

钙螯合羊骨胶原多肽抑制骨质疏松发生的 RANK/RANKL/OPG 信号机制

韩克光¹, 申勇涛¹, 原 恺¹, 范 华², 陈 静¹,

金淑秀¹, 古少鹏¹, 田文霞¹, 张 鼎¹, 霍乃蕊^{1*}, 常 泓^{3*}

(1. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801; 2. 山西农业大学实验中心, 太谷 030801;

3. 山西农业大学生命科学院, 太谷 030801)

摘要: OPG/RANKL/RANK 信号通路在破骨细胞形成过程中起着至关重要的作用, 本研究将探讨钙螯合羊骨胶原多肽(SBCP-Ca)对骨质疏松(OP)发生的抑制作用及其基于 OPG/RANKL/RANK 信号通路的作用机制。通过摘除大鼠双侧卵巢建立 OP 模型, SBCP-Ca(100 mg · mL⁻¹)的灌胃剂量为 10 mL · (kg · d)⁻¹, 持续 8 周。试验期结束后, 股骨远端干骺端扫描电镜观察结果表明 OP 造模成功。模型组大鼠血液中反映骨形成和吸收的 PINP 和 β-CTx 水平均极显著高于假手术组 ($P < 0.01$), 股骨中的钙含量和羟脯氨酸含量则极显著低于假手术组 ($P < 0.01$)。SBCP-Ca 组的血清 PINP、β-CTx 水平则与假手术组无显著差异 ($P > 0.05$), 股骨中的钙含量和羟脯氨酸含量极显著高于模型组 ($P < 0.01$)。荧光定量 PCR 结果表明模型组股骨组织中 RANK 和 RANKL 相对转录水平均极显著高于假手术组 ($P < 0.01$), 骨质疏松对 OPG 的表达没有显著影响。SBCP-Ca 组的 RANK 和 RANKL 极显著低于模型组 ($P < 0.01$), OPG 水平则极显著高于模型组和假手术组 ($P < 0.01$)。以上结果表明: SBCP-Ca 可有效抑制 OP 的发生, 通过抑制 RANK 和 RANKL 表达, 促进 OPG 表达的三重作用来抑制破骨细胞的形成和骨吸收活性。

关键词: 骨质疏松; 破骨细胞; PINP; β-CTx; RANK/RANKL/OPG 信号通路

中图分类号: S857.16

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)05-1047-07

Regulation of RANK/RANKL/OPG Signal Pathway by Calcium Chelated Sheep Bone Collagen Peptide in Inhibiting the Occurrence of Osteoporosis

HAN Ke-guang¹, SHEN Yong-tao¹, YUAN Kai¹, FAN Hua², CHEN Jing¹,

JIN Shu-xiu¹, GU Shao-peng¹, TIAN Wen-xia¹, ZHANG Ding¹, HUO Nai-rui^{1*}, CHANG Hong^{3*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. Shanxi Agricultural University Experimental Center, Taigu 030801, China;

3. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: OPG/RANKL/RANK signal pathway plays critical roles in the formation of osteoclasts. Inhibitive roles of calcium chelated sheep bone collagen peptide (SBCP-Ca) in the development of osteoporosis (OP) and its mechanism based on the OPG/RANKL/RANK signal pathway were investigated in this study. OP models of SD rats were established by bilateral ovariectomy. SBCP-Ca (100 mg · mL⁻¹) was intragastrically administered at 10 mL · (kg · d)⁻¹ for 8 weeks. After treatment, scanning electron microscopy for metaphysis of distal femur showed that OP

收稿日期: 2017-10-09

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)

作者简介: 韩克光, 男, 山西祁县人, 副教授, 硕士, 主要从事兽医药物代谢与药效研究, E-mail: sxndkghan@163.com; 申勇涛, 山西黎城人, 硕士生, 主要从事兽医公共卫生研究, E-mail: 2292192900@qq.com。韩克光和申勇涛为并列第一作者

* 通信作者: 霍乃蕊, 女, 山西平遥人, 博士, 教授, 主要从事动物疾病预防与动物性食品安全研究, E-mail: tgnrhuo@163.com; 常 泓, 女, 山西榆次人, 博士, 教授, 主要从事食品安全和分子生物学研究, E-mail: 941004578@qq.com

models were successfully established. The serum levels of PINP and β -CTx, which reflected bone formation and bone resorption respectively, were significantly higher in model group ($P < 0.01$), while the calcium and proline contents in femur bone were significantly lower than the sham group ($P < 0.01$). The levels of PINP and β -CTx in SBCP-Ca group showed no statistical differences compared with the sham group ($P > 0.05$), both Ca and proline content were higher than that of the model group ($P < 0.01$). The results of real-time PCR suggested that the relative mRNA levels of *RANK* and *RANKL* in model group were significantly higher than that of the sham group ($P < 0.01$), while the expression of *OPG* showed no significant changes. The results showed that the transcriptional levels of *RANK* and *RANKL* were significantly lower in SBCP-Ca group than that of the model group ($P < 0.01$), and the *OPG* level was significantly higher than that of the other groups ($P < 0.01$). It can be concluded that SBCP-Ca could inhibit the occurrence of osteoporosis effectively by inhibiting the expression of *RANK* and *RANKL*, and promoting the expression of *OPG* in bone tissue. The triple actions of SBCP-Ca inhibited the formation and the resorption activity of osteoclasts.

Key words: osteoporosis; osteoclasts; PINP; β -CTx; RANK/RANKL/OPG signal pathway

受集约化养殖过程中饲养环境、饲养方式、糖皮质激素的应用以及饲料质量等问题的影响,骨质疏松(osteoporosis, OP)引起的动物健康和动物福利问题广受关注^[1-3]。OP是一种常见的骨代谢疾病,以骨脆性增加、骨量减少、微观结构退化、高骨转换、破骨细胞(osteoclasts, OC)形成和骨吸收活性异常增加为特征^[4-7]。OPG/RANK/RANKL系统是OC形成过程中的一个重要信号通路^[8-10],是骨骼生理研究领域的重大进展^[8]。该系统包括核因子- κ B受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK),核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activated nuclear factor kappa B ligand, RANKL)和骨保护素(osteoprotegerin, orthopantomography, OPG)。多种因素通过OPG/RANK/RANKL系统引起骨量丢失,导致OP发生^[11],许多细胞因子也通过该系统发挥对骨代谢的调节作用^[12]。鉴于其在OP发生机制中的重要作用,该信号系统成为治疗OP药物设计的新靶点^[3]。

课题组前期研究结果表明以羊骨胶原肽(sheep bone collagen peptide, SBCP)和氯化钙为原料制备的钙整合羊骨胶原多肽(SBCP-Ca)对去卵巢大鼠的骨质改善效果比雌激素更为安全和有效^[13],为进一步了解SBCP-Ca防治OP的作用机制,本研究建立OP动物模型,探讨SBCP-Ca对OPG/RANK/RANKL系统的影响,为骨破坏性疾病治疗药物的研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

SBCP-Ca由本实验室以羊骨胶原肽和氯化钙为原料制备^[14]。Trizol(Life公司)、反转录PCR试剂盒和SYBRTMPremix Ex TaqTM II为TaKaRa产品;大鼠血清I型前胶原氨基端前肽(procollagen type I N-terminal propeptide, PINP)和I型胶原羧基端肽(C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen, β -CTx)ELISA试剂盒购自Elabscience Biotechnology有限公司;原子吸收光谱仪(AA7020,北京东西分析仪器有限公司);Spectra-Max M5多功能酶标仪(Molecular Devices);扫描电子显微镜(JEOL JEM-6490LV,日本电子光学实验室);荧光定量PCR仪(Mx 3005PTM,美国Stratagene)等。

1.2 实验动物

10周龄雌性未孕SD大鼠和啮齿类动物标准颗粒饲料均由山西医科大学动物实验中心[SCXK(晋)2015-0001]提供,大鼠体重(203 \pm 20)g,自由饮水,环境条件符合GB14923-2001要求,适应性饲养2周后,模型组和SBCP-Ca组大鼠以10%水合氯醛进行麻醉(4 mL \cdot kg⁻¹,腹腔注射),背部去毛区(3 cm \times 5 cm)经聚维酮碘消毒后,再用75%酒精脱碘,再沿背中线下做长2~3 cm的纵行切口,暴露卵巢及与其紧密相连的子宫角,结扎子宫角并将其切断,摘除双侧卵巢,缝合背部肌肉及皮肤。假手术

组的手术过程同上,但不切除卵巢组织。术后连续 5 d 肌注青霉素以防感染,康复 1 周后,分组试验 ($n=8$)。SBCP-Ca 组以 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SBCP-Ca 连续灌胃 8 周,剂量为 $10 \text{ mL} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$,假手术组和模型组灌服同体积蒸馏水,8 周后断食 12 h,乙醚浅麻醉,摘除眼球眼眶取血,脱颈处死大鼠,采集股骨样本。血样经 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后,收集并分装血清,置 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 血清 PINP 和 β -CTx 的测定

大鼠血清 PINP 和 β -CTx 含量按照 ELISA 试剂盒所描述的夹心 ELISA 和竞争 ELISA 法测定。

1.4 骨钙和羟脯氨酸含量的测定

大鼠股骨在液氮中研磨成粉,风干至恒重,准确称取并置于瓷坩埚中,马弗炉 $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预灰化 1 h, $550 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续灰化 3 h,关掉电源,待温度降至 $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下,取出坩埚,样品若有黑色,则加 1~2 滴硝酸继续消化 1 h,直至出现白色结晶。将灰分用 2 mL 盐酸 (1:5) 溶解,再加入 18 mL 去离子水混匀,取 4 mL 用去离子水定容至 50 mL,再取定容好的溶液 10 mL,加 5% 氯化锶溶液 0.2 mL,用原子吸收光谱仪测定钙含量。羟脯氨酸按试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明操作测定。

1.5 骨微观结构观察

大鼠左侧股骨经戊二醛固定和 EDTA 脱钙处理后,取股骨远端干骺端横切面制作切片,进行扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)分析。

1.6 qRT-PCR

Trizol 法提取各组大鼠右侧股骨总 RNA^[15], 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性并测定浓度。cDNA 合成参照文献进行^[16]。根据 SYBRTM Premix Ex TaqTM II 试剂盒说明进行荧光定量 PCR,反应体系($10 \mu\text{L}$):SYBRTM Premix Ex TaqTM II ($2 \times$) $5 \mu\text{L}$,上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $0.4 \mu\text{L}$, ROX Reference Dye II ($50 \times$) $0.2 \mu\text{L}$,模板 100 ng,补充 ddH₂O 至 $10 \mu\text{L}$ 。设置程序:预变性 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min;变性 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,延伸 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s^[17],45 个循环。待反应结束后,用扩增曲线的 Ct 值计算定量结果。以 β actin 为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 RANK、RANKL、OPG 在各组大鼠股骨中的相对表达水平^[18]。引物参照 NCBI 上已公开发表的序列进行设计并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

1.7 测序分析

荧光定量 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果与各基因的标准序列进行比对,验证 PCR 扩增产物是否为对应的目的基因片段。

1.8 统计方法

所有结果均用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,试验数据用 SPSS 21.0 软件进行方差分析,柱状图用 SigmaPlot 10.0 软件绘制。

表 1 qRT-PCR 引物及预期产物大小

基因	序列(5'→3')	产物/ bp
Gene	Primer sequences	Product size
RANK	F: TGGTTCACCTGTTCTTAATCC R: CGTGAAACACTGGCTTAAAC	100
RANKL	F: AGGCTGGGCCAAGATCTCTA R: GATAGTCCGCAGGTACGCTC	134
OPG	F: TGTGAAAGCAGTGTGCAACG R: CCAGGCAAGCTCTCCATCAA	83
β actin	F: CCTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT R: AGTGGTACGACCAGAGGCATA	114

2 结果

2.1 OP 模型的建立

由表 2 可知,模型组的 PINP 水平和 β -CTx 水平平均极显著高于假手术组 ($P < 0.01$),说明骨转换加快,成骨活性和破骨活性均增强,符合骨质疏松的特点。模型组钙和羟脯氨酸的含量均极显著低于假手术组 ($P < 0.01$),说明模型组骨质流失严重。SEM 观察结果显示假手术组(图 1A)骨髓腔面积较小,骨小梁(trabecular bone, TB)结构清晰,排列紧密,粗而延续,骨质致密。而模型组(图 1B)TB 变得薄而断续, TB 间距变宽,骨髓腔变得大而空洞,细胞很少,骨质变得疏松。以上结果表明本研究 OP 造模成功。

2.2 SBCP-Ca 对去卵巢大鼠骨骼指标的影响

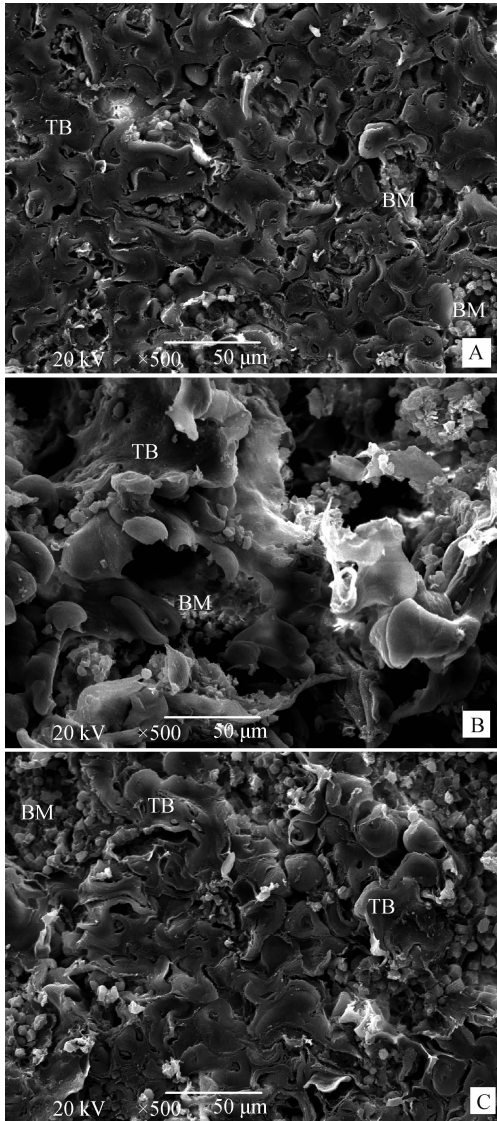
表 2 显示,去卵巢大鼠灌服 SBCP-Ca 后, PINP 与 β -CTx 水平极显著低于模型组 ($P < 0.01$),并且与假手术组无统计学差异 ($P > 0.05$),说明骨转换正常;钙与羟脯氨酸含量均极显著高于模型组 ($P < 0.01$),且钙含量还极显著高于假手术组 ($P < 0.01$),说明 SBCP-Ca 可防止骨质流失并可促进钙盐在骨的沉积而增加骨的硬度。

表2 SBPC-Ca对去卵巢大鼠血清PINP、 β -CTx水平及骨组织钙和羟脯氨酸含量的影响($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effects of SBPC-Ca on the level of PINP, β -CTx in serum and the content of Ca and hydroxyproline in bone of ovariectomized rats($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	PINP/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	β -CTx/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Ca/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	羟脯氨酸/($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) Hydroxyproline
模型组 Model	3 528.37 \pm 154.74 ^{Aa}	529.67 \pm 23.63 ^{Aa}	9.73 \pm 0.14 ^{Cc}	1.87 \pm 0.08 ^{Cc}
假手术组 Sham	2 258.45 \pm 140.87 ^{Bb}	370.98 \pm 61.89 ^{Bb}	12.60 \pm 0.05 ^{Bb}	2.38 \pm 0.18 ^{Aa}
SBPC-Ca	2 155.33 \pm 132.89 ^{Bb}	372.41 \pm 58.66 ^{Bb}	15.71 \pm 0.93 ^{Aa}	2.09 \pm 0.09 ^{Ab}

右上角大写字母和小写字母分别代表0.01水平和0.05水平差异显著,同列数据右上角所标字母相异表示差异显著,相同表示差异不显著,下同

a, b, c represent significant level $\alpha=0.05$; A, B, C represent extremely significant level $\alpha=0.01$. Different letters in the same column indicate statistic differences between the treatments, same letters mean no significant differences between treatments. The same as below



A. 假手术组; B. 模型组; C. SBPC-Ca组; TB为骨小梁; BM为骨髓腔

A. Sham group; B. Model group; C. SBPC-Ca group; TB represents bone trabecula; BM represents bone marrow

图1 各组大鼠股骨远端干骺端扫描电镜观察

Fig. 1 SEM observation for metaphysis of distal femur by different treatments

2.3 SBPC-Ca对去卵巢大鼠骨微观结构的影响

SBPC-Ca组(图1C)骨小梁排列较为紧凑,连续性好,与模型组相比,大为改善,骨髓腔内充满细胞,说明SBPC-Ca可防止骨质疏松的发生,具有改善骨质的作用。

2.4 SBPC-Ca对去卵巢大鼠RANK、RANKL和OPG转录的影响

由图2可知,RANK和RANKL的相对转录量在模型组和假手术组之间差异极显著($P < 0.01$),说明在骨质疏松骨中,受体RANK在OC及OC前体细胞中的相对转录量极显著升高,是假手术组的73.19倍;由骨髓基质细胞和成骨细胞(osteoblasts, OB)表达的RANKL在模型组的相对表达量也极显著升高,是假手术组的38.68倍。上调表达的RANK和RANKL使更多的OC成熟,抑制OC凋亡,并增强OC的骨吸收活性,因此引发骨质疏松。图2中,模型组的OPG转录水平与假手术组差异不显著($P > 0.05$),说明卵巢切除和骨质疏松并不影响OB分泌OPG的能力。SBPC-Ca组的RANK和RANKL的相对转录水平极显著低于模型组($P < 0.01$),说明SBPC-Ca对OC的形成和骨吸收活性有显著抑制作用。SBPC-Ca组的OPG相对转录水平极显著高于模型组和假手术组($P < 0.01$),是假手术组的1.62倍,模型组的1.74倍,说明SBPC-Ca还可促进去卵巢大鼠OB分泌超过正常水平的OPG,从而阻断骨吸收,防止骨质疏松的发生。

图3中,模型组的RANKL/OPG比值是假手术组的41.71倍,差异极显著($P < 0.01$),而SBPC-Ca组的RANKL/OPG比值极显著低于模型组($P < 0.01$),且和假手术组差异不显著($P > 0.05$)。

2%琼脂糖凝胶电泳显示(图4),荧光定量PCR产物的大小与预期一致,分别为100(RANK)、134

(RANKL)、83 (OPG)、114 (β -actin) bp。对测序结果与各基因的标准序列进行比对,RANK 和 RANKL

各有一个碱基的差异,OPG 序列 100%吻合,说明本研究设计的引物特异性强,结果可靠。

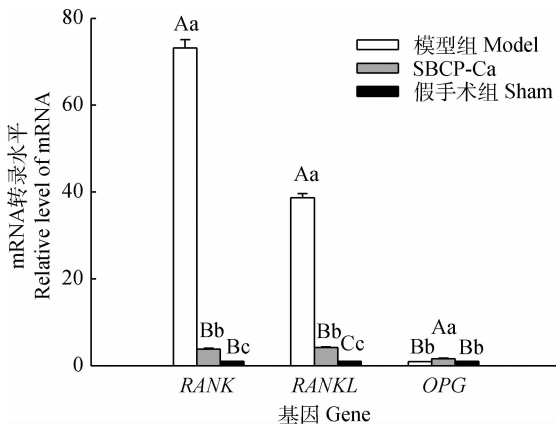


图 2 各组大鼠股骨组织中 RANK、RANKL 和 OPG 的 mRNA 转录情况

Fig. 2 Relative expression level of RANK, RANKL and OPG mRNA in rat femur by different treatment

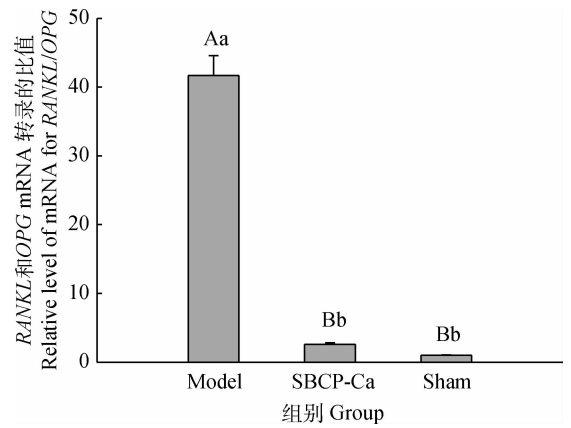
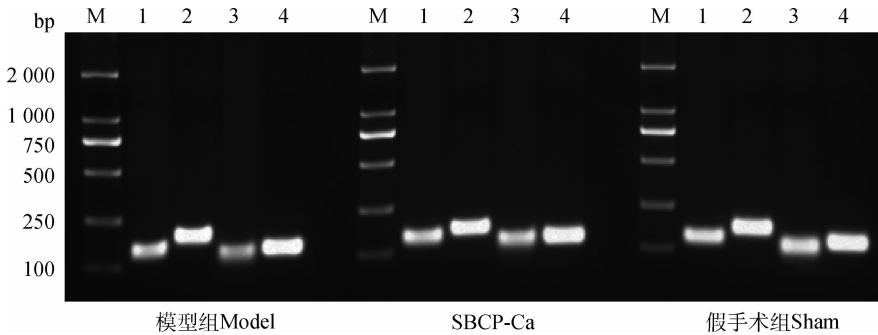


图 3 各组大鼠股骨中 RANKL 和 OPG mRNA 相对转录量的比值

Fig. 3 Ratio of relative level of mRNA of RANKL to OPG (RANKL/OPG)



M. DL2000 DNA marker; 1. RANK; 2. RANKL; 3. OPG; 4. β -actin

图 4 各组大鼠股骨中 RANKL、RANK 和 OPG 荧光定量 PCR 扩增结果

Fig. 4 Real-time PCR results of RANKL, RANK and OPG mRNA in femur of different groups

3 讨论

骨代谢生化标志物是在骨转换过程中产生的一些物质,反映骨的代谢速率、OC 的骨吸收活性和 OB 的骨形成活性。PINP 和 β -CTx 存在于血液中,是国际骨质疏松基金会、国际临床化学和实验室医学联盟推荐使用的标志物^[19-21],分别反映骨形成 (PINP) 和骨吸收 (β -CTx) 活性,是评价骨质疏松发生和药物疗效的骨代谢生化标志物,具有灵敏度高、特异性强、准确性较高的特点,在高转换骨质疏松模型中显著升高。本研究模型组的 PINP 和 β -CTx 水平均极显著高于假手术组,说明疏松骨质中的骨形成速率和骨吸收速率均很高,属高转换骨,而 SBCP-Ca 可使去卵巢大鼠的 PINP 和 β -CTx 水平维持在

假手术组水平,并使股骨中的羟脯氨酸含量和钙含量增加,避免了高骨转换引起的骨量丢失,有效抑制了骨质疏松的发生,骨组织病理切片也证实如此。

RANK 主要表达于单核/巨噬细胞系,在 OC 前体细胞和成熟 OC 细胞表面高度表达,是 RANKL 的唯一已知受体。骨组织中的 OC 和骨髓基质细胞都有分泌和合成 RANKL 的能力^[10-12]。RANK(受体)与 RANKL(配体)的结合将直接促进 OC 的分化成熟,增强其骨吸收活性并阻止其凋亡^[12,22]。OPG 是由 OB 分泌的一种可溶性糖蛋白,广泛存在于骨组织中^[12],是骨重建的关键因子^[6],是 RANKL 的诱骗受体,竞争性结合 RANKL,从而阻断 RANK 与 RANKL 的结合,抑制 OC 的分化成熟和功能的发挥^[22]。与 OPG 功能相似或促进

OPG 表达的药物治疗将可带来良好经济收益和社会效益^[8]。

本研究结果表明 SBCP-Ca 通过减少 OC 前体细胞表面的 RANK 受体数量、抑制 OB 和骨髓基质细胞分泌配体 RANKL, 增强 OB 分泌 OPG 的三重作用来抑制 OC 的形成和骨吸收活性, 防止骨质疏松的发生。

RANKL/OPG 比值可直接影响 OC 的分化和骨代谢^[23], 是调节骨吸收和骨形成平衡的重要因素^[24]。本研究中, 骨质疏松发生时, 尽管 OPG 水平没有变化, 但 RANKL/OPG 比值极显著升高, 而 SBCP-Ca 可使该比值与假手术组相似。可见在骨形成与骨吸收的动态平衡关系中, RANKL/OPG 是一个重要的调节杠杆, 可作为判断骨质疏松发生和药物作用的一个较为客观和准确的指标。

4 结 论

SBCP-Ca 通过抑制 RANK 在破骨前体细胞和成熟破骨细胞的表达, 抑制成骨细胞合成和分泌 RANKL, 促进成骨细胞分泌 OPG 的三重作用来抑制破骨细胞的形成和骨吸收活性, 从而抑制去卵巢大鼠骨质疏松的发生。

参考文献 (References):

- [1] 吕文亭, 马利芹, 杨永红, 等. 低钙日粮添加依普黄酮对笼养蛋鸡骨组织显微结构和形态计量学的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(11): 1818-1824.
LV W T, MA L Q, YANG Y H, et al. Effects of adding ipriflavone to low-calcium diet on microstructure and histomorphometry of bone in cage layers[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(11): 1818-1824. (in Chinese)
- [2] DVORAK G, GRUBER R, HUBER C D, et al. Trabecular bone structures in the edentulous diastema of osteoporotic sheep[J]. *J Dent Res*, 2008, 87(9): 866-870.
- [3] WEBSTER A B. Welfare implications of avian osteoporosis[J]. *Poult Sci*, 2004, 83(2): 184-192.
- [4] 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 W T, ZHANG X G, WANG Z P. Relationship between autophagy and osteoporosis[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 33(4): 337-341. (in Chinese)

- [5] 元宇, 全晓阳, 邹军. miR-214 对骨形成的抑制作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(2): 133-137.
YUAN Y, TONG X Y, ZOU J. The Roles of miR-214 in inhibition of bone formation[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 33(2): 133-137. (in Chinese)
- [6] GUÉGUEN L, POINTILLART A. The bioavailability of dietary calcium[J]. *J Am Coll Nutr*, 2000, 19(2 Suppl): 119S-136S.
- [7] BRONSKY J, PRUŠA R, NEVORAL J. The role of amylin and related peptides in osteoporosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 373(1-2): 9-16.
- [8] 刘继中, 纪宗玲, 陈苏民. OPG/RANKL/RANK 系统与骨破坏性疾病[J]. 生物工程学报, 2003, 19(6): 655-660.
LIU J Z, JI Z L, CHEN S M. The OPG/RANKL/RANK system and bone resorptive disease[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2003, 19(6): 655-660. (in Chinese)
- [9] VARLEY I, HUGHES D C, GREEVES J P, et al. RANK/RANKL/OPG pathway: genetic associations with stress fracture period prevalence in elite athletes[J]. *Bone*, 2015, 71: 131-136.
- [10] TU P, DUAN P, ZHANG R S, et al. Polymorphisms in genes in the RANKL/RANK/OPG pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in post-menopausal women[J]. *Osteoporos Int*, 2015, 26(1): 179-185.
- [11] OHLSSON C, VANDENPUT L. The role of estrogens for male bone health[J]. *Eur J Endocrinol*, 2009, 160(6): 883-889.
- [12] 尹鑫, 于海龙, 李青春, 等. 补肾中药对 OPG/RANK/RANKL 系统调控作用的研究进展[J]. 承德医学院学报, 2016, 33(2): 126-129.
YIN X, YU H L, LI Q C, et al. Research progress on regulation of kidney-tonifying herbs on OPG / RANK/RANKL system [J]. *Journal of Chengde Medical College*, 2016, 33(2): 126-129. (in Chinese)
- [13] 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 W W, SHEN Y T, CHENG Z L, et al. Comparison of the ameliorating effect of collagen peptide chelated calcium and estrogen on the bone quality in ovariectomized rats[J]. *Acta Laboratorium Animalis*

- Scientia Sinica*, 2017, 25(3): 256-262. (in Chinese)
- [14] 韩克光, 甄守艳, 范 华, 等. 钙螯合羊骨胶原多肽的制备及表征分析[J]. 农业工程学报, 2015, 31(21): 301-307.
HAN K G, ZHEN S Y, FAN H, et al. Preparation and characteristic analysis of calcium-chelated ossein peptide[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2015, 31(21): 301-307. (in Chinese)
- [15] 张铁军, 张 伟, 边立功, 等. 白藜芦醇对去卵巢大鼠骨质疏松症的保护作用[J]. 解剖学报, 2012, 43(5): 679-684.
ZHANG T J, ZHANG W, BIAN L G, et al. Protective effects and mechanisms of resveratrol on the rats suffering with osteoporosis[J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2012, 43(5): 679-684. (in Chinese)
- [16] 何 蕾, 薛仁宇, 曹广力, 等. 基于 RNA-Seq 技术分析家蚕卵巢培养细胞(BmN)高表达基因[J]. 蚕业科学, 2014, 40(3): 409-421.
HE L, XUE R Y, CAO G L, et al. Analysis of highly expressed genes in *Bombyx mori* ovarian culture cells(BmN) based on RNA-Seq technology[J]. *Science of Sericulture*, 2014, 40(3): 409-421. (in Chinese)
- [17] 李艳敏, 李翠翠, 郑 航, 等. 雌激素通过 ER- α 调控 CYP2C8 在鸡肝中的表达[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(12): 2362-2369.
LI Y M, LI C C, ZHENG H, et al. Expression of CYP2C8 is regulated by estrogen through ER- α in liver of chicken[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(12): 2362-2369. (in Chinese)
- [18] 赵兵令, 王海东, 陈天直, 等. 小鼠毛囊不同生长周期中 MITF 下游色素相关基因的定位表达及相关性分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(2): 198-206.
ZHAO B L, WANG H D, CHEN T Z, et al. Localization and correlation analysis of MITF downstream pigmentation-related genes at different growth cycle of mouse hair follicle[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 33(2): 198-206. (in Chinese)
- [19] 陈 玮. 中青年 Graves 病患者血清 PINP 及 β -CTx 与骨代谢关系分析[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.
CHEN W. Analysis of the relationship between PINP, β -CTx and bone metabolism in young adult patients with Graves' disease [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2013. (in Chinese)
- [20] KOIVULA M K, RISTELI L, RISTELI J. Measurement of aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP) in serum[J]. *Clin Biochem*, 2012, 45(12): 920-927.
- [21] VASIKARAN S, COOPER C, EASTELL R, et al. International osteoporosis foundation and international federation of clinical chemistry and laboratory medicine position on bone marker standards in osteoporosis [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2011, 49(8): 1271-1274.
- [22] 黄云梅. 基于 RANKL/RANK/OPG 轴的绝经后骨质疏松症发病机制及健骨颗粒干预研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2014.
HUANG Y M. Study on pathogenesis of postmenopausal osteoporosis and effect of Jiangu granule based on OPG/RANKL/RANK System [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2014. (in Chinese)
- [23] 刘 康, 吴风晴, 吴连国, 等. 骨碎补总黄酮对骨质疏松模型大鼠 OPG/RANKL/RANK 轴系统的影响[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(6): 652-656.
LIU K, WU F Q, WU L G, et al. Effect on OPG/RANKL/RANK axial system in osteoporotic rats by total flavones of *drynariae rhizoma* [J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2015, 32(6): 652-656. (in Chinese)
- [24] 李子怡, 李玉坤. OPG/RANK/RANKL 信号通路在骨质疏松症中的研究进展和应用[J]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2017, 3(2): 124-128.
LI Z Y, LI Y K. Researching progress and application of OPG-RANK-RANKL signaling pathway in osteoporosis [J]. *Chinese Journal of Geriatric Orthopaedics and Rehabilitation (Electronic Edition)*, 2017, 3(2): 124-128. (in Chinese)