

维生素 K₂对成骨细胞增殖和分化的影响

郭洪敏 杜靖远

摘要 目的 探讨维生素 K₂对体外培养的新生大鼠成骨细胞增殖与分化的影响。方法 从新生大鼠颅骨分离出成骨细胞,采用细胞计数、³H胸腺嘧啶核苷掺合试验、放免法测定细胞内骨钙素 (bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein, BGP)浓度,观察维生素 K₂对成骨细胞的影响。结果 实验中加入维生素 K₂ 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 及 10^{-8} mol/L,成骨细胞生长数量分别为 28×10^5 、 26×10^5 、 29×10^5 及 30×10^5 /ml, BGP分别为 38.12 ± 6.47 、 46.65 ± 4.59 、 34.38 ± 5.22 及 32.22 ± 4.86 ng/10⁶细胞;而对照组为 32×10^5 /ml及 19.92 ± 3.67 ng/10⁶细胞。表明维生素 K轻度抑制成骨细胞增殖,但可明显增加 BGP的含量。结论 维生素 K有望作为治疗骨质疏松的新药物。

关键词 成骨细胞 维生素 K 骨质疏松

The effect of vitamin K₂ on proliferation and differentiation of osteoblasts Guo Hongmin, Du Jingyuan. Department of Orthopaedics, Union Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430022

Abstract Objective To demonstrate the role of vitamin K₂ on proliferation and differentiation of osteoblasts. **Methods** Osteoblasts from newborn rat calvaria were cultured for 3 days in a medium containing various concentrations of vitamin K₂. The cell count, [³H]³ thymidin incorporation and intra cellular osteocalcin (bone γ -carboxyglutamic acid-containing protein, BGP) level were studied to observe the effect of vitamin K₂ on osteoblasts. **Results** In the experiment of adding vitamin K₂ 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-8} mol/L, the osteoblast count was 28×10^5 , 26×10^5 , 29×10^5 and 30×10^5 /ml, respectively. BGP was 38.12 ± 6.47 , 46.65 ± 4.59 , 34.38 ± 5.22 and 32.22 ± 4.86 ng/10⁶ cell respectively. While in the control group they were 32×10^5 /ml and 19.92 ± 3.67 ng/10⁶ cell. The results showed that the proliferation of osteoblast was slightly suppressed and the cellular BGP level was evidently increased by vitamin K₂. **Conclusions** Vitamin K₂ may be used as a new medicine for treatment of osteoporosis.

Key Words Osteoblasts Vitamin K Osteoporosis

近年研究表明,维生素 K对骨质疏松有一定治疗作用^[1]。我们于 1996年 10月至 1997年 4月采取新生大鼠颅骨分离的成骨细胞,探讨维生素 K₂对体外培养的新生大鼠成骨细胞增殖与分化的影响。

材料和方法

一、药物

维生素 K₂为 Sigma公司(美国)产品,溶

于无水乙醇配成 10^{-2} mol/L贮存液,实验用培养液稀释为最终浓度 $10^{-5} \sim 10^{-8}$ mol/L。实验中加入的乙醇量不超过 0.1%,对照组加入的乙醇量同实验组 (1% 1/ml)。

二、方法

1. 成骨细胞的分离和培养: 参照文献^[2]及本实验室常规方法,将新生的 SD大鼠(本校实验动物中心提供)分离的颅骨成骨细胞种植在含 20% 小牛血清的 DMEM 培养液中制成单细胞悬液,置 37℃、5% CO₂培养箱内培养,待细胞融合后,消化传代。本实验用第 2代培养的成骨细胞。

作者单位: 430022 武汉市, 同济医科大学附属协和医院

骨科

2. 细胞生长曲线: 以 5×10^4 细胞 /ml 接种于培养瓶中, 分别用 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L 浓度的维生素 K_2 加入培养瓶中, 3 天后消化、制成单细胞悬液 (各浓度 4 瓶), 用血细胞计数器计数, 连续 3 次, 取均值

3. 3H 胸腺嘧啶核苷 (3H 胸苷) 掺合试验: 细胞 DNA 合成时摄取 3H 胸苷作为原料。将培养细胞消化悬浮后, 按 3×10^4 个细胞 /孔接种于 24 孔培养板, 24 小时后换成低血清 DMEM 培养基 (含维生素 K_2 $10^{-5} \sim 10^{-8}$ mol/L), 各浓度重复 6 次, 共培养 72 小时。在 66 小时时加入 3H 胸苷继续培养 6 小时, 吸除培养液, PBS 洗 5 次, 每孔内加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 1ml, $4^\circ C$ 过夜。将溶液收集于闪烁瓶中, 加入适量第 1 闪烁体及第 2 闪烁体。暗适应 3 小时, 用液体闪烁仪测量每孔的每分钟计数 (cpm) 值

4. 细胞内骨钙素 (BGP) 定量测定: 以 5×10^4 个细胞接种于培养瓶中, 细胞达 50% 融合后加入不同浓度的维生素 K_2 ($10^{-5} \sim 10^{-8}$ mol/L), 各浓度重复 6 次培养 3 天, 消化悬浮后取 10^6 个细胞, 离心后加 1ml PBS 与 0.2% triton-X (含 4mmol/L EDTA) 按 1:1 混合, 静置 10 分钟后用放免法测定 BGP 含量, 放免药盒为北方生物技术研究所提供

三、统计学处理

本实验数据用均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s_x$) 表示, 显著性检验用 t 检验

结 果

一、维生素 K_2 对成骨细胞生长的影响

实验中加入维生素 K_2 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 及 10^{-8} mol/L, 成骨细胞生长数量分别为 (28 ± 3) $\times 10^5$ 、(26 ± 4) $\times 10^5$ 、(29 ± 5) $\times 10^5$ 及 (30 ± 6) $\times 10^5$ /ml, 而对照组为 (32 ± 5) $\times 10^5$ /ml, 可以看出不同浓度的维生素 K_2 对成骨细胞生长均有轻度抑制作用, 以 10^{-6} mol/L 浓度明显, 与对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$)

二、维生素 K_2 对成骨细胞 3H 胸苷掺合及 BGP 的影响

见附表, 加入不同浓度维生素 K_2 后, 细胞摄入同位素量均低于对照组, 以 10^{-6} mol/L 浓度明显 ($P < 0.05$)。不同浓度维生素 K_2 均可增加成骨细胞的 BGP 含量 ($P < 0.01$)

附表 不同浓度维生素 K_2 对成骨细胞 3H 胸苷掺合及骨钙素的影响 ($\bar{x} \pm s_x$)

组别	药物浓度 (mol/L)	cpm 值	BGP (ng/10 ⁴ 细胞)
对照组		1757.28 \pm 108.92	19.92 \pm 3.67
实验组	10^{-5}	1633.22 \pm 135.25	38.12 \pm 6.47 *
	10^{-6}	1347.54 \pm 138.51	46.65 \pm 4.59 *
	10^{-7}	1642.33 \pm 145.34	34.38 \pm 5.22 *
	10^{-8}	1596.22 \pm 122.67	32.22 \pm 4.86 *

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 余为 $P > 0.05$

讨 论

维生素 K 是骨内多种蛋白依赖性维生素。人体可利用两种形式的维生素 K —— K_1 和 K_2 , 维生素 K_1 是植物源性的, 主要由饮食提供; 维生素 K_2 由肠道细菌合成。据报道骨质疏松性骨折患者血浆中维生素 K 浓度明显降低^[3]; 亦有报道长期使用维生素 K 拮抗剂——香豆素的患者其桡骨骨矿密度明显下降^[4]。本实验结果表明: 不同浓度的维生素 K_2 可轻度抑制成骨细胞增殖, 明显提高成骨细胞内骨钙素含量。骨钙素, 亦称骨 γ 羧基谷氨酸蛋白, 它是由成骨细胞产生和分泌的一种非胶原蛋白, 具有骨代谢调节激素样作用。骨钙素中谷氨酸基的 γ 羧基化后才具有生物学效应, 而这种羧基化必须有维生素 K 参与。羧基化后的骨钙素可与 Ca^{2+} 和羟磷灰石结合, 使骨矿化。本实验结果表明, 维生素 K_2 可增加骨细胞内骨钙素的含量, 轻度抑制其增殖, 其治疗骨质疏松的机理是影响骨的合成代谢而非有丝分裂, 为维生素 K 的临床应用提供了理论依据。

维生素 K 作为骨内多种蛋白的依赖性维生素增加成骨细胞骨钙素的合成, 也就是说可增强骨的矿化作用, 对骨质疏松的预防和治疗将有一定作用, 并且其来源广泛, 价格便宜。但维生素 K 参与骨代谢的很多问题仍未明了, 况且作为老年人长期用维生素 K 是否增加血液

粘稠度,维生素 K治疗骨质疏松的合适剂量和应用时间均需要进一步研究和解决

参 考 文 献

1 Orimo H, Shiraki M. Clinical evaluation of vitamin K₂ in the treatment of involutional osteoporosis: a double-blind multicenter comparative study with 1 α -hydroxy vitamin D₃. J Bone Miner Res, 1992, 7(Suppl 1): 122-129.

2 王洪复.由胎鼠头盖骨细胞的实验技术和细胞形态观察.上海医科大学学报, 1991, 18: 475.
3 Hodges S.J, Pilkington J, Stamp T.C.B. Depressed levels of circulating menaquinones in patients with osteoporotic fractures of the spine and femoral neck. Bone, 1991, 12: 387-389.
4 Monreal M, Olive A, Lafoz E, et al. Heparins, coumarin and bone density. Lancet, 1991, 338: 406.

(收稿: 1997-10-21 修回: 1998-02-11)

超声波法测量跟骨骨密度的临床意义

郭金明 杨鸿生 圆尾宗司

一、临床资料

1996年 1月至 1997年 3月,收集 62例无明显外伤史但有胸腰椎压缩骨折的日本妇女(骨折组),年龄 64~82岁;随机选 112名无骨折的健康日本妇女为对照组,年龄 64~82岁。两组均无肝、肾、内分泌疾病和代谢营养不良性骨病史,无服用影响骨代谢的药物史。

诊断标准:用 X线平片法通过测量椎体前缘高度(AH)、中间高度(MH)和后缘高度(PH)判断脊椎骨折:AH/PH或 MH/PH比值低于正常均值的 3个标准差,或 AH和 PH均低于正常均值的 3个标准差,即诊断该椎体骨折。

测量方法:用美国 LUNAR公司生产的 LUNAR Achilles+ Ultrasound Densitometer测量受试对象右侧跟骨,按 LUNAR公司提供的操作说明书测量,测量指标有宽波段超声衰减(BUA)、声速(SOS)及由两者演算而来的硬度指数(stiffness)。检测数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,精确度用变异系数(CV)表示,显著性检验用 t检验。

二、结果

1.精确度的估价:对 5名健康妇女中每 1名的右侧跟骨进行连续 5次测量,取各指标参数均值,结果见附表。BUA、SOS和 stiffness的平均变异系数分别为 2.7%、0.3%和 2.6%。

2.胸腰椎骨折组骨折危险度(阈值):对照组的平均年龄、体重和身高分别为 76.7±6.2岁、50.7±6.7kg和 154.0±8.5cm;骨折组分别为 75.5±5.1岁、

附表 5名健康妇女 BUA、SOS和 stiffness的测量结果 ($\bar{x}\pm s$)

例序	BUA (dB/MHz)	SOS (m/s)	stiffness (%)
1	118.7±1.2(1.0)	1556.8±9.5(0.6)	94.4±3.5(3.8)
2	80.2±3.2(4.1)	1586.9±13.7(0.9)	76.9±1.6(2.1)
3	114.6±3.2(2.8)	1600.2±6.4(0.4)	103.4±1.8(1.7)
4	115.8±4.7(4.0)	1541.7±4.8(0.3)	89.0±2.7(3.0)
5	78.3±1.2(1.5)	1600.7±5.4(0.3)	80.1±2.1(2.6)

注:()内为 CV(%)

49.7±7.4kg和 154.6±7.3cm,两组差异无显著性($P>0.05$)。骨折组 BUA、SOS和 stiffness值分别为 78.6±8.5dB/MHz、1480±19m/s和 56.6%±10.0%,低于此阈值者分别为 32、36及 29例;对照组分别为 98.2±11.3dB/MHz、1517±25m/s和 75.7%±13.0% ($P<0.001$ 或 <0.0001)。

三、讨论

目前超声波法测量骨密度有 3种类型仪器,一种是测定超声波在骨组织的 SOS,与骨的密度和弹性有关;一种是测定声波通过骨组织时 BUA,与骨的密度和结构有关;另一种是 LUNAR Achilles系统,综合 BUA和 SOS得出第 3项指数 stiffness,它能全面评价骨的质量状况。因此超声波法特别是 LUNAR Achilles系统不仅能反映骨的密度,而且能反映骨的结构和弹性,又无辐射作用,也有较高的精确度。根据本组结果,我们认为 BUA、SOS和 stiffness的骨折阈值分别为 78.6dB/MHz、1480m/s和 56.6%,当下降至上述阈值时容易发生自发性胸腰椎体压缩骨折。

(收稿: 1997-05-30 修回: 1998-02-04)

作者单位: 110021 沈阳市,中国医科大学第三临床学院骨科(郭金明);日本兵库医科大学整形外科(杨鸿生、圆尾宗司)