

# 水翁花提取物的PPAR 配体活性鉴定

金晓辉<sup>1,2,3</sup>, 魏孝义, 黄志伟, 吴东海\*

(1. 中国科学院华南植物园, 广东广州510650; 2. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广东广州510663; 3. 中国科学院研究生院, 北京100049)

**摘要** [目的] 鉴定水翁花提取物2,4-二羟基-6-甲氧基-3,5-二甲基查耳酮(DMC)的PPAR配体结合活性及其特点。[方法] 用GAL4嵌合体报告基因试验检测DMC的PPAR配体结合活性; 用油红O染色法检测DMC对3T3-L1前脂肪细胞分化的影响; 用<sup>3</sup>H]-2-脱氧葡萄糖摄取试验检测DMC对3T3-L1脂肪细胞葡萄糖摄取的影响; 用荧光实时定量PCR检测经DMC处理的3T3-L1脂肪细胞中PPAR靶基因的表达情况。[结果] DMC能以剂量依赖型的方式对PPAR产生激活作用, 促进脂肪细胞的分化, 显著提高脂肪细胞的葡萄糖摄取率, 并且提高脂肪细胞中一些PPAR靶基因的表达量。[结论] DMC能通过激活PPAR促进脂肪细胞的葡萄糖摄取。

**关键词** 水翁花; PPAR; 葡萄糖摄取

中图分类号 S571.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-09106-04

## Identify and Characterize the PPAR Ligand-binding Activity of Extracts of *Cleistocalyx Operculatus*

JIN Xiaohui et al (South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650)

**Abstract** [Objective] To identify and characterize the peroxisome proliferator-activated receptor- (PPAR) ligand-binding activity of 2,4-dihydroxy-6-methoxy-3,5-dimethylchalcone, a chalcone derivative extracted from the dried flower of *Cleistocalyx operculatus*. [Method] The PPAR-transactivation activity of DMC was examined by using a GAL4 hybrid reporter gene assay. The effect of DMC on adipogenesis was measured by oil red O staining. The glucose uptake rate was measured by using [<sup>3</sup>H]-2-deoxy glucose in 3T3-L1 adipocytes after treatment with DMC. The effect of DMC on expression of PPAR target genes in differentiated 3T3-L1 adipocytes was examined by real-time PCR. [Results] DMC can selectively activate PPAR with a dose-dependent manner. Result of oil red O staining showed that DMC can promote adipocyte differentiation. DMC can also strongly enhance glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Furthermore, the result of real-time PCR showed the DMC can modulate some PPAR-responsive genes in differentiated 3T3-L1 adipocytes. [Conclusion] Our data establish DMC as a natural PPAR ligand with capability of promoting glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes.

**Key words** *Cleistocalyx operculatus*; PPAR; Glucose uptake

过氧化物酶体增长因子活化受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)是一类由配体激活的核转录因子,属于核受体超家族成员。目前已发现PPAR存在3种亚型,分别为PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 和PPAR $\gamma$ ,其中PPAR $\gamma$ 主要存在于脂肪组织中<sup>[1]</sup>。由于PPAR $\gamma$ 是调节胰岛素信号转导和糖脂代谢等的关键因子<sup>[2]</sup>,也是治疗心血管疾病、糖尿病以及多种癌症的主要靶分子,因而,近年来PPAR $\gamma$ 的配体成了抗糖尿病药物研究的热点。

水翁花为桃金娘科植物水翁[*Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr. et Perry]的干燥花蕾,具有清热解毒、祛暑生津、消滞利湿的功效<sup>[3]</sup>,也是我国南方地区凉茶的主要原料之一。水翁花提取物的主要成分为有机酸和黄酮类,其中黄酮类包括5,7-二羟基-6,8-二甲基黄烷酮、7-羟基-5-甲氧基-6,8-二甲基黄烷酮和2,4-二羟基-6-甲氧基-3,5-二甲基查耳酮<sup>[3]</sup>。我们通过GAL4嵌合体报告基因试验对包括水翁花的黄酮类提取物在内的40多种天然化合物进行筛选,发现1种水翁花的黄酮类提取物,即2,4-二羟基-6-甲氧基-3,5-二甲基查耳酮(2,4-dihydroxy-6-methoxy-3,5-dimethylchalcone, DMC)(图1)具有明显的PPAR配体结合活性。在此基础上,笔者通过一系列体外试验对DMC的作用机制进行了进一步的探讨。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

**1.1.1 药品和主要试剂。**DMC由中国科学院华南植物园提供(溶于DMSO中保存);罗格列酮为葛兰素史克有限公司产品(溶于DMSO中保存);DMSO为AMRESCO公司产品;脂质

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30670457);国家973计划资助项目(2004CB720102)。

作者简介 金晓辉(1978-),男,浙江温州人,硕士研究生,研究方向:代谢疾病的分子机理。\*通讯作者。

收稿日期 2008-05-04

体(Lipofectamine 2000)、高糖DMEM培养基、OPTI-MEM培养基以及胎牛血清(FBS)均为invitrogen公司产品;双荧光素酶检测试剂盒和逆转录试剂盒为Promega公司产品;胰岛素、地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMX)以及油红O均为Sigma公司产品;<sup>3</sup>H-2-脱氧葡萄糖购自中国同位素总公司;Tizol试剂、SYBR Premix Ex Taq和RNase free dH<sub>2</sub>O均为宝生物(大连)有限公司产品。

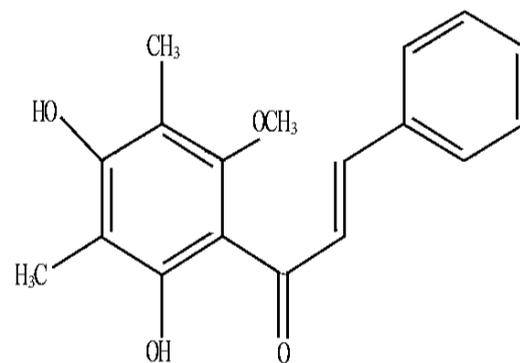


图1 DMC的结构式2,4-二羟基-6-甲氧基-3,5-二甲基查耳酮

Fig. 1 Structure of DMC: 2,4-dihydroxy-6-methoxy-3,5-dimethylchalcone

**1.1.2 细胞和质粒。**293T细胞、3T3-L1细胞购自ATCC公司;萤火虫荧光素酶(Firefly-Luc)报告基因质粒pFR-Luc为Stratagene公司产品;海肾荧光素酶(Renilla-Luc)报告基因质粒pRL-TK-Renilla为Promega公司产品;PPAR表达质粒(GAL4-PPAR-LBD)由中国科学院广州生物医药与健康研究院黄志伟研究组构建得到。

**1.1.3 主要仪器。**美国Turner Biosystems公司荧光照度计Veritas Microplate luminometer;美国BIOTEK公司Synergy HT酶标仪;美国Perkin Elmer公司TRI-CARB 2800TR液体闪烁分析仪;美国bio-rad公司4-color Real-time PCR System荧光实时定量PCR仪。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 GAL4嵌合体报告基因试验。**将对数生长期的293T

细胞以每孔  $1.5 \times 10^4$  个接种于96孔培养板,培养过夜,细胞长到80%~90%满时用于转染。用OPTI-MEM培养基分别稀释Lipofectamine 2000(体积比是0.5:100)和质粒DNA,将稀释后的脂质体和质粒DNA以等体积混合,室温放置20 min后对细胞进行瞬时共转染,转染的质粒DNA用量分别为: GAL4-PPAR-LBD 每孔25 ng, pFR-Luc 每孔50 ng, pRL-TK-Renilla 每孔5 ng。转染后孵育4 h再加药,试验组加入浓度从1 nmol/L到10  $\mu$ mol/L的DMC,正常对照组加入同样体积的DMSO,加药24 h之后检测荧光素酶活性,分别用荧光照度计读取Firefly-luc与Renilla-luc的荧光值,以Firefly-luc与Renilla-luc的比值作为活性测定结果。

**1.2.2 3T3-L1前脂肪细胞的诱导分化。**3T3-L1前脂肪细胞培养于10%FBS高糖DMEM,培养条件为37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>。细胞生长至完全融合后2 d,换成诱导液(含200 nmol/L胰岛素、1  $\mu$ mol/L地塞米松、0.5 nmol/L IBMX)的10%FBS高糖DMEM诱导2 d,然后换成含200 nmol/L胰岛素的10%FBS高糖DMEM继续诱导2 d,之后换成10%FBS高糖DMEM,隔天换液1次。

**1.2.3 油红O检测DMC对3T3-L1前脂肪细胞分化的影响。**24孔板培养的3T3-L1前脂肪细胞生长至完全融合后2 d,换成诱导液(含200 nmol/L胰岛素、1  $\mu$ mol/L地塞米松)的10%FBS高糖DMEM培养,同时每孔分别加入终浓度为1.5和10  $\mu$ mol/L的DMC,加DMSO的孔作为正常对照,诱导3 d后,换成含200 nmol/L胰岛素的10%FBS高糖DMEM。2 d后进行油红O染色:吸去全部培养基,PBS洗涤1次,用10%甲醛将细胞固定24 h,弃去固定液,用60%异丙醇洗涤1次,等细胞充分干燥后加入油红O溶液,室温下染色30 min,弃去染色剂,用dH<sub>2</sub>O洗涤4次,干燥后用100%异丙醇萃取,萃取后的染液转移到新的24孔板,用酶标仪读取A<sub>500 nm</sub>的值。

**1.2.4 3T3-L1脂肪细胞的葡萄糖摄取试验。**将24孔培养板中诱导后8 d的3T3-L1脂肪细胞分别用5  $\mu$ mol/L的DMC和5  $\mu$ mol/L的罗格列酮处理48 h,DMSO处理的细胞作为正常对照。在进行葡萄糖摄取试验之前,将细胞换成含0.1%FBS的DMEM培养基饥饿培养2 h,洗去培养基,PBS洗涤细胞3次,换成含2%BSA的KRH缓冲液(20 mmol/L HEPES, pH值7.4;136 mmol/L NaCl;4.7 mmol/L KCl;1.25 mmol/L MgSO<sub>4</sub>;1.25 mmol/L CaCl<sub>2</sub>)37 $^{\circ}$ C孵育30 min。将细胞分为2组,一组加入终浓度为200 nmol/L的胰岛素继续37 $^{\circ}$ C孵育30 min,另一组不加胰岛素继续37 $^{\circ}$ C孵育30 min,随后每孔加入20  $\mu$ l含1.6  $\mu$ G [<sup>3</sup>H]-2-脱氧葡萄糖的2-脱氧葡萄糖混和液,37 $^{\circ}$ C孵育10 min后迅速吸去孵育液,冰冷PBS洗涤细胞3次,室温下等细胞充分干燥后用闪烁液吹打裂解细胞,将裂解液转移到5 ml闪烁管中,用液体闪烁分析仪读取CPM值。

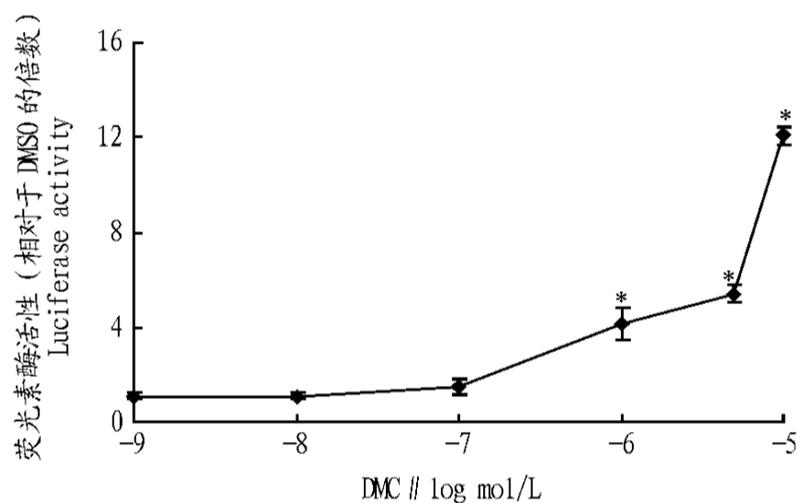
**1.2.5 总RNA的提取、cDNA合成以及荧光实时定量PCR试验。**将12孔培养板中诱导后6 d的3T3-L1脂肪细胞分别用1  $\mu$ mol/L的DMC和1  $\mu$ mol/L的罗格列酮以及DMSO处理24 h,用Trizol法提取细胞的总RNA。总RNA提取产物经凝胶电泳鉴定,用紫外分光光度计检测浓度。取每个样品的RNA 2  $\mu$ g逆转录成cDNA。荧光实时定量PCR的热循环条件为:首先95 $^{\circ}$ C变性5 min,然后95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,70 $^{\circ}$ C 1 s

循环40次。检测的基因包括:PPAR、aP2(adipocyte fatty acid binding protein)、PEPCK(phosphoenol pyruvate carboxylase)、LPL(lipoprotein lipase)、C/EBP(CAAT/enhancer binding protein)、CD36、CAP(c-clb associated protein)、IRS2(insulin receptor substrate 2)以及作为内参照的GAPDH,所用的引物由上海英骏生物技术有限公司合成,引物序列见表1,试验结果用待测基因与GAPDH的相对比值表示。

表1 定量PCR的引物序列

Table 1 Primer sequence of real-time PCR

基因Gene	5'引物5' primer(5 to 3)	3'引物3' primer(5 to 3)
PPAR	AGTGIGAAATACAGCAAATCT	TTCGCTGATCCACTGC
aP2	GAATTCGATGAAATCACCAGCA	CCTTTATGTGGGTCACCTTCCA
PEPCK	TCATCATACCCAAGAGCAAAG	CTTTCATGCACCCCTCGAAAT
LPL	GGCTAACCCAGGGTGAGGAA	TGTTTCCTCCCTGATGTCCTC
C/EBP	CCAAGAAGTCGGTGGACAAGA	CCGTCATGTGACCTGGTCAACT
CD36	TCCAGCCAATGCCCTTTC	TGGAGATTACTTTTCAGTCCAGAA
CAP	GGATACATCGACCTGCCCTTATC	TTCAGGTTGCTGTGGCTC
IRS2	GTCTAAGGTCATCCGTCCAGA	GGGATATAGTTGAGCCCGTTC
GAPDH	AAGAAGGTCGTGAAGCAGCC	TCCACCACCCCTGTGCTGTA

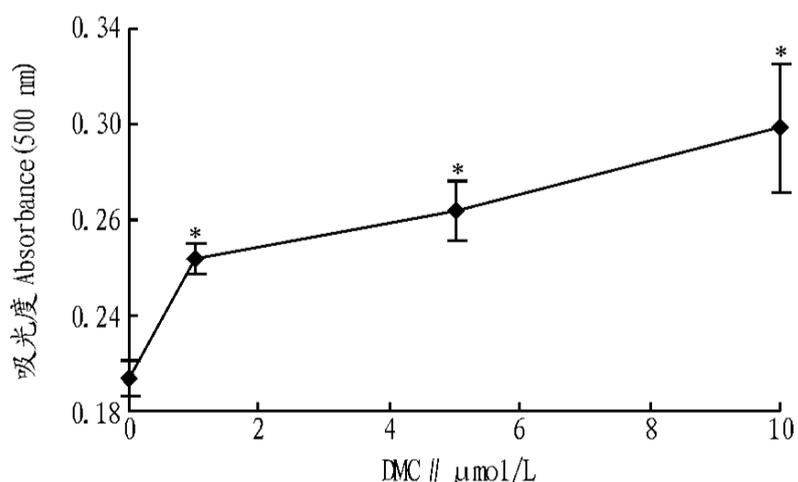


注:与DMSO处理的293T细胞相比,P < 0.05

Note: Compared with 293T cell in DMSO treatment, P < 0.05.

图2 293T细胞GAL4-PPAR-LBD嵌合体反式激活试验中DMC对PPAR配体结合区活性的影响

Fig.2 Effects of DMC on PPAR ligand-binding activity in GAL4-PPAR-LBD transactivation assay in 293T cell



注:与DMSO处理的3T3-L1脂肪细胞相比,P < 0.05

Note: Compared with 3T3-L1 adipocytes in DMSO treatment, P < 0.05.

图3 DMC在3T3-L1前脂肪细胞中对脂肪生成的影响

Fig.3 Effects of DMC on adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes

**1.3 统计学处理** 试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 13.0进行统计学处理。组间差异显著性采用单因素方差分析,P < 0.05表示有显著差异。

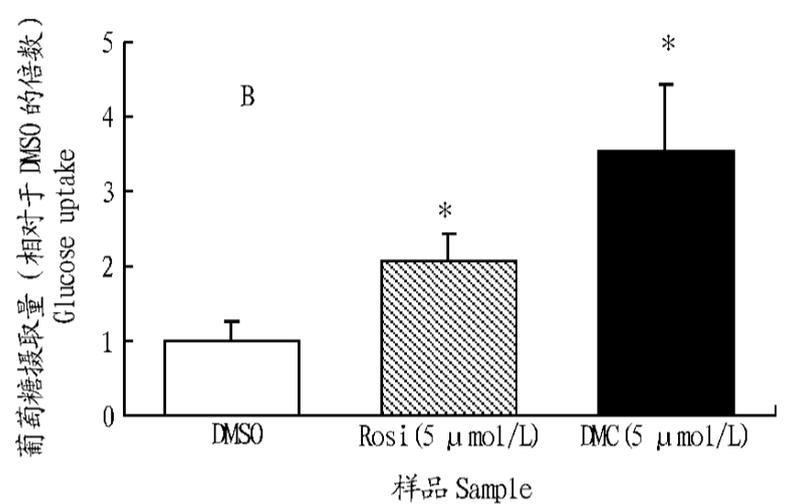
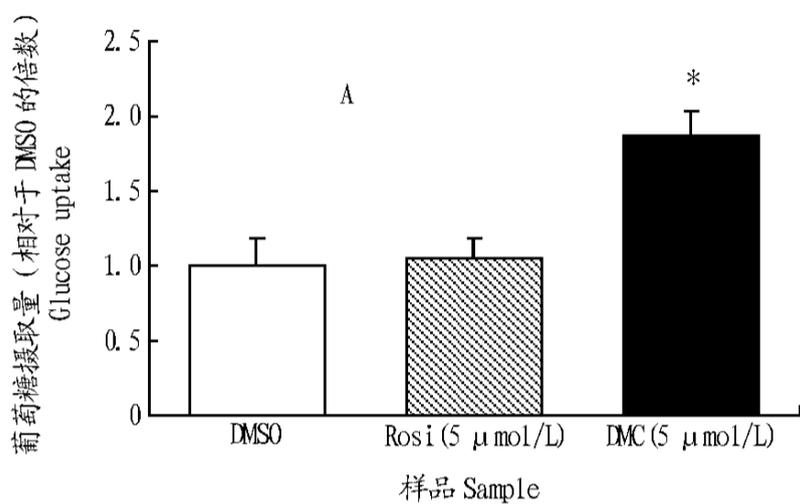
## 2 结果与分析

### 2.1 DMC具有PPAR的配体结合活性 293T细胞的

GAL4-PPAR-LBD 嵌合体报告基因试验结果显示了 DMC 能以剂量依赖型的方式激活 PPAR (图2), DMC 作用的半数最大效应浓度( $EC_{50}$ ) 约为  $5 \mu\text{mol/L}$ , 在 DMC 浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  时报告基因活性达到了最大值, 约为 DMSO 对照组的 12 倍。

**2.2 DMC 能促进 3T3-L1 前脂肪细胞的分化**  $A_{500\text{nm}}$  的数值代表了细胞中的甘油三酯含量, 如图3所示, 分化过程中用 DMC 处理的细胞的甘油三酯含量明显高于用 DMSO 处理的正常对照组, 且随着 DMC 浓度的提升, 甘油三酯含量也随之增加。表明了 DMC 能促进 3T3-L1 前脂肪细胞的分化, 且作用方式呈量效关系。

**2.3 DMC 能显著促进 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖摄取** 如

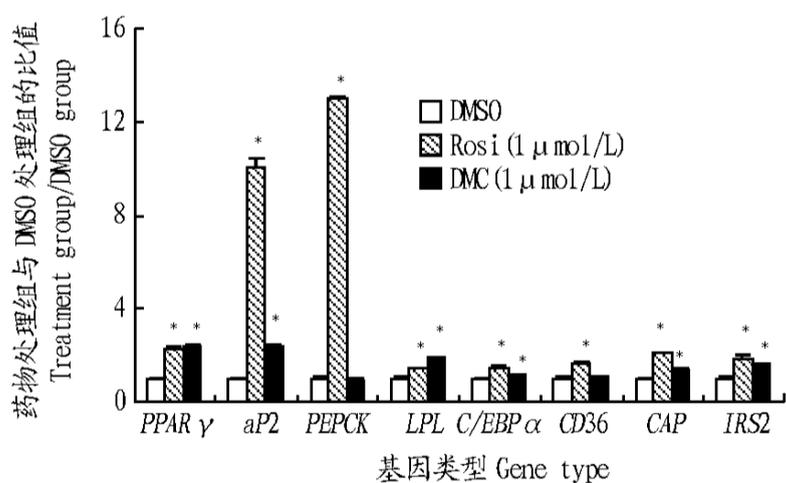


注:A: 细胞在葡萄糖摄取试验之前不加胰岛素刺激; B: 细胞在葡萄糖摄取试验之前加胰岛素刺激。与 DMSO 处理的 3T3-L1 脂肪细胞相比,  $P < 0.05$ 。

Note: A. Cells without stimulation of insulin before glucose uptake assay. B. Cells stimulated with insulin before glucose uptake assay. Compared with 3T3-L1 adipocytes in DMSO treatment,  $P < 0.05$ .

图4 DMC 在 3T3-L1 脂肪细胞中对葡萄糖摄取的影响

Fig. 4 Effect of DMC on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes



注: 与 DMSO 处理的 3T3-L1 脂肪细胞相比,  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with 3T3-L1 adipocytes in DMSO treatment,  $P < 0.05$ .

图5 DMC 干预的 3T3-L1 脂肪细胞中的基因表达情况。

Fig. 5 Gene expression of 3T3-L1 adipocytes under DMC

### 3 讨论

PPAR 与配体结合而被激活后, 能与维甲酸类受体 X (retinoid X receptor, RXR) 形成异二聚体, 作用于靶基因上游的 PPAR 反应元件 (PPAR-responsive element, PPRE), 从而调节目的基因的转录。PPRE 存在于多种与糖脂代谢有关的基因中, 如 aP2、LPL、PEPCK 等, 这些 PPAR 靶基因直接或间接参与许多病理和生理过程, 如能量平衡、细胞分化、糖脂代谢、改善胰岛素抵抗等。因此, 以 PPAR 为靶点的化合物已成为改善胰岛素抵抗从而治疗 2 型糖尿病的药物开发的热点。噻烷二酮 (TZD) 类药物, 如罗格列酮和吡格列酮等, 是

图4所示, 在不加胰岛素或加  $200 \text{ nmol/L}$  短效胰岛素的情况下, DMC 都能显著提高 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖摄取量, 相对于 DMSO 处理的正常组, 2 个 DMC 处理组的葡萄糖摄取量分别达到了 186% 和 353%, 并且都超过了罗格列酮处理组。

**2.4 DMC 能提高一些 PPAR 靶向基因的表达量** 如图5所示, DMC 能提高 PPAR、aP2、LPL、C/EBP、CAP 和 IRS2 的表达量, 其中 PPAR 和 aP2 的表达量都超过正常组的 2 倍, 但是 aP2 的表达量明显低于罗格列酮组。同时也发现, DMC 不能提高 PEPCK 的表达量, 对 CD36 的表达量的提高也不具统计学意义。

目前以 PPAR 为靶点的治疗 2 型糖尿病的代表药物。但是这些药物在临床应用上通常会带来体重增加、浮肿、增加充血性心力衰竭的机率等<sup>[4]</sup> 不良后果。因此, 近年来 2 型糖尿病的药物研究集中在寻求具有与 TZD 类药物有相似疗效但毒副作用更小的 PPAR 配体上。

一些传统中药运用于人们对肥胖和糖尿病的经验治疗中已经有很悠久的历史, 近年来也有一些关于某些中药提取物具有 PPAR 配体活性的报道, 如三白草的提取物<sup>[5]</sup>、啤酒花的提取物<sup>[6]</sup> 以及大黄素<sup>[7]</sup> 等。水翁主要生长在我国南方地区, 近年来的研究表明, 水翁花的提取物具抑制 ATP 酶<sup>[8]</sup>、抗肿瘤<sup>[9-11]</sup>、抗氧化<sup>[11-12]</sup> 和抗高血糖的活性<sup>[13]</sup> 以及能够阻断血管内皮生长因子受体的信号通路<sup>[9]</sup>, 但目前还没有关于这些提取物具有 PPAR 配体活性的报道。在笔者的研究中, 我们的 GAL4 嵌合体报告基因试验结果表明了水翁花的黄酮类提取物 DMC 具有明显的 PPAR 配体结合活性。

PPAR 是调节脂肪细胞分化的关键因子, PPAR 的激活能促进脂肪细胞分化, 但这也正是 TZD 类药物在临床应用中使患者体重增加的主要原因。在笔者的研究中, 我们在 3T3-L1 前脂肪细胞分化的过程中分别加入不同浓度的 DMC, 结果显示了 DMC 能促进脂肪细胞分化, 且作用效果呈量效关系。但是, 我们也在另外的一些试验中发现, DMC 促进脂肪细胞分化的能力明显弱于相同浓度的罗格列酮。

脂肪细胞对葡萄糖的摄取受胰岛素的调控, 罗格列酮等

PPAR 激动剂能提高脂肪和肌肉等组织对胰岛素的敏感性,促进这些组织对葡萄糖的摄取,从而降低机体的血糖浓度。在该研究中,我们发现 DMC 可显著促进 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖摄取,在浓度为 200 nmol/L 的胰岛素存在的情况下效果尤其明显,甚至超过了相同浓度的罗格列酮的作用效果。

大量证据表明,调节 PPAR 的活性能改变脂肪细胞中多种基因的表达量。在该研究中,我们用定量 PCR 检测了经过浓度为 1 μmol/L 的 DMC 处理的 3T3-L1 脂肪细胞中几种公认的 PPAR 应答基因 mRNA 的表达量,并将结果与相同浓度的罗格列酮处理的脂肪细胞进行比较。结果发现,DMC 能在一定程度上提高 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、LPL、C/EBP $\beta$ 、CAP 和 IRS2 的表达量,但是 PPAR $\alpha$  的表达量提高的程度明显低于罗格列酮处理的细胞,由于 PPAR $\alpha$  是脂肪形成的主要标志性基因,因此这个结果与之前的脂肪细胞分化结果相符,表明了 DMC 的生脂肪能力相对于罗格列酮较弱。另外,DMC 不能提高 PEPCK 和 CD36 这 2 种与脂肪酸储存和转运有关的基因表达量,而罗格列酮对这 2 种基因表达量都有明显的提高,这一结果更加说明了 DMC 相对较弱的生脂肪能力。

以上所有结果表明了 DMC 能通过激活 PPAR 促进 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖摄取,同时也提示了 DMC 较之于 TZD 类药物,可能在治疗上不会引起大量的体脂聚积,因此也不会造成明显的体重增加现象。

#### 参考文献

- [1] KLEWER S A, FORMAN B M, BLOMBERG B, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(15): 7355 - 7359.
- [2] ROSEN E D, SHEGELMAN B M. PPAR $\gamma$ : A nuclear regulator of

metabolic differentiation, and cell growth [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(41): 37731 - 37734.

- [3] 南京中医药大学. 中药大辞典上册 M. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 754.
- [4] NESTOR R W, BELL D, BONOW R O, et al. Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: A consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(1): 256 - 263.
- [5] HWANG B Y, LEE J H, NAM J B, et al. Two new furanoditerpenes from *Saururus chinensis* and their effects on the activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(4): 616 - 617.
- [6] YAJIMA H, IKESHIMA E, SHIRAKI M, et al. Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma and reduce insulin resistance [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(32): 33456 - 33462.
- [7] JING Y, YANG J, SHANG Y, et al. Enodin with PPAR $\gamma$  ligand-binding activity promotes adipocyte differentiation and increases glucose uptake in 3T3-L1 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353(2): 225 - 230.
- [8] WOO A Y, WAYE M M, KWAN H S, et al. Inhibition of AIPases by *Geistocalyx operculatus*. A possible mechanism for the cardioprotective actions of the herb [J]. *Vascul Pharmacol*, 2002, 38(3): 163 - 168.
- [9] ZHU X F, LIU Z C, XIE B F, et al. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor signal pathway and antitumor activity of CNIII (2,4-dihydroxy-6-methoxy-3,5-dimethylchalcone), a component from Chinese herbal medicine [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67(5): 1444 - 1450.
- [10] YE C L, LIU J W, WEI D Z, et al. In vivo antitumor activity by 2,4-dihydroxy-6-methoxy-3,5-dimethylchalcone in a solid human carcinoma xenograft model [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 56(1): 70 - 74.
- [11] YE C L, LIU J Y. Antioxidant and anticancer activity of 3-formyl-4,6-dihydroxy-2-methoxy-5-methylchalcone and (2S)-8-formyl-5-hydroxy-7-methoxy-6-methylflavone [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59(4): 553 - 559.
- [12] MAI T T, THUN N, TIEN P G, et al. Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents [J]. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2007, 53(3): 267 - 276.
- [13] MAI T T, CHUYEN N V. Anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of *Geistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry [J]. *Bosch Bot Technol Biochem*, 2007, 71(1): 69 - 76.

(上接第 9062 页)

果主要用于肝胆系统、骨骼系统疾病的诊断。区别骨型碱性磷酸酶和肝型碱性磷酸酶活性相当困难。这是因为这 2 种同工酶来源于同一基因,其动力学性质、电泳迁移率和其他理化性质均十分相似,且相互间有交叉免疫反应。目前鉴别和定量测定骨型碱性磷酸酶的方法有电泳法和非电泳法<sup>[3]</sup>。非电泳法有化学抑制法、热稳定试验、亲和沉淀法和免疫分析法等。目前人医方面常采用热稳定试验测定血清碱性磷酸酶保存率,以区别碱性磷酸酶是来自骨骼还是肝脏。来自肝脏的保存率均在 34% 以上,而来自骨骼的保存率低于 26%<sup>[4]</sup>。该试验结果表明,测定的奶牛和绵羊血清碱性磷酸酶保存率均低于 26%,说明该碱性磷酸酶来自骨骼。

(2) 当动物缺钙、磷或钙磷比例不当而引起骨营养不良时,随着血钙含量的下降,甲状旁腺激素含量上升,促进肾脏合成 1,25-(OH) $_2$ V $_D_3$ ,使得静止的成骨细胞转变为活跃的成骨细胞,合成大量的碱性磷酸酶释放入血;另一方面,由于钙摄入不足,生成的类骨组织不能被钙化,成骨细胞不能转化为骨细胞,成骨细胞反馈性增生活跃,其合成的碱性磷酸酶

释放入血,造成血中碱性磷酸酶活性升高。因此,碱性磷酸酶活性是反映骨代谢状况的最好的系列化指标<sup>[1-3]</sup>。从该试验结果来看,奶牛和绵羊血清碱性磷酸酶活性与卢宗藩等报道的正常值<sup>[5-7]</sup>没有明显差异( $P > 0.05$ ),说明该次测定的奶牛和绵羊骨营养状况良好;但奶牛怀孕中期的碱性磷酸酶活性比未怀孕、怀孕前期、怀孕后期明显降低( $P < 0.05$ )。引起这种变化的原因是否与胎儿发育有关,有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 黄有德,刘宗平. 动物中毒与营养代谢病学 M. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2001: 195 - 200.
- [2] 贺普霄. 家畜营养代谢病 M. 北京: 中国农业出版社, 1994: 77 - 79.
- [3] 吴文苑. 骨型碱性磷酸酶的检测方法和临床应用 [J]. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 1999, 20(2): 64 - 65.
- [4] 王培昌, 钱书虹. 新编临床生物化学实验诊断 M. 郑州: 河南医科大学出版社, 1996: 379.
- [5] 卢宗藩, 吴维芳, 王宗元, 等. 家畜及实验动物生理生化参数 M. 北京: 中国农业出版社, 1983: 168 - 169.
- [6] 崔中林. 兽医临床诊疗数值 M. 北京: 中国农业出版社, 1990: 42 - 43.
- [7] 王荣鑫, 马森, 潘生庆, 等. 青海藏系绵羊七项血清酶水平的研究 [J]. 青海畜牧兽医学院学报, 1985(1): 13 - 16.