

基础医学

胰岛素样生长因子1对不同生长时期鹿茸生长中心细胞体外增殖的影响**○

冯海华¹, 闭兴明¹, 赵丽红¹, 宋宇¹, 岳占碰¹, 张学明¹, 李春义^{○2}, 邓旭明¹

Effects of insulin-like growth factor 1 on the in vitro proliferation of antler organic center cells at different growing periods

Abstract

AIM: The change of antler growth velocity in the whole antler growing period is caused directly by the antler's sensitiveness to the growth factor or by the exterior factors such as hormone is now unknown. Using cell culture techniques to investigate the effects of insulin-like growth factor 1 (IGF1) on the proliferation of antler growth central cells at different growing periods in vitro.

METHODS: This study was carried out at Basic Veterinary Medicine Research Institute in College of Animal Science and Veterinary Medicine of Jilin University from March 2005 to June 2006. Empirical methods: Totally three healthy 4-years-old sika deer were selected. Each calf was slaughtered for antlers at its earlier stage (30 days), intermediate stage (60 days) and advanced stage (90 days) of antler growth, respectively. Mesenchyme layer (evection part, the antler growth central cell layer) was located and taken under anatomical microscope. The antler growth central cells were isolated from sika deer antler and primarily cultured respectively. Cell viability was always above 90% measured using Trypan blue, then the viable cells were frozen in liquid nitrogen. The second population cells were incubated with 1, 3 and 10 nmol/L IGF1 for 24 hours. Simultaneously, blank control group was established using equal volume of culture medium without calf serum. Empirical evaluation: ³H-Thymidine incorporation assay was applied to determine the radioactivity content of protein synthesis. The unit was Bq.

RESULTS: Isolation and culture of the antler growth central cells at different antler growth stages: The cultured antler growth central cells were uniformly spindle-shaped and adhered to plastic surface, the cloning growth of these cells proliferated rapidly. Growth velocity of the antler growth central cells was different at different growing periods, the cells of growth 60 days owned the highest rate in proliferation and followed by the cells of 90 days and 30 days, separately.

Effects of IGF1 on protein synthesis radioactivity content of the antler growth central cells at different growing periods: The mean value of protein synthesis radioactivity content on the antler growth central cells was 49.8 Bq, 532.0 Bq and 535.8 Bq at growth 30 days, 60 days and 90 days, respectively, which increased 9.64, 38.93 and 4.88 times as higher as that of the blank control group, with the significant differences [(5.2 ± 0.6) Bq, (13.7 ± 5.4) Bq, (109.8 ± 27.0) Bq, P < 0.01].

CONCLUSION: IGF1 can enhance the proliferation of antler growth central cells. The sensitivity of IGF1 on the antler growth central cells differs at different antler growing periods. It is significantly higher at growth 60-day antler, and the sensitivity correlates with the growth velocity of antlers.

Feng HH, Bi XM, Zhao LH, Song Y, Yue ZP, Zhang XM, Li CY, Deng XM. Effects of insulin-like growth factor 1 on the in vitro proliferation of antler organic center cells at different growing periods. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2007;11(37):7373-7376 (China) [www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/07-37/37k-7373(ps).pdf]

摘要

目的:在整个生长期中鹿茸生长速度的变化,究竟是由鹿茸生长中心细胞本身对生长因子刺激的敏感度引起,还是由激素等外部因素所致目前尚不清楚。实验利用细胞培养技术观察胰岛素样生长因子1对不同生长期的鹿茸生长中心细胞体外增殖的影响。

方法: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。实验方法:3头4岁龄的健康梅花鹿,分别在鹿茸生长的早期(生长30 d)、中期(生长60 d)、晚期(生长90 d)三期各锯取1头鹿的鹿茸,在解剖显微镜下定位和切取间质层(突起部)即为鹿茸生长中心细胞所在的组织层。原代分离培养不同生长期的鹿茸生长中心细胞,锥虫蓝染色显示细胞活性达90%以上,活性确定后的细胞液氮冻存。取第2代细胞,经1、3、10 nmol/L胰岛素样生长因子1处理24 h。设立空白对照组,用不含犊牛血清的等量培养液来替换孔中正常培养液。实验评估:³H-胸腺嘧啶核苷法检测蛋白合成放射性含量,单位为Bq。

结果:不同生长时期鹿茸生长中心细胞的分离与培养:贴壁的鹿茸生长中心细胞形态均匀,呈梭形,克隆样生长,增殖迅速。不同生长期的鹿茸生长中心细胞生长速度不同,60 d的鹿茸生长中心细胞生长最快,90 d次之,30 d最慢。胰岛素样生长因子1对不同生长期鹿茸生长中心细胞蛋白合成放射性含量的影响:取材于生长30 d的鹿茸生长中心细胞,胰岛素样生长因子1各浓度组的蛋白合成放射性含量均值为49.8 Bq,是空白对照组[(5.2 ± 0.6) Bq]的9.64倍,差异有显著性意义(P < 0.01)。取材于生长60 d的鹿茸生长中心细胞,胰岛素样生长因子1各浓度组的蛋白合成放射性含量均值为532.0 Bq,是空白对照组[(13.7 ± 5.4) Bq]的38.93倍,差异有显著性意义(P < 0.01)。取材于生长90 d的鹿茸生长中心细胞,胰岛素样生长因子1各浓度组的蛋白合成放射性含量均值为535.8 Bq,是空白对照组[(109.8 ± 27.0) Bq]的4.88倍,差异有显著性意义(P < 0.01)。

结论:胰岛素样生长因子1有促进鹿茸生长中心细胞分裂增殖的作用。不同生长期的鹿茸生长中心细胞对胰岛素样生长因子1刺激的敏感度不同,生长期为60 d时尤为显著,该敏感度与取材细胞时鹿茸的生长速度相关。

关键词:胰岛素样生长因子1;鹿茸;生长中心细胞

冯海华, 闭兴明, 赵丽红, 宋宇, 岳占碰, 张学明, 李春义, 邓旭明. 胰岛素样生长因子1对不同生长时期鹿茸生长中心细胞体外增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(37):7373-7376 [www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/07-37/37k-7373(ps).pdf]

¹Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China; ²AgResearch Limited Invermay Agricultural Centre Puddle Alley, Private Bag 50034, Mosgiel, New Zealand

Feng Hai-hua, Doctor, Lecturer, Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China fhh70@163.com

Correspondence to: Deng Xu-ming, Doctor, Professor, Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China xumingdeng@yahoo.com

Supported by: the Two-Base Project of National Natural Science Foundation of China, No. 30510403163*; the National Natural Science Foundation of China, No. 30571340*

Received: 2007-03-20
Accepted: 2007-07-09

¹ 吉林大学畜牧兽医学院基础兽医教研室,吉林省长春市130062; 新西兰 INVERMAY 农业研究中心, Mosgiel 新西兰 50034

冯海华,女,1970年生,山东省临朐县人,汉族,2007年吉林大学毕业,博士,讲师,主要从事鹿茸再生方面的研究。
fhh70@163.com

通讯作者:邓旭明,博士,教授,吉林大学畜牧兽医学院基础兽医教研室,吉林省长春市130062
xumingdeng@yahoo.com

国家自然科学基金“两个基地”项目
③0510403163; 国家自然科学基金
③0571340

中图分类号:R329.28
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2007)37-0737-04

收稿日期:2007-03-20
修回日期:2007-07-09
(07-50-5-1669/ZS·Y)

课题背景: 国家自然科学基金“两个基地”项目(③0510403163),立项课题“茸角再生过程中软骨内成骨的分子调控机制”,主要研究 CollagenX (ColX)对鹿茸角再生过程中对软骨内成骨的影响,采用细胞分离、培养以及分子生物学技术,通过 RACE 方法,首次分离、克隆出梅花鹿的 ColX 基因(已经登陆 GENBANK)。国家自然科学基金项目(③0571340),立项课题“IGF-I 及其受体在梅花鹿茸角内的表达及与茸角再生的关系”,提出了胰岛素样生长因子1存在于梅花鹿茸角顶部再生鹿茸角增殖区,促进了干细胞及软骨细胞的增殖。

0 引言

鹿茸是能够每年完全再生的惟一哺乳动物器官,为人类提供了探索自然界是如何解决哺乳动物器官再生的良好机会,可以作为一种难得的生物医学模型^[1,2],但迄今为止鹿茸生长的调控机制尚不清楚^[2-4]。鹿茸发生和再生都来源于鹿额骨生茸区的骨膜,该骨膜细胞为一种自主独立分化系统,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^[5-8]。鹿茸是哺乳动物生长速度最快的组织,鹿茸的快速生长主要取决于其生长中心细胞的分裂繁殖速度,其速度比癌细胞还要快30几倍^[9-11]。但是在这样快速情况下形成的鹿茸组织竟然有条不紊,没有任何出现癌变的迹象。所以揭示鹿茸生长的调控秘密还有可能为揭示癌变机制提供线索。

鹿茸是雄鹿的副性征,其生长发育周期受雄激素的调节^[12]。每年春天当鹿体内睾酮含量下降到一定的临界值以下时,鹿角(脱掉茸皮的鹿茸)由角柄(俗称草桩,是鹿角脱落和鹿茸再生的基础)上脱落,鹿茸的再生随即发生,夏天鹿体睾酮水平保持最低,鹿茸进入快速生长期,秋天睾酮含量急剧上升,导致鹿茸的生长停止和完全骨化、脱掉茸皮,整个冬天由于鹿体内的睾酮一直处于高水平,致使裸露的鹿角紧密附着于角柄上,直到下一个春天睾酮水平再次下降后才脱落,并触发新一轮鹿茸的再生^[13-15]。在生长期,鹿茸的生长呈典型的S曲线形。开始时较慢,生长中期最快呈几何级数,然后生长速度下降^[16]。虽然鹿茸角的生长发育周期受雄激素水平变化的调节,但鹿茸生长本身几乎与雄激素无关,而是由生长因子特别是胰岛素样生长因子1所决定的^[17,18]。鹿茸生长期生长速度的变化,即由慢到快、再由快到慢,这种变化是由鹿茸生长中心细胞本身的内在因素引起,还是由外部因素所导致,目前尚不清楚。

1 材料和方法

设计:重复测量设计。

单位:吉林大学畜牧兽医学院,新西兰 INVERMAY 农业研究中心。

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。3头4岁龄的健康梅花鹿(由中国农科院左家特产研究所提供,商业用鹿)。试剂:DMEM培养基(Gibco);胰蛋白酶(Sigma);型胶原酶(Invitrogen);犊牛血清(Invitrogen);锥虫蓝(Sigma);DMSO(Sigma);胰岛素样生长因子1(Roche)。

设计、实施、评估者:实验设计为第七、八作者,资料收集、干预实施及结果评估为第一~六作者。均经过系统培训,未使用盲法评估。

方法:

取材与组织分离:3头梅花鹿,分别在鹿茸生长的早(生长30d)、中(生长60d)、晚(生长90d)三期各锯取1头鹿的鹿茸,取材部位见图1。鹿茸锯下后,立即带入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。将切下的鹿茸尖部组织带入细胞培养间,再用手术刀从中央部纵向切开以暴露茸尖内部组织。依据Li等^[5]的取材方法,在解剖显微镜下定位和切取鹿茸的间质层(突起部),该层即为鹿茸生长中心细胞所在的组织层(图2)。



图1 白色斜线以上部分为鹿茸的取材部位



图2 M提示鹿茸生长中心细胞的取材部位

细胞培养:用含有双抗的平衡缓冲盐溶液清洗鹿茸间质层组织3次,然后将该组织在平皿中切碎,再用缓冲液清洗。将清洗后的组织碎块移入含有特殊配置的鹿茸组织消化液(90% DMEM 培养液,10% 犊牛血清,

100 U/mL 青霉素,100 mg/L 链霉素)以及最终浓度为200 U/mL的Ⅰ型胶原酶的培养瓶中。培养瓶在轻微震荡的情况下于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1 000 r/min离心10 min除去消化液,再用细胞培养液清洗2次后转移至培养瓶中。将这些培养瓶放入37℃、体积分数为0.05的CO₂培养箱中进行培养。

细胞活性检测和冻存:培养3 d后,大多数游离出的细胞和小的组织块都已贴瓶并开始分裂繁殖,在培养面形成大小不等的细胞群落。用等量的新培养液替换含有未贴瓶的组织和细胞的旧培养液,并继续培养直到大多细胞群落相互融合为止。用胰酶-乙二胺四乙酸消化掉贴瓶生长的细胞,并对消化掉的细胞进行锥虫蓝染色以确定细胞活性。活性确定后的细胞被分装到含有1 mL冻存液(80%DMEM培养液,10%犊牛血清,100 U/mL青霉素,100 mg/L链霉素,10% DMSO)的冻存管中,每管细胞数约10⁹ L⁻¹。将冻存管放入液氮罐中保存。

分组干预:鹿茸生长中心细胞由液氮取出、解冻,并接种到含有正常培养液的培养瓶中培养。细胞长满培养面的85%~90%时,用胰酶-EDTA将细胞消化掉,锥虫蓝染色法确定细胞活性。将细胞以2×10⁷ L⁻¹的密度接种到24孔板,1 mL培养液/孔,此时的细胞为培养的第2代细胞。接种细胞的培养板放入37℃的CO₂培养箱中进行培养。实验分为胰岛素样生长因子1组与空白对照组,48 h后分别用等量不含犊牛血清的培养液、不含犊牛血清但含有1、3、10 nmol/L胰岛素样生长因子1的培养液来替换孔中正常培养液,各组均设立重复的4孔,继续培养24 h。在培养结束前2 h,于培养液中加入2.5 mCi/L的³H-胸腺嘧啶核苷。

蛋白合成放射性含量的检测:培养结束后用4℃的三氯乙酸(10%)清洗细胞3次,再用NaOH 500 μL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孔均值表示,单位为Bq。

主要观察指标:不同生长期鹿茸生长中心细胞的分离与培养。胰岛素样生长因子1对不同生长期鹿茸生长中心细胞蛋白合成放射性含量的影响。

统计学分析:由第七作者采用SPSS 10.0对所得数据进行方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,P<0.01为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 不同生长期鹿茸生长中心细胞的分离与培养:含体积分数为0.1的犊牛血清DMEM培养的鹿茸生长中心细胞第3天全量换液除去未贴壁细胞,倒置显微镜下可见此时细胞已贴壁,形态均匀,呈梭形,呈克隆性生长,增殖迅速(图3)。不同生长时期的鹿茸生长中心细胞生长速度不同,60 d的鹿茸生长中心细胞生长最快,90 d次之,30 d最慢。锥虫蓝检测结果表明本试验中所用细胞的活性达90%以上。

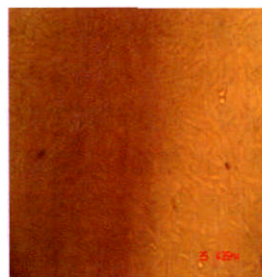


图3 倒置显微镜观察原代培养3 d的鹿茸生长中心细胞

2.2 胰岛素样生长因子1对不同生长期鹿茸生长中心细胞蛋白合成放射性含量的影响:取材于生长30 d的鹿茸生长中心细胞,1、3、10 nmol/L胰岛素样生长因子1组的蛋白合成放射性含量平均值为49.8 Bq,最高值为(62.4±27.1) Bq,分别是空白对照组(5.2±0.6) Bq的9.64倍和12.07倍,差异有显著性意义(P<0.01)。

取材于生长60 d的鹿茸生长中心细胞,1、3、10 nmol/L胰岛素样生长因子1组的蛋白合成放射性含量平均值为532.0 Bq,最高值为(663.6±261.5) Bq,分别是空白对照组(13.7±5.4) Bq的38.93倍和48.56倍,差异有显著性意义(P<0.01)。

取材于生长90 d的鹿茸生长中心细胞,1、3、10 nmol/L胰岛素样生长因子1组的蛋白合成放射性含量平均值为535.8 Bq,最高值为(599.6±147.5) Bq,分别是空白对照组(109.8±27.0) Bq的4.88倍和5.46倍,差异有显著性意义(P<0.01)。见图4。

应用要点:实验首次证实精确定位的鹿茸生长中心细胞在不同生长期对胰岛素样生长因子1刺激的敏感度不同。实验根据相关文献报道的鹿茸干细胞取材方法,在梅花鹿茸生长的早、中、晚期分别收集鹿茸生长中心细胞进行离体培养,分析整个生长期鹿茸生长速度的变化。

偏倚或不足:为了确定在体外培养情况下是否能用传代的方法重复复活体中不同鹿茸生长期鹿茸细胞对胰岛素样生长因子1刺激敏感度的变化,试验应该分析每一生长期几个不同培养代数的细胞在分裂繁殖方面对胰岛素样生长因子1刺激的反应,且生长中心细胞的培养方法还需进一步改进。

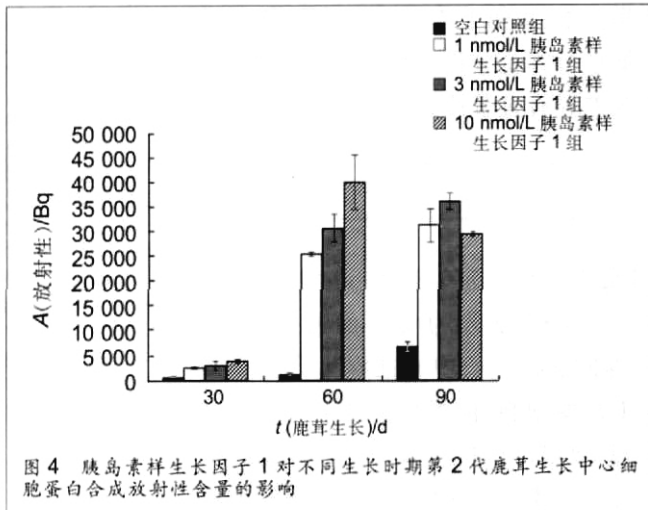


图4 胰岛素样生长因子1对不同生长期第2代鹿茸生长中心细胞蛋白合成放射性含量的影响

3 讨论

当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导致^[13,19]。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与鹿茸尖部生长中心的血流量,从而降低了鹿茸的生长速度。然而在快速鹿茸骨化出现前给公鹿去势或使用雄激素拮抗剂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^[13]。其后Suttie等^[17,18]提出胰岛素样生长因子1可能是刺激鹿茸生长的主要生长因子。本实验结果显示,在离体培养2代后,来自不同生长期的鹿茸生长中心细胞在分裂增殖对胰岛素样生长因子1刺激的敏感度迥然不同。离体培养鹿茸细胞对胰岛素样生长因子1刺激的最高敏感度与鹿茸生长最快期(约60 d)相吻合。生长早期(30 d)的鹿茸干细胞对胰岛素样生长因子1敏感度的相对值高于对照组,但绝对值却低于生长晚期的鹿茸干细胞。表明除了生长因子胰岛素样生长因子1浓度的变化外,鹿茸生长中心细胞本身对胰岛素样生长因子1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。

实验中使用的胰岛素样生长因子1浓度是依据Sadighi等^[20]报道结果而定的。他们发现3~10 nmol/L范围的胰岛素样生长因子1浓度对培养的鹿茸尖部细胞具有最大的刺激作用。本实验中全部胰岛素样生长因子1处理组都非常显著高于对照组($P < 0.01$)。总的趋势是,所有胰岛素样生长因子1处理组,鹿茸生长中心细胞的分裂繁殖都与加入的胰岛素样生长因子1浓度呈明显的量-效关系。早期的鹿茸生长中心细胞的最大胰岛素样生长因子1反应浓度为10 nmol/L,而晚期的鹿茸生长中心细胞的最大胰岛素样生长因子1反应浓度是3 nmol/L。即前者的最大胰岛素样生长因子1反应浓度明显高于后者。

本实验证实了精确定位的鹿茸生长中心细胞,在不同的生长期对生长因子胰岛素样生长因子1刺激的敏感度不同,该敏感度与取材细胞时鹿茸的生长速度相关。也就是说,鹿茸的生长速度越快,由此而获得的鹿茸生长中心细胞在离体培养情况下对胰岛素样生长因子1的刺激反应就越强。鹿茸生长中心细胞对胰岛素样生长因子1刺激的最高敏感度与鹿茸生长最快期(约60 d)相吻合。因此,胰岛素样生长因子1促进鹿茸干细胞分裂增殖的作用,可能是其促进鹿茸再生的重要机制之一。

4 参考文献

- Goss RJ. Future directions in antler research. *Anat Rec* 1995;241 (3): 291-302
- 冯海华,赵丽红,岳占碰,等.鹿茸角软骨细胞体外培养方法的建立及生长特性分析[J]. *中国农学通报* 2007, 23(5): 6-9
- 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
- Molnar A, Gyurjan I, Korpos E, et al. Identification of differentially expressed genes in the developing antler of red deer *Cervus elaphus*. *Mol Genet Genomics* 2007; 277(3):237-248
- Li C, Suttie JM. Tissue collection methods for antler research. *Eur J Morphol* 2003;41 (1):23-30
- Li CY, Yang FH, Li GY, et al. Antler regeneration: a dependent process of stem tissue primed via interaction with its enveloping skin. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 2006; 307A(19): 95-105
- Gyurján I, Molnár A, Borsy A, et al. Gene expression dynamics in deer antler: mesenchymal differentiation toward chondrogenesis. *Mol Genet Genomics* 2007;277(3):221-235
- 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
- Goss RJ. *Deer Antlers. Regeneration, Function and Evolution*[M]. New York, NY: Academic Press 1983;87
- Landete-Castillejos T, Estevez JA, Martínez A, et al. Does chemical composition of antler bone reflect the physiological effort made to grow it? *Bone* 2007;40(4):1095-1102
- 冯海华,邓旭明,岳占碰,等.梅花鹿鹿茸软骨细胞的培养及X型胶原的克隆和序列分析[J]. *中国农学通报*, 2006, 22(11):22-24
- Vanpé C, Gaillard JM, Kjellander P, et al. Antler size provides an honest signal of male phenotypic quality in roe deer. *Am Nat* 2007; 169 (4): 481-493
- Bubenik GA. Endocrine regulation of the antler cycle[M]. In: Brown RD, editor. *Antler Development in Cervidae*. Caesar Kleberg Wildl Res Inst. Kingsville, TX 1982: 73-107
- Li C, Wang W, Manley T, et al. No direct mitogenic effect of sex hormones on antlerogenic cells detected in vitro. *General and Comparative Endocrinology* 2001;124 (1):75-81
- 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*). *Theriogenology* 2007;67(8):1371-1378
- Fennessy P, Corson I, Suttie J, et al. Antler growth patterns in young red deer stags[M]. In: Brown R, editor. *The Biology of Deer*. Mississippi State University: Springer-Verlag 1992: 487-492
- Suttie JM, Gluckman PD, Butler JH, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) antler-stimulating hormone? *Endocrinology* 1985;116 (2):846-848
- 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
- 岳占碰,邓旭明,冯海华.鹿茸角发育与再生机理[J]. *经济动物学报*, 2005, (1): 46-49
- Sadighi M, Haines SR, 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 Endocrinol* 1994;143 (3):461-469