

· 药物研究 ·

维生素 K2 及其配伍制剂抗实验性骨质疏松症的筛选研究

陈鹏¹ 何波¹ 杨仁华¹ 陆义芹^{1,2} 沈志强^{1*}

(1. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500;

2. 云南省第一人民医院妇产科, 昆明 650032)

中图分类号: R58 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013)05-0500-09

摘要: **目的** 对由维生素 K2、柠檬酸钙、天然维生素 E、维生素 D₃ 及辅酶 Q10 配伍形成的 14 个受试品进行抗去卵巢大鼠高转换型骨质疏松症作用筛选。**方法** 14 个受试品均由昆明云大医药开发有限公司配制提供, 具体为: 受试品 1: 维生素 K2 (80 μg/kg)、受试品 2: 维生素 K2 (80 μg/kg) + 辅酶 Q10 (50 mg/kg)、受试品 3: 维生素 K2 (50 μg/kg) + 柠檬酸钙 (500 mg/kg)、受试品 4: 维生素 K2 (80 μg/kg) + 柠檬酸钙 (500 mg/kg)、受试品 5: 维生素 K2 (50 μg/kg) + 维生素 D₃ (4 μg/kg)、受试品 6: 维生素 K2 (80 μg/kg) + 维生素 D₃ (4 μg/kg)、受试品 7: 维生素 K2 (50 μg/kg) + 维生素 E (40 mg/kg)、受试品 8: 维生素 K2 (80 μg/kg) + 维生素 E (40 mg/kg)、受试品 9: 维生素 K2 (50 μg/kg) + 维生素 E (40 mg/kg) + 维生素 D₃ (4 μg/kg)、受试品 10: 维生素 K2 (80 μg/kg) + 维生素 E (40 mg/kg) + 维生素 D₃ (4 μg/kg)、受试品 11: 维生素 K2 (50 μg/kg) + 维生素 E (40 mg/kg) + 柠檬酸钙 (500 mg/kg)、受试品 12: 维生素 K2 (80 μg/kg) + 维生素 E (40 mg/kg) 组 + 柠檬酸钙 (500 mg/kg)、受试品 13: 维生素 K2 (50 μg/kg) + 维生素 D₃ (4 μg/kg) + 柠檬酸钙 (500 mg/kg)、受试品 14: 维生素 K2 (80 μg/kg) + 维生素 D₃ (4 μg/kg) + 柠檬酸钙 (500 mg/kg)。采用去卵巢 (ovariectomy, OVX) 方法复制大鼠骨质疏松症模型。动物随机分为: 正常对照组、假手术组 (未切卵巢)、去卵巢模型组、30 μg/kg 己烯雌酚阳性药物对照组和 14 个受试品组。受试品以 1 mL/100 g 体重每日灌胃 1 次, 连续 60 d; 正常对照组动物灌胃生理盐水, 连续 60 d; 假手术组和模型组均灌胃给予花生油, 连续 60 d。末次给药后采用双能 X 线检测股骨和腰椎的骨密度 (bone mineral density, BMD) 及骨矿含量 (bone mineral content, BMC)、原子吸收检测股骨骨钙水平。**结果** (1) 对 BMD 及 BMC 的影响: 与模型组比较, 受试品 13 和 14 可明显升高股骨和椎骨的 BMD 及 BMC (与模型组比较, $P < 0.01$), 且受试品 14 的作用强于受试品 13 (与受试品 13 比较, $P < 0.05$)。受试品 1 及由其配伍的受试品 2、4、6、8、10、12 均可增加股骨和椎骨的 BMD 及 BMC ($P < 0.05$, 与模型组比较)。受试品 5 和 9 可以增加股骨和椎骨的 BMD 及 BMC ($P < 0.05$, 与模型组比较), 其作用与受试品 1、2、4、6、8、10、12 基本相当。与模型组比较, 受试品 3、7 和 11 仅增加椎骨的 BMD, 对股骨 BMD 无明显影响。(2) 对股骨重量和骨钙水平的影响: 与模型组比较, 受试品 13 和 14 显著增加股骨的湿重、干重、灰重, 明显提高骨钙水平, 与模型组比较, $P < 0.01$, 且受试品 14 强于受试品 13; 受试品 1 及由其配伍的受试品 2、4、6、8、10、12、受试品 5 和 9 均明显增加股骨的湿重、干重、灰重, 同时可提高骨钙水平, 且作用相当。受试品 3、7 和 11 虽然可增加股骨的湿重和干重, 但对灰重尤其是骨钙水平均无明显影响。**结论** 在本实验条件下, 14 个受试品中, 受试品 13 和 14 作用较强, 且受试品 14 强于受试品 13; 受试品 1、2、4、5、6、8、9、10、12、13 具有基本相当的抗骨质疏松症作用, 但均弱于受试品 14; 在本实验条件下, 受试品 3、7、11 无明显作用。从组分配伍来分析, 80 μg/kg 的维生素 K2 及其配伍制剂均具有明显的增加骨密度和骨钙作用, 其中配伍的维生素 D₃ 和柠檬酸钙具有明显的协同增效作用; 本研究所用剂量的维生素 E 或辅酶 Q10 并不能明显提高维生素 K2 的抗骨质疏松作用。

关键词: 维生素 K2; 柠檬酸钙; 天然维生素 E; 维生素 D₃; 辅酶 Q10; 骨质疏松症; 骨密度; 骨矿含量; 骨钙

*通讯作者: 沈志强, E-mail: shzhq21cn@yahoo.com.cn

Anti-osteoporotic screening study of vitamin K2 and its compatibility of medicines

CHEN Peng¹, HE Bo¹, YANG Renhua¹, LU Yiqin², SHEN Zhiqiang¹

(1. Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, School of Pharmaceutical Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China)

Corresponding author: SHEN Zhiqiang, E-mail: shzhq21cn@yahoo.com.cn

Abstract: To screen the anti-osteoporotic activity of 14 samples, which were consisted of vitamin K2, calcium citrate, natural vitamin E, vitamin D3, and coenzyme Q10, in osteoporotic model rats with high turnover osteoporosis induced by ovariectomy. **Methods** All the 14 samples were provided by the Pharmaceutical Development Company Limited of Yunnan University, including sample 1: vitamin K2 (80 g/kg), sample 2: vitamin K2 (80 g/kg) + coenzyme Q10 (50 mg/kg), sample 3: vitamin K2 (50 g/kg) + calcium citrate (500 mg/kg), sample 4: vitamin K2 (80 g/kg) + calcium citrate (500 mg/kg), sample 5: vitamin K2 (50 g/kg) + vitamin D3 (4 g/kg), sample 6: vitamin K2 (80 g/kg) + vitamin D3 (4 g/kg), sample 7: vitamin K2 (50 g/kg) + vitamin E (40 mg/kg), sample 8: vitamin K2 (80 g/kg) + vitamin E (40 mg/kg), sample 9: vitamin K2 (50 g/kg) + vitamin E (40 mg/kg) + vitamin D3 (4 g/kg), sample 10: vitamin K2 (80 g/kg) + vitamin E (40 mg/kg) + vitamin D3 (4 g/kg), sample 11: vitamin K2 (50 g/kg) + vitamin E (40 mg/kg) + calcium citrate (500 mg/kg), sample 12: vitamin K2 (80 g/kg) + vitamin E (40 mg/kg) + calcium citrate (500 mg/kg), sample 13: vitamin K2 (50 g/kg) + vitamin D3 (4 g/kg) + calcium citrate (500 mg/kg), and sample 14: vitamin K2 (80 g/kg) + vitamin D3 (4 g/kg) + calcium citrate (500 mg/kg). Female Sprague-dawley rats were randomly divided into normal control group, sham operation group, and ovariectomized (OVX) group. Rat osteoporosis model was established using OVX. Rats in OVX group were then randomly divided into model group, 30μg/kg diethylstilbestrol positive control group, and the above 14 test sample groups, respectively. Rats in 14 test sample groups were given a 1ml/100g administration of the samples intragastrically once a day, lasting for 60 days. Normal saline was used in normal control group, and peanut oil was used in sham and model groups, respectively. The detailed grouping was shown in Table 1. Bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were examined by dual-energy X-ray absorptiometry analysis, and bone calcium by atomic absorption, respectively. **Results** Effect on BMD and BMC: as compared with that in model group, test sample 13 and 14 could significantly improve BMD and BMC of the femur and the vertebrae ($P < 0.01$). The effect of test sample 14 was stronger than that of test sample 13 ($P < 0.05$). Test sample 1 and test samples 2, 4, 6, 8, 10, and 12 (combined with the same dose of test sample 1) could increase BMD and BMC of the femur and the vertebrae ($P < 0.01$). Test sample 5 and 9 obtained the similar effect to those of test samples 1, 2, 4, 6, 8, 10, and 12. As compared with model group, test samples 3, 7, and 11 only improved BMD of the vertebrae, but had no effect on BMD of the femur. Effect on femur weight and bone calcium: as compared with that in model group, test samples 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 13, and 14 markedly increased the wet, dry and ash weight of the femur, and elevated the level of bone calcium. Among them, test sample 14 showed the highest activity ($P < 0.05$). Test samples 3, 7 and 11 increased the wet and dry weight, but had no significant effect on ash weight or bone calcium. **Conclusion** Among all the 14 provided samples, test sample 14 shows the strongest anti-osteoporotic effect. Test samples 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12 and 13 have the similar activity, but inferior to test sample 14. Test samples 3, 7 or 11, however, have no significant anti-osteoporotic activity.

Key words: Vitamin K2; Calcium citrate; Natural vitamin E; Vitamin D3; Coenzyme Q10; Osteoporosis; Bone mineral density; Bone mineral content; Bone calcium

骨质疏松(osteoporosis, OP)是以骨量减少、骨组织显微结构退化为特征,以致骨的脆弱性增高而骨折危险性增加的系统性多病因的一种全身骨骼疾病,素有“隐形杀手”之称。随着我国人口寿命的延长及老年型社会的出现,OP的发病率在我国呈明显

增长趋势。目前,全球 60~70 岁的人 1/3 有 OP,80 岁以上的老人的发病率接近 2/3,该病已成为老年人的常见病、多发病之一,WHO 将之列三大老年病之一。OP 是一种退行性全身性疾病,半数以上患者有疼痛症状,尤其是导致骨质疏松性骨折。OP 已

成为威胁中老年人健康、严重影响其生活质量的一个不容忽视的公共健康问题,及早预防和治疗 OP 已成为医学界迫在眉睫的任务。

维生素 K (vitamin K, VK) 是一类具有萘醌 (naphthoquinone) 基团(2-甲基-1,4 萘醌)的衍生物,又名凝血维生素或抗出血维生素,具有促进凝血作用,为体内某些凝血因子合成所必需。1960 年 Bouckaert 等报道维生素 K2 能促进大鼠与家兔的骨折愈合,1975 年 Pettifor 等发现给孕妇服用维生素 K2 拮抗剂华法令能引起新生儿骨骼畸形,首次提出维生素 K 参与人体骨代谢的假说。多数动物和体外实验研究显示,维生素 K2 为一种双向调节药物,即促进骨形成同时抑制骨吸收^[1, 2]。1995 年日本首次将维生素 K2 作为治疗骨质疏松的药物应用。

骨质疏松症患者常伴有维生素 D 缺乏现象,补充维生素 D 必不可少。维生素 D 不但可以促进肠钙吸收与尿钙的重吸收,促进钙盐在骨基质内沉积,同时它还能够调节神经-肌肉组织的协调性。因此,它不但在骨量累积过程中有突出作用,还有一定的预防和减少骨折的作用。此外,补钙对于骨质疏松症患者是较肯定的辅助手段,但仅仅补钙效果不佳,还须结合日光下的运动锻炼,保持对骨骼的应激力,促进钙的摄取、利用。目前,关于维生素 K2 与维生素 D3 及钙制剂联合应用于骨质疏松症,虽有一些基础与临床研究,但结果尚存在争议^[3, 4]。

昆明云大医药开发有限公司以维生素 K2 为主要有效成分,分别配伍了柠檬酸钙、天然维生素 E、维生素 D3 及辅酶 Q10,形成了共 14 个受试品。本研究在前期工作基础上,复制去卵巢大鼠骨质疏松症模型,进行 14 个受试品抗高转换型骨质疏松症作用的筛选实验。

1 材料与方法

1.1 动物

6 月龄雌性 Sprague-dawly (SD) 大鼠,SPF 级,体重为 220-250 g,由昆明医科大学实验动物医学部提供,实验动物生产许可证:SCXK(滇)2005-0008,实验动物使用许可证:SYXK(滇)2005-0001。

1.2 受试品与阳性对照品

14 种受试品的剂量设置、配制方法均由委托方(昆明云大医药开发有限公司)制定、提供,具体详见表 1。己烯雌酚片,规格:0.5 mg/片,批号:20100920,国药准字号:H34021250,合肥久联制药有限公司生产。

1.3 实验仪器

LIBROR AEG-220 型精密电子秤,日本岛津公司产品;Centra[®]MP4R 型离心机,IEC 公司生产;AA-670 型原子吸收分光光度计,日本岛津公司产品;M-525 SII 型马孚炉,美国 NEY 公司;BS210S 型万分之一天平,德国 Sartoris;双能 X 线骨密度测量仪 (EXPERT-XL 型,美国 Lunar 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 采用摘除 SD 大鼠双侧卵巢方法建立大鼠骨质疏松模型:6 月龄雌性大鼠,适应性饲养 2 w 后,随机分为 3 组,即正常对照组、模型组与假手术组 (Sham 组)。按去卵巢 (ovariectomy, OVX) 骨质疏松动物模型要求进行手术,略有改进,即 2% 戊巴比妥钠溶液按 40 mg/kg 腹腔注射麻醉 4 月龄雌性大鼠,俯卧位固定,在背部中 1/3 处剪毛,自腰椎背部中线向下作纵行切口,长 2~3 cm,沿肩脚线分别于两侧肋下剪开腰肌,可见脂肪组织,其包被下深红色颗粒状组织即卵巢,下端与其相连的子宫角,行手术结扎并切断子宫角,完整切除双侧卵巢,切口缝合,完成手术造模。假手术组大鼠行假手术,即采用同样的麻醉和手术入路,找到卵巢后,切除卵巢附近的部分脂肪后即关闭。

术后所有大鼠按 16000 U/100 g 肌肉注射青霉素,1 次/d,连续 3 d,防止术后感染。卵巢切除后,所有造模组大鼠连续 5 d 阴道涂片,处死不符合标准的切除了卵巢的大鼠,并查看卵巢残留情况。无性周期者留之。3 个月后检测骨密度、骨形态计量学判断模型成功与否。造模成功后,进行随机分组。

1.4.2 动物分组:雌性大鼠随机分成 18 组,10 只/组,即:正常对照组;假手术组 (未切卵巢);去卵巢模型组;30 μg/kg 己烯雌酚阳性药物对照组;~ (18) 受试品 1~14 组。第 (3) 至第 (18) 组动物均摘除双侧卵巢造模。

1.4.3 给药途径与方法:14 个受试品按委托方所提供的剂量与制剂直接灌胃,己烯雌酚溶于生理盐水中。造模成功后,受试品及阳性对照品均以 1 mL/100 g 体重每日灌胃 1 次,连续 60 d。正常对照组灌胃给予生理盐水,假手术组和模型组均灌胃给予花生油。每周称体重一次,并根据体重调整灌胃量。

1.4.4 取材:末次灌胃后 2 h,大鼠脱颈处死,摘取股骨 (完整股骨近心端包括股骨头,远心端到膝关节) 和第 2 腰椎 (L₂),用浸有 PBS 缓冲液的纱布包裹后,4℃ 低温保存,以检测骨密度和骨钙含量。

表 1 14 种受试品(花生油配制溶解)
Table 1 Fourteen test samples (preparation with peanut oil)

受试品序号 Sequence Number of test sample	组分及其剂量 Components and doses
受试品 1 Test sample 1	维生素 K2 (80 μg/kg) Vitamin K2 (80 μg/kg)
受试品 2 Test sample 2	维生素 K2 (80 μg/kg) + 辅酶 Q10 (50 mg/kg) Vitamin K2 (80 μg/kg) + coenzyme Q10 (50 mg/kg)
受试品 3 Test sample 3	维生素 K2 (50 μg/kg) + 柠檬酸钙 (500 mg/kg) Vitamin K2 (50 μg/kg) + calcium citrate (500 mg/kg)
受试品 4 Test sample 4	维生素 K2 (80 μg/kg) + 柠檬酸钙 (500 mg/kg) Vitamin K2 (80 μg/kg) + calcium citrate (500 mg/kg)
受试品 5 Test sample 5	维生素 K2 (50 μg/kg) + 维生素 D3 (4 μg/kg) Vitamin K2 (50 μg/kg) + vitamin D3 (4 μg/kg)
受试品 6 Test sample 6	维生素 K2 (80 μg/kg) + 维生素 D3 (4 μg/kg) vitamin K2 (80 μg/kg) + vitamin D3 (4 μg/kg)
受试品 7 Test sample 7	维生素 K2 (50 μg/kg) + 维生素 E (40 mg/kg) Vitamin K2 (50 μg/kg) + vitamin E (40 mg/kg)
受试品 8 Test sample 8	维生素 K2 (80 μg/kg) + 维生素 E (40 mg/kg) Vitamin K2 (80 μg/kg) + vitamin E (40 mg/kg)
受试品 9 Test sample 9	维生素 K2 (50 μg/kg) + 维生素 E (40 mg/kg) + 维生素 D3 (4 μg/kg) Vitamin K2 (50 μg/kg) + vitamin E (40 mg/kg) + vitamin D3 (4 μg/kg)
受试品 10 Test sample 10	维生素 K2 (80 μg/kg) + 维生素 E (40 mg/kg) + 维生素 D3 (4 μg/kg) Vitamin K2 (80 μg/kg) + vitamin E (40 mg/kg) + vitamin D3 (4 μg/kg)
受试品 11 Test sample 11	维生素 K2 (50 μg/kg) + 维生素 E (40 mg/kg) + 柠檬酸钙 (500 mg/kg) Vitamin K2 (50 μg/kg) + vitamin E (40 mg/kg) + calcium citrate (500 mg/kg)
受试品 12 Test sample 12	维生素 K2 (80 μg/kg) + 维生素 E (40 mg/kg) + 柠檬酸钙 (500 mg/kg) Vitamin K2 (80 μg/kg) + vitamin E (40 mg/kg) + calcium citrate (500 mg/kg)
受试品 13 Test sample 13	维生素 K2 (50 μg/kg) + 维生素 D ₃ (4 μg/kg) + 柠檬酸钙 (500 mg/kg) Vitamin K2 (50 μg/kg) + vitamin D ₃ (4 μg/kg) + calcium citrate (500 mg/kg)
受试品 14 Test sample 14	维生素 K2 (80 μg/kg) + 维生素 D ₃ (4 μg/kg) + 柠檬酸钙 (500 mg/kg) Vitamin K2 (80 μg/kg) + vitamin D ₃ (4 μg/kg) + calcium citrate (500 mg/kg)

1.4.5 观测指标

1.4.5.1 骨密度 (bone mineral density, BMD) 及骨矿物质含量 (bone mineral content, BMC):用双能 X 射线骨密度测量仪分别测量离体的大鼠左侧股骨和 L₂ 的 BMD 和 BMC。利用该系统的人体兴趣区软件进行分析。

1.4.5.2 骨钙含量测定:左股骨称湿重并于检测骨密度后置马孚炉 200 ℃ 烘烤 5 h,冷却后再次称重,为干重,继之于 750℃ 烘烤 5 h,冷却后称灰重,之后用火焰原子吸收分光光度法测骨钙。

1.4.6 数据分析:采用 IBM SPSS 20 统计软件进行分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),LSD 方法统计,两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 对骨矿物质密度 (BMD) 的影响

由表 2 可见:去卵巢模型组大鼠股骨和椎骨的

骨密度均显著降低 ($P < 0.01$,与正常对照组或假手术组比较),表明骨质疏松模型复制成功。与模型组比较,30 μg/kg 的阳性对照品己烯雌酚可明显增加股骨和椎骨的骨密度 ($P < 0.01$,与模型组比较)。与模型组比较,受试品 13、14 可明显升高股骨和椎骨的骨密度,与模型组比较, $P < 0.01$,在 14 个受试品中活性相对较强,受试品 14 的作用强于受试品 13。受试品 1【维生素 K2 (80 μg/kg)】及其配伍受试品 2、4、6、8、10、12 均可增加股骨和椎骨的骨密度 ($P < 0.05$,与模型组比较);受试品 5、9 可以增加股骨和椎骨的骨密度 ($P < 0.05$,与模型组比较),其作用与受试品 1、2、4、6、8、10、12 相当。与模型组比较,受试品 3、7 和 11 仅增加椎骨的骨密度 ($P < 0.05$,与模型组比较),对股骨骨密度无明显影响 ($P > 0.05$,与模型组比较)。

2.2 对骨矿物质含量 (BMC) 的影响

由表 3 可见:与正常对照组或假手术组比较,去卵巢模型组大鼠股骨和椎骨的骨矿含量显著减少

表 2 14 种受试品对去势大鼠骨质疏松模型骨密度(g/cm^2)的影响

Table 2 Effect of 14 test samples on bone mineral density (g/cm^2) in ovariectomy-induced osteoporotic rats

组别 Group	腰椎骨密度 BMD of lumbar vertebra	股骨骨密度 BMD of femur
正常对照组 Normal control group	0.22 ± 0.01	0.25 ± 0.01
假手术组 Sham group	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.02
模型对照组 Osteoporotic model group	0.11 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.02 ^a
己烯雌酚对照组 Diethylstilbestrol positive control group	0.19 ± 0.02 ^c	0.20 ± 0.03 ^c
受试品 1 Test sample 1	0.13 ± 0.02 ^b	0.14 ± 0.01 ^b
受试品 2 Test sample 2	0.13 ± 0.02 ^b	0.14 ± 0.02 ^b
受试品 3 Test sample 3	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01
受试品 4 Test sample 4	0.14 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.01 ^b
受试品 5 Test sample 5	0.14 ± 0.02 ^b	0.14 ± 0.02 ^b
受试品 6 Test sample 6	0.14 ± 0.02 ^b	0.15 ± 0.01 ^b
受试品 7 Test sample 7	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01
受试品 8 Test sample 8	0.14 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.02 ^b
受试品 9 Test sample 9	0.15 ± 0.02 ^c	0.15 ± 0.03 ^c
受试品 10 Test sample 10	0.15 ± 0.01 ^c	0.15 ± 0.01 ^c
受试品 11 Test sample 11	0.13 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.01
受试品 12 Test sample 12	0.14 ± 0.02 ^b	0.14 ± 0.01 ^b
受试品 13 Test sample 13	0.16 ± 0.02 ^c	0.15 ± 0.02 ^c
受试品 14 Test sample 14	0.17 ± 0.01 ^{cd}	0.18 ± 0.02 ^{cd}

注: $n=10, \bar{x} \pm s$,与正常对照组或假手术组比较,^a $P<0.01$, compared with normal control group or sham group;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$, compared with model group;与其他 13 个受试品比较,^d $P<0.05$, compared with the other 13 test samples

($P<0.01$)。与模型组比较,30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的己烯雌酚可明显增加股骨和椎骨的骨矿含量($P<0.01$)。受试品 13 和 14 均可显著升高股骨和椎骨的骨矿含量(与模型组比较, $P<0.01$),且受试品 13 的作用弱于受试品 14(与受试品 13 比较, $P<0.05$)。受试品 1 及其配伍受试品 2、4、6、8、10、12 均可增加股骨和

椎骨的股矿含量($P<0.05$,与模型组比较)。受试品 5 和受试品 9 可以增加股骨和椎骨的骨矿含量,其作用与受试品 1、2、4、6、8、10、12 相当。与模型组比较,受试品 3、7 和受试品 11 只增加椎骨的股矿含量,而对股骨的股矿含量无明显影响($P>0.05$)。

表 3 14 种受试品对去势大鼠骨质疏松模型骨矿含量(g)的影响

Table 3 Effect of 14 test samples on bone mineral content (g) in ovariectomy-induced osteoporotic rats

组别 Group	腰椎骨矿含量 BMC of lumbar vertebra	股骨骨矿含量 BMC of femur
正常对照组 Normal control group	0.31 ± 0.03	0.51 ± 0.03
假手术组 Sham group	0.31 ± 0.04	0.53 ± 0.06
模型对照组 Osteoporotic model group	0.19 ± 0.05 ^a	0.36 ± 0.05 ^a
己烯雌酚对照组 Diethylstilbestrol positive control group	0.29 ± 0.02 ^c	0.48 ± 0.05 ^c
受试品 1 Test sample 1	0.25 ± 0.03 ^b	0.41 ± 0.04 ^b
受试品 2 Test sample 2	0.25 ± 0.05 ^b	0.41 ± 0.05 ^b
受试品 3 Test sample 3	0.23 ± 0.05	0.40 ± 0.03
受试品 4 Test sample 4	0.24 ± 0.04 ^b	0.42 ± 0.05 ^b
受试品 5 Test sample 5	0.25 ± 0.04 ^b	0.42 ± 0.04 ^b
受试品 6 Test sample 6	0.26 ± 0.04 ^b	0.42 ± 0.04 ^b
受试品 7 Test sample 7	0.23 ± 0.03	0.40 ± 0.05
受试品 8 Test sample 8	0.25 ± 0.03 ^b	0.41 ± 0.03 ^b
受试品 9 Test sample 9	0.25 ± 0.03 ^b	0.42 ± 0.04 ^b
受试品 10 Test sample 10	0.25 ± 0.03 ^b	0.43 ± 0.06 ^b
受试品 11 Test sample 11	0.24 ± 0.03 ^b	0.40 ± 0.04
受试品 12 Test sample 12	0.25 ± 0.03 ^b	0.41 ± 0.04 ^b
受试品 13 Test sample 13	0.26 ± 0.03 ^c	0.44 ± 0.04 ^c
受试品 14 Test sample 14	0.28 ± 0.02 ^{cd}	0.45 ± 0.02 ^{cd}

$n=10, \bar{x} \pm s$,^a $P<0.01$,与正常对照组或假手术组比较, compared with normal control group or sham group;^b $P<0.05$,^c $P<0.01$,与模型组比较, compared with model group;^d $P<0.05$,与其他 13 个受试品比较, compared with the other 13 test samples.

2.3 对骨重的影响

实验数据经统计学分析,由表 4 可见:去卵巢模型组大鼠股骨的湿重、干重及灰重均显著减少($P < 0.01$,与正常对照组或假手术组比较)。与模型组比较,阳性对照品己烯雌酚($30\text{ }\mu\text{g/kg}$)可明显增加股骨的湿重、干重及灰重($P < 0.01$)。与模型组比较,受试品 13、14 显著增加湿重、干重及灰重,活性

相对最强($P < 0.01$),且受试品 14 强于受试品 13;受试品 1 及其配伍受试品 2、4、6、8、10、12 均可增加股骨的湿重、干重及灰重($P < 0.05$);受试品 5、9 亦能增加股骨的湿重、干重及灰重($P < 0.05$),作用与受试品 1、2、4、6、8、10、12 相当。与模型组比较,受试品 3、7 和 11 增加股骨的湿重和干重($P < 0.05$),但对灰重均无明显影响($P > 0.05$)。

表 4 14 种受试品对去势大鼠骨质疏松模型股骨重量(g)的影响
Table 4 Effect of 14 test samples on femur weight (g) in ovariectomy-induced osteoporotic rats

组别 Group	湿重 Wet weight	干重 Dry weight	灰重 Ash weight
正常对照组 Normal control group	0.913 ± 0.091	0.693 ± 0.078	0.527 ± 0.079
假手术组 Sham group	0.922 ± 0.087	0.688 ± 0.059	0.530 ± 0.061
模型对照组 Osteoporotic modelgroup	0.684 ± 0.085 ^a	0.445 ± 0.077 ^a	0.314 ± 0.082 ^a
己烯雌酚对照组 Diethylstilbestrol positive control grou	0.803 ± 0.087 ^c	0.637 ± 0.076 ^c	0.469 ± 0.079 ^c
受试品 1 Test sample 1	0.753 ± 0.046 ^b	0.519 ± 0.071 ^b	0.395 ± 0.066 ^b
受试品 2 Test sample 2	0.757 ± 0.058 ^b	0.528 ± 0.082 ^b	0.404 ± 0.081 ^b
受试品 3 Test sample 3	0.754 ± 0.054 ^b	0.517 ± 0.067 ^b	0.380 ± 0.067
受试品 4 Test sample 4	0.757 ± 0.051 ^b	0.530 ± 0.075 ^b	0.391 ± 0.063 ^b
受试品 5 Test sample 5	0.769 ± 0.041 ^b	0.524 ± 0.064 ^b	0.388 ± 0.046 ^b
受试品 6 Test sample 6	0.760 ± 0.043 ^b	0.530 ± 0.048 ^b	0.391 ± 0.068 ^b
受试品 7 Test sample 7	0.752 ± 0.052 ^b	0.516 ± 0.085	0.381 ± 0.073
受试品 8 Test sample 8	0.749 ± 0.040 ^b	0.519 ± 0.051 ^b	0.389 ± 0.068 ^b
受试品 9 Test sample 9	0.769 ± 0.054 ^b	0.542 ± 0.064 ^c	0.406 ± 0.063 ^b
受试品 10 Test sample 10	0.771 ± 0.050 ^b	0.536 ± 0.079 ^b	0.398 ± 0.085 ^b
受试品 11 Test sample 11	0.756 ± 0.058 ^b	0.518 ± 0.073 ^b	0.356 ± 0.075
受试品 12 Test sample 12	0.759 ± 0.043 ^b	0.522 ± 0.071 ^b	0.391 ± 0.071 ^b
受试品 13 Test sample 13	0.776 ± 0.051 ^c	0.539 ± 0.065 ^c	0.427 ± 0.091 ^c
受试品 14 Test sample 14	0.781 ± 0.059 ^c	0.561 ± 0.078 ^{cd}	0.434 ± 0.064 ^{cd}

注: $n = 10, \bar{x} \pm s$,与正常对照组或假手术组比较,^a $P < 0.01$, compared with normal control group or sham group;与模型组比较,^b $P < 0.05$,
^c $P < 0.01$,compared with model group;与其他 13 个受试品比较,^d $P < 0.05$,compared with the other 13 test samples

2.4 对骨钙水平的影响

由表 5 可见:去卵巢模型组大鼠股骨的骨钙水平均显著降低($P < 0.01$,与正常对照组或假手术组比较)。与模型组比较,阳性对照品己烯雌酚(30

$\mu\text{g/kg}$)可明显增加骨钙水平($P < 0.01$)。与模型组比较,受试品 13、14 明显增加骨钙水平($P < 0.01$),受试品 13 活性弱于受试品 14;受试品 1 及其配伍受试品 2、4、6、8、10、12、受试品 5 和 9 均明显

增加骨钙水平($P < 0.05$)。与模型组比较,受试品 3、7 和受试品 11 组的骨钙水平均无明显变化($P > 0.05$)。

表 5 14 种受试品对去势大鼠骨质疏松模型股骨骨钙含量的影响

Table 5 Effects of 14 test samples on bone calcium content of femur in ovariectomy-induced osteoporotic rats

组别 Group	骨钙含量(%) Content of bone calcium (%)
正常对照组 Normal control group	22.5 ± 3.10
假手术组 Sham group	22.7 ± 2.87
模型对照组 Osteoporotic model group	14.8 ± 3.05 ^a
己烯雌酚对照组 Diethylstilbestrol positive control group	19.9 ± 2.02 ^c
受试品 1 Test sample 1	17.2 ± 1.68 ^b
受试品 2 Test sample 2	17.7 ± 2.49 ^b
受试品 3 Test sample 3	17.1 ± 2.23
受试品 4 Test sample 4	17.7 ± 2.45 ^b
受试品 5 Test sample 5	17.8 ± 2.70 ^b
受试品 6 Test sample 6	17.9 ± 2.23 ^b
受试品 7 Test sample 7	17.2 ± 2.57
受试品 8 Test sample 8	17.6 ± 2.27 ^b
受试品 9 Test sample 9	17.9 ± 2.72 ^b
受试品 10 Test sample 10	17.9 ± 2.84 ^b
受试品 11 Test sample 11	16.7 ± 2.91
受试品 12 Test sample 12	17.4 ± 2.17 ^b
受试品 13 Test sample 13	18.5 ± 2.27 ^c
受试品 14 Test sample 14	19.8 ± 2.37 ^{cd}

注: $n = 10$, $\bar{x} \pm s$,与正常对照组或假手术组比较, ^a $P < 0.01$, compared with normal control group or sham group;与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$, compared with model group;与其他 13 个受试品比较, ^d $P < 0.05$, compared with the other 13 test samples

3 讨论

1960 年,研究发现维生素 K 除凝血功能之外,尚有促进骨形成、抑制骨吸收的作用,能防治多种原

因引起的骨质疏松症,能与其它多种药物配合使用具有协同或增强效应。据此推测,维生素 K 对于骨骼正常生理功能的维持可能具有重要的意义。研究报道维生素 K2 通过激活孕烷 X 受体(SXR),调节成骨细胞的骨标记物基因的表达来促进骨形成,即维生素 K 通过 SXR 对骨形成进行着基因水平的调控^[5, 6],维生素 K2 可以特异性地诱导破骨细胞的凋亡,并呈时间依赖关系,而且维生素 K2 能抑制破骨细胞中组织蛋白酶 K mRNA 的表达,可通过抑制骨吸收激活 IL-1、IL-6 等因子来抑制破骨细胞活性从而抑制骨吸收^[7]。临床研究结果表明 45 mg/d 维生素 K2 持续 24 个月治疗绝经后妇女骨质疏松,可以降低椎体骨折发生率,45 mg/d 维生素 K2 持续 12-24 个月,椎体骨密度(BMD)维持原状或仅轻度升高,提示维生素 K2 可以改善骨质量,降低骨质疏松及骨折的风险^[8]。

维生素 D 不但可以促进肠钙吸收与尿钙的重吸收,促进钙盐在骨基质内沉积,同时它还能够调节神经-肌肉组织的协调性。因此,它不但在骨量累积过程中有突出的作用,还有一定的预防跌倒、减少骨折的作用。在骨质疏松症患者中常存在严重的维生素 D 缺乏现象,因此,补充维生素 D 显得必要。如果存在维生素 D 羟化酶活性障碍,则宜补充活性维生素 D 制剂,如骨化三醇、阿法骨化醇等。但需注意,过量补充可能导致维生素 D 中毒的危险。

体外、动物实验肯定了维生素 K 与维生素 D 联合使用的协同作用。在体外实验中,1,25(OH)₂D₃ 能增强维生素 K2 对骨膜成骨细胞的矿化作用^[9]。在去卵巢大鼠动物模型中,维生素 K2 对股骨 BMD 的作用受血浆中 25(OH)D₃ 水平的影响^[10]。虽然至今没有关于维生素 K 与活性维生素 D3 合用对去卵巢动物模型治疗效果的报道,但二者合用的预防作用已被去卵巢大鼠动物实验所证实。Matsunaga 等^[11] 和 Hara 等^[12] 均报道了维生素 K2 与活性维生素 D3 合用阻止绝经早期骨丢失和改善骨的机械性能的协同作用,效果优于单一用药。

国内外许多新研究对补钙治疗 OP 的疗效提出了质疑,结论是无法证实钙能有效预防骨量减少。人体对钙元素吸收的减少是骨骼系统退变的一个重要因素,就 OP 而言,体内激素调节紊乱导致的内分泌代谢异常才是真正的发病原因。这种代谢异常使得骨骼对钙元素的摄取、吸收和利用能力下降,以致出现骨骼的病变。因此,OP 的治疗应强调有效提高骨骼对钙元素的摄取、利用能力,仅通过口服单纯补

钙,是无法纠正骨骼对钙元素的利用障碍的,必须同时应用防治骨质疏松症的药物。令人吃惊的是,美国、瑞士等西方发达国家在近年研究中发现:钙不仅不能有效地降低 OP 骨折的发生率,相反,OP 患者在摄入高钙后髌部骨折的危险性上升了 50%,髌部骨折的发生率随钙剂的高量摄入而明显增加。而对于高血钙者和长期卧床的病人,以及骨折初期患者,不可轻易补钙。

维生素 K2、维生素 D3 及钙对骨质疏松均有一定的防治作用,由于作用机制不同,其联合作用成为当前研究的热点。该方面的研究多集中于动物实验研究。Takee 等^[3]通过配伍配比实验研究发现三者联合应用明显提高骨强度。CT 扫描发现联合应用组动物的骨小梁体积、骨小梁数量明显提高,骨小梁间距则显著降低,提示联合摄取钙、维生素 K2 和维生素 D3 可更好地预防骨质疏松性骨折。同时补充足量的钙对维生素 K2 与活性维生素 D3 协同效应的发挥可能有利,刺激了骨的矿化。但日本学者桥本淳等对类风湿关节炎继发骨质疏松患者分别用维生素 K2 与维生素 D3 组合及羟乙磷酸盐、维生素 D3 组合,用骨代谢标记检测其临床效果,结果显示活性维生素 D3 与羟乙磷酸盐合用组自 7 个月以后,骨钙素、尿游离脱氧吡啶酚均下降,与单独应用羟乙磷酸盐的结果一致。而活性维生素 D3 与维生素 K2 合用后骨钙素呈上升趋势,而尿游离脱氧吡啶酚水平则明显增加。

总之,维生素 K2 与活性维生素 D3 及钙制剂的合用在治疗骨质疏松上的疗效仍然需要大规模的临床循证医学证据。

本研究应用 OVX 复制人类 PMO 模型,由于 OVX 大鼠体内雌性激素急剧减少导致对破骨细胞的抑制作用减弱,破骨细胞活性大大增强,骨吸收亢进而出现的代偿性骨形成增强,表现为骨的高转换状态。当骨吸收大于骨形成,骨代谢的平衡状态被破坏,则导致骨量丢失,形成骨高转换型骨质疏松。该模型与人类绝经后骨质疏松相似,具有方便性、关联性和适合性三大特点,是目前研究骨质疏松症的“金模型”。

由于 OVX 后骨量丢失主要发生在以骨小梁为主的松质骨,松质骨处于高转换状态,骨吸收大于骨形成导致骨丢失,而皮质骨代谢却不同,松质骨骨量的减少造成皮质骨受力明显增加,加之体重的增加,皮质骨发生适应性变化,骨内膜吸收增加,骨髓腔面积增大,骨外膜成骨增加,早期皮质骨骨量不减少,

甚至增加,所以总的骨量增加,但又由于松质骨比皮质骨的表面积极大得多,所以 BMD 可以准确地反映单位面积的骨骼变化,而 BMC 主要反映大鼠整体的骨量变化。

本实验结果显示,与模型组比较,受试品 13 和 14 显著增加股骨和椎骨的骨密度,且提高股骨的湿重、干重、灰重,骨钙水平亦明显提高,与模型组比较, $P < 0.01$,提示在 14 个受试品当中,受试品 13 和 14 活性相对较强,且受试品 14 强于受试品 13。受试品 1【维生素 K2 (80 $\mu\text{g}/\text{kg}$)】及其配伍受试品 2、4、6、8、10、12、受试品 5 和受试品 9 也能增加骨密度和骨钙水平,同时可提高股骨的湿、干、灰重,且作用基本相当。受试品 3、7 和受试品 11 只增加椎骨的骨密度和股骨含量,而对股骨的骨密度和股骨含量均无明显影响,提示这 3 种受试品对骨质量无明显改善作用。从组分配伍来分析,80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的维生素 K2 及其配伍制剂均具有明显的增加骨密度和骨钙作用,其中配伍的维生素 D3 具有显的协同增效作用;维生素 E 或辅酶 Q10 并不能明显提高维生素 K2 的抗骨质疏松作用。

骨形态计量学是目前各种骨代谢性疾病诊断研究的最有效方法,也是药效学研究的“黄金标准”。骨生物力学是检测骨功能改变如骨折的量化指标,其特性是反映骨的生长代谢情况的一个重要指标,骨生物力学与骨组织形态学结合在一起,可较全面反映骨生理、病理与功能的变化,因此,骨生物力学性能的变化应作为评价骨质疏松的一个重要而特殊的指标。综上,在本筛选研究的基础上,对受试品 14 还需增加骨组织病理学与骨形态计量学检测、股骨及椎骨的骨组织力学性能的检测,如此才能客观科学地评价药物对骨质疏松症的治疗作用。

【参 考 文 献】

- [1] Koshihara Y, Hoshi K. Vitamin K2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro. J Bone Miner Res, 1997, 12:431-438.
- [2] Takeuchi Y, Suzawa M, Fukumoto S, et al. Vitamin K2 inhibits adipogenesis, osteoclastogenesis, and ODF/RANK ligand expression in murine bone marrow cell cultures. Bone, 2000, 27:769-776.
- [3] Takee A, Hirano J, Uchikura C, et al. Effects of drug treatment on bone strength and structural changes with aging: an experimental study in rats. J Orthop Sci, 2002, 7(5):544-548.
- [4] Zou ZQ, Fu SC, Liu ZH. The research progress of vitamin K2. Chin J Osteoporos, 2005, 11(3):389-392.
- [5] Michelle M, Aixu S, Zhou CC, et al. Vitamin K2 regulation of

bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. J Biol Chem, 2003, 278(45):43919-43927.

[6] Tomoe I, Kuniko HI, Kazuhiro I. Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. J Bio Chem, 2006, 281(25):16927-16934.

[7] Reddi K, Henderson B, Meghji S, et al. Interleukin 6 production by lipopolysaccharide-stimulated human fibroblasts is potently inhibited by naphthoquinone (vitamin K) compounds. Cytokine, 1995, 7:287-290.

[8] Wnelan AM, Jurgens TM, Bowles SK. Natural health products in the prevention and treatment of osteoporosis: systematic review of randomized controlled trials. Ann Pharmacother, 2006, 40:836-849.

[9] Koshihara Y, Hoshi K, Shiraki M. Enhancement of mineralization on human osteoblasts by vitamin K2 (menaquinone 4). J Clin Exp Med, 1992, 161:439-440.

[10] Hara K, Akiyama Y, Tomiuga T, et al. Influence of vitamin D3 on inhibitory effect of vitamin K2 on bone lose in ovariectomized rats. Folia Pharmacol Jpn, 1994, 104:101-109.

[11] Matsunaga S, Ito H, Sakou T. The effete of vitamin K and D supplementation on ovariectomy-induced bone loss. Calcif Tissue Int, 1999, 65:285-289.

[12] Hara K, Kobayashi M, Akiyama Y. Effect of combined treatment with vitamin K2 and 1 α -(OH)-vitamin D3 on bone lose in ovariectomized rats. Foila Pharmacol Jpn, 2001, 118:231-240.

(收稿日期:2012-12-18)

(上接第 490 页)

椎体后壁单线影。(3)椎体单双侧的选择 对于骨折部位靠近单侧椎弓根的椎体,可行单侧经椎弓根穿刺;对于胸椎,因其椎体较小经肋横关节即可到达椎体中央,多选择单侧经椎弓根穿刺;对于腰椎,由于其椎体较大常需选择双侧经椎弓根穿刺;对于后凸畸形明显的压缩骨折球囊应尽可能靠近椎体中前1/3以纠正后凸畸形。(4)穿刺点及穿刺径路 入点为病椎的横突与上关节突交界的外缘,位于椎弓根上外壁与肋-横突关节之间;沿肋-横突关节间隙穿刺进入椎体,达对侧皮质,使球囊置于病椎椎体中央。(5)病椎选择 对于多椎体压缩呈后凸畸形患者,应首先根据症状体征结合相关影像学确定所要治疗的病椎,一般避免多个相邻椎体同时治疗,以防过度降低椎体间的生理弹性,而诱发其他椎体骨折,加重病变。(6)骨水泥的量 椎体大小、压缩程度及穿刺针位置差别均可能影响骨水泥的量。我们以骨水泥扩散轮廓接近椎体后壁或出现外漏作为停止注射的标志。本组中未出现穿刺相关副损伤,可能与样本量小有关,此外,透视下精确的穿刺操作是避免穿刺损伤的重要保证。

总之,单、双侧 PKP 术治疗骨质疏松椎体压缩骨折均可迅速改善临床症状,重建脊柱稳定性,减少卧床时间,改善活动能力,两种术式都是有效、安全值得推广应用的微创治疗技术。

development of percutaneous vertebroplasty. Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19(5):392-394.

[2] Phillips FM, Todd Wetzel F, Lieberman I, et al. An in vivo comparison of the potential for extravertebral cement leak after vertebroplasty and kyphoplasty. Spine, 2002, 27:2173-2178.

[3] Phillips FM, Minimally invasive treatments of osteoporotic vertebral compression fractures. Spine, 2003, 28:S45-S53.

[4] Phillips FM, Ho E, Campbell HM, et al. Early radiographic and clinical results of balloon kyphoplasty for the treatment of osteoporotic vertebral compression fractures [J]. Spine, 2003, 28(19):2260-2265.

[5] Papadopoulos EC, Edobor-Osula F, Gardner MJ, et al. Unipedicular balloon kyphoplasty for the treatment of osteoporotic vertebral compression fractures; early results [J]. J Spinal Disord Tech, 2008, 21(8):589-596.

[6] Song BK, Eun JP, Oh YM. Clinical and radiological comparison of unipedicular versus bipedicular balloon kyphoplasty for the treatment of vertebral compression fractures [J]. Osteoporos Int, 2009, 20(10):1717-1723.

[7] Ge Zhao-hui, Zhao Haoning, Zhan Xuehua, et al. Kyphoplasty through unilateral extrapedicular approach in the treatment of 38 patients with thoracic vertebral compression fracture. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009, 13(48):9536-9540.

[8] Shen Yong, Liu Fajing, Zhang Yingyi, et al. Outcomes of bilateral percutaneous kyphoplasty for osteoporotic vertebral compression fractures. Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2011, 21(3):202-204.

(收稿日期:;2012-12-08)

【 参 考 文 献 】

[1] Ren Hu, Shen Yong, Yang Da-long. Clinical application and

维生素K2及其配伍制剂抗实验性骨质疏松症的筛选研究

作者：[陈鹏](#)，[何波](#)，[杨仁华](#)，[陆义芹](#)，[沈志强](#)，[CHEN Peng](#)，[HE Bo](#)，[YANG Renhua](#)，[LU Yiqin](#)，[SHEN Zhiqiang](#)

作者单位：[陈鹏, 何波, 杨仁华, 沈志强, CHEN Peng, HE Bo, YANG Renhua, SHEN Zhiqiang\(昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明, 650500\)](#)，[陆义芹, LU Yiqin\(昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明, 650500; 云南省第一人民医院妇产科, 昆明, 650032\)](#)

刊名：[中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名：[CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS](#)

年，卷(期)：2013, 19(5)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201305018.aspx