

# 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

潘利平<sup>1</sup>, 曹永平<sup>1 $\Delta$</sup> , 文立成<sup>1</sup>, 柴卫兵<sup>1</sup>, 杜军保<sup>2</sup>, 金红芳<sup>2</sup>, 柳佳<sup>2</sup>, 杨昕<sup>1</sup>, 孟志超<sup>1</sup>, 刘恒<sup>1</sup>, 崔云鹏<sup>1</sup>, 王瑞<sup>1</sup>, 吴浩<sup>1</sup>, 周星彤<sup>1</sup>, 李翔<sup>1</sup>, 李卓扬<sup>1</sup>, 塔拉提百克·买买提居马<sup>1</sup>

(北京大学第一医院 1. 骨科, 2. 儿科, 北京 100034)

**[摘要]** **目的:** 研究关节液及关节软骨中硫化氢(hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)及其合成酶的含量和变化, 以及 H<sub>2</sub>S 对白介素 1 $\beta$ (interlukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )诱导的软骨细胞人基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase 13, MMP-13)表达的影响。**方法:** 收集在北京大学第一医院行膝关节手术(关节镜手术或膝关节置换术)患者的关节液及废弃的关节软骨, 用亚甲基蓝法检测关节液 H<sub>2</sub>S 的含量; 从废弃的关节软骨中分离出相对正常的软骨细胞, 用 H<sub>2</sub>S 分子探针方法检测软骨细胞中的内源性 H<sub>2</sub>S, 用免疫细胞化学方法检测软骨细胞中 H<sub>2</sub>S 合成酶胱硫醚- $\beta$ -合成酶(cystathionine beta-synthase, CBS)、胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶(cystathionine gamma-lyase, CSE)、巯基丙酮酸硫转移酶(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, MPST); 用 Western blot 法检测 H<sub>2</sub>S 合成酶 CBS、CSE、MPST 在不同退变程度的软骨组织中的含量。培养相对正常的人软骨细胞至第三代, 分为 4 组: (1) 对照组: 不加任何药物; (2) IL- $\beta$  组: 单加 5  $\mu$ g/L 的 IL-1 $\beta$ ; (3) IL-1 $\beta$  + H<sub>2</sub>S 组: 提前 0.5 h 加 200  $\mu$ mol/L 的 NaHS, 再加 5  $\mu$ g/L 的 IL-1 $\beta$ ; (4) H<sub>2</sub>S 组: 单加 200  $\mu$ mol/L 的 NaHS。Western blot 法检测各组细胞 MMP-13 蛋白、总核因子  $\kappa$ B p65(nuclear factor  $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p65)及磷酸化 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的含量, Real-time PCR 检测各组细胞 MMP-13 基因的转录情况。**结果:** 退变膝关节的关节液中 H<sub>2</sub>S 含量为(14.3  $\pm$  3.3)  $\mu$ mol/L, Outerbridge 分级 3 级软骨组织中 CSE 表达量显著高于 Outerbridge 分级 1 级软骨组织中的表达量(1.67  $\pm$  0.09 vs. 1.26  $\pm$  0.11,  $P$  < 0.01), 而 CBS 与 MPST 的表达量差异无统计学意义( $P$  > 0.05)。IL-1 $\beta$  组 MMP-13 的表达较正常对照组明显升高, 且差异具有统计学意义(1.87  $\pm$  0.67 vs. 0.22  $\pm$  0.10,  $P$  < 0.05), IL-1 $\beta$  + H<sub>2</sub>S 组 MMP-13 的表达较 IL-1 $\beta$  组明显降低, 且差异具有统计学意义(0.55  $\pm$  0.11 vs. 1.87  $\pm$  0.67,  $P$  < 0.05), H<sub>2</sub>S 组 MMP-13 的表达较正常对照组差异无统计学意义。Real-time PCR 方法测量了药物干预实验中各组细胞 MMP-13 基因转录情况, 结果显示 IL-1 $\beta$  组 MMP-13 基因转录较正常对照组明显升高, 且差异具有统计学意义(31.40  $\pm$  0.31 vs. 1.00  $\pm$  0.00,  $P$  < 0.05), IL-1 $\beta$  + H<sub>2</sub>S 组 MMP-13 基因转录较 IL-1 $\beta$  组明显降低, 且差异具有统计学意义(24.41  $\pm$  1.28 vs. 31.40  $\pm$  0.31,  $P$  < 0.05), H<sub>2</sub>S 组 MMP-13 基因转录较正常对照组无显著性变化。IL-1 $\beta$  组总 p65 含量较正常对照组明显升高, 且差异具有统计学意义(2.13  $\pm$  0.08 vs. 0.73  $\pm$  0.08,  $P$  < 0.05), IL-1 $\beta$  + H<sub>2</sub>S 组总 p65 含量较 IL-1 $\beta$  组明显降低, 且差异具有统计学意义(1.24  $\pm$  0.13 vs. 2.13  $\pm$  0.08,  $P$  < 0.05), H<sub>2</sub>S 组总 p65 含量较正常对照组无显著性变化; IL-1 $\beta$  组磷酸化 p65 含量较正常对照组明显升高, 且差异具有统计学意义(1.30  $\pm$  0.13 vs. 0.19  $\pm$  0.04,  $P$  < 0.05), IL-1 $\beta$  + H<sub>2</sub>S 组磷酸化 p65 含量较 IL-1 $\beta$  组明显降低, 且差异具有统计学意义(0.92  $\pm$  0.26 vs. 1.30  $\pm$  0.13,  $P$  < 0.05), H<sub>2</sub>S 组磷酸化 p65 含量较正常对照组无显著性变化。**结论:** H<sub>2</sub>S 参与了软骨退变, 起到部分抑制细胞外基质降解酶 MMP-13 的作用, 从而实现对软骨细胞外基质的保护。

**[关键词]** 硫化氢; 骨关节炎; 基质金属蛋白酶 13; 软骨疾病

**[中图分类号]** R681.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2016)02-0194-09

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-167X.2016.02.003

## Hydrogen sulfide in cartilage and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase 13 expression in chondrocytes induced by interleukin-1 $\beta$

PAN Li-ping<sup>1</sup>, CAO Yong-ping<sup>1 $\Delta$</sup> , WEN Li-cheng<sup>1</sup>, CHAI Wei-bing<sup>1</sup>, DU Jun-bao<sup>2</sup>, JIN Hong-fang<sup>2</sup>, LIU Jia<sup>2</sup>, YANG Xin<sup>1</sup>, MENG Zhi-chao<sup>1</sup>, LIU Heng<sup>1</sup>, CUI Yun-peng<sup>1</sup>, WANG Rui<sup>1</sup>, WU Hao<sup>1</sup>, ZHOU Xing-tong<sup>1</sup>, LI Xiang<sup>1</sup>, LI Zhuo-yang<sup>1</sup>, TALATIBAIKE · Mai-mai-ti-ju-ma<sup>1</sup>

(1. Department of Orthopedics, 2. Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate whether endogenous hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) was involved in the pathogenesis of osteoarthritis (OA) and its underlying mechanism, to detect H<sub>2</sub>S and its synthases ex-

$\Delta$  Corresponding author's e-mail, freehorse66@163.com

网络出版时间:2016-3-15 8:54:15 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20160315.0854.002.html>

pression in knee cartilage in patients diagnosed with different severity of OA, and to explore the transcription and expression of gene MMP-13 in chondrocytes treated with IL-1 $\beta$  or H<sub>2</sub>S. **Methods:** Synovial fluids of the in-patients with different severity of OA hospitalized in Peking University First Hospital were collected for measurement of H<sub>2</sub>S content using methylene blue assay. Articular cartilages of the patients who underwent knee arthroplasty were collected for the cell culture of relatively normal chondrocytes. The chondrocytes were cultured to the P3 generation and H<sub>2</sub>S molecular probes were used for detection of endogenous H<sub>2</sub>S generation in the chondrocytes. Immunocytochemistry was used to detect the localization of H<sub>2</sub>S synthases including cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS), cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE), and mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST) in OA chondrocytes. Western blot was used to quantify the protein expressions of CSE, MPST, and CBS in cartilage tissues of the patients who were diagnosed with OA and underwent knee arthroplasty. The relatively normal human chondrocytes were cultured to passage 3 and then divided into 4 groups for different treatments: (1) the normal control group, no reagent was added; (2) the IL-1 $\beta$  group, 5  $\mu$ g/L of IL-1 $\beta$  was added; (3) the IL-1 $\beta$  + H<sub>2</sub>S group, 200  $\mu$ mol/L of NaHS was added 30 min before adding 5  $\mu$ g/L of IL-1 $\beta$ ; (4) the H<sub>2</sub>S group, 200  $\mu$ mol/L of NaHS was added. The transcription and expression of gene MMP-13 in chondrocytes of each group were determined with Real-time PCR and Western blot, respectively. And the total NF- $\kappa$ B p65 and phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 in chondrocytes were detected with Western blot. **Results:** The content of H<sub>2</sub>S in the synovial fluid of degenerative knee was (14.3  $\pm$  3.3)  $\mu$ mol/L. Expressions of endogenous H<sub>2</sub>S and its synthases including CBS, CSE and MPST were present in the cytoplasm of chondrocytes. CSE protein expression in Grade 3 (defined by outerbridge grading) cartilage tissues was significantly increased as compared with that of Grade 1 cartilage tissues (1.67  $\pm$  0.09 *vs.* 1.26  $\pm$  0.11,  $P < 0.05$ ). However, no significant difference of CBS or MPST expression among the different groups was observed. The expression of MMP-13 protein in the IL-1 $\beta$  group was significantly higher than that in the normal chondrocytes (1.87  $\pm$  0.67 *vs.* 0.22  $\pm$  0.10,  $P < 0.05$ ), and that in the IL-1 $\beta$  + H<sub>2</sub>S group was significantly decreased than that in the IL-1 $\beta$  group (0.55  $\pm$  0.11 *vs.* 1.87  $\pm$  0.67,  $P < 0.05$ ), and that in the H<sub>2</sub>S group had no significant difference compared with that in the normal control group. The transcription of MMP-13 protein in the IL-1 $\beta$  group was significantly higher than that in the normal chondrocytes (31.40  $\pm$  0.31 *vs.* 1.00  $\pm$  0.00,  $P < 0.05$ ), and that in the IL-1 $\beta$  + H<sub>2</sub>S group was significantly decreased than that in the IL-1 $\beta$  group (24.41  $\pm$  1.28 *vs.* 31.40  $\pm$  0.31,  $P < 0.05$ ), and that in the H<sub>2</sub>S group had no significant difference compared with that in the normal control group. The total NF- $\kappa$ B p65 in the IL-1 $\beta$  group was significantly higher than that in the normal chondrocytes (2.13  $\pm$  0.08 *vs.* 0.73  $\pm$  0.08,  $P < 0.05$ ), and that in the IL-1 $\beta$  + H<sub>2</sub>S group was significantly decreased than that in the IL-1 $\beta$  group (1.24  $\pm$  0.13 *vs.* 2.13  $\pm$  0.08,  $P < 0.05$ ), and that in the H<sub>2</sub>S group had no significant difference compared with that in the normal control group. The phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 in IL-1 $\beta$  group was significantly higher than that in the normal chondrocytes (1.30  $\pm$  0.13 *vs.* 0.19  $\pm$  0.04,  $P < 0.05$ ), and that in IL-1 $\beta$  + H<sub>2</sub>S group was significantly decreased than that in the IL-1 $\beta$  group (0.92  $\pm$  0.26 *vs.* 1.30  $\pm$  0.13,  $P < 0.05$ ), and that in the H<sub>2</sub>S group had no significant difference compared with that in the normal control group. **Conclusion:** H<sub>2</sub>S affected the cartilage degeneration by partly inhibiting the degradation of extracellular matrix.

**KEY WORDS** Hydrogen sulfide; Osteoarthritis; Matrix metalloproteinase 13; Cartilage diseases

退行性骨关节病(osteoarthritis, OA)是一种导致膝关节疼痛和功能障碍的退行性疾病,是60岁以上人群丧失劳动能力的主要原因之一<sup>[1]</sup>。关节软骨退变是OA的主要特点之一,目前尚没有一种能够治愈OA的方法,终末期OA患者往往只能通过膝关节置换术来改善关节功能以提高生活质量。

既往研究表明,OA软骨退变的病理机制主要为软骨细胞的凋亡和细胞外基质的降解<sup>[2]</sup>,且该软骨退变过程与炎症密切相关。Lee等<sup>[3]</sup>总结了一系列炎症因子[如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF),白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8,信号通路传导介质核因子- $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p65),细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase 1/2, ERK 1/2), p38, c-jun N端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK), Toll样受体及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,

MMP)-1、3、9、13,带有血小板凝血酶敏感蛋白样模体的解整链蛋白金属蛋白酶-4、5等]在OA发病过程中发挥的重要作用,其中,炎症因子IL-1 $\beta$ 等可引起软骨细胞凋亡及细胞外MMP的表达,从而引起细胞外基质的降解,最终导致软骨退变,进而出现膝关节疼痛及功能障碍。

硫化氢(hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)后在体内发现的第3个气体信号分子。近年的研究表明,H<sub>2</sub>S是重要的炎症调节因子,并参与蛋白修饰、调节离子通道、抗凋亡、抗氧化等代谢过程,且广泛地存在于人体各个组织,在心脑血管系统、消化系统疾病中发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。内源性H<sub>2</sub>S通过人体必需氨基酸——半胱氨酸在体内经酶催化生成,这些酶主要为胱硫醚- $\beta$ -合成酶(cystathionine  $\beta$ -synthase, CBS)、胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶(cystathionine  $\gamma$ -lyase, CSE)、3-巯基丙酮酸

硫转移酶(mercaptopyruvate sulfurtransferase, MPST), 并且其分布具有组织特异性<sup>[4]</sup>。

本研究通过检测气体信号分子 H<sub>2</sub>S 及其合成酶在不同退变程度的膝关节软骨组织中是否存在差异, 研究 H<sub>2</sub>S 干预 IL-1 $\beta$  诱导的软骨细胞 MMP-13 的转录表达情况, 以探讨气体信号分子 H<sub>2</sub>S 是否参与软骨退变过程及其可能机制, 为进一步了解 OA 的发病机制及探讨新的防治方法提供方向。

## 1 资料与方法

### 1.1 病例资料

收集 2014 年 2 月至 4 月在北京大学第一医院住院行膝关节手术(关节镜手术或膝关节置换术)患者的膝关节液 14 例, 其中男性 6 例, 女性 8 例, 平均年龄(45.6  $\pm$  8.2) 岁(35 ~ 59 岁)。根据患者膝关节 X 线片, 用膝关节 K-L 分级对患者膝关节退变的严重程度进行分层。

收集 2014 年 5 月至 9 月在北京大学第一医院因 OA 行膝关节置换术的患者的术中废弃关节软骨 14 例, 其中 6 例[男性 2 例, 女性 4 例, 平均年龄(65.2  $\pm$  3.3) 岁]软骨按照 Klagsbrun 等<sup>[5]</sup>的方法部分改良后消化获取 OA 软骨细胞, 余下的 8 例[男性 1 例, 女性 7 例, 平均年龄(69.1  $\pm$  4.5) 岁]软骨分别用于提取软骨组织内蛋白质。根据关节软骨 Outerbridge 分级对软骨组织退变程度进行分层。

本试验获得北京大学第一医院临床研究伦理委员会批准, 研究对象均签署知情同意书。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 亚甲基蓝法测定关节液中 H<sub>2</sub>S 的含量

取关节液, 4  $^{\circ}$ C 密闭条件下 1 000 r/min 离心 5 min 后取上清液, 用亚甲基蓝法测定关节液内 H<sub>2</sub>S 含量: 取离心后的关节液 100  $\mu$ L, 加入 5% (体积分数) 醋酸锌 100  $\mu$ L, 震荡混匀后加入 5 mol/L NaOH 溶液 100  $\mu$ L, 4  $^{\circ}$ C 最大转速(12 000 r/min) 离心 10 min 后弃上清液, 加去离子水 500  $\mu$ L 冲洗, 离心后弃上清液。再加入 5% 醋酸锌溶液 100  $\mu$ L、0.2% N,N-二甲基对苯胺 100  $\mu$ L、10% (体积分数) 硫酸铁铵 10  $\mu$ L 充分震荡静置 10 min 后吸取上清液, 用分光光度计在波长 665 nm 处检测光密度值(D)。根据 H<sub>2</sub>S 浓度-光密度值标准曲线计算上清液中 H<sub>2</sub>S 含量, 即为关节液中 H<sub>2</sub>S 含量。

#### 1.2.2 关节软骨细胞的获取、培养及加药处理

将所取软骨块剪碎, 加入 0.25% (体积分数) 胰蛋白酶溶液, 在 5% (体积分数) CO<sub>2</sub>、饱和湿度、37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中消化 30 min。加入含 10% (体积分数) 胎牛血

清的杜尔伯科改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) 终止消化, 离心弃上清液。在软骨组织中加入含 0.25% II 型胶原酶的培养液, 在 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度、37  $^{\circ}$ C 细胞培养箱中消化 3 ~ 5 h。培养液的成分为 DMEM、10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 g/L 链霉素。每 15 ~ 30 min 搅拌一次, 或使用磁力搅拌器, 消化至没有明显成形的软骨组织块存在为止, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 终止消化。200 目金属滤网过滤消化液, 收集滤液, 离心弃上层液体, 用细胞培养液吹散混匀细胞, 按  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于培养瓶并置于 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度、37  $^{\circ}$ C 培养箱培养, 3 d 换液, 细胞达到 80% 时传代。

取第三代软骨细胞, 以同样的方法进行分组培养, 各组分别进行以下药物处理: (1) 对照组: 不加任何药物; (2) IL-1 $\beta$  组: 单加 5  $\mu$ g/L 的 IL-1 $\beta$ ; (3) IL-1 $\beta$  + H<sub>2</sub>S 组: 提前 0.5 h 加 200  $\mu$ mol/L 的 NaHS, 再加 5  $\mu$ g/L 的 IL-1 $\beta$ ; (4) H<sub>2</sub>S 组: 单加 200  $\mu$ mol/L 的 NaHS。培养特定时间后提取细胞蛋白或核苷酸。

#### 1.2.3 H<sub>2</sub>S 分子探针检测关节软骨细胞中的内源性 H<sub>2</sub>S

取第三代软骨细胞, 爬片处理后用 4% (体积分数) 多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 洗后, 加入终浓度为 100  $\mu$ mol/L 的 H<sub>2</sub>S 分子探针(由北京大学医学部汤新景教授提供) 溶液<sup>[6]</sup>, 37  $^{\circ}$ C 避光 30 min, PBS 洗后封片用荧光显微镜照像。

#### 1.2.4 免疫细胞化学方法检测关节软骨中 H<sub>2</sub>S 合成酶

取第三代软骨细胞, 爬片处理后用 0.3% (体积分数) Triton 处理细胞 20 min, PBS 洗后用 4% (体积分数) 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 洗后加 3% (体积分数) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 常温下避光孵育 12 min 灭活内源性过氧化物酶, PBS 洗后用 BSA 封闭液常温封闭 30 min, 弃去勿洗。分别加入 1:100 的 CBS、CSE、MPST 的鼠来源的一抗, 室温孵育 1 h, 4  $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜, PBS 洗后加入复合辣根过氧化物酶 HRP 抗鼠 IgG, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗后 DAB 显色 5 ~ 10 min 不等, 苏木素复染细胞核, 若过染, 可用 1% (体积分数) HCL 褪色。染色完成后封片, 显微镜下观察。

#### 1.2.5 Western blot 方法测定关节软骨中 H<sub>2</sub>S 合成酶的表达量

用组织蛋白提取试剂盒提取软骨组织蛋白, 用 Bradford 法<sup>[7]</sup> 检测蛋白浓度。经 10% (质量分数) 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转至硝酸纤维素膜, 5% (质量分数) 脱脂奶粉封闭, 分别加入 CBS (1:2 000)、CSE (1:800)、MPST (1:2 000)、GAPDH

(1:4 000)一抗,4 ℃孵育过夜。辣根过氧化物酶HRP标记的抗兔或抗鼠二抗室温孵育1 h;加入HRP化学发光检测试剂,于暗室内曝光形成条带,用AlphaEase FC软件行扫描灰度值。

### 1.2.6 Western blot 方法测定 MMP-13、总 p65 及磷酸化 p65 含量

用蛋白提取试剂盒提取细胞蛋白,Western blot方法同前。所有一抗浓度分别为 MMP-13 1:500,总 p65 1:1 000,磷酸化 p65 1:1 000,兔来源的二抗稀释浓度均为 1:4 000。细胞实验结果重复3次。

### 1.2.7 Real-time PCR 方法测定 MMP-13 基因转录水平

取第三代软骨细胞,加入1 mL Trizol 裂解细胞,加0.2 mL的氯仿震荡离心,取水相加入0.5 mL的异丙醇,离心弃去上清液,75% (体积分数)的乙醇清洗后自然干燥沉淀 RNA,DEPC水溶解 RNA后测量含量及纯度(纯度控制在1.8~2.0)。取 Total RNA 1  $\mu$ g,加入 Random Primer Mix 2  $\mu$ L,及 Nuclease-free H<sub>2</sub>O,加至液体总量为 8  $\mu$ L,短暂离心后,放于 65 ℃保温 5 min,然后冰浴 5 min (消除 RNA 的二级结构)。短暂离心将液体集中于管底,然后再依次加入 ProtoScript II Reaction Mix (2  $\times$ ) 10  $\mu$ L, ProtoScript II Reaction Mix (10  $\times$ ) 2  $\mu$ L。轻轻混匀后,先在 25 ℃保温 5 min,然后 42 ℃保温 1 h,再在 80 ℃保温 5 min,得到 cDNA 20  $\mu$ L,选择 20  $\mu$ L 的反应体系,分别应用 MMP-13 以及 GAPDH 的上、下游引物(MMP13-F 5'-TGCAGAGCGCTACCTGAGAT-3', MMP13-R 5'-AGACTGCATTTCTCGGAGCC-3', GAPDH-F 5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3', GAPDH-R 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'),对逆转录的 cDNA 进行 Real-time PCR 反应。反应体系为上、下游引物(10 mol/L)各 1  $\mu$ L,模板 cDNA 2  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L,SYBR Green 10  $\mu$ L。采用两步法进行 PCR 反应,反应条件:95 ℃、10 min,1 个循环;95 ℃、15 s;60 ℃、1 min,40 个循环。反应结束后,采用 ABI 7300 Real-time PCR 软件分析 PCR 过程,检测样本的 Ct 值,即 PCR 扩增过程中扩增产物荧光信号超过基线值(进入指数增长期)时的循环数。以 GAPDH 为内参照基因,通过 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法进行相对定量分析。细胞实验结果重复3次。

### 1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 (IBM SPSS, US) 软件进行数据处理,多样本均数比较应用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间均数两两比较,方差齐者采用最小显著差值法(least-Significance Difference, LSD),

方差不齐时采用 Tambane's T2 法。两样本均数比较应用配对样本 *t* 检验(dependent-samples *t* test)。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。计量资料均采用均数  $\pm$  标准差表示。

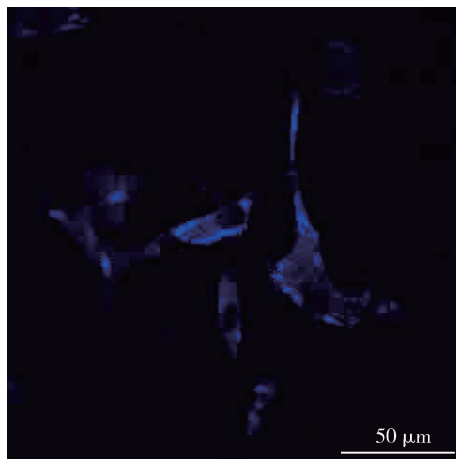
## 2 结果

### 2.1 关节液 H<sub>2</sub>S 含量的测定

所取关节液的膝关节均有不同程度的退变,其中 K-L 分级 1 级 6 例,2 级 5 例,3 级 3 例。通过亚甲基蓝法测量关节液 H<sub>2</sub>S 的含量,发现退变膝关节的关节液 H<sub>2</sub>S 浓度为(14.3  $\pm$  3.3)  $\mu$ mol/L。

### 2.2 软骨细胞内源性 H<sub>2</sub>S 及其合成酶的表达

H<sub>2</sub>S 分子探针方法显示,体外培养的软骨细胞胞浆内含有内源性 H<sub>2</sub>S,免疫荧光下显示为蓝色(图 1)。应用免疫细胞化学方法,发现体外培养的软骨细胞中有 H<sub>2</sub>S 合成酶 CBS、CSE、MPST 的表达,且均存在于细胞胞浆内(图 2)。



The blue fluorescence represented the H<sub>2</sub>S within the chondrocytes, while the black hole in the center represented its nuclear.

图 1 软骨细胞中 H<sub>2</sub>S 分子探针的显色结果

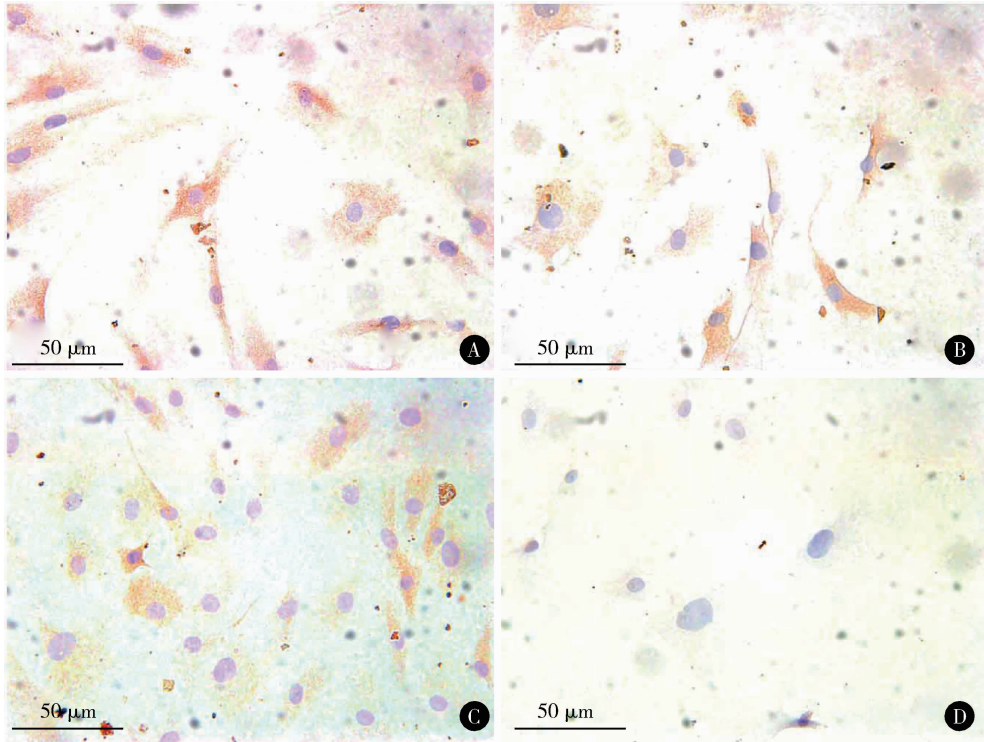
Figure 1 Result of chondrocytes reacted with H<sub>2</sub>S fluorescent molecular probe

### 2.3 不同退变程度的软骨组织中 H<sub>2</sub>S 合成酶的表达

根据 Outerbridge 分级<sup>[8]</sup>,取 1 级和 3 级的软骨块(图 3),Outerbridge 1 级软骨组织表面可见轻度的水泡,软骨软化、肿胀;Outerbridge 3 级软骨组织可见直径大于 1 cm 深溃疡,但无软骨下骨暴露。

用 Western blot 方法检测不同退变程度的软骨组织中 H<sub>2</sub>S 合成酶的表达量,我们发现 H<sub>2</sub>S 合成酶 CSE 在退变严重的软骨组织中呈高表达(图 4)。在 Outerbridge 分级 1 级软骨组织中 CSE 表达量为 1.26  $\pm$  0.11,在 Outerbridge 分级 3 级软骨组织中其表达量为 1.67  $\pm$  0.09,二者差异具有统计学意义

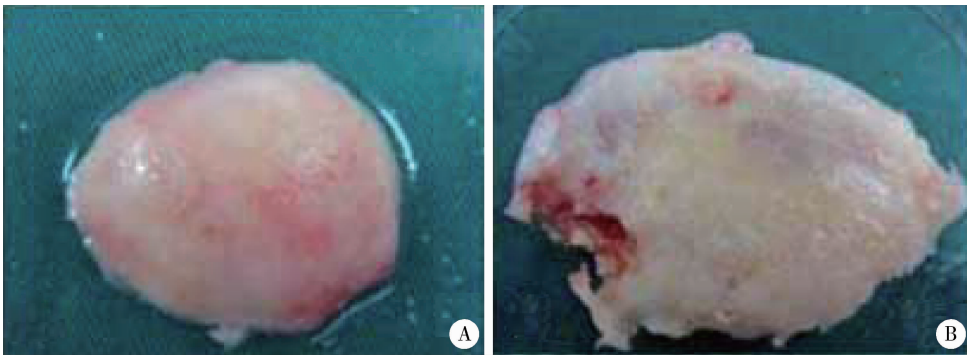
( $P < 0.01$ ), 而 CBS 与 MPST 的表达量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



The chondrocytes were stained with the immunocytochemical method. Its nuclear was stained blue, while its cytoplasm was stained yellow. The yellow cytoplasm in A, B, and C represented the existence of CBS, CSE and MPST, respectively, and D was the negative control image.

图 2 免疫细胞化学方法检测的软骨细胞中 H<sub>2</sub>S 合成酶的结果

Figure 2 H<sub>2</sub>S synthetase detected with the immunocytochemical method in chondrocytes



A, the degenerative cartilage in level of Outerbridge 1; B, the degenerative cartilage in level of Outerbridge 3.

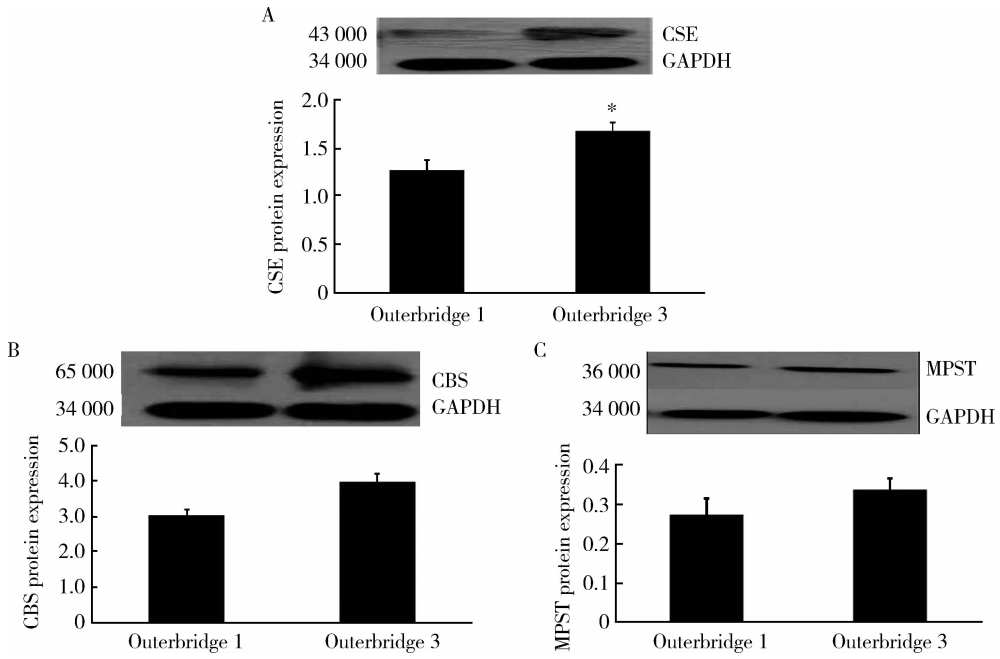
图 3 不同退变程度的软骨组织的大体标本

Figure 3 Gross samples of degenerative cartilage

### 2.4 各组细胞 MMP-13 蛋白含量及 MMP-13 基因转录水平

Western bolt 方法测量药物干预实验中各组细胞 MMP-13 蛋白的表达量,结果显示 IL-1β 组 MMP-13 的表达较正常对照组明显升高,且差异具有统计学意义( $1.87 \pm 0.67$  vs.  $0.22 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ ), IL-1β + H<sub>2</sub>S 组 MMP-13 的表达较 IL-1β 组明显降低,且差异具有统计学意义( $0.55 \pm 0.11$  vs.  $1.87 \pm 0.67$ ,  $P < 0.05$ ), H<sub>2</sub>S 组 MMP-13 的表达较

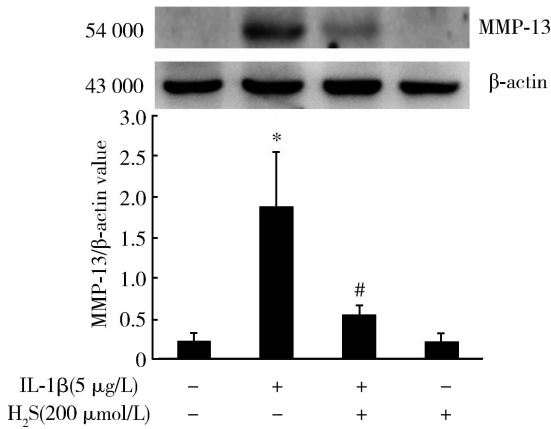
正常对照组差异无统计学意义(图 5)。Real-time PCR 方法测量了药物干预实验中各组细胞 MMP-13 基因转录情况,结果显示 IL-1β 组 MMP-13 基因转录较正常对照组明显升高,且差异具有统计学意义( $31.40 \pm 0.31$  vs.  $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.05$ ), IL-1β + H<sub>2</sub>S 组 MMP-13 基因转录较 IL-1β 组明显降低,且差异具有统计学意义( $24.41 \pm 1.28$  vs.  $31.40 \pm 0.31$ ,  $P < 0.05$ ), H<sub>2</sub>S 组 MMP-13 基因转录较正常对照组差异无统计学意义(图 6)。



CSE, cystathionine  $\gamma$ -lyase; CBS, cystathionine  $\beta$ -synthase; MPST, mercaptopyruvate sulfurtransferase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. \*  $P < 0.01$ , compared with Outerbridge 1. A, expression of CSE in cartilage graded in Outerbridge 3 was significantly higher than that graded in Outerbridge 1; B, no significant difference of CBS was present between cartilage graded in Outerbridge 3 and 1; C, no significant difference of MPST was present between cartilage graded in Outerbridge 3 and 1.

图 4 不同退变程度的软骨组织中 H<sub>2</sub>S 合成酶的表达 (n = 8)

Figure 4 Expression of H<sub>2</sub>S synthetase in different severities of degenerative cartilage (n = 8)



MMP-13, matrix metalloproteinase 13; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ . \*  $P < 0.05$ , compared with the control group; #  $P < 0.05$ , compared with the IL-1 $\beta$  group.

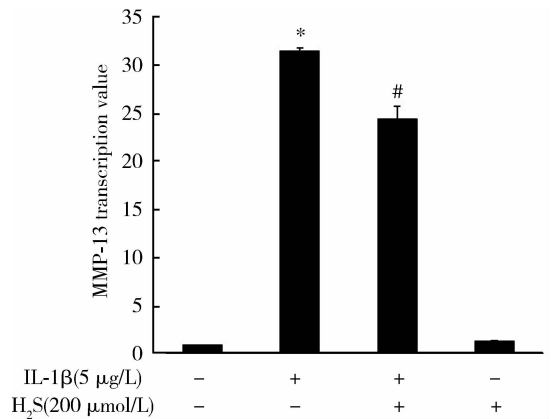
图 5 H<sub>2</sub>S 抑制 IL-1 $\beta$  诱导软骨细胞 MMP-13 蛋白表达 (n = 3)

Figure 5 H<sub>2</sub>S inhibited the expression of MMP-13 in chondrocytes induced with IL-1 $\beta$  (n = 3)

## 2.5 各组细胞 NF- $\kappa$ B 通路中总 p65 及磷酸化 p65 含量

Western bolt 方法测量药物干预实验中各组细胞总 NF- $\kappa$ B p65 蛋白及磷酸化 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的含量,结果显示 IL-1 $\beta$  组总 p65 含量较正常对照组明显升高,且差异具有统计学意义 ( $2.13 \pm 0.08$  vs.  $0.73 \pm 0.08$ ,  $P < 0.05$ ), IL-1 $\beta$  + H<sub>2</sub>S 组总 p65 含量较 IL-1 $\beta$  组明显降低,且差异具有统计学意义

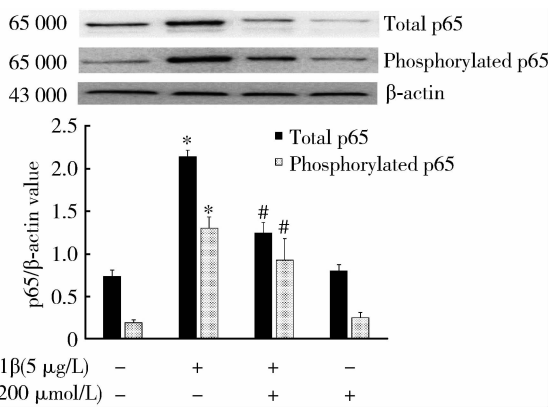
( $1.24 \pm 0.13$  vs.  $2.13 \pm 0.08$ ,  $P < 0.05$ ), H<sub>2</sub>S 组总 p65 含量较正常对照组无显著性变化; IL-1 $\beta$  组磷酸化 p65 含量较正常对照组明显升高,且差异具有统计学意义 ( $1.30 \pm 0.13$  vs.  $0.19 \pm 0.04$ ,  $P < 0.05$ ), IL-1 $\beta$  + H<sub>2</sub>S 组磷酸化 p65 含量较 IL-1 $\beta$  组明显降低,且差异具有统计学意义 ( $0.92 \pm 0.26$  vs.  $1.30 \pm 0.13$ ,  $P < 0.05$ ), H<sub>2</sub>S 组磷酸化 p65 含量较正常对照组无显著性变化 (图 7)。



MMP-13, matrix metalloproteinase 13; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ . \*  $P < 0.05$ , compared with the control group; #  $P < 0.05$ , compared with the IL-1 $\beta$  group.

图 6 H<sub>2</sub>S 抑制 IL-1 $\beta$  诱导软骨细胞 MMP-13 基因转录 (n = 3)

Figure 6 H<sub>2</sub>S inhibited the transcription of gene MMP-13 in chondrocytes induced with IL-1 $\beta$  (n = 3)



IL-1β, interleukin-1β. \*  $P < 0.05$ , compared with the control group; #  $P < 0.05$ , compared with the IL-1β group.

图 7 H<sub>2</sub>S 抑制 IL-1β 对 NF-κB p65 的激活作用 (n = 3)

Figure 7 H<sub>2</sub>S inhibited the activation of NF-κB p65 induced with IL-1β (n = 3)

### 3 讨论

软骨退变是 OA 的重要病理改变,而细胞外基质的降解是软骨退变的重要病理变化<sup>[2]</sup>,且炎症因素在 OA 中的作用非常重要。目前,随着对 H<sub>2</sub>S 认识的逐渐深入,已经发现 H<sub>2</sub>S 在急、慢性炎症以及高血压病、肥胖、糖尿病、肾病、退行性脑病中起到重要的调节作用<sup>[9]</sup>。但是,H<sub>2</sub>S 是否参与软骨退变,关节软骨是否合成内源性 H<sub>2</sub>S,是否表达内源性 H<sub>2</sub>S 合成酶,软骨细胞用于降解细胞外基质的 MMPs 对于 H<sub>2</sub>S 又有怎样的反应,国内外的相关研究都较少。本实验深入探讨了关节液、关节软骨中 H<sub>2</sub>S 及其合成酶的含量和变化,研究 H<sub>2</sub>S 对 IL-1β 诱导的软骨细胞 MMP-13 表达情况的影响,以明确 H<sub>2</sub>S 是否参与 OA 的发病过程及其参与机制。

首先,本实验测量了关节液中 H<sub>2</sub>S 含量,发现退变膝关节的关节液含量为 (14.3 ± 3.3) μmol/L。早在 2010 年,Whiteman 等<sup>[10]</sup>运用亚甲基蓝法<sup>[11-13]</sup>对关节液中 H<sub>2</sub>S 含量进行了测定,发现 OA 关节液中 H<sub>2</sub>S 含量为 25.1 μmol/L,类风湿性关节炎关节液中 H<sub>2</sub>S 含量是 OA 关节液 H<sub>2</sub>S 含量的 2 倍多。我们的检测结果与 Whiteman 等<sup>[10]</sup>的结果存在差异的原因,可能与 H<sub>2</sub>S 易挥发的生理特性以及样本量偏少导致的局限性相关,但该测量结果已证明关节液中存在气体信号分子 H<sub>2</sub>S。

其次,本实验探讨了关节软骨中 H<sub>2</sub>S 及其合成酶的存在,并研究了不同退变程度的软骨组织中 H<sub>2</sub>S 合成酶含量的差异。利用 H<sub>2</sub>S 分子探针技术,本实验证实了软骨细胞中有内源性 H<sub>2</sub>S 的产生。内源性 H<sub>2</sub>S 的产生源自于 H<sub>2</sub>S 合成酶,我们利用免

疫细胞化学及 Western blot 方法,证明了软骨细胞中 H<sub>2</sub>S 合成酶的存在,并发现 CSE 的表达随着关节软骨退变程度的增加而增加,且差异具有统计学意义,该结果与 Fox 等<sup>[14]</sup>的研究结果相一致。他们的研究表明,在 TNF-α, IL-1β 及 IL-6 等炎症刺激下,软骨细胞中 CSE 的表达量明显升高,而 CBS 表达差异无统计学意义。本研究则是从骨关节病的软骨组织中得出了相似的结论,较体外试验的结果更具有说服力。既往研究表明,内质网应激可上调 CSE<sup>[15-16]</sup>,而内质网应激在 OA 中起到重要作用。TNF-α 可招募 SP1 蛋白,激活的 SP1 进入细胞核结合到 CSE 启动子,从而上调 CSE 的表达<sup>[17-18]</sup>,而 TNF-α 同样在 OA 发病过程中起到重要作用。这些研究表明,OA 发病过程中随着疾病进展,CSE 表达量在逐渐增加,无论是在 IL-1β 还是在其他与 OA 相关的因素的刺激下,而 CBS 和 MPST 都不具有这个特点。

再次,本实验研究了 H<sub>2</sub>S 对 IL-1β 诱导的软骨细胞 MMP-13 的影响。IL-1β 在 OA 发病过程中起到至关重要的作用,软骨细胞、成骨细胞、滑膜细胞、单核细胞均可分泌 IL-1β<sup>[19-22]</sup>。OA 患者关节液、滑膜、软骨及软骨下骨中 IL-1β 水平均升高<sup>[19-21]</sup>,软骨细胞及成纤维样滑膜细胞表面的 IL-1β 受体也明显升高<sup>[23-24]</sup>。高水平的 IL-1β 与软骨细胞膜上的受体结合,通过信息传递系统将病变的信息输送到细胞内,从而干扰了软骨细胞的正常代谢活动,如改变软骨细胞正常结构和功能、促进软骨细胞凋亡发生、降解软骨细胞基质和参与滑膜炎性病变及影响骨代谢等,对 OA 的发生和发展起着至关重要的作用<sup>[25]</sup>。既往已有较多的实验用 IL-1β 刺激软骨细胞,以形成“OA 样”的软骨细胞<sup>[26-30]</sup>。体外实验中,IL-1β 可诱导软骨细胞凋亡及炎症与分解代谢的多项指标,如一氧化氮、前列腺素 2、IL-6 和 MMP-13 等<sup>[26-30]</sup>。本实验同样以 IL-1β 刺激正常软骨细胞以建立 OA 软骨细胞模型,通过该模型的建立来探讨 H<sub>2</sub>S 在软骨退变中可能的作用。

Western blot 结果显示 H<sub>2</sub>S 可部分抑制 IL-1β 诱导的 MMP-13 的表达,这项研究结果与既往在骨和软骨细胞中的研究相似。Vacek 等<sup>[31]</sup>发现在骨组织中,MMPs 的活性随 H<sub>2</sub>S 含量的增加而降低。Burguera 等<sup>[32]</sup>、Ha 等<sup>[33]</sup>发现在软骨细胞中硫化氢钠能抑制 IL-1β 诱导 MMPs 的表达。我们用 Real-time PCR 检测了 MMP-13 基因的转录情况,发现 H<sub>2</sub>S 是通过抑制 MMP-13 基因的转录过程来抑制 MMP-13 的蛋白合成的。MMPs 作为降解细胞外基

质的蛋白酶家族,在软骨基质降解中起到重要作用。MMP-13作为MMPs的重要一员,受应激、炎症及分化诱导的信号调节,在OA发病过程中起到重要作用。Goldring等<sup>[34]</sup>总结发现在OA的不同阶段,MMP-13是一个关键基因,且与很多信号通路如NF- $\kappa$ B、JNK、p38MAPK等,及转录因子如NF- $\kappa$ B、HIF2 $\alpha$ 、Ihh及Runx2等相关。这些调节因子都直接或间接影响到MMP-13的转录和活性。IL-1 $\beta$ 诱导的MMP-13的高表达是通过NF- $\kappa$ B通路及MAPK通路实现的<sup>[35]</sup>。既往有研究发现,H<sub>2</sub>S可通过抑制MAPK及NF- $\kappa$ B通路来保护H9c2心肌细胞<sup>[36]</sup>和胃上皮细胞的作用<sup>[37]</sup>。我们进一步检测了软骨细胞中总NF- $\kappa$ B p65及磷酸化NF- $\kappa$ B p65的水平,结果显示IL-1 $\beta$ 可诱导软骨细胞中总NF- $\kappa$ B p65及其磷酸化水平的升高,H<sub>2</sub>S则可部分抑制该作用。这与既往的在其他细胞中的研究结论相一致<sup>[35-36, 38]</sup>,且Ha等<sup>[33]</sup>也在软骨细胞中发现了H<sub>2</sub>S的类似作用,因此,H<sub>2</sub>S对MMP-13的抑制作用同样可能是通过NF- $\kappa$ B通路实现的,但这仍有待进一步研究证实。

本研究尚有一些不足之处:首先,本研究中用于测量H<sub>2</sub>S含量的关节液样本量偏少,测量结果存在一定的局限性;其次,本研究选择非负重区无明显退变的关节软骨作为正常对照组,这与许多类似研究中软骨细胞的来源相似,而在实际情况中,这些关节软骨,特别是表层关节软骨,由于受年龄以及关节腔内炎症因子等生物因素的影响仍会发生轻度的退变。为尽可能取到相对正常的关节软骨,在研究过程中我们选择无明显退变的关节软骨深层组织作为正常对照组,而更精确的结果需要进一步的动物实验研究来证明;再次,软骨细胞属低氧、低代谢细胞。本实验将软骨细胞置于pH7.4、5%的CO<sub>2</sub>环境中进行培养,虽然适于其生长,但未还原软骨细胞原始生存状态。软骨细胞接种密度过低、长期单层培养或经过反复传代(>5代),其分化不稳定,细胞易与细胞或基质间失去联系,细胞因子无法提供反馈调节,细胞出现反分化,呈成纤维细胞样,合成II型胶原及分泌软骨基质的能力下降<sup>[39]</sup>,因此,本实验中检测用的软骨细胞均取自第三代细胞。

综上所述,退变膝关节的关节液H<sub>2</sub>S含量为(14.3 $\pm$ 3.3) $\mu$ mol/L,膝关节软骨组织中存在内源性H<sub>2</sub>S及其合成酶,且H<sub>2</sub>S合成酶CSE的表达随软骨退变程度的增加而显著升高。体外实验表明,H<sub>2</sub>S可能通过NF- $\kappa$ B通路部分抑制MMP-13蛋白表达与基因转录水平。这些结果表明H<sub>2</sub>S参与软骨退变过程,且发挥保护软骨,部分抑制细胞外基质降

解的作用,具体作用机制有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis [J]. Clin Geriatr Med, 2010, 26(3): 355-369.
- [2] Loeser RF. Aging and osteoarthritis; the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix [J]. Osteoarthr Cartil, 2009, 17(8): 971-979.
- [3] Lee AS, Ellman MB, Yan D, et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain [J]. Gene, 2013, 527(2): 440-447.
- [4] Predmore BL, Lefer DJ, Gojon G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine [J]. Antioxid Redox Signal, 2012, 17(1): 119-140.
- [5] Klagsbrun M. Large-scale preparation of chondrocytes [J]. Meth Enzymol, 1979, 58: 560-564.
- [6] Du J, Huang Y, Yan H, et al. Hydrogen sulfide suppresses oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-stimulated monocyte chemoattractant protein 1 generation from macrophages via the nuclear factor kappaB (NF-kappaB) pathway [J]. J Biol Chem, 2014, 289(14): 9741-9753.
- [7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Anal [J]. Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [8] Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae [J]. Bone Joint Surg Br, 1961, 43: 752-757.
- [9] Polhemus DJ, Lefer DJ. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease [J]. Circ Res, 2014, 114(4): 730-737.
- [10] 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 [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1203: 146-150.
- [11] Li XH, Du JB, Shi L, et al. Down-regulation of endogenous hydrogen sulfide pathway in pulmonary hypertension and pulmonary vascular structural remodeling induced by high pulmonary blood flow in rats [J]. Circ J, 2005, 69(11): 1418-1424.
- [12] Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide [J]. Circulation, 2008, 117(18): 2351-2360.
- [13] Chan FK, Cryer B, Goldstein JL, et al. A novel composite endpoint to evaluate the gastrointestinal (GI) effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs through the entire GI tract [J]. J Rheumatol, 2010, 37(1): 167-174.
- [14] 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]. J Cell Mol Med, 2012, 16(4): 896-910.
- [15] Kabil O, Banerjee R. Enzymology of H<sub>2</sub>S biogenesis, decay and signaling [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(5): 770-782.
- [16] Dickhout JG, Carlisle RE, Jerome DE, et al. Integrated stress response modulates cellular redox state via induction of cystathionine gamma-lyase: cross-talk between integrated stress response and thiol metabolism [J]. J Biol Chem, 2012, 287(10): 7603-7614.
- [17] Sen N, Paul BD, Gadalla MM, et al. Hydrogen sulfide-linked sulphydration of NF-kappaB mediates its antiapoptotic actions [J]. Mol Cell, 2012, 45(1): 13-24.
- [18] Ishii I, Akahoshi N, Yu XN, et al. Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity,



- tissue distribution and developmental expression[J]. *Biochem J*, 2004, 381(Pt 1): 113–123.
- [19] Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, et al. Enhanced and coordinated *in vivo* expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(12): 2165–2174.
- [20] Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour MP, et al. Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients[J]. *Osteoarthr Cartil*, 2002, 10(6): 491–500.
- [21] Szekanecz Z, Koch AE. Cell-cell interactions in synovitis. Endothelial cells and immune cell migration[J]. *Arthritis Res*, 2000, 2(5): 368–373.
- [22] de Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, van Osch GJ, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2012, 20(12): 1484–1499.
- [23] Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, et al. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function[J]. *Arthritis Rheum*, 1992, 35(5): 530–540.
- [24] Sadouk MB, Pelletier JP, Tardif G, et al. Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor[J]. *Lab Invest*, 1995, 73(3): 347–355.
- [25] Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology[J]. *Biorheology*, 2002, 39(1/2): 237–246.
- [26] Cheng W, Wu D, Zuo Q, et al. Ginsenoside Rb1 prevents interleukin-1 beta induced inflammation and apoptosis in human articular chondrocytes[J]. *Int Orthop*, 2013, 37(10): 2065–2070.
- [27] Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(1): 128–135.
- [28] Huang Y, Wu D, Fan W. Protection of ginsenoside Rg1 on chondrocyte from IL-1beta-induced mitochondria-activated apoptosis through PI3K/Akt signaling[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 392(1/2): 249–257.
- [29] Zhang X, Xu X, Xu T, et al. beta-Ecdysterone suppresses interleukin-1beta-induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes *via* inhibition of NF-kappaB signaling pathway [J]. *Drug Dev Res*, 2014, 75(3): 195–201.
- [30] Wang SN, Xie GP, Qin CH, et al. Aucubin prevents interleukin-1 beta induced inflammation and cartilage matrix degradation *via* inhibition of NF-kappaB signaling pathway in rat articular chondrocytes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 24(2): 408–415.
- [31] Vacek TP, Qipshidze N, Tyagi SC. Hydrogen sulfide and sodium nitroprusside compete to activate/deactivate MMPs in bone tissue homogenates[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2013, 9: 117–123.
- [32] Burguera EF, Vela-Anero A, Magalhaes J, et al. Effect of hydrogen sulfide sources on inflammation and catabolic markers on interleukin 1beta-stimulated human articular chondrocytes [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2014, 22(7): 1026–1035.
- [33] Ha C, Tian S, Sun K, et al. Hydrogen sulfide attenuates IL-1beta-induced inflammatory signaling and dysfunction of osteoarthritic chondrocytes[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(6): 1657–1666.
- [34] Goldring MB, Otero M, Plumb DA, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis [J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 21: 202–220.
- [35] Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 561459.
- [36] Guo R, Wu K, Chen J, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects against doxorubicin-induced inflammation and cytotoxicity by inhibiting p38MAPK/NFkappaB pathway in H9c2 cardiac cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(6): 1668–1680.
- [37] Guo C, Liang F, Shah Masood W, et al. Hydrogen sulfide protected gastric epithelial cell from ischemia/reperfusion injury by Keap1 s-sulfhydration, MAPK dependent anti-apoptosis and NF-kappaB dependent anti-inflammation pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 725: 70–78.
- [38] Yang G, Yang W, Wu L, et al. H<sub>2</sub>S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(22): 16567–16576.
- [39] Martin I, Vunjak-Novakovic G, Yang J, et al. Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 253(2): 681–688.

(2015-11-16 收稿)

(本文编辑:刘淑萍)