

Effects of Collagen Peptide from Tuna Bone Chelated Calcium on Osteoporosis in Ovariectomized Rats

Shiwei Hu¹, Xiaomin Zhou², Cheng Li², Wanyuan Zheng²

¹Innovation Application Institute, Zhejiang Ocean University, Zhoushan Zhejiang

²Zhejiang Industrial Group Co., Ltd., Zhoushan Zhejiang

Email: hushiweihai@163.com

Received: Jan. 10th, 2019; accepted: Jan. 24th, 2019; published: Jan. 31st, 2019

Abstract

The loss of collagen peptide and bone calcium directly induces osteoporosis. Supplementation of collagen peptide and calcium is an effective approach to prevent osteoporosis. In this study, the effects of collagen peptide from tuna bone chelated calcium (TCP/Ca), prepared in the previous experiments, on inhibition of osteoporosis, were investigated in bilateral oophorectomy rats. Results showed that TCP/Ca significantly decreased the concentration of tartaric acid phosphatase, cathepsin K and receptor activator of nuclear factor κ B in the serum of osteoporosis rats, and inhibited bone resorption. TCP/Ca significantly reduced serum bone alkaline phosphatase, osteocalcin, propeptide carboxy-terminal procollagen, and also lowered the ratio of receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin. TCP/Ca remarkably increased bone mineral density of femur, enhanced maximum load and structural strength of tibia. These indicated that TCP/Ca can effectively inhibit osteoporosis in oophorectomy rats, which provides a theoretical basis for high value utilization of tuna bone.

Keywords

Tuna Bone, Collagen Peptide from Tuna Bone Chelated Calcium, Osteoporosis

金枪鱼骨胶原蛋白肽螯合钙对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响

胡世伟¹, 周小敏², 李澄², 郑万源²

¹浙江海洋大学创新应用研究院, 浙江 舟山

²浙江兴业集团有限公司, 浙江 舟山

摘要

胶原多肽与骨钙的流失直接导致了骨质疏松症的发生, 补充胶原多肽与钙质是预防骨质疏松的有效途径。本文以前期制备的金枪鱼骨胶原蛋白肽(collagen peptide from tuna bone, TCP)螯合钙为受试物, 通过双侧摘除卵巢构建的骨质疏松症模型, 研究螯合钙抑制骨质疏松症的作用。实验结果显示, 螯合钙显著降低了骨质疏松症大鼠血清骨吸收关键因子抗酒石酸酸性磷酸酶、组织蛋白酶K和核因子 κ B受体活化因子的浓度, 抑制骨吸收; 螯合钙显著降低了大鼠血清骨形成关键因子骨源性碱性磷酸酶、骨钙素、I型前胶原羧基端前肽的浓度, 减小了核因子 κ B受体活化因子配体和骨保护素的比例, 调节骨形成; 螯合钙显著增加了股骨密度, 增强了胫骨最大载荷和结构强度。提示, 金枪鱼骨胶原蛋白肽螯合钙能有效地抑制摘除卵巢大鼠的骨质疏松症, 为金枪鱼骨的高值化利用提供了理论依据。

关键词

金枪鱼骨, 胶原蛋白肽螯合钙, 骨质疏松症

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着人口老龄化趋势的加剧, 绝经后骨质疏松症患者的数量也呈现逐年增加的趋势, 对绝经妇女的健康构成了严重威胁。绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)在全球超过 2 亿的骨质疏松症患者占比约为 33%。此病症是由于绝经期妇女卵巢功能下降, 雌激素分泌减少, 继发性甲状旁腺功能亢进, 降钙素的分泌相减降低, 出现的以低骨量和骨组织显微结构损坏为特征的症状, 临床表现为骨质疏松性和骨折概率增多[1]。胶原多肽和骨钙的流失是此病症最重要的 2 种诱发因素[2] [3]。因此, 目前认为有效地补充胶原多肽和钙离子是预防和治疗 PMOP 的有效手段。

金枪鱼鱼骨是金枪鱼加工过程的副产物, 含有丰富的骨胶原蛋白和有机钙质[4], 例如, 每 10 吨金枪鱼鱼骨可提取 3 吨以上的骨胶原蛋白。国外在利用鱼骨废弃物方面积累了较多的经验, 如在日本, 把狭鳕鱼鱼骨制成磷灰石, 可以做成人造骨骼和假牙; 国内鱼骨的利用多数以废弃物的形式处理, 仅小部分加工成能耗大且低附加值的产品, 如骨糊食品、鱼露、膨化食品、动物饲料等[5]。近期, 泰国学者利用金枪鱼骨中的钙制作出一种钙强化饼干, 并阐述了其营养价值[6]。这些对金枪鱼骨的利用, 绝大多数都聚焦于优质的钙源加以利用, 对金枪鱼骨中胶原蛋白的研究较少。另一方面, 国内外基本还没有成型的加工技术, 只有小部分加工成饲料, 大部分作为废弃物直接排放, 既污染环境, 又严重浪费资源。研究发现, 金枪鱼骨粉能增加哺乳期大鼠及其后代的骨密度[7], 但其中有效的功能因子尚不确定。本文以金枪鱼鱼骨为原材料, 以前期实验方法制备获得金枪鱼骨胶原蛋白肽(collagen peptide from tuna bone, TCP)螯合钙为受试物, 以双侧摘除卵巢的大鼠为骨质疏松症的动物模型, 从骨代谢基础指标、骨密度和生物力学等方面, 探讨 TCP 螯合钙对去卵巢大鼠骨质疏松症的作用, 为金枪鱼骨的高值化利用和研发抗骨质

疏松症的功能食品或特殊医学配方食品提供实验依据。

2. 实验方法

2.1. 金枪鱼骨和实验动物

黄鳍金枪鱼鱼骨粉由浙江兴业集团有限公司提供。

雌性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 180~220 g, 购自北京维通利华实验动物技术公司(SCXK(京)2017-0001)。

2.2. 实验试剂与仪器

碱性蛋白酶, 南宁庞博生物工程有限公司; 阿仑膦酸钠(alendronate, ALN), 石家庄石药集团欧意药业有限公司; 碱性磷酸酶、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRACP)测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 雌二醇(estradiol, E2)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、骨源性碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, BALP)、I 型前胶原羧基端前肽(propeptide carboxy-terminal procollagen, PICP)、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 activator of nuclear factor κ B ligand, RANKL)、组织蛋白酶 K (Cathepsin K, Cath-K)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)等酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immune sorbet assay, ELISA)试剂盒, 美国 R&D 公司; 其他试剂为国产分析纯。

Model680 酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; GL-20M 冷冻离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; QS3023 小动物骨骼强度测定仪, 张家港市青松生物医学仪器有限公司; GK99-UNIGAMMA X-RAY PLUS 双能 X 线骨密度仪, 意大利 1'acn 公司。

2.3. TCP 螯合钙制备

称取金枪鱼鱼骨粉 100 g, 溶解于 20 mM 的 1 L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2), 在 0.10~0.12 MPa 压力下, 100°C~120°C 蒸煮 5 h, 冷却后加入 500,000 U 的碱性蛋白酶, 用 1 M HCl 或 NaOH 溶液调节反应体系的 pH 值 9.0, 45°C 下进行酶解反应, 酶解完毕后沸水浴灭活酶 10 min。流水冷却至室温后以 4000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 500 Da 透析袋透析后减压浓缩, 冷冻干燥得 TCP。酶解后残渣为骨钙部分, 加入到 200 mL 质量分数为 40%的柠檬酸溶液中水解 10 h 以获得金枪鱼骨来源的钙离子。水解结束后, 调节 pH 值至中性, 过滤取上清, 喷雾干燥得金枪鱼骨柠檬酸钙。

取 2 g TCP 和 0.33 g 鱼骨柠檬酸钙(肽钙质量比 6:1)溶于 20 mL 蒸馏水中, 在恒温振荡器中进行螯合反应, pH 7.5, 螯合温度 35°C, 螯合时间 40 min。螯合反应结束后, 向溶液中加入 60 mL 无水乙醇沉淀螯合物, 沉淀体系于 4°C 条件下沉降 6 h, 4500 r/min 离心 20 min, 沉淀物经冷冻干燥, 即得 TCP 螯合钙, 钙螯合率为 92.03%。

2.4. 动物模型建立与分组

通过摘除双侧卵巢的手术建立骨质疏松症大鼠模型。雌性 SD 大鼠适应性喂养 7 d, 随机分为假手术组和摘除卵巢组。腹腔注射 3.4 mL/kg·bw 的 10%水合氯醛麻醉大鼠, 剪除大鼠对双侧卵巢, 庆大霉素溶液消毒后缝合腹部肌肉, 再次消毒后缝合皮肤, 再进行第三次消毒, 假手术组大鼠剪除相等量的脂肪, 大鼠每天注射庆大霉素以预防病菌感染, 连续 3 d, 15 d 后选择状态正常的大鼠进行实验。大鼠饲喂 90 d, 尾静脉取血, 检测血 E2、TRACP 和碱性磷酸酶的含量, 以假手术组(SHAM)大鼠(10 只)为对照组, 摘除卵巢组大鼠血清 E2 显著下降($P < 0.01$), TRACP 和碱性磷酸酶活性显著提高($P < 0.01$)者判断为造模成功的大鼠。

选择造模成功的大鼠随机分为模型对照组(OVX)、阿仑膦酸钠阳性对照组(ALN)、TCP 螯合钙低剂量(L-TCP/钙)、TCP 螯合钙高剂量组(H-TCP/钙), 每组 10 只。TCP/钙低、高剂量组分别灌胃 400 mg/kg 和 800 mg/kg 的 TCP/钙, 阳性对照组灌胃 1 mg/kg 的 ALN, 假手术组和模型对照组灌胃等体积量的生理盐水, 1 次/d, 连续 12 w, 期间大鼠自由进食饮水。末次给药后, 大鼠禁食不禁水 10 h, 经乙醚麻醉后由腹主动脉处用注射器取血, 常规方法分离血清 4℃ 保存, 迅速剥离大鼠双侧股骨与胫骨, 纱布包裹后-20℃ 保存备用。

2.5. 骨吸收指标检测

按照 TRACP 试剂盒说明书的方法测定其活性;按照 ELISA 试剂盒说明书的方法分别测定血清 Cath-K 的活性和 RANK 的含量。

2.6. 骨形成指标检测

按照 ELISA 试剂盒说明书的方法分别测定血清 BALP 的活性和 OCN、PICP、OPG 和 RANKL 的含量。

2.7. 骨密度检测

取左侧股骨, 室温环境平衡 1 h, 利用双能 X 线骨密度仪进行扫描, 检测骨密度(bone mineral density, BMD)。

2.8. 骨最大载荷测定

取右侧胫骨, 经室温环境平衡 1 h 后, 利用小动物骨骼强度仪检测最大荷载。

2.9. 骨结构强度测定

取左侧胫骨, 经室温环境平衡 1 h 后, 利用小动物骨骼强度仪检测结构强度。

2.10. 统计学分析

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS17.0 软件进行单因素 ANOVA 方差分析, 采用 Tukey's 法进行数据间两两比较, 以 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义上的差异。

3. 结果

3.1. TCP/钙对骨吸收指标的影响

由表 1 可知, 与 SHAM 组比较, OVX 组大鼠血清 TRACP 和 Cath-K 的活性均显著增加($P < 0.01$)。灌胃 TCP/钙后, 与 OVX 组比较, 高剂量组大鼠 TRACP 和 Cath-K 的活性分别显著降低了 42.85% ($P < 0.01$) 和 49.62% ($P < 0.01$); 同时, 低剂量组大鼠 TRACP 和 Cath-K 的活性也显著降低了 21.61% ($P < 0.05$) 和 29.39% ($P < 0.05$)。结果表明, TCP/钙可以通过降低 TRACP 和 Cath-K 的水平抑制破骨细胞的生物活性。

由表 1 可知, 与 SHAM 组比较, OVX 组大鼠血清 RANK 含量显著增加($P < 0.05$)。高剂量 LCP 组 RANK 含量显著减少了 19.96% ($P < 0.05$)。结果表明, TCP/钙能通过抑制 RANK 的分泌发挥抑制骨质疏松的作用。

3.2. TCP/钙对骨形成指标的影响

由表 2 可知, H-TCP/钙组大鼠 BALP 活性、OCN 和 PICP 含量均显著下降($P < 0.01$); L-TCP/钙组大鼠 BALP 活性也显著下降($P < 0.05$), 而 OCN 和 PICP 含量变化不显著。结果表明, TCP/钙可以通过抑制

BALP、OCN 和 PICP 的水平改善骨质疏松症状。成骨细胞分泌 OPG 和 RANKL 能够促使破骨细胞分化活化的细胞因子, RANKL 与 OPG 的比值被认为是破骨细胞活性的重要指标, 对骨吸收起到决定性的作用。由表 2 可知, 与 SHAM 组比较, OVX 组血清 OPG 含量显著降低($P < 0.01$), RANKL 含量和 RANKL/OPG 比值显著($P < 0.01$)。灌胃 TCP/钙后, 与 OVX 组大鼠比较, L-TCP/钙组和 H-TCP/钙组大鼠血清 OPG 和 RANKL 的含量均显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$), RANKL/OPG 比值分别也显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明, TCP/钙可通过调节 OPG 和 RANKL, 抑制破骨细胞的生成, 改善骨质疏松。

Table 1. Effects of TCP/Ca on bone resorption indexes in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

表 1. TCP/钙对大鼠骨吸收指标的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Groups	TRACP (U/L)	Cath-K ($\mu\text{g/mL}$)	RANK (pg/mL)
SHAM	18.35 \pm 2.67	1.34 \pm 0.07	28.12 \pm 1.54
OVX	41.24 \pm 1.78 ^{###}	2.62 \pm 0.15 ^{##}	34.77 \pm 4.62 [#]
ALN	29.74 \pm 1.33 ^{**}	1.67 \pm 0.12 ^{**}	29.48 \pm 3.24 [*]
L-TCP/钙	32.33 \pm 2.04 [*]	1.85 \pm 0.14 [*]	31.44 \pm 2.81
H-TCP/钙	23.57 \pm 1.76 ^{**}	1.32 \pm 0.12 ^{**}	27.83 \pm 3.40 [*]

注: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 与 SHAM 组比较; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 与 OVX 组比较。Note: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs SHAM group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs OVX group.

Table 2. Effects of TCP/Ca on osteogenesis indexes in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

表 2. TCP/钙对大鼠骨形成指标的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Groups	BALP (U/L)	OCN (ng/mL)	PICP (ng/mL)	OPG (pg/mL)	RANKL (pg/mL)	RANKL/OPG
SHAM	82.41 \pm 4.26	3.55 \pm 0.45	6.22 \pm 0.43	13.40 \pm 1.28	16.29 \pm 1.27	1.23 \pm 0.17
OVX	220.58 \pm 9.65 ^{###}	6.71 \pm 0.38 ^{##}	9.89 \pm 0.77 ^{##}	6.58 \pm 0.93 ^{##}	32.23 \pm 2.77 ^{##}	4.94 \pm 0.78 ^{##}
ALN	130.07 \pm 7.10 ^{**}	4.11 \pm 0.47 ^{**}	7.83 \pm 0.55 [*]	9.76 \pm 0.69 ^{**}	24.37 \pm 1.52 ^{**}	2.50 \pm 0.33 ^{**}
L-TCP/钙	183.19 \pm 6.47 [*]	5.76 \pm 0.55	8.87 \pm 0.86	8.89 \pm 0.64 [*]	27.59 \pm 3.41 [*]	3.20 \pm 0.45 [*]
H-TCP/钙	133.24 \pm 5.23 ^{**}	4.17 \pm 0.36 ^{**}	6.72 \pm 0.72 ^{**}	11.31 \pm 0.70 ^{**}	21.44 \pm 2.03 ^{**}	1.86 \pm 0.18 ^{**}

注: ^{##} $P < 0.01$ 与 SHAM 组比较; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 与 OVX 组比较。Note: ^{##} $P < 0.01$ vs SHAM group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs OVX group.

3.3. TCP/钙对骨密度和骨生物力学性能的影响

由表 3 可知, 与 SHAM 组大鼠比较, OVX 组股骨及股骨干和骨骺端的 BMD 显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 进一步说明骨质疏松症大鼠模型的构建成功。灌胃 TCP/钙后, 高剂量组大鼠与 OVX 组大鼠比较, 股骨及股骨干和骨骺端的 BMD 分别显著增加了 14.27% ($P < 0.01$), 10.54% ($P < 0.05$)和 17.55% ($P < 0.01$)。低剂量组变化不显著。结果表明, TCP/钙能够提高骨质疏松症大鼠的骨密度, 改善骨质疏松。

由表 3 可知, 与 SHAM 组大鼠比较, OVX 组胫骨最大载荷和结构强度均显著降低($P < 0.01$)。灌胃 TCP/钙后, 与 OVX 组大鼠比较, 高剂量组大鼠胫骨的最大载荷和胫骨结构强度分别显著增加了 31.68% ($P < 0.05$)和 52.35% ($P < 0.01$)。结果表明, TCP/钙能够较好地提高大鼠胫骨的最大载荷和骨结构强度, 改善骨质疏松症状。

4. 讨论

本文研究了 TCP/钙对双侧摘除卵巢大鼠骨质疏松症的抑制作用。结果显示, TCP/钙能够显著降低骨质疏松症大鼠的骨吸收, 提高骨密度, 增强骨生物力学性能。表明 TCP/钙能显著改善双侧摘除卵巢大鼠的骨质疏松症。

Table 3. Effects of TCP/Ca on BMD and bone biomechanics in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)**表 3.** TCP/钙对大鼠骨密度和骨生物力学性能的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Groups	BMD (g/cm ³)			胫骨最大载荷(kg)	胫骨结构强度(kg)
	股骨	股骨-骨干	股骨-骨骺端		
SHAM	0.3034 ± 0.0126	0.2804 ± 0.0117	0.3190 ± 0.0202	9.13 ± 1.12	24.78 ± 3.04
OVX	0.2614 ± 0.0203 ^{###}	0.2543 ± 0.0122 [#]	0.2655 ± 0.0247 ^{###}	6.44 ± 0.49 ^{###}	14.67 ± 1.55 ^{###}
ALN	0.2876 ± 0.0087 [*]	0.2741 ± 0.0100 [*]	0.2902 ± 0.0169 [*]	7.87 ± 0.54 [*]	20.22 ± 1.63 ^{**}
L-TCP/钙	0.2744 ± 0.0120	0.2623 ± 0.0136	0.2802 ± 0.0196	7.03 ± 0.71	16.19 ± 1.26
H-TCP/钙	0.2987 ± 0.0107 ^{**}	0.2811 ± 0.0104 [*]	0.3121 ± 0.0135 ^{**}	8.25 ± 0.79 ^{**}	22.43 ± 2.52 ^{**}

注: [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$ 与 SHAM 组比较; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 与 OVX 组比较。Note: [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$ vs SHAM group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs OVX group.

BALP 可以反映骨骼矿化和成骨细胞生物活性[8]; OCN 对成骨细胞的分化和骨基质矿化具有重要的意义[8]; PICP 是骨胶原的合成过程中重要的因子[9], 三者均能够及时地反映骨生成。本实验中 TCP/钙显著降低了骨质疏松症大鼠的 BALP、OCN 和 PICP 的水平, 提示 TCP/钙能够通过调控大鼠的骨生成, 抑制骨质疏松。

RANKL/OPG 的比值直接影响着破骨细胞的活性, 同时也影响了骨吸收率和骨密度[10], 能较准确地预测骨吸收。本实验中 TCP/钙显著增加了大鼠的血清 OPG 水平, 降低了 RANKL 水平, 减小了 RANKL/OPG 比值。TRACP 对破骨细胞的调节作用主要是通过影响骨基质的吸收和胶原蛋白的转化来实现的[11]。Cath-K 可以降解 I 型胶原, 在破骨细胞中具有高选择性的表达[11]。本实验中 TCP/钙显著降低了骨质疏松症大鼠的 TRACP 和 Cath-K 的含量, 提示 TCP/钙能够通过抑制破骨细胞的形成, 抑制骨质疏松症大鼠的骨吸收。

目前对骨质疏松症诊断的最主要指标是 BMD, 而事实上, 除 BMD 外, 骨质疏松的发生发展还与骨脆性的增加有关。检测 BMD 是目前骨质疏松症研究和药物疗效评价的重要手段。利用双能 X 射线骨密度仪检测 BMD 是“判断抗骨质疏松药物疗效的金标准”方法[12]。较高的骨折发生率是骨质疏松症最大的危害, 骨生物力学可以直接反映骨组织结构的力学效应, 预测骨折发生。本实验中 TCP/钙显著增加了骨质疏松症大鼠的骨密度、最大载荷和结构强度, 提示 TCP/钙能够通过提高大鼠的骨密度、增强骨强度, 抑制骨质疏松症的发生。

基金项目

本文获得舟山市科技计划项目(2015C21014; 2016C41012)资助。

参考文献

- [1] 杨希重. 番茄红素对去卵巢大鼠骨质疏松症防治作用的实验研究[D]: [博士学位论文]. 青岛: 青岛大学, 2008.
- [2] Pujia, A., Gazzaruso, C. and Montalcini, T. (2017) An Update on the Potential Role of C-Peptide in Diabetes and Osteoporosis. *Endocrine*, **58**, 408-412. <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1286-5>
- [3] Xia, G., Zhao, Y., Yu, Z., et al. (2015) Phosphorylated Peptides from Antarctic Krill (*Euphausia superba*) Prevent Estrogen Deficiency Induced Osteoporosis by Inhibiting Bone Resorption in Ovariectomized Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**, 9550-9557. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04263>
- [4] 贾建萍, 周彦钢, 林赛君, 等. 金枪鱼骨营养成分分析[J]. 食品工业科技, 2013, 34(10): 334-337.
- [5] 胡静. 金枪鱼罐头的研制及其副产物利用技术研究[D]: [博士学位论文]. 海口: 海南大学, 2015.
- [6] Benjakul, S. and Karnjanapratum, S. (2018) Characteristics and Nutritional Value of Whole Wheat Cracker Fortified with Tuna Bone Bio-Calcium Powder. *Food Chemistry*, **259**, 181-187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.124>

- [7] Suntornsaratoon, P., Charoenphandhu, N. and Krishnamra, N. (2018) Fortified Tuna Bone Powder Supplementation Increases Bone Mineral Density of Lactating Rats and Their Offspring. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **98**, 2027-2034. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8688>
- [8] Lei, T., Liang, Z., Li, F., *et al.* (2017) Pulsed Electromagnetic Fields (PEMF) Attenuate Changes in Vertebral Bone Mass, Architecture and Strength in Ovariectomized Mice. *Bone*, **108**, 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.12.008>
- [9] Verroken, C., Zmierzak, H.G., Goemaere, S., *et al.* (2017) Insulin Resistance Is Associated with Smaller Cortical Bone Size in Nondiabetic Men at the Age of Peak Bone Mass. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **102**, 1807-1815.
- [10] Titanji, K. (2017) Beyond Antibodies: B Cells and the OPG/RANK-RANKL Pathway in Health, Non-HIV Disease and HIV-Induced Bone Loss. *Frontiers in Immunology*, **8**, 1851. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01851>
- [11] Kim, C.J., Shin, S.H., Kim, B.J., *et al.* (2018) The Effects of Kaempferol-Inhibited Autophagy on Osteoclast Formation. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 125. <https://doi.org/10.3390/ijms19010125>
- [12] Zhou, Y., Gao, Y. and Xu, C. (2018) A Novel Approach for Correction of Crosstalk Effects in Pathway Analysis and Its Application in Osteoporosis Research. *Scientific Reports*, **8**, 668. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19196-2>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2166-613X, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjfn@s41598-018-19196-2