

孙怡, 夏洪志, 牛堃, 等. 维生素 K₂ 单独及与钙剂联合使用对斑马鱼骨骼健康的改善作用及机制研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(3): 320–327. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030026

SUN Yi, XIA Hongzhi, NIU Kun, et al. Effect of Vitamin K₂ Alone and in Combination with Calcium on the Bone Health Improvement and Mechanism in Zebrafish Model[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(3): 320–327. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030026

· 营养与保健 ·

维生素 K₂ 单独及与钙剂联合使用对斑马鱼骨骼健康的改善作用及机制研究

孙 怡, 夏洪志, 牛 堃, 李江波, 朱宇雷, 李古月, 尹忠燕
(南通励成生物工程有限公司, 江苏南通 226010)

摘要:目的: 研究维生素 K₂ 单独使用及与钙剂联合使用对斑马鱼骨骼健康改善作用及机制。方法: 采用转基因 Tg 系健康斑马鱼作为实验动物, 利用泼尼松龙诱导骨质疏松斑马鱼模型, 显微镜下观察并拍照, 以斑马鱼成骨细胞荧光面积和荧光密度为指标, 评价药物处理后斑马鱼骨骼发育情况, 并采用 Real-time qPCR 检测相关基因表达变化。结果: 在 5~20 μg/mL 的实验安全剂量范围内, 维生素 K₂ 及与 D₃ 和钙剂联合使用, 均能显著改善由泼尼松龙诱导的斑马鱼成骨细胞荧光面积和荧光密度的降低 ($P < 0.05$); 维生素 K₂ 通过促进成骨细胞生成相关的 *alp*、*bmp2a* 和 *bmp4* 基因的表达, 抑制破骨细胞生成相关的 *opg*、*rank1*、*trap*、*ctsk* 基因的表达以及抑制细胞外基质中骨钙化相关基因 *vdrb*、*sparc*、*colla2* 表达从而发挥功效。结论: 维生素 K₂ 通过促进成骨细胞生成相关基因的表达, 抑制破骨细胞和细胞外基质中骨钙化相关基因的表达, 发挥改善斑马鱼骨骼健康的作用, 其与钙剂联合给药, 可提升其改善骨骼健康能力。

关键词: 维生素 K₂, 斑马鱼, 骨质疏松, 作用机制

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)03-0320-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030026



本文网刊:

Effect of Vitamin K₂ Alone and in Combination with Calcium on the Bone Health Improvement and Mechanism in Zebrafish Model

SUN Yi, XIA Hongzhi, NIU Kun, LI Jiangbo, ZHU Yulei, LI Guyue, YIN Zhongyan

(Nantong Licheng Biological Engineering Co., Ltd., Nantong 226010, China)

Abstract: Objective: To investigate the bone health improvement effects and mechanism of vitamin K₂ alone and in combination with calcium on osteoporotic zebrafish model. Methods: Healthy zebrafish with transgenic Tg line were used as experimental animals. The model of osteoporosis zebrafish was induced by prednisone. The fluorescence area and density of zebrafish osteoblasts were used as indicators to evaluate the bone development of zebrafish which were observed and photographed under microscope. Furthermore, the expression changes of related genes were detected by Real-time qPCR. Results: Vitamin K₂ alone and in combination with D₃ and calcium chloride could significantly improve the reduction of fluorescence area and fluorescence density of zebrafish osteoblasts induced by prednisolone in the experimental safe dose range of 5~20 μg/mL ($P < 0.05$). Vitamin K₂ played anti-osteoporosis activity by promoting the expression of *alp*, *bmp2a* and *bmp4* genes related to osteoblast, inhibiting the expression of *opg*, *rank1*, *trap* and *ctsk* genes related to osteoclast, and inhibiting the expression of *vdrb*, *sparc* and *colla2* genes related to bone extracellular matrix. Conclusion: Vitamin K₂ could improve the bone health of zebrafish by promoting the expression of genes related to osteoblast formation and inhibit the expression of genes related to osteoclasts and bone calcification in extracellular matrix. The combined administration of vitamin K₂ with D₃ and calcium chloride could enhance the ability to improve bone health.

Key words: vitamin K₂; zebrafish; osteoporosis; mechanism

收稿日期: 2023-03-03

作者简介: 孙怡 (1983-), 女, 硕士, 研究方向: 功能性食品的研究与开发, E-mail: sunyi@richenchina.cn。

骨质疏松是一种常见的骨骼疾病,其特征为骨量下降,骨脆性增加^[1]。随着人口老龄化的加剧,骨质疏松发病率呈逐年上升趋势^[2-3],此外,由其导致的骨折并发炎症,对中老年人的生活质量、生命安全具有极大的影响^[4-5]。现代研究表明,维生素 K₂ 可通过激活维生素 K 依赖蛋白将无机钙与有机蛋白结合成骨基质,从而提高骨密度^[6-7]。此外,也有研究报道维生素 K₂ 对骨质疏松,特别是绝经后骨质疏松具有很好的改善作用,可以减少患者骨量丢失,降低骨折风险^[8-11]。现其作为食品添加剂、营养补充剂,已被广泛用于保健食品、功能食品等。然而,维生素 K₂ 及其在与钙剂联合用药时其改善骨质疏松效果及作用机制研究相对较少,缺乏有效的理论支撑。

斑马鱼作为一种脊椎动物,具有胚胎透明易观察、易饲养、易实现高通量筛选等特点,斑马鱼与哺乳动物在骨发育过程中具有相似的同源性调控因子,如成骨细胞发育涉及 Wnt/ β -连环蛋白、TGF- β 和 Hedgehog 信号等关键蛋白^[12]、参与骨形成的关键调控因子包括 *osterix*、*runx2a/b*、*coll10a1* 和骨连接素 7 等^[13]。因此,由于其基因组和人类基因组的高同源性,且其骨骼发育机制的高度保守性,已成为近年来研究骨骼发育和疾病的重要模式生物^[14-15]。

糖皮质激素被广泛用于骨质疏松动物模型的构建^[16-19],传统的骨形态观察方法为化学染色法,常用的染料为茜素红、钙黄绿素、阿利新蓝等^[20-22],然而,由于其存在操作过程复杂、耗时长、染料稳定性差等问题^[23],对实验结果的稳定性和真实性具有较大的影响。近年来,随着基因编辑技术日渐成熟,转基因品系的实验动物模型被广泛用于疾病模型构建,如表达增强绿色荧光蛋白(eGFP)的转基因斑马鱼 Tg(*ola.sp7:nlsGFP*)已经被研究者用来研究斑马鱼骨骼的发育^[19,23]。采用泼尼松龙诱导转基因品系的斑马鱼骨质疏松模型,可导致斑马鱼细胞外基质、成骨细胞和破骨细胞相关基因表达发生异常,可视化观察到斑马鱼骨骼荧光面积及荧光光密度的降低,从而实现抗骨质疏松活性成分的高通量快速评价^[24-25]。

因此,本文基于泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松模型,研究维生素 K₂ 单独使用及与钙剂联合使用,对骨质疏松斑马鱼骨骼发育状态的改善作用,以及其对斑马鱼成骨细胞、破骨细胞、细胞间质等关键基因表达水平的影响,为维生素 K₂ 及与钙剂联合用于抗骨质疏松时的作用机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

绿色荧光标记成骨细胞转基因斑马鱼 Tg(*ola.sp7:nlsGFP*)幼鱼 山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台孵化;维生素 K₂ (纯度 80%)、D₃ 油(质量浓度 25000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、氯化钙 南通励成生物工程技术有限公司自制;泼尼松龙、依替膦酸二钠 源叶生物科技有限公司;FastPure[®] cell/tissue total RNA

isolation Kit V2、HiScript[®] II Q RT supermix for qPCR (+gDNA wiper)、ChamQ universal SYBR qPCR master mix 试剂盒 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

DP2-BSW 图像采集系统 日本 Olympus 公司;AXIO ZOOM.V16 体视荧光显微镜 德国 Carl Zeiss 公司;DS-200 高速组织捣碎机 江苏江阴科研仪器厂;Centrifuge 5804 R 超低温离心机 德国 Eppendorf 股份有限公司;C1000 TouchPCR 仪 伯乐生命医学产品(上海)有限公司;Forma 3111 型水套式 CO₂ 培养箱 美国 Forma 公司;斑马鱼养殖饲养设备 北京爱生科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 斑马鱼胚胎的获取 斑马鱼的养殖和繁殖参照 Westerfield 法^[26]。取卵前一日,雌雄鱼分开,定时喂以人工颗粒状饵料和刚孵出的卤虫无节幼体(*Artemia nauplii*)。照明 14 h/黑暗 10 h 交替进行,第 2 d 光照开始前将雌雄鱼(1:2 或 1:1)并池,光照后获得受精卵。对受精卵进行消毒和洗涤后移入斑马鱼胚胎培养用水(含 5.0 mmol/L NaCl, 0.17 mmol/L KCl, 0.4 mmol/L CaCl₂, 0.16 mmol/L MgSO₄)中,28 $^{\circ}\text{C}$ 下控光培养。

1.2.2 维生素 K₂ 及与钙剂联合使用的抗骨质疏松活性评价 参考 Huang 等^[23]报道的方法,并对造模浓度进行了优选,具体评价方法如下:选用健康成骨细胞绿色荧光标记的转基因斑马鱼(*ola.sp7:nlsGFP*)作为实验对象,在胚胎发育至 1 dpf 时,使用 1.0 mg/mL 链酶蛋白酶 E 溶液脱去卵膜,在体视显微镜下挑选正常的斑马鱼幼鱼,移入 24 孔培养板中,设置空白对照组(Control)、模型组(PD)、阳性对照组和各药物处理组。各实验组用水均为胚胎培养用水,除空白对照组不加入泼尼松龙处理外,其余各实验组均加入质量浓度为 7.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的泼尼松龙溶液。阳性对照组(ED)加入质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的依替膦酸二钠溶液处理,D₃ 和 CaCl₂ 联合处理阳性对照组(D₃+CaCl₂)加入质量浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 D₃ 溶液以及质量浓度为 2 mg/mL 的氯化钙溶液。维生素 K₂ 药物处理组设置低、中、高三浓度,低浓度处理组(VK-1)维生素 K₂ 的浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,中浓度处理组(VK-2)维生素 K₂ 的浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,高浓度处理组(VK-3)维生素 K₂ 的浓度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。D₃、钙剂和维生素 K₂ 联合处理组也设置低(D₃+CaCl₂+VK-1)、中(D₃+CaCl₂+VK-2)、高(D₃+CaCl₂+VK-3)三浓度,在加入质量浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 D₃、2 mg/mL 的氯化钙的基础上,分别加入质量浓度为 5、10 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 维生素 K₂,每组 10 条斑马鱼,同时设置 2 个复孔,加培养水至 2.0 mL。然后加盖,分别将各实验组斑马鱼置于光照培养箱(28 $^{\circ}\text{C}$)让胚胎继续发育至 5 dpf,使用麻醉剂麻醉斑马鱼,显微镜下观察斑马鱼荧光细胞

情况并拍照,利用 Image-Pro Plus 软件计算斑马鱼头部骨骼中成骨细胞荧光面积和荧光密度,利用 GraphPad Prism 6.0 软件对结果进行统计,根据公式(1)计算药物处理的相对改善骨骼健康能力。

$$\text{相对改善骨骼健康能力(\%)} = \left(\frac{\text{给药组荧光面积} - \text{模型组荧光面积}}{\text{空白组荧光面积} - \text{模型组荧光面积}} \right) \times 100$$

式(1)

1.2.3 维生素 K₂ 及与钙剂联合使用的抗骨质疏松作用机制研究 按照 1.2.2 中的给药方案处理斑马鱼后,收集斑马鱼,用 PBS 清洗斑马鱼幼鱼 3 次,去除表面残留,收集各组斑马鱼幼鱼,按照总 RNA 提取试剂盒说明书要求,进行总 RNA 提取,测定 RNA 浓度,采用反转录试剂盒,将 RNA 逆转录为 cDNA,随后进行 Real-time PCR 扩增,扩增条件为:95 °C 预变性 10 min,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 15 s,40 个循环。以 β-actin 为内参基因,检测 *alp*、*runx2a*、*sox9a*、*bmp2b*、*bmp4*、*opg*、*rank1*、*trap*、*ctsk*、*vdrb*、*sparc*、*colla2* 基因的表达水平。引物序列见表 1。

1.3 数据处理

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析,实验结果表示为平均值±标准误差($\bar{x} \pm \text{SEM}$)。组间差异比较采用单因素方差(one-way ANOVA)进行显著性分析。 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 维生素 K₂ 及与钙剂联合使用的抗骨质疏松活性评价

发育 5d 的斑马鱼幼鱼,头部骨骼主要由软骨、脑颅和咽骨架三部分构成^[27],其中麦可尔软骨(mandible, MD)、鳃条骨(branchiostegal rays, BR)、匙骨(cleithrum, CB)和鳃盖骨(opercle)为早期骨化评价指标^[27]。维生素 K₂ 及与钙剂联合使用对骨质疏松斑马鱼头部骨骼发育的影响如图 1 所示,由斑马鱼头部骨骼表型图可知,泼尼松龙可抑制斑马鱼头部骨骼 MD、BR、CB 以及 opercle 的发育,通过加入维生素 K₂ 及与钙剂复合物,可以直观观察到斑马鱼头部骨骼荧光面积和荧光亮度的变化。D₃ 和 CaCl₂ 组合物可加速斑马鱼头部鳃条骨发育,在实验浓度

表 1 引物序列设计
Table 1 Primer sequence list

基因	正向引物序列	反向引物序列
<i>alp</i>	5'-CAGGCAAATCAGTGGGAATC-3'	5'-TTGGGCATGTCTGCATCA-3'
<i>runx2a</i>	5'-GACTCCGACCTCACGACAA-3'	5'-CGTCCCGTCAGGAACATC-3'
<i>sox9a</i>	5'-GCCAGGCAAAGCGGATCT-3'	5'-GCGGGAGGTATTGGTCAAAC-3'
<i>bmp2b</i>	5'-GTGAACGCAGAGCAGGTTAG-3'	5'-CCTAACACTGGAGCTGGACA-3'
<i>bmp4</i>	5'-CTGCCAGGACCACGTAACAT-3'	5'-CCGACGCTTCTTCTTCCCT-3'
<i>opg</i>	5'-GTCAAAACCGCTGGAACGCC-3'	5'-CAGCAGATGCTCTTCCCCCTG-3'
<i>rank1</i>	5'-CTCACCTTCCAATCAAGACGCC-3'	5'-CTTTCATGCCATCCCAGGCTATCT-3'
<i>trap</i>	5'-GGCCAAGTCCAAAGCTGATT-3'	5'-CGGATATGGACCACACTGGA-3'
<i>ctsk</i>	5'-CGTCACTTCGGTGAAGAACC-3'	5'-ACAGTCCACCAGGTTCTGAG-3'
<i>vdrb</i>	5'-TTTCACGCTTCAGACCTCCAG-3'	5'-AAGCCCTGCTCCTGGTACAT-3'
<i>sparc</i>	5'-AAGCCATTGAGGTCGTGGAG-3'	5'-TGTTAGTGCCGCAGACATGC-3'
<i>colla2</i>	5'-CAAGGAGTCTGCATGTCCGT-3'	5'-TCCCTTAGGACCCCTCTCAC-3'

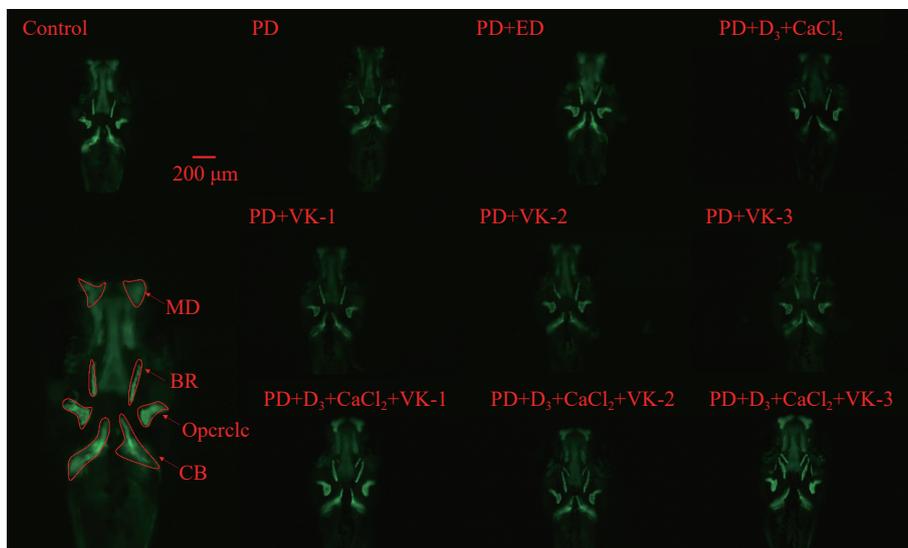


图 1 维生素 K₂ 及与 D₃ 和 CaCl₂ 联合用药对斑马鱼骨骼发育的影响

Fig.1 Effects of vitamin K₂ alone and in combination with D₃ and CaCl₂ on osteoblast development of zebrafish

条件下,可观察到 4 条鳃条骨,维生素 K₂ 在浓度为 20 μg/mL 时也有相同的效果,此外,维生素 K₂ 与 D₃ 和 CaCl₂ 联合使用时,该复合物对鳃条骨以及匙骨发育呈现明显促进作用,随着维生素 K₂ 浓度的增高,可明显观察到斑马鱼鳃条骨数量从三条增加到六条、匙骨荧光亮度明显增强。

通过对斑马鱼头部骨骼的荧光面积和荧光密度的数据进行统计,可以更加客观地评价维生素 K₂ 及与 D₃ 和 CaCl₂ 联合使用的抗骨质疏松活性。药物对斑马鱼头部骨骼荧光面积、荧光密度的影响如图 2、图 3 所示,由实验结果可知,PD 模型组与 Control 组相比,斑马鱼成骨细胞荧光面积($P<0.0001$)和荧光

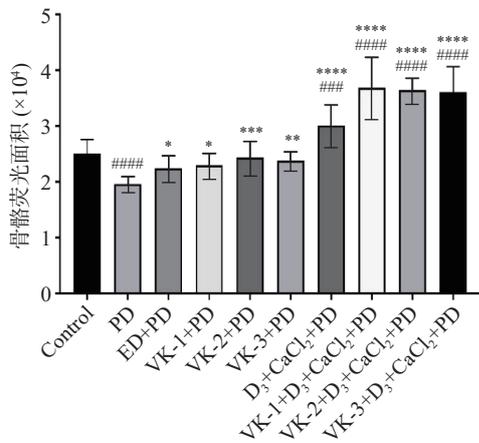


图 2 维生素 K₂ 及与 D₃ 和 CaCl₂ 联合用药对斑马鱼成骨细胞荧光面积影响的统计结果

Fig.2 Statistical results of the effect of vitamin K₂ alone and in combination with D₃ and CaCl₂ on fluorescence area of zebrafish osteoblasts

注:####表示实验组与 Control 组比较 $P<0.0001$,###表示实验组与 Control 组比较 $P<0.001$; *表示实验组与模型组比较 $P<0.05$,**表示实验组与模型组比较 $P<0.01$,***表示实验组与模型组比较 $P<0.001$,****表示实验组与模型组比较 $P<0.0001$;图 3 同。

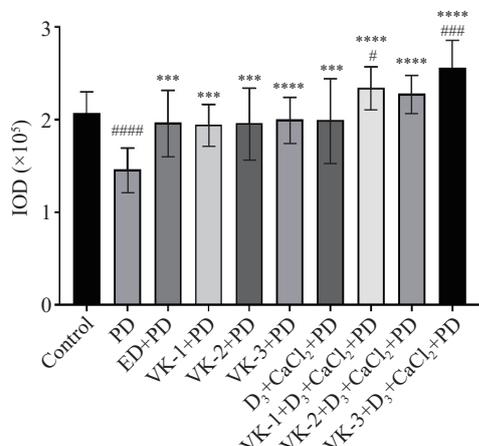


图 3 维生素 K₂ 及与 D₃ 和 CaCl₂ 联合用药对斑马鱼成骨细胞荧光密度影响的统计结果

Fig.3 Statistical results of the effect of vitamin K₂ alone and in combination with D₃ and CaCl₂ on fluorescence density of zebrafish osteoblasts

密度明显减少($P<0.0001$),表明由泼尼松龙诱导的骨质疏松模型成功;与模型组相比,阳性对照组依替膦酸二钠、D₃ 和 CaCl₂ 组合物均能显著提高斑马鱼成骨细胞荧光面积($P<0.05$, $P<0.0001$)和荧光密度($P<0.001$),表明模型结果可信。在实验浓度范围内,维生素 K₂ 及与 D₃ 和 CaCl₂ 联合使用能显著改善由泼尼松龙诱导的斑马鱼成骨细胞荧光面积($P<0.05$)和荧光密度减少($P<0.001$),且呈现出一定程度的剂量依赖性。此外,维生素 K₂ 通过与 D₃ 和 CaCl₂ 组合物联合使用,发挥协同效应,使其骨骼细胞荧光面积显著强于空白对照组($P<0.0001$),在维生素 K₂ 浓度为 20 μg/mL 时,其与 D₃ 和 CaCl₂ 联合使用可使斑马鱼成骨细胞荧光强度显著增强(与空白组相比, $P<0.001$),结合表型图结果可知,维生素 K₂ 与钙剂组成的复合物对斑马鱼骨骼荧光面积和荧光密度显著增强与鳃条骨的快速发育以及匙骨荧光密度增强有关。该现象也出现在淫羊藿素处理的铁过载诱导的骨质疏松斑马鱼中,其可显著促进斑马鱼骨骼发育^[28]。淫羊藿素为临床上常用于骨质疏松疾病治疗的淫羊藿的有效成分,结果表明,维生素 K₂ 与 D₃ 和 CaCl₂ 联合使用表现出极强的抗骨质疏松活性。

各实验组的相对改善骨骼健康能力的测定结果如图 4 所示,在实验浓度范围内,维生素 K₂ 单独处理可使骨质疏松斑马鱼骨骼状态恢复到与正常斑马鱼发育状态的 60%~87% 左右,D₃ 和 CaCl₂ 组合物对斑马鱼骨骼状态的改善能力约是空白组的 2 倍,维生素 K₂ 与 D₃ 和 CaCl₂ 联合使用可显著提升改善骨骼健康的能力,约是空白组的 4 倍左右,结果进一步证明维生素 K₂ 与 D₃ 和 CaCl₂ 联合使用可充分发挥协同效果。

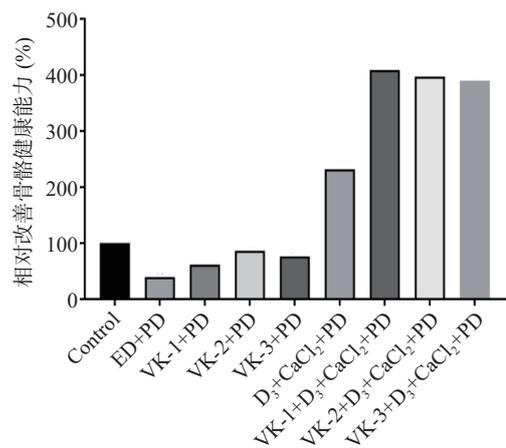


图 4 各给药组的相对改善骨骼健康能力统计结果
Fig.4 Statistical results of relative ability to improve bone health in each administration group

2.2 维生素 K₂ 及与钙剂联合使用的抗骨质疏松作用机制研究

以成骨细胞发育相关的基因 *alp*、*runx2a*、*sox9a*、*bmp2b*、*bmp4* 为检测因子,测定各药物组对斑马鱼成骨生成相关基因表达水平的影响,结果如图 5 所

示,由实验结果可知,在实验周期内,造模药泼尼松龙可以显著下调斑马鱼体内 *alp*、*bmp2a* 和 *bmp4* 基因的表达($P<0.01$),显著提升 *runx2a* 和 *sox9a* 基因的表达($P<0.0001$),可能的原因为机体对泼尼松龙导致的 *runx2a* 和 *sox9a* 基因过度抑制从而产生的一种补偿效果。 D_3 和 $CaCl_2$ 组合物可以显著改善泼尼松龙对 *alp* 和 *bmp2a* 基因抑制效果($P<0.001$),显著抑

制泼尼松龙导致的 *runx2a* 和 *sox9a* 基因上调($P<0.0001$)。维生素 K_2 以及维生素 K_2 与 D_3 和 $CaCl_2$ 联合使用,在实验浓度范围内可以显著改善泼尼松龙对 *alp* 和 *bmp2a* 基因抑制效果(维生素 K_2 浓度为 $20\ \mu\text{g/mL}$ 组除外)($P<0.05$),显著抑制泼尼松龙导致的 *runx2a* 和 *sox9a* 基因上调($P<0.0001$)。此外,维生素 K_2 在 $5\sim 10\ \mu\text{g/mL}$ 时,可以显著提升泼尼松龙

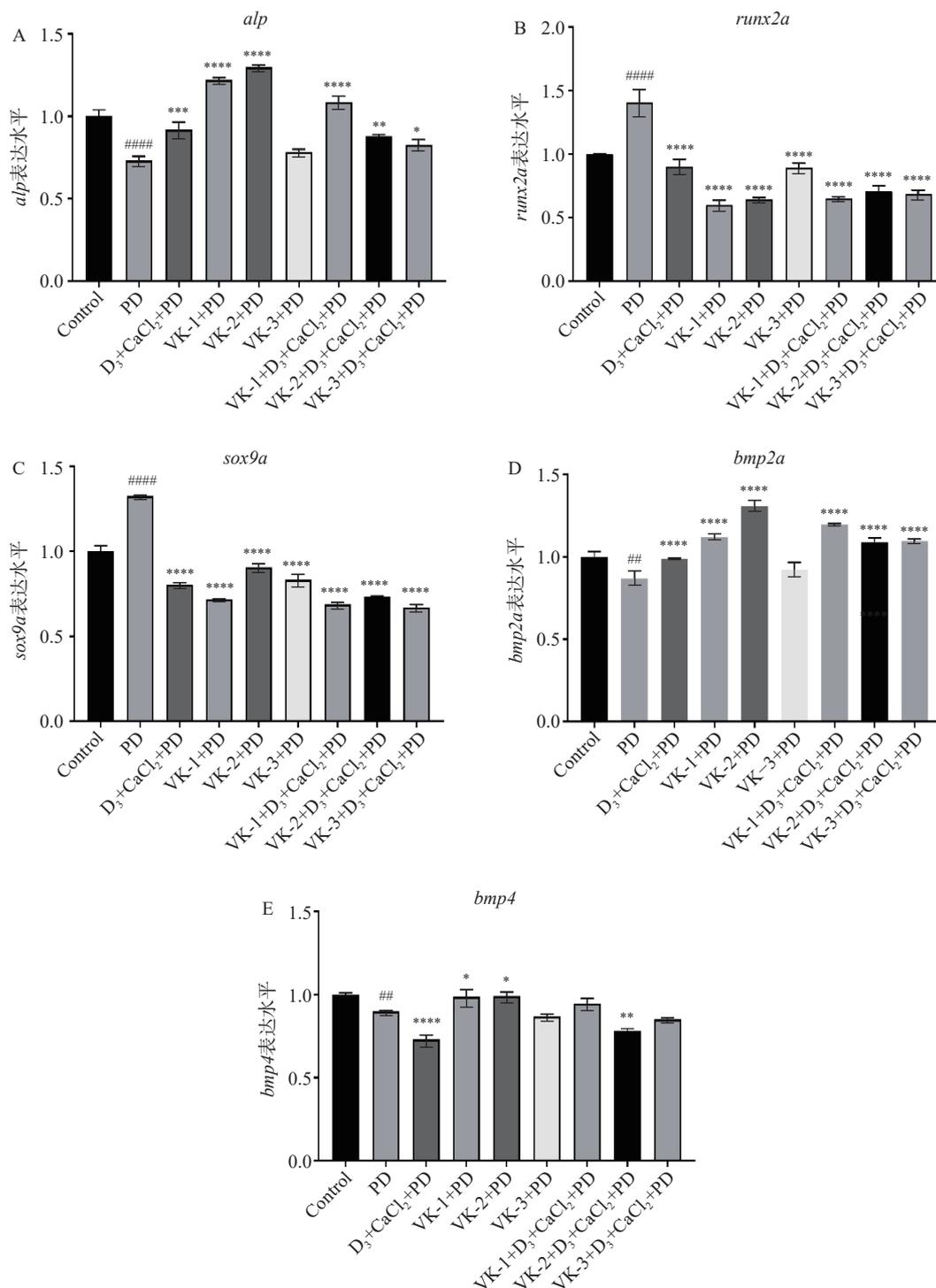


图5 维生素 K_2 及与 D_3 和 $CaCl_2$ 联合用药对斑马鱼成骨发育相关基因的影响

Fig.5 Effects of vitamin K_2 alone and in combination with D_3 and $CaCl_2$ on genes related to osteogenesis in zebrafish

注:##表示实验组与Control组比较 $P<0.01$,####表示实验组与Control组比较 $P<0.0001$; *表示实验组与模型组比较 $P<0.05$, **表示实验组与模型组比较 $P<0.01$, ***表示实验组与模型组比较 $P<0.001$, ****表示实验组与模型组比较 $P<0.0001$; 图6~图7同。

导致的 *bmp4* 基因的下调 ($P < 0.05$)。ALP 活性的高表达是成骨细胞分化成熟的早期标志^[20], *bmp2a* 和 *bmp4* 为成骨细胞分化过程中关键因子^[29], 因此, 维生素 K₂ 通过逆转泼尼松龙导致的成骨细胞生成相关的 *alp*、*bmp2a* 和 *bmp4* 基因下调, 从而改善骨形成状态。

以斑马鱼破骨生成相关基因 *opg*、*rank1*、*trap*、*ctsk* 为评价指标, 测定维生素 K₂ 及与钙剂联合处理对其表达水平的影响, 结果如图 6 所示, 由实验结果可知, 在实验周期内, 造模药泼尼松龙可以显著促进斑马鱼机体内 *opg*、*rank1*、*trap* 和 *ctsk* 基因的表达 ($P < 0.01$), D₃ 和 CaCl₂ 组合物可以显著抑制泼尼松龙对 *opg* 和 *ctsk* 基因上调效果 ($P < 0.0001$)。在实验浓度范围内, 维生素 K₂ 及与 D₃ 和 CaCl₂ 联合用药可显著改善泼尼松龙对 *rank1* 基因上调效果 ($P < 0.01$), 维生素 K₂ 单独给药可显著改善泼尼松龙对 *ctsk* 基因上调效果 ($P < 0.01$), 在维生素 K₂ 及与 D₃ 和 CaCl₂ 联合用药浓度为 20 μg/mL 才能显著改善泼尼松龙对 *ctsk* 基因上调效果 ($P < 0.0001$); 维生素 K₂ 在浓度为 5 μg/mL 时可显著改善泼尼松龙对 *opg* 基因上调效果 ($P < 0.0001$), 当维生素 K₂ 及与 D₃ 和 CaCl₂ 联合用药时, 其在药物浓度为 5 μg/mL 时表现

出更强的下调 *opg* 基因表达水平的能力 ($P < 0.0001$)。此外, 维生素 K₂ 通过与 D₃ 和 CaCl₂ 联合用药, 在低浓度组处理时 (5 μg/mL) 可以显著改善泼尼松龙导致的 *trap* 基因的上调 ($P < 0.01$)。破骨细胞是维持骨稳态的重要指标^[24], TRAP 是鉴定破骨细胞的关键因子^[20], 泼尼松龙可诱导破骨细胞分化激活, 从而导致上调 *opg*、*rank1*、*trap*、*ctsk* 基因表达, 从而导致骨质疏松。因此, 维生素 K₂ 通过抑制破骨细胞激活相关基因的表达, 从而调节骨吸收状态。

以斑马鱼细胞外基质中骨钙化相关基因 *vdrb*、*sparc*、*colla2* 为检测指标, 各基因表达水平结果如图 7 所示, 由实验结果可知, 在实验周期内, 造模药泼尼松龙可以显著抑制斑马鱼机体内 *vdrb*、*sparc* 和 *colla2* 基因的表达 ($P < 0.0001$), D₃ 和 CaCl₂ 组合物可以显著改善泼尼松龙对 *vdrb* 基因下调效果 ($P < 0.05$)。在实验浓度范围内, 维生素 K₂ 可显著提升 *vdrb* (维生素 K₂ 浓度为 20 μg/mL 组除外)、*sparc* 和 *colla2* 基因表达水平 ($P < 0.01$), 维生素 K₂ 及与 D₃ 和 CaCl₂ 联合用药后在低浓度时就可显著改善泼尼松龙导致的 *colla2* 基因表达下调 ($P < 0.0001$), 然而, 联合用药后, 仅在中浓度组可促进 *vdrb* 基因表达上调 ($P < 0.05$), 在低浓度组可促进 *sparc* 基因表达上

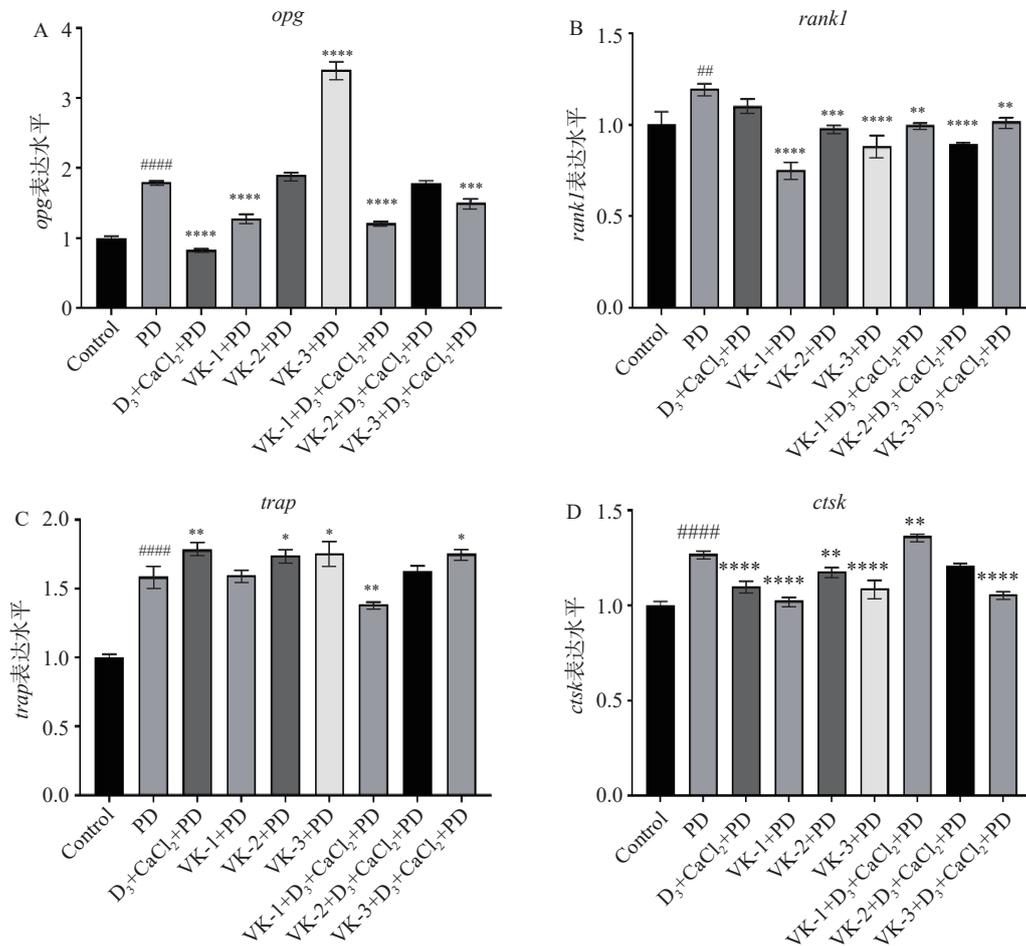


图 6 维生素 K₂ 及与 D₃ 和 CaCl₂ 联合用药对斑马鱼破骨发育相关基因的影响

Fig.6 Effects of vitamin K₂ alone and in combination with D₃ and CaCl₂ on genes related to osteoclast development in zebrafish

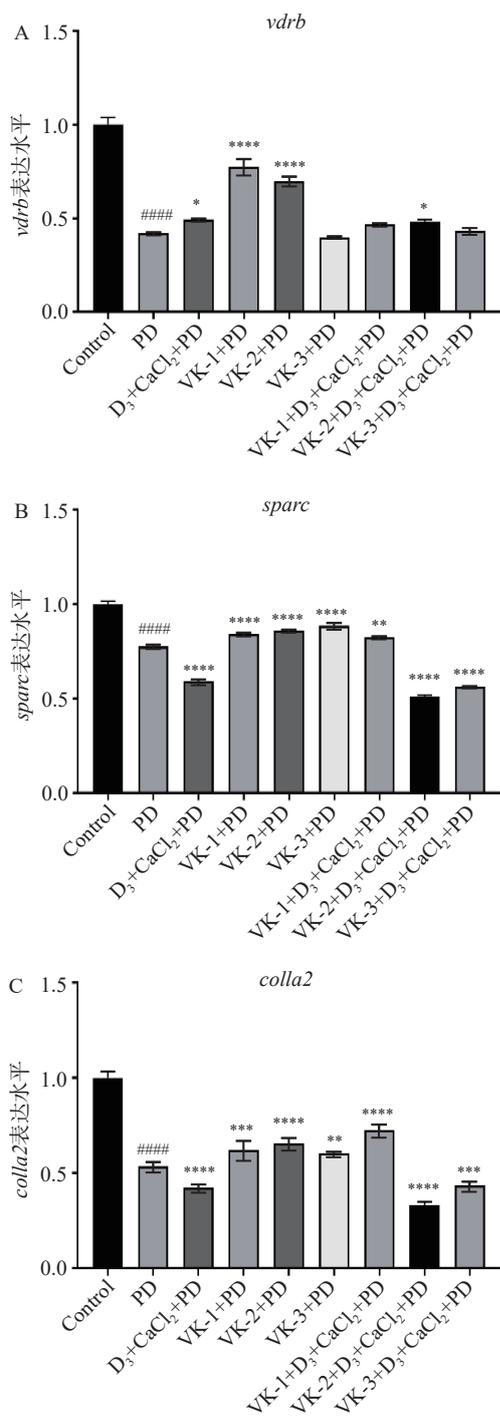


图7 维生素 K₂ 及与 D₃ 和 CaCl₂ 联合用药对斑马鱼细胞外基质骨钙化相关基因的影响

Fig.7 Effects of vitamin K₂ alone and in combination with D₃ and CaCl₂ on genes related to bone calcification in extracellular matrix of zebrafish

调($P < 0.01$)。vdrb 是一种维生素 D 受体转录因子,能调节体内钙或磷酸盐的吸收,sparc 和 colla2 基因不仅参与骨形成,还能够促进游离钙离子结合能力,恢复和维持骨骼矿化,加快骨重建^[16,24],因此,维生素 K₂ 抗骨质疏松活性的发挥离不开其上调细胞外基质中骨钙化相关基因 vdrb、sparc、colla2 表达的能力。

综上,维生素 K₂ 及与 D₃ 和 CaCl₂ 联合使用,通过调节骨形成、骨吸收、细胞外基质间转录因子的动

态平衡,发挥抗骨质疏松作用。

3 结论

本文通过对不同浓度维生素 K₂ 及其与钙剂联合处理下,骨质疏松斑马鱼的成骨细胞荧光面积、荧光密度以及成骨细胞生成、破骨细胞生成、抑制细胞外基质中骨钙化相关基因表达水平的变化,进行分析比较,明确维生素 K₂ 在 5~20 μg/mL 安全浓度范围内,能显著改善由泼尼松龙诱导的斑马鱼成骨细胞荧光面积和荧光密度的降低,其与 D₃ 和 CaCl₂ 联合使用时,发挥协同作用,显著促进斑马鱼成骨细胞荧光面积的增多。维生素 K₂ 可通过促进成骨细胞生成相关的 alp、bmp2a 和 bmp4 基因的表达、抑制破骨细胞生成相关的 opg、rank1、trap、ctsk 基因的表达以及促进细胞外基质中骨钙化相关基因 vdrb、sparc、colla2 表达从而发挥抗骨质疏松活性。

维生素 K₂ 与骨组织代谢息息相关,其不仅对骨形成具有促进作用,还可以对骨吸收起到抑制作用,还能调节细胞外基质因子,从而维持骨发育动态平衡,其单独或是与其他钙剂联合使用,对泼尼松龙诱导的骨质疏松具有很好的改善效果。当前疫情时代,国民健康意识显著提升,健康预防理念更加深入人心,此外,随着人口老龄化的加剧,骨健康类产品需求将呈现上升态势,因此,维生素 K₂ 作为一种安全的食品添加剂和功能原料,单独使用或是与钙剂联合使用,作为抗骨质疏松和改善骨骼健康的保健食品、功能食品的功能因子,将有广阔的市场前景,本文研究结果将为促进骨骼生产健康产品的研发提供理论基础。

参考文献

- [1] COMPSTO J E, MCCLUNG M, LESLIE W. Osteoporosis[J]. *Lancet*, 2019, 393: 364–376.
- [2] PECK W, BURCKHARDT P, CHRISTIANSEN C, et al. Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis[J]. *The American Journal of Medicine*, 1993, 94(6): 646–650.
- [3] SIRI E, CHEN Y, ABBOTT T, et al. Bone mineral density thresholds for pharmacological intervention to prevent fractures[J]. *Archives of Internal Medicine*, 2004, 164(10): 1108–1112.
- [4] ILVA B, BROY S, BOUTROY S, et al. Fracture risk prediction by non-BMD DXA measures: The 2015 ISCD Official Positions Part 2: Trabecular bone score[J]. *Journal of Clinical Densitometry*, 2015, 18(3): 309–330.
- [5] ENSRUD K, BLACKWELL T, FINK H, et al. What proportion of incident radiographic vertebral fractures in older men is clinically diagnosed and vice versa: A prospective study[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2016, 31(8): 1500–1503.
- [6] ZEYTIINOGLU M, JAIN R, VOKES T. Vertebral fracture assessment: Enhancing the diagnosis, prevention, and treatment of osteoporosis[J]. *Bone*, 2017, 104: 54–65.
- [7] ULIVIERI F, RINAUDO L. Beyond bone mineral density: A new dual X-ray absorptiometry index of bone strength to predict fragility fractures, the bone strain index[J]. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*, 2020, 7: 590139.

- [8] WINZENRIETH R, MICHELET F, HANS D. Three-dimensional (3D) microarchitecture correlations with 2D projection image gray-level variations assessed by trabecular bone score using high-resolution computed tomographic acquisitions: Effects of resolution and noise[J]. *Journal of Clinical Densitometry*, 2013, 16(3): 287–296.
- [9] MCCLOSKEY E, ODEN A, HAREY NC, et al. A meta-analysis of trabecular bone score in fracture risk prediction and its relationship to FRAX[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2016, 31(5): 940–948.
- [10] BRIOT K, PATEMOTTE S, KOLTA S, et al. Added value of trabecular bone score to bone mineral density for prediction of osteoporotic fractures in postmenopausal women: The OPUS study[J]. *Bone*, 2013, 57(1): 232–236.
- [11] 胥小琴, 张丹, 陶新城, 等. 维生素 K₂ 防治绝经后骨质疏松症作用的荟萃分析[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(12): 1780–1787. [XU X Q, ZHANG D, TAO X C, et al. A meta-analysis of the role of vitamin K₂ in the prevention and treatment of osteoporosis in postmenopausal women[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2021, 27(12): 1780–1787.]
- [12] HUANG W, YANG S, SHAO J, et al. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation[J]. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2007, 12: 3068–3092.
- [13] LI N, FELBER K, ELKS P, et al. Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation[J]. *Developmental Dynamics*, 2009, 238: 459–466.
- [14] KRISTIN D, IMKE A, ANASTASIA K, et al. Skeletal biology and disease modeling in zebrafish[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2021, 36(3): 436–458.
- [15] 詹扬, 韦英杰, 王长梅, 等. 淫羊藿总黄酮对泼尼松龙诱导斑马鱼致骨质疏松的防治作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(4): 251–255. [ZHAN Y, WEI Y J, WANG C M, et al. Preventive effect of total flavonoids of *Epomedii Folium* on the zebrafish osteoporosis model induced by prednisolone[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2014, 34(4): 251–255.]
- [16] 曹语珈, 王凯, 王子丽, 等. 多花黄精多糖对斑马鱼 2 型糖尿病合并骨质疏松症模型的药效学研究[J]. *中草药*, 2021, 52(21): 6545–6551. [CAO Y J, WANG K, WANG Z L, et al. Pharmacodynamics study of polysaccharide from *Polygonatum cyrtonema* on zebrafish model with type 2 diabetic and osteoporosis[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(21): 6545–6551.]
- [17] 徐志平, 卞龙艳, 闻纯. 防己诺林碱对糖皮质激素诱导雄性骨质疏松大鼠影响的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(3): 323–327. [XU Z P, BIAN L Y, WEN C. Effect of fangchinoline on glucocorticoid-induced osteoporosis in male rats[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2020, 26(3): 323–327.]
- [18] 董莹莹, 王猛, 郭艳, 等. 低钙饲料联合地塞米松致大鼠骨质疏松模型的建立[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(10): 1393–1397, 1404. [DONG Y Y, WANG M, GUO Y, et al. Establishment of a rat model of osteoporosis induced by low calcium diet combined with dexamethasone[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2019, 25(10): 1393–1397, 1404.]
- [19] 江瑞雪, 蒋欣泉, 文晋. 骨质疏松动物模型研究现状与进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(7): 1039–1044. [JIANG R X, JIANG X Q, WEN J. Research progress in osteoporosis animal modeling[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2022, 28(7): 1039–1044.]
- [20] 郑慧丽, 华永庆, 刘欣慧, 等. 基于斑马鱼模型的枸杞子改善骨质疏松活性部位筛选及其机制初探[J]. *药科学报*, 2023, 58(1): 127–138. [ZHENG H L, HUA Y Q, LIU X H, et al. Screening of active components and preliminary mechanism exploration of *Lycii Fructus* for improving osteoporosis based on the zebrafish model[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2023, 58(1): 127–138.]
- [21] 蒲诗雅, 裴得胜. 邻苯二甲酸酯暴露对斑马鱼幼鱼生长发育的影响[C]. 重庆市第二届生态环境技术大会暨重庆市环境科学学会 2019 年学术年会论文集, 2019: 8. [PU S Y, PEI D S. Growth and development effects of zebrafish larvae after exposure to phthalic acid esters (PAEs)[C]. Proceedings of the 2nd Chongqing Eco-Environmental Technology Conference and the 2019 Academic Annual Meeting of Chongqing Environmental Science Society, 2019: 8.]
- [22] 谭登, 张玉, 张农山, 等. 补肾通络方对骨质疏松斑马鱼效应评价及破骨细胞自噬机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7): 79–85. [TAN D, ZHANG Y, ZHANG N S, et al. Effect of Bushen Tongluo Formula on osteoporosis of zebrafish and study on autophagy mechanism of osteoclast[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2020, 26(7): 79–85.]
- [23] HUANG H, LIN H, LAN F, et al. Application of bone transgenic zebrafish in anti-osteoporosis chemical screening[J]. *Animal Models and Experimental Medicine*, 2018, 1: 53–61.
- [24] HE H, WANG C, TANG Q, et al. Possible mechanisms of prednisolone-induced osteoporosis in zebrafish larva[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 101: 981–987.
- [25] 詹扬, 李颖萌, 余婧婷, 等. 基于两种饮食的斑马鱼骨质疏松模型评价骨肽的抗骨质疏松作用[J]. *中国食品添加剂*, 2022, 33(12): 134–138. [ZHAN Y, LI Y M, YU J T, et al. Evaluation of the anti-osteoporosis effect of osteo peptide with two zebrafish osteoporosis models[J]. *China Food Additives*, 2022, 33(12): 134–138.]
- [26] WESTTERFIELD M. The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*)[M]. Westfield, Eugene, OR, 1993.
- [27] 彭伟, 张文娟, 薛钰. 斑马鱼作为骨骼疾病模型的研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(2): 248–253. [PENG W, ZHANG W J, XUE Y. Research progress of zebrafish models of bone diseases[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2019, 27(2): 248–253.]
- [28] 肖世长. 淫羊藿素通过下调雌激素缺失状态下的铁过载抗绝经后骨质疏松研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2022. [XIAO S C. Icaritin inhibits postmenopausal osteoporosis by down regulating iron overload in estrogen deficient state[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2022.]
- [29] 杨建, 佟广香, 郑先虎, 等. 肌间刺缺失对斑马鱼骨骼发育的影响[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(3): 546–553. [YANG J, TONG G X, ZHENG X H, et al. Comparative analysis of skeletal development between wildtype zebrafish and intermuscular bone-deficient mutants[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(3): 546–553.]