

维生素 K 营养状况评价指标及检测方法

吴胡炜¹ 聂淑慧¹ 王海燕¹ 综述 胡贻椿^{1,2} 审校

1 中国疾病预防控制中心营养与健康所;2 国家卫生健康委公共营养与健康重点实验室,北京 100050

摘要:维生素 K(vitamin K, VitK)自被发现以来以其凝血功能为人们熟知,但近年来研究者们逐渐发现 VitK 在骨骼健康、心血管疾病、肿瘤、代谢综合征等多方面具有积极的健康效应,因此非常有必要了解我国人群的 VitK 营养状况,使 VitK 更好地发挥有益的健康效应。已有一些可用于评价体内 VitK 营养状况的指标被报道,但目前仍无公认的评价指标,因此无法针对不同的营养或疾病状态进行评估并提出改善建议。本研究通过整理回顾近年来报道的体内循环的 VitK 相关指标及检测方法,同时就不同的检测操作条件下,如储存时间、温度及反复冻融等对 VitK 相关指标的稳定性的影响等方面进行了综述,并对各种方法的特点进行了总结和分析。

关键词:维生素 K 检测 评价指标 稳定性

中图分类号:R151.3 O657 TS201.4

文献标志码:A

DOI:10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2025.05.024

维生素 K(vitamin K, VitK)是一类具有 2-甲基-1,4-萘醌结构的维生素,是人体必需的营养素。天然的 VitK 有维生素 K₁(phylloquinone, PK/VitK₁)和维生素 K₂(menaquinones, MKn/VitK₂)两种形式, VitK₁ 主要来源于光合作用植物, VitK₂ 主要来源于动物及细菌加工食物中的天然脂溶性维生素。VitK₂ 由于侧链异戊二烯残基的数量不同,以 MK-n 表示,已知的衍生物包括 MK-4~MK-13, 目前研究较多的是 MK-4 和 MK-7^[1]。

VitK 是特定肽结合的谷氨酸(Glu)残基翻译后修饰为 γ-羧基谷氨酸(Gla)的辅助因子。VitK 通过对维生素 K 依赖蛋白(vitamin K-dependent proteins, VKDPs)的激活,参与体内多项生理功能。DAM^[2]在最初发现 VitK 时,就揭示了其血液凝固功能。随着进一步的研究,发现 VitK 在骨代谢和心血管健康等方面发挥重要作用。SARAH 等^[3]为研究 VitK 与骨骼健康的关系,进行系统综述,纳入的研究包括 13 项骨质流失数据,7 项骨

折数据试验,其结果支持 VitK 补充可以减少骨流失。MARIEKE 等^[4]研究发现在健康儿童中,适量补充 MK-7 会增加 MK-7 的循环浓度并增加骨钙素羧化作用,通过骨钙素促进骨骼健康。SHEA 等^[5]总结了基于人群和临床研究中 VitK 和血管钙化的现有证据,提出 VitK₂ 比 VitK₁ 在预防血管钙化方面发挥更大作用。VAN BALLEGOIJEN 等^[6]通过测量去磷酸非羧化基质 Gla 蛋白(desphospho-uncarboxylated matrix Gla protein, dp-ucMGP)浓度发现低 VitK 状态在心血管疾病的发展中发挥着潜在作用,特别是在高危和慢性肾病人群中。此外, VitK 还在癌症进展^[7]和炎症反应^[8]、氧化应激^[9]、鞘脂合成和胰腺外分泌活性^[10]等方面发挥对人体的积极作用。

基于 VitK 的重要功能及为预防 VitK 缺乏导致的健康问题,科学评估人体 VitK 营养状况并提出针对性的改善措施建议具有重要意义。目前已报道的 VitK 营养状况评价指标包括血液中 VitK₁、VitK₂、羧化不全骨钙素(undercarboxylated osteocalcin, ucOC)、dp-ucMGP 等。然而,当前没有任何一项指标被认为是 VitK 体内营养状况评价的公认指标。本文旨在通过对各种指标特点和相关检测方法以及在样本中的稳定性的讨论,为 VitK 检测标准的提出和 VitK 参考摄入量的制定提供科学依据。

基金项目:国家卫生健康委公共营养与健康重点实验室开放课题(No. WLKFZ202409);中国健康促进基金会营养促进专项(No. Z093001);国民营养素需要评估、食物环境评价及应用(No. 102393220020070000013)

作者简介:吴胡炜,男,硕士研究生,研究方向:人群营养, E-mail:wuhuwei@126.com

通信作者:胡贻椿,女,研究员,研究方向:人群营养, E-mail:huyuc@ninh.chinacdc.cn

1 维生素 K 营养状况评价指标

已有不少用于 VitK 营养状况的评价指标被报道,最早通过测定依赖 VitK 的凝血因子或凝血酶原时间等指标来反映 VitK 的营养状况,随着 VitK 依赖蛋白的发现和检测技术的不断进步,研究者们开始尝试选择血液中的 VitK₁、VitK₂ (MK4、MK7 等)和羧化不全的 VitK 依赖性蛋白及尿中代谢产物等多种生物标志物对体内 VitK 水平进行评价,这使得从生化层面了解机体的 VitK 营养状况成为可能。

1.1 不同分型的 VitK

人体内的 VitK 包括 VitK₁ 和 VitK₂ 的多种形式,其中血清/浆的 VitK₁ 水平是评估 VitK 状态的常用指标,可以反映近期饮食摄入量。而 VitK₂ 在血清/浆中的浓度远低于 VitK₁,其脂溶性特性使其易受脂质的干扰,对检测方法的要求很高,在 VitK₂ 的各种分型中以 MK-4 和 MK-7 的报道居多。人体内其他生物样本中如母乳中也有相关的方法报道,母乳中 VitK 水平的评估对非侵入性评价母乳喂养的婴儿是否摄入充足的 VitK 有重大意义。在临床和营养研究中测定 VitK 浓度可以更好地了解 VitK 在健康和疾病中的作用,液相色谱联用各种检测器的技术可用于生物样本中的 VitK 及其各种分型定量。

1.2 凝血酶原时间和活化部分凝血活酶时间

VitK₁ 是肝脏合成凝血因子 II、VII、IX、X 所必需的物质,VitK₁ 浓度降低或缺乏可引起这些凝血因子合成障碍,进而引起凝血功能障碍。凝血酶原的检测可以间接反映血液中 VitK₁ 含量,检测指标包括凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 和活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT)。当完全羧化的凝血因子 II 的浓度降至约 50% 时,PT 才开始上升至参考范围以上^[11],而 APTT 对 VitK 状态的敏感度还低于 PT,因而 PT 和 APTT 在临床上常用于粗略估计全血中的 VitK 水平^[12-13],但在肝功能不全或一些其他代谢疾病时,其无法正确反映机体 VitK 水平,因而这类指标缺乏敏感性和特异性,只能揭示 VitK 的严重缺乏。

1.3 VitK 缺乏或拮抗剂诱导的蛋白质-因子 II

VitK 缺乏或拮抗剂诱导的蛋白质-因子 II (protein induced in Vitamin K absence or antagonism-factor II, PIVKA-II) 是凝血酶原的非活性前体,VitK 不足时,VKDPs 的翻译后羧化作用会降低,则 PIVKA-II 的数量增加,PIVKA-II 在常规凝血试验发生变化之前就可以在血浆中被检

测到^[11]。该指标在临床应用包括支持新生儿 VitK 缺乏性出血的诊断、监测 VitK 拮抗剂暴露及与甲胎蛋白结合作为肝细胞癌的诊断标志物,但该指标对 VitK 摄入量的变化和在低 VitK 水平检测时的灵敏度仍较低。

1.4 ucOC

骨钙素 (osteocalcin, OC),也被称为骨钙蛋白 (bone Gla protein, BGP),是骨骼内一种主要的非胶原蛋白。ucOC 是一种反映骨代谢状态的生化指标,临床可用于评估骨质疏松的风险和治疗效果。VitK 是 ucOC 发生 γ -羧基化的关键,是将 ucOC 转化为成熟 OC 所必需的,羧化可降低体内 ucOC 水平、升高体内 OC 水平。因此可以通过检测人体血液中 ucOC 的浓度来间接评价体内 VitK 的水平。但受人群特征如年龄、更年期、性别^[14]及体内维生素 D 水平等的影响^[15],ucOC 在不同健康人群基线水平不同。因此认为单独的 ucOC 指标在 VitK 状态评价时不够可靠,应考虑 ucOC 在总 OC (tOC) 所占的比例,即 ucOC/tOC (ucOC%) 是衡量骨骼健康时更可靠的 VitK 状态的指标。

1.5 dp-ucMGP

基质 Gla 蛋白 (matrix Gla protein, MGP) 是一种主要由软骨中的软骨细胞和动脉血管壁的平滑肌细胞合成的小分子基质蛋白,是 VitK 依赖性蛋白,其活性依赖于 VitK 依赖性 γ -谷氨酸羧化酶^[16]。MGP 有不同的形式,其中 dp-ucMGP 是与 VitK 缺乏有关的形式。在 VitK 缺乏时 dp-ucMGP 不能转化成 MGP,血浆高浓度的 dp-ucMGP 反映了低 VitK 状态,因此可以通过检测血清/浆 dp-ucMGP 的浓度来间接反映体内 VitK 的水平^[17-18]。值得注意的是,不同人群 dp-ucMGP 水平与人群特征相关,如 O'DONNELL 等^[19]发现总 MGP 浓度水平随着年龄的增长而升高,生理和疾病状态如血管钙化、心功能不全等^[20-22]也能对总 MGP 的合成造成影响。因此在利用 dp-ucMGP 的浓度评估人体 VitK 的水平时,需考虑上述人群特征因素对 MGP 基线水平的影响。

1.6 尿中的代谢物

尿代谢产物 7C-糖苷配基、5C-糖苷配基是常见的 VitK 代谢物。HARRINGTON 等^[23-24]在限制或补充 VitK₁ 后,评估了 7C-糖苷配基和 5C-糖苷配基的尿排泄量,结果发现尿液代谢物与膳食 VitK₁ 摄入量有良好的关系,从而提出了尿代谢产物是 VitK 状态的可能标志物。

尿 Gla 是一种 VitK 依赖性的钙离子结合氨

基酸,在多种 VKDPs 中广泛存在。尿 Gla 通过肾脏在尿液中排泄,尿液中游离 Gla 可对 VKDPs 的 γ -羧化状态进行总体评估,可在 24 小时收集尿液过程中测量其浓度,尿 Gla 排泄量可用作成人 VitK 状态的指标,并反映 VKDPs 周转和降解^[25]。值得注意的是尿 Gla 水平会随着年龄的增长而发生显著变化。GOTO 等^[26]研究表明,尿 Gla 水平在婴儿(0~1 岁)中最高,然后随年龄增长而下降,在成人中达到最低值,但是在 60 岁以上又逐渐升高。

尿液样本具有非侵入性,样本量充足,采样方法简单等优势。由于这类指标的测量理想情况下需要收集 24 h 尿液,增加了样本收集的困难,因此它们在临床或大规模人群研究中的使用非常受限。

2 人群维生素 K 营养状况

2.1 体内 VitK 含量

当前国内外一般人群中 VitK 含量报道较少,且以 VitK₁ 居多, VitK₂ 报道较少,如表 1 所示。不同年龄、性别,不同地区的饮食习惯、经济水平,所处地理位置对 VitK 的摄入量有影响, VitK 摄入量尤其是 VitK₁ 摄入量与体内 VitK 水平显著相关。美国^[27]和英国健康人群的体内 VitK₁ 水平相较于东亚国家和意大利较低,如日本,因常食用

富含 VitK₂ 的发酵食品(如纳豆),其健康女性人群体内的 VitK₂ 水平甚至整体 VitK 水平较其他国家更高^[28-31]。SADOWSKI 等^[27]和 THANE 等^[29]分别研究了不同性别人群的 VitK₁ 体内水平,发现在不同性别中 VitK₁ 也有差异。我国 Nie 等^[32]报道了中国育龄女性的体内 VitK 含量,包括 VitK₁、VitK₂ 的 MK-4 和 MK-7 分型,发现 VitK₁ 的含量随年龄的增长而增加。已有关于母乳样本的报道较少, KAMAO 等^[33]报道了日本 3~265 d 婴儿的母乳样本中 VitK 水平, VitK₁ 范围为 0.95~12.38 ng/mL, MK-4 和 MK-7 的范围分别是 0.72~4.75 和 0.07~15.86 ng/mL。Wang 等^[34]报道了我国 0~5 月龄的婴儿母乳中的 VitK 含量, VitK 总含量为 4.50 ng/mL, VitK₁、MK-4、MK-7 的含量 [M(P25, P75)] 分别为 2.81(1.66~4.39)、1.20(0.58~1.97) 和 0.13(0.08~0.19) ng/mL。该研究指出, VitK₁ 和 MK-4 的含量在母乳中会随着哺乳时间的推移而变化,通常在 91~120 d 时达到最高,而在 31~60 d 时达到最低。尽管现有研究描述了人群的体内 VitK 含量的区间分布,但基于均数和中位数的不同描述标准使得相互之间难以比较。此外,由于尚无公认的评价指标,对特定人群在不同生理状态 VitK 是否缺乏的评价报道较少。

表 1 国内外研究体内维生素 (VitK) 水平

样本类型	国家	人群	年龄/岁	VitK ₁ /(ng/mL)	MK-4/(ng/mL)	MK-7/(ng/mL)	参考文献
血浆	美国	健康人群	20~92	1.01±0.55 ⁽¹⁾			[27]
血浆	英国	健康人群	≥65	0.32(0.08, 1.55) ⁽²⁾			[28]
血浆	英国	健康人群	19~64	0.74±0.97 ⁽¹⁾			[29]
血浆	日本	健康女性	30~49	1.52±1.02 ⁽¹⁾	0.07±0.14 ⁽¹⁾	4.96±6.39 ⁽¹⁾	[30]
			50~69	1.74±1.29 ⁽¹⁾	0.10±0.19 ⁽¹⁾	8.42±11.44 ⁽¹⁾	
			≥70	1.29±1.09 ⁽¹⁾	0.09±0.19 ⁽¹⁾	4.21±6.81 ⁽¹⁾	
血清	意大利	健康人群	平均 56.8	1.36±1.08 ⁽¹⁾	0.91±0.85 ⁽¹⁾	1.95±1.37 ⁽¹⁾	[31]
	中国	健康女性	18~49	0.82(0.21, 3.07) ⁽³⁾	0.06(0.02, 0.24) ⁽³⁾	0.55(0.12, 3.54) ⁽³⁾	[32]
血清	中国	健康女性	18~29	0.73(0.46, 1.20) ⁽³⁾	0.06(0.03, 0.12) ⁽³⁾	0.51(0.38, 0.76) ⁽³⁾	
			30~39	0.80(0.56, 1.33) ⁽³⁾	0.05(0.03, 0.09) ⁽³⁾	0.50(0.33, 0.78) ⁽³⁾	
			40~49	0.88(0.59, 1.43) ⁽³⁾	0.06(0.03, 0.10) ⁽³⁾	0.61(0.39, 0.88) ⁽³⁾	
母乳	日本	乳母	18~39	3.77±2.17 ⁽¹⁾	1.80±0.73 ⁽¹⁾	1.54±2.30 ⁽¹⁾	[33]
母乳	中国	乳母	19~40	2.81(1.66, 4.39) ⁽³⁾	1.20(0.58, 1.97) ⁽³⁾	0.13(0.08, 0.19) ⁽³⁾	[34]

注:(1)数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示;(2)数据以 $G(P2.5, P97.5)$ 表示;(3)数据以 $M(P2.5, P97.5)$ 表示;MK:甲萘醌

2.2 体内 VKDPs 水平

由表 2 可见,亚洲国家如中国、泰国和韩国,健康成年女性的血清 ucOC 水平相近,而日本健康成年女性^[28]和荷兰健康成年人^[37]血清中 ucOC 水平相对更高。荷兰健康女性体内 dp-ucMGP 水平显著高于男性^[38-39]。中国健康人群体内 PIVKA-II 水平参考范围与韩国接近,但汉族男性高于女性^[40-42]。Nie 等^[32]研究发现,在中国

育龄女性中,血清中 ucOC 水平在年龄和南北方亚组内差异有统计学意义,但在 MGP、dp-ucMGP 和 PIVKA-II 指标水平上差异无统计学意义。总的来说,各 VitK 相关的间接指标会因种族、性别、年龄、地域等因素有所差异,因此需要分别建立不同国家、人群的参考值范围。当前,我国 Nie 等^[32]基于中国育龄女性建立了 ucOC、% ucOC、dp-ucMGP 和 PIVKA-II 等多个 VKDPs 指标的参考范

围,分别是 1.09~2.51 ng/mL、5.80%~22.78%、2.69~5.88 ng/mL 和 3.98~8.40 ng/mL。

表 2 国内外研究间接检测指标维生素 K 依赖蛋白 (VKDPs) 体内水平

国家	人群	年龄/岁	ucOC/(ng/mL)	%ucOC/%	dp-ucMGP/(ng/mL)	PIVKA-II/(mAU/mL)	参考文献
中国	健康女性	平均 36.95	1.81 (1.09,2.51) ⁽³⁾	11.10 (5.80,22.78) ⁽³⁾	4.41 (2.69,5.88) ⁽³⁾	6.26 (3.98,8.40) ⁽³⁾	[32]
泰国	健康女性	20~50	2.69±2.02 ⁽¹⁾				[35]
日本	健康女性	30~49	3.59±2.17 ⁽¹⁾	26.00,82.00 ⁽²⁾			[30]
		50~69	4.39±2.79 ⁽¹⁾				
		≥70	5.51±3.82 ⁽¹⁾				
韩国	健康女性	平均 47.8	2.02±1.58 ⁽¹⁾				[36]
荷兰	健康成人	≥20	1.50,5.00 ⁽²⁾				[37]
	青少年儿童	<20	3.40,96.90 ⁽²⁾				
荷兰	健康成人	20~85			4.74±1.99 ⁽¹⁾		[38]
荷兰	健康女性	平均 64.9			6.14(1.08,30.24) ⁽³⁾		[39]
韩国	健康对象					13.0,37.4 ⁽²⁾	[40]
中国	汉族男性	>18				15.39,42.01 ⁽²⁾	[41]
	汉族女性	>18				11.96,39.13 ⁽²⁾	
中国	健康对象					21.82(17.65,26.53) ⁽³⁾	[42]

注:(1)数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示;(2)数据以 $G(P2.5,P97.5)$ 表示;(3)数据以 $M(P2.5,P97.5)$ 表示;ucOC:羧化不全骨钙素;dp-ucMGP:非磷酸化、未羧化基质 Gla 蛋白;PIVKA-II:VitK 缺乏或拮抗剂诱导的蛋白质-因子 II

3 检测方法

根据上述指标的特点,VitK 营养状况指标的检测可分为直接检测法和间接检测法。直接检测方法是直接检测 VitK 在血液、粪便、母乳等生物样本中的水平,包括 VitK₁ 和 VitK₂ 的各种分型。间接检测方法则通过测定羧化不足的 VKDPs 间接反映体内 VitK 水平,如 PIVKA-II、ucOC、dp-ucMGP 等未羧化 VKDPs。

3.1 直接检测法

3.1.1 液相色谱法

高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 与其他色谱方法相比具有更高灵敏度、特异性、上样量少和高分辨率的特点,适用于各种复杂基质的样品分析,其量化能力使之在 VitK 的直接测定中更具优势。HPLC 是现在常用于 VitK 测定的方法,包括一系列的提取、分离和检测过程。但由于 VitK 在生物样本中的含量微少,因此仍需要复杂的样品制备、较长的色谱运行时间以及其他复杂的检测前工作。

3.1.1.1 VitK 的提取分离

从生物样本中提取 VitK₁ 和 VitK₂ 是克服脂质干扰问题的关键步骤。VitK 提取方法可能导致结果存在较大的差异^[29]。蛋白质沉淀 (protein precipitation, PP)、液-液萃取 (liquid-liquid extraction, LLE) 和固相萃取 (solid phase extraction, SPE) 是生物样本中 VitK 纯化过程中最常用的 3 种技术,最终目的是减少检测干扰和增强目标信号。PP 是指通过物理方法或化学方法如盐析、有机溶剂沉淀等使溶液中的蛋白

质从溶液中析出形成沉淀去除的过程。LLE 通过两种不混溶的溶剂分离目标分子,操作简单,适用于大量样品处理,而 SPE 使用固相吸附和洗脱溶剂分离目标分子,基本原理和 HPLC 相同,适用于敏感分子的分离,使用较少的溶剂,对环境友好,但操作复杂度较高。在过去 LLE 是最常用的分离、预浓缩和净化方法。例如 SAMEH 等^[43] 开发并验证了的高度灵敏且可靠的盐析辅助-液-液萃取 (salting-out assisted liquid-liquid extraction, SALLE) 与高效液相色谱联用荧光检测器 (high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, HPLC-FL) 方法相结合,用于人血浆中 VitK 同系物的痕量测定,与报道的其他 HPLC-FL 方法相比具有更好的回收率,且灵敏度高 2~500 倍。GENTILI 等^[44] 测定 VitK 在母乳中的浓度时处理样本在 LLE 前进行过夜冷皂化,可减少样品用量、程序更简化且价格低。由于 SPE 在时间和溶剂方面既简单又经济,因此与 LLE 相比,SPE 在分析物预浓缩和基质去除方面越来越普遍^[45]。

3.1.1.2 VitK 的检测

各种检测器的开发研究,使得 VitK 测量取得了进步。1982 年 SHEARER 等就开始研究将 HPLC 结合紫外检测器应用于 VitK 的检测,随后荧光检测器也逐渐应用于测定血清和血浆中的 VitK^[46-48]。随着技术不断地进步,高效液相色谱串联大气压化学电离源质谱 (HPLC-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization, LC-APCI-MS)^[49]、液相色谱-串联质谱法 (liquid chromatography tandem

mass spectrometry, LC-MS/MS) 因为其在提高灵敏度、高特异性和高通量方面具有独特的优势,也相继应用于测定 VitK₁ 与 VitK₂^[50],其中 RIPHAGEN 等^[51]推荐的 LC-MS/MS 法结合 APCI,通过 SPE 进行样品制备,可以检测出体内常见的 VitK₁、MK4 和 MK7,检测限为 0.14 nmol/L (VitK₁ 和 MK4) 和 4.40 nmol/L (MK7),定量回收率在 86% 到 92% 之间,线性范围达到 15 nmol/L,此方法前处理方法较为简单、耗时较少,被认为是评估 VitK 的有效方法。

3.1.2 电化学分析法 电化学检测器 (electrochemical detector, ECD) 如吸附伏安法和极谱测定法等也被报道用于 VitK 含量的测定。吸附伏安法的优点是灵敏度高、操作简单、可以直接测定样品,无需复杂的样品处理步骤,但受电极表面的清洁度、溶液的组成、扫描速率和富集时间等因素的影响^[52]。极谱测定的灵敏度较高、操作简单、样品无需特殊处理,缺点是受汞的毒性、电极的稳定性、溶液的组成等因素的影响^[53]。电化学分析检测器同样可以联用 HPLC 进行定量分析,WAKABAYASHI 等^[54]报道了一种采用 HPLC 结合 ECD 技术的方法,用于同时测定人血清中的 VitK₁ 和 VitK₂,实现了对 VitK 同系物的高灵敏度检测。

3.1.3 免疫学方法 免疫测定如放射免疫测定 (radioimmunoassay, RIA) 和酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 在临床研究中也常被用于生物样本中 VitK₁、VitK₂ 测定,具有成本低、操作简单、不需要复杂的样品前处理的优点。但检测方法限制,样本浓度太低,精确度可能受抗体特异性影响,重现性低,达不到精确定量的要求^[55]。所以当检测 VitK 此类小分子、需要高精度或复杂样品分析时不用此类方法。

3.2 间接检测法

免疫学方法是检测各类 VKDPs 的常用方法。一般可采用 ELISA 对血清 ucOC 进行分析。还有其他检测方法,如 GUNDBERG 等^[56]采用的 RIA 测定了血清中的 OC 和 ucOC 的水平。SCHURGERS 等^[57]使用 ELISA 对血清/浆中的 dp-ucMGP 进行测定,提出 ucMGP 是心血管钙化检测的可能生物标志物。JESPERSEN 等^[58]使用自动化分析系统 IDS-iSYS InaKtif MGP 测定法对丹麦 491 名一般人群 (229 名男性和 262 名女性,年龄 19 ~ 71 岁) 进行血浆 dp-ucMGP 测量,dp-ucMGP 的范围在 (465±181) pmol/L。

多种方法可用于 PIVKA-II 的检测,如 ELISA 常被用于临床检测^[59-60]。Yan 等^[41]利用基于化学发光酶免疫测定法原理的自动化系统 ARCHITECT 建立了健康中国成年人血清 PIVKA-II 的参考区间。SOHN 等^[61]开发了一个基于多反应监测-质谱法的平台检测血清样品中的 PIVKA-II。

尿中代谢产物常使用色谱法测量。HARRINGTON 等^[62]建立的 HPLC-ECD 法,用于测定 VitK 在尿中的 2 种主要代谢产物 5C-糖苷配基和 7C-糖苷配基的含量,该法具有线性好 ($r^2 \geq 0.999$) 和灵敏度高的特点。HAROON 等^[63]建立了用于分析尿液中 Gla 的反相高效液相色谱测定法。MATSU-URA 等^[64]开发了气液色谱定量测定人尿液中游离 Gla 的方法。BRITZ-MCKIBBIN 等^[65]使用毛细管电泳和激光诱导荧光检测开发了一种简单而灵敏的方法来分析蛋白质、尿液和血浆中的 Gla 含量。

4 生物样本中 VitK 及相关指标的稳定性

4.1 血液

4.1.1 不同分型的 VitK 稳定性 RIPHAGEN 等^[41]发现 VitK₁、MK-4 和 MK-7 在 4 °C 储存的血浆中均可稳定保存长达 7 d,甚至更长,在 15 °C 下可稳定保存长达 14 d,甚至更长,在室温下的黑暗环境中稳定保存可长达 72 h,在人造光下透明管中保存时稳定可达 24 h;在 -20 °C 下可稳定保存长达 12 周。1 ~ 3 次冻融循环后 VitK₁、MK-4 和 MK-7 的浓度没有显著变化。

4.1.2 VKDPs 的稳定性 LACOMBE 等^[66]采用 ELISA 检测血清中 ucOC 的浓度,发现其测量结果在 2 个冻融周期后没有变化,3 个冻融周期仅平均减少 3%,表明其受冻融影响较小。PRICE 等^[67]为研究血浆中 OC 的稳定性,在一项 30 人血浆样本的研究中发现,OC 水平不受 4 次冻融循环的影响。在 -20 °C 保存的 5 个血浆样本中的 OC 水平在 14 个月内保持不变,在另一组 10 个血浆样本中,OC 水平分别在 25 °C 中 24 h 和 4 °C 中 72 h 后保持不变。测得在同时间获得的 30 例正常人的血浆和血清样本中 OC 水平无明显差异。然而,在 25 °C 下 8 h 后,血清 OC 水平下降了 19%,表明血清 OC 在 25 °C 下的稳定性可能低于血浆。SCHURGERS 等^[68]的稳定性研究发现血清中 OC 反复冻融 (从储存温度 -80 °C 到室温,室温保持 1 h) 后的稳定性较好,冻融 3 次后仅损失 2%,冻融 5 次后损失 12%,冻融 10 次后损

失17%。

GRIFFIN等^[69]验证了血浆样本中 dp-ucMGP 浓度的稳定性,在-80℃下储存9个月后仍保持稳定,回收率为100%±10%;在1个加热循环(24h)(回收率100%±10%)和2个冻融周期(回收率100%±10%)后,血浆 dp-ucMGP 水平仍保持稳定。

4.2 母乳

GENTILI等^[44]采用HPLC-MS/MS测定了在母乳中VitK₁、MK-4、MK-7的含量,并测量了在-18℃和常温下反复冻融3个周期,每个周期24h,结果发现对比原样本,3次反复冻融的母乳样本中VitK₁、MK-4、MK-7的浓度没有发生改变;同时通过-18℃条件储存一个月时间,再次检测浓度依然未发现明显改变,从而认为其具备长期保存的稳定性。

4.3 组织

FU等^[70]从Rush记忆与衰老项目的499名参与者(平均年龄92岁,72%为女性)中获取其死后大脑样本。使用LC-MS/MS和HPLC分别测量了4个区域(颞叶中层皮质、额叶中层皮质、小脑、前分水岭白质)的VitK浓度。MK4在老年人的脑组织中以-80℃条件保存可保持稳定长达9年,但难以达到更长时间。储存时间≥9.0年的大脑中MK-4的几何平均浓度比储存时间≤1.0年的大脑低48%~52%。

综上所述,血液中VitK和VKDPS指标不会随反复冻融出现较大的损失。但值得注意的是OC在血清样本中相对于血浆样本中在25℃下的稳定性较差,提示OC反复冻融时,长时间停留在室温的血清样本可能会受到一些影响。在母乳和脑组织中的VitK指标具有冻融稳定性和长期储存稳定性,间接反映VitK水平的未羧化VKDPS指标在母乳和其他组织的稳定性尚缺少研究。尿液中的相关指标也可以反映VitK在人体内水平,但其稳定性尚未见报道。

5 结语

VitK在骨骼健康、心血管疾病、癌症、代谢综合征、2型糖尿病、认知能力等多种疾病方面具有积极健康效应,因此正确评估人群VitK的营养状况十分重要。已有不少关于VitK功能机制、人群干预效果的研究报道,尤其是VitK₂,使其成为当前备受关注的营养素。各国研究者在人群VitK的评价指标及其检测方法、体内水平等方面已有一些进展,但目前仍缺乏公认评价VitK营养状况

的指标及检测方法的标准。本课题组前期通过横断面研究初步分析了育龄女性和中老年人两个人群的VitK膳食摄入和血液中VitK及相关未羧化VKDPS水平的动态变化关系,认为血液中的VitK是评价人群VitK营养状况的潜力指标^[71],并建立了体内VitK和未羧化VKDPS指标的参考范围和亚临床阈值,但相关结果仍需进一步验证,如评估不同人群、不同生理状态下指标的敏感性、参考范围的适用性研究等。

在检测方法上,LC-MS/MS的方法已被用于血液、母乳等样本中VitK₁、VitK₂(MK-4、MK-7、MK-9等)的检测,具有较高的灵敏度和准确性,但由于VitK₂在生物样本中的含量很低,容易受其他成分影响,未来还需要进一步优化该方法,提高检测效率和成本效益。dp-ucMGP和ucOC也被认为是评价VitK在人体水平的有潜力的指标,分别应用于评价VitK对心血管和骨健康改善的相关研究中。为了更全面地评估人体的VitK营养状况,未来可以进一步挖掘与VitK相关的生物标志物,以更深入了解VitK在人体内的代谢和作用机制,从而为其营养状况的评估提供更全面的依据。其次,各类指标的自动化平台开发也十分重要,通过自动化平台,可以实现高通量、多组分的同步检测,结合代谢组学、蛋白质组学及多组学整合的新兴检测技术,也可以提高检测的效率和精确度,同时减少人为操作带来的误差,确保检测结果的可靠性。

参考文献

- [1] SHEA M K, BOOTH S L. Concepts and controversies in evaluating vitamin K status in population-based studies [J]. *Nutrients*, 2016, 8(1): 8.
- [2] DAM H. The antihemorrhagic vitamin of the chick [J]. *Biochem J*, 1935, 29(6): 1273-1285.
- [3] COCKAYNE S, ADAMSON J, LANHAM-NEW S, et al. Vitamin K and the prevention of fractures: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Arch Intern Med*, 2006, 166(12): 1256-1261.
- [4] VAN SUMMEREN M J, BRAAM L A, LILIE M R, et al. The effect of menaquinone-7 (vitamin K₂) supplementation on osteocalcin carboxylation in healthy prepubertal children [J]. *Brit J Nutr*, 2009, 102(8): 1171-1178.
- [5] SHEA M K, HOLDEN R M. Vitamin K status and vascular calcification: evidence from observational and clinical studies [J]. *Adv Nutr*, 2012, 3(2):

- 158-165.
- [6] VAN BALLEGOOIJEN A, BEULENS J. The role of vitamin K status in cardiovascular health: evidence from observational and clinical studies [J]. *Curr Nutr Rep*, 2017, 6(3) : 197-205.
- [7] KIELY M, HODGINS S J, MERRIGAN B A, et al. Real-time cell analysis of the inhibitory effect of vitamin K₂ on adhesion and proliferation of breast cancer cells [J]. *Nutr Res*, 2015, 35 (8) : 736-743.
- [8] REDDI K, HENDERSON B, MEGHJI S, et al. Interleukin 6 production by lipopolysaccharide-stimulated human fibroblasts is potently inhibited by naphthoquinone (vitamin K) compounds [J]. *Cytokine*, 1995, 7(3) : 287-290.
- [9] LI J, LIN J C, WANG H, et al. Novel role of vitamin k in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(13) : 5816-5826.
- [10] LEV M, MILFORD A F. Effect of vitamin K depletion and restoration on sphingolipid metabolism in *Bacteroides melaninogenicus* [J]. *J Lipid Res*, 1972, 13(3) : 364-370.
- [11] SUTTIE J W. Vitamin K and human nutrition [J]. *J Am Diet Assoc*, 1992, 92(5) : 585-590.
- [12] 巩建萍, 郭雅卿, 连雪, 等. 维生素 K₁ 对老年 2 型糖尿病患者骨密度和胰岛素抵抗的影响 [J]. *中国药房*, 2012, 23(8) : 709-711.
- [13] 吕小东, 姚亚丽, 姚忠喜. 维生素 K₁ 对小儿内心直视手术围术期凝血机制的影响 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2001 (1) : 8-11.
- [14] SOKOLL L J, SADOWSKI J A. Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population [J]. *Am J Clin Nutr*, 1996, 63(4) : 566-573.
- [15] BUNYARATAVEJ N. The intriguing correlation between undercarboxylated osteocalcin and vitamin D [J]. *T J Med Assoc Thai*, 2015, 98(8) : 16-20.
- [16] PRICE P A, URIST M R, OTAWARA Y. Matrix Gla protein, a new γ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 1983, 117(3) : 765-771.
- [17] DELANAYE P, KRZESINSKI J-M, WARLING X, et al. Dephosphorylated-uncarboxylated Matrix Gla protein concentration is predictive of vitamin K status and is correlated with vascular calcification in a cohort of hemodialysis patients [J]. *BMC Nephrol*, 2014, 15(1) : 1-8.
- [18] VAN DEN HEUVEL E G, VAN SCHOOR N M, LIPS P, et al. Circulating uncarboxylated matrix Gla protein, a marker of vitamin K status, as a risk factor of cardiovascular disease [J]. *Maturitas*, 2014, 77 (2) : 137-141.
- [19] O'DONNELL C J, SHEA M K, PRICE P A, et al. Matrix Gla protein is associated with risk factors for atherosclerosis but not with coronary artery calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(12) : 2769-2774.
- [20] FARZANEH-FAR A, WEISSBERG P L, PROUDFOOT D, et al. Transcriptional regulation of matrix gla protein [J]. *Z Kardiol*, 2001, 90 (Suppl 3) : 38-42.
- [21] MUSTONEN E, POHJOLAINEN V, ARO J, et al. Upregulation of cardiac matrix Gla protein expression in response to hypertrophic stimuli [J]. *Blood Press*, 2009, 18(5) : 286-293.
- [22] PRICE P A, THOMAS G R, PARDINI A W, et al. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (6) : 3926-3934.
- [23] HARRINGTON D J, BOOTH S L, CARD D J, et al. Excretion of the urinary 5C-and 7C-aglycone metabolites of vitamin K by young adults responds to changes in dietary phylloquinone and dihydrophyloquinone intakes [J]. *J Nutr*, 2007, 137(7) : 1763-1768.
- [24] HARRINGTON D J, CLARKE P, CARD D J, et al. Urinary excretion of vitamin K metabolites in term and preterm infants: relationship to vitamin K status and prophylaxis [J]. *Pediatr Res*, 2010, 68(6) : 508-512.
- [25] GÓRSKA R M. Laboratory Assessment of Vitamin Status [M]. London: Academic Press, 2019: 107-147.
- [26] GOTO K, KATO S, SUMIYA S, et al. Urinary levels of gamma-carboxyglutamic acid and its clinical significance [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(1) : 142-145.
- [27] SADOWSKI J A, HOOD S J, DALLAL G E, et al. Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration [J]. *Am J Clin Nutr*, 1989, 50(1) : 100-108.
- [28] WANG L Y, BATES C J, YAN L, et al. Determination of phylloquinone (vitamin K₁) in plasma and serum by HPLC with fluorescence detection [J]. *Clin Chim Acta*, 2004, 347(1-2) : 199-207.
- [29] THANE C W, WANG L Y, COWARD W A. Plasma

- phyloquinone (vitamin K₁) concentration and its relationship to intake in British adults aged 19–64 years [J]. *Br J Nutr*, 2006, 96(6): 1116-1124.
- [30] TSUGAWA N, SHIRAKI M, SUHARA Y, et al. Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for γ -carboxylation of osteocalcin [J]. *Am J Clin Nutr*, 2006 (2): 380-386.
- [31] FUSARO M, NOALE M, VIOLA V, et al. Vitamin K, vertebral fractures, vascular calcifications, and mortality: vitamin K Italian (VIKI) dialysis study [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, (11): 2271.
- [32] NIE S, YANG L, FENG J, et al. Reference range of vitamin K evaluating indicators in Chinese childbearing women [J]. *Nutrients*, 2023, 15 (8): 1977.
- [33] KAMA O M, TSUGAWA N, SUHARA Y, et al. Quantification of fat-soluble vitamins in human breast milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 859(2): 192-200.
- [34] WANG H, YANG Z, WANG S, et al. Study on vitamin K levels in mature milk of Chinese lactating mothers [J]. *Nutrients*, 2024, 16(19): 3351.
- [35] BUNYARATAVEJ N, SOONTRAPA S, ROJANASTHIN S, et al. Level of undercarboxylated osteocalcin in reproductive Thai females [J]. *J Med Assoc Thai*, 2005, 88 (Suppl 5): 37-39.
- [36] KIM S M, KIM K M, KIM B T, et al. Correlation of undercarboxylated osteocalcin (ucOC) concentration and bone density with age in healthy Korean women [J]. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(8): 1171-1175.
- [37] THEUWISSEN E, MAGDELEYN S E J, BRAAM L A J L M, et al. Vitamin K status in healthy volunteers [J]. *Food Funct*, 2014, 5(2): 229-234.
- [38] CRANENBURG E C, KOOS R, SCHURGERS L J, et al. Characterisation and potential diagnostic value of circulating matrix Gla protein (MGP) species [J]. *Thromb Haemostasis*, 2010, 104 (4): 811-822.
- [39] DALMEIJER G W, VAN DER SCHOUW Y T, VERMEER C, et al. Circulating matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification and vitamin K status in healthy women [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(4): 624-628.
- [40] KO D H, HYUN J, KIM H S, et al. Analytical and clinical performance evaluation of the abbott architect PIVKA assay [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2018, 48(1): 75-80.
- [41] YAN C, HU J, YANG J, et al. Serum ARCHITECT PIVKA-II reference interval in healthy Chinese adults: sub-analysis from a prospective multicenter study [J]. *Clin Biochem*, 2018, 54: 32-36.
- [42] FENG H, LI B, LI Z, et al. PIVKA-II serves as a potential biomarker that complements AFP for the diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 401.
- [43] AHMED S, MAHMOUD A M. A novel salting-out assisted extraction coupled with HPLC- fluorescence detection for trace determination of vitamin K homologues in human plasma [J]. *Talanta*, 2015, 144: 480-487.
- [44] GENTILI A, MICCHELI A, TOMAI P, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of vitamin K homologues in human milk after overnight cold saponification [J]. *J Food Compos Anal*, 2016, 47: 21-30.
- [45] BADAWY M E I, EL-NOUBY M A M, KIMANI P K, et al. A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis [J]. *Anal Sci*, 2022, 38 (12): 1457-1487.
- [46] LAMBERT W E, DE LEENHEER A P, LEFEVERE M F. Determination of vitamin K in serum using HPLC with post-column reaction and fluorescence detection [J]. *J Chromatogr Sci*, 1986, 24(2): 76-79.
- [47] SHINO M. Determination of endogenous vitamin K (phyloquinone and menaquinone-n) in plasma by high-performance liquid chromatography using platinum oxide catalyst reduction and fluorescence detection [J]. *Analyst*, 1988, 113(3): 393-397.
- [48] SONG Q, WEN A, DING L, et al. HPLC-APCI-MS for the determination of vitamin K₁ in human plasma: method and clinical application [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 875(2): 541-545.
- [49] HU K, LI Y, DING R, et al. A simple, sensitive, and high-throughput LC-APCI-MS/MS method for simultaneous determination of vitamin K(1), vitamin K(1) 2, 3-epoxide in human plasma and its application to a clinical pharmacodynamic study of warfarin [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 159: 82-91.
- [50] LI C, LIANG C, KONG Z, et al. Determination of vitamin k₁, mk-4, mk-7, and d levels in human serum of postmenopausal osteoporosis women based on high stability LC-MS/MS: MK-7 may be a new marker of bone metabolism [J]. *Ann Nutr Metab*, 2023, 79(3): 334-342.
- [51] RIPHAGEN I J, VAN DER MOLEN J C, VAN FAASSEN M, et al. Measurement of plasma vitamin

- K₁(phylloquinone) and K₂(menaquinones-4 and -7) using HPLC-tandem mass spectrometry [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2016, 54(7): 1201-1210.
- [52] 王丽增, 许杨, 吴全胜, 等. 维生素 K₁ 的吸附伏安法研究及应用 [J]. *理化检验化学分册*, 1992, 28(4): 219-220.
- [53] 陈养民, 王福民, 王淑荣, 等. 单扫描极谱法测定注射液及血清中维生素 K₁ [J]. *分析科学学报*, 2005, 21(4): 396-398.
- [54] WAKABAYASHI H, ONODERA K, YAMATO S, et al. Simultaneous determination of vitamin K analogs in human serum by sensitive and selective high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *Nutrition*, 2003, 19(7): 661-665.
- [55] WILD D. *The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques* [M]. Massachusetts: Newnes, 2013.
- [56] GUNDBERG C M, NIEMAN S D, ABRAMS S, et al. Vitamin K status and bone health: an analysis of methods for determination of undercarboxylated osteocalcin1 [J]. *J Clin Endocr Metab*, 1998, 83(9): 3258-3266.
- [57] SCHURGERS L J, CRANENBURG E C, VERMEER C. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K [J]. *Thromb Haemostasis*, 2008, 100(10): 593-603.
- [58] JESPERSEN T, MØLLEHAVE L T, THUESEN B H, et al. Uncarboxylated matrix Gla-protein: A biomarker of vitamin K status and cardiovascular risk [J]. *Clin Biochem*, 2020, 83: 49-56.
- [59] TRUONG J T, FU X, SALTZMAN E, et al. Age group and sex do not influence responses of vitamin K biomarkers to changes in dietary vitamin K [J]. *J Nutr*, 2012, 142(5): 936-941.
- [60] DAHLBERG S, NILSSON C U, KANDER T, et al. Detection of subclinical vitamin K deficiency in neurosurgery with PIVKA-II [J]. *Scand J Clin Lab Inv*, 2017, 77(4): 267-274.
- [61] SOHN A, KIM H, YU S J, et al. A quantitative analytical method for PIVKA-II using multiple reaction monitoring-mass spectrometry for early diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(11): 2829-2838.
- [62] HARRINGTON D J, SOPER R, EDWARDS C, et al. Determination of the urinary aglycone metabolites of vitamin K by HPLC with redox-mode electrochemical detection [J]. *J Lipid Res*, 2005, 46(5): 1053-1060.
- [63] HAROON Y. Rapid assay for γ -carboxyglutamic acid in urine and bone by precolumn derivatization and reversed-phase liquid chromatography [J]. *Anal Biochem*, 1984, 140(2): 343-348.
- [64] MATSU-URA S, YAMAMOTO S, MAKITA M. Determination of γ -carboxyglutamic acid in human urine by gas-liquid chromatography [J]. *Anal Biochem*, 1981, 114(2): 371-376.
- [65] BRITZ-MCKIBBIN P, VO H C, MACGILLIVRAY R T A, et al. Analysis of γ -carboxyglutamic acid content of protein, urine, and plasma by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence [J]. *Anal Chem*, 1999, 71(8): 1633-1637.
- [66] LACOMBE J, AL RIFAI O, LOTER L, et al. Measurement of bioactive osteocalcin in humans using a novel immunoassay reveals association with glucose metabolism and β -cell function [J]. *Am J Physiol-Endoc M*, 2020, 318(3): E381-E391.
- [67] PRICE P A, NISHIMOTO S K. Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma [J]. *P Natl A Sci India B*, 1980, 77(4): 2234-2238.
- [68] SCHURGERS L J, TEUNISSEN K J, KNAPEN M H, et al. Characteristics and performance of an immunosorbent assay for human matrix Gla-protein [J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 351(1-2): 131-138.
- [69] GRIFFIN T P, ISLAM M N, WALL D, et al. Plasma dephosphorylated-uncarboxylated matrix gla-protein (dp-ucMGP): reference intervals in Caucasian adults and diabetic kidney disease biomarker potential [J]. *Sci Rep-UK*, 2019, 9(1): 18452.
- [70] FU X, SHEA M K, DOLNIKOWSKI G G, et al. Vitamin D and vitamin K concentrations in human brain tissue are influenced by freezer storage time: the memory and aging project [J]. *J Nutr*, 2021, 151(1): 104-108.
- [71] 聂淑慧. 我国重点人群膳食维生素 K 摄入及营养状况评价指标研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心营养与健康所, 2024.

收稿日期: 2024-07-01