

新疆不同产区塔里木马鹿鹿茸对比研究

陈伟, 范文奎, 吕秀华, 周凡^{*} (新疆华世丹药物研究有限责任公司, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 检测新疆 5 个不同产地塔里木马鹿鹿茸质量性状、多肽(42, 26, 15 kDa)含量及其对小鼠前成骨细胞增殖和活性的影响。方法 对比分析不同产地鹿茸性状(直径、干鲜比、茸长、眉枝、水分、总灰分和浸出物); 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定鹿茸多肽中的蛋白含量并作聚类分析, 采用 SDS-PAGE 电泳法鉴别鹿茸多肽类型; 建立小鼠成骨细胞模型, 采用 MTT 及 ELISA 法分析其对细胞增殖和功能的作用。结果 不同产地塔里木马鹿茸药材中鹿茸质量性状存在差异, 塔里木河沙雅县鹿茸质量性状较好, 鹿茸多肽含量高, 显著提高了小鼠成骨细胞增殖率 40.74%及碱性磷酸酶活性。结论 新疆沙雅地区塔里木马鹿鹿茸活性较好。本实验为建立塔里木马鹿亚种鹿茸质量标准的提升提供了数据支撑。

关键词: 塔里木马鹿; 鹿茸多肽; 成骨细胞; 碱性磷酸酶

中图分类号: R282.7

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2018)01-0085-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.01.019

引用本文: 陈伟, 范文奎, 吕秀华, 等. 新疆不同产区塔里木马鹿鹿茸对比研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(1): 85-88.

Comparative Study on Different Regions Velvet Antlers of *Cervus Elaphus Yarkandensis* in Xinjiang

CHEN Wei, FAN Wenxi, LYU Xiuhua, ZHOU Fan^{*} (Xinjiang Hua Shidan Pharmaceutical Research Co., Ltd., Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the quality, contents and effects of antler peptides (42, 26, 15 kDa) in *Cervus elaphus yarkandensis* from different regions. **METHODS** Characters (diameters, DW/FW, length, brow tine, ash content and extractum) of velvet antlers from different regions were comparative researched. Concentrations of different antler peptides were measured by BCA protein assay kit, and data was analyzed by clustering analysis. The SDS-PAGE method was used to detect types of antler peptides. Moreover, by mouse osteoblasts model, cell proliferations and cell activity were detected by MTT and ELISA method. **RESULTS** Qualities of velvet antler in *Cervus elaphus yarkandensis* were significantly different from different locations. Among these velvet antlers, they had the best characteristics and the highest content of antler peptides which harvesting in Xayar County, what's more, the proliferation (40.74%) and ALP secretion of mouse osteoblast was significant increased in Xayar County antler peptide group. **CONCLUSION** The Xayar County antler had the best characteristics. It provides data supporting for raising the quality standard of *Cervus elaphus yarkandensis* antler peptides.

KEY WORDS: *Cervus elaphus yarkandensis*; antler peptides; osteoblasts; ALP

塔里木马鹿(*Cervus elaphus yarkandensis*)作为新疆马鹿主要亚种之一, 分布于新疆塔里木河沿线, 有沙雅、尉犁和且末 3 个地方种群^[1-2]。塔里木马鹿鹿茸作为一种昂贵的药材, 其含有的鹿茸多肽具有增强免疫力、促进骨生长和抑制炎症因子表达等多种药理活性^[3-5]。已有研究报道表明, 塔里木马鹿鹿茸的不同部位的主成分含量差异极为显著, 导致该药物的质量标准难以建立^[6-7]。而不同产地同一种鹿茸形态分布差异也十分巨大。不同产地的马鹿鹿茸性状、活性成分(鹿茸多肽)含量及活性具有差异, 它们之间可能具有的关联性未见报道。在前期研究基础上^[8], 本实验旨在测定新疆 5 个不同产地塔里木亚种马鹿鹿茸质量、

多肽含量, 并检测其对小鼠成骨细胞增殖和活性的影响, 并探讨形成差异的潜在原因。

1 仪器与材料

1.1 仪器

DLSB-10120 低温冷却循环泵(郑州长城科工贸有限公司); SHZ-DIII 循环水式真空泵(上海东玺制冷仪器设备有限公司); TGL-16M 台式高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); Model 680 酶标仪(BIO-RAD); CO₂ 培养箱(SHELL/JB); DYCZ-25D 电泳仪(北京市六一仪器厂)。

1.2 材料

5 种不同产地的塔里木马鹿茸(头岔茸)分别收购于新疆阿克苏地区沙雅县海楼乡, 库尔勒地区

基金项目: 新疆兵团知识产权推进计划(2016CD003-08); 兵团社会发展科技攻关计划(2016AD012)

作者简介: 陈伟, 男, 硕士生 Tel: 18999864306 E-mail: 285239579@qq.com *通信作者: 周凡, 女, 硕士, 工程师 Tel: (0901)6683568 E-mail: 155196512@qq.com

尉犁县 31 团、33 团、34 团及焉耆县 21 团。采集的塔里木马鹿茸药材经石河子大学李鹏教授鉴定为鹿科动物塔里木马鹿 (*Cervus elaphus yarkandensis*) 未骨化或稍骨化密生茸毛的幼角, 药材存放于新疆华世丹药物研究有限责任公司标本室(由华世丹药物研究有限责任公司提供); BCA 蛋白质定量试剂盒(天根生化科技有限公司, 批号: PA121221); α -MEM 培养基(Hyclone, 批号: NYJ0975); 胎牛血清(FBS, 中国医学科学院生物工程研究所); BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒(武汉博士德生物有限公司, 批号: AR1023); 考马斯亮蓝 R250, TEMED, MTT, DMSO 均购自 Sigma 公司; 小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1(中国科学院上海细胞生物研究所)。

2 方法

2.1 不同产地塔里木马鹿鹿茸性状检测

每个产地鹿场分别取 3 只年龄一致, 采茸期相近的马鹿进行鹿角取样, 按照鹿茸传统加工方式进行煮炸加工、烘烤和风干。并记录其形状、干重、鲜重、直径、茸长和眉枝, 并计算其平均值及其误差。

参照中国药典 2015 年版^[9-10]通则 0832 水分测定法(烘干法), 在 105 °C 下, 根据减失的重量, 计算 2.5 g 鹿茸粉末中含水量。

参照中国药典 2015 年版通则 2302 灰分测定法, 在 500~600 °C 下, 根据残渣的重量, 计算 3.0 g 鹿茸粉末(过 2 号筛)中灰分含量(%)。

参照中国药典 2015 年版通则 2302 测定法, 根据干燥品的重量, 计算 2.0 g 鹿茸粉末(过 2 号筛)中醇溶性浸出物含量(%)。

2.2 BCA 法及 SDS-PAGE 电泳检测不同产地塔里木马鹿鹿茸多肽

2.2.1 BCA 法测定鹿茸多肽含量 按照 BCA 蛋白质定量试剂盒说明书进行操作, 以标准牛血清蛋白溶液, 制作标准曲线, 并以酶标仪 570 nm 波长测定不同产地鹿茸多肽含量。并依据不同产地马鹿鹿茸多肽含量的差别进行聚类分析。

2.2.2 SDS-PAGE 蛋白电泳检测鹿茸多肽类型 按照 BCA 法测定的蛋白浓度, 并用 PBS 稀释为等浓度溶液, 作为鹿茸多肽溶液。按每孔 20 μ g 处理样品, 将鹿茸多肽与 5 $\times$ buffer 混合均匀, 加热煮沸 8 min, 冷却, -20 °C 贮存备用。采用恒压变流的电泳方法, 70 V, 1 h 进行浓缩; 120 V, 3 h 进

行分离电泳, 至溴酚蓝距凝胶底边约 5 mm 时, 停止电泳。取电泳凝胶, 放入考马斯亮蓝染液中 37 °C 过夜, 再以脱色液漂洗 3 次。以灰度分析软件分析。

2.3 MTT 法及 ELISA 法检测马鹿鹿茸多肽对 MC3T3-E1 增殖和活性的影响

2.3.1 MTT 法检测细胞存活率 用含 10%FBS 的 α -MEM 培养基培养 MC3T3-E1 细胞, 取 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 对数期细胞悬液, 按每孔 100 μ L 接入 96 孔细胞培养板, 贴壁培养 24 h 后弃除培养基, 加入含 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鹿茸多肽的培养基 200 μ L, 以空白培养基为对照孔。每组重复 6 孔。给药 48 h, 每孔加入 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 溶液 10 μ L, 于 37 °C、5% CO_2 条件下继续孵育 4 h, 弃去培养液, 加入 DMSO 100 μ L, 振荡 10 min, 以酶标仪测定 490 nm 下的吸光度, 计算细胞存活率。

2.3.2 ELISA 法检测细胞 ALP 活性 按“2.3.1”项下方法进行前期细胞培养, 取 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 对数期细胞悬液, 按每孔 500 μ L 接入 6 孔细胞培养板, 贴壁培养 24 h 后弃除培养基, 加入含 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鹿茸多肽的 α -MEM 培养基 1 mL, 以空白培养基为对照孔。给药 7 d, 每 48 h 换液, 胰酶消化收集细胞, PBS 清洗细胞 3 遍, 1% Triton X-100 提取蛋白, BCA 法定量检测蛋白浓度。依据碱性磷酸酶检测试剂盒说明, 以酶标仪测定 490 nm 下的吸光度。计算细胞内 ALP 活性。

3 结果

3.1 不同产地塔里木马鹿鹿茸性状检测

本实验采集的塔里木头茬茸主干圆柱状, 主干较长, 平均茸长 65.17 cm, 有较多分枝, 眉枝平均数目 30.18 枝, 属大型茸, 下部具筋楞, 锯口断面呈蜂窝状, 小扈口较大。对比不同产地鹿茸性状, 可发现不同产地的马鹿鹿茸形态差异显著, 其中沙雅县鹿茸的干鲜比、眉枝、总灰分的平均值最低, 而水分含量最高, 特色非常鲜明, 见表 1。

3.2 BCA 法测定鹿茸多肽含量及聚类分析结果

经 BCA 法测定, 标准曲线为 $Y=0.001x+0.172$ ($r=0.9979$), 呈良好线性关系, 符合样品检测标准。由样品检测结果, 可知 5 个不同产区鹿茸中沙雅县产马鹿鹿茸多肽含量均值最高。将不同产地的 3 个不同样品鹿茸多肽含量进行聚类分析, 以横坐标最小距离 10 可以将 15 个不同产地的鹿茸聚为 2 类。结果见表 2 和图 1。

表 1 不同产地马鹿鹿茸性状($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Characters of antlers from different regions ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

性状指标	马鹿鹿茸产地				
	沙雅县	尉犁县 31 团	尉犁县 33 团	尉犁县 34 团	焉耆县 21 团
干鲜比	0.27±0.01	0.39±0.01	0.39±0.03	0.37±0.01	0.37±0.09
直径/cm	8.00±1.02	7.30±0.57	7.60±0.57	6.60±1.52	8.30±0.57
茸长/cm	57.66±3.21	76.00±3.61	70.33±5.69	65.33±1.53	55.00±3.60
眉枝/cm	27.00±3.46	34.00±4.58	29.6±0.57	31.33±3.79	29.00±2.65
水分/%	7.52±0.17	7.11±0.02	6.92±0.14	6.78±0.56	6.38±0.19
总灰分/%	41.17±2.37	43.62±0.38	45.71±0.18	44.32±0.51	41.35±1.27
浸出物/%	3.30±0.11	3.01±0.61	3.59±0.87	4.1±0.64	5.21±0.93

表 2 不同产地马鹿鹿茸多肽含量($n=3$)

Tab. 2 Contents of antlers peptides from different regions ($n=3$)

鹿茸产地	鹿茸多肽含量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	RSD/%
沙雅县	4.97	2.84
尉犁县 31 团	3.33	1.82
尉犁县 33 团	3.31	2.21
尉犁县 34 团	3.84	1.89
焉耆县 21 团	4.93	1.91

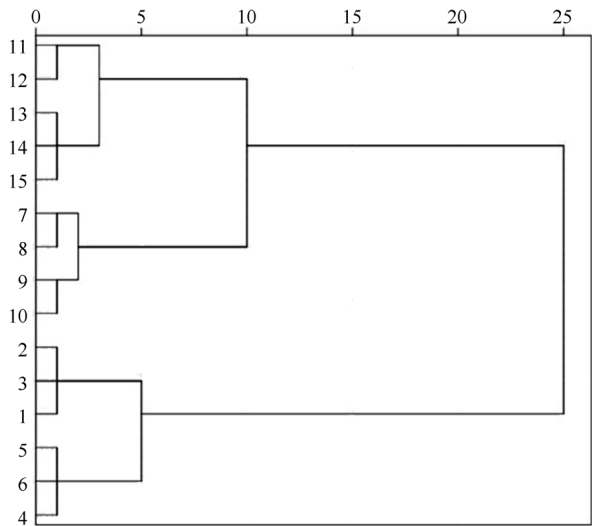


图 1 不同产地塔里木马鹿鹿茸多肽含量聚类分析

1~3-沙雅县样品; 4~6-尉犁县 31 团样品; 7~9-尉犁县 34 团样品; 10~12-尉犁县 35 团样品; 13~15-焉耆县 21 团样品。

Fig. 1 Clustering analysis of antlers peptides contents from different regions

1~3-Xayar county antlers samples; 4~6-regiment 31 of Yuli county samples; 7~9-regiment 34 of Yuli county samples; 10~12-regiment 35 of Yuli county samples; 13~15-regiment 21 of Yanji county samples.

3.3 SDS-PAGE 法检测鹿茸多肽类别

随机抽取每个产地的一种马鹿鹿茸多肽样品进行 SDS-PAGE 电泳, 可发现马鹿鹿茸多肽样品有 3 条谱带较为清晰, 分别为 42, 26, 15 kDa。经条带颜色分析可知沙雅县鹿茸多肽 3 个条带颜色较深, 表明产区样品 3 种肽段含量高于其他产区。结果见图 2。

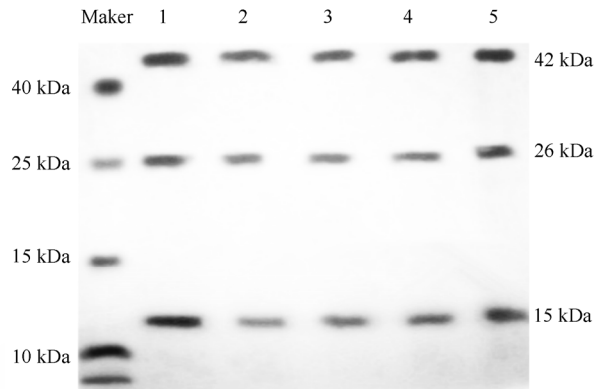


图 2 5 种不同产地塔里木马鹿鹿茸多肽 SDS-PAGE 结果
1-沙雅县鹿茸样品; 2-尉犁县 31 团样品; 3-尉犁县 34 团样品; 4-尉犁县 35 团样品; 5-焉耆县 21 团样品; Maker-标准蛋白。

Fig. 2 SDS-PAGE results of antlers peptides from 5 different regions

1-Xayar county antlers samples; 2-regiment 31; 3-regiment 34; 4-regiment 35; 5-regiment 21 of Yanji county; Maker-standard protein.

3.4 鹿茸多肽对 MC3T3-E1 细胞增殖及 ALP 活性的影响

同浓度不同产地鹿茸多肽对细胞存活率及细胞 ALP 活性的影响差异显著, 沙雅县产鹿茸在促进 MCT3T-E1 细胞增殖及活性提高方面作用显著。结果见表 3。

表 3 不同产地鹿茸多肽对 MC3T3-E1 细胞存活率及 ALP 活性的作用($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Cell proliferations and ALP activity of MC3T3-E1 incubating with antlers peptides from different regions ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

样品来源	细胞存活率/%	ALP 活力 (金氏单位/克蛋白)
空白组	100.00±3.15	353.74±11.11
沙雅县	137.03±3.40 ²⁾	783.12±35.76 ²⁾
尉犁县 31 团	122.63±6.86	310.28±9.50
尉犁县 33 团	114.18±4.24	349.29±3.05
尉犁县 34 团	125.01±2.62 ¹⁾	327.44±13.15
焉耆县 21 团	114.48±3.60	116.58±3.61

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

4 讨论

目前马鹿鹿茸多肽的药理活性及其机制得到了广泛的证实^[11-12],但是仍无鹿茸多肽类药物应用于临床,归根于马鹿鹿茸及其多肽产品质量差异巨大,尚无规范的质量标准。本实验从塔里木鹿茸基础性状分析出发,以检测其多肽含量差异及肽段特征为手段,以鹿茸多肽对成骨细胞作用为目的,搭建分析平台对5种不同产地的塔里木鹿茸进行对比分析,为构建塔里木马鹿鹿茸规范性质量标准提供了方法和数据支撑。实验结果显示,新疆塔里木亚种中沙雅县产区鹿茸多肽含量及活性均优于其他产区。探究鹿茸活性强弱与鹿茸表观遗传性状关联可发现,在塔里木马鹿5个不同产区中,沙雅县马鹿平均眉枝数量为27个,低于其他4个产区鹿茸眉枝数量;其平均茸长为57.66 cm,与5个产地马鹿鹿茸平均茸长65.17 cm相比偏低;另外,沙雅县鹿茸平均直径为8 cm,高于5个产区鹿茸平均直径;鹿茸活性结果同时表明沙雅县鹿茸对成骨细胞增殖率提高37%,细胞ALP活性提高54%。通过关联性分析可发现,鹿茸活性越好,其眉枝数目越低、茸长平均偏短、直径平均偏粗以及水分含量越高,这些关联性指标研究并未见报道。对比报道的塔里木马鹿生态环境变化进一步研究沙雅产区鹿茸活性高、性状好的深层原因,可发现处于塔里木河中上段的沙雅县产区水草资源优于其他产区,同时其环境盐碱化程度相对较低,推测马鹿鹿茸品质依赖于其周围生态环境的优劣^[13-14]。

综上,塔里木马鹿鹿茸的开发具有较高的经济价值和生态保护意义,对比不同产地马鹿鹿茸性状及活性的区别,并探讨它们内在的联系,对优选鹿茸原药材及建立规范的塔里木马鹿鹿茸质量标准都提供了参考。

REFERENCES

- [1] 帕尔哈提·萨依提. 塔里木马鹿遗传资源调查情况[J]. 当代畜禽养殖业, 2015(6): 37-38.
- [2] SU Y, JU G C, SHAO Y C, et al. Haplotype characteristics and their relationship with antler productive traits in *Cervus elaphus yarkandensis* [J]. J Jilin Agric Univ(吉林农业大学学报), 2016, 38(4): 478-481.
- [3] HONG Y, TIAN H, CHEN X M, et al. Comparative study on the bioactive polypeptides purified from the fresh and dry velvet antler of *Cervus elaphus* Linnaeus in Talim Xinjiang [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2011, 32(3): 176-179.
- [4] 吕秀华. 新疆产塔里木马鹿茸多肽分析及抗骨质疏松作用研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2015.
- [5] 杨光旭, 魏雪苗, 范红艳, 等. 鹿茸多肽药理学活性的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2017, 38(2): 126-129.
- [6] LIN L, LIU S C, ZHANG M J, et al. Extraction and comparative analysis of polypeptides contents of different segments in *Cervus elaphus* Linnaeus [J]. J Jilin Agric Univ(吉林农业大学学报), 2007, 29(4): 378-380, 383.
- [7] LIU H M, JU Y, ZHANG R R, et al. Differentially expressed proteins screening in different parts of sika deer velvet antler by comparative proteomics [J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica(畜牧兽医学报), 2017, 48(4): 618-626.
- [8] LV X H, CHEN W, ZHOU F, et al. Effect of antler peptides of *Cervus elaphus Yarkandensis* on MC3T3-E1 cells [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2015(2): 47-50.
- [9] 中国药典. 一部[S]. 2015: 303.
- [10] ZHAO W L. General introduction and application analysis of revision of Chinese crud drug in the Chinese Pharmacopeia (2015 Edition) Volume I [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(5): 605-608.
- [11] 龚庆, 赵文海, 宋秋莹, 等. 鹿茸多肽对去卵巢大鼠骨质疏松预防作用的研究[J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(5): 890-893.
- [12] 胡太超. 鹿茸成分分析比较及新西兰赤鹿茸多肽的生物活性研究[D]. 吉林农业大学, 2015.
- [13] AINIWAER T, MAHEMUTI H. Preliminary analysis on the habitat selection of red deer tarim species (*Cervus elaphus Yarkandensis*) in middle reaches of tarim river [J]. Xinjiang Agric Sci(新疆农业科学), 2008, 45(5): 847-853.
- [14] DILSHAT A, MAHMUT H, ANWAR T, et al. Habitat alternation analysis on Xayar population of tarim red deer in Xinjiang, China [J]. Chin J Zool(动物学杂志), 2010, 45(4): 72-80.

收稿日期: 2017-07-28

(本文责编: 曹粤锋)