

# 硫化氢通过缺氧诱导因子1 $\alpha$ 促进张应力下骨髓间充质细胞的成骨

· 研究原著 ·

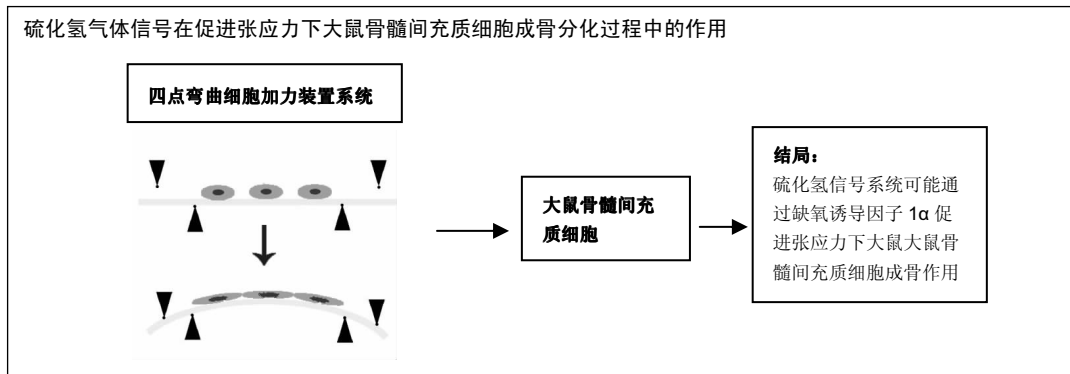
蒋校文, 张翼, 范晓升, 陈彦泽(郴州市第一人民医院口腔科, 南华大学转化医学研究所, 湖南省郴州市 423000)

引用本文: 蒋校文, 张翼, 范晓升, 陈彦泽. 硫化氢通过缺氧诱导因子1 $\alpha$ 促进张应力下骨髓间充质细胞的成骨[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(21):3281-3286.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.21.001

ORCID: 0000-0002-2701-9583(蒋校文)

文章快速阅读:



蒋校文, 男, 1981年生, 汉族, 2010年四川大学华西口腔医学院毕业, 副主任医师, 目前主要从事张成骨的机制研究。

通讯作者: 蒋校文. 郴州市第一人民医院口腔科, 南华大学转化医学研究所, 湖南省郴州市 423000

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2017)21-03281-06

稿件接受: 2017-04-26

文题释义:

**牵张成骨的特性:** 牵张成骨是一种内源性骨组织工程技术, 是通过将骨骼切开, 在切骨线两侧安放特制的牵张器, 经过一定的延迟期后(5-7 d), 缓慢牵张切骨间隙(1.0-1.5 mm/d), 使切骨间隙不断增宽, 并激发机体组织再生的潜力, 在牵张间隙内不断形成新生骨组织, 同时使骨骼周围的肌肉、神经、血管、皮肤等同期延长, 从而达到延长骨骼的目的。

**缺氧诱导因子 1:** 即低氧诱导因子 1, 普遍存在于人和哺乳动物细胞内, 常氧下也有表达, 但合成的缺氧诱导因子 1 蛋白很快即被细胞内氧依赖性泛素蛋白酶降解途径所降解, 只有在缺氧条件下缺氧诱导因子 1 才可稳定表达。

摘要

**背景:** 有研究表明, 硫化氢信号能够促进牵张成骨, 而具体机制尚不清楚。

**目的:** 观察硫化氢气体信号在促进张应力下大鼠骨髓间充质细胞成骨分化过程中与缺氧诱导因子1 $\alpha$ 的关系。

**方法:** 应用四点弯曲细胞加力装置系统, 对体外分离培养的大鼠骨髓间充质细胞施加2 000  $\mu$ strain的单一周期张应力, 同时通过使用工具药物改变加力单元中硫化氢及缺氧诱导因子1 $\alpha$ 的含量水平, 加力后检测成骨标志物的变化。

**结果与结论:** ①细胞成骨: 外源性硫化氢信号能够促进张应力下大鼠骨髓间充质细胞成骨, 而抑制加力单元缺氧诱导因子1 $\alpha$ 的表达则会减弱硫化氢信号的促进成骨作用; ②结果说明: 硫化氢信号系统可能通过缺氧诱导因子1 $\alpha$ 促进张应力下大鼠骨髓间充质细胞成骨作用。

**关键词:**

干细胞; 骨髓干细胞; 硫化氢; 缺氧诱导因子; 骨髓间充质细胞; 张应力; 大鼠; 成骨; GYY4137; YC-1; 牵张成骨; 四点弯曲; 国家自然科学基金

**主题词:**

组织工程; 硫化氢; 缺氧诱导因子1;  $\alpha$ 亚基

**基金资助:**

国家自然科学基金(81301651); 郴州市第一人民医院重点项目(N2015-006)

Jiang Xiao-wen, Associate chief physician, Department of Stomatology, the First People's Hospital of Chenzhou & Institute of Translation Medicine, University of China South, Chenzhou 423000, Hunan Province, China

Corresponding author: Jiang Xiao-wen, Department of Stomatology, the First People's Hospital of Chenzhou & Institute of Translation Medicine, University of China South, Chenzhou 423000, Hunan Province, China

## Hydrogen sulfide promotes the osteogenesis of bone marrow mesenchymal cells through hypoxia-inducible factor-1 alpha under tensile stress

Jiang Xiao-wen, Zhang Yi, Fan Xiao-sheng, Chen Yan-ze (Department of Stomatology, the First People's Hospital of Chenzhou & Institute of Translation Medicine, University of China South, Chenzhou 423000, Hunan Province, China)

**Abstract**

**BACKGROUND:** Hydrogen sulfide signaling has been proved to promote distraction osteogenesis; however, the underlying mechanism remains unclear.

**OBJECTIVE:** To evaluate the relationship between hydrogen sulfide and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )

during the osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal cells under tensile stress.

**METHODS:** 2 000  $\mu$  strain was loaded on the *in vitro* cultured rat bone marrow mesenchymal cells by a four-point bending apparatus, and hydrogen sulfide donor or HIF-1 $\alpha$  inhibitor was adopted in the tensile unit. Subsequently, the levels of osteogenic markers were detected.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Exogenous hydrogen sulfide signaling could promote the osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal cells under tensile stress. However, this promotion was obviously eliminated when the endogenous HIF-1 $\alpha$  expression was inhibited. These results show that hydrogen sulfide signaling system promotes the osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal cells under tensile stress probably through HIF-1 $\alpha$ .

**Subject headings:** Tissue Engineering; Hydrogen Sulfide; Hypoxia-Inducible Factor 1, alpha Subunit

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81301651; the Key Project of the First People's Hospital of Chenzhou, No. N2015-006

**Cite this article:** Jiang XW, Zhang Y, Fan XS, Chen YZ. Hydrogen sulfide promotes the osteogenesis of bone marrow mesenchymal cells through hypoxia-inducible factor-1 alpha under tensile stress. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(21):3281-3286.

## 0 引言 Introduction

牵张成骨(distraction osteogenesis, DO)是通过对切开具有成骨能力的骨段施加特定大小和频率的牵张力,从而使牵张间隙硬组织生成并同时达到拉伸软组织目的的内源性组织工程,已经成为肢体长骨和颅颌面骨发育不全、缺损重要的治疗手段<sup>[1]</sup>。但是牵张成骨在临床上仍存在如:治疗周期过长、感染、成骨不良等诸多并发症限制其在临床上的广泛运用<sup>[1]</sup>。近年来国内外学者通过基因转染、细胞移植、生长因子、中药、超声等多种手段促进牵张成骨<sup>[2-10]</sup>,取得了一定的实验室结果,但能够广泛运用在临床上还有比较遥远的距离<sup>[11]</sup>。就其关键原因可能还是牵张成骨过程是一个既不同于胚胎成骨发育,又不完全等同于骨折修复的过程,特定的牵张力是如何控制牵张成骨这一复杂过程的分子机制还不清楚,因此牵张成骨的机制完善仍是解决牵张成骨广泛运用问题的关键。

气体递质是内源性气体信号分子,包括一氧化氮、一氧化碳和硫化氢( $H_2S$ ),近来研究发现小分子信号气体参与多种生理及病理过程。目前气体递质在牵张成骨过程中的表达变化及作用机制研究较少。一氧化氮是第一个被确定的气体信号分子。在多种哺乳动物细胞中,L精氨酸和氧气在多种一氧化氮合成酶的氧化催化下产生一氧化氮。一氧化氮生物学效应的发现是一次革命,使人类第一次认识到气体也可作为重要细胞信号分子<sup>[12]</sup>。在牵张成骨中,一氧化氮的研究较多,有学者通过兔及犬下颌骨牵张成骨模型均发现下颌骨牵张成骨过程中一氧化氮合酶在不同时期具有不同的表现,提示一氧化氮信号系统对牵张成骨的新骨生成具有一定的调节作用<sup>[13-14]</sup>。吴巍等<sup>[15]</sup>在兔下颌骨牵张成骨过程中进一步使用一氧化氮供体发现能够促进牵张成骨新骨生成。 $H_2S$ 是被第3个发现的气体信号分子,这种臭鸡蛋味道的气体能在哺乳动物细胞内产生,制造 $H_2S$ 的关键酶包括胱硫醚 $\gamma$ 裂解酶、胱硫醚 $\beta$ 合成酶和3巯基丙酮酸硫转移酶。L半胱氨酸、同型半胱氨酸和这些分子的衍生物是产生 $H_2S$ 代谢过程的原料<sup>[16]</sup>。本课题组前期首次通过四点弯曲细胞加力装置体外实验及活体动物实验研究发现小分子信号气体 $H_2S$ 在牵张成骨过程中具有重要的作

用,而且使用外源性 $H_2S$ 信号能够促进牵张成骨。而 $H_2S$ 信号系统促进牵张成骨的具体机制尚不清楚<sup>[17-19]</sup>。实验课题组在兔下颌骨牵张成骨模型中同时发现使用缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factors, HIFs)蛋白也能够促进牵张成骨新骨生成<sup>[20]</sup>。有学者在血管内皮细胞模型中的研究中发现 $H_2S$ 通过调节缺氧诱导因子激活下游信号通路发挥生物功能<sup>[21-22]</sup>。

因此实验提出假设,在牵张成骨过程中, $H_2S$ 小分子信号体系是否通过激活缺氧诱导因子来促进成骨。为了验证这一假设实验选用四点弯曲细胞加力装置对大鼠骨髓间充质细胞(bone marrow mesenchymal cell, BMMC)施加特定大小张应力,同时使用缺氧诱导因子工具药物改变细胞单元的缺氧诱导因子1 $\alpha$ 水平,来研究缺氧诱导因子1 $\alpha$ 在 $H_2S$ 促进牵张成骨的过程中的作用。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 细胞学体外实验。

1.2 时间及地点 2015年9月至2016年2月在南华大学转化研究所完成。

1.3 材料 健康2月龄雄性SD大鼠,体质量250-350 g,由南华大学实验动物中心提供,许可证号:SYXK(湘)2010-0006。

### 1.4 实验方法

1.4.1 大鼠骨髓骨髓间充质细胞的分离和培养 无菌条件下取出双侧股骨和胫骨,用培养基冲出骨髓,离心弃去脂肪层后吹打制成细胞悬液,加入Percoll分离液(美国Gibco公司)后离心后吸取界面细胞层,用含体积分数5%胎牛血清的PBS洗涤细胞3次后弃上清,加入含体积分数10%胎牛血清的LG-DMEM培养基(美国Gibco公司)吹成细胞悬液。最终所获细胞接种于培养瓶内,培养箱内培养2 d后更换培养基,倒置显微镜下观察当细胞融合浓度达70%-80%时,用体积分数0.25%的胰蛋白酶消化细胞传代,选用第3代细胞进行下一步实验。

1.4.2 细胞加力 选择生长良好的细胞以 $1.5 \times 10^5/cm^2$ 的浓度接种于特制的塑料培养板上<sup>[1]</sup>,继续培养24 h后,在

特制培养皿内以单一周期张应力加力60 min(通过四点弯曲系统(成都电子科技大学)对细胞培养板施加频率为0.5 Hz的垂直力,使培养板位移为1 mm,即张应力为2 000  $\mu$  strain,对应细胞变形量分别为0.2%。随机分为4组,每组8孔,其中第1组为空白对照组,仅予以加力;第2组为缺氧诱导因子1 $\alpha$ 抑制剂组,加入缺氧诱导因子1 $\alpha$ 抑制剂(YC-1)使其培养单元终浓度为80  $\mu$ mol/L;第3组为H<sub>2</sub>S供体组,加入GYY4137,使其培养单元终浓度为4 mmol/L;第4组为缺氧诱导因子1 $\alpha$ 抑制/H<sub>2</sub>S供体组,是在第3组的基础上加入YC-1,使其培养单元终浓度为80  $\mu$ mol/L。培养2 h后收集培养液及细胞进行下一步检测。

**1.4.3 细胞计数** 培养24 h后弃去培养皿中液体,取出培养板,PBS清洗后,胰酶消化,收集培养板上细胞,离心后制成细胞悬液后锥虫蓝色后计数板上计数,并换算成细胞数量。

**1.4.4 H<sub>2</sub>S相对含量检测** 通过敏感硫电极方法建立标准硫离子曲线。收集加力结束后培养皿中培养液及细胞移入反应瓶(10 mL锥形瓶,瓶底中央约有直径1 cm、高0.8 cm的中央孔),再加入1 mol/L的HCl共0.5 mL使检测物中的H<sub>2</sub>S释放,反应瓶中央孔内加入1 mol/L的NaOH 0.5 mL以吸收释放H<sub>2</sub>S,迅速封口,37  $^{\circ}$ C水浴摇床孵育4 h,取中央孔液体用敏感硫电极测定溶液中H<sub>2</sub>S相对含量<sup>[17]</sup>。

**1.4.5 碱性磷酸酶测定** 将加力后2 h培养板上的细胞PBS洗涤、胰酶消化,与3 mL带血清培养基混匀,离心弃上清,再加入2 mL PBS经过混匀离心弃上清,最后加入90  $\mu$ L PBS液收集细胞。将细胞反复冻融3次,利用碱性磷酸酶检测试剂盒(南京建成)检测其450 nm波长下碱性磷酸酶活性,结果以U/mg表示,即得到该样本每毫克冻融蛋白所含的碱性磷酸酶活性。

**1.4.6 骨钙素测定** 使用试剂盒中标准品450 nm波长下测量后计算出标准曲线的直线回归方程。收集加力后2 h培养皿内1 mL培养液离心后收集上清,酶标包被板中入待测样本10  $\mu$ L,再加样本稀释液40  $\mu$ L后37  $^{\circ}$ C温育30 min,弃液洗板后加入酶标工作液50  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C温育30 min后弃液加入显色剂,37  $^{\circ}$ C避光显色15 min后检测其450 nm波长下吸光值,通过方程计算出培养液内骨钙素相对浓度。

**1.4.7 I型胶原氨基端前肽(PINP)测定** 使用试剂盒(科瑞美,北京)中标准品450 nm波长下测量后计算出标准曲线的直线回归方程。收集加力后2 h培养皿内1 mL培养液离心后收集上清,酶标包被板中入待测样本5  $\mu$ L,再加样本稀释液45  $\mu$ L后,再加入PINP生物素室温温育30 min,弃液洗板后加入酶标工作液150  $\mu$ L,室温温育30 min后弃液加入显色剂,避光显色30 min后加入终止液后检测其450 nm波长下吸光值,通过方程计算出培养液内PINP相对浓度。

**1.4.8 Real time-PCR测定** 收集培养板上加力后2 h细胞,参照Trizol试剂盒(Gibco,纽约,美国)说明书提取细

胞细胞总RNA;用紫外分光光度计测量其浓度;采用反转录试剂盒(TaKaRa,大连,中国)在BioRad 1 000<sup>TM</sup>上反转录成cDNA,再以第1链cDNA为模板,采用SYBR Green I染料进行实时荧光定量RT-PCR反应。

实验以GAPDH为内参基因,PCR反应所用的上游引物为5'-CTT CGT CAG CGT CCT ATC AGT TC-3',下游引物为5'-CAG CGT CAA CAC CAT CAT TCT G-3'。分析成骨细胞转录因子2(runt-related transcription factor 2, Runx2) mRNA相对表达量,其上游引物为5'-TAT GAC TCT ACC CAC GGC AAG T-3',下游引物为5'-ATA CTC AGC ACC AGC ATC ACC-3'。PCR扩增条件为:95  $^{\circ}$ C 30 s,95  $^{\circ}$ C 5 s,57  $^{\circ}$ C 30 s,共40个循环。目的基因的相对含量表达为Runx2与对应组GAPDH测量值的比值。

**1.4.9 Western Blot检测缺氧诱导因子1 $\alpha$ 蛋白表达** 加力结束后立即收集培养板上的细胞利用细胞裂解液得到总蛋白,以牛血清为标准品,利用BCA蛋白定量试剂盒(美国Gibco公司)建立标准曲线,计算总蛋白浓度,取总蛋白为20  $\mu$ g行SDS-PAGE电泳,转PVDF膜,脱脂奶粉封闭后一抗(兔抗鼠缺氧诱导因子1 $\alpha$ 多克隆抗体,1:500;英国Abcam公司)孵育过夜后二抗(羊抗兔IgG,1:500;武汉博士德公司)37  $^{\circ}$ C孵育1 h后置于自动成像仪暗匣中加显影液,计算机扫描收集图像。

**1.5 主要观察指标** 各组H<sub>2</sub>S、碱性磷酸酶、骨钙素、I型胶原氨基端前肽(PINP)、Runx2、缺氧诱导因子1 $\alpha$ 的检测结果。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 13.0软件对实验数据进行统计学分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间数据采用单因素方差分析和LSD检验比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 加力后细胞数量变化** 倒置显微镜下观察4组细胞在加力结束及结束后2 h无明显形态学改变。加力后4组细胞数差异无显著性意义( $P > 0.05$ ;表1)。

**2.2 各组H<sub>2</sub>S含量变化** 利用敏感硫电极法测定4组加力后2 h,H<sub>2</sub>S供体组和缺氧诱导因子1 $\alpha$ /H<sub>2</sub>S供体组H<sub>2</sub>S含量与其他2组相比均升高( $P < 0.05$ ;表1)。

**2.3 各组碱性磷酸酶活性变化** H<sub>2</sub>S供体组和缺氧诱导因子1 $\alpha$ /H<sub>2</sub>S供体组碱性磷酸酶活性与其他两组相比均升高( $P < 0.05$ ;表1),以H<sub>2</sub>S供体组中碱性磷酸酶含量最高。

**2.4 各组骨钙素水平变化** H<sub>2</sub>S供体组骨钙素水平均高于其他3组( $P < 0.05$ ;表1)。

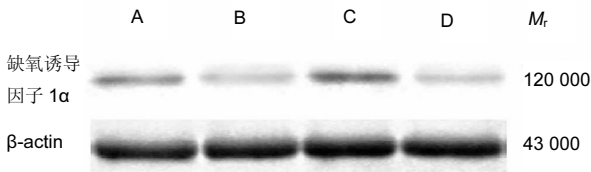
**2.5 各组PINP浓度变化** 空白对照组和缺氧诱导因子1 $\alpha$ 抑制/H<sub>2</sub>S供体组差异无显著性意义,其他各组组间差异具有显著性意义( $P < 0.05$ ;表1),以H<sub>2</sub>S供体组中PINP含量最高。

**2.6 各组Runx2 mRNA变化** H<sub>2</sub>S供体组中Runx2 mRNA相对表达量在4组中最高( $P < 0.05$ ;表1)。

表 1 加力结束后 H<sub>2</sub>S 及成骨标志物检测结果(x $\pm$ s, n=8)

Table 1 Levels of osteogenic markers and hydrogen sulfide at the end of tensile stress loading

指标	空白对照组	缺氧诱导因子 1 $\alpha$ 抑制组	H <sub>2</sub> S 供体组	缺氧诱导因子 1 $\alpha$ 抑制/H <sub>2</sub> S 供体组
细胞数(10 <sup>6</sup> )	6.22 $\pm$ 0.80	5.67 $\pm$ 0.75	6.21 $\pm$ 0.66	6.38 $\pm$ 0.61
H <sub>2</sub> S(U/mg)	17.84 $\pm$ 1.48	15.70 $\pm$ 3.95	35.45 $\pm$ 3.29 <sup>a</sup>	35.43 $\pm$ 3.44 <sup>a</sup>
碱性磷酸酶(U/mg)	194.12 $\pm$ 15.40	183.69 $\pm$ 22.98	241.35 $\pm$ 26.81 <sup>a</sup>	209.06 $\pm$ 27.18 <sup>a</sup>
骨钙素(U)	1.48 $\pm$ 0.16	1.17 $\pm$ 0.17	1.91 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.28 $\pm$ 0.18
PINP( $\mu$ g/L)	8.00 $\pm$ 0.26	2.23 $\pm$ 0.35	4.81 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	3.16 $\pm$ 0.37
Runx2 mRNA 相对表达量	10.97 $\pm$ 1.29	9.23 $\pm$ 1.21	15.06 $\pm$ 2.65 <sup>a</sup>	11.13 $\pm$ 0.81

表注: 与空白对照组和缺氧诱导因子 1 $\alpha$  抑制组相比, <sup>a</sup>P < 0.05. PINP: I 型胶原氨基端前肽。图 1 加力结束后细胞缺氧诱导因子 1 $\alpha$  蛋白表达Figure 1 Protein expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in rat bone marrow mesenchymal cells at the end of tensile stress loading图注: 图 A-D 为空白对照组, 缺氧诱导因子 1 $\alpha$  抑制组, H<sub>2</sub>S 供体组, 缺氧诱导因子 1 $\alpha$  抑制/H<sub>2</sub>S 供体组; B, D 可见加入缺氧诱导因子 1 $\alpha$  抑制剂后, 加力单元被明显抑制。

2.7 加力后细胞缺氧诱导因子 1 $\alpha$  蛋白的表达 Western blot 结果提示, 在加力后 4 h 细胞内空白对照组及 H<sub>2</sub>S 供体组有明显缺氧诱导因子 1 $\alpha$  蛋白的表达, 而且 H<sub>2</sub>S 供体组蛋白表达强于空白对照组; 在使用缺氧诱导因子 1 $\alpha$  抑制剂的缺氧诱导因子 1 $\alpha$  抑制剂组及缺氧诱导因子 1 $\alpha$  抑制/H<sub>2</sub>S 供体组中该蛋白的表达明显下降(图 1)。

### 3 讨论 Discussion

H<sub>2</sub>S 信号分子在牵张成骨中的研究罕见报道, 但是通过前期的实验背景和实验的结果发现其在牵张成骨过程中起着一定的作用。作为被发现的第 3 种小分子信号气体, H<sub>2</sub>S 一直是心血管系统研究的明星分子<sup>[23-25]</sup>。实验前期通过大鼠骨髓间充质细胞的体外四点弯曲实验发现 H<sub>2</sub>S 信号参与了张应力下成骨分化的过程, 还证明 H<sub>2</sub>S 信号系统的减弱可能是过大牵张力下成骨能力减弱的原因之一<sup>[17-18]</sup>。同时发现通过 GYY4137 这一新型 H<sub>2</sub>S 供体能够持续释放 H<sub>2</sub>S, 并能够促进牵张成骨<sup>[19]</sup>。因为牵张成骨的过程属于一种缺氧状态, 研究发现在牵张成骨动物模型中持续表达缺氧诱导因子<sup>[26]</sup>, 实验在兔下颌骨牵张成骨过程总使用重组缺氧诱导因子蛋白发现其能够促进成骨<sup>[20]</sup>。同时, 有学者在内皮细胞体外实验中发现, H<sub>2</sub>S 气体是通过缺氧诱导因子发挥其成血管作用。因此, 实验猜想, 在牵张成骨过程中, H<sub>2</sub>S 信号系统也是通过促进缺氧诱导因子促进成骨。为了证明该假说, 实验选用了四点弯曲加力装置创造张应力环境, 同时使用大鼠骨髓间充质细胞这一牵张成骨中重要的作用细胞作为研究对象, 通过使用工具药物改变细胞

加力环境中的 H<sub>2</sub>S 及缺氧诱导因子的表达, 同时检测加力单位细胞或培养基的碱性磷酸酶、骨钙素、Runx2 及 PINP 等成骨相关指标的变化, 进一步丰富牵张成骨的分子机制。碱性磷酸酶及 Runx2 是早期成骨分化的成骨标志, 骨钙素及 PINP 是成骨晚期。实验结果发现在无外源性 H<sub>2</sub>S 信号表达下, 抑制加力单元中缺氧诱导因子的表达, 减弱了成骨矿化能力; 施加外源性 H<sub>2</sub>S 信号后能够促进细胞的早期及晚期成骨矿化能力, 这与实验前期的实验结果相吻合; 而缺氧诱导因子抑制剂减少了单元目的蛋白的表达, 同时明显减弱了外源性 H<sub>2</sub>S 信号促进牵张成骨的能力。该结果提示缺氧诱导因子可能是 H<sub>2</sub>S 信号促进张应力下成骨过程中重要的靶点。

既往的研究发现 H<sub>2</sub>S 能够调节缺氧诱导因子的表达。缺氧诱导因子是能够应答细胞内氧气浓度的降低而对多种基因进行调控的转录因子家族, 与生物体的生长、发育及一些疾病的发病机理都存在着密切的关系<sup>[27-28]</sup>。对缺氧诱导因子的研究主要集中在缺氧诱导因子 $\alpha$ , 哺乳动物一共存在 3 种缺氧诱导因子 $\alpha$  亚基(缺氧诱导因子 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ ), 其中缺氧诱导因子 1 $\alpha$  研究较多。H<sub>2</sub>S 能够增加缺氧诱导因子活性<sup>[29]</sup>。Liu 等<sup>[21]</sup>研究发现, 在低氧环境下 H<sub>2</sub>S 可以通过上调缺氧诱导因子和血管内皮生长因子来促进鼠脑毛细血管内皮细胞的增殖迁移。Bir 等<sup>[22]</sup>在基因敲除小鼠模型中进一步证实, H<sub>2</sub>S 上调缺血组织和内皮细胞缺氧诱导因子的表达和是通过调整组织中的一氧化氮代谢来实现。陈娣等<sup>[30]</sup>对心肺复苏后大鼠心肌细胞研究发现 H<sub>2</sub>S 能够上调缺氧诱导因子水平。同时, 陶蓓蓓等<sup>[31]</sup>在常氧培养条件研究发现, H<sub>2</sub>S 能够呈剂量和时间依赖性显著提高缺氧诱导因子 1 $\alpha$  的蛋白水平, 并且对缺氧诱导因子 1 $\alpha$  mRNA 水平有快速、持久的提高作用。

缺氧诱导因子 1 $\alpha$  在调节成骨-血管耦连过程中起着重要作用<sup>[32-51]</sup>。Wan 等<sup>[52]</sup>利用基因敲除和药物途径在小鼠牵张成骨模型中证实, 缺氧诱导因子通路是骨修复过程中调节成血管和成骨所必需的, 通过激活缺氧诱导因子通路可以促进牵张成骨。由于牵张成骨的动物实验过程周期较长, 受到的干扰因素较多, 而气体分子的研究又具有一定的难度, 导致小分子信号气体在牵张成骨中的研究少之又少。实验通过四点弯曲加力装置模拟牵张

成骨模型,也是首次研究H<sub>2</sub>S信号系统在张应力下成骨过程中的变化,实验发现使用缺氧诱导因子抑制剂后,加力单元缺氧诱导因子1 $\alpha$ 蛋白有明显表达下降,同时成骨指标均反映出在原来H<sub>2</sub>S供体作用下增强的成骨能力明显被削弱,从该层面说明缺氧诱导因子是H<sub>2</sub>S信号下游的重要靶点。

由于小分子信号气体没有直接的标记物,在活体内很难直接定量定位研究,目前在牵张成骨的研究中罕见报道,既往的研究主要是以其限速酶最为研究对象,实验首次直接研究小分子信号气体在张应力下模拟牵张成骨的体外模型中的表达变化,具有一定的先进性。实验仍有一定的缺陷,选择体外实验的原因是体内实验干扰因素较多,难以控制,但体外实验不能替代复杂的体内环境。因此,H<sub>2</sub>S-缺氧诱导因子信号传导在牵张成骨过程中的具体关系仍需要下一步体内更加缜密的实验内容来验证。

通过上述体外实验首次初步探讨了缺氧诱导因子与小分子气体H<sub>2</sub>S在张应力下大鼠骨髓间充质细胞成骨分化中的关系,结果提示H<sub>2</sub>S信号可能通过缺氧诱导因子促进张应力下细胞成骨能力,有利于完善牵张成骨分子机制及为牵张成骨筛选治疗药物提供一定的理论基础。

**作者贡献:** 课题设计为第一作者和通讯作者。实验实施为第二、三、四作者。实验评估为第一、三作者。资料收集为第一、二作者。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

**伦理问题:** 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例,实验方案中有关动物伦理问题已经南华大学实验动物伦理委员会讨论批准。

**文章查重:** 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者对研究和文章出现的不端行为承担责任。文章中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] 胡静.颌骨牵张成骨的临床及基础研究[J].中华口腔医学杂志,2005,40(1):10-12.
- [2] Jiang XW, Zou SJ, Ye B, et al. bFGF-Modified BMMSCs enhance bone regeneration following distraction osteogenesis in rabbits. Bone. 2010;46(4):1156-1161.
- [3] 冯桂娟,郑科,宋冬惠,等.Runt相关基因2修饰的骨髓间充质干细胞促进兔下颌骨牵张成骨的研究[J].华西口腔医学杂志,2016,34(2):125-129.
- [4] Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis-a preliminary result of three cases. Bone. 2004;35(4):892-898.
- [5] Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, et al. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. Bone. 2007;40(2):522-528.
- [6] Schiller JR, Moore DC, Ehrlich MG. Increased lengthening rate decreases expression of fibroblast growth factor 2, platelet-derived growth factor, vascular endothelial growth factor, and CD31 in a rat model of distraction osteogenesis. J Pediatr Orthop. 2007;27(8):961-968.
- [7] Li G, Boussein ML, Luppen C, et al. Bone consolidation is enhanced by rhBMP-2 in a rabbit model of distraction osteogenesis. J Orthop Res. 2002;20(4):779-788.
- [8] 赵芮,李汶洋,胡静.乳铁蛋白对牵张成骨促进作用的研究[J].口腔医学研究,2016,32(2):249-252.
- [9] 高怡,黄培镇,李悦,等.骨碎补总黄酮对牵张成骨过程中骨形态发生蛋白-2和转化生长因子- $\beta$ 1表达的影响[J].广州中医药大学学报,2016,33(5):679-683.
- [10] Chan CW, Qin L, Lee KM, et al. Low intensity pulsed ultrasound accelerated bone remodeling during consolidation stage of distraction osteogenesis. J Orthop Res. 2006;24(2):263-270.
- [11] 姜腾飞,韩培.促进牵张成骨因素研究进展[J].国际骨科学杂志,2016,37(4):242-246.
- [12] 邓次妮,沈璐华.一氧化氮合酶/一氧化氮系统与心血管疾病[J].心血管病学进展,2007,28(4):603-606.
- [13] 张志纯,刘启明,李曦光.一氧化氮合酶在兔下颌骨牵张成骨过程中的表达[J].中国口腔颌面外科杂志,2005,5(1):61-65.
- [14] 周诺,廖妮,韦山良,等.一氧化氮合酶在犬下颌骨牵张成骨过程中的表达和意义[J].华西口腔医学杂志,2009,27(6):676-680.
- [15] 吴巍,姚欣欣,李咏梅,等.一氧化氮供体在牵张成骨中对骨形成速率的影响[J].北华大学学报(自然科学版),2016,17(1):62-65.
- [16] 康凯,姜洪池.气体信号分子硫化氢与疾病[J].中国普外基础与临床杂志,2009,16(2):170-173.
- [17] 蒋校文,张翼,范晓升,等.硫化氢信号系统在张应力下大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程中的变化[J].北京口腔医学,2015,23(1):21-24.
- [18] 蒋校文,张翼,范晓升,等.张应力下大鼠骨髓间充质细胞成骨分化过程中硫化氢信号系统的作用[J].实用医学杂志,2015,31(20):3291-3294.
- [19] Jiang XW, Chen YZ, Lu K, et al. GYY4137 promotes bone formation in a rabbit distraction osteogenesis model: a preliminary report. J Oral Maxillofac Surg. 2015;73(4):732.e1-e6.
- [20] Jiang XW, Zhang Y, Fan XS, et al. The effects of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  protein on bone regeneration during distraction osteogenesis: an animal study. Int J Oral Maxillofac Surg. 2016;45(2):267-272.
- [21] Liu X, Pan L, Zhuo Y, et al. Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  is involved in the pro-angiogenic effect of hydrogen sulfide under hypoxic stress. Biol Pharm Bull. 2010;33(9):1550-1554.
- [22] Bir SC, Kolluru GK, McCarthy P, et al. Hydrogen sulfide stimulates ischemic vascular remodeling through nitric oxide synthase and nitrite reduction activity regulating hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis. J Am Heart Assoc. 2012;1(5):e004093.

- [23] 胡明珠,周波,盛琼,等.PI3K/Akt/Sirt1信号通路介导硫化氢后处理对大鼠缺血心肌的保护作用[J].中国药理学通报,2016,32(2):268-273.
- [24] 杨海扣,于水,米琰,等.外源性硫化氢后处理对大鼠心肌缺血/再灌注损伤线粒体通透性转换孔的影响[J].中国药理学通报,2010,26(7):944-947.
- [25] 徐钢,季永,汪莉,等.内源性硫化氢参与缺血后处理减轻离体大鼠心脏缺血/再灌注损伤[J].中国药理学通报,2008,24(7):910-914.
- [26] He JF, Xie ZJ, Zhao H, et al. Immunohistochemical and in-situ hybridization study of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  and angiopoietin-1 in a rabbit model of mandibular distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37(6):554-560.
- [27] 姚青,李筠,张鹏,等.缺氧诱导因子1和缺氧诱导因子2:结构、功能及调节[J].生命科学,2011,23(6):753-761.
- [28] 赵光宗,方军,丁刚,等.拉啉莫德抑制成骨细胞中缺氧诱导因子2 $\alpha$ 的表达及其功能[J].中国组织工程研究,2016,20(7):917-924.
- [29] Budde MW, Roth MB. Hydrogen sulfide increases hypoxia-inducible factor-1 activity independently of von Hippel-Lindau tumor suppressor-1 in *C. elegans*. *Mol Biol Cell.* 2010;21(1):212-217.
- [30] 陈娣,潘昊,李醇文,等.硫化氢对心肺复苏后大鼠心肌缺氧诱导因子 $\alpha$ 的影响[J].中华急诊医学杂志,2011,20(7):687-691.
- [31] 陶蓓蓓,张彩彩,刘姝媛,等.低氧诱导因子1参与常氧条件下硫化氢促血管内皮细胞迁移的作用[J].生理学报,2012,64(2):129-134.
- [32] Edelmayer M, Al-Habbal D, Pensch M, et al. Effect of prolyl hydroxylase inhibitor-loaded collagen barrier membranes on osteoclastogenesis and osteoblastogenesis. *J Biomater Appl.* 2017. doi: 10.1177/0885328217702563.
- [33] Böhm AM, Dirckx N, Maes C. Recruitment of osteogenic cells to bone formation sites during development and fracture repair - German Version. *Z Rheumatol.* 2016;75(3):316-321.
- [34] Stegen S, van Gastel N, Eelen G, et al. HIF-1 $\alpha$  Promotes Glutamine-Mediated Redox Homeostasis and Glycogen-Dependent Bioenergetics to Support Postimplantation Bone Cell Survival. *Cell Metab.* 2016;23(2):265-279.
- [35] Zhang T, Xie J, Sun K, et al. Physiological oxygen tension modulates soluble growth factor profile after crosstalk between chondrocytes and osteoblasts. *Cell Prolif.* 2016;49(1):122-133.
- [36] Kuroyanagi G, Otsuka T, Yamamoto N, et al. Mimosine suppresses the PGF2 $\alpha$ -induced synthesis of osteoprotegerin but not interleukin-6 in osteoblasts. *Int J Mol Med.* 2016;37(2):533-541.
- [37] Cui M, Kanemoto S, Cui X, et al. OASIS modulates hypoxia pathway activity to regulate bone angiogenesis. *Sci Rep.* 2015;5:16455.
- [38] Huang J, Liu L, Feng M, et al. Effect of CoCl<sub>2</sub> on fracture repair in a rat model of bone fracture. *Mol Med Rep.* 2015;12(4):5951-5956.
- [39] Chen NX, O'Neill KD, Allen MR, et al. Low Bone Turnover in Chronic Kidney Disease Is Associated with Decreased VEGF-A Expression and Osteoblast Differentiation. *Am J Nephrol.* 2015;41(6):464-473.
- [40] Xing Y, Wang R, Chen D, et al. COX2 is involved in hypoxia-induced TNF- $\alpha$  expression in osteoblast. *Sci Rep.* 2015;5:10020.
- [41] Quinlan E, Partap S, Azevedo MM, et al. Hypoxia-mimicking bioactive glass/collagen glycosaminoglycan composite scaffolds to enhance angiogenesis and bone repair. *Biomaterials.* 2015;52:358-366.
- [42] Johnson RW, Schipani E, Giaccia AJ. HIF targets in bone remodeling and metastatic disease. *Pharmacol Ther.* 2015;150:169-177.
- [43] Liu XD, Cai F, Liu L, et al. MicroRNA-210 is involved in the regulation of postmenopausal osteoporosis through promotion of VEGF expression and osteoblast differentiation. *Biol Chem.* 2015;396(4):339-347.
- [44] Peng J, Lai ZG, Fang ZL, et al. Dimethylxalylglycine prevents bone loss in ovariectomized C57BL/6J mice through enhanced angiogenesis and osteogenesis. *PLoS One.* 2014;9(11):e112744.
- [45] Kawao N, Tamura Y, Okumoto K, et al. Tissue-type plasminogen activator deficiency delays bone repair: roles of osteoblastic proliferation and vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(3):E278-E288.
- [46] Regan JN, Lim J, Shi Y, et al. Up-regulation of glycolytic metabolism is required for HIF1 $\alpha$ -driven bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(23):8673-8678.
- [47] Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature.* 2014;507(7492):323-328.
- [48] Zhao G, Liu Y, Fang J, et al. Dimethyl fumarate inhibits the expression and function of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;448(3):303-307.
- [49] Liu X, Tu Y, Zhang L, et al. Prolyl hydroxylase inhibitors protect from the bone loss in ovariectomy rats by increasing bone vascularity. *Cell Biochem Biophys.* 2014;69(1):141-149.
- [50] Dirckx N, Van Hul M, Maes C. Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2013;99(3):170-191.
- [51] Dorjgochoo T, Zheng Y, Gao YT, et al. No association between genetic variants in angiogenesis and inflammation pathway genes and breast cancer survival among Chinese women. *Cancer Epidemiol.* 2013;37(5):619-624.
- [52] Wan C, Gilbert SR, Wang Y, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  pathway accelerates bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(2):686-691.