

## 梅花鹿鹿茸间充质层与前成软骨层细胞的培养 及SB-431542对其增殖的影响

张璐,韩玉帅,郭斌,王守堂,田学超,冯海华,岳占碰  
(吉林大学畜牧兽医学院,长春 130062)

**摘要:**分离培养梅花鹿鹿茸间充质层细胞和前成软骨层细胞,通过研究TGF- $\beta$ 的特异性小分子拮抗剂SB-431542对这两种细胞增殖的影响,探讨TGF- $\beta$ 在鹿茸间充质层细胞和前成软骨层细胞增殖与分化中的调节机制。从生长30天的梅花鹿鹿茸中分离间充质层细胞和前成软骨层细胞,进行体外培养,将传代培养第2代的间充质层细胞和前成软骨层细胞分别在含不同浓度TGF- $\beta$  I型受体特异性抑制剂SB-431542(0、1、3、5、8、10  $\mu\text{mol/L}$ )的培养液中培养,48h后用MTT法测定这两种细胞增殖活性的变化,用SPSS软件对其增殖的差异性进行分析。结果显示,体外培养的鹿茸间充质层细胞呈成纤维细胞样,前成软骨层细胞呈纺锤形或梭形,台盼兰染色显示细胞活性均在90%以上。经SB-431542处理的间充质层细胞的增殖活性低于对照组( $P < 0.05$ ),而前成软骨层细胞增殖活性高于对照组( $P < 0.05$ ),且3  $\mu\text{mol/L}$ 和5  $\mu\text{mol/L}$ 的SB-431542处理的前成软骨层细胞增殖活性明显高于对照组( $P < 0.01$ )。试验表明,TGF- $\beta$ 可能在维持鹿茸间充质层细胞的快速增殖和诱导间充质细胞向软骨细胞分化等过程中起重要的作用。

**关键词:**梅花鹿鹿茸;间充质层细胞;前成软骨层细胞;SB-431542;增殖

中图分类号:S8;Q24

文献标志码:A

论文编号:2010-2944

### Culture of Sika Deer Antler Mesenchymal Layer Cells and Prechondrocytes and the Effects of SB-431542 on Their Proliferation

Zhang Lu, Han Yushuai, Guo Bin, Wang Shoutang, Tian Xuechao, Feng Haihua, Yue Zhanpeng  
(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062)

**Abstract:** In this study, the sika deer antler mesenchymal layer cells and prechondrocytes were isolated and cultured, and the regulatory mechanism of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) to cell proliferation and differentiation of deer antler mesenchymal layer cells and prechondrocytes was explored through the research on the effects of SB-431542, a special small molecular antagonist, on the proliferation of these two kinds of cells. The mesenchymal layer cells and prechondrocytes were isolated from the sika deer antler which had grown for 30 days and cultured in vitro, and then the mesenchymal layer cells and prechondrocytes which had been sub-cultured for the second generation were cultured in culture solution with SB-431542 at different concentrations (0, 1, 3, 5, 8, 10  $\mu\text{mol/L}$ ), then MTT assay was performed to detect the changes of cell proliferation activity after 48 hours, and SPSS software was used to analyze the differences of cell proliferation.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目“PTHrP-IHH信号通路对梅花鹿茸角再生的调控”(31072099);长春市科技支撑计划资助项目“优质梅花鹿良种选育与高效快繁关键技术研究及开发”(08KZ36);国家高技术研究发展计划资助项目“梅花鹿鹿茸再生相关基因的筛选、克隆及功能分析”(2007AA10Z150);教育部新教师基金资助项目“梅花鹿茸角CoIX基因表达分布及调控分析”(200801831048)高等学校博士学科点专项科研基金资助项目“甲状腺素相关肽及其受体在梅花鹿茸角内的表达及与茸角再生的关系”(20100061110078)。

**第一作者简介:**张璐,女,1984年出生,陕西省陇县人,硕士研究生,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: zhanglu4602968@163.com。

**通讯作者:**岳占碰,男,1966年出生,山西省保德县人,教授,博士,主要从事动物生殖与发育等方面的研究。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, E-mail: zpyue@yahoo.com.cn。

收稿日期:2010-10-14,修回日期:2010-10-29。

The results showed that the deer antler mesenchymal layer cells cultured in vitro were fibroblast-like, while the prechondrocytes were fusiform or spindle-shaped, and trypan blue staining showed that the cell activity was above 90%. The proliferation activity of the mesenchymal layer cells treated by SB-431542 was lower than the control group ( $P<0.05$ ), while the prechondrocytes group was higher than the control group ( $P<0.05$ ), furthermore, the proliferation activity of prechondrocytes treated by SB-431542 at the concentration of  $3\mu\text{mol/L}$  and  $5\mu\text{mol/L}$  was significantly higher than that of the control ( $P<0.01$ ). The results indicated that TGF- $\beta$  might play an important role in the process of maintaining the tachy-proliferation of mesenchymal layer cells and inducing the differentiation of mesenchymal layer cells to chondrocytes.

**Key words:** sika deer antlers; mesenchymal layer cells; prechondrocytes; SB-431542; proliferation

## 0 引言

哺乳动物器官的再生能力很低,鹿茸是哺乳动物唯一的失去后还能完全再生的器官,是研究哺乳动物器官再生及创伤修复理想的动物模型。鹿茸的生长速度很快,存在于鹿茸生长顶端的间充质层细胞在鹿茸的快速生长过程中起关键作用,这些细胞快速增殖并不断分化,实现鹿茸的快速生长<sup>[1-2]</sup>。鹿茸的生长和再生受许多因素所调控,其中转化生长因子 $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )家族在该过程中起重要的作用<sup>[3-4]</sup>。SB-431542是特异性TGF- $\beta$  I型受体抑制剂,可竞争性结合ATP位点而特异性抑制TGF- $\beta$  I型受体,阻止I型受体的磷酸化,进而阻断TGF- $\beta$ 信号通路中特定靶基因的表达<sup>[5]</sup>。梅花鹿是中国重要的经济动物,关于梅花鹿鹿茸再生的分子机理资料报道较少,试验以梅花鹿为研究对象,通过研究SB-431542对梅花鹿鹿茸间充质层与前成软骨层细胞增殖的影响,来探讨TGF- $\beta$ 家族在鹿茸生长和再生中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

从吉林农业大学梅花鹿养殖场选取约1岁龄的健康梅花鹿,初角茸生长到约30天时割取鹿茸。

### 1.2 试剂

DMEM培养基(Gibco);胰蛋白酶(Sigma);II型胶原酶(Invitrogen);透明质酸酶(Invitrogen);胎牛血清(杭州四季青);台盼兰(Sigma);DMSO(Sigma);SB-431542(Sigma);MTT(Sigma)。

### 1.3 组织分离

切取5 cm长的鹿茸尖部,将切下的鹿茸尖部组织在无菌条件下从中央部纵向切开以暴露茸尖内部组织,结合形态学观察结果,依据Li<sup>[6]</sup>等的取材方法,在解剖显微镜下定位和切取鹿茸的间充质层与前成软骨层。

### 1.4 细胞培养及传代

鹿茸间充质层组织切碎后用0.2%胶原酶II消化,

接种到含10%FBS的DMEM培养瓶中,放入37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。鹿茸前成软骨层组织切碎后先用0.1%透明质酸酶37℃消化20 min,去除透明质酸酶后加入含200 U/mL II型胶原酶和10%胎牛血清的DMEM中消化,37℃温箱孵育约3 h,去除消化液,PBS洗三次,用细胞培养液悬浮后转移至培养瓶中,在37℃和5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。3天后换液并继续培养,细胞生长到80%融合时,用胰蛋白酶消化贴壁生长的细胞,进行台盼兰染色以确定细胞的活性,倒置显微镜观察并计数,做细胞爬片的HE染色。

### 1.5 试验设计

将第二代间充质层细胞与前成软骨层细胞接种于96孔板( $1\times 10^4$ 个/mL),细胞贴壁并生长至80%~90%丰度时,加入不同浓度的SB-431542(终浓度为0、1、3、5、8、10  $\mu\text{mol/L}$ ,用DMSO溶解),孵育48 h后每孔加入0.5 mL的MTT/PBS溶液100  $\mu\text{L}$ ,37℃培养4 h,再各加入DMSO 100  $\mu\text{L}$ 后剧烈震动10 min,用酶标仪于590 nm处测定吸光度。

### 1.6 数据统计

用SPSS10.0软件对所得数据进行分析。

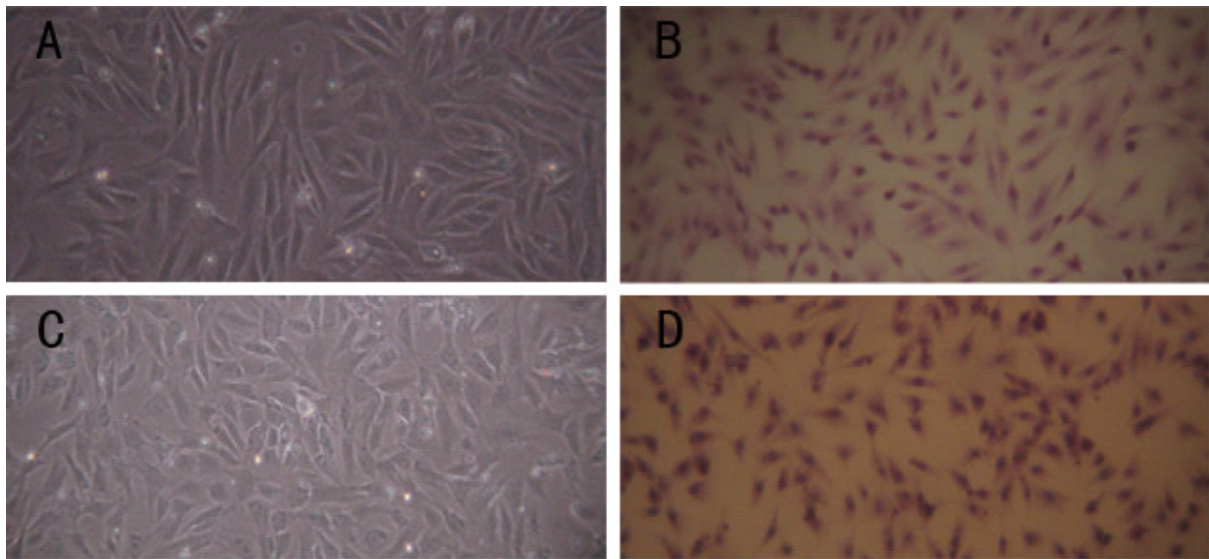
## 2 结果与分析

### 2.1 鹿茸间充质层细胞与前成软骨层细胞的分离培养

将鹿茸间充质层细胞与前成软骨层细胞在培养的第3天换液,除去未贴壁的细胞,镜下观察可见,鹿茸间充质层细胞形态均匀,呈成纤维细胞样(见图1A、B);前成软骨层细胞呈纺锤形或梭形(见图1C、D)。台盼兰染色显示细胞活性均在90%以上。

### 2.2 SB-431542对鹿茸间充质层细胞与前成软骨层细胞增殖的影响

将传代培养第2代的细胞经不同浓度SB-431542(0,1,3,5,8,10  $\mu\text{M}$ )作用,培养48 h后用MTT法测其细胞增殖的变化,并用SPSS软件分析其差异性。结果表明,经SB-431542处理的间充质层细胞的增殖活性低于对照组( $P<0.05$ )(见图2),而前成软骨层细胞增殖



A:间充质层细胞倒置显微镜观察(100×);B:间充质层细胞爬片HE染色(100×)  
C:前成软骨层细胞倒置显微镜观察(100×);D:前成软骨层细胞爬片HE染色(100×)

图1 传二代梅花鹿鹿茸间充质层细胞与前成软骨层细胞形态

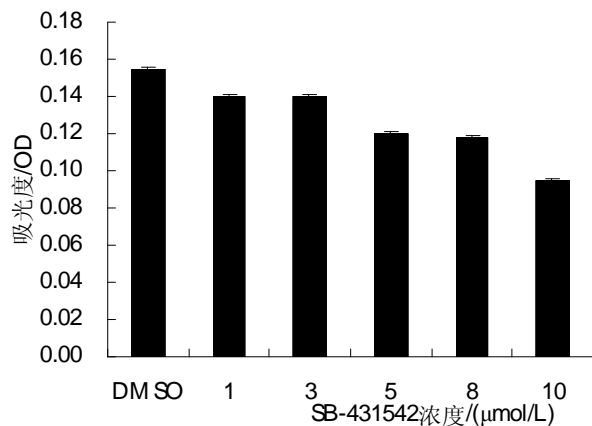


图2 不同浓度SB-431542对梅花鹿鹿茸间充质层细胞增殖的影响

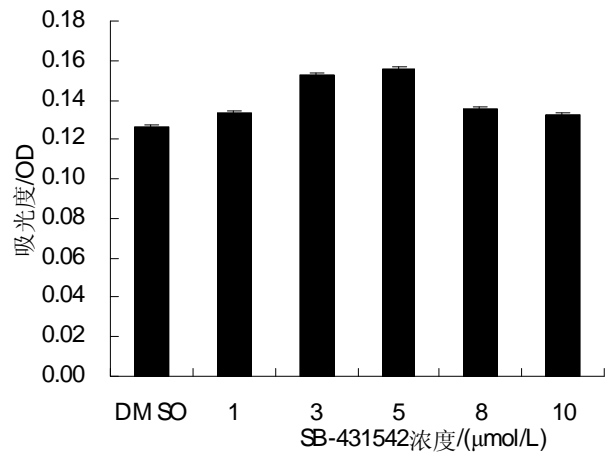


图3 不同浓度SB-431542对梅花鹿鹿茸前软骨层细胞增殖的影响

活性高于对照组( $P < 0.05$ ),且3 μmol/L和5 μmol/L的SB-431542处理的前成软骨层细胞增殖活性明显高于对照组( $P < 0.01$ )(见图3)。

### 3 讨论

关于鹿茸组织的结构及不同层次组织定位,目前已有详尽报道。Li等<sup>[6]</sup>报道了在未经组织染色的新鲜鹿茸尖部组织切面上精确定位和分离鹿茸间充质层与前成软骨层细胞的方法。该取材方法的建立为在细胞和分子水平上研究鹿茸生长及再生机理奠定了基础。此研究利用这种取材方法获得梅花鹿生长约30天的初角茸间充质层与前成软骨层细胞,研究TGF-β的特异性小分子拮抗剂SB-431542对这两种细胞增殖的影响,探讨TGF-β在鹿茸间充质层细胞和前成软骨层细

胞增殖与分化中的调节机制。

在鹿茸的生长过程中,鹿茸生长顶端的间充质层细胞不断增殖与分化,实现鹿茸的快速生长。前成软骨层是由间充质层分化而来,逐渐过渡为软骨层,该层细胞的形态介于间充质层细胞和软骨层细胞之间。间充质层细胞的分离培养利用已建立起来的方法,即将间充质层组织用胶原酶进行消化,得到游离的间充质层细胞<sup>[7-9]</sup>。这种组织块预消化培养法,既能充分利用样品组织,又能有效地获得目的细胞。前成软骨细胞的分离培养方法和软骨细胞类似,在体外分离培养过程中,为使细胞能够从细胞间基质中游离出来,可以用酶消化法去除基质才能获得游离的细胞。采用透明质酸酶和II型胶原酶依次消化,裂解硫酸软骨素和胶原



蛋白等细胞间基质,使前成软骨组织松软,该分离方法可获得数量多、活力强的细胞,可以满足相关实验研究的需要<sup>[10-12]</sup>。

Noda M等<sup>[13]</sup>在对小鼠成骨细胞的研究发现,TGF- $\beta$ 能够抑制其碱性磷酸酶的活性,从而抑制细胞过度骨化。Oka K等<sup>[14]</sup>在对关节软骨的研究中发现,抑制TGF- $\beta_2$ 信号可导制关节周围软骨停止分化并且发生骨化。SB-431542是特异性TGF- $\beta$  I型受体抑制剂。研究结果显示,鹿茸间充质层细胞在低浓度的SB-431542存在的情况下增殖受到了抑制,随着SB-431542浓度的增加,抑制作用更加明显。鹿茸间充质层细胞在失去TGF- $\beta$ 信号调节的情况下生长速度变慢,说明TGF- $\beta$ 可能对鹿茸间充质层细胞的增殖起促进作用。SB-431542对前成软骨层细胞增殖的影响和间充质层细胞相比结果恰恰相反,经SB-431542处理后的前成软骨层细胞与对照组相比增殖速度加快,在SB-431542浓度为5  $\mu\text{mol/L}$ 时达到最高,之后出现下降。表明TGF- $\beta$ 对前成软骨层的作用是以促使前成软骨层细胞的成熟从而完成向软骨细胞的分化为主,并且抑制其细胞过度生长。TGF- $\beta$ 对鹿茸各层细胞的作用因细胞的种类、细胞周围微环境和细胞自身状态的不同而表现出刺激或抑制效应<sup>[15]</sup>,鹿茸的快速生长与TGF- $\beta$ 维持鹿茸间充质层细胞的快速增殖和诱导间充质细胞向软骨细胞分化有密切的联系。

### 参考文献

- [1] Kierdorf U, Kierdorf H, Szuwart T. Deer antler regeneration: cells, concepts, and controversies[J]. *J Morphol*, 2007, 268(8): 726-38.
- [2] Price J, Allen S. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004, 359(1445): 809-22.
- [3] Francis S M, Suttie J M. Detection of growth factors and proto-oncogene mRNA in the growing tip of red deer (*Cervus elaphus*) antler using reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)[J]. *Exp Zool*, 1998, 281(1): 36-42.
- [4] Fauchoux C, Nicholls B M, Allen S, et al. Recapitulation of the parathyroid hormone-related peptide- indian hedgehog pathway in the regenerating deer antler[J]. *Dev Dyn*, 2004, 231: 88-97.
- [5] Laping N J, Grygielko E, Mathur A, et al. Inhibition of transforming growth factor (TGF)- beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF- beta type I receptor kinase activity: SB-431542[J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 62(1): 58-64.
- [6] Li C, Suttie J M. Tissue collection methods for antler research [J]. *Eur J Morphol*, 2003, 41(1): 23-30.
- [7] 李光凤,冯海华,赵丽红,等.梅花鹿鹿茸间充质层细胞的体外培养和冷冻保存[J]. *经济动物学报*, 2008, 12(3): 125-127.
- [8] 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.
- [9] 冯海华,赵丽红,闭兴明,等.IGF I对生长30d鹿茸的体外培养鹿茸生长中心干细胞的影响[J]. *中国农学通报*, 2008, 24(2): 1-3.
- [10] Kierdorf U, Kierdorf H, Schultz M, et al. Histological structure of antlers in castrated male fallow deer[J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004, 281(2): 1352-1362.
- [11] Price J S, Oyajobi B O, Oreffo R O, et al. Cells cultured from the growing tip of red deer antler express alkaline phosphatase and proliferate in response to insulin-like growth factor-I[J]. *J Endocrinol*, 1994, 143(2): R9-16.
- [12] Kierdorf U, Stoffels E, Stoffels D, et al. Histological studies of bone formation during pedicle restoration and early antler regeneration in roe deer and fallow deer[J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2003, 273(2): 741-751.
- [13] Noda M, Rodan G A. Type- $\beta$  transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteoblast-like cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1986, 140: 56-65.
- [14] Oka K, Oka S, Sasaki T, et al. The role of TGF- $\beta$  signaling in regulating chondrogenesis and osteogenesis during mandibular development[J]. *Dev Biol*, 2007, 303(1): 391-404.
- [15] Border W A, Noble N A. Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis[J]. *New Engl J Med*, 1994, 331: 1286-1292.