

基于电喷雾质谱法及化学计量法筛选鹿茸促睾丸 间质细胞分泌睾酮的活性成分

王亚苹¹, 李晶峰², 张凯月³, 张楠茜³, 高颖¹, 张辉³, 孙佳明³

(1. 长春中医药大学药学院, 吉林长春 130117) (2. 东北亚生物科技有限公司, 吉林长春 130117)

(3. 长春中医药大学人参科学研究院, 吉林长春 130117)

摘要: 采用电喷雾串联质谱法 (ESI-MS/MS) 及化学计量法快速筛选鹿茸促睾丸间质细胞分泌睾酮的活性成分。运用电喷雾串联质谱法分别检测 6 批鹿茸鲜品和 6 批鹿茸传统加工品中化学成分, 并测定各样品增加大鼠睾丸间质细胞的睾酮分泌量, 联合主成分分析 (PCA)、偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 对得出的一级质谱数据进行分析; 实现鹿茸鲜品和鹿茸传统加工品两组样品的快速区分。采用偏最小二乘法 (PLS) 和灰色关联度分析 (GRA) 筛选出其中具有潜在促睾丸间质细胞分泌睾酮的活性成分, 通过对二级质谱数据分析明确其中的可能活性成分的结构和组成。结果表明, 鹿茸鲜品与加工品的组成成分有显著差异, 且二者均具有良好的促睾丸间质细胞分泌睾酮的活性, 其中活性较强的成分主要为 Tyr-Ser-Phe (m/z 416) 和 Phe-Phe-Leu/Ile (m/z 426)。本方法能够简单快速分析鹿茸中促睾丸间质细胞的活性成分, 为鹿茸作为保健食品的后续开发提供参考。

关键词: 鹿茸; 电喷雾串联质谱; 化学计量法; 睾丸间质细胞

文章编号: 1673-9078(2021)04-262-268

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.4.0972

The Active Components of Testosterone Secreted by Antler Testis Stromal Cells Rapidly Screened by Electrospray Tandem Mass Spectrometry and Chemometrics

WANG Ya-ping¹, LI Jing-feng², ZHANG Kai-yue³, ZHANG Nan-xi³, GAO Ying¹, ZHANG Hui³, SUN Jia-ming³

(1.College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

(2.Northeast Asia Biotechnology Co. Ltd., Changchun 130117, China)

(3.Jinlin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: Electrospray tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) and chemometrics were used to screen the active components of testosterone secreted by testis stromal cells of Antler antler. Using electrospray tandem mass spectrometry, the chemical composition of 6 batch of pilose antler and 6 batch of velvet antler prepared by traditional process was detected. The testosterone secretion of rat leydig cells was also determined. The principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to analyze the mass spectrometry data. Rapid differentiation of fresh velvet antler and traditional processed products was achieved. Partial least square method (PLS) and gray correlation degree analysis (GRA) were used to select the active

引文格式:

王亚苹,李晶峰,张凯月,等.基于电喷雾质谱法及化学计量法筛选鹿茸促睾丸间质细胞分泌睾酮的活性成分[J].现代食品科技,2021,37(4):262-268

WANG Ya-ping, LI Jing-feng, ZHANG Kai-yue, et al. The active components of testosterone secreted by antler testis stromal cells rapidly screened by electrospray tandem mass spectrometry and chemometrics [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 262-268

收稿日期: 2020-10-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81373936); 吉林省科技厅重点研发项目 (20200404081YY); 吉林省卫生与健康青年科技骨干培养计划项目 (20200026)

作者简介: 王亚苹 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 新药研究与开发

通讯作者: 高颖 (1974-), 女, 副教授, 研究方向: 新药研究与开发; 张辉 (1958-), 男, 教授, 研究方向: 中药化学; 孙佳明 (1976-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药化学研究

components with potential testosterone secretion by testicular stromal cells. The structure and composition of the possible active components were determined by secondary mass spectrometry data analysis. The results showed that the components of fresh antler and traditional processed products were significantly different, and both of them had good activity of testosterone secretion by testicular stromal cells. The most active components were Tyr-Ser-Phe (m/z 416), PHE-Phe-Leu/Ile (m/z 426), respectively. This method could be used to analyze the active components of testicular stromal cells in antler and provide reference for the development of antler as health food.

Key words: velvet antler; electrospray tandem mass spectrometry; stoichiometry; leydig cell

鹿茸 (*Cervi Cornu Pantotrichum*) 是我国传统名药之一, 为鹿科动物梅花鹿 (*Cervus nippon* Temminck) 或马鹿 (*Cervus elaphus* Linnaeus) 的雄鹿未骨化而带茸毛的幼角。在我国有几千年的应用历史, 味甘、咸, 性温, 归肾、肝经^[1,2]。在《神农本草经》中列为中品, 具有壮肾阳, 益精血, 强筋骨等功效^[3]。鹿茸中含有氨基酸、蛋白质、磷脂、胆固醇等丰富的营养成分^[4]。用于肾阳不足、精血虚亏、阳痿早泄、宫寒不孕、头晕耳鸣、腰膝酸软、四肢冷、溃疡久不愈合等^[5]。睾丸间质细胞为睾丸间质内部的内分泌细胞, 其功能主要是分泌睾酮, 分泌的睾酮含量占睾酮总量的 95%^[6]。通过睾丸间质细胞分泌睾酮的能力和增殖能力可以表现出其改善雄激素的分泌量和调节生理机能的能力^[7], 故鹿茸的壮肾阳、益精血功效与睾酮分泌的水平是有着密切的关联。

电喷雾电离串联质谱技术是一种软电离技术^[8], 为天然产物结构研究的重要手段^[9]。直接进样电喷雾串联质谱法只需要很少的样品量, 并且不需要对被分析物进行分离处理, 节省了分析步骤, 提高了检测效率。如能将其与化学计量学方法结合应用, 就可将被分析中药等复杂体系中化学成分组成及结构与其对应活性相关联, 从而达到快速筛选活性成分的目的^[10]。本研究利用电喷雾质谱法对鹿茸鲜品和传统加工品的化学成分进行分析, 结合化学计量法对所获得的电喷雾质谱指纹图谱及其促睾丸间质细胞分泌睾酮的活性数据进行分析^[11], 快速筛选分析出鹿茸中具有促睾丸间质细胞分泌睾酮的可能活性成分及其结构, 为进一步探寻鹿茸促睾丸间质细胞分泌睾酮研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 样品与试剂

鹿茸样品采购于吉林省东丰鹿场; 乙腈、甲醇和甲酸(色谱纯), 美国 Fisher 公司; 超纯水, 美国 Milli-Q 纯水仪; 四甲基偶氮唑盐 (MTT), 美国 Amresco 公司; DMEM 培养基, 美国 Gibco 公司, 其它试剂为分析纯, 北京化工厂。

1.1.2 仪器与设备

6320 ion-trap 电喷雾离子阱质谱, 美国 Agilent 公司; KQ3200BE 超声波清洗器, 中国昆山市超声仪器有限公司; Model680 型酶标仪, 日本 TAKARA 公司; TGL-16B 台式离心机, 中国上海安亭科学仪器有限公司; BP211D 型十万分之一电子天平, 北京赛多利斯天平有限公司; GZLY-0.4 型药用真空冷冻干燥机, 北京速原中天科技有限公司; MiliQ 超纯水器, 美国密理博公司; Millipore 微滤仪, 美国 Millipore 公司; HH-6 型数显恒温水浴锅, 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

将新鲜二杠鹿茸用酒精灯火燎去毛, 纵向切成 2 份, 其中 1 份用保鲜膜将其断面包裹, 用于传统加工, 1 份作为鲜品。

传统加工: 先将包裹好的鹿茸放入沸水中进行煮炸, 每次 1 min; 煮炸 5 次, 每次煮炸后将连有氮气的 16 号针头插入到包裹好的茸尖端进行排气, 最后一次煮炸排气后放入 70 °C 的烘箱中烘烤 8 h, 取出切成小块, 水洗 5 次, 将加工后的样品装袋并保存于 4 °C 的恒温冰箱中贮藏备用^[12]。

取制备好的鹿茸鲜品以及加工品各 20 g, 以 10 倍量的水进行组织粉碎, 在 4 °C 下浸提 24 h。取出离心 (3600 r/min, 10 min), 上清液进行微滤, 将微滤液冻干, 备用。

称取上述样品冻干粉各 1 mg, 以 70% 甲醇溶解并定容至 1 mL, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 0.45 μm 的醇膜过滤, 滤液用于电喷雾质谱分析。

1.2.2 测定条件

质量范围 m/z : 200~500, 实验前质量数经过校正; 目标分子量: 400; 采用正离子模式。样品由流动注射泵进样, 流速: 5 μL/min; 干燥气温度: 350 °C; 干燥气流量: 9 mL/min; 雾化气压强: 0.24 MPA (35.0 psi); 毛细管电压: 3.5 kV。

1.2.3 睾丸间质细胞的分离培养

取 SD 雄性成年大鼠体重 250~300 g, 随机分组。

大鼠断颈处死，剖开腹腔剥离取出睾丸，放入 Type I 胶原酶中，37 °C 恒温振荡器中振荡消化 30 min，用 3 倍体积 DMEM 稀释终止消化。过滤、离心后制成悬浮液，吸出后接种于培养瓶中，放于 37 °C CO₂ 孵箱中培养^[13]。

1.2.4 ELISA 法测定睾丸间质细胞分泌的睾酮含量^[14]

在 96 孔板中接种密度为 10⁵ 个/mL 细胞悬液，100 μL/孔，培养 2 d，吸去培养液。样品组每组分别加入供试品溶液 50 μg/mL、100 μg/mL、200 (μg/mL)/孔；阳性组加入含人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 的 DMEM/F12 培养液 (含 HCG 终浓度为 1 U/mL) 100 μL；空白对照组加入 DMEM/F12 培养液 100 μL；每组分别设 3 个复孔。处于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后，向预先包被有大鼠睾酮单克隆抗体的酶标板中加入不同浓度的标准品及样品。然后加入生物素标记二抗和酶标试剂，在 37 °C 条件下反应 60 min 形成免疫复合物。用洗涤液洗板 5 次后除去未结合的酶，再加入底物 A、B，37 °C 条件下显色 10 min。加入终止液，在 10 min 内测定 450 nm 下的吸光值^[15]。

1.2.5 数据分析

采用 SIMCA-P 14.1 软件进行主成分分析 (PCA)、偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA)、正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 和偏最小二乘分析 (PLS)；采用 Excel 进行灰色关联度分析 (GRA)。

2 结果与分析

2.1 鹿茸鲜品和加工品中化学成分的电喷雾质谱分析

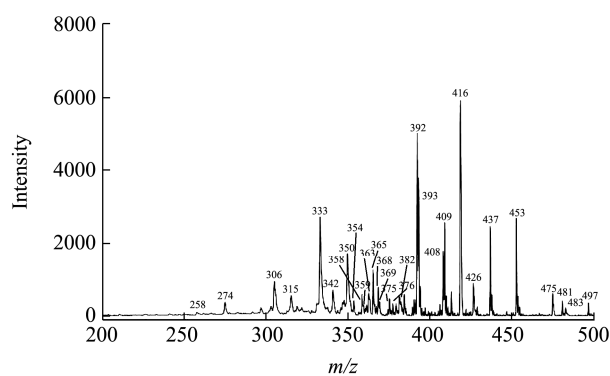


图 1 鹿茸鲜品电喷雾质谱指纹图谱

Fig.1 Electrospray mass spectrometry fingerprint of antler fresh products

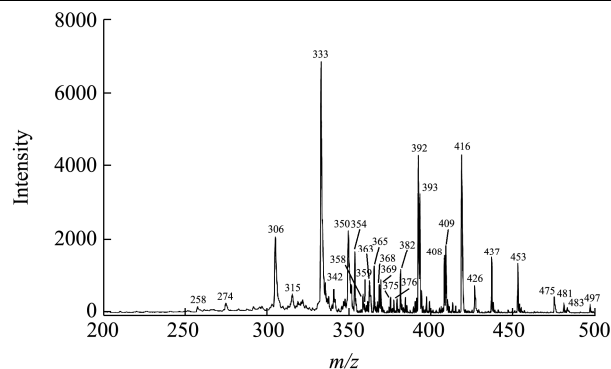


图 2 鹿茸加工品电喷雾质谱指纹图谱

Fig.2 Electrospray mass spectrometry of pilose antler processed products

采用正离子扫描模式，在优化的 ESI-MS/MS 条件下对鹿茸鲜品和加工品进行质谱分析，得到其一级质谱指纹图谱。

2.2 睾丸间质细胞分泌的睾酮含量

表 1 睾丸间质细胞分泌睾酮含量 (%)

Table 1 Contents of testosterone secreted by testicular stromal cells (%)

批次	鲜品	加工品
1	82.723	63.223
2	70.678	59.879
3	43.033	48.287
4	65.638	63.446
5	53.374	60.622
6	48.622	88.609

实验室前期研究不同批次鹿茸鲜品和加工品中的氨基酸组成、含量以及睾酮分泌活性进行测定，基于此发现了鹿茸加工前后特征性的差异氨基酸成分。但鹿茸的药效物质基础主要为多肽类成分，仅仅以氨基酸作为指标性成分，无法有效的筛选鹿茸中促睾酮分泌的活性成分。因此在前期活性数据基础上结合基于 ESI-MS/MS 技术的鹿茸全成分的分析结果，更准确有效的筛选活性成分^[16]。

2.3 鹿茸鲜品和加工品电喷雾质谱指纹图谱的多元统计分析

将每个样品质谱数据 m/z 200~500 范围内的质谱峰丰度作为变量，应用 SIMCA14.1 软件对每个导出的一级质谱数据进行 PCA 分析，所得结果见图 3。图中每个点代表 1 个样本，鹿茸鲜品与加工品之间在一定

程度上具有差异性。但 PCA 分析不能忽略组内误差,不能消除与研究目的无关的随机误差。因此采用有监督的 OPLS-DA 可降低组内差异,突出组间变异规律^[17,18]。而 OPLS-DA 的使用必须以 PLS-DA 模型通过验证为基础。

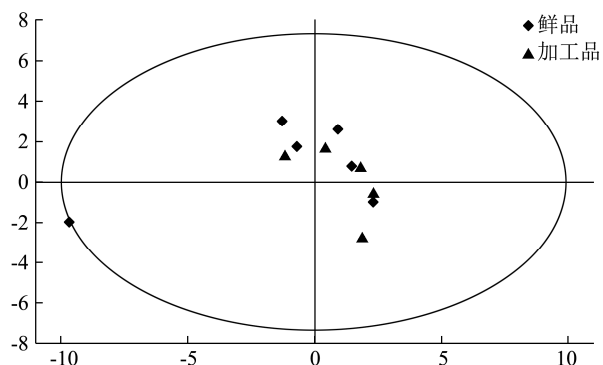


图3 鹿茸鲜品与加工品的PCA得分散点图

Fig.3 PCA distribution of antler fresh and processed products

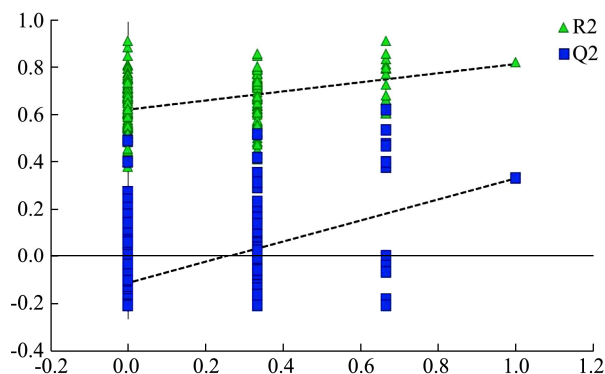


图4 鹿茸鲜品与加工品的PLS-DA模型验证图

Fig.4 PLS-DA model verification diagram of antler fresh products and processed products

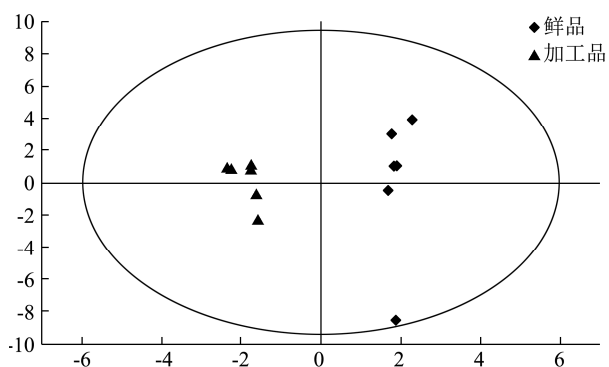


图5 鹿茸鲜品与加工品的OPLS-DA得分散点图

Fig.5 OPLS-DA scatter plot of fresh antler and processed products

图4显示PLS-DA模型的拟合程度良好,左端任何一次随机排列产生的 R^2 (0.621)和 Q^2 (-0.115)值均小于右端的原始值,表明原始模型的预测能力较任何一次随机排列y变量的预测能力都大,即模型有效。

OPLS-DA 分析能够将组间差异最大化,由图5可以看出鹿茸鲜品与加工品明显分为两类,得到良好区分,表明加工前后的鹿茸存在差异。同时采用VIP值的大小来筛选差异较大的成分,VIP值>1的变量能够对样品的分类起关键性作用。由表2分析可知 m/z 258、409、416、408、426、375、315、392、483、393、354、453和437可以作为鹿茸鲜品与加工品主要差异性成分。

表2 鹿茸鲜品与加工品的OPLS-DA VIP贡献值(VIP>1)

Table 2 Opls-da VIP contribution value of velvet antler fresh products and processed products (VIP>1)

编号	质荷比	VIP
1	258	1.79225
2	409	1.2406
3	416	1.23998
4	408	1.14119
5	426	1.13574
6	375	1.11851
7	315	1.09436
8	392	1.08604
9	483	1.06628
10	393	1.05049
11	354	1.04403
12	453	1.03112
13	437	1.01909

表3 各离子峰对促睾酮分泌活性贡献关联度

Table 3 Correlation degree of contribution of each ion peak to the activity of promoting testosterone secretion

标号	离子峰 m/z	关联系数	标号	离子峰 m/z	关联系数
1	408	0.855707	16	453	0.81837
2	416	0.855589	17	365	0.816773
3	409	0.851602	18	376	0.807449
4	426	0.851414	19	342	0.805817
5	393	0.846361	20	475	0.805428
6	359	0.846287	21	369	0.797599
7	274	0.844501	22	350	0.792341
8	258	0.844245	23	369	0.775817
9	481	0.841451	24	363	0.770588
10	315	0.831436	25	306	0.760039
11	392	0.831091	26	382	0.758729
12	497	0.830649	27	358	0.720086
13	437	0.822912	28	354	0.71414
14	483	0.821798	29	333	0.708382
15	375	0.82118			

2.4 鹿茸鲜品和加工品电喷雾质谱指纹图谱

与促睾酮分泌活性的灰色关联度分析

灰色关联分析的目的是确定参考序列和若干个比较序列之间的关联系数和关联度, 寻求系统中各个因素间的主要关系^[19]。通过对原始数据标准化转化后, 计算灰色关联度。所得关联度见表 3, 依据关联度的大小, 确定各成分对促睾酮分泌作用贡献的大小顺序为: m/z 408>416>409>426>393>359>274>258>481>315>392>497>437>483>375>453>365>376>342>475>368>350>369>363>306>382>358>354>333。其中 4 个离子峰所代表的化学成分与促睾酮分泌活性的关联度>0.85, 但与其它离子峰的关联度差别不明显, 因此, 鹿茸的促 Leydig 细胞睾酮分泌作用是由多组分共同发挥作用的结果。

2.5 鹿茸鲜品和加工品电喷雾质谱指纹图谱

与促睾酮分泌活性的偏最小二乘法分析

偏最小二乘法(PLS)是一种高效的统计回归技术, 适用于基因组和蛋白质组学数据的分析^[20]。利用 SIMCA14.1 软件, 经过多次提取主成分, 多次迭代, 拟合出鹿茸鲜品和加工品的电喷雾质谱一级质谱中共有离子峰丰度数据与促睾酮分泌活性数据之间的数理方程: $Y=0.0600106X_{258}+0.0781771X_{274}-0.086587X_{306}+0.113733X_{315}-0.0797819X_{333}+0.0968694X_{342}-0.0432387X_{350}+0.0388062X_{354}-0.0576641X_{358}+0.00138796X_{359}-0.0175176X_{363}-0.062117X_{365}+0.041837X_{368}+0.052248X_{369}-0.0666202X_{375}+0.0339687X_{376}+0.0597742X_{382}-0.0131358X_{392}+0.00365154X_{393}+0.0131067X_{408}+0.0275998X_{409}+0.0854705X_{416}+0.0868593X_{426}+0.0721696X_{437}+0.0808682X_{453}+0.0650291X_{475}+0.0585195X_{481}+0.0607728X_{483}+0.061128X_{497}$, 各离子峰所代表的化学成分对促睾酮分泌活性贡献大小顺序为: m/z 315>342>426>306>416>453>333>274>437>375>475>365>497>483>258>382>481>358>369>350>369>354>376>409>363>392>408>393>359, 其中 m/z 258、274、315、342、354、359、368、369、376、382、393、408、409、416、426、437、453、475、481、483 和 497 与活性呈正相关, 而 m/z 306、333、350、358、363、365、375 和 392 与活性呈负相关。

2.6 促睾酮分泌活性成分结构分析

综合灰色关联度分析和偏最小二乘法分析结果, 可以发现对促睾酮分泌活性贡献最大的前 5 位离子峰有 2 个是重合的, 分别是 m/z 416 和 426, 同时与活性呈正相关, 因此重点对这两个离子峰所代表的化学成分的结构进行分析。

2.6.1 m/z 416 二级质谱分析

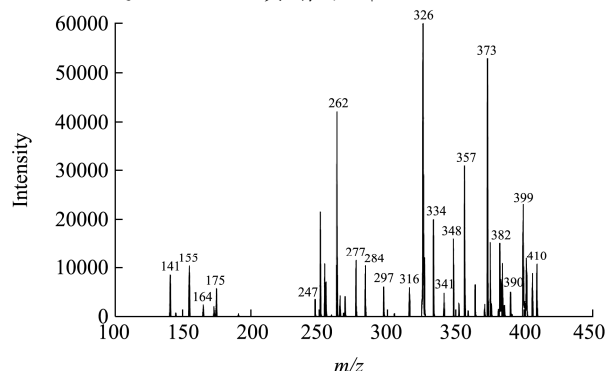


图 6 m/z 416 二级质谱图

Fig.6 Secondary mass spectrometry of m/z 416

二级质谱图中 m/z 416 为 $[M+H]^+$ 离子峰, 说明其分子量为 415。在电子碰撞解离过程中, $[M+H]^+$ 脱去一分子 H_2O 产生 m/z 398, $[M+H]^+$ 酰胺键断裂后电荷保留于 N-端形成的 b 碎片离子, m/z 值 (b_1 : 164, b_2 : 251), 在二级质谱中从肽链 C 端被以此轰击下来片段的 m/z 值为 87 (b_2-b_1), 其对应的氨基酸残基为 Ser (105- H_2O), b_1 碎片 (m/z : 164) 对应的氨基酸离子为 Tyr (181- NH_3), $[M+H]^+$ (m/z : 416) 离子失去一分子 Phe (165) 生成 b_2 离子 (m/z : 251); 所以, m/z 为 416 的肽离子氨基酸序列应为 Tyr-Ser-Phe。

2.6.2 m/z 426 二级质谱分析

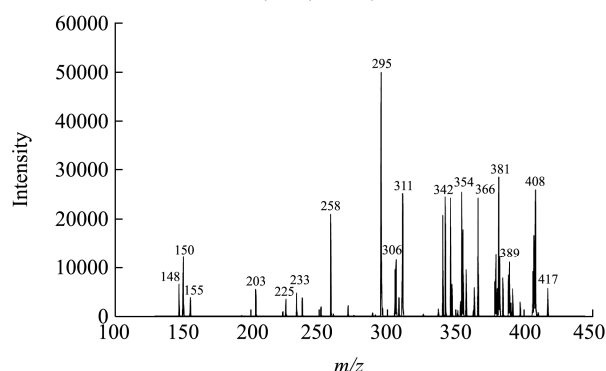


图 7 m/z 426 二级质谱图

Fig.7 Secondary mass spectrometry of m/z 426

二级质谱图中 m/z 426 为 $[M+H]^+$ 离子峰, 说明其分子量为 425。在电子碰撞解离过程中, $[M+H]^+$ 脱去一分子 H_2O 产生 m/z 408, 酰胺键断裂后电荷保留于 N-端形成的 b 碎片离子 m/z 值 (b_1 : 148, b_2 : 295), 在二级质谱中从肽链 C 端被以此轰击下来片段的 m/z 值为 147 (b_2-b_1), 其对应的氨基酸残基为 Phe

(165-H₂O), b₁ 碎片 (m/z : 148) 对应的氨基酸离子为 Asn (165-NH₃), [M+H]⁺ (m/z : 426) 离子失去一分子 Leu (131) 生成 b₂ 离子 (m/z : 295), 由于质谱无法区分 Leu 和 Ile, 因此 Leu 也可能为 Ile, 故 m/z 为 426 的肽离子氨基酸序列应为 Phe-Phe-Ile 或 Phe-Phe-Leu。

3 讨论

鹿茸作为我国传统中药保健食品, 具有壮肾阳, 益精血, 增强免疫力, 抗衰老等功效^[21]。在鹿茸的众多成分中, 主要的活性成分为鹿茸多肽, 鹿茸多肽具有促进生殖功能、保护神经、增强免疫力、保护心肌损伤、保护肝损伤、对组织创伤修复等功效^[22]。杨若明等^[23]通过观察麋鹿茸对大鼠生殖系统的影响, 结果发现麋鹿茸提取液具有明显促进雌鼠生殖系统发育的作用。傅雷等^[24]研究发现随着鹿茸多肽含量的增加, 鹿茸多肽可以促进小鼠子宫的生长发育, 且与剂量呈正相关。程津津等^[25]通过不同分组小鼠灌胃发现不同剂量的鹿茸可使子宫和阴道器官的脏器指数以及雌二醇水平有所提高, 说明鹿茸具有雌激素的作用。孙慧等^[16]对鹿茸中的氨基酸组成进行分析, 确定谷氨酸可作为鹿茸加工品质量控制的指标性成分之一。多肽类成分作为鹿茸的主要药效物质基础, 本文针对此类物质探索鹿茸对睾丸间质细胞的影响。

对鹿茸的研究分析方法多采用紫外分光光度法、红外光谱法、薄层色谱法、高效液相色谱法等^[26], 而 ESI-MS/MS 作为一种软电离技术, 进样量少, 且无需分离处理样品, 简单快速。本研究利用 ESI-MS/MS 对鹿茸加工前后的样品进行质谱分析, 结合多元统计分析对所获得的指纹图谱数据进行处理, 能够很好的区分鹿茸鲜品和传统加工品, 并筛选出 m/z 258、409、416、408、426、375、315、392、483、393、354、453 和 437 的肽类成分可以作为鹿茸鲜品与加工品主要差异性物质, 为鹿茸传统加工品的鉴定提供了新的思路和方法。

4 结论

应用偏最小二乘法 (PLS) 和灰色关联度分析 (GRA) 对所获得的一级质谱数据进行处理, 快速筛选出具有促大鼠睾丸间质细胞分泌睾酮的可能成分。值得注意的是, 通过与鹿茸加工前后一级谱数据多元统计分析结果筛选出的差异性成分相对照可以发现 m/z 416 和 m/z 426 均为排名靠前的差异性成分, 根据二级质谱数据对 2 个可能活性成分进行解析, 其结构分别为 Tyr-Ser-Phe (m/z 416) 和 Phe-Phe-Leu/Ile (m/z

426)。本研究推测出的活性成分为具有对活性正向影响的化合物, 且排序靠前, 关于排序靠后以及负向影响的化合物的结构及其活性还需进一步深入的研究。

参考文献

- [1] 王响, 鞠贵春. 鹿茸多肽的研究进展[J]. 野生动物学报, 2020, 41(2): 518-522
WANG Xiang, JU Gui-chun. Research progress of antler polypeptide [J]. Acta Ferro Ferro, 2020, 41(2): 518-522
- [2] 单国顺, 赵启苗, 臧彬如, 等. 花鹿茸切制工艺的优化[J]. 中成药, 2020, 42(7): 1819-1823
SHAN Guo-shun, ZHAO Qi-miao, ZANG Bin-ru, et al. Optimization of the cutting technology of pilose antler [J]. Chinese Patent Medicine, 2020, 42(7): 1819-1823
- [3] 王逸文, 徐方剑, 孙浩, 等. 鹿茸多肽提取工艺及其药理学作用[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(4): 94-96
WANG Yi-wen, XU Fang-jian, SUN Hao, et al. Extraction technology and pharmacology of pilose antler polypeptide [J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 50(4): 94-96
- [4] Huo Y S, Huo H, Zhang J. The contribution of deer velvet antler research to the modern biological medicine [J]. Chin J Integr Med, 2014, 20(10): 723-728
- [5] 刘春红, 汤焱聪, 高瑜培, 等. 鹿茸乙醇提取物对秀丽隐杆线虫抗衰老的作用[J/OL]. 食品工业科技: 1-8[2021-01-26]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060027>.
LIU Chun-hong, TANG Yi-cong, GAO Yu-pei, et al. Anti-aging effect of ethanol extract of pilose antler on *C. elegans* [J/OL]. Science and Technology of Food Industry: 1-8[2021-01-26]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060027>.
- [6] 修朋, 曲扬华, 高月锋, 等. 维生素 E 对绵羊原代睾丸间质细胞睾酮合成的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2018, 54(2): 60-65
XIU peng, QU Yan-hua, GAO Yue-feng, et al. Effect of vitamin E on testosterone synthesis in primary testicular stromal cells of sheep [J]. Chinese Journal of Animal Husbandry, 2018, 54(2): 60-65
- [7] 王磊. Luman 在小鼠睾丸间质细胞睾酮分泌过程中的作用及机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019
WANG Lei. Effect of Luman on testosterone secretion in mouse testicular stromal cells and its mechanism [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019
- [8] 张静, 高玉时, 周倩, 等. 高效液相色谱-电喷雾电离串联质谱法测定鸡肉、鸡蛋中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考药物残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2211-2219

- ZHANG Jing, GAO Yu-shi, ZHOU Qian, et al. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol and fluorophenicol residues in chicken and eggs by HIGH performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2017, 8(6): 2211-2219
- [9] 闫峻,顾娟,冯硕,等.大青叶化学成分及抗氧化活性研究[J].质谱学报,2019,40(4):381-390
- YAN Jun, GU Juan, FENG Shuo, et al. The leaf chemical components and antioxidant activity research [J]. Journal of Mass Spectrometry, 2019, 40(4): 381-390
- [10] 孙佳明,田淋淋,何忠梅,等.电喷雾质谱结合化学计量学方法快速筛选玛咖促睾丸间质细胞增殖活性成分[J].分析化学,2016,44(11): 1735-1741
- SUN Jia-ming, TIAN Gon-ling, HE Zhong-mei, et al. Electrospray mass spectrometry combined with stoichiometry to rapidly screen the proliferative active components of maca promoting testicular mesenchymal cells [J]. Analytical Chemistry, 2016, 44(11): 1735-1741
- [11] 贺敬霞,牟倩倩,张建琪,等.UPLC 结合化学计量法对不同产地黄芪的快速鉴别[J].中草药,2017,48(1):179-184
- HE Jing-xia, MOU Qian-qian, ZHANG Jian-qi, et al. Rapid identification of Astragalus from different origins by UPLC combined with chemical measurement method [J]. Chinese Herbal Medicine, 2017, 48(1): 179-184
- [12] 宫瑞泽,赵卉,曲迪,等.不同产地加工及炮制方法对鹿茸中胶原蛋白含量的影响[J].食品科学,2019,40(22):1-6
- GONG Rui-ze, ZHAO Hui, QU Di, et al. Effects of different processing and processing methods on collagen content in velvet antler [J]. Food Science, 2019, 40(22): 1-6
- [13] 丁赫.BMAL1 对小鼠睾丸间质细胞凋亡和睾酮分泌的影响[D].长春:吉林农业大学,2019
- DING He. Effects of BMAL1 on apoptosis and testosterone secretion of testicular stromal cells in mice [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019
- [14] Payne A H, Downing J R, Wong K L. Luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of leydig cells [J]. Endocrinology, 1980, 106(5): 1424
- [15] 贾福怀,季存蕊,涂宏建,等.海狗丸的体外活性研究[J].中国民族民间医药,2018,27(15):13-16
- JIA Fu-huai, JI Chu-rui, TU Hong-jian, et al. Study on the *in vitro* activity of fur seal pill [J]. Chinese Ethnic and Folk Medicine, 2018, 27(15): 13-16
- [16] 孙慧,李晶峰,赵子佳,等.传统加工方式对鹿茸氨基酸组成与促睾丸间质细胞分泌睾酮的影响[J].时珍国医国药,2017, 28(11):2656-2858
- SUN Hui, LI Jing-feng, ZHAO Zi-jia, et al. Effects of traditional processing methods on amino acid composition of velvet antler and testosterone secretion by testicular stromal cells [J]. Shizhen National Medicine, 2017, 28(11): 2656-2858
- [17] Giuliani A. The application of principal component analysis to drug discovery and biomedical data [J]. Drug Discov Today, 2017, 22(7): 1069-1076
- [18] Sang P, Wang L, Cao J. Parametric functional principal component analysis [J]. Biometrics, 2017, 73(3): 802-810
- [19] 殷莉丽,夏琴,蔡晓洋,等.基于姜黄中姜黄素类成分与姜黄粉末颜色指数 L*、a*、b* 值的相关性分析[J].中药材,2016,39(6):1247-1250
- YIN Li-li, XIA Qin, CAI Xiao-yang, et al. Correlation analysis of curcumin components in turmeric powder and color index L*, A*, B* values [J]. Traditional Chinese Medicine, 2016, 39(6): 1247-1250
- [20] Boulesteix A L, Strimmer K. Partial least squares: a versatile tool for the analysis of high-dimensional genomic data [J]. Brief Bioinform, 2007, 8(1): 32-44
- [21] 崔长升,于淼,王任晶,等.梅花鹿鹿茸多糖的提取工艺优化及抗衰老的作用[J].中国老年学杂志,2020,40(8):1697-1701
- CUI Chang-sheng, YU Miao, WANG Ren-jing, et al. Optimization of extraction technology of antler polysaccharide from Sika deer and its anti-aging effect [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2020, 40(8): 1697-1701
- [22] 李琳,叶彤,陈文凤,等.鹿茸多肽功能的研究进展[J].吉林医药学院学报,2020,41(1):54-56
- LI Lin, YE Tong, CHEN Wen-feng, et al. The research progress of velvet antler polypeptide function [J]. Journal of Jilin Medical College, 2020, 41(1): 54-56
- [23] 杨若明,张经华,周素红,等.麋鹿茸中的性激素对大鼠和小鼠生殖系统的影响[J].解剖学报,2001,2: 180-181,208
- YANG Ruo-ming, ZHANG Jin-hua, ZHOU Su-hong, et al. Effects of sex hormones in antler of Milu deer on the reproductive system of rats and mice [J]. Chinese Journal of Anatomy, 2001, 2: 180-181, 208
- [24] 傅雷,彭岩,徐红,等.鹿茸对去卵巢小鼠子宫生长的影响[J].大连医科大学学报,2007,1:30-32
- FU Lei, PENG Yan, XU Hong, et al. The effect of velvet antler on the uterus growth of ovariectomized mice [J]. Journal of Dalian Medical University, 2007, 1: 30-32

