

鲫鱼卵唾液酸糖蛋白对 SAMP6 小鼠骨丢失的保护作用

赵延蕾, 詹麒平, 马乾滨, 王一名, 王静凤

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

摘要: 本文研究了鲫鱼卵唾液酸糖蛋白 (Sialoglycoproteins of *Carassius auratus* eggs, Ca-SGP) 对 SAMP6 小鼠骨丢失的保护作用。以雄性 SAMP6 小鼠为老年性骨质疏松症动物模型, 连续灌胃 Ca-SGP 150d 后, 检测血清骨代谢生化标志物, 测定小鼠股骨矿化沉积率、胫骨骨密度及松质骨微结构。结果显示, 经 Ca-SGP (500mg/kg bw) 干预后, 小鼠血清中骨生成标志物骨源性碱性磷酸酶的活性和 I 型前胶原羧基端前肽、骨钙素的含量得到显著升高 ($p < 0.01$), 骨吸收标志物抗酒石酸酸性磷酸酶和组织蛋白酶 K 的活性得到显著抑制 ($p < 0.01$); 胫骨骨密度提高 10.92% ($p < 0.01$); 松质骨骨体积分数、骨小梁数目及厚度均得到显著增加 ($p < 0.01$), 骨小梁间隙显著缩小 ($p < 0.01$); 骨矿化沉积率提高 98.87%, 差异显著 ($p < 0.01$)。该研究表明 Ca-SGP 可改善老年性骨质疏松症小鼠低骨转换, 提高骨密度, 改善骨小梁结构, 促进骨矿化, 为开发抗骨质疏松症药物和功能食品提供了理论支持。

关键词: 鲫鱼卵唾液酸糖蛋白; 骨代谢; 骨密度; 松质骨微结构; 骨矿化沉积率; 松质骨

文章编号: 1673-9078(2016)6-13-17

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.003

Protective Effect of Sialoglycoproteins Isolated from *Carassius auratus* Eggs on Bone Loss in SAMP6 Mice

ZHAO Yan-lei, ZHAN Qi-ping, MA Qian-bin, WANG Yi-ming, WANG Jing-feng

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The protective effect of sialoglycoproteins from *Carassius auratus* eggs (Ca-SGP) on bone loss in the senescence accelerated mouse strain P6 (SAMP6) was examined. This animal model of senile osteoporosis was established using male SAMP6 mice, which were intragastrically administered with Ca-SGP daily for 150 days. Subsequently, the serum biochemical markers of bone metabolism, femoral mineral apposition rate (MAR), tibial bone mineral density (BMD), and tibial trabecular microstructure were measured. The results indicated that after Ca-SGP (500 mg/kg•bw) intervention, the activity of bone alkaline phosphatase, a bone formation marker, and the levels of carboxyl-terminal propeptide of procollagen type I and osteocalcin in serum were significantly increased ($p < 0.01$). Moreover, the activities of tartrate-resistant acid phosphatase, a marker of bone resorption, and cathepsin K were significantly inhibited ($p < 0.01$). Tibial BMD was increased by 10.92%, showing a significant difference ($p < 0.01$). The trabecular bone volume fraction, trabecular number, and trabecular thickness were pronouncedly increased ($p < 0.01$), and trabecular separation was significantly reduced ($p < 0.01$) upon Ca-SGP treatment. The bone MAR was increased by 98.87%, showing a significant difference ($p < 0.01$). These results demonstrated that Ca-SGP exhibited an ameliorative effect on the low bone turnover in aged male mice with osteoporosis, enhanced their BMD, and improved trabecular microstructure and bone mineralization, which may provide some theoretical basis for the development of anti-osteoporotic agents or functional foods.

Key words: sialoglycoproteins; *Carassius auratus*; bone metabolism; bone mineral density; trabecular microstructure; bone mineral apposition rate; trabecular bone

老年性骨质疏松症多发生于 65 岁以上的老年人, 是一种因低骨转换导致骨量减少, 骨质量受损, 骨强度降低, 骨脆性增加和骨折危险性升高的全身性骨代谢障碍疾病^[1]。第六次全国人口普查结果显示我国老

收稿日期: 2015-08-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31371816)

作者简介: 赵延蕾 (1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 王静凤 (1964-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品营养学

龄人口为 11883 万人, 占总人口比例的 8.87%, 并呈逐年上升的趋势^[2]。随着人口寿命的不断增长及老龄人口的持续增加, 老年性骨质疏松症严重影响老年人的生活质量和身体健康, 俨然已成为一个亟待解决的社会问题。

临床上治疗骨质疏松症的药物主要为骨吸收抑制剂、骨形成促进剂和骨矿物三大类^[3], 代表性药物有双膦酸盐、甲状旁腺激素、钙剂等。这些药物虽对骨质疏松症具有一定的治疗作用, 但价格昂贵, 且长

期服用易产生过敏反应、胃肠功能紊乱及肝肾功能受损等副作用,极大增加了骨质疏松症患者的经济负担和身体痛苦。鱼卵价格低廉,富含胚胎生长发育所需的全部营养物质,如糖蛋白、多不饱和脂肪酸、卵磷脂等。目前我国对鱼卵的加工利用仍处于初级阶段,大部分鱼卵作为鱼类加工的副产物用于生产鱼粉等低值产品,其利用价值极低,资源严重浪费;对鱼卵高值化利用也主要围绕于功能脂质的提取分析。有关鱼卵糖蛋白的功能活性研究甚少。课题组前期研究发现,鲫鱼卵唾液酸糖蛋白(Sialoglycoproteins of *Carassius auratus* eggs, Ca-SGP)可显著增强前成骨细胞 MC3T3-E1 成骨活性,有效改善去卵巢大鼠骨质疏松症^[4]。

SAMP6 小鼠具有低峰值骨量、低峰值骨密度及骨组织微结构破坏等病理特征,是研究老年性骨质疏松症的理想动物模型^[5]。因此,本文在前期研究的基础上,以 SAMP6 雄性小鼠为老年男性骨质疏松症动物模型,从骨代谢生化标志物、骨密度、骨微结构及骨矿化沉积率四方面探讨了 Ca-SGP 对老年男性骨质疏松症骨丢失的保护作用,以期为鱼卵的高值化利用提供科学依据,为抗骨质疏松药物的研发提供新方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料和动物

成熟鲜活雌性鲫鱼,购于青岛大连路水产品市场。

健康雄性 SAMR1 小鼠和 SAMP6 小鼠,5 月龄,体质量 34 ± 2 g, SPF 级,由天津中医药大学第一附属医院馈赠。动物实验室环境温度为 $22 \sim 24$ °C,相对湿度 52%~60%, 12 h: 12 h 明暗交替。

1.1.2 药品及试剂

阿仑膦酸钠片,购自石家庄石药集团欧意药业公司;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)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid, TRACP)、组织蛋白酶 K(cathepsin K, Cath-K)等 ELISA 试剂盒,购自美国 R&D 公司;盐酸四环素,购自北京索莱宝科技公司;钙黄绿素,购自东京化成工业株式会社;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器

GL-20M 型高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器公司); Model680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);

GK99-UNIGAMMA X-RAY PLUS 双能 X 射线骨密度仪(意大利 I'CAN 公司); SCANCO μ CT 80 型 Micro-CT 扫描仪(瑞士 Scanco Medical AG 公司); EXAKT 切磨系统(德国 EXAKT 公司); Leica DM2500 型荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Ca-SGP 的制备

参照 Xia^[4] 人方法提取 Ca-SGP,略有改动。新鲜鲫鱼卵除杂后,按料液比 1:3(m/V)加入 0.5 M NaCl,匀浆离心,上清液加入等体积的 90% 苯酚溶液,4 °C 搅拌过夜。离心后取上清液,经自来水透析 3 d、蒸馏水透析 1 d 后,冻干得粗蛋白。粗蛋白缓慢上样于 QFF 阴离子交换柱(缓冲液为 0.02 mol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液),以 0.1 M 的 NaCl-Tris-HCl 溶液进行线性洗脱,收集离子强度为 0.15 M~0.35 M 的洗脱组分,脱盐冻干后得到唾液酸糖蛋白,纯度为 92.5%。

1.2.2 动物分组及给药

SAMP6 小鼠适应性喂养 5 d 后,按体重随机分为模型对照组(M)、阳性对照组(Y)和鲫鱼卵唾液酸糖蛋白低(Ca-SGP-L)、高(Ca-SGP-H)剂量组,每组 8 只。另取 8 只 SAMR1 小鼠作为正常对照组(N)。其中, Ca-SGP 低、高剂量组小鼠分别灌胃 300、600 mg/kg bw 的 Ca-SGP,阳性对照组小鼠灌胃 1 mg/kg bw 的阿仑膦酸钠,模型对照组和正常对照组小鼠灌胃等剂量的生理盐水。灌胃体积 10 ml/kg bw, 1 次/d,连续 150 d。实验期间,小鼠自由饮水进食。

1.2.3 血清骨代谢生化标志物的检测

末次给药后,所有小鼠禁食不禁水 12 h,摘眼球取血,血液于室温中静置 30 min 后,4500 r/min 离心 15 min,分离血清,按 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠血清中 BALP、TRACP、Cath-K 的活性及 OCN、PICP 的含量。

1.2.4 胫骨骨密度测定

小鼠末次给药处死后,迅速剥离小鼠胫骨,仔细剔除骨上附着的肌肉和结缔组织,注意避免对骨表面造成损伤。将骨组织样本置于测试台上,采用双能 X 射线骨密度仪按小动物模式对骨组织样本进行扫描。扫描完成后使用仪器配套软件对小鼠胫骨骨密度(Bone Mineral Density, BMD)进行测定。

1.2.5 胫骨 Micro-CT 扫描分析

小鼠末次给药后处死,仔细分离小鼠胫骨,剔除软组织,截取胫骨近心端,置于 10% 中性甲醛固定后保存于 75% 乙醇。使用 Micro-CT 扫描仪对样本进行扫描。扫描参数如下:电压 70 kV,电流 114 μ A,扫

描分辨率 10 μm 。选取骨骺线下 1 mm 区域为感兴趣区, 并使用配套软件测量感兴趣区松质骨骨体积分数 (Bone Volume Fraction, BV/TV), 骨小梁数目 (Trabecular Number, Tb.N), 骨小梁厚度 (Trabecular Thickness, Tb.Th) 及骨小梁间隙 (Trabecular Separation, Tb.Sp)。

1.2.6 股骨骨矿化沉积率测定

每组选取 3 只小鼠于实验结束前第 14、13 d 腹腔注射 20 mg/kg bw 的盐酸四环素, 实验结束前第 4、3 天腹腔注射 5 mg/kg bw 的钙黄绿素。小鼠末次给药后处死, 迅速剥离小鼠股骨, 剔除其上附着的软组织, 取股骨远心端固定于 10% 中性甲醛, 经系列乙醇脱水、甲基丙烯酸甲酯包埋后, 使用 EXAKT 切磨系统制作 40 μm 不脱钙骨切片, 荧光显微镜下观察, 使用 Image J 软件测量黄绿荧光光线之间的平均距离, 与两次注射的间隔时间相除得骨矿化沉积率 (Mineral Apposition Rate, MAR)。

1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析, 并按 LSD 法两两比较, 结果表示为 $\bar{x} \pm s$, 以 $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 Ca-SGP 对 SAMP6 小鼠血清骨代谢生化

标志物和低骨转换的影响

血清中的骨代谢生化标志物包括反映成骨细胞活性的骨形成标志物和反映破骨细胞活性的骨吸收标志物, 二者可分别准确反映动物体骨生成和骨吸收的状

态, 是检测受试物疗效的重要参考指标。骨重建包括骨吸收和骨形成两个阶段^[6], 衰老导致的骨生成功能减弱和骨吸收亢进是老年性骨质疏松症的主要发病机理。BALP 是成骨细胞分泌的胞外酶, 其半衰期长, 稳定性好, 是反映成骨细胞活性的特异性指标。I 型胶原是构成骨基质的主要成分, 与骨组织的微观结构和生物性能密切相关。而 PICP 是成骨细胞合成 I 型胶原时的中间产物, 血循环中 PICP 的含量可反映成骨细胞的活性和 I 型胶原的合成速率^[7]。OCN 是由成熟成骨细胞分泌的一种特异性蛋白, 是骨组织中非胶原蛋白的主要成分, Yang^[8]等认为血清 OCN 含量可作为评估骨转换率及骨生成的特异性指标。骨吸收标志物 TRACP 和 Cath-K 是破骨细胞介导骨吸收过程中的关键酶, 其活性与破骨细胞的功能密切相关。其中, TRACP 参与骨基质中钙磷矿化物的降解^[9], Cath-K 则在降解 I 型胶原的过程中发挥重要作用^[10]。结果如表 1 所示, 与正常对照组相比, 模型对照组小鼠血清中 BALP 活性和 PICP、OCN 含量显著下降 ($p < 0.01$), TRACP 和 Cath-K 活性显著升高 ($p < 0.01$), 说明模型组小鼠骨生成减慢, 骨吸收亢进, 骨代谢平衡被打破。而通过 Ca-SGP 的干预则使小鼠血清中骨生成标志物 BALP、PICP 和 OCN 水平得到了不同程度的升高, 其中以高剂量的 Ca-SGP 升高效果更为显著 ($p < 0.01$), 三者分别升高了 24.52%, 18.97%, 28.29%; 与此同时, 小鼠血清中骨吸收标志物 TRACP 和 Cath-K 活性均得到显著抑制 ($p < 0.01$), 较模型对照组小鼠相比平均降低了 17.22%、19.56%。综合 Ca-SGP 对小鼠血清中 BALP、TRACP、Cath-K 活性及 PICP、OCN 含量的影响, 提示 Ca-SGP 可通过提高 SAMP6 小鼠骨生成、抑制骨吸收, 进而改善因衰老引起的低骨转换, 从而维持 SAMP6 小鼠骨代谢平衡。

表 1 Ca-SGP 对小鼠血清中骨代谢生化标志物的影响 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Ca-SGP on the bone metabolic indexes in serum

Group	BALP /(ng/mL)	PICP /(ng/mL)	OCN /(ng/mL)	TRACP /(U/L)	Cath-K /(U/L)
N	5.20 \pm 0.39	11.61 \pm 0.73	49.58 \pm 4.65	17.68 \pm 1.72	79.61 \pm 5.90
M	4.13 \pm 0.12 ^{##}	8.99 \pm 0.73 ^{##}	33.02 \pm 2.83 ^{##}	25.98 \pm 1.86 ^{##}	110.50 \pm 7.89 ^{##}
Y	4.80 \pm 0.34 ^{**}	10.41 \pm 0.91 ^{**}	38.14 \pm 2.03 [*]	20.09 \pm 0.99 ^{**}	92.15 \pm 6.17 ^{**}
Ca-SGP-L	4.66 \pm 0.33 ^{**}	9.55 \pm 0.83	37.47 \pm 4.87 [*]	22.13 \pm 1.98 ^{**}	89.88 \pm 10.16 ^{**}
Ca-SGP-H	5.15 \pm 0.49 ^{**}	10.70 \pm 0.60 ^{**}	46.05 \pm 4.62 ^{**}	20.89 \pm 1.64 ^{**}	87.89 \pm 5.83 ^{**}

注: ^{##} $p < 0.01$, 与正常对照组比较; ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, 与模型对照组比较。

2.2 Ca-SGP 对 SAMP6 小鼠骨密度的影响

BMD 是指骨单位面积或体积内的矿物质含量, 是临床上诊断骨质疏松症的金标准, 该指标对于预测

骨质疏松症骨折发生的危险性评价受试物治疗疗效具有十分重要的意义。骨矿物含量减少即骨密度下降是骨质疏松症的主要病理表现。结果见图 1, 较正常对照组, 模型对照组小鼠胫骨 BMD 降低了 15.58%,

差异显著 ($p<0.01$)。小鼠经 *Ca*-SGP 干预后, 胫骨 BMD 得到明显升高, 与模型对照组小鼠相比, *Ca*-SGP 低、高剂量组小鼠的胫骨 BMD 分别升高了 6.14% ($p<0.01$), 10.92% ($p<0.01$)。结合结果 2.1, 提示 *Ca*-SGP 可通过促进 SAMP6 小鼠骨生成、抑制骨吸收改善因衰老引起的骨丢失, 从而提高单位骨组织面积中的矿物质含量。

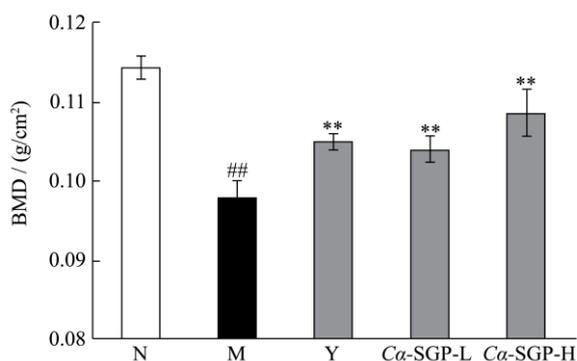


图1 *Ca*-SGP 对 SAMP6 小鼠胫骨骨密度的影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Fig.1 Effects of *Ca*-SGP on the tibial bone mineral density in SAMP6 mice

注: ## $p<0.01$, 与正常对照组比较; ** $p<0.01$, 与模型对照组比较。

2.3 *Ca*-SGP 对 SAMP6 小鼠松质骨微结构的影响

骨量减少及骨组织微结构退化是老年性骨质疏松症的主要特征, 也是导致老年人骨密度下降的主要原因。Micro-CT 通过对骨骼的高分辨率 X 线成像获取精密的三维图像, 并对其体积、结构等进行定量分析, 是目前实验室研究骨微结构的常用方法^[11]。松质骨由骨小梁相互连接构成, 多分布于骨骺端, 是骨重建的主要场所, 也是骨丢失的主要区域。本研究采用 Micro-CT 对小鼠胫骨近心端松质骨进行组织形态计量学测定, 通过直观地观察骨组织的微结构变化评价 *Ca*-SGP 对 SAMP6 小鼠骨的作用效果。结果如表 2 所示, 与正常对照组小鼠相比, 模型对照组小鼠松质骨出现严重的骨量丢失和结构退变, 具体表现为 BV/TV 显著减少 ($p<0.01$), Tb.N 显著降低 ($p<0.01$), Tb.Th 显著减少 ($p<0.01$), Tb.Sp 显著增大 ($p<0.01$)。Chen^[12]等人的研究发现, 与同月龄的 SAMR1 小鼠相比, 5 月龄和 12 月龄的 SAMP6 小鼠松质骨的 BMD 和 BV/TV 均显著降低, 并怀疑与其 Tb.Th、Tb.N 显著减少, Tb.Sp 显著增大密切相关。本试验中, 低高剂量的 *Ca*-SGP 均能通过增加 SAMP6 小鼠松质骨的骨小梁数目, 增强骨小梁厚度, 减小骨小梁间隙, 改善骨小梁微结构, 提高骨体积分数, 其中高剂量的 *Ca*-SGP 作用更为显著。结合结果 2.2, 说明 *Ca*-SGP 可抑制小鼠因衰老引起的骨丢失及骨微结构破坏, 进而提高 SAMP6 小鼠骨密度。

表 2 *Ca*-SGP 对 SAMP6 小鼠胫骨松质骨微结构的影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of *Ca*-SGP on the tibial trabecular microstructure in SAMP6 mice

Group	BV/TV	Tb.N /mm	Tb.Th /mm	Tb.Sp /mm
N	0.079 ± 0.011	4.28 ± 0.35	0.070 ± 0.006	0.23 ± 0.019
M	0.044 ± 0.005 ^{##}	1.65 ± 0.13 ^{##}	0.037 ± 0.002 ^{##}	0.61 ± 0.078 ^{##}
Y	0.053 ± 0.006	2.78 ± 0.31 ^{**}	0.037 ± 0.004	0.36 ± 0.027 ^{**}
<i>Ca</i> -SGP-L	0.057 ± 0.004 [*]	2.72 ± 0.30 ^{**}	0.039 ± 0.004	0.37 ± 0.031 ^{**}
<i>Ca</i> -SGP-H	0.063 ± 0.005 ^{**}	3.21 ± 0.26 ^{**}	0.041 ± 0.002 [*]	0.31 ± 0.021 ^{**}

注: ## $p<0.01$, 与正常对照组比较; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, 与模型对照组比较。

2.4 *Ca*-SGP 对 SAMP6 小鼠新骨形成和矿化沉积率的影响

盐酸四环素和钙黄绿素能与钙整合并在骨表面形成荧光标记, 因此通过活体注射盐酸四环素、钙黄绿素, 可直观地观察两次注射期间的新骨形成情况。由图 2 (a) 知, 模型对照组小鼠新骨生成减慢, 灌胃 *Ca*-SGP 后, 小鼠新骨生成明显活跃。骨矿化是指钙、磷等无机盐在一定条件下以羟基磷灰石的形式沉积到

类骨质中形成正常骨质的过程, 故骨矿化沉积率是反映骨重建阶段成骨细胞矿化类骨质活跃程度的重要指标^[13]。由图 2 (b) 知, 模型对照组小鼠骨矿化沉积率显著低于正常对照组小鼠 ($p<0.01$), 经 *Ca*-SGP 灌胃后, *Ca*-SGP 低高剂量组小鼠骨矿化沉积率均显著升高 ($p<0.01$), 较模型对照组小鼠相比平均升高了 78.12%。Masroui^[14]认为 BALP 可通过水解多种磷酸脂为羟磷灰石的沉积提供磷酸, 进而促进骨矿化, 结果 2.1 中 *Ca*-SGP 的干预显著提高了 SAMP6 小鼠血清中 BALP 的活性, 推测 *Ca*-SGP 促进小鼠骨矿化沉积

可能与其提高 BALP 活性有关。综合图 2 (a)、(b), 提示 *Ca*-SGP 可诱导新骨形成, 促进骨矿化。

骨组织形态计量学是一种能够直观地观察骨组织结构变化的体视学技术, 该技术可从静态和动态两个方面反映骨新陈代谢过程中的组织学改变并对其做出定量评价。本实验通过对 SAMP6 小鼠骨组织动态参数 MAR 的测定, 解释了其骨组织静态参数 BV/TV、Tb.N、Tb.Th 及 Tb.Sp 变化的原因, 进一步从骨组织结构方面证明了 *Ca*-SGP 对 SAMP6 小鼠骨丢失的保护作用。

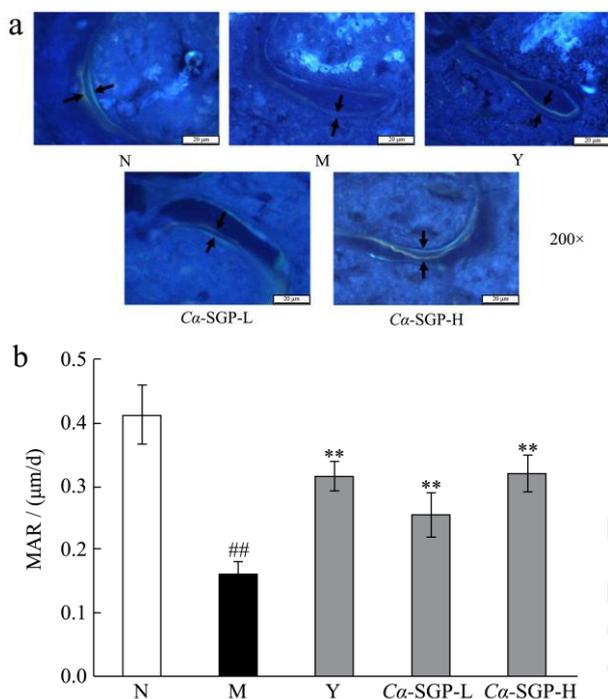


图2 *Ca*-SGP 对 SAMP6 小鼠新骨形成 (a) 和矿化沉积率 (b) 的影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Fig.2 Effect of *Ca*-SGP on new bone formation (a) and MAR (b) in SAMP6 mice

注: ## $p<0.01$, 与正常对照组比较; ** $p<0.01$, 与模型对照组比较。

3 结论

本文以 SAMP6 雄性小鼠为老年男性骨质疏松症动物模型, 研究了 *Ca*-SGP 对老年男性骨质疏松症骨丢失的保护作用。结果表明, *Ca*-SGP 通过升高血清中 BALP 活性和 PICP、OCN 含量, 抑制血清中 TRACP 和 Cath-K 活性, 提高了 SAMP6 小鼠因衰老引起的低骨转换, 进而促进了骨矿化沉积, 改善了松质骨微结构, 增强了骨密度, 从而有效抑制了骨丢失。综上所述, *Ca*-SGP 可显著改善老年男性骨质疏松症, 这为鱼卵的深加工利用提供了新方向, 但其作用机制还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 张智海,刘忠厚,李娜,等.中国人骨质疏松症诊断标准专家共识(第三稿 2014 版)[J].中国骨质疏松杂志, 2014, 20(9): 1007-1010
ZHANG Zhi-hai, LIU Zhong-hou, LI Na, et al. Expert consensus on the diagnosis of osteoporosis in Chinese Population [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2014, 20(9): 1007-1010
- [2] 郑志国.我国人口老龄化态势和应对方略-基于全国六次人口普查的分析[J].管理科学,2011,24(05):66-70
ZHENG Zhi-guo. Trend of aging of population and coping strategy-based on the analysis of sixth national census [J]. Journal of Management, 2011, 24(05): 66-70
- [3] 汪呈,曹宇,顾永清,等.骨质疏松治疗药物的研究进展[J].科学通报,2014,59(13):1209-1214
WANG Cheng, CAO Yu, GU Yong-qing, et al. Research progress of drugs for osteoporosis treatment [J]. Chinese Science Bulletin, 2014, 59(13): 1209-1214
- [4] Xia G, Wang S, He M, et al. Anti-osteoporotic activity of sialoglycoproteins isolated from the eggs of *Carassius auratus* by promoting osteogenesis and increasing OPG/RANKL ratio [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 15: 137-150
- [5] 张玉凤,吴小红,辜向东,等.老年性骨质疏松模型小鼠的颅骨增龄性变化[J].动物医学进展,2015,36(04):73-78
ZHANG Yu-feng, WU Xiao-hong, GU Xiang-dong, et al. Age-related changes of calvarial bone in senile osteoporotic mouse model [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(04): 73-78
- [6] Zhao H, Ito Y, Chappel J, et al. Synaptotagmin VII regulates bone remodeling by modulating osteoclast and osteoblast secretion [J]. Developmental cell, 2008, 14(6): 914-925
- [7] 王姗姗,周晓春,李秀秀,等.鲫鱼卵唾液酸糖蛋白对去卵巢大鼠骨质疏松症的改善作用[J].食品科学,2014, 35(13): 182-185
WANG Shan-shan, ZHOU Xiao-chun, LI Xiu-xiu, et al. Improvement effect of sialoglycoprotein from crucian carp(*carassius auratus*) spawn in ovariectomized female rats with osteoporosis [J]. Food Science, 2014, 35(13): 182-185
- [8] Yang L C, Lu T J, Lin W C. The prebiotic arabinogalactan of *Anoectochilus formosanus* prevents ovariectomy-induced osteoporosis in mice [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(4): 1642-1653
- [9] Yao N S, Wu Y Y, Janckila A J, et al. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP5b) activity as a biomarker for

- bone metastasis in non-small cell lung cancer patients [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2011, 412(1-2): 181-185
- [10] Zhuo Y, Gauthier J Y, Black W C, et al. Inhibition of bone resorption by the cathepsin K inhibitor odanacatib is fully reversible [J]. *Bone*, 2014, 67: 269-280
- [11] Hsu J T, Wang S P, Huang H L, et al. The assessment of trabecular bone parameters and cortical bone strength: A comparison of micro-CT and dental cone-beam CT [J]. *Journal of Biomechanics*, 2013, 46(15): 2611-2618
- [12] Chen H, Zhou X, Emura S, et al. Site-specific bone loss in senescence-accelerated mouse (SAMP6): A murine model for senile osteoporosis [J]. *Experimental gerontology*, 2009, 44(12): 792-798
- [13] Kushwaha P, Khedgikar V, Gautam J, et al. A novel therapeutic approach with Caviunin-based isoflavonoid that en routes bone marrow cells to bone formation via BMP2/Wnt- β -catenin signaling [J]. *Cell Death & Disease*, 2014, 5(9): e1422
- [14] Roudsari J M, Mahjoub S. Quantification and comparison of bone-specific alkaline phosphatase with two methods in normal and paget's specimens [J]. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 2012, 3(3): 478-483