

· 论 著 ·

血清 H₂S 水平与骨密度的相关性初步研究

郝彦明¹ 王洪震¹ 何大伟² 方玲娜³ 张盼盼² 陆荣柱² 徐又佳⁴ 李翀^{1*}

1. 昆山市第一人民医院骨科, 江苏 昆山 215300

2. 昆山市第一人民医院实验检验中心, 江苏 昆山 215300

3. 昆山市第一人民医院内分泌科, 江苏 昆山 215300

4. 苏州大学附属第二医院骨科, 江苏 苏州 215004

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 02-0182-03

摘要: 目的 血清 H₂S 水平与骨质疏松的相关性。方法 收集 2015 年 10 月至 2017 年 10 月 112 例在江苏昆山地区体检和门诊就诊人员的资料, 其中男 82 例, 女 30 例, 年龄 25~86 岁, 平均 (51.40±10.60) 岁; 采用 DEXA 骨密度仪检测该人群的骨密度, 以及采用亚甲基蓝法测定血清 H₂S 水平。结果 体内血清 H₂S 水平与髋部骨密度呈正相关, 与腰椎骨密度无明显相关性。结论 血清 H₂S 水平与髋部骨密度存在相关, 可能是髋部骨密度下降的独立危险因素, H₂S 可能是骨密度的保护因素。

关键词: 骨质疏松; 硫化氢; 骨密度; 髋部骨折

Preliminary study of the correlation between serum H₂S and bone mineral density

HAO Yanming¹, WANG Hongzhen¹, HE Dawei², FANG Lingna³, ZHANG Panpan², LU Rongzhu², XU Youjia⁴, LI Chong^{1*}

1. Department of Orthopedics, the First People's Hospital of Kunshan, Kunshan 215300

2. Experimental Center, the First People's Hospital of Kunshan, Kunshan 215300

3. Department of Endocrinology, the First People's Hospital of Kunshan, Kunshan 215300

4. Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Suzhou, Suzhou 215004, China

* Corresponding author: Li C, Email: a3878072@163.com

Abstract: **Objective** To study the correlation between serum H₂S and osteoporosis. **Methods** From October 2015 to October 2017, 112 cases were collected from individuals attended physical examination or clinics in Jiangsu Kunshan area, 82 cases were male, 30 were female, age ranged 25-86 years, with an average of 51.40±10.60 years. Bone mineral density (BMD) was measured by dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA), and the methylene blue method was used for the determination of serum H₂S levels. **Results** Serum H₂S levels positively correlated with BMD at the hip, but had no significant correlation with BMD at the spine. **Conclusion** Serum H₂S level is associated with hip bone mineral density, thus could be an independent risk factor for the decrease of bone density in the hip, and H₂S may also be a protective factor for bone density.

Key words: osteoporosis; hydrogen sulfide; bone mineral density; hip fracture

骨质疏松作为一种患病率、致残率和致死率均非常高的慢性疾病,以骨量减少、骨脆性增加、骨折风险增高为特征,是中老年骨痛和骨折的主要原因。但目前治疗骨量丢失的常见药物有钙剂、维生素 D、降钙素、雌激素、二膦酸盐、选择性的雌激素受体激动剂等,并且最新的 Meta 分析提示服用钙剂和维生素 D 不能降低骨质疏松患者骨折风险^[1];长期使用

二膦酸盐可导致一些副作用,如:食管炎、特殊骨折、下颌坏死、房颤等,所以需要进一步研究安全有效的预防骨量减少和治疗骨质疏松症的新策略、新靶点。

硫化氢(H₂S)被证实是继 CO、NO 后存在于体内的第 3 种内源性气体分子,有着广泛的生物学效应,心血管系统、神经系统、肌肉等组织系统中均有广泛的分布,参与许多生理和疾病的病理生理过程。近年来,不断有研究发现 H₂S 在骨代谢以及骨质疏松、骨关节炎等疾病中也有着重要的调控作用,可能成为治疗骨质疏松症的新靶点。本研究团队针对血清 H₂S 水平与骨质疏松的相关性做了初步研究,目

基金项目: 苏州市科技指导项目(syds2016031); 昆山市社会发展科技专项(ks1531)

* 通信作者: 李翀, Email: a3878072@163.com

的是研究体内血清 H_2S 水平含量与骨质疏松指标的相关意义,探寻抗骨质疏松新的靶点和治疗措施。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2015 年 10 月至 2017 年 10 月,112 例江苏昆山地区体检和门诊就诊人员资料,受检骨密度和血常规(血清 H_2S 检测使用血常规检查后血样)的患者,其中男 82 例,女 30 例,年龄 25~86 岁,平均 (51.40 ± 10.60) 岁。排除标准^[2]:(1)多发骨折、开放性骨折、暴力性骨折(交通伤、坠落伤等);(2)合并慢性肝肾疾病、代谢性疾病、肿瘤、血液系统疾病;(3)行卵巢切除术;(4)长期接受糖皮质激素、雌激素、降钙素以及双膦酸盐等治疗,患者均知情同意,且本研究获得昆山市第一人民医院伦理委员会批准。

1.2 检测指标

1.2.1 骨密度检测。对昆山地区体检和门诊就诊人员采用美国 Lunar 公司 DPX-NP 双能 X 线骨密度仪检测髌部和腰椎(L_{1-4})骨密度,自动生成 T 值;其中 $T \geq -1.0$ 为正常, T 值位于 $-1.0 \sim -2.5$ 为骨量减低, $T \leq -2.5$ 为骨质疏松症^[3]。

1.2.2 血清相关指标测定。选取检查骨密度患者的血常规血样,血常规行急查后立即离心血清,保存于 -80°C 冰箱,以待统一检测血清硫化氢浓度,采用德国 TSZ 人硫化氢 ELISA 试剂盒,目录号:hg14903,试剂存储在 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$,使用试剂盒检测 H_2S 水平,使用纯化的抗体涂层微孔平板,制作固相抗体,样品包括标准已知浓度和未知被移进包被微孔,孵育后加入生物素化抗 IgG,结合链霉亲和素洗后成为抗体-抗原-酶-抗体复合物完全,加入 TMB 底物 TMB 显色溶液,溶液变成蓝色,在 HRP 酶催化下,在酸的作用下最终变成黄色,这种有色产品的强度与样品中 H_2S 的浓度相关,测定光密度(OD)在 450 nm 的微孔板的读数,通过标准计算 H_2S 浓度曲线。计算结果平均定量,重复读数控制,并减去平均零标准样品的光密度。绘制标准曲线,通过绘制每个标准轴上的平均吸光度与浓度的曲线。X 轴通过图 1 上的点绘制最佳拟合曲线。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件(IBM 公司,美国)进行统计学分析。以血清 H_2S 浓度为自变量,髌部和腰椎骨密度分别作为因变量,行 Pearson 相关性分析;行多元回归分析以及偏相关分析。检验水准取值取双侧 0.05。

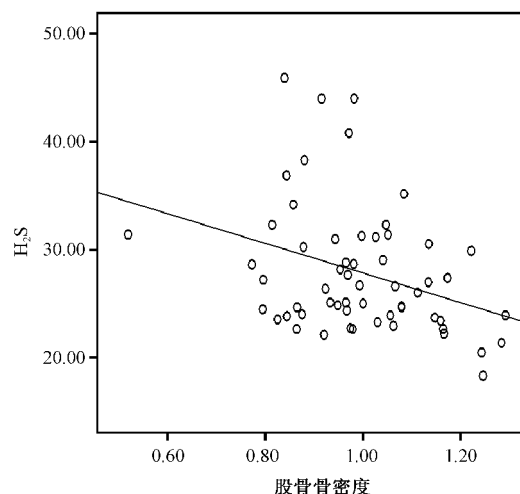


图 1 血清 H_2S 浓度与股骨骨密度行 Pearson 相关性分析
Fig. 1 Pearson correlation analysis between serum H_2S concentration and femoral bone mineral density

2 结果

昆山地区受检人员测定的骨密度和血清 H_2S 相关性分析,以血清 H_2S 浓度为变量的自变量,髌部和腰椎骨密度分别作为因变量,行 Pearson 相关性分析,其中血清 H_2S 浓度与腰椎骨密度相关分析得出相关系数 $r = -0.161$, $P > 0.05$,血清 H_2S 浓度与腰椎骨密度无显著相关性;但是血清 H_2S 浓度与髌部股骨骨密度相关分析得出 $r = -0.376$, $P < 0.05$,血清 H_2S 浓度与髌部股骨骨密度有显著相关性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究团队是首次报道通过人体临床研究血清 H_2S 与骨密度的相关性。本研究团队在该临床研究中建立了血清 H_2S 检测方法,收集了江苏昆山地区 112 例体检人员,通过 DPX-NP 双能 X 线测定骨密度,亚甲基蓝法检测血清 H_2S 。通过分析发现血清 H_2S 水平与髌部骨密度呈负相关($r = -0.376$, $P = 0.001$),提示内源性 H_2S 可能为骨密度的保护因素。

Vacek 等^[4]通过切除大鼠的卵巢制作绝经后骨质疏松模型,检测大鼠体内内源性 H_2S 水平,观察外源性 H_2S 供体硫氢化钠对 PMOP 的影响。并从细胞自噬的角度探讨 H_2S 抗骨质疏松的可能机制,研究证明 H_2S 参与了动物体内骨的代谢, H_2S 通过抑制氧化应激保护成骨细胞的功能。 H_2S 还

参与了其他多种生理与病理生理过程,具有广泛的生物学效应,逐渐显示出极大的治疗性应用前景。如果进一步研究发现外源性 H_2S 能够抑制 OP 的发生,本研究将为骨质疏松的防治提供新的线索和策略。

H_2S 对非骨骼系统不同程度保护的作用已经有大量研究证实,如保护心肌;保护并预防缺血再灌注引起的损伤^[5]。保护氧化应激引起的神经元的损伤^[6],同样,Xu 等^[7]通过细胞层面研究证明合适浓度 H_2S 对骨系统也发挥正面效果, H_2S 可以通过抑制离体成骨细胞的氧化应激对骨质疏松起到保护作用, H_2S 能保护氧化应,应激诱导成骨细胞的损伤,保护成骨细胞的功能。

Dhonukshe-Rutten 等^[8]通过对破骨细胞研究认为, H_2S 可以通过 H_2S 供体 GYY4137 促使破骨细胞分化的加速度,并且增加破骨细胞内水平的抗氧化剂谷胱甘肽,抑制破骨细胞生成 RANKL 刺激巨噬细胞,但该结论和机理还存在一定争论,需要进一步研究。而本研究通过阅读相关文献给予简单总结:引起的氧化应激还是抗氧化防御,取决于细胞的氧化还原状态的细胞功能双面效果,笔者推测^[9] RANKL 诱导的破骨细胞向哪方面分化是取决于前体细胞是受由产生 H_2S 的 CSE 调节氧化还原状态。

在动物模型方面,研究发现 H_2S 可以治疗雌激素缺乏引起的骨量丢失,调节 H_2S 水平可以调控雌激素刺激的成骨细胞和骨形成一种新的机制,并且调控 H_2S 水平是治疗绝经后骨质疏松的一种方法^[10]。

对于 H_2S 如何参与骨代谢,笔者总结认为, H_2S 通过 OPG/RANKL 通路而影响成骨细胞与破骨细胞的代谢。在成骨细胞方面,通过刺激破骨细胞成熟的过程中 OPG/RANKL 而发挥作用,RANKL 与破骨细胞表面的 RANK 结合后激活 NF- κ B 和 c-Fos、钙调磷酸酶等促使破骨细胞成熟而促进骨吸收,但 OPG 竞争性抑制 RANKL 与破骨细胞膜上的 RANK 结合,抑制破骨细胞前体的分化,诱导破骨细胞凋亡而抑制骨的吸收^[11]。并且通过动物模型研究^[12]证实,去卵巢骨质疏松大鼠股骨组织中 OPG 的表达明显降低,相反,RANKL 表达增加;外源性 H_2S 供体 NaHS (50、100 μ mol/kg) 上调大鼠股骨组织中 OPG 的表达,降低了 RANKL 的表达。

本研究团队持续在进行 H_2S 与骨代谢的进一步研究。血清 H_2S 浓度与腰椎高密度相关分析有显著相关性,但与腰椎骨密度相关分析无显著相关性。笔者将进一步增加样本量进行相关研究,并且

调查分析其他种族人群如我国新疆维吾尔族地区喜欢饮食含硫食物,能够为人体提供 H_2S ,可能有缓解骨量减少的作用。通过观察维吾尔族居民膳食有机硫摄入量对骨量的影响,明确 H_2S 是否对人体骨量有保护作用。此外,CBS、CSE 和 MPST 是人体内 H_2S 代谢的关键酶,可调节内源性 H_2S 水平,探讨该 3 种酶的基因多态性与骨量的关系,可为骨质疏松症的易感性的生物学标志物提供重要参考,同时为预防骨丢失提供新策略。

【参 考 文 献】

- [1] Zhao JG, Zeng XT, Wang J, et al. Association between calcium or Vitamin D supplementation and fracture incidence in community-dwelling older adults: A systematic Review and meta-analysis [J]. JAMA, 2017, 318(24): 2466-2482.
- [2] Wood JC. Cardiac iron across different transfusion dependent diseases [J]. Blood Rev, 2008, 22(Suppl 2): 14-21.
- [3] Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women [J]. Osteoporos Int, 2013, 24(1): 23-57.
- [4] 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(1): 117-123.
- [5] Elrod J W, Calvert J W, Morrison J, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(39): 15560-15565.
- [6] Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress [J]. Faseb, 2004, 18(10): 1165-1167.
- [7] Xu ZS, Wang XY, Xiao DM, et al. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H_2O_2 -induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(10): 1314-1323.
- [8] Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, de Groot LC, et al. Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people [J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(6): 921-929.
- [9] 郝彦明,李翀,张盼盼.新型气体信号分子 H_2S 与骨代谢的研究概况 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(10): 1341-1344.
- [10] Grassi F, Malik Tyagi A, Calvert JW, et al. Hydrogen sulfide is a novel regulator of bone formation implicated in the bone loss induced by estrogen deficiency. J Bone Miner Res, 2015, 28(10): 1002-1007.
- [11] Yasuda H. RANKL a necessary chance for clinical application to osteoporosis and cancer-related bone diseases [J]. World J Orthop, 2013, 4(4): 207-217.
- [12] Stuss M, Rieske P, Cegowska A, et al. Assessment of OPG/RANK/RANKL gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after treatment with strontium ranelate and ibandronate in patients with postmenopausal osteoporosis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(5): 1007-1011.

(收稿日期: 2018-03-30;修回日期: 2018-05-31)