

# 硫化氢可对膝骨关节炎模型兔关节软骨发挥保护效应

李夏楠, 田少奇, 王远贺, 刘江俊, 丁涛, 褚国庆, 孙康(青岛大学附属医院关节外科, 山东省青岛市 266500)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1984

ORCID: 0000-0001-9005-5088(李夏楠)

文章快速阅读:



李夏楠, 男, 1992 年生, 山东省滨州市人, 汉族, 2019 年青岛大学毕业, 硕士, 主要从事骨与关节疾病研究

通讯作者: 孙康, 博士, 教授, 博士生导师, 青岛大学附属医院, 山东省青岛市 266500

文题释义:

**胱硫醚 β 合成酶:** 是一种细胞质中的同源四聚体, 在维生素 B<sub>6</sub> 的催化下, 胱硫醚 β 合成酶能使丝氨酸与同型半胱氨酸合成胱硫醚, 其催化 L-半胱氨酸生成内源性 H<sub>2</sub>S。

**胱硫醚 γ 裂解酶:** 是一种参与半胱氨酸合成的酶, 催化胱硫醚脱氨水解成半胱氨酸、α 酮丁酸及氨, 是心血管中产生的一种重要的内源性 H<sub>2</sub>S 酶, 主要存在于血管平滑肌、内皮细胞中。

**基质金属蛋白酶:** 是酶活性依赖锌离子蛋白酶超家族, 是关节软骨基质降解最主要的蛋白水解系统。

文献标识码:B

稿件接受: 2019-05-08



摘要

**背景:** H<sub>2</sub>S 是重要的炎症调节因子, 广泛存在于人体各组织器官中, 在多个系统疾病中发挥着重要作用。

**目的:** 通过研究兔膝骨关节炎模型中 H<sub>2</sub>S 对关节软骨退变的影响, 探讨 H<sub>2</sub>S 对骨性关节炎的治疗作用。

**方法:** 取 32 只新西兰大白兔随机分为空白对照组、骨性关节炎组、H<sub>2</sub>S 干预组和抑制 H<sub>2</sub>S 生成组, 每组 8 只。空白对照组不做处理, 骨性关节炎组、H<sub>2</sub>S 干预组和抑制 H<sub>2</sub>S 生成组以改良 Hulth 法建立骨性关节炎模型后, 分别给予膝关节腔注射生理盐水、NaHS 稀释液(60 μmol/L)、H<sub>2</sub>S 合成酶抑制剂(氨基氧乙酸, 37.5 mg/kg; 焯丙基甘氨酸, 60 mg/kg)各 1 mL, 1 次/周, 连续 6 周。实验方案于 2018-03-01 经青岛大学动物实验伦理委员会批准, 批准号: AHQU-MAL2018032。

**结果与结论:** ①病理变化: 空白对照组关节软骨形态正常; 骨性关节炎组关节软骨退变严重; H<sub>2</sub>S 干预组关节软骨退变较轻; 抑制 H<sub>2</sub>S 生成组关节软骨退变较骨性关节炎组更重; ②Mankin's 评分: 骨性关节炎组、H<sub>2</sub>S 干预组和抑制 H<sub>2</sub>S 生成组评分较空白对照组均增加; H<sub>2</sub>S 干预组较骨性关节炎组评分更低, 抑制 H<sub>2</sub>S 生成组较骨性关节炎组评分高; ③II 型胶原染色: 与空白对照组比, 骨性关节炎组 II 型胶原阳性染色降低, 分布不均; H<sub>2</sub>S 干预组 II 型胶原阳性染色较骨性关节炎组表达增多; 抑制 H<sub>2</sub>S 生成组 II 型胶原阳性染色降低且表层出现缺损; ④与骨性关节炎组比较, H<sub>2</sub>S 干预组关节软骨中基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 3 与基质金属蛋白酶 13 mRNA 表达水平降低; 抑制 H<sub>2</sub>S 生成组上述 mRNA 表达水平增加。结果说明, H<sub>2</sub>S 可以抑制关节软骨中基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 3 与基质金属蛋白酶 13 mRNA 的表达水平, 减少关节软骨 II 型胶原蛋白降解, 对骨关节炎中的关节软骨有保护作用。

**关键词:**

骨性关节炎; 硫化氢; II 型胶原蛋白; 基质金属蛋白酶; 兔; 关节软骨; 软组织构建; 组织工程

**中图分类号:** R453; R689.3; TQ105.1+2

**基金资助:**

国家自然科学基金项目(青年科学基金项目)(81702172), 项目负责人: 田少奇; 青岛市民生科技计划项目(17-3-3-12-nsh), 项目负责人: 孙康

**缩略语:**

胱硫醚 β 合成酶: cystathionine β synthase, CBS; 胱硫醚 γ 裂解酶: cystathionine γ lyase, CSE; 基质金属蛋白酶系统: matrix metalloproteinase, MMPs

Li Xianan, Master, Department of Joint Surgery, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266500, Shandong Province, China

Corresponding author: Sun Kang, MD, Professor, Doctoral supervisor, Department of Joint Surgery, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266500, Shandong Province, China

## Hydrogen sulfide protects articular cartilage in rabbit models of knee osteoarthritis

Li Xianan, Tian Shaoqi, Wang Yuanhe, Liu Jiangjun, Ding Tao, Chu Guoqing, Sun Kang (Department of Joint Surgery, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266500, Shandong Province, China)

**Abstract**

**BACKGROUND:** H<sub>2</sub>S is an important inflammatory regulator, which widely exists in various tissues and organs of human body and plays an important role in many systemic diseases.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of H<sub>2</sub>S on articular cartilage degeneration in rabbit knee osteoarthritis model and to explore the therapeutic effect of H<sub>2</sub>S on osteoarthritis.

**METHODS:** Thirty-two New Zealand white rabbits were randomly divided into four groups: blank control, osteoarthritis, H<sub>2</sub>S, and H<sub>2</sub>S inhibition groups ( $n=8$ /group). Blank control group was not treated, the other three groups were used to establish the osteoarthritis model by modified Hult method, and were then injected with normal saline, NaHS diluent (60  $\mu$ mol/L) and H<sub>2</sub>S synthase inhibitor (aminooxyacetic acid, 37.5 mg/kg; propargylglycine, 60 mg/kg) 1 mL each into the knee joint cavity once a week for 6 weeks. The study was approved by the Laboratory Animal Ethical Committee of Qingdao University, approval No. AHQU-MAL2018032.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Pathological changes: the morphology of articular cartilage in the blank control group was normal; the degeneration of articular cartilage in the osteoarthritis group was serious; the degeneration of articular cartilage in the H<sub>2</sub>S group was mild; and the degeneration of articular cartilage in the H<sub>2</sub>S inhibition group was more serious than that in the osteoarthritis group. (2) Mankin's score showed that the scores in the osteoarthritis, H<sub>2</sub>S and H<sub>2</sub>S inhibition groups were significantly higher than those in the blank control group ( $P < 0.05$ ); the scores in the H<sub>2</sub>S group were lower than those in the osteoarthritis group, and the scores in the H<sub>2</sub>S inhibition group were significantly higher than those in the osteoarthritis group ( $P < 0.05$ ). (3) Type II collagen staining showed that compared with the blank control group, the positive staining of type II collagen in the osteoarthritis group was significantly lower and unevenly distributed; the positive staining of type II collagen in H<sub>2</sub>S group was higher than that in osteoarthritis group; the positive staining of type II collagen in H<sub>2</sub>S inhibition group was significantly lower and the superficial layer was defective. (4) Compared with the osteoarthritis group, the mRNA expression levels of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and matrix metalloproteinase-13 in articular cartilage were decreased in the H<sub>2</sub>S group, and increased in the H<sub>2</sub>S inhibition group compared with the osteoarthritis group. (5) These results show that H<sub>2</sub>S can inhibit the mRNA expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and matrix metalloproteinase-13 in articular cartilage, reduce the degradation of type II collagen in articular cartilage, and protect articular cartilage in osteoarthritis.

**Key words:** osteoarthritis; hydrogen sulfide; type II collagen; matrix metalloproteinase; rabbits; articular cartilage; soft tissue construction; tissue engineering

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China (Youth Foundation), No. 81702172 (to TSQ); the Qingdao Livelihood Science and Technology Program, No. 17-3-3-12-nsh (to SK)

## 0 引言 Introduction

骨性关节炎又被称作退行性骨关节病,在老年人口中高度流行,是导致60岁以上人群关节疼痛和关节功能丧失三个最常见原因之一<sup>[1-2]</sup>。骨性关节炎的发病机制尚未完全清楚,如今人们普遍认为其本质是在机械性和生物性因素共同作用下,关节软骨分解代谢及合成代谢失调,从而导致关节软骨细胞凋亡及细胞外基质、软骨下骨退变<sup>[3-4]</sup>。关节软骨基质的主要成分是胶原蛋白,其中90%以上的是II型胶原蛋白<sup>[5]</sup>。基质金属蛋白酶在细胞外基质降解过程中起着重要作用,对骨性关节炎的发病有着重要意义<sup>[6]</sup>。

硫化氢(H<sub>2</sub>S)是继一氧化氮和一氧化碳之后,人们发现的第3种生物气体信号分子<sup>[7]</sup>。既往研究表明,H<sub>2</sub>S可参与调节离子通道、蛋白修饰、抗氧化、抗凋亡等代谢过程,是重要的炎症调节因子,广泛存在于人体各组织器官中,在多个系统疾病中发挥着重要作用<sup>[8-10]</sup>。2010年,Whiteman等<sup>[11]</sup>首次证明了人膝关节滑液中存在H<sub>2</sub>S。随后又有研究显示,骨性关节炎及类风湿性关节炎患者膝关节液中H<sub>2</sub>S的水平与健康志愿者存在差异,提示H<sub>2</sub>S可能在关节疾病中发挥一定作用<sup>[12]</sup>。

作者拟应用外源性H<sub>2</sub>S干预兔骨性关节炎模型,通过观察其关节软骨退变的组织形态学变化及关节软骨中基质金属蛋白酶的基因表达情况,来探索H<sub>2</sub>S对骨性关节炎的作用及影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2018年5至12月在青岛大学中心实验室完成。

1.3 材料

**实验动物:** 体质量2.5-3.0 kg,兔龄为10-12月龄雄性

清洁级新西兰大白兔32只,由青岛大学中心实验室动物房提供,动物许可证号:SYXK(鲁)20150003。室温下分笼饲养于无特殊病原菌的动物房,标准饲料饲养,动物可以自由进食和水,实验前适应性饲养3 d。实验过程均2018-03-01经青岛大学实验动物管理伦理委员会批准,批准号:AHQU-MAL2018032,符合实验动物伦理要求。

**实验使用的主要试剂和仪器:** 硫化氢(NaHS)购自上海麦克林公司;CBS酶抑制剂-氨基氧乙酸、CSE酶抑制剂-炔丙基甘氨酸购自美国Sigma公司;两步法抗兔免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司;RNA提取试剂盒(TRIZOL<sup>®</sup> Reagent)购自美国Invitrogen公司;基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶3、基质金属蛋白酶13以及内参 $\beta$ -actin的上下游引物购自上海生物工程有限公司;SYBR Premix Ex Taq II试剂盒(Perfect Real-Time)购自日本TaKaRa公司;倒置显微镜购自日本Olympus BX公司;荧光定量基因扩增仪购自美国ABI7300公司;恒温水浴箱(LRH-150)购自上海益恒公司;紫外分光光度仪购自美国Labsystem公司。

### 1.4 方法

1.4.1 实验分组 将32只新西兰大白兔采用随机数字表法随机分为空白对照组、骨性关节炎组、H<sub>2</sub>S干预组和抑制H<sub>2</sub>S生成组,每组8只。

1.4.2 兔骨性关节炎模型建立 见表1。

1.4.3 药物干预 术后1周开始,骨性关节炎组给予膝关节腔注射生理盐水1 mL,H<sub>2</sub>S干预组膝关节腔给予注射60  $\mu$ mol/L的NaHS稀释液1 mL,抑制H<sub>2</sub>S生成组膝关节腔给予注射H<sub>2</sub>S合成酶抑制剂(氨基氧乙酸,37.5 mg/kg;炔丙基甘氨酸,60 mg/kg)1 mL,1次/周,连续6周。空白对照组不做任何处理。

1.4.4 大体观察 处死动物后,切开其膝关节囊暴露出关节软骨,首先对其进行大体观察。

表 1 兔骨性关节炎的造模过程

Table 1 Model process of rabbit osteoarthritis

项目	内容
造模目的	研究 H <sub>2</sub> S 对骨性关节炎的作用及影响
选择动物的条件	10-12 月龄雄性新西兰大白兔 32 只, 体质量 2.5-3.0 kg
模型与所研究疾病的关系	改良 Hulth 法是一种稳定的、易复制的人工诱导骨关节炎造模法, 是研究骨性关节炎等疾病常用的动物模型造模法 <sup>[13]</sup>
动物来源及品系	由青岛大学中心实验室动物房提供
造模技术描述	适应性喂养 3 d 后, 采用改良 Hulth 法制作, 即切断其膝关节前十字韧带及内侧副韧带, 摘除内侧半月板 <sup>[13]</sup> 。术后连续 3 d, 肌肉注射青霉素 400 000 U 预防感染, 1 周后, 强迫各组兔每天活动 0.5 h, 连续 6 周。
动物数量及分组方法	32 只兔随机分为空白对照组、骨性关节炎组、H <sub>2</sub> S 干预组和抑制 H <sub>2</sub> S 生成组, 每组 8 只
造模成功评价指标	兔膝关节内翻畸形, 关节软骨退变, 软骨下骨暴露
造模后观察指标	①大体观察; ②病理学观察; ③免疫组化观察 II 型胶原蛋白表达; ④反转录 PCR 检测软骨细胞中基因表达
造模后动物处理	末次关节腔注射后 1 周, 空气栓塞法处死兔子, 在兔膝关节面软骨处定点取材, 深达软骨下骨, 约 0.5 cm <sup>3</sup> 大小, 用 0.9% 氯化钠溶液清洗软骨表面组织及血迹, 将软骨置于 40 g/L 多聚甲醛溶液和液氮中冷存备用。
伦理委员会批准	实验经青岛大学实验动物管理伦理委员会批准, 批准号: AHQU-MAL2018032

1.4.5 病理学观察 将软骨样本用常规梯度乙醇脱水, EDTA 溶液脱钙, 石蜡包埋后垂直软骨表面方向作 4 μm 厚连续切片, 然后行苏木精-伊红染色, 每张切片随机选 3 个不同视野, 根据改良 Mankin 评分系统进行评估<sup>[14]</sup>。由 2 名病理科医师轮流阅片评分, 取平均分。

1.4.6 免疫组化观察 II 型胶原蛋白表达 将石蜡切片常规烤片、脱蜡、水化; 浸入柠檬酸盐缓冲液用微波修复抗原; 用体积分数 5% 羊血清 (PBS 配置) 在 37 °C 下恒温封闭 30 min; 滴羊抗兔 II 型胶原蛋白多克隆抗体 4 °C 孵育过夜; HRP 标记的二抗 37 °C 孵育 30 min; DAB 显色 8-12 min; 树脂封固后应用图像采集系统分析结果。

1.4.7 反转录 PCR 检测软骨细胞中基因表达 取出液氮中的关节软骨标本, 研磨后加入 1 mL Trizol 溶液, 将组织匀浆, 直至标本溶化。静置 5 min 后向匀浆液中加入 200 μL 氯仿 (1 mL 的 Trizol 配 200 μL 的氯仿), 在室温下静置 3.0-4.0 min。4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min 后取无色上清液 400 μL, 然后加入等量的 400 μL 预冷的异丙醇, 室温下放置 5 min。4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清液, 加入 1 mL 体积分数 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次。室温下放置晾干, 加入 50 μL 不含 RNA 酶的双蒸水反复吹打, 混匀, 充分溶解 RNA。利用紫外分光光度计测量吸光度值及 RNA 的浓度, 核酸 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值应介于 1.8-2.0 之间, 重复测量 3 次。按照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA, -20 °C 保存。应用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒行实时荧光定量 PCR 检测, 分析样本中基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 3 与基质金属蛋白酶 13 的基因相对表达量。目的基因及内参的引物序列情况见表 2。样本中基质金属蛋白酶 1、基

质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶 13 的基因相对表达情况根据公式  $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算。

表 2 各目的基因及内参的引物序列情况

Table 2 Primer sequences of target genes and internal references

基因引物名称	基因引物具体序列
基质金属蛋白酶 1	
上游序列	5'-AAG CCA GAT GCT GAA ACC CTG-3'
下游序列	5'-GAC CCT TGG AGA CTT TGG TGA AT-3'
基质金属蛋白酶 3	
上游序列	5'-ACA CCG GAT CTG CCA AGA GA-3'
下游序列	5'-CTG GAG AAC GTG AGT GGA GTC A-3'
基质金属蛋白酶 13	
上游序列	5'-TTG ACC ACT CCA AGG ACC CAG-3'
下游序列	5'-GAG GAT GCA GAC GCC AGA AGA-3'
内参 β-actin	
上游序列	5'-CGA GAT CGT GCG GGA CAT-3'
下游序列	5'-CAG GAA GGA GGG CTG GAA C-3'

1.5 主要观察指标 ①大体观察; ②病理学观察; ③免疫组化观察 II 型胶原蛋白表达; ④反转录 PCR 检测软骨细胞中基因表达。

1.6 统计学分析 所有数据均使用 SPSS 22.0 统计分析软件 (美国 IBM 公司) 进行统计学分析, 定量资料以  $\bar{x} \pm s$  描述, 符合正态分布的数据运用单因素方差分析比较组间差异, 不符合正态分布的数据则采用非参数秩和检验比较组间差异。P < 0.05 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用新西兰大白兔 32 只, 分为 4 组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 硫化氢可改善膝骨关节炎模型兔关节软骨的大体形态 空白对照组关节软骨面光滑平整、光泽明亮, 关节边缘规则齐整, 无骨赘形成, 见图 1A。骨性关节炎组关节软骨呈灰黄色, 表面粗糙, 有裂隙及溃疡形成, 但多数未达到骨质, 有较多骨赘形成, 见图 1B。H<sub>2</sub>S 干预组关节软骨呈淡黄色, 表面欠光滑, 光泽较明亮, 有少量裂纹及骨赘形成, 见图 1C。抑制 H<sub>2</sub>S 生成组关节软骨表面有大量裂隙及溃疡形成, 多达骨质, 软骨退变严重, 软骨下骨暴露, 并有大量骨赘形成, 见图 1D。

2.3 硫化氢可改善膝骨关节炎模型兔关节软骨的病理学表现 苏木精-伊红染色结果显示, 空白对照组可见软骨细胞排列整齐, 潮线清晰完整, 细胞呈梭形, 胞核完整, 胞浆密度均匀, 细胞表面有不规则胞突, 见图 2A。骨性关节炎组可见软骨细胞及基质胶原纤维排列紊乱, 层次不清, 潮线不完整, 细胞轮廓不清, 胞浆内可见脂滴或囊泡, 胞核边聚或固缩, 见图 2B。H<sub>2</sub>S 干预组可见潮线较完整, 软骨细胞形态大致正常, 轮廓清晰, 胞核及胞膜基本完整, 胶原纤维尚清晰, 滑动带明显, 见图 2C。抑制 H<sub>2</sub>S 生成组可见潮线裂隙多, 不完整, 软骨细胞大量增生, 细胞轮廓不清晰, 胞浆内出现囊泡, 胞核固缩, 胶原纤维排列紊乱,

层次不清, 见图2D。

与空白对照组相比, 其余3组改良Mankin's评分明显升高, 说明造模成功; 且H<sub>2</sub>S干预组改良Mankin's评分低于骨性关节炎组, 说明膝关节注射外源性H<sub>2</sub>S能一定程度上保护软骨; 抑制H<sub>2</sub>S生成组的改良Mankin's评分高于骨性关节炎组, 这说明抑制关节内H<sub>2</sub>S产生会加重软骨退变, 见表3。

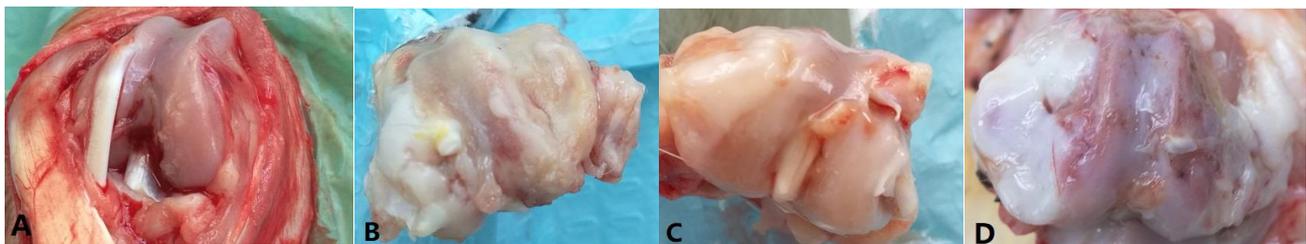
表3 硫化氢对膝骨关节炎模型兔关节软骨改良 Mankin's 评分的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

Table 3 Effect of hydrogen sulfide on the advanced Mankin's score of rabbit cartilage in each group

组别	Mankin's 评分
空白对照组	0.25±0.46
骨性关节炎组	8.88±1.25
H <sub>2</sub> S 干预组	4.25±1.04
抑制 H <sub>2</sub> S 生成组	10.63±1.19
P 值	< 0.01

2.4 硫化氢可增加膝骨关节炎模型兔关节软骨中 II 型胶原蛋白的表达 免疫组化染色结果显示, 空白对照组 II 型胶原阳性染色广泛, 颜色深, 均匀分布于关节软骨各层之中, 见图3A。骨性关节炎组 II 型胶原阳性染色明显减少, 分布不均, 表层出现裂隙, 见图3B。H<sub>2</sub>S 干预组 II 型胶原阳性染色分布可, 阳性染色略低于空白对照组, 见图3C。抑制H<sub>2</sub>S生成组 II 型胶原阳性染色显著分散, 色浅, 各层中均出现较大缺损或裂隙, 见图3D。

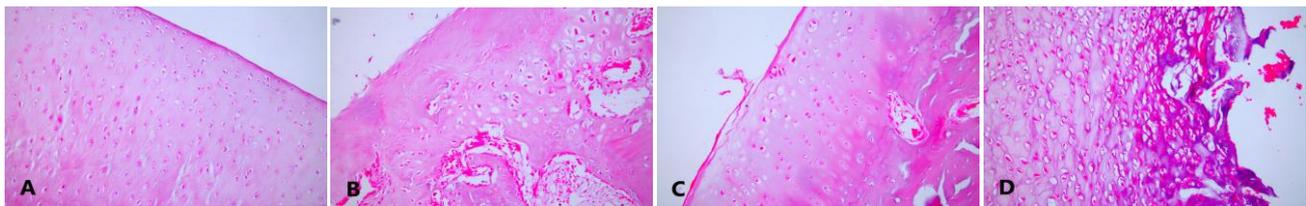
2.5 硫化氢可抑制膝骨关节炎模型兔关节软骨中基质金属蛋白酶mRNA的表达水平 结果显示, 与空白对照组相比, 其他3组关节软骨的基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶3、基质金属蛋白酶13 mRNA表达水平增多( $P < 0.05$ )。与骨性关节炎组相比, H<sub>2</sub>S干预组软骨中基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶3和基质金属蛋白酶13的mRNA的表达水平降低( $P < 0.05$ )。而抑制H<sub>2</sub>S生成组软骨中的基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶3与基质金属蛋白酶13的mRNA的表达水平较骨性关节炎组增加( $P < 0.05$ ), 见图4。



图注: 图中 A 为空白对照组: 为正常关节软骨结构; B 为骨性关节炎组: 关节软骨退变较重, 较多骨赘形成; C 为 H<sub>2</sub>S 干预组: 关节软骨退变较轻, 少量骨赘形成; D 为抑制 H<sub>2</sub>S 生成组: 关节软骨退变重, 软骨下骨暴露, 骨赘增生明显。

图1 硫化氢对膝骨关节炎模型兔关节软骨的大体形态的影响

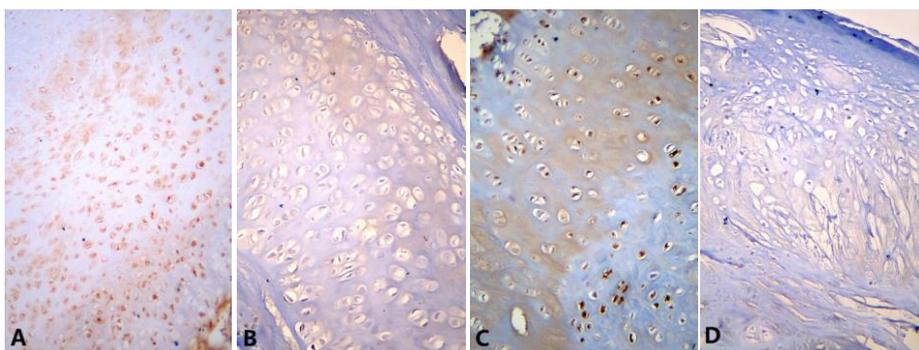
Figure 1 Effect of hydrogen sulfide on the gross observation of knee joint in rabbit models of osteoarthritis



图注: 图中 A 为空白对照组: 正常软骨结构; B 为骨性关节炎组: 软骨细胞轮廓不清, 层次紊乱; C 为 H<sub>2</sub>S 干预组: 软骨细胞形态大致正常; D 为抑制 H<sub>2</sub>S 生成组: 软骨细胞大量增生, 细胞层次严重紊乱。

图2 硫化氢对膝骨关节炎模型兔关节软骨的病理学表现的影响(苏木精-伊红染色, x200)

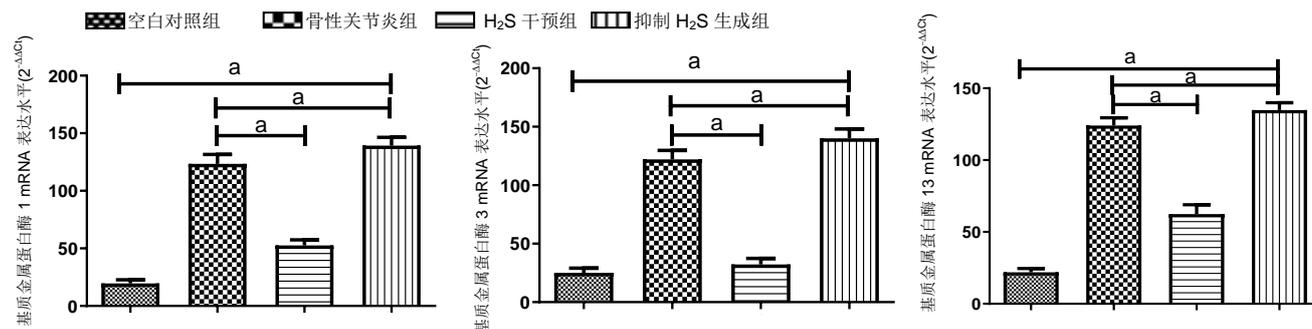
Figure 2 Effect of hydrogen sulfide on the histological observation of knee joint in rabbit models of osteoarthritis (hematoxylin-eosin staining, x200)



图注: 图中 A 为空白对照组: 阳性染色均匀广泛; B 为骨性关节炎组: 阳性染色少而浅, 表层出现裂隙; C 为 H<sub>2</sub>S 干预组: 阳性染色较广, 未见明显裂隙; D 为抑制 H<sub>2</sub>S 生成组: 阳性染色浅且显著分散, 出现较大裂隙。

图3 各组关节软骨中 II 型胶原蛋白表达情况(x200)

Figure 3 Expression of type II collagen in articular cartilage of each group (x200)



图注: <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

图 4 硫化氢对膝骨关节炎模型兔关节软骨中基质金属蛋白酶 1、基质金属蛋白酶 3 与基质金属蛋白酶 13 mRNA 表达的影响

Figure 4 Effect of hydrogen sulfide on the mRNA expression levels of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and matrix metalloproteinase-13 in articular cartilage in rabbit models of knee osteoarthritis

### 3 讨论 Discussion

近年来生命科学迅速发展, 人体生命活动中多种具有重要作用的气体小分子也逐步被发现。20世纪80至90年代, 人们先后发现一氧化氮及一氧化碳在人体生命活动中具有的重要作用, 开启了对人体中气体小分子研究的大门<sup>[15-17]</sup>。21世纪初, H<sub>2</sub>S作为第3种气体小分子在体内被发现, 其作为信号分子在体内发挥的各项作用也逐渐被展开研究。一系列事实研究表明, 机体内生理浓度的H<sub>2</sub>S广泛参与了多个系统生理病理过程的调节, 在生命活动中有着特殊的作用<sup>[18-20]</sup>。2010年, Whiteman等<sup>[11]</sup>首次在人膝关节滑液中检测出H<sub>2</sub>S的存在。随后, 人们证实关节软骨中存在H<sub>2</sub>S合成酶<sup>[21]</sup>。体内H<sub>2</sub>S合成酶主要为胱硫醚-β-合成酶胱硫醚-γ-裂解酶, 其催化L-半胱氨酸生成内源性H<sub>2</sub>S<sup>[22]</sup>。有研究发现, 膝关节内H<sub>2</sub>S和H<sub>2</sub>S合成酶的表达与关节软骨退变程度有相关性, 这可能与内源性H<sub>2</sub>S的抗炎、抗凋亡、抗氧化等作用有关<sup>[12, 21]</sup>。以上报道多数以体外细胞实验作为研究方向, 作者利用兔骨性关节炎模型, 通过外源性H<sub>2</sub>S及H<sub>2</sub>S生成抑制剂进行干预, 从2个方面验证H<sub>2</sub>S对软骨退变的作用影响。内源性H<sub>2</sub>S以气体形式发挥作用, 而外源性H<sub>2</sub>S不稳定, 多以硫化氢供体的形式被用作研究, 此次研究采用的NaHS是一种常用的硫化氢供体, 其溶于水或体液后能迅速释放大量的H<sub>2</sub>S。一般情况下, 硫化氢的毒性水平在毫摩尔范围内, 生理水平的硫化氢则在微摩尔范围(50-160 μmol/L)<sup>[23]</sup>, 实验以低浓度生理水平的硫化氢展开研究, 以保证硫化氢在治疗过程中的相对安全性。

骨性关节炎的发病机制尚未完全清楚, 软骨退变是其主要病理改变, 除机械性因素外, 炎症因素是其发病的重要原因, 各种炎症因子参与诱导了软骨细胞外基质的降解, 这是软骨退变的重要病理变化<sup>[23]</sup>。关节软骨基质的主要成分是胶原蛋白, 它使软骨具有张力和剪切力特性, 占关节软骨质量的50%以上, 关节软骨中有15种以上的胶原纤维, II型胶原蛋白占其中90%-95%<sup>[24]</sup>。骨性关节炎的病理变化表现为关节软骨胶原纤维支架损伤, 软骨水分显著增多, 其本质是在各种蛋白酶的作用之下, II型胶原纤维降解代谢速率显著增快, II型胶原纤维被裂解<sup>[25]</sup>。基质金属蛋白

酶是酶活性依赖锌离子蛋白酶超家族, 是关节软骨基质降解最主要的蛋白水解系统, 其中基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶3和基质金属蛋白酶13是破坏软骨的主要介质, 其受炎症、应激及分化诱导的信号调节<sup>[26-27]</sup>, 能够裂解软骨基质的各种成分, 与胶原纤维的降解密切相关, 对骨性关节炎的发病起着重要作用。相较于正常软骨, 骨性关节炎软骨中的基质金属蛋白酶表达显著增多, 抑制基质金属蛋白酶可有效减少软骨基质的降解<sup>[28]</sup>。有研究证实, H<sub>2</sub>S可一定程度抑制白细胞介素1β诱导的软骨细胞基质金属蛋白酶的表达<sup>[29]</sup>。实验通过动物模型进一步验证H<sub>2</sub>S这一作用。

免疫组化染色结果显示, 骨性关节炎组中II型胶原纤维染色较空白对照组明显减少, 分布不均, 且各层中出现裂隙和缺损, 符合骨性关节炎的病理表现。给予外源性H<sub>2</sub>S干预后, II型胶原蛋白阳性染色增加, 软骨各层中较少出现裂隙。而给予H<sub>2</sub>S生成抑制剂后, II型胶原蛋白的阳性染色较模型组更加分散, 软骨各层中出现较大的裂隙及缺损。另一方面, 结果显示骨性关节炎组软骨中基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶3与基质金属蛋白酶13的mRNA表达均增多, 与既往的研究结果一致<sup>[28]</sup>。给予外源性H<sub>2</sub>S干预后, 基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶3与基质金属蛋白酶13的mRNA表达降低, 而抑制H<sub>2</sub>S生成后, 以上3种基质金属蛋白酶的mRNA表达水平则有所升高。这提示一定浓度的H<sub>2</sub>S可以通过抑制基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶3与基质金属蛋白酶13的过量生成来减少关节软骨中II型胶原纤维的降解, 从而减轻骨性关节炎中关节软骨的损伤。基于以上研究结果, 作者认为一定浓度的H<sub>2</sub>S可以通过抑制基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶3与基质金属蛋白酶13的表达水平来降低关节软骨II型胶原蛋白和细胞外基质的降解, 使软骨基质的合成代谢与降解代谢之间保持相对平衡, 进而保护关节软骨。通过实验, 一方面对一定浓度的外源性H<sub>2</sub>S治疗骨性关节炎的积极作用给予了肯定, 另一方面也为关节中内源性H<sub>2</sub>S的存在意义提供了研究基础。但是H<sub>2</sub>S调节基质金属蛋白酶1、基质金属蛋白酶3与基质金属蛋白酶13的表达的信号通路以及H<sub>2</sub>S治疗骨

性关节炎的浓度范围 and 安全性还需进一步研究。

**作者贡献:** 研究设计为任荣。被试招募由郭启发和李钊伟负责。数据收集和分析者为李泽清和唐保明。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金项目(青年科学基金项目)(81702172)”“青岛市民生科技计划项目资助(17-3-3-12-nsh)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案于 2018-03-01 经青岛大学动物实验伦理委员会批准, 批准号: AHQU-MAL2018032。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物行空气栓塞法出后进行检测, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经青岛大学生物统计学专家审核。

**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, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”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] Neogi T. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(9):1145-1153.
- [2] 钱春美,沈艳婷,袁秀荣,等.骨性关节炎研究进展[J].吉林中医药, 2016,36(5):538-540.
- [3] Poulet B, Staines KA. New developments in osteoarthritis and cartilage biology. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;28:8-13.
- [4] Queen RM, Sparling TL, Schmitt D. Hip, Knee, and Ankle Osteoarthritis Negatively Affects Mechanical Energy Exchange. *Clin Orthop Relat Res*. 2016;474(9):2055-2063.
- [5] Aigner T, Bertling W, Stöss H, et al. Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*. 1993;91(3):829-837.
- [6] 李镇顺,黄皓,赵先英.基质金属蛋白酶与骨性关节炎的机制探讨[J].国际检验医学杂志,2016,37(5):633-634.
- [7] Łowicka E, Beltowski J. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep*. 2007;59(1):4-24.
- [8] Predmore BL, Lefer DJ, Gojon G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 17(1):119-140.
- [9] Ying R, Wang XQ, Yang Y, et al. Hydrogen sulfide suppresses endoplasmic reticulum stress-induced endothelial-to-mesenchymal transition through Src pathway. *Life Sci*. 2016; 144:208-217.
- [10] Tang B, Ma L, Yao X, et al. Hydrogen sulfide ameliorates acute lung injury induced by infrarenal aortic cross-clamping by inhibiting inflammation and angiotensin II release. *J Vasc Surg*. 2017;65(2):501-508.e1.
- [11] Whiteman M, Haigh R, Tarr JM, et al. Detection of hydrogen sulfide in plasma and knee-joint synovial fluid from rheumatoid arthritis patients: relation to clinical and laboratory measures of inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1203: 146-150.
- [12] 潘利平,曹永平,立成,等.软骨中硫化氢含量及其对白介素1 $\beta$ 诱导的软骨细胞基质金属蛋白酶13表达的抑制作用[J].北京大学学报(医学版), 2016,48(2):194-202.
- [13] Rogart JN, Barrach HJ, Chichester CO. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1999;7(6):539-547.
- [14] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am*. 1971;53(3):523-537.
- [15] Xia G, Sun Y. Expression of the inducible nitric oxide synthase isoform in chorionic villi in the early spontaneous abortion. *J Tongji Med Univ*. 2000;20(4):338-339.
- [16] 黄娅茜,金红芳,杜军保,等.昨日的废气今日分子明星[J].生理科学进展,2017,48(1):1-3.
- [17] 杜军保,金红芳,唐朝枢.关注气体小分子在心血管疾病发病中的意义[J].中国循证儿科杂志,2006,1(2):86-88.
- [18] Beltowski J. Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine--An update. *Pharmacol Rep*. 2015;67(3):647-658.
- [19] 易登良,曾奇虎,范忠才.外源性硫化氢对糖尿病心肌病保护作用机制的研究进展[J].山东医药,2018,58(46):90-92.
- [20] 李超.硫化氢在糖尿病肾病中的保护作用及机制研究进展[J].检验医学与临床,2018,15(22):3466-3470.
- [21] Fox B, Schantz JT, Haigh R, et al. Inducible hydrogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: is H<sub>2</sub>S a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint? *J Cell Mol Med*. 2012;16(4):896-910.
- [22] Winther AK, Dalsgaard T, Hedegaard ER, et al. Involvement of hydrogen sulfide in perivascular and hypoxia-induced inhibition of endothelin contraction in porcine retinal arterioles. *Nitric Oxide*. 2015;50:1-9.
- [23] 罗邦,游咏.硫化氢供体生物学作用研究进展[J].中南医学科学杂志, 2016,44(1):107-111.
- [24] Lee AS, Ellman MB, Yan D, et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene*. 2013;527(2): 440-447.
- [25] 张猛,周嘉俊,罗宗平.软骨损伤后 I、II 型胶原蛋白的表达[J].中国组织工程研究,2014,18(51):8305-8309.
- [26] Barlas IO, Sezgin M, Erdal ME, et al. Association of (-1,607) 1G/2G polymorphism of matrix metalloproteinase-1 gene with knee osteoarthritis in the Turkish population (knee osteoarthritis and MMPs gene polymorphisms). *Rheumatol Int*. 2009;29(4): 383-388.
- [27] 王浩,李义,安玉芳.乌头注射液对膝骨关节炎模型兔关节软骨细胞MMP-1、MMP-3、MMP-13的影响[J].中国中医药科技,2018, 25(3):341-343.
- [28] 董福,宋锦旗,姜楠,等.膝关节软骨早期缺损修复中的基质金属蛋白酶3抑制剂 I [J].中国组织工程研究,2016,20(15):2156-2162.
- [29] Burguera EF, Vela-Anero A, Magalhães J, et al. Effect of hydrogen sulfide sources on inflammation and catabolic markers on interleukin 1 $\beta$ -stimulated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(7): 1026-1035.