



利用 qRT-PCR 技术筛选鹿茸生长中心细胞与鹿茸干细胞内参基因

张伟 刘佳 董振 李春义*

中国农业科学院 特产研究所 特种经济动物分子生物学国家重点实验/吉林省鹿茸工程研究中心, 长春 130112

*通讯作者, lichunyi1959@163.com

摘 要 鹿茸是一个生长速度极快且能每年周期性完全再生的哺乳动物器官,是一个新兴的生物医学研究模型。鹿茸生长中心和鹿茸干细胞是离体条件下研究该模型的主要细胞类型。合适的内参基因是利用 qRT-PCR 准确分析基因相对表达量的先决条件。本研究筛选了 TATA 盒结合蛋白(TATA box binding protein, *TBP*)、 β -肌动蛋白(actin beta, *ACTB*)、微管蛋白 1 α (tubulin alpha 1a, *TUBA1A*)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose- 6- phosphate dehydrogenase, *G6PDH*)、3- 磷酸 甘油 醛 脱 氢 酶 (glyceraldehyde- 3- phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)及 β 2-微球蛋白(β 2-microglobulin, *B2M*)这 6 个基因作为内参基因,利用 qRT-PCR 技术分别检测这些基因 mRNA 在鹿茸生长中心细胞及鹿茸干细胞中的表达情况,并对其表达的稳定性进行了综合评估。运用 Delta-*Ct* method, geNorm(ver.3.5)、Bestkeeper(ver.1.0)和 NormFinder(ver.0.953)和 RefFinder 软件综合分析表明,在鹿茸干细胞之间,*ACTB* 和 *TUBA1A* 基因表达稳定性最高;在鹿茸生长中心细胞之间,*B2M* 和 *ACTB* 基因表达稳定性最高;在所有鹿细胞系之间,*B2M* 和 *ACTB* 基因表达稳定性最高。因此,*B2M*、*ACTB* 以及 *TUBA1A* 候选基因可作为研究鹿茸生长中心细胞及鹿茸干细胞基因差异表达的内参基因,本研究为进一步研究鹿茸生长发育机制和开展鹿茸模型应用于生物医学研究提供了一定的理论依据。

关键词 鹿茸,干细胞,生长中心,qRT-PCR,内参基因

中图分类号 S825 **文献标识码** A

Reference Gene Selection for Antler Stem Cells and Antler Growth Center Cells for qRT-PCR

ZHANG Wei LIU Jia DONG Zhen Li Chun-Yi*

Deer Antler Engineering Center of Jilin Province/State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economical Animals, Institute of Special Animal and Plant Sciences Chinese Academy of Agricultural Sciences Changchun, 130112

* Corresponding author, lichunyi1959@163.com

Abstract Annual full regeneration of deer (*Cervidae*) antlers has been proved to be a stem cell-based process, and antler stem cells reside in both antlerogenic periosteum (AP) and pedicle periosteum (PP). The extraordinary growth rates of antlers provide us a rare system in which rapid cell proliferation is elegantly regulated without becoming cancerous. Thus deer antlers are unique mammalian organs that have potential to be a valuable model for biomedical research, such as the areas of stem cell, organ regeneration, bone development and growth control. qRT-PCR is one of the most common-used techniques in molecule biology study of deer antler. Appropriate internal reference genes are prerequisites for the accurate analysis of gene

基金项目: 国家自然科学基金(No. 31500792 和 No. 31402059)和中国农业科学院科技创新工程项目(No.CAAS-ASTIP-2014-ISAPS-04)

收稿日期:2017-01-16 接受日期:2017-02-21

expression in antler research by qRT-PCR. In this study, antler stem cell tissue samples including AP, PP and facial periosteum (FP) (as a perfect negative control in antler stem cells research) were collected using surgical operation in a relative sterile environment. Antler growing center tissue samples, including reserve mesenchymy (RM), precartilage (PC), transition zone (TZ) and cartilage (C) were isolated from growing antler tips. Primary culture of these cells were carried out after release cells from these tissue types using type II collagenase (150 U/mL) and cells were cultured in dulbecco's modified eagle medium (DMEM) with 10% fetal calf serum (FBS) in 37 °C and 5% CO₂. Stability of mRNA expression and levels of 6 candidate reference genes, including actin beta (*ACTB*), tubulin alpha1a (*TUBA1A*), TATA box binding protein (*TBP*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), glucose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PDH*) and beta-2-microglobulin (*B2M*) in antler growth center cells and antler stem cells were measured by through qRT-PCR method. Software, which are Delta- Ct method, geNorm (ver.3.5), Bestkeeper (ver.1.0), NormFinder (ver.0.953) and RefFinder, were used to analyze all the acquired data. The results showed that expressions of *ACTB* and *TUBA1A* genes were most stable in antler stem cells; *B2M* and *ACTB* in antler growth center cells. The results of comprehensive analysis using the software indicated that *B2M*, *ACTB* and *TUBA1A* genes were the most stable reference genes, and suitable for antler research. The present study provides a foundation for accurate quantification of differential gene expression for antler research and mechanistic study of this fascinating model for mammalian organ regeneration.

Keywords Deer antler, Stem cells, Growth center, qRT-PCR, Reference genes

目前,我国是世界三大养鹿(*Cervidae*)国(新西兰,俄罗斯和中国)之一,鹿及鹿产品资源非常丰富,鹿产业对我国经济尤其是东北三省、内蒙和新疆等地具有重要作用,其中茸鹿养殖和鹿茸生产成为了我国鹿产业的鲜明特点(杨福合, 2012)。鹿茸是我国最早发现并将其用于临床的传统中药(何刚, 1992)。此外,鹿茸作为唯一可完全周期性再生的哺乳动物器官,具有周期性再生和快速生长(1~2 cm/d)等特点(Li et al., 2014; Fior, 2014; 李春义, 2017)。软骨修复以及器官再生是现今生物医学研究面临的一个难题。鹿茸(包含皮肤, 血管, 神经, 软骨及骨组织)的发生、再生是基于生茸区骨膜细胞(antlerogenic periosteum cells, AP)和角柄骨膜细胞(pedicle periosteum cells, PP)的过程。已有研究表明这两类骨膜细胞具有典型的干细胞特性,结合 AP 组织异位移植可诱发异位鹿茸生成(Gao et al., 2012)和 PP 组织剔除阻止鹿茸再生(Li et al., 2007)的活体实验,因此, AP 和 PP 组织被证实是鹿茸发生和再生的组织基础,并被命名为鹿茸干细胞(antler stem cells)组织(Li et al., 2011; Li, 2012; Li, Chu, 2016)。鹿茸还可以认为是一个血管化的可周期性再生的软骨器官,其成骨方式为软骨内成骨,该成骨方式是指在预先形成的软骨雏形的基础上,使软骨逐步被替换为骨的成骨过程。但由于鹿茸软骨

富含血管组织,因此被称为修饰性软骨内成骨,鹿茸成骨时其生长中心一部分细胞迅速分裂增殖,另一部分细胞慢慢地分化成鹿茸的不同组织(Li, 2013; 张伟等, 2015)。鹿茸的生长中心(growth center)具有明显且易观察的成骨带,从上至下依次分为间充质层(reserve mesenchymal, RM)、前成软骨层(prechondroblastic, PC)、过渡区(transition zone, TZ)、软骨层(cartilage, C),是研究软骨形成、再生及修复的优秀模型(Lord et al., 2005; Cegielski et al., 2009; Li, 2013)。因此,通过揭示鹿茸再生以及软骨形成过程中不同基因的差异表达可进一步揭示鹿茸生长发育机制,以及促进鹿茸在再生医学和经济动物产业中的应用。

qRT-PCR 技术是一种基于普通 PCR 技术结合荧光化学物质发展而来的核酸定量方法。该技术具备识别特异性强、灵敏度高、重复性好、操作简单、自动化水平高等优点,已成为研究基因表达定量分析的首选方法,广泛应用于生物体内基因功能的研究(Valasek, Repa, 2005; Huggett et al., 2005)。然而,在定量实验尤其是相对定量过程中,许多因素(如 RNA 的纯度, cDNA 的制备质量, 内参的选择以及 qRT-PCR 的扩增效率等)都可能影响定量结果的准确性(Vandesompele et al., 2002)。因此,为了获得精确且可信的研究数据,在基因定量分析实验

时,需要选择合适的内参基因对实验样品进行校正处理(Quackenbush, 2002)。在实际操作中通常选用持家基因(如 α 微管蛋白, β 微管蛋白和肌动蛋白基因等)作为内参基因。但是,任何一种看家基因的稳定性都是相对的,可能会随着外界条件的变化而变化。因此在 qRT-PCR 分析中,必须根据不同的组织样品、不同的发育阶段以及不同实验条件等,选出相对合适的内参基因和数目,以对结果进行准确校正(蒋晓梅等, 2014)。

在肿瘤研究领域,传统的内参基因也表现出不稳定的现象(郝立宏等, 2011; Nguewa et al., 2008),鹿茸与肿瘤在细胞生物学特性上具有许多相似性如:在生茸期的增殖速度是肿瘤细胞的 30 多倍(Kierdorf, Kierdorf, 2011),但是国内外尚未见对鹿茸研究相关细胞系(干细胞和生长中心细胞)合适内参基因的筛选报道。因此,本研究选取了 6 个常用内参基因作为鹿细胞系分析的候选内参基因,利用 qRT-PCR 检测了不同细胞系中各内参基因 mRNA 的表达情况,采用 $\Delta\Delta Ct$ method(Silver et al., 2006)、GeNorm (ver.3.5) (Vandesompele et al., 2002)、NormFinder (ver.0.953) (Andersen et al., 2004)、Bestkeeper (ver.1.0) (Pfaffl et al., 2004) 以及 RefFinder(Xie et al., 2012)程序软件对所得数据进行分析,旨在筛选出鹿细胞系中最稳定表达的内参基因,以期为今后研究鹿细胞系中重要基因的表达提供一定的基础和校正数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

干细胞采集:选取额外嵴达到种属特异性高度(约 1~2 cm, 7~8 月龄),体重约 35 kg 的雄性梅花鹿(*Cervus nippon*)一只,用于生茸骨膜(antlerogenic periosteum, AP)组织采集。脱盘前期雄性梅花鹿(两岁龄)一只,用于角柄骨膜(pedicle periosteum, PP)组织,依据骨膜与角柄骨质的贴合程度分为致敏角柄骨膜(potentiated pedicle periosteum, PPP)和休眠角柄骨膜(dormant pedicle periosteum, DPP)。二岁龄雄性梅花鹿一只用于脸部骨膜(facial periosteum, FP)组织采集,FP 组织为鹿茸干细胞组织研究的理想对照。

鹿茸生长中心组织采集:生长标准二杠茸“拉沟”前(鹿茸发育初期,时间约为鹿茸生长的第 15~20 d 左

右)鹿茸一只,用于鹿茸生长中心组织采集。

实验鹿及鹿茸均由中国农业科学院特产研究所左家所区实验鹿养殖基地(试验站)提供。

1.2 主要试剂及仪器

试剂:改良杜氏伊格尔培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、College type II、Trypsin 及磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) (Gibco, 美国);青链霉素、PurelinkTM RNA 提取纯化试剂盒(Life tech, 美国);1 st cDNA 反转录试剂盒(Takara, 日本);SYBR 荧光定量试剂盒(ROX) (Roche, 德国);四甲基罗丹明异硫氰酸盐-鬼笔环肽(Sigma, 美国);实验所需引物由上海生工合成。本课题组样品采集相关专利:无菌组织采集装置(赵海平等, 2014);无菌手术器械包(褚文辉等, 2014);一种动物组织切割器械(李春义等, 2014)。

1.3 方法

1.3.1 组织采集

经过本课题组多年研究发现,鹿茸干细胞和鹿茸生长中心组织的发育具有时间和空间特性(Li, Suttie, 2003)。因此,合适的采样时间及取样方法对后续研究至关重要。其取样方法以及取样部位均有差异(图 1)。鹿茸干细胞组织取样具体操作如下:将鹿麻醉后,转移至预先消毒的手术室,取样部位备皮消毒后,揭开覆盖骨膜的皮肤,去除骨膜上附着的结缔组织,随后利用鼠牙镊将骨膜组织撕下,置于无菌样品存储液(含青、链霉素)中,转移至超净工作台中进行细胞原代培养。鹿茸生长中心组织的采集相对简便,麻醉实验鹿后,利用传统锯茸方法将鹿茸锯下,利用无菌棉包扎创口,将整枝鹿茸携带至实验室进行原代培养。

1.3.2 原代培养

在超净工作台将组织取出,利用无菌预冷的 PBS 洗涤 2~3 次,随后利用组织切割装置将组织切成 0.22 mm 的小块,收集组织小块置于 150 U 的 College type II 酶,该酶由 DMEM 配置,37 °C 恒温水浴消化 5~10 min,随后离心收集组织,接种至 T-25 细胞培养瓶中,添加少量培养基倒置于 37 °C, 5% CO₂ 环境中培养 3~4 h,待经消化的组织紧贴后将瓶身正置,继续培养 5~7 d 后于倒置相差显微镜下观察鹿细胞形态。为更加方便地观察细胞形态,

本实验利用罗丹明染色剂对原代细胞进行了骨架染色。染色程序:去除细胞培养基,PBS洗涤2次,添加4%多聚甲醛常温固定20 min,PBS洗涤2次,添加罗丹明染色剂室温染色3 min,PBS洗涤2次,于倒置荧光显微镜下观察并采集照片。将成功进行原代培养的细胞分别命名为APC,PPPC,DPPC,FPC,RMC,PCC,TZC和CC(具体请参见表1)

1.3.3 内参基因的选择及qRT-PCR特异性引物设计

选择6个常用内参基因,TATA盒结合蛋白(TATA box binding protein, *TBP*)、 β -肌动蛋白(Actin beta, *ACTB*)、微管蛋白1 α (tubulin alpha 1a, *TUBA1A*)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, *G6PDH*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyc-

eraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)及 β 2-微球蛋白(β -2-microglobulin, *B2M*)作为梅花鹿细胞检测的候选内参基因,利用NCBI以及primer 5.0软件同源比对序列和设计特异性引物(表2)。引物设计条件:熔链温度(T_m):58~62 $^{\circ}\text{C}$;PCR扩增长度:100~300 bp;引物长度:17~23 bp;GC含量:45%~55%。

1.3.4 RNA提取与cDNA合成

利用0.8% trypsin消化各鹿细胞系细胞,PBS重悬清洗2次,利用total RNA提取试剂盒(life technology, 美国),提取细胞总RNA,所得RNA样品用超微量酶标仪(Pro 2000, Tecan, 瑞士)测定其浓度及纯度后,调整RNA浓度一致后,利用TAKRA 1st cDNA合成试剂盒将各样品的RNA反转录合成

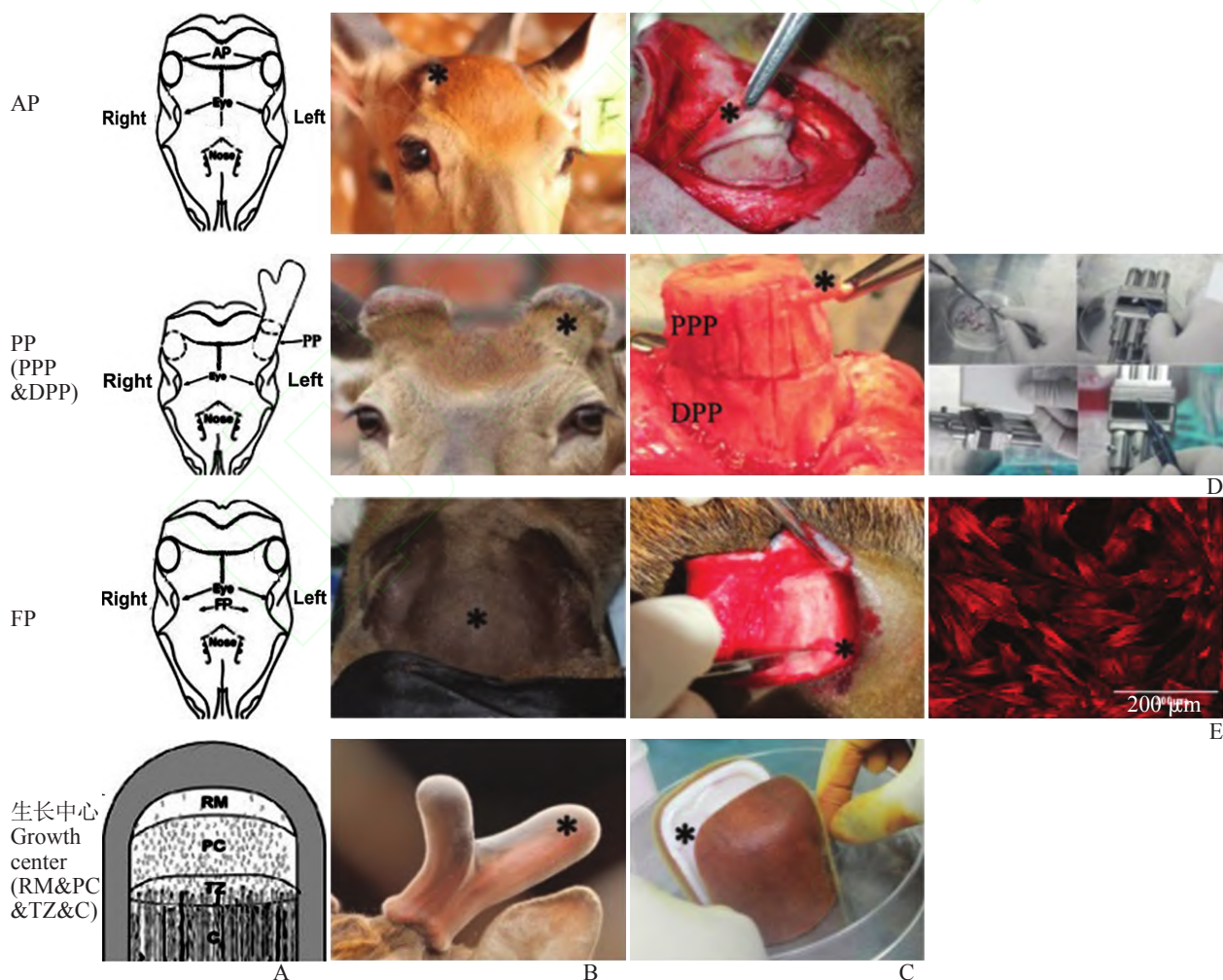


图1 鹿茸干细胞及鹿茸生长中心组织采集及原代细胞培养

Figure 1 Sampling and primary cell culture for antler stem cell and growth center tissue

A. 取样示意图;B. 取样部位图;C. 取样部位切开方式;D. 原代培养;E. 经罗丹明染色的原代细胞;*: 取样部位

A. Sketch map of sampling location; B. Sampling location; C. Sampling methods; D. Primary culture; E. Rhodamine stained primary cells; *: Sampling location.

cDNA 模板,用超纯水稀释至一定比例后,用于 PCR 扩增或于-20 ℃保存。

1.3.5 内参基因的荧光定量 PCR 扩增

荧光定量 PCR 反应体系 20 μL: 正反引物各 0.4 μL (10 μmol/L), cDNA 模板 1 μL (50 ng/μL), 2*SYBR master 10 μL, ddH₂O 8.2 μL, 每个样品重复 3 次。反应条件: 95 ℃预变性 10 min; 40 个循环: 95 ℃ 30s, 60 ℃ 60 s, 增加熔解曲线分析, 在退火延伸阶段收集荧光信号信息, 利用 qRT-PCR 仪(ABI 7500, 美国)自动读取数据并导出, 采用标准曲线分析计算各引物的扩增效率。引物扩增效率(*E*)计算公式为 $E=10^{-1/\text{斜率}}$ 。

1.3.6 数据处理及分析

将样品的 *C_t* 值导出并计算相对表达量 *Q*, 计算公式为: $Q=E^{\Delta C_t}$, 式中: *E* 为基因扩增效率, $\Delta C_t=C_{t\text{min}}-C_{t\text{样品}}$ (*C_t_{min}*: 样品中最低值; *C_t_{样品}*: 每个样品的值)。

根据 6 个内参基因在不同细胞系中的相对表达量, 分别应用 Delta-*C_t* method、GeNorm(ver.3.5)、NormFinder(ver.0.953)和 Bestkeeper(ver.1.0)4 种软件程序对 6 个内参基因的表达稳定性进行分析, 最后采用 RefFinder 软件对所有内参基因的表达稳定性进行了排序, 以筛选最为稳定合适的内参基因。

2 结果

2.1 鹿茸干细胞及鹿茸生长中心细胞原代培养

将 AP、PPP、DPP、FP、顶端间充质层(reserve mesenchymy, RM)、顶端前成软骨层(precartilage, PC)、顶端过渡区(transition zone, TZ)以及顶端软骨层(cartilage, C)组织于无菌环境中取出(图 1A, B, C), 进行了组织原代培养(图 1D), 在显微镜下观察所培养的细胞(图 1E)均匀分布于视野中, 细胞形态基本一致, 呈梭形, 纯度较高, 增殖速度快, 适用于

表 1 鹿细胞系

Table 1 Cells for deer research

组别	缩写	样品名称
Group	Abbreviation	Sample name
鹿茸干细胞	APC	生茸区骨膜细胞 Antlerogenic periosteum cells
	PPPC	致敏区角柄骨膜细胞 Potentiated pedicle periosteum cells
	DPPC	休眠区角柄骨膜细胞 Dormant pedicle periosteum cells
	FPC	面部骨膜细胞 Facial periosteum cells
生长中心细胞	RMC	鹿茸顶端间充质细胞 Reserve mesenchymy cells
Antler growth center cells	PCC	鹿茸顶端前成软骨层细胞 Precartilage cells
	TZC	鹿茸顶端过渡区细胞 Transition zone cells
	CC	鹿茸顶端软骨层细胞 Cartilage cells

表 2 qRT-PCR 的检测基因及其引物

Table 2 The internal reference genes and primer pairs for real-time fluorescent quantitative PCR

基因	ID(牛)	引物序列(5'-3')	扩增片段/bp
Gene	ID (<i>Bos taurus</i>)	Primer sequences	Amplicon length
<i>TBP</i>	NM_001075742.1	F: GTCCACAACACCACTGAG R: TGCTTACCCACCAACAG	267
<i>ACTB</i>	AY141970.1	F: GCGTGACATCAAGGAGAAGC R: GGAAGGACGGCTGGAAGA	134
<i>TUBA1A</i>	NM_001166505.1	F: GCCAGATGCCAAGTGAC R: TGCCAGTGCGAACCTCATC	126
<i>G6PDH</i>	AY862878.1	F: ACCTACATCGTGGGCTAT R: TTGTAGGAGGCAGTGTC	146
<i>GAPDH</i>	XR_001295477.2	F: ATGTTTGTGATGGGCGTGAAC R: CCAGTAGAAGCAGGGATGATGTT	265
<i>B2M</i>	NM_173893.3	F: TTGGTCCTTCTCGGGCTG R: CTTCTCCCCATTCTTCAGC	181

TBP: TATA 结合蛋白; *ACTB*: Beta-肌动蛋白; *TUBA1A*: 微管蛋白 alpha 1a; *G6PDH*: 6-磷酸葡萄糖脱氢酶; *GAPDH*: 3-磷酸甘油醛脱氢酶; *B2M*: Beta-2-微球蛋白; 下同

TBP: TATA box binding protein; *ACTB*: β -actin; *TUBA1A*: Tubulin, alpha 1a; *G6PDH*: Glucose-6-phosphate dehydrogenase; *GAPDH*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *B2M*: Beta-2-microglobulin; The same below

下一步实验。

2.2 内参基因片段的RT-PCR扩增分析

1%琼脂糖凝胶电泳检测表明,在120~270 bp之间,*TBP*、*ACTB*、*TUBA1A*、*G6PDH*、*GAPDH*及*B2M*的扩增片段较亮,与预期相符,且无杂带与二聚体(图2),表明6个常用候选内参基因引物特异性较高,可用于qRT-PCR分析。

以不同鹿细胞系的cDNA为模板进行qRT-PCR分析(图3)。选择的6个常用内参基因在不同鹿细胞系中的熔解曲线为显著的单一峰(除*ACTB*外),并且qRT-PCR的扩增曲线清晰可辨。将cDNA模板按照1:10梯度稀释后,以*Ct*值为纵坐标,相对拷贝数的对数为横坐标进行相应的标准曲线

分析,结果表明,除*GAPDH*和*TBP*外,其他基因的扩增效率为94%~110%,决定系数为0.996~1(表3)。综上,本实验qRT-PCR的分析结果准确可用。

2.4 内参基因在不同鹿细胞系中表达的稳定性分析

通过*Ct*值法,分析了6个常用内参基因在不同鹿细胞系中的表达量情况。通过比较这6个内参基因的*Ct*值发现,各内参基因在各鹿的细胞系中的表达水平存在一定的差异。由图4可以看出,*GAPDH*的*Ct*值最低,其表达丰度最高;*TBP*和*G6PDH*的*Ct*值最高,其表达丰度最低。

2.5 内参基因在不同鹿细胞系中表达的综合分析

为筛选出表达稳定的内参基因,本研究利用Delta *Ct*、geNorm(ver.3.5)、NormFinder(ver.0.953)和Bestkeeper(ver.)4种软件分别对各内参基因的相对表达量Q进行统计分析。结果显示(表4),在不同鹿细胞系中6种内参基因的表达稳定性存在差异,基于推荐的综合法结果表明,在不同鹿茸干细胞之间,*ACTB*、*TUBA1A*以及*B2M*表达稳定性最高。在不同鹿茸生长中心分层细胞之间,*B2M*、*ACTB*以及*G6PDH*表达稳定性位居前列。在所有鹿细胞系之间,则*B2M*、*ACTB*以及*TUBA1A*为适宜的内参基因。

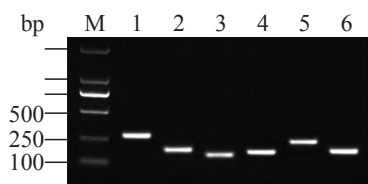


图2 6种内参基因的PCR扩增产物

Figure 2 PCR products of 6 reference genes

M: DL 2000 marker; 1: *TBP*; 2: *ACTB*; 3: *TUBA1A*; 4: *G6PDH*; 5: *GAPDH*; 6: *B2M*

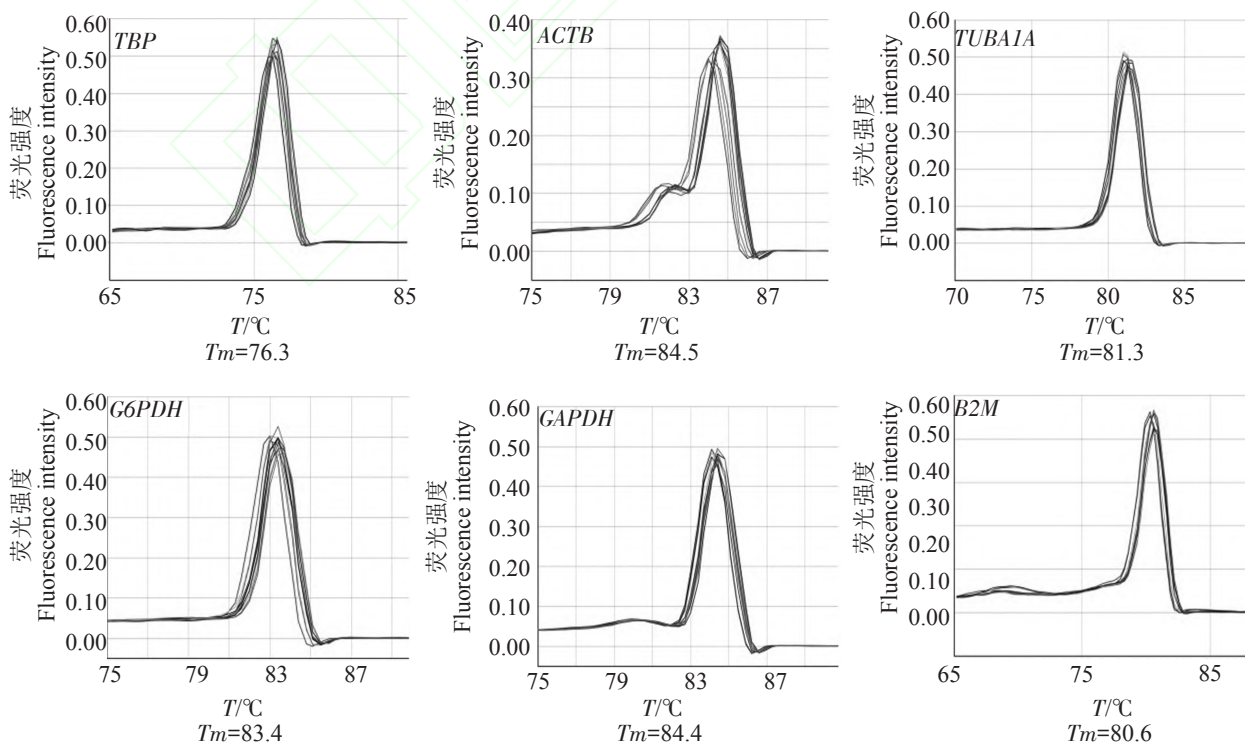


图3 鹿细胞中6个内参基因的qRT-PCR熔解曲线

Figure 3 Real-time PCR melting curve of 6 reference genes in deer cells

3 讨论

qRT-PCR 技术是目前分子生物学中分析基因表达的一种有效手段,选用一个或几个合适的内参基因对目的基因进行校正可以提高该方法的准确度。因此,在基因相对表达分析中使用合适的内参基因显得十分关键(Radonić et al., 2004)。一直以来,在鹿细胞系 qRT-PCR 分析的实验中,研究者多采用单一的、普遍的看家基因对目标基因进行标定,如 *GAPDH*, β -*actin* 等(谢红梅等, 2016; 韩春梅

等, 2012; 郭倩倩等, 2014; 褚文辉等, 2009)。虽然,目前有部分学者对不同生长时期鹿茸组织进行了内参基因筛选工作,发现表达较为稳定的内参基因有 *GAPDH*、*ACTB*、*RPL40* 以及 *Gpx* 等(张然然等, 2015; Pita-Thomas et al., 2010; Liu et al., 2014)。但是,至今国内外尚未见鹿细胞系内参筛选报道。鹿茸干细胞组织是诱发鹿茸发生和再生的组织基础,具备极强的增殖潜力和分化潜能,并且其细胞学特性与肿瘤细胞高度相似,如极快速地分裂繁殖和高水平凋亡(鲍加荣等, 2008)。鹿茸生长中心是维持

表 3 6 个常用候选内参基因的 qRT-PCR 标准曲线

Table 3 qRT-PCR standard curves of 6 candidate reference genes

基因 Gene	cDNA 母液的 <i>C_t</i> 值 <i>C_t</i> value of initial cDNA solution	扩增效率 Amplification efficiency	曲线斜率 Slope of amplification curve	决定系数 <i>R</i> ² Determination coefficient	解链温度/℃ Melting temperature
<i>TBP</i>	16.1779	0.81664	-3.857	0.9938	76.3
<i>ACTB</i>	14.20027	0.974613	-3.3843	0.9997	84.5
<i>TUBA1A</i>	14.21913	0.949194	-3.45	0.9966	81.3
<i>G6PDH</i>	14.85823	1.094145	-3.1152	0.9966	83.4
<i>GAPDH</i>	14.16763	1.335784	-2.7142	0.9846	84.4
<i>B2M</i>	19.41827	1.103513	-3.0965	0.9957	80.6

表 4 6 个常用候选内参基因稳定性排序

Table4 Stability ranking of 6 candidate reference genes

组别 Groups	方法 Methods	排序(稳定度, 高→低) Ranking order(stability, high→low)					
		1	2	3	4	5	6
干细胞 Stem cells	Delta <i>C_t</i>	<i>ACTB</i>	<i>B2M</i>	<i>TUBA1A</i>	<i>G6PDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TBP</i>
	geNorm	<i>ACTB/TUBA1A</i>		<i>B2M</i>	<i>GAPDH</i>	<i>G6PDH</i>	<i>TBP</i>
	Normfinder	<i>TUBA1A</i>	<i>TUBA1A</i>	<i>B2M</i>	<i>G6PDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TBP</i>
	Bestkeeper	<i>B2M</i>	<i>ACTB</i>	<i>TUBA1A</i>	<i>GAPDH</i>	<i>G6PDH</i>	<i>TBP</i>
	综合排序	<i>ACTB</i>	<i>TUBA1A</i>	<i>B2M</i>	<i>GAPDH</i>	<i>G6PDH</i>	<i>TBP</i>
	Recommended comprehensive ranking						
生长中心细胞 Growth center cells	Delta <i>C_t</i>	<i>ACTB</i>	<i>B2M</i>	<i>G6PDH</i>	<i>TUBA1A</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TBP</i>
	geNorm	<i>ACTB/B2M</i>		<i>G6PDH</i>	<i>TUBA1A</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TBP</i>
	Normfinder	<i>B2M</i>	<i>ACTB</i>	<i>TUBA1A</i>	<i>G6PDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TBP</i>
	Bestkeeper	<i>B2M</i>	<i>ACTB</i>	<i>G6PDH</i>	<i>TUBA1A</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TBP</i>
	综合排序			<i>G6PDH</i>	<i>TUBA1A</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TBP</i>
	Recommended comprehensive ranking	<i>B2M</i>	<i>ACTB</i>				
干细胞+生长中心细胞 Stem cells+growth center cells	Delta <i>C_t</i>	<i>ACTB</i>	<i>B2M</i>	<i>TUBA1A</i>	<i>G6PDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TBP</i>
	geNorm	<i>ACTB/B2M</i>		<i>TUBA1A</i>	<i>G6PDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TBP</i>
	NormFinder	<i>B2M</i>	<i>ACTB</i>	<i>TUBA1A</i>	<i>G6PDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TBP</i>
	Bestkeeper	<i>B2M</i>	<i>ACTB</i>	<i>TUBA1A</i>	<i>G6PDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TBP</i>
	综合排序	<i>B2M</i>	<i>ACTB</i>	<i>TUBA1A</i>	<i>G6PDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TBP</i>
	Recommended comprehensive ranking						

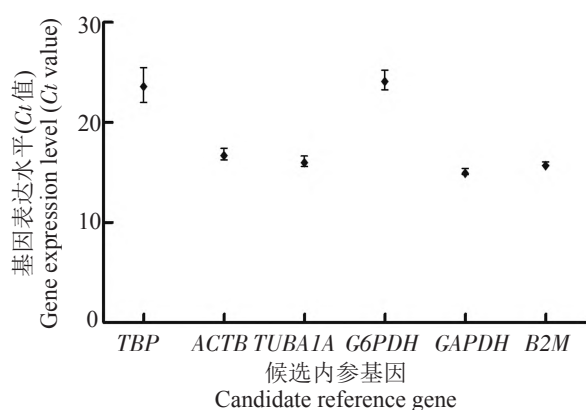


图4 所有内参基因在鹿细胞系的平均Ct值

Figure 4 Mean Ct value of all reference genes in cell lines for antler research

鹿茸快速生长的组织基础,在鹿茸生长期发生着剧烈的细胞增殖分化活动(冯海华等, 2007)。已有研究表明,常用内参基因在肿瘤组织和正常组织之间进行差异分析时,也表现出极不稳定的现象(Yang et al., 2016; Lemma et al., 2016),此外据报道,传统的内参基因在不同条件处理下也会发生表达不稳定的现象(孙亚丽等, 2014; 王继英等, 2015)。因此,推测常用内参基因也不能在所有鹿细胞系中均稳定表达,应依据不同的组织以及处理条件进行内参基因的选择。鹿茸作为唯一的能够周期性再生的哺乳动物器官,具有重要的生物医学研究价值,在组织及细胞水平对其内参基因稳定性的研究十分关键。

本研究利用qRT-PCR技术对6个功能各异的候选内参基因的mRNA表达量进行了检测,通过4种分析方法(Delta-Ct method, GeNorm, Bestkeeper和NormFinder)分析了6个常用候选内参基因的稳定性,在所有鹿细胞系分析中,Delta-Ct method和GeNorm方法计算得出最稳定的内参基因为ACTB,而Bestkeeper和NormFinder软件分析得出最稳定的内参基因却为B2M,结果稍有不同,产生这种现象的原因可能是由于不同软件及分析方法的算法差异。为了消除算法之间的差异,本研究利用ReFinder软件对4种软件分析结果进行综合分析后发现,在不同鹿茸干细胞之间,ACTB、TUBA1A以及B2M表达稳定性位居前列。在不同鹿茸生长中心分层细胞之间,B2M、ACTB以及G6PDH表达稳定性位居前列。在所有鹿细胞系之间,则B2M、ACTB以及TUBA1A表达稳定性位居前列。该结果为进

一步开展鹿功能基因表达研究提供了理论依据。

值得注意的是,在所有鹿细胞系中,4个分析方法结果都表明TBP的表达是最不稳定的,因此在今后鹿细胞系基因差异表达研究中最好避免使用TBP作为内参基因。从各基因的平均Ct值可以看出,GAPDH的Ct值最小,说明表达丰度最高。结合GAPDH基因的表达稳定性,发现其稳定程度低于B2M、ACTB和TUBA1A,表明基因表达稳定性与表达量两者之间可能不存在相互关系,这与前人研究结果相符(孙亚丽等, 2014)。本研究中的ACTB基因虽然也能扩增出单一条带,但是出现部分杂峰,可4种软件分析结果表明,ACTB基因的稳定性均位居前列,因此,熔解曲线呈现单一峰图是否可作为基因稳定性的指标,值得进一步研究。

4 结论

本研究基于Delta Ct、geNorm(ver.3.5)、NormFinder(ver.0.953)、Bestkeeper(ver.1.0)以及ReFinder软件统计学方法分析比较了TBP、ACTB、G6PDH、GAPDH、TUBA1A以及B2M这6个候选内参基因在鹿茸生长中心细胞以及鹿茸干细胞中的表达稳定性。综合分析结果表明,B2M、ACTB以及TUBA1A候选基因可作为研究鹿茸生长中心细胞及鹿茸干细胞基因差异表达的内参基因。本研究为今后检测鹿茸生长中心细胞与干细胞基因表达差异性研究提供理论数据和参考。

参考文献

- 鲍加荣, 李春义, 邢秀梅, 等. 2008. 鹿茸再生及干细胞研究进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 12(51): 10163-10166. (Bao J R, Li C Y, Xing X M, et al, 2008. Research progress in deer antler regeneration and stem cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 12(51): 10163-10166.
- 褚文辉, 赵海平, 杨福合, 等. 2009. 梅花鹿Col X基因的RNAi重组慢病毒载体的构建及鉴定[J]. 中国农业大学学报, 14(4): 29-34. (Chu W H, Zhao H P, Yang F H, et al. 2009. Construction and characterization of lentiviral vector of RNA interference of collagen type X gene of sika deer[J]. Journal of China Agricultural University, 14(4): 29-34.)
- 褚文辉, 李春义, 赵海平, 等. 2014. 一种便携式无菌手术器械包[P]. 中国, 专利号: 201420244508.1. (Chu W H, Li C Y, Zhao H P, et al, 2014. A portable sterile surgical in-

- strument packs[P]. China, patent No. 201420244508.1)
- 冯海华, 闭兴明, 赵丽红, 等. 2007. 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, (37): 7373-7376. (Feng H Y, Bi X M, Zhao L H, et al, 2007. Effects of insulin-like growth factor 1 on the *in vitro* proliferation of antler organic center cells at different growing periods [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, (37): 7373-7376.)
- 郭倩倩, 王大涛, 褚文辉, 等. 2014. 利用慢病毒表达载体干扰梅花鹿柄骨膜细胞 *P21* 基因[J]. 吉林农业大学学报, 36(1): 116-121. (Guo Q Q, Wang D T, Chu W H, et al. 2014. RNA interference targeting *P21* gene of pedicle periosteum cells from sika deer by shRNA lentivirus [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 36(1): 116-121.)
- 韩春梅, 高庆华, 李世军, 等. 2012. 原癌基因 *c-myc* 在塔里木马鹿茸不同生长期的表达[J]. 中国兽医学报, 32(10): 1536-1541. (Han C M, Gao Q H, Li S J, et al. 2012. Expression of proto-oncogene *C-myc* in the tarim deer antler in different growth stages[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 32(10):1536-1541.
- 郝立宏, 马坚伟, 邵淑娟. 2011. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)作为内参的质疑以及在肿瘤中的表达[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 20(5): 496-498. (Hao L H, Ma S W, Shao S J. 2011. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) as a reference to internal reference and its expression in tumors [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 20(5): 496-498.)
- 何刚. 1992. 鹿茸的药理作用与临床应用的研究进展[J]. 延边医学院学报, 15(3): 231-234. (He G. 1992. Advances in pharmacological effects and clinical application of deer antler[J]. Journal of Yanbian Medical College, 15 (3): 231-234.)
- 蒋晓梅, 张新全, 严海东, 等. 2014. 柳枝稷根组织实时定量PCR分析中内参基因的选择[J]. 农业生物技术学报, 22(1): 55-63. (Jiang X M, Zhang X Q, Yan H D, et al. 2014. Reference gene selection for real-time quantitative PCR normalization in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) root tissue[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 22(1): 55-63.)
- 李春义. 2017. 鹿茸完全再生机制研究进展[J]. 农业生物技术学报, 25(1): 1-10. (Li C Y. 2016. Progress on the mechanism underlying full regeneration of mammalian organ deer antlers[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 25(1): 1-10.)
- 李春义, 赵海平, 褚文辉, 等. 2014. 一种动物皮内切割组合刀具[P]. 中国, 专利号: 201410281710.6. (Li C Y, Zhao H P Chu W H, et al, 2014. A acquisition device used for special animal aseptic tissue[P]. China, patent No. 201420244472.7)
- 秦晓艺, 王杰. 2015. 杏鲍菇采后木质化相关基因实时定量PCR中内参基因的选择[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 43(7): 221-227. (Qing X Y, Wang J. 2015. Selection of reference gene for quantitative real-time PCR analysis of lignification related genes in post-harvest *Pleurotus eryngii*[J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition), 43(7): 221-227.)
- 孙亚丽, 张德辉, 赵亮, 等. 2014. 铜胁迫下天蓝苜蓿根组织实时定量PCR内参基因的选择[J]. 农业生物技术学报, 22(10): 1223-1231. (Sun Y L, Zhang D H, Zhao L, et al. 2014. Reference gene selection for real-time quantitative PCR in black medic (*Medicago lupulina* L.) root tissue under copper stress[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 22(10): 1223-1231.)
- 王继英, 王彦平, 郭建凤, 等. 2015. 仔猪外周血中内参基因的筛选及细胞因子和受体的表达水平[J]. 中国农业科学, 48(7): 1437-1444. (Wang J Y, Wang Y P, Guo J F, et al. 2015. Selection of reference genes and determination of cytokines and receptor mRNA expression in peripheral blood of piglets[J]. Scientia Agricultural Sinica, 48 (7): 1437-1444.)
- 谢红梅, 孟祥宇, 孙天霞, 等. 2016. siRNA沉默胸腺素 $\beta 4$ 对鹿茸间充质干细胞增殖的影响[J]. 长春中医药大学学报, 32(3): 462-464. (Xie H M, Meng X Y, Sun T X, et al. 2016. Effect of siRNA-mediated thymosin $\beta 4$ silence on proliferation in mesenchymal stem cell[J]. Journal of Changchun University of Chinese Medicine, 32(3): 462-464.)
- 杨福合. 2012. 中国鹿产业发展战略研究[D]. 硕士学位论文, 长春: 吉林大学, 导师: 周柏翔, PP. 1-3. (Yang F H. 2012. Chinese deer industry development strategy research[D]. Thesis for M.S., Changchun: Jilin university, Supervisor: Zhou B X, PP. 1-3.)
- 张然然, 刘华淼, 邢秀梅, 等. 2015. 鹿茸组织中内参基因的筛选和验证[J]. 中国畜牧兽医, 42(4): 883-889. (Zhang R R, Liu H M, Xing X M, et al. Selection and validation of reference genes in velvet antlers tissues[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 42(4): 883-889.)
- 赵海平, 李春义, 褚文辉, 等. 2014. 一种特种动物无菌组织采集装置[P]. 中国, 专利号: 201420244472.7. (Zhao H P, Li C Y, Chu W H, et al, 2014. A acquisition device used for special animal aseptic tissue [P]. China, patent No. 201420244472.7)

- 张伟, 褚文辉, 李春义. 2015. 鹿茸成骨过程及其相关调控机制研究进展[J]. 中国农学通报, 31(8): 6-11. (Zhang W, Chu W H, Li C Y. 2015. Recent progress on regulatory mechanisms of deer antler ossification[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 31(8): 6-11.
- Andersen C L, Jensen J L, Ørntoft T F. 2004. Normalization of Real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets[J]. Cancer Research, 64(15): 5245-5250.
- Cegielski M, Izykowska I, Podhorska-Okolow M, et al. 2009. Histological studies of growing and mature antlers of red deer stags (*Cervus elaphus*) [J]. Anatomia, Histologia, Embryologia, 38(3): 184-188.
- Gao Z G, Yang F H, McMahon C, et al. 2012. Mapping the morphogenetic potential of antler fields through deleting and transplanting subregions of antlerogenic periosteum in sika deer (*Cervus Nippon*) [J]. Journal of Anatomy, 220(2): 131-143.
- Fior J. 2014. Salamander regeneration as a model for developing novel regenerative and anticancer therapies[J]. Journal of Cancer, 5(8):715-719.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, et al. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; Strategies and considerations[J]. Genes and Immunity, 6(4): 279-84.
- Kierdorf U, Kierdorf H. 2011. Deer antlers - a model of mammalian appendage regeneration: An extensive review[J]. Gerontology, 57(1): 53-65.
- Li C, Chu W. 2016. The regenerating antler blastema: the derivative of stem cells resident in a pedicle stump[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 21(3): 455-467.
- Li C, Suttie J M. 2003. Tissue collection methods for antler research [J]. European Journal of Morphology, 41(1): 23-30.
- Li C, Mackintosh C G, Martin S K, et al. 2007. Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum deletion[J]. European Journal of Morphology, 328(1):65-75.
- Li C, Yang F, Suttie J. 2011. Stem cells, stem cell niche and antler development[J]. Animal Production Science,51: 267-276.
- Li C, Zhao H, Liu Z, et al. 2014. Deer antler--a novel model for studying organ regeneration in mammals[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 56: 111-122.
- Li C. 2012. Deer antler regeneration: A stem cell-based epimorphic process[J]. Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews, 96(1): 51-62.
- Li C. 2013. Histogenetic aspects of deer antler development [J]. Frontiers in Bioscience (Elite edition) (Front Biosci), 5(5): 479-489.
- Liu M C, Yao B J, Zhang H, et al. 2014. Identification of novel reference genes using sika deer antler transcriptome expression data and their validation for quantitative gene expression analysis[J]. Genes & Genomics, 36(5): 573-582.
- Lord E A, Martin S K, Gray J P, et al. 2007. Cell cycle genes *PEDF* and *CDKN1C* in growing deer antlers[J]. Anatomical Record (Hoboken, N.J. : 2007), 290(8): 994-1004.
- Lemma S, Avnet S, Salemo M, et al. 2016. Identification and validation of housekeeping genes for gene expression analysis of cancer stem cells[J]. PLoS One,11(2):e0149481.
- Nguewa P A, Agorreta J, Blanco D, et al. 2008. Identification of importin 8 (IPO8) as the most accurate reference gene for the clinicopathological analysis of lung specimens[J]. BMC Molecular Biology, 9:103.
- Pfaffl M W, Tichopad A, Prgomet C, et al. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best keeper-Excel-based tool using pair-wise correlations[J]. Biotechnology Letters, 26(6): 509-515.
- Pita-Thomas W, Fernández-Martos C, Yunta M, et al. 2010. Gene expression of axon growth promoting factors in the deer antler[J]. PLoS One, 5(12): e15706.
- Quackenbush J. 2002. Microarray data normalization and transformation [J]. Nature Genetics, 32(suppl): 496-501.
- Radonić A, Thulke S, Mackay I M, et al.2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 313(4): 856-862.
- Silver N, Best S, Jiang J, et al. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using Real-time PCR[J]. BMC Molecular Biology, 7: 33.
- Valasek M A, Repa J J. 2005. The power of real-time PCR[J]. Advances in Physiology Education, 29(3):151-159.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. 2002. Accurate normalization of Real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. Genome Biology, 3(7): research 0034.
- Xie F, Xiao P, Chen D. 2012. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs[J]. Plant Molecular Biology, 80 (1), 75-84.
- Yang J, Yang Q, Yu S, et al. 2016. Evaluation and validation of suitable reference genes for reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction studies in cholangiocarcinoma patients and cell lines[J]. Oncology Letters, 11 (4): 2673-2681.