

羊骨髓肽及其钙螯合物对成骨细胞增殖和活性的影响

金淑秀¹, 王钰慧², 霍乃蕊^{1*}, 郑明学¹, 韩克光¹, 古少鹏¹, 田文霞¹, 张鼎¹

(1. 山西农业大学 动物科技学院, 太谷 030801; 2. 山西农业大学 食品科学与工程学院, 太谷 030801)

摘要: 成骨细胞在骨代谢过程中发挥成骨作用, 笔者制备羊骨髓肽钙螯合物(MP-Ca), 探究其对体外培养成骨细胞的增殖及活性的影响, 并将其效果同羊骨髓肽(MP)进行比较。制备的 MP-Ca 经傅里叶红外光谱仪进行扫描鉴定; 从新生 SD 大鼠颅骨中分离纯化的成骨细胞经碱性磷酸酶(ALP)和茜素红染色鉴定; 在培养液中添加不同浓度的受试物, CCK-8 法确定最佳作用浓度。以 17-β 雌二醇($10^2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为阳性对照, 通过测定各组细胞 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 和 ALP、骨钙素(BGP)的含量, 考察 MP、MP-Ca 在最适作用浓度($10^3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)下对成骨细胞增殖和活性的影响。结果表明, MP 和 MP-Ca 的红外光谱图未完全重叠, 吸收峰发生了明显的位移变化, 说明 MP 与 CaCl_2 反应形成了 MP-Ca。分离的成骨细胞经 ALP 染色呈阳性, 胞内可见大量黑褐色颗粒; 茜素红染色后细胞呈深红色, 并形成钙化结节。MP-Ca 处理组的 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 和 ALP、BGP 水平均显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)高于 MP 处理组, 但均显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)低于雌激素组。综上, 尽管效果不及雌激素, MP-Ca 和 MP 均可促进体外培养成骨细胞的增殖并增强其成骨活性, 效果 MP-Ca 优于 MP。

关键词: 骨髓肽; 肽钙螯合物; 成骨细胞; 成骨活性; 17-β 雌二醇

中图分类号: S857.161

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)12-2745-08

Function of Bone Marrow Peptide and Its Calcium-Chelated Form in the Proliferation and the Osteogenic Activity of Cultured Osteoblasts

JIN Shu-xiu¹, WANG Yu-hui², HUO Nai-rui^{1*}, ZHENG Ming-xue¹,

HAN Ke-guang¹, GU Shao-peng¹, TIAN Wen-xia¹, ZHANG Ding¹

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University,

Taigu 030801, China; 2. College of Food Science and Engineering, Shanxi

Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Osteoblasts play bone-forming roles in the process of bone metabolism. Calcium-chelated bone marrow peptides (MP-Ca) was prepared and its effects on the proliferation and osteogenic activity of osteoblast (OB) were investigated and compared with calcium-free peptides of sheep bone marrow (MP). Prepared MP-Ca was identified via Fourier transform infrared spectrometer. The osteoblasts isolated from the skull of newborn SD rats were identified through alkaline phosphatase (ALP) and alizarin red staining. Different concentrations of test substance, including the positive control 17 β-estradiol, were added to the medium and the CCK-8 method was used to determine the optimal concentration for the subsequent study. The proliferation and the osteogenic activity of OB were expressed as $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ and the content of ALP and osteocalcin (BGP) in cell lysate prepared from MP-Ca, MP, estrogen treated OB cells at optimal concentrations. MP and

收稿日期: 2018-06-11

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: 金淑秀(1994-), 女, 山西祁县人, 硕士生, 主要从事兽医公共卫生与人畜共患传染病防治的研究, E-mail: 517509072@qq.com

* 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

MP-Ca showed no completely overlapped infrared spectra and apparent shifts of absorption peaks were observed, which indicated that MP-Ca was different form MP and it was prepared successfully. After ALP staining the isolated and purified OB cells appeared positive reaction. The results showed that OD_{450 nm}, ALP and BGP levels of the MP-Ca treated cells were significantly higher than those of the MP treatment ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but they were significantly lower than those of 17 β -estradiol treated group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). It can be concluded that although inferior to 17 β -estradiol, MP and MP-Ca were effective in promoting the proliferation of osteoblasts *in vitro* and enhance their bone formation activity, and MP-Ca was superior to MP.

Key words: bone marrow peptides; calcium-chelated peptides; osteoblasts; osteogenic activity; 17 β -estradiol

骨质疏松 (osteoporosis, OP) 是由于成骨细胞 (osteoblast, OB) 介导的骨形成与破骨细胞 (osteoclast, OC) 介导的骨吸收失衡, 导致骨吸收大于骨形成而引起的以骨小梁稀疏、断裂、骨量减少、骨密度下降为特征的骨代谢疾病^[1-2]。受集约化养殖、环境污染、动物生产、其他疾病发生等因素的影响, 畜禽 OP 越来越受到人们的重视。

除骨形成作用外, OB 还参与 OC 骨吸收活性的调节^[2-4], 在 RANK/RANKL/OPG 信号通路中, OB 分泌的 RANKL 可识别 OC 前体细胞表面的 RANK 并与之结合, 转导骨吸收信号以调节 OC 前体细胞的增殖和成熟。另外 OB 分泌产生的 OPG 可与 RANK 竞争性地结合 RANKL, 从而防止骨的过度吸收, 可见 OB 的数量和活性将直接决定骨量及骨密度^[4-6], 提高 OB 的细胞数量和成骨活性在骨质疏松防治中尤为关键。

课题组前期研究表明, 羊骨髓肽 (marrow peptides, MP) 及其钙螯合物 (MP-Ca) 对去卵巢大鼠均具有明显的骨质改善作用, 且比雌激素更安全^[7]。在抗骨质疏松新药筛选和药效学评价中, 体外培养的成骨细胞是一种重要模型^[2, 8]。为进一步揭示 MP、MP-Ca 改善骨质的机制, 本研究通过体外试验探究二者对成骨细胞增殖及活性影响, 并将二者的效果进行比较, 为研发更安全、更有效的 OP 防治药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

Tensor 27 型傅里叶变换红外光谱仪 (Bruker 光谱仪器公司)、MC721 酶联免疫检测仪 (上海菁华科技仪器有限公司)、II 型胶原酶 (Sigma)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (HyClone)、100 \times 青霉素

链霉素混合液 (北京博奥拓达科技有限公司)、胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司)、17 β -雌二醇 (Sigma)、牛血清白蛋白 (BSA Solarbio)、Triton-X100 (Sigma)、Cell Counting Kit-8 试剂盒 (日本同仁)、碱性磷酸酶 (ALP) 测试盒及总蛋白定量测试盒 (南京建成生物工程研究所)、Rat BGP ELISA Kit (上海桥杜生物科技有限公司)。羊骨髓肽 (内蒙古锡盟肽好生物制品责任有限公司生产) 中的蛋白质含量为 96% (以干基计), DMEM/F12 培养基 (Gibco) 中加入 10% 胎牛血清、1% 青霉素链霉素混合液制得完全培养基。

1.2 羊骨髓肽钙螯合物 (MP-Ca) 的制备及鉴定

以羊骨髓肽 (sheep bone marrow peptide, MP) 和氯化钙为原料制备 MP-Ca。螯合工艺为^[8]: MP 浓度 89.28 mg \cdot mL⁻¹、肽钙质量比 2:1、pH8.1、40 $^{\circ}$ C 螯合 30 min、8 倍体积乙醇静置沉淀 3 h (乙醇质量分数 > 95%), 8 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 沉淀再经真空冷冻干燥 (-26 $^{\circ}$ C 预冻, 工作压力 90~100 Pa, 升华温度 45~55 $^{\circ}$ C) 制得 MP-Ca, 经测定 MP-Ca 中的钙含量为 (9.05 \pm 0.36)%。用傅里叶红外光谱仪在 4 000~400 cm⁻¹ 波段内对样品粉末进行扫描以确定 MP-Ca 的形成。

1.3 新生大鼠颅骨成骨细胞的分离和纯化

无菌条件下, 将出生 24 h 内的 SD 大鼠 [山西医科大学动物实验中心提供 SCXK (晋) 2015-0001] 脱颈处死, 采集颅骨, PBS 冲洗后剪碎, 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液中消化 25 min, 收集消化液, 组织中添加 0.1% II 型胶原酶继续消化 1 h, 收集消化液, 合并 2 次消化液, 1 500 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 用 DMEM/F12 完全培养基重悬细胞, 移至 25 cm² 的细胞培养瓶, 培养箱中培养 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂), 培养物每隔 0.5 h 转至另一培养瓶中, 重复

2~3 次,以除去大部分成纤维细胞而获得原代成骨细胞,待细胞完全贴壁融合后,以 0.25% 胰蛋白酶溶液消化,传代 3 次获得纯度高、稳定性好的成骨细胞^[9-10]。

1.4 成骨细胞的鉴定

通过细胞形态学观察、茜素红染色及碱性磷酸酶(ALP)细胞化学染色对“1.3”纯化获得的成骨细胞进行鉴定^[11-12]。

1.5 成骨细胞生长曲线的绘制及各受试物最佳作用浓度的确定

将生长良好的第三代成骨细胞以 1×10^4 个 \cdot 孔⁻¹ 的浓度接种于 96 孔细胞培养板上,每孔含完全培养基 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 培养至贴壁后每天换液。用 CCK-8 法绘制生长曲线时,每天取 5 孔进行测定,连续 7 d,测定时弃掉旧培养液,每孔加 90 μ L 新鲜培养液和 10 μ L CCK-8 溶液,避光孵育 4 h 后用酶标仪测定 OD_{450 nm}^[13]。确定 MP、MP-Ca 对成骨细胞增殖的影响时,根据生长曲线,将到达平台期的时间确定为 CCK-8 法检测时间。确定各受试物的最佳作用浓度时,每孔的接种浓度均为 1×10^4 ,培养 24 h 待细胞贴壁后,每天换液时在完全培养基中加入不同浓度的受试物进行培养,在之前确定的检测时间进行检测,OD_{450 nm} 最大值所对应的浓度即为每种受试物的最佳作用浓度。

1.6 MP、MP-Ca 对成骨细胞增殖的影响

向 96 孔板内已经贴壁的成骨细胞中加入

100 μ L 完全培养基(对照组)或含有最佳作用浓度受试物的完全培养基,绘制各组细胞的生长曲线,方法同“1.5”。

1.7 成骨细胞骨钙素(BGP)含量及碱性磷酸酶(ALP)活性测定

将成骨细胞以 1×10^4 浓度接种到 24 孔板上,每个处理组 6 个重复,贴壁后换用添加了最佳作用浓度 MP 或 MP-Ca 的完全培养液,每天换液,培养 72 h 后用 0.1% Triton X-100 裂解 30~40 min,吸取 4 μ L 细胞裂解液测定总蛋白浓度,其他裂解液 1 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,取 30 μ L 上清液用于 BGP 含量和 ALP 活性的测定,按照 ALP 试剂盒和大鼠 BGP ELISA 试剂盒的操作步骤进行。ALP 的活性通过总蛋白质浓度标准化,表示为 King-Armstrong Unit \cdot g⁻¹。

1.8 统计方法

试验数据采用 SPSS 21.0 软件处理,结果以“平均值 \pm 标准误”表示,折线图、柱状图由 SigmaPlot 10.0 软件绘制。

2 结果

2.1 羊骨髓肽钙螯合物(MP-Ca)的鉴定

如图 1 所示,MP 和 MP-Ca 的红外光谱图波形一致但未完全重叠,吸收峰发生了明显的位移变化。

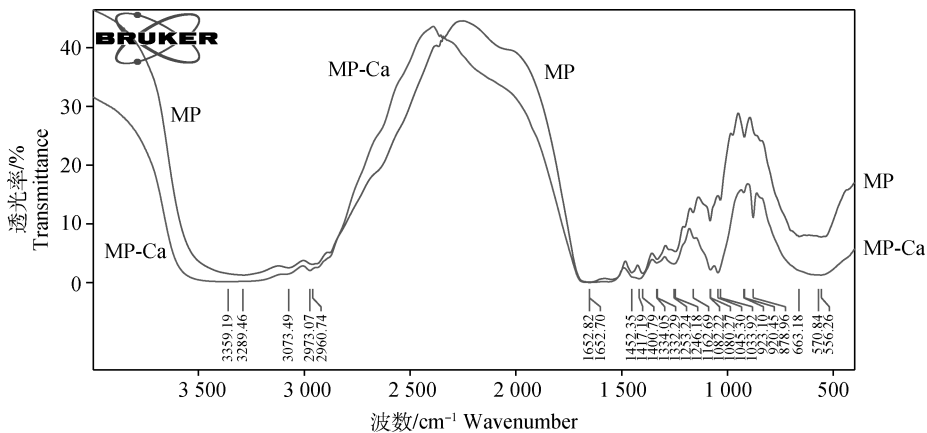


图 1 羊骨髓肽(MP)与羊骨髓肽钙螯合物(MP-Ca) 红外光谱图

Fig. 1 The infrared spectrum of short peptide with MP and MP-Ca

对红外光谱图进一步分析,结果如表 1 所示,说明钙离子主要与骨髓肽游离氨基端的氨基(-NH₂)、游离羧基端的羧基(-COOH)以及肽链内部的羰基

(C=O)发生了结合,通过螯合,羊骨髓肽变成了羧酸盐和铵盐。

表 1 羊骨髓肽与钙离子螯合前后红外光谱分析

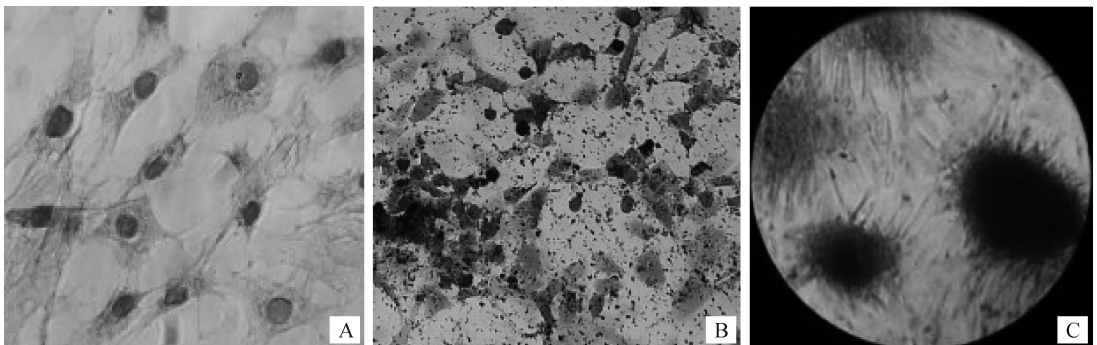
Table 1 Changes of infrared spectra before and after calcium chelating of bovine bone marrow oligopeptide

红外吸收峰 Infrared absorption peaks	MP 波数/cm ⁻¹ Wave number of MP	MP-Ca 波数/cm ⁻¹ Wave number of MP-Ca	变化 Changes	原因分析 Reasons	
官能区 Functional area	1	3 289.46	3 359.19	波数增加, 谱带红移并变 宽, 螯合成为铵盐	N-H 伸缩振动即-NH ₂ 的 伸缩振动(ν _{N-H})
	2	3 073.49		消失	COO-对称振动
	3	2 960.74	2 973.07	波数增大, 发生蓝移	C=O 伸缩振动(ν _{C=O})
	4	1 651.96	1 624.58	波数减小	COO-伸缩振动
	5	1 452.35		消失	COO-对称振动
	6	1 400.79	1 417.19	波数增大	COO-对称振动
指纹区 Fingerprint area	7	1 162.69		消失	COO-由伸缩振动变成了变形振动
	8	1 082.43		红移, 谱带变宽	
	9		878.96	新增加	单键的伸缩振动, 变形振动
	10	663.18		消失	
	11	555.26	570.84	红移, 波数增加	

2.2 成骨细胞的鉴定

分离的原代成骨细胞经 HE 染色后, 可见细胞呈短梭形、三角形、多边形、鳞片状、铺路石状等成纤维细胞样形态, 符合成骨细胞的特征^[11-12], 细胞轮廓清晰, 细胞质丰富且呈淡红色, 细胞核呈卵圆形, 大而清晰(图 2A)。第三代成骨细胞经碱性磷酸酶

染色后, 视野内可见大量阳性细胞, 细胞膜及细胞质内有大量黑褐色颗粒(图 2B); 茜素红与钙离子螯合形成可紫红色或红色复合物, 第三代成骨细胞经茜素红染色后在细胞表面形成红染的钙化结节(图 2C)。



A. 经 HE 染色的原代成骨细胞; B. 经碱性磷酸酶(ALP)染色的第三代成骨细胞; C. 经茜素红染色的第三代成骨细胞钙化结节

A. HE-stained primary cultured osteoblasts; B. Osteoblasts stained by alkaline phosphatase; C. Calcified nodules on the surface of osteoblasts after Alizarin Red staining

图 2 从新生大鼠颅骨细胞中分离培养的成骨细胞(×100)

Fig. 2 Identification of osteoblasts isolated from neonatal rat calvarial cell (×100)

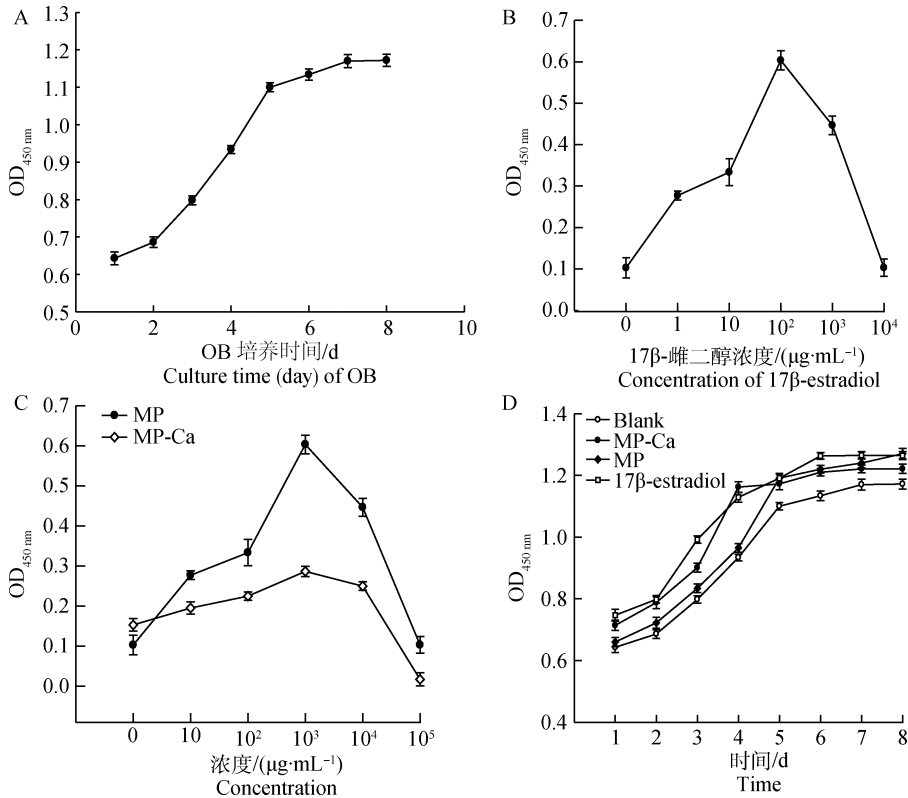
2.3 MP、MP-Ca 对成骨细胞增殖活性的影响

由生长曲线(图 3A)可知, 第三代成骨细胞贴壁

后第 1 天内经过短暂的适应期, 第 2 天便进入指数增殖期, 5 d 之后进入稳定期, 此后细胞数目基本稳

定。因此,确定受试物最佳作用浓度时选择 OB 贴壁后的第 5 天进行检测。由图 3B、C 可知完全培养液中添加不同浓度的受试物,第 5 天检测时,MP、MP-Ca 均在 $10^3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值最高,细胞数量最多,故确定此浓度为 MP、MP-Ca 的最适作用浓度。同理,雌激素最适作用浓度为 $10^2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。图 3D

中的测定结果经方差分析,相同的接种密度,在最适浓度下,雌激素、MP-Ca 和 MP 组的 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 在整个检测期均高于空白组 ($P < 0.05$),且 MP-Ca 组的 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 显著高于 MP 组 ($P < 0.05$),在第 4 天时,甚至高于雌激素组 ($P < 0.05$)。



A. 成骨细胞生长曲线;B、C. 不同受试物最适浓度的选择;D. 不同受试物对成骨细胞增殖情况的影响

A. The growth curve of cultured osteoblasts; B, C. Selection of optimal concentration for each treatment group; D. Effects of different treatment groups on the proliferation of osteoblasts

图 3 各处理组最适浓度的选择及其对成骨细胞增殖情况的影响

Fig. 3 Selection of optimal concentration for each treatment group and the effect of them on the growth curve of osteoblasts

以上结果说明 MP-Ca 和 MP 表现出雌激素样作用,均可促进成骨细胞的增殖,且与 MP 相比,MP-Ca 促进作用更显著 ($P < 0.05$)。

2.4 MP、MP-Ca 对成骨细胞成骨活性的影响

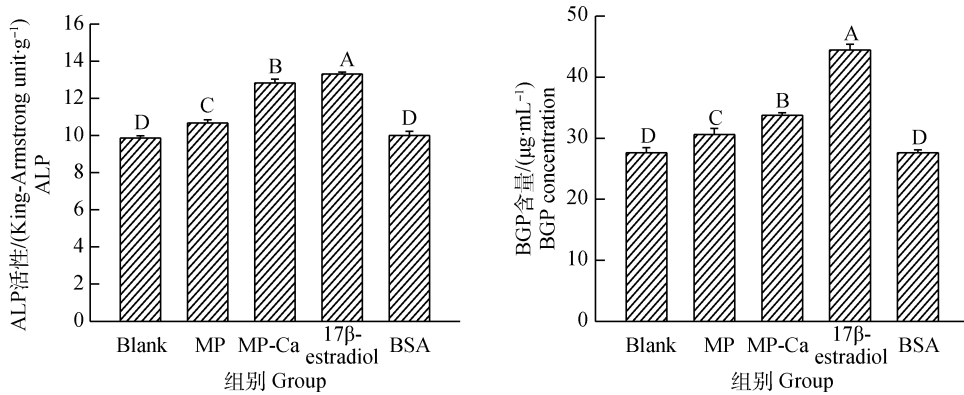
由图 4 可知,MP 及 MP-Ca 处理成骨细胞后,细胞裂解液中的 ALP 活性及 BGP 含量尽管极显著低于雌激素组 ($P < 0.01$),但均极显著高于空白组 ($P < 0.01$);且 MP-Ca 处理组的 ALP 活性及 BGP 含量均极显著高于 MP 处理组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

受集约化养殖过程中饲养管理方式、日照、饲料

配比、激素和抗生素应用、重金属污染等问题的影响,骨质疏松(osteoporosis, OP)对畜禽健康及动物福利的影响逐渐引起社会关注^[6,14-15]。研究表明,OP 发生时,机体的抗氧化水平下降,免疫功能下降,肝、肾、甲状腺等组织表现出病理变化^[16-17]。过去 20 年来,抗骨吸收药物一直被作为治疗 OP 的首选,但由于骨吸收与骨形成紧密相关,在抑制骨吸收时,骨形成的减少也不可避免^[18-22],因而促进骨形成的更安全有效的 OP 防治药物的研发日益受到人们的重视。

动物来源的多肽及其钙螯合物的生物利用度高、安全性好,被证实可促进骨骼生长发育、提高骨



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, 字母相异表示差异显著, 相同表示差异不显著
Capital letters and lower case letters present significant level $\alpha=0.05$, and $\alpha=0.01$. Different letters indicate statistic differences between the treatments, same letters mean no significant differences

图 4 各受试物对第三代成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性及骨钙素(BGP)含量的影响

Fig. 4 Effect of tested agents on the activity of alkaline phosphatase and BGP content of third generation osteoblasts

密度、恢复骨质疏松大鼠骨骼微观结构, 具有 OP 防治作用, 同时还具有促进免疫、抗氧化等功能, 广受关注而不断被开发^[23-26]。但其对骨质的改善作用的相关研究大都集中效果验证方面, 集中在受试物对血液生化指标和骨骼指标的影响方面, 对作用机制方面, 例如对成骨细胞的增殖和成骨活性的影响报道极少。

作为生物体的主要组成部分, 骨组织内始终进行着由成骨细胞介导的骨形成与由破骨细胞介导的骨吸收组成的骨转换过程。OB 作为调控骨吸收的中心细胞^[5], 其增殖分化活动受到抑制是骨质疏松症的主要原因^[7]。成骨细胞的数量与活性将直接决定最终的骨形成量^[2]。

在骨代谢过程中会产生多种生化标志物, 其中碱性磷酸酶(ALP)是参与骨代谢的重要蛋白质, 既可代表成骨细胞的早期分化水平, 又代表着骨形成。同样, 骨钙素(BGP)在成骨细胞分化过程中产生, 是骨矿化不可或缺的重要因子^[27]。

经红外光谱鉴定, MP 与 CaCl_2 发生了螯合, 形成了羊骨髓肽羧酸盐和铵盐^[28], 其螯合部位与其他肽钙螯合物相同^[26,29]。MP-Ca 和 MP 均可增强成骨细胞的增殖活性、成骨细胞裂解液中的 ALP 活性和 BGP 含量, 增强成骨细胞的成骨活性, 且同质量浓度 MP-Ca 的效果优于 MP, 所以 MP-Ca 中 Ca^{2+} 的螯合掺入, 不仅可降低 MP 的用量, 还可使效果增强, 具体作用机制还有待进一步研究。

4 结论

体外研究表明, 效果虽不及雌激素, MP 和 MP-

Ca 均可促进 OB 的增殖并增强其骨形成活性, 且 MP-Ca 效果优于 MP。

参考文献 (References):

- [1] 翟远坤, 牛银波, 潘亚磊, 等. 柚皮苷对体外培养乳鼠颅骨成骨细胞增殖和分化成熟的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(1):105-111.
ZHAI Y K, NIU Y B, PAN Y L, et al. Effects of naringin on proliferation, differentiation and maturation of rat calvarial osteoblasts *in vitro* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2013, 38(1): 105-111. (in Chinese)
- [2] 殷晓雪, 陈仲强, 党耕町, 等. 淫羊藿苷对人成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(4):289-291.
YIN X X, CHEN Z Q, DANG G T, et al. Effects of epimedium pubescens icariine on proliferation and differentiation of human osteoblasts[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2005, 30(4):289-291. (in Chinese)
- [3] 邢国胜, 谈志龙, 王淑云, 等. 补肾健骨汤对成骨细胞增殖及碱性磷酸酶、骨钙素合成的影响[J]. 中草药, 2001, 32(11):1020-1022.
XING G S, TAN Z L, WANG S Y, et al. *In vitro* effects of Bushen Jiangu decoction on proliferation, alkaline phosphatase and osteocalcin composition of osteoblasts of rat[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2001, 32(11):1020-1022. (in Chinese)
- [4] 元宇, 郭健民, 邹军. OPG/RANKL/RANK 信号通路在运动与骨免疫学中的研究进展[J]. 中国骨质

- 疏松杂志, 2015, 21(8):1005-1010.
- YUAN Y, GUO J M, ZOU J. Research progress of OPG/RANKL/RANK signal pathway in exercise and osteoimmunology[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2015, 21(8):1005-1010. (in Chinese)
- [5] 郭 梁. 成骨细胞、破骨细胞及 OPG/RANKL/RANK 轴与骨质疏松症[J]. *中医正骨*, 2010, 22(7):41-44.
- GUO L. Osteoblasts, osteoclasts and OPG/RANKL/RANK axis with osteoporosis [J]. *The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology*, 2010, 22(7):41-44. (in Chinese)
- [6] 韩克光, 申勇涛, 原 恺, 等. 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[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(5):1047-1053.
- HAN K G, SHEN Y T, YUAN K, et al. Regulation of RANK/RANKL/OPG signal pathway by calcium chelated sheep bone collagen peptide in inhibiting the occurrence of osteoporosis[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(5):1047-1053. (in Chinese)
- [7] 程稚玲. 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]. 太谷: 山西农业大学, 2016.
- CHENG Z L. Preparation of calcium chelate collagen short peptide and its effect on bone improvement in ovariectomized rats[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [8] 翟远坤, 潘亚磊, 牛银波, 等. 补骨脂素与异补骨脂素对鼠颅骨成骨细胞分化成熟影响的比较研究[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(3):355-361.
- ZHAI Y K, PAN Y L, NIU Y B, et al. Comparative studies on the differentiation and maturation of rat calvarial osteoblasts by psoralen and isopsoralen *in vitro*[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2012, 28(3):355-361. (in Chinese)
- [9] KARSDAL M A, LARSEN L, ENGSIG M T, et al. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(46):44061-44067.
- [10] 吕秀华, 陈 伟, 周 凡, 等. 新疆塔里木马鹿茸多肽对小鼠前成骨细胞的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2015, 22(2):47-50.
- LV X H, CHEN W, ZHOU F, et al. Effect of antler peptides of cervus elaphus yarkandensis on MC3T3-E1 Cells[J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2015, 22(2):47-50. (in Chinese)
- [11] 王建华, 王 艳, 潘永梅. 补骨脂素对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响[J]. *天然产物研究与开发*, 2007, 19(5):844-846.
- WANG J H, WANG Y, PAN Y M. Effects of psoralen on proliferation and differentiation of cultured osteoblasts *in vitro*[J]. *Natural Product Research and Development*, 2007, 19(5):844-846. (in Chinese)
- [12] 李 娟, 申广浩, 程 光, 等. 组织块法培养 SD 大鼠的成骨细胞及鉴定[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(46):8571-8574.
- LI J, SHEN G H, CHENG G, et al. Explant culture and identification of SD rat's osteoblasts[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2012, 16(46):8571-8574. (in Chinese)
- [13] 江洋珍, 王俊俊, 梁继超, 等. 薯蓣皂苷元对大鼠成骨细胞增殖、分化及 OPG/RANKL mRNA 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(1):134-136.
- JIANG Y Z, WANG J J, LIANG J C, et al. Effects of diosgenin on cell proliferation, differentiation and OPG/RANKL mRNA expression of rat osteoblasts cultured *in vitro*[J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2010, 25(1):134-136. (in Chinese)
- [14] 王 涛, 兰 玲. 笼养蛋鸡骨质疏松症的诊治[J]. *新疆畜牧业*, 2007(3):47.
- WANG T, LAN L. Diagnosis and treatment of osteoporosis in laying hens[J]. *Xinjiang Xumuye*, 2007(3):47. (in Chinese)
- [15] 李 兰, 周 侗, 邵晋康, 等. 绝经期骨质疏松雌激素替代治疗临床研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6(2):48-51.
- LI L, ZHOU T, SHAO J K, et al. Effect of hormone replacement therapy on postmenopausal osteoporosis[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2000, 6(2):48-51. (in Chinese)
- [16] 张 琪. 骨胶原肽及钙螯合胶原肽对去卵巢大鼠抗氧化能力的改善作用[D]. 太谷: 山西农业大学, 2018.
- ZHANG Q. The improvement of antioxidant capacity of sheep bone collagen peptide(SBCP) and collagen peptide chelated calcium(CPCC) in ovariectomized rats [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [17] 左爱玲. 钙螯合胶原肽等对去卵巢大鼠免疫功能的改善作用[D]. 太谷: 山西农业大学, 2017.

- ZUO A L. Immunoregulatory effect of calcium chelating collagen peptides on ovariectomized rats [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [18] GALLAGHER J C, SAI A J. Molecular biology of bone remodeling: Implications for new therapeutic targets for osteoporosis [J]. *Maturitas*, 2010, 65 (4):301-307.
- [19] SIMS N A, GOOI J H. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19(5):444-451.
- [20] LASSEN N E, ANDERSEN T L, PLØEN G G, et al. Coupling of bone resorption and formation in real time: New knowledge gained from human Haversian BMUs [J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32 (7): 1395-1405.
- [21] LIU C C, KALU P D, SALERNO E, et al. Preexisting bone loss associated with ovariectomy in rats is reversed by parathyroid hormone [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 6(10):1071-1080.
- [22] GLOVER S J, EASTELL R, MCCLOSKEY E V, et al. Rapid and robust response of biochemical markers of bone formation to teriparatide therapy [J]. *Bone*, 2009, 45(6):1053-1058.
- [23] 宋 芹. 胶原蛋白短肽与中药补骨脂提取物抗骨质疏松作用的研究 [D]. 成都:成都中医药大学, 2009.
- SONG Q. Study of antiosteoporotic activity of collagen peptid and Psoralea Corylifolia Extract [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2009. (in Chinese)
- [24] 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, 38(23):191-195.
- XU X M, DONG W B. Calcium-binding collagen polypeptide from pigskin gelatin improves bone mineral density in rats [J]. *Food Science*, 2017, 38(23):191-195. (in Chinese)
- [25] 潘兴昌,柳 园,戴婷婷,等. 海洋鱼骨胶原低聚肽改善骨质疏松的效果观察 [J]. *预防医学情报杂志*, 2011, 27(5): 393-395.
- PAN X C, LIU Y, DAI T T, et al. Effect of ocean fish collagen oligopeptides on osteoporosis [J]. *Journal of Preventive Medicine Information*, 2011, 27 (5):393-395. (in Chinese)
- [26] 谢 静. 自制猪骨胶原多肽对去卵巢骨质疏松大鼠与成骨细胞增殖的影响 [D]. 长沙:湖南农业大学, 2009.
- XIE J. Effect of self-made swine bone collagen polypeptides on the ovariectomized rats and proliferation of osteoblast [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2009. (in Chinese)
- [27] 戎赞华, 窦志艳, 徐 青. 骨形成的生化标志物及其影响因素的研究进展 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2003, 12(12):1319-1322.
- RONG Z H, DOU Z Y, XU Q. Research progression of biochemistry marker and influence factor of bone formation [J]. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2003, 12(12): 1319-1322. (in Chinese)
- [28] 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)
- [29] 王小林,孔祥珍,华欲飞,等. 大豆分离蛋白肽钙螯合物的制备及表征 [J]. *中国油脂*, 2017, 42(7):50-54.
- WANG X L, KONG X Z, HUA Y F, et al. Preparation and characterization of soybean protein isolate peptide-calcium chelate [J]. *China Oils and Fats*, 2017, 42(7):50-54. (in Chinese)

(编辑 白永平)