

不同培养代数鹿茸生长中心细胞对 IGF1 刺激的反应

梅妹¹, 邓旭明¹, 岳占碰¹, 赵丽红¹, 李春义², 冯海华¹

(¹ 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; ² 新西兰 INVERMAY 农业研究中心, Mosgiel, 新西兰 50034)

摘要:【研究目的】探讨胰岛素样生长因子(IGF1)对生长 60 d 的梅花鹿鹿茸体外培养不同代数鹿茸生长中心细胞的影响。【方法】分离、培养生长 60d 的梅花鹿鹿茸生长中心细胞, 将培养第 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, 在培养 24 h 后用 3H- 胸腺嘧啶核苷掺入测定法检测每分钟衰变数(DPM)值。【结果】全部 IGF1 处理组都显著高于对照组($p < 0.01$)。不同浓度 IGF I 处理组的平均值和最高值都是离体培养 2 代的细胞的 DPM 最高(分别为 31918 和 39818 DPM/mg 蛋白), 培养 5 代的细胞(分别为 5455 和 6815 DPM/mg 蛋白)已大大地下降; 到了第 8 代的(分别为 4030 和 4838 DPM/mg 蛋白)又有进一步的下降。【结论】IGF1 能够促进鹿茸生长中心细胞分裂增殖, 生长 60 d 鹿茸的生长中心细胞在离体培养, 不同培养时期的鹿茸生长中心细胞对 IGF I 刺激的敏感度不同。

关键词: IGF1; 鹿茸; 生长中心细胞; 梅花鹿

中图分类号: Q78, S852.65 文献标识码: A

Effects of Insulin-Like Growth Factor 1 on the Proliferation at Different Generation of Antler Organic Center Cells

Mei Mei¹, Deng Xuming¹, Yue Zhanpeng¹, Zhao Lihong¹, Li Chunyi², Feng Haihua¹

(¹College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062,

²Ag Research Limited Invermay Agricultural Centre Puddle Alley, Private Bag 50034, Mosgiel, New Zealand)

Abstract: 【Objective】To investigate the effects of insulin-like growth factor 1 (IGF1) on the proliferation of antler organic center cells from various passages in vitro at 60 days growing period of antler. 【Method】Antler organic center cells were isolated from sika deer antler of growing 60 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 disintegration per minute (DPM) value. 【Results】The proliferation of cells from growing 60 day's antler in the experimental group was significantly higher than that of the control group ($p < 0.01$). The average and maximal DPM value of the proliferation of cells in the experimental group was the highest in the second population cells (31918 and 39818 DPM/mg respectively), decreased in the fifth population cells materially (5455 and 6815 DPM/mg), and decreased in the eighth population cells again (4030 and 4838 DPM/mg). 【Conclusion】The results show that IGF1 can enhance the proliferation of antler organic center cells cultured in vitro. The sensitivity of IGF1 on the antler organic center cells from various passages at 60 days growing period of antler in vitro.

Key words: IGF1, antler, organic center cells, Sika deer

基金项目: 项目来源“863 科技攻关项目”(2007AA10Z150); “国家自然科学基金两个基地”项目(30510403163); “国家自然科学基金项目”(30571340)。

第一作者简介: 梅妹, 女, 1973 年出生, 安徽怀远人, 主治医师, 学士, 主要从事药理学方面的研究。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: 0431-87836222; E-mail: jldxnb@jluhp.edu.cn。

通讯作者: 冯海华, 女, 1970 年出生, 山东省临朐人, 讲师, 博士, 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: 2008-01-06; 修回日期: 2008-01-09。

鹿茸是唯一的一种能够每年完全再生的哺乳动物器官, 因此为笔者提供了探索自然界是如何解决了哺乳动物器官再生的机会, 可以作为一种难得的生物医学模型^[1-3], 但迄今为止鹿茸生长的调控机制尚不清楚。Suttie 等^[4-5]认为鹿茸的生长速度与鹿体内胰岛素样生长因子(IGF1)的水平呈强正相关, 鹿茸尖部组织富含 IGF 受体^[6-7]。本研究在梅花鹿鹿茸生长最快的时期 60 d 时分离鹿茸生长中心细胞传代培养, 检测生长中心细胞对 IGF1 刺激的敏感度, 以探讨影响鹿茸生长速度的因素。搞清控制鹿茸生长速度的机理不但能为提高鹿茸产量打下基础, 而且可能为解决生物医学领域的重大问题开辟新的途径。

1 材料和方法

1.1 试验材料

选定 4 岁龄的健康梅花鹿(农科院左家特产研究所提供), 在鹿茸生长的最快时期 60 d 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

在细胞培养间切下鹿茸尖部组织, 从中央部纵向切开以暴露茸尖内部组织。依据 Li 等^[8]的取材方法, 在解剖显微镜下定位和切取鹿茸的间质层。该层即为鹿茸生长中心细胞所在的组织层。

1.4 细胞培养

用平衡缓冲盐溶液清洗鹿茸间质层组织 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 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°C 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 d 后换液并继续培

养直到大多细胞群落相互融合为止。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 2×10^4 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 ³H-胸腺嘧啶核苷。培养结束后用 4°C 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 蛋白。

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 鹿茸生长中心细胞的分离、培养

用含 10%犊牛血清的 DMEM 培养的鹿茸生长中心细胞第 3 天全量换液除去未贴壁的细胞, 倒置显微镜下观察, 鹿茸生长中心细胞此时已贴壁, 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本试验中所用的细胞活性全部都在 90%以上。

2.2 IGF1 对鹿茸生长中心细胞的影响

结果见图 1。取材于生长 60 d 鹿茸的生长中心细胞, 全部 IGF1 处理组都显著高于对照组($p < 0.01$)。3 个不同浓度 IGF I 处理组的平均值和最高值都是离体

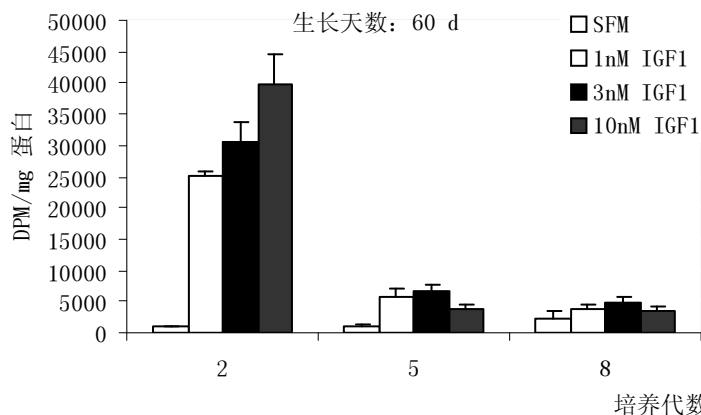


图 1 IGF1 对体外培养不同代数鹿茸生长中心细胞分泌蛋白含量的影响

培养2代的细胞最高(分别为31 918和39 818 DPM/mg蛋白);而培养5代的细胞的这些值(分别为5 455和6 815 DPM/mg蛋白)已大大下降;到了第8代的细胞这些值(分别为4 030和4 838 DPM/mg蛋白)又有进一步的下降。这说明,取材于生长60 d鹿茸的生长中心细胞在离体培养2代后对IGF I的敏感度已达到高峰,进一步传代(包括第5、8代的细胞)将导致这些生长中心细胞对IGF I刺激敏感度下降。

3 讨论

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IGF1所决定的^[4]。鹿茸尖部的细胞在离体培养条件下与加入的IGF1浓度呈明显的量-效关系^[8-10]。所以IGF1是公认的、目前为止所发现的刺激鹿茸细胞分裂繁殖最强的生长因子。然而Sadighi等^[11]用测量距离的方法来确定鹿茸生长中心细胞的位置:由鹿茸顶端量起0.75 cm处即为。由于不同鹿种、不同个体、不同鹿茸生长期的鹿茸生长中心细胞层离开其顶端的距离不同,所以用测量距离法定位鹿茸生长中心细胞并非适用于所有鹿。Price等^[9]依据肉眼能看到的鹿茸组织中管状系统的形状和密度定位鹿茸生长中心细胞,也有一定的主观性。Li等^[11]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取材鹿茸生长中心细胞的方法。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,以及在建立鹿茸生物学模型上提供了有利的手段。通过该方法取材检测IGF1对生长60 d的梅花鹿鹿茸体外培养不同代数鹿茸生长中心细胞的影响,不同浓度IGF I处理组的蛋白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代的细胞的这些值已大大下降,到了第8代的细胞又有进一步的下降。Sadighi等^[11]发现3~10 nM范围的IGF I浓度对培养的鹿茸尖部细胞具有最大的刺激作用,而我们的实验中1 nM的IGF I仍然具有刺激作用,并且实验组之间无显著差异,而实验组与对照组之间差异显著。

取材于鹿茸生长最快时期60 d鹿茸的生长中心细胞在离体培养2代后对IGF I的敏感度已达到高

峰,进一步传代(包括第5、8代的细胞)将导致这些生长中心细胞对IGF I刺激敏感度下降。表明IGF1能够促进鹿茸生长中心细胞分裂增殖,在生长最快时期体外培养不同代数鹿茸的生长中心细胞对生长因子IGF1刺激的敏感度不同。

参考文献

- [1] Price J, Allen S. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 2004, 29: 809-822.
- [2] 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.
- [3] Kierdorf U, Kierdorf H, Szuwart T. Deer antler regeneration: cells, concepts, and controversies [J]. *Journal of Morphology*, 2007, 268(8): 726-738.
- [4] Suttie J M, Gluckman PD, Butler JH, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) antler-stimulating hormone? [J]. *Endocrinology*, 1985, 116: 846-848.
- [5] Li C, Suttie JM. Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue [J]. *Anatomy and Embryology*, 2001, 264: 375-388.
- [6] Elliott JL, Oldham JM, Ambler GR, et al. Presence of insulin-like growth factor-I receptors and absence of growth hormone receptors in the antler tip [J]. *Endocrinology*, 1992, 130: 2513-2520.
- [7] Elliott JL, Oldham JM, Ambler GR, et al. Receptors for insulin-like growth factor-II in the growing tip of the deer antler [J]. *Journal of Endocrinology*, 1993, 138: 233-242.
- [8] Price JS, Oyajobi BO, Oreffo RO, et al. Cells cultured from the growing tip of red deer culture express alkaline phosphatase and proliferate in response to insulin-like growth factor-I [J]. *Journal of Endocrinology*, 1994, 143(2): 9-16.
- [9] 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 [J]. *Growth Hormone & IGF Research*, 2001, 11(4): 240-246.
- [10] 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]. *Journal of Endocrinology*, 1994, 143: 461-469.
- [11] Li C, Suttie JM. Tissue collection methods for antler research [J]. *European Journal of Morphology*, 2003, 41(1): 23-30.