

沙棘总黄酮、槲皮素对鸡成骨细胞碱性磷酸酶活性作用机制的体外研究

刘洪柱 李 垚* 陈 鑫 赵 伟 张丽欣 欧阳文文 刘红南

(东北农业大学动物营养研究所, 哈尔滨 150030)

摘要: 本试验旨在研究在体外培养条件下沙棘总黄酮 (total flavones of *Hippophae rhamnoides*, TFH) 及槲皮素 (quercetin) 对爱拔益加 (AA) 肉鸡鸡胚成骨细胞碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性的影响及其作用机制。成骨细胞分别采用基础培养液、基础培养液添加 β -雌二醇 (β -estradiol, E_2)、TFH 或槲皮素培养细胞 24 h; 细胞经雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 拮抗剂处理 2 h, 再分别于基础培养液、基础培养液添加 TFH 或槲皮素中培养 24 h; 细胞经胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 抑制剂处理 2 h, 再分别于基础培养液、基础培养液添加 TFH 或槲皮素培养 24 h; 收集细胞, 测定细胞 ALP 活性。基础培养液添加 TFH、槲皮素, 于孵育 0、2、5、15、30、60 min 6 个时间点收集细胞, ELASA 法测定磷酸化胞外信号调节激酶 (phosphorylated extracellular-regulated kinase, p-ERK) 浓度。细胞采用基础培养液培养细胞 24 h 后经基础培养液、基础培养液分别添加 E_2 、TFH、槲皮素培养细胞 30 min; 经 ER 拮抗剂处理 15 min, 再分别于基础培养液、基础培养液添加 E_2 、TFH 或槲皮素培养 30 min; 收集细胞, ELASA 法测定 p-ERK 浓度。结果表明: 1) 培养液添加 TFH、槲皮素可以显著提高 ALP 活性 ($P < 0.05$), ER 拮抗剂、MEK 抑制剂可完全阻断这 2 种黄酮的作用 ($P < 0.05$); 2) 培养液添加 TFH 在培养后 5、15 min, 槲皮素在培养后 2、5、15、30、60 min ERK 磷酸化水平显著提高 ($P < 0.05$); 3) 培养液添加 TFH、槲皮素可显著提高细胞 ERK 磷酸化水平 ($P < 0.05$), ER 拮抗剂可完全阻断这一作用 ($P < 0.05$)。结果提示: TFH、槲皮素可以显著提高 ALP 活性和 ERK 磷酸化水平, 具有雌激素样作用, 二者可能是通过 ER 途径和 ERK 途径调节 ALP 活性。

关键词: 沙棘总黄酮; 槲皮素; 成骨细胞; 碱性磷酸酶; 胞外信号调节激酶

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2011)08-1378-08

在现代动物养殖中由于使用抗生素促生长剂导致的病菌抗药性增加、使用效果变差等副作用, 以及药物残留导致的食物安全问题, 都在促使人们寻求一种可替代抗生素且安全性能优良的新一代饲料添加剂。天然植物提取物添加剂以其无毒害、无药残、安全方便、功能全面等优点越来越受到人们的重视。在沙棘、大豆、小麦等植物中含有一种多酚类物质——黄酮类化合物, 它具有广泛

的生物活性和药理活性, 可在循环、免疫、神经、内分泌等系统中发挥作用, 在食品、药品及饲料添加剂等领域已有广泛的应用, 因其来源广、效果确切和纯天然而受到人们的普遍关注。碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 是成骨细胞 (osteoblast, OB) 主要的功能活性酶, ALP 活性反应了成骨细胞的成骨活性, 其主要作用是促进骨矿化过程, 是骨形成的特异性酶。大量试验证实, 黄酮类

收稿日期: 2011-03-08

基金项目: 国家科技支撑项目 (2006BAD14802-8-1); 东北农业大学创新团队发展计划项目 (CXT006-2-1)

作者简介: 刘洪柱 (1984—), 男, 山东泰安人, 硕士研究生, 从事动物分子营养与代谢调控研究。E-mail: liu-yi1984@163.com

* 通讯作者: 李 垚, 教授, 博士生导师, E-mail: liyao1966@sina.com

化合物普遍具有调节骨代谢的作用^[1],可以提高体外培养成骨细胞 ALP 活性^[2-3],但不同植物来源的黄酮作用效果不同^[4]。沙棘总黄酮(total flavones of *Hippophae rhamnoides*, TFH)是沙棘中主要的生物活性物质,属于黄酮类化合物的一种,其主要单体成分为槲皮素(querctin)、异鼠李素(isorhamnetin)、杨梅素(myricetin)等苷类化合物^[5]。经试验证实,添加不同比例的 TFH 可明显提高爱拔益加(AA)肉鸡钙的表观消化率、饲料中钙磷的利用率,促进胫骨的发育和增加骨骼强度^[6-7]。动物内源性雌激素可以通过分布于细胞质中的雌激素受体(estrogen receptor, ER),或结合膜受体激活细胞内细胞中胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)传导通路2种方式调节细胞功能;此外,雌激素对 ERK 主要起促进作用,具有引起细胞增殖、分化以及血管扩张等生物学效应;在中脑星形胶质细胞、成骨细胞、神经胶质瘤细胞中,雌激素都能介导 ERK 的快速活化^[8]。由于黄酮类化合物的化学结构与内源性雌激素相似,推测它们对骨代谢的作用途径可能相同,目前尚未见沙棘黄酮对骨代谢作用机制的报道。本试验以体外培养的 AA 肉鸡鸡胚成骨细胞为研究对象,分别用 TFH 及槲皮素作用于体外培养的成骨细胞,探讨它们对细胞内 ALP 活性的影响,并进一步深入研究其信号转导机制,为植物提取物添加剂在动物营养中应用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 TFH 和槲皮素的制备

TFH 利用二氧化碳超临界萃取技术由沙棘叶中提取,在东北林业大学完成。通过紫外分光光度法^[9]测定沙棘叶中总黄酮的含量为 16.84%。槲皮素(纯度 $\geq 98\%$),购自美国 Sigma 公司。

1.2 试剂

β -雌二醇(β -estradiol, E_2 , 美国 Sigma 公司),胎牛血清(fetal calf serum, FBS, 杭州四季青公司),最小必需培养液(α -MEM, 无酚红)、II 型胶原酶、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司,青霉素、链霉素、二甲基亚砷(DMSO)购自美国 Amresco 公司,ALP 染液(南京建成生物工程研究所);ER 拮抗剂(ICI 182780, 英国 Tocris Cookson 公司),MEK 抑制剂(PD 98059, 德国 Calbiochem 公司)。

1.3 仪器

Model 680 型酶标仪(美国 BIO-RAD 公司), TDL-50B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司),24 孔、6 孔细胞培养板(美国 Costar 公司),DMIRB 型倒置显微镜(德国 Leica 公司)。

1.4 试验方法与设计

1.4.1 鸡胚股骨成骨细胞的原代培养及鉴定

选取 15 日龄 AA 肉鸡鸡胚(购自东北农业大学孵化场),参考张建峰^[10]的方法分离成骨细胞的,得到细胞用含 15% FBS 的 α -MEM 培养液悬浮,吹打均匀后以 2×10^7 个/mL 的密度接种于 6 孔板,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,隔天换液,细胞汇合后用 0.1% 胰蛋白酶消化传代。用第 3 代生长良好的成骨细胞进行正式试验。

将细胞接种至培养皿中,待细胞长至大部分汇合后,按试剂盒的说明的方法对成骨细胞 ALP 染色及矿化结节染色,进行细胞鉴定。

1.4.2 ALP 活性的测定

1.4.2.1 培养液配制及处理方法

基础培养液: α -MEM 含 5% FBS, 100 U/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素。

E_2 培养液:基础培养液加 20 pg/mL E_2 。

TFH 培养液:将 TFH 用 DMSO 溶解, DMSO 终浓度均为 0.2%, 分别与含 5% FBS 的 α -MEM 培养液混溶, TFH 浓度为 300 mg/L, 以 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 4 °C 保存备用。

槲皮素培养液:方法同 TFH 培养液,槲皮素浓度为 15 mg/L。

ER 拮抗剂处理:加入 1 μ mol/L ICI 182780。

MEK 抑制剂处理:加入 10 μ mol/L PD 98059。

1.4.2.2 试验设计与方法

将成骨细胞接种于 24 孔板中,接种密度与培养方法同 1.4.1,基础培养液培养 24 h 后分别进行不同的处理。

分别采用基础培养液(I组)、 E_2 培养液(II组)、TFH 培养液(III组)、槲皮素培养液(IV组)培养细胞 24 h;经 ER 拮抗剂处理 2 h,再于基础培养液(V组)、TFH 培养液(III组)和槲皮素培养液(VI组)中培养 24 h;经 MEK 抑制剂处理 2 h,再于基础培养液(VIII组)、TFH 培养液(IX组)和槲皮素培养液(X组)培养 24 h。

磷酸缓冲液(PBS)冲洗细胞 2 遍,刮下细胞,

加裂解液 [0.05% 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100)] 裂解细胞, 4 °C 离心, 取上清液待测。

每个样品加入 3 mmol/L 对硝基苯磷酸二钠 (p-nitrophenyl phosphate disodium, PNPP) 作为底物, 在 pH 10.5、37 °C 条件下孵育 30 min, 加 0.4 mol/L NaOH 终止反应, 用酶标仪检测 OD_{405 nm}, 同时以对硝基苯酚 (p-nitrophenol, PNP) 为标准品做出标准曲线, 最终计算得出 ALP 活性的具体数值。

1.4.3 ERK 磷酸化水平的测定

将成骨细胞接种于 6 孔板中, 接种密度与培养方法同 1.4.1。基础培养液培养 24 h 后换含有 TFH 培养液 (I 组)、槲皮素培养液 (II 组), 继续培养, 每组 3 个重复。于孵育 0、2、5、15、30、60 min 6 个时间点收集细胞、制备待测样品 (方法同 1.4.2), 采用 ELASA 检测试剂盒测定磷酸化胞外信号调节激酶 (phosphorylated extracellular-regulated kinase, p-ERK) 浓度。

将成骨细胞接种于 6 孔板中, 接种密度与培养方法同 1.4.1。基础培养液培养 24 h 后, 细胞分别采用基础培养液 (I 组)、E₂ 培养液 (II 组)、TFH 培养液 (III 组)、槲皮素培养液 (IV 组) 培养细胞 24 h; 基础培养液培养细胞 30 min 后经 ER 拮抗剂处理 15 min, 再分别于基础培养液 (V 组)、基础培养液添加 E₂ (VI 组)、TFH (VII 组) 或槲皮素

(VIII 组) 中培养 30 min; 每组 3 个重复。孵育后, 收集细胞、制备待测样品, 采用 ELASA 检测试剂盒测定 p-ERK。

1.5 数据分析

试验结果均以平均值 ± 标准差表示, 试验数据采用 SPSS 17.0 软件的 One-way ANOVA 进行方差分析, 采用 Duncan 氏法进行多重比较, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2 结果

2.1 成骨细胞培养及鉴定

刚分离获得的成骨细胞为圆形单核细胞, 接种培养 12 h 后, 倒置显微镜下可见贴壁生长的细胞为不规则梭形、三角形或多角形, 胞核明显, 胞质丰富; 胞浆向外伸展, 有较多突起, 部分细长突起常跨越细胞与远处的细胞突起相连接, 在细胞聚集的部位形成相对独立的细胞簇 (图 1-A); ALP 染色结果显示, 体外培养的鸡成骨细胞细胞能合成 ALP, 细胞质内有红色颗粒状物质, 有少量分散在细胞周围 (图 1-B); 矿化结节染色结果显示, 成骨细胞在维生素 C、β-甘油磷酸钠存在条件下培养 18 d 后, 可使胞外基质矿化, 并形成大量矿化结节, 茜素红染色呈红色 (图 1-C)。

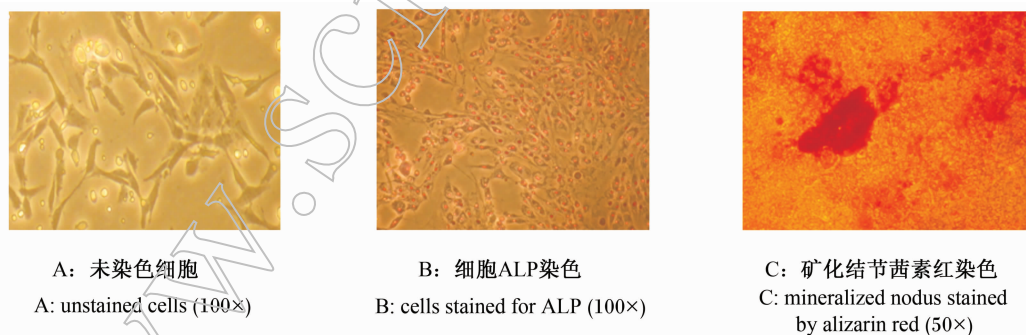


图 1 成骨细胞培养及鉴定

Fig. 1 Culture and identification of osteoblasts

2.2 TFH、槲皮素及 ER 拮抗剂、MEK 抑制剂对成骨细胞 ALP 活性的影响

由表 1 可知, 培养液中添加 TFH (III 组) 与槲皮素 (IV 组) 成骨细胞 ALP 活性显著高于基础培养液 (I 组) 成骨细胞 ($P < 0.05$), 但均显著低于培养液添加 E₂ (II 组) 的细胞 ($P < 0.05$); ER 拮

抗剂、MEK 抑制剂处理的细胞 ALP 活性与基础培养液 (I 组) 成骨细胞无显著差异 ($P > 0.05$); 培养液添加 TFH 经 ER 拮抗剂 (VI 组) 或 MEK 抑制剂处理 (IX 组) 的细胞 ALP 活性显著低于仅在培养液添加 TFH (III 组) 的细胞 ($P < 0.05$), 培养液添加槲皮素的各组为同样变化规律。

表1 TFH、槲皮素及ER拮抗剂、MEK抑制剂对成骨细胞ALP活性的影响

Table 1 Effects of TFH, quercetin, ER antagonist and MEK inhibitor on ALP activity of osteoblasts U/L

项目 Items	组别 Groups									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
ALP 活性	0.052 ±	0.178 ±	0.084 ±	0.094 ±	0.046 ±	0.037 ±	0.043 ±	0.053 ±	0.037 ±	0.052 ±
ALP activity	0.008 ^c	0.008 ^a	0.011 ^b	0.008 ^b	0.002 ^c	0.003 ^c	0.003 ^c	0.009 ^c	0.006 ^c	0.006 ^c

同行肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。表3同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$). The same as in Table 3.

2.3 TFH、槲皮素在不同孵育时间对成骨细胞 ERK 磷酸化水平的影响

由表2可知,培养液添加TFH(I组)在孵育5、15 min时较0 min细胞ERK的磷酸化水平显著

提高 ($P < 0.05$), 15 min时达最大值;培养液添加槲皮素(II组)在孵育2、5、15、30、60 min时同0 min比较,ERK磷酸化水平显著提高 ($P < 0.05$), 在60 min达最大值。

表2 TFH、槲皮素在不同孵育时间对成骨细胞ERK磷酸化水平的影响

Table 2 Effects of TFH and quercetin on ERK phosphorylation level of osteoblasts after different incubation time pmol/L

项目 Items	孵育时间 Incubation time/min	组别 Groups	
		I	II
p-ERK 浓度 Concentration of p-ERK	0	2.500 ± 0.911 ^b	2.500 ± 0.911 ^d
	2	4.561 ± 1.674 ^{ab}	5.198 ± 0.163 ^c
	5	6.283 ± 2.493 ^a	6.054 ± 0.408 ^{bc}
	15	7.889 ± 0.316 ^a	5.557 ± 0.298 ^c
	30	5.435 ± 1.335 ^{ab}	7.276 ± 0.128 ^{ab}
	60	4.627 ± 0.503 ^{ab}	7.522 ± 1.008 ^a

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$).

2.4 TFH、槲皮素及ER拮抗剂对成骨细胞ERK磷酸化水平的影响

由表3可知,细胞孵化30 min后,与基础培养液相比较,培养液添加TFH、槲皮素及E₂可显著提高ERK的磷酸化水平 ($P < 0.05$), 细胞经ER

拮抗剂处理无显著影响 ($P > 0.05$), 培养液添加TFH经ER拮抗剂处理(VII组)的细胞ERK的磷酸化水平显著低于仅培养液添加TFH(III组)的细胞 ($P < 0.05$); 培养液添加槲皮素的各组为同样变化规律。

表3 TFH、槲皮素及ER拮抗剂对成骨细胞ERK磷酸化水平的影响

Table 3 Effects of TFH, quercetin and ER antagonist on ERK phosphorylation level of osteoblasts pmol/L

项目 Items	组别 Groups							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
p-ERK 浓度	2.500 ±	6.655 ±	5.435 ±	7.276 ±	1.754 ±	4.346 ±	1.912 ±	2.152 ±
Concentration of p-ERK	0.911 ^{cd}	0.819 ^a	1.335 ^{ab}	0.128 ^a	0.175 ^d	0.737 ^{bc}	0.409 ^d	1.592 ^d

3 讨论

3.1 成骨细胞的培养与鉴定

本试验采用酶消化方法获取的成骨细胞为贴

附生长型细胞, 细胞的形态类似于体内生长的成纤维细胞, 贴壁细胞开始多呈不规则三角形、梭形或多角形, 具有数个细胞突起, 胞核明显。但培养细胞的形态不能作为鉴别细胞类型的主要特征标

志。ALP 的特异性分泌和体外矿化能力是鉴定体外培养成骨细胞的重要生物学指标。分化早期的成骨细胞开始表达 ALP^[11],其表达随着细胞的分化逐步增强,其作用是水解磷酸盐以释放出无机磷,增加其局部浓度,促进基质矿化。ALP 染色结果显示,成骨细胞分化程度较为均一,80%~90%的细胞染色呈阳性,酶活性部位呈红色颗粒状,均匀分布于胞浆,细胞核阴性,证实本试验获得的细胞具有 ALP 活性。成骨细胞在含有维生素 C 及 β -甘油磷酸钠的培养基内生长 18 d 后,维生素 C 能促进成骨细胞合成 I 型胶原,而结节细胞中的高活性 ALP,能催化底物 β -甘油磷酸钠的磷酸键断裂,提高了培养基中磷浓度,促进钙磷沉积在胶原形成的基质中^[12]产生独特的矿化结节,镜下观察为不透明区域,用茜素红染色证实此结节为钙化区。本试验中的培养细胞可在体外产生钙化现象,矿化结节染色呈阳性反应,进一步证实所培养细胞为成骨细胞,结果与卓丽玲等^[13]报道的一致。

3.2 TFH、槲皮素对 ALP 活性的影响

成骨细胞是骨形成和骨代谢过程的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化。ALP 是成骨细胞的主要功能活性酶,富含于胞浆中,在分化早期,ALP 活性反应了成骨细胞的成骨活性,ALP 可水解有机磷酸释放出无机磷,相对增加局部无机磷浓度,用于羟磷灰石的形成,促进矿化过程,是骨形成的特异性酶。因此,定量测定 ALP 活性对反映成骨细胞的分化程度、功能状态以及骨形成状况具有重要意义。

ALP 可以催化底物 PNPP 生成 PNP,因此定量测定 PNP 的含量可间接反应 ALP 活性。邓益锋等^[14]在培养基中添加不同浓度的雌激素培养鸡胚成骨细胞 24 h 后,20 pg/mL E_2 组的 ALP 活性显著高于对照组;本试验培养液中添加 20 pg/mL E_2 ,细胞 ALP 活性显著提高,2 个试验结果一致。Prouillet 等^[15]在人骨肉瘤细胞系 MG-63 细胞株培养液中加入 50 μ mol/L 槲皮素,24、48 h 后与对照组比较,ALP 活性显著提高;范媛媛^[2]报道,1 $\times 10^{-6}$ mol/L 大豆异黄酮可显著提高体外培养 2、4 d 的大鼠成骨细胞 ALP 活性;Kanno 等^[16]对 MC3T3-E1 鼠成骨细胞模型的研究发现,大豆黄酮可以增加细胞 ALP 活性和钙、磷含量,促进细胞的

矿化;本试验中,细胞培养 24 h 后 TFH、槲皮素都可显著提高 ALP 活性,TFH 与大豆异黄酮同属黄酮类化合物,其结构与 E_2 相似,推测二者都是通过提高 ALP 活性来促进骨的生成。

3.3 TFH、槲皮素对 ALP 活性的作用机制

ER 属于甾体激素受体家族,有 2 种亚型,ER α 和 ER β ,在成骨细胞中共同表达 ER α 和 ER β ,提示具有雌激素样作用的 TFH 与单体槲皮素可直接作用于细胞,哪一种亚型是成骨细胞优势表达的受体亚型,目前尚无定论。Kuiper 等^[17]报道,一些黄酮类化合物(如:槲皮素、山奈酚)具有结合 ER 2 种亚型的能力,将它们称为植物雌激素;Prouillet 等^[15]研究发现槲皮素可以通过 ER 途径调节 MG-63 成骨细胞 ALP 活性。在本试验中,TFH、槲皮素对 ALP 活性的提高作用可被 ER 拮抗剂完全阻断,说明二者也可能是通过结合 ER 来调节鸡成骨细胞 ALP 活性的。

ERK 信号转导通路属于丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase,MAPK)通路家族中的一员。MEK 是 MAPK 通路上游的激酶,MEK 可以磷酸化 MAPK,磷酸化的 MAPK 被激活,然后将信号传递至细胞核中,调节基因表达。MEK 抑制剂可以通透细胞,选择性抑制 MEK,进而抑制下游激酶 ERK 的磷酸化。Hsu 等^[18]报道丁香亭(由葡萄中提取的一种黄酮衍生物)是通过 ERK 途径,提高 ALP 活性来诱导人成骨细胞分化;Prouillet 等^[15]研究发现槲皮素可以通过 ERK 途径调节 MG-63 成骨细胞 ALP 活性。在本试验中,TFH、槲皮素对 ALP 活性的提高作用可被 MEK 抑制剂完全阻断,这提示 TFH、槲皮素调节鸡成骨细胞 ALP 活性也需要通过 ERK 途径。Prouillet 等^[15]报道槲皮素可在几分钟内提高 MG-63 成骨细胞 ERK 的磷酸化水平,因此本试验又进一步研究了 TFH、槲皮素对 ERK 磷酸化的影响。试验设计参考 Prouillet 等^[15]的试验方法,用 TFH、槲皮素作用细胞 2、5、15、30、60 min 后,结果表明二者在几分钟内可以迅速提高成骨细胞 ERK 磷酸化水平。TFH、槲皮素对 ERK 磷酸化水平的提高是二者激活 ERK 信号转导通路,进而影响 ALP 活性的直接证据。

雌激素参与调控机体多种生理功能与病理过程的作用方式有 2 种,经典的作用模式是雌激素

与 ER 结合,通过靶基因上游的雌激素反应元件 (estrogen reactive element, ERE) 调控靶基因的转录,需要雌激素与 ER 形成复合体后转移至细胞核才能发挥作用。有研究表明,除经典的基因组作用模式外,雌激素还存在非基因组作用模式,这种作用模式不需要雌激素进入细胞核,而是通过分布于细胞膜的 ER,激活细胞内信号级联放大反应,并且可以在短时间内发挥作用。据 Zhang 等^[19] 等研究,雌激素结合膜上的 ER 后可以激活 MAPK 途径。在本试验中,TFH、槲皮素激活 ERK 途径是否由 ER 介导,为此试验研究了 ER 拮抗剂对 ERK 磷酸化水平的影响。在上述 TFH、槲皮素于不同处理时间对 ERK 磷酸化影响的试验中,二者在几分钟内可以迅速提高 ERK 的磷酸化水平,基本符合雌激素的非基因组作用模式,说明不同处理时间的设计是基本合理的;而且作用 30 min 时可较大提高 ERK 的磷酸化水平,因此将 30 min 作为添加 ER 拮抗剂的最佳时间来探讨 ERK 途径与 ER 的关系。结果显示,ER 拮抗剂可完全阻断 TFH、槲皮素对 ERK 磷酸化水平的提高作用,推测二者对 ALP 的影响可能不是通过雌激素的经典作用模式,而是先结合定位于膜上的 ER,然后由 ER 介导快速激活 ERK 途径,将信号传至核内促进 ALP 的表达。

ERK 被 ER 激活后,可以活化下游的转录因子[如类雌激素蛋白 1 (Ets-like protein 1, ELK1)、激动蛋白 1 (active protein, AP-1)、环单磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB)],促进基因转录。Peverali 等^[20] 报道在人的 ALP 基因启动子中发现了 AP-1 结合位点,推测转录因子(如: AP-1)可能是成骨细胞中 ERK 通路下游的作用靶点、ERK 快速活化与提高 ALP 活性的联系纽带。但是 TFH、槲皮素与 ER 的哪个亚型具有结合优势,ERK 通路的下游转录因子及哪种转录因子促进了 ALP 基因的表达都尚需进一步研究。

4 结论

TFH 及其单体槲皮素具有弱的雌激素样作用,可以提高鸡胚成骨细胞 ALP 活性;二者的作用途径可能是先结合膜上的 ER,而后由 ER 介导快

速激活 ERK 信号转导通路,活化下游转录因子,启动基因表达,进而影响 ALP 活性。

参考文献:

- [1] 史琳娜,苏宜香. 大豆异黄酮类对去卵巢大鼠骨丢失的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(2): 113 - 117.
- [2] 范媛媛. 大豆异黄酮对体外培养成骨细胞作用的实验研究[D]. 硕士学位论文. 天津: 天津医科大学, 2007.
- [3] 潘永梅. 异黄酮类植物雌激素对大鼠成骨细胞生物活性影响的实验研究[D]. 硕士学位论文. 石家庄: 河北医科大学, 2006.
- [4] 张力, 郑中朝, 田青, 等. 大豆异黄酮对樱桃谷鸭钙磷代谢的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2006, 41(6): 1 - 5.
- [5] 高锦明, 张鞍灵, 李芸生, 等. 沙棘黄酮化学研究的进展[J]. 沙棘, 1998, 11(2): 34 - 40.
- [6] 李垚, 王宝东, 王艳波, 等. 沙棘黄酮对 AA 肉鸡生长性能和内分泌的影响[J]. 中国家禽, 2008, 30(2): 13 - 15.
- [7] 陈鑫, 李垚, 赵伟, 等. 沙棘叶总黄酮对 AA 肉鸡饲料中钙磷利用率和胫骨发育的影响[J]. 中国饲料, 2010(8): 30 - 33.
- [8] IVANOVA T V, IVANOV V N, NADEZHINA E S. Transcription factors NF-kappaB and AP-1/c-fos in cell response to nocodazol[J]. Membrane & Cell Biology, 2001, 14(6): 727 - 741.
- [9] 赵二芳, 张敬, 吕晶, 等. 可见与紫外光度法测定沙棘叶中总黄酮的比较[J]. 沙棘, 2008, 21(2): 22 - 23.
- [10] 张建峰. 鸡 IGF- I 对成骨细胞功能的影响及其基因多态性与蛋鸡骨代谢相关性的研究[D]. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2002.
- [11] RODAN G A. Introduction to bone biology bone[J]. Bone, 1992, 13 (Suppl. 1): S3 - S6.
- [12] 李勇, 季晖, 李萍. 淫羊藿总黄酮对体外培养成骨细胞的影响[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(1): 48 - 50.
- [13] 卓丽玲, 顾建红, 赵瑞英, 等. 乳鼠成骨细胞的培养及鉴定[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(10): 901 - 904.
- [14] 邓益锋, 陈秀霞, 侯加法. 雌激素鸡胚成骨细胞增殖、凋亡及其 ALP 活性的影响[C]//中国畜牧兽医学学会 2008 年学术年会暨第六届全国畜牧兽医青年

科技工作者学术研讨会论文集. 北京:中国畜牧兽医学学会,2008.

- [15] PROUILLET C, MAZIERE J C, MAZIERE C, et al. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2004, 67(7):1307-1313.
- [16] KANNO S, HIRANO S, KAYAMA F. Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells[J]. *Toxicology*, 2004, 196(1):137-145.
- [17] KUIPER G G, LEMMEN J G, CARLSSON B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with receptor beta[J]. *Endocrinology*, 1998, 139(10):4252-4263.
- [18] HSU Y L, LIANG H L, HUNG C H, et al. Syringetin, a flavonoid derivative in grape and wine, induces human osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009, 53(11):1452-1461.
- [19] ZHANG Z, MAIER B, SANTEN R J, et al. Membrane association of estrogen receptor alpha mediates estrogen effect on MAPK activation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 28(5):926-933.
- [20] PEVERALI F A, BASDRA E K, PAPAVALASSIOU A G. Stretch-mediated activation of selective MAPK subtypes and potentiation of AP-1 binding in human osteoblastic cells[J]. *Molecular Medicine*, 2001, 7(1):68-78.

WWW.SCIENCE-TRUTH.COM

Mechanisms of Action for Total Flavones of *Hippophae Rhamnoides* and Quercetin on Alkaline Phosphatase Activity in Chicken Osteoblasts

LIU Hongzhu LI Yao* CHEN Xin ZHAO Wei ZHANG Lixin OUYANG Wenwen LIU Hongnan
(Institute of Animal Nutrition, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The experiment was conducted to study the effects of total flavones of *Hippophae rhamnoides* (TFH) and quercetin on alkaline phosphatase (ALP) activity in osteoblasts of arbor acres (AA) broilers' embryo *in vitro* and its mechanisms of action. Cells were cultured in basal culture medium, basal culture medium supplemented with β -estradiol (E_2), TFH and quercetin for 24 h, respectively; after treated by estrogen receptor (ER) antagonist for 2 h, the cells were cultured for another 24 h in basal culture medium, basal culture medium supplemented with TFH and quercetin, respectively; after treated with extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor for 2 h, the cells were cultured for another 24 h in basal culture medium, basal culture medium supplemented with TFH and quercetin, respectively; the cells were collected for the analysis of ALP activity. Cells were cultured in basal culture medium supplemented with TFH or quercetin, and collected at six time points (0, 2, 5, 15, 30, 60 min) for the determination of phosphorylated extracellular-regulated kinase (p-ERK) concentration by ELASE. Cells were cultured in basal culture medium, basal culture medium supplemented with E_2 , TFH or quercetin for 30 min, respectively; after treated by ER antagonist for 15 min, the cells were cultured for 30 min in basal culture medium, basal culture medium supplemented with E_2 , TFH and quercetin, respectively; cells were collected for the determination of p-ERK concentration by ELASE. The results showed as follows: 1) culture medium supplemented with TFH or quercetin significantly increased the ALP activity ($P < 0.05$), and the effects of which were totally prevented by ER antagonist and MEK inhibitor ($P < 0.05$); 2) the phosphorylation level of ERK were significantly increased in culture medium supplemented with TFH after 5, 15 min incubation and with quercetin after 2, 5, 15, 30, 60 min incubation ($P < 0.05$); 3) culture medium supplemented with TFH or quercetin significantly increased the phosphorylation level of ERK, the effects of which were totally prevented by ER antagonist ($P < 0.05$). The results indicate that TFH and quercetin can significantly increase the ALP activity and ERK phosphorylation level, exert the estrogen-like effect, and may adjust the ALP activity via ERK and ER pathways. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23 (8): 1378-1385]

Key words: total flavones of *Hippophae rhamnoides*; quercetin; osteoblast; alkaline phosphatase; extracellular signal-regulated kinase