

· 综述 ·

维生素 K2(MK-7)防治骨质疏松的作用机制研究进展

周建烈^{1*} 陈杰鹏² 段丽丽² 张美侠³ 曲国春⁴ 徐峰⁵ 邓意辉⁵

- 1.《今日维生素 K2》网站,广东 汕头 515000
2. 广东双骏生物科技有限公司,广东 汕头 515000
3. 中国医科大学代谢病分子机制与药物研究所,辽宁 沈阳 110122
4. 北京军区空军医院,北京 100061
5. 沈阳药科大学维生素 K2 研究中心,辽宁 沈阳 110016

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 04-0539-07

摘要: 维生素 K2 具有抗骨质疏松的骨骼健康效应。在维生素 K2 系列中 MK-7 的活性最强。经成骨细胞、破骨细胞培养的体外机制分析及去卵巢骨质疏松模型、去神经骨质疏松模型、悬吊骨质疏松模型、肥胖骨质疏松模型和临床研究,揭示 MK-7 抗骨质疏松的作用机制:① 通过维生素 K2 依赖性蛋白的 γ -羧基化途径,将骨钙素分子中的谷氨酸残基羧化;② 通过刺激成骨细胞分化、调控骨细胞外基质矿化、上调骨标志物基因表达、抑制破骨细胞生成,促进骨形成和降低骨吸收。

关键词: 维生素 K2;MK-7;骨质疏松症;作用机制

Update on the mechanism of vitamin K2 (MK-7) in preventing and treating osteoporosis

ZHOU Jianlie^{1*}, CHEN Jiepeng², DUAN Lili², ZHANG Meixia³, QU Guochun⁴, XU Feng⁵, DENG Yihui⁵

- 1.《Vitamin K2 Today》Website, Shantou 515000
2. Guangdong Sungen Bioscience Co., Ltd, Shantou 515000
3. Institute of Molecular Mechanisms and Pharmaceuticals of Metabolic Diseases, Chinese Medical University, Shenyang 110122
4. Air Force Hospital of Beijing Military Region, Beijing 100061
5. Center of Vitamin K2 Research, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

* Corresponding author: ZHOU Jianlie, Email: jlzhou201@hotmail.com

Abstract: Vitamin K2 plays anti-osteoporosis effect on bone health. MK-7 has the strongest activity in vitamin K2 series. The mechanism of anti-osteoporosis of MK-7 was revealed by in vitro analysis of osteoblasts and osteoclasts culture, ovariectomized osteoporosis model, denervated osteoporosis model, suspended osteoporosis model, obese osteoporosis model and clinical research. The mechanism of anti-osteoporosis of MK-7: ① γ -Carboxylation of glutamate residue in osteocalcin molecule through the carboxylation pathway of vitamin K2-dependent protein; ② Inhibiting osteoclast formation, promoting bone formation and reducing bone resorption, through stimulation of osteoblast differentiation, regulation of bone extracellular matrix mineralization and up-regulation of gene expression of bone markers.

Key words: vitamin K2; MK-7; osteoporosis; mechanism

维生素 K2,也称甲基萘醌(menaquinone, MK),作用于肝外组织(骨和血管等器官),将无机钙与有机蛋白结合成骨基质和阻止血管钙化。在正常剂量下,维生素 K2 不会影响肝脏凝血因子的形成。维生素 K2 中 MK-7 来源于合成与发酵,发酵的 MK-7 最好的来源是纳豆^[1],MK-7 比 MK-4 具有更高的生

物利用度、更长的半衰期、更强的抗骨质疏松活性。MK-7 能通过刺激成骨细胞分化、调控骨细胞外基质矿化、上调骨标志物基因表达、抑制破骨细胞生成,促进骨形成、抑制骨吸收,具有防治骨质疏松症的作用。

1 MK-7 参与骨代谢

MK-7 以不同的方式参与骨转换的合成代谢,促进成骨细胞分化、上调成骨细胞特异基因转录、激

* 通信作者: 周建烈, Email: jlzhou201@hotmail.com

活骨矿化等过程。MK-7可显著增加成骨细胞的蛋白质含量、碱性磷酸酶活性、骨钙素和DNA含量;MK-7能刺激成骨细胞的骨形成,对骨组织和成骨细胞的MC3T3-E1细胞具有合成代谢作用^[2]。

MK-7通过刺激成骨细胞分化促进骨形成,提高骨形成标志物水平(例如碱性磷酸酶、胰岛素样生长因子),增强骨转换^[3],通过 γ -谷氨酰羧基化调节细胞外骨骼基质矿化^[4]。MK-7还可以通过其抗分解代谢活性(减少破骨细胞分化和抑制成骨细胞凋亡),抑制骨吸收^[3]。

2 MK-7防治骨质疏松症的作用机制

2.1 维生素K2依赖性蛋白(VK2DP)的作用

维生素K2依赖性蛋白主要有骨钙蛋白(OC)和基质Gla蛋白(MGP)^[5-7]。骨钙蛋白(骨钙素)也称为骨Gla蛋白(含有 γ -羧基谷氨酸的骨基质蛋白),是骨骼内一种主要的非胶原蛋白,由成骨细胞和一些其他细胞分泌产生^[8]。维生素K2是骨钙素 γ -羧基化的关键。未羧化骨钙素不能在骨组织中结合羟基磷灰石^[9-10],羧化骨钙素才能结合羟基磷灰石晶体中的钙离子,从而发挥其调节骨细胞外基质组成与羟基磷灰石晶体的大小和形状的作用^[4,11]。活性维生素D $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ 能够调控骨钙蛋白基因的转录和翻译^[12],但其与钙离子结合的能力取决于负责骨钙蛋白分子在位置17、21和24的三个谷氨酸残基被 γ -羧基化的状况^[4]。骨钙素除对骨代谢起作用外,还在不同生理活动中(如葡萄糖代谢^[10]、能量代谢、生育能力^[13]、异位钙化^[14])起着重要作用。根据它们的羧基化程度,各种形式的骨钙蛋白与钙离子的亲和力也不同。由于未羧化和羧化不全的骨钙蛋白对羟基磷灰石亲和力低,它们容易释放进入血液循环。因此,循环骨钙蛋白是一种很好的骨形成生化标志物。血浆骨钙蛋白浓度与骨转换和骨代谢有关,未羧化骨钙蛋白浓度依赖于MK-7水平^[11,15],它被认为是维生素K₂营养状态的指标^[16]。基质Gla蛋白(MGP)是一种肝外基质Gla蛋白,由软骨细胞、破骨细胞和血管平滑肌细胞合成。MGP能抑制动脉血管壁中层钙化和软骨钙化,同时促进骨代谢正常。羧化MGP具有最佳的生物活性^[17-18]。

2.2 MK-7对成骨细胞功能的影响

MK-7影响成骨细胞的增殖和分化,阻止成骨细胞凋亡,能以剂量依赖性方式抑制Fas介导的成骨细胞凋亡^[19-20],能更有效地改善成骨细胞功

能^[21]。在成骨细胞培养基中加入维生素K2可增加碱性磷酸酶活性^[20,22-23]和增加骨合成代谢标志物水平(如骨钙蛋白)^[24-25]。碱性磷酸酶活性越高,骨有机基质和骨矿基质形成越多,骨钙蛋白和羟基磷灰石沉积也越多。维生素K2在成骨细胞功能中的重要作用需通过 γ -羧基化途径。维生素K2通过上调骨标志物基因,行使某些骨保护功能。维生素K2能激活甾体和外源性受体(SXR)^[21,26-29],调控成骨细胞生物标志物基因和细胞外基质相关基因的转录。外源性受体(SXR)也称为孕烷X受体(PXR)。PXR敲除的小鼠研究^[30]显示,PXR是调节基因转录的核受体,在骨代谢调节中具有保护作用^[31]。另外,维生素K2还可以诱导CYP3A4(SXR靶基因)上调、激活MSX2(PXR靶基因)^[21]、上调细胞粘素C和骨形态发生蛋白-2(BMP-2)基因表达^[26]。

此外,还有与 γ -羧基化机理不同的独立途径。维生素K2能通过刺激细胞因子[如骨保护素(OPG)]和抑制NF- κ B(细胞因子诱导的核因子)配体受体激动剂(RANKL)在成骨细胞/破骨细胞中的表达,帮助骨形成和抑制骨吸收,同时也促进成骨细胞分化^[20,24]。维生素K2可抑制成骨细胞的NF- κ B活化^[32],通过对成骨细胞诱导增殖、抑制凋亡和增加表达,来改善成骨细胞的功能。维生素K2可调节骨细胞的骨标志物转录^[29],促进成骨细胞向骨细胞转化和增加骨样细胞的数量^[33]。

2.3 维生素K2对破骨细胞功能的影响

维生素K2抑制破骨细胞的骨吸收机制包括:①维生素K2可以直接或间接地抑制破骨细胞形成,可干扰RANKL的表达和上调OPG在破骨细胞前体中表达;②在成骨细胞培养基中,维生素K2可减少抗酒石酸酸性磷酸酶阳性(TRAP+)细胞的增殖,并降低其活性^[20,23-34];③维生素K2通过剂量依赖方式诱导骨吸收因子[如PGE₂、IL1 α 和1,25(OH)₂D₃]的产生,来抑制骨吸收^[20,35-37]。

成骨细胞培养研究^[23,34-38]显示,加入维生素K2能抑制破骨细胞的骨吸收,下调细胞因子诱导的NF- κ B活化,抑制骨吸收。NF- κ B信号转导途径的激活是破骨细胞形成必不可少的。维生素K2对骨丢失的抑制作用可能与 γ -羧基化机制无关,与维生素K2侧链触发有关^[36]。

3 MK-7防治骨质疏松症的细胞学研究

MK-7已被证明可以预防卵巢切除大鼠的骨质疏松症。Yamaguchi等^[2]对大鼠股骨干和股骨干骺

端组织培养 48 h 后得出结论,认为 MK-7 在体外对骨组织和成骨细胞 MC3T3-E1 具有促合成代谢作用,促进了成骨细胞的骨形成;另外, Yamaguchi 等^[39]通过 MK-7 对体外培养的大鼠股骨破骨细胞样细胞形成和破骨细胞的骨吸收影响研究,得出 MK-7 对体外破骨细胞骨吸收具有抑制作用的结论;2001 年、2002 和 2003 年 Yamaguchi 等^[2,40-41]对大鼠股骨干骺端组织培养 48 h 后,认为 MK-7 对体外培养的老年雌性大鼠股骨组织的骨形成具有促进作用。MK-7 可能对随年龄增加而出现的骨骼退行性变化起到预防作用,对骨吸收因子诱导的骨吸收具有直接抑制作用;2011 年 Yamaguchi 等^[32]在对成骨细胞和破骨细胞的形成和作用途径研究时,认为维生素 K2 具有以下作用:① 通过下调细胞因子诱导的 NF- κ B 激活;② 通过增加 NF- κ B mRNA(通过与 γ -羧基化无关的途径完成的);③ 通过防止由转化生长因子- β (TGF- β)或骨形态发生蛋白-2(BMP-2)诱导的 SMAD 信号传导的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的抑制;④ 通过拮抗破骨细胞前体中 NF- κ B 配体(RANKL)诱导 NF- κ B 活化的受体激活剂。最终得出结论,认为维生素 K2 具有促进骨形成和抗骨吸收的双重作用,能调节 NF- κ B 信号转导,改善病理性的骨丢失,促进骨骼健康。Ichikawa 等^[21]认为维生素 K2 在骨形成中作为细胞外基质相关基因的转录调节因子,参与了胶原蛋白的合成。其研究结果显示:① MK-7 通过增强成骨细胞功能,促进了骨形成;② MK-7 能上调成骨细胞中 SXR 靶基因(如 CYP3A4);③ 维生素 K2 可促进胶原蛋白在成骨细胞 MC63 细胞中积累。Katsuyama 等^[29]通过检测 MK-7 对成骨细胞基因表达的影响,得出由于 MC3T3E1 细胞具有 MK-7 的核结合受体, MK-7 通过上调 BMP2 的表达,间接影响了成骨细胞 MC3T3E1 的细胞功能。其研究结果表明:① 对照组与 MK-7 组诱导的 MC3T3E1 细胞基因表达具有差异;② 在给予 MK-7 后 24 h, MK-7 上调韧带素 C 和 BMP2 的表达,下调基因二聚糖和丁酸亲和素的表达;③ MK-7 组细胞中韧带素 C 水平高于对照组细胞;④ 与对照组相比, MK-7 组细胞中信号转导系统 BMP2 mRNA 表达更高;⑤ MK-7 组细胞磷酸化 Smad1 水平比对照组细胞更高。Katsuyama 等^[42]通过应用纯的 MK-7 评估其对成骨细胞 MC3T3E1 的直接作用,认为 MK-7 可能直接作用于 MC3T3E1 细胞,刺激成骨细胞分化,而非增殖。其研究结果表明:① MK-7 可诱导骨钙素(OC)、骨保护素(OPG)、

NF- κ B 配体(RANKL)受体激活物和 RANK 的表达;② MK-7 能提高 OC 和 RANKL 蛋白水平,但这种作用被抗 RANK 抗体所抑制时, MK-7 可逆转这种抑制作用。

4 MK-7 防治骨质疏松症的动物实验研究

4.1 卵巢切除(OVX)大鼠模型研究

Yamaguchi 等^[43-44]通过给予卵巢切除大鼠含有发酵大豆[纳豆,含 MK-7 (9.4 μ g/100 g)]不添加或添加 MK-7,持续 77 d 和 150 d,认为膳食 MK-7 的摄入对卵巢切除所致的骨丢失有预防作用,这种预防作用可能伴有 MK-7 降解形成 MK-4。Tsukamoto^[45]通过研究卵巢切除大鼠长期喂食 MK-7 对骨丢失的影响,发现卵巢切除大鼠和正常大鼠的血清 MK-7 水平和 γ -羧化骨钙素(骨形成的生物标志物)浓度都显著升高,认为 MK-7 可能在预防年龄相关的骨丢失中发挥重要作用。Asawa 等^[23]的研究认为维生素 K2 能识别骨骼中的靶细胞(成骨细胞),从而能够抑制卵巢切除术引起的骨丢失。Akiyama 等^[38]对 20 周龄大鼠卵巢切除后观察 2 周,发现维生素 K2 能够通过抑制体内骨吸收和破骨细胞形成来防止骨丢失。

4.2 坐骨神经切除大鼠模型实验

Iwamoto 等^[46]通过建立坐骨神经切除大鼠模型实验,探讨维生素 K2 对大鼠皮质骨和松质骨的影响,认为维生素 K2 能够减轻坐骨神经切除所致的松质骨骨丢失。其研究结果表明:① 与对照组相比,坐骨神经切除能降低皮质骨和松质骨的骨量;② 维生素 K2 可改善坐骨神经切除所致的皮质骨和小梁骨的骨侵蚀,防止坐骨神经切除所致的小梁骨矿物质沉积率(MAR)降低,增加松质骨的骨形成速率(BFR/骨表面);③ 与对照组相比,坐骨神经切除还降低骨细胞密度和骨腔占位率,增加皮质骨的孔隙度,而维生素 K2 可改善坐骨神经切除诱导的骨细胞密度降低和皮质骨的孔隙度增加。

4.3 尾部悬吊大鼠模型研究

Ehara 等^[47]采用后肢悬吊的骨骼失重大鼠模型,喂养 4 d,取正常大鼠和骨质疏松大鼠干骺端组织在含有载体或 MK-7 的培养基中培养 48 h 后得出结论, MK-7 可增强锌对骨质疏松大鼠小梁骨钙化的影响。其研究结果显示:① MK-7 的培养基使正常大鼠股骨干骺端组织中碱性磷酸酶活性和钙含量显著增加;② 有效浓度的硫酸锌存在使正常大鼠和骨骼失重大鼠股骨干骺端组织中碱性磷酸酶活性和

钙含量都显著增加,加入 MK-7,硫酸锌对骨钙含量的刺激作用明显增强。Iwasaki 等^[48]模拟人类长期在航天飞行期间骨体积损失,进行维生素 K2 对尾部悬吊大鼠(13 周龄)骨异常影响的研究,认为维生素 K2 可能有助于抑制骨丢失,维持航天期间的正常骨小梁结构。其研究结果表明:① 尾部悬吊 4 周可增加骨吸收和持续抑制骨形成,导致进行性骨丢失;② 维生素 K2 能有效地防止尾部悬吊组骨密度的显著降低、矿物质同位率(MAR)降低、每个骨周边破骨细胞数(N.Oc/B.Pm)增加、每个骨表面破骨细胞表面(Oc.S/BS)增加;③ 维生素 K2 可使骨小梁体积和结构维持在接近正常水平。

4.4 肥胖小鼠模型研究

Young 等^[49]的研究显示,成骨细胞与脂肪细胞的分化来源于相同的干细胞。当肥胖导致脂肪细胞数量增加时,成骨细胞数量就减少,导致骨丢失。Kim 等^[24]采用肥胖小鼠模型,观察喂食维生素 K1 和维生素 K2 共 12 周对骨转换生化指标及骨形态结构的影响,认为喂食维生素 K2 可以通过调节成骨细胞和破骨细胞活性来增加骨形成指数、降低骨吸收指数,从而逆转高脂饮食诱导的骨质疏松,并抑制骨丢失(维生素 K1 无效)。其研究结果显示:① 高脂饮食+维生素 K2 组的血清骨钙素(成骨细胞功能指标)水平高于高脂饮食组;② 高脂饮食组、高脂饮食+维生素 K1 组和高脂饮食+维生素 K2 组的血清骨保护素(OPG)水平分别为(2.31±0.31)、(2.35±0.12)和(2.90±0.11) ng/mL;③ 高脂饮食组血清核因子 NF-κB 受体活化因子配体(RANKL)水平显著高于高脂饮食+维生素 K1 组和高脂饮食+维生素 K2 组($P<0.05$);④ 在高脂饮食诱导的肥胖状态下,补充维生素 K2 可以防止骨质流失。

5 MK-7 防治骨质疏松的临床研究

Tsukamoto 等^[50]研究了正常人摄取发酵大豆(纳豆)后循环 MK-7 水平和 γ -羧化骨钙素浓度的变化,得出摄入发酵大豆(纳豆)可提高正常人血清 MK-7 水平和 γ -羧化骨钙素浓度这样的结论。Hodges 等^[51]研究证实,骨质疏松性骨折患者明显缺乏 MK-7 和 MK-8,提示循环 MK-7 和 MK-8 水平可作为骨质疏松性骨折发生风险的生化指标。Kaneki 等^[52]研究发现, MK-7 水平的巨大地理差异可能归因于纳豆摄入量,因纳豆食用量引起 MK-7 水平升高可能是日本妇女骨折风险相对较低的原因。Summeren 等^[53]对 55 名 6~10 岁健康的青春期前儿

童进行 MK-7 补充的随机双盲、安慰剂对照试验, MK-7 组(28 人)每天服用 45 μ g MK-7,对照组(27 人)每天服用安慰剂亚麻油,共 8 个星期。其研究结果显示:① MK-7 组血清无活性的羧化不全骨钙素(ucOC)降低,ucOC:cOC ratio (UCR)改善, MK-7 浓度升高,而安慰剂组的 ucOC、cOC、UCR 和 MK-7 浓度均没有随时间而变化;② 两组骨标志物和凝血参数随着时间推移保持不变,从而得出健康青春期前儿童适度补充 MK-7 可以使血液 MK-7 和羧化骨钙素浓度升高这样的结论。Inaba 等^[54]进行了两项研究,研究 A 为将 60 名 50~69 岁绝经后妇女随机双盲、对照地分成四个剂量组,每天摄取 0、50、100、200 μ g MK-7,共 4 周;研究 B 为根据研究 A 的结果进行随机双盲、安慰剂对照试验,将 120 名 20~69 岁受试者分成安慰剂组和 MK-7 组, MK-7 组每天服用 100 μ g MK-7,安慰剂组每天给予安慰剂,共 12 周。最终得出的结论为每天摄入 100 μ g 以上的 MK-7 能提高骨钙素的 γ -羧基化水平。Knapen 等^[55]给予 244 名健康绝经后妇女补充低剂量 MK-7 (180 μ g/d)或安慰剂,共 3 年,结果表明绝经后妇女服用 MK-7 补充剂可以帮助预防骨质流失。Forli 等^[56]进行随机双盲、安慰剂对照的前瞻性纵向研究,将 35 例肺移植受者和 59 例心脏移植受者随机分配到安慰剂组(每天给予安慰剂)或 MK-7 组(每天补充 180 μ g MK-7),共 1 年。其研究结果表明:① 1 年后与安慰剂组比较, MK-7 组腰椎(L₂₋₄)骨密度(bone mineral density, BMD)增加 0.028 (SE 0.014) g/cm² ($P=0.055$),骨矿物质含量增加 1.33 (SE 1.91) g/cm² ($P=0.5$);② 控制基线测量后,1 年后与安慰剂组比较, MK-7 组的肺移植受者亚组腰椎(L₂₋₄)骨矿物质含量明显增加 3.39 (SE 1.65) g/cm² ($P=0.048$),而 MK-7 组的心脏移植受者亚组增加 0.45 (SE 0.02) g/cm² ($P=0.9$);③ 在拟合腰椎(L₂₋₄)骨密度模型差异的正向逐步线性回归分析后,控制可能的混杂变量(包括使用双膦酸盐)后显示,唯一显著的预测因子是移植的器官($B=-0.065$ g/cm², $P<0.001$)和 MK-7 ($B=0.034$ g/cm², $P=0.019$);④ 维生素 D 不足是常见的, MK-7 组甲状旁腺素水平最高,表明对维生素 D 的需求量较高。最终得出的结论为一年的 MK-7 补充对腰椎骨密度具有良好的影响,肺移植受者和心脏移植受者的反应不同,应该更多关注维生素 D 的营养状态。

6 MK-7 优于 MK-4 和维生素 K1

大量研究结果表明, MK-7 的生物活性优于 MK-

4和维生素K1,这是由于酶的亲和力差异和组织分布不同引起的。维生素K1主要储存在肝脏中,它在凝血蛋白产生中起着更大作用,而维生素K2(包括MK-7和MK-4)广泛分布在人体组织内。维生素K2的 γ -谷氨酰羧化酶(GGCX)的亲和力比维生素K1更高。不同的维生素K2亚型也具有不同的生物活性水平和酶亲和力。与维生素K1和MK-4比较,MK-7的生物利用度更好,血浆半衰期更长。此外,MK-7的抗NF- κ B活性水平超过MK-4和维生素K1。研究^[43-44]显示,MK-7降解可以形成MK-4,膳食MK-7的摄入能预防骨丢失。

2017年美国药典委员会^[57]与欧洲食品安全局、英国EVM、美国医学科学院和世界卫生组织一起对近年来与MK-7相关的临床和非临床研究数据进行了综述,认为在推荐的摄入量水平服用MK-7膳食补充剂,不会产生任何给个人或公共健康带来严重风险的事件。

综上所述,MK-7(维生素K2)抗骨质疏松的作用机制不仅是通过维生素K依赖性蛋白 γ -羧基化途径,而且能通过刺激成骨细胞分化、调控骨细胞外基质矿化、上调骨标志物基因表达、抑制破骨细胞生成,促进骨形成和降低骨吸收,从而防治骨质疏松症。其生物活性、生物利用度和血浆半衰期均优于MK-4和维生素K1。

【参 考 文 献】

- [1] Kaneki M, Hedges SJ, Hosoi T, et al. Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K2: Possible implications for hip-fracture risk[J]. *Nutrition Journal*, 2001, 17(4):315-321.
- [2] Yamaguchi M, Sugimoto E, Hachiya S. Stimulatory effect of menaquinone-7 (vitamin K2) on osteoblastic bone formation in vitro[J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 223:131-137.
- [3] Villa JKD, Diaz MAN, Pizzolo VR, et al. Effect of vitamin K in bone metabolism and vascular calcification: A review of mechanisms of action and evidences[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(18):3959-3970.
- [4] Lombardi G, Perego S, Luzi L, et al. A four-season molecule: Osteocalcin. Updates in its physiological roles[J]. *Endocrine Journal*, 2015, 48(2):394-404.
- [5] Berkner KL. Vitamin K-Dependent Carboxylation[J]. *Vitamins & Hormones*, 2008, 78:131-156.
- [6] Booth SL, Suttie JW. Dietary intake and adequacy of vitamin K[J]. *Journal of Nutrition*, 1998, 128(5):785-788.
- [7] Stenflo J, Fernlund P, Egan W, et al. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71(7):2730-2733.
- [8] Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, et al. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone[J]. *Physiological Reviews*, 1989, 69(3):990-1047.
- [9] Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72:3925-3929.
- [10] Price PA. Vitamin K-dependent formation of bone Gla protein (osteocalcin) and its function[J]. *Vitam Horm*, 1985, 42:65-108.
- [11] Booth SL, Centi A, Smith SR, et al. The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator? [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2013, 9(1):43-55.
- [12] Cancela L, Hsieh C-L, Francke U, et al. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(25):15040-15048.
- [13] Karsenty G, Oury F. Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 382(1):521-526.
- [14] Theuvsen E, Smit E, Vermeer C. The role of vitamin K in soft-tissue calcification[J]. *Advances in Nutrition*, 2012, 3(2):166-173.
- [15] Gundberg CM, Nieman SD, Abrams S, et al. Vitamin K status and bone health: an analysis of methods for determination of undercarboxylated osteocalcin[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1998, 83(9):3258-3266.
- [16] Shiraki M, Yamazaki Y, Shiraki Y, et al. High level of serum undercarboxylated osteocalcin in patients with incident fractures during bisphosphonate treatment[J]. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2010, 28(5):578-584.
- [17] Krueger T, Westenfeld R, Ketteler M, et al. Vitamin K deficiency in CKD patients: a modifiable risk factor for vascular calcification? [J]. *Kidney International*, 2009, 76(1):18-22.
- [18] Booth SL, Tucker KL, Chen H, et al. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 71(5):1201-1208.
- [19] Urayama S, Kawakami A, Nakashima T, et al. Effect of vitamin K2 on osteoblast apoptosis: Vitamin K2 inhibits apoptotic cell death of human osteoblasts induced by Fas, proteasome inhibitor, etoposide, and staurosporine[J]. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2000, 136(3):181-193.
- [20] Koshihara Y, Hoshi K, Okawara R, et al. Vitamin K stimulates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis in human bone marrow cell culture[J]. *Journal of Endocrinology*, 2003, 176(3):339-348.
- [21] Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, et al. Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells[J]. *The Journal of Biological*

- Chemistry, 2006, 281(25): 16927-16934.
- [22] Akedo Y, Hosoi T, Inoue S, et al. Vitamin K2 modulates proliferation and function of osteoblastic cells in vitro [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992, 187(2):814-820.
 - [23] Asawa Y, Amizuka N, Hara K, et al. Histochemical evaluation for the biological effect of menatetrenone on metaphyseal trabeculae of ovariectomized rats [J]. Bone, 2004, 35(4): 870-880.
 - [24] Kim M, Na W, Sohn C. Vitamin K1 (phyloquinone) and K2 (menaquinone-4) supplementation improves bone formation in a high-fat diet-induced obese mice [J]. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2013, 53(2):108-113.
 - [25] Poon CC, Li RW, Seto SW, et al. In vitro vitamin K(2) and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D(3) combination enhances osteoblasts anabolism of diabetic mice [J]. European Journal of Pharmacology, 2015, 767:30-40.
 - [26] Katsuyama H, Saijoh K, Otsuki T, et al. Menaquinone-7 regulates gene expression in osteoblastic MC3T3E1 cells [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2007, 19(2): 279-284.
 - [27] Igarashi M, Yogiashi Y, Mihara M, et al. Vitamin K induces osteoblast differentiation through pregnane X receptor-mediated transcriptional control of the Mx2 gene [J]. Molecular and Cellular Biology, 2007, 27(22):7947-7954.
 - [28] Shearer MJ, Newman P. Metabolism and cell biology of vitamin K [J]. Thrombosis and Haemostasis, 2008, 100(4):530-547.
 - [29] Tabb MM, Sun A, Zhou C, et al. Vitamin K2 Regulation of Bone Homeostasis Is Mediated by the Steroid and Xenobiotic Receptor SXR [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(45): 43919-43927.
 - [30] Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism [J]. Endocrine Reviews, 2002, 23(5):687-702.
 - [31] Azuma K, Casey SC, Ito M, et al. Pregnane X receptor knockout mice display osteopenia with reduced bone formation and enhanced bone resorption [J]. Journal of Endocrinology, 2010, 207(3):257-263.
 - [32] Yamaguchi M, Weitzmann MN. Vitamin K2 stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by suppressing NF- κ B activation [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2011, 27(1):3-14.
 - [33] Atkins GJ, Welldon KJ, Wijenayaka AR, et al. Vitamin K promotes mineralization, osteoblast to-osteocyte transition, and an anticatabolic phenotype by γ -carboxylation-dependent and-independent mechanisms [J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2009, 297(6):C1358-C1367.
 - [34] Kameda T, Miyazawa K, Mori Y, et al. Vitamin K2 inhibits osteoclastic bone resorption by inducing osteoclast apoptosis [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, 220(3):515-519.
 - [35] Akiyama Y, Hara K, Tajima T, et al. Effect of vitamin K2 (menatetrenone) on osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow cultures [J]. European Journal of Pharmacology, 1994, 263(1-2):181-185.
 - [36] Hara K, Akiyama Y, Nakamura T, et al. The inhibitory effect of vitamin K2 (Menatetrenone) on bone resorption may be related to its side chain [J]. Bone, 1995, 16(2):179-184.
 - [37] Hara K, Akiyama Y, Ohkawa I, et al. Effects of menatetrenone on prednisolone-induced bone loss in rats [J]. Bone, 1993, 14(6):813-818.
 - [38] Akiyama Y, Hara K, Kobayashi M, et al. Inhibitory effect of vitamin K2 (menatetrenone) on bone resorption in ovariectomized rats: A histomorphometric and dual energy X-ray absorptiometric study [J]. Japanese Journal of Pharmacology, 1999, 80(1):67-74.
 - [39] Yamaguchi M, Ma ZJ. Inhibitory effect of menaquinone-7 (vitamin K2) on osteoclast-like cell formation and osteoclastic bone resorption in rat bone tissues in vitro [J]. Mol Cell Biochem, 2001, 228:39-47.
 - [40] Yamaguchi M, Uchiyama S, Tsukamoto Y. Stimulatory effect of menaquinone-7 on bone formation in elderly female rat femoral tissues in vitro: prevention of bone deterioration with aging [J]. Int J Mol Med, 2002, 10:729-733.
 - [41] Yamaguchi M, Uchiyama S, Tsukamoto Y. Inhibitory effect of menaquinone-7 (vitamin K2) on the bone-resorbing factors-induced bone resorption in elderly female rat femoral tissues in vitro [J]. Mol Cell Biochem, 2003, 245:115-120.
 - [42] Katsuyama H, Otsuki T, Tomita M, et al. Menaquinone-7 regulates the expressions of osteocalcin, OPG, RANKL and RANK in osteoblastic MC3T3E1 cells [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2005, 15(2):231-236.
 - [43] Yamaguchi M, Taguchi H, Gao YH, et al. Effect of vitamin K2 (menaquinone-7) in fermented soybean (natto) on bone loss in ovariectomized rats [J]. J Bone Miner Metab, 1999, 17:23-29.
 - [44] Yamaguchi M, Kakuda H, Gao YH, et al. Prolonged intake of fermented soybean (natto) diets containing vitamin K2 (menaquinone-7) prevents bone loss in ovariectomized rats [J]. J Bone Miner Metab, 2000, 18:71-76.
 - [45] Tsukamoto Y. Studies on action of menaquinone-7 in regulation of bone metabolism and its preventive role of osteoporosis [J]. Biofactors, 2004, 22(1-4):5-19.
 - [46] Iwamoto J, Matsumoto H, Takeda T, et al. Effects of vitamin K2 on cortical and cancellous bone mass, cortical osteocyte and lacunar system, and porosity in sciatic neurectomized rats [J]. Calcified Tissue International, 2010, 87(3):254-262.
 - [47] Ehara Y, Takahashi H, Hanahisa Y, et al. Effect of vitamin K2 (menaquinone-7) on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of normal and skeletal-unloaded rats: enhancement with zinc [J]. Res Exp Med (Berl), 1996, 196(3):171-178.
 - [48] Iwasaki Y, Yamato H, Murayama H, et al. Maintenance of trabecular structure and bone volume by vitamin K2 in mature rats with long-term tail suspension [J]. Journal of Bone and

- Mineral Metabolism, 2002, 20(4):216-222.
- [49] Young HE, Mancini ML, Wright RP, et al. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs[J]. Developmental Dynamics, 1995, 202(2):137-144.
- [50] Tsukamoto Y, Ichise H, Kakuda H, et al. Intake of fermented soybean (natto) increases circulating vitamin K2 (menaquinone-7) and gamma-carboxylated osteocalcin concentration in normal individuals[J]. J Bone Miner Metab, 2000, 18(4):216-222.
- [51] Hodges SJ, Pilkington MJ, Stamp TC, et al. Depressed levels of circulating menaquinones in patients with osteoporotic fractures of the spine and femoral neck[J]. Bone, 1991, 12(6):387-389.
- [52] Kaneki M, Hodges SJ, Hosoi T, et al. Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K2: possible implications for hip-fracture risk[J]. Nutrition, 2001, 17(4):315-321.
- [53] van Summeren MJH, Braam LAJLM, Lilien MR, et al. The effect of menaquinone-7 (vitamin K2) supplementation on osteocalcin carboxylation in healthy prepubertal children[J]. Br J Nutr, 2009, 102(8):1171-1178.
- [54] Inaba N, Sato T, Yamashita T. Low-Dose Daily Intake of Vitamin K(2) (Menaquinone-7) Improves Osteocalcin γ -Carboxylation: A Double-Blind, Randomized Controlled Trials[J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2015, 61(6):471-480.
- [55] Knapen MH, Drummen NE, Smit E, et al. Three-year low-dose menaquinone-7 supplementation helps decrease bone loss in healthy postmenopausal women[J]. Osteoporosis International, 2013, 24(9):2499-2507.
- [56] Forli L, Bollerslev J, Simonsen S, et al. Dietary vitamin K2 supplement improves bone status after lung and heart transplantation[J]. Transplantation, 2010, 89(4):458-464.
- [57] Marles RJ, Roe AL, Oketch-Rabah HA. US Pharmacopeial Convention safety evaluation of menaquinone-7, a form of vitamin K[J]. Nutr Rev, 2017, 75(7):553-578.
- (收稿日期: 2019-01-01;修回日期: 2019-03-14)

(上接第538页)

- [16] 倪力刚, 刘康, 史晓林. 不同浓度骨碎补总黄酮对模型大鼠的组织蛋白酶K及骨矿含量的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 3:8-10.
- [17] Duque G, Troen BR. Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: new facts for a major geriatric syndrome[J]. J Am Geriatr Soc, 2008, 56(5):935-941.
- [18] 沙鑫, 李锋, 吴太林, 等. 丹参素抑制RANKL诱导的破骨细胞分化[J]. 现代生物医学进展, 2015, 36:7017-7020.
- [19] Liu XH, Pan LL, Jia YL, et al. A novel compound DSC suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by inhibition of Akt/NF-kappaB signalling in macrophages[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 708(1-3):8-13.
- [20] 宋倩, 李玉坤. 组织蛋白酶K与骨质疏松症治疗的研究进展[J]. 中国慢性病预防与控制, 2014, 4:498-501.
- [21] Simsek B, Karacaer O, Karaca I. Urine products of bone breakdown as markers of bone resorption and clinical usefulness of urinary hydroxyproline: an overview[J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(2):291-295.
- [22] 孔德策, 杨铁毅, 邵进. 绝经后骨质疏松骨代谢标志物研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2016, 1:36-41.
- [23] 李明慧, 王桂敏. 甘草附子汤对去卵巢大鼠骨组织中I型胶原代谢及组织蛋白酶K表达的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 5:356-359.
- [24] Tanaka M, Hashimoto Y, Sekiya N, et al. Effects of novel cathepsin K inhibitor ONO-5334 on bone resorption markers: a study of four sustained release formulations with different pharmacokinetic patterns[J]. J Bone Miner Metab, 2014, 32(4):447-454.
- [25] 何伟涛, 刘康, 孙金诤, 等. 组织蛋白酶k与骨质疏松症治疗的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(9):670-673.
- [26] Shi X, Liu K, Wu L. Interventional value of total flavonoids from Rhizoma Drynariae on Cathepsin K, a potential target of osteoporosis[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2011, 17(7):556-560.
- [27] Selinger CI, Day CJ, Morrison NA. Optimized transfection of diced siRNA into mature primary human osteoclasts: inhibition of cathepsin K mediated bone resorption by siRNA[J]. J Cell Biochem, 2005, 96(5):996-1002.
- [28] Bromme D, Lecaillon F. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects[J]. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2009, 18(5):585-600.
- (收稿日期: 2018-03-19;修回日期: 2018-07-03)