

基于组织结构特征和蛋白质与钙含量比值的鹿茸分区研究

赵海平^{1,3}, 姚梦杰¹, 徐源¹, 刘佳¹, 岳志刚¹, 齐晓妍¹, 李春义^{2*}

1. 中国农业科学院特产研究所 吉林省鹿茸工程研究中心, 吉林 长春 130112

2. 鹿茸科学与产品技术研究所所长 长春科技学院, 吉林 长春 130600

3. 青岛农业大学动物科技学院, 山东 青岛 266109

摘要: 目的 建立客观鹿茸分区方法。方法 采集 3 种规格的鹿茸, 分别为马鹿三杈茸、梅花鹿三杈茸和二杠茸。通过纵向剖面、横断面和组织学切片对鹿茸内部组织结构、形态特征和组织类型进行分析, 确定鹿茸的感官分区指标。通过测定鹿茸不同区段成分上的差异, 设立数据化的分区指标。结果 建立血管形态和骨密质环 2 个感官分区指标, 蜡片: 无肉眼可见血管; 粉片: 血管细密, 粗细均匀; 蜂片: 开始出现密质骨时, 周围血管细密, 中间粗, 呈蜂窝状; 骨片: 密质骨连成骨密质环。利用蛋白质含量和钙含量的比值设定了不同区段鹿茸分区值 (PV 值): 蜡片 ≥ 65.00 , 粉片 $6.30 \sim 64.99$, 蜂片 $4.70 \sim 6.29$, 骨片 ≤ 4.69 。结论 通过感官指标和 PV 值建立了鹿茸的客观分区方法, 能够精确客观地对鹿茸进行分区, 不仅适用于不同种鹿茸, 如马鹿茸和梅花鹿茸; 而且也适用于不同规格的鹿茸, 如二杠茸和三杈茸; 还能够适用于不同加工方式处理的鹿茸, 如传统煮炸法和冷冻真空干燥法。该方法为增强鹿茸治疗的针对性和促进鹿茸深加工奠定了基础。

关键词: 鹿茸; 内部组织特点; 马鹿三杈茸; 梅花鹿三杈茸; 二杠茸; 分区值

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)05-1518-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.028

Establishment of classification method for dividing velvet antler portions based on tissue structures and ratio of protein to calcium content

ZHAO Hai-ping^{1,3}, YAO Meng-jie¹, XU Yuan¹, LIU Jia¹, YUE Zhi-gang¹, QI Xiao-yan¹, LI Chun-yi²

1. Deer Antler Engineering Research Center, Institute of Special Animal and Plant Sciences of CAAS, Changchun 130112, China

2. Institute of Antler Science and Product Technology, Changchun Sci-Tech University, Changchun 130600, China

3. College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

Abstract: **Objective** To establish an objective classification method for dividing velvet antler (VA) portions. **Methods** Three types of VA, including three-branched VA of wapiti, three-branched and two-branched VA of sika deer, were collected. To identify visual indicators of different portions, the VA internal tissue structure, morphological characteristics and tissue types of the longitudinal cut, crosscut and histological sections were analyzed. Differences in components of different VA portions were analyzed and partition index was set up. **Results** Morphological landmarks of blood vessels and ring of compact bone were found to be useful as two visual indicators for distinguishing the four VA portions. Wax-like (WL) slice: no visible blood vessel; Blood-color (BC) slice: fine-grained and uniform blood vessels; Honeycomb-like (HL) slice: uniform blood vessels and thicker in center, compact bone appeared at edge without connecting to a complete ring; Bone (B) slice: coarsened blood vessels and thicker in center, compact bone connecting to a complete ring. Portion value (PV), determined by using ratio of protein to calcium content, was applied to distinguish four VA portions: WL ≥ 65.00 ; BC: $6.30 \sim 64.99$; HL: $4.70 \sim 6.29$; B ≤ 4.69 . **Conclusion** The objective portion dividing method for VA was established based on the morphological landmarks and the PV in this study. It can accurately and objectively distinguish four VA portions. They were not only suitable for different deer species, such as wapiti and sika deer VA; for different types of VA, such as two-branch and three-branch; but also for VA processed by different methods, such as traditionally cooking and modern freeze-drying. The established methods for dividing VA portions can be utilized for targeted use of VA to more specific symptoms in clinics, and for promoting development of deep-processing for deer industry.

Key words: velvet antlers; internal tissue structure; three-branched velvet antler of wapiti; three-branched velvet antler of sika deer; two-branched velvet antler; portion value

收稿日期: 2021-09-06

基金项目: 吉林省科技计划项目 (20190304006YY)

作者简介: 赵海平, 男, 副研究员, 博士, 主要从事鹿茸生物学和药效方面研究。E-mail: zhperic@163.com

*通信作者: 李春义, 研究员, 主要从事鹿茸生物学和干细胞方面研究。E-mail: lichunyi1959@163.com

鹿茸 *Cervi Cornu Pantotrichum* 是鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *C. elaphus* Linnaeus 的雄性未骨化密生茸毛的幼角，为雄鹿的第二性征。鹿茸作为我国的传统中药，最早记载于《神农本草经》。根据《中国药典》2020 年版，鹿茸具有壮肾阳、益精血、强筋骨、调冲任、托疮毒的功效^[1]。由于鹿茸的组织成分从上到下并非匀质，所以不同部位的药效各有不同。同一鹿种不同区段的鹿茸价格迥异，自尖部到基部逐渐降低，尖部价格为基部价格的上百倍^[2]。这种巨大的价格差距说明，在我国近 2000 年对鹿茸的应用历史过程中，人们已经发现同一鹿种不同区段鹿茸之间的功效有着很大的差异。

鹿茸作为自然界唯一能够完全再生的^[3]、组织生长速度最快（达 2.75 cm/d）^[4]和骨化速度最快（平均高达 250 g/d）^[5-7]最快的哺乳动物器官，在近代成为组织器官发育^[8]、再生^[3]、软骨和皮肤缺损修复^[9]等方面的独特研究模型。研究发现鹿茸的生长中心位于尖部，该部除皮肤外由既连续又可独立区分的 4 个组织层构成：间充质层、前软骨层、过度层和软骨层；不同组织层的细胞种类、组织类型均不相同^[10]。现代生物学研究也证明同一鹿种不同区段鹿茸的功效也有显著差别^[11]。

虽然在传统应用和现代生物学均已发现鹿茸不同部位的差异，但由于没有科学的、精确的、客观的标准，鹿茸的分区只能凭主观判断进行操作。所以目前鹿茸的分区比较混乱，方法不一，而且不同文献中对鹿茸同一个区段的称谓也不一致。从业者常采用多区段的分法，如蜡片、半蜡片、白粉片、黄粉片、红粉片、蜂片、骨片等。与之不同的是，学术上常采用 4 区段分法，如蜡片、粉片、蜂片、骨片^[2]。除此，还有多种不同的称谓，如张嵩等^[12]将鹿茸的 4 个区段称为蜡片、粉片、纱片、骨片；王艳梅等^[13]将鹿茸的 4 个区段称为蜡片、粉片、血片和骨片；而汪树理等^[14]、郭月秋等^[15]将其称为蜡片、粉片、纱片和骨片；还有人将其称为嘴片、粉片、纱片骨片^[16]。坊间还有血片（蜡片）、粉片和老角片之说。国内也有人在分析鹿茸成分时采用西方的 3 区段分法：上部、中部、下部^[17]。按照现行《中华人民共和国农业行业标准》（NY/T1162-2006 鹿茸片）（2006 年颁布，以下统一简称为“行业标准”），鹿茸自尖部到基部分为蜡片、粉片、纱片、骨片 4 个区段。“行业标准”中对鹿茸的分区主要是

根据传统经验通过感观对色泽、组织形态、气味等方面进行人工主观识别，缺乏明确的客观指标，本研究中称之为“传统鹿茸分区方法”。由于传统鹿茸分区方法不能科学地、精确地、客观地区分鹿茸的不同区段，限制了临床上不同区段鹿茸对不同疾病的针对性治疗，致使鹿茸的功效没有得到合理的利用；也阻碍了鹿茸质量标准的制定和深加工产品的研发。本课题组认为，建立科学的、精确的客观鹿茸分区方法，是使鹿茸这味传统中药走向现代化发展道路的先决条件。

本研究结合行业标准与传统称谓，将鹿茸这 4 个区段分别称为蜡片、粉片（血片）、蜂片（纱片）、骨片；并依据鹿茸的外部形态，内部组织结构特点和成分组成建立了客观鹿茸分区方法，为使鹿茸的药效得到科学合理地应用，促进鹿茸这一传统中药走向现代化的发展道路奠定了基础。

1 仪器与材料

RM2255 型石蜡切片机，德国莱卡公司；e2695 型液相色谱，美国 Waters 公司；凯氏定氮仪，美国 Tecator 公司；MARS5 型密闭微波消解仪，美国 CEM 公司；7700X 型电感耦合等离子体质谱（ICP-MS），美国安捷伦公司；FDU-1100 型冷冻干燥机，东京理化 EYELA 公司；DQ-100 型手动参茸切片机，大德药机有限公司；FW135 型中药粉碎机，天津泰斯特仪器公司。

2 方法

2.1 鹿茸样品处理

采集能够反映不同种类（包含马鹿和梅花鹿）和不同发育时期（三杈茸和二杠茸）鹿茸，其中鲜茸（锯茸后立即带回实验室，进行后续处理）和干茸（按照传统煮炸加工方法干制，非排血茸）各 3 支（表 1），包括马鹿三杈茸（图 1-A、D）和梅花鹿三杈茸（图 1-B、E）、二杠茸（图 1-C、F）各 6 支。用于观察内部组织结构和测定成分。另采集 1 支梅花鹿三杈鲜茸，用于组织学分析。所有鹿茸均采集自中国农业科学院特产研究所试验站，均具有种属特异性的典型特征。

表 1 3 种规格鹿茸的质量

Table 1 Weight of three types of velvet antlers

种类	分枝数量	干茸		鲜茸	
		数量	质量/g	数量	质量/g
马鹿	4	3	1220、1225、1529	3	2710、2735、2338
梅花鹿	3	3	546、547、603	3	1705、1328、1123
	2	3	253、258、255	3	615、630、638



A-马鹿三杈干茸 B-梅花鹿三杈干茸 C-梅花鹿二杈干茸 D-马鹿三杈鲜茸 E-梅花鹿三杈鲜茸 F-梅花鹿二杈鲜茸
A-dried three-branched velvet antler of wapiti B-dried three-branched velvet antler of sika deer C-dried two-branched velvet antler of sika deer D-fresh three-branched velvet antler of wapiti E-fresh three-branched velvet antler of sika deer F-fresh two-branched velvet antler of sika deer

图 1 3 种规格鹿茸的外形

Fig. 1 Morphology of three types of velvet antlers

2.2 鹿茸内部组织结构观察和分区

将 1 支梅花鹿三杈鲜茸锯成约 20 cm 的小段(图 2), 沿正中纵向剖开。一侧用于肉眼观察不同区段的组织结构, 找出有标志性的形态特点; 另一侧沿纵向每隔一段距离(约 0.5 cm)取 0.2~0.3 mm 厚的鹿茸组织样品, 用于组织学检查, 分析内部组织类型。将其余鹿茸样品按照如下程序进行切片: 用酒精喷灯将鹿茸表面的茸毛燎掉, 擦洗干净, 去掉侧枝; 鲜茸放置到-20 °C 过夜冷冻, 干茸用蒸汽蒸软; 然后, 用手动参茸切片机切成约 2 mm 厚的薄片, 观察不同区段的组织结构和内部形态特点。



图 2 梅花鹿三杈鲜茸纵切面

Fig. 2 Longitudinal cut of fresh three-branched velvet antlers of sika deer

按照行业标准所描述的鹿茸不同区段的特征和经验, 根据鹿茸纵向剖面和横截面所展现出来的表型特征, 对鹿茸进行分区。马鹿三杈茸和梅花鹿三杈茸各分为 7 个区段, 分别为蜡片区(wax-like, WL)、蜡粉片过渡区(WB)、粉片区(blood-color, BC)、粉蜂片过渡区(BH)、蜂片区(honeycomb-like, HL), 蜂骨片过渡区(HB), 骨片区(bone, B), 共 4 个区段和 3 个过渡区段; 梅花鹿二杈茸分为

WL、BC、HL、B(鹿茸最基部约 0.5 cm 长的区段) 4 个区段。

2.3 组织学检查

在纵向劈开的三杈鲜茸组织样品, 用 10% 的福尔马林固定 1 周。用 10% 的甲酸脱钙后, 石蜡包埋, 切片厚度为 5 μm, 用苏木素和伊红染色, 阿利辛蓝复染。重点观察 WL、BC、HL、B 4 个区段鹿茸内部组织类型。

2.4 烘干和粉碎

鲜茸切片后, 放-80 °C 预冷, 然后用冷冻干燥机冻干; 干茸切片后用 65 °C 烘干。干制后的鹿茸片用中药粉碎机粉碎, 过 100 目筛。

2.5 HPLC 分析

选择冻干后粉碎的马鹿和梅花鹿三杈茸, 采用高效液相色谱法对鹿茸 WL、BC、HL、B 4 个区段的水溶性成分进行差异分析, 主要分析 4 个区段的指纹图谱和峰下面积的差异。

2.5.1 供试品溶液的制备 称取冻干粉 0.5 g, 在 50 mL 离心管中用 10 mL 蒸馏水稀释, 置于超声浴中, 超声 30 min (50 kHz), 离心 15 min (10 000 r/min), 收集上清液, 用同样方法再次提取残渣, 2 次上清液合在一起, 加水定容至 25 mL。所得溶液通过 0.45 μm 滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.5.2 阴性对照溶液的制备 蒸馏水作为阴性对照溶液。

2.5.3 色谱条件 色谱分析使用 Waters e2695 系统(Waters, 配 2489UV 检测器, 连接 Waters Empower 3 数据站), 采用 Pursuit XR_{C18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 在 30 °C 下进行色谱分离。检测波长 260 nm, 体积流量 1 mL/min, 每次进样 10 μL。流动相由甲醇(A)和水(B)组成, 梯度洗脱: 0~30 min, 1%~10%A。该方法重复 3 次, 获得的结果均一致, 作为本实验的最终结果。

2.6 蛋白质含量测定

鲜茸和干茸各个区段的鹿茸粉, 采用凯氏定氮法, 参照 AOAC 的官方分析方法^[18]进行蛋白质含量的测定。约 0.2 g 的鹿茸粉用 15 mL H₂SO₄ 在 420 °C 条件下处理 2 h, 冷却后, 滴定, 总氮的量乘以 6.25 为蛋白质的量^[19]。当 2 个独立测定之间的绝对差异超过 10% 时, 重复测定。

2.7 钙含量测定

鲜茸和干茸各个区段的鹿茸粉, 采用 ICP-MS 法, 按照孙伟丽等^[20]描述的方法, 进行钙含量的测定。

2.8 分区值 (PV) 计算

PV 值的设立的计算公式如下

$$PV = C_p / C_{ca} \times 10^5$$

C_p 为蛋白质的含量, C_{ca} 钙的含量

WB、BH、HB 的值分别用以区分 WL、BC、HL、B。

2.9 统计分析

蛋白质含量、钙含量、PV 值的数值, 采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计学分析并制图。

3 结果

3.1 内部的组织结构

通过对鹿茸纵剖面 (图 2)、各区段横断面 (图 3) 和组织学切片的观察 (图 4) 得知, 对于同一区段, 不同规格鹿茸、鲜茸和干茸的内部组织结构和形态特点差别不明显; 而对于同一规格的鲜茸 (或干茸) 来说, 不同区段之间差别明显, 组织类型也不一致, 具体描述见表 2。

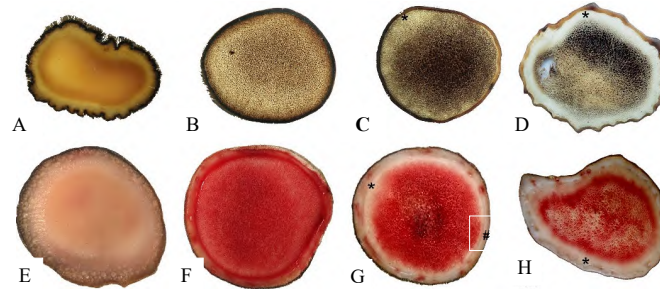


图 3 梅花鹿三杈茸 4 个区段鹿茸横切面
A、D-干茸切片 E、H-鲜茸切片 A、E-蜡片 (WL 区), 无肉眼可见血管, 蜡质肉样 B、F-粉片 (BC 区), 周围血管细, 中央血管粗, 类似蜂巢状, 开始出现密质骨 (*处), 但是有缺口 (#处) 没有连成环 D、H-骨片 (B 区), 血管变粗, 密质骨 (*处) 连成环
A, D-dried velvet antler slices E, H-fresh velvet antler slices A, E-WL, no blood vessels or no visible blood, vessel waxy-like and meat-like B, F-BC, fine-grained and uniform blood vessels C, G-HL, uniform blood vessels and thicker in center, honeycomb-like; compact bone (*) appearing at edge without connecting to a complete ring (#) D, H-B, coarsened blood vessels and thicker in center, translucent compact bone (*) connecting to a complete ring

图 3 梅花鹿三杈茸 4 个区段鹿茸横切面

Fig. 3 Cross cut of four portions of three-branched velvet antler of sika deer

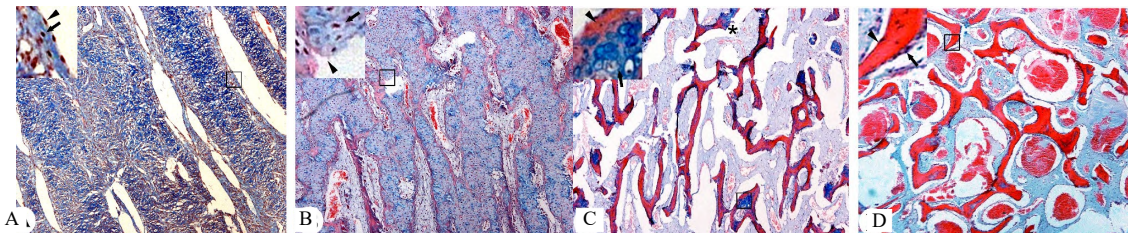


图 4 梅花鹿三杈茸 4 个区段鹿茸的组织结构
A-WL 区, 间充质, 形成表面覆盖有成软骨细胞 (箭头) 的柱状结构, 内部含有软骨细胞 (箭头), 说明开始向软骨转化 B-BC 区, 软骨组织, 可见蓝染的连续的软骨柱, 内部充满软骨细胞 (箭头), 箭头指向的为破软骨细胞 C-HL 区 弥散的骨小梁依然可见大量的软骨细胞 (箭) 和破软骨细胞 (*), 表面覆盖有成骨细胞 (箭头) D-B 区, 正在进行骨重建的骨小梁, 成骨 (箭头) 和破骨 (箭头) 共存
A-WL, continuous column cartilage (blue staining), which was covered by osteoblasts (arrowhead) and chondrocytes (arrow) B-BC, continuous column cartilage (blue staining), arrow points to the chondrocytes and arrowhead points to the chondroclast C-HL, discrete bony trabeculae. On the surface of trabeculae, extremely fast osteogenesis is occurring but still accompanied by osteoclasia and chondroclast (*) D-B, Rapidly generated trabeculae were remodeling. Osteogenesis (arrowhead) and osteoclasia (arrow) coexist simultaneously.

图 4 梅花鹿三杈茸 4 个区段鹿茸的组织结构

Fig. 4 Histology of four portions of three-branched velvet antler of sika deer

表 2 鹿茸 4 个区段内部组织特征和类型

Table 2 Tissue characteristics of four portions of velvet antlers

区段	内部特征		组织类型
	干茸	鲜茸	
WL	无血管或肉眼可见血管，蜡样，触感坚硬细腻	无血管或肉眼可见血管，蜡质肉样，触感柔软细腻	间充质/软骨
BC	血管细密均匀，轻触落粉，如粉覆面，触感颗粒状，松脆易碎	血管细密均匀，触感柔软，比蜡片稍硬	软骨
HL	周围血管细密，中央血管变粗，呈蜂窝状，边缘处出现密质骨，但是没有连成环状，触感中央颗粒状，松脆易碎，外周坚硬有韧性	周围血管细密，中央血管变粗，呈蜂窝状，边缘处出现密质骨，但是没有连成环状，触感松脆易碎，外周坚硬有韧性	软骨/骨
B	周围血管细密，中央血管更粗，呈蜂窝状，有的融合成空腔，边缘密质骨连成骨密质环，触感坚硬有韧性	周围血管细密，中央血管更粗，呈蜂窝状，有的融合成空腔，边缘密质骨连成骨密质环，触感坚硬有韧性	软骨/骨

通过肉眼观察,发现 3 种规格鹿茸、鲜茸和干茸不同区段的共性差别在于血管形态、软骨和骨柱及骨密质环,因此选择这 3 个指标用于分区。4 个区段骨化程度逐渐加深;肉眼可见血管从无(WL 区,图 3-A、E)到有,并逐渐增粗,当肉眼可见血管布满整个鹿茸横断面时,为 BC 区(图 3-B、F),此区段血管细密,粗细均匀;软骨和骨柱分布均匀,骨密质环从无到有,当鹿茸横断面边缘开始出现密质骨时,为 HL 区(图 3-C、G),此区段周围血管细密,中间粗,呈蜂窝状;软骨和骨柱变得破损无序,当鹿茸横断面边缘的密质骨连成环状的骨密质环时,为 B 区(图 3-D、H),此区段周围血管细密,中间更粗,形成血窦。

3.2 内部的组织类型

由梅花鹿三杈茸鲜茸不同区段的组织学切片(图 4)可以看出,WL 区(图 4-A)形成表面覆盖有成软骨细胞的柱状结构,内部含有软骨细胞,此处已经开始从间充质向软骨转化。BC 区(图 4-B)可见纵向血管分割的蓝染的连续的软骨柱,内部充满软骨细胞。HL 区(图 4-C)可见弥散的骨小梁与血窦,内部依然含有大量的软骨细胞和破软骨细胞,表面覆盖有成骨细胞。B 区(图 4-D),由完整骨环围绕的内部组织分布着正在进行骨重建的骨小梁和大量的血窦,成骨细胞和破骨细胞共存。

3.3 水溶性成分差异比较

同一区段的马鹿和梅花鹿三杈鲜茸的 HPLC 色谱图类似,同一鹿茸 4 个区段 HPLC 峰数量相近,色谱图见图 5,峰面积见图 6,没有显著差异($P>0.05$)。

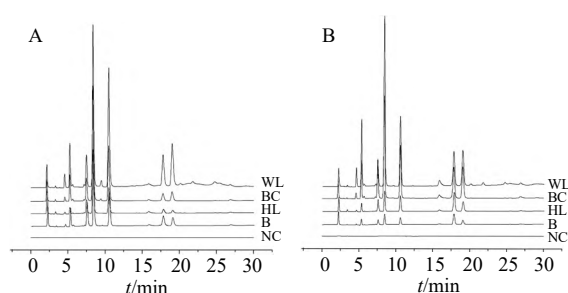


图 5 马鹿 (A) 和梅花鹿 (B) 三杈鲜茸 4 个区段的 HPLC 色谱图比较

Fig. 5 Comparison in HPLC chromatograms of four portions of three-branched velvet antlers of wapiti (A) and sika deer (B)

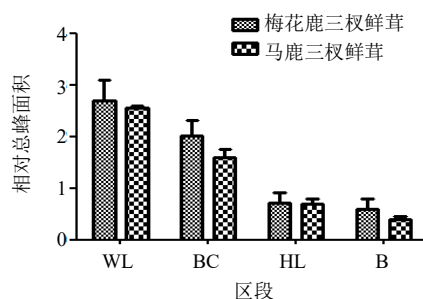


图 6 马鹿和梅花鹿三杈鲜茸 HPLC 总峰面积比较 ($n=6$)
Fig. 6 Comparison in HPLC peak area in a given portion of fresh three-branched velvet antler between wapiti and sika deer ($n=6$)

不同区段之间,不论是马鹿还是梅花鹿三杈鲜茸的 HPLC 色谱峰的数量基本相同(图 5);但色谱峰面积差别较大(图 7),峰面积值从尖部到基部逐渐降低,其中马鹿三杈鲜茸相邻区段之间差别显著($P<0.05$ 、 $P<0.01$),梅花鹿三杈鲜茸粉片和蜂片。

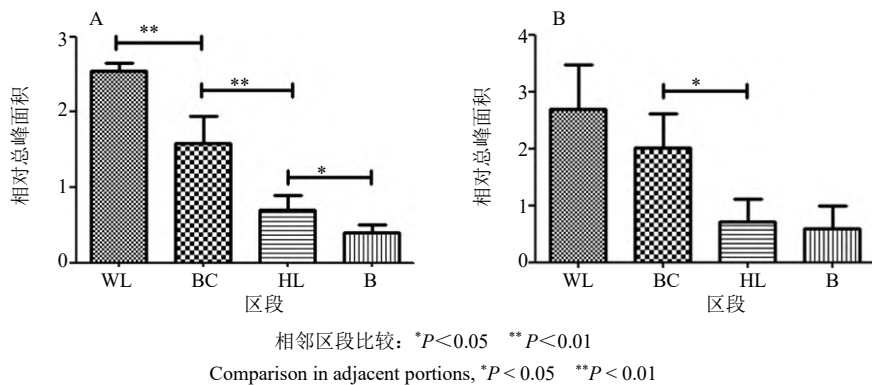


图 7 马鹿 (A) 和梅花鹿 (B) 的三杈鲜茸 4 个区段 HPLC 总峰面积比较

Fig. 7 Comparison in HPLC peak area in four portions of fresh three-branched velvet antlers of wapiti (A) and Sika deer (B)

之间差异显著 ($P<0.05$), 总体趋势为 WL 的峰值最高, BC、HL、B 依次降低。

3.4 4 个区段蛋白质含量的变化趋势

鹿茸样品的蛋白质含量在 46.14%~85.56%。不同

规格、同一区段鹿茸组织的蛋白质含量之间的差异不显著, 见图 8。除了马鹿三杈茸的 WB 和 HL ($P<0.05$) 之外, 其余区段的干茸和鲜茸之间的蛋白质含量的差异均不显著, 见图 9。

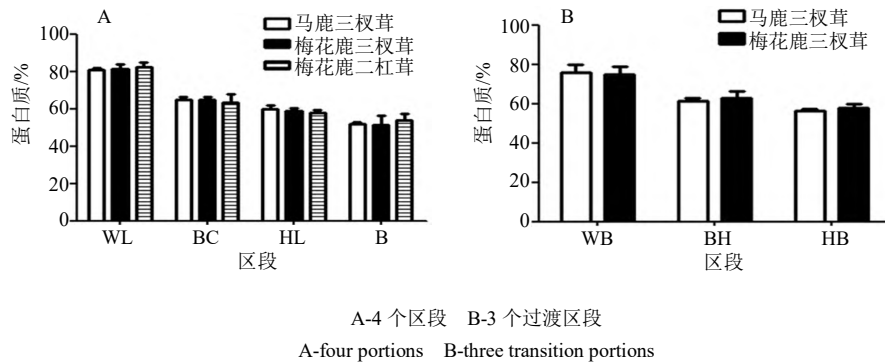


图 8 3 种规格之间的同一区段鹿茸的蛋白质含量比较

Fig. 8 Comparison in protein content in a given portion between three types of velvet antlers

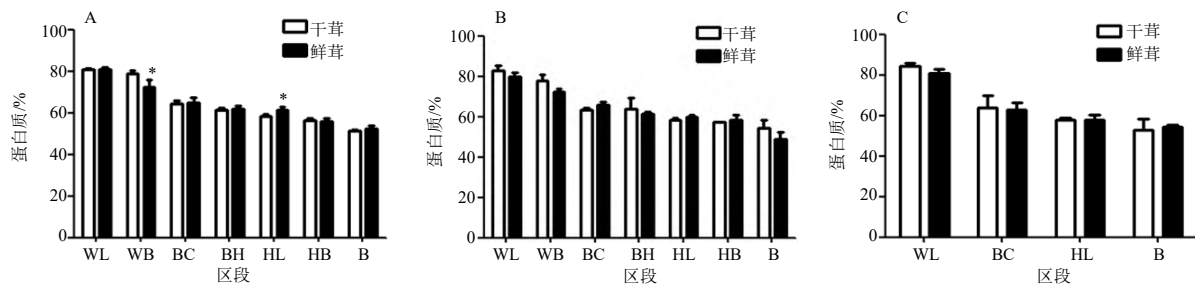


图 9 干茸和鲜茸之间同一区段鹿茸的蛋白质含量比较

Fig. 9 Comparison in protein content in a given portion between dried and fresh velvet antlers

3 种规格鹿茸的蛋白质含量从尖部到基部均逐渐降低, WL、BC、HL、B4 个区段的相邻区段之间差异均达到显著 ($P<0.05$) 或极显著水平 ($P<0.01$ 、 0.001); 同一种鹿茸的 4 个区段蛋白质含量

逐渐降低, 而某些区段与其过渡区段 (如马鹿三杈茸 BH 与 HL, 梅花鹿三杈茸 BC 与 BH、BH 与 HL、HL 与 HB) 之间存在差异不显著的现象, 见图 10。

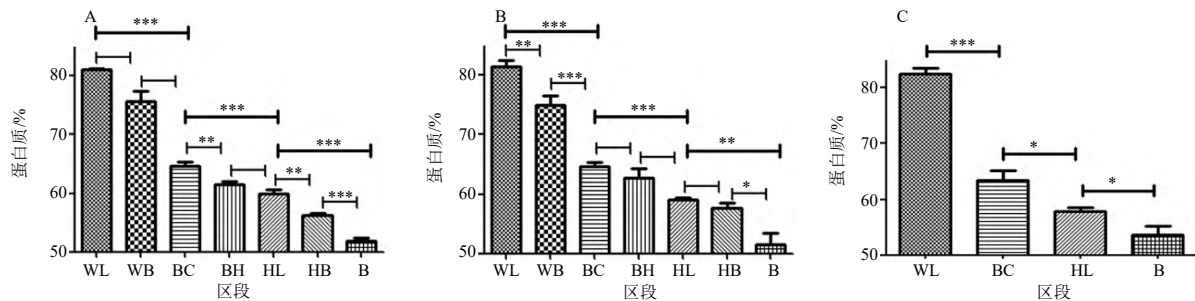


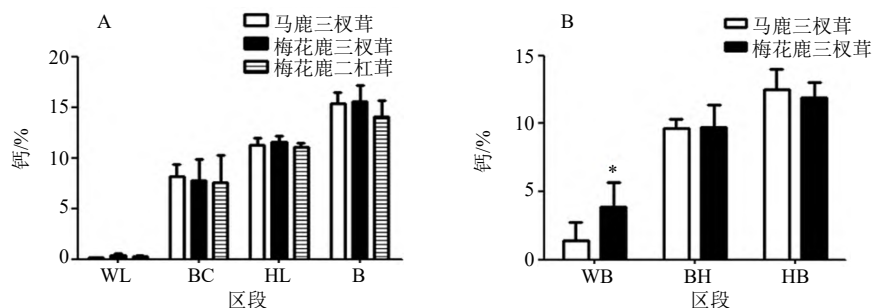
图 10 鹿茸 4 个区段蛋白质含量比较

Fig. 10 Comparison in protein content in four portions of velvet antlers

3.5 4 个区段钙含量的变化趋势

鹿茸样品的钙含量在 0.08%~18.51%。除马鹿三杈茸和梅花鹿三杈茸在 WB 存在差异显著 ($P<0.05$) 的现象之外, 3 种规格之间的同一区段鹿茸的

钙含量差异不显著 ($P>0.05$), 见图 11。除马鹿三杈茸的 WB、梅花鹿三杈茸 WL 和 BC 存在差异显著 ($P<0.05$) 的现象之外, 其余区段的干茸和鲜茸之间的钙含量差异均不显著 ($P>0.05$), 见图 12。

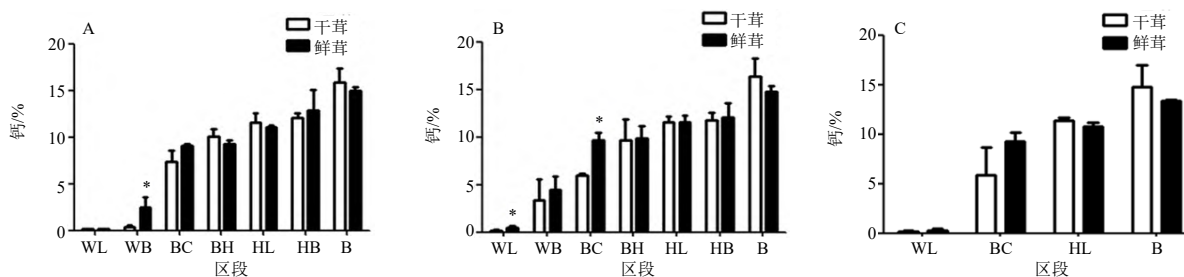


A-4 个区段 B-3 个过渡区段 2 种规格同一区段比较: $*P<0.05$

A-four portions B-three transition portions comparison in a given portion between two types: $*P<0.05$

图 11 3 种规格之间的同一区段鹿茸的钙含量比较

Fig. 11 Comparison in calcium content in a given portion between three types of velvet antlers



A-马鹿三杈茸 B-梅花鹿三杈茸 C-梅花鹿二杈茸 干茸和鲜茸同一区段比较: $*P<0.05$

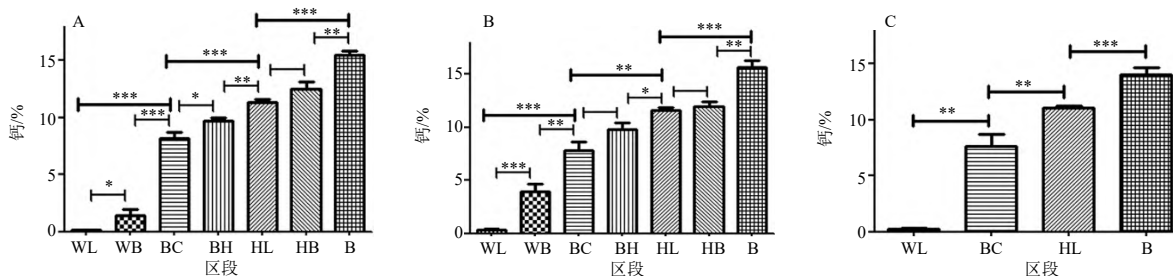
A-three branched velvet antlers of wapiti B-three branched velvet antlers of sika deer C-two branched velvet antlers of sika deer comparison in a given portion between dried and fresh velvet antlers, $*P<0.05$

图 12 干茸和鲜茸之间同一区段鹿茸的钙含量比较

Fig. 12 Comparison in calcium content in a given portion between dried and fresh velvet antlers.

3 种规格鹿茸的钙含量从尖部到基部均逐渐升高, WL、BC、HL 和 B 4 个区段的相邻区段之间差异均达到极显著水平 ($P<0.01$, 0.001); 同一鹿茸 4 个区段

钙含量逐渐升高, 而某些区段与其过渡区段 (马鹿三杈茸 HL 与 HB, 梅花鹿三杈茸 BC 与 BH、HL 与 HB) 之间存在差异不显著 ($P>0.05$) 的现象, 见图 13。



A-马鹿三杈茸 B-梅花鹿三杈茸 C-梅花鹿二杈茸 相邻区段比较: $*P<0.05$ $**P<0.01$ $***P<0.001$

A-three branched velvet antlers of wapiti B-three branched velvet antlers of sika deer C-two branched velvet antlers of sika deer comparison in adjacent portions: $*P<0.05$ $**P<0.01$ $***P<0.001$

图 13 同一鹿茸 4 个区段钙含量比较

Fig. 13 Comparison in calcium content in four portions of velvet antlers

3.6 4 个区段 PV 值大小的变化趋势

通过蛋白质含量和钙含量的比值设定的鹿茸 PV 值, 数值范围的跨度相比蛋白质含量和钙含量都大, 分布在 2.75~600.32, 所以更能显著地区分不同区段。

3 种规格鹿茸之间的同一区段的 PV 值差异不显著, 见图 14。除梅花鹿三杈茸的 BC 存在显著差异 ($P < 0.05$) 的现象之外, 其余区段的干茸和鲜茸的 PV 值差异均不显著, 见图 15。

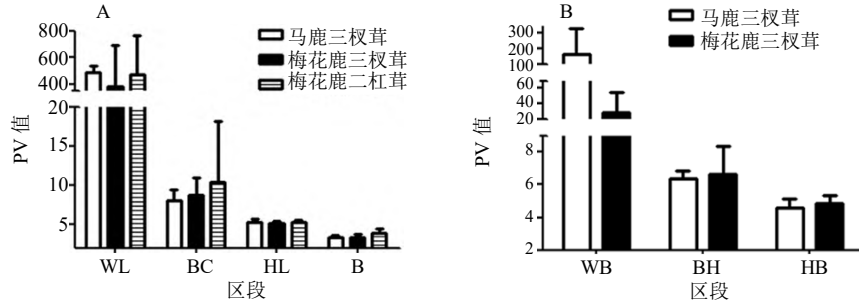
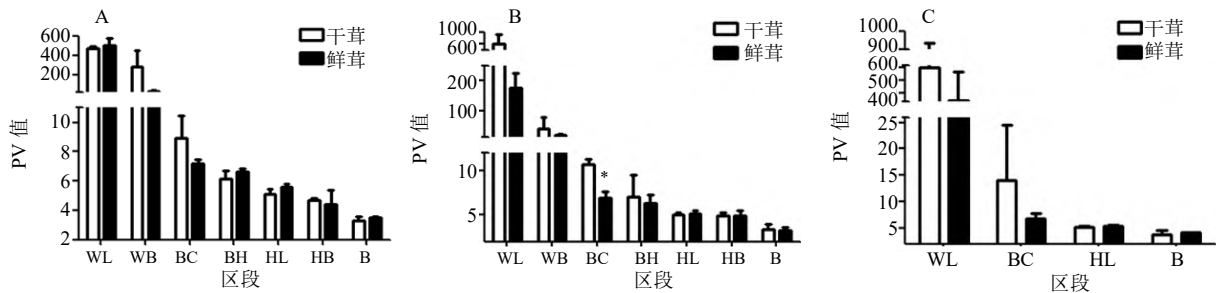


图 14 3 种规格鹿茸之间的同一区段 PV 值的比较

Fig. 14 Comparison in PV value in a given portion between three types of velvet antlers



A-马鹿三杈茸 B-梅花鹿三杈茸 C-梅花鹿二杈茸 干茸和鲜茸同一区段比较: $*P < 0.05$

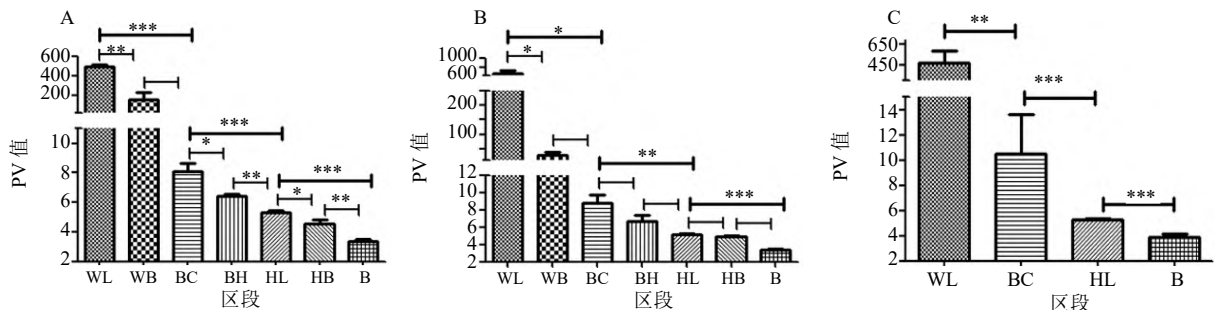
A-three branched velvet antlers of wapiti B-three branched velvet antlers of sika deer C-two branched velvet antlers of sika deer, comparison in a given portion between dried and fresh velvet antlers, $*P < 0.05$

图 15 干茸和鲜茸之间同一区段 PV 值比较

Fig. 15 Comparison in PV value in a given portion between dried and fresh velvet antlers

3 种规格鹿茸的 PV 值从尖部到基部均逐渐降低, 其中马鹿和梅花鹿三杈茸的 WL、BC、HL 和 B4 个区段的相邻区段之间的差异均达到显著 ($P < 0.05$) 或极显著水平 ($P < 0.01$ 、 0.001); 同一鹿茸 4 个区段 PV 值逐渐升高, 而某些区

段与其过渡区段 (马鹿三杈茸 WB 与 BC, 梅花鹿三杈茸 WB 与 BC、BC 与 BH、BH 与 HL、HL 与 HB) 之间存在差异不显著的现象, 梅花鹿二杈茸蜂片和粉片的 PV 值差异不显著, 见图 16。



A-马鹿三杈茸 B-梅花鹿三杈茸 C-梅花鹿二杈茸 相邻区段比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$

A-three branched velvet antlers of wapiti B-three branched velvet antlers of sika deer C-two branched velvet antlers of sika deer, comparison in adjacent portions: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$

图 16 同一鹿茸 4 个区段 PV 值的比较

Fig. 16 Comparison in PV value in four portions of velvet antlers

根据上述结果, 将各区段的 PV 值进行统计学分析, 结果见表 3。选择马鹿和梅花鹿三杈茸过渡区的 PV 值共 12 个数据, 去掉一个最高值和一个最低值, 剩余 10 个数值的平均值作为相邻区段间的界限值。WL 区 PV 值 ≥ 65.00 , BC 区 PV 值为 $6.30 \sim 64.99$, HL 区 PV 值为 $4.70 \sim 6.29$, B 区 PV 值 ≤ 4.69 。

表 3 鹿茸不同区段 PV 值 ($n=6$)

Table 3 PV value of four portions of velvet antlers ($n=6$)

区段	马鹿三杈茸	梅花鹿三杈茸	梅花鹿二杠茸
WL	490.85 ± 48.54	383.04 ± 312.20	470.80 ± 291.55
WB	160.33 ± 174.60	28.17 ± 26.84	—
BC	8.08 ± 1.37	8.78 ± 2.18	10.47 ± 7.76
BH	6.39 ± 0.45	6.65 ± 1.71	—
HL	5.32 ± 0.38	5.11 ± 0.28	5.23 ± 0.27
HB	4.56 ± 0.61	4.87 ± 0.48	—
B	3.38 ± 0.25	3.33 ± 0.45	3.88 ± 0.59

4 讨论

目前鹿茸分区方法混乱、客观指标和质量标准缺乏等现状, 阻碍了鹿茸的深加工和药用。因此, 有必要建立科学的、精确的客观鹿茸分区方法。我们认为客观鹿茸分区方法, 必须具备如下两个条件: 第一, 无差别地适用于各种规格的鹿茸; 第二, 设有明显的客观指标。本研究根据不同区段鹿茸的内部组织结构和成分组成, 首次设立了“血管形态”和“骨密质环”2 个指标作为鹿茸分区的感官指标。同时首次根据鹿茸中蛋白和钙含量比值设立“PV 值”这一指标, 通过客观数值将各个区段进行了数据化, 并为相邻区段之间设立了明显的界线, 定义了每个区段的数值范围, 使鹿茸分区更为合理, 还能将深加工鹿茸产品的原材料定位到鹿茸的某一区段。

不同区段鹿茸的组织结构、类型和成分组成各不相同。从鹿茸纵剖面(图 2)、横断面(图 3)和组织学切片(图 4)可以看出, 不同区段组织结构和类型之间清晰的变化。本研究的组织学结果显示: 鹿茸 4 个区段骨化程度从尖部到基部逐渐增大, 该结果与赤鹿^[10]、白尾鹿^[21]的研究结果一致。液相色谱分析、代谢组学^[2, 22]分析结果显示, 鹿茸不同区段成分含量和种类均有一定程度的差异。理论推测, (1)可能是上述差异造成了不同区段鹿茸的药效存在一定的差异, 如鹿茸不同区段在抗骨质疏松方面的功效显著不同^[11]; (2)可以利用这种差异来区别

鹿茸的不同区段。

对于不同区段鹿茸的成分含量, 本研究通过对总水溶性成分含量(HPLC 法测定)和单一种类(蛋白质和钙)成分含量两种方式进行分析。对同一区段来说, HPLC 法测定的总水溶性成分含量在不同规格鹿茸之间差异不显著, 说明该方法能够同时适用于 3 种规格的鹿茸, 但是由于 HPLC 法不能有效地区分的梅花鹿三杈茸鲜茸的不同区段。因此, 本研究使用的 HPLC 测定法不满足构建客观鹿茸分区方法的条件。

3 种规格鹿茸 4 个相邻区段之间的 PV 值(图 16)达到差异显著的水平(除梅花鹿二杠茸粉片和蜂片之间的 PV 值外)。相对于单一成分的蛋白质含量(图 10)和钙的含量(图 13)来说, PV 值的数值在各区段之间的差距更大, 因此更灵敏, 使分区效果更好。对于不同种类和规格的鹿茸来说, 各区段的 PV 值处于同一水平(表 1): 同一区段的马鹿茸和梅花鹿茸的 PV 值之间没有显著差异(图 14); 同一区段的梅花鹿三杈茸和二杠茸的 PV 值之间没有显著差异(图 14); 同一区段的干茸和鲜茸的 PV 值之间没有显著差异(图 15)。上述结果说明, 该 PV 值不仅适用于种间的鹿茸, 不同规格的鹿茸, 也能够适用于不同加工方式处理的鹿茸。

梅花鹿二杠茸粉片和蜂片之间的 PV 值(图 16)出现了不显著的现象。对于同一区段来说, 3 种规格的鹿茸、干茸和鲜茸之间的蛋白质含量、钙含量和 PV 值也偶尔存在着差异显著的现象。这是因为本研究中所用的样品, 全是采用传统鹿茸分区方法进行划分的, 人为操作误差较大。这一现象也证明了传统鹿茸分区方法的可靠性较差。PV 值的使用能很好地克服这一缺点。很多区段与其过渡区段之间的 PV 值差异不显著(图 16), 除传统鹿茸分区方法的人为操作误差因素外, 还说明鹿茸 4 个区段之间存在一定的缓冲区, 将鹿茸划分为 4 个区段是合理的, 如果再进行细化(如划分为 7 个区段), 会出现难以区分相邻区段的现象。

综上所述, 本研究设立的 PV 值对鹿茸进行分区的方法具备了客观鹿茸分区方法的必备条件。但是由于 PV 值测定较为繁琐, 因此应同时结合感官指标对鹿茸进行分区。对于难以确定区段归属的部分再进行 PV 值的测定, 能够得到较为精确的结果。

合理公认的鹿茸质量鉴定方法的缺乏, 是鹿茸质量标准缺失的主要因素。本研究建立的客观鹿茸

分区方法, 为建立现代化的鹿茸质量鉴定方法迈出了第一步, 有助于鹿茸产业的深加工和走向标准化, 同时还为建立动物药甚至整个中药的质量鉴定方法提供了示范。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 263.
- [2] 刘文媛, 李春义, 巴恒星, 等. 鹿茸 4 个区段非靶向代谢组学研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2020, 42(4): 454-466.
- [3] Li C Y, Zhao H P, Liu Z, *et al.* Deer antler: A novel model for studying organ regeneration in mammals [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 56: 111-122.
- [4] Goss R J. Section iii basic sciences and pathology 24 problems of antlerogenesis [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1970, 69(1): 227-238.
- [5] Suttie J M, Wenham G, Kay R N. Simple *in vivo* method for determining calcium and phosphorus content of the metacarpus of red deer using radiography [J]. *Vet Rec*, 1983, 113(17): 393-394.
- [6] Li C Y, Yang F H, Sheppard A. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration-insights from studying annual renewal of deer antlers [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2009, 4(3): 237-251.
- [7] Stewart K M, Bowyer R T, Kie J G, *et al.* Antler size relative to body mass in moose: Tradeoffs associated with reproduction, [J]. *Gaithersburg*, 2000, 1: 59-63.
- [8] Li C Y. Deer antler regeneration: A stem cell-based epimorphic process [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2012, 96(1): 51-62.
- [9] Sun H M, Yang F H, Chu W H, *et al.* Lentiviral-mediated RNAi knockdown of Cbfa1 gene inhibits endochondral ossification of antler stem cells in micromass culture [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47367.
- [10] Li C, Clark D E, Lord E A, *et al.* Sampling technique to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery [J]. *Anat Rec*, 2002, 268(2): 125-130.
- [11] Tseng S H, Sung C H, Chen L G, *et al.* Comparison of chemical compositions and osteoprotective effects of different sections of velvet antler [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 352-360.
- [12] 张嵩, 李峰. 不同规格鹿茸商品药材中氨基酸含量分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12): 1919-1923.
- [13] 王艳梅, 邹兴淮. 东北梅花鹿茸不同部位总磷脂含量的比较分析 [J]. 经济动物学报, 2003, 7(3): 30-31.
- [14] 汪树理, 潘浦群, 李晓红, 等. 4 种东北梅花鹿茸片总糖与水溶性蛋白的分析 [J]. 经济动物学报, 2007, 11(4): 194-195.
- [15] 郭月秋, 陈代贤, 吕浩然. 鹿茸片、粉及鹿角粉的薄层色谱鉴别 [J]. 中药材, 2000, 23(3): 136-137.
- [16] 陈代贤. 鹿源系列中药材真伪质量鉴别图谱 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 126.
- [17] 郝琳琳, 刘松财, 任晓慧, 等. 马鹿茸不同部位 IGF-1 含量的比较分析 [J]. 经济动物学报, 2005, 9(4): 201-203.
- [18] Latimer Jr G W. Official methods of analysis of AOAC International 20th edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis [J]. *Gaithersburg*, 2016, 16: 56-59.
- [19] Kjeldahl J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern [J]. *Zeitschrift Für Anal Chem*, 1883, 22(1): 366-382.
- [20] 孙伟丽, 赵海平, 张国坤, 等. 不同加工方式对梅花鹿三叉茸不同区段矿物质元素含量的影响研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3821-3828.
- [21] Banks W J. The ossification process of the developing antler in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) [J]. *Calcif Tissue Res*, 1974, 14(4): 257-274.
- [22] 孙伟丽, 赵海平, 王雪华, 等. 基于代谢组学技术分析不同区段鹿茸差异代谢分子物质 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 5047-5053.

[责任编辑 时圣明]