



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

褪黑激素通过 MT1 激活 PI3K/AKT/mTOR 信号调控鹿
茸间充质细胞分化的机制研究

THE MECHANISM OF MELATONIN REGULATING
THE DIFFERENTIATION OF ANTLER
MESENCHYMAL CELLS THROUGH MT1

研究生: 顾晓莹

CANDIDATE: Gu XIAOYING

学 号: 2020302110087

STUDENT NO.:

专 业: 特种经济动物饲养

MAJOR: THE REARING OF SPECIAL-TYPE
ECONOMIC ANIMALS

导 师: 熊家军 副教授

SUPERVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR XIONG
JIAJUN

中国 武汉
WUHAN, CHINA

二〇二三年六月

JUNE, 2023

华中农业大学硕士学位论文

褪黑激素通过 MT1 激活 PI3K/AKT/mTOR 信号调控鹿茸间
充质细胞分化的机制研究

The Mechanism of Melatonin Regulating the Differentiation
of Antler Mesenchymal Cells through MT1 Activation of
PI3K/AKT/mTOR

硕士研究生：顾晓莹

学 号：2020302110087

指导教师：熊家军 副教授

专业：特种经济动物饲养 研究方向：特种经济动物驯化与繁育

获得学位名称：农学硕士 获得学位时间：2023 年 6 月

华中农业大学动物科技学院动物医学院

二〇二三年六月

资助项目

国家自然科学基金 (No.31972533)

Natural Science Foundation of China (No.31972533)

目 录

1 前言.....	1
1.1 梅花鹿鹿茸的生长研究.....	1
1.1.1 影响鹿茸的生长因素.....	1
1.1.2 鹿茸的生长过程.....	5
1.2 间充质干细胞.....	6
1.3 褪黑激素.....	7
1.4 PI3K/AKT/mTOR 信号通路.....	8
1.5 研究目的及意义.....	10
2 材料与方法.....	12
2.1 实验材料.....	12
2.1.1 主要试剂与耗材.....	12
2.1.2 主要仪器设备.....	13
2.1.3 实验试剂的配制.....	14
2.2 方法.....	15
2.2.1 细胞的分离、培养与冻存.....	15
2.2.2 细胞活性检测.....	16
2.2.3 细胞增殖检测.....	16
2.2.4 细胞总 RNA 提取及检测.....	18
2.2.5 cDNA 链反转录合成.....	18
2.2.6 PCR 反应.....	19
2.2.7 基因相对表达量分析.....	20
2.2.8 细胞总蛋白提取.....	23
2.2.9 蛋白浓度检测.....	23
2.2.10 蛋白免疫印迹检测.....	24
2.2.11 间充质细胞的甲苯胺蓝和阿利新蓝染色.....	25
2.2.12 鹿茸间充质细胞转染 siRNA.....	25
2.2.13 免疫荧光检测.....	26
2.2.14 免疫组织化学检测.....	27
2.2.15 数据分析.....	28
3 结果.....	29
3.1 鹿茸间充质细胞和软骨细胞的鉴定.....	29
3.2 MLT 对鹿茸间充质细胞增殖的影响.....	29
3.2.1 MLT 增强鹿茸间充质细胞活力.....	29
3.2.2 MLT 促进间充质细胞增殖.....	30

3.2.3 MLT 激活 mTOR/4EBP1 信号促进增殖	32
3.3 MLT 对鹿茸间充质细胞分化的影响	32
3.3.1 MLT 促进鹿茸间充质细胞分化	32
3.3.2 MLT 诱导间充质细胞分化染色鉴定	33
3.3.3 MLT 促进间充质细胞分化相关基因表达	34
3.3.4 MLT 激活 PI3K/AKT/mTOR 信号促进细胞分化	35
3.4 MLT 通过 MT1 对鹿茸间充质细胞生长的影响	36
3.4.1 MT1 的干扰效率检测.....	37
3.4.2 干扰 MT1 后 MLT 对间充质细胞的增殖和分化的影响	37
3.4.3 干扰 MT1 后抑制 PI3K/AKT 通路的信号传递.....	38
4 讨论.....	40
4.1 MLT 促进鹿茸间充质细胞增殖	40
4.2 MLT 促进鹿茸间充质细胞分化	41
4.3 MLT 通过其受体 MT1 激活 PI3K/AKT/mTOR 通路促进间充质细胞分化	42
5 总结.....	44
6 创新与下一步计划	45
6.1 创新.....	45
6.2 下一步计划.....	45
参考文献.....	46

摘要

鹿茸质量和产量是评价鹿的生产性能的一个重要指标。鹿茸的药用价值是梅花鹿饲养的主要经济指标之一，鹿茸也是哺乳动物中唯一可以再生的器官。鹿茸的生长受光周期和内源激素水平影响而呈现周期性的生长与脱换。褪黑激素（Melatonin, MLT）作为动物体内重要调节昼夜节律激素，被证实在鹿茸生长过程中发挥了重要作用。鹿茸的快速生长依赖于间充质细胞的增殖与分化。因此，本研究以鹿茸间充质细胞为研究对象，通过体外添加 MLT 的方式来探究细胞增殖、周期以及相关生长因子的分泌水平。同时利用 RNA 干扰技术来特异性敲低褪黑激素受体 1A（MTNR1A, MT1）探究 MLT 及其受体对鹿茸间充质细胞分化的影响以及相关的调控机制，研究结果主要如下：

（1）对鹿茸间充质细胞用浓度分别为 0、1、5、10、20 和 50 μM 的 MLT 处理 24、48、72 h 后检测细胞活力。结果显示，1 μM 的处理组的鹿茸间充质细胞的细胞活力均极显著上升（ $p < 0.001$ ）；通过检测 EDU 细胞增殖，1 μM 的 MLT 处理组比对照组鹿茸间充质细胞的 EDU 阳性率显著上升（ $p < 0.01$ ）；

（2）外源添加浓度为 1 μM 的 MLT 处理鹿茸间充质细胞检测间充质细胞标志物和细胞周期基因表达情况。结果显示，处理组间充质细胞的标志物和细胞周期及增殖相关的基因表达都显著升高；软骨细胞标志物 Col2a1、Col1 和 Aggrecan 在间充质细胞中的表达显著上升（ $p < 0.01$ ），而且 TGF- β 1 的基因表达也是显著升高（ $p < 0.01$ ）；

（3）蛋白免疫印迹结果显示，MLT 促进间充质细胞增殖的过程中，鹿茸间充质细胞中 p-mTOR 和 p-4EBP1 表达显著上调（ $p < 0.05$ ）；

（4）在鹿茸间充质细胞的细胞培养液中添加浓度为 1 μM 的 MLT 和细胞分化诱导液进行分化实验。染色结果显示间充质细胞发生分化；qRT-PCR 结果显示 Aggrecan 和 Col2a1 的基因表达上调，Cyclin D1 和 TGF- β 1 的基因表达也上调；

（5）蛋白免疫印迹结果显示，MLT 诱导鹿茸间充质细胞分化过程中，PI3K、p-AKT、p-mTOR 和 p-4EBP1 的蛋白表达极显著升高（ $p < 0.001$ ）；

（6）对鹿茸间充质细胞 MT1 进行 siRNA 干扰表达，结果显示，si-MT1+MLT 组的鹿茸间充质细胞的 BMP2 和 Runx2 的基因表达下调（ $p < 0.001$ ），间质细胞中

Col2a1 的蛋白表达显著下降 ($p<0.05$), PI3K/AKT 信号通路中的 PI3K 和 p-AKT 的蛋白表达显著下降 ($p<0.01$)。

综上所述: MLT 可以加快鹿茸间充质细胞的周期进程, 进而促进间充质细胞增殖, 也可以加速鹿茸间充质细胞的分化。MLT 通过 MT1 激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路提高鹿茸间充质细胞中的软骨细胞标志物 Col2a1 和 Aggrecan 的表达, 这将加快了鹿茸软骨发育进程。

关键词: 鹿茸; 间充质细胞; 褪黑激素; 褪黑激素受体 1A; PI3K/AKT/mTOR; 分化

Abstract

The quality and yield of the antler is an important indicator to evaluate the performance of deer. The medicinal value of antler is one of the main economic indicators of sika deer breeding, and antler is also the only regenerative organ in mammals. The growth of the antler is influenced by photoperiod and endogenous hormone levels, and shows periodic growth and shedding. Melatonin (MLT), an important hormone regulating circadian rhythm in animals, is shown to play an important role in the growth of antlers. The rapid growth of antler depends on the proliferation and differentiation of mesenchymal cells. Therefore, in the present study, deer antler mesenchymal cells were treated in vitro with melatonin to investigate cell proliferation, cycle, and secretion levels of relevant growth factors. At the same time, RNA interference technology was used to specifically knock down melatonin receptor 1A (MTNR1A, MT1) to explore the effect of melatonin and its receptor on antler mesenchymal cells differentiation and the related regulatory mechanism. The main findings were as follows:

(1) After treating deer antler mesenchymal cells with melatonin at concentrations of 0, 1, 5, 10, 20, and 50 μM for 24, 48, and 72 hours, cell viability was measured. The results showed that the cell viability of deer antler mesenchymal cells in the 1 μM treatment group was significantly increased ($p < 0.001$); By detecting the proliferation of EDU cells, the positive rate of EDU in the 1 μM melatonin treated group was significantly higher than that in the control group ($p < 0.01$)

(2) Antler mesenchymal cells were treated with melatonin (1 μM) to detect the expression of mesenchymal markers and cell cycle genes. The results showed that the expressions of mesenchymal markers and cell cycle - and proliferation-related genes were significantly increased in the treatment group. The expression of chondrocyte markers Col2a1, Col1 and Aggrecan in the mesenchymal cells was significantly increased ($p < 0.01$), and the gene expression of TGF- β 1 was also significantly increased ($p < 0.01$).

(3) Western blot results showed that the expression of p-mTOR and p-4EBP1 was significantly up-regulated in the process of melatonin promoting the proliferation of deer antler mesenchymal cells ($p < 0.05$).

(4) Differentiation experiments were performed by adding 1 μ M melatonin and differentiation induction medium to the cell culture medium of antler mesenchymal cells. The results of staining showed that mesenchymal cells were differentiated. The qRT-PCR results showed that the gene expression of Aggrecan and Col2a1 was up-regulated, and the gene expression of Cyclin D1 and TGF- β 1 was also up-regulated.

(5) Western blot results showed that the protein expressions of PI3K, p-AKT, p-mTOR and p-4EBP1 were significantly increased during the differentiation of antler mesenchymal cells induced by melatonin ($p < 0.001$).

(6) MT1 siRNA was used to interfere the expression of MT1 in antler mesenchymal cells, and the results showed that the gene expression of BMP2 and Runx2 in si-MT1+MLT group was down-regulated ($p < 0.001$), and the protein expression of Col2a1 in antler mesenchymal cells was significantly decreased ($p < 0.05$). The protein expressions of PI3K and p-AKT in PI3K/AKT signaling pathway were significantly decreased ($p < 0.01$).

In summary, melatonin accelerates the cyclic progression of antler mesenchymal cells, thereby promoting their proliferation, and it also accelerates their differentiation. Melatonin enhances the expression of the chondrocyte markers Col2a1 and Aggrecan in velvet antler mesenchymal cells by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway via MT1, which accelerates the chondrocyte development process in antlers.

Key words: deer antler; Mesenchymal cells; Melatonin; MT1; PI3K/AKT/mTOR; differentiation

缩略词表 (Abbreviation)

	英文全称 English Name	中文全称 Chinese Name
CCK-8	Cell Counting Kit	细胞计数试剂盒
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium	达尔伯克(氏)改良伊格尔(氏)培养基
DMSO	Dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	4E 结合蛋白 1
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
TGF- β	transforming growth factor- β	转化生长因子 β
MLT	Melatonin	褪黑激素
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	增殖细胞核抗原
MTNR1A	Recombinant Melatonin Receptor 1A	褪黑激素受体 1A
PI3K	Phosphatidylinositol3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
mTOR	mammalian target of rapamycin	哺乳动物雷帕霉素靶蛋白
PS	Penicillin-streptomycin	青链霉素
MSC	Mesenchymal cell	间充质细胞
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase Chain Reaction	实时定量 PCR
PCC	Pre-chondrocytes	前成软骨细胞
BMP2	bone morphogenetic protein 2	骨形态发生蛋白 2
PRDX2	Peroxiredoxin 2	过氧化物还原酶 2
RUNX2	Runt-related transcription factor 2	核心结合因子 2
CC	Chondrocytes	软骨细胞
AKT	protein kinase B	蛋白激酶 B

	英文全称	中文全称
	English Name	Chinese Name
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
Col2a1	Collagen II	二型胶原蛋白
EDU	5-Ethynyl-2'- deoxyuridine	5-乙炔基-2' 脱氧尿嘧啶核 苷
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚

1 前言

1.1 梅花鹿鹿茸的生长研究

反刍动物是现存的唯一具有颅骨附件的哺乳动物,角对于动物来说不仅是作为防御工具,也是求偶工具,比如牛角、羊角、鹿角等(Wang et al 2019, Cluttonbrock 1982)。在哺乳动物中,鹿角是唯一可以再生的器官。梅花鹿是中小型鹿,属于脊索动物门哺乳纲偶蹄目反刍亚目鹿科真鹿亚科鹿属,是亚洲的特产物种,在中国的野生种群属于濒危物种。据统计,梅花鹿在全球有 16 个亚种,主要分布在中国、俄罗斯、日本,在中国依据地理和形态学差异分布划分为 6 个亚种,分别是命名于 1860 年的台湾亚种(*Cervus nippon taiouanus*)、1864 年的东北亚种(*Cervus nippon hortulorum*)、1884 年的山西亚种(*Cervus nippon grassianus*)、1873 年的华南亚种(*Cervus nippon kopschi*)、1871 年的华北亚种(*Cervus nippon mandarinns*)和 1978 年的四川亚种(*Cervus nippon sichuanicus*),但是在这其中华北亚种和山西亚种已经灭绝(何叶艳等 2019)。根据遗址的挖掘和古籍的考究,中国的梅花鹿曾广泛分布于全国各地,中国梅花鹿的养殖历史可以推算到 3400 多年前。现阶段,梅花鹿的主要养殖品种为吉林梅花鹿、双阳梅花鹿、西丰梅花鹿、兴凯湖梅花鹿、敖东梅花鹿、东丰梅花鹿、东大梅花鹿等(卫功庆等 2022)。鹿全身上下都作为药材或者食物进行食用,鹿茸被视为“宝中之宝”,是名贵的中药材。在汉代文献中就有对鹿茸的介绍,并将鹿作为灵丹妙药的象征(马逸清 2002)。在《本草纲目》中认为鹿茸可以补肾壮阳、生精益血、补髓健骨(赵卉等 2015)。随着社会的发展以及人类对于养生的追求,关于鹿茸制品的需求也越来越高,在现有的养殖条件下,探索如何提高鹿茸的品质与产量事关养鹿业未来的发展。目前国内外对于鹿茸再生的作用机理还缺乏系统的研究,因此探索鹿茸再生及软骨发育的分子机理将成为提高鹿茸产量和品质的一项有效手段。

1.1.1 影响鹿茸的生长因素

鹿茸的生长发育受到方方面面的影响,主要为遗传因素、营养因素、环境因

素等（张振祥等 2020）。在梅花鹿养殖过程中，人们为了达到利益的最大化会选择具有优良现状的鹿品种，会提供丰富的营养物质，改善居住环境。鹿茸是机体内各种因子协调生长发育而来。鹿茸的自身生长过程中，除了自身的软骨细胞的生长，伴随着血管生长、神经生长、纤维细胞生长、上皮细胞生长，为此需贮存大量的生长因子，彼此之间协同促进鹿茸细胞的增殖分化，使鹿茸得以年复一年的新生。

（1）光照

鹿角的再生过程中的生茸、骨化、脱落等是有季节规律的。光照周期与季节有着密切关系。冬季到春季的光照时间不断延长，鹿角在春分前后脱落，直到夏季的光照时间达到一年之中最长，鹿茸的生长达到快速生长期，鹿茸在夏至前后开始走向成熟，达到最大化，而到了秋季时，光照时间在不断缩减，鹿茸停止发育开始脱茸骨化，冬季的光照时间最短，鹿茸完成骨化变为鹿角（田允波 1994）。光照周期的变化正好与鹿茸的生长过程相对应。Goss（1987）通过对控制光周期的变化观察鹿茸的变化，发现鹿茸的生长变化是对光周期延长的反应和光周期缩短的反应，而且增加光照对鹿茸的骨化脱落和再生有更好的效果。张民海等人（1995）采用露天光源增加光照强度，在光照强度大于等于 300Lx 时鹿茸生长发育效果最好，证明光照强度对鹿茸的生长发育影响。对不同时期鹿体内的睾酮和雌二醇的含量变化检测，认为鹿体内的激素分泌水平受到光周期的影响，从而影响了鹿茸的生长发育（李春义 1988）。

（2）温度和湿度

不同季节之间的差异还包括温度和湿度。春季时温度低于往年时，鹿角的脱落会比往年脱落的时期晚，生长速度变慢；4-7 月时鹿茸生长发育的关键时刻，温度升高，鹿茸生长速度加快。鹿茸在湿度大的环境里生长速度快于湿度小的环境。温度与湿度对鹿茸生长发育的影响是相辅相成的，温暖潮湿的时候是鹿茸生长发育最快最好的时期，有利于鹿茸生长（张正保和郑爱燕 2008）。

（3）年龄和健康状况

对于鹿茸的生长除了光照、温度、湿度等外部条件的影响，鹿的本身的年龄和品种对鹿茸的生长有着直接的影响。一般认为，从开始生茸的年龄开始到青壮年的时期，鹿的产茸量逐渐升高达到顶峰；开始步入老龄期，鹿的产茸量减少，

是产茸量最低的阶段。马鹿和梅花鹿都属于鹿科动物，但马鹿的产茸量远远低于梅花鹿的产茸量，梅花鹿的品质优于马鹿（雷维华等 2004）。马鹿的体型大于梅花鹿的体型，马鹿的鹿茸的生长速度更快，也是同样的马鹿的鹿茸的重量重于梅花鹿的鹿茸的重量。

健康状况会直接影响鹿茸的生长发育。鹿在鹿茸生长期不幸罹病，会严重影响鹿茸的品质和产量，有可能导致鹿茸生长停滞、不正常、萎缩、坏死等，就算得到医治恢复健康，鹿茸可以继续生长，对于鹿茸的品质和产量的下降仍有不可逆的影响（吕树臣等 2013）。

（4）收茸和角柄受伤

鹿茸根据枝杈的数量分为鞍子、挂角、花砍茸、莲花、二杠茸和三岔茸。不同茸的收取时间不同，长茸的时期也不同，鹿茸的产量也不同。为了保证鹿茸的产量和质量，要根据鹿的年龄、品种锯茸。在生长期的鹿茸受到损伤，往往会长出畸形茸，影响鹿茸的生长速度和质量、产量（朱南山等 2006）。

鹿茸的生长过程中离不了角柄。角柄是鹿茸和鹿头骨的有机联系，是鹿茸形成的基础。角柄有丰富的神经和血管，对鹿茸的生长有重要的意义。随着锯茸的次数增加，角柄逐渐变短变粗，最终消失于老龄期。角柄发生损伤，会增加畸形鹿茸的生长可能性，严重的会不长鹿茸（李光玉 2005）。

（5）蛋白质水平和能量

鹿茸在生长期需要补充大量的蛋白质，低蛋白质水平会导致鹿茸缓慢生长甚至停止生长。有研究发现梅花鹿在低蛋白水平的饲料下消化率下降，梅花鹿的体态瘦弱，鹿茸的直径、围度都受到影响（李平等 2015）。梅花鹿为反刍动物。反刍动物的蛋白质消化通过瘤胃微生物降解，这一过程需要消耗大量的能量，所以饲料中的能量给梅花鹿消化饲料中的蛋白质提供能量，间接影响鹿茸的生长（钟立成等 2009）。

（6）睾酮

对于梅花鹿来说，鹿茸是雄性梅花鹿的第二性征，因此睾酮与鹿茸的形成之间有的密切联系。检测不同时期的鹿体内发睾酮水平，发现鹿体内的睾酮水平具有周期性分泌的特点。在早春时睾酮降至阈值以下，往年的鹿角脱落，鹿茸开始重新生长；在秋季是睾酮水平达到阈值，鹿茸停止生长，并且开始脱落骨化（张

振祥等 2020)。Li 等人对幼仔公鹿进行去势，导致公鹿无法分泌睾酮，维持体内睾酮水平，成年后鹿茸无法生长，但是在处于鹿茸生长期的成年鹿进行去势，鹿茸会一直处于茸化状态，后续对其注射外源睾酮使体内睾酮达到正常生理状态的水平，鹿茸得以重新生长 (Li et al 2003)。

(7) 生长因子

胰岛素样生长因子 (IGF-I) 在细胞分化和增殖、动物生长和代谢中起重要作用。IGF-I 由 70 个氨基酸的单链多肽组成，具有多启动子基因，IGF-I 具有内分泌、自分泌和旁分泌的特征。在成年鹿中，肝和脾中 IGF-I mRNA 转录本的组织表达水平较高，心脏、肺、肾和十二指肠低。在胎鹿中、肝、肺、肾和十二指肠中的组织表达水平高于心脏和脾中的组织表达水平 (Zhang et al 2013)。IGF-I 与鹿茸生长速度呈现相关性，可以促进鹿茸间充质细胞的增殖。HU 等人 (2014) 通过对鹿茸细胞进行 mRNA 介导的 IGF-I 基因沉默，发现 IGF-I 通过降低 PIGF-1-MIR-2 的表达甚至不表达，显著降低鹿茸细胞的端粒酶活性，抑制细胞增殖，使得 S 期细胞百分比降低，细胞停滞在 G0/G1 期。

转化生长因子引诱间充质干细胞向软骨细胞转化。转化生长因子是调节细胞增殖，细胞分化和细胞外基质产生的多功能细胞因子，它在发育、伤口愈合、器官纤维化和肿瘤转移中具有重要意义。在哺乳动物中发现转化生长因子具有 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 三种亚型。利用 CRISPR-Cas 9 敲除 TGF- β 1 基因研究了 TGF- β 1 对体外软骨细胞增殖和迁移的影响，结果表明，TGF- β 1 的缺乏抑制了软骨细胞的体外增殖，但促进了软骨细胞的迁移。TGF- β 1 导致细胞增殖减少和迁移增加，激活了 BMP4 信号通路的传输 (Liu et al 2019)。

NGF 是神经生长因子，也是多肽类生长因子，促进神经的生长和细胞分裂、分化 (Angeletti and Bradshaw 1971)。NGF 与反应性神经元上的 p75 和 TRK 家族受体结合可导致其在胚胎发生和再生过程中存活和生长 (Shelton et al 1995, Frade and Barde 1998)。Liu 等人 (2017) 使用三步法从中国眼镜蛇毒液分离出 NGF 并在体外运用于 BMSCs 的软骨分化，NGF 通过 TRK 和 p75 受体的相互作用，激活 PI3K/AKT 通路，上调了 Col2a1 和 Aggrecan 等软骨细胞标志物的表达。有研究证明，鹿茸的顶端位置有丰富的神经系统，NGF 位于其中，NGF 在再生鹿角的动脉平滑肌中表达，而且在动脉平滑肌中的 NGF 表达与鹿角尖端的感觉

轴突之间存在一种反馈机制 (Li et al 2007)。

血管内皮生长因子 (VEGF) 可以促进内皮血管生成反应, 同时伴随着内皮细胞的增殖及其组织成血管网络。鹿茸是具有神经和血管的结构。Auerbach 等人 (1976) 最初观察到涉及内皮细胞有丝分裂的血管生成在再生鹿角母细胞碎片中是活跃的。随后 Goss (1980) 指出鹿茸的大部分血液通过真皮中的血管被输送到生长的尖端, 鹿茸的生长主要发生在此处, 并且生长中的鹿茸的骨核仅在鹿茸生长的早期阶段提供大量血液, 在增加该轴的骨化之前限制了这条路线作为重要的血液供应。研究表明, 通过抑制 VEGF 活性, 骨形成受损, 肥大软骨细胞的扩张被完全抑制 (Murata et al 2008)。此外, VEGF 还可以通过抑制细胞凋亡促进软骨细胞的存活 (Nagao et al 2017)。VEGF 受体存在于内皮细胞、肥大软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞上。VEGF 和 VEGFR-2 在促进成骨细胞活性的直接激活和通过血管生成促进相同活性方面发挥双重作用 (Lai et al 2007)。

1.1.2 鹿茸的生长过程

鹿茸的生长是一个周期性再生, 每年实现脱落和新生 (Price and Allen 2004), 在一个生长周期内包括鹿角脱落, 新生茸, 鹿茸骨化等 (张明海等 2003)。往年的鹿角在春天时由于睾酮水平下降脱落, 这是鹿角的铸造的标志, 意味着鹿角开始新一轮再生。鹿角铸造后不久, 远端椎弓根的骨膜明显增大, 有蒂状突起, 形成芽基。7-9 d 后, 芽基完成上皮化, 鹿茸的生长相对缓慢。在接下来 60-80 d 内, 随着秋季的来临, 鹿茸的生长出现快速增长期, 呈现指数级增长, 每天可以 2 cm 以上的长度伸长。到秋季, 鹿茸的生长速度开始变为缓慢, 茸皮开始脱落, 并开始发生骨化。完全骨化形成鹿角在来年春天又开始脱落, 进入下一个徐循环分支可见隆起, 以典型的 S 型生长曲线拉长 (Li et al 2014)。

鹿茸的生长尖端显示出特征性的远近端分区, 不同区域之间具有逐渐过渡和模糊的边界, 从上到下分为天鹅绒、间充质层、前成软骨层、软骨层, 间充质层、前成软骨层、软骨层是鹿茸生长的增殖区 (Landete et al 2019)。间充质层的特点是有丝分裂活性高, 高水平的细胞凋亡 (Li et al 2002), 间充质细胞不断增殖和分化。在前成软骨层, 细胞经历软骨形成分化的第一步。在增殖区最后部分是软骨层, 软骨细胞依次经历成熟和肥大, 最终软骨基质矿化 (Szuwart et al 1998,

Banks 1974)。在这个区域内，软骨被许多软骨细胞侵蚀，骨质沉积在变薄的软骨小梁表面，软骨细胞和成骨细胞的联合活动导致矿化软骨网络逐渐被骨小梁系统取代，使得周围的骨组织矿化程度更高（Kierdorf et al 2013）。

1.2 间充质干细胞

干细胞从通俗易懂的方面来讲就是可以永生、可以分化成任意器官组织的一类细胞，从功能上描述它的定义是具有自我更新能力、多向分化潜能的细胞，在体内能够分化产生某种特定组织类型的细胞。干细胞的概念第一次提出是 1909 年组织学家 Alexander Maksimov。干细胞可以分为胚胎干细胞和成体干细胞，如造血干细胞、骨髓间充质干细胞等属于成体干细胞。Friedenstein 和 Petrakova 的开创性研究是在 1966 年首次发现了间充质干细胞（Mesenchymal stem cells, MSCs），位于骨髓基质隔室内，可以分化为骨骼、脂肪、软骨及肌肉等（Friedenstein et al 1966, Pittenger et al 1999）。为了间充质干细胞有一个统一的认识，间充质干细胞有一个最低的定义，即间充质干细胞是贴壁细胞，可以表达 CD73、CD90 和 CD105，不表达 CD11b 或 CD14、CD19、CD34、CD45 等，在体外诱导通过使用分化特异性方案下可以分化为软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞等（Vater et al 2011）。随后的研究发现多种不同类型的间充质干细胞，这些间充质干细胞利用其自我更新和分化的特性维持了其所在组织的工作。在医学上运用间充质干细胞的分化特性治疗白血病和广泛性骨缺损、心血管修复、糖尿病、肺纤维化治疗、脊髓损伤以及骨骼和软骨修复（Barry and Murphy 2004, Caplan and Dennis 2006, Uccelli et al 2008）。

鹿角更新是一种基于干细胞的外胚层过程，鹿角干细胞启动鹿角的从头生成。鹿角干细胞可分为三种类型鹿茸骨膜细胞（APCs）、蒂骨膜细胞（PPC）和储备间充质细胞（RMCs），APCs 用于初始蒂和第一只鹿角的形成；PPC 用于每年的鹿茸再生，RMCs 用于鹿茸的快速生长（Wang et al 2019）。间充质层是鹿茸细胞生长的来源。间充质层在鹿茸生长过程不断变薄，直至骨化消失。间充质细胞的不断增殖和分化，形成软骨细胞，软骨细胞不断增殖并发育成熟，分化为成骨细胞（Wang et al 2019）。

1.3 褪黑激素

褪黑激素在体外促进成骨细胞分化和基质矿化的能力，从而表明 MLT 可能在鹿茸生长调节中发挥重要作用 (Luchetti et al 2014)。褪黑激素 (Melatonin, MLT) 最先是从小牛的松果体中提取出的一种激素，是一种松果体分泌的产物，其功能最初认为负责调节人体昼夜节律、睡眠和能量代谢以及胰岛素的合成、分泌和作用，通过维持控制的外部光信号向机体传递昼夜节律信息 (Liu et al 2017, Skarlis and Anagnostouli 2020)。MLT 在体内主要是由松果体产生，分泌量与昼夜时长的变化相关。除大脑外，MLT 也在淋巴细胞、骨髓、眼睛和胃肠道中合成。MLT 在夜晚的时候合成量远远高于白天。在生物体中，首先松果体细胞从血液中摄取色氨酸，按步在色氨酸羧化酶、芳香-L-氨基酸脱羧酶、5-羟色胺-N-乙酰转移酶以及羟化-氧-甲基转移酶作用下，色氨酸转化为 5-甲氧基-N-乙酰胺即 MLT。

MLT 还在调节心血管系统 (Zeman and Herichova 2013)、免疫调节 (Bhattacharya et al 2019) 和骨骼发育 (Luo et al 2019) 方面发挥着至关重要的作用。MLT 可以影响心血管系统并参加昼夜节律系统的调节。心血管系统由于自主神经系统活动、激素分泌、肾功能、血浆电解质浓度等节律性变化而表现出明显的昼夜节律。MLT 可以通过多种途径影响心血管系统的昼夜节律，如通过下丘脑的视交叉上核 SCN 的中央振荡器此外，通过对心脏和血光的交感神经输出，或者通过参与心血管控制的其他激素系统的相互作用 (Zisapel 2018)。夜间 MLT 分泌增加与心血管活性降低呈负相关；松果体中 MLT 能够预防缺血再灌注损伤引起的心率失常，影响血压控制，调节大脑血流，调节周围动脉对去甲肾上腺素的反应性 (Paulose 2016)。

MLT 对多种肿瘤细胞具有显著的凋亡、血管生成、肿瘤抑制和抗增殖作用。褪黑激素抑制癌细胞的各种机制包括：抗氧化作用、雌激素受体表达的基本调节、端粒酶活性的耗竭、细胞凋亡和分化、抗血管生成、表观遗传改变、细胞周期停滞、能量代谢 (Mediavilla et al 2010)。就 MLT 而言，它能够彻底改变雌激素介导的细胞通路，从而减少雌激素对细胞的刺激，并能够产生良好的肿瘤抑制作用 (Martínez et al 2006)。MLT 还能调节各种生长因子的分泌，如胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、生长激素依赖性生长因子 (GHFs)、表皮生长因子 (EGFR)、血

管内皮生长因子（VEGF）、肝细胞生长因子（HGF）、转化生长因子（TGF- β ）、血小板衍生生长因子（PDGF），改变细胞癌变的趋势，达到抗癌变和抑制肿瘤的作用（Di Bella et al 2013, Bhattacharya et al 2019）。褪黑激素作为有效的自由基清除剂和金属螯合剂的作用，具有减轻氧化应激和炎症反应以及稳定细胞膜的能力（Reiter et al 2018）。

迄今为止，已鉴定并表征其生物学作用的褪黑激素受体 MTNR1A（MT1）、MTNR1B 和 MTNR1C。而 MT1 和 MTNR1B 发现于哺乳动物，MTNR1C 是从斑马鱼、非洲爪蟾和鸡中克隆出来的（Ebisawa et al 1994）。在结构上，MT1 和 MTNR1B 两者都具有 G 蛋白偶联受体（GPCR）的特征结构，具有 7 个跨膜（TM） α -螺旋、4 个细胞内结构域和 4 个细胞外结构域（Reppert et al 1995, Luo et al 2019）。MLT 可通过褪黑激素受体介导和受体非依赖性作用的机制防止骨降解并促进骨形成（Luchetti et al 2010）。MLT 可能是通过三种机制影响骨骼功能，第一种机制是促进成骨细胞分化和活性，第二种机制是增加成骨细胞的骨保护素的表达，从而阻止破骨细胞的分化，第三种机制是清除由破骨细胞活动产生并负责骨吸收的自由基（Esposito et al 2009）。在切除松果体的动物中，与对照组相比，骨矿物质密度显著降低；在夜间补充 MLT，可改善相关的身体症状，并恢复骨重塑的不平衡以防止骨质流失（Luchetti et al 2010）。

以往的研究表明，季节性光周期的变化会刺激鹿茸的再生，这主要与体内促性腺激素的分泌有关（Malpaux et al 2001）。对赤鹿口服和皮下埋植 MLT，发现鹿体内的 MLT 含量上升和 IGF-1 的浓度也上升，鹿茸的再生提前发生且鹿茸重量增加（Suttie et al 1992）。在梅花鹿颈部皮下植入不同剂量的褪黑激素缓释剂，发现 MLT 处理显著增加了鹿茸的重量，鹿茸的相对生长率也有显著增加的趋势（Sun et al 2022）。MT1 突变与梅花鹿绒产量的关联分析表明，MT1 的 SNP（单核苷酸多态性）与其产量有关（Yang et al 2014）。因此鹿茸的生长发育与 MLT 有着密切联系。

1.4 PI3K/AKT/mTOR 信号通路

PI3K 由一个调节亚基 p85 和四个催化亚基 p110 α 、 β 、 δ 、 γ 组成，具有丝氨酸/苏氨酸激酶的活性和磷脂酰肌醇激酶的活性（毕艺鸣 2019）。p110 亚基通过

与 p85 亚基结合把底物磷脂酰肌醇 2 磷酸转化为磷脂酰肌醇 3 磷酸, 继而磷酸化其他蛋白 (Wymann and Pirola 1998, Randis et al 2008)。蛋白激酶 B 就是其中一种蛋白。蛋白激酶 B 即 AKT, 又被称为 PKB 或 Rac, 已知存在 AKT1、AKT2、AKT3 三种形式, 参与多种生理活动如细胞增殖、细胞生长、细胞凋亡等。PI3K 作为其上游产生的磷脂酰肌醇 3 磷酸激活 AKT, AKT 被磷酸化, 再将信号传递到下游底物。mTOR 是丝氨酸激酶, 是 AKT 的下游底物 (Ersahin et al 2015)。mTOR 在接受 AKT 的激活, 激活后形成 mTOR/Raptor 复合体, 磷酸化 4EBP1, 增强活性, 驱动细胞周期的进程, 调控蛋白翻译进程, 调节生理活动 (McMahon et al 2011)。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路参与调节多种细胞生理过程, 比如细胞增殖和凋亡、细胞形变和迁移、干细胞的维持和分化、免疫细胞活化等, 还参与集体的生理病理过程, 比如肿瘤发生和发展、免疫系统活化、个体发育、组织器官再生等。PI3K/AKT/mTOR 信号通路在细胞分化过程中有着举足轻重的作用 (尹盟盟等 2014)。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路在胚胎干细胞分化过程中被激活, 调节胚胎干细胞的分化。PI3K/AKT 通路在小鼠胚胎干细胞 mESC 的自我更新和维持中已经得到证实 (Ying et al 2008)。Alva 等人敲除 PTEN-PI3K/AKT 信号通路的负调节因子, 增强了 AKT 的活性, 激活了 AKT/mTOR 信号通路, 增加了 hESC 的自我更新、存活, 促进了中胚层的分化 (Alva et al 2011)。Armstrong 等人通过蛋白免疫印迹、流式细胞术和抗体阵列的分析得知使用在人胚胎干细胞中 PI3K 抑制剂 LY294002 使 PI3K 失活导致磷酸化 AKT 激酶 (丝氨酸 473 和苏氨酸 308) 和 AKT 激酶下游靶标的下调, 导致磷酸化形式的 c-RAFbd 表达下调, 而 c-RAF 的活性形式可磷酸化 MEK1/2, 导致 MAPK/ERK 信号级联的大部分组分下调, 反映了这些细胞中正在进行的分化过程 (Armstrong et al 2006)。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路在成体干细胞中根据细胞类型可以进行成脂分化、成骨分化、成肌分化、内皮分化、上皮细胞分化等。雷帕霉素 (Rapamycin) 是 mTOR 的特异性抑制剂。在成骨细胞培养液中添加 Rapamycin, Rapamycin 终止了 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激活, 抑制了成骨细胞增殖, 在成骨细胞分化的早期阶段检测 ALP 活性、OCN 的 mRNA 水平和 Runx2 的蛋白水平均下调,

抑制成骨细胞的分化, 这个研究反向证明了 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在成骨分化中被激活, 促进细胞分化 (Singha et al 2008)。TGF- β 可诱导细胞分化, 在软骨细胞培养中添加 TGF- β 1, 可以增加包括 Aggrecan 和 Col2a1 的总蛋白质合成, 同时激活 AKT/mTOR 信号通路, 而 mTOR 沉默降低了 4EBP1 的磷酸化表达, 抑制 Aggrecan 和 Col2a1 表达 (Hwang et al 2020)。Lu 等人 (2020) 通过测序的功能富集分析表明, hbASCs 中的 DEGs 参与 MAPK 和 PI3K/AKT 信号通路, 参与增殖和分化, 用外源性 FGF2 处理 ASCs 增强了它们的脂肪形成分化并上调了 AKT 和 PPAR γ 2, 而用 PI3K 抑制剂 LY24402 处理导致到相反的效果, 这些结果表明 FGF2 通过 PI3K/AKT 信号通路促进脂肪细胞分化。血管内皮细胞在血管组织工程和心力衰竭临床应用方面具有广泛的前景, VEGF 对细胞存活、内皮细胞迁移和毛细血管样结构形成依赖于这些活动 PI3K/AKT 信号通路, 在研究中证明了 VEGF 激活 PI3K/AKT 信号通路调节大鼠 CSC 分化为 VEC (Xiao et al 2014)。

Li 等人 (2022) 建立了大鼠骨质疏松症模型, MLT 通过激活 PI3K/AKT/mTOR 通路来改善铁死亡, 从而抑制骨质疏松症的发生。Zhao (2020) 发现 100 μ M 地塞米松显著降低了 MC3T3-E1 细胞的成骨细胞分化和矿化, 使用 1 μ M MLT 后减弱了这些抑制作用, 在此基础上接着使用抑制 PI3K/AKT (MK2206) 和 BMP/Smad (LDN193189) 信号消除了 MLT 诱导的分化和矿化。

1.5 研究目的及意义

近年来, 鹿茸的药用价值被越来越多的行业中得到重视。为了满足人们以及生产中对鹿茸的品质要求, 我们需要改善并提高其的品质。对于牛羊等反刍动物养殖, 梅花鹿的低饲养成本和高的经济价值, 吸引更多人投入梅花鹿养殖行业。2020 年我国农业农村部正式公布《国家畜禽遗传资源目录》, 梅花鹿被划为特种畜禽, 属于正规的养殖动物, 可药用和食用等。鹿茸的生长是内源性因素和外源性因素共同调控的结果, 其复杂性导致鹿茸的生长机制充满着许多未知, 等待研究者深入研究。

鹿茸的生长是增殖区细胞的不断增殖和分化的过程, 受多种激素、生长因子和信号通路调控。MLT 能够调节昼夜节律, 在多种生理系统发挥作用, 还能调

节骨骼生长。在实验室前期研究中已经证明了 *MLT* 可以促进鹿茸间充质细胞和软骨细胞的增殖，促进其生殖相关激素的分泌。但 *MLT* 在鹿茸间充质细胞中的促进并诱导其分化的效果和机制有待进一步研究。本实验以鹿茸间充质细胞为模型，通过外源添加 *MLT* 和干扰其受体 *MT1* 表达后，运用 qRT-PCR、Westernblot、IF 和 EDU 等方法探究 *MLT* 对鹿茸间充质细胞分化的调控作用，旨在探究 *MLT* 对鹿茸生长发育的调控机制，为鹿茸再生提供一些理论基础，也为提高鹿茸的品质与产量提供重要理论支持，更有力地开发和利用梅花鹿鹿茸资源。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 主要试剂与耗材

本实验所涉及到的主要试剂与耗材如表 2-1 所示。

表 2-1 主要试剂及耗材

Table 2-1 Main reagents and consumables

试剂与耗材 reagents and consumables	厂家 Manufacturers
Lipofectamine RNAi MAX 转染试剂盒	美国 Invitrogen 公司
FBS	美国 Gibco 公司
Trypsin-EDTA(1X)	美国 Gibco 公司
青霉素-链霉素混合液	中国 biosharp 公司
DMEM/High	美国 Hyclone 公司
总 RNA 提取试剂盒	南京诺唯赞生物积极股份有限公司
DMSO	美国 Sigma 公司
胶原酶 II	德国 Biofroxx 公司
阿利新蓝染料	武汉塞维尔生物科技有限公司
甲苯胺蓝染料	武汉塞维尔生物科技有限公司
cDNA 反转录试剂盒	天根生化科技（北京）有限公司
SYBR qRT-PCR 试剂盒	南京诺唯赞生物积极股份有限公司
一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒（10%）	上海雅酶生物医药科技有限公司
CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒	日本同仁(CK-04)公司
EDU 法细胞增殖成像分析试剂盒	中国 Abbkine 公司
褪黑激素	美国 Sigma 公司
地塞米松	上海罗恩公司
β -甘油磷酸钠五水合物	上海罗恩公司
抗坏血酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司

2.1.2 主要仪器设备

本实验所涉及到的主要仪器设备如表 2-2 所示。

表 2-2 主要仪器设备

Table 2-2 Main apparatus

仪器设备名称 Name of apparatus	型号、规格 Type	生产厂家 Manufacturer
电热恒温水浴锅	GD120	英国 Grant 公司
台式离心机	Mikro-20	美国 Mikro 公司
冷冻离心机	Centrifuge 5810	德国 eppendorf 公司
微量分光光度计	Nanodrop2000	美国 Thermo 公司
多功能酶标仪	PE EnSpire	美国 PE 公司
电泳槽	DYY-III	北京六一仪器厂
稳压稳流电泳仪	DYY-2	北京六一仪器厂
超纯水仪	WaterPro	美国 LABCONCO 公司
制冰机	AF 103 AS	武汉递热爱生物科技有限公司
微量移液器	1 mL、200 μ L、10 μ L	德国 epeendorf 公司
CO ₂ 培养箱	BB15 型	德国 Hera cell 公司
qRT-PCR 仪	IQ5	美国 Bio-Rad 公司
微波炉	P70D20TJ-D3	Galanz 公司
超低温冰箱	DW-86L66	海尔公司
超净工作台	SW-CJ-2D	苏州净化公司
液氮罐		四川西亚公司
电子天平	BL1500	德国 Sartorius 公司
分析天平	TP114	北京赛多利斯科学仪器有限公司
超纯水仪	Milli-Q	贝徕美生物科技有限公司
激光共聚焦显微镜	Zeiss LSM 800	德国蔡司

2.1.3 实验试剂的配制

(1) 10%细胞培养液：在 DMEM/High 培养液中加入 10%的胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 ng/mL 链霉素，混匀后分装至 50 mL 离心管，于 4℃条件下保存备用；

(2) MLT溶液：用DMSO溶解MLT，配制浓度为 10 mM的储存液，用 10%细胞培养液稀释MLT储存液 1 mM备用。

(3) 细胞诱导液：100 nM地塞米松+50 μM抗坏血酸+10 mM β-甘油磷酸钠

(4) 不含胎牛血清的细胞培养液：在 DMEM/High 培养液中加入 100 U/mL 青霉素、100 ng/mL 链霉素，混匀后分装至 50 mL 离心管，4℃保存备用；

(5) 2%琼脂糖凝胶：电子天平称取 2.00 g 琼脂糖，加入 100 mL 1×TAE 电泳缓冲液，在微波炉中加热融化；

(6) 细胞冻存液：分别向离心管中加入 50% FBS、45% DMEM 高糖培养液、5% DMSO 混匀；

(7) 磷酸盐缓冲液(PBS)：称取 8.00 g 氯化钠、0.20 g 氯化钾、1.44 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)，0.24 g 磷酸二氢钾，加水溶解并定容 1000 mL，高压灭菌 15 min；

(8) 甲苯胺蓝染液配置：硼酸盐法，1%的甲苯胺蓝+1%的四硼酸钠用 1X 的 PBS 配置；

(9) 0.3%阿利新蓝染液配置：0.03g 阿利新蓝+10ml 无水乙醇溶解后，取 8ml+0.1M HCL 定容至 10ml 即可（现用现配）；

(10) 蛋白裂解液配制：对于六孔板每孔需加入 94 μL 的 RIPA 蛋白裂解液，2 μL 的 50X-Cocktail、2 μL 的 50X-PMSF 以及各 1 μL 的 1%磷酸酶蛋白酶抑制剂 A 和 B（现用现配）。

2.2 方法

2.2.1 细胞的分离、培养与冻存

(1) 样品采集与分离

本实验研究所用前成软骨层和软骨层细胞均取自 2~3 岁梅花鹿鹿茸组织,鹿茸组织采自湖北省武汉金三鑫鹿业有限公司。

选取快速生长期健康梅花鹿鹿茸(生长约 60 d),75%酒精消毒后,切取顶端 5 cm 鹿茸组织,使用 75%酒精清洗 3 次,尽量挤出鹿茸中的液体成分,用含 5%双抗的 PBS 再清洗 3 次,放入无菌的 4℃的含 5%双抗的 PBS 中,带回实验室。用无菌 PBS 清洗后,用手术刀从顶端中央纵向切开,暴露内部组织,按 Li(2003)等的取材方法,在解剖镜下定位和切取鹿茸前成软骨层和软骨层。

(2) 组织块预消化培养法进行培养细胞

鹿茸前成软骨层细胞和软骨层细胞的原代培养:在无菌间内剪碎样品组织,并用 PBS 清洗 3 次,移入 50 mL 离心管,再用 PBS 清洗 1 次。加入 0.2%胶原酶 II 150 μ L 消化,于摇床上缓慢摇动,每隔 2 h 在显微镜下观察组织块边缘情况。当组织块边缘由光滑变为有大量絮状物出现并伴随液体中存在大量细胞时,于 1000 r/min 条件下离心 5 min,终止消化取出消化液备用。将收集到的细胞用无血清 DMEM 洗 1 次,接种到细胞培养瓶中,于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养。组织块继续用消化液消化直到基本消失,然后得到的细胞经 DMEM 清洗一次,接种到新的培养瓶中。第二天可在倒置显微镜下观察细胞的贴壁情况。当观察到大量细胞已经贴壁并铺满瓶底时,进行细胞传代分瓶培养。

培养细胞的传代:待原代细胞生长到 80~90%融合时,进行细胞传代培养。先用 PBS 液将细胞清洗 2 次,以排除培养液中血清对胰蛋白酶的影响。0.25%胰蛋白酶消化,待细胞变圆、将离壁时,加入完全培养基终止消化,轻轻吹打使细胞脱落,收集消化下的细胞于 10 mL 离心管内,1500 r/min 离心 5 min,弃上清,调整细胞密度,以 1×10^5 个/mL 接种到含 10% FBS 的 DMEM 培养液中,吸管吹打混匀,移入底面积为 75 cm² 的细胞培养瓶中,放入 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养。首次传代和第 2 次传代时,10 h 后换液,尽量去除培养瓶中残存的组织块。

（3）细胞的冻存

当细胞长至融合时，用封口膜封口并标记，进行冻存。使用连续降温法，即将冻存管用较厚的脱脂棉包好，装入泡沫的保温盒内，直接放入 -80°C 超低温冰箱，使其缓慢结冻，24 h 后，移至可以将细胞冷冻保存。0.25%胰蛋白酶消化，加入含血清培养基终止消化，吹打、收集细胞，1500 r/min 离心 5 min 弃上清后，加入含 5% DMSO 和 45% FBS 的细胞冻存液（ 4°C 预冷），轻轻吹打混匀，使其成为活细胞数为 5×10^6 个/mL 的细胞悬液，按 1 mL/管分装入 2 mL 冻存管，液氮中长期保存。

（4）细胞的复苏

将细胞冻存管从液氮罐中取出，迅速放入 37°C 水浴中解冻后，将细胞吹打均匀，将细胞悬液移入 10 mL 离心管内，并加入 37°C 的 10% FBS DMEM 高糖培养液 5 mL（缓慢加入），1500 r/min 离心，弃去上清液，加入完全培养液并转移到细胞培养皿中，放入 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养。

2.2.2 细胞活性检测

将细胞传代至 96 孔板，隔夜培养后，以不同浓度(0、1、5、10、50、100 μM)、不同时间(24、48、72 h)处理鹿茸间充质，每个处理 5 个复孔，置于 37°C 、5% CO_2 条件下的培养箱中。按照 cell counting kit-8 (CCK-8) 细胞增殖-毒性检测试剂盒操作步骤说明书进行处理，每孔加入 90 μL 10%完全培养液及 10 μL CCK-8，注意避免产生气泡，否则会影响 OD 值。将培养板用锡箔纸包裹后放入培养箱中避光孵育，4 h 后拿出培养板在酶标仪中检测 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

2.2.3 细胞增殖检测

将细胞传代至 96 孔板，隔夜培养后，MLT 处理 24 h。EDU 的检测原理是在合成过程中其代替胸腺嘧啶脱氧核苷掺入到新合成的 DNA 中。按照 Abbkine EdU 法细胞增殖成像分析试剂盒说明操作如下：

（1）用 10 mM EdU 溶液在培养基中制备 $2 \times \text{EdU}$ 工作溶液（20 μM ）。推荐的 EdU 终浓度为 10 μM ，用细胞培养液 1:500 稀释 10 mM EdU 即可得到

2×EdU 工作溶液 (20 μM)。

(2) 将预热 (37°C) 的 2×EdU 溶液等体积添加到含有试验细胞的培养基中, 使 96 孔板中的 EdU 终浓度变为 1×。

(3) 在最适合条件下孵育细胞 2 h。

(4) 孵育后除去培养基, 并向每个孔中加入 100 μL 含 3.7% 甲醛的 PBS 固定, 室温下孵育 15 min。

(5) 除去固定液, 用 100 μL BSA Wash Solution (1×) 浸洗孔中细胞 5 min, 重复 3 次。

(6) 除去洗涤液, 向每个孔中加入 100 μL 通透剂 (含 0.5% Triton X-100 的 PBS), 室温下孵育 15 min。

(7) 除去通透剂, 用 100 μL BSA Wash Solution (1×) 浸洗孔中细胞 5 min, 重复 2 次。

(8) 根据表 2-3 制备 Click-iT 反应混合物。

配置好的 Click-iT 反应混合物必须在 15 min 内使用。

表 2-3 Click-iT 反应体系

Table 2-3 Click-iT Reaction System

组分 Component	体积 volume
Deionized Water	758 μL
Reaction Buffer (10×)	100 μL
Copper Reagent	40 μL
AbFluor 488 Azide	2 μL
Reducing Agent (10×)	100 μL
Total Volume	1 mL

(9) 向每个样品中加入 100 μL Click-iT 反应混合物, 室温下避光孵育 30 min。

(10) 除去反应混合物, 用 100 μL BSA Wash Solution (1×) 浸洗孔中细胞 5 min, 除去洗涤液。

(11) 进行核染色 (1×Hoechst 33342) 标记。

(12) 用荧光显微镜 (Ex/Em = 501/525 nm) 分析样品中标记的 DNA, 用

Ex/Em = 360/460 nm 检测细胞核。

2.2.4 细胞总 RNA 提取及检测

Trizol 试剂抽提软骨细胞的总 RNA 的步骤如下：

(1) 复苏后的细胞在培养瓶中培养至汇合度 90% 以上，将细胞传代至 6 孔板，隔夜培养后，用 MLT 进行处理，24 h 后弃去 6 孔板内的培养液，用 PBS 洗 2 次。

(2) 每管加 1 mL Trizol 试剂（样品体积不超过 Trizol 试剂体积的 10%），迅速混匀（若样品较多可先将混好的样品置于冰上）；室温下静置 10 min 以便核酸蛋白质复合体的解离。

(3) 加 200 μ L 的氯仿，用手剧烈摇荡 15 s，室温下静置 5 min；在 4 $^{\circ}$ C 条件下，12000 r/min 离心 10 min；将水相（上清液）转入一新离心管，加 0.5 mL 异丙醇，室温下沉淀 10 min。

(4) 4 $^{\circ}$ C，12000 r/min 离心 15 min。

(5) 弃上清液，加 1 mL 75%乙醇清洗 RNA，振荡片刻后（务必使沉淀悬浮起来，以确保洗涤干净），7500 r/min 离心 5 min，弃上清液。

(6) 室温静置 15 min，使 RNA 沉淀并干燥，加入 20 μ L DEPC 水溶解，保存于 -80 $^{\circ}$ C 条件下备用。

(7) 取 2 μ L 进行琼脂糖电泳，检测 RNA 质量。

(8) 总 RNA 提取完后，用琼脂糖凝胶（1.0%）电泳方法初步检测检测总 RNA 是否有明显降解；使用美国 Pharmacia 公司 DNA/RNA 浓度测定仪检测 RNA 纯度，根据 OD260/OD280 值计算 RNA 质量，一般为 1.8~2.0 时，表示 RNA 纯度较高，质量较好，于 -80 $^{\circ}$ C 条件下冻存备用。

2.2.5 cDNA 链反转录合成

根据 RNA 相对浓度计算反转录上样量，尽量保证各处理组样品反转录上样量一致。反转录步骤参照 Fast Quant RT Kit（with gDNA）（Tian Gen）试剂盒方法说明，具体反应体系如表 2-4、表 2-5：

第一步:

表 2-4 逆转录第一步体系

Table 2-4 First step system of reverse transcription

5×RT Buffer	2 μL
Total RNA	X μL
RNase-Free dd H ₂ O	Up to 10 μL

反应条件: 42℃ 反应 3 min; 所有反应液均在冰上配制。

第二步:

表 2-5 逆转录第二步体系

Table 2-5 Second step system of reverse transcription

10× Fast RT Buffer	2 μL
RT Enzyme Mix	1 μL
FQ-RT Primer Mix	2 μL
Step 1 的反应液	10 μL
RNase-Free dd H ₂ O	Up to 20 μL

反应条件: 先 42℃ 反应 15 min, 后 95℃ 反应 3 min。

2.2.6 PCR 反应

PCR 扩增体系如表 2-6 所示。

表 2-6 PCR 扩增体系

Table 2-6 The amplification system for PCR

ddH ₂ O	7.4 μL
2×Es Taq MasterMix	10 μL
上游引物 F (10 μM)	0.8 μL
下游引物 R (10 μM)	0.5 μL
cDNA	1 μL
Total volume	20 μL

PCR 扩增反应条件如表 2-7 所示。

表 2-7 PCR 反应条件

Table 2-7 Reaction condition of PCR

温度 temperature	时间 Time	
95℃	5 min	
95℃	30 s	} 40 个循环
56℃	30 s	
72℃	30 s	
72℃	5 min	
16℃	5 min	

反应结束后，取 5 μ L PCR 产物用于电泳检测，确认 PCR 反应产物大小与目的片段是否一致，将扩增效果好的样品用于回收。

2.2.7 基因相对表达量分析

(1) 引物设计

本实验选用 GAPDH 作为内参基因，引物序列如表 2-8 所示。

表 2-8 qPCR 引物

Table 2-6 Primers list for qPCR

基因 Gene	引物名称 Primer Name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物大小 (bp) Product size
<i>GAPDH</i>	F1	GAAGGGTGGCGCCAAGAGGG	142
	R1	GGGGGCCAAGCAGTTGGTGG	
<i>CyclinD1</i>	F2	GCGCAGACCTTCGTTGCCCT	123
	R2	GCCGTTGGCGCTTCCCAGAT	
<i>PCNA</i>	F3	CCTTGGTGCAGCTAACCCCTT	94
	R3	TTGGACATGCTGGTGAGGTT	

基因 Gene	引物名称 Primer Name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物大小 (bp) Product size
<i>p21</i>	F4	GACCACTTGGACCTGTCGCT	183
	R4	GGGTTAGGGCTTCCTCTTGG	
<i>Runx2</i>	F5	TCAGAACCCACGGCCCTCCC	177
	R5	GACAGCGGCGTGGTGGAGTG	
<i>Aggrecan</i>	F9	CAACCTCCTGGGAGTGAGGA	120
	R9	GCTTTGCCGTGAGGATCAC	
<i>CD73</i>	F7	GTGTCGTGTGCCAGTTATG	247
	R7	AATCCGTCTCCACCACTGAC	
<i>col2a</i>	F6	GAGGCAGCCGGCAACCTGAG	118
	R6	TGCGAGCTGGGTTCTTGCGG	
<i>CD105</i>	F9	ACCAGGAGCTACTTCTGACCC	175
	R9	CCACCTCGTTACTGACCACAT	
<i>BMP2</i>	F10	AGCGGAAACGCCTCAAG	94
	R10	ACTATGGACTCTGCCCCTTC	
<i>Colla</i>	F11	GTTCCAACCAGCAGCAACAG	115
	R11	GGTAACTGGCTACGGAGAGC	
<i>MTI</i>	F12	TGGCTGTTTGTGGCCAGTTA	158
	R12	ACGTGATTGGAGCTATCCGC	

从 NCBI 上查阅与鹿同源性较高的牛等偶蹄目动物序列, 利用 Primer Premier 5.0 与 Oligo 6.0 在保守区域内自行设计获得。利用 NCBI 中 Primer BLAST 工具确认引物特异性后送至北京擎科生物科技有限公司进行合成。

将合成后的引物于开盖前 12000 r/min 离心 1 min, 使引物沉于管底, 轻轻打开管盖, 按照合成单上的说明添加 TE 溶解, 吹打混匀使引物充分溶解, 振荡后

瞬时离心。配制时应先稀释成浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的引物储存液，再将储存液稀释成浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液，分装并低温储存（4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 1~2 周，-20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存），避免反复冻融，防止降解。

实验所用引物需在前期利用普通 PCR 与 2%凝胶电泳检测扩增结果来检测，当增条带单一时，方可进行下一步的实时荧光定量实验。

(2) qRT-PCR

在定量试验中，设定温度梯度范围为 52~61 $^{\circ}\text{C}$ 来检测该引物的最适退火温度 (T_m) 与引物特异性。理想的温度梯度下目的基因和内参基因扩增曲线均为单一波峰没有杂峰，不存在非特异性扩增。实验设有空白对照和阴性对照，各处理组均设定 3 个样品重复。

本实验采用 10 μL 扩增反应体系，以不同处理组的 cDNA 作为模板（模板 cDNA 上样前用核酸蛋白测量仪测量相对浓度，根据浓度计算上样量体积，尽量保证模板 cDNA 上样量一致，减少加样差异带来的统计学误差），利用设计的引物对 cDNA 进行 PCR 扩增，PCR 反应加样体系如表 2-9 所示。

表 2-9 qRT-PCR 扩增体系

Table 2-9 Reaction system for qRT-PCR

蒸馏水	3 μL
SYBR Green real time PCR Master Mix	5 μL
引物 1(10 μM)	0.5 μL
引物 2(10 μM)	0.5 μL
cDNA	1 μL
Total volume	10 μL

以上反应液均在冰上配制，配好后充分吹打混匀，将反应液放在离心机上瞬时离心后上机扩增。

扩增反应条件设定如下：

qRT-PCR 采用 Bio-Rad CFX96 real-time PCR detection system 进行，反应条件为：95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 cycles (95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s)。溶解曲线从 65 $^{\circ}\text{C}$ 开始到 95 $^{\circ}\text{C}$ ，0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 增量，读取荧光值。利用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算基因相对表达水平，GAPDH 为内参基因。

2.2.8 细胞总蛋白提取

鹿茸细胞传代至六孔板内，经处理后收集六孔板内的总蛋白。按照蛋白提取试剂盒（武汉谷歌生物科技有限公司）说明方法配制一定量的蛋白裂解液，充分混匀后，置于冰盒内备用。100 μL 蛋白裂解液包含 94 μL RIPA、2 μL 50xPMSF、2 μL 50xCocktail、1 μL 磷酸化蛋白酶 A 和 1 μL 磷酸化蛋白酶 B。首先，弃掉六孔板内旧的细胞培养液，用 PBS 清洗三次，每个孔内加入 100 μL 的蛋白裂解液，静置 20 min（六孔板置于冰面上），之后用细胞刮刀将贴壁细胞刮下，以便于细胞的充分裂解，再静置 10 min，随后将裂解的蛋白转移至干净的离心管内，进行冰浴 10 min，使其充分裂解。在离心管内添加 20 μL 5X-蛋白上样缓冲液（武汉谷歌生物科技有限公司），充分混匀后，用封口膜封闭离心管口。最后将离心管放进沸水里煮 5 min，使其充分变性。煮沸完成后，将离心管进行离心，使其管盖上的水分沉积，蛋白样品置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存，以便于随后的蛋白免疫印迹（Western Blot）实验。

2.2.9 蛋白浓度检测

本实验采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒（P0012S，碧云天）进行蛋白浓度测定。具体操作步骤如下：

（1）配制标准品：取 0.8 ml 蛋白标准配制液加入到蛋白标准液（20 mg BSA）中，充分溶解后配制成 25 mg/ml 的蛋白标准溶液，取适量用 PBS 稀释至终浓度为 0.5 mg/ml 的标准品试剂。

（2）配制 BCA 工作液：根据样品数量，按体积比 50:1 加入 BCA 的 A 和 B 工作液，充分混匀，BCA 工作液室温 24 h 内稳定。

（3）96 孔板标准品孔中分别加入 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 标准品，再用 PBS 将其它孔补足到 20 μL 。

（4）样品孔中每孔加入 10 μL 蛋白样品，再补加 PBS 至 20 μL 。

（5）每孔加入 200 μl BCA 工作液，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

（6）利用酶标仪，检测波长为 562 nm 时各孔的 OD 值，根据结果绘制蛋白浓度标准曲线，通过标准曲线计算出检测样品的蛋白终浓度。

2.2.10 蛋白免疫印迹检测

(1) 检漏：在制作蛋白胶之前，首先要检查玻璃板之间是否密封。将组装好的玻璃板固定在仪器上，在两板之间加满双蒸水，静置 5 min，观察液面是否有下降，如果没有出现液面下降情况则证明密封性良好，可进行制胶。

(2) 制胶：取 29:1 的丙烯酰胺溶液 (Acrylamide)、1.5M Tris-HCl (pH=8.8)、1.0 M Tris-HCl、10% SDS、10%过硫酸铵、TEMED 和 ddH₂O，按比例制成所需要浓度的分离胶。随后加满无水乙醇，保证分离胶液面与地平线平行；1 h 后，配制一定量的 5%浓缩胶，并插上梳子。

(3) 电泳：使用 Bio-Rad 公司的垂直电泳槽。首先在添加蛋白样品两端的孔内加入 3 μ L 的蛋白 marker，蛋白样品的上样量均为 20 μ g，多余的孔用 2x-SDS 来填充，避免压力不均造成的蛋白移位。蛋白样品在浓缩胶内迁移时使用恒压 80 V 电泳，当蛋白样品达到分离胶内时，调整电压为 120 V 恒压，直至蛋白 marker 完全分离。

(4) 转膜：小心撬开玻璃板，根据蛋白 marker 分布的位置，切出所需要的目的蛋白，并且通过尺子量出蛋白胶的大小，以便于裁剪所需要的聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)。PVDF 膜裁剪后需要甲醇浸泡以达到活化效果。按照海绵-滤纸-蛋白胶-PVDF 膜-滤纸-海绵的顺序放置，在整个放置过程中，注意 PVDF 膜和蛋白胶之间不能存在气泡，如果出现气泡可以通过玻璃棒将气泡擀出。完成后将转模板插入转印芯内，放入冰袋，倒入预冷至 4 $^{\circ}$ C 的转膜缓冲液。整个转膜过程中会释放大量的热，因此需要将整个转膜槽放入充满冰块的泡沫盒内。选择 200 mA 恒流，120 min。

(5) 封闭：转膜完成后，取出 PVDF 膜，放入含有 TBST 的孵育盒内，摇床洗 2 min，倒掉 TBST 加入配置好的 5%的脱脂牛奶或者 BSA，摇床上封闭 2 h。

(6) 一抗孵育：倒掉封闭液，并用 TBST 清洗 PVDF 膜三次，每次 3 min，随后将 PVDF 膜转移至含有抗体的一抗稀释液内，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。所使用抗体为表 2-10。

表 2-10 本实验使用的抗体信息

Table 2-10 Antibody information used in this experiment

抗体名称 Name of antibodies	货号 Type	生产厂家 Manufacturer	稀释比列 WB dilution
Anti-GAPDH	B1030	博奥龙	1: 3000
Anti- α -tubulin	B1052	博奥龙	1: 3000
Anti-PI3K	A4992	ABclonal	1: 1000
Anti-Col2a1	15943	Proteintech	1: 2000
Anti-AKT	C67E7	CST	1: 1000
Anti-AKT1(phosphor Ser473)	AP0098	Abclonal	1: 1000
Anti-mTOR	A2445	ABclonal	1: 1000
Anti-mTOR(phosphor S2448)	AP0115	ABclonal	1: 1000
Anti-MT1	GTX100003	GeneTex	1: 1000

(7) 二抗孵育: 回收一抗稀释液, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。随后将条带转移至二抗稀释液内, 室温孵育 2 h。

(8) 显影: 丢弃二抗稀释液, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。配置显影液(ECLA 和 ECL B 按 1:1 配置), 加在 PVDF 膜上, 放入仪器内显影并保存图像。

(9) 灰度值分析: 蛋白条带使用 ImageJ 软件进行灰度值分析。

2.2.11 间充质细胞的甲苯胺蓝和阿利新蓝染色

处理后的细胞用 PBS 洗涤 3 次, 4%多聚甲醛室温固定 15 min。然后, 将细胞与制备的甲苯胺蓝溶液在室温下孵育 2 h, 并用蒸馏水洗涤 3 次。将制备的 0.3% 阿利新蓝溶液在室温下孵育 2 h, 然后用蒸馏水洗涤。最后, 使用显微镜采集照片。

2.2.12 鹿茸间充质细胞转染 siRNA

将生长状态良好的鹿茸软骨细胞传代于六孔板中并置于细胞培养箱内进行培养, 待细胞汇合度达到约 60%时进行转染, 转染使用 Lipofectamine RNAi MAX 试剂盒, 操作过程具体如下:

(1) 对于六孔板内每孔细胞的转染操作，分别在两个无 RNA 酶的 1.5 ml 离心管内加入 100 μ l OPTI 培养液，随后分别加入 3 μ l 的 siRNA 和 RNAiMAX 转染试剂，涡旋并离心后，室温静置 5 min。

(2) 将稀释好的 siRNA 和 RNAiMAX 进行混合，涡旋并离心后，室温静置 20 min，使其两者充分结合。

(3) 从培养箱内取出六孔板，弃掉细胞培养液，用无血清的 DMEM/High 进行清洗，清洗后每孔先加入 400 μ l 的 OPTI，之后加入 200 μ l 的 siRNA 脂质体混合物，缓慢摇匀后，至于细胞培养箱内培养。

(4) 孵育 6 h 后，弃掉 siRNA 脂质体混合物，加入 2 ml 新鲜的含血清的培养基，细胞培养 72 h 后提取蛋白或者 RNA。

2.2.13 免疫荧光检测

免疫荧光染色原理：多聚甲醛可交联细胞内的大分子，因而使包括蛋白质之内的大分子被固定住，Triton X-100 可完全破坏细胞膜的选择通透性，使细胞膜完全打开，这样保证了抗体顺利进入细胞内。特异性抗体与对应的抗原结合，荧光二抗和对应一抗结合，同时使用封闭液减少非特异性结合。在荧光显微镜激发光下，即可检测到目的蛋白特异性荧光信号。具体方法及步骤如下：

(1) 制作细胞爬片：在 24 孔板内的中心滴加 50 μ L 细胞培养液，随后用干净的镊子夹取一片细胞爬片放置 24 孔板内，由于张力的作用，细胞爬片可以牢牢贴壁，经消化后的细胞均匀铺在 24 孔板内。细胞经处理后开始固定与透膜。

(2) 固定和透膜：弃掉 24 孔板内培养液，用 PBS 清洗三遍，随后用 4% 的多聚甲醛固定细胞，在固定液内浸泡 30 min。固定结束后弃掉多聚甲醛，并室温干燥 10 min。

(3) 封闭：在 24 孔板内加入 5% BSA 封闭液，室温孵育 2 h。

(4) 一抗孵育：将细胞爬片转移到一抗稀释液中，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

(5) 清洗：取出细胞爬片，用 PBST 清洗清洗 3 次，每次 10 min。

(6) 二抗孵育：细胞爬片转移到二抗稀释液中，室温孵育 2 h。

(7) 清洗：二抗孵育结束后，用 PBST 清洗细胞爬片 3 次，每次 10 min。

(8) DAPI 染色：将细胞爬片转移到 DAPI 工作液中，室温染色 10 min。

(9) 清洗: 染色结束后, 细胞爬片转移到 PBST 中清洗 3 次, 每次 10 min。

(10) 封片: 选取合适载玻片, 在载玻片对应中央位置, 加入 20 μL 的 DABCO 防淬灭液体。然后将细胞爬片转移到 DABCO 液体中央, 然后盖上盖玻片, 并用枪头慢慢压片, 用无色指甲油封片。

(11) 激光共聚焦采图: 本实验使用 Zeiss 公司的 LSM 8000 Meta 激光共聚焦显微镜进行免疫荧光采图。

2.2.14 免疫组织化学检测

在超净台内纵向切开鹿茸组织, 在显微镜下分离鹿茸间充质层、鹿茸前成软骨层和软骨层。每层组织用手术刀切成 3 mm x 3 mm 的正方块, 用于组织块包埋。

(1) 组织脱水: 使用梯度酒精对组织进行脱水处理。

(2) 组织透明: 组织块经酒精脱水后必须经过透明。透明剂 (二甲苯) 能同时与脱水剂和石蜡混合, 其取代脱水剂后, 石蜡便能顺利地渗入组织。

(3) 浸蜡: 透明后的组织块依次经 3 缸石蜡 (60 $^{\circ}\text{C}$) 进行浸蜡。

(4) 包埋: 包埋是使浸透蜡的组织块包裹在石蜡块中。包埋用蜡的温度应略高于浸蜡温度, 保证组织块与包埋石蜡完全融为一体。

(5) 切片和烤片: 包埋好的蜡块使用徕卡病理切片机进行切片, 切好的组织片放入 40 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中进行摊片, 防脱玻片倾斜着插入水面去捞取切片, 使切片贴附在载玻片的合适位置, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烤片 3 个小时即可。

(6) 切片脱蜡: 将石蜡切片依次放入二甲苯 I (20 min) -二甲苯 II (20 min) -二甲苯 III (20 min) -无水乙醇 I (5 min) -无水乙醇 II (5 min) -95% 酒精 (5 min) -90% 酒精 (5 min) -80% 酒精 (5 min) -70% 酒精 (5 min), 然后蒸馏水浸洗 5 min。

(7) 切片入阿利新蓝染液或甲苯胺蓝溶液中溶液 15min, 自来水洗。

(13) 复染: Harris 苏木素复染, 2 min 左右, 水洗后用 1% 的盐酸酒精分化, 再用 PBS 浸洗返蓝。

(14) 脱水: 将切片置于水中冲洗后, 将切片依次放入 70% 酒精-80% 酒精-90% 酒精-95% 酒精-无水乙醇 I-无水乙醇 II-二甲苯 I-二甲苯 II 中脱水透明, 每个试剂中放置 2 min, 最后在通风橱中风干切片。

(15) 封片: 将中性树胶滴在组织旁边, 再用盖玻片盖上, 要先放平一侧,

然后轻轻放下另一侧，以免产生气泡，封好的切片平躺置于通风橱中晾干。

(16) 镜检拍照：晾干的切片可以在显微镜下观察或者采集图像。

2.2.15 数据分析

运用 SPSS 20.0 软件中的单因素方差分析(One-way ANOVA)和 T 检验对实验数据进行各处理组组间表达差异的显著性分析，是 $p < 0.05$ 或 $p < 0.01$ 或 $p < 0.001$ 分别为差异显著或极显著判断标准，采用 Bio-Rad IQ5 软件及 Microsoft Office Excel 对 qRT-PCR 数据进行分析，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因 mRNA 水平在不同处理组间的相对表达量，采用 ImageJ 计算蛋白水平在不同处理组间的相对表达量，采用 ImageJ 计算 EDU 在不同处理组间的阳性率。相对表达量的结果均使用平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示，数据利用 Graphpad Prism 8 软件作图。实验数据来自至少 3 次独立重复实验。

3 结果

3.1 鹿茸间充质细胞和软骨细胞的鉴定

在这项研究中,鹿茸间充质细胞和软骨细胞来自于鹿茸顶端的间充质层和软骨层,为了确定间充质层和软骨层的细胞类型,采用甲苯胺蓝染色和阿利新蓝染色。染色结果可知,间充质层在甲苯胺蓝染液下整个呈现蓝色,没有出现紫色异染(图 3-1 a),前成软骨层呈现紫色(图 3-1 b),而软骨层明显可以看到紫色异染,且颜色深于前成软骨层(图 3-1 c)。在阿利新蓝染色下,可以明显看到间充质层的蓝色弱于软骨层,间充质层的细胞核是蓝色(图 3-1 a),前成软骨层的细胞质呈现蓝色(图 3-1 b),软骨层的胞质和胞核都被染上蓝色(图 3-1 c)。

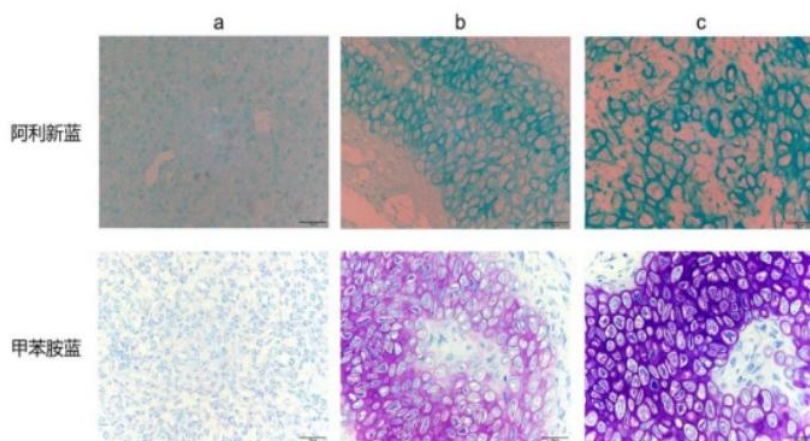


图 3-1 鹿茸间充质细胞和软骨细胞的鉴定

Figure 3-1 Identification of Deer Antler Mesenchymal Cells and Chondrocytes

图注: (a) MSCs 甲苯胺蓝和阿利新蓝染色图; (b) QCs 甲苯胺蓝和阿利新蓝染色图; (c): RCs 甲苯胺蓝和阿利新蓝染色图。标尺=50 μm

Note: (a) MSCs Toluidine blue and Alcian blue staining; (b) QCs Toluidine blue and Alcian blue staining; (c) RCs Toluidine blue and Alcian blue staining. Scale bar = 50 μm

3.2 MLT 对鹿茸间充质细胞增殖的影响

3.2.1 MLT 增强鹿茸间充质细胞活力

为了探索MLT对鹿茸间充质细胞的作用,MLT处理鹿茸间充质细胞 24、48、

72 h后,使用CCK-8 法测定各组鹿茸间充质细胞的吸光度值来检测细胞的活力情况,结果显示,MLT浓度为 1 μM 、5 μM 的条件下,24、48、72 h处理后间充质细胞与对照组相比,能显著促进间充质细胞的活力,且MLT浓度为 1 μM 时,差异更显著 ($p<0.001$);MLT浓度为 10 μM 和 20 μM 的条件下,24、48、72 h处理后间充质细胞与对照组没有明显差异;MLT浓度为 50 μM 时,48、72 h处理后间充质细胞与对照组相比,细胞活力明显下降,具有显著性,说明在此浓度下MLT抑制了间充质细胞增殖(图 3-2 A、B和C)。因此,在这项研究中可以确定并以 1 μM 的MLT作为后续的处理浓度。

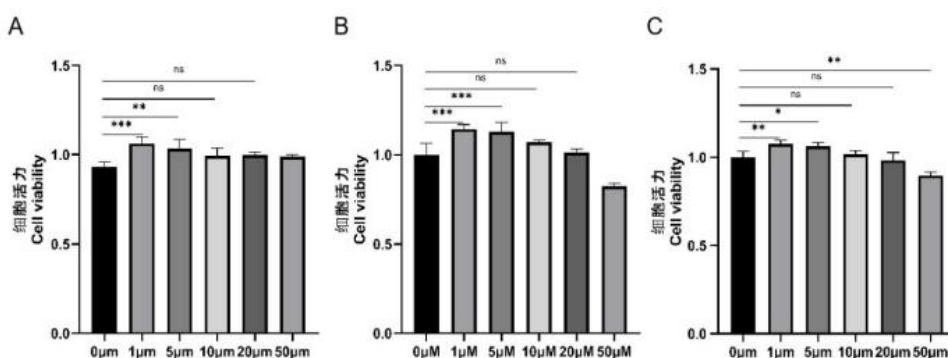


图 3-2 MLT增强鹿茸间充质细胞活力

Fig 3-2 MLT enhances the vitality of deer antler mesenchymal cells

图注: A、B、C, 鹿茸间充质细胞添加 MLT 组 (MLT) 和对照组 (NC) 细胞活力对比图, 实验组 (1、5、10、20、50 μM 浓度的 MLT 处理鹿茸间充质细胞) 的差异性与对照组 (0 μM 浓度的 MLT 处理间充质细胞) 相比。“*”代表差异显著, $p<0.05$; “**”代表差异显著, $p<0.01$; “***”代表差异显著, $p<0.001$ 。

Note: A, B, C, Comparison of cell viability between the pilose antler mesenchymal cells supplemented with melatonin group (MLT) and control group (NC), experimental group (1, 5, 10, 20, 50 μM concentration of melatonin treated deer antler mesenchymal cells and the control group (0 μM concentration of melatonin treated mesenchymal cells). "*" represents significant difference, $p<0.05$; "**" represents significant difference, $p<0.01$; "***" represents significant difference, $p<0.001$.

3.2.2 MLT 促进间充质细胞增殖

为了更好地检测MLT对间充质细胞增殖的影响,在这项研究中利用EDU渗入实验的手段来检测在处理 24 h后细胞的增殖率。结果显示,MLT处理后,间充质

细胞的EDU阳性数量明显增多（图 3-3 A）。通过对荧光强度的分析，MLT处理 24 h后的EDU阳性率上升，且与对照相比有显著差异（ $p<0.01$ ）（图 3-3 A）。表明MLT处理后间充质细胞的增殖受到促进作用。为了确定MLT对鹿茸间充质细胞增殖过程中的作用机制，该研究利用qRT-PCR检测了CD73 和CD105 的表达水平。结果表明在MLT作用下鹿茸间充质细胞的标志物CD73 和CD105 的表达与对照组相比显著升高（ $p<0.01$ ）（图 3-3 B和C）。进一步检测了增殖相关基因PCNA和 Cyclin D1 的表达。结果表明，与对照组相比，MLT可以显著提高间充质细胞表达PCNA和Cyclin D1（ $p<0.05$ ）（图 3-3 D和E）。基于以上结果可以得知MLT可以有效地促进鹿茸间充质细胞增殖。

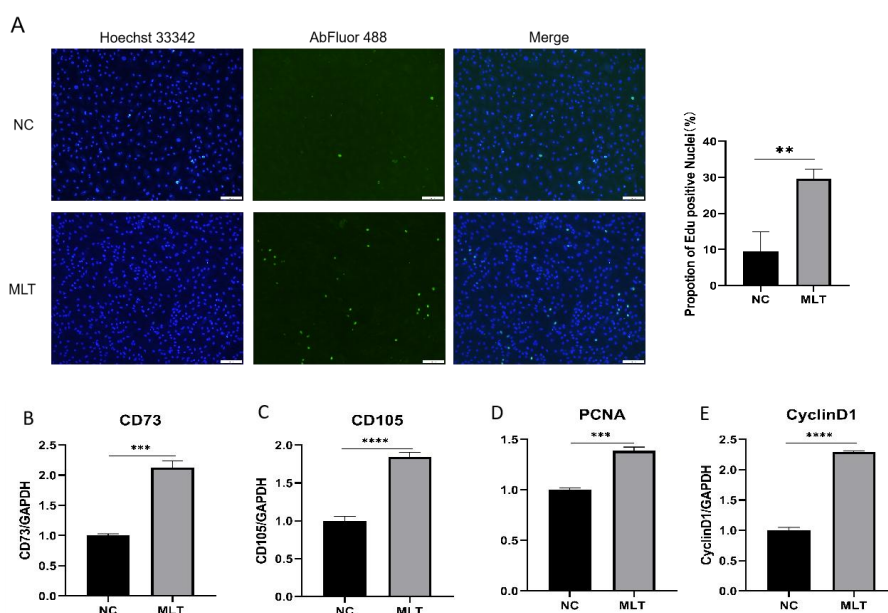


图 3-3 MLT 促进间充质细胞增殖

Figure 3-3 MLT promotes mesenchymal cell proliferation

图注：A，鹿茸间充质细胞添加 $1\mu\text{M}$ 浓度 MLT 组（MLT）和对照组（NC）EDU 染色对比图和阳性率比较；B、C、D、E,通过 qRT-PCR 检测间充质细胞中的 CD73、CD105、PCNA、Cyclin D1 的 mRNA 表达。标尺= $100\mu\text{m}$ 。“*”代表差异显著， $p<0.05$ ；“**”代表差异显著， $p<0.01$ ；“***”代表差异显著， $p<0.001$ 。

Note: A, addition of antler mesenchymal cells $1\mu\text{M}$ Comparison of EDU staining patterns and positive rates concentration melatonin group (MLT) and control group (NC); B,C,D, and E, the mRNA expression of CD73, CD105, PCNA, and Cyclin D1 in mesenchymal cells was determined by qRT-PCR. Scale bar = $100\mu\text{m}$. "*" represents significant difference, $p<0.05$; "**" represents significant difference, $p<0.01$; "***" represents significant difference, $p<0.001$.

3.2.3 MLT 激活 mTOR/4EBP1 信号促进增殖

研究表明mTOR信号通路与细胞增殖相关，mTOR信号可以导致细胞代谢水平的提高、持续的生长和增殖（McMahon et al 2011）。为了探讨MLT是否通过激活mTOR信号通路来促进鹿茸间充质细胞增殖，在这项研究中利用Westernblot检测了mTOR和4EBP1蛋白的磷酸化水平。结果表明：MLT处理后p-mTOR和p-4EBP1的表达水平显著升高（图3-4 A、B和C）（ $p < 0.05$ ）。因此，MLT在调控间充质细胞增殖过程中激活了mTOR信号通路。

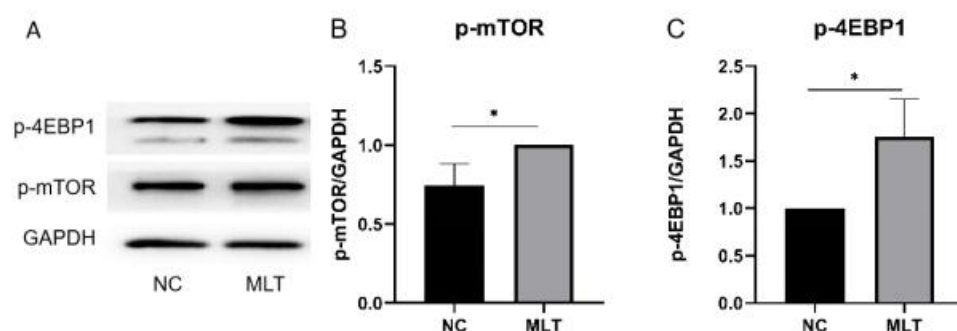


图 3-4 MLT 激活 mTOR/4EBP1 信号促进增殖

Figure 3-4 Activation of mTOR / 4EBP1 signaling by MLT promotes proliferation

图注：A、B、C，通过 Westernblot 检测 MLT 处理间充质细胞 24 h 后 p-mTOR 和 p-4EBP1 的蛋白表达。“*”代表差异显著， $p < 0.05$ ；“**”代表差异显著， $p < 0.01$ ；“***”代表差异显著， $p < 0.001$ 。

Note: A, B, and C, the protein expression of p-mTOR and p-4EBP1 in mesenchymal cells treated with MLT for 24 h was determined by Westernblot. "*" represents significant difference, $p < 0.05$; "**" represents significant difference, $p < 0.01$; "***" represents significant difference, $p < 0.001$.

3.3 MLT 对鹿茸间充质细胞分化的影响

3.3.1 MLT 促进鹿茸间充质细胞分化

在软骨细胞中，Col2a1 和 Col1、Aggrecan 是软骨细胞的特异性蛋白。我们通过 qRT-PCR 检测 Col1 和 Aggrecan 的表达水平，同时通过 Westernblot 检测 Col2a1 的蛋白表达，探究 MLT 是否可以促使间充质细胞分化。结果表明，与对照组相比，

MLT处理后,鹿茸间充质细胞内Col2a1 和Col1、Aggrecan的表达水平显著升高(图 3-5 A、B、E和F)。TGF- β 1 作为转化生长因子,已经被证实可以诱导鹿茸间充质细胞的分化。因此用qRT-PCR方法检测TGF- β 1 的表达水平,检测结果显示,TGF- β 1 的基因表达量在MLT处理后显著上升 ($p<0.01$) (图 3-5 A)。因此,MLT 促进鹿茸使间充质细胞分化,为鹿茸生长奠定基础。

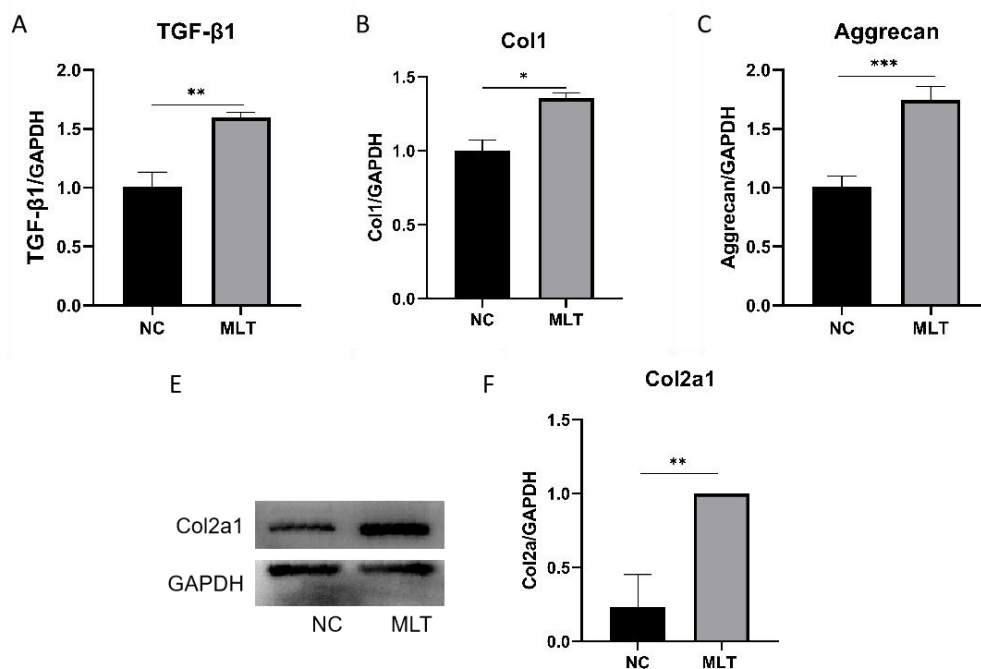


图 3-5 MLT 促进鹿茸间充质细胞分化

Figure 3-5 MLT promotes differentiation of deer antler mesenchymal cells

图注: A、B、C, 通过 qRT-PCR 检测 MLT 处理间充质细胞中 TGF- β 1、Col1、Aggrecan 的 mRNA 表达; E、F, 通过 Westernblot 检测间充质中 Col2 的蛋白表达。“*”代表差异显著, $p<0.05$; “**”代表差异显著, $p<0.01$; “***”代表差异显著, $p<0.001$ 。

Note: A, B, and C, the mRNA expressions of TGF- β 1, Col1, and Aggrecan in mesenchymal cells treated with MLT were detected by qRT-PCR. E and F, protein expression of Col2 in mesenchyme was determined by Western blot. "*" represents significant difference, $p<0.05$; "***" represents significant difference, $p<0.001$.

3.3.2 MLT 诱导间充质细胞分化染色鉴定

MLT在促进间充质细胞增殖的同时也可以加速细胞分化进程。为了验证MLT对间充质细胞的分化作用,在这项研究中对其进行诱导分化 7d, 进行阿利新蓝

染色和甲苯胺蓝染色。阿利新蓝染色和甲苯胺蓝染色是软骨细胞的特异性染色方法。从染色结果中可知，MLT诱导分化鹿茸间充质细胞在阿利新蓝染色下细胞核、细胞质有明显的蓝色，细胞密度增大；MLT诱导分化鹿茸间充质细胞在甲苯胺蓝染色下细胞核、细胞质有明显的紫色异染现象，细胞密度增大（图 3-6）。因此，MLT可以加速诱导间充质细胞分化。

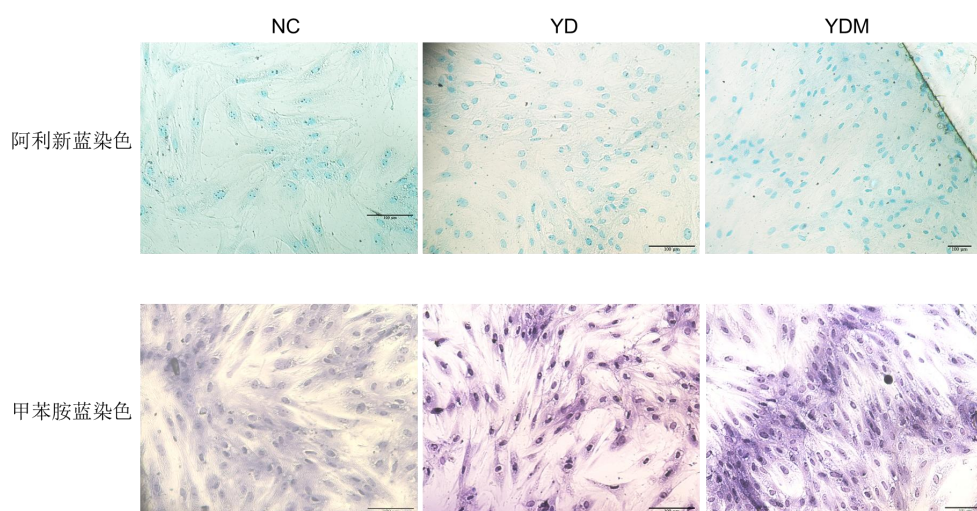


图 3-6 MLT 诱导间充质细胞分化染色鉴定

Figure 3-6 Identification of mesenchymal cell differentiation induced by MLT staining

图注：NC：对照组，YD：诱导组，YDM：MLT+诱导组，通过甲苯胺蓝和阿利新蓝染色检测诱导 7 d 的细胞分化程度。标尺=100 μm 。“*”代表差异显著， $p<0.05$ ；“**”代表差异显著， $p<0.01$ ；“***”代表差异显著， $p<0.001$ 。

Note: NC: control group, YD: induction group, YDM: melatonin + induction group; Toluidine blue and alcian blue staining were used to detect the degree of cell differentiation after 7 days of induction. Scale bar = 100 μm . "*" represents significant difference, $p<0.05$; "**" represents significant difference, $p<0.01$; "***" represents significant difference, $p<0.001$.

3.3.3 MLT 促进间充质细胞分化相关基因表达

MLT可以促进鹿茸间充质细胞增殖，而且促使鹿茸间充质细胞的Col2a1的表达。通过qRT-PCR检测与细胞周期和分化相关的CyclinD1、TGF- β 1，还检测了软骨细胞标志物Aggrecan和Col2a1，结果表明，MLT在影响鹿茸间充质细胞的周期变化，与诱导组相比，MLT诱导组的Cyclin D1 ($p<0.01$)和TGF- β 1 ($p<0.001$)的基因表达显著上升（图 3-7 A和B），且p21的基因表达显著下降 ($p<0.01$)（图

3-7 C); 同时也显著提高了MLT诱导组中的软骨细胞标志物Aggrecan ($p<0.01$) 和Col2a1 ($p<0.05$) 的表达, 促进了鹿茸间充质细胞的分化(图 3-7 D和E)。

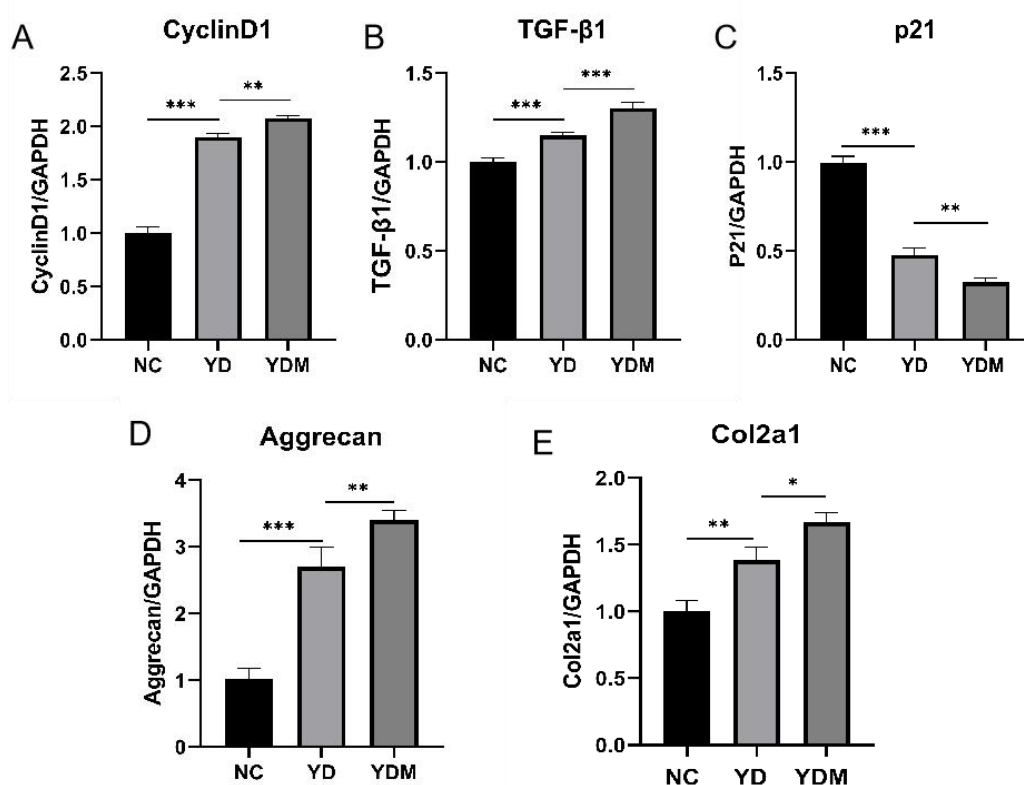


图 3-7 MLT 促进间充质细胞分化相关基因表达

Figure 3-7 MLT promotes mesenchymal cell differentiation related gene expression

图注: A、B、C、D、E, 通过 qRT-PCR 检测细胞中 Cyclin D1、TGF-β1、p21、Aggrecan 和 Col2a1 的 mRNA 表达。“*”代表差异显著, $p<0.05$; “**”代表差异显著, $p<0.01$; “***”代表差异显著, $p<0.001$ 。

Note: A, B, C, D, and E, the mRNA expression of Cyclin D1, TGF-β1, p21, Aggrecan, and Col2a1 in the cells was detected by qRT-PCR. "*" represents significant difference, $p<0.05$; "**" represents significant difference, $p<0.01$; "***" represents significant difference, $p<0.001$.

3.3.4 MLT 激活 PI3K/AKT/mTOR 信号促进细胞分化

MLT可以诱导鹿茸间充质细胞分化, 接下来利用Westernblot检测软骨细胞标志物Col2a1、PI3K/AKT/mTOR信号通路。结果显示, 在添加MLT处理后, Col2a1 的表达显著升高 ($p<0.001$) (图 3-8 E), PI3K/AKT/mTOR通路中重要的四个蛋白PI3K、p-AKT、p-mTOR和p-4EBP1 的表达也显著上升 ($p<0.001$) (图 3-8 A、

B、C和D)。因此可以认为MLT通过PI3K/AKT/mTOR信号通路诱导鹿茸间充质细胞表达Col2a1，使其分化为软骨细胞。

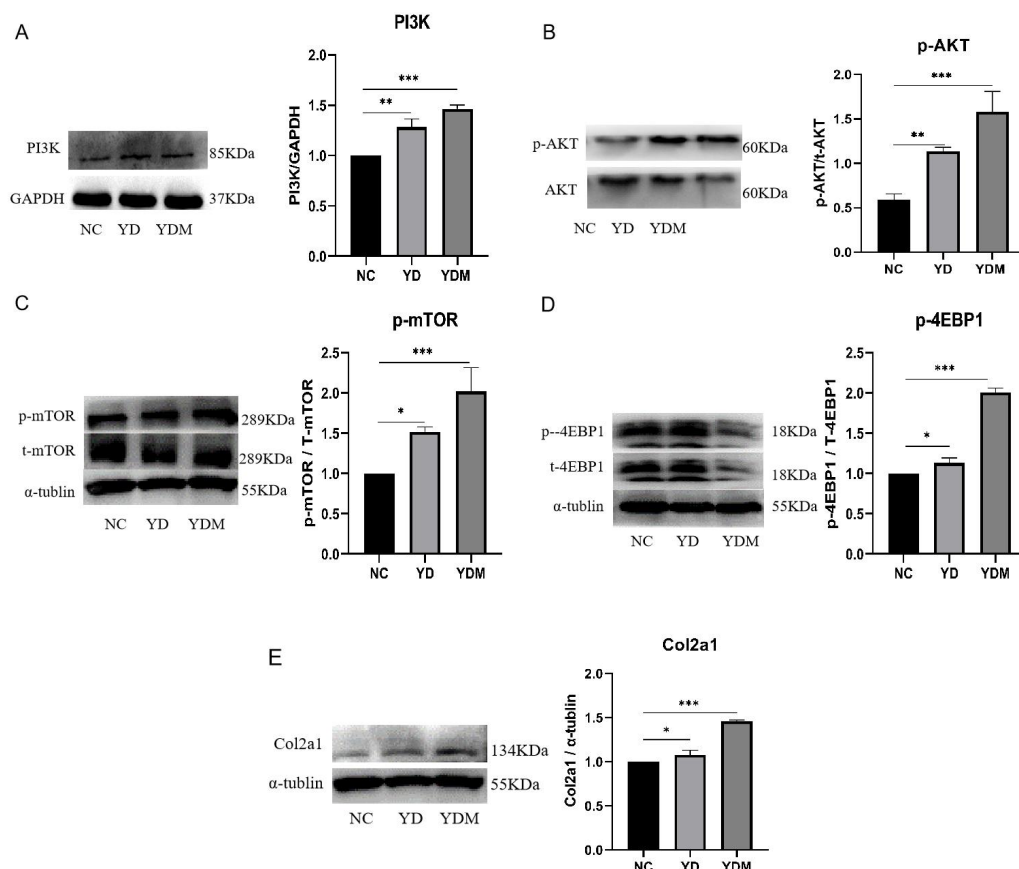


图 3-8 MLT 激活 PI3K/AKT/mTOR 信号促进细胞分化

Figure 3-8 MLT activates PI3K/AKT/mTOR signaling to promote cell differentiation

图注：A、B、C、D，MLT 对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响；E，MLT 诱导间充质细胞分化后 Col2a1 的表达影响。“*”代表差异显著， $p < 0.05$ ；“**”代表差异显著， $p < 0.01$ ；“***”代表差异显著， $p < 0.001$ 。

Note: A, B, C, D, the effect of melatonin on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway; E, Effect of melatonin on Col2a1 expression after mesenchymal cell differentiation. "*" represents significant difference, $p < 0.05$; "**" represents significant difference, $p < 0.01$; "***" represents significant difference, $p < 0.001$.

3.4 MLT 通过 MT1 对鹿茸间充质细胞生长的影响

3.4.1 MT1 的干扰效率检测

为了进一步探索MLT对鹿茸间充质细胞是否通过其受体MT1 来发挥作用,本研究利用RNA干扰技术敲低间充质细胞MT1 的表达。通过Westernblot检测MT1 的干扰效率,结果表明, si-MT1 干扰 72h后, MT1 的蛋白表达量显著敲低 ($p<0.01$)。同时也通过免疫荧光检测MT1 干扰效率,结果同样表明在si-MT1 干扰 72h后, MT1 的蛋白表达量显著敲低 ($p<0.01$) (图 3-9 A和B)。

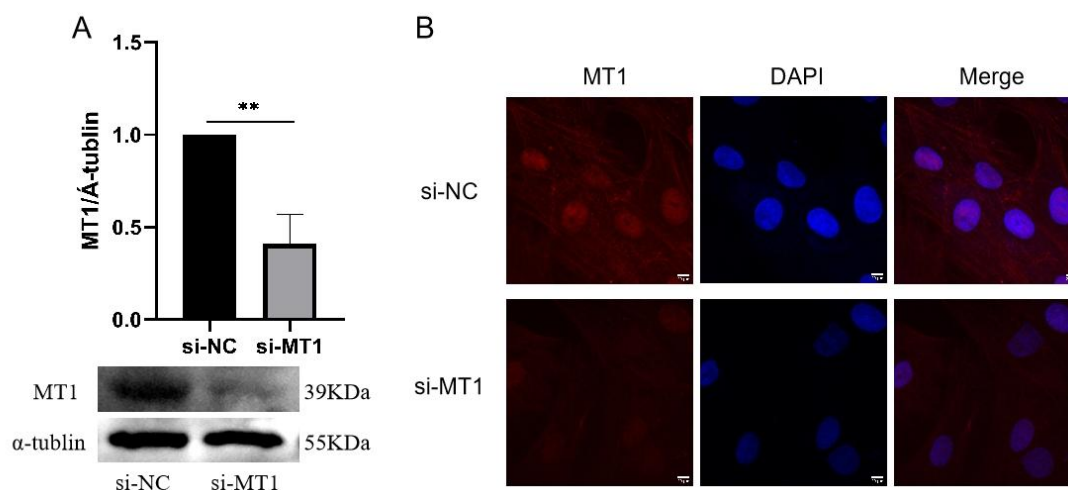


图 3-9 MT1 的干扰效率检测

Figure 3-9 Interference efficiency detection of MT1

图注: A, MT1 干扰后间充质细胞的 MT1 蛋白表达; B, MT1 干扰后间充质细胞的 MT1 免疫荧光检测。标尺=20 μ m。“*”代表差异显著, $p<0.05$; “**”代表差异显著, $p<0.01$; “***”代表差异显著, $p<0.001$ 。

Note: A, MT1 protein expression in mesenchymal cells after MT1 interference; B, Immunofluorescence of MT1 in mesenchymal cells after MT1 interference. Scale bar = 20 μ m. "*" represents significant difference, $p<0.05$; "**" represents significant difference, $p<0.01$; "***" represents significant difference, $p<0.001$.

3.4.2 干扰 MT1 后 MLT 对间充质细胞的增殖和分化的影响

为了进一步说明MLT通过其受体MT1 对鹿茸间充质细胞增殖以及细胞周期的影响,试验设置了NC组、MLT组、si-MT1 组以及si-MT1+MLT组,处理细胞 72 h后,提取RNA,反转录后用qRT-PCR检测细胞增殖相关基因表达量的变化。

结果显示，干扰后的Cyclin D1 基因表达量极显著下降 ($p<0.01$) (图 3-10 A)，CD73 基因表达量极显著下降 ($p<0.01$) (图 3-10 E)，TGF- β 1 基因表达量显著下降 ($p<0.01$) (图 3-10 B)。与MLT组相比，si-MT1+MLT组的BMP2 和Runx2 的基因表达量极显著下降 ($p<0.001$) (图 3-10 C和D)。基于以上数据可以得知MLT 调控间充质细胞的增殖与分化可依赖于MT1。

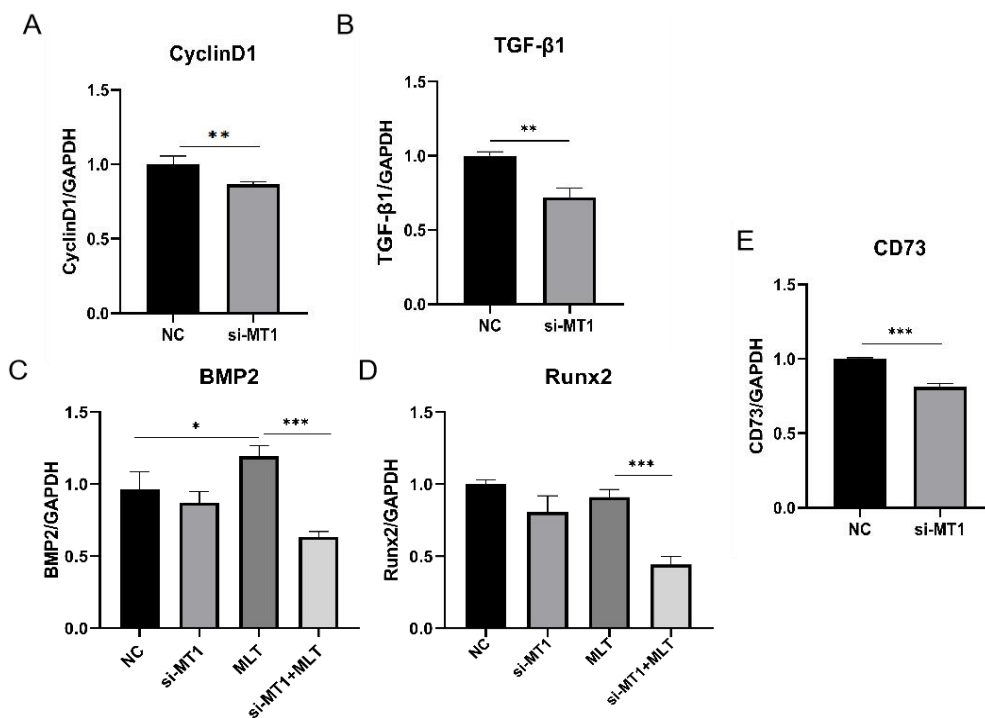


图 3-10 干扰 MT1 后 MLT 对间充质细胞的增殖和分化的影响

Figure 3-10 Effects of MLT on proliferation and differentiation of mesenchymal cells after interference with MT1

图注：NC：对照组，si-MT1：干扰组，MLT：MLT 组，si-MT1+MLT：干扰+MLT 组；通过 qRT-PCR 检测细胞中 Cyclin D1、TGF- β 1、BMP2 Runx2 和 CD73 的 mRNA 表达。“*”代表差异显著， $p<0.05$ ；“**”代表差异显著， $p<0.01$ ；“***”代表差异显著， $p<0.001$ 。

Note：NC: control group, si-MT1: interference group, MLT: melatonin group, si-MT1+MLT: interference + melatonin group; A、B、C、D、E, The mRNA expressions of Cyclin D1, TGF- β 1, Runx2, BMP2 and CD73 in cells were detected by qRT-PCR. "*" represents significant difference, $p<0.05$; "**" represents significant difference, $p<0.01$; "***" represents significant difference, $p<0.001$.

3.4.3 干扰 MT1 后抑制 PI3K/AKT 通路的信号传递

为了进一步探索MLT通过其受体MT1 调控和鹿茸间充质细胞分化的作用机制，在这项研究中检测了PI3K/AKT信号通路。利用Westernblot检测Col2a1 和PI3K/AKT/mTOR信号通路中关键蛋白的磷酸化水平。结果显示，与MLT组相比，Col2a1 的蛋白表达显著下降 ($p<0.05$) (图 3-11 A)，PI3K的蛋白表达量显著下降 ($p<0.05$) (图 3-11 B)，作为PI3K的下游p-AKT的蛋白表达量也极显著下降 ($p<0.01$) (图 3-11 C)。因此，在这项研究中可以认为MT1 被干扰表达后，MLT对间充质细胞的分化会受到影响，抑制PI3K/AKT信号通路的传递，抑制Col2a1 的表达。

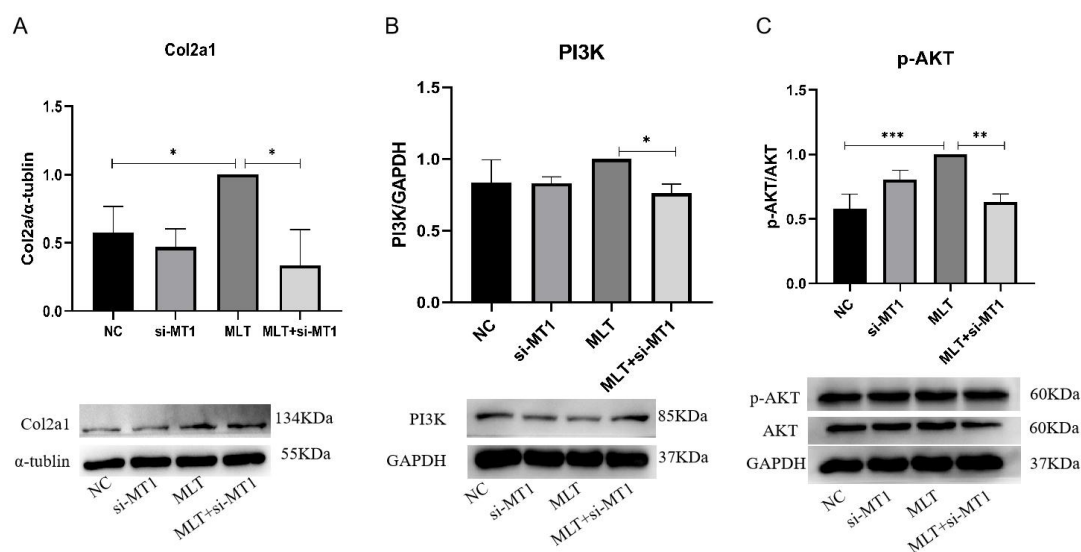


图 3-11 干扰 MT1 后抑制 PI3K/AKT 通路的信号传递

Figure 3-11 Interferes with MT1 post inhibition signaling of PI3K / Akt pathway

图注：A，MT1 干扰后间充质细胞中 Col2a1 的蛋白检测；B，MT1 干扰后间充质细胞中 PI3K/AKT 通路蛋白检测。“*”代表差异显著， $p<0.05$ ；“**”代表差异显著， $p<0.01$ ；“***”代表差异显著， $p<0.001$ 。

Note : A, protein detection of Col2a1 in mesenchymal cells after MT1 interference; B, Measurement of PI3K/AKT pathway proteins in mesenchymal cells after MT1 interference. "*" represents significant difference, $p<0.05$; "**" represents significant difference, $p<0.01$; "***" represents significant difference, $p<0.001$.

4 讨论

4.1 MLT 促进鹿茸间充质细胞增殖

鹿茸的再生、生长和成熟受内分泌激素和环境影响的控制 (Goss 1980), 从已有的研究中已经确定了生长因子和转录因子、细胞粘附和基质形成分子与鹿茸的生长有关联。这些分子包括 BMP-2 和 BMP-4 (Feng et al 1995, Feng et al 1997)、TGF- β 1、TGF- β 2、IGF-I、IGF-II、原癌基因 c-fos 和 c-myc (Francis and Suttie 1998)、Ihh、PTHr/PTHrPR (Fauchaux et al 2004, Gyurján et al 2007)。MLT 是一种内源性激素, 在动物和临床的研究中表现出低毒性。MLT 的主要作用是抗炎、抗氧化、调节免疫和骨骼修复等。在梅花鹿上进行皮下埋植 MLT, 结果表明 MLT 处理后显著增加了鹿茸重量, 且埋植了 MLT 的鹿茸生长速率有高于对照组的鹿茸生长速率 (李可可 2020)。鹿茸间充质细胞位于鹿茸组织的尖端, 可迅速分化为软骨细胞、成纤维细胞和骨细胞, 被认为是鹿茸组织的来源 (Molnár et al 2007, Kierdorf 2011)。有研究证明 MLT 对成骨细胞增殖具有双重作用, 促进或抑制细胞增殖取决于浓度, 1 mM 浓度的 MLT 抑制成骨细胞增殖, 而 1 nM -100 μ M MLT 促进成骨细胞增殖, 这两个过程涉及与 G1 期相关的 Cyclin D1 和 CDK4 的上调或者下调, 以及与 G2/M 期相关的 Cyclin B1 和 CDK1 的上调或者下调 (Liu et al 2011)。这与我们的研究结果一致。在本项研究中通过对鹿茸间充质细胞进行体外添加 MLT, 发现在 24、48、72h 处理时间下, 1 μ M 的 MLT 对鹿茸间充质细胞具有促进增殖的作用, 并且在 EDU 细胞增殖实验中明显能看到 1 μ M 的 MLT 处理后, 阳性细胞占总细胞比率明显增多。本实验采用 1 μ M 的 MLT 处理鹿茸间充质细胞后, 升高其细胞活性。细胞周期的调控受蛋白激酶复合物的影响, 蛋白激酶复合物由细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)组成, 在 G1 期 Cyclin D1 表达上调并激活 CDK4, CDK4 促进蛋白激酶复合物的表达和激活, 以便细胞进入细胞周期的后续进程 (Wu et al 2020)。在增殖的细胞中存在 PCNA 的大量表达, PCNA 的功能与细胞周期调节有关是细胞增殖状态的指标之一 (Kong et al 2022)。与增殖相关的基因 Cyclin D1、PCNA 的表达升高, 证实 MLT 可能通过上调 Cyclin D1 和 PCNA 的表达促进细胞增殖。

mTOR 作为与整个器官和细胞能量代谢相关的信号分子至关重要, 可根据

营养状况、应激信号，在调节细胞生长、增殖和存活方面发挥核心作用和生长因子（Chu et al 2020）。mTOR 的磷酸化激活，激活依赖性 4E-BP1/真核翻译起始因子的信号，推动细胞周期的进程（Fingar et al 2004）。有研究表明来自感觉神经的 FGF1 通过与 FGFR1 结合直接作用于 MSC，并激活 mTOR/自噬轴以维持 MSC 稳态（Pei et al 2023）。在一项研究中，雪旺细胞用 100 mM 葡萄糖处理以模拟高血糖状况，利用 MLT 来增强细胞增殖及其抗氧化特性防止高葡萄糖诱导的细胞死亡，在此过程中发现 MLT 保护雪旺细胞免受由 mTOR 通路激活介导的高葡萄糖诱导的细胞凋亡（Tiong et al 2019）。在这项研究中 MLT 处理鹿茸间充质细胞后 p-mTOR 和 p-4EBP1 的蛋白表达都为上调。因此，MLT 激活了 mTOR 信号通路促进鹿茸间充质细胞增殖。

4.2 MLT 促进鹿茸间充质细胞分化

低剂量 MLT 治疗可缓解 MSCs 的衰老并增加 MSCs 的增殖和分化。Radio 等人（2006）的后续研究，详细介绍了 MLT 参与 MSC 调节，证明这种神经激素在生理浓度（50 nm）与成骨培养基相结合，显著增加成骨细胞增殖和分化增强的生物标志物 ALP，伴随着 I 型胶原蛋白、骨桥蛋白、骨涎蛋白和骨钙素的基因表达。TGF- β 1 是一种多功能细胞因子，可调节细胞增殖、细胞分化和细胞外基质的产生，对发育、伤口愈合、器官纤维化和肿瘤转移具有重要意义。TGF- β 1 在梅花鹿鹿茸的皮肤、间充质和软骨层均有表达，是鹿茸的生的重要调控因子之一（Liu et al 2019）。Col2a1、Col1、Aggrecan 是软骨细胞的标志物，且在快速生长期 I 型胶原蛋白 α 链、软骨可聚蛋白多糖两者皆是上调（慧芳等 2022）。在 MLT 处理后的鹿茸间充质细胞中 TGF- β 1 的基因表达升高，且 Col2a1、Col1、Aggrecan 的基因表达也升高。说明 MLT 可以提高 TGF- β 1 的基因表达调控鹿茸间充质细胞的增殖和分化。

软骨细胞在其生长过程分泌含有蛋白多糖-透明质酸的细胞外基质。甲苯胺蓝染料和阿利新蓝染料都属于碱性染料，甲苯胺蓝是与软骨细胞中的酸性物质-含硫酸基的蛋白多糖结合，阿利新蓝作为阳离子染料与含阴离子基团的羧基蛋白多糖结合。我们发现在诱导鹿茸间充质细胞分化过程中 MLT 的添加使得细胞中阿利新蓝和甲苯胺蓝的染色区域增多，且染色颜色加深。作为软骨细胞标志物的

Col2a1 和 Aggrecan 在 MLT 诱导分化后,间充质细胞中的基因和蛋白表达量显著上升。因此,在此研究中可以认为鹿茸间充质细胞会在 MLT 的诱导下加速分化成软骨细胞。

P21 是细胞周期蛋白依赖性激酶的抑制剂,抑制从 DNA 合成前期的 G1 期到 DNA 合成期的 S 期和 DNA 合成晚期的 G2 期到细胞分裂的 M 期的一个细胞周期(Harada and Ogden 2000)。而细胞周期基因 Cyclin D1 在细胞周期从 DNA 合成前期的 G1 期到 DNA 合成期的 S 期的过程中起关键作用(Sherr 1995)。MLT 诱导分化鹿茸间充质细胞分化中,利用 qRT-PCR 检测发现 Cyclin D1 的基因表达上升且 P21 的基因表达降低,所以猜测 MLT 可能促使鹿茸间充质细胞更多停留在 S 期来促进其分化。

4.3 MLT 通过其受体 MT1 激活 PI3K/AKT/mTOR 通路促进间充质细胞分化

间充质干细胞是多能祖细胞,可以在适当条件下分化为多种细胞类型,例如成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞,MLT 在 MSC 定型和分化的调节中发挥重要作用。前面我们已知 MLT 可以促进鹿茸间充质细胞的增殖和分化,而且 MLT 激活了 mTOR 信号通路调控鹿茸间充质细胞的生长。在哺乳动物中,MLT 常见的受体为 MT1 和 MTNR1B。Yang 等人对 MT1 的 SNP (单核苷酸多态性) 分析表明其与梅花鹿茸产量有关 (Yang et al 2014)。我们发现在经过 MLT 处理后,鹿茸间充质细胞的 MT1 的表达升高,但是在 MT1 的表达受到抑制后鹿茸间充质细胞的 Col2a1 的蛋白表达降低,这与之前的研究结果可以得到论证,MT1 在鹿茸的生长有着重要作用。

有研究通过持续 21 d 的 MLT 处理人间充质干细胞,MLT 通过 MT2 诱导成骨基因 Runx2、骨钙素和 BMP2 的表达,通过形成 MT2 /Gi β -arrestin/MEK/ERK1/2 复合物诱导成骨细胞从 hAMSCs 分化,从而诱导成骨 (Sethi et al 2010)。在骨髓来源的 MSC 中,MLT 可增强成骨作用并抑制脂肪生成,CCAAT/ C/EPB 家族和 PPAR γ 调节脂肪细胞分化,而转录因子 Runx2 和 Osterix 调节成骨细胞分化,PPAR γ 的激活会下调 Runx2 的表达,而 PPAR γ 不足会导致骨髓脂肪生成减少和 Runx2 介导的成骨增加 (Zhang et al 2013)。这与研究中结果相符,使用

siRNA 干扰技术使 *MT1* 的表达降低,发现间充质细胞中 *BMP2* 和 *Runx2* 的基因表达下降,影响间充质细胞的分化进程。

MLT 在间充质细胞中作为一个调节信号,参与到 *Wnt/β-catenin*、*MAPK*、*PI3K/AKT* 和 *TGF-β* 信号转导,使其分化为软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞等。*mTOR* 是多种细胞功能的重要调节因子,包括细胞增殖、分化和蛋白质合成 (Kim and Guan 2015)。对信号通路分析表明,在椎间盘组织和 NP 细胞中,*MLT* 作用于 *MT1/2*,降低 *PI3K*、*PDPK1* 和 *AKT* 的磷酸化,进而下调 *Cyclin D1* 和 *PCNA* 的表达,抑制 NP 细胞增殖,预防椎间盘 (Zhang et al 2015, Li et al 2017)。在软骨发育中, *mTOR* 是重要调节因子之一,调节哺乳动物肢体骨骼的生长 (Ma et al 2021, Zhang et al 2023)。在这项研究中 *MLT* 诱导间充质细胞分化后, Westernblot 结果显示 *PI3K*、*p-AKT*、*p-mTOR* 的蛋白表达量上升,且 *Col2a1* 的蛋白表达升高,猜测 *MLT* 可能激活了 *PI3K/AKT/mTOR* 通路诱导间充质细胞分化。我们使用 siRNA 干扰间充质细胞中 *MT1* 的表达, *PI3K*、*p-AKT* 的表达量下降了,且 *Cyclin D1*、*TGF-β1* 的基因表达降低,间充质细胞的增殖和分化均受到抑制。因此,在这项研究中可以认为 *MLT* 通过 *MT1* 激活 *PI3K/AKT/mTOR* 通路调控细胞成骨相关 *BMP2*、*Runx2* 和细胞周期相关的 *CyclinD1*、*P21* 的表达相应上升或下降。

5 总结

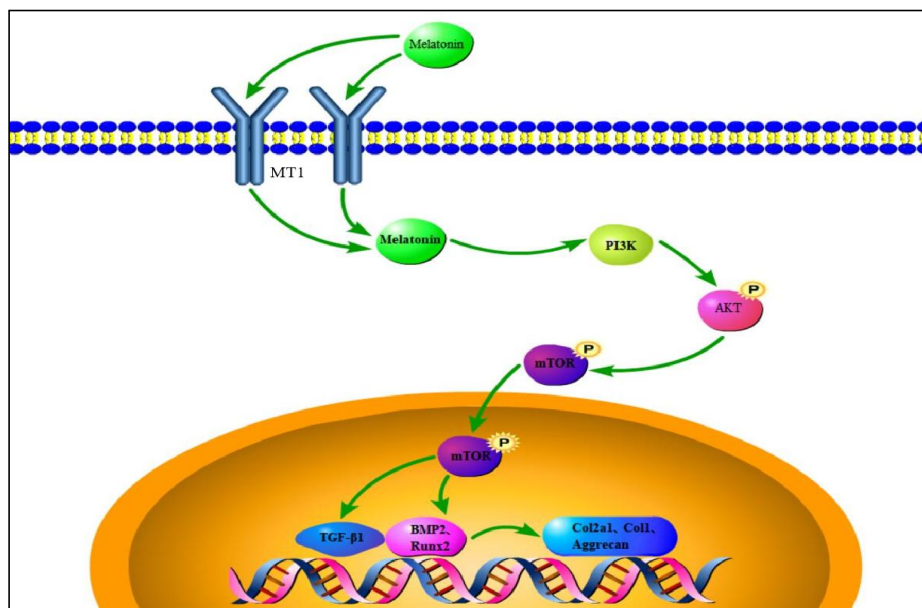
本实验的研究目的是探究 MLT 及其受体 MT1 对鹿茸间充质细胞的分化促进鹿茸生长的作用机制。本实验对鹿茸间充质细胞外源添加 MLT，诱导其分化，并干扰间充质细胞中的 MT1 的表达，来研究 MLT 对鹿茸间充质细胞的调控作用，揭示鹿茸再生的调控机制。

(1) 1 μM 的 MLT 可以促进鹿茸间充质细胞增殖。MLT 上调间充质细胞中的 Cyclin D1 和 PCNA 的基因表达，激活了 mTOR 信号通路。

(2) 1 μM 的 MLT 可以促进鹿茸间充质细胞分化。MLT 上调间充质细胞的 Cyclin D1 和 TGF- β 1 的基因表达，同时上调了软骨细胞的标志物 Col1、Col2a1 和 Aggrecan。

(3) 1 μM 的 MLT 通过 MT1 激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进鹿茸间充质细胞分化。添加 MLT 后使 PI3K、p-AKT、p-mTOR 的蛋白表达量升高，但干扰 MT1 后，鹿茸间充质细胞的 BMP2、Runx2 和 TGF- β 1 的基因表达下降，并且 Col2a1 的表达也低于诱导组。对于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路，干扰 MT1 后鹿茸间充质细胞中 PI3K、p-AKT 的蛋白表达量降低。

综上所述，结果表明 MLT 通过 MT1 进入鹿茸间充质细胞，激活 PI3K/AKT/mTOR 通路，上调了 Cyclin D1、TGF- β 1、BMP2 和 Runx2 的基因表达，促进 Col2a1、Col1 和 Aggrecan 的基因表达，从而促进间充质细胞的增殖和分化，促进鹿茸生长发育。



6 创新与下一步计划

6.1 创新

(1) 课题组前期师兄师姐们已经在褪黑素对鹿茸间充质细胞和软骨细胞的增殖影响做过相关研究, 本实验尝试在细胞诱导液中添加 MLT 诱导鹿茸间充质细胞, 探究 MLT 对间充质细胞分化的作用;

(2) 本实验揭示了 MLT 可以通过 *MT1* 激活 *PI3K/AKT/mTOR* 通路诱导鹿茸间充质细胞分化的部分机制。

6.2 下一步计划

(1) MLT 诱导鹿茸间充质细胞分化的实验继续研究细胞分化的进程, 增加诱导分化时间;

(2) 此实验可知 MLT 通过调控 *PI3K/AKT/mTOR* 信号通路影响鹿茸间充质细胞的增殖和分化, 深入研究 *PI3K/AKT/mTOR* 信号通路对鹿茸间充质细胞分化的调控机制。

参考文献

1. 毕艺鸣. PI3K/Akt 信号转导通路在异绿原酸 A 抗氧化应激诱导 H9C2 心肌细胞凋亡中的作用研究[硕士学位论文].广州, 南方医科大学,2019.
2. 何叶艳, 吕凯伦, 董加俊, 俞一钊, 何珂.梅花鹿华南亚种和东北亚种警戒声比较.四川动物, 2019, 38(03):241-248.
3. 慧芳, 孙天霞, 薛东明, 姜英男, 赵雨.梅花鹿茸不同生长时期转录组及蛋白组联合分析.吉林中医药, 2022, 42(08):975-979.
4. 雷维华, 曹志梅, 王建寿, 庞国杰.影响鹿茸生长的主要因素.特种经济动植物, 2004(01):8-32.
5. 李春义.梅花鹿茸角生长发育各阶段血浆睾酮、雌二醇的含量变化.兽类学报, 1988, 8(3):224-231.
6. 李光玉.梅花鹿、马鹿营养、血清 IGF-1 浓度及鹿茸生长规律研究[博士学位论文].北京:中国农业科学院, 2005.
7. 李可可, 孙旭阳, 陈超, 荆焕松, 许学林, 游思, 赵靖波, 熊家军.外源 MLT 对鹿茸软骨细胞生长发育的影响.中国畜牧兽医, 2020, 47(07):1997-2004.
8. 李平, 燕志宏, 田松军, 魏小红, 顾丽菊, 任丽群.日粮蛋白质水平对贵州省梅花鹿鹿茸生长的影响.基因组学与应用生物学, 2015, 34(10):2142-2146.
9. 吕树臣,王春清,常维毅,宋百军,何玉华.影响鹿茸产量因素与增茸措施.黑龙江畜牧兽医,2013(12):123-125.
10. 马逸清.中国的鹿文化(一).国土与自然资源研究, 2002(04):70-71.
11. 田允波.光照和性激素对鹿茸生长的调控.家畜生态, 1994(03):45-48.
12. 卫功庆, 薛嘉璐, 刘舒欣, 段景玲, 姜涛, 王艺锟.中国梅花鹿种质资源的保护与利用.吉林农业大学学报, 2022, 44(04):379-385.
13. 尹盟盟, 崔玉荣, 王璐, 王佳玉, 高颖, 席姣娅. PI3K/Akt 信号通路调控胚胎干细胞的自我更新和多向分化潜能的研究进展. 生理学报, 2014, 66(02):223-230.
14. 张明海, 朴云珠.光照强度对梅花鹿鹿茸生长发育的研究.畜牧兽医学报, 1995, 26(5):391-396.

15. 张振祥, 陈霞霞, 张姗姗, 陈艳霞.鹿茸生长影响因子概述.甘肃畜牧兽医, 2020, 50(07):8-11.
16. 张正保, 郑爱燕.鹿茸生长的影响因素分析.畜牧兽医科技信息, 2008(06):108-109.
17. 赵卉, 刘继永, 王峰, 肖家美, 张秀莲, 李光玉.鹿茸等五种鹿产品种氨基酸含量及组成对比分析.时珍国医国药, 2015, 26(05):1056-1058.
18. 钟立成, 尹远新, 王桂华等.饲料蛋白质水平与鹿茸产量和质量的关系.经济动物学报, 2009, 13(02):63-67.
19. 朱南山, 张彬, 王洁.鹿产茸性能的调控因素.经济动物学报, 2006(01):49-52+55.
20. Alva JA, Lee GE, Escobar EE, Pyle AD. Phosphatase and tensin homolog regulates the pluripotent state and lineage fate choice in human embryonic stem cells. *Stem Cells*,2011,29(12):1952-62.
21. Angeletti RH, Bradshaw RA. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971,68(10):2417-2420.
22. Armstrong L, Hughes O, Yung S, Hyslop L, Stewart R, Wappler I, Peters H, Walter T, Stojkovic P, Evans J, Stojkovic M, Lako M. The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum Mol Genet*,2006,15(11):1894-913.
23. Auerbach R, Kubai L, Sidky Y. Angiogenesis induction by tumors, embryonic tissues, and lymphocytes. *Cancer Res*, 1976,36(9 PT 2):3435-40.
24. Banks WJ. The ossification process of the developing antler in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Calcif Tissue Res*,1974,14(4):257-74.
25. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(4): 568-584
26. Bhattacharya S, Patel KK, Dehari D, Agrawal AK, Singh S. Melatonin and its ubiquitous anticancer effects. *Mol Cell Biochem*,2019,462(1-2):133-155.
27. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 2006, 98(5): 1076

28. Chu Y, Chen W, Peng W, Liu Y, Xu L, Zuo J, Zhou J, Zhang Y, Zhang N, Li J, Liu L, Yao K, Gao G, Wang X, Han R, Liu C, Li Y, Zhou H, Huang Y, Ye Y. Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Exosomes-Mediated Autophagy Promotes the Survival of Trophoblasts Under Hypoxia Through mTOR Pathway by the Downregulation of EZH2. *Front Cell Dev Biol*,2020,8:545852.
29. Cluttonbrock T H. The Functions of Antlers. *Behaviour*, 1982, 79: 108-+
30. Di Bella G, Mascia F, Gualano L, Di Bella L. Melatonin anticancer effects: review. *Int J Mol Sci* ,2013,14(2):2410-30.
31. Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci USA*,1994,91(13):6133-7.
32. Ersahin T, Tuncbag N, Cetin-Atalay R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol Biosyst*. 2015,11(7):1946-54.
33. Esposito E, Genovese T, Caminiti R, Bramanti P, Meli R, Cuzzocrea S. Melatonin reduces stress-activated/mitogen-activated protein kinases in spinal cord injury. *J Pineal Res*,2009,46(1):79-86.
34. Feng J Q, Chen D, Esparza J, Harris M A, Mundy G R, Harris S E. Deer Antler Tissue Contains 2 Types of Bone Morphogenetic Protein-4 Messenger-Rna Transcripts. *Bba-Gene Struct Expr* ,1995, 1263(2): 163-8.
35. Feng J Q, Chen D, GhoshChoudhury N, Esparza J, Mundy G R, Harris S E. Bone morphogenetic protein 2 transcripts in rapidly developing deer antler tissue contain an extended 5' non-coding region arising from a distal promoter. *Bba-Gene Struct Expr*, 1997, 1350(1): 47-52.
36. Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*, 2004,24(1):200-216.
37. Frade JM, Barde YA. Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioessays*, 1998,20(2):137-145.
38. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants

- of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 1966;16(3):381-90.
39. Goss R J. Tumor-like growth of antlers in castrated fallow deer: an electron microscopic study. *Scanning Microsc*, 1990, 4(3): 715-20; discussion 20-1.
40. Goss RJ. Prospects of regeneration in man. *Clin Orthop Relat Res*,1980,(151):270-82.
41. Goss, R.J., Photoperiodic control of antler cycles in deer: VII. Role of light vs. dark in suppression of circannual rhythms. *J. Exp. Zool.*,1987,244: 113-116.
42. Gyurján I Jr, Molnár A, Borsy A, Stéger V, Hackler L Jr, Zomborszky Z, Papp P, Duda E, Deák F, Lakatos P, Puskás LG, Orosz L. Gene expression dynamics in deer antler: mesenchymal differentiation toward chondrogenesis. *Mol Genet Genomics*. 2007;277(3):221-35.
43. Harada K, Ogden GR. An overview of the cell cycle arrest protein, p21(WAF1). *Oral Oncol*, 2000,36(1):3-7.
44. Hu W, Qi L, Tian YH, Hu R, Wu L, Meng XY. Studies on the purification of polypeptide from sika antler plate and activities of antitumor. *BMC Complement Altern Med*, 2015,15:328.
45. Hwang HS, Lee MH, Kim HA. TGF- β 1-induced expression of collagen type II and ACAN is regulated by 4E-BP1, a repressor of translation. *FASEB J*, 2020,34(7):9531-9546.
46. Kierdorf U, Flohr S, Gomez S, Landete-Castillejos T, Kierdorf H. The structure of pedicle and hard antler bone in the European roe deer (*Capreolus capreolus*): a light microscope and backscattered electron imaging study. *J Anat.*, 2013,223(4):364-84.
47. Kierdorf U, Kierdorf H. Deer antlers - a model of mammalian appendage regeneration: an extensive review. *Gerontology*, 2011,57(1):53-65.
48. Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest*, 2015,125(1):25-32.
49. Kong X, Liu Z, Long C, Shen L, Liu X, Wei G. Repression of Mafb promotes foreskin fibroblast proliferation through upregulation of CDK2, cyclin E and PCNA. *Andrologia*, 2022,54(6):e14411.

50. Lai AK, Hou WL, Verdon DJ, Nicholson LF, Barling PM. The distribution of the growth factors FGF-2 and VEGF, and their receptors, in growing red deer antler. *Tissue Cell*, 2007,39(1):35-46.
51. Landete-Castillejos T, Kierdorf H, Gomez S, Luna S, García AJ, Cappelli J, Pérez-Serrano M, Pérez-Barbería J, Gallego L, Kierdorf U. Antlers - Evolution, development, structure, composition, and biomechanics of an outstanding type of bone. *Bone*, 2019,128:115046.
52. Li C, Clark DE, Lord EA, Stanton JA, Suttie JM. Sampling technique to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery. *Anat Rec*, 2002,268(2):125-30.
53. Li C, Littlejohn RP, Corson ID, Suttie JM. Effects of testosterone on pedicle formation and its transformation to antler in castrated male, freemartin and normal female red deer (*Cervus elaphus*). *Gen Comp Endocrinol*, 2003,131(1):21-31.
54. Li C, Stanton JA, Robertson TM, Suttie JM, Sheard PW, Harris AJ, Clark DE. Nerve growth factor mRNA expression in the regenerating antler tip of red deer (*Cervus elaphus*). *PLoS One*, 2007,2(1):e148
55. Li C, Zhao H, Liu Z, McMahon C. Deer antler--a novel model for studying organ regeneration in mammals. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 56: 111-122
56. Li M, Yang N, Hao L, Zhou W, Li L, Liu L, Yang F, Xu L, Yao G, Zhu C, Xu W, Fang S. Melatonin Inhibits the Ferroptosis Pathway in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Activating the PI3K/AKT/mTOR Signaling Axis to Attenuate Steroid-Induced Osteoporosis. *Oxid Med Cell Longev*, 2022,2022:8223737.
57. Li Z, Li X, Chen C, Chan MTV, Wu WKK, Shen J. Melatonin inhibits nucleus pulposus (NP) cell proliferation and extracellular matrix (ECM) remodeling via the melatonin membrane receptors mediated PI3K-Akt pathway. *J Pineal Res*, 2017,63(3):10.1111/jpi.12435.
58. Liu L, Zhu Y, Xu Y, Reiter RJ. Melatonin delays cell proliferation by inducing G1 and G2 /M phase arrest in a human osteoblastic cell line hFOB 1.19. *J Pineal Res*,

- 2011,50(2):222-31.
59. Liu M, Han X, Liu H, Chen D, Li Y, Hu W. The effects of CRISPR-Cas9 knockout of the TGF- β 1 gene on antler cartilage cells in vitro. *Cell Mol Biol Lett*, 2019,24:44.
60. Liu Z, Gan L, Luo D, Sun C. Melatonin promotes circadian rhythm-induced proliferation through Clock/histone deacetylase 3/c-Myc interaction in mouse adipose tissue. *J Pineal Res*, 2017,62(4).
61. Lu GM, Rong YX, Liang ZJ, Hunag DL, Wu FX, Ma YF, Luo ZZ, Liu XH, Mo S, Li HM. FGF2-induced PI3K/Akt signaling evokes greater proliferation and adipogenic differentiation of human adipose stem cells from breast than from abdomen or thigh. *Aging (Albany NY)*, 2020,12(14):14830-14848.
62. Lu Z, Lei D, Jiang T, Yang L, Zheng L, Zhao J. Nerve growth factor from Chinese cobra venom stimulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis*, 2017,8(5):e2801.
63. Luchetti F, Canonico B, Bartolini D, Arcangeletti M, Ciffolilli S, Murdolo G, Piroddi M, Papa S, Reiter RJ, Galli F. Melatonin regulates mesenchymal stem cell differentiation: a review. *J Pineal Res*, 2014,56(4):382-97.
64. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, Canesi L, Papa S, Galli F. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J*, 2010,24(10):3603-24.
65. Luo, C.; Yang, Q.; Liu, Y.; Zhou, S.; Jiang, J.; Reiter, R.J.; Bhattacharya, P.; Cui, Y.; Yang, H.; Ma, H.; et al. The multiple protective roles and molecular mechanisms of melatonin and its precursor N-acetylserotonin in targeting brain injury and liver damage and in maintaining bone health. *Free. Radic. Biol. Med*, 2019, 130, 215 - 233.
66. Ma L, Zhang R, Li D, Qiao T, Guo X. Fluoride regulates chondrocyte proliferation and autophagy via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Chem Biol Interact*. 2021;349:109659.
67. Malpoux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol*

- Rhythms*, 2001,16(4):336-47.
68. Martínez-Campa C, Alonso-González C, Mediavilla MD, Cos S, González A, Ramos S, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin inhibits both ER alpha activation and breast cancer cell proliferation induced by a metalloestrogen, cadmium. *J Pineal Res*, 2006,40(4):291-6.
69. McMahon G, Weir MR, Li XC, Mandelbrot DA. The evolving role of mTOR inhibition in transplantation tolerance. *J Am Soc Nephrol*, 2011,22(3):408-415.
70. Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem*, 2010,17(36):4462-81.
71. Molnár A, Gyurján I, Korpos E, Borsy A, Stéger V, Buzás Z, Kiss I, Zomborszky Z, Papp P, Deák F, Orosz L. Identification of differentially expressed genes in the developing antler of red deer *Cervus elaphus*. *Mol Genet Genomics*, 2007,277(3):237-48.
72. Murata M, Yudoh K, Masuko K. The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage*, 2008,16(3):279-86.
73. Nagao M, Hamilton JL, Kc R, Berendsen AD, Duan X, Cheong CW, Li X, Im HJ, Olsen BR. Vascular Endothelial Growth Factor in Cartilage Development and Osteoarthritis. *Sci Rep*, 2017,7(1):13027.
74. Paulose JK, Wright JM, Patel AG, Cassone VM. Human Gut Bacteria Are Sensitive to Melatonin and Express Endogenous Circadian Rhythmicity. *PLoS One*, 2016,11(1):e0146643.
75. Pei F, Ma L, Jing J, Feng J, Yuan Y, Guo T, Han X, Ho TV, Lei J, He J, Zhang M, Chen JF, Chai Y. Sensory nerve niche regulates mesenchymal stem cell homeostasis via FGF/mTOR/autophagy axis. *Nat Commun*, 2023,14(1):344.
76. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999,284(5411):143-7.
77. Price J, Allen S. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers.

- Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004,359(1445):809-22.
78. Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res*, 2006,40(4):332-42.
79. Randis TM, Puri KD, Zhou H, Diacovo TG. Role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in inflammatory arthritis and tissue localization of neutrophils. *Eur J Immunol*, 2008,38(5):1215-24.
80. Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Zhou XJ, Xu B. Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. *Molecules*, 2018,23(2):509.
81. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995,92(19):8734-8.
82. Sethi S, Radio NM, Kotlarczyk MP, Chen CT, Wei YH, Jockers R, Witt-Enderby PA. Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways. *J Pineal Res*, 2010,49(3):222-38.
83. Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, Camerato T, Armanini MP, Phillips HS, Carroll K, Spencer SD, Levinson AD. Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci*, 1995,15(1 Pt 2):477-91.
84. Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci*, 1995,20(5):187-90.
85. Singha UK, Jiang Y, Yu S, Luo M, Lu Y, Zhang J, Xiao G. Rapamycin inhibits osteoblast proliferation and differentiation in MC3T3-E1 cells and primary mouse bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, 2008,103(2):434-46.
86. Skarlis C, Anagnostouli M. The role of melatonin in Multiple Sclerosis. *Neurol Sci*, 2020,41(4):769-781.
87. Sun X, Gu X, Li K, Li M, Peng J, Zhang X, Yang L, Xiong J. Melatonin

- Promotes Antler Growth by Accelerating MT1-Mediated Mesenchymal Cell Differentiation and Inhibiting VEGF-Induced Degeneration of Chondrocytes. *Int J Mol Sci*, 2022,23(2):759.
88. Suttie JM, Breier BH, Gluckman PD, Littlejohn RP, Webster JR. Effects of melatonin implants on insulin-like growth factor 1 in male red deer (*Cervus elaphus*). *Gen Comp Endocrinol* , 1992,87(1):111-9.
89. Szuwart T, Kierdorf H, Kierdorf U, Clemen G. Ultrastructural aspects of cartilage formation, mineralization, and degeneration during primary antler growth in fallow deer (*Dama dama*). *Ann Anat*, 1998,180(6):501-10.
90. Tiong YL, Ng KY, Koh RY, Ponnudurai G, Chye SM. Melatonin Prevents Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in High Glucose-Treated Schwann Cells via Upregulation of Bcl2, NF- κ B, mTOR, Wnt Signalling Pathways. *Antioxidants (Basel)*, 2019,8(7):198.
91. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(9): 726
92. Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater*, 2011,7(2):463-477.
93. Wang D, Berg D, Ba H, Sun H, Wang Z, Li C. Deer antler stem cells are a novel type of cells that sustain full regeneration of a mammalian organ-deer antler. *Cell Death Dis*, 2019,10(6):443.
94. Wang Y, Zhang C, Wang N, Li Z, Heller R, Liu R, Zhao Y, Han J, Pan X, Zheng Z, Dai X, Chen C, Dou M, Peng S, Chen X, Liu J, Li M, Wang K, Liu C, Lin Z *et al*. Genetic basis of ruminant headgear and rapid antler regeneration. *Science*, 2019,364(6446):eaav6335.
95. Wu H, Reizel T, Wang YJ, Lapiro JL, Kren BT, Schug J, Rao S, Morgan A, Herman A, Shekels LL, Rasette MS, Lane AN, Cassel T, Fan TWM, Manivel JC, Gunewardena S, Apte U, Sicinski P, Kaestner KH, Albrecht JH. A negative reciprocal regulatory axis between cyclin D1 and HNF4 α modulates cell cycle progression and metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020,117(29):17177-17186.

96. Wymann MP, Pirola L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1998,1436(1-2):127-150.
97. Xiao N, Qi XY, Tang LN, Tan LL, Chen YQ, Zhao HM. VEGF promotes cardiac stem cells differentiation into vascular endothelial cells via the PI3K/Akt signaling pathway. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2014 ,42(6):400-5.
98. Yang FF, Huo LJ, Yang LG, Riaz H, Xiong LR, Chen JG, Zhang SJ, Xiong JJ. Association between melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene single-nucleotide polymorphisms and the velvet antler yield of Sika deer. *Mol Biol Rep*, 2014,41(4):1901-6.
99. Ying QL, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 2008 ,453(7194):519-23.
- 100.Zeman M, Herichova I. Melatonin and clock genes expression in the cardiovascular system. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2013,5(2):743-53.
- 101.Zhang J, Yang R, Sun S, Sun L, Liu Y, Zhang Y, Yan S, Li Y, Zhao Z. Cloning and characterization of new transcript variants of insulin-like growth factor-I in Sika deer (*Cervus elaphus*). *Growth Horm IGF Res*, 2013,23(4):120-7.
- 102.Zhang L, Zhang J, Ling Y, Chen C, Liang A, Peng Y, Chang H, Su P, Huang D. Sustained release of melatonin from poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres to induce osteogenesis of human mesenchymal stem cells in vitro. *J Pineal Res*, 2013,54(1):24-32.
- 103.Zhang Y, Li H, Pu Y, Gong S, Liu C, Jiang X, Tao J. Melatonin-mediated inhibition of Purkinje neuron P-type Ca^{2+} channels in vitro induces neuronal hyperexcitability through the phosphatidylinositol 3-kinase-dependent protein kinase C delta pathway. *J Pineal Res*, 2015,58(3):321-34.
- 104.Zhang Z, He C, Bao C, Li Z, Jin W, Li C, Chen Y. MiRNA Profiling and Its Potential Roles in Rapid Growth of Velvet Antler in Gansu Red Deer (*Cervus elaphus kansuensis*). *Genes (Basel)*, 2023,14(2):424.
- 105.Zhao R, Tao L, Qiu S, Shen L, Tian Y, Gong Z, Tao ZB, Zhu Y. Melatonin rescues glucocorticoid-induced inhibition of osteoblast differentiation in

MC3T3-E1 cells via the PI3K/AKT and BMP/Smad signalling pathways. *Life Sci*, 2020,257:118044.

106.Zisapel N. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *Br J Pharmacol*, 2018,175(16):3190-3199.