

牛骨胶原蛋白肽促进 HOB 增殖

刘俊丽² 宋淑军² 司少艳² 徐冰心² 秦亚亚²

张兵¹ 马铭¹ 卢伟鹏¹ 王毅虎¹ 冯凯² 郭燕川^{1*}

(1. 中国科学院理化技术研究所, 光化学转换与功能材料重点实验室, 北京 100190;

2. 解放军第306医院病理实验科, 北京 100101)

中图分类号: R855.22 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013)07-0703-05

摘要: 目的 研究牛骨胶原蛋白肽(Bovine Collagen peptides, BCP)对人成骨细胞(Human Osteoblast, HOB)增殖的影响。方法 分离培养HOB, 茜素红染色鉴定HOB的成骨特性, 利用MTT实验检测胶原蛋白肽对HOB的增殖, 流式细胞仪测定胶原蛋白肽对HOB细胞周期。结果 茜素红矿化染色结果表明, HOB具有成骨能力。MTT实验表明0.3 mg/ml胶原蛋白肽能显著促进细胞的增殖, 并能增加G2 + S期的百分含量。结论 牛骨胶原蛋白肽能够促进HOB增殖, 为骨质疏松的预防和治疗提供理论依据。

关键词: 胶原蛋白肽; 人成骨细胞; 增殖

Bovine collagen peptides promotes proliferation of human osteoblasts

LIU Junli², SONG Shujun², SI Shaoyan², XU Bingxin², QIN Yaya², ZHANG Bing¹,

MA Ming¹, LU Weipeng¹, WANG Yihu¹, FENG Kai², GUO Yanchuan¹

(1. Key Laboratory of Photochemical Conversion and Optoelectronic Materials,

Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Science, Beijing 100190;

2. Department of Pathology and Experimental Medicine, the 306th Hospital of PLA, Beijing 100101, China)

Corresponding author: GUO Yanchuan, Email: YanchuanGuo@mail.ipc.ac.cn

Abstract: **Objective** To investigate the effect of bovine collagen peptides (BCP) on the proliferation of human osteoblasts (HOB). **Methods** HOBs were isolated and cultured. The osteogenesis of HOB was identified using Alizarin red staining. The effect of BCP on proliferation of the cells was detected using MTT method. The effect of BCP on cell cycle of HOB was examined using flow cytometry. **Results** Alizarin red staining showed that HOB had osteogenic ability. The results of MTT showed that 0.3 mg/ml BCP could significantly promote HOB proliferation. And the results of flow cytometry showed that 0.3 mg/ml BCP could increase the percentage of G2 + S phase. **Conclusion** Bovine collagen peptide can promote HOB proliferation, which may provide a theoretical basis for the prevention and the treatment of osteoporosis.

Key words: Bovine collagen peptides; HOB; Proliferation

随着世界人口日趋老龄化, 骨质疏松的发病率愈来愈高, 对中老年人的身体健康构成严重威胁^[1]。目前治疗骨质疏松症的药物根据其作用机制可分为三大类: 抑制骨吸收药物, 促进骨形成药物和骨健康基本补充剂。作为骨健康基本补充剂, 胶原蛋白肽被发现在骨质疏松症的预防和治疗中发挥作用^[2], 它是以骨明胶为原料, 应用酶解工

艺, 通过控制反应条件制备骨胶原蛋白产品, 该产品早已被用于医药和食品, 一般被监管机构公认为安全食品^[3]。据文献报道, 口服胶原蛋白肽化合物已被证明吸收循环后能够在软骨积累, 该机制可能有助于饱受关节疾病折磨的关节病患者^[4]。然而, 胶原蛋白肽预防和治疗骨质疏松症的机理目前尚未有文献报道。因此本实验将研究胶原蛋白肽对人成骨细胞(Human osteoblast, HOB)增殖的影响, 初步探究牛骨胶原蛋白肽的促骨活性机理, 为骨质疏松的预防和治疗提供理论依据。

基金项目: 中国科学院理化技术研究所-东宝生物合作课题(编号: DBSW2013-01), 总装后勤部课题资助项目

* 通讯作者: 郭燕川, Email: YanchuanGuo@mail.ipc.ac.cn

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

小鼠前成骨细胞系 MC3T3 为美国 ATCC 公司产品,本室保存。DMEM 培养基和优质胎牛血清购自 Gibco 公司,地塞米松、 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸磷酸盐,二甲基亚砜(Dimethylsulphoxide,DMSO),胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司,MTT 购自美国 Genview 公司,青霉素、链霉素购自华北制药公司,其他试剂均为市售分析纯,胶原蛋白肽由包头东宝生物技术股份有限公司提供。

本实验所用仪器为 HERAcell150 型 CO₂ 细胞培养箱(贺力氏公司,德国),IMT-2 型倒置显微镜(奥林巴斯公司,日本),550 型酶联免疫检测仪(BIO-RAD 公司,美国);耗材为培养皿,96 孔培养板(Constar 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 HOB 分离与培养: HOB (Human Bone, HOB)来源于 1 例患者骨髓嵴废用骨(男,23 岁),经病人知情同意后实施。具体步骤参照文献^[5]进行,简述如下:标本简单用 PBS 冲洗,然后切成小块(直径 1~2 mm),然后用 PBS 彻底清洗后,加入 2 ml 含粗胶原酶的 DMEM 培养基在 37℃ 轻轻摇动 2 h,然后用 PBS 冲洗。骨头碎片和分离的细胞分别培养在含有 15 mmol/L Hepes, pH 7.4 和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,第一次更换培养液的前 4 天不做任何处理,然后每星期更换一次培养液,当原代培养的细胞融合后,用胰蛋白酶/EDTA 进行消化,传代,冻存。

1.2.2 细胞的常规培养:取冻存的 HOB, MC3T3 进行复苏,用含 100 ml/L 胎牛血清和 100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 DMEM 在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件的恒温培养箱内培养,根据生长情况定期传代,采用第 3~5 次传代后 24 h 的细胞进行实验。

1.2.3 茜素红染色鉴定 HOB:为测量细胞外基质钙沉积形成骨结节,细胞基质用能够结合 Ca 的茜素红染料染色,茜素红染色形成的红色是矿化的指示^[1]。HOB 在 6 孔板中接种密度为 8×10^4 /孔,细胞用成骨诱导剂(50 μ g/ml 抗坏血酸磷酸盐, 10 mM β -甘油磷酸钠, 10 nmol/L 地塞米松)诱导,每 3d 换液 1 次,21d 天后吸去培养液, PBS 洗两次,然后用 4% 多聚甲醛 4℃ 固定 30 min,用去离子水冲洗。细胞用 40 mmol/L 茜素红溶液(pH 值 4.4)染

色 40 min,在室温下,用去离子水冲洗两次,染色细胞的图像被数码相机(IM50, Leica, Germany)捕获。

1.2.4 MTT 法检测胶原蛋白肽对 HOB 增殖:为了明确胶原蛋白肽(CollagolProtein, CP)化合物对成骨细胞增殖的适宜的效应浓度,分别将 CP 配制成适宜的浓度,并设空白(Control, CN)对照,将第 3 次传代的 HOB 分为 4 组,空白对照组(Blank 组)仅加入含 PBS 的 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,将传代细胞按每孔 4000 个/100 μ L 分别接种于 3 个 96 孔细胞培养板中,按上述分组方案分组,每组设 6 个复孔。24 h 细胞贴壁后换液,分别加入上述相应药物置于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件恒温培养箱内培养。培养结束后,分别在所需检测的培养孔内每孔加入 20 μ L 浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液, 37℃ 继续孵育 4 h, 终止培养,小心吸取孔内培养上清液,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min。选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值。

1.2.5 流式细胞仪测定 HOB 细胞周期:为了明确牛骨胶原蛋白肽对 HOB 细胞周期的影响,分别将牛骨胶原蛋白肽配制成 0.3 mg/ml 的浓度,并设空白(Control, CN)对照,将 HOB 传代细胞以 3.0×10^4 个/孔细胞密度接种于六孔板,将 0.3 mg/ml 的牛骨胶原蛋白肽,空白对照分别作用于 HOB,并置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养 3 d、4 d 和 5 d,培养结束后,各组细胞用 0.25% 胰酶消化制成单细胞悬液, 70% 乙醇固定于 -20℃ 24 h, PBS 清洗后, 1000 rpm 离心 5 min, 加入 1 mg/ml RNaseA 于 37℃ 处理 30 min 后离心, 加入 10 mg/ml 碘化丙啶 0.15 ml 染色 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。各组细胞用 0.25% 胰酶消化制成单细胞悬液, 70% 乙醇固定于 -20℃ 24 h, PBS 清洗后, 1000 rpm 离心 5 min, 加入 1 mg/ml RNaseA 于 37℃ 处理 30 min 后离心, 加入 10 mg/ml 碘化丙啶 0.15 ml 染色 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.6 统计分析处理:统计分析参照《SPSS16.0 统计方法》,利用 SPSS 软件包进行两组独立样本的 *t* 检验,并对多于 3 组以上的样本进行每一个时间段的单因素方差分析。其基本过程如下:在选入因变量和分类变量后,首先分析所分析数据是否服从正态分布,并满足方差齐性要求,如果满足则运行程序对各处理数据间的差异是否显著进行判定,并利用“S-N-K”和“LSD”进一步作组间的两两多重比较, *P* < 0.05 认为具有显著性差异。

2 结果

2.1 HOB 培养与鉴定

当原代培养的细胞融合后,用胰蛋白酶/EDTA 进行消化,细胞呈长梭形,生长密,胞体丰满,细胞呈现极性排列。因为 MC3T3 具有成骨能力,茜素红矿化染色后能够形成红色。为鉴定 HOB 成骨能力,本实验将 MC3T3 作为参照,HOB 经成骨诱导剂诱导 21 d 天,茜素红染色结果表明 HOB 能够形成红色,但形态与 MC3T3 不同:MC3T3 为橘红色,细胞长满后易卷起脱落,HOB 呈深红色,贴壁能力较强(图 1),表明 HOB 具有成骨能力。

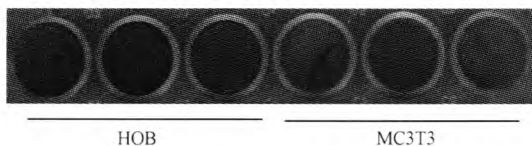


图 1 茜素红矿化染色鉴定 HOB

Fig. 1 Identification of HOB using alizarin red staining

2.2 胶原蛋白肽对 HOB 增殖的效应

为了进一步明确胶原蛋白肽对 HOB 增殖的最佳效应,分别将胶原蛋白肽配制成 0.3, 3 mg/ml 的浓度,并设空白(Control, CN)对照,将传代细胞按每孔 3000 个/100 μ l 分别接种于 96 孔细胞培养板中,培养 3 d, 5 d, 7 d, 倒置显微镜 $\times 100$ 下观察:0.3 mg/ml 胶原蛋白肽组 HOB 为长梭形,生长密,胞体丰满,胞突细长,伸展充分,胞浆均匀,核圆形或卵圆形,细胞呈现极性排列;对照组细胞生长密度较稀,细胞伸展状态没有明显差别,3 mg/ml 的胶原蛋白肽组细胞生长较对照组稀,胞突变短,伸展不够充分,细胞极性排列不明显。

MTT 检测结果发现,5 d, 7 d 后,与空白对照组相比,0.3 mg/ml 的胶原蛋白肽能显著促进细胞的增殖活动($P < 0.05$),而 3 mg/ml 的胶原蛋白肽对细胞的增殖表现出一定的抑制效应(图 2),表明 0.3 mg/ml 胶原蛋白肽对细胞的增殖具有最佳效应。

2.3 流式细胞仪检测胶原蛋白肽对 HOB 细胞周期的效应

MTT 结果表明,0.3 mg/ml 的胶原蛋白肽对 HOB 的增殖具有显著促进作用,因此,在检测细胞周期时,将 0.3 mg/ml 的胶原蛋白肽分别作用于 HOB 3 d, 4 d, 5 d, 统计分析结果表明,与 CN 组相

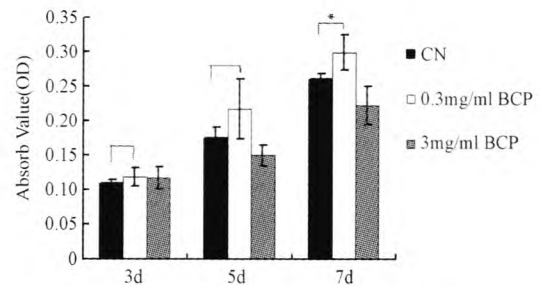


图 2 牛骨胶原蛋白肽对 HOB 增殖的影响

Fig. 2 The effect of BCP on the proliferation of HOB

BCP: 牛骨胶原蛋白肽 CN: 对照

BCP: Bovine Collagen Peptides CN: Control ** : $P < 0.01$ vs CN

比,CP 组 G1 期比例显著减少,G2 + S 期比例显著增加($P < 0.01$)(图 3, 4),进一步说明 CP 对 MC3T3-E1 具有显著促进作用,表明胶原蛋白肽通过促进 G2 + S 期的百分含量而促进细胞的增殖。

3 讨论

我国骨关节疾病患者总数已超过 1.5 亿人,是骨关节疾病的“超级大国”。而且目前,我国老龄化的形式将日益严峻。一些研究表明,每日摄入胶原蛋白肽可增加骨密度^[7]。由于胶原肽是胶原或明胶经蛋白酶降解处理后制成的,具有较高的消化吸收性,胶原蛋白富含人体需要的甘氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸等氨基酸。有关胶原蛋白肽功能方面的报道,有四项报告认为胶原蛋白肽是有益的,没有副作用,但研究并不广泛,存在一定的局限性,建议进一步增加对照研究^[8-10]。一项研究发现,口服胶原蛋白肽能够改善少数患者的症状,但具有恶心等副作用^[11]。另一项研究报道类风湿关节炎患者的疾病症状没有改善^[12],胶原蛋白肽有益的作用可能是由于在软骨积累并刺激软骨细胞产生胶原蛋白^[13]。上述结果启示我们:服用胶原蛋白肽可能对骨关节疾病患者有益,但具有一定的选择性,即使能够改善少数患者的症状,但并未阐明其作用机制,因此胶原蛋白肽能否促进 HOB 的增殖是本文研究的关键所在。

小鼠前成骨细胞系 MC3T3 虽然具有成骨能力,但并不能真实反映人成骨细胞的功能效应。因此,本研究选取 23 岁男性患者的骨骼畸形用骨分离培养人成骨细胞,由于人成骨细胞包绕在硬组织中,致使处理困难,用骨组织块法、酶消化法、骨膜组织块法、骨髓培养法以及薄层骨片经 EDTA 法处理并经胶原酶消化,均可分离培养成骨细胞。本研究采用

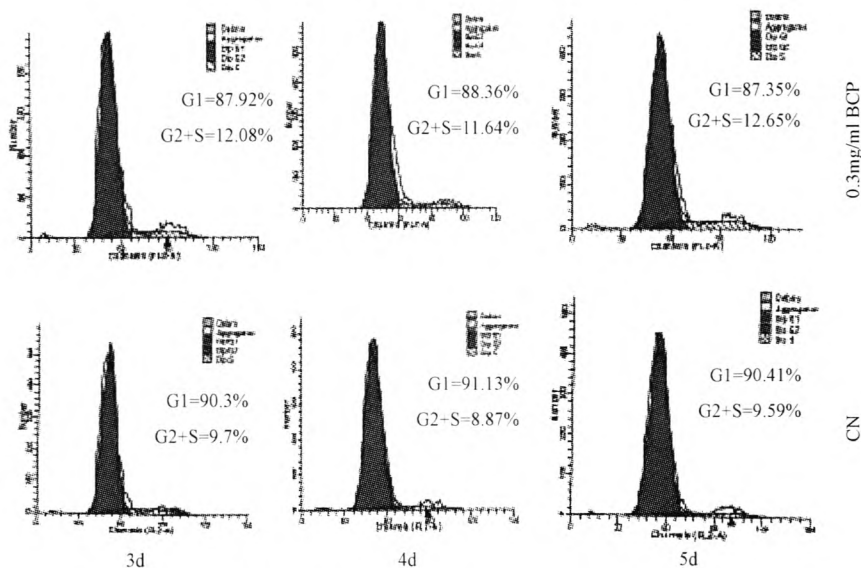


图3 流式细胞仪检测 HOB 细胞周期

Fig.3 Cell cycle analysis of HOB using flow cytometry

BCP: 牛骨胶原蛋白肽 CN:对照

BCP: Bovine Collagen Peptides CN: Control

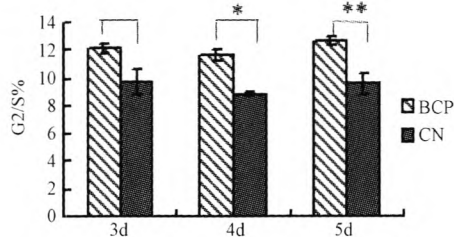


图4 牛骨胶原蛋白肽改变 HOB 细胞周期时相分布

Fig.4 Alteration of Cell Cycle Distribution of HOB by BCP Treatment

BCP: 牛骨胶原蛋白肽

CN:对照 * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ vs CN

BCP: Bovine Collagen Peptides CN: Control

上述四种方法,对 HOB 分别进行培养,发现骨组织块法分离培养 HOB 简单,易行,细胞不易污染,操作比较方便。成骨细胞在体外培养时加入成骨诱导剂能够形成矿化的细胞外基质,一般在培养 10d 时即可出现。本研究选用 MC3T3 作为对照,利用茜素红矿化染色鉴定 HOB 的成骨特性,发现 HOB 茜素红矿化染色着色深红,具有较强的成骨能力,可用于细胞增殖研究,能够比较客观地胶原蛋白肽对人体成骨细胞的效应。

据文献报道,每天摄入 10 g 药物级的胶原蛋白肽可减少膝关节或髌关节等骨关节炎患者的疼痛,血液中的羟脯氨酸含量增加^[14]。本实验以此剂量为基础,选择一系列不同的胶原蛋白肽浓度,在不同

的作用时间内筛选胶原蛋白肽促进 HOB 细胞增殖的最佳效应浓度,随着培养时间的延长,胶原蛋白肽对 HOB 的增殖具有促进作用,进一步研究表明 0.3 mg/ml 的胶原蛋白肽是促进细胞增殖的最佳效应浓度。

本研究进一步用流式细胞仪检测胶原蛋白肽对 HOB 细胞周期的效应,表明胶原蛋白肽通过促进 G2 + S 期的百分含量而促进细胞的增殖,这为胶原蛋白肽作为骨健康基本补充剂,用于骨质疏松的预防和治疗提供了理论依据。在后续的研究中,我们将进一步明确胶原蛋白肽对 HOB 的分化效应,以及对去卵巢大鼠骨质疏松的预防及治疗效果,从整体水平评价胶原蛋白肽对骨质疏松的预防及治疗的机理。

【参 考 文 献】

- [1] Zhongzhou Liu. bone mineral and clinic practise. Beijing: China Science and technology, 2006.
- [2] Adam M, Spacek P, Hulejová H, et al. Postmenopausal osteoporosis. Treatment with calcitonin and a diet rich in collagen proteins. Cas Lek Cesk. 1996, 135(3):74-78.
- [3] Moskowitz RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. Semin Arthritis Rheum. 2000, 30(2):87-99.
- [4] Bello AE, Oesser S. Collagen hydrolysate for the treatment of osteoarthritis and other joint disorders: a review of the literature. Curr Med Res Opin. 2006, 22(11):2221-2232.

(下转第 717 页)

- 433.
- [6] Sosa M, Dominguez M, Navarro MC, et al. Bone mineral metabolism is normal in non-sulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*, 1996, 10: 201-205.
- [7] He Yong, Shao Yibo, Liu Shuqin. Salmon calcitonin on postmenopausal osteoporosis and bone metabolism indexes related to. *Journal of Anhui medical university*, 2002, 37(6): 468-70.
- [8] Lin Chunyi. Salmon calcitonin treatment of postmenopausal osteoporosis in 200 cases analysis. *Journal of Practical Orthopaedics*, 2006, 12(6): 551-553.
- [9] Campion JM, Maricic MJ. Osteoporosis in men. *Am Fam Physician*, 2003, 67(7): 1521-1526.
- [10] Civitelli R, Connelly S, Zaccari F, et al. Bone turnover in postmenopausal osteoporosis. Effect of calcitonin treatment. *J Clin Invest*, 1988, 82: 1268-1274.
- [11] Siwerman SL, Azria N, Badras L, et al. The analgesic role of calcitonin following osteoporotic fracture. *Osteoporos Int*, 2002, 13(11): 858.
- [12] Zhang Quan, Huang Huangyuan. Calcitonin treatment of osteoporotic short-term curative effect assessment of pain. *J Shanghai Med Univ*, 2000, 27: 75-76.
- [13] Kraenzlin EM, Seibel MJ. Measurement of biochemical markers of bone resorption. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP, editors. *Dynamics of bone and cartilage metabolism*, San Diego: Academic Press, 1999, 411-416.
- [14] Delmas PD, Eastell B, Granero P, et al. The use of biochemical markers of bone turnover in Osteoporosis Int, 2000, Suppl 6: S2-S17.
- [15] Hughes FS, Buttery Lee DK, Ifillanent MVJ, et al. Cytokine induced prostaglandin E2 synthesis and cyclooxygenase activity are regulated both by a nitric oxide-dependent and independent mechanism in rat osteoblast in vitro. *J Biol Chem*, 1998, 274: 1776-1782.
- [16] Jimi E, Nakamura I, Duorg LT, et al. Interleukin 1 induces multinucleation and bone resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res*, 1999, 247: 84-93.
- [17] Lu Xiaohe. *Practical clinical drug monitoring*. Version 1. Beijing: People's medical publishing house, 2004: 447.
- [18] Chen Xinqian, Jin Youyu, Tang Guang. *New materia medica*. The 15th edition. Beijing: People's medical publishing house, 2004: 754.

(收稿日期: 2012-10-08)

(上接第 706 页)

- [5] ZhenQiang Situ, Junzheng Wu, cell culture. Second edition. Xi'an: World Book Inc, 2007.
- [6] Ovchinnikov D. Alcian blue/alizarin red staining of cartilage and bone in mouse. *Cold Spring Harb Protoc*. 2009: 5170.
- [7] Nomura Y.; Ohashi K.; Watanabe M, et al. Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatine to ovariectomized rats. *S Nutrition*, 2005, 21 (11-12): 1120-1126.
- [8] Bagchi D, Misner B, Bagchi M, et al. Effects of orally administered undenatured type II collagen against arthritic inflammatory disease: a mechanistic exploration. *Int J Clin Pharmacol Res*, 2002, 22(3-4): 101-110.
- [9] Trentham DE, Dynesius-Trentham RA, Orav EJ, et al. Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science*. 1993, 261(5129): 1727-1730.
- [10] Ausar SF, Beltramo DM, Castagna LF, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by oral administration of bovine tracheal type II collagen. *Rheumatol Int*, 2001, 20(4): 138-144.
- [11] Sieper J, Kary S, Sorensen H, et al. Oral type II collagen treatment in early rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Arthritis Rheum*, 1996, 39(1): 41-51.
- [12] McKown KM, Carbone LD, Kaplan SB, et al. Lack of efficacy of oral bovine type II collagen added to existing therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(6): 1304-1308.
- [13] Oesser S, Adam M, Babel W, et al. Oral administration of ¹⁴C labelled gelatine hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *Journal of nutrition*, 1999, 129(10): 1891-1895.
- [14] Clark KL, Sebastianelli W, Flechsenhar KR, et al. 24-Week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain. *Curr Med Res Opin*, 2008, 24(5): 1485-1496.

(收稿日期: 2013-05-02)

作者: 刘俊丽, 宋淑军, 司少艳, 徐冰心, 秦亚亚, 张兵, 马铭, 卢伟鹏, 王毅虎
作者单位: 刘俊丽, 宋淑军, 司少艳, 徐冰心, 秦亚亚(解放军第306医院病理实验科, 北京, 100101), 张兵, 马铭, 卢伟鹏, 王毅虎(中国科学院理化技术研究所, 光化学转换与功能材料重点实验室, 北京100190)
刊名: 中国骨质疏松杂志 
英文刊名: Chinese Journal of Osteoporosis
年, 卷(期): 2013, 19(7)

参考文献(14条)

1. Zhonghou Liu [bone mineral and clinic practise](#) 2006
2. Adam M. Spacek P. Hulejová H [Postmenopausal osteoporosis. Treatment with calcitonin and a diet rich in collagen proteins](#) 1996(03)
3. Moskowitz RW [Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease](#) 2000(02)
4. Bello AE. Oesser S [Collagen hydrolysate for the treatment of osteoarthritis and other joint disorders:a review of the literature](#) 2006(11)
5. ZhenQiang Situ. Junzheng Wu [cell culture](#) 2007
6. Ovchinnikov D [Alcian blue/alizarin red staining of cartilage and bone in mouse](#) 2009
7. Nomura Y. Oohashi K. Watanabe M [Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatine to ovariectomized rats](#) 2005(11-12)
8. Bagchi D. Misner B. Bagchi M [Effects of orally administered undenatured type II collagen against arthritic inflammatory disease:a mechanistic exploration](#) 2002(3-4)
9. Trentham DE. Dynesius-Trentham RA. Orav E J [Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis](#) 1993(5129)
10. Ausar SF. Beltramo DM. Castagna LF [Treatment of rheumatoid arthritis by oral administration of bovine tracheal type II collagen](#) 2001(04)
11. Sieper J. Kary S. Sorensen H [Oral type II collagen treatment in early rheumatoid arthritis. A double-blind, placebocontrolled, randomized trial](#)[外文期刊] 1996(01)
12. McKown KM. Carbone LD. Kaplan SB [Lack of efficacy of oral bovine type II collagen added to existing therapy in rheumatoid arthritis](#) 1999(06)
13. Oesser S. Adam M. Babel W [Oral administration of, 14C labelled gelatine hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice\(C57/BL\)](#) 1999(10)
14. Clark KL. Sebastianelli W. Flechsenhar KR [24-Week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain](#) 2008(05)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201307011.aspx