

维生素 K2 对老年去卵巢大鼠血管钙化的影响

陈雪英, 杨雅, 游志刚, 丁颖, 吴韦, 姜醒华

(南昌大学第二附属医院心内科, 江西省南昌市 330066)

[关键词] 维生素 K2; 基质 Gla 蛋白; 去卵巢大鼠; 血管钙化

[摘要] **目的** 在老年去卵巢大鼠模型上探讨维生素 K2 对血管钙化的影响。**方法** 36 只 10 个月龄雌性 SD 大鼠, 随机分为假手术组、去卵巢组、去卵巢 + 维生素 K2 组。去卵巢手术后 3 周, 去卵巢 + 维生素 K2 组给予维生素 K2 灌胃 30 mg/kg, 每周 5 次, 持续 12 周。各组大鼠在术前及药物干预后每 3 周留取血清及尿液, 18 周后处死大鼠, HE 染色观察子宫、血管组织变化, 酶联免疫吸附法检测血清和尿液基质 Gla 蛋白 (MGP) 含量及雌激素水平变化, 荧光实时定量 PCR 检测胸主动脉 MGP mRNA 的表达, 免疫组织化学法观察血管未羧化 MGP (ucMGP) 的表达, Von Kossa 染色观察动脉钙化, 原子分光光度计测定血管总钙含量。**结果** 去卵巢后大鼠子宫和血管组织切片呈现明显不同, 血中雌激素水平下降, 表明去卵巢大鼠模型构建成功。去卵巢前各组大鼠血清及尿液中 MGP 含量无明显差异 ($P > 0.05$); 去卵巢后, 假手术组 MGP 含量无明显变化, 去卵巢组 MGP 含量下降, 去卵巢 + 维生素 K2 组 MGP 含量先下降后上升。去卵巢 + 维生素 K2 组血管中 MGP mRNA 表达量较假手术组高 ($P < 0.01$), 较去卵巢组低 ($P < 0.01$)。血管 ucMGP 表达出现在血管钙化周围区域, 去卵巢 + 维生素 K2 组未见明显 ucMGP 的表达。去卵巢 + 维生素 K2 组血管总钙含量明显低于去卵巢组 ($P < 0.01$), 高于假手术组 ($P < 0.05$)。**结论** MGP 在绝经后血管钙化的发病中有重要作用, 维生素 K2 可能通过调节 MGP 羧化及基因表达抑制血管钙化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Vitamin K2 on the Vascular Calcification of Old Ovariectomized Rats

CHEN Xue-Ying, YANG Ya, YOU Zhi-Gang, DING Ying, WU Wei, and JIANG Xing-Hua

(Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[KEY WORDS] Vitamin K2; Matrix Gla Protein; Ovariectomized Rats; Vascular Calcification

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of Vitamin K2 on vascular calcification in old ovariectomized rats model.

Methods Thirty-six ten months female SD rats were allocated into three groups randomly: sham operation group, ovariectomized (OVX) group and OVX + Vitamin K2 (OVX + VK2) group. Rats in OVX + VK2 group were administered orally with Vitamin K2 (30 mg/(kg · d), 5 times a week) after three weeks of ovariectomy for 12 weeks. The urine and serum of all rats were kept every three weeks. All rats were sacrificed after 18 weeks, uterus and arteries were observed by histochemical method. The contents of MGP in serum and urine were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Relative quantification of MGP mRNA expression in arterial was detected by Fluorescent real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction. Expression of ucMGP was detected by immunohistochemistry. Arterial calcification was evaluated by Von Kossa staining. The content of arterial calcium was measured. **Results** After 18 weeks of ovariectomized, the pathological section of uterus and aortic had different variation in different groups. The content of estrogen in serum had no difference before ovariectomized. Before sacrifice, the content of estrogen of sham group had no change, the other groups reduced ($P < 0.05$). The content of MGP in serum and urine had no difference before ovariectomized, the content of MGP in serum and urine decreased in OVX group, the content of MGP in serum and urine decreased and then increased in OVX + VK2 group. Relative quantification of MGP mRNA expression of arterial in OVX + VK2 group was significantly lower than sham group ($P < 0.01$), and was higher than that in OVX group ($P < 0.01$).

[收稿日期] 2011-07-13

[基金项目] 国家自然科学基金(30860112)

[作者简介] 陈雪英, 硕士研究生, 研究方向为绝经后女性血管钙化和骨质疏松的共同发病机制。通讯作者姜醒华, 主任医师, 副教授, 研究方向为冠心病的发病机制及介入治疗, E-mail 为 jiangxhcq@sohu.com。杨雅, 博士, 副主任医师, 研究方向为骨质疏松的发病机制和临床防治以及糖尿病的相关临床研究。

The size of ucMGP localized in OVX + VK2 group was less than that in OVX group. The contents of arterial calcium in OVX + VK2 group were higher than that in sham group ($P < 0.05$) and lower than that in OVX group ($P < 0.01$).

Conclusions Vitamin K2 can improve vascular calcification of OVX rats possibly through the regulation of MGP carboxylation and gene expression.

血管钙化是心脑血管疾病高发病率和高死亡率的重要因素之一。血管钙化在绝经后老年女性中发病率升高, 并和骨质疏松同时并存, 大量流行病学资料也显示动脉钙化所致的心血管疾病和骨质疏松有密切联系^[1]。但具体的作用机制不明。近来研究发现基质 Gla 蛋白 (MGP) 与血管钙化和骨矿化形成密切相关, 它是一种维生素 K 依赖性循环蛋白, 其活化需要维生素 K 作为辅酶的 γ -羧化作用, 未羧化的 MGP (ucMGP) 不具有活性, 活化的 MGP 是软骨及血管钙化的最主要的抑制蛋白^[2]。故设想维生素 K2 可能通过调节 MGP 基因的表达及羧化, 对绝经后女性的血管钙化有治疗作用。本研究是在 10 月龄去卵巢大鼠模型基础上观察维生素 K2 对 MGP 蛋白羧化及基因表达的影响, 探讨维生素 K2 抑制绝经后女性血管钙化的作用机制, 为老年女性这一特殊群体血管钙化的防治提供重要的研究资料以及对临床诊断和治疗提供指导价值。

1 材料和方法

1.1 实验试剂和主要仪器

维生素 K2 (Sigma, St. Louis, MO); 大鼠 MGP 定量检测试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司); MGP (未羧化) 一抗 (吉泰生物杭州办事处, ALX-804-642), 二抗 (EliVision™ 试剂盒); 酶标仪 (美国宝特 ELX800 型); 原子分光光度计 (日立 Z-500 型); PRISM7300PCR 仪 (美国 ABI 公司); RNAstore 样本保存液 (TIANGEN, DP408); RNAiso Plus (D9108S); PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (DRR037S)、Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (DRR039A)、PCR 配套试剂 (大连宝生物工程公司); 其余试剂均为市售分析纯。

1.2 分组与造模

36 只 10 月龄 Sprague-Dawley 雌性大鼠 (江西省中医学实验动物中心提供) 按照 1:2 的比例随机分为假手术组 (12 只) 与模型组 (24 只), 各组大鼠称重后, 用 3% 戊巴比妥钠 0.1 mL/100 g 腹腔注射。大鼠俯卧位固定, 于脊柱旁 1 cm, 肋弓下 2 cm 处开一约 1.5 cm 切口, 钝性分离至肌肉层, 剪开腹膜, 找到卵巢, 用眼科剪沿输卵管剪断分离卵巢, 无菌丝线

结扎, 假手术组仅切除卵巢附近的相当于卵巢大小的一部分脂肪组织, 压迫止血后, 分层缝合肌肉筋膜及皮肤。术后均肌注青霉素 40 万单位, 2 次/天, 连续 3 天, 术后分笼饲养。饲养 3 周后将模型组分为两组: 一组为去卵巢 (OVX) 组 (12 只), 另一组为去卵巢 + 维生素 K2 (OVX + VK2) 组 (12 只)。

1.3 药物干预及标本收集

去卵巢手术后 3 周, 维生素 K2 用丙二醇及丙三醇混合液溶解, OVX + VK2 组给予维生素 K2 溶解液 0.3 mL 灌胃, 每周 5 次, 共 12 周, 给药剂量为 30 mg/(kg · d), 给药剂量每 2 周按体重调整一次, 其余两组给予 0.3 mL 丙二醇及丙三醇混合液灌胃。术前及药物干预后每 3 周眼眶静脉丛取血, 代谢笼留取尿液 (-20℃ 保存), 共收集 6 次。18 周后注射过量戊巴比妥钠处死动物, 迅速取胸腹主动脉全长 (主动脉弓下约 1 cm), -20℃ 保存, 一部分保存于组织保存液中, 一部分置于 4% 多聚甲醛固定液中。

1.4 血清和尿中 MGP 含量及血中雌激素水平检测

血清和尿液中 MGP 含量及初次取血和末次取血血中雌激素水平采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 进行检测, 测定参照试剂盒说明进行。所有标本均为集中检测。

1.5 血管 MGP mRNA 表达检测

1.5.1 总 RNA 的提取及逆转录 从样本保存液中取出, 用滤纸吸干表面液体, 将部分组织 (约 100 mg) 置于盛有液氮的研钵内, 快速研成粉末状, 迅速将粉末移入匀浆器, 加入 RNAiso Plus 1 mL, 冷冻匀浆, 余按照试剂盒说明书提取总 RNA。立即逆转录合成 cDNA, 取 2 μ L RNA 样本, 反应体系 20 μ L, 反应条件: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 1 个循环。

1.5.2 荧光实时定量 PCR 反应 GAPDH 作为内标基因, 引物及探针均由大连宝生物工程公司设计合成。MGP 引物序列: 上游 5'-CGC TAC GCC CTG ATC TAC G-3', 下游 5'-GGA ATA TGA AAC CAG ACT CCG TAA C-3', 探针序列 5'(FAM)-ACG CCG CCT ACA ACC GCT ACT TCA G (Eclipse)-3'; GAPDH 序列: 上游 5'-TGG TCT ACA TGT TCC AGT ATG ACT-3', 下游 5'-CCA TTT GAT GTT AGC GGG ATC TC-3', 探针序列 5'(FAM)-CCA CGG CAA GTT CAA CGG CAC AGT (Eclipse)-3'。MGP 优化后的

反应体系: Premix Ex Taq™ (1 ×) 25 μL, MGP 上下游引物(10 μmol/L) 各 1.0 μL, 荧光探针溶液 2.0 μL, ROX Reference Dye (50 ×) 1.0 μL, DNA 模板 2.0 μL, 灭菌蒸馏水 16.0 μL, 总反应体系为 50.0 μL。GAPDH 优化后的反应体系: Premix Ex Taq™ (1 ×) 25 μL, GAPDH Forward Primer (10 μmol/L) 0.8 μL, MGP Reverse Primer (10 μmol/L) 0.8 μL, 荧光探针溶液 1.6 μL, ROX Reference Dye (50 ×) 1.0 μL, DNA 模板 2.0 μL, 灭菌蒸馏水 18.0 μL, 总反应体系为 50.0 μL。反应条件均为: 95℃ 3 s, 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 循环 40 次。每标本检测 2 次。根据最终的优化体系, 比较目的基因与内标基因的扩增效率的斜率回归有无显著性差异。如果没有显著性差异, 应用比较阈值法即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 所得结果表示目的基因相对于正常对照组的倍数, 公式为 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{MGP} - Ct_{GAPDH})_{\text{实验组}} - (Ct_{MGP} - Ct_{GAPDH})_{\text{对照组}}$ 。如果有显著性差异, 按 Rasmussen 计算出相对表达差异^[3]。

1.6 血管 Von Kossa 染色及 ucMGP 免疫组织化学染色

血管组织进行石蜡包埋、切片, 行常规脱蜡、脱水后浸入 5% 硝酸银溶液中, 日光照射 60 min, 再用 2.5% 硫代硫酸钠溶液处理 5 min 定影, 然后依次用苏木素复染, 经脱水、透明、封片^[4]。并行 HE 染色

观察子宫、血管组织变化。免疫组织化学法检测 ucMGP 的表达, 步骤按说明书进行, 一抗为 anti = GluMGP, 二抗为 EliVision™ plus 试剂盒。

1.7 血管总钙含量测定

胸主动脉(约 1 cm) 80℃ 烤干, 称重, 加入 2 mol/L 硝酸 3 mL, 180℃ 消化并烤干, 冷却后加入去离子水(含 27 nmol/L 氯化钾和 27 μmol/L 氯化铜) 10 mL 复溶, 取 2 mL 加入 1% 氯化锶 100 μL, 原子吸收分光光度计在 422.7 nm 处读取吸光度, 测定组织的钙含量。

1.8 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同时间各组间的比较采用重复测量数据的两因素多水平方差分析, 多组比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 Student-Newman-Keuls 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 去卵巢大鼠子宫组织形态学变化

卵巢切除 18 周后, 假手术组子宫内膜正常, 腺腔扩张、腺体丰富, 肌层玻璃样变不明显; OVX 组和 OVX + VK2 组子宫内膜明显萎缩, 腺体数量明显减少, 腺腔多闭合, 肌层玻璃样变性(图 1)。

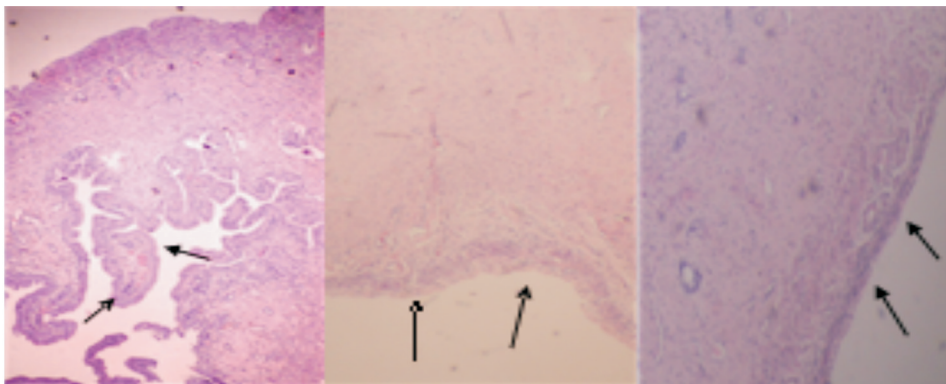


图 1. 去卵巢 18 周后大鼠子宫组织形态学变化(HE 染色, 200 ×) 从左至右为假手术组、OVX 组、OVX + VK2 组。箭头所指为子宫内膜。

Figure 1. Changes of uterus histomorphology after 18 weeks in ovariectomized rats

2.2 去卵巢大鼠主动脉组织形态学变化

假手术组主动脉血管内膜、中膜和外膜完整, 中膜有数层弹性膜构成; OVX 组主动脉血管内膜完整, 外膜毛糙, 中层有多发团块钙沉积; OVX + VK2 组主动脉内膜稍毛糙, 中层未见明显钙化沉积。血管 Von Kossa 染色示 OVX 组血管中膜弹性纤维间

可见大量棕黑色颗粒(图 2)。

2.3 血雌激素水平和血管总钙含量

各组去卵巢前雌激素水平无明显差异。处死前, 假手术组血雌激素水平比去卵巢前稍低, 但无统计学差异; OVX 组和 OVX + VK2 组血雌激素水平明显降低($P < 0.05$)。OVX + VK2 组血管总钙含量明

显低于 OVX 组 ($P < 0.01$), 但高于假手术组 ($P < 0.05$; 表 1)。

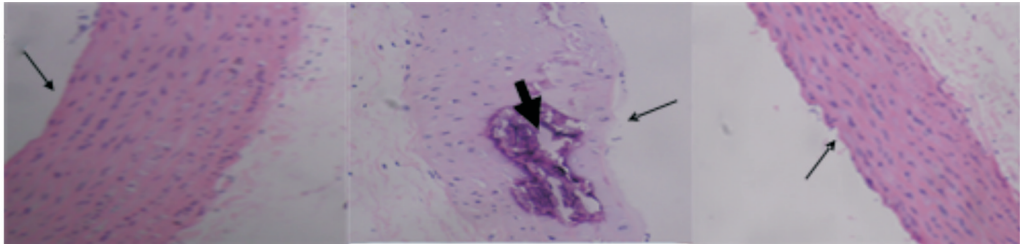


图 2. 去卵巢 18 周后大鼠主动脉组织形态学变化 (200 ×) 从左至右为假手术组、OVX 组、OVX + VK2 组; 细箭头所指为血管内膜, 粗箭头所指为钙沉积部位。

Figure 2. Changes of aortic histomorphology after 18 weeks in ovariectomized

表 1. 去卵巢前及处死前血雌激素水平及血管总钙含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 1. The content of serum estrin before ovariectomized and sacrificed and total calcium content in aortic vascular

分 组	雌激素浓度 (ng/L)		血管总钙含量 ($\mu\text{mol/g}$)
	去卵巢	处死前	
假手术组	155.6 \pm 2.1	144.0 \pm 2.1	95.2 \pm 23.4
OVX 组	151.6 \pm 2.2	123.7 \pm 1.8 ^a	734.9 \pm 174.0 ^b
OVX + VK2 组	145.5 \pm 1.8	124.0 \pm 2.1 ^a	284.9 \pm 52.7 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$, 与去卵巢前比较; b 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 OVX 组比较。

2.4 大鼠血清及尿液中 MGP 含量

去卵巢前血清及尿液中 MGP 含量无明显差异, 去卵巢后 OVX 组和 OVX + VK2 组血清及尿液中 MGP 含量下降, 随后 OVX 组变化不明显, OVX + VK2 组呈上升趋势 (图 3 和图 4)。

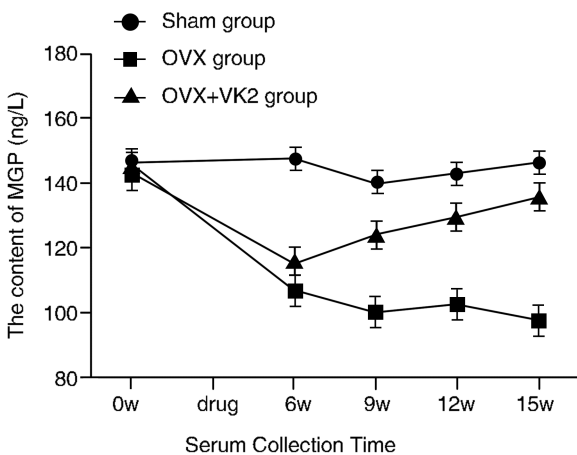


图 3. 各组大鼠血清 MGP 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)
Figure 3. Contents of serum MGP in ovariectomized rats

2.5 血管 MGP mRNA 的表达

OVX 组 MGP mRNA 表达最高, 假手术组最低, OVX + VK2 组表达量介于两者之间, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 表 2)。

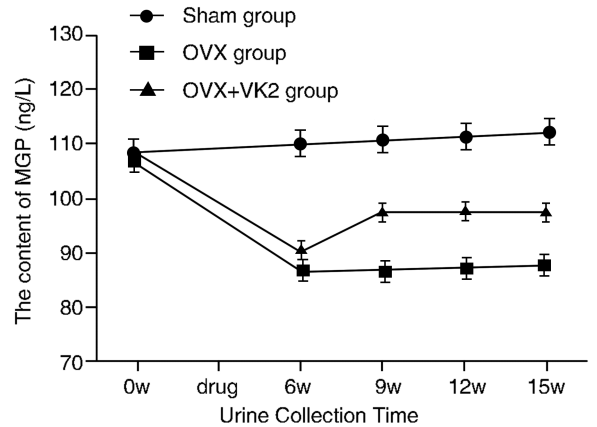


图 4. 各组大鼠尿液中 MGP 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)
Figure 4. Contents of urine MGP in ovariectomized rats

表 2. 维生素 K2 对血管 MGP mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2. The expression of MGP mRNA in rat aorta

分 组	Ct 值		$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (与 OVX 组比较)
	MGP	GAPDH	
假手术组	14.18 \pm 0.55	16.92 \pm 1.03	101.85 \pm 22.54
OVX 组	19.42 \pm 3.69	18.09 \pm 3.78	1 ^a
OVX + VK2 组	16.51 \pm 1.13	17.84 \pm 1.19	34.64 \pm 4.50 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 OVX 组比较。

2.6 血管 Von Kossa 染色及 ucMGP 免疫组织化学染色情况

假手术组血管钙化不明显, ucMGP 有少量表达, 沉积于中膜弹性纤维间; OVX 组可见大片钙化区, ucMGP 在钙化周围区聚集; OVX + VK2 组钙化不明显, ucMGP 阳性表达较少 (图 5)。

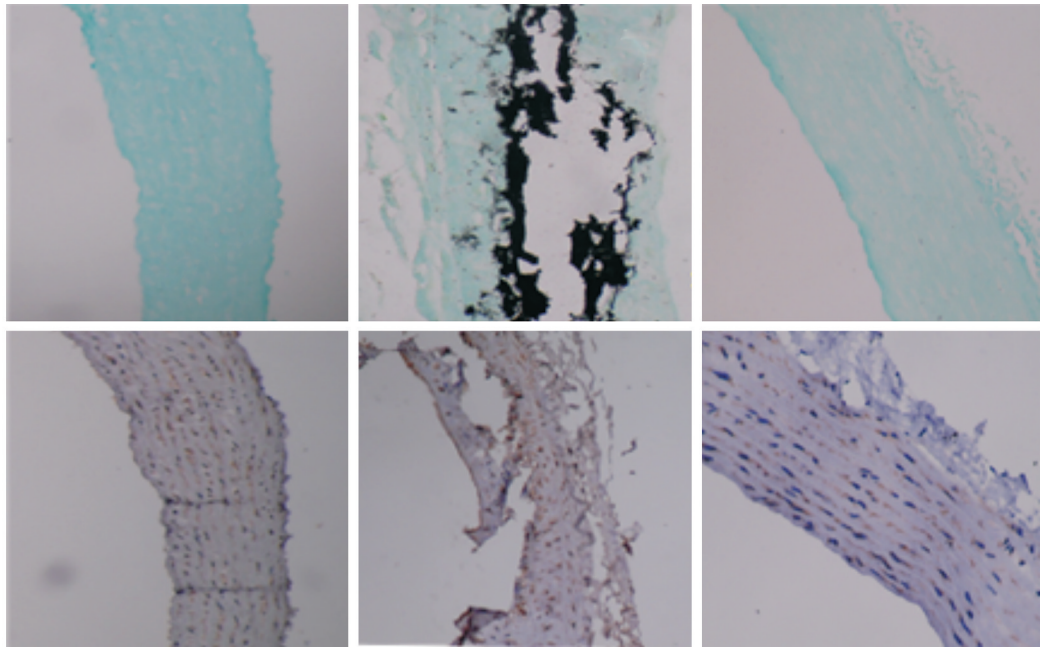


图 5. 血管 Von Kossa 染色和 ucMGP 免疫组织化学染色 上为血管 Von Kossa 染色, 下为 ucMGP 免疫组织化学染色; 从左至右为假手术组、OVX 组、OVX + VK2 组。

Figure 5. Von Kossa staining and ucMGP immunohistochemical staining in arterial vessel wall

3 讨论

血管钙化是动脉粥样硬化、高血压、糖尿病血管病变、血管损伤、慢性肾病等疾病的共同病理过程, 导致血管壁僵硬性增加、顺应性降低、心肌缺血、左心室肥大和心力衰竭, 引发血栓形成、斑块破裂等严重后果, 是心血管疾病的重要危险因子, 且在绝经后女性发生率更高^[5,6]。大量临床研究显示, 摄入维生素 K2 可以减轻冠状动脉钙化, 而维生素 K1 无此作用, 但具体的作用机制尚不清楚^[7,8]。现已明确 MGP 是血管及软骨等钙化的抑制剂^[2], MGP 基因敲除小鼠出现血管及软骨的异常钙化, 身材矮小, 骨质疏松及骨折, 由于动脉硬化于 2 个月内死亡^[9]。而且 MGP 活化需要维生素 K 作为辅酶的 γ -羧化作用来完成, 所以 MGP 在维生素 K2 抑制血管钙化中可能发挥重要作用。

绝经后女性血管钙化的发病率较绝经前明显升高, 可能与绝经后女性雌激素水平下降有关, 其具体的作用机制不明确。本研究在老龄去卵巢大鼠模型上观察维生素 K2 对血管钙化及血管中 MGP mRNA 表达的影响, 探讨其影响血管钙化的作用机制。雌性大鼠虽没有绝经期, 但去卵巢后的身体状态与绝经后女性相似, 是国际上最为常用的一种模拟妇女绝经后骨质疏松的模型^[10]。本研究应用 10 个月龄的 SD 大鼠, 更符合老年女性绝经后的身体代谢情况。病理切片结果可见, 去卵巢后 18 周由于雌激素

水平的下降, OVX 组子宫内膜萎缩, 玻璃样变, 同时出现血管钙化, 使血管总钙含量增高, 和临床所见绝经后女性心血管事件发病率增高相符。维生素 K2 干预使子宫内膜改善不明显, 却使血管钙化减轻, 同时使血管总钙含量降低。说明老年 SD 大鼠去卵巢后血管钙化加重, 而维生素 K2 可以抑制血管钙化。

但 MGP 抑制血管钙化的具体机制尚不明确, 现有以下几种研究: ①通过其 Gla 残基结合钙形成羟基磷灰石结晶, 阻止钙过饱和及在血管壁中沉积^[11]。游离钙离子是 MGP 调节的重要信号, MGP 可通过 G 蛋白介导的阳离子敏感机制对病理性钙化进行调节^[12]。②MGP 可触发血管中层平滑肌细胞向骨软骨细胞前体分化, 最终转分化为骨细胞和软骨细胞, 参与血管钙化^[13]。③MGP 通过调节碱性磷酸酶活性, 参与骨形态发生蛋白 2 介导的骨发生过程^[14]。④研究发现 MGP 可以通过 RANKL 途径调节血管钙化及骨的形成^[15]。

本研究中, 血清及尿液 MGP 含量在摘除卵巢后下降, 而维生素 K2 干预可以使其再升高, 假手术组 MGP 含量变化不明显, 由此可见维生素 K2 可使体液中 MGP 含量增加, 体液中 MGP 的高含量预示着对血管钙化的保护作用。所以血清 MGP 含量或许可以作为临床评价血管钙化情况的一项指标, 近来也有相关方面的报道^[16]。其原因可能是假手术组血管钙化较多, 产生的 MGP 直接和局部钙盐结合, 不释放到血中, 而维生素 K 干预后使血管钙化减轻, 血管局部钙

盐减少,提供少的基质来结合 MGP^[17]。

血管 Von Kossa 染色及 ucMGP 免疫组化染色显示 ucMGP 在钙化区域周围聚集,钙化越严重者 ucMGP 阳性表达越多(OVX 组),和文献报道一致^[18],维生素 K2 组血管钙化不明显,ucMGP 阳性表达也较少。Rennenberg 等^[19]研究显示长期服用维生素 K 拮抗剂香豆素类使股动脉钙化增加,可能是其抑制了 MGP 的羧化所致。那么维生素 K2 可以减少血管中 ucMGP 的量,可能是促使其羧化转变为有活性的 MGP,从而发挥抑制血管钙化的作用,使维生素 K2 干预组的血管钙化减轻。

实时荧光定量 PCR (FQ-PCR) 技术是一种新的体外核酸扩增技术,具有特异性好,灵敏度高,线性关系好,重现性好等特点,本研究建立了采用 Taq-Man 探针荧光定量 PCR 检测血管 MGP 基因表达,并利用相对定量公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来进行基因表达差异的比较,可以更为客观地反映基因表达水平的差异情况。本研究显示去卵巢大鼠血管 MGP mRNA 表达降低,而维生素 K2 可以上调 MGP mRNA 的表达。并且有研究显示,维生素 K2 可以使血管平滑肌细胞中 MGP mRNA 表达升高^[20],与本研究结果相一致。这说明维生素 K2 使 MGP 基因在血管中表达升高,抑制血管钙化的作用增强。但也有研究显示,维生素 K 拮抗剂华法林激发钙在血管中沉积,并且增加 MGP 在这个区域沉积^[16]。其机制可能是局部钙沉积可以激发 MGP 表达升高来抑制血管钙化。

综上所述,去卵巢大鼠血管钙化加重,并伴有 MGP mRNA 表达降低,而维生素 K2 可以改善血管钙化,使血清 MGP 蛋白升高,血管 ucMGP 表达减少,血管 MGP mRNA 表达升高,说明 MGP 在绝经后女性血管钙化的发病机制中有重要的作用,而维生素 K2 调节 MGP 基因的表达及活化作用可能是其抑制血管钙化的部分作用机制。所以,维生素 K2 抑制绝经后女性血管钙化,可作为防治绝经后心血管疾病的一种选择。但目前尚未在临床使用,对于绝经期女性患者如何使用维生素 K2,其合适剂量、使用时间及对血液系统的影响等有待进一步临床观察与研究。

[参考文献]

[1] Eastell R, Newman C, Crossman DC. Cardiovascular disease and bone[J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 503: 78-83.
 [2] Price PA, Williamson MK. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein [J]. J Biol Chem, 1985, 260: 14971-975.
 [3] Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems[J]. J Mol Endocrinol, 2002, 29: 23-39.

[4] 张勇刚,张旭升,魏睿宏,等. 大鼠钙化血管尾加压素 II 及其受体上调[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (7): 505-509.
 [5] Nandalur KR, Baskurt E, Hagspiel KD, et al. Carotid artery calcification on CT May independently predict stroke risk[J]. Am J Roentgenol, 2006, 186: 547-552.
 [6] Budoff MJ, Shaw LJ, Liu ST, et al. Long-term prognosis associated with coronary calcification: observations from a registry of 25253 patients[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 49: 1 860-870.
 [7] Gast GC, de Roos NM, Sluijs I, et al. A high menaquinone intake reduces the incidence of coronary heart disease [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009, 19: 504-510.
 [8] Beulens JW, Bots ML, Atsma F, et al. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification[J]. Atherosclerosis, 2009, 203: 489-493.
 [9] Luo G, Ducy P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix Gla protein[J]. Nature, 1997, 386: 78-81.
 [10] Ishihara A, Sasaki T, Debari K, et al. Effects of ovariectomy on bone morphology in maxillae of mature rats [J]. J Electron Microsc, 1999, 48: 465-469.
 [11] Hofbauer LC, Brueck CC, Shanahan CM, et al. Vascular calcification and osteoporosis from clinical observation towards molecular understanding[J]. Osteoporos Int, 2007, 8: 251-259.
 [12] Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Weissberg PL, et al. Matrix Gla protein is regulated by a mechanism functionally related to the calcium-sensing receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 277: 736-740.
 [13] Speer MY, Yang HY, Brabb T, et al. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries [J]. Circ Res, 2009, 104: 733-741.
 [14] Xue W, Wallin R, Olmsted-Davis EA, et al. Matrix Gla protein function in human trabecular meshwork cells: inhibition of BMP2-induced calcification process [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47: 997-1 007.
 [15] Cranenburg EC, Koos R, Schurgers LJ. Characterisation and potential diagnostic value of circulating matrix Gla protein (MGP) species [J]. Thromb Haemost, 2010, 104: 811-822.
 [16] Osako MK, Nakagami H, Koibuchi N, et al. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system [J]. Circ Res, 2010, 107: 466-475.
 [17] Schurgers LJ, Spronk HM. Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats [J]. Blood, 2007, 109: 2 823-831.
 [18] Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, et al. Novel conformation-specific antibodies against matrix-carboxylglutamic acid (Gla) protein: Undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25: 1 629-633.
 [19] Rennenberg RJ, van Varik BJ, Schurgers LJ, et al. Chronic coumarin treatment is associated with increased extracoronary arterial calcification in humans [J]. Blood, 2010, 115: 5 121-123.
 [20] Saito E, Watch H, Sato F, et al. Treatment with Vitamin K2 combined with bisphosphonates synergistically inhibits calcification in cultured smooth muscle cells [J]. J Atheroscler Thromb, 2007, 14 (6): 317-324.