

## 饲料中添加淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡的骨保护作用及机制

刘雅晴<sup>1,2</sup> 徐建芳<sup>2</sup> 张会艳<sup>2</sup> 赵青余<sup>2</sup> 汤超华<sup>2</sup> 张军民<sup>2</sup> 董焕声<sup>1\*</sup> 司玮<sup>2\*</sup>

(1. 青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 畜禽营养与饲养全国重点实验室, 北京 100193)

**摘要:** 本试验旨在研究淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡的骨保护作用及机制。试验选用产蛋率相近且健康状况良好的 60 周龄海兰褐蛋鸡 180 只, 随机分为 2 组, 每组 6 个重复, 每个重复 15 只鸡。预试期 1 周, 正试期 15 周。对照组饲喂基础饲料, 淫羊藿提取物组饲喂在基础饲料中添加 200 mg/kg 淫羊藿提取物的试验饲料。结果表明: 与对照组相比, 1) 淫羊藿提取物组在 62~65 周龄时的产蛋率显著提高 ( $P < 0.05$ ), 在 66~69 周龄和 70~76 周龄时的料蛋比显著降低 ( $P < 0.05$ ); 2) 淫羊藿提取物组在 76 周龄时蛋壳厚度呈现增加的趋势 ( $P = 0.097$ ), 在 69 和 76 周龄时的蛋白高度和哈氏单位显著增加 ( $P < 0.05$ ); 3) 淫羊藿提取物组在 76 周龄时血清骨钙素 (BGP) 含量和抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 活性显著降低 ( $P < 0.05$ ); 4) 淫羊藿提取物组在 69 周龄时的股骨指数显著增加 ( $P < 0.05$ ); 5) 淫羊藿提取物组在 76 周龄时胫骨的骨强度呈现增加的趋势 ( $P = 0.085$ ); 6) 淫羊藿提取物组在 76 周龄时的股骨骨密度及骨矿物质含量显著增加 ( $P < 0.05$ ); 7) 在 76 周龄时, 饲料中添加 200 mg/kg 淫羊藿提取物可以改善骨组织的微观结构; 8) 饲料中添加 200 mg/kg 淫羊藿提取物显著上调了蛋鸡骨组织中骨保护素 (OPG)、Runx 相关转录因子 2 (Runx2)、骨形态发生蛋白 2 (BMP2) 及 SMAD 家族成员 4 (Smad4) 的 mRNA 相对表达量 ( $P < 0.05$ )。由此可见, 饲料中添加 200 mg/kg 淫羊藿提取物能够提高产蛋后期蛋鸡产蛋率, 降低料蛋比, 提高鸡蛋的蛋白高度和哈氏单位, 降低蛋鸡骨转换, 促进成骨细胞分化, 改善骨密度和骨微观结构, 对骨起到保护作用。

**关键词:** 淫羊藿提取物; 产蛋后期蛋鸡; 骨质疏松; 骨骼健康

中图分类号: S831

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2025)08-5198-16

骨质疏松症是一种骨代谢疾病, 其特点为骨量减少, 骨强度降低, 骨折的风险增加<sup>[1]</sup>。在蛋鸡养殖过程中骨质疏松症的发病率较高, 很大一部分原因与其骨骼的特殊性有关。蛋鸡具有 3 种类型的骨骼: 皮质骨、松质骨和髓质骨。皮质骨是一种致密的结构性骨; 松质骨即小梁骨, 是位于骨骼末端的网格状蜂窝结构; 髓质骨是位于骨髓腔中的高度不稳定的编织骨, 可以在产蛋周期中快速

形成和吸收<sup>[2-3]</sup>。正常情况下, 破骨细胞介导的骨吸收和成骨细胞介导的骨形成处于动态平衡过程中, 然而蛋鸡每天要面临着高强度的产蛋压力, 骨转换较为活跃。随着时间的积累, 破骨细胞介导的骨吸收大于成骨细胞介导的骨形成, 髓质骨所释放的骨钙无法满足蛋鸡产蛋需要, 结构性骨逐渐被吸收, 骨质逐渐流失, 容易造成骨质疏松<sup>[4-5]</sup>。患骨质疏松症的蛋鸡骨骼脆性增加, 容易发生骨

收稿日期: 2024-12-04

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (Y2025YC45); 国家蛋鸡产业技术体系 (CARS-40-K11); 北京市家禽创新团队 (BAIC06-2024-G05); 中国农业科学院科技创新工程 (ASTIP-IAS-12)

作者简介: 刘雅晴 (1999—), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 研究方向为动物饲养与饲料。E-mail: liuyaqing0@163.com

\* 通信作者: 董焕声, 教授, 硕士生导师, E-mail: donghuansheng@163.com; 司玮, 研究员, 博士生导师, E-mail: siwei01@caas.cn

折,继而导致患病蛋鸡持续性疼痛和体型消瘦,严重影响动物福利<sup>[6]</sup>。在养殖过程中,产蛋鸡常突然瘫痪,马健<sup>[7]</sup>在 2006 年 1 月到 2008 年 12 月共调查苏中蛋鸡养殖密集区域的 8 622 批产蛋鸡,发现 11.65% 的笼养蛋鸡瘫痪是由骨质疏松造成的。患骨质疏松症的蛋鸡还会出现产蛋率下降、鸡蛋品质变差、薄壳蛋和软壳蛋增多以及鸡蛋的破损率上升等问题<sup>[8]</sup>。严重时该疾病甚至可能导致蛋鸡死亡。Mccoy 等<sup>[9]</sup>研究发现,在整个产蛋周期中,蛋鸡的死亡率为 9.7%,其中 35% 的死亡病例与骨质疏松直接相关。以山东省为例,有研究表明,2008—2022 年,山东省大、中、小 3 种规模的蛋鸡养殖平均净利润分别为 840.2、881.2、499.1 元/百只,目前虽无直接数据表明蛋鸡骨质疏松症造成的综合经济损失占养殖总成本的具体比例,但根据上述发病率、死亡率及产蛋量下降等综合来看,其对养殖产业的经济损失影响巨大<sup>[10-11]</sup>。因此,如何改善蛋鸡骨骼健康这一问题引起了越来越多人的关注。

如今防治骨质疏松的饲料添加剂主要包括钙制剂(如碳酸钙、磷酸钙)、维生素 D<sub>3</sub> 以及有机微量元素(如蛋氨酸锌、蛋氨酸锰)等,这些添加剂通过调节钙磷代谢、促进骨形成或抑制骨吸收等机制改善蛋鸡骨骼健康<sup>[12-15]</sup>。然而,现有饲料添加剂仍存在一些不足:首先,随着蛋鸡年龄的增长,钙和维生素 D<sub>3</sub> 的吸收利用率较低<sup>[4]</sup>,长期使用易导致钙磷比例失衡;另外,维生素 D<sub>3</sub> 的不足或过量,都会导致骨骼受损,骨吸收腔增多,对防治骨质疏松起到相反的作用<sup>[16]</sup>;其次,有机微量元素的长期或过度补充会对动物机体多个系统造成不良甚至毒性影响。有研究发现,过量补充蛋氨酸锌会对蛋鸡产蛋性能产生不利影响,扰乱肝肾功能,并且还会导致蛋鸡内脏器官的组织学病变<sup>[17]</sup>。因此,亟需开发高效、安全且经济的新型抗骨质疏松饲料添加剂,以弥补现有方案的不足。近年来,关于淫羊藿提取物在动物骨质疏松防治领域的研究取得了显著进展。传统中药淫羊藿已被证明具有改善骨质疏松的作用,同时还具有抗肿瘤、抗炎和抗氧化的作用<sup>[18]</sup>。研究表明,从淫羊藿叶中分离制备的淫羊藿黄酮类化合物可改善卵巢切除大鼠的骨强度,提高骨密度和骨组织微观结构,从而减轻骨质疏松程度<sup>[19]</sup>。此外,淫羊藿骨碎补联合骨营养补剂对去卵巢大鼠的研究结果显示,该联合

治疗方案能显著增加骨密度和骨钙含量,进一步增强抗骨质疏松效果<sup>[20]</sup>。淫羊藿提取物的总类黄酮能够通过抑制卵巢切除小鼠的尿钙排泄,从而有效抑制远端股骨骨量减少和骨强度下降<sup>[21]</sup>。在其他动物模型中,淫羊藿活性成分也展现出良好的骨保护作用。例如,朝藿定 A 和宝藿苷 I 在斑马鱼骨质疏松模型中可显著改善骨矿化状况,表明其具有显著的抗骨质疏松的作用<sup>[22]</sup>。淫羊藿主要活性成分淫羊藿苷及其他活性成分(淫羊藿素、朝藿定 C、宝藿苷 I)可通过促进成骨细胞增殖与分化、抑制破骨细胞形成,在分子水平上调控骨形态发生蛋白(BMP)、细胞外信号调节激酶(ERK)、氨基末端激酶(JNK)等信号通路,并通过调控骨硬化蛋白(SOST)基因表达,发挥骨保护作用<sup>[23-26]</sup>。此外,研究还发现,淫羊藿苷能够通过激活自噬,对骨髓中的衰老巨噬细胞发挥显著的抗炎作用,并恢复骨髓间充质干细胞(BMSCs)的成骨活性,从而减轻骨质疏松小鼠的骨质流失<sup>[29]</sup>。尽管在啮齿类动物模型和斑马鱼模型中,淫羊藿及其活性成分已展现出良好的抗骨质疏松作用,但目前关于淫羊藿提取物在家禽,特别是蛋鸡骨质疏松防治中的研究仍较少。因此,进一步探索其在蛋鸡骨骼健康中的作用机制具有良好的研究前景和现实意义。本研究旨在通过淫羊藿提取物饲喂产蛋后期蛋鸡,研究其对产蛋后期蛋鸡的骨保护作用及其机制,为开发安全、高效的抗骨质疏松饲料添加剂提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器设备

Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪(HPLC)(美国 Agilent Technologies);547-360 厚度仪(日本 Mitutoyo);EFR-01 蛋壳强度测试仪(以色列 ORKA);EA-01 鸡蛋全功能测定仪(以色列 ORKA);Prodigy Advance 双能 X 线骨密度检测仪(美国 GE Healthcare);TA-XT plus 质构仪(英国 Stable Micro Systems);HDP/3PB 质构仪探头(英国 Stable Micro Systems);Applied Biosystems QuantStudio 7 Flex 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific);Bio-Drop- $\mu$ Lite 超微量核酸/蛋白分析仪(英国 Biochrom);Tecan Infinite 200 Pro 多功能酶标仪(瑞士 Tecan)。

## 1.2 试验设计

所有试验程序均经过中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 (IAS) 实验动物福利和伦理委员会的审查和批准 (批准号: IAS2023-116)。

试验在北京绿都兴瑞养殖专业合作社进行。选取 60 周龄产蛋率相近的海兰褐蛋鸡 180 只, 随机分为 2 组, 每组 6 个重复, 每个重复 15 只鸡。对照组饲喂基础饲料, 淫羊藿提取物组在基础饲料中添加 200 mg/kg 淫羊藿提取物。预试期 1 周, 正试期 15 周。基础饲料参考 NRC (1994)<sup>[30]</sup>, 结合《海兰褐蛋鸡饲养手册》配制, 其组成及营养水平见表 1。采用 GB/T 6432—2018<sup>[31]</sup> 中的方法检测饲料中粗蛋白质的含量。采用 GB/T 6436—2018<sup>[32]</sup> 中的方法检测饲料中钙的含量。根据 GB/T 6437—2018<sup>[33]</sup> 中的方法检测饲料中总磷的含量。饲料中其他成分参照《中国饲料成分及营养价值表 (2019 年第 30 版)》<sup>[34]</sup> 计算。

将淫羊藿提取物溶于 70% 甲醇中, 利用 HPLC 进行分析。标准品及淫羊藿提取物溶液 HPLC 色谱图见图 1, 9 种标准品 (纯度  $\geq 98\%$ ) 均购自上海源叶生物科技有限公司。淫羊藿提取物活性成分及含量见表 2, 其中淫羊藿苷的含量最高, 为 200.811 mg/g, 占总量的 20.081%。其他成分分别为朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、箭藿苷 A、箭藿苷 B、鼠李糖基淫羊藿次苷 II、宝藿苷 I 及淫羊藿素。

表 1 基础饲料组成及营养水平 (风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	62.00
豆粕 Soybean meal	23.00
小麦麸 Wheat bran	3.70
石粉 Limestone	9.50
磷酸氢钙 $\text{CaHPO}_4$	0.80
DL-蛋氨酸 DL-Met	0.20
沸石粉 Zeolite powder	0.11
食盐 NaCl	0.30
预混料 Premix <sup>1)</sup>	0.39
合计 Total	100.00

续表 1

项目 Items	含量 Content
营养水平 Nutrient levels <sup>2)</sup>	
代谢能 ME/(MJ/kg)	10.98
粗蛋白质 CP	14.73
钙 Ca	4.07
总磷 TP	0.51
有效磷 AP	0.21
赖氨酸 Lys	0.79
蛋氨酸 Met	0.45
蛋氨酸+胱氨酸 Met+Cys	0.71
色氨酸 Trp	0.17
苏氨酸 Thr	0.59

1) 预混料为每千克饲料提供 The premix provided the following per kg of the diet: VA 8 000 IU, VB<sub>1</sub> 1.05 mg, VB<sub>2</sub> 8.52 mg, VB<sub>6</sub> 8.07 mg, VB<sub>12</sub> 3 mg, VD<sub>3</sub> 450 IU, VE 15 IU, VC 99 mg, 泛酸钙 calcium pantothenate 50.18 mg, 生物素 biotin 1.95 mg, 叶酸 folic acid 0.50 mg, 烟酸 nicotinic acid 29.70 mg, 植酸酶 phytase 100 mg, 氯化胆碱 choline chloride (50%) 1 000 mg, Cu (as copper sulfate) 8.03 mg, Fe (as ferrous sulfate) 60 mg, Mn (as manganese sulfate) 65.03 mg, Zn (as zinc sulfate) 66.10 mg, I (as potassium iodide) 1.09 mg, Se (as sodium selenite) 0.31 mg.

2) 粗蛋白质、钙和总磷为实测值, 其余营养水平均为计算值。CP, Ca and TP were measured values, while the other nutrient levels were calculated values.

## 1.3 饲养管理

在试验期间每天 06:00、11:00 和 15:00 各饲喂 1 次, 蛋鸡自由采食和饮水。舍内通风良好, 卫生清洁, 光照充足。每天鸡舍保持光照 16 h (05:00—21:00)。鸡舍温度维持在 22~24 °C。

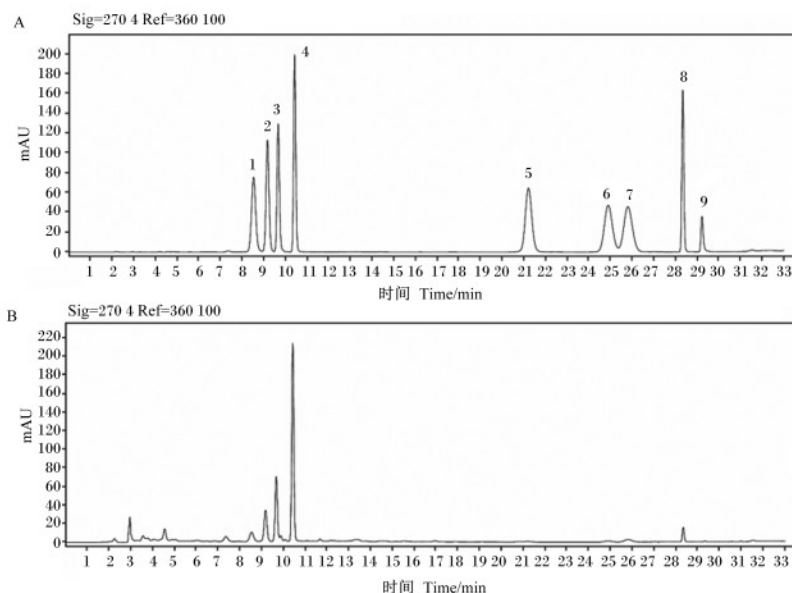
## 1.4 指标测定与方法

### 1.4.1 生产性能测定

每天 14:00 定时捡蛋, 记录每个重复蛋鸡的产蛋数、蛋重及破蛋数, 用于计算产蛋率、平均蛋重及破蛋率。每 2 周记录各重复蛋鸡的饲料消耗量, 用于计算平均日采食量及料蛋比。

### 1.4.2 蛋品质测定

分别在蛋鸡 65、69 和 76 周龄时, 每个重复随机选择 3 枚鸡蛋用于蛋品质检测。用鸡蛋全功能测定仪测定蛋白高度和哈氏单位; 用厚度仪测定鸡蛋钝端、中端和锐端 3 个部位的蛋壳厚度, 取平均值; 用蛋壳强度测试仪测定蛋壳强度。用电子秤测定蛋壳重量。用游标卡尺测量鸡蛋的长径及短径, 计算蛋形指数; 用电子秤测定蛋黄重量和蛋重量, 计算蛋黄比例。



Sig: 信号 signal; Ref: 参考 reference; 1: 朝藿定 A epimedin A; 2: 朝藿定 B epimedin B; 3: 朝藿定 C epimedin C; 4: 淫羊藿苷 icariin; 5: 箭藿苷 A sagittatoside A; 6: 箭藿苷 B sagittatoside B; 7: 鼠李糖基淫羊藿次苷 II 2'-O-rhamnosylcariside II; 8: 宝藿苷 I baohuoside I; 9: 淫羊藿素 icaritin。

图 1 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准品 HPLC 色谱图 (A) 与淫羊藿提取物溶液 HPLC 色谱图 (B)

Fig.1 HPLC chromatograms of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  standard (A) and *Epimedium* extract solution (B)

表 2 淫羊藿提取物活性成分及含量

Table 2 Active components and contents of

<i>Epimedium</i> extracts	mg/g
项目 Items	含量 Content
朝藿定 A Epimedin A	26.612
朝藿定 B Epimedin B	58.620
朝藿定 C Epimedin C	101.313
淫羊藿苷 Icarin	200.811
箭藿苷 A Sagittatoside A	3.942
箭藿苷 B Sagittatoside B	5.412
鼠李糖基淫羊藿次苷 II 2'-O-rhamnosylcariside II	11.465
宝藿苷 I Baohuoside I	19.711
淫羊藿素 Icaritin	8.259

#### 1.4.3 血清骨代谢相关指标测定

分别在蛋鸡 65、69 和 76 周龄时, 每组每个重复随机选取 1 只鸡进行翅静脉采血, 室温静置 2 h 后在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 $\times g$  条件下离心 10 min 收集血清, 分装后于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。根据试剂盒内说明书提供的方法检测血清抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP)、碱性磷酸酶 (ALP) 活性和骨钙素 (BGP) 含量。TRAP 和 ALP 活性试剂盒购自北京索莱宝

科技有限公司, BGP 含量试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。

#### 1.4.4 股骨和胫骨骨指数测定

分别在蛋鸡 65、69 和 76 周龄时, 将采血后的蛋鸡进行称重、屠宰, 用手术刀和手术剪分离蛋鸡胫骨和股骨, 去除骨表面附着的肌肉和筋膜。使用电子秤测定股骨和胫骨的重量, 使用游标卡尺测量股骨和胫骨的长度, 并计算骨指数。随后将胫骨和股骨分别用锡箔纸包裹后放入液氮中速冻, 采样结束后转移至 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱内保存备用。

骨指数 = 骨重 (g) / 活体重 (kg)。

#### 1.4.5 骨强度测定

质构仪使用前先进行力量矫正和高度矫正, 在骨中间位置做标记, 使质构仪探头准确在骨骼中间位置施加压力, 利用三点弯曲装置检测蛋鸡骨骼强度。股骨: 测试速度为 15 mm/min, 跨距为 40 mm。胫骨: 测试速度为 50 mm/min, 跨距为 60 mm。

#### 1.4.6 股骨骨密度及骨矿物质含量测定

通过双能 X 线骨密度检测仪进行扫描检测骨密度及骨矿物质含量。仪器的检测灵敏度为 0.001  $\text{g}/\text{cm}^2$ , 开机精度质量控制的变异系数 (CV)

值小于 1%, 金属铝体模型值在预设值范围内 [(1.247±0.020) g/cm<sup>2</sup>]

#### 1.4.7 骨组织微观结构观察

蛋鸡 76 周龄时采集股骨置于 4% 多聚甲醛中固定。固定结束后, 放入乙二胺四乙酸 (EDTA) 脱钙液中脱钙, 当脱钙后的组织用针刺没有阻力感时即可终止脱钙。然后对组织进行常规脱水、包埋、制成切片并对组织进行 Goldner 三色染色 (试剂购自北京索莱宝科技有限公司), 于光学显微镜下观察并拍照。

#### 1.4.8 蛋鸡骨相关基因表达测定

蛋鸡 76 周龄时采集胫骨, 取 1 小块胫骨用灭

菌研钵研磨, 用 TRIzol (赛默飞世尔科技公司) 试剂提取组织总 RNA。检测 RNA 的纯度、浓度及完整性, 确保 RNA 符合使用标准, 然后使用 Perfect-Start Uni RT & qPCR Kit 试剂盒 (北京全式金生物科技股份有限公司) 对 RNA 进行反转录。以  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 作为内参基因, 进行实时荧光定量 PCR 检测。反应体系为 10  $\mu$ L, 其中 cDNA 为 0.2  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.2  $\mu$ L, 2 $\times$ PerfectStart Green qPCR SuperMix 5  $\mu$ L, Universal Psaive Reference Dye (50 $\times$ ) 0.2  $\mu$ L, Nuclease-free Water 4.2  $\mu$ L。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。实时荧光定量 PCR 引物见表 3。

表 3 实时荧光定量 PCR 引物

Table 3 Primers for RT-qPCR

基因 Genes	登录号 Accession No.	引物序列 Primer sequences (5'—3')
$\beta$ -肌动蛋白 $\beta$ -actin	NM_205518.1	F: CACGATCATGTTTGAGACCTT R: CATCACAATACCAGTGGTACG
Runt 相关转录因子 2 <i>Runx2</i>	NM_204128.2	F: GATTACAGACCCCAGGCAGG R: TGGCTCAAGTAGGACGGGTA
骨保护素 <i>OPG</i>	NM_001033641.2	F: GTTCCTACTCGTTTCACACC R: GCTCTTGTGAAGTGTGCCTTTG
骨形态发生蛋白 2 <i>BMP2</i>	NM_001398170.1	F: TCAGCTCAGGCCGTTGTTAG R: GTCATTCCACCCCACGTCAT
骨形态发生蛋白 4 <i>BMP4</i>	NM_205237.4	F: AGTGATGAAGCCGCTGTCC R: GCCCTGATGAGTCTGTGCC
核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 <i>RANKL</i>	NM_001083361.1	F: CACGATCATGTTTGAGACCTT R: CATCACAATACCAGTGGTACG
SMAD 家族成员 4 <i>Smad4</i>	XM_040652581.2	F: CGCAGTGTTCTGTCAGAGTT R: GCCGCAGGTCAAACACCTTA

## 1.5 数据统计分析

试验数据采用 SPSS 27.0 进行统计分析, 采用独立样本 *t* 检验分析对照组和淫羊藿提取物组数据的显著性。试验结果用平均值 $\pm$ 均值标准误表示,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $0.05 \leq P < 0.10$  表示有显著趋势。

## 2 结果

### 2.1 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡生产性能的影响

由表 4 可知, 在 62~65 周龄时, 淫羊藿提取物组产蛋率显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 在 66~69 周

龄时, 与对照组相比, 淫羊藿提取物组产蛋率具有增加的趋势 ( $P = 0.090$ ); 在 70~76 周龄时, 淫羊藿提取物组与对照组相比产蛋率没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。在 62~65 周龄时, 淫羊藿提取物组与对照组相比破蛋率没有显著差异 ( $P > 0.05$ ); 在 66~69 周龄和 70~76 周龄时, 淫羊藿提取物组破蛋率相比于对照组有降低的趋势 ( $P = 0.073$ )。在 62~65 周龄时, 与对照组相比, 淫羊藿提取物组料蛋比有降低的趋势 ( $P = 0.092$ ); 在 66~69 周龄和 70~76 周龄时, 淫羊藿提取物组料蛋比均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。2 组间平均蛋重和平均日采食量各阶段相比都没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 4 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡生产性能的影响

Table 4 Effects of *Epimedium* extract on performance of laying hens during late laying period

项目 Items	对照组 Control group	淫羊藿提取物组 <i>Epimedium</i> extract group	P 值 P-value
产蛋率 Laying rate/%			
62~65 周龄 62 to 65 weeks of age	92.147±1.107 <sup>b</sup>	95.166±0.501 <sup>a</sup>	0.032
66~69 周龄 66 to 69 weeks of age	88.342±2.134	92.997±1.061	0.090
70~76 周龄 70 to 76 weeks of age	87.918±1.989	91.717±0.837	0.118
平均蛋重 Average egg weight/g			
62~65 周龄 62 to 65 weeks of age	63.698±0.611	65.029±0.466	0.114
66~69 周龄 66 to 69 weeks of age	64.217±0.614	65.081±0.640	0.353
70~76 周龄 70 to 76 weeks of age	64.670±0.852	65.828±0.403	0.247
破蛋率 Egg breaking rate/%			
62~65 周龄 62 to 65 weeks of age	2.001±0.348	1.465±0.094	0.162
66~69 周龄 66 to 69 weeks of age	3.050±0.494	1.914±0.365	0.094
70~76 周龄 70 to 76 weeks of age	3.596±0.528	2.027±0.578	0.073
平均日采食量 ADFI/g			
62~65 周龄 62 to 65 weeks of age	132.888±1.334	135.044±2.058	0.400
66~69 周龄 66 to 69 weeks of age	131.156±1.441	128.674±1.086	0.199
70~76 周龄 70 to 76 weeks of age	135.067±2.056	131.639±1.039	0.178
料蛋比 Feed/egg			
62~65 周龄 62 to 65 weeks of age	2.266±0.028	2.183±0.034	0.092
66~69 周龄 66 to 69 weeks of age	2.317±0.041 <sup>a</sup>	2.159±0.026 <sup>b</sup>	0.009
70~76 周龄 70 to 76 weeks of age	2.345±0.039 <sup>a</sup>	2.226±0.015 <sup>b</sup>	0.016

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下表同。

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

## 2.2 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡蛋品质的影响

由表 5 可知, 在 65 和 69 周龄时, 对照组与淫羊藿提取物组相比蛋壳厚度没有显著差异 ( $P > 0.05$ ); 在 76 周龄时, 与对照组相比, 淫羊藿提取物组蛋壳厚度有增加的趋势 ( $P = 0.097$ )。在 65 周龄时,

2 组之间蛋白高度和哈氏单位均没有显著差异 ( $P > 0.05$ ); 在 69 和 76 周龄时, 与对照组相比, 淫羊藿提取物组蛋白高度及哈氏单位显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。2 组间蛋壳强度、蛋壳重量、蛋形指数和蛋黄比例在各阶段均没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 5 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡蛋品质的影响

Table 5 Effects of *Epimedium* extract on egg quality of laying hens during late laying period

项目 Items	对照组 Control group	淫羊藿提取物组 <i>Epimedium</i> extract group	P 值 P-value
蛋壳厚度 Eggshell thickness/mm			
65 周龄 65 weeks of age	0.369±0.005	0.375±0.005	0.470
69 周龄 69 weeks of age	0.398±0.019	0.404±0.013	0.265
76 周龄 76 weeks of age	0.365±0.005	0.377±0.005	0.097
蛋壳强度 Eggshell strength/N			
65 周龄 65 weeks of age	37.220±1.831	37.561±0.987	0.871
69 周龄 69 weeks of age	35.794±1.500	36.046±0.814	0.883
76 周龄 76 weeks of age	35.766±1.200	35.998±1.468	0.903
蛋壳重量 Eggshell weight/g			
65 周龄 65 weeks of age	5.981±0.100	6.097±0.111	0.442

续表 5

项目 Items	对照组 Control group	淫羊藿提取物组 <i>Epimedium</i> extract group	P 值 P-value
69 周龄 69 weeks of age	5.803±0.117	5.875±0.083	0.619
76 周龄 76 weeks of age	5.773±0.091	5.961±0.100	0.173
蛋白高度 Albumen height/mm			
65 周龄 65 weeks of age	6.750±0.252	6.772±0.235	0.949
69 周龄 69 weeks of age	5.828±0.220 <sup>b</sup>	6.450±0.209 <sup>a</sup>	0.048
76 周龄 76 weeks of age	5.934±0.203 <sup>b</sup>	6.556±0.172 <sup>a</sup>	0.026
哈氏单位 Haugh unit			
65 周龄 65 weeks of age	81.089±1.779	80.889±1.422	0.931
69 周龄 69 weeks of age	74.975±1.522 <sup>b</sup>	79.389±1.188 <sup>a</sup>	0.029
76 周龄 76 weeks of age	75.369±1.037 <sup>b</sup>	78.883±0.909 <sup>a</sup>	0.016
蛋形指数 Egg shape index			
65 周龄 65 weeks of age	1.321±0.012	1.310±0.010	0.500
69 周龄 69 weeks of age	1.305±0.010	1.304±0.013	0.944
76 周龄 76 weeks of age	1.329±0.009	1.313±0.009	0.201
蛋黄比例 Egg yolk ratio/%			
65 周龄 65 weeks of age	25.949±0.464	25.895±0.450	0.933
69 周龄 69 weeks of age	28.768±0.380	28.285±0.481	0.437
76 周龄 76 weeks of age	28.106±0.508	28.454±0.842	0.706

### 2.3 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡血清骨相关指标的影响

由表 6 可知,与对照组相比,淫羊藿提取物组血清 BGP 含量和 TRAP 活性在 65 周龄时没有显著差异 ( $P>0.05$ ),在 69 周龄时血清 BGP 含量

( $P=0.075$ )和 TRAP 活性( $P=0.094$ )均呈现降低的趋势,在 76 周龄时血清 BGP 含量和 TRAP 活性显著降低( $P<0.05$ )。在各试验阶段,各组间血清 ALP 活性没有显著差异( $P>0.05$ )。

表 6 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡血清骨相关指标的影响

Table 6 Effects of *Epimedium* extract on serum bone-related indexes of laying hens during late laying period

项目 Items	对照组 Control group	淫羊藿提取物组 <i>Epimedium</i> extract group	P 值 P-value
骨钙素 BGP/(ng/mL)			
65 周龄 65 weeks of age	0.387±0.065	0.305±0.036	0.297
69 周龄 69 weeks of age	0.361±0.033	0.268±0.033	0.075
76 周龄 76 weeks of age	0.626±0.079 <sup>a</sup>	0.429±0.037 <sup>b</sup>	0.048
抗酒石酸酸性磷酸酶 TRAP/(U/mL)			
65 周龄 65 weeks of age	5.225±0.464	5.213±0.980	0.992
69 周龄 69 weeks of age	5.510±0.480	4.357±0.400	0.094
76 周龄 76 weeks of age	7.330±1.134 <sup>a</sup>	4.101±0.798 <sup>b</sup>	0.042
碱性磷酸酶 ALP/(U/L)			
65 周龄 65 weeks of age	202.366±31.287	289.587±40.308	0.118
69 周龄 69 weeks of age	147.280±22.383	167.937±19.804	0.505
76 周龄 76 weeks of age	150.642±26.740	121.027±18.196	0.381

## 2.4 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡骨指数的影响

由表 7 可知, 与对照组相比, 饲料中添加 200 mg/kg 的淫羊藿提取物显著提高了 69 周龄时的股骨指数 ( $P < 0.05$ ); 在整个试验阶段, 饲料中添

加 200 mg/kg 的淫羊藿提取物对蛋鸡股骨长度、股骨重、胫骨长度、胫骨重和胫骨指数均没有显著影响 ( $P > 0.05$ )。

表 7 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡骨指数的影响

Table 7 Effects of *Epimedium* extract on bone indexes of laying hens during late laying period

项目 Items	对照组 Control group	淫羊藿提取物组 <i>Epimedium</i> extract group	P 值 P-value
股骨长度 Femur length/mm			
65 周龄 65 weeks of age	85.715±1.328	85.782±1.048	0.969
69 周龄 69 weeks of age	86.020±0.777	86.398±0.922	0.760
76 周龄 76 weeks of age	84.123±0.607	86.542±1.613	0.631
股骨重 Femur weight/g			
65 周龄 65 weeks of age	11.217±0.712	11.748±0.457	0.544
69 周龄 69 weeks of age	10.617±0.182	11.283±0.351	0.122
76 周龄 76 weeks of age	11.330±0.427	11.688±0.663	0.659
股骨指数 Femur index/(g/kg)			
65 周龄 65 weeks of age	5.522±0.331	5.651±0.272	0.768
69 周龄 69 weeks of age	4.709±0.205 <sup>b</sup>	5.304±0.116 <sup>a</sup>	0.030
76 周龄 76 weeks of age	5.716±0.167	5.944±0.290	0.512
胫骨长度 Tibia length/mm			
65 周龄 65 weeks of age	117.230±2.483	116.965±0.971	0.923
69 周龄 69 weeks of age	117.937±0.882	117.702±0.425	0.815
76 周龄 76 weeks of age	116.880±1.129	117.348±1.680	0.822
胫骨重 Tibia weight/g			
65 周龄 65 weeks of age	13.493±0.731	13.587±0.421	0.914
69 周龄 69 weeks of age	14.583±0.532	14.283±0.749	0.751
76 周龄 76 weeks of age	13.375±0.366	13.120±0.972	0.648
胫骨指数 Tibia index/(g/kg)			
65 周龄 65 weeks of age	7.147±0.308	7.253±0.348	0.823
69 周龄 69 weeks of age	6.537±0.260	6.681±0.164	0.650
76 周龄 76 weeks of age	6.259±0.289	6.769±0.159	0.153

## 2.5 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡骨强度的影响

由表 8 可知, 在 65 和 69 周龄时, 与对照组相比, 饲料中添加 200 mg/kg 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡胫骨和股骨强度没有显著影响 ( $P > 0.05$ )。在 76 周龄时, 与对照组相比, 淫羊藿提取物组蛋鸡的胫骨强度出现了增加的趋势 ( $P = 0.085$ ), 股骨强度没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

## 2.6 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡股骨骨密度及骨矿物质含量的影响

由表 9 可知, 在 65 和 69 周龄时, 与对照组相比, 淫羊藿提取物组股骨骨密度及骨矿物质含量

均无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 在 76 周龄时, 与对照组相比, 淫羊藿提取物组股骨骨密度及骨矿物质含量显著增加 ( $P < 0.05$ )。

## 2.7 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡骨组织微观结构的影响

如图 2 显示, 对照组蛋鸡股骨的皮质骨吸收腔增加, 骨小梁数目减小, 骨小梁网状结构被破坏, 说明产蛋后期蛋鸡发生骨质疏松。与对照组相比, 淫羊藿提取物组蛋鸡股骨的皮质骨吸收腔减小, 皮质骨面积和宽度增加, 骨小梁结构比较完整, 骨小梁数量和厚度增加, 髓质骨面积和数量增加。

表 8 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡骨强度的影响

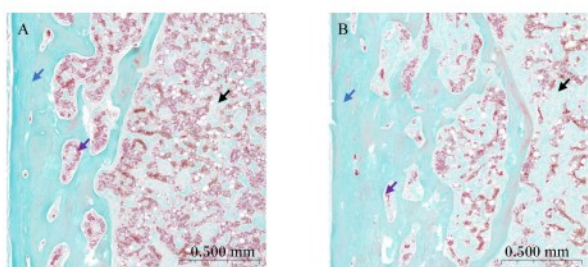
Table 8 Effects of *Epimedium* extract on bone strength of laying hens during late laying period

项目 Items	对照组 Control group	淫羊藿提取物组 <i>Epimedium</i> extract group	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
胫骨强度 Tibia strength			
65 周龄 65 weeks of age	188.795±10.031	192.171±12.388	0.836
69 周龄 69 weeks of age	197.327±10.889	221.630±9.400	0.122
76 周龄 76 weeks of age	193.071±4.600	217.499±11.158	0.085
股骨强度 Femur strength			
65 周龄 65 weeks of age	228.285±10.192	220.239±13.343	0.642
69 周龄 69 weeks of age	180.187±10.011	199.675±8.360	0.166
76 周龄 76 weeks of age	210.006±19.421	205.793±12.536	0.859

表 9 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡骨密度及骨矿物质含量的影响

Table 9 Effects of *Epimedium* extract on bone mineral density and bone mineral contents of laying hens during late laying period

项目 Items	对照组 Control group	淫羊藿提取物组 <i>Epimedium</i> extract group	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
骨密度 BMD/(g/cm <sup>2</sup> )			
65 周龄 65 weeks of age	0.166±0.013	0.180±0.017	0.510
69 周龄 69 weeks of age	0.207±0.015	0.223±0.011	0.382
76 周龄 76 weeks of age	0.181±0.018 <sup>b</sup>	0.228±0.016 <sup>a</sup>	0.027
骨矿物质含量 BMC/g			
65 周龄 65 weeks of age	1.233±0.150	1.500±0.165	0.260
69 周龄 69 weeks of age	1.817±0.119	1.967±0.105	0.369
76 周龄 76 weeks of age	1.517±0.095 <sup>b</sup>	2.026±0.164 <sup>a</sup>	0.023



A: 对照组; B: 淫羊藿提取物组。图片为骨组织 Goldner 三色染色(放大倍数, 8×)。黑色箭头所指的是髓质骨; 蓝色箭头所指的是皮质骨; 紫色箭头所指的是皮质骨吸收腔。

A: control group; B: *Epimedium* extract group. Image shows Goldner trichrome staining of bone tissue (magnification, 8×). Black arrows point to medullary bone; blue arrows point to cortical bone; purple arrows point to cortical bone resorption cavities.

图 2 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡骨组织微观结构的影响

Fig. 2 Effects of *Epimedium* extract on microstructure of bone tissue of laying hens during late laying period

## 2.8 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡骨相关基因 mRNA 表达水平的影响

由表 10 可知,淫羊藿提取物组蛋鸡骨组织中骨保护素(*OPG*)、Runt 相关转录因子 2(*Runx2*)、骨形态发生蛋白 2(*BMP2*)及 SMAD 家族成员 4(*Smad4*)的 mRNA 相对表达量显著高于对照组( $P<0.05$ ); 2 组间骨组织中核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体(*RANKL*)和骨形态发生蛋白 4(*BMP4*)的 mRNA 相对表达量均无显著差异( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡生产性能和蛋品质的影响

现代商品蛋鸡,通常会饲养到 80~90 周龄。老龄蛋鸡通常会面临着生产性能和蛋品质降低的问题<sup>[35]</sup>。蛋重、产蛋率和料蛋比是反映蛋鸡生产性能的重要指标<sup>[36]</sup>。蛋壳厚度、蛋壳强度、蛋白高度、哈氏单位、蛋形指数和蛋黄比率等指标能够综合评价蛋品质<sup>[37-38]</sup>。产蛋与骨之间存在紧密且相

互的关系,产蛋量的增加在一定程度上会消耗蛋鸡的骨骼,引起骨代谢失衡。髓质骨是现存羊膜动物中雌性鸟类特有的一种依赖雌激素的性别特异性组织,被称为蛋壳形成过程中的动态钙库,能够为蛋壳形成提供 35%~40% 的钙<sup>[3,39]</sup>。髓质骨由随机分布的羟基磷灰石晶体组成<sup>[40-41]</sup>,当未发生钙化时,髓质骨进行矿化,然后在蛋壳形成过程中破骨细胞进行骨吸收,将羟基磷灰石中的钙和磷进行快速分解和代谢为离子钙和无机磷酸盐,该矿物质离子被释放到循环中,用于蛋壳形成或排泄钙<sup>[4]</sup>。研究表明,淫羊藿素处理 BMSCs 能够促进其成骨分化,增加钙沉积物的形成<sup>[25]</sup>。地塞米松是骨细胞分化的经典诱导剂,淫羊藿苷在没有地塞米松的情况下仍具有显著的体外成骨细胞分化的能力,并且  $10^{-5}$  mol/L 淫羊藿苷比最佳浓度  $10^{-8}$  mol/L 的地塞米松更能促进成骨矿化<sup>[42]</sup>。杨鹤云等<sup>[43]</sup>在蛋鸡饮水中混入黄芪和淫羊藿口服液发现,中剂量和高剂量组蛋鸡产蛋率显著增加,料蛋比和软破异形蛋率显著降低。本研究发现,饲料中添加 200 mg/kg 淫羊藿提取物能够显著提高蛋鸡 62~65 周龄时的产蛋率,在蛋鸡 66~69 周

龄时具有增加的趋势,而在蛋鸡 70~76 周龄时 2 组产蛋率差异并不显著。在本研究中,淫羊藿提取物处理增加了蛋鸡 62~65 周龄时的产蛋率,说明淫羊藿提取物可能能够促进骨钙形成,随后用于蛋壳形成。蛋鸡 70~76 周龄时 2 组产蛋率差异不显著,可能是由于在蛋鸡 62~65 周龄时,仍然有较多活性卵泡,然而随着年龄的增长,蛋鸡卵巢功能衰退<sup>[44]</sup>,可能即使添加了 200 mg/kg 淫羊藿提取物虽然能够起到一定的改善作用但也无法逆转这种因衰老带来的生殖系统功能的衰退。童小峰等<sup>[45]</sup>研究发现,饲料中添加 0.2% 的淫羊藿苷能够显著提高平均蛋重,平均日采食量具有降低的趋势,蛋白高度显著升高,而添加 0.05% 的淫羊藿苷没有出现上述变化。本研究发现,饲料中添加 200 mg/kg 淫羊藿提取物能够降低料蛋比,降低产蛋后期蛋鸡破蛋率,蛋壳厚度具有增加的趋势,增加了蛋白高度和哈氏单位。由此可见,饲料中添加淫羊藿提取物能够提高蛋鸡的饲料利用率,节约养殖成本,对降低产蛋后期蛋鸡的破蛋率具有一定的积极作用,在一定程度上可以改善蛋壳的质量,减少破蛋的发生,增加养殖场的经济效益。

表 10 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡骨相关基因 mRNA 表达水平的影响

Table 10 Effects of *Epimedium* extract on mRNA expression levels of bone-related genes of laying hens during late laying period

项目 Items	对照组 Control group	淫羊藿提取物组 <i>Epimedium</i> extract group	P 值 P-value
骨保护素 <i>OPG</i>	1.006±0.062 <sup>b</sup>	2.386±0.351 <sup>a</sup>	0.008
Runt 相关转录因子 2 <i>Runx2</i>	1.019±0.117 <sup>b</sup>	1.539±1.156 <sup>a</sup>	0.037
核因子-κB 受体活化因子配体 <i>RANKL</i>	1.065±0.210	0.685±0.136	0.180
骨形态发生蛋白 2 <i>BMP2</i>	1.007±0.070 <sup>b</sup>	3.162±0.599 <sup>a</sup>	0.036
骨形态发生蛋白 4 <i>BMP4</i>	1.023±0.123	0.944±0.061	0.585
SMAD 家族成员 4 <i>Smad4</i>	1.019±0.112 <sup>b</sup>	2.206±0.337 <sup>a</sup>	0.033

### 3.2 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡骨指数、骨强度、骨密度及骨矿物质含量和骨组织微观结构的影响

骨骼能够为身体和运动提供机械支撑,适当的骨重量与体重比可能能够保证蛋鸡有良好的身体结构。在本研究中,饲料中添加 200 mg/kg 淫羊藿提取物显著增加蛋鸡 69 周龄时的股骨指数。朱贵忱等<sup>[46]</sup>研究发现,维甲酸所致的骨质疏松大鼠用 50、100 或 200 mg/kg 淫羊藿苷干预后均能够提高大鼠的骨强度。本研究中,饲料中添加

200 mg/kg 淫羊藿提取物在蛋鸡 69 周龄时具有增加产蛋后期蛋鸡胫骨骨强度的趋势,对股骨骨强度没有产生显著的影响。这可能是由于骨强度的升高是一个积累的过程,在本试验中淫羊藿提取物的作用时间和剂量还不能够使骨强度发生显著的改变。马慧萍等<sup>[47]</sup>用不同剂量的淫羊藿总黄酮治疗维甲酸诱发大鼠骨质疏松症,发现淫羊藿总黄酮各剂量组大鼠股骨的干重、灰重、骨钙、骨磷和骨密度等均明显升高。Huang 等<sup>[48]</sup>研究发现,淫羊藿苷可以通过干扰蛋鸡嘧啶代谢、牛磺酸代

谢和脂质代谢从而增加骨密度,改善骨组织微观结构。Shi等<sup>[49]</sup>招募1017名骨质疏松患者,进行口服淫羊藿联合常规药物治疗与常规药物治疗、单独口服淫羊藿与常规药物治疗,发现淫羊藿能够改善骨密度,并作为辅助或替代药物缓解疼痛。淫羊藿类黄酮化合物具有类雌激素的作用。雌激素在维持骨稳态方面具有重要作用。雌激素能够直接促进BMSCs向成骨细胞分化,从而增强骨形成。此外,雌激素还可以抑制破骨细胞形成并诱导破骨细胞凋亡,从而抑制骨吸收。有研究表明,淫羊藿苷能够通过膜雌激素受体介导的非核作用在体外对成骨细胞的增殖发挥雌激素样作用<sup>[50]</sup>。本试验研究发现,饲料中添加200 mg/kg淫羊藿提取物在蛋鸡65和69周龄时骨密度及骨矿物质含量与饲喂基础饲料的蛋鸡相比差异并不显著;在蛋鸡76周龄时,饲料中添加200 mg/kg淫羊藿提取物蛋鸡骨密度及骨矿物质含量显著升高,蛋鸡皮质骨吸收腔减小、数量减少,骨小梁更加完整,髓质骨数量增多、分布更广。这表明饲料中添加200 mg/kg淫羊藿提取物能够改善产蛋后期蛋鸡骨骼健康。

### 3.3 淫羊藿提取物对血清骨相关指标的影响

血清骨转换生化标志物可以在一定程度上反映成骨细胞和破骨细胞的活动,有助于鉴别原发性和继发性骨质疏松症、判断骨转换类型、预测骨丢失速率、评估骨折风险、了解病情进展等<sup>[51]</sup>。BGP在骨中由成骨细胞分泌,当骨吸收时,腔隙内的酸性环境会导致BGP释放到体循环中,血清BGP含量能够反映骨转换速率<sup>[52]</sup>;TRAP是由破骨细胞产生的,能够与其他酶一起参与骨基质中固体钙磷矿化物的降解,反映破骨活性<sup>[53]</sup>;在骨形成过程中,成骨细胞分泌并合成一种名为ALP的糖蛋白,ALP在骨中发挥着关键作用,通过水解磷酸酯和焦磷酸盐,为骨的形成提供支持<sup>[54]</sup>。当发生高转换型骨质疏松时,这3种指标均升高<sup>[55]</sup>。雌激素缺乏导致的骨质疏松属于高转换型骨质疏松,骨形成和骨吸收均增加,骨吸收影响大于骨形成,骨量减少,易发生骨折<sup>[56]</sup>。有研究发现,淫羊藿苷可以降低产蛋后期蛋鸡的骨转换,降低血清ALP、TRAP的活性及BGP的含量<sup>[48]</sup>。淫羊藿苷还可有效降低糖尿病骨质疏松大鼠血清中骨转换标志物的水平(I型胶原C端肽、ALP、TRAP-5b、BGP和I型原胶原N端前肽),增加骨组织中

*Runx2*、*OPG* mRNA表达和*OPG/RANKL* mRNA比率,使骨密度增加,防止骨质流失<sup>[57]</sup>。在本研究中,饲料中添加200 mg/kg淫羊藿提取物显著降低蛋鸡76周龄时血清BGP含量及TRAP活性,但对ALP的活性没有显著影响。BGP含量降低说明淫羊藿提取物能够调节成骨细胞和破骨细胞的活性。成骨细胞在骨重塑过程中起着重要的作用。成骨细胞能够分泌OPG,OPG通过阻断RANKL与核因子- $\kappa$ B受体活化因子(RANK)的结合来抑制破骨细胞的激活,从而在骨转换中发挥核心作用<sup>[58-59]</sup>。在本试验中TRAP活性降低,ALP活性没有变化,说明成骨细胞的活跃程度下降不显著,破骨细胞的活跃程度下降可能是成骨细胞分泌的OPG抑制了破骨细胞活性。由此可见,饲料中添加200 mg/kg淫羊藿提取物能够降低骨转换率,使净影响为骨形成大于骨吸收。

### 3.4 淫羊藿提取物对产蛋后期蛋鸡骨相关基因表达的影响

*Runx2*属于Runt结构域家族转录因子的成员之一,通过结合特定DNA序列来调控众多基因的转录,从而控制BMSCs向成骨细胞的分化以及成骨细胞向骨细胞的成熟<sup>[60]</sup>。成骨细胞是由BMSCs分化而来,在此过程中受到多种信号通路的调控,其中BMP/Smad信号通路已被证明。BMP2或BMP4与细胞表面受体结合,使Smad1、Smad5或Smad8发生磷酸化后与Smad4结合形成复合物,靶向下游*Runx2*促进成骨细胞分化<sup>[61]</sup>。在本研究中,淫羊藿提取物能够上调蛋鸡骨组织中*OPG*、*BMP2*、*Smad4*和*Runx2*基因的表达。淫羊藿提取物中的主要活性成分淫羊藿苷可能是发挥调控作用的关键物质。研究表明,淫羊藿苷可通过激活相对年轻和年老大鼠的BMP2/Smad5/*Runx2*通路来加速骨折愈合<sup>[62]</sup>。此外,淫羊藿苷还能够通过BMP信号传导上调脑和肌肉芳香烃受体核转运蛋白1(*BMAL1*)表达,而*BMAL1*的过表达可进一步促进成骨基因(如*BMP2*、*Runx2*、*ALP*和*OC*)的表达,从而促进BMSCs向成骨细胞分化<sup>[24]</sup>。Jiao等<sup>[63]</sup>发现,淫羊藿苷促进BMSCs软骨分化和细胞增殖,上调*BMP2*的表达,而BMP-Smad信号通路抑制剂Noggin能够逆转淫羊藿苷对BMSCs的修复作用。本研究中,淫羊藿提取物中除淫羊藿苷外,还含有朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、箭藿苷A、箭藿苷B、鼠李糖基淫羊藿次

苷 II、宝藿苷 I 及淫羊藿素等多种活性成分。这些成分可能通过不同的机制协同调控骨代谢。例如, 朝藿定 A 可能通过 OPG/RANKL、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和蛋白激酶 B (AKT) 信号通路抑制破骨细胞的形成、分化和骨细胞吸收<sup>[64]</sup>。朝藿定 C 可能调控磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)-AKT 信号通路发挥骨保护作用<sup>[65]</sup>。而宝藿苷 I 通过改善 MAPK 和核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路的激活和降低尿激酶型纤溶酶原激活物受体 (uPAR) 的表达来抑制破骨细胞分化, 减少骨吸收<sup>[66]</sup>。然而, 本研究中, 淫羊藿苷作为淫羊藿提取物中含量最高的活性成分 (占总量的 20.081%), 其通过 BMP/Smad 信号通路调控成骨分化的作用最为显著。综上所述, 在本研究中, 淫羊藿提取物主要通过其核心成分淫羊藿苷激活 BMP2/Smad4/Runx2 信号通路, 促进成骨分化。同时, 其他活性成分可能通过协同作用进一步增强骨保护效果。未来研究可进一步分离和鉴定淫羊藿提取物中各成分的具体作用机制, 以明确其在骨代谢调控中的贡献。

#### 4 结 论

饲料中添加 200 mg/kg 淫羊藿提取物能够提高产蛋后期蛋鸡的产蛋率, 降低料蛋比, 提高蛋白高度和哈氏单位; 降低骨转换, 通过 BMP/Smad 信号通路促进成骨细胞分化, 上调 OPG mRNA 表达水平, 降低破骨细胞活性, 提高骨密度, 改善骨微观结构, 使骨折风险降低, 从而发挥骨保护作用。

#### 参考文献:

- [ 1 ] GENNARI L, MERLOTTI D, FALCHETTI A, et al. Emerging therapeutic targets for osteoporosis [ J ]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2020, 24 ( 2 ): 115-130.
- [ 2 ] WHITEHEAD C C. Overview of bone biology in the egg-laying hen [ J ]. Poultry Science, 2004, 83 ( 2 ): 193-199.
- [ 3 ] KIM W K, BLOOMFIELD S A, SUGIYAMA T, et al. Concepts and methods for understanding bone metabolism in laying hens [ J ]. World's Poultry Science Journal, 2012, 68 ( 1 ): 71-82.
- [ 4 ] SINCLAIR-BLACK M, GARCIA R A, ELLESTAD L E. Physiological regulation of calcium and phosphorus utilization in laying hens [ J ]. Frontiers in Physiology, 2023, 14: 1112499.
- [ 5 ] YU Z W, HUANG J, ZHOU Z X. Icariin protects against cage layer osteoporosis by intervening in steroid biosynthesis and glycerophospholipid metabolism [ J ]. Animal Diseases, 2021, 1 ( 1 ): 1.
- [ 6 ] WEBSTER A B. Welfare implications of avian osteoporosis [ J ]. Poultry Science, 2004, 83 ( 2 ): 184-192.
- [ 7 ] 马健. 苏中地区笼养蛋鸡瘫痪综合征的调查与诊断 [ D ]. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2009. MA J. Investigation and diagnosis of the paralysis syndrome of caged laying hen [ D ]. Master's Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009. ( in Chinese )
- [ 8 ] 刘文舫. 杜仲叶提取物对蛋鸡生产性能, 蛋品质与健康的影响 [ D ]. 硕士学位论文. 成都: 西南民族大学, 2023. LIU W F. Effects of *Eucommia ulmoides* leaves extract on production performance, egg quality and health of laying hens [ D ]. Master's Thesis. Chengdu: Southwest Minzu University, 2023. ( in Chinese )
- [ 9 ] MCCOY M A, REILLY G A C, KILPATRICK D J. Density and breaking strength of bones of mortalities among caged layers [ J ]. Research in Veterinary Science, 1996, 60 ( 2 ): 185-186.
- [ 10 ] 毕思恺, 刘虹, 许少成, 等. 山东省蛋鸡养殖成本收益分析 [ J ]. 青岛农业大学学报 ( 社会科学版 ), 2024, 36 ( 4 ): 32-36. BI S K, LIU H, XU S C, et al. Cost and benefit analysis of laying-hen farming in Shandong province [ J ]. Journal of Qingdao Agricultural University ( Social Science Edition ), 2024, 36 ( 4 ): 32-36. ( in Chinese )
- [ 11 ] 马健. 笼养蛋鸡骨质疏松症的诊断、治疗和预防 [ C ] // 中国畜牧兽医学会家禽学分会第九次代表会议暨第十六次全国家禽学术讨论会论文集. 北京: 《中国家禽》编辑部, 2013: 497-500. MA J. Diagnosis, treatment and prevention of osteoporosis in caged laying hens [ C ] // Proceedings of the Ninth Representative Meeting of the Chinese Animal Husbandry and Veterinary Association Poultry Branch and the Sixteenth National Poultry Symposium. Beijing: Editorial Board of Chinese Poultry, 2013: 497-500. ( in Chinese )
- [ 12 ] FLEMING R H. Nutritional factors affecting poultry bone health [ J ]. The Proceedings of the Nutrition Society, 2008, 67 ( 2 ): 177-183.
- [ 13 ] 主性, 侯加法. 笼养蛋鸡骨质疏松症的研究进展 [ J ]. 黑龙江畜牧兽医, 2007 ( 2 ): 27-28.

- ZHU X, HOU J F. Research progress on osteoporosis in caged laying hens [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2007 (2): 27–28. (in Chinese)
- [14] ALKHTIB A, SCHOLEY D, CARTER N, et al. Bioavailability of methionine-coated zinc nanoparticles as a dietary supplement leads to improved performance and bone strength in broiler chicken production [J]. *Animals*, 2020, 10(9): 1482.
- [15] TASKOZHINA G, BATYROVA G, UMAROVA G, et al. The manganese-bone connection: investigating the role of manganese in bone health [J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2024, 13(16): 4679.
- [16] 邓益锋, 侯加法. 日粮中维生素 D<sub>3</sub> 含量对笼养蛋鸡骨矿含量及骨显微结构的影响 [J]. *中国兽医科技*, 2004, 34(10): 21–24.  
DENG Y F, HOU J F. Effect of vitamin D<sub>3</sub> concentration in cage layer diet on bone mineral content and microstructure [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2004, 34(10): 21–24. (in Chinese)
- [17] CHEN N N, LIU B, XIONG P W, et al. Safety evaluation of zinc methionine in laying hens: effects on laying performance, clinical blood parameters, organ development, and histopathology [J]. *Poultry Science*, 2018, 97(4): 1120–1126.
- [18] 周晓洁, 姚辛敏, 周妍妍. 淫羊藿的药理作用研究进展 [J]. *中医药学报*, 2022, 50(11): 112–115.  
ZHOU X J, YAO X M, ZHOU Y Y. Research progress on pharmacological effects of *Epimedium* [J]. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*, 2022, 50(11): 112–115. (in Chinese)
- [19] ZHAO B J, WANG J, SONG J, et al. Beneficial effects of a flavonoid fraction of *Herba Epimedii* on bone metabolism in ovariectomized rats [J]. *Planta Medica*, 2016, 82(4): 322–329.
- [20] 王旭东, 赵宏宇, 邸琳, 等. 淫羊藿骨碎补联合骨营养补剂对骨质疏松大鼠的影响 [J]. *食品工业科技*, 2021, 42(13): 338–344.  
WANG X D, ZHAO H Y, DI L, et al. Effects of *Epimedium Rhizoma drynariae* combined with bone nutritional tonic on rats with osteoporosis [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(13): 338–344. (in Chinese)
- [21] CHEN W F, MOK S K, WANG X L, et al. Total flavonoid fraction of the *Herba Epimedii* extract suppresses urinary calcium excretion and improves bone properties in ovariectomised mice [J]. *British Journal of Nutrition*, 2011, 105(2): 180–189.
- [22] 詹扬, 韦英杰, 孙娥, 等. 二维斑马鱼模型联合色谱技术评价朝藿定 A 及其代谢物宝藿苷 I 抗骨质疏松活性 [J]. *药学学报*, 2014, 49(6): 932–937.  
ZHAN Y, WEI Y J, SUN E, et al. Two-dimensional zebrafish model combined with hyphenated chromatographic techniques for evaluation anti-osteoporosis activity of epimedin A and its metabolite baohuoside I [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2014, 49(6): 932–937. (in Chinese)
- [23] CHEN M, CUI Y Z, LI H, et al. Icaritin promotes the osteogenic action of BMP2 by activating the cAMP signaling pathway [J]. *Molecules*, 2019, 24(21): 3875.
- [24] HUANG Z F, WEI H, WANG X, et al. Icaritin promotes osteogenic differentiation of BMSCs by upregulating *BMAL1* expression via BMP signaling [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 21(3): 1590–1596.
- [25] WEI Q S, WANG B, HU H L, et al. Icaritin promotes the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells via the regulation of sclerostin expression [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2020, 45(3): 816–824.
- [26] SONG L G, ZHAO J S, ZHANG X Z, et al. Icaritin induces osteoblast proliferation, differentiation and mineralization through estrogen receptor-mediated ERK and JNK signal activation [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2013, 714(1–3): 15–22.
- [27] HUANG X W, WANG X P, ZHANG Y, et al. Absorption and utilisation of epimedin C and icaritin from *Epimedium* herba, and the regulatory mechanism via the BMP2/Runx2 signalling pathway [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 118: 109345.
- [28] XI Y H, JIANG T W, YU J M, et al. Preliminary studies on the anti-osteoporosis activity of baohuoside I [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 115: 108850.
- [29] BAI L, LIU Y P, ZHANG X H, et al. Osteoporosis remission via an anti-inflammaging effect by icaritin activated autophagy [J]. *Biomaterials*, 2023, 297: 122125.
- [30] NRC. Nutrient requirements of poultry [S]. 9th ed. Washington, D. C.: The National Academies Press, 1994.
- [31] 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中粗蛋白的测定凯氏定氮法: GB/T 6432—2018 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.  
State Administration for Market Regulation, China

- National Standardization Administration. Determination of crude protein in feeds-Kjeldahl method; GB/T 6432—2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018. (in Chinese)
- [32] 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中钙的测定: GB/T 6436—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.  
State Administration for Market Regulation, China National Standardization Administration. Determination of calcium in feeds; GB/T 6436—2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018. (in Chinese)
- [33] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 饲料中总磷的测定: 分光光度法: GB/T 6437—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.  
State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. Determination of phosphorus in feeds-spectrophotometry; GB/T 6437—2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018. (in Chinese)
- [34] 佚名. 中国饲料成分及营养价值表(2019年第30版)[J]. 中国饲料, 2019(22): 111-116.  
Anon. Tables of feed composition and nutritive in China(2019 thirty edition)[J]. China Feed, 2019(22): 111-116. (in Chinese)
- [35] HAN G P, KIM D Y, LEE E C, et al. Effect of dietary supplementation of taurine on productive performance, egg quality, and liver health in aged laying hens[J]. Animal Feed Science and Technology, 2023, 304: 115734.
- [36] 卢焱. 茶多酚降低鸡蛋胆固醇效果及其机制研究[D]. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学, 2019.  
LU Y. Study on the effect and mechanism of tea polyphenols on egg cholesterol reduction[D]. Master's Thesis. Chongqing: Southwest University, 2019. (in Chinese)
- [37] 张浩, 李然, 曹金元. 鸡蛋品质主要指标的涵义及检测方法[J]. 养殖与饲料, 2020, 19(8): 58-60.  
ZHANG H, LI R, CAO J Y. Meaning and detection methods of the main indicators of egg quality[J]. Animals Breeding and Feed, 2020, 19(8): 58-60. (in Chinese)
- [38] 辛清武, 朱志明, 缪中纬, 等. 万寿菊干花粉对海兰灰蛋鸡生产性能和蛋品质的影响[J]. 动物营养学报, 2022, 34(5): 2896-2906.  
XIN Q W, ZHU Z M, MIAO Z W, et al. Effects of marigold dry meal on performance and egg quality of Hy-Line gray laying hens[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(5): 2896-2906. (in Chinese)
- [39] CANOVILLE A, SCHWEITZER M H, ZANNO L E. Systemic distribution of medullary bone in the avian skeleton; ground truthing criteria for the identification of reproductive tissues in extinct *Avenetatarsalia*[J]. BMC Evolutionary Biology, 2019, 19(1): 71-90.
- [40] ASCENZI A, FRANCOIS C, BOCCIARELLIDS. On the bone induced by estrogens in birds[J]. Journal of Ultrastructure Research, 1963, 8: 491-505.
- [41] DACKER C G, ARKLE S, COOK D J, et al. Medullary bone and avian calcium regulation[J]. Journal of Experimental Biology, 1993, 184(1): 63-88.
- [42] MA X N, ZHOU J, FE B F, et al. Icarin induces osteoblast differentiation and mineralization without dexamethasone *in vitro*[J]. Planta Medica, 2013, 79(16): 1501-1508.
- [43] 杨鹤云, 史万玉. 黄芪和淫羊藿口服液对蛋鸡生产性能的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(22): 172-174.  
YANG H Y, SHI W Y. Effect of oral solution of *Astragalus* and *Epimedium* on production performance of laying hens[J]. Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016(22): 172-174. (in Chinese)
- [44] 姜礼文, 冯京海, 张敏红, 等. 不同周龄蛋鸡卵巢机能及氧化还原状态的变化研究[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(10): 165-169.  
JIANG L W, FENG J H, ZHANG M H, et al. Influence of age on ovary function and oxidative stress in laying hens[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 40(10): 165-169. (in Chinese)
- [45] 童小峰, 张磊, 黄杰, 等. 淫羊藿苷对蛋鸡生产性能、蛋品质、输卵管氧化还原状态和炎症细胞因子基因表达的影响[J]. 动物营养学报, 2020, 32(12): 5676-5683.  
TONG X F, ZHANG L, HUANG J, et al. Effects of icariin on performance, egg quality, redox state and gene expression of inflammatory cytokines in oviduct of laying hens[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(12): 5676-5683. (in Chinese)
- [46] 朱贵忱, 刘明雨, 孙利锋, 等. 淫羊藿苷对二甲酸致大鼠骨质疏松影响的研究[J]. 河北医药, 2014, 36(1): 8-10.  
ZHU G C, LIU M Y, SUN L F, et al. Effect of icariin on osteoporosis induced by retinoic acid in rats[J]. Hebei Medical Journal, 2014, 36(1): 8-10. (in Chinese)
- [47] 马慧萍, 贾正平, 葛欣, 等. 淫羊藿总黄酮抗大鼠实验性骨质疏松作用研究[J]. 华西药学杂志, 2002, 17(3): 163-167.  
MA H P, JIA Z P, GE X, et al. Studies on the therapeutic effect of total flavonoids of *Herba Epimedium* on experimental osteoporosis in rats[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002, 17(3): 163-167. (in Chinese)
- [48] HUANG J, HU Y P, TONG X F, et al. Untargeted

- metabolomics revealed therapeutic mechanisms of icariin on low bone mineral density in older caged laying hens [J]. *Food & Function*, 2020, 11(4): 3201–3212.
- [49] SHI S H, WANG F, HUANG Y, et al. *Epimedium* for osteoporosis based on western and eastern medicine: an updated systematic review and Meta-analysis [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 782096.
- [50] ZHANG D P, SU Y, HE Q, et al. Icariin exerts estrogen-like actions on proliferation of osteoblasts *in vitro* via membrane estrogen receptors-mediated non-nuclear effects [J]. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 2022, 21(1): e127000.
- [51] 翁睿, 李峰. 骨转换生化标志物预测骨质疏松性骨折的研究进展 [J]. *老年医学研究*, 2023, 4(3): 53–56. WENG R, LI F. Advances in predicting osteoporotic fractures with biochemical markers of bone turnover [J]. *Geriatrics Research*, 2023, 4(3): 53–56. (in Chinese)
- [52] MARTINIAKOVA M, BIRO R, KOVACOVA V, et al. Current knowledge of bone-derived factor osteocalcin: its role in the management and treatment of diabetes mellitus, osteoporosis, osteopetrosis and inflammatory joint diseases [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2024, 102(4): 435–452.
- [53] 曾芳馨, 熊中云. 抗酒石酸酸性磷酸酶与骨代谢 [J]. *华西医学*, 2005(3): 545. ZENG F X, XIONG Z Y. Tartrate resistant acid phosphatase and bone metabolism [J]. *West China Medicine*, 2005(3): 545. (in Chinese)
- [54] 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(2): 64–65. WU W Y. Methods of detection and clinical application of bone-type alkaline phosphatase [J]. *Foreign Medical Science; Clinical Biochemistry and Laboratory*, 1999(2): 64–65. (in Chinese)
- [55] 张萌萌, 徐又佳, 侯建明, 等. 骨质疏松实验室诊断及影响因素专家共识 2022 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(9): 1249–1259. ZHANG M M, XU Y J, HOU J M, et al. Expert consensus on laboratory diagnosis and influencing factors of osteoporosis [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2022, 28(9): 1249–1259. (in Chinese)
- [56] EASTELL R, O' NEILL T W, HOFBAUER L C, et al. Postmenopausal osteoporosis [J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2016, 2: 16069.
- [57] QI S S, HE J, ZHENG H X, et al. Icariin prevents diabetes-induced bone loss in rats by reducing blood glucose and suppressing bone turnover [J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2019, 24(10): 1871.
- [58] REID P, HOLEN I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG) [J]. *European Journal of Cell Biology*, 2009, 88(1): 1–17.
- [59] 宋瑞龙. OPG 对破骨细胞分化过程中细胞骨架的影响及其分子机理 [D]. 博士学位论文. 扬州: 扬州大学, 2014. SONG R L. Influences of osteoprotegerin on the cytoskeleton of osteoclast and the involve signalling pathways in the process of osteoclast differentiation [D]. Ph. D. Thesis. Yangzhou: Yangzhou University, 2014. (in Chinese)
- [60] SCHROEDER T M, JENSEN E D, WESTENDORF J J. *Runx2*: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts [J]. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, 2005, 75(3): 213–225.
- [61] SALHOTRA A, SHAH H N, LEVI B, et al. Mechanisms of bone development and repair [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, 21(11): 696–711.
- [62] ZHANG X Y, CHEN Y P, ZHANG C, et al. Effects of icariin on the fracture healing in young and old rats and its mechanism [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2021, 59(1): 1245–1255.
- [63] JIAO F, TANG W, WANG J, et al. Icariin promotes the repair of bone marrow mesenchymal stem cells in rabbit knee cartilage defects via the BMP/Smad pathway [J]. *Annals of Translational Medicine*, 2022, 10(12): 691.
- [64] 刘颖. 淫羊藿及其主要成分朝藿定 A 对骨质疏松影响及机制的研究 [D]. 博士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018. LIU Y. Study on the effects of *Epidium* and epimedin A—an component of *Epidium* on osteoporosis and its mechanism [D]. Ph. D. Thesis. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [65] 宋蕾, 王丽雯, 周雅婷, 等. 朝藿定 C 体内抗骨质疏松作用机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(3): 555–558. SONG L, WANG L W, ZHOU Y T, et al. Investigating the *in vivo* mechanisms of epimedin C against osteoporosis [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2021, 32(3): 555–558. (in Chinese)
- [66] MA M, FAN A Y, LIU Z, et al. Baohuoside I inhibits osteoclastogenesis and protects against ovariectomy-induced bone loss [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 874952.

## Bone-Protective Effects and Mechanisms of Dietary Supplementation with *Epimedium* Extract in Laying Hens during Late Laying Period

LIU Yaqing<sup>1,2</sup> XU Jianfang<sup>2</sup> ZHANG Huiyan<sup>2</sup> ZHAO Qingyu<sup>2</sup> TANG Chaohua<sup>2</sup>  
ZHANG Junmin<sup>2</sup> DONG Huansheng<sup>1\*</sup> SI Wei<sup>2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2. State Key Laboratory of Animal Nutrition and Feeding, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** This experiment aimed to investigate the bone-protective effect and mechanism of *Epimedium* extract in laying hens during late laying period. A total of 180 healthy 60-week-old Hy-Line Brown laying hens with similar egg production rates were selected and randomly divided into 2 groups, each containing 6 replicates of 15 hens. The pre-feeding period lasted one week, while the trial period lasted 15 weeks. The control group was fed a basal diet, whereas the *Epimedium* extract group was fed the basal diet supplemented with 200 mg/kg *Epimedium* extract. The results showed that: compared with the control group, 1) the hens in the *Epimedium* extract group significantly increased the laying rate at 62 to 65 weeks of age ( $P < 0.05$ ) and significantly decreased the feed-to-egg ratio at 66 to 69 weeks of age and 70 to 76 weeks of age ( $P < 0.05$ ); 2) at 76 weeks of age, the eggs in the *Epimedium* extract group exhibited a tendency to increase eggshell thickness ( $P = 0.097$ ) and significantly increased albumen height and Haugh unit at 69 and 76 weeks of age ( $P < 0.05$ ); 3) at 76 weeks of age, the hens in the *Epimedium* extract group significantly decreased the serum osteocalcin (BGP) content and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity ( $P < 0.05$ ); 4) at 69 weeks of age, the hens in the *Epimedium* extract group significantly increased the femur index ( $P < 0.05$ ); 5) at 76 weeks of age, the hens in the *Epimedium* extract group tended to increase tibia strength ( $P = 0.085$ ); 6) at 76 weeks of age, the hens in the *Epimedium* extract group significantly increased femur bone mineral density and bone mineral content ( $P < 0.05$ ); 7) at 76 weeks of age, the addition of 200 mg/kg *Epimedium* extract to the diet improved the microstructure of bone tissue; 8) the addition of 200 mg/kg *Epimedium* extract to the diet up-regulated the relative mRNA expression of osteoprotegerin (*OPG*), runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*), bone morphogenetic protein 2 (*BMP2*) and SMAD family member 4 (*Smad4*) in the bone tissue ( $P < 0.05$ ). Overall, these results indicate that the dietary supplementation with 200 mg/kg *Epimedium* extract increases the laying rate during the late laying period, reduces the feed-to-egg ratio, enhances egg quality by increasing albumen height and Haugh unit, decreases bone turnover, promotes osteoblast differentiation, improves bone density and bone microstructure, and exerts a protective effect on bones. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2025, 37(8):5198-5213]

**Key words:** *Epimedium* extract; laying hens during late laying period; osteoporosis; bone health

\* Corresponding authors: DONG Huansheng, professor, E-mail: donghuansheng@163.com; SI Wei, professor, E-mail: siwei01@caas.cn

(责任编辑 陈鑫)