

硫化氢对 H₂O₂ 所致大鼠胸主动脉损伤的保护作用

陈丽灵, 唐 燕, 刘 振, 孟国梁, 白文莉, 李 莎, 谢利平, 季 勇*

(南京医科大学病理生理学系, 江苏省心血管病分子干预重点实验室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 探讨硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)对过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)引起的大鼠离体胸主动脉损伤的保护作用和机制。方法: 分离正常大鼠胸主动脉, 制备主动脉环, 利用 300 μmol/L H₂O₂ 建立大鼠胸主动脉环氧化应激损伤模型。25、50、100 μmol/L 的硫化氢(sodium hydrosulfide, NaHS)预处理后再用 H₂O₂ 损伤大鼠胸主动脉环, 应用血管功能检测张力仪比较各组舒张功能, 并采用二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)荧光染色法测定活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的生成。Western blot 法检测大鼠胸主动脉环中 ERK1/2 和磷酸化 ERK1/2(p-ERK1/2)蛋白的表达。结果: 300 μmol/L 的 H₂O₂ 可引起大鼠胸主动脉环内皮依赖性舒张功能受损, 50、100 μmol/L 的 NaHS 预处理后该损伤得到明显改善, 使 H₂O₂ 诱发的 ROS 亦显著减少。同时, H₂O₂ 可激活大鼠胸主动脉组织中的 MAPK/ERK 通路, 使其磷酸化水平增加, 而给予 50、100 μmol/L 的 NaHS 预处理后可抑制该作用。结论: 硫化氢对 H₂O₂ 致大鼠胸主动脉氧化应激性损伤有保护作用, 其机制可能与调节 ERK 信号通路有关。

[关键词] 硫化氢; 氧化应激; 舒张功能; ERK

[中图分类号] Q256

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)11-1499-07

Hydrogen sulfide has protective effect against H₂O₂-induced injury in isolated thoracic aorta of rats

CHEN Li-ling, TANG Yan, LIU Zhen, MENG Guo-liang, BAI Wen-li, LI Sha, XIE Li-ping, JI Yong*

(Department of Pathophysiology, Key Laboratory of Cardiovascular Disease and Molecular Intervention in Jiangsu Province, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect and mechanism of hydrogen sulfide(H₂S) on hydrogen peroxide(H₂O₂)-induced injury in isolated thoracic aorta of rats. **Methods:** Thoracic aortic rings were isolated from normal Sprague-Dawley rats, subsequently exposed to 300 μmol/L H₂O₂ to establish an oxidative stress model. The thoracic aortic rings were pre-treated with 25 μmol/L, 50 μmol/L or 100 μmol/L of NaHS followed by incubation with 300 μmol/L H₂O₂. The endothelium-dependent vasorelaxant function of thoracic aortic rings was measured by a pressure transducer coupled to a Labchart V6 System. Production of ROS was evaluated using DHE fluorescent staining assay. The expressions of protein MAPK/ERK1/2 and p-ERK1/2 in thoracic aortic were determined by Western blot analysis. **Results:** H₂O₂ of 300 μmol/L can decrease vasorelaxant function in rats' thoracic aortic rings. Pre-treated with 50 μmol/L or 100 μmol/L of NaHS can attenuate the damage and decrease the production of ROS caused by H₂O₂. H₂O₂ also activated MAPK/ERK pathway in the isolated rats' thoracic aorta, which could be inhibited by NaHS of 50 μmol/L or 100 μmol/L. **Conclusion:** H₂S may have protective effect against H₂O₂-induced injury through ERK signal pathway in isolated thoracic aorta of rats.

[Key words] hydrogen sulfide; oxidative stress; relaxation function; ERK

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(11): 1499-1504, 1526]

氧化应激是指机体在遭受各种有害刺激时, 体内高活性分子如活性氧自由基(reactive oxygen

species, ROS)产生过多, 氧化系统和抗氧化系统失衡, 细胞的氧化还原失调造成细胞、组织的损伤^[1]。氧化应激作为动脉粥样硬化、冠心病等心血管疾病的重要发病机制之一, 可能与低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和脂蛋白(a)(lipoprotein a, Lp(a))的氧化、细胞线粒体内 ROS 大量产生等的氧化

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金重点项目(2011 NJMU264)

*通讯作者, E-mail: yongji@njmu.edu.cn

应激反应有关^[2]。有研究表明心肌细胞氧自由基生成增加引发蛋白质、脂质大分子、酶及DNA的氧化损伤,并进一步作用于能量代谢,最终导致细胞凋亡和坏死^[3]。因此,寻求能够降低氧化应激的物质具有重要意义。

硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是一种内源性气体分子,近年来被认为是继一氧化碳和一氧化氮(nitric oxide, NO)之后的第3种气体信号分子^[4-5],广泛参与机体多种生理和病理过程,在诸多重要器官和系统中发挥清除氧自由基、减少脂质过氧化物等作用^[6]。因此本实验以硫氢化钠(sodium hydrosulfide, NaHS)作为H₂S供体,目的在于探讨其对过氧化氢引起的大鼠离体胸主动脉氧化应激性损伤的保护作用和机制,对氧化应激参与的各种疾病的预防和治疗具有重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物

Sprague-Dawley大鼠,雄性,体重220~240g(南京医科大学实验动物中心提供)。

1.1.2 主要试剂和仪器

NaHS(SI11996848,美国Sigma aldrich公司);乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)(A6625,美国Sigma aldrich公司);OCT包埋剂(4583,美国SAKURA公司);防脱载玻片(AR1065,武汉博士德公司);30%AA母液、TEMED(杭州碧云天公司);兔抗大鼠ERK抗体、兔抗大鼠p-ERK抗体、小鼠抗大鼠β-actin抗体(美国CST公司);HRP标记的兔抗大鼠IgG、HRP标记的小鼠抗大鼠IgG(美国Santa Cruz公司);BCA蛋白质定量试剂盒(美国Pierce公司);SuperSignal ECL发光试剂盒(德国Thermo Fisher Scientific公司);二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)-ROS荧光探针(北京威格拉斯生物技术有限公司);其他试剂未作特殊说明者,均为国产分析纯。

血管功能检测张力仪(美国DMT公司);冰冻切片 机(德国Leica公司);倒置荧光显微镜(eclipse TE2000-S,日本NIKON公司);蛋白电泳仪(美国BIO-RAD公司)。

1.2 方 法

1.2.1 制备胸主动脉环

大鼠经10%的水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉后,迅速打开胸腔,小心分离出胸主动脉,置于预冷的4℃Kreb's液(119 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L

KCl, 1.18 mmol/L KH₂PO₄, 1.17 mmol/L MgSO₄, 25 mmol/L NaHCO₃, 2.5 mmol/L CaCl₂, 0.026 mmol/L EDTA, 5.5 mmol/L Glucose, pH7.4)中,小心去除胸主动脉周围脂肪和结缔组织后,切成长约3 mm的主动脉环。然后将胸主动脉环套挂在预置4 ml Kreb's液的血管功能检测张力仪的浴槽内,保持37℃恒温,持续通以95% O₂和5% CO₂的混合气体,采用Labchart V6实验系统记录主动脉环张力变化。胸主动脉环加静息张力9.8 mN,平衡60 min,期间每15 min换液1次,然后加入6 × 10⁻² mol/L的KCl诱发主动脉环的收缩,待主动脉环收缩至稳定平台后,用37℃Kreb's液洗去KCl。再向浴槽中加入1 × 10⁻⁷ mol/L去氧肾上腺素(phenylephrine, PE),收缩达峰值平台后,依次加入累积浓度为1 × 10⁻⁹、1 × 10⁻⁸、1 × 10⁻⁷、1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁵ mol/L的Ach,加入1 × 10⁻⁶ mol/L Ach后,使PE预收缩的胸主动脉舒张,若舒张80%以上,可认为内皮完整。

1.2.2 大鼠胸主动脉氧化应激损伤模型的建立

将主动脉环随机分为4组,分别为对照组(只加生理盐水)、H₂O₂组(加入200、300、400 μmol/L的H₂O₂)。向H₂O₂各组分别加入200、300、400 μmol/L的H₂O₂,避光孵育60 min后洗去,再向浴槽中加入1 × 10⁻⁷ mol/L PE,收缩达峰值平台后,依次加入累积浓度为1 × 10⁻⁹、1 × 10⁻⁸、1 × 10⁻⁷、1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁵ mol/L Ach,并记录胸主动脉环张力变化,探寻H₂O₂最适浓度。

1.2.3 检测H₂S对损伤大鼠胸主动脉环的舒张功能的影响

将主动脉环随机分为5组,分别为对照组(只加生理盐水)、H₂O₂组(只加300 μmol/L H₂O₂避光处理)、H₂O₂ + NaHS组(25、50、100 μmol/L NaHS避光孵育5 min后,再加300 μmol/L的H₂O₂)。避光孵育60 min后,向浴槽中加入1 × 10⁻⁷ mol/L PE,收缩达峰值平台后,依次加入累积浓度为1 × 10⁻⁹、1 × 10⁻⁸、1 × 10⁻⁷、1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁵ mol/L Ach,记录各组主动脉环张力变化。

1.2.4 DHE荧光染色检测大鼠胸主动脉环的ROS

将上述胸主动脉环小心取出,滤纸吸干,包埋于OCT中,冰冻切片将胸主动脉环切成5 μm厚主动脉环,DHE荧光染色后在倒置荧光显微镜下观察ROS荧光强度,并拍照。用Image-Pro Plus 6.0分析量化荧光强度。

1.2.5 Western blot检测胸主动脉组织中总ERK1/2、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)蛋白的表达

将主动脉环随机分为 5 组,分别为对照组(只加生理盐水)、H₂O₂ 组(只加 300 μmol/L H₂O₂)、H₂O₂ + NaHS 组 (25、50、100 μmol/L NaHS 避光孵育 5 min 后,再加 300 μmol/L 的 H₂O₂)。H₂O₂ 避光孵育 60 min 后,将胸主动脉环组织收集后加入裂解液,于冰上剪碎,冰上裂解 1 h 后,BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 蛋白上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿转转膜仪转膜。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗于 4℃过夜,使用 TBS-T 漂洗后,加二抗,室温孵育 2 h,再用 TBS-T 漂洗,加入 ECL 显影剂后,检测蛋白表达,蛋白条带使用 Image J 软件分析目的条带光密度值。

1.3 统计学方法

应用 Prism 软件进行统计分析,各组数据以平

均值 ± 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示,组间比较采用 one-way ANOVA 分析方法以 Bonferroni test 进行检验,两两比较应用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂O₂ 对胸主动脉环的内皮依赖性舒张功能的影响

200 μmol/L H₂O₂ 组对胸主动脉环的舒张功能无明显损伤,300 μmol/L H₂O₂ 组和 400 μmol/L H₂O₂ 组对胸主动脉环的舒张功能具有明显的损伤作用,但 300 μmol/L H₂O₂ 组和 400 μmol/L H₂O₂ 组之间并无明显差异(表 1)。

表 1 H₂O₂ 对大鼠胸主动脉环舒张功能的影响

Table 1 Influence of H₂O₂ on endothelium-dependent vasorelaxant function of thoracic aortic rings from rats (%)

组别	Ach 浓度 (mol/L)				
	1 × 10 ⁻⁹	1 × 10 ⁻⁸	1 × 10 ⁻⁷	1 × 10 ⁻⁶	1 × 10 ⁻⁵
对照组	21.34 ± 7.70	29.80 ± 5.76	69.63 ± 15.42	97.82 ± 7.13	102.1 ± 1.58
H ₂ O ₂ (200 μmol/L)组	7.10 ± 2.61	13.83 ± 7.06	33.43 ± 9.91	87.39 ± 10.97	96.37 ± 3.79
H ₂ O ₂ (300 μmol/L)组	1.85 ± 0.54	4.47 ± 1.75	23.62 ± 9.00	62.88 ± 15.12*	84.59 ± 19.80
H ₂ O ₂ (400 μmol/L)组	10.14 ± 5.22	15.22 ± 8.57	23.25 ± 6.07	68.42 ± 7.73**	85.44 ± 12.06

与对照组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$, $n = 6$ 。

2.2 H₂S 对损伤胸主动脉环的内皮依赖性舒张功能的作用

相对于对照组,H₂O₂ 组胸主动脉环经 300 μmol/L H₂O₂ 孵育后舒张功能被明显损伤;相对于 H₂O₂ 组,经过 25 μmol/L NaHS 预处理,再经 300 μmol/L

H₂O₂ 孵育后,损伤的舒张功能无明显改善;而经 50、100 μmol/L NaHS 预处理后,胸主动脉环的舒张功能得到明显改善,但两组之间并差异无统计学意义,H₂O₂ + NaHS(100 μmol/L)组和对照组之间也无明显差异(表 2)。

表 2 H₂S 对损伤大鼠胸主动脉环的舒张功能的作用

Table 2 Effect of H₂S on endothelium-dependent vasorelaxant function of H₂O₂-incubated thoracic aortic rings from rats (%)

组别	Ach 浓度 (mol/L)				
	1 × 10 ⁻⁹	1 × 10 ⁻⁸	1 × 10 ⁻⁷	1 × 10 ⁻⁶	1 × 10 ⁻⁵
对照组	11.25 ± 7.46	24.94 ± 11.15	53.24 ± 11.37	95.31 ± 7.65	105.9 ± 6.69
H ₂ O ₂ 组	9.42 ± 3.99	5.61 ± 3.88	19.82 ± 8.92	70.08 ± 5.26*	81.66 ± 9.97
H ₂ O ₂ + NaHS(25 μmol/L)组	12.22 ± 3.73	22.46 ± 7.70	28.71 ± 7.58	66.92 ± 7.00*	85.75 ± 11.97
H ₂ O ₂ + NaHS(50 μmol/L)组	4.67 ± 1.51	9.15 ± 2.05	19.16 ± 5.46	79.89 ± 4.06**	98.57 ± 3.13
H ₂ O ₂ + NaHS(100 μmol/L)组	6.03 ± 2.43	12.17 ± 4.66	14.40 ± 6.58	85.82 ± 5.68###	93.00 ± 7.66

与对照组比较,* $P < 0.001$;与 H₂O₂ 组相比,## $P < 0.05$,### $P < 0.001$, $n = 6$ 。

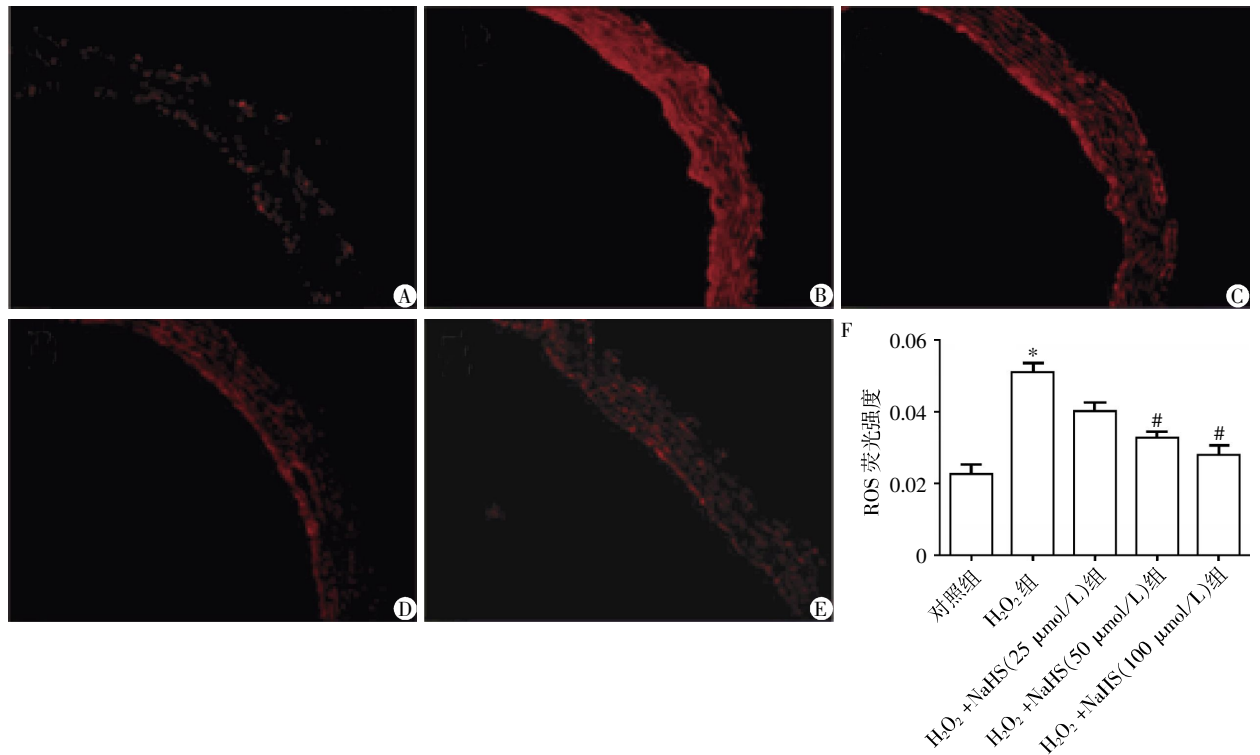
2.3 H₂S 对损伤胸主动脉环的 ROS 生成的作用

胸主动脉环经 DHE 荧光染色、荧光强度分析后发现 H₂O₂ 组胸主动脉环的荧光强度显著强于对照组,相对于 H₂O₂ 组,H₂O₂ + NaHS(25 μmol/L)组荧光强度无明显减弱,H₂O₂ + NaHS(50 μmol/L)组、H₂O₂ + NaHS(100 μmol/L)组荧光强度则明显减弱,提示 H₂S 明显抑制了 ROS 的生成。H₂O₂ +

NaHS(50 μmol/L)组和 H₂O₂ + NaHS(100 μmol/L)组之间并无差异(图 1)。

2.4 H₂S 对损伤胸主动脉环的 ERK 磷酸化水平的影响

H₂O₂ 组的 ERK1/2 磷酸化水平显著高于对照组,50、100 μmol/L NaHS 明显抑制了 p-ERK 的表达,25 μmol/L NaHS 无明显抑制作用(图 2)。



A、B、C、D、E 为 DHE 荧光染色照片($\times 20$)A: 对照组; B: H_2O_2 ; C: H_2O_2 + NaHS(25 $\mu\text{mol/L}$) 组; D: H_2O_2 + NaHS(50 $\mu\text{mol/L}$) 组; E: H_2O_2 + NaHS(100 $\mu\text{mol/L}$) 组; F: 各组 ROS 荧光量统计图。与对照组相比, * $P < 0.001$; 与 H_2O_2 组相比, # $P < 0.001$, $n = 6$ 。

图1 H_2S 对损伤大鼠胸主动脉环的 ROS 生成的作用

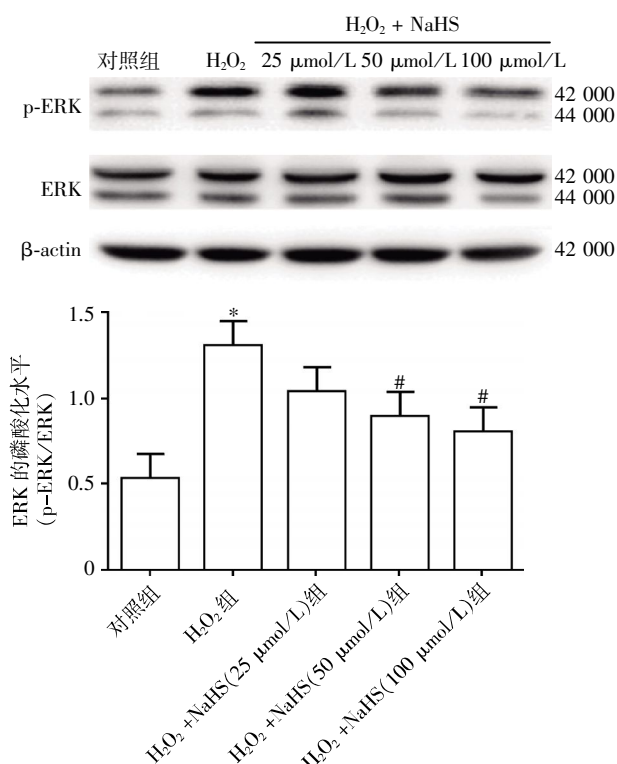
Figure 1 Effect of H_2S on the production of ROS in H_2O_2 -incubated thoracic aortic rings from rats

3 讨论

血管内皮细胞 (vascular endothelial cell, VEC) 除了作为血管壁和血液之间的屏障及传递信息外, 还具有多种生理功能, 包括维持血管结构及平滑肌张力、保持血管收缩及舒张平衡、调节血管细胞生长、调节抗凝及纤溶系统、介导炎症与免疫、调节白细胞与血小板在血管内皮黏附、调节脂质氧化、调节血管通透性等^[7]。近年研究表明, 高血糖、高血脂、吸烟及氧化应激等均会导致血管内皮受损, 进而内皮功能发生障碍, 造成血液中的活性物质发生改变、血小板自凝、血管收缩痉挛、平滑肌细胞增生、血管重塑^[8]。血管内皮功能障碍被公认为是心血管疾病尤其是动脉粥样硬化发生发展的始动环节^[9], 在动脉粥样硬化的发展过程中有重要影响, 主要表现为血管内皮依赖性舒张功能下降和黏附分子的异常表达。血管内皮依赖性舒张功能下降主要是由于内皮细胞合成释放的内皮衍生松弛因子 (endothelium derived relaxing factor, EDRF) 发生了变化, EDRF 的主要成分 NO 分泌异常及活性降低。NO 不仅具有强烈的舒张血管作用, 还可抑制中性粒细胞趋化、聚集及黏附于血管内皮, 抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移,

促进内皮细胞生长, 抑制单核细胞和血小板黏附于血管内皮等。因此, NO 合成减少或生物活性降低, 是导致内皮功能障碍和血管并发症的主要原因^[10]。

在引发血管内皮功能障碍的病理生理过程中, 氧化应激起着重要的作用。 H_2O_2 作为一种重要的 ROS, 极易透过细胞膜, 形成高活性的自由基, 从而介导血管的氧化应激损伤。现有的研究证实高浓度的 H_2O_2 可迅速导致细胞不可逆损伤甚至死亡^[11], 而低浓度 H_2O_2 则能通过激活细胞内各种信号转导机制对细胞造成损伤^[12], 甚至还参与预适应的形成^[13]。有研究利用 H_2O_2 处理人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs), 发现细胞活力明显降低, 增殖受到抑制, 细胞内相应的自由基明显增多, 引起内皮细胞明显的氧化应激损伤^[14]。本实验中, 用 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理大鼠胸主动脉环后, 应用依赖 NO 的血管舒张剂 Ach 舒张 PE 预收缩的胸主动脉环, 发现胸主动脉环内皮依赖性舒张功能的明显下降, ROS 的生成显著增加, 可能与氧化应激损伤了大鼠胸主动脉内皮细胞, 致 EDRF 的主要成分 NO 释放减少及活性降低, 从而引发血管内皮功能障碍有关。本实验结果与文献报道相符, 表明成功建立了胸主动脉氧化应激损伤的模型。



与对照组相比, * $P < 0.001$; 与 H₂O₂ 处理组相比, # $P < 0.05$, $n = 6$ 。

图 2 H₂S 对损伤胸主动脉环的 ERK 的磷酸化水平的影响
Figure 2 Effect of H₂S on the expressions of protein ERK1/2 and p-ERK1/2 in H₂O₂-incubated thoracic aortic rings from rats

H₂S 是一种具有臭鸡蛋气味的无色气体, 曾被认为是致命的毒气, 然而近年来的研究发现包括人类在内的哺乳动物体内都会产生 H₂S, 并证实 H₂S 在呼吸、心血管、神经等多个系统中起着抗氧化应激与保护组织的作用。在氧化应激参与形成低氧性肺动脉高压的过程中, H₂S 发挥了抗氧化作用, 其作用机制部分是通过减少氧化型谷胱甘肽的含量来提高机体的抗氧化能力^[15]。另有研究显示补充 NaHS 可以改善由缺血再灌注或阿霉素中毒所引起的心肌组织的谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量及 γ -谷氨酰半胱氨酸合酶、GSH 合酶、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性的下降^[16-17]。在神经系统中, 脑缺血再灌注损伤大鼠提前给予 NaHS 后, 随着 NaHS 浓度的增加, 脑缺血再灌注后大鼠海马中 H₂S 增加, 同时血红素加氧酶 (heme oxygenase, HO) 活性提高, HO-1 mRNA 表达增加。而 HO-1 是细胞对抗应激反应和抗氧化损伤的重要组成部分^[18]。

心血管组织中内源性 H₂S 主要通过胱硫醚- γ -裂解酶 (cystathionine- γ -lyase, CSE) 的催化产生, 在心血管系统中发挥重要的生理作用, 包括负性肌力、

舒张血管、抑制血管重构等^[16]。近年研究发现, 缺血心肌组织中 H₂S 水平下降, 外源性给予 H₂S 供体 NaHS 后可减少心内膜下心肌细胞坏死、炎性细胞浸润、脂质过氧化产物沉积^[19]。彭湘萍等^[20]利用氧化高密度脂蛋白 (ox-HDL) 致 HUVECs 受损, 预处理 NaHS 可以提高细胞存活率, 降低损伤细胞的丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 及乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)。其中, MDA 是脂质过氧化的代谢产物, 其含量代表氧自由基的水平及脂质过氧化的程度。LDH 是一种糖酵解酶, 存在于细胞的胞质内, 当细胞受损、细胞膜完整性破坏后, 培养液中 LDH 水平会增高, 故其活性可反映细胞损伤程度。另有研究显示, 对大鼠乳鼠心肌细胞体外给予 NaHS 可以拮抗 H₂O₂ 引起的心肌细胞 MDA 水平升高, 抑制心肌细胞凋亡, 发挥心肌保护作用, 升高超氧阴离子的有效清除剂——SOD 水平^[21]。然而, H₂S 对氧化应激造成主动脉损伤的保护作用尚未见报道, 为了验证 H₂S 是否对 H₂O₂ 所致大鼠胸主动脉氧化应激性损伤具有保护作用, 我们以 NaHS 作为 H₂S 的供体, 发现外源性 H₂S 可以明显减少损伤胸主动脉环组织中的 ROS 生成, 结果与文献报道 H₂S 的抗氧化作用相符。另外, H₂S 还明显改善 H₂O₂ 损伤的胸主动脉环内皮依赖性舒张功能。已知氧化应激可导致血管内皮功能障碍, 结合本实验结果, H₂S 对损伤胸主动脉环的内皮依赖性舒张功能的改善作用机制可能与 H₂S 直接清除氧自由基和减少脂质过氧化反应, 保护内皮细胞有关。

为了进一步探究 H₂S 抗氧化作用的机制, 我们检测了主动脉环中的 ERK 磷酸化水平。ERK 为细胞外信号调节激酶, 是 MAPK 家族信号通路成员之一, 它包括两种异构体 ERK1 和 ERK2^[22], 主要由细胞因子、生长因子介导, 参与促进有丝分裂, 从而促进细胞的增殖、分化。研究证实, 抑制 ERK 会导致细胞在自由基损伤时的凋亡增加, 激活的 ERK 可促进胞浆靶蛋白磷酸化或调节其他蛋白激酶活性, 促进多种转录因子磷酸化, 增强转录活性^[23-24]。有关氧化应激和 ERK 的研究显示, 氧化应激可直接造成细胞的 DNA 损伤, 进而可引起 MAPK 信号转导通路激活, ERK 活性上调^[25], 从而适应性地修复 DNA 损伤。多个研究证实氧化应激可诱导血管平滑肌细胞中的生长因子 Cyclophilin A (CyPA) 的表达和分泌增加, 并可由细胞内分泌至细胞外, 从而介导活性氧对 ERK1/2 的激活^[26-27]。磷酸化作为大多数酶的活性形式, 本实验主要观察了磷酸化 ERK 的蛋白表

达。实验中,我们观察到 H_2O_2 可诱导 ERK 磷酸化水平的明显增加, H_2S 则抑制被 H_2O_2 激活的 ERK 磷酸化水平,可能与 H_2S 直接通过抑制 ROS 的生成、减轻 DNA 的损伤,进而抑制氧化应激上调 ERK 磷酸化水平的作用有关。而 H_2S 是如何抑制 ERK 的磷酸化水平至今并不明确,是否与通过上调抗氧化因子即核因子相关因子 2^[28-29]、线粒体解偶联蛋白 2^[30] 的表达以及增强含锰超氧化物歧化酶的活性等^[31-32],从而发挥抗氧化的作用有待进一步研究。

本实验验证了 H_2S 对大鼠胸主动脉氧化应激性损伤有保护作用,其机制可能与调节 ERK 信号通路有关,为进一步研究 H_2S 对循环系统氧化应激相关疾病的防治提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] Silva JE, Rabelo R. Regulation of the uncoupling protein gene expression [J]. *Eur J Endocrinol*, 1997, 136 (3): 251-264
- [2] Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84 (4): 1381-1478
- [3] Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115 (3): 500-508
- [4] Moore PK, Bhatia M, Mochhala S. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24 (12): 609-611
- [5] Wang R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? [J]. *FASEB J*, 2002, 16 (13): 1792-1798
- [6] 王洪瑾. 硫化氢与氧化应激 [J]. *医学研究生学报*, 2011, 24 (4): 433-436
- [7] Cooke JP. The endothelium; a new target for therapy [J]. *Vasc Med*, 2000, 5 (1): 49-53
- [8] Kim JA, Montagnani M, Koh KK, et al. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanism [J]. *Circulation*, 2006, 113 (15): 1888-1904
- [9] Pesić S, Radenković M, Grbović L. Endothelial dysfunction: mechanisms of development and therapeutic options [J]. *Med Pregl*, 2006, 59 (7-8): 335-341
- [10] Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis [J]. *Circ J*, 2009, 73 (4): 595-601
- [11] Goldhaber JJ, Weiss JN. Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities [J]. *Hypertension*, 1992, 20 (1): 118-127
- [12] Sabri A, Byron KL, Samarel AM, et al. Hydrogen peroxide activates mitogen-activated protein kinases and Na^+ - H^+ exchange in neonatal rat cardiac myocytes [J]. *Circ Res*, 1998, 82 (10): 1053-1062
- [13] Yao Z, Tong J, Tan X. Role of reactive oxygen species in acetylcholine-induced preconditioning in cardiomyocytes [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277 (6 Pt 2): H2504-2509
- [14] 宁若冰, 许昌声, 柴大军, 等. 麝香保心丸对 H_2O_2 诱导人脐静脉内皮细胞增殖及氧化应激的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2011, 9 (8): 966-969
- [15] 魏红玲, 杜军保, 唐朝枢, 等. 硫化氢对低氧性肺动脉高压中氧化应激的调节作用 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2007, 39 (6): 6565-6569
- [16] Geng B, Chang L, Pan C, et al. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury by isoproterenol [J]. *Biochim Biophys Res Commun*, 2004, 318 (3): 756-763
- [17] 苏钰雯, 杜军保, 韩薇, 等. 硫化氢供体对阿霉素心肌病大鼠氧化应激作用的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24 (8): 1469-1474
- [18] 邵建林, 王俊科, 马虹. 外源性硫化氢对脑缺血再灌注损伤大鼠海马气体信号分子的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2007, 27 (5): 451-454
- [19] Elrod JW, Calvert JW, 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
- [20] 彭湘潭, 彭振宇. H_2S 对 ox-HDL 致内皮细胞损伤的保护作用 [J]. *吉首大学学报(自然科学版)*, 2011, 32 (2): 108-117
- [21] 边云飞, 秦卫伟, 宋晓苏, 等. 硫化氢对氧应激所致心肌细胞损伤的影响及机制 [J]. *中国动脉硬化症杂志*, 2011, 19 (4): 310-314
- [22] Yu Y, Sato JD. MAP kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and p70 S6 kinase mediate the mitogenic response of human endothelial cells to vascular endothelial growth factor [J]. *J Cell Physiol*, 1999, 178 (2): 235-246
- [23] Xie M, Liu XS, Xu YJ, et al. ERK1/2 signaling pathway modulates the airway smooth muscle cell phenotype in the rat model of chronic asthma [J]. *Respiration*, 2007, 74 (6): 680-690
- [24] Gabryel B, Pudielko A, Adamczyk J, et al. Calcineurin and ERK1/2-signaling pathways are involved in the antiapoptotic effect of cyclosporine A on astrocytes exposed to simulated ischemia *in vitro* [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2006, 374 (2): 127-139
- [25] Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, et al. Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-acti-

- 699-709
- [8] Wilczynski J, Duechler M, Czyz M, et al. Targeting NF- κ B and HIF-1 pathways for the treatment of cancer: Part I [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2011, 59(4): 289-299
- [9] Du J, Xu R, Hu Z, et al. PI3K and ERK-induced Rac1 activation mediates hypoxia-induced HIF-1 α expression in MCF-7 breast cancer cells [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25213
- [10] Xiong WJ, Hu LJ, Jian YC, et al. Wnt5a participates in hepatic stellate cell activation observed by gene expression profile and functional assays [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(15): 1745-1752
- [11] Yang GY, Liang B, Zhu J, et al. Calpain activation by Wingless-type murine mammary tumor virus integration site family, member 5A (Wnt5a) promotes axonal growth [J]. J Biol Chem, 2011, 286(8): 6566-6576
- [12] Camilli TC, Xu M, O'Connell MP, et al. Loss of Klotho during melanoma progression leads to increased filamin cleavage, increased Wnt5A expression, and enhanced melanoma cell motility [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2011, 24(1): 175-186
- [13] Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma [J]. Cancer Cell, 2002, 1(3): 279-288
- [14] Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, et al. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion [J]. Cancer Res, 2006, 66(21): 10439-10448
- [15] Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Rao AS, et al. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma [J]. Oncogene, 2005, 24(13): 2144-2154
- [16] Dejmek J, Dejmek A, Safholm A, et al. Wnt-5a protein expression in primary duodenal B colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis [J]. Cancer Res, 2005, 65(20): 9142-9146

[收稿日期] 2012-06-11

(上接第 1504 页)

- vated protein kinases [J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(8): 977-985
- [26] Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, et al. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress [J]. Circ Res, 2000, 87(9): 789-796
- [27] Liao DF, Jin ZG, Baas AS, et al. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells [J]. J Biol Chem, 2000, 275(1): 189-196
- [28] Ganster F, Burban M, de la Bourdonnaye M, et al. Effects of hydrogen sulfide on hemodynamics, inflammatory response and oxidative stress during resuscitated hemorrhagic shock in rats [J]. Crit Care, 2010, 14(5): 165
- [29] Calvert JW, Jha S, Gundewar S, et al. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling [J]. Circ Res, 2009, 105(4): 365-374
- [30] Lu M, Zhao FF, Tang JJ, et al. The neuroprotection of hydrogen sulfide against MPTP-induced dopaminergic neuron degeneration involves uncoupling protein 2 rather than ATP-sensitive potassium channels [J]. Antioxid Redox Signal, 2012, 17(6): 849-859
- [31] Fridovich I. Superoxide dismutases, an adaptation to a paramagenetic gas [J]. J Biol Chem, 1989, 264(14): 7761-7764
- [32] Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory disease [J]. J Clin Periodontol, 1997, 24(5): 287-296

[收稿日期] 2012-08-20