

维生素 K₂ 对维甲酸致大鼠骨质疏松症的抑制作用

闫鸿丽 雷泽 沈志强 何波 付正启 木晓云 温晓江 朱洪友

中图分类号: R243 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)09-0664-04

摘要:目的 比较 VitK₂(20) K₂(35) 和柠檬酸-苹果酸钙(CCM)对维甲酸致大鼠骨质疏松症的抑制作用。方法 取60只3月龄雌性大鼠随机均分为正常对照组、模型组、1 mg/kg Vit K₂(20)组、0.01 mg/kg Vit K₂(35)组、100 mg/kg CCM组和0.125 mg/kg的尼尔雌醇(nilestriol)片阳性对照组。正常对照组以二次蒸馏水 10 ml·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,其余组按维甲酸 70 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃共15 d,从第9天起上午灌服维甲酸,下午分别灌服 VitK₂(20) K₂(35) CCM和尼尔雌醇,灌胃量均为 10 ml·kg⁻¹·d⁻¹,连续14 d。结果 与模型组比较,1 mg/kg VitK₂(20),0.01 mg/kg K₂(35)和100 mg/kg CCM灌胃给药14 d可明显提高大鼠血清钙含量,显著升高股骨骨密度,并且骨密度与股骨灰重呈线性相关,其中 VitK₂(35)组的子宫指数、卵巢指数均明显高于其他药物组(P < 0.05);VitK₂组骨小梁厚度增加,表面积百分率明显增大,VitK₂(35)组的骺板软骨细胞增生明显且有許多新的骨小梁形成。结论 VitK₂(20) K₂(35)和 CCM对维甲酸致大鼠的骨质疏松症有明显抑制作用,在同等剂量下,VitK₂活性约为 CCM的 10² ~ 10⁴倍,VitK₂(35)尤为显著。

关键词: 维生素 K₂; 柠檬酸-苹果酸钙; 维甲酸; 骨质疏松症

DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.09.010

The inhibitory effect of vitamin K₂ on osteoporosis induced by tretinoin in growing female rats YAN Hongli, LEI Ze, SHEN Zhiqiang, et al. Yunnan University Medical Development Co., Ltd, Kunming 650222, China

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effects of vitamin K₂(20), K₂(35) and calcium citrate malate (CCM) on osteoporosis induced by tretinoin in growing female rats. **Methods** Sixty three month old female rats were randomly divided into normal group, model group, Vitamin K₂(20) group, Vitamin K₂(35) group, CCM group and nilestriol group. The normal group received 10 ml·kg⁻¹·d⁻¹ of second distilled water, the other five groups received 70 mg·kg⁻¹·d⁻¹ of tretinoin for 15 days, from the ninth day, respectively received additional drugs of 1 mg/kg K₂(20), 0.01 mg/kg K₂(35), 100 mg/kg CCM and 0.125 mg/kg nilestriol in the afternoon for 14 days. **Results** The femur bone mineral density(BMD) and the serum level of Ca²⁺ was significantly increased in Vit K₂ groups and CCM group compared with the model group, while the femur BMD had a positive linear correlation with its bone ash weight, the index of ovarian and uterine of Vit K₂(35) group were significantly higher than other drug groups. Trabecular thickness and percentage of trabecular area in Vit K₂ groups were significantly increased more than that of the osteoporotic model, particularly, epiphyseal cartilage cells hyperplasia was very obvious and many new bone trabecular was formed in VitK₂(35) group. **Conclusion** Vitamin K₂(20), K₂(35) and CCM all have the inhibitory effect on osteoporosis induced by tretinoin, Vit K₂ especially K₂(35) is about 10²-10⁴ times more potent than the traditional agents CCM at the same dose.

基金项目: 国家科技部中小企业创新基金(05C26215301427)

作者单位: 650222 昆明 昆明云大医药开发有限公司(闫鸿丽、雷泽、付正启、木晓云、温晓江);昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室(闫鸿丽、沈志强、何波);云南大学化学科学与工程学院(朱洪友)

通讯作者: 雷泽, Email: leize1001@tom.com

Key words: Vitamin K₂; Calcium Citrate Malate; Tretinoin; Osteoporosis

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨量减少,骨组织显微结构退化,骨的脆性增高及骨折危险性增加为特征的全身性疾病^[1]。绝经后的妇女及中老年人是其主要的发病人群,根据世界卫生组织制定的骨质疏松标准,全球约有2亿人处在低骨质和骨质疏松状态^[2],骨质疏松已成为世界范围内的一个主要健康问题。维甲酸广泛用于动物骨质疏松模型的制备,它能激活破骨细胞促进骨吸收,使骨重建处于骨吸收大于骨形成的负平衡状态,从而形成高转化型骨质疏松^[3]。但它不抑制成骨细胞活性,对骨形成和骨基质的矿化过程也无明显影响。在模型特征上,除骨量显著减少外,骨组织显微结构病理改变非常典型,骨小梁稀疏、骨皮质变薄和骨髓腔扩大都十分明显,但与骨质疏松发生有关的血中性激素和Ca²⁺、P³⁺、ALP等生化指标却无变化^[4]。研究表明,维生素K₂(Vit K₂)除了具有凝血功能之外,还具有显著的抗骨质疏松活性,1995年日本已认可VitK₂作为OP防治药物。钙剂是传统的抗OP药物,柠檬酸-苹果酸钙(Calcium Citrate Malate, CCM)是钙、柠檬酸-苹果酸按一定比例配合成的有机酸钙,是目前常用的钙强化剂。本研究采用维甲酸致大鼠骨质疏松模型,研究并比较了Vit K₂(20)、Vit K₂(35)和CCM对实验性OP的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

Vit K₂(20)、K₂(35)和CCM均由昆明云大医药开发有限公司提供。尼尔雌醇片(1 mg/片,批号070420),国药准字H31021648,上海医药(集团)有限公司华联制药厂出品。维甲酸(tretinoin, RA),纯度99%,上海邦成化工有限公司出品;血清钙检测试剂盒(批号20070191)及血清磷检测试剂盒(批号20070081)均为北京中生北控生物科技股份有限公司出品;血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒(批号20070201),上海荣盛生物技术有限公司出品。

1.2 动物

3月龄雌性SD大鼠,体重210~260 g,由昆明医学院实验动物中心提供,合格证号SCXK(滇)2005-008。

1.3 主要仪器

LIBROR AEG-220型精密电子秤(日本岛津公

司);Centra[®] MP4R型离心机(IEC公司);TMS-1024型SAPPHIRE 240全自动生化分析仪(Tokyo Boeki Medical System LTD);AA-670型原子吸收分光光度计(日本岛津公司);M-525 SII型马孚炉(美国NEY公司);双能X射线骨密度测量仪。

1.4 分组

3月龄雌性大鼠60只,按每组10只随机分为6组,即正常对照组、模型组、1 mg/kg Vit K₂(20)组、0.01 mg/kg Vit K₂(35)组、100 mg/kg CCM组和0.125 mg/kg的尼尔雌醇片阳性对照组(milestrial)。

1.5 给药

维甲酸与CCM直接溶于双蒸水中。Vit K₂(20)、K₂(35)先溶于吐温80,再加双蒸水稀释至所需浓度,其中吐温80终浓度最大为0.5%。正常对照组给予双蒸水,按10 ml·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,其余5组按维甲酸70 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,灌胃量为10 ml·kg⁻¹·d⁻¹,1次/d,共15 d。自灌胃第9天起,除上午灌服维甲酸外,于下午分别灌服Vit K₂(20)、K₂(35)、CCM和尼尔雌醇,灌胃量均为10 ml·kg⁻¹·d⁻¹,1次/d,连续14 d。每周称体重1次,并根据体重调整灌胃量。

1.6 标本采集

实验第23天,大鼠脱颈处死,股动脉取血,取子宫、卵巢和双侧股骨。血液以2500 r/min离心10 min,取上层血清用邻甲酚肽络合酮比色法测定血钙(Ca²⁺)、钼蓝法检测血磷(P³⁺)、AMP法检测碱性磷酸酶(ALP)。剔除干净附着的软组织后,子宫、卵巢和右侧股骨立即称重,子宫和卵巢的重量(mg)与体重(g)之比分别为子宫指数(mg/g)和卵巢指数(mg/g)。右股骨称湿重之后,置马孚炉200℃烘烤5 h,冷却后称干重,之后再于750℃下烘烤5 h,冷却后称灰重,最后用火焰原子吸收分光光度法测定骨钙含量。用QCT测左股骨骨密度后,固定于4%中性甲醛中,骨干骺端经洗涤、脱钙、脱水后石蜡包埋切片,再经二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水后,用苏木精-伊红对染(HE染色),梯度酒精脱水、二甲苯透片后封藏于中性树胶中,光镜下观察骨形态,用显微摄影系统和图文分析系统检测计算骨小梁(bone trabecula, Tb)计数(number of bone trabecula, Tb.N)、骨小梁厚度(thickness of bone trabecular, Tb.Th)、骨小梁表面积(area of bone trabecula, Tb.Ar)和骨小梁间隙面积(area of inter trabecular space, ITb.Ar)等指标,计算机

每个视野观察总面积(total area, T. Ar)为 573518.88 μm^2 。骨小梁表面积百分率(% Tb. Ar)和骨小梁间隙面积百分率(% ITb. Ar)分别以其面积占观察总面积之百分比表示(即 $\text{Tb. Ar}/\text{T. Ar} \times 100\%$ 和 $\text{ITb. Ar}/\text{T. Ar} \times 100\%$)。

1.7 统计学处理

用 SPSS 11.0 版统计软件处理所得数据。选用单因素方差分析(One-way ANOVA) LSD 方法统计,结果以 $\bar{x} \pm s$ (均数 \pm 标准差)表示和直线相关分析。

2 结果

2.1 体重及子宫和卵巢指数

表 1 3 种药物对维甲酸(70 mg/kg)诱发骨质疏松症大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	初始体重(g)	1周体重(g)	2周体重(g)	3周体重(g)
正常对照组	—	217.8 \pm 13.0	227.6 \pm 12.5	228.9 \pm 20.2	241.7 \pm 16.4
模型组	—	221.4 \pm 11.5	216.9 \pm 22.4	208.0 \pm 31.4	215.7 \pm 31.1 ^a
Vit K ₂ (20)	1	221.4 \pm 20.3	223.5 \pm 25.4	204.7 \pm 27.7	213.1 \pm 37.3
Vit K ₂ (35)	0.01	220.7 \pm 14.5	227.8 \pm 14.1	222.3 \pm 16.6	225.5 \pm 26.5
CCM	100	223.6 \pm 15.8	224.8 \pm 1.7	214.7 \pm 21.9	222.9 \pm 20.2
Nilestriol	0.125	219.8 \pm 16.7	220.3 \pm 13.8	209.8 \pm 15.7	216.8 \pm 19.4

注:n = 10,与模型组比较,^aP < 0.05

表 2 3 种药物对维甲酸(70 mg/kg)诱导骨质疏松症大鼠脏器指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	子宫指数(mg/g)	卵巢指数(mg/g)
正常对照组	—	2.83 \pm 0.37	0.50 \pm 0.16
模型组	—	1.81 \pm 0.70	0.44 \pm 0.10
Vit K ₂ (20)	1	2.23 \pm 0.75	0.45 \pm 0.06
Vit K ₂ (35)	0.01	2.51 \pm 1.10 ^a	0.55 \pm 0.11 ^a
CCM	100	1.71 \pm 0.25	0.46 \pm 0.09
Nilestriol	0.125	2.38 \pm 1.12 ^a	0.46 \pm 0.08

注:n = 10,与模型组比较,^aP < 0.05

表 3 3 种药物对维甲酸(70 mg/kg)诱导大鼠骨质疏松症血清生化指标的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	ALP(U/L)	Ca ²⁺ (mmol/L)	P ³⁺ (mmol/L)
正常对照组	—	145.38 \pm 23.03	2.71 \pm 0.12	2.32 \pm 0.21
模型组	—	181.09 \pm 73.63	2.56 \pm 0.21 ^b	2.49 \pm 0.29
Vit K ₂ (20)	1	177.49 \pm 58.70	2.75 \pm 0.20 ^a	2.90 \pm 0.45 ^a
Vit K ₂ (35)	0.01	164.27 \pm 52.72	2.65 \pm 0.15	2.85 \pm 0.36 ^a
CCM	100	155.96 \pm 44.61	2.57 \pm 0.07	2.81 \pm 0.17 ^a
Nilestriol	0.125	151.46 \pm 46.71 ^b	2.66 \pm 1.13	2.44 \pm 0.62

注:n = 10,与模型组比较,^aP < 0.05;与正常对照组比较,^bP < 0.05

2.3 对股骨重量、骨钙及骨密度的影响

以骨密度(X)和骨灰重(Y)为变量输出的散点图呈直线趋势,进行直线相关分析, $Y = 0.13X + 0.772$ 。与正常对照组比较,模型组股骨骨密度均明显降低(P < 0.05);与模型组比较,4种药物均明显

增高骨钙含量(P < 0.05),同时正常对照组、Vit K₂(20)组、K₂(35)组、CCM组的股骨骨密度均明显升高(P < 0.05);其余组间差异均无统计学意义(P > 0.05)(表4)。

2.2 对血清生化指标的影响

与模型组比较,Nilestriol明显降低ALP水平,各药物组间无明显差异(P > 0.05);Vit K₂(20)明显升高Ca²⁺水平(P < 0.05);Vit K₂(20)、K₂(35)和CCM均显著升高P³⁺水平(P < 0.05)(表3)。

实验开始时,各组间大鼠体重相近,灌胃1周后各组大鼠的体重有所变化,但组间没有差异(P > 0.05)。灌胃3周后正常对照组大鼠的体重明显高于模型组,于3周内,药物对动物体重均无明显影响(表1)。与模型组比较,Vit K₂(35)组子宫指数和卵巢指数均明显升高(P < 0.05);其他各组与模型组之间无明显统计学差异(P > 0.05)(表2)。

2.4 对股骨形态计量学的影响

干骺端病理切片HE染色,正常对照组骨小梁密集,骨软骨细胞排列整齐,模型组的骨小梁稀疏,软骨细胞层变薄,软骨细胞排列紊乱明显坏死。与正常对照组比较,模型组的骨小梁计数、骨小梁厚度和骨小梁表面积百分率显著降低,同时骨小梁间隙面积百分率明显升高(P < 0.01),表明骨质疏松模型复制成功。与模型组相比,Vit K₂组的骨小梁厚度增加(P < 0.01),骨小梁表面积百分率明显增大,小梁间隙面积百分率减少(P < 0.01)(表5)。

光镜下,模型组实验大鼠股骨上端松质骨内,骨小梁变细,骺板明显,骺板软骨细胞排列稍乱,可见初级骨小梁,其余各组均有初级骨小梁增生,其中,Vit K₂(20)组股骨上端松质骨骨小梁增宽,骺板明显,但骺板软骨细胞层稍窄且排列欠整齐;Vit K₂(35)组的骺板软骨细胞增生明显,同时,与正常对照组相似,其股骨上端松质骨内骨小梁数较多,静止层、增殖层和肥大层软骨细胞清楚,且有较多新生骨小梁形成。

表4 3种药物对维甲酸(70 mg/kg)诱导大鼠骨质疏松症股骨重量、骨钙及骨密度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	骨钙 (%)	股骨重 (mg)			股骨骨密度 (g/cm ²)
			湿重	干重	灰重	
正常对照组	—	42.97 ± 3.34	627.50 ± 80.36	397.40 ± 54.26	251.00 ± 35.98	0.19 ± 0.017
模型组	—	27.25 ± 4.93 ^b	581.50 ± 104.08	347.20 ± 72.51	225.20 ± 36.03	0.17 ± 0.014 ^b
Vit K ₂ (20)	1	34.11 ± 4.08 ^a	650.00 ± 78.00	383.88 ± 68.30	245.25 ± 41.92	0.22 ± 0.02 ^a
Vit K ₂ (35)	0.01	49.06 ± 10.61 ^a	614.60 ± 101.61	363.28 ± 70.38	238.95 ± 40.64	0.19 ± 0.02 ^a
CCM	100	39.06 ± 10.88 ^a	582.90 ± 127.15	336.56 ± 84.10	226.11 ± 52.08	0.19 ± 0.03 ^a
Nilestriol	0.125	40.16 ± 12.63 ^a	608.24 ± 109.21 ^a	374.34 ± 65.27 ^a	233.51 ± 43.62 ^a	0.19 ± 0.01 ^a

注 :n = 10, 与模型组比较, ^aP < 0.05; 与正常对照组比较, ^bP < 0.05

表5 老鹳草素对维甲酸(70 mg/kg)诱发骨质疏松大鼠股骨形态计量学的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	Tb.N (个/mm ²)	Tb.Th (μm)	% Tb.Ar	% ITb.Ar
正常对照组	—	13.80 ± 1.98	41.07 ± 5.73	5458.49 ± 414.42	28.86 ± 4.14
模型组	—	9.10 ± 1.19 ^b	25.70 ± 2.67 ^b	2230.23 ± 243.47 ^b	54.28 ± 5.08 ^b
Vit K ₂ (20)	1	8.60 ± 1.83	25.30 ± 3.20	2546.24 ± 342.34	48.85 ± 3.58 ^a
Vit K ₂ (35)	0.01	9.25 ± 1.48	33.80 ± 2.94 ^a	3275.02 ± 346.92 ^a	52.94 ± 3.00
CCM	100	8.40 ± 1.50	24.50 ± 2.37	2212.80 ± 456.87	54.62 ± 3.31
Nilestriol	0.125	10.60 ± 1.34	34.6 ± 26.70 ^a	3641.62 ± 261.37 ^a	49.68 ± 5.14

注 :n = 10, 与模型组比较, ^aP < 0.01; 与正常对照组比较, ^bP < 0.01

3 讨论

本实验用维甲酸 70 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃 15 d, 动物体重下降, 体毛枯疏, 卵巢指数下降, 血清 ALP 增高, 股骨湿重、干重和灰重均下降, 股骨骨钙含量减少, 实验大鼠出现典型的骨质疏松特征。

Vit K₂ 是谷氨酸-γ-羧化酶的辅酶, 将凝血酶原中谷氨酸残基羧化成 γ-羧化谷氨酸残基, 又是一种骨特异基因的转录调节剂, 通过类固醇及异质物受体(SXR)诱导成骨细胞标记物的表达, 能显著提高血清中的骨钙素含量, 增强骨矿化过程, 对骨骼形成具有重要作用^[5,6]。Vit K₂ 可通过抑制 COX4 (cytochrome oxidase subunit IV) 的表达和前列腺素的合成而抑制破骨细胞。Vit K₂ 特异性诱导破骨细胞的凋亡, 并呈时间依赖性地出现凋亡细胞显著增多, 对单独分离出的破骨细胞也有诱导凋亡功能, 而对基质细胞无此作用, 但 Vit K₂ 可抑制组织蛋白酶 K 的 mRNA 表达, 从而抑制组织蛋白酶溶解骨基质^[7]。Vit K₂ 通过促进成骨细胞的生成及抑制破骨细胞双向调节骨代谢, 从而达到增加骨密度、维持骨健康的作用。骨质疏松患者每天服用 Vit K₂(45 mg/d) 1 年后, 骨密度明显高于对照组, 其增加骨密度的作用优于 α-羟基维生素 D₃(1 μg/d)^[8]。

Vit K₂(20) 1 mg/kg、K₂(35) 0.01 mg/kg 和 CCM 100 mg/kg 灌胃 2 周后, 其血清磷均高于模型组和正常对照组; 与模型组相比, 大鼠血清钙含量增加; 股

骨骨密度均明显升高, 其中 Vit K₂(35) 子宫指数、卵巢指数均明显高于其他各组。本研究表明 Vit K₂ 可以提高血清中钙浓度及明显增加股骨骨密度, 对于骨质疏松有良好的抑制作用, 在同等用量下, Vit K₂ 的活性是 CCM 钙的 10² ~ 10⁴ 倍, 其中 K₂(35) 的抑制作用尤为显著。

【参 考 文 献】

- [1] 李恩, 薛延, 王洪复, 等. 骨质疏松鉴别诊断与治疗. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 87-90.
- [2] 马培奇, 编译. 骨质疏松症治疗药物研究概述. 上海医药, 2008, 29(5): 227-230.
- [3] Allen SP, Maden M, Price JS, et al. A role for retinoic acid in regulating theregeneration of deer antlers. Dev Biol, 2002, 251(2): 409-423.
- [4] 吴波, 徐冰, 黄添友, 等. 维 A 酸致大鼠骨质疏松模型与机理研究. 药学报, 1996, 31(4): 241-245.
- [5] Weber P. Vitamin K and bone health. Nutrition, 2001, 17(10): 880-887.
- [6] 罗晓茹. 维生素 K₂ 在治疗绝经后骨质疏松症中的作用. 国外医学药学分册, 2006, 33(5): 379-380.
- [7] 邹志强. 维生素 K₂ 的研究进展. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(3): 389-392.
- [8] Orimo H, Shiraki M, Fujita T, et al. Clinical evaluation of Menatetrenone in the treatment of involutional osteoporosis—a double-blind multicenter comparative study with 1-α-hydroxy-vitamin D₃ (abstract). J Bone Miner. Res, 1992, 7(Suppl 1): S122.

(收稿日期 2009-04-24)