

杜仲中槲皮素、京尼平苷及桃叶珊瑚苷对小鼠成骨样细胞系 MC3T3-E1 增殖和分化的影响

牟丽秋^{1,3}, 杜俊^{1,3}, 胡旻耘^{1,3}, 刘新义^{1,2,3}, 刘亭亭^{1,3}, 王传邦^{1,3}, 吴军勇^{1,3}, 向大雄^{1,2,3*}

1. 中南大学湘雅二医院药学部, 湖南 长沙 410011

2. 中南大学湘雅二医院临床药学研究所, 湖南 长沙 410011

3. 中南大学药学院, 湖南 长沙 410013

摘要: 目的 对杜仲抗骨质疏松的药效成分进行初步筛选。方法 采用小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 体外培养模型, 通过 MTT 法测定细胞增殖, ELISA 方法测定碱性磷酸酶 (ALP) 活性, 观察杜仲中槲皮素、京尼平苷及桃叶珊瑚苷对成骨细胞增殖和分化的影响。结果 槲皮素促 MC3T3-E1 细胞增殖的有效浓度为 10^{-6} mmol/L, 桃叶珊瑚苷则为 10^{-5} mmol/L; 10^{-4} μ mol/L 京尼平苷在干预后 4 d, 才逐渐显现出促进 MC3T3-E1 增殖作用。槲皮素 (10^{-5} 、 10^{-3} mmol/L)、京尼平苷 (10^{-3} mmol/L) 和桃叶珊瑚苷 (10^{-3} mmol/L) 可增加 MC3T3-E1 ALP 活性。结论 槲皮素、京尼平苷和桃叶珊瑚苷可促进成骨细胞的增殖和分化, 且作用强度具有浓度相关性和时间相关性, 可能为杜仲抗骨质疏松的药效物质基础。

关键词: 杜仲; 成骨细胞; 骨质疏松; 槲皮素; 京尼平苷; 桃叶珊瑚苷

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2015) 02-0165-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.02.010

Effect of quercetin, geniposide, and aucubin in *Eucommia ulmoides* on proliferation and differentiation of osteoblast MC3T3-E1 in mice

MU Li-qiu^{1,3}, DU Jun^{1,3}, HU Yi-yun^{1,3}, LIU Xin-yi^{1,2,3}, LIU Ting-ting^{1,3}, WANG Chuan-bang^{1,3}, WU Jun-yong^{1,3}, XIANG Da-xiong^{1,2,3}

1. Department of Pharmacy, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

2. Institute of Clinical Pharmacy, Central South University, Changsha 410011, China

3. College of Pharmacy, Center South University, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To screen the pharmaceutical ingredients from *Eucommia ulmoides* with the function on anti-osteoporosis.

Methods The proliferation of osteoblast MC3T3-E1 in mice cultured *in vitro* was assayed using MTT and ALP activity was assayed using ELISA kit, in order to observe the effect of quercetin, geniposide, and aucubin from *E. ulmoides* on the proliferation and differentiation of osteoblast. **Results** The effective concentration of quercetin on MC3T3-E1 proliferation was 10^{-6} mmol/L and aucubin was 10^{-5} mmol/L. While geniposide at 10^{-4} mmol/L could gradually increase the proliferation of MC3T3-E1. The ALP activity of MC3T3-E1 could be increased by quercetin (10^{-5} and 10^{-3} mmol/L), geniposide (10^{-3} mmol/L), and aucubin (10^{-3} mmol/L). **Conclusion** Quercetin, geniposide, and aucubin could promote the proliferation and differentiation of osteoblasts, which are the basic materials from *E. ulmoides* with the function of anti-osteoporosis and is in a concentration- and time-dependent manner.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; osteoblast; osteoporosis; quercetin; geniposide; aucubin

骨质疏松症 (osteoporosis) 是指单位体积内骨量减少, 以致骨的微观结构发生改变, 从而导致骨脆性增加甚至骨折的一类骨代谢疾病^[1]。近年来, 骨质疏松发病率已跃居世界各种常见病的第 7 位, 已经成为一种在世界范围内严重威胁人类健康的疾

病, 引起了人们的广泛关注^[2]。

杜仲作为我国传统名贵滋补药材, 是一富含多种化学物质的天然壮骨良药, 其防治与骨质疏松相类似的临床症状的骨症已有千余年的历史。杜仲为杜仲科杜仲属植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的

收稿日期: 2014-10-30

基金项目: “十二·五”国家科技支撑计划课题 (SQ2010BAJY1411-08)

*通信作者 向大雄, 教授, 主要从事中药新型给药系统及中药新资源研究与开发。 E-mail: xiangdaxiong@163.com

干燥树皮,具有调节血压、降血脂、抗衰老、抗肿瘤、保肝利胆、抗菌消炎、镇静止痛、利尿等功效^[3]。早在20世纪90年代,就有日本学者对杜仲叶的水提取物进行研究,发现杜仲具有抗骨质疏松的功效^[4]。随后,国内外大量研究结果也表明,杜仲对骨质疏松具有较好的防治作用^[5]。但到目前为止,国内外所进行的杜仲抗骨质疏松的研究,基本上是停留在杜仲醇提液或水提液等粗提取物的研究水平上。杜仲中含有环烯醚萜类、木脂素类、黄酮类等多种成分,而究竟是何种成分具有确切的抗骨质疏松作用,目前极少见到该方面的研究报道。

成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化。作为国际上骨代谢研究广泛应用的细胞模型,小鼠成骨样细胞系 MC3T3-E1 具备体外培养成骨细胞的各种生物学特性,包括碱性磷酸酶(ALP)活性、I型胶原合成和基质矿化等,已经成为研究药物对成骨细胞影响的有价值的体外细胞模型^[6]。因此,本实验将杜仲中3种单体化合物——槲皮素、京尼平苷、桃叶珊瑚苷分别与小鼠成骨样细胞株 MC3T3-E1 体外共同培养,研究不同浓度的单体化合物不同时间对 MC3T3-E1 增殖和分化的影响,以初步筛选杜仲促进骨形成的药效物质基础,探讨杜仲中几种主要成分对抗骨质疏松的作用,为开发新的防治骨质疏松中药新药提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

槲皮素(quercetin,批号100081-200907,中国食品药品检定研究院);京尼平苷(geniposide,批号110749-200714,中国食品药品检定研究院)、桃叶珊瑚苷(aucubin,批号bcb6989v, Sigma)。α-MEM培养基(Hyclone);标准胎牛血清(FBS, Hyclone);青霉素、链霉素(Hyclone);L-谷氨酰胺(Sigma);0.25%胰蛋白酶(碧云天);噻唑蓝(MTT, Sigma, 批号mkbd6849v);二甲基亚砜(DMSO, Sigma);磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.2~7.4)由中南大学湘雅二医院细胞实验室提供。

1.2 器材与仪器

生物安全柜(Forma Class II, A2, Thermo); CO₂ 孵箱(FormaSeriesII WaterJacketed, HEPAfilter, Thermo);倒置相差显微镜(TS100, Nikon);酶联免疫检测仪(Varioskanflash, Thermo);低温高速离心机(Beckman,);25 cm² 细胞培养瓶,6孔、12

孔、96孔细胞培养板(Corning Costar)

1.3 细胞株的培养

小鼠成骨样细胞(MC3T3-E1)株,由中南大学湘雅二医院内分泌科周后德老师赠送。MC3T3-E1细胞用25 mm²培养瓶在α-MEM培养基(含10% FBS,青霉素100 U/mL,链霉素100 μg/mL)无菌条件下,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,倒置显微镜每12 h观察1次,待细胞长满瓶底80%以上时,用胰酶消化,然后加入α-MEM培养基终止消化,离心后弃上清,加入适量培养基,再将细胞用吹打管吹打混匀成单个细胞,平均3 d传代1次^[6]。

1.4 药物溶液的配制

称取3.0 mg槲皮素标准品、3.8 mg京尼平苷、3.5 mg桃叶珊瑚苷,分别加入0.5 mL DMSO溶解,再加入9.5 mL完全培养基混匀,之后用0.22 μm的微孔滤膜滤过,即得1 mmol/L的槲皮素、京尼平苷、桃叶珊瑚苷溶液。以上述溶液作为母液,用培养基依次进行倍比稀释,分别得到浓度为10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ mmol/L的槲皮素、京尼平苷、桃叶珊瑚苷溶液。

1.5 3种化合物对细胞增殖的影响

将处于对数期的小鼠成骨细胞用0.25%胰酶消化,以含10% FBS的α-MEM培养液配成单个细胞悬液,然后以3×10⁴个/mL的密度接种于96孔培养板,每孔200 μL,于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h。待细胞完全贴壁后,吸弃原培养基,分别更换为浓度为10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ mmol/L的槲皮素溶液,以不含细胞的孔作为空白对照组,不加药的细胞孔作为正常对照组,空白对照与正常对照组均加入与槲皮素溶液等体积的DMSO,每组重复5孔,隔天换液。分别于加药后的1、2、3、4、5 d,各取出一板,于板孔中加入5 mg/mL的MTT 20 μL,继续孵育4 h后,取出培养板,用注射器轻轻吸弃孔内液体,于每孔中加入150 μL DMSO(分析纯),室温振荡10 min,使结晶充分溶解,于酶标仪570 nm处测定各孔吸光度(A₅₇₀)值。同法测定京尼平苷、桃叶珊瑚苷对MC3T3-E1增殖的影响^[7]。

1.6 3种化合物对细胞ALP活性的影响

将处于对数期的小鼠成骨细胞用0.25%的胰酶消化,以含10% FBS的α-MEM培养液配成单个细胞悬液,调整细胞浓度为1×10⁵个/mL,接种于24孔培养板,每孔900 μL,培养24 h待细胞贴壁后,分别更换为浓度为10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶

mmol/L 的槲皮素溶液,并设不加药的细胞孔作为正常对照组,每组重复3孔,隔天换液。分别于加药后的第2、5天,用PBS洗涤细胞3次后经胰酶消化后收集细胞,用ELISA试剂盒测定ALP活性,以 A_{405} 表示。同法测定京尼平苷、桃叶珊瑚苷对MC3T3-E1分化的影响^[5]。

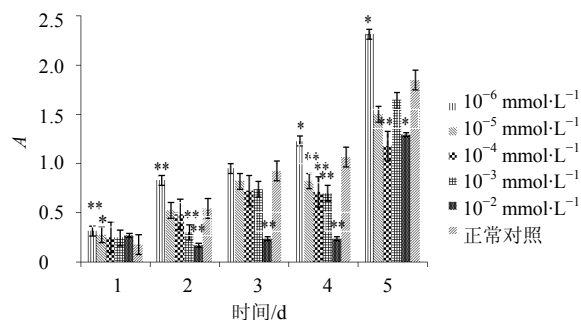
1.7 统计学处理

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,首先进行组间Levene's方差齐性检验,然后采用ANOVA检验方法进行各组间均值的显著性统计,组间两两比较采用LSD检验。所有数据均采用SPSS16.0统计软件进行分析。

2 结果

2.1 对MC3T3-E1细胞增殖的影响

2.1.1 槲皮素 与正常对照组相比,槲皮素给药后1 d, 10^{-5} mmol/L 有促进成骨细胞增殖的作用 ($P < 0.05$), 10^{-6} mmol/L 可显著促进其增殖 ($P < 0.01$); 给药后2 d, 槲皮素 10^{-6} mmol/L 有显著促进成骨细胞增殖的作用 ($P < 0.01$), 10^{-3} mmol/L、 10^{-2} mmol/L 有显著抑制其增殖的作用 ($P < 0.01$); 给药后3 d, 除槲皮素 10^{-2} mmol/L ($P < 0.01$) 有显著抑制其增殖的作用外,其余各浓度组对其增殖无明显影响; 给药后4 d, 槲皮素 10^{-6} mmol/L 有促进成骨细胞增殖的作用 ($P < 0.05$); 其他各浓度组均显著抑制其增殖 ($P < 0.01$); 给药后5 d, 槲皮素 10^{-6} mmol/L 有促进成骨细胞增殖的作用 ($P < 0.05$), 10^{-4} mmol/L ($P < 0.01$)、 10^{-2} mmol/L ($P < 0.05$) 可抑制MC3T3-E1增殖,见图1。



与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

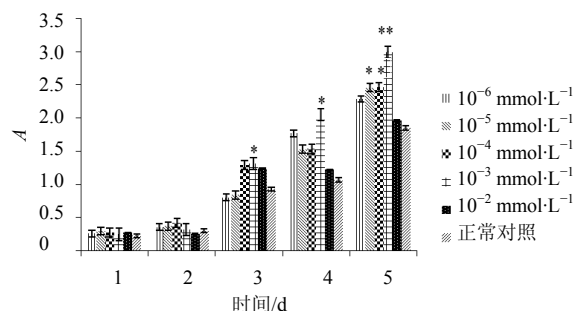
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal group

图1 槲皮素对MC3T3-E1细胞体外增殖的影响

Fig. 1 Effects of quercetin on cell proliferation of MC3T3-E1 in vitro

2.1.2 京尼平苷 与正常对照组相比,京尼平苷给药1 d和2 d后,各浓度对成骨细胞的增殖的影响无

显著性差异;给药3 d和4 d后,京尼平苷 10^{-3} mmol/L 均可促进成骨细胞的增殖 ($P < 0.05$); 给药后5 d, 京尼平苷 10^{-5} mmol/L、 10^{-4} mmol/L 可促进成骨细胞的增殖 ($P < 0.05$), 10^{-3} mmol/L ($P < 0.01$) 可显著地促进成骨细胞的增殖。京尼平苷 10^{-3} mmol/L 组细胞增殖数量随培养时间的变化近乎呈线性增长,见图2。



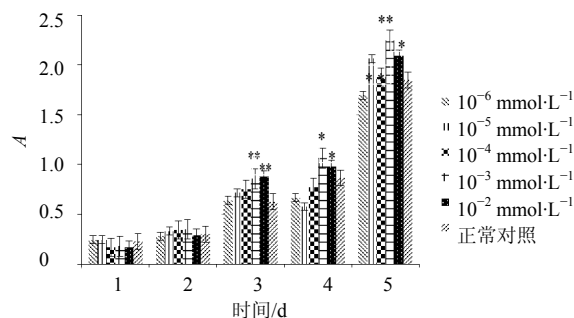
与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal group

图2 京尼平苷对MC3T3-E1细胞体外增殖的影响

Fig. 2 Effects of geniposide on cell proliferation of MC3T3-E1 in vitro

2.1.3 桃叶珊瑚苷 与正常对照组相比,桃叶珊瑚苷给药1 d和2 d后,桃叶珊瑚苷各浓度组均对成骨细胞的增殖的影响无显著性差异;给药后3 d, 桃叶珊瑚苷 10^{-4} mmol/L ($P < 0.01$)、 10^{-3} mmol/L ($P < 0.01$) 促进MC3T3-E1增殖;给药后4 d, 桃叶珊瑚苷 10^{-3} mmol/L ($P < 0.05$)、 10^{-2} mmol/L ($P < 0.05$) 可促进成骨细胞的增殖;给药后5 d, 桃叶珊瑚苷 10^{-2} mmol/L ($P < 0.05$) 可促进成骨细胞的增殖, 10^{-3} mmol/L ($P < 0.01$) 可显著促进其增殖。见图3。



与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal group

图3 桃叶珊瑚苷对MC3T3-E1细胞体外增殖的影响

Fig. 3 Effects of aucubin on cell proliferation of MC3T3-E1 in vitro

2.2 对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响

2.2.1 槲皮素 给药后 2 d, 与正常对照组相比, 槲皮素各浓度组对成骨细胞 ALP 活性无明显影响; 给药后 5 d, 与正常对照组相比, 槲皮素 10^{-5} mmol/L 可增加成骨细胞 ALP 活性 ($P < 0.05$), 槲皮素 10^{-3} mmol/L 可显著增加成骨细胞 ALP 活性 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 槲皮素对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响

Table 1 Effects of quercetin on ALP activity of MC3T3-E1

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	A ₄₀₅	
		给药后 2 d	给药后 5 d
槲皮素	10^{-6}	6.51 ± 0.66	6.41 ± 0.93
	10^{-5}	6.53 ± 0.45	5.87 ± 0.35*
	10^{-4}	6.43 ± 0.85	5.39 ± 0.31
	10^{-3}	6.46 ± 1.38	5.63 ± 0.18**
	10^{-2}	6.05 ± 1.11	6.12 ± 0.59
正常对照	—	5.67 ± 0.27	3.49 ± 0.27

与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control group

2.2.2 京尼平苷 给药后 2 d, 与正常对照组相比, 京尼平苷 10^{-4} mmol/L 组 ALP 活性显著降低 ($P < 0.05$), 其余各组差异无统计学意义; 给药后 5 d, 与正常对照组相比, 京尼平苷 10^{-3} mmol/L 组 (可显著增加成骨细胞 ALP 活性 $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 京尼平苷对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响

Table 2 Effects of geniposide on ALP activity of MC3T3-E1

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	A ₄₀₅	
		给药后 2 d	给药后 5 d
槲皮素	10^{-6}	5.21 ± 0.29	4.52 ± 0.42
	10^{-5}	4.92 ± 0.44	4.14 ± 0.29
	10^{-4}	4.88 ± 0.12*	3.93 ± 0.30
	10^{-3}	5.80 ± 0.32	4.39 ± 0.04*
	10^{-2}	5.63 ± 0.27	3.87 ± 0.19
正常对照	—	5.67 ± 0.27	3.49 ± 0.27

与正常对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal control group

2.2.3 桃叶珊瑚苷 给药后 2 d, 与正常对照组相比, 桃叶珊瑚苷各浓度组其差异无统计学意义; 给药后 5 d, 与正常对照组相比, 桃叶珊瑚苷 10^{-2} mmol/L 组 ALP 活性高于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

3 讨论

本实验通过 MTT 实验技术及 ALP 活性检测研

表 3 桃叶珊瑚苷对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响

Table 3 Effects of aucubin on ALP activity of MC3T3-E1

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	A ₄₀₅	
		给药后 2 d	给药后 5 d
槲皮素	10^{-6}	5.10 ± 0.19	3.79 ± 0.03
	10^{-5}	5.35 ± 0.27	3.51 ± 0.22
	10^{-4}	5.75 ± 0.32	3.81 ± 0.16
	10^{-3}	5.61 ± 0.46	3.44 ± 0.79
	10^{-2}	5.06 ± 0.15	4.07 ± 0.05*
正常对照	—	5.67 ± 0.27	3.49 ± 0.27

与正常对照组比较, * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal control group

究不同浓度槲皮素、京尼平苷、金丝桃苷等单体化合物对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 进行干预后不同时间点的细胞增殖及分化情况。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^[7-8]。

MTT 检测结果表明, 槲皮素促 MC3T3-E1 细胞增殖的有效浓度为 10^{-6} mmol/L, 其中在作用后的第 5 d 促增殖作用最明显。槲皮素 10^{-5} 、 10^{-6} mmol/L 在给药后 5 d, 可增加成骨细胞 ALP 活性, 而进一步升高浓度时, 则表现出一定的细胞毒性, 产生抑制细胞增殖的作用。试验结果说明在一定浓度下, 槲皮素可促进 MC3T3-E1 细胞的增殖和矿化, 促进骨形成。杨亚军等^[9]研究发现槲皮素可显著地促进成骨细胞 ROB 的增殖和矿化, 亦有研究表明槲皮素和山柰酚可增强成骨细胞活性^[10], 可开发为有效防治骨质疏松的药物^[11-12], 本实验结果与上述文献一致。这可能是由于槲皮素具有双酚环结构, 可与雌激素受体亚型结合, 激活 ERK 通路, 显示雌激素样作用^[13-14]。

各浓度组的京尼平苷在作用前 2 d 对 MC3T3-E1 细胞的增殖未显示有显著性作用, 干预 3 d 后, 10^{-4} 、 10^{-3} mol/L 京尼平苷才逐渐显现出促进 MC3T3-E1 增殖作用。5 d 后, 10^{-3} mol/L 京尼平苷显著促进 MC3T3-E1 细胞增殖, 10^{-3} mol/L 组细胞数量与京尼平作用时间呈一定线性关系。桃叶珊瑚

苷作用 3~5 d, 10^{-4} mol/L 组和 10^{-3} mol/L 组显示出了促进成骨细胞增殖的作用。而京尼平苷和桃叶珊瑚苷则分别在 10^{-3} mmol/L 和 10^{-2} mmol/L 浓度下增加 ALP 活性。从以上结果可以看出, 槲皮素、京尼平苷和桃叶珊瑚苷可促进成骨细胞的增殖和分化。因此, 杜仲发挥抗骨质疏松的药效物质基础可能与其中含有槲皮素、京尼平苷和桃叶珊瑚苷有关。

对于上述活性物质, 其作用强度与作用时间和浓度的关系, 从实验结果看并不十分明确。这可能与 MTT 实验的准确性不高有关, 一般情况下, MTT 实验准确性在 70%~80%, 96 孔板中各孔细胞数量是否均一, 加入药物量是否准确都容易对实验结果造成影响。其次, 实验时间在设置上可能需要增加短时间内药物作用效果的考察。

本实验从杜仲中选取了黄酮类成分槲皮素, 环烯醚萜类化合物京尼平苷、桃叶珊瑚苷 3 种单体化合物对体外培养成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖及分化的影响进行了初步研究, 关于这 3 种单体化合物的抗骨质疏松作用尚需从细胞、分子等水平进行深入的研究; 此外, 杜仲中其他单体成分如山柰酚、杜仲醇苷等对于成骨细胞的影响, 还需从增殖、分化、矿化、对细胞因子的影响等方面进行深入的研究^[15]。

参考文献

- [1] 刘忠厚. 骨质疏松症 [M]. 北京: 科学出版社, 1998, 131: 87-90.
- [2] Johnell O, Kanis J A. An estimate of the worldwide prevalence, mortality and disability associated with hip fracture [J]. *Osteoporos INT*, 2004, 15(11): 897-902.
- [3] Zhang R, Liu Z G, Li C, *et al.* Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) cortex extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats [J]. *Bone*, 2009, 45(3): 553-559.
- [4] Deyama T, Nishibe S, Nakazawa Y. Constituents and pharmacological effects of *Eucomia* and *Siberian ginseng* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(12): 1057-1070.
- [5] 张 蓉. 杜仲防治绝经后骨质疏松及其机理研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2008.
- [6] Lee YS, Choi EM. Costunolide stimulates the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(6): 712-718.
- [7] 刘洪柱. 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 [J]. *动物营养学报*, 2011, 23(8): 1378-1385.
- [8] 金树梅, 彭雁飞, 李红珠, 等. 加减青娥方体外对 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化的影响 [J]. *药物评价研究*, 2014, 37(6): 493-497.
- [9] Yang Y J, Yang Z L, Wang D C. Comparative study on effects of rutin and quercetin on metabolism in osteoblast cells [J]. *Zhong Yao Cai*, 2006, 29(5): 467-70.
- [10] 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]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67(7): 1307-1313.
- [11] Liang W, Luo ZH, Ge SH, *et al.* Oral administration of quercetin inhibits bone loss in rat model of diabetic osteopenia [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670(1): 317-324.
- [12] Kanter M, Altan M F, Donmez S, *et al.* The effects of quercetin on bone minerals, biomechanical behavior, and structure in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Cell Biochem Funct*, 2007, 25: 747-752.
- [13] Prouillet C, Maziere J 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]. *Biochem Pharmacol*, 2004 Apr 1;67(7): 1307-13.
- [14] Kuiper G G, Lemmen J G, *et al.* Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta [J]. *Endocrinology*, 1998, 139: 4252-4263.
- [15] 熊志力. 青娥方促进成骨细胞骨活性成分的相关研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2003.