

鹿茸再生干细胞体外培养及核结合因子 a1 的检测

孙红梅, 杨福合, 邢秀梅, 刘琳玲, 赵海平, 褚文辉, 李春义*

(中国农业科学院特产研究所, 吉林 吉林 132109)

摘要: 为了建立鹿茸再生干细胞的体外分离培养方法, 进一步了解鹿茸再生、骨化等生理过程, 本试验采用酶消化和组织块培养相结合的手段, 成功进行了鹿茸再生干细胞的体外培养及传代扩增, 对其生长曲线进行了初步分析, 并对核结合因子 a1 (Cbfa1) 基因的表达情况进行了免疫细胞化学的分析, 结果表明用酶消化和组织块培养法能够很好地获得鹿茸再生干细胞; 鹿茸再生干细胞表达 Cbfa1 基因。

关键词: 角柄骨膜干细胞; 体外培养; Cbfa1

中图分类号: S825

文献标识码: B

文章编号: 0529-5130(2010)12-0076-03

鹿茸是鹿科动物头盖骨上的附属性器官, 由于每年能够脱落并完全再生一次, 再生鹿茸生长速度极快(每天可达 2~3 cm), 且其骨质结构分化很细等特点, 成为很好的研究再生和骨化的生物模型^[1-4], 受到许多学者的关注。20 多年的研究表明, 鹿茸的发生和再生是建立在干细胞基础上的^[5], 称为鹿茸再生干细胞。这一发现已成为鹿茸生物学研究的一个新的突破。本研究建立了鹿茸再生干细胞的体外培养方法, 并对其生物学特性进行了初步研究, 为进一步探讨鹿茸再生干细胞的诱导分化及鹿茸再生、骨化等生理机制奠定了基础。

1 材料方法

1.1 材料

3 岁龄雄性梅花鹿 1 头, 取自中国农业科学院特产所实验动物基地。培养液 DMEM、胎牛血清购于 Gibco 公司, 噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) 和多聚赖氨酸 (Polylysine) 购于 SIGMA 公司。鼠抗-runx2 抗体购于 Zymed 公司, 羊抗鼠 IgM-HRP 购于 Santa Cruz Biotechnology 公司, DAB 显色试剂购于天津灏洋生物制品科技有限公司。

1.2 角柄骨膜干细胞的分离与培养

将刚处死的梅花鹿的鹿头带回实验室, 对角柄及其周围的鹿毛进行处理, 刮净, 用碘酒进行皮肤消毒, 然后用酒精棉球脱碘, 消毒好之后拿到无菌室, 无菌条件下取出角柄骨膜, 将角柄骨膜剪成 1 mm³ 大小组织块, 然后用 100 U 的 I 型胶原酶于 37 ℃ 进行消化, 消化到组织块周围出现毛边时, 离心去除消化液, 用 DMEM 洗 1 次, 然后均匀接种到细胞培养

瓶中, 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养。5~7 d 后, 待细胞生长至 80% 融合时用 0.08% 胰酶消化, 传代, 备用。

1.3 形态学观察

接种后在倒置显微镜下随时观察组织块周围细胞的形态, 并作摄像纪录。将传代的细胞制备细胞爬片, 培养 3~5 d 后, 进行 HE 染色, 观察细胞形态。

1.4 MTT 法检测细胞的增殖

将传代培养的细胞消化后, 调整细胞接种密度为 1×10⁴, 接种于 96 孔培养板中, 每孔接种 200 μL, 设 9 组, 每组均设 6 个重复孔, 接种后第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 和 9 天, 分别取出 1 组, 加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL, 37 ℃ 孵育 4 h 后, 弃上清, 加入 150 μL DMSO, 避光振荡 10 min, 用全自动酶标仪测定 490 nm 处吸光度值。

1.5 免疫细胞化学检测核结合因子 a1 (core binding factor, Cbfa1)

将第 3 代细胞调整细胞密度为 1×10⁵ 个/mL, 接种于加有盖玻片 (经多聚赖氨酸处理) 的 6 孔培养板内, 培养 5 d 后取出细胞爬片, 用预冷固定液 (甲醇: 丙酮=1:1) 于 4 ℃ 固定 10 min, PBS 浸洗后, 3% H₂O₂ 5 min, 0.1% Triton-X100 30 min, 山羊血清 37 ℃ 封闭 30 min, 加入鼠抗-runx2 抗体, 于 4 ℃ 过夜。PBS 浸洗 3 次, 加羊抗鼠 IgM-HRP, 37 ℃ 孵育 30 min。PBS 洗 3 次。DAB 染色 10 min, 自来水洗涤后, 苏木素染液复染, 脱水、透明、中性树胶封片。显微镜下观察照相。

2 结果

2.1 细胞培养

利用倒置相差显微镜观察培养不同阶段的细胞形态, 消化后的组织块均匀飘浮于培养基中, 1~2 d 后, 组织块逐渐粘附于细胞培养瓶底部, 3~4 d 可见有细胞从组织块周围爬出, 5~7 d 的后观察细胞

收稿日期: 2010-01-07; 修回日期: 2010-09-01

基金项目: 国家自然科学基金 30971664。

作者简介: 孙红梅 (1978-), 女, 助理研究员。

* 通讯作者: 李春义 (1959-), 男, 研究员, 博士, 主要从事鹿茸生物学研究, E-mail: chunyi.li@agresearch.co.nz。

的生长情况。培养基颜色略黄,组织块四周发散出较多的骨膜细胞,呈放射状向周边生长,胞体较大,呈梭状。传代培养细胞长势良好,传代培养后,12~24 h 即可完全贴壁,细胞呈较均一的长梭形,3 d 左右细胞可铺满整个培养瓶底面,可继续传代扩增。传代

后的细胞形态无明显变化,性质稳定。对细胞爬片进行 HE 染色,倒置显微镜下观察角柄骨膜干细胞为梭形,胞核染成蓝色,胞浆染成红色。呈漩涡状生长。胞体较大。见下图 1。

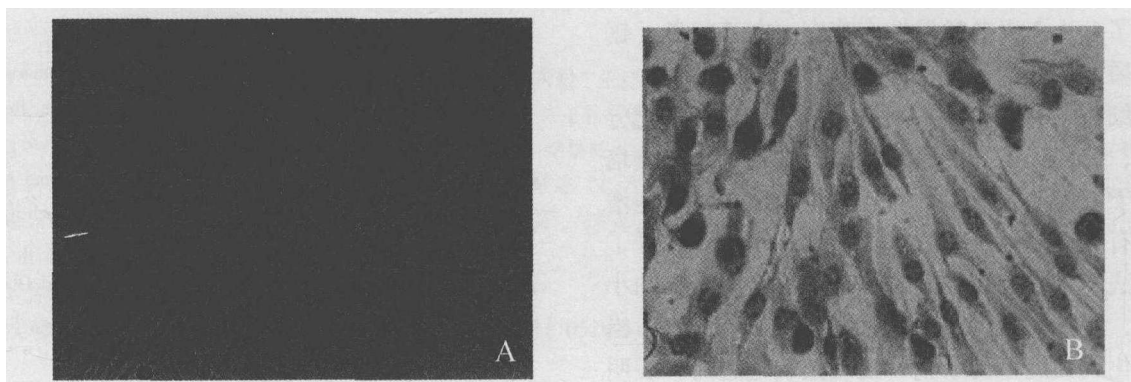


图 1 传代培养的角柄骨膜细胞 (B 为 HE 染色)

2.2 角柄骨膜细胞生长曲线

接种后 1~2 d, 细胞数量变化不大, 为细胞生长的潜伏期, 第 3 天细胞数量明显增多, 说明细胞已进入指数增生期, 至接种后第 7 天细胞增长达到高峰, 以后细胞生长速度较为缓慢, 进入平台期。见图 2。

2.3 Cbfa1 的表达

免疫细胞化学结果显示, 角柄骨膜细胞经 DAB 显色, 胞浆染成深棕色 (图 3) 说明 Cbfa1 表达呈阳性。

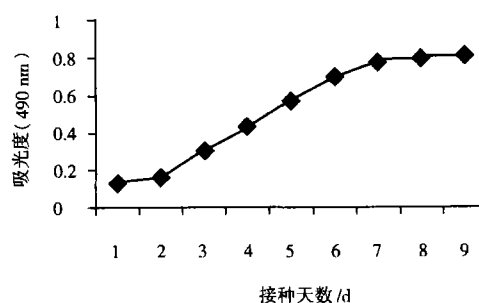


图 2 角柄骨膜细胞生长曲线

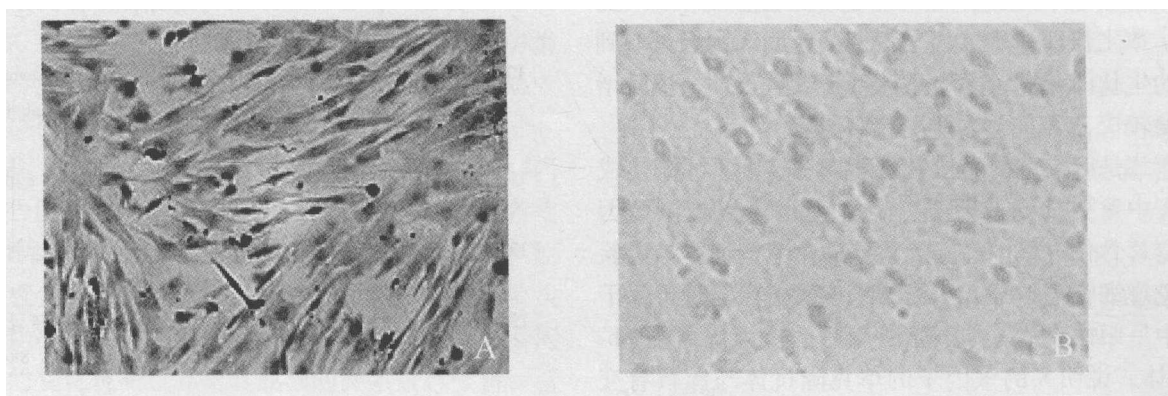


图 3 角柄骨膜细胞 DAB 显色结果 (B 为阴性对照)

3 讨论

研究表明, 鹿茸的再生是基于干细胞的过程^[4-5]。这种干细胞定位于鹿茸的角柄骨膜中, 被称之为鹿茸再生干细胞。具有定向分化的能力。在鹿茸生物学研究等领域具有广泛的应用前景。

这种细胞仅定位于狭长的角柄骨膜中, 骨膜组织是一层依附于骨干上的薄膜, 采集不是很便利。所以本试验在将梅花鹿处死后, 连同角柄将鹿头整体取下。在实验室内剔除皮肤表面的细小绒毛、严格消毒, 然后带到无菌室以工字型开口切开角柄皮肤, 暴露骨膜, 剔出结缔组织, 然后再用鼠牙镊子逐条地将

其取下。这样,骨膜很容易从骨干上剥离,又保证了整个取样过程的无菌操作。另外,组织的采集也有季节差异。大量试验表明,鹿茸的再生来源于角柄骨膜^[6]。因此,我们推测在鹿角脱落前后骨膜会增厚,以供应鹿茸再生的细胞需求,而在此时进行骨膜组织的采集会比较容易,组织量也会比较丰富。所以,本试验选择了1头3岁龄的雄性梅花鹿,在其花盘(锯茸后的骨质残留)脱落前夕,进行采样。

原代细胞培养一般采用组织块培养或者酶消化分散培养法,骨膜为致密的结缔组织,普通的组织块培养法不利于细胞的发散且耗时较长,酶消化法细胞增殖快,但有大量的杂细胞掺入。所以,本试验选择了联合培养法,首先使用 collagenase I 不完全消化细小的组织块,将消化后的组织进行贴壁培养。这样,当组织块消化到四周不再平整,出现絮状毛边时,表明在消化酶的作用下组织块边缘的细胞被消化下来。且组织块容易贴壁,内部状态好的细胞容易爬出。7 d 后,培养液的颜色发生了变化,显微镜下可以观察到细胞大量地从组织块周围爬出,呈长梭形,越靠近组织块细胞越致密,个体也越小。欧阳钧等^[7]培养人骨膜成骨细胞时发现,随着骨膜细胞不断地分裂长满培养瓶后,细胞体积逐渐增大,分泌功能增强,分泌物堆积在细胞周边,使细胞周界模糊不清。本试验也有类似现象发现。传代后的细胞形态无明显变化,性质稳定。因此,通过离体培养,使体内低量的角柄骨膜细胞在体外实现扩增是可行的。

细胞的生长曲线显示,细胞生长的潜伏期较短,一般4 h后即开始贴壁,24 h可完全贴壁,3~7 d为细胞指数生长期,之后为平台期。说明细胞经过一到两天的生长滞留期,第3天达到指数生长期,细胞增殖速度较快,第7天达到生长期顶峰。

鹿茸是鹿头上的骨质性器官^[8-10],而Cbfal是成骨过程中重要的调节因子^[11-13],所以可以推测该因子在鹿茸骨化过程中会起到重要的调节作用。本试验通过免疫细胞化学的方法检测了该因子在鹿茸再生干细胞中呈阳性表达。本试验所用的一抗为抗人的Cbfal抗体,说明人的该因子的单克隆抗体与鹿具有交

叉反应,可以定性检测鹿的该因子的表达情况。但其调节机制及具体的调节功能目前还不清楚。本研究为以后的鹿茸骨化及再生的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Li C, Suttie J M, Clark D E. Histological examination of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*) [J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2005, 282: 163-174.
- [2] Li C, Harris A J, Suttie J M. Tissue Interactions and Antlerogenesis: New Findings Revealed by a Xenograft Approach [J]. *J Exp Zool*, 2001, 290: 18-30.
- [3] Li C, Suttie J M, Clark D E. Clark Morphological Observation of Antler Regeneration in Red Deer (*Cervus elaphus*) [J]. *J Morphol*, 2004, 262: 731-740.
- [4] Li C. Development of deer antler model for biomedical research [J]. *Recent Adv & Res Updates*, 2003, (4): 255-274.
- [5] Li C, Yang F, Allan S. 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.
- [6] Li C Y, Colin G, Mackintosh & Shirley K, et al. Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum deletion [J]. *Cell Tissue Res*, 2007, 328: 65-75.
- [7] 欧阳钧,王前,王国黄,等.人骨膜成骨细胞培养及初步观察[J].*中华骨科杂志*, 1995, 15(11): 123-126.
- [8] 赵丽红,岳占斌,张学明,等.鹿茸的软骨内骨化及其调控机理的研究进展[J].*经济动物学报*, 2006, 10(4): 238-241.
- [9] Bubenik G A, Sempere A J, Hamr J, et al. Developing Antler, a Model for Endocrine Regulation of Bone Growth Concentration Gradient of T3, T4, and Alkaline Phosphatase in the Antler [J]. *Calcif Tissue Int*, 1987, 41: 38-43.
- [10] Samarendra N, Baksi and Jarrett W, Newbrey. Bone Metabolism During Antler Growth in Female Reindeer [J]. *Calcif Tissue Int*, 1989, 45: 314-317.
- [11] 王华. Cbfa与成骨细胞分化和骨发育[J]. *国外医学儿科学分册*, 2000, 27(1): 15-18.
- [12] 夏玉莲,孙元明,李雨民.核结合因子a1表达的调控[J]. *中国地方病学杂志*, 2003, 22(6): 561-563.
- [13] 朱帮福,卢兹凡,陈南春.成骨分化特异性转录因子Cbfal[J]. *国外医学分子生物学分册*, 2001, 23(2): 88-91.