

本文引用: 刘艳文, 徐倩, 周坤, 等. 硫化氢对巨噬细胞吞噬脂质过程中钙化的影响及其机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(4): 317-325. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.04.006.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-04-0317-09

· 实验研究 ·

硫化氢对巨噬细胞吞噬脂质过程中钙化的影响及其机制

刘艳文¹, 徐倩², 周坤², 李梓伊¹, 刘水清¹, 张俊¹, 任重², 姜志胜²

1. 江苏经贸职业技术学院, 江苏省南京市 211168; 2. 南华大学心血管疾病研究所, 湖南省衡阳市 421001

[摘要] **[目的]** 探讨硫化氢对巨噬细胞钙化的影响及其潜在分子机制。**[方法]** 采用油红 O 染色观察细胞内脂质蓄积情况, von Kossa 染色和原子吸收光谱法分别对单核巨噬细胞钙化模型的钙盐沉积和细胞内钙含量进行形态学分析及定量分析。利用 Western blot 和 RT-PCR 检测硫化氢不同剂量和不同处理时间下骨桥蛋白(OPN)的 mRNA 和蛋白表达。同时, 利用 Western blot 检测早期生长反应因子 1(EGR1)和内质网应激相关标志物 C/EBP 同源蛋白(CHOP)和葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 的表达变化, 活性氧荧光探针检测评估活性氧水平, 并结合 von Kossa 染色和钙离子荧光探针检测评估硫化氢对巨噬细胞钙化的影响。通过干扰 EGR1 表达和使用内质网应激抑制剂 4-苯基丁酸(4-PBA)探讨硫化氢影响巨噬细胞钙化的分子机制。**[结果]** 与氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)组相比, β -甘油磷酸钠(β -GP)+40 g/L ox-LDL 组细胞内脂质蓄积明显增加, 硫化氢显著抑制巨噬细胞钙化, 且呈剂量和时间依赖性。与 β -GP+ox-LDL 组相比, 100 μ mol/L NaHS 处理 4 天效果最为显著, 细胞内钙含量降低 66% ($P<0.01$), 细胞间钙盐沉积减少 71% ($P<0.01$), OPN mRNA 和蛋白表达分别降低 50% 和 48% ($P<0.05$)。硫化氢处理使 EGR1 的表达上调了 21%, CHOP 和 GRP78 的表达分别下调了 58% 和 59% ($P<0.01$)。内质网应激抑制剂 4-PBA 使 OPN 表达下调 73% ($P<0.01$), 而干扰 EGR1 表达则完全抵消了硫化氢对 OPN 表达及钙盐沉积的抑制作用 ($P<0.01$)。**[结论]** 硫化氢通过上调 EGR1 表达抑制内质网应激, 从而显著抑制巨噬细胞钙化。

[关键词] 硫化氢; 钙化; 巨噬细胞; 早期生长反应因子 1; 内质网应激

[中图分类号] R5; R3

[文献标识码] A

Effect of hydrogen sulfide on calcification during macrophage phagocytosis of lipids and its mechanisms

LIU Yanwen¹, XU Qian², ZHOU Kun², LI Ziyi¹, LIU Shuiqing¹, ZHANG Jun¹, REN Zhong², JIANG Zhisheng²

1. Jiangsu Vocational Institute of Commerce, Nanjing, Jiangsu 211168, China; 2. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of hydrogen sulfide on macrophage calcification and its underlying molecular mechanisms. **Methods** Oil red O staining was used to observe intracellular lipid accumulation, and von Kossa staining and atomic absorption spectroscopy were used for morphological and quantitative analysis of calcium deposition and intracellular calcium content in a mononuclear macrophage calcification model. Western blot and RT-PCR were used to detect the mRNA and protein expression of osteopontin (OPN) at different doses and treatment times of hydrogen sulfide. At the same time, Western blot was used to detect the expression changes of early growth response factor 1 (EGR1), endoplasmic reticulum stress-related markers C/EBP homologous protein (CHOP) and glucose-regulated protein 78 (GRP78). Reactive oxygen species levels were evaluated by fluorescence probe staining, and the effect of hydrogen sulfide on macrophage calcification was evaluated by combining von Kossa staining and calcium ion fluorescence probe staining. The molecular mechanisms of hydrogen sulfide affecting macrophage calcification were explored by interfering with EGR1 expression and using endoplasmic reticulum stress inhibitor 4-phenylbutyric acid (4-PBA). **Results** Compared with oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) group, β -glycerophosphate (β -GP)+40 g/L ox-LDL group showed a significant

[收稿日期] 2025-01-16

[修回日期] 2025-04-01

[基金项目] 江苏经贸职业技术学院“领军人才培养计划”资助; 国家自然科学基金项目(91839103)

[作者简介] 刘艳文, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为动脉硬化发生机制, E-mail: 305092969@qq.com。通信作者姜志胜, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学及心肌缺血损伤的细胞分子机制与防治, E-mail: zsjiang2005@163.com。

increase in intracellular lipid accumulation, while hydrogen sulfide significantly inhibited macrophage calcification in a concentration- and time-dependent manner. Compared with the β -GP+ox LDL group, the most significant effect was observed after incubation with 100 μ mol/L NaHS for 4 days. The hydrogen sulfide group showed a 66% decrease in intracellular calcium content ($P<0.01$), a 71% decrease in intercellular calcium deposition ($P<0.01$), and a 50% and 48% decrease in OPN mRNA and protein expression, respectively ($P<0.05$). Hydrogen sulfide treatment upregulated the expression of EGR1 by 21%, while downregulating the expression of CHOP and GRP78 by 58% and 59%, respectively ($P<0.01$). The endoplasmic reticulum stress inhibitor 4-PBA could downregulate OPN expression by 73% ($P<0.01$), while interfering with EGR1 expression completely counteracts the inhibitory effect of hydrogen sulfide on OPN expression and calcium deposition ($P<0.01$). **Conclusion** Hydrogen sulfide significantly inhibits macrophage calcification by upregulating EGR1 expression and suppressing endoplasmic reticulum stress.

[**KEY WORDS**] hydrogen sulfide; calcification; macrophage; early growth response factor 1; endoplasmic reticulum stress

在心血管疾病的演变过程中,动脉血管壁的钙盐沉积扮演着重要的角色,尤其是在动脉粥样硬化的晚期阶段,这种内膜的钙化现象尤为明显。在斑块形成的关键时刻,内膜钙化会削弱斑块的稳定性,进而增加血栓形成的风险。研究表明,硫化氢作为一种与一氧化氮和一氧化碳类似的气体信号分子,可抑制心血管疾病的发生发展。本研究拟探讨硫化氢对巨噬细胞吞噬脂质过程中钙化的影响及其机制,旨在为血管钙化的干预提供新的靶点和策略。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 购自上海细胞生物研究所细胞库。

1.2 主要试剂

碱性品红、硝酸银、超氧阴离子活性氧检测试剂盒、 β -甘油磷酸钠(β -glycerophosphate, β -GP)、氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)及 Fluo-4 AM(钙离子荧光探针)试剂盒。 β -actin 一抗、兔抗鼠辣根过氧化物酶标记的二抗(武汉博士德);RT-PCR 试剂盒(北京博大泰克);骨桥蛋白(osteopontin, OPN)单克隆抗体(Santa Cruz 公司);早期生长反应因子 1(early growth response factor 1, EGR1)一抗(Proteintech 公司);C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)和葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulated protein 78, GRP78)一抗(戴格生物);Taq PCR MasterMix 及 DNA marker(北京天根公司)。

1.3 钙化模型制备

在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的细胞培养箱内培养 RAW264.7 细胞,每隔两天更换一次培养基,并进行细胞传代操

作。选取处于指数增长阶段的细胞用于实验。依照文献^[1-3],采用 5 mmol/L β -GP 和 40 g/L ox-LDL 来激活复制小鼠单核巨噬细胞钙化模型。

1.4 实验分组

1.4.1 硫化氢对巨噬细胞钙化影响的剂量效应和时间效应实验分组 实验分为对照组、ox-LDL 组、 β -GP+ox-LDL 组、硫化氢组(用 25、50、100 和 200 μ mol/L NaHS 处理细胞 6 天或 100 μ mol/L NaHS 处理细胞 0、2、4 和 6 天)。

1.4.2 巨噬细胞钙化进程中 EGR1 的表达变化与内质网应激的发生实验分组 实验分为对照组、 β -GP 组、ox-LDL 组和 β -GP+ox-LDL 组。

1.4.3 硫化氢对巨噬细胞 EGR1 表达及内质网应激的影响实验分组 实验分为对照组、 β -GP+ox-LDL、 β -GP+ox-LDL+内质网应激抑制剂 4-苯基丁酸[(4-phenylbutyric acid, 4-PBA), 1 μ mol/L]组和 β -GP+ox-LDL+ H_2S 组。

1.4.4 硫化氢经 EGR1 调控内质网应激影响巨噬细胞钙化实验分组 实验分为对照组、 β -GP+ox-LDL+NC 组、 β -GP+ox-LDL+ H_2S +NC 组和 β -GP+ox-LDL+ H_2S +shEGR1 组。

1.5 von Kossa 染色

利用硝酸银染色法进行细胞钙化模型的形态学鉴定,在光镜下,钙化组细胞间有大量黑色或褐色颗粒,对照组细胞间无黑色或褐色颗粒。

1.6 RT-PCR 检测 OPN mRNA 表达

在 1.5% 琼脂糖凝胶上对 RT-PCR 产物进行分离,每个样品的 OPN 加样量为 5 μ L, GAPDH 的加样量为 1 μ L,随后使用溴化乙锭进行显色处理。通过凝胶成像系统对分离后的条带进行成像和数据分析,评估目的基因的表达变化。本实验每个条件均重复操作 3 遍以确保结果的可靠性。

1.7 Western blot 检测巨噬细胞中 EGR1、GRP78 和 CHOP 蛋白表达

加药处理的巨噬细胞经 PBS 洗涤后,用 RIPA 裂解缓冲液冰上裂解 30 min,于 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清。BCA 法测定蛋白浓度,样品与上样缓冲液混合煮沸变性,经 10% SDS-PAGE 电泳分离后湿转至 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶封闭 3 h,与一抗(EGR1、GRP78 和 CHOP 稀释比为 1:1 000)于 4 ℃ 孵育过夜,再与羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000)于室温孵育 1 h。显影后凝胶成像仪成像,利用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.8 钙离子荧光染色

加药处理的巨噬细胞经 PBS 洗涤 3 次后,加入 Fluo-4 AM 工作液,于 37 ℃ 避光孵育 30 min 完成荧光探针装载。PBS 洗涤 3 次去除未装载探针,继续孵育 30 min。相差倒置荧光显微镜观察 Fluo-4 荧光信号,绿色荧光代表细胞内钙离子含量。

1.9 活性氧检测

加药处理的巨噬细胞经 PBS 洗涤 3 次后,加入适量的 DHE 染色液,于 37 ℃ 避光孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次后置于相差倒置荧光显微镜下观察并拍照,红色荧光代表活性氧水平。

1.10 油红 O 染色观察细胞内脂质蓄积

将细胞接种于 6 孔板内,加入 PMA 处理 24 h,诱导成为巨噬细胞,各组给予不同处理因素作用一定时间后,加固定液固定细胞 10 min,去除固定液,用 PBS 冲洗 2 遍,于 6 孔板中取出盖玻片,生长有细胞的一面朝上,加 4% 多聚甲醛固定细胞 10~15 min;60% 异丙醇漂洗;0.3% 油红 O-异丙醇溶液染色 10~15 min;60% 异丙醇松化数秒;苏木精复染色 1~5 min;自来水冲洗返蓝 1 min;甘油明胶封固,光镜下观察。

1.11 统计学分析

采用 SPSS18.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 巨噬细胞钙化情况

von Kossa 染色显示,对照组细胞间无黑色颗粒沉积, β -GP+ox-LDL 组细胞间有大量黑色颗粒沉积,说明细胞间出现钙盐沉积(图 1)。油红 O 染色显示,ox-LDL 组和 β -GP+ox-LDL 组细胞内脂质蓄积

与对照组相比显著增加, β -GP+ox-LDL 组细胞内脂质蓄积与 ox-LDL 组相比显著增加(图 2)。

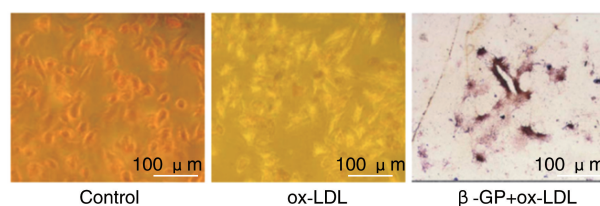


图 1. 细胞间钙盐沉积

Figure 1. Intercellular calcium salt deposition

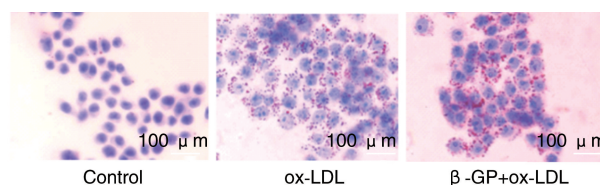


图 2. 巨噬细胞钙化过程中脂质蓄积情况

Figure 2. Lipid accumulation during macrophage calcification process

2.2 硫化氢对巨噬细胞钙化影响的剂量效应和时间效应

2.2.1 硫化氢对细胞间钙盐沉积和钙含量的影响

随着硫化氢处理剂量的增加,细胞间钙盐沉积得到明显改善。与 β -GP+ox-LDL 组相比,100 μ mol/L NaHS 处理后细胞间钙盐沉积降低了 71%,细胞内钙含量减少了 66%,效果最为显著($P < 0.01$)。随着硫化氢处理时间的延长,细胞间钙盐沉积(黑色颗粒)明显减少,以处理 4 天作用最为明显。细胞内钙含量和钙盐沉积的变化与形态学结果一致。以上结果表明,硫化氢能够减少巨噬细胞内外钙的蓄积(图 3)。

2.2.2 硫化氢对细胞 OPN mRNA 和蛋白表达的影响

与对照组和 β -GP+ox-LDL 组对比,硫化氢组 OPN mRNA 和蛋白的表达显著降低,OPN mRNA 的表达减少了 51%,OPN 蛋白的表达减少了 49% ($P < 0.05$),以 100 μ mol/L NaHS 作用最为显著。用 100 μ mol/L NaHS 处理不同时间,随着硫化氢作用时间的延长,OPN mRNA 和蛋白的表达显著降低,OPN mRNA 的表达降低了 50%,OPN 蛋白的表达降低了 48%,以处理 4 天作用最为显著($P < 0.05$;图 4)。

2.3 硫化氢对细胞钙化作用的机制探讨

2.3.1 巨噬细胞钙化进程中 EGR1 的表达与内质网应激的发生 von Kossa 染色显示,与 β -GP 组和 ox-LDL 组相比, β -GP+ox-LDL 组出现明显阳性染

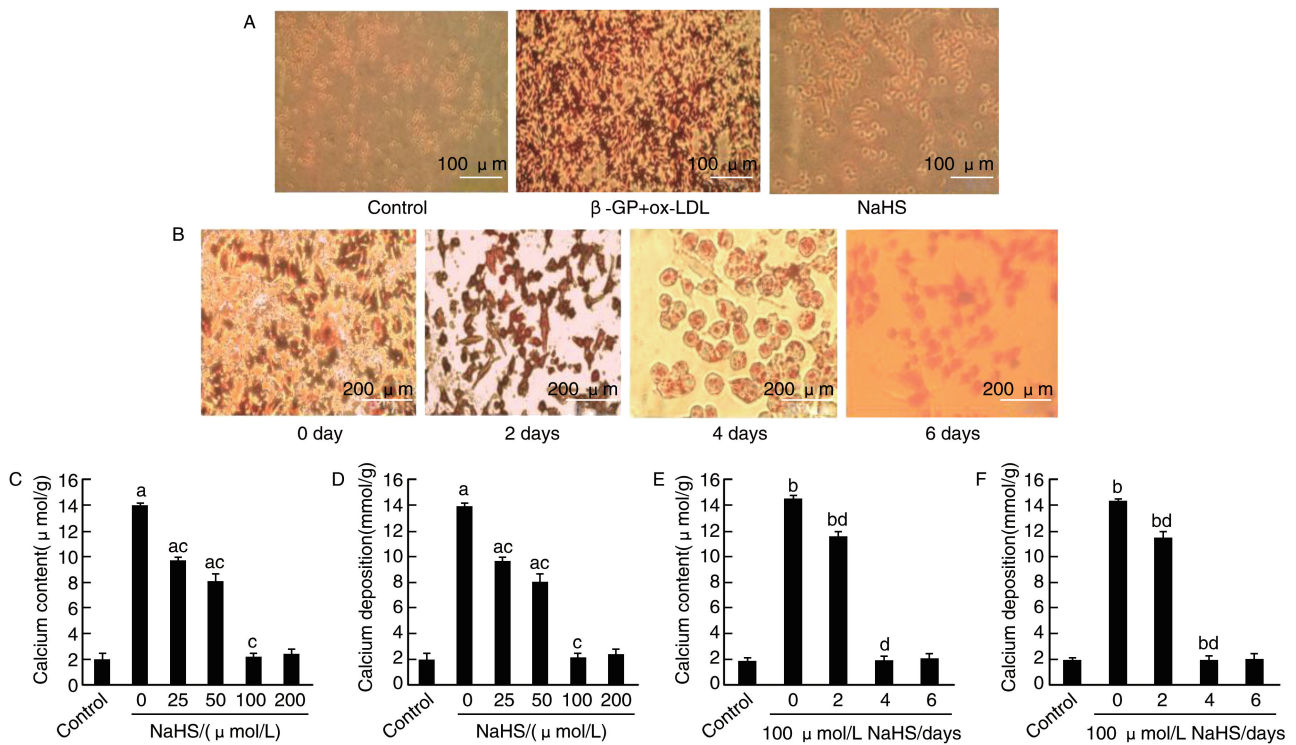


图 3. 硫化氢不同剂量和不同时间处理对细胞间钙盐沉积和钙含量的影响

A 为 von Kossa 染色显示硫化氢不同剂量处理对细胞间钙盐沉积的影响, B 为 von Kossa 染色显示硫化氢不同时间处理对细胞间钙盐沉积的影响, C、D 为硫化氢不同剂量处理细胞内钙含量和细胞间钙盐沉积量, E、F 为硫化氢不同时间处理细胞内钙含量和细胞间钙盐沉积。
a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 0 μmol/L NaHS 组比较; d 为 $P < 0.01$, 与 100 μmol/L NaHS 处理 0 天比较。

Figure 3. The effects of different doses and different treatment times of hydrogen sulfide on intercellular calcium deposition and calcium content

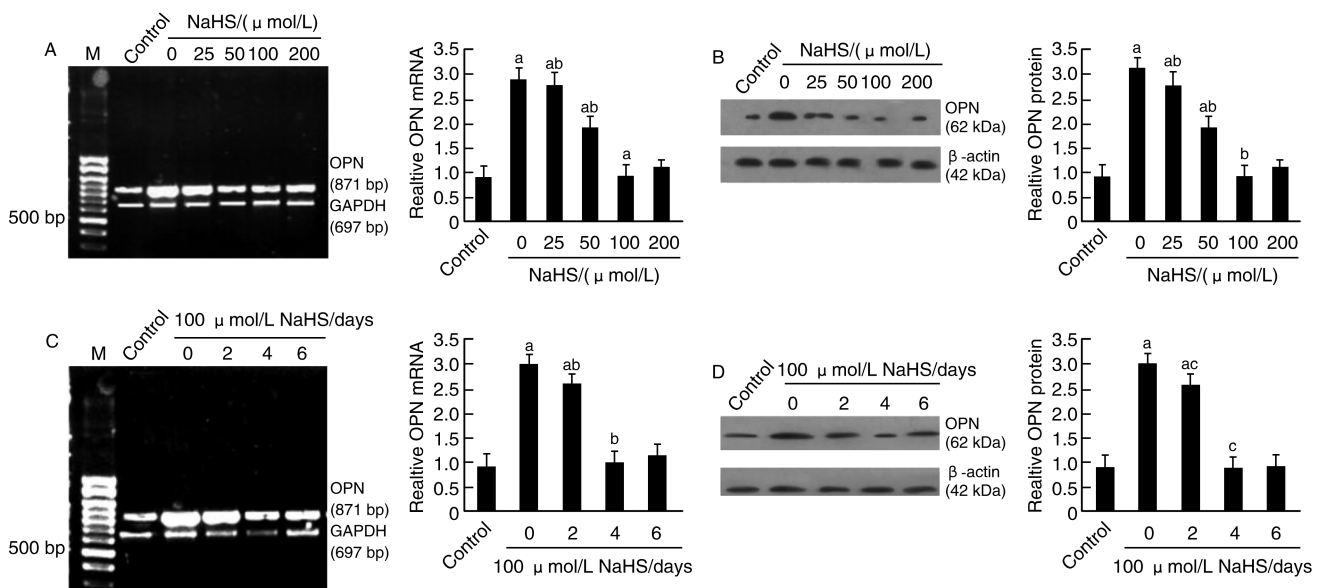


图 4. 硫化氢不同剂量和不同时间处理对细胞 OPN mRNA 和蛋白表达的影响 ($n=3$)

A、B 分别为硫化氢不同剂量处理对细胞 OPN mRNA 和蛋白的表达, C、D 分别为硫化氢不同时间处理对细胞 OPN mRNA 和蛋白的表达。
a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 0 μmol/L NaHS 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 100 μmol/L NaHS 处理 0 天比较。

Figure 4. The effects of different doses and treatment times of hydrogen sulfide on the expression of OPN mRNA and protein in cells ($n=3$)

色,表明钙盐沉积增多;这一结果在钙离子荧光染色中得到进一步验证, β -GP+ox-LDL 组绿色荧光强度显著增强。Western blot 结果显示,与 β -GP 组和 ox-LDL 组相比, β -GP+ox-LDL 组 OPN 的表达分别增加了 52% 和 77% ($P<0.01$)。以上结果证实巨噬细胞钙化模型构建成功。与 β -GP 组和 ox-LDL 组相比, β -GP+ox-LDL 组 EGR1 的表达分别降低了

23% 和 44% ($P<0.01$),提示 EGR1 可能参与调控巨噬细胞钙化进程。与 β -GP 组和 ox-LDL 组相比, β -GP+ox-LDL 组 CHOP 和 GRP78 的表达分别增加了 1 倍、79% 和 47%、90% ($P<0.01$)。活性氧荧光探针检测显示, β -GP+ox-LDL 组活性氧水平显著升高(图 5)。这些结果表明,在巨噬细胞钙化进程中伴随着内质网应激反应的激活。

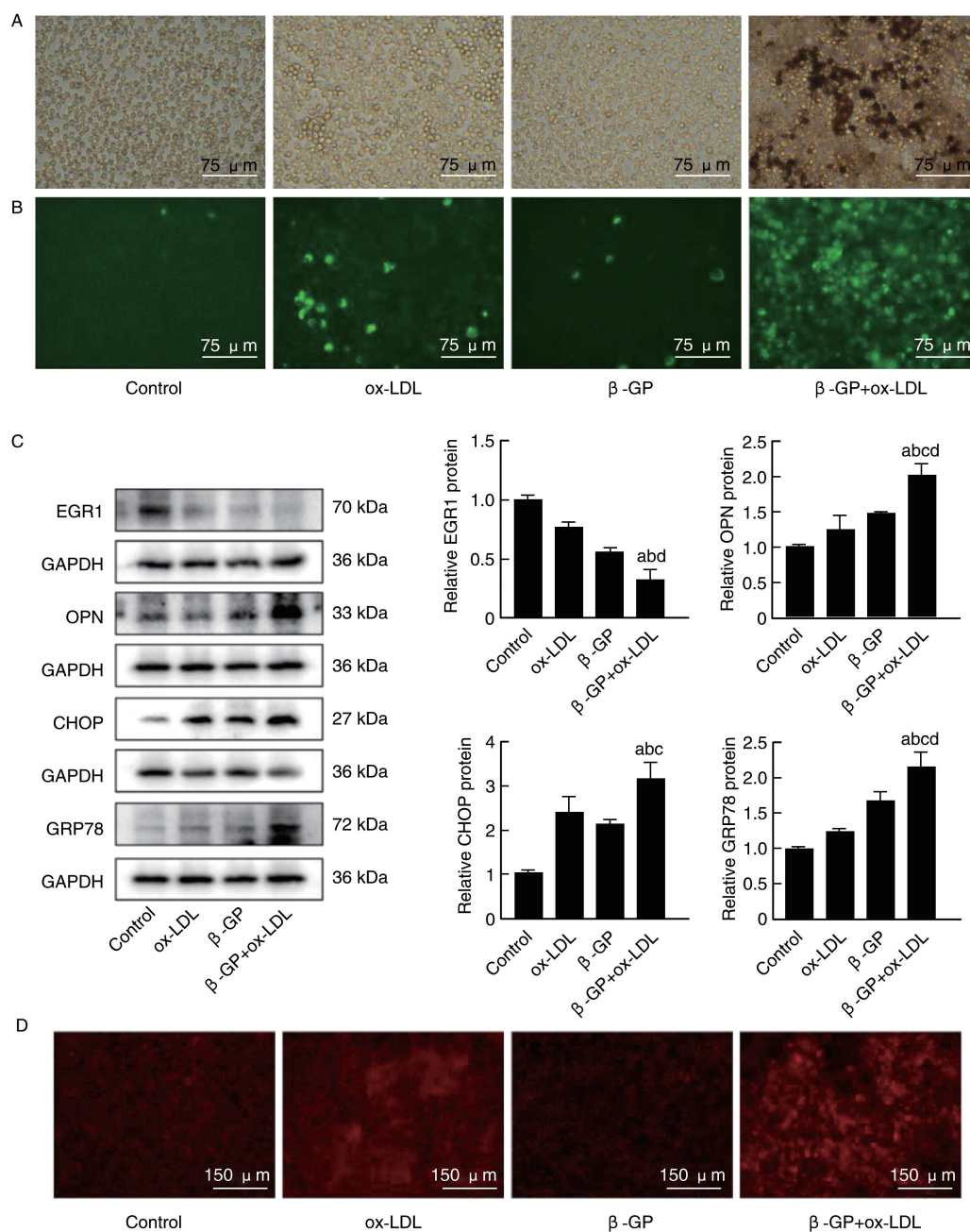


图 5. 巨噬细胞钙化进程中 EGR1 的表达与内质网应激的发生($n=3$)

A 为 von Kossa 染色检测细胞间钙盐沉积水平, B 为钙离子荧光探针检测细胞内钙离子含量, C 为 Western blot 检测巨噬细胞钙化时 EGR1、OPN、CHOP 和 GRP78 的表达, D 为活性氧荧光探针检测细胞内活性氧水平。

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 ox-LDL 组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 β -GP 组比较。

Figure 5. Expression of EGR1 and occurrence of endoplasmic reticulum stress during macrophage calcification process($n=3$)

2.3.2 硫化氢对巨噬细胞 EGR1 的表达及内质网应激的影响 Western blot 结果显示,与 β -GP+ox-LDL 组相比, β -GP+ox-LDL+H₂S 组 EGR1 的表达增加了 21%,CHOP 和 GRP78 的表达分别降低了 58% 和 59%,OPN 的表达降低了 75% (均 $P < 0.01$),提示硫化氢可能通过调控 EGR1 的表达和内质网应激抑制巨噬细胞钙化。von Kossa 染色显示, β -GP+ox-LDL+H₂S 组钙盐沉积显著减少;钙离子荧

光探针检测显示, β -GP+ox-LDL+H₂S 组荧光强度显著低于 β -GP+ox-LDL 组。与 β -GP+ox-LDL 组相比,4-PBA 干预后 OPN、CHOP 和 GRP78 的表达分别降低了 73%、51% 和 97% ($P < 0.01$)。活性氧荧光探针检测显示,4-PBA 干预后活性氧水平显著低于 β -GP+ox-LDL 组(图 6)。以上结果表明,硫化氢可能通过调控 EGR1 的表达和内质网应激发挥抗钙化作用。

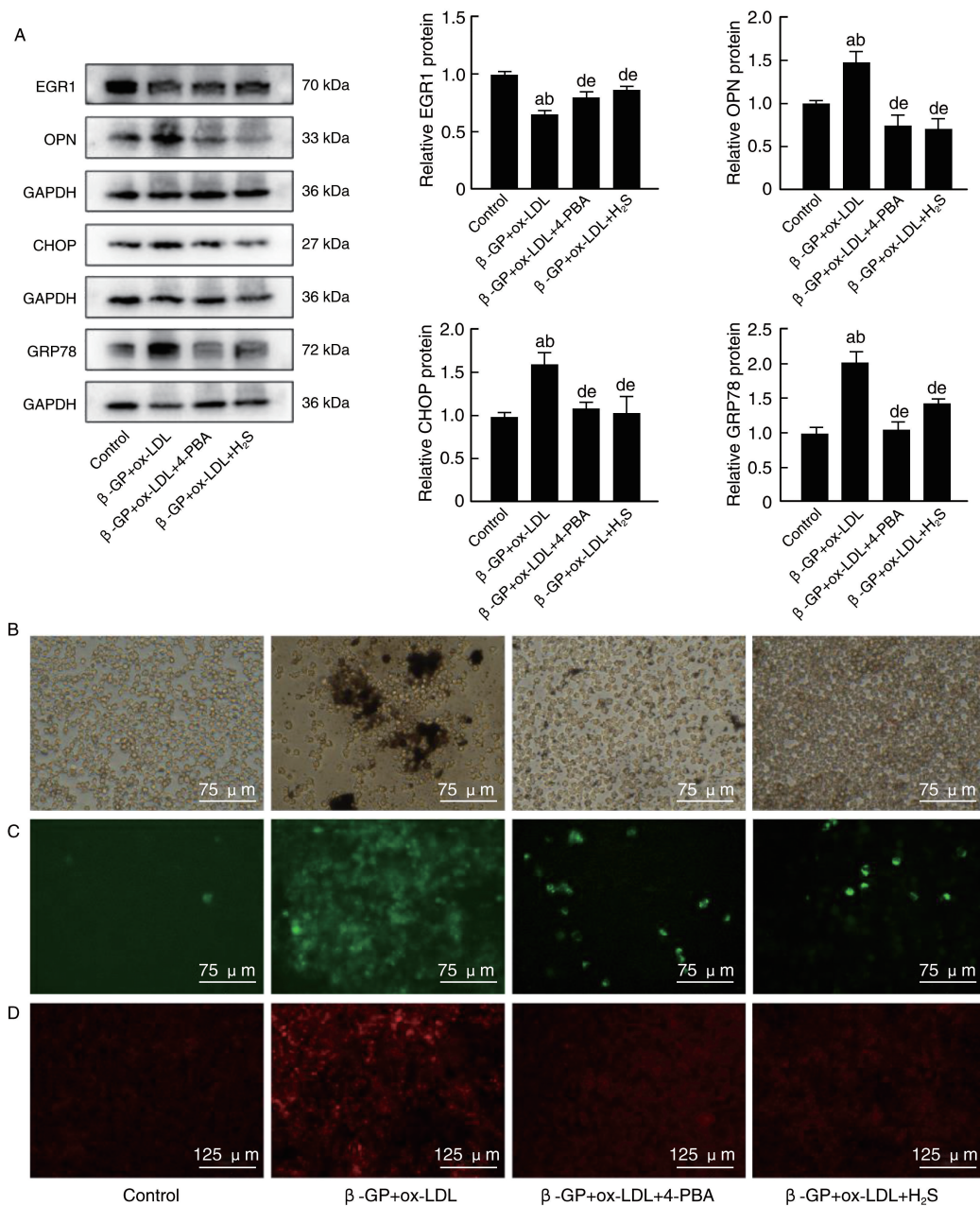


图 6. 硫化氢对巨噬细胞 EGR1 的表达及内质网应激的影响($n=3$)

A 为 Western blot 检测 EGR1、OPN、CHOP 和 GRP78 的表达,B 为 von Kossa 染色检测细胞间钙盐沉积,

C 为钙离子荧光探针检测细胞内钙离子含量,D 为活性氧荧光探针检测细胞内活性氧水平。

a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与对照组比较;c 为 $P < 0.05$,d 为 $P < 0.01$,与 β -GP+ox-LDL 组比较。

Figure 6. Effect of hydrogen sulfide on the expression of EGR1 in macrophages and endoplasmic reticulum stress($n=3$)

2.3.3 硫化氢经 EGR1 调控内质网应激影响巨噬细胞钙化 Western blot 结果显示,与 β -GP+ox-LDL+NC 组相比, β -GP+ox-LDL+H₂S+NC 组 EGR1 的表达增加了 35%,CHOP 和 GRP78 的表达分别降低了 62% 和 48%,OPN 的表达降低了 62% (均 $P < 0.01$)。敲低 EGR1 后,硫化氢对 OPN、CHOP 和 GRP78 表达的调控作用被显著抑制 ($P < 0.05$),提示 EGR1 可能是硫化氢发挥抗钙化作用的关键分子。von Kossa 染色显示,与 β -GP+ox-LDL+NC 组相

比, β -GP+ox-LDL+H₂S+NC 组钙盐沉积显著减少,而敲低 EGR1 后这种保护作用被显著削弱。钙离子荧光探针检测显示, β -GP+ox-LDL+H₂S+NC 组荧光强度显著低于 β -GP+ox-LDL+NC 组,而 β -GP+ox-LDL+H₂S+shEGR1 组荧光强度显著回升。活性氧荧光探针检测显示, β -GP+ox-LDL+H₂S+NC 组活性氧水平显著降低,而敲低 EGR1 后活性氧水平显著升高(图 7)。以上结果表明,硫化氢可能通过 EGR1 调控内质网应激影响巨噬细胞钙化。

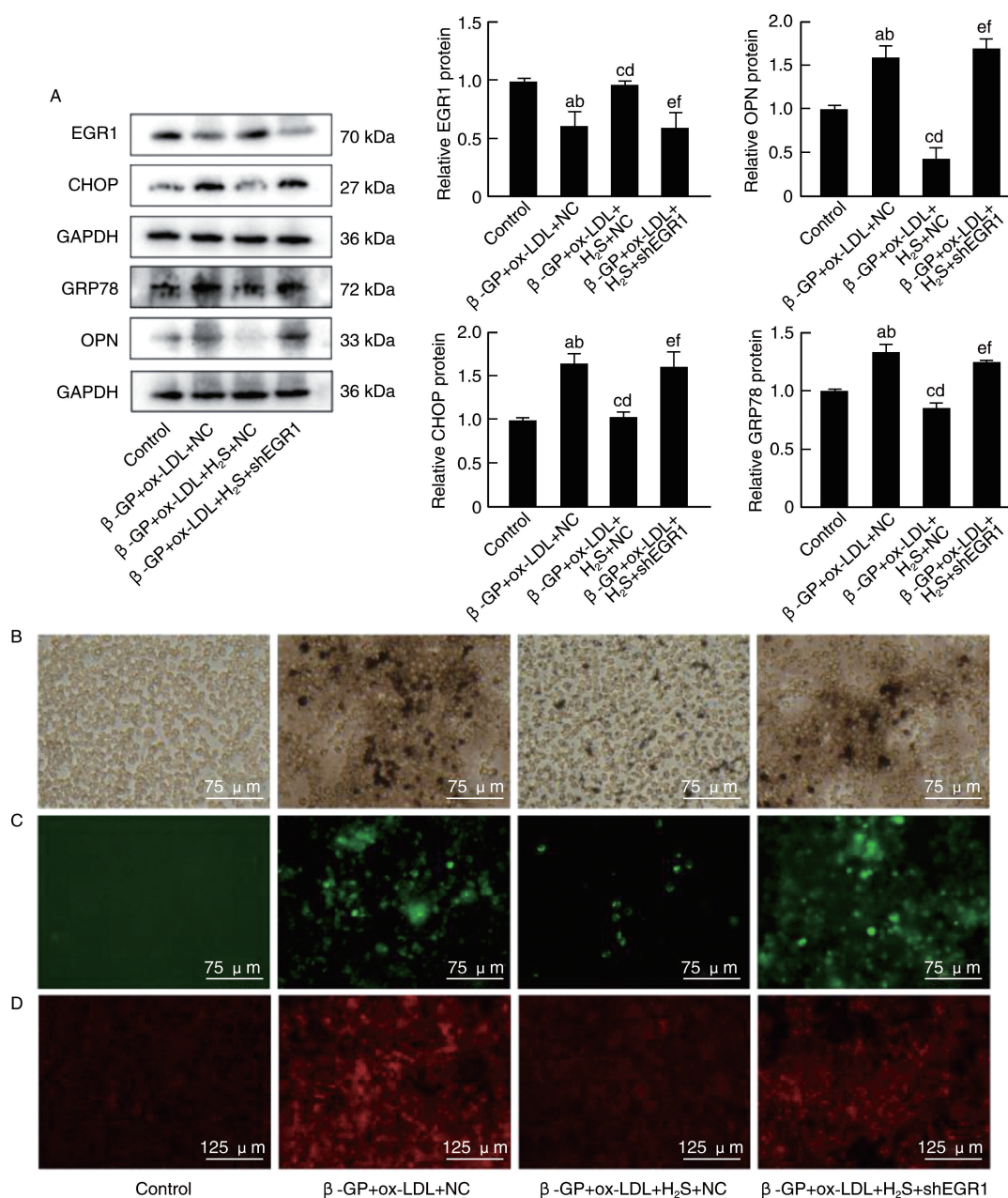


图 7. 硫化氢经 EGR1 调控内质网应激影响巨噬细胞钙化 ($n=3$)

A 为 Western blot 检测 EGR1、OPN、CHOP 和 GRP78 的表达, B 为 von Kossa 染色检测细胞间钙盐沉积, C 为钙离子荧光探针检测细胞内钙离子含量, D 为活性氧荧光探针检测细胞内活性氧水平。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 β -GP+ox-LDL+NC 组比较; e 为 $P < 0.05$, f 为 $P < 0.01$, 与 β -GP+ox-LDL+H₂S+NC 组比较。

Figure 7. Hydrogen sulfide affected macrophage calcification by regulating endoplasmic reticulum stress via EGR1

3 讨论

硫化氢作为一种环境污染的有毒气体,对人类健康构成了重大威胁,是导致空气和水体污染以及若干职业病的罪魁祸首^[4-6]。研究指出,超出正常生理剂量的硫化氢会对人体的中枢神经和呼吸系统产生抑制作用。然而,在近年来的科学研究中,人们逐渐认识到硫化氢也具有对人体有益的特性。与一氧化氮和一氧化碳等信号分子类似,硫化氢在生物体内或许承担着不可或缺的角色。

众多研究指出,在心血管疾病的发展过程中,血管钙化是一种普遍的病理现象^[7-9]。特别是动脉粥样硬化,其进程常常伴随着血管壁钙盐沉积,尤其是在斑块晚期阶段,内膜的钙化现象尤为显著。这一现象加剧了斑块的不均匀受力,增加了易损斑块的数量,加速了血栓形成的过程。在动脉粥样硬化和血管钙化的形成机制中,巨噬细胞的功能、形态及代谢的改变扮演了关键角色。巨噬细胞释放的骨形成相关蛋白是促进细胞间钙盐沉积和表型转变的核心因素。此外,通过 PKC/MAPK 信号途径,巨噬细胞释放的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子还可以进一步促进钙化的发生和发展。

已有文献证实, β -GP 是促进细胞内钙磷沉积的关键因素之一^[10]。血管平滑肌细胞经过连续 10 天的 β -GP 处理,能够形成明显的钙化点,进而构建出平滑肌细胞钙化模型。本研究采用 β -GP 与 ox-LDL 共同作用,构建巨噬细胞钙化模型。实验显示,5 mmol/L β -GP 与 40 g/L ox-LDL 的作用下,细胞出现显著的钙盐沉积现象,细胞内钙含量显著增高。以此模型为基础,本研究深入探讨了硫化氢对巨噬细胞钙化的影响,目的是寻找新的治疗手段和策略,以应对动脉粥样硬化的形成与进展。

内源性硫化氢的转化路径^[11-13]包括以下几种方式:首先,线粒体将硫化氢转化为硫代硫酸盐,进而形成亚硫酸盐及硫酸盐(为主要产物)。其次,硫化氢与高铁血红蛋白结合,形成硫血红蛋白,这一过程同样涉及一氧化氮和一氧化碳的代谢途径。第三,硫化氢与过氧亚硝酸盐发生反应,并且还与过氧化氢、超氧阴离子、次氯酸根起作用,这可能与机体清除自由基的机制相关。最后,硫化氢可被硫氰酸酶分解^[14-16]。由此可见,许多因素都可能影响硫化氢的作用效果。研究表明,氧化应激参与了许多病理过程,如动脉粥样硬化、老年痴呆、癌症等。在心血管疾病中,高脂、高血压等多个重要的致病因素都可以通过激活胞内的氧化压力通路,选

择性上调炎症因子的表达。不同种类的氧化应激可激活内皮细胞并诱导活性氧生成,活性氧自身及其调控的目标分子都能激活炎症相关基因。

本研究结果发现,硫化氢能够显著抑制巨噬细胞钙化,且呈剂量和时间依赖性。100 μ mol/L NaHS 处理 4 天效果最为显著,细胞间钙盐沉积显著减少,细胞内钙含量显著降低,钙化标志蛋白 OPN 的 mRNA 和蛋白表达也明显降低。已有研究表明,硫化氢可通过多种机制影响疾病进展,例如通过抑制炎症反应、减少氧化应激和调节细胞凋亡等^[17-18]。然而,关于硫化氢在巨噬细胞钙化中的具体作用机制尚未完全阐明。本研究从 EGR1 和内质网应激的角度揭示了硫化氢的抗钙化机制,为相关研究提供了新的方向。

EGR1 是一种重要的转录因子,参与调控细胞增殖、分化和应激反应等多种生物学过程^[17]。本研究发现,硫化氢显著上调 EGR1 表达,而干扰 EGR1 表达则完全抵消了硫化氢对 OPN 表达和钙盐沉积的抑制作用,提示 EGR1 可能是硫化氢发挥抗钙化作用的关键分子。然而,EGR1 在巨噬细胞钙化中的具体调控机制仍需进一步研究。

内质网应激是细胞应对内质网功能紊乱的一种保护性反应,但其过度激活可导致细胞凋亡和功能障碍^[18]。本研究发现,硫化氢显著抑制内质网应激标志物 CHOP 和 GRP78 的表达,而内质网应激抑制剂 4-PBA 可显著下调 OPN 表达,提示内质网应激可能参与巨噬细胞钙化的调控。这一结果在血管平滑肌细胞钙化的研究中得到了佐证, Lee 等^[19]研究发现 C5a-C5aR1 可诱导内质网应激,进而激活 PERK/eIF2 α /ATF4 通路,加速血管平滑肌细胞成骨转分化。此外,另一些研究同样也证实了这一观点^[20-21]。然而,关于内质网应激在巨噬细胞钙化中的作用机制目前仍不明确。

本研究提出硫化氢可能通过 EGR1/内质网应激轴抑制巨噬细胞钙化的假说。具体而言,硫化氢通过上调 EGR1 表达,进而抑制内质网应激和活性氧生成,最终减轻巨噬细胞钙化。这一假说得到了多项实验结果的支持:首先,硫化氢显著上调 EGR1 表达;其次,硫化氢显著抑制内质网应激标志物 CHOP 和 GRP78 的表达;最后,干扰 EGR1 表达完全抵消了硫化氢对 OPN 表达及钙盐沉积的抑制作用。尽管本研究揭示了硫化氢通过 EGR1/内质网应激轴抑制巨噬细胞钙化的分子机制,但仍存在一些局限性:首先,本研究仅基于细胞实验,未来需通过动物实验进一步验证;其次,EGR1 调控内质网应

激的具体分子机制尚未完全阐明,未来需要通过转录组学和蛋白质组学等技术进行深入研究;最后,硫化氢在巨噬细胞钙化中的作用是否涉及其他信号通路仍需进一步探讨。

综上所述,本研究以硫化氢为切入点,通过模拟巨噬细胞钙化过程,深入分析了硫化氢对巨噬细胞钙盐沉积的作用及其机制,揭示了硫化氢通过上调 EGR1 表达抑制内质网应激,进而显著抑制巨噬细胞钙化的分子机制,为血管钙化的防治提供了新的潜在靶点。未来的研究可进一步探讨 EGR1/内质网应激轴在血管钙化中的作用及其调控机制,为相关疾病的治疗提供新的思路。

[参考文献]

- [1] HOTAMISLIGIL G S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease [J]. *Cell*, 2010, 140 (6): 900-917.
- [2] KIMURA H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions [J]. *Amino Acids*, 2011, 41(1): 113-121.
- [3] PAGEL J I, DEINDL E. Early growth response 1: a transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades [J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2011, 48(4): 226-235.
- [4] LI J, LI M, LI L, et al. Hydrogen sulfide attenuates ferroptosis and stimulates autophagy by blocking mTOR signaling in sepsis-induced acute lung injury [J]. *Mol Immunol*, 2022, 141: 318-327.
- [5] WEN Y, WANG H, ZHU Y. The drug developments of hydrogen sulfide on cardiovascular disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018(1): 4010395.
- [6] 杨超, 薛俊莉, 陶鸽如, 等. 氢分子对血管平滑肌细胞钙化及 AMPK/mTOR 信号通路的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(6): 982-987.
YANG C, XUE J L, TAO G R, et al. Effects of hydrogen molecules on calcification of vascular smooth muscle cells and AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2023, 39(6): 982-987.
- [7] YANG J, MINKLER P, GROVE D, et al. Non-enzymatic hydrogen sulfide production from cysteine in blood is catalyzed by Iron and vitamin B6 [J]. *Commun Biol*, 2019, 2: 194.
- [8] BONETTI J, CORTI A, LEROUGE L, et al. Phenotypic modulation of macrophages and vascular smooth muscle cells in atherosclerosis-nitro-redox interconnections [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10 (4): 516.
- [9] CHEN Y, GAO P, HUANG L, et al. A tough nitric oxide-eluting hydrogel coating suppresses neointimal hyperplasia on vascular stent [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 7079.
- [10] PANG Q, WANG P, PAN Y, et al. Irisin protects against vascular calcification by activating autophagy and inhibiting NLRP3-mediated vascular smooth muscle cell pyroptosis in chronic kidney disease [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(3): 283.
- [11] 谢利平, 孙仲煦, 季勇. 气体信号分子与动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(4): 304-311.
XIE L P, SUN Z X, JI Y. Gasotransmitters and atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(4): 304-311.
- [12] 宣柳, 刘增辉, 马箴, 等. 外源性硫化氢抑制动脉粥样硬化形成机理探讨 [J]. *中国临床保健杂志*, 2024, 27(3): 378-381.
XUAN L, LIU Z H, MA Z, et al. Mechanism of exogenous hydrogen sulfide inhibiting atherosclerosis [J]. *Chin J Clin Health*, 2024, 27(3): 378-381.
- [13] 陈诚, 张钰, 彭瑜, 等. 血管平滑肌细胞表型的成骨转换与血管钙化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(7): 627-633.
CHEN C, ZHANG Z, PENG Y, et al. Osteogenic transition of vascular smooth muscle cells phenotype and vascular calcification [J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(7): 627-633.
- [14] LI H W, XIAO F Y. Effect of hydrogen sulfide on cardiomyocyte apoptosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury via the JNK signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(4): 2054-2061.
- [15] LIU F, YUAN L, LI L, et al. S-sulphydration of SIRT3 combats BMSC senescence and ameliorates osteoporosis via stabilizing heterochromatic and mitochondrial homeostasis [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 192: 106788.
- [16] TESTAI L, CITI V, MARTELLI A, et al. Role of hydrogen sulfide in cardiovascular ageing [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160: 105125.
- [17] AGHAGOLZADEH P, RADPOUR R, BACHTLER M, et al. Hydrogen sulfide attenuates calcification of vascular smooth muscle cells via KEAP1/NRF2/NQO1 activation [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 265: 78-86.
- [18] WANG R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed [J]. *Physiol Rev*, 2012, 92(2): 791-896.
- [19] LIU A, CHEN Z, LI X, et al. C5a-C5aR1 induces endoplasmic reticulum stress to accelerate vascular calcification via PERK-eIF2 α -ATF4-CREB3L1 pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 119 (15): 2563-2578.
- [20] DUAN X, ZHOU Y, TENG X, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in vascular calcification [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 387(4): 694-699.
- [21] FURMANIK M, VAN GORP R, WHITEHEAD M, et al. Endoplasmic reticulum stress mediates vascular smooth muscle cell calcification via increased release of GRP78 (glucose-regulated protein, 78 kDa)-loaded extracellular vesicles [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(2): 898-914.

(此文编辑 文玉珊)