

# 维生素 K<sub>3</sub> 对去卵巢大鼠骨质疏松 预防作用的实验研究

陶天遵 陶树青 吕嵩 尹文哲 张风云 乔振海 吴振铎 边晓燕 李月部

**摘要** 绝经后骨质疏松的防治以药物为主要手段。近年来一些实验初步表明,维生素 K 可通过促进骨矿化和抑制骨吸收等作用减少绝经后骨量丢失,且无明显副作用。本实验进一步探讨维生素 K<sub>3</sub> 对去卵巢大鼠骨质疏松的预防作用,并将其效果与尼尔雌醇(CEE<sub>2</sub>)进行比较。结果显示,维生素 K<sub>3</sub> 组椎体和股骨端骨密度显著高于 OVX 组(P<0.001),光镜下骨小梁较 OVX 组增宽、致密,透射电镜下维生素 K<sub>3</sub> 组骨细胞呈功能活跃状态,胶原纤维排列较 OVX 组致密,分布亦均匀。CEE<sub>2</sub> 组各项结果优于维生素 K<sub>3</sub> 组, Vit K<sub>3</sub>+CEE<sub>2</sub> 组优于单一用药组。以上结果表明,维生素 K<sub>3</sub> 可在一定程度上预防去卵巢大鼠骨质疏松,效果逊于尼尔雌醇。二者联合用药效果优于单一用药。

**关键词** 骨质疏松症 维生素 K 雌激素 卵巢切除术

## preventive effect of vitamin K<sub>3</sub> on osteoporosis in ovariectomized rats

Tao Tianzun, Tao Shuqing, Lu Song, Yin Wenzhe, Qiao Zhenhai

(Dept. of Orthopedics, 2nd Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Wu Zhenduo and Bian Xiaoyan

(Center of Electron Microscope, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

**Abstract** Chemoprophylaxis is one of the main method to prevent the occurrence of postmenopausal osteoporosis. In recent years, some experiments have shown that vitamin K can increase the bone mass of postmenopausal women by enhancing bone mineralization and inhibiting bone resorption, with few untoward side effects found. The purpose of our experiment was further to explore the preventive effect of vitamin K<sub>3</sub> (Vit K<sub>3</sub>) on osteoporosis in ovariectomized rats and compare it with nylestriol (CEE<sub>2</sub>) and Vit K<sub>3</sub> combined with nylestriol. The results showed that the bone mineral densities of lumbar spine and distal femur were significantly greater, trabeculae were thicker and denser, osteocytes were more active, collagens were denser and distributed in better order than those in OVX group, but not as good as those in CEE<sub>2</sub> group. The Vit K<sub>3</sub>+CEE<sub>2</sub> group showed the best preventive effects. The above results indicated that vitamin K<sub>3</sub> could, to some extent, prevent the osteoporosis in ovariectomized rats, but its effect was not as strong as that of nylestriol. Vit K<sub>3</sub> combined with nylestriol showed better preventive effect than single drug-treated group.

**Key Words** Osteoporosis Vitamin K Estrogen Ovariectomy

1975年 Pettifor 报道妊娠前3个月妇女口服抗凝剂华法令(维生素 K 拮抗剂)能导致新生儿先天性骨骼畸形,并认为此与维生素 K 缺乏有关<sup>[1]</sup>。其后大量资料表明,长期华法令治疗能引起包括大鼠、羊、人等不同程度的骨量减少

和骨质疏松<sup>[2~4]</sup>。本实验进一步探讨维生素 K<sub>3</sub> 对去卵巢大鼠骨质疏松的预防作用,并将其效果与单独使用尼尔雌醇(CEE<sub>2</sub>)进行比较,同时观察二者联合用药的预防效果。

## 1 材料和方法

1.1 动物分组及处理:3月龄雌性 Wistar 大白

作者单位:150086,哈尔滨医科大学附属二院骨科(陶天遵 吕嵩 陶树青 尹文哲 张风云 乔振海),电镜中心(吴振铎 边晓燕),黑龙江省人民医院外科(李月部)

鼠 40 只,按体重分层,随机分为 5 组,见表 1。

表 1 动物分组及处置表

组	例数	处 置
Sham	8	开腹后关腹,不切除卵巢
OVX	8	切除 双侧卵巢,不给药
CEE <sub>2</sub>	8	切除双侧卵巢,CEE 灌胃
Vit K <sub>2</sub>	8	切除双侧卵巢,Vit K <sub>2</sub> 肌注
Vit K <sub>2</sub> +CEE <sub>2</sub>	8	切除双侧卵巢,Vit K <sub>2</sub> 肌注,CEE 灌胃

剂(CEE<sub>2</sub>),15mg/100g 体重,每周灌胃 1 次,Vit K<sub>2</sub>0.12mg/100g 体重,隔日肌注 1 次

各组大鼠分笼饲养,摄取标准大鼠饲料,饮用自来水,室温 18±2℃

1.2 药品:尼尔雌醇片,上海第十二制药厂出品。维生素 K<sub>2</sub>注射液,上海第一制药厂出品。

1.3 仪器: Encore I 生化分析仪,Norland 骨密度仪(N2780X<sub>2</sub>型,<sup>125</sup>I,27.4keV),OLYMPUS 光学显微镜,HITACHI H600A 型透射电镜。

1.4 取材及检测: 实验 15 周结束后股动脉放血处死动物。

1.4.1 血清生化指标测定:股动脉血高速离心后取上清,分别用甲基麝香草酚蓝测钙法、直接测定法和对硝基苯磷酸二钠速率法分别测定血清 Ca、P、AKP 含量。

1.4.2 光镜:取第 5 腰椎椎体和左胫骨近端,常规光镜标本切片并观察。

1.4.3 透射电镜:取第 2 腰椎椎体和右胫骨近端,常规透射电镜标本制样并观察。

1.4.4 骨密度测定:取第 1 腰椎椎体和右股骨,骨密度测定。

1.5 统计学处理:各组大鼠所有参数均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异采用方差分析,显著性 t 检验法。

## 2 结果

2.1 血清生化指标测定结果见表 2。

2.2 光镜观察结果:与 Sham 组比较,OVX 组骨小梁较稀疏,部分骨小梁变窄。各用药组骨小梁较宽,分布较密集,与 Sham 组近似。各胫骨

表 2 各组大鼠血清生化测定结果

指标	Sham	OVX	CEE <sub>2</sub>	Vit K <sub>2</sub>	Vit K <sub>2</sub> +CEE <sub>2</sub>
Ca(mmol/L)	2.274±0.260	2.326±0.361	2.286±0.276	2.423±0.444	2.414±0.383
P(mmol/L)	1.221±0.370	1.138±0.417	1.096±0.328	1.143±0.459	1.161±0.256
AKP(U/L)	182.1±45.9	302.0±88.3	180.8±54.1	212.6±73.5	200.6±52.5

各组结果 t 检验,血清 Ca、P 各組间比较,P>0.1;血清 AKP,OVX 组高于其余各组,P<sub>OVX</sub><0.01,P<sub>Vit K<sub>2</sub></sub><0.1,P<sub>Vit K<sub>2</sub>+CEE<sub>2</sub></sub><0.01,P<sub>CEE<sub>2</sub></sub><0.05;其余各組间比较,P>0.1

近端与椎体光镜所见基本一致。

2.3 透射电镜观察结果:OVX 组骨细胞体积较小,核内异染色质为主,凝集成较大的团块状,部分细胞核呈固缩状。胞质内线粒体、高尔基体、粗面内质网等不发达,糖原颗粒较少,并可见到较多空骨陷窝和少量功能活跃的破骨细胞。胶原纤维结构疏松,横纹模糊,排列紊乱,分布不均。各用药组骨细胞体积较大,胞质内线粒体、高尔基体、粗面内质网等较发达,糖原颗粒较多,与 Sham 组近似。Vit K<sub>2</sub> 组胶原纤维排列、分布与横纹清晰度不如 CEE<sub>2</sub> 组,Vit K<sub>2</sub>+CEE<sub>2</sub> 组胶原纤维情况优于 Vit K<sub>2</sub> 和 CEE<sub>2</sub> 组(图 1~6)。

2.4 骨密度测定结果见表 3。

## 3 讨论

绝经后骨质疏松的发生主要是由于女性绝经后体内雌激素水平下降,一方面对破骨细胞抑制作用减弱,使其活性增强,骨溶解加速;另一方面可通过降低成骨细胞活性和影响 PTH、Vit D 活性而导致骨形成及钙化下降,所以骨溶解作用大于骨形成作用,骨质代谢处于负平衡状态。经过一段时间后则发生骨量减少而导致骨质疏松。

体内和体外一些实验初步表明,维生素 K 可通过以下机制影响骨发育和骨代谢:(1)促进

表3 各组大鼠骨密度数值(g/cm<sup>2</sup>)

部位	Sham	OVX	CEE <sub>3</sub>	Vit K <sub>3</sub>	Vit K <sub>3</sub> +CEE <sub>3</sub>
椎体	0.1396±0.0046	0.0934±0.0089	0.1346±0.0063	0.1325±0.0041	0.1379±0.0045
股骨端	0.1606±0.0047	0.1266±0.0030	0.1524±0.0056	0.1424±0.0060	0.1534±0.0068
股骨干	0.1553±0.0079	0.1534±0.0044	0.1549±0.0056	0.1564±0.0056	0.1583±0.0062

注:各组结果 $t$ 检验,椎体:OVX组显著低于其它各组, $P<0.001$ ;CEE<sub>3</sub>组与Sham、Vit K<sub>3</sub>及Vit K<sub>3</sub>+CEE<sub>3</sub>组比较, $P>0.1$ , $P_{K-S}<0.01$ , $P_{K-FS}>0.1$ , $P_{K-K+E}<0.05$ 。股骨端:OVX组显著低于其它各组, $P<0.001$ , $P_{F-S}<0.001$ , $P_{E-K}<0.01$ , $P_{E-K-E}>0.1$ , $P_{K-S}<0.001$ , $P_{K-E-S}<0.05$ , $P_{K-K+E}<0.01$ 。股骨干:各组间比较, $P>0.1$ 。

成骨细胞骨钙素(BGP)的合成,加强骨有机质和无机质的紧密结合,促进骨矿化;(2)抑制成骨细胞PGE<sub>2</sub>的合成和分泌,降低PGE<sub>2</sub>对破骨细胞的激活作用,抑制骨吸收<sup>[5-7]</sup>。

本实验血清生化指标,各用药组血清AKP值低于OVX组, $P<0.01$ ,即OVX组骨细胞成骨活动可能加快,但同时骨细胞溶解破坏也增多,所以血清AKP值增高;而其它组成骨与骨细胞破坏处于近似正常水平的状态,说明各用药组可降低骨转换从而减少骨丢失。血清Ca、P值各组间均无显著差异,其原因可能是血清Ca、P受PTH、CT、Vit D等多种因素调节,其浓度能够维持正常水平而与骨量变化情况不严格相关,此与人绝经后骨质疏松患者血清Ca、P基本正常的表现相一致<sup>[8]</sup>。

形态学观察结果,光镜下各用药组骨小梁分布与宽度优于OVX组而与Sham组近似。电镜下各用药组骨细胞状态优于OVX组。胶原纤维情况,Vit K<sub>3</sub>组优于OVX组,逊于CEE<sub>3</sub>组,Vit K<sub>3</sub>+CEE<sub>3</sub>组优于Vit K<sub>3</sub>及CEE<sub>3</sub>组,说明Vit K<sub>3</sub>不能如CEE<sub>3</sub>一样强有效地预防去卵巢后雌激素水平下降导致的胶原纤维合成不佳与成熟障碍,这同白木正孝等人报道的Vit K<sub>2</sub>对体外培养成骨细胞胶原纤维合成作用的影响基本一致<sup>[7]</sup>。

椎体及股骨端骨密度测定结果,说明Vit K<sub>3</sub>对去卵巢后松质骨的丢失具有一定的预防作用,但效果逊于CEE<sub>3</sub>,联合用药效果优于单一用药。股骨干骨密度,各组间无显著差异,表明密质骨对雌激素水平下降的反应不明显。

尽管CEE<sub>3</sub>对子宫内膜、乳腺等的副作用弱于雌二醇和雌酮,但有报道每周1mg CEE<sub>3</sub>仍可导致部分患者白带过多,阴道流血和乳房

胀痛,说明CEE<sub>3</sub>仍有一定的副作用。

综上所述,CEE<sub>3</sub>防治骨质疏松症机制可能为抑制破骨细胞活性,同时促进骨基质胶原纤维形成及成熟,而Vit K<sub>3</sub>则通过促进骨钙素形成而促进骨基质矿化,同时抑制成骨细胞合成及分泌PGE<sub>2</sub>来抑制破骨细胞功能。两者通过不同途径来增加骨形成和减少骨丢失,从而起到预防及治疗绝经后骨质疏松症的作用。从实验结果来看,Vit K<sub>3</sub>+CEE<sub>3</sub>组各项检测指标均优于单独用药组,表明两药间有明显正协同作用。临床上可通过投给Vit K<sub>3</sub>,在保证骨质疏松症患者治疗效果同时,减少激素替代疗法中雌激素用量,从而可降低甚至防止雌激素的多种不良毒副作用,提高骨质疏松症患者的治疗水平。

(本文图1~6见插图第2页)

### 参 考 文 献

- Pettifor JM, Benson R. Congenital malformations associated with the administration of oral anticoagulants during pregnancy. *J Pediatr*, 1975, 86: 459.
- Feteih R. Effect of sodium warfarin on vitamin K-dependent proteins and skeletal development in the rat fetus. *J Bone Miner Res*, 1990, 5: 887.
- Pastoureau P. Osteopenia and bone remodeling abnormalities in warfarin-treated lambs; a possible role of osteocalcin. *J Bone Miner Res*, 1990, 5(S1): 21S29.
- Monreal M, Olive A, Lafoz, E, et al. Heparins, coumarin and bone density. *Lancet*, 1991, 338: 706.
- 星和子, 腰原康子, 白木正孝, ほか. 骨芽細胞に対するメナキノン-4の作用. *ビタミン*, 1993, 67(6): 225.
- Akedo Y, Hosoi T, Inoue S. Vitamin K<sub>2</sub> modulates proliferation and function of osteoblastic cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 187: 814.
- 腰原康子, 星和子, 白木正孝, ほか. 活性型ビタミンK<sub>2</sub>(メナキノン-4)による培養ヒト骨芽細胞の石灰化促進作用. *医学のあゆみ*, 1992, 161(6): 439.
- Morris N. Osteoporosis: screening, prevention and management. *Fertil Steril*, 1993, 59(4): 707.



图 1 OVX 组骨细胞( $\times 12000$ )

(箭头示细胞核固缩)

图 2 OVX 组胶原纤维( $\times 12000$ )

(箭头示疏松模糊紊乱的胶原纤维)

图 3 Vit K<sub>3</sub> 组骨细胞( $\times 12000$ )

图 4 Vit K<sub>3</sub> 组胶原纤维( $\times 12000$ )

(箭头示胶原纤维情况介于模型组与正常组之间)

图 5 Vit K<sub>3</sub>+CEE<sub>3</sub> 组骨细胞( $\times 12000$ )

图 6 Vit K<sub>3</sub>+CEE<sub>3</sub> 组胶原纤维( $\times 12000$ )