

维生素 K 对幼鼠骨量及骨强度影响的实验研究

赵新华 赵熙和 崔伟 任典旭



摘要 目的 从骨计量学及骨生物力学等方面评价维生素 K 对幼鼠骨发育的影响。**结果** 股骨及腰椎骨计量学各参数值(骨湿重、干重、骨体积、骨密度、骨小梁面积等)随维生素 K 摄入水平增加而增加;腰椎各计量学参数值在饲料维生素 K 水平超过 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,无显著变化;维生素 K 可提高股骨的结构力学性能(最大载荷与结构硬度),而对其材料力学性能无显著影响。**结论** 维生素 K 能促进幼鼠骨发育;从骨健康角度考虑,目前根据凝血功能需求建议的大鼠饲料维生素 K 需要量(即本实验低剂量组; $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 饲料)不能满足幼鼠骨发育需求。

关键词 维生素 K 骨计量学 骨生物力学

Effect of various levels of vitamin K intake on parameters of bone metrology and biomechanics in rats

Zhao Xinhua, Zhao Xihe, Cui Wei, et al

Department of biochemistry, Beijing Ji Shui Tan Hospital, Beijing 100035, China

Abstract Objective To explore the effect of various levels of vitamin K intake on bone development. **Methods** Forty weanling Wistar male rats were divided into four groups. In one group, 1% sulfadiazine was added to regular diet (vitamin K $50\mu\text{g}/\text{kg}$) to induce vitamin K deficiency. In the other three groups, the vitamin K level in diets were 50, 300 and $2550\mu\text{g}/\text{kg}$ respectively. Twelve weeks later, the rats were killed and effects of the different level of vitamin K intake on bone development were evaluated by the parameters of bone metrology and bone biomechanics. **Results** Femur metrological parameters (bone weight, bone volume, bone mineral density and areas of trabecular bone etc.) improved with the increase of dietary vitamin K level, while the parameters of lumbar spine did not change when vitamin K level was over $300\mu\text{g}/\text{kg}$ diet; vitamin K could improve the femoral structural biomechanical properties (strength and rigidity), but had no effect on the material biomechanical properties. **Conclusion** Vitamin K can enhance the development of bone. The rat vitamin K requirement may be higher than that currently recommended ($50\mu\text{g}/\text{kg}$ diet).

Key words Vitamin K Bone metrology Bone biomechanics

近年来,一些有关维生素 K 与骨代谢的研究提示维生素 K 能促进骨源性蛋白的羧化,但

与骨发育的关系尚缺乏长期动物实验研究。骨计量学指标(骨重、骨密度、骨小梁面积等)可直

作者单位:100035 北京积水潭医院生化研究室(赵新华);中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所(赵熙和);航天医学与医学工程研究所(崔伟);首都医科大学(任典旭)

作者简介:赵新华,女,1971年生,1994年毕业于山西医科大学预防医学系,同年考入中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所攻读硕士学位研究生,1994年毕业获营养学硕士学位。现在北京积水潭医院创伤骨科研究所重点实验室工作。

观反映骨的再建情况及骨量多少,并且骨的力学性能是评价骨质量最有说服力的指标。本实验旨在从骨计量学及骨生物力学等方面观察维生素 K₁对幼鼠骨发育的影响,以期从骨健康角度探讨维生素 K 的生理需要量。

1 材料和方法

1.1 动物来源及分组

实验选用雄性 Wistar 断乳大鼠40只,体重(50±6)克,由中国医学科学院动物中心提供,按体重随机分为4组,分组情况如下:①Vk 缺乏组(饲料中含1%磺胺嘧啶,阻断大鼠体内肠道菌群对 Vk 的合成);②低剂量组(饲料含 Vk 50 μg/kg);③中剂量组(饲料含 Vk 300 μg/kg);④高剂量组(饲料含 Vk 2550 μg/kg)。

1.2 动物喂养及饲料

大鼠单笼饲养,自由进食,,饮去离子水,动物房温度保持在20~25℃,湿度50%左右,记录进食量,每周称体重一次,实验期3个月。饲料配方参照 Joht T 等的实验研究,经测定基础饲料 Vk 含量为50μg/kg,钙含量5.7 g/kg,缺乏组在基础饲料基础上添加1%磺胺嘧啶,低剂量组饲以基础饲料,中高剂量组分别在基础饲料中添加250μg 和2500μg Vk,使分别达到每公斤饲料含 Vk 300和2550 mg (Vk 为 Sigma 公司产品)。

1.3 样品收集及处理

实验结束前大鼠禁食一夜,次日晨在乙醚麻醉下由腹主动脉取血,摘取肝脏及双侧肾脏,用冷生理盐水冲洗,滤纸吸干,立即称重。剥

离出双侧股骨。

左侧股骨测定指标流程:湿重→骨密度→干重→骨灰分测定。

右侧股骨:三点弯曲实验。

第三腰椎测定指标流程:湿重→骨密度→压缩实验→干重。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 骨干重:105℃烤干至恒重后称重。骨相对干重:骨干重/体重。骨比重(表观骨密度):骨湿重/骨体积(g/cm³)。

1.4.2 骨密度测定

方法:单光子骨密度法。仪器:SD-1000型单光子骨矿物测定仪,放射源为镅²⁴¹Am;由核工业部北京地质研究所生产,误差≤3%。股骨骨密度测三点:中点、近侧1/5点、远侧1/5点。腰椎骨密度:剥离大鼠第3腰椎(L₃),去除周围的棘突和关节突起,制备成具有两个平行面的圆柱体,从中点扫描。

1.4.3 骨灰分测定

左侧股骨去除两侧干骺端(以便去除松质骨),用牙科锯将股骨干分为近、中和远三等份,105℃烤干至恒重后,600℃灰化24小时,称重并计算矿盐含量(%干重)。

1.4.4 骨组织形态计量学测量

左侧胫骨用5%硝酸溶液脱钙5天,在胫骨近侧端0.5 cm 处横断,取断端下方骨组织0.5 cm 厚,石蜡包埋,切片(6μm),HE 染色,用 Quantimet 970图像分析仪测定。

1.4.5 股骨生物力学性能测定

方法:三点弯曲实验。

样品处理:股骨测量前用浸透生理盐水的湿纱布包裹,实验结束后,测量断面几何参数计算骨截面惯性矩,进而结合骨结构力学参数计算骨材料力学参数。

仪器:日本岛津 DSS-25T 电子万能材料试验机。

测试条件及方法:将骨标本置于该实验机上,记录载荷变形曲线。加载速度:6 mm/min,跨距:22.3mm。

表1 基础饲料配方

成分	含量(%)
黄豆粉	41.00
蔗糖	20.00
淀粉	29.70
花生油	4.00
混合无机盐	1.75
混合维生素	1.35
DL-蛋氨酸	0.10
CaH ₂ PO ₄ ·4H ₂ O	2.17

各参数计算如下:

结构力学性能参数:由载荷变形曲线直接获得。①最大载荷(N):系指骨断裂前所承受的最大力;②最大挠度(mm)系指骨断裂前所发生的最大变形长度;③变形位能(N·mm):弹性区的面积。

材料力学性能参数:由应力—应变曲线获得:①最大应力(MPa):系指股骨断裂前单位骨面积所承受的载荷;②最大应变(%):系指股骨断裂前单位骨长度发生的变形。

1.5 数据处理:用 Stata 统计软件进行方差分析,相关性检验。

2 实验结果

2.1 股骨与腰椎骨重、骨体积

大鼠股骨湿重、干重、骨体积、骨长均随 V_k 剂量增加而增加。V_k 缺乏组各项指标显著低于其余各组($P < 0.05$)。中高剂量组骨湿重显著高于低剂量组,高剂量组骨干重显著高于低剂量组,见表2。

中高剂量组大鼠腰椎湿重、干重、骨体积相近,明显高于低剂量组与 V_k 缺乏组,低剂量组显著高于 V_k 缺乏组($P < 0.05$),见表3。

表2 股骨重量、长度、体积($\bar{x} \pm s$)

组别	湿重(g)	干重(g)	骨长(cm)	体积(cm ³)
V _k 缺乏组	0.576 ± 0.06 ^a	0.350 ± 0.04 ^a	3.11 ± 0.37 ^a	0.384 ± 0.03 ^a
低剂量组	0.675 ± 0.04 ^b	0.427 ± 0.02 ^b	3.47 ± 0.13 ^b	0.453 ± 0.03 ^b
中剂量组	0.734 ± 0.04 ^c	0.459 ± 0.03 ^{bc}	3.52 ± 0.10 ^b	0.454 ± 0.02 ^b
高剂量组	0.763 ± 0.04 ^c	0.472 ± 0.03 ^c	3.58 ± 0.09 ^b	0.477 ± 0.03 ^b

注: * 每列右上角字母不同者表示差异有显著性($P < 0.05$)

表3 腰椎湿重、干重、体积($\bar{x} \pm s$)

组别	湿重(g)	干重(g)	体积(cm ³)
V _k 缺乏组	0.122 ± 0.02 ^a	0.070 ± 0.01 ^a	0.079 ± 0.011 ^a
低剂量组	0.159 ± 0.02 ^b	0.089 ± 0.01 ^b	0.099 ± 0.012 ^b
中剂量组	0.182 ± 0.02 ^c	0.102 ± 0.01 ^c	0.115 ± 0.012 ^c
高剂量组	0.181 ± 0.02 ^c	0.102 ± 0.01 ^c	0.114 ± 0.012 ^c

注: * 每列右上角字母不同者表示差异有显著性($P < 0.05$)

2.2 骨密度测量结果

高剂量组大鼠股骨中点、干骺端、股骨颈端三点骨密度值均显著高于其余各组($P < 0.05$),中剂量组股骨颈端 BMD 显著高于维生素 K 缺

乏组($P < 0.05$)。维生素 K 缺乏组腰椎骨密度显著低于其余各组($P < 0.05$),并且高剂量组显著高于低剂量组,上述各点骨密度值均随维生素 K 剂量增加而增加,见表4。

表4 股骨与腰椎骨密度(g/cm³, $\bar{x} \pm s$)

组别	股 骨			腰椎
	中点	干骺端	股骨颈端	
V _k 缺乏组	0.244 ± 0.007 ^a	0.264 ± 0.008 ^a	0.242 ± 0.008 ^a	0.246 ± 0.012 ^a
低剂量组	0.242 ± 0.006 ^a	0.261 ± 0.010 ^a	0.252 ± 0.007 ^{ab}	0.259 ± 0.008 ^b
中剂量组	0.244 ± 0.005 ^a	0.270 ± 0.013 ^a	0.257 ± 0.008 ^b	0.265 ± 0.008 ^{ba}
高剂量组	0.252 ± 0.006 ^b	0.289 ± 0.013 ^b	0.272 ± 0.013 ^c	0.268 ± 0.009 ^c

注: * 每列右上角字母不同者表示差异有显著性($P < 0.05$)

2.3 骨组织形态计量学

维生素 K 缺乏组股骨中点骨截面总面积

与皮质面积显著低于其余各组。高剂量组骨总面积与皮质面积显著高于中剂量组与低剂量组。皮质相对面积各组间差异无显著性,见表5。

表5 股骨中点骨形态计量学($\bar{x}\pm s$)

组别	总面积(mm ²)	皮质面积(mm ²)	皮质相对面积(%)
Vk 缺乏组	6.01±0.14 ^a	4.13±0.29 ^a	68.8±4.2
低剂量组	6.95±0.36 ^b	4.58±0.46 ^b	65.8±5.1
中剂量组	7.09±0.38 ^b	4.55±0.29 ^b	64.3±3.5
高剂量组	7.58±0.49 ^c	5.19±0.45 ^c	68.6±4.9

注: * 每列右上角字母不同者表示差异有显著性($P<0.05$)

2.4 胫骨近侧段病理切片光镜观察结果

胫骨近侧端病理切片观察可见,维生素 K 缺乏组大鼠骨小梁较稀疏,并且宽度很窄,中剂量组大鼠骨小梁较维生素 K 缺乏组宽度与数目均有一定程度的增加,高剂量组大鼠骨小梁很宽,并且分布密集,数量与宽度在所有组别中最佳。

2.5 股骨生物力学性能

骨的材料力学参数:最大应力与弹性模量各组间差异无显著性。

骨的结构力学参数:最大载荷与结构硬度值随 Vk 剂量增加有增高趋势。两项指标 Vk

缺乏组显著低于其余各组,并且高剂量组结构硬度显著高于低剂量组。

骨的几何参数:骨截面惯性矩随 Vk 剂量增加而增高,Vk 缺乏组显著高于其余各组,同时高剂量组显著高于低剂量组($P<0.05$)。

骨的材料力学参数(骨截面惯性矩)与骨的结构力学参数(最大载荷、结构硬度)正相关,相关系数 r 分别为 0.569、0.578,两者均 $P<0.01$ 。骨截面惯性矩与骨的材料力学参数(最大应力、弹性模量)负相关, r 分别为 -0.665、-0.592,两者均 $P<0.01$ 。

表6 股骨三点弯曲实验结果($\bar{x}\pm s$)

组别	材料力学参数		结构力学参数		几何参数
	最大应力(MPa)	弹性模量(MPa)	最大载荷(N)	结构硬度(N/mm)	骨截面惯性矩(mm ⁴)
Vk 缺乏组	236.1±18.8	13.5±3.2	75.4±9.4 ^a	128.4±27.8 ^a	2.17±0.46 ^a
低剂量组	238.1±26.0	11.6±3.2	87.7±9.5 ^b	134.1±29.1 ^{ab}	2.64±0.40 ^b
中剂量组	236.6±29.0	12.7±1.0	90.1±8.6 ^b	166.3±22.2 ^{bc}	2.92±0.31 ^{bc}
高剂量组	218.7±15.8	11.1±1.7	93.8±5.1 ^b	168.8±27.8 ^c	3.31±0.58 ^c

注: * 每列右上角字母不同者表示差异有显著性($P<0.05$)

3 讨论

本实验观察到随着维生素 K 剂量的增加,股骨各计量学参数值高剂量组均显著优于低剂量组与维生素 K 缺乏组(见表1,3,4)。从病理切片也可形象地观察到高剂量组骨小梁数目增多,宽度增加,分布优于其余各组(见图1)。说明维生素 K 能促进骨形成,使骨量增加,可能与

其能提高成骨细胞活性,促进骨钙素合成和羧化有关^[1]。

腰椎属于松质骨,由表2可见中高剂量组动物腰椎湿重、干重及体积几乎相同,皆显著优于低剂量组与维生素 K 缺乏组。维生素 K 缺乏组动物骨密度显著低于其余各组,说明维生素 K 在中剂量(3000μg/kg 饲料)以下范围有可能不能保证腰椎的正常发育。

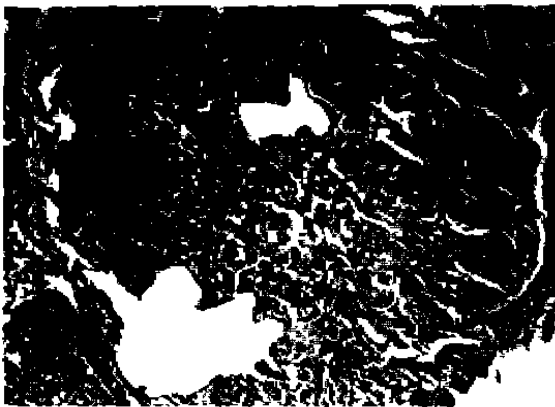


图1a 维生素K缺乏组大鼠胫骨病理切片×40

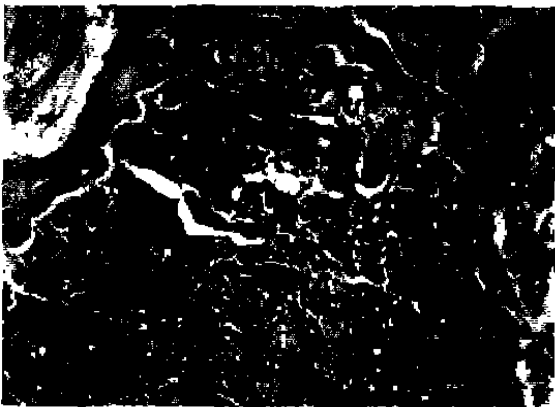


图1b 中剂量组大鼠胫骨病理切片×40

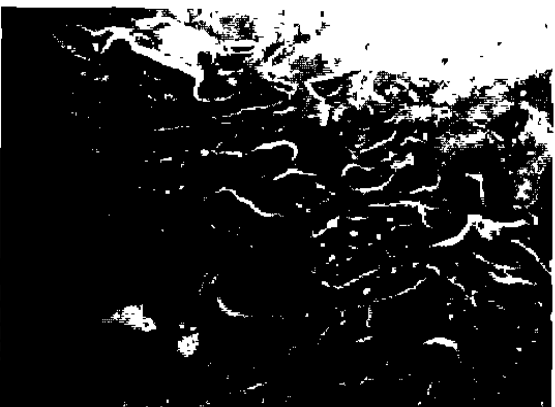


图1c 高剂量组大鼠胫骨病理切片×40

本实验发现股骨骨量与维生素K剂量相关,而腰椎骨量在维生素K剂量超过 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ 后,即使维生素K摄入水平增加到近10倍也无明显变化。股骨与腰椎的不平行变化可能与两者骨骼类型不同有关,两者分别属于四肢骨与中轴骨、密度骨与松质骨。机体骨骼组织并不是均一的整体,体内密质骨与松质骨,中轴骨和四肢骨的代谢调节机理不同,生长类型和矿物质增加均有差异^[2-4]。日本学者 Orimo 也曾报道一例在骨质疏松患者的维生素K干预实验,结

果发现掌骨(密质骨)骨密度增加,而腰椎骨密度没有改变^[5],与本实验结果一致。

骨骼系统构成机体坚硬的骨架结构,对机体起着支撑、保护、持重等重要的力学功能。因此,骨的力学性能是评价骨质量最有说服力的指标之一。骨的材料力学特性是指骨组织本身的力学性能,与骨的几何形状无关^[6]。骨的结构力学特性是指整个骨结构的力学性能,不但与骨的材料力学特性有关,而且受骨的几何特性即形状尺寸等的影响^[6-8]。

本实验发现维生素K对大鼠股骨材料力学性能无影响而显著提高其结构力学性能。结构力学性能的提高主要是由于骨截面惯性矩增加造成的,两者指标正相关。可见在本实验条件下,骨的几何特性对骨的结构力学贡献大于骨的材料特性。Ferreti 等研究也提出骨截面惯性矩是影响骨力学性能的首要因素,其与骨结构力学正相关而与材料力学负相关^[9]。本实验结论与其观点一致,见图2。

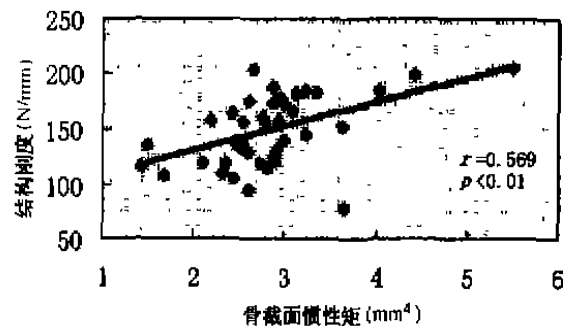


图2a 股骨干骨截面惯性矩与结构硬度的相关关系

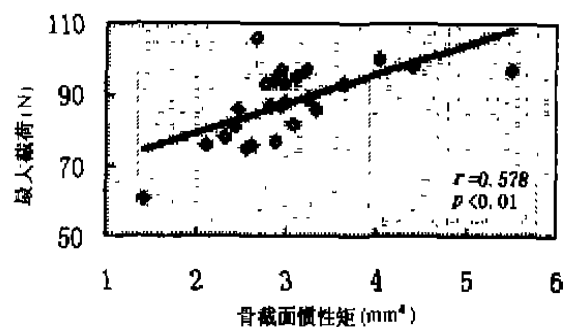


图2b 股骨干骨截面惯性矩与最大载荷的相关关系

骨组织在长期代谢过程中,在外界因素的作用下,不断从力学角度对骨结构进行有效再建^[9]。本实验及其他许多研究提示:骨的几何特性对骨结构力学的贡献有时大于骨的材料特性^[6],所以对骨折危险度的预测不但要考虑骨密度的变化,同时也应考虑骨形状的改变。

本实验结果说明维生素 K 能促进幼鼠骨发育,目前建议的大鼠饲料维生素 K 需要量(即本实验低剂量组:50 μ g/kg 饲料)不能满足幼鼠骨发育需求。提示我们在儿童和青少年时期,保证充足的 V_k 摄入,有利于骨发育及峰值骨密度的提高。

参 考 文 献

- 1 Koshihara Y, Hoshi K, Shiraki M, et al. Enhancement of mineralization in human osteoblast-like cells by V_k (Menatrenone). *J Bone Miner Res*, 1992, 7: S209.
- 2 Bonjour JP, Theintz G. Critical years and stage of puberty for spinal and femoral bone mass accumulating during ado-

(上接第31页)

合用骨吸收抑制剂如降钙素或雌激素。也可以应用 IGF-BP 以延长 IGF-1 作用时间,减少对机体非特异性影响和降低副反应。

参 考 文 献

- 1 王桂兰,蒋玲,董建军. 山东省中老年骨质疏松影响因素的调查. *中华流行病学杂志*, 1994, 增刊.
- 2 Myers MG, Sum Jr XJ, Cheatham E. IRS-1 is a common element in insulin and IGF-I signal to phosphatidylinositol-3-kinase. *Endocrinology*, 1993, 132: 1421-1430.
- 3 McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Regulatory effect of IGF-I and IGF-II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology*, 1989, 24: 301.
- 4 Delany AM, Rydzelski, Canalis E. Autodown-regulation of collagenase-3 in rat bone cell cultures by IGF-I. *Endocrinology*, 1996, 37: 4665.
- 5 Hiroshi M, Yoshi Yuki H, Nobuhiko W. IGF-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinology*, 1992, 131: 1075-1080.
- 6 Mohan S, Fayley JR, Baylink DJ. Age-related changes in

lescence. *J Bone Miner Res*, 1991, 73: 555.

- 3 Tanner JM, Whitehouse RH. Relative importance of growth hormone and sex steroids for the growth at puberty of trunk length, limb length, and muscle width in growth hormone-deficient children. *J Paediatrics*, 1978, 89: 1000.
- 4 Victor H 等主编. 骨骼系统基本生物力学. 黄庆森等译. 天津科学技术出版社, 1986.
- 5 Orimo H, Shiraki M, Fujita T, et al. Clinical evaluation of menatrenone in the treatment of involutional osteoporosis—a double blind multicenter comparative study with 1 α -hydroxy V_d. *J Bone Miner Res (suppl)*, 1992, 7: S122.
- 6 Ferretti JC, Capozza RF. Interrelationships between densitometric, geometric and mechanical properties of bone modeling. *J Bone Miner Res*, 1993, 8: 1389-1396.
- 7 Burr RB. The relationships among physical, geometrical and mechanical properties of bone, with a note on the properties of nonhuman primate bone. *Year Book Phys Anthropol*, 1980, 23: 109-146.
- 8 Curry JD. The mechanical adaption of bones. Princeton, NJ. Princeton University Press, 1984.
- 9 Rubin CT. Skeletal strain and the functional significance of bone architecture. *Calcif Tissue Int*, 1984, 36: S11.

IGFBP-4 and IGFBP 5 levels in human serum and bone; implications for bone loss with aging. *Prog Growth Factor Res*, 1995, 6: 465-473.

- 7 Ernst M, Rodan GA. Increased activity of IGF in osteoblastic cells in the presence of GH; positive correlation with the presence of the GH-induced IGF-BP3. *Endocrinology*, 1990, 127: 807-814.
- 8 Chen TL, Liu F, Bates RL. Further characterization of IGF-BPs in rat osteoblast-like cell cultures; modulation by 17 β estradiol and human GH. *Endocrinology*, 1991, 128: 2489.
- 9 Weissberges AJ, Hokky, Lazarus L. Contrasting effect of oral and transdermal routes of estrogen replacement therapy on 24 hour GH secretion, IGF and GH binding protein in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991, 72: 374-381.
- 10 Chambers TJ, Fuller K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci*, 1985, 6: 155.
- 11 Rosen C, Donahue LR, Hunter S. The 24/25-KDa serum IGF-BP is increased in elderly women with hip and spine fracture. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 74: 24-27.