

评述与展望

Review and Progress

基于组学技术的鹿茸生物学研究进展

刘文媛 巴恒星 李春义*

中国农业科学院特产研究所, 特种经济动物分子生物学国家重点实验室, 长春, 130000

* 通信作者, lichunyi1959@163.com

摘要 鹿茸是唯一可周期性再生的哺乳动物器官, 由软骨、骨、血管、神经及皮肤组织构成。鹿茸再生过程是基于干细胞的增殖和分化, 且生长速度极快而不发生癌变。其不仅可作为一种肢体再生的生物医学模型, 而且也作为一种研究骨组织生长发育的模型。现代组学技术快速发展, 已普遍应用于生物学的各种领域。利用组学技术, 在转录和蛋白质水平上, 有力地推动了在分子水平上研究鹿茸生物学的进程。本综述拟对组学技术在鹿茸生物学研究中的应用进行总结回顾, 并对未来的发展趋势做进一步展望, 为鹿茸生物学的深入研究提供参考。

关键词 鹿茸, 转录组, microRNA, 蛋白质组

Progress in Antler Biology Study Based on Omics Technology

Liu Wenyuan Ba Hengxing Li Chunyi*

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

* Corresponding author, lichunyi1959@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.038.003024

Abstract Deer antlers is the only mammalian organ that can fully regenerate in annual cycles. It comprised of cartilage, bone, blood vessel, nerve and velvet skin. Full regeneration of deer antlers is a stem cell-based process of rapid proliferation and differentiation without going cancerous. It can not only be used as a biomedical model for the investigation of limb regeneration, but also growth and development of bone. The modern omics technology is developing fast and has been widely applied to various fields in biology. The omics approaches including transcriptomics and proteomics have advanced our understanding of antler biology at the molecular level. This article is intended to review the application of omics technology in the study of antler biology and point out the future direction of antler research, which provides reference for further study of antler biology.

Keywords Antler, Transcriptomics, microRNA, Proteomics

鹿茸是唯一能够完全再生的哺乳动物器官(Goss, 1995)。在雄性激素的调控下, 每年都会进行周期性脱落和再生, 其再生过程不同于低等生物的细胞去分化, 而是基于干细胞的分化过程(Li et al., 2009)。鹿茸的生长发育速度十分迅速, 最高时超过 2 cm/d (Li, 2012), 同时仍然保持有序的组织结构而不发生癌变, 最终出现完全骨化, 导致鹿茸组织死亡, 有效阻止了

鹿茸的无限制生长。上述生物学现象是鹿茸研究领域的热点。

由于鹿茸是一个具有独特生物学特性的复杂哺乳动物骨器官, 利用传统的分子生物学技术很难在系统层次(包括基因, 转录, 蛋白和代谢)上深入剖析鹿茸生长发育机制。近年来发展的组学技术通常采用高通量技术, 在整体和动态水平上积累并挖掘组

基金项目: 本研究由国家自然科学基金(31402035)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610342016003)和吉林省科技厅项目(20170101003JC)共同资助

引用格式: Liu W.Y., Ba H.X., and Li C.Y., 2019, Progress in antler biology study based on omics technology, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 38(7): 3024-3029 (刘文媛, 巴恒星, 李春义, 2019, 基于组学技术的鹿茸生物学研究进展, *基因组学与应用生物学*, 38(7): 3024-3029)

学数据时发现新分子和新机制,使整个生命科学发生了根本性的变革,生命科学研究已经进入了组学时代。目前组学技术包括转录组、microRNA 组、蛋白质组以及代谢组学。本综述将对目前组学在该领域的应用进行回顾总结,为鹿茸生长与骨化机制的进一步研究提供参考。

1 鹿茸生物学

1.1 鹿茸生长发育

鹿茸的生长发育始于覆盖头部额外嵴上的生茸区骨膜(antlerogenic periosteum, AP)。雄鹿进入青春期后,在雄性激素的作用下,AP 组织逐渐开始增殖变厚,逐渐形成角柄。有些鹿种如赤鹿或梅花鹿,在角柄长到 3~4 cm 高时,内部的骨/软骨组织与覆盖的头部皮肤开始变得紧密接触,快速发育最终形成初角茸。而鹿茸每年周期性再生是基于角柄骨膜(pedicle periosteum, PP)组织发育的。具体地,温带鹿种在春季,上一年完全骨化的鹿角从角柄上自动脱落,角柄残桩伤口愈合后,PP 组织细胞开始分化形成生长中心,鹿茸再生;在夏季,鹿茸快速生长,并由茸皮覆盖;在秋季,由于鹿体内的雄激素水平的迅速上升,导致鹿茸快速骨化,茸皮也渐渐干枯、脱落;在冬季,完全骨化死亡的鹿角紧密附着在活组织角柄上。次年春天鹿角脱落,随后开始新一轮的鹿茸再生循环(Suttie et al., 1985; Li et al., 2004)。整个鹿茸生长发育过程也伴随着新的血管和神经的再生。

1.2 鹿茸干细胞与再生

鹿茸的发生和再生均源于鹿茸干细胞(antler stem cell, ASC)的增殖和分化。导致鹿茸初生的干细胞存在于 AP 组织中,而鹿茸再生的干细胞则存在于 PP 组织中。研究表明,干细胞的更新、分化与成熟均与其周围的微环境有关(杨言慧等, 2017)。无一例外的是,鹿皮肤为鹿茸干细胞提供了这个微环境。在鹿茸发生时,雄性激素刺激鹿茸干细胞(AP 细胞)缓慢增殖和分化,而当 AP 开始与头部皮肤相互接触并进一步紧密结合时,紧密结合的皮肤给鹿茸干细胞提供了特殊的微环境,这个微环境触发了鹿茸干细胞快速增殖和定向分化,最终导致鹿茸的发生(Li et al., 2009)。类似地,当骨化的鹿角脱落后,伤口开始愈合,角柄皮肤与 PP 紧密接触,并激活 PP 中的鹿茸干细胞,启动鹿茸的再生,开始形成前后两个新月形的生长中心,即为鹿茸眉枝和主干的中心,同时头皮/角柄皮肤被诱导成茸皮。在形态学和组织学上,角柄骨膜

与皮肤接触的紧密程度有一个比较明显的分界,即远端大约 1/3 部分骨膜与皮肤是紧密接触的,被称为致敏区骨膜(potentiated pedicle periosteum, PPP);而近心端大约 2/3 部分骨膜与皮肤之间存在大量的疏松结缔组织使得两者没有紧密接触,被称为休眠区骨膜(dormant pedicle periosteum, DPP)(Li et al., 2004; 2005)。插膜实验表明 PPP 已经具备了发起鹿茸再生的潜力,而 DPP 却需要与皮肤紧密相贴后才能获得这个潜力(Li et al., 2009)。

2 转录组学在鹿茸研究中的应用

转录组亦即一个组织或细胞的基因组中被转录出来的全部 mRNA 集合,这是转录组的一种定义方式(Costa et al., 2016)。由于鹿属于非模式物种,暂无参考基因组,很大程度上限制了该物种的组学数据的挖掘和利用。因此可以通过转录组学的手段来寻找鹿茸组织或干细胞在不同发育时期起关键作用的基因。目前 RNA-Seq 技术替代了异源芯片杂交技术,其检测范围更广、周期更短,定量更准确。

2.1 利用转录组学研究鹿茸的生长发育

鹿茸的生长点位于鹿茸的顶端,为研究鹿茸快速生长的分子机制,找出关键基因,学者们都以鹿茸的顶端组织为研究对象进行转录组研究。早期, Gyurjan 等(2007)采用异源 cDNA 芯片杂交技术,对鹿茸顶端组织与生长板软骨基因表达情况进行比较,找出 15 个调控间充质细胞向软骨分化的差异表达基因,主要富集在 FGF、TGF β 和 Wnt 信号通路。研究表明,鹿茸尖端软骨组织与生长板软骨有显著差异,这可能与鹿茸含有丰富的血管有关,鹿茸快速生长发育过程中需要大量的氧气和养分,都需要这些血管中的血液供给,这也是鹿茸软骨区别普通软骨的最大特点。Steger 等(2010)用异源 cDNA 芯片技术比较了矿化鹿茸顶端组织和骨骼(成年公鹿的肋骨和脊椎,胎鹿的长骨骨髓生长板)基因表达,发现有 8 个与骨骼发育相关的基因和 10 个与代谢相关的基因表达上调,而后将马鹿、牛和人的 cDNA 和启动子序列进行同源比较,表明转录因子 Runx2 和 Osx 的表达是下调其他骨化基因的主要元件。由于 cDNA 芯片杂交技术有局限性,一些低丰度的重要基因可能没有被发现,应进一步进行基因筛选研究,分析它们在鹿茸生长发育过程中的作用。

鹿茸在脱盘后开始生长,生长速度逐渐加快,一般梅花鹿和马鹿在 60 d 后达到快速生长期,90 d 后

开始出现快速骨化(李春义等, 1988)。为了解整个发育过程的基因动态变化, 学者们对不同发育时间的鹿茸进行转录组分析。对 60 d 和 90 d 的鹿茸顶端组织进行 RNA-seq 测序并比较(Yao et al., 2012a; 2012b; Zhao et al., 2013), 结果显示: 在 60 d 时表达水平显著上调的是与软骨增殖和分化高度相关的基因, 以及编码细胞外基质蛋白的基因; 在 90 d 时表达水平显著上调的是与软骨内骨化有关的基因, 主要以编码胶原类基质成分的基因为主, 表明鹿茸在骨化期间需要大量的胶原类基质来沉积新骨质。进一步比较这两个发育时期, 在 60 d 时有 24 个核糖体蛋白表达显著上调, 12 种与软骨增殖肥大有关转录物上调, 7 种与骨化相关的转录物下调, 多种胶原蛋白持续高表达。初步确定了与鹿茸的快速生长和骨化有关的调控基因。对 10 d 和 60 d 的鹿茸转录表达谱进行比较(刘海龙, 2013), 同样筛选到多种编码胶原蛋白以及核糖体蛋白基因高表达。通过对这 3 个重要时间点的转录组研究, 筛选出了许多重要基因, 为鹿茸生长发育的进一步研究奠定了基础。张然然等(2017)用转录组学对 5 个生长期节点(第 10 天, 第 20 天, 第 28 天, 第 44 天, 第 66 天)的鹿茸顶端组织进行了系统研究, 差异基因功能主要涉及转录调节、信号转导、蛋白酶解、氧化还原等生物学过程。其中转录调节基因 *PER1*、*FGFR1* 的表达随鹿茸的生长而增加, 而 *GAS1* 则相反, 推测其在鹿茸生长中起着重要作用。综上所述, 在鹿茸发生的整个过程, 与蛋白合成相关基因的高表达为鹿茸提供了丰富的细胞外基质成分, 促进鹿茸的快速生长与骨化。但这些试验不足之处在于未将鹿茸生长中心划分方法取材(Li et al., 2002), 未和组织层发生关系, 难以和其他相关研究比较。因此, 后续可以开展鹿茸生长中心特定组织发育动态转录组学研究, 以进一步揭示鹿茸的生长和骨化机制。

2.3 MicroRNA 组学在鹿茸生物学的应用

microRNA 是一类仅有 18~25 个核苷酸, 在物种间广泛存在的、高度保守的非编码单链小分子 RNA, 通过完全或不完全地结合靶基因 mRNA 的非编码区、编码区来沉默或降解基因, 生物体中大约 1/3 的基因都被 microRNA 调控(Selbach et al., 2008; 金吉春和金星林, 2013)。目前学者们发现 microRNA 也广泛参与鹿茸快速生长和再生过程。检测 microRNA 的方法主要包括芯片杂交和高通量测序, 其中 microRNA 芯片只能鉴定已知的 microRNA, 快速地比较它们在不同组织之间的表达量, 而高通量测序技术

RNA-seq 对非模式生物的研究更有利, 还能鉴定出未知的 microRNA。

崔东明等(2016)利用 microRNA 芯片对鹿茸尖部间充质细胞层和软骨组织层的 microRNA 进行检测。结果显示, 间充质和软骨部位分别有 239 条和 304 条 microRNA, 有 158 个 microRNA 共同显著表达。经验证, 在软骨组织层表达上调的有 miR-1、miR-18a、miR-18b、miR-19a、miR-19b、miR-20b 和 miR-let-7f, 而 miR-99b、miR-133 及 miR-184 表达下调。推测这些差异表达的 microRNA 在鹿茸尖端前软骨细胞分化及血管形成中起重要的调节作用。其中表达上调的 miR-1、miR-18a 和 miR-18b 作用在 IGF-1 的 3'UTR 序列上, 且 IGF-1R 的 3'UTR 序列上存在与 miR-let-7f 和 miR-let-7f 特异性结合靶点, 它们通过调控 IGF-1 基因表达来影响鹿茸软骨细胞的增殖(Hu et al., 2013; 2014a; 2014b; 2015)。miR-19a 和 miR-19b 在鹿茸细胞内过表达会下调 TGF- β R 的表达(闫语多等, 2016), 这也进一步说明 IGF-1 和 TGF- β R 是鹿茸生长发育过程中的重要调节因子。Ba 等(2016)利用高通量测序的方法对鹿茸角柄两种不同状态的骨膜细胞, 即致敏与休眠状态(DPP 和 DPP)的骨膜细胞进行了高通量测序。找到 14 个差异表达的 microRNA, 8 个下调, 6 个上调。此外, 有 20 个保守且物种特异的新 microRNA 以及与胚胎干细胞高度相关的 miR-296、miR-145 等, 进一步证明了角柄骨膜细胞是鹿茸干细胞。在 DPP 向 PPP 分化过程中, 有很多 microRNA 参与了 Wnt、MAPK 和 TGF- β 信号通路。这些 miRNA 在参与 DPP 向 PPP 干细胞转化过程, 在鹿茸再生的最初阶段可能发挥着重要作用。以上研究表明, 鹿茸 microRNA 组的研究取得了初步的结果, microRNA 通过精细地调控鹿茸重要调节因子的基因表达, 参与鹿茸的生长发育。

3 蛋白质组学在鹿茸研究中的应用

蛋白质是生命活动的体现者和功能的执行者。转录水平不能完全替代蛋白质表达水平, 蛋白质组学能从整体上揭示蛋白质的表达特征, 是了解鹿茸再生和生长发育等生物学问题的重要手段。学者们前期利用凝胶电泳与质谱分析结合的技术研究了鹿茸蛋白质组学并已取得初步结果, 现有学者开始将基于质谱的蛋白质组学定量技术应用在鹿茸生物学。

3.1 利用蛋白质组学研究鹿茸的生长发育

鹿茸的生长发育是由各种活性蛋白因子和信号

通路精确调控的。Park 等(2004)用双向电泳的方法比较了赤鹿鹿茸蛋白质组。从鹿茸尖端分离到了 800 多个蛋白点,最终只鉴定到了 130 个左右的蛋白。其中有 10 种蛋白可能与鹿茸尖端生长发育有关,如: MEKK1、SRP72、DRG1 等,这些蛋白可能在鹿茸生长和细胞分化中起重要作用。试验进一步比较了鹿茸与血浆蛋白质组,一致性高达 43%,进一步证实:鹿茸的快速生长发育可能需要大量来源于血液的因子刺激和支撑。

不同生长期的蛋白质组学数据能反映鹿茸的不同发育阶段蛋白水平的变化,张然然等(2016)用双向电泳结合质谱的技术对梅花鹿鹿茸 4 个生长期节点(第 10 天,第 40 天,第 60 天,第 130 天)的差异蛋白质进行研究。筛选到 46 种差异表达的蛋白质,主要参与细胞骨架、转运过程、信号转导、细胞凋亡等 12 个生物学过程。鉴定到与骨发育相关的蛋白质在这 4 个生长期都显著表达,即 I 型胶原蛋白前体、II 型胶原蛋白、P4HB 和 SPARC,这与转录组的结果一致,说明鹿茸的快速生长需要大量的细胞外基质蛋白合成;抗氧化蛋白 PRDX2 和 PRDX4 的表达与鹿茸生长速度成正比,推测其在鹿茸快速生长过程中抵抗氧化损伤的重要作用;Gal-1 蛋白在鹿茸生长过程中也发生了显著的差异表达,其在 AP、PP 细胞中高表达,参与骨膜干细胞的分化过程(Li et al., 2012)。用同样的方法对天山马鹿三杈茸(65 d)和四杈茸(75 d)的鹿茸蛋白进行筛选(王磊等, 2017),鉴定到 5 种新蛋白: SRI、SPDS、CATHL1、FILIP1、GALK。此外, FTR、RBP4 和 CRABP1 在鹿茸三杈过渡到四杈中对鹿茸组织的细胞增殖和分化有调控作用。以上研究揭示了鹿茸不同生长时期的一些蛋白质表达特征,为鹿茸生长发育的进一步研究提供参

3.2 利用蛋白质组学研究鹿茸再生

鹿茸如何再生是鹿茸生物学的一个前沿问题,为探讨鹿茸的再生机制,学者们对鹿茸干细胞进行了蛋白质组学分析。Li 等(2012)用双向电泳的方法对鹿 AP、PP 和面部骨膜的蛋白质组进行分析,从 AP 细胞、PP 细胞中分别鉴定出 66 个、98 个蛋白,并发现很多高表达蛋白富集在 PI3K/Akt、ERK/MAPK、p38MAPK 等重要细胞信号通路中,且这两种细胞都能表达胚胎干细胞标记物 POI5F1、SOX2、NANOG 和 MYC,表明鹿茸干细胞可能是介于胚胎干细胞和成体干细胞之间。而后,徐代勋(2011)对鹿茸 PP 组织的不同部位的差异蛋白进行筛选,在已鉴定的 47 个蛋白中,有 6 种蛋白可能参与鹿茸再生,分别为 Hsp90 α 、

PKM2、fibulin5、MAPK1、PEDF 和 peroxiredoxin-4。董振(2016)用双向电泳的方法在 PPP 和 DPP 干细胞中最终鉴定到 84 个差异蛋白,其中有 9 种蛋白与鹿茸再生关系密切,可能参与干细胞从休眠到致敏的转化过程。Dong 等(2016)用同位素标记相对定量方法(iTRAQ)在这 2 种细胞中鉴定到了 169 个差异表达蛋白,有 70 个蛋白上调,99 个蛋白下调,还发现 HIF-1 和 PI3K-AKT 信号通路在调节鹿茸再生中起重要作用。可见 iTRAQ 技术的敏感度和准确度比双向电泳更高,能鉴定到更多的功能蛋白。比较这 2 种细胞的膜蛋白组(王权威, 2016),研究表明,与 DPP 相比,PPP 细胞膜中有 17 个膜蛋白上调表达,还推测 Vinculin、ANXA5、ANXA2 和 HSPB1 等膜蛋白与鹿茸再生过程密切相关。

以上研究表明,多种蛋白可能通过复杂的信号通路精确地调控着鹿茸干细胞的转变,未来若能进一步确定与鹿茸再生的关键因子,有可能揭示鹿茸周期性的再生机制。

4 展望

综上所述,组学技术很大程度上加速了鹿茸生物学的研究,但这些研究都局限于转录和蛋白水平上,而且很多研究没有和鹿茸的生理、解剖结构有机地联系在一起,很难有针对性地解决鹿茸再生机制问题。除了基因和蛋白参与生命活动的调控外,鹿茸生长发育中产生的代谢物也可能是重要的参与者。随着代谢组学的兴起,学者们可以更深层次地挖掘鹿茸生物学中的内源性代谢物,从多角度、多层次、系统地研究内在规律。另一方面,鹿茸不仅是一个能够周期性再生器官,更应该把它看作一个复杂的发育系统,单一组学在一个复杂系统的特定层次上很难全面阐明系统内的相关分子机制,未来若能在全面了解鹿茸生长中心组织特性的前提下,综合分析多组学研究数据,根据组学数据之间的互补性、相似性和相互验证的特点,将会全面而系统地阐明鹿茸再生和快速生长发育机制。

在现代医学上,鹿茸不仅是一种骨组织再生模型,还是一种被人们认可的滋补中药。但鹿茸里真正起作用的药理活性物质是未知的,而这些活性物质往往是参与鹿茸生长代谢的关键因子。本研究通过建立不同区段鹿茸转录因子、蛋白质和代谢的多组学谱系,对这些大数据进行整合,全面、系统地揭示鹿茸的分子组成,分离出有效的活性成分,对所得成分进行功能检验,最终筛选出真正起到多重药理活

性的鹿茸物质, 以期为鹿茸不同区段的药效以及开发高科技的鹿茸制品提供数据和技术支撑。

作者贡献

刘文媛完成数据分析及论文初稿的写作; 巴恒星参与论文的修改; 李春义是项目的构思者及负责人, 指导论文写作。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金(31402035)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(16103-42016003)和吉林省科技厅项目(20170101003JC)共同资助。

参考文献

- Ba H.X., Wang D.T., and Li C.Y., 2016, MicroRNA profiling of antler stem cells in potentiated and dormant states and their potential roles in antler regeneration, *Mol. Genet. Genomics*, 291(2): 943-955
- Costa V., Angelini C., De Feis I., and Ciccociola A., 2010, Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq, *J. Biomed. Biotechnol.*, (5757): 853916
- Cui D.M., Meng X.Y., Li T., Tian Y.H., Li M., Li L., and Hu W., 2016, Preparation of microRNA chip from deer antler tissue and screening of differential expression microRNAs, *Jingji Dongwu Xuebao (Journal of Economic Animals)*, 20(2): 83-88 (崔东明, 孟星宇, 李婷, 田玉华, 李洪, 李琳, 胡薇, 2016, 鹿茸顶端组织 miRNA 芯片制备及差异表达 miRNA 的筛选, *经济动物学报*, 20(2): 83-88)
- Dong Z., 2016, Analysis of differentially expressed proteins of the potentiated and dormant pedicle pericyclic cells in sika deer (*Cervus nippon*) through 2D-DIGE, Thesis for M.S., Chinese Academy of Agricultural Sciences, Supervisor: Li C.Y., pp. 29-34 (董振, 2016, 梅花鹿幼角与休眠鹿茸干细胞差异表达蛋白的 2D-DIGE 分析, 硕士学位论文, 中国农业科学院, 导师: 李春义, pp. 29-34)
- Dong Z., Ba H.X., Zhang W., Coates D., and Li C.Y., 2016, iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of the potentiated and dormant antler stem cells, *Int. J. Mol. Sci.*, 17(11): 1778
- Goss R.J., 1995, Future directions in antler research, *The Anatomical Record*, 241(3): 291-302
- Gyulai L.J., Molnar A., Borsy A., Steger V., Hackler L.J., Zomborszky Z., Papp P., Duda E., Deak F., Lakatos P., Puskas L. G., and Orosz L., 2007, Gene expression dynamics in deer antler: mesenchymal differentiation toward chondrogenesis, *Mol. Genet. Genomics*, 277(3): 221-235
- Hu W., Li M., Hu R., Li T., and Meng X.Y., 2015, microRNA-18b modulates insulin-like growth factor-1 expression in deer antler cell proliferation by directly targeting its 3' untranslated region, *DNA Cell Biol.*, 34(4): 282
- Hu W., Li T., Hu R., Wu L., Li M., and Meng X.Y., 2014a, MicroRNA let-7a and let-7f as novel regulatory factors of the sika deer (*Cervus nippon*) IGF-1R gene, *Growth Factors*, 32(1): 27-33
- Hu W., Li T., Wu L., Li M., and Meng X.Y., 2014b, Identification of microRNA-18a as a novel regulator of the insulin-like growth factor-1 in the proliferation and regeneration of deer antler, *Biotechnol. Lett.*, 36(4): 703-710
- Hu W., Meng X.Y., Lu T.C., Wu L., Li T., Li M., and Tian Y.H., 2013, MicroRNA inhibits the proliferation of Chinese sika deer-derived cartilage cells by binding to the 3'-untranslated region of IGF-1, *Mol. Med. Rep.*, 8(2): 523-528
- Jin J.C., and Jin X.L., 2013, The overview and research of microRNA, *Yixue Yanjiusheng Xuebao (Journal of Medical Postgraduates)*, 26(10): 1109-1112 (金吉春, 金星林, 2013, microRNA 的概述及其研究, *医学研究生学报*, 26(10): 1109-1112)
- Li C.Y., 2012, Deer antler regeneration: a stem cell-based epimorphic process, *Birth Defects Research Part C Embryo Today Reviews*, 96(1): 51-62
- Li C.Y., Clark D.E., Lord E.A., Stanton J.A., and Suttie J.M., 2002, Sampling technique to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery, *The Anatomical Record*, 268(2): 125-130
- Li C.Y., Harper A., Puddick J., Wang W.Y., and McMahon C., 2012, Proteomes and signalling pathways of antler stem cells, *PLoS One*, 7(1): e30026
- Li C.Y., Suttie J.M., and Clark D.E., 2005, Histological examination of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*), *Anatomical Record*, 282(2): 163
- Li C.Y., Suttie J.M., and Clark D.E., 2004, Morphological observation of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*), *J. Morphol.*, 262(3): 731-740
- Li C.Y., Yang F.H., and Sheppard A., 2009, Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration-insights from studying annual renewal of deer antlers, *Curr. Stem. Cell Res. Ther.*, 4(3): 237-251
- Li C.Y., Zhao S.Z., and Wang W.Y., eds., 1988, Antler, China Agriculture Science and Technology Press, Beijing, China, pp.5-10 (李春义, 赵世臻, 王文英, 编著, 1988, 鹿茸, 中国农业科技出版社, 中国, 北京, pp.5-10)
- Liu H.L., 2013, Sequencing and *de novo* analysis of the Chinese Sika deer antler transcriptome and screening differentially expressed genes during the rapid growth process, Thesis for

- M.S., Changchun University of Chinese Medicine, Supervisor: Zhao Y., pp.50-59 (刘海龙, 2013, 梅花鹿鹿茸快速生长过程中转录组测序分析及差异表达基因筛选, 硕士学位论文, 长春中医药大学, 导师: 赵雨, pp.50-59)
- Park H.J., Lee D.H., Park S.G., Lee S.C., Cho S., Kim H.K., Kim J.J., Bae H., and Park B.C., 2004, Proteome analysis of red deer antlers, *Proteomics*, 4(11): 3642-3653
- Selbach M., Schwanhauser B., Thierfelder N., Fang Z., Khanin R., and Rajewsky N., 2008, Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs, *Nature*, 455(7209): 58-63
- Steger V., Molnar A., Borsy A., Gyurjan I., Szabolcsi Z., Dancs G., Molnar J., Papp P., Nagy J., Puskas L., Barta E., Zomborszky Z., Horn P., Podani J., Semsey S., Lakatos P., and Orosz L., 2010, Antler development and coupled osteoporosis in the skeleton of red deer *Cervus elaphus*: expression dynamics for regulatory and effector genes, *Mol. Genet. Genomics*, 284(4): 273-287
- Suttie J.M., Gluckman P.D., Butler J.H., Fennessy P.F., Corson I. D., and Laas F.J., 1985, Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) antler-stimulating hormone? *Endocrinology*, 116(2): 846-848
- Wang L., Zhang R.R., Liu H.M., Zhou Y.N., Dong S.W., and Xing X.M., 2017, Comparative proteomics analysis on different parts of *Cervus alaphus songaricus* velvet antler, *Xumu Shouyi Xuebao (Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica)*, 48(8): 1401-1415 (王磊, 张然然, 刘华森, 刘汇涛, 周永宁, 董世武, 邢秀梅, 2017, 马鹿鹿茸不同部位差异蛋白质组学分析, 畜牧兽医学报, 48(8): 1401-1415)
- Wang Q.W., 2016, Membrane proteome of antler regeneration stem cells, Thesis for M.S., Chinese Academy of Agricultural Sciences, Supervisor: Wang G.W., pp.25-29 (王权威, 2016, 鹿茸再生干细胞膜蛋白质组研究, 硕士学位论文, 中国农业科学院, 导师: 王贵武, pp.25-29)
- Xu D.X., 2011, Screening of differential proteins indifferent parts of pedicle periosteum of Sika deer, Thesis for M.S., Jiangsu University of Science and Technology, Supervisor: Li C.Y., pp.28-32 (徐代勋, 2011, 梅花鹿鹿茸角柄骨膜不同部位差异蛋白的筛选, 硕士学位论文, 江苏科技大学, 导师: 李春义, pp.28-32)
- Yan Y.D., Han X.Y., Wu L., and Hu W., 2016, Advances in microRNA in atler velvet tissues, *Zhongguo Xumu Zazhi (Chinese Journal of Animal Science)*, 52(21): 90-94 (闫语多, 韩香玉, 吴雷, 胡薇, 2016, 鹿茸组织 microRNA 的研究进展, 中国畜牧杂志, 52(21): 90-94)
- Yang Y.H., Jiao J.X., Li J.D., and Li C.Y., 2017, Deer antler: derivative of interactions between antler stem cells and niche, *Zhongguo Xiandai Zhongyao (Modern Chinese Medicine)*, 19(1): 31-36 (杨言慧, 贾晶晶, 李军德, 李春义, 2017, 鹿茸: 干细胞与其微环境相互的产物, 中国现代中药, 19(1): 31-36)
- Yao B.J., Zhao Y., Wang S.M., Zhang M., Liu M., Liu H., and Li J., 2012a, *De novo* characterization of the antler tip of Chinese sika deer transcriptome and analysis of gene expression related to rapid growth, *Mol. Cell. Biochem.*, 364(1-2): 93-100
- Yao B.J., Zhao Y., Zhang H., Zhang M., Liu M., Liu H., and Li J., 2012b, Sequencing and *de novo* analysis of the Chinese sika deer antler-tip transcriptome during the ossification stage using Illumina RNA-Seq technology, *Biotechnol. Lett.*, 34(5): 813-822
- Zhao Y., Yao B.J., Zhang M., Wang S.M., Zhang H., and Xiao S.L., 2013, Comparative analysis of differentially expressed genes in sika deer antler at different stages, *Mol. Biol. Rep.*, 40(2): 1665-1676
- Zhang R.R., Liu H.M., Shao Y.C., Zhou P.Y., Su Y., Wang L., and Xing X.M., 2016, Comparative proteomic analysis in different growth stages of sika deer velvet antler, *Xumu Shouyi Xuebao (Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica)*, 47(3): 493-501 (张然然, 刘华森, 邵元臣, 周盼伊, 苏莹, 王磊, 邢秀梅, 2016, 不同生长时期梅花鹿鹿茸差异蛋白质组学分析, 畜牧兽医学报, 47(3): 493-501)
- Zhang R.R., Liu H.M., Wang L., Xing X.M., Su W.L., and Gao B., 2017, Transcriptome analysis of sika deer antlers at different stages, *Xumu Shouyi Xuebao (Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica)*, 48(2): 235-242 (张然然, 刘华森, 王磊, 邢秀梅, 苏伟林, 高兵, 2017, 不同生长时期梅花鹿鹿茸转录组分析, 畜牧兽医学报, 48(2): 235-242)