

# IGF1对不同培养代数梅花鹿鹿茸间充质层细胞增殖的影响

赵丽红<sup>1</sup>, 韩玉帅<sup>1</sup>, 邓旭明<sup>1</sup>, 柳巨雄<sup>1</sup>, 李春义<sup>2</sup>, 岳占碰<sup>1</sup>, 冯海华<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062;

<sup>2</sup>新西兰 INVERMAY 农业研究中心, 新西兰莫斯格罗 50034)

**摘要:**通过细胞培养技术,探讨胰岛素样生长因子1(IGF1)对体外培养不同代数的梅花鹿鹿茸间充质层细胞增殖的影响。分离、培养生长90天的梅花鹿鹿茸间充质层细胞,将传代培养第2代、5代、8代细胞经含有不同浓度的IGF1(0, 1, 3, 和10 nM)作用,培养24 h后用<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷掺入测定法检测蛋白合成放射性含量。不同浓度IGF1处理组的蛋白合成放射性含量的平均值和最高值都是离体培养2代的细胞最高(分别为32 146和35 973 DPM/mg);培养5代的细胞(分别为2 781、3 206 DPM/mg)已明显下降;第8代时(分别为489和736 DPM/mg)又进一步下降,并且与对照组无显著的差异。不同培养时期的梅花鹿鹿茸间充质层细胞对IGF1刺激的敏感度不同,取材于生长90天鹿茸的间充质层细胞在离体培养8代后已失去了对IGF1刺激的敏感性。

**关键词:**IGF1; 间充质层细胞; 鹿茸; 梅花鹿

中图分类号:Q78, S852.65

文献标志码:A

论文编号:2009-2143

## Effects of Insulin-Like Growth Factor 1 on the Proliferation of Sika Deer Antler Mesenchymal Layer Cells at Different Generation

Zhao Lihong<sup>1</sup>, Han Yushuai<sup>1</sup>, Deng Xuming<sup>1</sup>, Liu Juxiong<sup>1</sup>, Li Chunyi<sup>2</sup>, Yue Zhanpeng<sup>1</sup>, Feng Haihua<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062;

<sup>2</sup>AgResearch Invermay Agricultural Centre Puddle Alley, Private Bag, Mosgiel New Zealand 50034)

**Abstract:** To investigate the effects of insulin-like growth factor 1 (IGF1) on the proliferation of sika deer antler mesenchymal layer cells from different passages in vitro. The mesenchymal layer cells were isolated from sika deer antlers of growing 90 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 radioactivity content of protein synthesis. The average and maximal radioactivity content of protein synthesis value of the proliferation of cells from growing 90 day's antler in the experimental group were the highest in the second population cells (32 146 and 35 973 DPM/mg respectively), decreased in the fifth population cells materially (2781 and 3206 DPM/mg), and decreased continuously in the eighth population cells (489 and 736 DPM/mg) and there was no significant difference compared with the control group. The sensitivity of sika deer antler mesenchymal layer cells to IGF1 varies from various passages. There was no difference in sensitivity to IGF1 in the eighth population cells at 90 days growing period of antler in vitro.

**Key words:** IGF1; mesenchymal layer cells; antler; sika deer

**基金项目:**教育部新教师基金“梅花鹿茸角 *ColX* 基因表达分布及调控分析”(200801831048); 国家高技术研究发展计划“梅花鹿茸再生相关基因的筛选、克隆及功能分析”(2007AA10Z150); 长春市科技支撑计划“优质梅花鹿良种选育与高效快繁关键技术研究与开发”(08KZ36)。

**第一作者简介:**赵丽红,女,1981年出生,安徽省蚌埠市人,博士研究生,主要从事鹿茸再生的分子机理等方面的研究。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: 0431-87836162, E-mail: vethong@yahoo.com.cn。

**通讯作者:**冯海华,女,1970年出生,山东省临朐县人,博士,副教授,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: 0431-87836162, E-mail: fhh70@163.com。

**收稿日期:**2009-10-19, **修回日期:**2009-11-13。

## 0 引言

鹿茸是一种传统中药材,在中国已应用了2 000多年。同时鹿茸又是一种难得的生物学模型,鹿茸是哺乳动物生长速度最快的组织,在快速生长期其速度每天可达20 mm以上<sup>[1-2]</sup>。鹿茸的快速生长主要取决于其生长中心间充质层细胞的分裂增殖速度,其增殖速度比癌细胞的增殖速度还要快30多倍<sup>[2]</sup>。令人吃惊的是,在这样快速增殖情况下形成的鹿茸组织竟是井然有序的,没有任何出现癌变的迹象。迄今为止,鹿茸生长的调控机制尚不清楚,揭示鹿茸生长的调控机理,不仅能为提高鹿茸产量打下基础,还有可能为阐明癌变发生机理提供线索。

Suttie等<sup>[3-5]</sup>认为,鹿茸的生长速度与鹿体内胰岛素样生长因子1(Insulin-like growth factor 1, IGF1)的水平呈强正相关,鹿茸尖部组织富含IGF1受体。此研究在梅花鹿鹿茸生长到90天时分离鹿茸间充质层细胞进行传代培养,研究IGF1对不同培养代数鹿茸间充质层细胞体外增殖的影响,为阐明鹿茸生长的调控机理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

选定4岁龄的健康梅花鹿(中国农业科学院左家特产研究所提供),在鹿茸生长到90天时割取鹿茸。

### 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

割取鹿茸尖部组织,从中央部纵向切开以暴露茸尖内部组织。依据Li等<sup>[6]</sup>的取材方法,在解剖显微镜下定位和切取鹿茸的间充质层。

### 1.4 细胞培养及传代

用缓冲溶液清洗鹿茸间充质层3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(终浓度为含200 U/mL的I型胶原酶的90% DMEM培养液,10%的犊牛血清)的培养瓶中。于37℃温箱中孵育3 h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后转移至培养瓶中培养。培养3天后换液并继续培养,直到大多细胞群落相互融合时进行传代。用胰酶-EDTA消化贴瓶生长的细胞,并对消化的细胞进行台盼兰染色以确定细胞的活性。

### 1.5 试验设计

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确定细胞活性。将细胞以 $2 \times 10^4$ 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48 h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24 h。在培养结束前2 h,于培养液中加入 $2.5 \mu\text{Ci/mL}$ 的<sup>3</sup>H-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  $\mu\text{L}$  1N NaOH溶解细胞。吸取200  $\mu\text{L}$ 溶解液于液体闪烁计数器中测定放射强度。另吸取200  $\mu\text{L}$ 溶解液进行蛋白合成放射性含量测定。最终结果以4孔的算术平均数 $\pm$ 标准差来表示,单位为DPM/mg。

### 1.6 数据统计

采用SPSS10.0对所得数据进行方差分析,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 鹿茸间充质层细胞的分离和培养

培养的鹿茸间充质层细胞第3天全量换液除去未贴壁的细胞,倒置显微镜下观察鹿茸间充质层细胞已贴壁,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,此试验中所用的细胞活性均在90%以上。

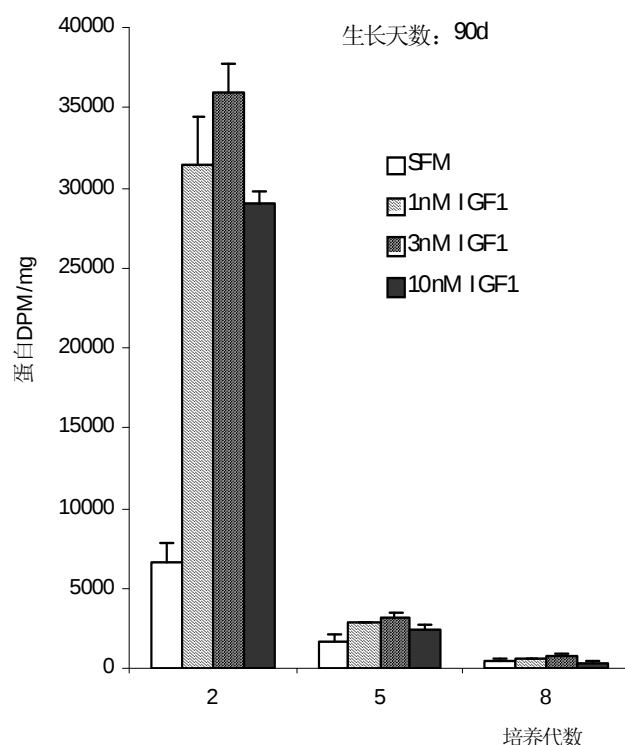


图1 IGF1对体外培养不同代数鹿茸间充质层细胞分泌蛋白的影响

## 2.2 IGF1对鹿茸间充质层细胞增殖的影响

对取材于生长90天鹿茸的间充质层细胞,3个不同浓度IGF1(1,3,10nM)处理组蛋白合成放射性含量的平均值和最高值都是离体培养2代的细胞最高(分别为32 146和35 973 DPM/mg),与对照组比较差异显著( $P<0.01$ );而培养5代的细胞的平均值和最高值(分别为2 781和3 206 DPM/mg)已大大下降,与对照组比较差异仍然显著( $P<0.01$ );到了第8代的细胞平均值和最高值(分别为489、736 DPM/mg)已下降到与对照组(390 DPM/mg)无显著差异的程度( $P>0.05$ ),结果见图1。这说明,取材于生长90天鹿茸的间充质层细胞在离体培养8代后实际上已失去了对IGF1刺激的敏感性。

## 3 讨论

鹿茸是唯一的一种能够每年完全再生的哺乳动物器官,为研究提供了探索哺乳动物器官再生的理想的动物模型<sup>[2]</sup>。鹿茸生长和再生都来源于鹿额骨生茸区的骨膜,该骨膜细胞可在鹿体的其他部位诱导生茸,所以为研究成体干细胞的特性提供了难得的材料<sup>[1]</sup>。Li等<sup>[1,6]</sup>报道了如何在未经组织染色的、新鲜鹿茸尖部的组织切面上精确定位和分离鹿茸间充质层细胞的方法。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,以及建立鹿茸生物医学模型上提供了有利的手段。此研究利用这种取材方法获得梅花鹿生长90天的鹿茸间充质层细胞,检测了鹿茸间充质层细胞在培养不同代数对生长因子IGF I刺激的敏感度。

通过检测IGF1对生长90天的梅花鹿鹿茸体外培养不同代数鹿茸间充质层细胞的影响发现,不同浓度IGF1处理组的蛋白合成放射性含量的平均值和最高值都是离体培养2代的细胞最高;培养5代的细胞的IGF1处理组的平均值和最高值已大大下降;到了第8代的细胞又有进一步的下降,并且与对照组已经无显著差异。培养8代的间充质层细胞的状态属于鹿茸生长末期的间充质层细胞,该结果表明,鹿茸在生长后期的生长速度下降以至于停止可能与鹿茸间充质层细胞失去对IGF1刺激的敏感性直接相关。目前鹿茸研究领域普遍接受的观点是鹿茸生长晚期生长速度的下降是由于鹿体内雄激素水平的快速上升所致<sup>[7]</sup>。因为雄

激素的快速上升会导致鹿茸组织的快速骨化。而不断骨化的鹿茸组织会大大减缓供应位于鹿茸尖部生长中心的血流量,从而降低了鹿茸的生长速度。然而在鹿茸快速骨化出现前给公鹿去势或使用雄激素拮抗剂醋酸环丙氯地孕酮(Cyproterone acetate, CA)只能延长鹿茸生长期,并不能维持鹿茸生长中期的生长速度<sup>[8]</sup>。其后Suttie等<sup>[9]</sup>提出IGF1是刺激鹿茸生长的主要生长因子,鹿茸在生长早期和晚期的生长速度低是由于鹿体内IGF1水平低而造成的。此研究的结果表明,除了生长因子IGF1浓度的变化外,鹿茸间充质层细胞本身对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之一。

## 参考文献

- [1] Li C, Suttie J M. Tissue collection methods for antler research[J]. *Eur J Morphol*,2003,41(1):23-30.
- [2] Li C, Yang F, Sheppard A. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration-insights from studying annual renewal of deer antlers[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*,2009,4(3):237-251.
- [3] Suttie J M, Gluckman P D, Butler J H, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) antler-stimulating hormone? [J]. *Endocrinology*, 1985,116:846-848.
- [4] 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[J]. *Growth Factors*.2007,25(4):264-279.
- [5] Elliott J L, Oldham J M, Ambler G R, et al. Receptors for insulin-like growth factor-II in the growing tip of the deer antler[J]. *J Endocrinology*,1993,138:233-242.
- [6] Li C, Clark D E, Lord E A, et al. Sampling technique to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery[J]. *Anat Rec*.2002,268:125-130.
- [7] Bartos L, Schams D, Bubenik G A. Testosterone, but not IGF-1, LH, prolactin or cortisol, may serve as antler-stimulating hormone in red deer stags (*Cervus elaphus*) [J]. *Bone*.2009,44(4):691-8.
- [8] Bubenik G A, Bubenik A B, Brown G M, et al. The role of sex hormones in the growth of antler bone tissue. I: Endocrine and metabolic effects of antiandrogen therapy[J]. *Journal of Experimental Zoology*,1975,194:349-358.
- [9] Suttie J M, Gluckman P D, Butler JH, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) antler-stimulating hormone? [J]. *Endocrinology*, 1985,116:846-848.