

羊骨髓肽-钙螯合物对诱导分化的破骨细胞形成和吸收的影响

陈静¹, 姚薇², 韩克光^{1*}, 郑明学¹, 古少鹏¹, 张鼎¹, 田文霞¹, 霍乃蕊^{1*}

(1. 山西农业大学动物科技学院, 山西 太谷 030801; 2. 山西农业大学食品与工程学院, 山西 太谷 030801)

【摘要】 目的 探讨羊骨髓肽(sheep bone marrow peptides, MP)及其钙螯合物(MP-Ca)对诱导分化的OC形成和活性的影响。方法 将MP与CaCl₂螯合制备MP-Ca,以RAW264.7为破骨前体细胞模型,建立OC的RANKL诱导体系,以MP和MP-Ca干预诱导过程,确定二者在最适作用浓度下对诱导曲线、TRAP活性和骨吸收陷窝数的影响。结果 诱导后第5天,细胞呈现OC典型形态,TRAP染色呈阳性并在共培养的骨片上形成骨吸收陷窝,MTT检测时OD₄₉₀达到峰值;以第5天作为检测时间,MP与MP-Ca均以10³ μg/mL时OD₄₉₀最低;以10³ μg/mL MP和MP-Ca干预诱导体系,除第1天外,干预组OD₄₉₀均显著低于空白组($P < 0.05$);在第5天,MP-Ca组的OD₄₉₀和TRAP活性均显著低于MP组($P < 0.05$);各干预组的骨吸收陷窝数均显著低于空白组,且MP组显著低于MP-Ca组($P < 0.05$);17β-雌二醇(10 μg/mL)的各检测指标均显著低于干预组($P < 0.05$)。结论 虽效果不及雌激素,MP和MP-Ca均可抑制OC的诱导形成及其破骨活性,MP-Ca对OC诱导形成的抑制作用强于MP。

【关键词】 破骨细胞;骨髓肽;肽钙螯合物;17β-雌二醇;骨代谢

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 05-0574-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.05.006

Effects of sheep bone marrow peptides with and without calcium chelation on RANKL-induced osteoclast formation and activity

CHEN Jing¹, YAO Wei², HAN Keguang^{1*}, ZHENG Mingxue¹, GU Shaopeng¹,
ZHANG Ding¹, TIAN Wenxia¹, HUO Nairui^{1*}

(1. College of Animal Science And Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;
2. College of Food And Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801)

Corresponding author: HUO Nairui. E-mail: tgnrhuo@163.com; HAN Keguang. E-mail: keguanghan@163.com

【Abstract】 Objective Osteoclast numbers and activity are directly related to bone turnover and metabolism. This study aimed to investigate the effects of sheep bone marrow peptides (MP) and calcium-chelated MP (MP-Ca) on the formation and activity of RANKL-induced osteoclasts. **Methods** MP-Ca was prepared by a chelating reaction between MPs and CaCl₂. RAW264.7 cells were induced to osteoclasts by RANKL treatment, and cell proliferation was examined using the MTT assay. Induction was intervened by MP and MP-Ca to determine optimal concentrations and to investigate their effects on induction curves, TRAP activity, and the number of lacunae formed in bone slices. **Results** Under the induction system, on day 5, cultured cells were took on typical morphology of mature osteoclasts, TRAP staining was positive, resorptive pits formed, and the peak OD₄₉₀ value was achieved. The lowest OD₄₉₀ value was achieved when 10³ μg/mL MP or MP-Ca were added into the induction system on day 5. When 10³ μg/mL MP or MP-Ca was added to the

【基金项目】 国家自然科学基金(31201347);山西省回国留学人员项目(2014-042)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31201347), Shanxi Province Returned Overseas Scholars Program (2014-042)。

【作者简介】 陈静(1993—)女,硕士,研究方向:兽医药物代谢与药效。E-mail: 408239281@qq.com

【通信作者】 霍乃蕊(1972—)女,教授,博士生导师,研究方向:动物疫病防治与公共卫生。Email: tgnrhuo@163.com;

韩克光(1968—)男,副教授,硕士生导师,研究方向:兽医药物代谢与药效。Email: keguanghan@163.com

* 共同通信作者

induction system, except on day 1, OD_{490} values from days 2–8 were significantly lower than the blank group ($P < 0.05$). In addition, the OD_{490} value and TRAP activity of the MP-Ca group were markedly lower than the MP group ($P < 0.05$). Pit numbers in the intervention groups were notably lower than the blank group, and the number of lacunae in the MP group was significantly lower than the MP-Ca group ($P < 0.05$). All indices checked in the 17- β -estradiol group were lower than the intervention groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Although inferior to estrogen, both MP and MP-Ca inhibit the RANKL-induced formation and the resorptive activity of osteoclasts. Moreover, MP-Ca was more effective at inhibiting osteoclast formation than MP.

【Keywords】 osteoclasts; bone marrow peptides; calcium-chelated peptides; 17- β -estradiol; bone metabolism

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

骨质疏松 (osteoporosis, OP) 是一种常见的全身性骨代谢病^[1], 正常的骨代谢过程中, 骨吸收和骨形成处于动态平衡。研究表明 OP 发生时, OC 过度形成和活化, 骨吸收活性异常增加, 导致骨流失加快, 骨量减少, 骨质劣变^[2–3]。因此抑制 OC 形成及其骨吸收活性是 OP 防治的一个重要策略。钙制剂在 OP 防治中的作用, 已被大量研究证实^[4]。作为第四代钙制剂, 肽钙螯合物溶解性和解离性好, 生物利用度高, 且其中的肽可促进钙离子的转运和吸收^[5]。

课题组前期研究结果已证实了羊骨髓肽 (sheep bone marrow polypeptides, MP) 及其钙螯合物 (MP-Ca) 对去卵巢大鼠骨质疏松的防治效果^[6]。本研究将以 RAW264.7 为破骨前体细胞, 建立 OC 的 RANKL 诱导体系, 研究 MP 和 MP-Ca 对 OC 诱导形成和活性的影响, 并将二者的效果进行比较, 揭示其抑制 OP 发生的机制, 为 OP 防治药物研发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

MP 由内蒙古锡林郭勒盟肽好生物制品有限责任公司生产、分离和纯化, 以干基计, 蛋白含量为 96%。小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 和 RPMI 1640 不完全培养基购自南京凯基生物科技发展有限公司。完全培养基在不完全培养基中补充 10% 的胎牛血清 (浙江); 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 染色试剂盒、TRAP 酶活性检测试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自南京建成科技有限公司; MTT 试剂盒与 Triton X-100 为 Solarbio 产品; RANKL 和 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液分别为美国 Peprotech 和 Sigma 产品; 茚三酮试剂。

JEOL JEM-6490LV 扫描电子显微镜 (日本电子光学实验室, 日本); 6 孔和 24 孔细胞培养板 (Corning, 美国); Olympus CX21 倒置相差显微镜; MC721 酶联

免疫检测仪 (上海菁华科技仪器有限公司)。

1.2 MP-Ca 的制备与鉴定

以 MP 和 $CaCl_2$ 为原料, 按照实验室优化的螯合工艺制备 MP-Ca 冻干粉^[7–8]。对 MP-Ca 鉴定时, 先对其进行纯化, 除去样品中的游离的氨基酸和肽, 具体操作为: 在 MP-Ca 溶液中加入 5~8 滴茚三酮试剂, 加热至沸腾, 若溶液变为蓝紫色, 说明样品中仍有游离的氨基酸或小肽, 需要继续对样品进行醇沉纯化, 直至加入茚三酮试剂不再变色。溶解纯化后的 MP-Ca 样品, 加入过量的硫化钠, 振荡摇匀, 放置一段时间, 若有硫化钙沉淀生成, 说明钙离子来自肽钙螯合物, 过滤掉沉淀, 滤液中加入茚三酮试剂, 如果颜色变为蓝紫色, 说明溶液中的肽来自肽钙螯合物。

取适量 MP 和 MP-Ca 样品送至山西农业大学实验中心, 进行扫描电镜分析。

1.3 破骨细胞诱导体系的建立

RAW264.7 细胞用完全培养基于 37℃, 5% CO_2 培养箱中培养 48 h, 换液培养。待细胞贴壁达到瓶底面积 70%~80% 时, 以 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化, 收集消化液, 1000 r/min 离心 5 min, 细胞用完全培养基重悬后传代。

取对数期的 RAW264.7 细胞用含 RANKL (终浓度为 50 ng/mL) 的完全培养基制成浓度为 10^4 个/mL 的细胞悬液。在 6 孔培养板小孔中预置无菌盖玻片 (1 cm × 1 cm) 和骨片 (0.5 cm × 0.5 cm, 厚 20 μ m), 每孔加入 1 mL 上述细胞悬液, 培养约 4 h, 待细胞贴壁后在小孔中补加含 50 ng/mL RANKL 的培养基, 隔天换液, 期间观察细胞形态。

于培养第 3 天开始, 每 24 h 取出一枚盖玻片和骨片, 盖玻片按 TRAP 染色试剂盒说明进行 TRAP 染色, 骨片超声清洗后, 梯度乙醇脱水, 自然晾干, 1% 甲苯胺蓝室温染色 3~4 min, 蒸馏水洗。将盖玻片和骨片置光镜下观察, 确定破骨细胞诱导形成的时间。

1.4 MTT 法测定细胞生长曲线及受试物的最适干预浓度

96 孔板上, RAW264.7 细胞 (10^4 个/mL) 的接种量为 100 μ L/孔, 诱导组小孔中 RANKL 的终浓度为 50 ng/mL, 对照组小孔不加 RANKL。每组 8 个平行, 每个平行 5 个复孔, 每天取一个平行进行测定, 各孔按照 MTT 试剂盒说明进行操作, 并测定 OD_{490} 值, 绘制细胞生长曲线, 确定 OD_{490} 峰值所对应的检测天数, 并以此作为确定各受试物最适作用浓度时的检测时间。

按 1.3 建立诱导体系, 以不同浓度的受试物干预 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞向 OC 分化的过程。MP, MP-Ca 浓度分别为 0, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 μ g/mL, 17β -雌二醇 (E_2) 浓度为 0, 1, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 μ g/mL, 于培养第 5 天用 MTT 法进行检测, 确定各受试物的最适作用浓度。

1.5 最适作用浓度下受试物对破骨前体细胞分化增殖的影响

按 1.3 建立诱导体系, 以等体积最适作用浓度

$$\text{总蛋白浓度}(\mu\text{g/mL}) = \frac{OD_{562}(\text{测定}) - OD_{562}(\text{空白})}{OD_{562}(\text{测定}) - OD_{562}(\text{空白})} \times \text{标准样品浓度}(\mu\text{g/mL}) \quad (1)$$

$$\text{TRAP 比活力}(\text{U/g} \cdot \text{prot}) = \frac{OD_{405}(\text{测定}) - OD_{405}(\text{空白})}{\text{呈色物微摩尔消光系数}} \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{比色光径} \times \text{反应时间} \times \text{取样量}} \div \text{待测样本蛋白浓度} \quad (2)$$

1.7 骨吸收陷窝的计数

骨片取出后, 按 1.3 描述经 1% 甲苯胺蓝染色后, 100 倍光镜下计数整张骨片的吸收陷窝数。

1.8 统计学方法

数据采用 SPSS 21.0 统计软件和 Sigma Plot 10.0 软件处理, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果分析

2.1 MP-Ca 的鉴定

制备的 MP-Ca 经纯化后加入过量 Na_2S , 生成了 CaS 沉淀和游离肽 (显色反应呈阳性), 说明钙离子和肽结合形成了螯合物。在扫描电镜下, MP 与 Ca^{2+} 螯合后, 其疏松的片状结构表面增加了颗粒性物质, 类似于盐的结构, 这表明 MP 与钙离子发生了螯合, 形成了羧酸盐和胺盐。(见图 1)

2.2 破骨细胞鉴定

RAW264.7 细胞加入 RANKL 培养 24 h, 光镜下可见部分细胞开始融合, 培养 72 h 出现了具有典型 OC 形态的细胞, 可观察到胞体较大, 边缘不整齐, 周围有刷状缘 (褶皱), 有伪足的细胞 (图 2-左), 第 5 天观察时视野中基本都是此类细胞。第 6 天部分

的 MP, MP-Ca 及 E_2 干预 RAW264.7 的 RANKL 诱导分化的过程, 同时设空白组, 每组 10 个平行, 每个平行 5 个复孔, 每隔 24 h 进行 MTT 测定, 记录 OD_{490} 值并绘制各组细胞生长曲线。其中一个平行与骨磨片共培养, 于第 5 天进行骨吸收陷窝计数, 另取一个平行于第 5 天测定 TRAP 活性。

1.6 TRAP 活性的测定

吸弃培养基, 细胞用 PBS 洗涤两次, 每孔加入 200 μ L 0.2% Triton X-100 裂解细胞。取 100 μ L 细胞裂解液, 按 TRAP 酶活性检测试剂盒说明进行操作, 测定 OD_{405} 值。另取 100 μ L 细胞裂解液按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行操作并测定 OD_{562} 值。按式 (1) 将 OD_{562} 值换算成细胞裂解液总蛋白浓度, 式中标准样品浓度为 563 μ g/mL。

定义在 pH 4.8, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 每分钟水解 para-nitrophenyl phosphate (PNPP) 显色底物产生 1 μ mol p-nitrophenol 呈色物所需的酸性磷酸酶的量为一个酶活力单位 (U)。以总蛋白浓度作对照, TRAP 活性以 TRAP 比活力表示, 按式 (2) 进行计算。

细胞胞体缩小, 第 7 天细胞数目明显减少, 细胞裂解。第 3 天检测时, 共培养的盖玻片经 TRAP 染色可观察到胞浆内形成棕红色沉淀 (图 2-中); 诱导培养至第 5 天, 共培养的骨片经甲苯胺蓝染色可观察到清晰的吸收陷窝 (图 2-右)。

综上, 破骨前体细胞 RAW264.7 培养 4 h 贴壁后, 以 50 ng/mL RANKL 诱导培养 96 h, 分化形成具有典型细胞形态特征和骨吸收活性的成熟 OC, 所以第 5 天检测到的细胞为成熟的 OC。

2.3 细胞生长曲线

由图 3 可以看出, 第 1 天检测时, 诱导组和对照组的 OD_{490} 值大致相同, 两组细胞都在第 5 天达到峰值, 随后直接进入凋亡期。第 2 天检测时, 对照组细胞直接进入对数期, 而诱导组细胞的 OD_{490} 值没有升高。对数期内诱导组每个检测点的 OD_{490} 值均低于对照组。此结果与 2.2 中的形态学观察结果吻合, 所以在确定各受试物的最适作用浓度时, 选择第 5 天作为 MTT 法的检测点。

2.4 MP 和 MP-Ca 对 OC 诱导形成的影响

以不同浓度的受试物干预诱导过程, 于第 5 天进行检测, 由图 4 可知, 随着浓度的增加, MP、MP-Ca、 E_2 组的 OD_{490} 值总体呈下降趋势, 达到最低值

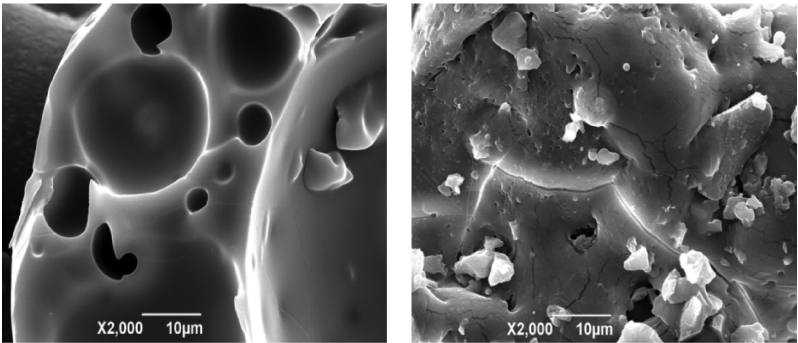


图 1 MP(左)和 MP-Ca(右)的扫描电镜图片(×2000)

Figure 1 Scanning electron microscopic images of MP (left) and MP-Ca (right) (×2000)

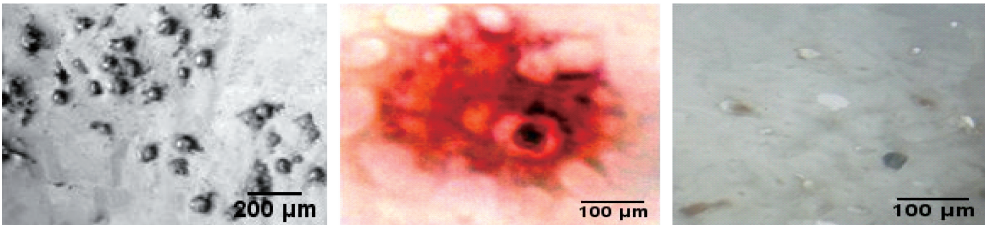


图 2 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞形态(左,×40)、TRAP 染色结果(中,×100)及骨吸收陷窝(右,×100)

Figure 2 Morphology (left, × 40), TRAP staining (middle, × 100) of RANKL-induced RAW264.7 cells, and pits formed in bone slice (right, × 100)

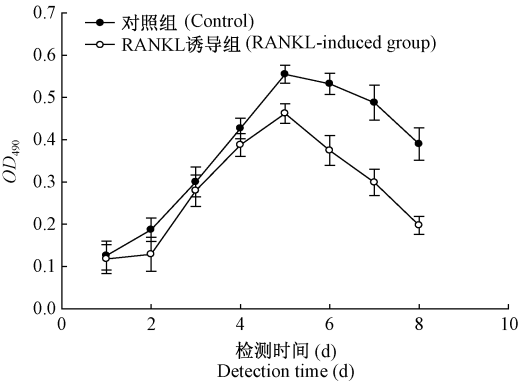


图 3 经 RANKL 诱导和未经 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞生长曲线

Figure 3 Growth curves of RANKL-induced and non-induced RAW264.7 cells

后,OD₄₉₀值保持相对稳定,因此确定 MP 和 MP-Ca 的最适作用浓度为 10³ µg/mL、17β-雌二醇为 10 µg/mL。

在含等量 RAW264.7 细胞的诱导体系中添加最适作用浓度的受试物,MTT 法测定并绘制细胞生长曲线,如图 5(A~C)所示,E₂、MP 和 MP-Ca 干预组的 OD₄₉₀起始值相同,但在第 2~8 天 OD₄₉₀值均低于空白组,说明各受试物对破骨前体细胞的诱导分化和增殖均有抑制作用。由图 5-D 可知,各干预组第 5 天的 OD₄₉₀值均显著低于空白

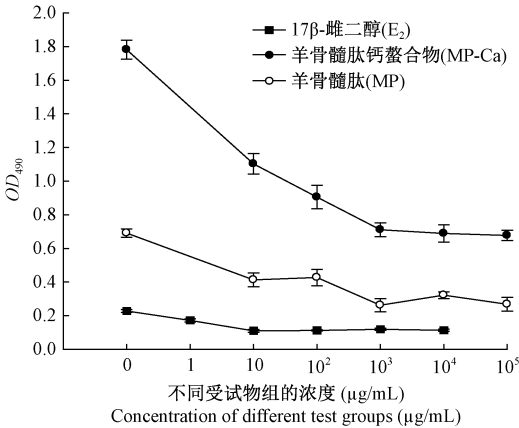


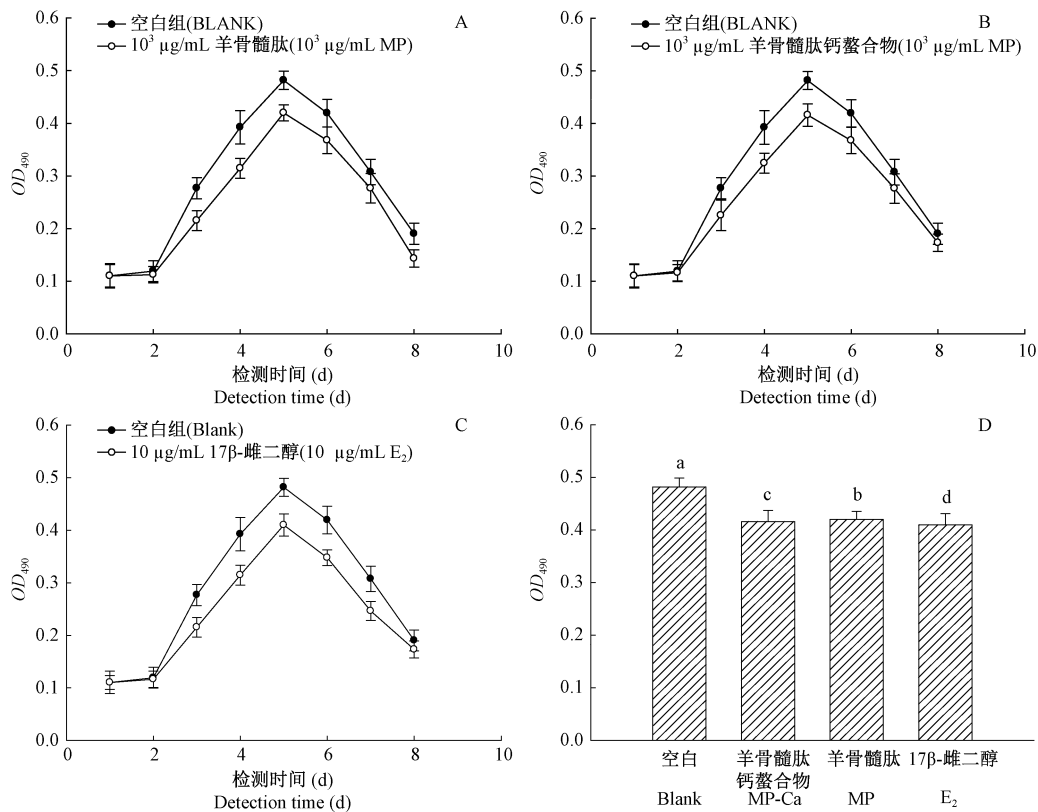
图 4 各受试物的不同浓度对破骨细胞诱导形成的影响

Figure 4 Effects of test substance concentration on the formation of RANKL-induced osteoclasts

组,且 MP-Ca 组显著低于 MP 组,但显著高于 E₂ 组 ($P < 0.05$)。

2.5 MP 和 MP-Ca 对 TRAP 活性和骨吸收陷窝数的影响

图 6 中各干预组细胞裂解液中的 TRAP 活性均显著低于空白组 ($P < 0.05$)。E₂ 组 TRAP 活性最低,MP-Ca 组显著低于 MP 组 ($P < 0.05$)。各干预组的骨吸收陷窝形成数均显著低于空白组 ($P < 0.05$),E₂ 组陷窝数最少,MP 组显著低于 MP-Ca 组 ($P < 0.05$)。



注:5-D 中柱上方不同的字母表示各组之间差异有显著性($P < 0.05$),图6 与此相同。

图5 MP、MP-Ca、E₂ 干预组细胞的生长曲线(A~C)及第5天各组 OD₄₉₀ 值比较(D)

Note. Different lower case letters above each column in 5-D indicate statistically significant differences ($P < 0.05$), The same as in Figure 6.

Figure 5 Growth curves of MP-, MP-Ca-, and 17-β-estradiol-intervened RAW264.7 cells that were induced with RANKL (A-C) and comparisons of the OD₄₉₀ of different groups on day 5 (D)

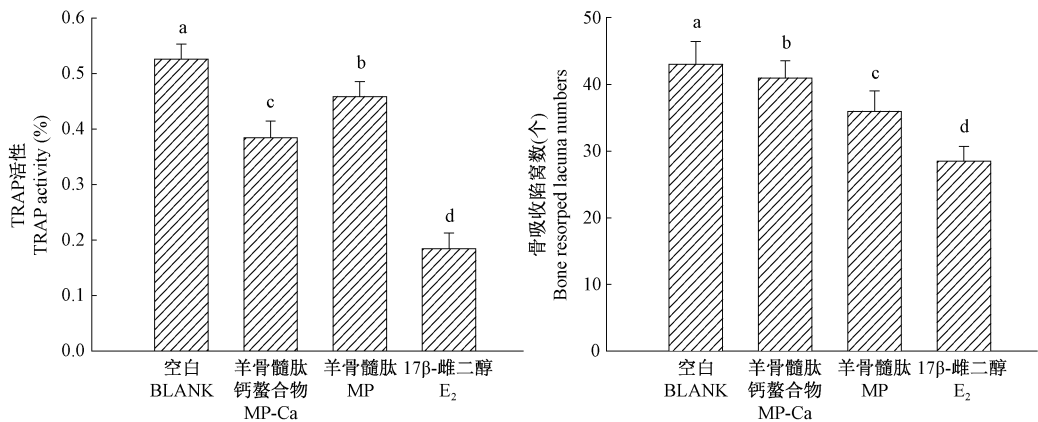


图6 MP、MP-Ca、E₂ 干预组细胞的 TRAP 活性和骨吸收陷窝数比较

Figure 6 Comparison of TRAP activity and lacuna numbers formed in the MP-, MP-Ca-, and 17-β-estradiol-intervened groups

3 讨论

肽与钙结合可形成稳定的肽钙螯合物^[9]。茆三酮化学反应法和电镜观察结果均表明 MP 与 Ca²⁺ 发生了螯合,证明 MP-Ca 制备成功。MP-Ca 既可满足动物对氨基酸的需求,又可促进钙的吸收^[10]。

目前抑制骨吸收的药物多为双磷酸盐类、激素类药物及中药等^[11]。尽管许多研究证实了多肽钙制剂对大鼠骨质疏松症的防治效果^[7,12],但有关其对骨吸收抑制作用的研究,报道较少^[13]。

TRAP 被认为是破骨前体细胞向 OC 分化过程中产生的标志性酶,其活性高低能反映 OC 的分化程度^[14]。融合形成的多核巨细胞虽然呈 TRAP 阳性,但不具有骨吸收活性,只有最后真正成熟的 OC

方具有骨吸收活性^[15]。本研究在第 2 天观察时个别细胞发生融合,第 3 天便可检测到 TRAP 活性,但处于此分化阶段的细胞没有骨吸收活性,第 4 天开始,具有刷状缘的成熟 OC 细胞数开始增多,第 5 天达到高峰并可检测到骨吸收陷窝。

MTT 法是检测活细胞数目和细胞增殖情况的常用方法^[16]。本研究表明最适浓度的受试物只减少破骨前体细胞分化过程中的活细胞数目,不改变生长曲线中峰值出现的时间,此结果与吴庆儒等^[14]相同。本研究 MTT 法及 TRAP 活性检测结果表明,相同最适作用浓度时,MP-Ca 对 OC 诱导形成的抑制作用强于 MP。活跃的 OC 会分泌酸性物质和酶对矿化的骨基质进行分解吸收^[17],骨吸收陷窝的数量、大小和深度能直接反应 OC 的骨吸收能力^[18]。MP 及 MP-Ca 均能显著减少骨吸收陷窝的数目,MP 组陷窝数目显著少于 MP-Ca 组,但单一的数目变化不足以说明 OC 骨吸收活性的变化,并不表明 MP 组的骨吸收活性一定低于 MP-Ca 组,除骨吸收数目外,还应考虑吸收陷窝的面积和深度。

综上,在 RAW264.7 的 RANKL 诱导体系中,MP 和 MP-Ca 均可抑制破骨前体细胞的增殖和分化,并抑制 OC 的骨吸收功能,并且 MP-Ca 对 OC 诱导形成的抑制作用强于 MP,具体机制有待进一步研究。

参 考 文 献(References)

- [1] alik Y, Çalık AF. The effect of bone mineral density on quality of life in men with osteoporosis[J]. 2015, 21(1):10-14.
- [2] 赵文韬, 张晓刚, 王志鹏. 自噬与骨质疏松症的相关性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(4):337-341.
Zhao WZ, Zhang XG, Wang ZP. Correlation between autophagy and osteoporosis[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2017, 33(4):337-341.
- [3] Bronský J, Průša R, Nevoral J. The role of amylin and related peptides in osteoporosis [J]. Clin Chim Acta, 2006, 373(1):9-16.
- [4] 金小岚. 钙剂和维生素 D 在骨质疏松症中的应用[J]. 中国临床医生杂志, 2013, 41(6):3-5.
Jin XQ. Application of calcium and vitamin D in osteoporosis [J]. Chin Clin Dr, 2013, 41(6):3-5.
- [5] 郭丹郡, 侯焱, 何慧. 生物活性肽促钙吸收机制与钙离子通道[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(11):4531-4535.
Guo DJ, Hou X, He H. Bioactive peptides promote calcium absorption and calcium channels [J]. Food Safe Qual Detec Technol, 2016, 7(11):4531-4535.
- [6] 程稚玲, 霍乃蕊. 钙螯合胶原短肽的制备及其对去卵巢大鼠的骨质改善作用[D]. 山西农业大学, 2016.
Cheng ZL, Huo NR. Preparation of calcium-chelating collagen peptides and their osteolytic effects on ovariectomized rats[D]. Shanxi Agricultural University, 2016
- [7] 高文伟, 申勇涛, 程稚玲, 等. 钙螯合胶原多肽与雌激素对去卵巢大鼠骨质改善作用的比较[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(3):256-262.
Gao WW, Shen YT, Cheng ZL, et al. Comparison of calcium chelating collagen peptides and estrogen on osteoporosis in ovariectomized rats[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(3):256-262.
- [8] 甄守艳, 霍乃蕊. 羊骨胶原肽的酶法制备及肽钙螯合研究[D]. 山西农业大学, 2015.
Zhen SY, Huo NR. Enzymatic preparation and peptide chelated sheep bone collagen peptide research [D]. Shanxi Agricultural University, 2015.
- [9] Guo H, Hong Z, Yi R. Core-Shell collagen peptide chelated calcium/calcium alginate nanoparticles from fish scales for calcium supplementation[J]. J Food Sci, 2015, 80(7):N1595-1601.
- [10] Nakchum L, Kim SM. Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2016, 46(2):123-130.
- [11] 闫景刚, 段卫华. 骨质疏松症治疗药物的研究进展[J]. 中国医药导报, 2015, 12(9):34-37.
Yan JG, Duan WH. Research progress in the treatment of osteoporosis[J]. Chin Med Herald, 2015, 12(9):34-37.
- [12] 许先猛, 董文宾. 猪皮胶原多肽螯合钙增加大鼠骨密度[J]. 食品科学, 2017(23):191-195.
Xu XM, Dong WB. Increased bone mineral density in pigs with chelating collagen peptides [J]. Food Sci, 2017 (23):191-195.
- [13] 王珊珊. 鲑鱼骨胶原肽与活性钙的制备及其抗骨质疏松活性研究[D]. 中国海洋大学, 2013.
Wang SS. Preparation and anti-osteoporotic activity of collagen peptide and active calcium of carp [D]. Ocean University of China, 2013.
- [14] 吴庆儒. 雌激素和孕激素对体外培养奶牛破骨细胞增殖分化的影响[D]. 华中农业大学, 2007.
Wu QR. Effects of estrogen and progesterone on the proliferation and differentiation of osteoclasts in dairy cows [D]. Huazhong Agricultural University, 2007.
- [15] 付应霄, 顾建红, 赵鸿雁, 等. 骨保护素对破骨细胞活性的影响[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(5):738-741.
Fu YX, Gu JH, Zhao HY, et al. Effect of osteoprotegerin on the activity of osteoclasts[J]. Chin J Vet Sci, 2013, 33(5):738-741.
- [16] Kilic D, Kesim S, Liman N, et al. Comparison of the effects of dental filling Materials on mouse fibroblasts [J]. Biotechnol Biotechnol Eq, 2012, 26(4):3155-3162.
- [17] Prause M, Seeliger C, Unger M, et al. Pantoprazole decreases cell viability and function of human osteoclasts in vitro [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015:413097.
- [18] 李鹏辉, 田宗成, 商澎. 破骨细胞骨吸收功能的检测方法[J]. 生物学杂志, 2012, 29(4):74-77.
Li PH, Tian ZC, Shang Y. Detection of bone resorption by osteoclasts[J]. J Biol, 2012, 29(4):74-77.