

以鹿茸为模型探索软骨组织发生

路 晓, 孙红梅, 张 伟, 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室, 长春 130000)

摘 要:软骨组织的研究一直依赖于哺乳动物胚胎模型,这种方法存在取材困难、难以明确界定分层边界等弊端。而鹿茸非常独特,可以作为一种新的生物医学模型对软骨发育进行研究。通过比较传统的软骨研究模型和鹿茸这种新型模型,分析了鹿茸作为软骨研究模型的优势,同时对鹿茸软骨组织发生与生长的组织基础,以及分子调控机制的研究进展进行了综述,并对鹿茸软骨组织中血管生成的调控因子进行了探讨,以期寻找更有效的软骨发育研究模型提供理论参考。

关键词:鹿茸;软骨发生;调控机制

doi:10.13304/j.nykjdb.2015.059

中图分类号:Q959.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0864(2015)04-0071-07

Exploration of Cartilage Development Using Deer Antler Model

LU Xiao, SUN Hong-mei, ZHANG Wei, LI Chun-yi*

(State Key Laboratory of Special Economic Animal Molecular Biology, Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130000, China)

Abstract: Studies on cartilage tissues has been relying on embryo model of mammals. This method has difficulties in obtaining material and clearly defining layered boundaries. While, the antler is unique that can be used as a new biomedicine model to study cartilage development. Through comparing the traditional cartilage research model with the new antler model, this paper analyzed the advantages of antlers being a new cartilage research model; reviewed the turning up of antler cartilage and tissue foundation of its growth, and molecular regulation mechanism; discussed the regulatory factors in angiogenesis of antler cartilage, so as to provide theoretical basis for finding a more effective model in studying cartilage development.

Key words: antler; chondrogenesis; regulation mechanism

软骨是细胞组成很单一的一种独特组织^[1],具有很强的抗压、抗撞击能力。由于没有血管分布,软骨组织几乎丧失了自我修复能力^[2],因此,肋软骨炎等软骨性疾病一直无法得到根治,而目前修复软骨损伤的途径和方法主要包括导入脉管系统或移植细胞到受损部位^[3]。为了获得脉管系统,许多研究者通过软骨下骨钻孔来使软骨暴露给血管,驱动内部软骨修复。然而这种途径驱动软骨形成只能提供暂时的纤维软骨环,而不具备持久的生物学功能^[4]。一些研究者也曾尝试采用多种方法移植细胞到受损软骨关节,然而,这

些修复过程缺乏移植组织与宿主组织之间的融合,愈后结果都不理想^[5]。目前为止,仍然没有一种令人信服的通用方法能将受损的软骨修复到正常功能水平^[6]。

软骨再生与修复机制的研究由于缺乏有效的研究模型而受到很大的制约。鹿茸软骨是非常独特的软骨组织,它不仅在自然条件下能够修复、再生,而且每年以一种惊人的速度再生(可达2 cm/d)^[7]。此外,与体骨的软骨内骨化过程不同,鹿茸软骨形成与血管形成是一体的,间充质细胞首先分化形成含有血管的前骨质,然后被软骨

收稿日期:2015-02-02; 接受日期:2015-05-28

基金项目:国家 863 计划项目(2011AA100603);国家自然科学基金项目(31170950)资助。

作者简介:路 晓,硕士研究生,主要从事鹿茸生物学研究。E-mail:1234wuguipa@163.com。* 通信作者:李春义,研究员,博士生导师,主要从事鹿茸干细胞与哺乳动物器官再生、鹿茸生物学及其基因工程研究。E-mail:lichunyi1959@163.com。

所替代,不经历血管侵入的过程。由于鹿茸软骨的这些特性^[8],鹿茸的前骨质组织是否为真正的软骨这一问题,在 20 世纪中期一直存在争议。为了弄清这一问题,Banks^[9]和 Frasier 等^[10]分别进行了鹿茸超微结构和鹿茸软骨基质的免疫学研究,确定了鹿茸前骨质组织具有软骨的结构特点,证实鹿茸的含血管前骨组织为真正的软骨。后来 Price 等^[11]从分子水平研究了软骨标志性基因的表达,证实了这一结论。孙红梅等^[12]从细胞水平研究了鹿茸干细胞的成软骨细胞分化,同样也得出了一致的结论。上述研究为以鹿茸作为研究对象研究软骨发育奠定了理论基础。本文分析了鹿茸作为软骨发生研究模型的优势,并对鹿茸软骨组织的发生与形成及其调控因子以及鹿茸软骨内血管生成的调控因子进行了综述,以期寻找更有效的软骨发育模型提供参考。

1 鹿茸作为软骨发生研究模型的优势

许多学者在研究软骨形成过程中使用哺乳动物的胚胎为生物模型,然而,胚胎期的软骨组织结构中,层与层(一般分为休眠层、增殖层、成熟层与钙化层)之间由于距离较窄而难以明确界定边界,并且常以胚胎长骨的生长板作为研究对象,其取材会受到一定的限制,故不利于研究的开展。

目前公认的脊椎动物骨骼形成方式有两种,分别是软骨内成骨和膜内成骨。其中软骨内成骨是脊椎动物成骨的主要方式,而鹿茸软骨组织的发生与哺乳动物的软骨形成过程非常相似,即都经过了间充质细胞分化为软骨细胞和软骨膜细胞,最终分化为肥大软骨细胞的过程。

与胚胎软骨研究模型相比,鹿茸有着得天独厚的优势:首先,鹿茸独一无二的周期性再生特性^[13]为软骨研究模型的取材提供了方便;其次,鹿茸空前的生长速度(生长高峰期可达 2.75 cm/d)为快速修复受损的软骨组织提供了一个难得的模型^[14];再次,鹿茸生长顶端由不规则排列的细胞构成,并且未形成软骨柱,该部分存在着处于不同分化阶段的软骨细胞,一般纵向由外向内分为真皮层、间充质层、前成软骨层、过渡层和软骨层^[15]。Li 等^[16]用 3 岁龄赤鹿生长 60 d 后的鹿茸,取其顶端组织,依据形态学特征和组织学

特征进行了分层(图 1),由于每一分层的跨度较大,易于分离,他们尝试在肉眼观察的情况下使用针线打孔做标记,之后切片用组织学染色,二者对比,发现打孔位置与染色位置相差无几,进一步说明鹿茸分层方便可行;最后,鹿茸干细胞的一些非典型性特征,比如胚胎干细胞标记和多效分化潜能,为了解胚胎干细胞的一些属性并使软骨组织完全修复提供了宝贵的模型^[17,18]。

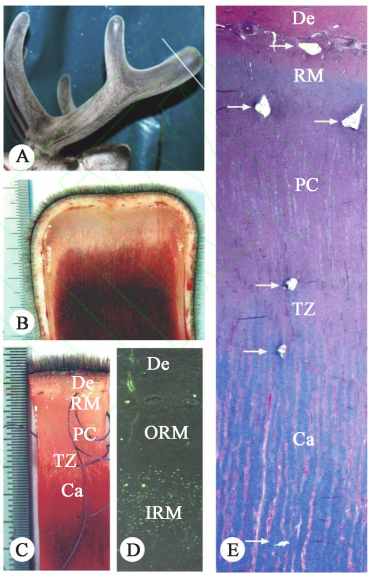


图 1 鹿茸顶端分层结果^[16]
Fig.1 The result of tip tissue sectioned sagittally along the longitudinal axis^[16].

A. 鹿茸生长到一定时间,在白线处切割,获得顶端组织;B. 纵向切开鹿茸顶端;C. 通过形态学标记分层,以针线打孔作标记;D. BrdU 结合在真皮层(De)、外部间充质层(ORM)和内部间充质层(IRM);E.组织学染色切片,针孔部分是肉眼观察的情况下对鹿茸组织进行分层。RM:间充质层;PC:前成软骨层;TZ:过渡层;Ca:软骨层

A. Antler ready to be harvested, and line indicating amount of tip removed;B. Tip after being cut sagittally;C. Layers as identified by the distinct morphological markers and marked by the stitches;D. BrdU incorporation in the dermis (De), outer reserve mesenchyme (ORM), and inner reserve mesenchyme (IRM);E. Histological section of the antler tip, with holes from the stitches evident (arrows). RM: Reserve mesenchyme; PC: Precartilage; TZ: Transition zone; Ca: Cartilage.

2 鹿茸软骨组织的发生与形成

鹿茸顶端组织可分为 3 个明显的部分,即间充质层、前成软骨层和软骨层。间充质层是分化

程度最低的一层,其慢慢向软骨分化过渡。在鹿茸皮肤(表皮和真皮)下,有一层软骨膜纤维层,包含许多狭长细胞并富含丰富的纤维细胞外基质。当鹿茸生长时,软骨膜细胞层发展成骨膜,并在其上开始膜内成骨过程^[19]。鹿茸组织的发生是基于鹿生茸区骨膜(antlerogenic periosteum, AP)与其上覆盖的皮肤相互作用的结果^[20]。鹿茸的形成起始于生茸区骨膜细胞层,经过角柄成骨阶段和鹿茸软骨内成骨过程后形成^[19]。

2.1 角柄成骨

角柄成骨过程可分为 3 个阶段:①膜内成骨阶段:从外观上看,角柄骨组织不断生长,当高度达到 1.0 cm 左右时,可以触摸到角柄的存在;同时 AP 细胞不断增殖变厚,在成骨细胞的作用下,骨小梁也快速形成,但此时由 AP 细胞衍生出的组织仅仅是骨松质^[19]。②过渡成骨阶段:角柄骨组织继续生长,当高度介于 1.0~2.5 cm 之间时,可以肉眼观察到角柄。此时,位于角柄顶端骨小梁区域的 AP 细胞开始分化成软骨细胞,紧接着替换成骨细胞,此时,骨和软骨的混合物(称为过渡骨)开始形成^[19]。③角柄软骨内成骨:角柄骨组织的高度达到 2.5~3.0 cm 时,角柄组织完成生长。此时,AP 组织细胞层细胞开始定向分化,先分化为前成软骨细胞,再分化为软骨细胞^[19]。

2.2 鹿茸软骨内成骨

角柄与初角茸的生长均含有软骨内成骨过程,值得注意的是,鹿茸软骨内成骨和角柄软骨内成骨在组织学上难以区别,均属于修饰性软骨内成骨。在鹿茸软骨内成骨中,鹿茸生长中心增殖区域的细胞,一部分迅速分裂,另一部分慢慢地分化成鹿茸的不同组织^[8];因此,鹿茸能够保持一定的增长速率快速生长。不断生长的鹿茸顶端被人为划分为增殖带、肥大带、成熟带、钙化带、初级松质区以及次级松质区这 6 个区域。这些区域代表从由骨膜衍生而来的间充质细胞分化的不同阶段^[21]。此外,鹿茸基部区域最先骨化,同时鹿茸顶端还在生长^[21]。

3 鹿茸软骨组织发育的调控因子

近年来研究发现,鹿茸组织的发育及其再生与多种生物小分子有关,例如胰岛素样生长因子

(insulin-like growth factor, IGF)、骨形成蛋白 2 (bone morphogenetic protein, BMP2)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、甲状旁腺素相关肽(parathyroid hormone related peptide, PTHrP)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)和转化生长因子(transforming growth factor, TGF)等,这些生长因子的自分泌及旁分泌的刺激作用与鹿茸的生长有着密不可分的联系^[15,22~25]。以下主要介绍几种与鹿茸软骨组织发生相关的生物小分子。

3.1 Sox 家族

Sox 基因家族属于 HMG box 超家族。Wegner^[26]早在 1999 年就已证实,Sox 家族在不同的组织和器官中均有表达,但表达水平却存在着显著差异。江玲霞^[27]在研究中发现 Sox9 基因在大脑组织、性腺和软骨组织中表达水平最高。赵辰等^[28]发现,Sox9 基因在软骨形成过程中并不是单独起作用的,通常都是协同 BMP2 作用从而提高后者的成软骨能力,也可能是 Sox9 抑制了 BMP2 诱导下高表达的成软骨负性调控因子 Smad7 的表达,继而进一步增强了 BMP2 的成软骨效应。Mount 等^[29]也证实 Sox9 基因可能是通过一些信号通路起作用的,如 FGFs 可通过促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号途径使 Sox9 的表达上调,同时 PTHrP 可使 Sox9 磷酸化,从而激活其转录活性。

3.2 Runx2 转录因子

Runx2 转录因子也称 Cbfa1,是一种比较复杂的多功能转录因子,一些实验结果证明,重要的转录因子会决定干细胞的多向分化潜能^[30,31]。Runx2 作为特异性转录因子,在骨形成中起重要的调节作用。2004 年, Gersbach 等^[32]研究证实,敲除 Runx2 基因的小鼠在胚胎时期不能形成肋骨,出生后由于呼吸困难而死亡,因此确定 Runx2 可启动一系列的成骨细胞功能分子的表达。Sun 等^[33]通过基因沉默的方式抑制 Cbfa1 的表达,证明软骨的发生是通过一定的信号通路形成的,而且该基因的沉默可导致 I 型胶原和骨钙素的表达受阻,从而使得增殖型软骨细胞向肥大型软骨细胞的分化过程受阻。

3.3 胰岛素样生长因子- I (IGF- I)

IGF 及其受体大量存在于鹿茸顶部的非骨化部位,是软骨组织生长的调节因子,包括 IGF- I 和 IGF- II。实验表明,通过沉默 *IGF- I* 基因能够抑制鹿茸软骨细胞的增殖,说明 IGF- I 的表达水平与鹿茸软骨细胞增殖呈正相关关系^[34]。

3.4 胶原蛋白 I、II A、II B 和 X

曾有研究报道了鹿茸尖部基因的表达情况,并将鹿茸与胎鹿软骨基因的表达及定位情况进行了比较,发现鹿茸中主要表达的蛋白质是胶原酶^[11]。通过原位杂交发现,鹿茸顶部从外侧的皮层到软骨区都有 I 型原胶原 mRNA 分布,通过冠状面观察,发现其主要存在于皮肤、纤维软骨膜以及与软骨膜紧密相邻的细胞密集区。在这些区域下方,随着细胞开始成柱状并与脉管系统和软骨基质的出现保持一致,可以发现原胶原 I 型、II A 型、II B 型和 X 型的转录。II A 型胶原主要在软骨区的前软骨细胞中表达,而在整个软骨区,II B 型和 X 型胶原均由成软骨细胞表达^[11]。

3.5 CGI99

本实验室构建的抑制性差减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 文库在筛选基因时发现了一个在鹿茸研究中从未报道过的基因,称为 *CGI99*,通过原位杂交试验发现, *CGI99* 在鹿茸软骨柱中高度表达,而在鹿茸的其他部位如血管中则几乎不表达(数据未发表),因此,推测该基因在鹿茸软骨发育、成骨中具有重要的调节作用,可能与软骨发生的分子调控机制有关。

根据其他物种中同源基因的相关报道,该基因主要与肿瘤细胞的增殖及转移、脑组织发育以及家禽抵御流感病毒等的调控有关^[35~44]。

4 鹿茸软骨内血管生成的调控

鹿茸含血管软骨的形成是鹿茸快速生长期高代谢水平的需要。鹿在进化的过程中,以鹿茸作为第二性征,为了在发情季节使用鹿茸作为争夺配偶的武器,鹿必须在有限的时间内完成很大的骨质器官——鹿茸的快速生长^[8]。形成骨组织最快的方式莫过于软骨内骨化,但是软骨组织有它的缺点,即无血管特性,只能通过营养物质扩散

获得营养,而扩散距离是有限的。按常规,为了按时完成鹿茸的快速生长,间充质细胞必须以很快的速度增殖,然后分化成软骨,这样就需要软骨重塑和成骨替换过程与之保持相同的速度,以保证深层细胞获得充足的营养和氧气。然而,鹿茸的形成并不完全遵循这样的过程,在鹿茸生长中心保留着大量的软骨,鹿茸创造了一种允许间充质细胞在低氧环境的软骨中心分化成血管内皮细胞,进而形成血管系统的途径,这样不仅保持了软骨的快速形成,也不会因滞后的软骨重塑和骨替换抑制鹿茸快速生长^[45]。因此,鹿茸含血管软骨的形成是鹿茸完成快速生长的需要。鹿茸生长速度越快,血管形成也就越多。研究发现:如果把鹿茸含血管软骨来源的生茸组织从原始位置移出,培养于裸鼠皮下、鹿皮下的弥散腔里或进行体外微粒体培养,也能形成无血管软骨^[45~47],这些结果表明鹿茸含血管软骨的形成并不是生茸组织(鹿茸含血管软骨的来源)本身固有的特性,有血管软骨或无血管软骨的形成可以通过改变干细胞所在的环境而决定,即软骨表型的转变是可以调控的。

鹿茸软骨表型的改变可能是干细胞环境中的外源性因子参与调控了血管形成相关的因子。因此找到这种驱动鹿茸软骨中血管生成的因子,对理解鹿茸软骨形成机制具有重要的推进作用,也可以为软骨损伤修复开辟一条新途径。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一种特异性很高的内皮细胞有丝分裂源,可以通过与血管内皮细胞上的受体结合发挥促进内皮细胞分裂的作用。Clark 等^[48]研究了 VEGF 在鹿茸尖部的表达,分离出了鹿茸中的 VEGF121 和 VEGF165,并在前软骨区和软骨带发现了 VEGF 的 mRNA,通过原位杂交技术,在前软骨的内皮细胞中探测到了 VEGF 受体 KDR 的存在。这些发现都说明 VEGF 在鹿茸软骨促进血管形成中起到重要的作用。Li 等^[49]在鹿茸生长的调控机理以及信号通路方面也有一定的成果,他们发现 PI3K/AKT 通路和 MAPK 通路在 AP 和角柄骨膜 (pedicle periosteum, PP) 中普遍存在,调控细胞的分裂、凋亡等过程。

5 展望

鹿茸惊人的生长速度及鹿茸季节性再生的特

性使其成为研究器官及肢体再生基本过程的一个极具潜力的天然医学模型,然而进行活体研究存在周期长、耗资大等缺点,而且鹿茸的生长始于头皮上一块小小的骨膜,如果进行大量活体试验,取材就会受限,所以目前的实验基本都是在细胞水平进行。根据鹿茸软骨发生机制、鹿茸干细胞、鹿茸软骨组织发生及血管生成相关的调控因子的研究成果,可以对天然鹿茸发生进行模拟,在体外建立培养体系诱导生成鹿茸软骨,有助于建立可重复、易用的软骨发生模型。孙红梅等^[12]在干细胞体外培养体系的建立中取得了阶段性的成果,可以将鹿茸再生干细胞进行成骨诱导,模拟鹿茸软骨内骨化的生长过程。此外, Li 等^[18]利用裸鼠本身的低免疫性的特点采用异体嫁接的方式将 AP 组织“种”到裸鼠头部,用以研究鹿茸软骨的再生机理,但是仍会受到物种间差异的影响。已有研究为鹿茸体外培育提供了很好的思路,但其研究却受到多个因素的影响,如物种间的排斥、体外培养细胞时微环境的自我调节等,所以仍然需要继续探索和创新。

以鹿茸为模型,对其软骨组织修复、再生机制及其调控因子的研究,不仅能够为软骨组织发生、修复提供基础数据,而且对软骨内血管生成调控机制的理解具有一定的指导意义,这对人类健康和人类组织与器官工程的研究具有深远的影响。鹿茸软骨的再生研究只是鹿茸整个再生研究过程的一部分,鹿茸周期性再生的特性为其作为一个有潜力的医学模型提供了基础。由于鹿茸再生与肢体发育有着极其相似的机制,应用于人类医学研究能够帮助实现重建由于受损或者疾病等原因摘除的器官。然而肢体再生或重建毕竟是一个复杂的过程,鹿茸的再生调控机制也还在研究中,从基础研究到真正应用到人类健康,仍然面临很多问题需要突破。

参 考 文 献

- [1] Shi J B, Jiang X, Di J F, *et al.*. Effect of basic fibroblast growth factor and insulin on the proliferation and differentiation of mouse chondrocyte [J]. *Chin. J. Clin. Rehabil.*, 2005, 9(10): 234-236.
- [2] Newman A P. Articular cartilage repair [J]. *Am. J. Sports Med.*, 1998, 26(2): 309-324.
- [3] Khan I M, Gilbert S J, Singhrao S K, *et al.*. Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review [J]. *Eur. Cell Mater.*, 2008, 16: 26-39.
- [4] Shapiro F, Koide S, Glimcher M J. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage [J]. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 1993, 75(4): 532-553.
- [5] Frenkel S R, Di C P E. Scaffolds for articular cartilage repair [J]. *Ann. Biom. Eng.*, 2004, 32(1): 26-34.
- [6] Ahmed T A, Hincke M T. Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration [J]. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2010, 16(3): 305-329.
- [7] Goss R J. Future directions in antler research [J]. *Anat. Rec.*, 1995, 241(3): 291-302.
- [8] 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(2): 163-174.
- [9] Banks W J. Histological and ultrastructural aspects of cervine antler development [J]. *Anat. Rec.*, 1973, 175(2): 175-487.
- [10] Frasier M B, Banks W J, Newbrey J W. Characterization of developing antler cartilage matrix. I. Selected histochemical and enzymatic assessment [J]. *Calcif. Tissue Res.*, 1975, 17(4): 273-288.
- [11] Price J S, Oyajobi B O, Nalin A M, *et al.*. Chondrogenesis in the regenerating antler tip in red deer: Expression of collagen types I, II A, II B, and X demonstrated by *in situ* nucleic acid hybridization and immunocytochemistry [J]. *Dev. Dyn.*, 1996, 205(3): 332-347.
- [12] 孙红梅, 杨福合, 邢秀梅, 等. 鹿茸再生干细胞成骨诱导(微粒体)培养体系的建立 [J]. *吉林农业大学学报*, 2010, 32(6): 680-683.
- [13] Sun H M, Yang F H, Xing X M, *et al.*. Establishment of micromass culture system for antler stem cell induction toward osteoblast differentiation *in vitros* [J]. *J. Jilin Agric. Univ.*, 2010, 32(6): 680-683.
- [14] Li C, Littlejohn R P, Carson I D, *et al.*. Effects of testosterone on pedicle formation and its transformation to antler in castrated male, freemartin and normal female red deer (*Cervus elaphus*) [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2003, 131(1): 21-31.
- [15] Price J, Faucheux C, Allen S. Deer antlers as a model of mammalian regeneration [J]. *Curr. Top Dev. Biol.*, 2005, 67: 1-48.
- [16] Nieto-Diaz M, Pita-Thomas D W, Munoz-Galdeano T, *et al.*. Deer antler innervation and regeneration [J]. *Front. Biosci.*, 2012, 17: 1389-1401.
- [17] 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(2): 125-130.
- [18] Kierdorf U, Li C, Price J S. Improbable appendages: Deer antler renewal as a unique case of mammalian regeneration [J]. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2009, 20(5): 535-542.
- [19] 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.
- [19] Li C. Histogenetic aspects of deer antler development [J].

- Front. Biosci.: Elite Ed., 2013,5:479-489.
- [20] Li C, Suttie J M, Clark D E. Morphological observation of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*) [J]. J. Morphol., 2004,262(3):731-740.
- [21] Banks W J, Newbrey J W. Antler development as a unique modification of mammalian endochondral ossification [A]. In: Brown R D. Antler development in Cervidae [C]. Kingsville, Texas: Caesar Kleberg Wildlife Research Institute, 1983, 279-306.
- [22] Yang Z H, Gu L J, Zhang D L, et al.. Red deer antler extract accelerates hair growth by stimulating expression of insulin-like growth factor I in full-thickness wound healing rat model [J]. Asian-Australas J. Anim. Sci., 2012,25(5):708-716.
- [23] 李沐. MicroRNA 介导的 *IGF-1* 基因沉默与端粒酶对鹿茸细胞增殖抑制的影响 [D]. 长春:吉林农业大学, 硕士学位论文, 2013.
- Li M. Study on *IGF-1* gene silence mediated by microRNA and the effect of telomerase against proliferation of antler cells [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, Master Dissertation, 2013.
- [24] 王守堂. PTHrP 及其受体在梅花鹿茸角中的表达与调节 [D]. 长春:吉林大学, 硕士学位论文, 2013.
- Wang S T. Expression and regulation of PTHrP and its receptor in sika deer antler [D]. Changchun: Jilin University, Master Dissertation, 2013.
- [25] Barling P M, Lai A K, Nicholson L F. Distribution of EGF and its receptor in growing red deer antler [J]. Cell Biol. Int., 2005,29(3):229-236.
- [26] Wegner M. From head to toes: The multiple facets of Sox proteins [J]. Nucl. Acids Res., 1999,27(6):1409-1420.
- [27] 江玲霞. 猪 *Sox9* 基因 cDNA 的全长克隆及功能预测 [D]. 南京:南京农业大学, 硕士学位论文, 2008.
- Jiang L X. Cloning and function prediction of the full-length cDNA of porcine *Sox9* gene [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, Master Dissertation, 2008.
- [28] 赵辰, 黄伟, 梁熙, 等. Smad7 在 *Sox9* 增强 BMP2 成软骨效应中的作用 [J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(2):95-100.
- Zhao C, Huang W, Liang X, et al.. Role of Smad7 in *Sox9*-potentiated and BMP2-induced differentiation of mouse mesenchymal stem cells into chondrocytes [J]. J. Third Mil. Med. Univ., 2015,37(2):95-100.
- [29] Mount J G, Muzylak M, Allen S, et al.. Evidence that the canonical Wnt signalling pathway regulates deer antler regeneration [J]. Dev. Dyn., 2006,235(5):1390-1399.
- [30] Zhang Y, Marsboom G, Toth P T, et al.. Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. PLoS ONE, 2013,8(10):1-12.
- [31] Huang P I, Chen Y C, Chen L H, et al.. PGC-1 α mediates differentiation of mesenchymal stem cells to brown adipose cells [J]. J. Atheroscler Thromb., 2011,18(11):966-980.
- [32] Gersbach C A, Byers B A, Pavlath G K, et al.. Runx2/Cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype [J]. Exp. Cell Res., 2004,300(2):406-417.
- [33] Sun H, Yang F, Chu W, et al.. Lentiviral-mediated *mai* knockdown of *cbfa1* gene inhibits endochondral ossification of antler stem cells in micromass culture [J]. PLoS ONE, 2012,7(10):e47367.
- [34] 李婷, 李沐, 孟星宇, 等. microRNA 介导的 IGF1 基因沉默对鹿茸软骨细胞增殖的影响 [J]. 西北农林科技大学学报, 2013,41(11):7-12.
- Li T, Li M, Meng X Y, et al.. Effect of microRNA-mediated IGF1 gene silencing on the proliferation of deer antler cartilage cells [J]. J. Northwest A & F Univ., 2013,41(11):7-12.
- [35] Huarte M, Sanz-Ezquerro J J, Roncal F, et al.. PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators [J]. J. Virol., 2001,75(18):8597-8604.
- [36] Guo J, Wang W, Liao P, et al.. Identification of serum biomarkers for pancreatic adenocarcinoma by proteomic analysis [J]. Can. Sci., 2009,100(12):2292-2301.
- [37] 张登禄, 韩金祥, 崔亚洲, 等. 胰腺癌转移相关基因 *C14orf166* 的真核表达及其蛋白相互作用的蛋白质组学筛选 [J]. 中国医药生物技术, 2010,5(3):189-192.
- Zhang D L, Han J X, Cui Y Z, et al.. The eukaryotic expression of pancreatic cancer related gene *C14orf166* and screening of its interacting proteins by proteomics methods [J]. Chin. Med. Biotechnol., 2010,5(3):189-192.
- [38] 张登禄, 韩金祥, 崔亚洲, 等. *C14orf166* 异位表达对 Hela 细胞增殖与迁移能力的影响 [J]. 中国肿瘤防治杂志, 2010,17(10):740-743.
- Zhang D L, Han J X, Cui Y Z, et al.. Ectopic expression of *C14orf166* and its effect on Hela cell proliferation and immigration [J]. Chin. J. Can. Prev. Treat., 2010,17(10):740-743.
- [39] 郭静会. 胰腺癌血清蛋白质指纹图谱及 CCR7 与胰腺癌淋巴结转移相关性研究 [D]. 上海:复旦大学, 博士学位论文, 2010.
- Guo J H. The study of protein profiling of pancreatic cancer and correlation of CCR7 with lymph node metastasis of pancreatic cancer [D]. Shanghai: Fudan University, Doctor Dissertation, 2010.
- [40] Howng S L, Hsu H C, Cheng T S, et al.. A novel ninein-interaction protein, CGI-99, blocks ninein phosphorylation by GSK3 β and is highly expressed in brain tumors [J]. FEBS Lett., 2004,566(1):162-168.
- [41] 王静. 脑发育不同阶段蛋白质组学及血清脑红蛋白含量的研究 [D]. 北京:中国人民解放军军医进修学院, 硕士学位论文, 2006.
- Wang J. Brain proteomic study in different developmental stages and the study on expression level of neuroglobin in serum [D]. Beijing: Chinese PLA Postgraduate Medical School, Master Dissertation, 2006.
- [42] Pérez-González A, Pazo A, Navajas R, et al.. hCLE/C14orf166 associates with DDX1-HSP C117-FAM98B in a novel transcription-dependent shuttling RNA-transporting complex [J]. PLoS ONE, 2014,9(3):e90957.

[43] Rodriguez A1, Pérez-González A, Nieto A. Cellular human CLE/C14orf166 protein interacts with influenza virus polymerase and is required for viral replication [J]. J. Virol., 2011, 85(22): 12062–12066.

[44] 宋家升. H5N1 亚型禽流感病毒对家鸭致病力分子机制的研究[D].北京:中国农业科学院,博士学位论文,2010.
Song J S. Detecting virulence determinants of H5N1 avian influenza virus for ducks [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, Doctor Dissertation, 2010.

[45] Li C, Waldrup K A, Corson I D, et al.. Histogenesis of antlerogenic tissues cultivated in diffusion chambers *in vivo* in red deer (*Cervus elaphus*) [J]. J. Exp. Zool., 1995, 272(5): 345–355.

[46] 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(1): 18–30.

[47] Li C, Suttie J M. Deer antlerogenic periosteum: A piece of postnatally retained embryonic tissue [J]. Anat. Embryol., 2001, 204(5): 375–388.

[48] Clark D E, Lord E A, Suttie J M. Expression of VEGF and pleiotrophin in deer antler [J]. Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol., 2006, 288(12): 1281–1293.

[49] Li C, Harper A, Puddick J, et al.. Proteomes and signalling pathways of antler stem cells [J]. PLoS ONE, 2012, 7(1): e30026.

【863 课题介绍】

课题名称:转基因哺乳动物器官生物反应器的建立
课题编号:2011AA100603

课题内容、目标:

本课题主要任务目标包括筛选出离体情况下能有效感染鹿茸干细胞的病毒载体;利用报告基因确定活体情况下最佳感染干细胞的方式,检测感染后所生鹿茸组织中目的基因的表达效率;组装并于离体条件下测试含有目的基因的重组质粒。

课题进展:

课题总体进展顺利,按课题任务书计划进度执行,目前已完了使用报告基因作指标,筛选出

离体情况下能最有效感染鹿茸干细胞的病毒载体;并初步检测了在离体条件下于鹿茸干细胞的表达情况,确定离体情况下感染鹿茸干细胞的最佳条件;确定活体情况下最佳感染干细胞的方式,使用最佳感染方式将自我组装的含有目的基因的重组质粒导入鹿茸干细胞中;以感染后的干细胞为基础,生成携带非报告基因的鹿茸,检测其后所生鹿茸组织中目的基因的表达情况,依据鹿茸组织细胞表达目的基因的效率,进一步完善感染鹿茸干细胞的各种参数等进展。