

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.45.021

[http://www.crter.org]

褚文辉, 王大涛, 鲁晓萍, 李春义. 基于干细胞的器官再生研究模型-鹿茸[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(45):7961-7967.

基于干细胞的器官再生研究模型-鹿茸***

褚文辉, 王大涛, 鲁晓萍, 李春义(中国农业科学院特产研究所, 吉林省特种动物分子生物学重点实验室, 吉林省长春市 130000)

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 鹿茸干细胞及其微环境中存在多种生长因子, 包括胰岛素样生长因子、表皮生长因子及血管内皮细胞生长因子等, 现已发现的多种生长因子均在其他组织中发现, 并没有一种是鹿茸中所特有的, 因此鹿茸或鹿茸多肽的神奇效果可能是几种物质混合作用的结果。

2 文章增加的新信息: 鹿茸干细胞存在于鹿的生茸区骨膜及角柄骨膜中。其上覆盖的皮肤构成了干细胞所需的特定微环境。干细胞与微环境通过一系列的外因子包括特异的细胞基质组分及结合生长因子等相互作用, 以应对组织中间歇性有规律的自我更新, 或者对一定情况的适当应答, 如组织损伤, 应答组织修复所需要的细胞群转移。干细胞微环境中特异的相互作用力是促发这一系列活动的关键。

3 提供临床借鉴的价值: 鹿茸干细胞是惟一能够驱动哺乳动物器官完全再生的成体干细胞, 其上的皮肤构成了鹿茸干细胞所需的特殊微环境。鹿茸再生包含了骨组织、皮肤、血管、神经组织的完全再生, 多种细胞因子参与其中。另一方面, 由新鲜鹿茸组织提取的多肽类物质, 在皮肤及骨组织伤口愈合中, 具有明显的刺激作用。进一步探索其作用机制对骨伤愈合及皮肤再生提供了新的思路与方法。总之, 鹿茸作为一种特殊的生物医学模型探索哺乳动物器官再生机制, 可以给迅速发展的人类再生生物学和再生医学研究提供有益的内容。

关键词:

干细胞; 干细胞综述; 鹿茸干细胞; 再生; 细胞因子; 骨组织; 皮肤组织; 血管; 神经组织; 973 项目

主题词:

干细胞; 骨和骨组织; 骨再生; 细胞因子类

基金资助:

国家 973 前期研究专项(2011CB111500)*; 吉林省自然科学基金项目(20101575)*; 国家 863 项目(2011AA100603)*

褚文辉, 男, 1984 年生, 江苏省泰兴市人, 汉族, 2009 年江苏科技大学毕业, 硕士, 助理研究员, 主要从事鹿茸干细胞及生物反应器研究。
jake-chu@hotmail.com

通讯作者: 李春义, 博士, 研究员, 中国农业科学院特产研究所吉林省特种动物分子生物学重点实验室, 吉林省长春市 130000
lichunyi1959@163.com

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344
(2013)45-07961-07

修回日期: 2013-05-29
(201305068/D · W)

摘要

背景: 鹿茸是惟一能够周期性再生的复杂哺乳动物器官, 其再生过程是基于干细胞的存在。研究鹿茸再生机制, 探索干细胞在哺乳动物器官再生中的作用对于再生生物学和再生医学研究具有重要的意义。

目的: 综述鹿茸再生研究, 干细胞及相关因子在鹿茸再生中的作用。

方法: 应用计算机检索 1994 年 1 月至 2012 年 10 月 PubMed 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)。检索词为: deer antler; antler regeneration; stem cell, 并限定文章语言种类为 English。此外还手动查阅相关专著数部。纳入文章所述内容涉及鹿茸再生的组织学、形态学、鹿茸干细胞与微环境研究、相关细胞因子。排除重复研究和纳入标准无关的文章。

结果与结论: 共检索文献 87 篇, 最终纳入文献 36 篇。决定鹿茸发生及再生的关键组织分别为生茸区骨膜和角柄骨膜, 这两种组织中的细胞被定义为鹿茸干细胞。鹿茸干细胞上覆盖的皮肤组织构成了这些干细胞活动所需的特定微环境。多种细胞因子如胰岛素样生长因子、性激素、表皮生长因子、血管内皮生长因子等参与了鹿茸再生及快速生长调控。探索鹿茸干细胞微环境内各组分间相互作用所需的信号因子, 阐明其调控机制, 对于揭示鹿茸再生之谜, 对了解干细胞在哺乳动物器官再生的作用具有十分重要的意义。

Deer antler: A stem cell-based organ regeneration research model

Chu Wen-hui, Wang Da-tao, Lu Xiao-ping, Li Chun-yi (Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals, Changchun 130000, Jilin Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Deer antlers are the unique mammalian organs which can periodically regenerate, and the process is known as a stem cell-based event. Exploring the underlying mechanism of deer antler regeneration and identifying the functional role of stem cell in mammalian organ regeneration are of great importance to regenerative biology and regenerative medicine.

OBJECTIVE: To review the relevant literatures of the research progress in antler regeneration, as well as effects of stem cells and cytokines on antler regeneration.

METHODS: A computer-based online search of PubMed (1994-01/2012-10) was performed for acquiring the articles in English by using the key words of "deer antler; antler regeneration; stem cell. In addition, manual

Chu Wen-hui, Master, Assistant researcher, Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals, Changchun 130000, Jilin Province, China
jake-chu@hotmail.com

Corresponding author: Li Chun-yi, Doctor, Investigator, Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals, Changchun 130000, Jilin Province, China
lichunyi1959@163.com

Accepted: 2013-05-29

search was also performed for those literatures that cannot be readily obtained from internet search. Articles concerning antler regeneration histology, morphology, antler stem cells and micro-environmental studies, and related cytokines. Repetitive studies or articles that are unrelated to the criteria set for the article were excluded.

RESULTS AND CONCLUSION: A total of 87 articles were obtained and finally 31 articles were selected. The key tissue types for antler regeneration are antlerogenic periosteum and pedicle periosteum, the cells within which are known as antler stem cells. The covering skin of antlerogenic periosteum and pedicle periosteum constitutes the functional niche for antler stem cells. Numerous cytokines are involved in the process of antler fast growing and full regeneration, including insulin-like growth factor, sex hormones, human epidermal growth factor, and vascular endothelial growth factor. It is vitally important to identify the interacting molecules between the antler stem cells and their niche cell types, and to define the role of each molecule that plays in antler regeneration, which will greatly advance our knowledge of the stem cell-based mammalian organ regeneration.

Subject headings: stem cells; bone and bones; bone regeneration; cytokines

Funding: the National Key Basic Research Special Foundation of China, No. 2011CB111500*; the Natural Science Foundation of Jilin Province, No. 20101575*; the National "863" Program of China, No. 2011AA100603*

Chu WH, Wang DT, Lu XP, Li CY. Deer antler: A stem cell-based organ regeneration research model. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(45):7961-7967.

0 引言 Introduction

再生生物学和再生医学以实现人体受损或衰竭器官(有功能的组织)的部分或者完全的体内原位复制为最终目的(Ref)。遗憾的是,在进化过程中绝大多数的哺乳动物失去了完全再生器官的能力,人类仅保留了有限的能力再生出部分的毛发、牙齿、皮肤、肝脏等(Ref)。有趣的是,鹿茸作为复杂的哺乳动物器官却与进化规律相悖,能够周期性的完全再生(Ref)。春天,骨化的鹿角从永久性骨质残桩即角柄上脱落,新生的鹿茸随即从角柄的末端再生出来。新生的鹿茸被覆以特殊皮肤,人们称之为茸皮。夏天,鹿茸进入快速生长期,在此期间鹿茸的骨质、血管、神经及茸皮都保持着惊人的生长速率。秋天,逐渐钙化的鹿茸基部阻碍了血液对生长鹿茸的供给,导致了茸皮的脱落,冬天,鹿茸已经完全钙化成为裸露的骨质结构,也就是鹿角,这种情况一直保持到来年的春天。新一轮的鹿角脱落会再次触发周期性的鹿茸再生(Ref)。鹿茸拥有令人惊异的再生能力,最初的研究认为鹿茸再生和低等两栖动物割处再生类似,都是源于断端细胞的反分化而实现的(Ref),但最新的研究结果发现鹿茸的再生是一个基于干细胞的过程。驱动鹿茸再生的干细胞来源于鹿额骨上永久性骨质残基-角柄上附着的一层骨膜(Ref),进一步的研究证明角柄骨膜细胞具有干细胞的特性,这便为实验研究提供了一个探索基于干细胞的哺乳动物器官完全再生的机会。现将鹿茸再生的组织基础,干细胞在鹿茸再生中的作用、干细胞微环境与鹿茸再生以及相关的细胞因子的作用作一综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 文献来源 由第一作者检索,检索时限为1994年

1月至2012年10月,检索数据库为 PubMed 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)。检索词为: deer antler; antler regeneration; stem cell。

1.2 资料筛选及评价 纳入标准:文章所述内容涉及鹿茸再生的组织学、形态学、鹿茸干细胞与微环境研究、相关细胞因子。排除标准:排除重复研究和纳入标准无关的文章。

1.3 资料提取与文献质量评价 初检得到了87篇相关文献。最后符合要求的为36篇。主要是关于鹿茸再生的组织基础、干细胞与微环境以及与鹿茸再生相关因子,包括综述和研究论文,统一整理后进行综述。

2 结果 Results

2.1 纳入文献基本情况 文献[1-9]研究了鹿茸再生的组织学基础及鹿茸再生的组织学过程;文献[9-15]研究了鹿茸干细胞的发现及干细胞鉴定结果;文献[16-19]研究了鹿茸干细胞所处微环境及微环境各组分间的相互作用;文献[20-31]研究了多种生长因子对鹿茸干细胞及微环境的影响。文献[32-36]研究了鹿茸多肽在皮肤伤口愈合及软骨细胞和成骨样细胞增殖中的作用,及鹿茸多肽对骨伤愈合刺激作用和延缓关节软骨的退变作用。

2.2 鹿茸再生的组织基础 组织学研究发现,鹿角脱落前期,在纵向切面上角柄远端部分变得粗糙且血管化明显。鹿角部分的陷窝苏木精-伊红染色较深,而角柄部分的陷窝颜色较浅,可以清晰地用一条虚拟的黑线将死的鹿角和活的角柄区分开来^[1]。角柄的远端的皮肤紧密地覆着在骨质上,没有发现皮下存在疏松结缔组织。鹿角一旦脱落,角柄残桩远端的皮肤随即肿胀并向内迁移以覆盖于断面。这一皮层从外观上看,已经类似于茸皮:油亮且毛发稀疏。组织学分析显示,茸皮的表皮较厚并已经新生了毛囊和大的皮脂

腺^[2]。与此层紧紧相连的角柄骨膜 (pedicle periosteum, PP)组织也开始增厚,其内部是分化活跃的区域。随着时间的推移,两个新月形的生长中心直接从增厚的远端角柄骨膜形成。一个在前部,另一个在后部。其内部是新生软骨组织,软骨组织上覆盖着一层增生的角柄骨膜细胞。在其后的生长过程中,两个生长中心分别形成了向前及向后的生长点。这两个生长点进一步生长就变成后来的鹿茸主干及眉枝。由鹿茸再生的组织学及形态学研究可以看出,在鹿茸再生的早期阶段,角柄皮肤和角柄骨膜都发生了增生及迁移。驱动鹿茸再生的生长中心则是角柄骨膜细胞的直接衍生物,原角柄骨质部分没有直接参与。然而,组织学及形态学的证据并不能确定鹿茸再生的组织基础就是角柄骨膜。但是,可以得出的结论是鹿茸再生不同于低等两栖生物的断肢再生,它没有经历断端所有细胞的反分化过程^[3],也不是由再生芽基 (blastema)所驱动的,而是增生的角柄骨膜衍生出的生长中心所驱动。因此,鹿茸再生是一种特殊的哺乳动物器官割处再生,很可能是基于干细胞的过程。另一个很有趣的现象是,角柄断面伤口的愈合过程中,在鹿场的开放环境中,如此大的一个创面(角柄直径5-8 cm),很少有感染或者炎症的发生,因此角柄/鹿茸可以作为一个天然免疫研究模型。

通过对鹿茸再生过程的组织学及形态学研究发现,鹿茸的周期性再生源于角柄骨膜组织膨大而形成的生长中心。Li等^[4]设计了一个巧妙的角柄骨膜剔除实验,从角柄残桩上完全剔除角柄骨膜组织,其后在角柄骨膜缺失的情况下观察鹿茸的再生情况。结果发现,在角柄骨膜完全剔除侧,一头鹿在整个生茸季节完全没有生茸的迹象,而对照侧角柄却长出了完整的三叉茸。另一个精巧的实验用以验证角柄的骨质部分是否参与了鹿茸再生,使部分剔除角柄骨膜,结果发现鹿茸的发生/再生出现在剩余角柄骨膜末端与其上覆盖着皮肤的交汇处,完全没有角柄骨质的参与。通过插膜实验将一块不透膜插入到骨质和覆盖的皮肤之间^[5],结果发现,插入的不透膜阻止了皮肤组织参与鹿茸的再生,所有3组不透膜插入组都再生出了无皮鹿茸。这些实验精准无误地将鹿茸再生的组织基础锁定为角柄骨膜,正是它驱动了每年周期性的鹿茸再生,没有皮肤和骨质的参与。

角柄骨膜无疑是驱动鹿茸再生的组织基础,但是包括角柄骨膜在内的角柄并不是与生俱来的。在青春期雄鹿的额外脊上有一块被称之为生茸区骨膜的组织,角柄则是它的直接衍生物。生茸区骨膜的发现被称之为鹿茸研究史上的里程碑^[6]。将生茸区骨膜移植到鹿身体的其他部位,如前额或者前腿,可以在移植处形成完整的鹿茸,这种鹿茸和正常的鹿茸一样拥有

角柄并能够每年周期性再生^[7]。利用病毒载体对萌发前的生茸区骨膜进行LacZ标记^[8],结果发现随后生成的角柄及初角茸中,几乎所有类型的组织中都有Xgal阳性细胞的存在,包括间充质、前软骨、软骨、骨,说明角柄和鹿茸的组织细胞都来源于生茸区骨膜。将生茸区骨膜细胞进行长时间体外培养,能形成一个较大的透明状骨质柱。在组织学上,这些骨柱的结构井然有序,类似于角柄或鹿茸中的骨小梁。其中央区域较多的是分化了的细胞,它们活跃地形成胞外基质,在外围是分化程度低的梭形细胞^[9]。生茸区骨膜无疑是一块极为特殊的组织,其内的细胞包含了鹿茸发生及再生所需的全部信息。另外,生茸区骨膜还具有类似胚胎组织的多能性,能衍生出间充质、前软骨、骨等多种组织。因此,决定鹿茸发生、再生的组织基础分别是生茸区骨膜及角柄骨膜,它们很有可能是一种多能干细胞组织。

2.3 鹿茸干细胞 生茸区骨膜无疑是一块极其特殊的组织,Li等^[9]将生茸区骨膜总结为一块后生遗留的胚胎组织。因而,鹿茸的周期性再生是一种基于干细胞的过程,生茸区骨膜的直接衍生物角柄骨膜也是一种特殊的成体干细胞组织。最近的研究发现生茸区骨膜、角柄骨膜细胞都表达相当水平的胚胎干细胞特异标记物CD9, Oc4, SOX2和Naog^[8]。另外,这两种细胞均有较高的端粒酶及Nucleostemin蛋白活性。端粒酶与细胞的自我更新能力紧密相关^[10]。Nucleostamin的表达与干细胞增殖及蝶螈的芽基再生形成有关^[11-12]。近期,研究表明角柄骨膜细胞还表达Stro-1^[13],一种间充质干细胞标记物。通过干细胞表面标记物测定,已经可以确定生茸区骨膜和角柄骨膜细胞均为特殊的成体干细胞。鉴定干细胞,另一个极具说服力的是分化潜能实验。已有数个不同研究小组对生茸区骨膜及角柄骨膜细胞的分化潜能进行了研究^[14]。体外培养时,在微粒体培养体系中添加地塞米松和抗坏血酸,生茸区骨膜和角柄骨膜细胞都能分化为软骨细胞及成骨细胞^[15]。有趣的是,当在生茸区骨膜及角柄骨膜的培养基中添加亚油酸或者在生茸区骨膜细胞培养基中添加兔血清时^[14],它们会分化为脂肪细胞。最近,通过与已知的C₂Cl₂肌肉祖细胞系进行共培养,成功地将生茸区骨膜细胞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也能达到相同的效果。当生茸区骨膜细胞被培养在能够促进神经元分化的N₂培养基时,它能够分化为神经元样细胞,在细胞的4周有类似神经轴突的结构。这些实验清晰地证明了,生茸区骨膜和角柄骨膜细胞,特别是生茸区骨膜细胞均具有多能性,在适当的条件下能分化为多种类型的细胞,因而,鹿茸再生是一种基于干细胞的割处再生过程。

2.4 鹿茸干细胞微环境及组分间相互作用 在每年的再生周期中,角柄骨膜中的干细胞被激活、应答以驱动周期性的鹿茸再生。一般而言,成体器官内干细胞的维持需要它们与周围已分化的细胞紧密相连,处于特定的构造中,也就是干细胞的微环境中。干细胞与外界环境通过一系列的外因子包括特异的细胞基质组分及结合生长因子等相互作用,以应对组织中间歇性有规律的自我更新,或者对一定情况的适当应答,如组织损伤,应答组织修复所需要的细胞群转移。干细胞微环境中特异的相互作用力是促发这一系列活动的关键。对鹿茸再生过程的解剖学及形态学研究表明,在鹿茸发生及鹿茸每年的再生过程中,均需要干细胞微环境的参与。

在研究生茸区骨膜萌发及异位茸形成的过程中,Goss等^[16]发现生茸区骨膜组织上覆盖的皮肤构成了生茸区骨膜萌发所需的特定微环境。但是有3个部位的皮肤不能提供生茸区骨膜萌发所需的微环境,他们分别是鼻子前端(鼻镜),尾巴腹面和鹿脊背中线的皮肤,而将生茸区骨膜移植到鹿身体其它任意部位皮下都诱导生茸区骨膜萌发形成异位鹿茸。最近的实验表明,裸鼠的皮肤也不能构成生茸区骨膜萌发所需的微环境,也不能和移植的生茸区骨膜相互作用,并将自身转化成茸皮^[17]。将生茸区骨膜移植到鹿的后背,尾巴及裸鼠皮下,仅在皮下膨大形成骨粒。比较鹿的鼻镜,尾腹部皮肤,裸鼠的皮肤,可以发现它们几乎都缺乏毛囊。鹿的背部皮肤确有毛发存在,但这一区域几乎是鹿身上毛发最稀疏的部分,且其中以针毛居多,因此毛囊包括真皮乳突细胞在内一定在相互作用中发挥了重要作用。进一步研究发现在裸鼠模型中共移植生茸区骨膜和鹿皮,生茸区骨膜可以有效地诱导共移植的鹿皮表皮转化为茸皮表皮,这种转化只有在与真皮相连接皮下疏松结缔组织及部分真皮剔除的情况下发生^[6]。生茸区骨膜与其上覆盖皮肤构成的微环境,不但可以将鹿皮转化为茸皮,反过来分化的茸皮也激活了生茸区骨膜的快速分裂繁殖。生茸区骨膜细胞的分化命运依赖于它们相对于皮肤内表面的位置。那些贴近内层皮肤的生茸区骨膜细胞分化成了有丝分裂静止干细胞,稍许远离的成了过渡性扩增细胞,更远的分化成了前软骨细胞。鹿皮的相关特性在最近的生茸区骨膜移植实验中也有发现。实验中,将生茸区骨膜组织翻转后移植皮下(使生茸区骨膜细胞层正对皮肤),自然条件下应分化为过渡性扩增细胞的内层生茸区骨膜细胞却成了分裂静止的干细胞,而外层生茸区骨膜细胞发育成了过渡性扩增细胞^[18]。因此,这一微环境中各组分间的作用是相互,必然存在着交换信息的信号物质。下一步的研究如果能够在体外条件下模拟3种不同的干细胞微环境:生茸区骨膜

与茸皮相互作用微环境,生茸区骨膜与普通鹿皮相互作用微环境,生茸区骨膜与非萌发皮肤相互作用微环境(鼻镜/后背/尾巴腹部),并探索体外微环境中各种游离小分子物质的差异并研究其功能,必将有助于探索鹿茸再生之谜。

鹿茸的再生同样也需要角柄骨膜被其上覆盖的皮肤通过物理或化学的方法来激发。在研究角柄骨膜组织采样技术时,Li等^[19]发现沿着角柄从远端到近段皮肤和角柄骨质的结合程度是不一样的。近端角柄皮肤和角柄骨膜是疏松结合的,而远端是紧密结合的。由于先前的研究已经发现,生茸区骨膜和其上覆盖皮肤紧密结合是鹿茸发生的先决条件。那么鹿茸的再生是否也需要角柄骨膜和其上皮肤的紧密结合?这样的结合是否也是有助于相关信号分子到达靶位点以诱导鹿茸再生?如果这个假设成立,那就不难解释为什么角柄远端区域角柄骨膜和其上的皮肤结合非常紧密而近段比较疏松。也就是说,不同的结合程度说明了角柄骨膜不同的应激状态,紧密结合区的角柄骨膜是已经致敏的,在条件具备是可以立即驱动鹿茸的再生,这样的结合也有助于相关信号分子的传递;而疏松结合区域的角柄骨膜是还没有被其上皮肤所致敏的。为了验证这个假设,再次进行了插膜实验^[6]。插膜前,在紧密及疏松结合域的交界处截去远端部分从而人为制造了一个角柄残基。为确保截断的正确,沿着角柄的长轴做了一个纵向的皮肤切口以确定疏松和紧密结合的边界。当疏松结合域的角柄骨膜和其上的皮肤被不透膜有效阻隔时,鹿茸再生被有效地抑制了,而阴性对照侧却长出了一个完整的二杠茸。而紧密结合域的膜插入却未能阻碍鹿茸的再生,没有皮肤的参与角柄骨膜长出了一个无皮茸,与疏松区插膜实验形成了鲜明的对比。实验的结果证明了,远端紧密结合区域的角柄骨膜已被致敏,隔离其和皮肤的信号传递并没有能够抑制鹿茸的再生。但是疏松区的信号交流通道一旦阻塞,鹿茸再生即停止。下一步的研究,应该集中于如何寻找抑制鹿茸再生的信号因子。

总而言之,鹿茸的发生及再生都需要有适宜的皮肤参与,这种需求与不同鹿茸组织类型无关,而与鹿茸生成组织的结合程度有关,以驱动扩散诱导因子的分泌。鹿茸生成细胞接受这些信号后,快速增殖及分化以构建鹿茸组织。

2.5 细胞因子与鹿茸再生 鹿茸再生是一种基于干细胞的过程,这种干细胞定位于鹿的角柄骨膜中。研究发现,干细胞微环境及其相互作用在鹿茸再生中起着至关重要的作用。这种相互作用很可能是通过多种生长因子在起作用。研究发现,类胰岛素生长因子在快速生长的鹿茸尖部各个分层:表皮/真皮层、间充质层、前软骨层、软骨层都有表达,但是表达量存在着

差异。在真皮/表皮层中,胰岛素生长因子1的含量都比其他三个层中的高^[20]。原位杂交和免疫组化发现胰岛素生长因子1在鹿茸尖端及上部的软骨细胞及成骨细胞中均存在阳性信号。然而,在中间及底部部分,胰岛素生长因子1仅在骨组织周围的成骨细胞中刚刚可以检测到^[21]。在体外培养时,通过放射性标记发现胰岛素生长因子1对鹿茸软骨膜细胞、鹿茸间质细胞、鹿茸软骨细胞都有促有丝分裂作用^[22]。进一步研究发现,鹿茸被锯掉后鹿血浆中的胰岛素生长因子1浓度迅速升高,这表明鹿茸中存在胰岛素生长因子特异性结合位点,远距分泌途径产生的胰岛素生长因子通过血液循环对生长的鹿茸产生作用,刺激鹿茸的快速生长。直接的证据是表皮/真皮层中胰岛素生长因子的含量明显高于其他分层,而且越远离表皮/真皮层含量越低,到骨化区域仅在骨组织周围的成骨细胞中刚刚可以检测到。因而,随着胰岛素生长因子在鹿茸中由尖部到基部含量的下降,各个部分相应的增殖潜能也下降。但是,胰岛素生长因子是如何影响鹿茸快速增殖的,是通过单一的靶位点还是多个信号通路,这一方面的研究还不是非常明确。另一方面,鹿茸的生长周期、体内的胰岛素生长因子水平周期以及性激素周期之间存在着微妙的关系。Suttie等^[23-24]报道周期性胰岛素生长因子1水平与角柄及初角茸的生长存在显著地正相关。鹿茸的快速生长期总出现在睾酮周期的低水平期,而在胰岛素生长因子1的高水平期或上升期^[23],对生茸期的雄鹿去势并不影响鹿茸的生长。然而在体外的无血清培养基中无论是在正常的生理水平还是低谷期睾酮对来源于鹿茸增殖层的细胞都没有直接的促有丝分裂作用。并且,在体外条件下大范围的睾酮浓度并不能促进这些细胞的有丝分裂,但在一定的浓度下(0.1-5.0 nmol)能够降低胰岛素生长因子1的促有丝分裂作用^[25]。

鹿茸拥有不可思议的生长速度,在一些大的鹿种中可达到1.0-2.0 cm/d^[26]。鹿茸的延长是通过间质细胞的快速分裂和软骨内成骨重塑进行的。TUNEL检测发现在软骨膜,未分化的间充质和鹿茸软骨膜细胞中凋亡的比例较高,而皮肤细胞中凋亡比例低^[27]。其中,间充质层TUNEL阳性细胞高达64%这比任何报道的成体组织中的含量都要高。有趣的是,较高的增殖速率恰恰也保持在间充质细胞,皮肤(尤其是毛囊中)和骨膜的细胞中;在软骨膜和骨膜组织的纤维层中,增殖的速率较低,在软骨组织几乎没有。在间充质层细胞中同时存在高度的细胞凋亡及增殖表明这一区域是鹿茸的生长区。这种大范围的细胞程序性死亡及增殖反映了器官发生和组织重塑之间异乎寻常的同步速率,因而,内在的或者系统的调控因子保持着鹿茸组织中生长和凋亡之间的平衡,这正是下一步

需要进行研究的重点。检测凋亡相关基因发现,在鹿茸软骨膜/间充质和非矿化的软骨中**bcl-2**和**bax**的表达量均比皮肤和矿化的软骨中的高^[27]。免疫组化发现,**bax**表达于间充质,成软骨细胞,软骨细胞,成骨细胞,骨细胞和破骨细胞中。也就是说,在鹿茸的快速再生过程中伴随着细胞的程序性死亡,这一现象贯穿于鹿茸骨骼的发育、生长及重塑过程。这也许可以解释为什么鹿茸保持着惊人的生长速率而不发生癌变。

鹿茸是一种特殊的骨组织,在其纵切面上由远端至近端依次可分为表皮/真皮层、间充质层、前软骨层、过渡区、软骨层及骨。鹿茸免疫组化研究发现,表皮生长因子(EGF)定位于鹿茸的皮肤、间充质、软骨细胞中以及成骨细胞系包括成骨前体细胞,成骨细胞,破骨细胞中。表皮生长因子受体(EGFR)同样表达于间充质、软骨和成骨细胞中^[28]。在皮肤中,表皮生长因子受体的分布更加广泛,在真皮层深处的细胞中强烈表达,但在浅层却没有,在真皮细胞的细胞核及其附属物中也没有信号。表皮生长因子受体在覆盖物中的分布和人类皮肤中情况类似。相反,在发育的鹿茸软骨中,信号的分布和啮齿类胎骨类似,这说明,在成体条件下,覆以茸皮的鹿茸中快速生长的软骨具有类似胚胎软骨的特性。鹿茸另一个引人注目的特性是具有血管化的软骨。这是任何其他软骨组织所不具备的。Clark等^[29]通过血管造影发现鹿茸中血管大多为动脉,它们主要分布于真皮内准确讲是真皮的底部,也就是所谓的血管层。这些血管来源于鹿茸的基底穿行于真皮内几乎不分叉。它们在鹿茸尖端开始变弯曲并开始分叉。鹿茸尖端的大量血管分支产生了前软骨,软骨,及骨中的静脉血管。有两种理论来解释这一现象。一种可能性是血管延伸,主动脉沿着管槽或管槽上特定的位点通过内皮细胞和支持细胞的增殖自我进行生长。另一种可能是新生血管或摄入性重塑导致的血管萌发,由细小的分支融合,或者由主动脉迁徙分支。血管内皮生长因子是一种高度特异的内皮细胞有丝分裂源,可通过与血管内皮细胞上的受体结合,对内皮细胞发挥强烈的促分裂和趋化作用;同时,血管内皮生长因子可提高血管通透性,使内皮细胞接受刺激因子的作用增强。检测发现鹿茸中存在血管内皮生长因子121和血管内皮生长因子165,且在鹿茸的前软骨和软骨层发现血管内皮生长因子mRNA的存在^[30]。已发现的血管内皮生长因子受体有3种:Flt 1(fms-like tyrosine kinase-1, VEGFR1)、KDR(kinase domain region, VEGFR2)、Flt 4(VEGFR3)。三者均属酪氨酸激酶受体,主要分布于内皮细胞。在鹿茸前软骨区域的内皮细胞中有KDR的mRNA存在。这一发现和血管内皮生长因子在鹿茸中有促血管生长作用相吻合。另一个有趣的发现是再

生鹿茸中的神经总是跟随着血管的生长。Li等^[31]探索鹿茸中神经分布时发现,再生的轴突沿着主要的血管分布,位于真皮层和鹿茸间充质的交界处。神经生长因子mRNA表达于再生的鹿茸中,尤其是鹿茸尖部动脉及微动脉的平滑肌细胞中。因此,鹿茸中血管化软骨中血管的新生或者延伸,很可能是神经调控的,而血管的生成又为神经的快速生长提供了基础。揭示两者的关系,有可能为骨损伤修复和多种软骨疾病的治疗提供新的思路和方法。

近年来,国内的学者对鹿茸多肽进行了广泛的研究,发现其对刺激皮肤生长及骨伤愈合有明显的作。鹿茸多肽是采集新鲜的梅花鹿鹿茸或马鹿鹿茸,从中提取出的多肽类生物活性因子,为鹿茸的主要活性成分。牛琼等^[32]报道称,鹿茸多肽能够显著提高实验鹿部伤口的皮肤愈合速度。鹿茸多肽除能刺激皮肤伤口愈合,对软骨细胞及成骨样细胞的增殖也有明显加速作用,研究结果表明:在体外条件下,10-50 mg/L鹿茸多肽能明显刺激兔肋软骨细胞和人胚关节软骨细胞及鸡胚成骨样细胞的增殖,其增殖作用有明显的量效关系且无种属特异性^[33]。另外,鹿茸多肽对人骨髓间充质干细胞的增殖有明显促进作用,且能防止骨髓间充质干细胞在体外连续培养过程中异行性的产生,鹿茸多肽的这种特性为种子细胞的优化提供了理论和实验依据^[34]。周利秋等^[35]通过构建大鼠实验性挠骨骨折模型,研究发现鹿茸多肽可以通过促进骨、软骨细胞增殖及促进骨痂内骨胶原的积累和钙盐沉积而加速骨折愈合。在兔膝骨性关节炎模型中,鹿茸多肽对可抑制膝骨性关节炎过程中软骨细胞凋亡,降低关节液中白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α 的水平,一定程度上延缓关节软骨的退变^[36]。上述这些结果与Suttie等^[23-24]的发现可能存在着某种联系,发现在再生的鹿茸尖部间充质区域存在着大量的 及 胰岛素样生长因子及其受体。现已知胰岛素样生长因子是一种来自多种组织的,具有促进软骨组织生长的调节因子。另外,生长的鹿茸尖部还存在表皮生长因子这就也许能够解释鹿茸多肽为什么可以促进皮肤伤口愈合^[28]。但是,鹿茸多肽是新鲜鹿茸中提取的小肽物质的混合物,其具体的作用物质及其机制现在尚不明确,与鹿茸中已经发现的多种生长因子之间的联系也只是推测,另外鹿茸中现已发现的多种生长因子均在其他组织中发现,并没有一种是鹿茸中所特有的,因此鹿茸或鹿茸多肽的神奇效果可能是几种物质混合作用的结果,其具体的机制还需要更多实验数据的支持。

3 结论 Conclusion

鹿茸可以作为一种良好的生物医学模型来研究

哺乳动物器官的完全再生。与人的皮肤、牙齿、毛发再生类似,鹿茸再生也是基于干细胞的过程。这种干细胞被称为鹿茸干细胞,它们被定位于鹿的生茸区骨髓和角柄骨髓中,其上的皮肤构成了鹿茸干细胞所需的特殊微环境。鹿茸的发生和再生都是鹿茸干细胞和其为环境细胞相互作用的结果。如何寻找该系统中相互作用的信号物质并鉴定其功能,应该成为下一步的研究重点。驱动鹿茸再生的生长中心保持着极高的细胞增殖及凋亡水平,这也许可以解释为什么鹿茸拥有可以媲美肿瘤的生长速度而不癌变。但是,其中的调控机制还知之甚少,对其深入研究不但有助于揭示鹿茸再生之谜,也为肿瘤研究提供了新的模型和思路。鹿茸再生包含了骨组织、皮肤、血管、神经组织的完全再生,多种细胞因子参与其中,添加和绘制完整的调控机制网络图谱需要更多的实验数据支持。总之,将鹿茸作为一种特殊的生物医学模型探索哺乳动物器官再生机制,可以给迅速发展的人类再生生物学和再生医学研究提供有益的内容。

作者贡献: 第一作者构思并设计本综述,并解析相关数据,通讯作者修改和审校,所有作者共同起草,第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 鹿茸干细胞-是惟一能够驱动哺乳动物器官完全再生的成体干细胞,其上的皮肤构成了鹿茸干细胞所需的特殊微环境。鹿茸再生包含了骨组织、皮肤、血管、神经组织的完全再生,多种细胞因子参与其中。另一方面,由新鲜鹿茸组织提取的多肽类物质,在皮肤及骨组织伤口愈合中,具有明显的刺激作用。进一步探索其作用机制对骨伤愈合及皮肤再生提供了新的思路与方法。总之,鹿茸作为一种特殊的生物医学模型探索哺乳动物器官再生机制,可以给迅速发展的人类再生生物学和再生医学研究提供有益的内容。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Li C, Suttie JM, Clark DE. Histological examination of antler regeneration in red deer (cervus elaphus). Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2005;282(2):163-174.
- [2] Li C, Suttie JM, Clark DE. Morphological observation of antler regeneration in red deer (Cervus elaphus). J Morphol. 2004; 262(3):731-740.

- [3] Call MK, Tsonis PA. Vertebrate limb regeneration. Adv Biochem Eng Biotechnol. New York:Oxford University Press. 2005;93:67-81.
- [4] Li C, Mackintosh CG, Martin SK, et al. Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum deletion. Cell Tissue Res. 2007;328(1):65-75.
- [5] Li C, Yang F, Li G, et al. Antler regeneration: A dependent process of stem tissue primed via interaction with its enveloping skin. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol. 2007; 307(2):95-105.
- [6] Goss RJ. Deer antlers. Regeneration, function and evolution. New York, NY: Academic Press, 1983.
- [7] Gao Z, Yang F, McMahon C, et al. Mapping the morphogenetic potential of antler fields through deleting and transplanting subregions of antlerogenic periosteum in sika deer (*Cervus nippon*). J Anat. 2012;220(2):131-143.
- [8] Li C. Development of deer antler model for biomedical research. Recent Adv Res Updates, 2003, 4:256-274.
- [9] Li C, Suttie JM. Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue? Anat Embryol (Berl). 2001;204(5):375-388.
- [10] 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. Stem Cells. 2008;26(4):850-863.
- [11] Beekman C, Nichane M, De Clercq S, et al. Evolutionarily conserved role of nucleostemin: controlling proliferation of stem/progenitor cells during early vertebrate development. Mol Cell Biol. 2006;26(24):9291-9301.
- [12] Maki N, Takechi K, Sano S, et al. Rapid accumulation of nucleostemin in nucleolus during newt regeneration. Dev Dyn. 2007;236(4):941-950.
- [13] Rolf HJ, Kierdorf U, Kierdorf H, et al. Localization and characterization of stro-1 cells in the deer pedicle and regenerating antler. PLoS One. 2008;3(4):e2064.
- [14] Berg DK, Li C, Asher G, et al. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. Biol Reprod. 2007; 77(3):384-394.
- [15] Li C, Suttie JM, Clark DE. Deer antler regeneration: A system which allows the full regeneration of mammalian appendages. Advances in Antler Science and Product Technology. New Zealand Mosgiel, Taieri Print Ltd. 200:1-10.
- [16] Goss RJ, Powel RS. Induction of deer antlers by transplanted periosteum. I. Graft size and shape. J Exp Zool. 1985;235(3): 359-373.
- [17] Li C, Harris AJ, Suttie JM. Tissue interactions and antlerogenesis: new findings revealed by a xenograft approach. J Exp Zool. 2001;290(1):18-30.
- [18] Gao X, Yang F, Zhao H, et al. Antler transformation is advanced by inversion of antlerogenic periosteum implants in sika deer (*Cervus nippon*). Anat Rec (Hoboken). 2010; 293 (10): 1787-1796.
- [19] Li C, Suttie JM. Tissue collection methods for antler research. Eur J Morphol. 2003;41(1):23-30.
- [20] Francis SM, Suttie JM. Detection of growth factors and proto-oncogene mRNA in the growing tip of red deer (*Cervus elaphus*) antler using reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). J Exp Zool. 1998;281(1):36-42.
- [21] Gu L, Mo E, Yang Z, et al. Expression and localization of insulin-like growth factor-i in four parts of the red deer antler. Growth Factors. 2007;25(4):264-279.
- [22] Price J, Allen S. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2004;359(1445):809-822.
- [23] Suttie JM, Gluckman PD, Butler JH, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) antler-stimulating hormone? Endocrinology. 1985;116(2):846-848.
- [24] Suttie JM, Fennessy PF, Gluckman PD, et al. Elevated plasma IGF 1 levels in stags prevented from growing antlers. Endocrinology. 1988;122(6):3005-3007.
- [25] Sadighi M, Li C, Littlejohn RP, et al. Effects of testosterone either alone or with IGF-I on growth of cells derived from the proliferation zone of regenerating antlers in vitro. Growth Horm IGF Res. 2001;11(4):240-246.
- [26] Ozkanlar S, Akcay F. Antioxidant vitamins in atherosclerosis--animal experiments and clinical studies. Adv Clin Exp Med. 2012;21(1):115-123.
- [27] Sugimoto K, Toyoshima H, Sakai R, et al. Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines. Blood. 1992;79(9):2378-2383.
- [28] Barling PM, Lai AK, Nicholson LF. Distribution of EGF and its receptor in growing red deer antler. Cell Biol Int. 2005;29(3): 229-236.
- [29] Clark DE, Li C, Wang W, et al. Vascular localization and proliferation in the growing tip of the deer antler. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2006;288(9):973-981.
- [30] Clark DE, Lord EA, Suttie JM. Expression of VEGF and pleiotrophin in deer antler. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2006;288(12):1281-1293.
- [31] Stone L, Codère F, Ma SA. Streptococcal lid necrosis in previously healthy children. Can J Ophthalmol. 1991;26(7): 386-390.
- [32] 牛琼, 杨欣建, 刘黎军, 等. 鹿茸多肽促进皮肤创面愈合的研究[J]. 内蒙古中医药, 2011, 30(23):72-73.
- [33] 郭颖杰, 周秋丽, 刘平, 等. 鹿茸多肽对骨、软骨细胞增殖的实验研究[J]. 中国生化药物杂志, 1998, 19(2):74-76.
- [34] 修忠标, 林建华. 鹿茸多肽对人骨髓间质干细胞体外增殖的影响[J]. 福建中医学院学报, 2005, 15(1):34-37.
- [35] 周秋丽, 王丽娟, 郭颖杰, 等. 鹿茸多肽对实验性骨折的治疗作用及机理研究[J]. 白求恩医科大学学报, 1999, 25(5):586-588.
- [36] 修忠标, 孙磊. 鹿茸多肽对实验性膝骨性关节炎软骨细胞凋亡及相关细胞因子的影响[J]. 中国骨伤, 2012, 25(5):418-423.