

硫化氢通过调节巨噬细胞极化促进
MC3TC - E1 细胞成骨分化的研究Research on hydrogen sulfide promoting osteogenic differentiation
of MC3TC - E1 cells by regulating macrophage polarization李梦贞¹, 何大伟^{2a}, 郝彦明^{2b},
李 翀^{2c}, 尹 毅^{2c}(1. 江苏大学 医学院, 江苏 镇江 212000;
2. 江苏大学 附属昆山医院, a. 临床实验研究中心; b. 关节外科; c. 脊柱外科, 江苏 昆山
215300)LI Meng - zhen¹, HE Da - wei^{2a},
HAO Yan - ming^{2b}, LI Chong^{2c},
YIN Yi^{2c}(1. School of Medicine, Jiangsu
University, Zhenjiang 212000, Jiangsu
Province, China; 2. a. Clinical
Experimental Research Center; b.
Department of Joint Surgery; c.
Department of Spinal Surgery, Kunshan
Hospital Affiliated to Jiangsu University,
Kunshan 215300, Jiangsu Province,
China)**基金项目:**国家重点研发计划基金资助项目
(2020YFC2006100); 江苏省社会发展
基金资助项目 (S23 - 075 -
101127); 昆山市骨质疏松性骨折防
治重点实验室基金资助项目
(KZ2023005)**作者简介:**李梦贞(2000 -), 女, 硕士研究生, 主
要从事脊柱外科和骨质疏松方向
的相关研究**通信作者:**尹毅, 主任医师, 硕士生导师
MP: 13806261052
E - mail: yy - 19723@163.com

摘要:目的 探讨硫化氢(H_2S)通过调控巨噬细胞(RAW264.7 细胞株)极化对成骨前体细胞(MC3TC - E1 细胞株)成骨分化的影响及其机制。方法 将 RAW264.7 细胞接种后分为 4 组(每组 $n = 10$), 分别为对照组(未处理)、M1 诱导组[加入 $100\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖(LPS)]、M2 诱导组(加入 $20\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 白细胞介素 - 4 + $20\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 白细胞介素 - 10, IL - 4 + IL - 10)、GY4137 干预组(H_2S 供体 GYY4137 $100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。用逆转录定量聚合酶链反应(RT - qPCR)和蛋白质印迹法(Western blot)检测包括肿瘤坏死因子 - α ($TNF - \alpha$)、白细胞介素 - 1β ($IL - 1\beta$) 和诱导型一氧化氮合酶($i - NOS$)在内的 M1 型巨噬细胞相关因子的 mRNA 及蛋白表达和包括白细胞介素 - 10 ($IL - 10$)、精氨酸酶 - 1 ($Arg - 1$) 和甘露糖受体 ($CD206$) 在内的 M2 型巨噬细胞相关因子的 mRNA 及蛋白表达, 并验证极化诱导效果及 GYY4137 的干预作用; 用细胞计数试剂盒 - 8 (CCK - 8) 实验法检测不同浓度 GYY4137 处理 RAW264.7 细胞 24 和 72 h 后的活性(每组 6 个复孔)。用流式细胞术检测对照组和 GYY4137 组($100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) M2 型标志物 $Arg - 1$ 和 $CD206$ 表达(每组 $n = 10$)。将 MC3TC - E1 细胞分为 4 组($n = 10$), 分别为空白组(无成骨诱导培养基)、成骨对照组(加成骨诱导培养基)、共培养组(与 RAW264.7 细胞 Transwell 共培养)和 GYY4137 预处理共培养组(与 $100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GYY4137 预处理的 RAW264.7 细胞共培养)。用 RT - qPCR 法检测包括 $Runx - 2$ 相关转录因子 2 ($Runx - 2$)、骨桥蛋白 (OPN)、骨形态发生蛋白 - 2 ($BMP - 2$) 和骨唾液酸蛋白 (BSP) 在内的成骨相关基因 mRNA 相对表达水平; 用碱性磷酸酶 (ALP) 染色法和茜素红染色法检测成骨分化能力。**结果** 对照组、M1 诱导组和 GYY4137 干预组的 $TNF - \alpha$ mRNA 相对表达水平分别为 1.56 ± 0.22 、 16.49 ± 3.56 和 0.57 ± 0.11 ; $IL - 1\beta$ mRNA 相对表达水平分别为 1.06 ± 0.24 、 3.37 ± 0.76 和 1.43 ± 0.34 , M1 诱导组的上述指标均显著高于对照组, GYY4137 干预组的上述指标均显著低于 M1 诱导组(均 $P < 0.001$)。GY4137 组和对照组的 $Arg - 1$ mRNA 相对表达水平分别为 1.38 ± 0.36 和 0.91 ± 0.12 ; $CD206$ mRNA 相对表达水平分别为 17.43 ± 2.84 和 1.14 ± 0.21 ; $CD206$ 蛋白相对表达水平分别为 0.89 ± 0.25 和 0.20 ± 0.04 ; $i - NOS$ 蛋白相对表达水平分别为 0.72 ± 0.19 和 0.25 ± 0.07 ; $Arg - 1$ 相对表达水平分别为 28.65 ± 3.21 和 12.31 ± 2.15 ; $CD206$ 相对表达水平分别为 31.24 ± 2.89 和 10.87 ± 1.98 , GYY4137 干预组的上述指标均显著高于对照组, 在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。GY4137 预处理共培养组和共培养组的 $Runx - 2$ mRNA 相对表达水平分别为 3.21 ± 0.45 和 1.56 ± 0.22 ; OPN mRNA 相对表达水平分别为 2.89 ± 0.38 和 1.43 ± 0.19 ; $BMP - 2$ mRNA 相对表达水平分别为 3.56 ± 0.52 和 1.67 ± 0.25 ; BSP mRNA 相对表达水平分别为 2.98 ± 0.41 和 1.51 ± 0.20 , GYY4137 预处理共培养组的上述指标均显著高于共培养组, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。GY4137 预处理共培养组和成骨对照组的 ALP 的光密度 (OD) 值分别为 (0.89 ± 0.12) 和 $(0.56 \pm 0.08)\text{ }\mu\text{m}^2$; 茜素红染色钙结节面积分别为

($2\,865.32 \pm 215.67$) 和 ($1\,568.45 \pm 189.32$) μm^2 ; GYY4137 预处理共培养组的上述指标均显著高于成骨对照组, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GYY4137 可通过促进 RAW264.7 细胞向 M2 型巨噬细胞极化, 上调成骨相关基因表达, 增强 MC3T3-E1 细胞成骨分化能力。

关键词: 硫化氢; 巨噬细胞; 极化; 成骨; 成骨前体细胞

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.17.009

中图分类号: R97 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)17-2446-07

Abstract: Objective To investigate the effect and of hydrogen sulfide (H_2S) on the osteogenic differentiation of osteoblast precursor cells (MC3T3-E1) by regulating the polarization of macrophages (RAW264.7). **Methods** RAW264.7 cells were divided into four groups ($n = 10$ in each group), including control group (untreated), M1 induction group [added with 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ lipopolysaccharide (LPS)], M2 induction group (added with 20 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ interleukin-4 + 20 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ interleukin-10, IL-4 + IL-10), GYY4137 intervention group (H_2S donor GYY4137 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression levels of M1 macrophage related factors including tumor necrosis factor- α ($\text{TNF}-\alpha$), interleukin-1 β ($\text{IL}-1\beta$) and inducible nitric oxide synthase ($i\text{-NOS}$) and M2 macrophage related factors including interleukin-10 ($\text{IL}-10$), arginase-1 ($\text{Arg}-1$) and mannose receptor ($\text{CD}206$), and to verify the effect of polarization induction and the intervention of GYY4137; cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the activity of RAW264.7 cells treated with GYY4137 at different concentrations for 24 h and 72 h (6 wells in each group). The expression levels of Arg-1 and CD206 in control group and GYY4137 group (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) were detected by flow cytometry ($n = 10$ in each group). MC3T3-E1 cells were divided into four groups ($n = 10$), which were blank group (without osteogenic induction medium), osteogenic control group (with osteogenic induction medium), co-culture group (co-cultured with RAW264.7 cells Transwell) and GYY4137 pretreatment co-culture group (co-cultured with 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GYY4137 pretreated RAW264.7 cells). The mRNA expression levels of osteogenic related genes including Runt-related transcription factor 2 ($\text{Runx}-2$), osteopontin (OPN), bone morphogenetic protein-2 ($\text{BMP}-2$) and bone sialoprotein (BSP) mRNA were detected by RT-qPCR; alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red staining were used to detect osteogenic differentiation. **Results** The relative expression levels of $\text{TNF}-\alpha$ mRNA in control group, M1 induction group and GYY4137 intervention group were 1.56 ± 0.22 , 16.49 ± 3.56 and 0.57 ± 0.11 , respectively; the relative expression levels of $\text{IL}-1\beta$ mRNA were 1.06 ± 0.24 , 3.37 ± 0.76 and 1.43 ± 0.34 , respectively. The above indexes in M1 induced group were significantly higher than those in control group, and the above indexes in GYY4137 intervention group were significantly lower than those in M1 induced group (all $P < 0.001$). The relative expression levels of Arg-1 mRNA in GYY4137 group and control group were 1.38 ± 0.36 and 0.91 ± 0.12 , respectively; the relative expression levels of CD206 mRNA were 17.43 ± 2.84 and 1.14 ± 0.21 , respectively; the relative expression levels of CD206 protein were 0.89 ± 0.25 and 0.20 ± 0.04 , respectively; the relative expression levels of $i\text{-NOS}$ protein were 0.72 ± 0.19 and 0.25 ± 0.07 , respectively; the relative expression levels of Arg-1 were 28.65 ± 3.21 and 12.31 ± 2.15 , respectively; the relative expression levels of CD206 were 31.24 ± 2.89 and 10.8 ± 1.98 , respectively. The above indexes in GYY4137 intervention group were significantly higher than those in control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.001$). The relative expression levels of $\text{Runx}-2$ mRNA in GYY4137 pretreatment and co-culture groups were 3.21 ± 0.45 and 1.56 ± 0.22 , respectively; the relative expression levels of OPN mRNA were 2.89 ± 0.38 and 1.43 ± 0.19 , respectively; the relative expression levels of $\text{BMP}-2$ mRNA were 3.56 ± 0.52 and 1.67 ± 0.25 , respectively; the relative expression levels of BSP mRNA were 2.98 ± 0.41 and 1.51 ± 0.20 , respectively. The above indexes in GYY4137 pretreatment co-culture group were significantly higher than those in co-culture group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The OD values of ALP in GYY4137 pretreatment co-culture group and osteogenic control group were (0.89 ± 0.12)

and $(0.56 \pm 0.08) \mu\text{m}^2$, respectively; the areas of alizarin red stained calcium nodules were $(2\ 865.32 \pm 215.67)$ and $(1\ 568.45 \pm 189.32) \mu\text{m}^2$, respectively; the above indexes of GYY4137 pretreatment co-culture group were significantly higher than those of osteogenic control group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$).

Conclusion $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GYY4137 can enhance the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells by promoting the polarization of RAW264.7 cells to M2 macrophages, up regulating the expression of osteogenic related genes.

Key words: hydrogen sulfide; macrophage; polarization; osteogenesis; osteogenic precursor cell

骨骼系统是一个动态组织,其不断地经历重塑过程^[1]。炎症免疫细胞在骨修复中有重要作用^[2]。在骨折的早期炎症阶段,经典活化的M1型巨噬细胞通过吞噬作用和释放出促炎性细胞因子,而在骨愈合过程的后期,交替活化的巨噬细胞则释放出一系列促再生细胞因子^[3],这些因子有助于建立一个抗炎环境,促进软骨和血管的形成。由于这2种巨噬细胞亚型在骨折愈合过程中起着关键作用,因此调节不同巨噬细胞亚型可能成为炎症性骨质流失和骨折愈合的新治疗策略。研究表明,骨髓间充质干细胞能够内源性产生硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S),并通过调控钙离子通道来调节自身的自我更新和成骨分化能力^[4]。此外, H_2S 还能够调节巨噬细胞的极化状态^[5],影响M1型和M2型巨噬细胞之间的动态平衡。本研究旨在探讨 H_2S 通过调控巨噬细胞极化促进MC3T3-E1细胞成骨分化的影响。

材料与方法

1 材料

细胞 RAW264.7细胞株和MCE3T3-E1细胞株,均由江苏大学附属昆山医院骨科实验室细胞库保存。

药品与试剂 GYY4137(H_2S 供体),规格:每瓶10 mg,批号:106740-09-4,购自美国Selleck公司;DMEM高糖培养基、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)、胰酶和青霉素-链霉素混合溶液(penicillin-streptomycin, PS),均购自美国Gibico公司;胎牛血清,购自德国Merck Millipore公司;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8),购自北京Biosharp公司;RNA提取试剂盒、Matrigel胶、反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒,均购自南京Vazyme公司;引物,购自苏州金唯智生物科技有限公司;鼠抗诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, i-NOS)抗体、鼠抗甘露糖受体C型1(mannose receptor

C-type 1, CD206)抗体,均购自美国Abcam公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色试剂盒,购自上海碧云天生物科技有限公司;茜素红染色试剂,购自北京索莱宝生物科技有限公司;白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)和IL-13蛋白,均购自南京近岸蛋白质科技有限公司;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),购自上海源叶生物科技有限公司。

2 实验方法

2.1 细胞培养

RAW264.7细胞及MCE3T3细胞均用含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM高糖培养基培养于5% CO_2 、37℃恒温恒湿的培养箱中。

2.2 CCK-8法检测细胞活性^[6]

将RAW264.7细胞以每孔4 000个接种于96孔板,每孔200 μL ;次日观察细胞状态,待细胞贴壁后吸除上清液,添加不同浓度梯度的含GYY4137试剂的培养基,浓度梯度为0、50、100、200、400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,每组设置6个复孔,继续培养24 h及72 h后将含GYY4137的培养基吸除,加入200 μL CCK-8工作液(培养基与CCK-8检测液体积比9:1混合),避光孵育30 min;多功能酶标仪检测各孔450 nm处光密度(optical density, OD)值。

2.3 细胞分组与处置方法

①将RAW264.7细胞以每孔 5×10^4 个的密度接种于6孔板,待细胞密度达到约70%后,诱导巨噬细胞不同表型。用LPS($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)处理为M1诱导组,用IL-4+IL-10(各 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)处理为M2诱导组,将对照组(未行任何处理)与M1及M2组进行对比,验证M1及M2的成功诱导。②取MCE3T3细胞以每孔 4×10^4 个密度铺于6孔板中,待细胞贴壁后置入Transwell小室,设空白组(无成骨诱导培养基)、成骨对照组(加成骨诱导培养基)、共培养组(与RAW264.7细胞Transwell共培养)、GYY4137预处理共培养组(与 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GYY4137预处理的RAW264.7细胞共培养),提取细胞总RNA用于RT-PCR检测;提取细胞总蛋白质用于蛋白质印迹法(Western blot, WB)检测。

2.4 RT-qPCR 法检测细胞 RNA^[7]

用 RNA 提取试剂盒提取 RAW264.7 细胞和 MCE3T3 细胞的 RNA,用逆转录试剂盒行逆转录得到对应 cDNA;配制 20 μL PCR 反应体系,振荡混匀离心后置于 PCR 仪中,反应程序为恒温段 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,循环段 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s 共计循环 40 次。

2.5 蛋白免疫印迹法检测各组蛋白表达^[8]

蛋白裂解液充分裂解 RAW264.7 细胞;吸取总蛋白置于 EP 管中,以 $1.0 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,取上清液;BCA 法测定蛋白浓度;100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 8 min;配制 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离胶,泳道中加入蛋白样本,60 V 电泳 30 min,120 V 电泳 1 h;300 mA 转膜 90 min 将蛋白转至聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜;5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱封闭过夜;次日用含吐温-20 的 Tris 盐酸缓冲液 (Tris-buffered saline with Tween-20, TBST) 室温洗膜 3 次,每次 10 min,一抗 (i-NOS 抗体、CD206 抗体均 1:2 000 稀释、GAPDH 抗体 1:1.0 $\times 10^4$ 稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜;次日 TBST 室温洗膜 3 次,每次 10 min,室温摇床二抗 (1:1.0 $\times 10^4$ 稀释) 1 h;TBST 室温洗膜 3 次;ECL 发光液显影,以 GAPDH 作为对照,用 Image J 5.0 软件对各组蛋白表达进行相对定量及灰度分析。

2.6 流式细胞术检测细胞极化^[9]

细胞处理结束后吸除培养基,用 PBS 清洗 1 次,将细胞消化后转移至离心管,以 $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清;用细胞染色 buffer 离心洗涤 2 次;用 PBS 调整细胞浓度至 $1.0 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 后再次离心,弃上清;胞内抗体染色管仅需加入 1 $\times$ Permeabilization Working Solution 200 μL 重悬细胞;对应的单染管、全染管加入相应的抗体 5 μL 混匀,室温避光孵育 30 min;需破膜抗体染色管加入 Cell Staining Buffer 2 mL,以 $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清;加入 Cell Staining Buffer 200 μL 重悬细胞;加入 Fixation Buffer 200 μL 混匀,室温避光孵育 30 ~ 60 min;加入 1 $\times$ Permeabilization Working Solution 1 mL,以 $8\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清,加入 1 $\times$ Permeabilization Working Solution 200 μL 重悬细胞;对应的单染管、全染管加入相应的抗体 5 μL 混匀,室温避光孵育 30 min;胞内抗体及需破膜抗体避光孵育完成后加入细胞染色 buffer 重悬细胞,以 $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心细胞悬液 5 min,弃掉上清;加入细胞

染色 buffer 200 μL 重悬细胞,用流式细胞仪进行检测和分析。

2.7 成骨分化实验检测成骨细胞分化^[10]

100 mM 塞米松 2.5 μL 、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抗坏血酸 200 μL 、10 mM β -甘油磷酸钠 500 μL 、1% 双抗 500 μL 、10% 胎牛血清 5 mL、DMEM 高糖培养基 (补充至总体为 50 mL),过滤除菌后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将对数期 MC3T3-E1 细胞以每孔 4×10^4 个接种于 Transwell 16 孔板下室,贴壁后分 4 组:空白组用普通培养基,成骨对照组用诱导培养基,共培养组及 GYY4137 预处理共培养组下室用诱导培养基,上室分别接种常规或预处理的 RAW264.7 细胞。细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境培养,每 2 天换液,培养 3 天或 7 天。结束后通过 ALP 染色、茜素红染色及 RT-qPCR 检测成骨相关基因,评估分化效。

2.8 ALP 染色法检测细胞分泌^[11]

将 MC3TC-E1 细胞接种于 Transwell 6 孔板,各组细胞加入成骨诱导培养基诱导培养 3 d,后吸除培养基上清液,用 PBS 洗涤 3 次,加入 4% 多聚甲醛 1 mL 固定 30 min,吸除固定液,加入染色工作液 1 mL,避光置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中孵育过夜后观察染色结果,若出现蓝紫色沉淀,则表明细胞分泌的 ALP 与染色充分结合。

2.9 茜素红染色法检测钙盐沉积^[12]

将 MC3TC-E1 细胞接种于 Transwell 24 孔板,各组加入成骨诱导培养基成骨诱导培养 7 天,后吸除培养基上清液,用 PBS 洗涤 3 次,加入 4% 多聚甲醛 1 mL 固定 30 min,加入茜素红染色工作液 1 mL 常温避光孵育 30 min 后置于荧光显微镜下观察钙盐沉积情况,镜下出现深红色钙化结节,提示钙盐沉积。

3 统计学处理

用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较用独立样本 t 检验。

结 果

1 细胞培养

RAW264.7 细胞及 MC3T3-E1 细胞在含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 高糖培养基中,于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿培养箱内培养,细胞贴壁生长良好,传代后 24 h 贴壁率达 90% 以上,72 h 细胞密度可达到 70% ~ 80%,符合后续实验细胞状态要求 (每组样本量均为 10)。

2 GYY4137 对 RAW264.7 细胞活性的影响

用 CCK-8 实验法检测不同浓度 GYY4137 处理 RAW264.7 细胞 24 和 72 h 后的活性,每组设置 6 个复孔,重复 3 次实验。当 GYY4137 浓度 $\geq 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞活性显著下降 ($P < 0.05$),故后续实验选用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GYY4137,见表 1。

3 GYY4137 对 $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-1\beta$ 、 $\text{IL}-10$ 、 $\text{Arg}-1$ 和 CD206 mRNA 表达的影响

RT-qPCR 结果显示: M1 诱导组的 M1 型标志物 ($\text{TNF}-\alpha$ 和 $\text{IL}-1\beta$) mRNA 相对表达水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.001$); M₂ 诱导组和 GYY4137 干预组的 M2 型标志物 ($\text{IL}-10$ 、 $\text{Arg}-1$ 和 CD206) mRNA 相对表达水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.001$),见表 2。

4 GYY4137 对 CD206 和 i-NOS 蛋白表达的影响

蛋白质印迹法检测巨噬细胞极化相关蛋白相对表达水平显示: M1 诱导组、M2 诱导组和 GYY4137 干预组的 CD206 和 i-NOS 蛋白相对表达水平均显著高于对照组 (均 $P < 0.05$), M2 诱导组和 GYY4137 干预组的 CD206 和 i-NOS 蛋白相对表达水平均显著高于

M1 诱导组 (均 $P < 0.05$),见表 3。

5 GYY4137 对 $\text{Arg}-1$ 和 CD206 表达的影响

流式细胞术检测 GYY4137 对巨噬细胞 M2 标志物表达的影响显示:对照组和 GYY4137 组的 $\text{Arg}-1$ 相对表达水平分别为 12.31 ± 2.15 和 28.65 ± 3.21 ; CD206 的相对表达水平分别为 10.87 ± 1.98 和 31.24 ± 2.89 。GYY4137 组的 M2 巨噬细胞 $\text{Arg}-1$ 和 CD206 的相对表达水平均显著高于对照组 (均 $P < 0.05$)。

6 GYY4137 预处理巨噬细胞对 $\text{Runx}-2$ 、 OPN 、 $\text{BMP}-2$ 和 BSP 表达的影响

共培养 3 天后, GYY4137 预处理共培养组的 Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, $\text{Runx}-2$)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, $\text{BMP}-2$)、骨唾液酸蛋白 (bone sialoprotein, BSP) mRNA 相对表达水平均显著高于空白组、成骨对照组及未使用 GYY4137 处理的巨噬细胞共培养组 (均 $P < 0.05$),见表 4。

表 1 GYY4137 处理不同时间对 RAW264.7 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of cell activity of effect of RAW264.7 treated by GYY4137 for different time ($\bar{x} \pm s$)

Concentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	<i>n</i>	Cultured 24 h	Cultured 72 h
0	6	0.80 ± 0.12	0.78 ± 0.10
50	6	0.82 ± 0.20	0.80 ± 0.15
100	6	0.88 ± 0.27	0.85 ± 0.22
200	6	0.54 ± 0.13 *	0.51 ± 0.11 *
400	6	0.40 ± 0.08 *	0.37 ± 0.09 *

Compared with 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, * $P < 0.05$.

表 2 GYY4137 对肿瘤坏死因子- α ($\text{TNF}-\alpha$)、白细胞介素- 1β ($\text{IL}-1\beta$)、白细胞介素-10 ($\text{IL}-10$)、精氨酸酶-1 ($\text{Arg}-1$) 和甘露糖受体 (CD206) mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of effects of GYY4137 on the mRNA relative expression levels of tumor necrosis factor- α ($\text{TNF}-\alpha$), interleukin- 1β ($\text{IL}-1\beta$), interleukin-10 ($\text{IL}-10$), arginase-1 ($\text{Arg}-1$) and mannose receptor (CD206) ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	$\text{TNF}-\alpha$	$\text{IL}-1\beta$	$\text{IL}-10$	$\text{Arg}-1$	CD206
Control	10	1.56 ± 0.22	1.06 ± 0.24	1.11 ± 0.19	0.91 ± 0.12	1.14 ± 0.21
M1 induction	10	16.49 ± 3.56 ***	3.37 ± 0.76 *	1.04 ± 0.17	0.74 ± 0.27	2.36 ± 0.45
M2 induction	10	0.62 ± 0.15	0.89 ± 0.21	6.12 ± 1.35 ***	1.56 ± 0.38 *	18.25 ± 3.12 ***
GYY4137 intervention	10	0.57 ± 0.11	1.43 ± 0.34	5.36 ± 1.24 ***	1.38 ± 0.36 *	17.43 ± 2.84 ***

Control group: Untreated; M1 induction group: Added with $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ lipopolysaccharide (LPS); M2 induction group: Added with $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ interleukin-4 + $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ interleukin-10; GYY4137 intervention group: H_2S donor, concentration gradient $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Compared with control group,

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

表 3 GYY4137 对 CD206 和诱导一氧化氮合酶 (i-NOS) 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of effects of GYY4137 on CD206 and inducible nitric oxide synthase (i-NOS) protein relative expression levels ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	CD206	i-NOS
Control	10	0.20 ± 0.04	0.25 ± 0.07
M1 induction	10	0.37 ± 0.06 *	0.42 ± 0.10 *
M2 induction	10	0.71 ± 0.13 **	0.68 ± 0.14 **
GYY4137 intervention	10	0.89 ± 0.25 **	0.72 ± 0.19 **

Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with M1 induction group, # $P < 0.001$.

表 4 GYY4137 预处理巨噬细胞对 Runt 相关转录因子 2 (*Runx-2*)、古桥蛋白 (*OPN*)、骨形态发生蛋白-2 (*BMP-2*) 和骨唾液酸蛋白 (*BSP*) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of 5 GYY4137 pretreatment on the expression of *Runx-2*, *OPN*, *BMP-2*, and *BSP* in macrophages ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	<i>Runx-2</i>	<i>OPN</i>	<i>BMP-2</i>	<i>BSP</i>
Blank	10	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.11
Osteogenic control	10	2.15 ± 0.32	1.98 ± 0.28	2.36 ± 0.35	2.05 ± 0.29
Co-culture	10	1.56 ± 0.22	1.43 ± 0.19	1.67 ± 0.25	1.51 ± 0.20
GYY4137 pretreatment co-culture	10	3.21 ± 0.45 ^{*#Δ}	2.89 ± 0.38 ^{*#Δ}	3.56 ± 0.52 ^{*#Δ}	2.98 ± 0.41 ^{*#Δ}

Runx-2: Runt-related transcription factor 2; *OPN*: Osteopontin; *BMP-2*: Bone morphogenetic protein-2; *BSP*: Bone sialoprotein; Blank group: Without osteogenic induction medium; Osteogenic control group: With osteogenic induction medium; Co-culture group: Co-cultured with RAW264.7 cells Transwell; GYY4137 pretreatment co-culture group: Co-cultured with 100 μmol · L⁻¹ GYY4137 pretreated RAW264.7 cells; Compared with control group, ^{*}*P* < 0.05; Compared with osteogenic control group, [#]*P* < 0.05; Compared with co-culture group, ^Δ*P* < 0.05.

7 GYY4137 预处理巨噬细胞对 ALP 染色吸光度值和茜素红染色钙结节面积的影响

空白组、成骨对照组、共培养组和 GYY4137 预处理共培养组的 ALP 染色吸光度值和茜素红染色钙结节面积比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05)。GYY4137 预处理共培养组共培养 3 天后的 ALP 染色吸光度值、茜素红染色钙结节面积均显著高于空白组、成骨对照组及未使用 GYY4137 处理的巨噬细胞共培养组(*P* < 0.05),见表 5。

表 5 GYY4137 预处理巨噬细胞对碱性磷酸酶 (ALP) 染色光密度值和茜素红染色钙结节面积的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of GYY4137 pretreatment on ALP staining optical density and alizarin red staining calcium nodule area of macrophages ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	ALP staining optical density (405 nm)	Alizarin red staining calcium nodule area (μm ²)
Blank	10	0.32 ± 0.06	526.35 ± 89.42
Osteogenic control	10	0.56 ± 0.08	1 568.45 ± 189.32
Co-culture	10	0.48 ± 0.07	1 256.78 ± 156.21
GYY4137 pretreatment Co-culture	10	0.89 ± 0.12 ^{*#Δ2}	865.32 ± 215.67 ^{*#Δ}

ALP: Alkaline phosphatase; Compared with control group, ^{*}*P* < 0.05; Compared with osteogenic control group, [#]*P* < 0.05; Compared with co-culture group, ^Δ*P* < 0.05.

讨 论

H₂S 是一种重要的气体信号分子,由半胱氨酸合成酶 (cystathionine-β-synthase, CBS)、半胱氨酸裂解酶 (cystathionine γ-lyase, CSE) 和半胱氨酸转氨酶等酶内源性合成^[13-14],在多种生理过程中发挥作

用,包括维持内环境稳定、调节血管收缩、促进和抑制炎症反应、促进和抑制细胞凋亡以及抗氧化等^[15]。近来有研究显示 H₂S 具有免疫调节作用,特别是与炎症反应有关^[16-17]。

研究表明,巨噬细胞通过分泌细胞因子、调节其他细胞类型以及吞噬老化或受损细胞等多种机制,对骨修复过程产生影响^[18-20]。不同亚型的巨噬细胞在骨修复中发挥着不同的作用,在骨组织受损时,巨噬细胞通过分泌细胞因子、趋化因子和生长因子,启动成纤维细胞、间充质干细胞和骨祖细胞的募集和修复^[2]。同时,巨噬细胞衍生的炎症介质和生长因子引导这些细胞的增殖、分化和细胞外基质的产生,从而在组织修复和再生中发挥重要作用。巨噬细胞具有高度的可塑性,能够根据外界刺激改变自身表型,以适应不同的免疫状态和炎症环境^[21-22]。

巨噬细胞存在 2 种活化状态:经典活化的巨噬细胞 (M1 表型) 和交替活化的巨噬细胞 (M2 表型)^[8,10,15]。巨噬细胞的表型转变取决于周围微环境,在干扰素 γ (interferon-γ, IFN-γ) 或亚刺激浓度的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的作用下,巨噬细胞倾向于 M1 表型的活化,分泌高水平的促炎性因子^[1,4,6,11,14-15]。M1 状态下的巨噬细胞能够有效地杀死细菌,但也可能与促炎性细胞因子的产生、器官损伤和组织损伤有关。相比之下,M2 型巨噬细胞在 2 型辅助性 T 细胞 (Th2 细胞) 产生的 IL-13 和 IL-4 的诱导下,分泌大量转化生长因子 β (transforming growth factor-β, TGF-β)、抗炎因子 IL-10、精氨酸酶 1 (arginase-1, Arg-1) 以及高表达膜蛋白 CD206^[6,11,14-16,21],这与组织修复和抗炎细胞因子的分泌密切相关。越来越多的证据表明^[2-4,22],巨噬细胞在骨修复过程中发挥着核心作用。

与其他组织再生不同,巨噬细胞参与了骨损伤、

愈合和再生的各个阶段。研究表明,在损伤区域所发生的骨修复的所有阶段都存在巨噬细胞的增加,特别是M2状态的巨噬细胞可能促进骨修复^[4,21]。因此,调控巨噬细胞的活化状态可能为骨修复提供适宜的免疫微环境,从而促进成骨。 H_2S 与巨噬细胞的活化和炎症体形成密切相关,参与巨噬细胞的凋亡、黏附、趋化和极化过程^[23]。GY4137作为一种新型的 H_2S 控释供体,相比传统的硫化氢钠(sodium hydrosulfide, NaHS)供体来讲,具有更低的毒性或药物不良反应,能够在体内缓慢而持续地释放 H_2S 。在本研究中,在LPS诱导M1型巨噬细胞的基础上增加GY4137后,M1型巨噬细胞相关炎症因子被抑制,表明GY4137可能抑制巨噬细胞M1表型的转化。为了验证成骨能力,我们将GY4137预处理的巨噬细胞与MC3T3-E1细胞在Transwell系统中培养,结果表明, H_2S 预处理的巨噬细胞促进了骨矿化,并增加了成骨细胞分化调节因子的表达。

本研究提示: H_2S 通过调节巨噬细胞M2极化来促成骨,为调控骨免疫微环境以进一步促进骨修复提供了理论和实验依据。

参考文献:

- [1] MICHALSKI M N, MCCAULEY L K. Macrophages and skeletal health[J]. *Pharmacol & Therapeut*, 2017, 174(6): 43—54.
- [2] YANG N, LIU Y. The role of the immune microenvironment in bone regeneration[J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18(16): 3697—3707.
- [3] SHIN R L, LEE C, SHEN O Y, et al. The crosstalk between mesenchymal stem cells and macrophages in bone regeneration: A systematic review[J]. *Stem Cells Int*, 2021, 14(6): 1—21.
- [4] ZHANG H, DU J, HUANG Y, et al. Hydrogen sulfide regulates macrophage function in cardiovascular diseases[J]. *Antioxid & Redox Sign*, 2023, 38(1—3): 45—56.
- [5] DILEK N, PAPAPETROPOULOS A, TOLIVER—KINSKY T, et al. Hydrogen sulfide: An endogenous regulator of the immune system[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161(11): 105119.
- [6] 从小凡, 陈腾, 李硕, 等. 双氢青蒿素通过促进活性氧的产生增强鼻咽癌细胞对顺铂诱导凋亡的敏感性[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(8): 1553—1560.
- [7] 梁俟, 胡志琴, 温艺红, 等. 环状RNA circ_0120051通过miR-144-3p/IDH2轴抑制心肌成纤维细胞的纤维化表型研究[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2024, 45(2): 196—205.
- [8] 郭金花, 赵君. 子宫内癌组织中SWI和SNF蛋白表达及临床意义[J]. *检验医学与临床*, 2024, 21(14): 2107—2111.
- [9] 王学文, 刘慧, 王倩, 等. 甘草酸二钾通过调节巨噬细胞极化促进皮肤修复[J]. *日用化学工业(中英文)*, 2024, 54(11): 1355—1361.
- [10] 张岚, 谭静怡. 原代成骨细胞来源胞外囊泡促进破骨细胞分化[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2024, 53(4): 434—442.
- [11] 许敏, 吴婷婷, 何家才. β -TCP作用T淋巴细胞后调控BMSCs成骨分化的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(8): 1168—1173.
- [12] 张好, 王翠竹, 皇甫慧敏, 等. 20(S)-原人参二醇对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2023, 49(4): 867—874.
- [13] WANG X L, PAN L L, LONG F, et al. Endogenous hydrogen sulfide ameliorates noxX4 induced oxidative stress in LPS-stimulated macrophages and mice[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(2): 458—474.
- [14] ZHUANG R, GUO L, DU J, et al. Exogenous hydrogen sulfide inhibits oral mucosal wound-induced macrophage activation via the NF- κ B pathway[J]. *Oral Diseases*, 2018, 24(5): 793—801.
- [15] CHEN Y, CAO W, LI B, et al. The potential role of hydrogen sulfide in regulating macrophage phenotypic changes via pink1/parkin-mediated mitophagy in sepsis-related cardiorenal syndrome[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2024, 46(2): 139—151.
- [16] KUMAR M, ARORA P, SANDHIR R. Hydrogen sulfide reverses LPS-induced behavioral deficits by suppressing microglial activation and promoting M2 polarization[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2021, 16(2): 483—499.
- [17] ZHAO L, LIU X, ZHANG J, et al. Hydrogen sulfide alleviates skeletal muscle fibrosis via attenuating inflammation and oxidative stress[J]. *Front Physiol*, 2020, 18(11): 533690.
- [18] JIN L, GUO X, GAO D, et al. An NIR photothermal-responsive hybrid hydrogel for enhanced wound healing[J]. *Bioactive Materials*, 2022, 10(16): 162—172.
- [19] KAUR S, RAGGATT L J, BATOON L, et al. Role of bone marrow macrophages in controlling homeostasis and repair in bone and bone marrow niches[J]. *Semin Cell & Dev Biol*, 2017, 61(1): 12—21.
- [20] YAO Y, CAI X, REN F, et al. The macrophage-osteoclast axis in osteoimmunity and osteo-related diseases[J]. *Front Immunol*, 2021, 12(31): 664871.
- [21] SCHLUNDT C, FISCHER H, BUCHER C H, et al. The multifaceted roles of macrophages in bone regeneration: A story of polarization, activation and time[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 133(1): 46—57.
- [22] MICHALSKI M N, KOH A J, WEIDNER S, et al. Modulation of osteoblastic cell efferocytosis by bone marrow macrophages[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(12): 2697—2706.
- [23] YANG R, LIU Y, SHI S. Hydrogen sulfide regulates homeostasis of mesenchymal stem cells and regulatory T cells[J]. *J Dent Res*, 2016, 95(13): 1445—1451.

(收稿日期 2025-01-25)