with 0, 1, 3, and 10 nM IGF1. Thymidine incorporation assay was applied after 24 hours of culture respectively to determine the disintegration per minute (DPM) value; 【RESULTS】The proliferation of cells from growing 30 day's antler in the experimental group (1, 3, 10nM) was significantly higher than that of the control group (0nM) ($p<0.01$). The average and maximal value of the proliferation of cells in the experimental group was lowest in the second population cells (2987 and 3743 DPM/mg respectively), highest in the fifth population cells (10320 and 12180 DPM/mg), and decreased in the eighth population cells again (8754 and 11568 DPM/mg); 【CONCLUSION】IGF1 can enhance the proliferation of antler stem cells cultured in vitro. The sensitivity of IGF1 on the antler stem cells from various passages at 30 days growing period of antler in vitro.

Key words: IGF1, antler, stem cell, Sika Deer

基金项目: 国家自然科学基金两个基地项目(30510403163), 国家自然科学基金项目(30571340)。

第一作者简介: 冯海华, 女, 1970年出生, 山东省临朐人, 讲师, 博士, 主要从事兽医药理学方面的研究。通信地址: 130062 吉林省长春市西安大路5333号吉林大学畜牧兽医学院, Tel: 0431-87986162 E-mail: fhh70@163.com。

通讯作者: 邓旭明, 男, 1964年出生, 教授, 博士, 主要从事兽医药理学方面的研究。通信地址: 130062 吉林省长春市西安大路5333号吉林大学畜牧兽医学院, Tel: 0431-87986162 E-mail: xumingdeng@yahoo.com。

收稿日期: 2007-11-08, 修回日期: 2007-12-04。

鹿角独特之处在于它的每年更新,这在哺乳动物中绝无仅有,因而成为研究器官再生的理想模型^[1,2]。鹿角生长周期受雄激素的调节,春天睾酮含量下降,鹿角脱落,鹿茸再生随即发生;夏天睾酮水平保持最低,鹿茸快速生长;秋天睾酮含量急剧上升,鹿茸的生长停止和完全骨化、脱掉茸皮;冬天由于睾酮处于高水平,使鹿角紧附于角柄,直到次年春天睾酮水平下降才脱落,并触发新一轮鹿茸的再生^[3,4]。在生长期,鹿茸的生长呈典型的S形曲线,开始时较慢,生长中期最快呈几何级数,然后生长速度下降,IGF1可能是刺激鹿茸生长的主要生长因子^[1,5]。该研究在梅花鹿鹿茸生长的30d时分离鹿茸干细胞传代培养,检测干细胞对IGF1刺激的敏感度,以探讨影响早期鹿茸生长速度的因素。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验于2005-03/2006-06在吉林大学畜牧兽医学院基础兽医研究室完成。选定4岁龄的健康梅花鹿(农科院左家特产研究所提供),在鹿茸生长的30d进行取材。

1.2 试剂

DMEM培养基(Gibco);胰蛋白酶(Sigma);I型胶原酶(Invitrogen);犊牛血清(Invitrogen);台盼兰(Sigma);DMSO(Sigma);IGF1(Roche)。

1.3 组织分离

选定4岁龄的健康梅花鹿,在鹿茸生长30d锯取鹿茸。锯下的鹿茸在细胞培养室的准备间消毒,并用手术刀切取5cm长的鹿茸尖部。在细胞培养间将鹿茸尖部从中央部纵向切开以暴露茸尖内部组织。依据Li等^[2]的取材方法,在解剖显微镜下定位切取鹿茸的间质层。

1.4 细胞培养

用平衡缓冲盐溶液清洗鹿茸间质层组织三次。将组织切碎,再用缓冲液清洗。将清洗后的组织碎块移入含有鹿茸组织消化液(90%DMEM培养液,10%的犊牛血清,青(100 U/ml)、链(100 μg/ml)霉素,以及最终浓度为200 U/ml的I型胶原酶)的培养瓶中。于37℃温箱中孵育3h左右。消化后的组织和游离出的细胞通过离心除去消化液,再用细胞培养液清洗两次后转移至培养瓶中培养。培养3d后换液并继续培养直到大多细胞群落相互融合为止。用胰酶-EDTA消化掉贴瓶生长的细胞,并对消化掉的细胞进行台盼兰染色以确定细胞的活性。活性确定后的细胞被分装到含有1ml冻存液的冻存管中(约为1百万个细胞/ml/管)逐步降温冻存至液氮罐中。

1.5 实验设计

细胞长满培养面的85%~90%时,用胰酶-EDTA将细胞消化掉并用台盼兰染色法确定细胞活性。将细胞以 2×10^4 细胞/ml的密度接种到24孔板的孔中,分别培养2代、5代、8代细胞。培养48h后,用等量不含犊牛血清但含有不同浓度的IGF1(0, 1, 3, 和10 nM)的培养液来替换孔中正常培养液,每个处理都为4孔重复,继续培养24h。在培养结束前2h,于培养液中加入2.5 μCi/ml的³H-胸腺嘧啶核苷。培养结束后用4%的三氯乙酸(TCA, 10%)清洗细胞3次。再用500 μl 1N NaOH溶解细胞。吸取200 μl溶解液于液体闪烁计数器中测定放射强度。另吸取200 μl溶解液进行蛋白含量测定。最终结果以4孔的算术平均数±标准差来表示,单位为DPM/mg蛋白。

1.6 数据统计

采用SPSS10.0对所得数据进行方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以确定处理组(含有不同浓度的IGF1组)与对照组(无IGF1组)之间差异的显著性。

2 结果

2.1 鹿茸干细胞的分离、培养

用含10%犊牛血清的DMEM培养的鹿茸干细胞第3天全量换液除去未贴壁细胞,倒置显微镜下观察,鹿茸干细胞此时已贴壁,细胞形态均匀,呈梭形,细胞呈克隆性生长,贴壁的细胞迅速增殖。台盼兰检测结果表明试验中所用的细胞活性全部都在90%以上。

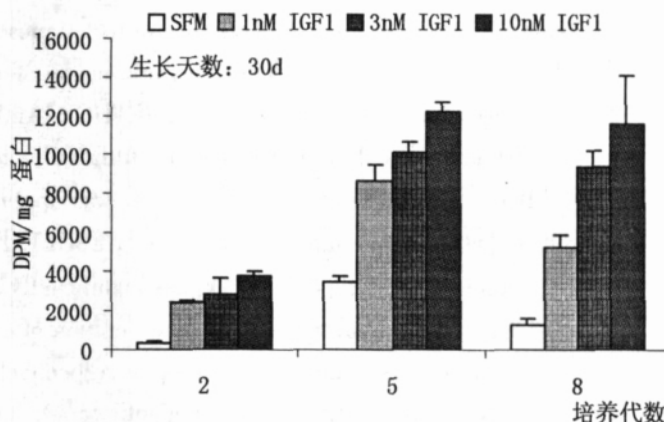


图1 IGF1对体外培养不同代数鹿茸生长中心干细胞分泌蛋白含量的影响

2.2 IGF1对鹿茸干细胞的影响

结果见图1。取材于生长30d鹿茸的干细胞,全部IGF1处理组都显著高于对照组($p < 0.01$)。3个不同浓度IGF1(1, 3, 10 nM)处理组的平均值和最高值都是离体培养2代的细胞最低(分别为2987和3743 DPM/mg蛋白);而培养5代的细胞最高(分别为10320和12180 DPM/mg蛋白);到了第8代的细胞这

些值又开始下降(分别为 8754 和 11568 DPM/mg 蛋白)。这说明 IGF1 能够促进鹿茸干细胞分裂增殖,生长 30d 鹿茸的干细胞在离体培养,不同培养时期的鹿茸干细胞对 IGF 刺激的敏感度不同,离体培养 2 代后对 IGF 的敏感度仍处于较低的水平,传代到第 5 代时其敏感度才达到高峰,到第 8 代时敏感度又开始下降。

3 讨论

近几年 Li 等^[2,9]连续报道了如何在未经染色的、新鲜鹿茸的组织切面上精确定位和取材鹿茸干细胞的方法。该取材方法的建立为在细胞和分子水平上研究鹿茸生物学,以及在建立鹿茸生物医学模型上提供了有利的手段。笔者通过这种方法获得的细胞能满足实验需要。

IGF 是一种促细胞分化的生长因子,存在于鹿茸角顶部再生鹿茸角增殖区,促进间充质干细胞及软骨细胞的增殖。在鹿茸组织内有 IGF 和 IGF 的表达,IGF 和 IGF 受体在鹿茸角顶部也有表达,体外试验证实 IGF 和 IGF 均可促进鹿茸细胞的增殖^[7]。实验所有 IGF1 处理组,鹿茸干细胞的分裂繁殖都与加入的 IGF1 浓度呈明显的量-效关系。这与 Sadighi 等^[8]的报道结果相似,他们发现 3-10nM 范围的 IGF1 浓度对培养的鹿茸尖部细胞具有最大的刺激作用。

研究通过细胞培养证实生长早期的鹿茸干细胞,在不同培养代数对 IGF1 刺激的敏感度不同,在离体培养 2 代后对 IGF 的敏感度仍处于较低的水平,传代

到第 5 代时其敏感度才达到高峰,到第 8 代时敏感度又开始下降。说明鹿茸干细胞本身对 IGF1 刺激的敏感度的变化也是影响鹿茸生长速度的主要因素。

参考文献

- [1] Goss RJ. Future directions in antler research [J]. *Anat Rec*, 1995,241(3):291-302.
- [2] Li C, Suttie JM. Tissue collection methods for antler research[J]. *Eur J Morphol*, 2003,41(1):23-30.
- [3] Umapathy G, Sontakke SD, Reddy A, et al. Seasonal variations in semen characteristics, semen cryopreservation, estrus synchronization, and successful artificial insemination in the spotted deer (*Axis axis*) [J]. *Theriogenology*, 2007,67(8):1371-1378.
- [4] Li C, Wang W and Manley T, et al. No direct mitogenic effect of sex hormones on antlerogenic cells detected in vitro [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2001,124(1):75-81.
- [5] Fennessy P, Corson I and Suttie J, et al. Antler growth patterns in young red deer stags. In: Brown R, editor. *The Biology of Deer*[M]. Mississippi State University: Springer-Verlag, 1992:487-492.
- [6] Li C, Clark DE, Lord EA, 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.
- [7] Price J, Allen S. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004,359(1445):809-822.
- [8] Sadighi M, Haines SR and 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(3):461-469.