

硫化氢对氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

任重^{1,2}, 赵战芝^{1,2}, 彭湘萍^{1,2}, 谢巍^{1,2}, 刘艳文^{1,2}, 索荣^{1,2}, 姜志胜^{1,2}
(1. 南华大学心血管疾病研究所; 2. 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 硫化氢; 氧化型低密度脂蛋白; N-乙酰半胱氨酸; 人脐静脉内皮细胞; 凋亡; 细胞线粒体膜电位; 细胞内活性氧

[摘要] 目的 探讨硫化氢对氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响及有关机制。方法 人脐静脉内皮细胞分别经不同浓度(25、50、100、200 μmol/L)和不同时间(6、12、24 h)硫氢化钠预孵育 24 h 后加入 100 mg/L 氧化型低密度脂蛋白处理 24 h, Hoechst 33258 荧光染色和流式细胞术检测细胞凋亡, 罗丹明 123 染色检测细胞线粒体膜电位变化, 双氢罗丹明 123 染色检测细胞内活性氧的含量变化。结果 硫氢化钠预处理能以时间和浓度依赖性的方式抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡(均 $P < 0.01$), 硫氢化钠或 N-乙酰半胱氨酸预先处理能显著阻断氧化型低密度脂蛋白引起的人脐静脉内皮细胞线粒体膜电位降低、活性氧生成增多(均 $P < 0.05$)。结论 硫化氢能显著抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡, 其机制与减少细胞线粒体膜电位及降低活性氧生成有关。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Investigation on the Effect and Mechanisms of Hydrogen Sulfide Against Apoptosis Induced by ox-LDL in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

REN Zhong, ZHAO Zhan-Zhi, PENG Xiang-Ping, XIE Wei, LIU Yan-Wen, SUO-Rong, and JIANG Zhi-Sheng
(Institute of Cardiovascular Disease and Key Lab for Arteriosclerosis, University of South China, Hengyang, Hunan 421001)

[KEY WORDS] Hydrogen Sulfide; ox-LDL; NAC; HUVEC; Apoptosis; Mitochondrial Membrane Potential; Reactive Oxygen Species

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of hydrogen sulfide on ox-LDL-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and the mechanisms involved. **Methods** The HUVEC were incubated with ox-LDL for 24 hours after treatment with NaHS at different concentrations (25, 50, 100, 200 μmol/L) for 24 hours or for different incubation time (6, 12, 24 hours) at the concentration of 50 μmol/L. The apoptotic alterations of HUVEC were observed by Hoechst 33258 staining and flow cytometry (FCM), respectively. The change of mitochondrial membrane potential (MMP) and intracellular reactive oxygen species (ROS) generation were detected by Dihydrohodamine123 (DHR123) staining and rhodamine123 (Rh123) staining. **Results** Pre-treatment with NaHS remarkably inhibited apoptosis induced by ox-LDL in HUVEC in a time- and concentration-dependent manner (all $P < 0.01$). The decrease of MMP and increase of the intracellular ROS generation in HUVEC induced by ox-LDL were significantly prohibited by treatment with NaHS or N-acetyl-L-cysteine (NAC) (all $P < 0.05$). **Conclusions** H₂S inhibits apoptosis induced by ox-LDL in HUVEC which is involved in preservation of mitochondrial membrane potential and attenuation of the intracellular ROS generation.

动脉粥样硬化是以血管内皮细胞损伤为基础、以脂质浸润和血管壁炎症为特征的病理过程。在动脉粥样硬化斑块中发现内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞都经历着凋亡与坏死, 而凋亡占主导地位, 参

[收稿日期] 2011-03-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30971169)和衡阳市科学技术发展计划项目(2009KJ10)

[作者简介] 任重, 硕士, E-mail 为 woo604@163.com。赵战芝, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治, E-mail 为 zhaozz99@126.com。彭湘萍, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治, E-mail 为 ping2028@163.com。通讯作者姜志胜, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血管闭塞性疾病发病机制及其防治, E-mail 为 zsjiang2005@163.com。

与了动脉粥样硬化的形成过程^[1]。现在认为血管内皮细胞的凋亡可能是动脉粥样硬化形成的始发步骤^[2]。动脉粥样硬化斑块中有多种化学修饰的脂蛋白,特别是氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL),它是动脉粥样硬化发生发展中的独立危险因素。硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是“一种具有臭鸡蛋气味的气体”,是继一氧化氮和一氧化碳之后的又一气体信号分子^[3-5]。在心血管系统,经过多年研究,发现 H₂S 主要在舒张血管、抑制血管重构和保护心肌等方面具有重要的生理作用,并且与多种心血管疾病相关。本研究以人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为研究对象,观察 H₂S 对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡作用的影响及可能机制,为 H₂S 在动脉粥样硬化发生发展中的作用提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞培养基 DMEM 购自 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季清公司;谷氨酰胺、丙酮酸钠、胰蛋白酶、EDTA、NaHS、DAPI、双氢罗丹明 123 (DHR123)、罗丹明 123 (Rh123) 购自 Sigma 公司;NAC (N-乙酰半胱氨酸) 购自 Amresco 公司;Hoechst 33258 凋亡检测试剂盒购自江苏碧云天公司。

1.2 细胞培养及分组

HUVEC 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期细胞进行实验。实验分为两部分:(1) NaHS 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡的影响:①对照组、ox-LDL 组、不同浓度 NaHS (25、50、100、200 μmol/L) 预处理组 (NaHS + ox-LDL); ②对照组、ox-LDL 组、不同孵育时间 (6、12、24 h) NaHS 预处理组 (NaHS + ox-LDL)。(2) H₂S 抗 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡作用机制: ① 对照组; ② NaHS + ox-LDL 组; ③ ox-LDL 组; ④ NAC + ox-LDL 组。

1.3 脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

健康人血浆购自衡阳市中心血站。先用超速离心法制备低密度脂蛋白,取部分用 10 μmol/L Cu-SO₄ 氧化修饰成 ox-LDL, 4℃ 保存。0.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定氧化与否。

1.4 Hoechst33258 染色观察 HUVEC 凋亡

将 HUVEC 接种于 6 孔板内,各实验组按要求给以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 冲洗两遍, Hoechst33258 染色液染色 10 min, 水冲净晾干, 荧光显微镜下观察、摄片。正常细胞核表现为弥漫均匀的低强度荧光, 凋亡细胞核呈浓染致密固缩状态。

1.5 PI 染色流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡率

收集细胞, PBS 洗涤细胞一次, 用 70% 的乙醇 5 mL 固定细胞过夜; 800 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤细胞二次; 加入含 RNase A (终浓度 50 mg/L) 的 PBS 500 μL, 37℃ 水浴孵育 30 min; 再加入碘化丙啶 (PI), 使其终浓度为 50 mg/L, 4℃ 避光 30 min; 300 目尼龙网过滤, 上流式细胞仪检测, 计数 10000 个细胞, 测定凋亡的细胞数。

1.6 DHR123 荧光染色检测细胞内活性氧水平

DHR123 是一种极易被氧化的亲脂性染料, 可自由进出细胞膜, 进入细胞后可被 ROS (主要为超氧化物、过氧化氢和过氧化亚硝基) 氧化成一种具有正电荷、能发出荧光的 Rh123, 并被泵入线粒体内, 从而维系在细胞内, 经过一定时间的累积, 即可通过流式细胞仪检出相应的荧光。HUVEC 经药物处理一定时间后, 倾去陈旧培养基, 用无血清的 DMEM 洗 2 次, 加入用无血清的 DMEM 稀释至终浓度为 1 μmol/L 的 DHR, 避光于 37℃ 孵育 1 h 后, 在荧光显微镜下观察、摄片; 随后收集细胞, PBS 洗 2 次, 制成 1 × 10⁶ 个/L 的悬液, 上流式细胞仪检测 (激发波长为 488 nm; 发射波长为 525 nm), 测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理。每个样品测定 10000 个活细胞, 直方图分析 Rh123 的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI), 该值即代表细胞 ROS 水平。

1.7 Rh123 荧光染色检测细胞线粒体膜电位 (ΔΨ_m)

Rh123 是一种能选择性为线粒体所吸收的荧光染料, 其吸收值随 ΔΨ_m 改变而呈相应变化, 从而改变细胞的荧光强度, 但其本身并不干扰 ΔΨ_m, 且无任何细胞毒性。因此, 可通过检测细胞 Rh123 的荧光强度反映细胞 ΔΨ_m^[6]。HUVEC 经药物处理一定时间后, 倾去陈旧培养基, 用无血清的 DMEM 洗 2 次, 加入不含小牛血清的 DMEM 稀释至终浓度为 100 μg/L 的 Rh123, 避光于 37℃ 孵育 45 min 后, 在荧光显微镜下观察、摄片; 随后用 0.25g/L 胰蛋白酶消化贴壁的 HUVEC, 收集 1 × 10⁶ 个/L 细胞用 PBS 洗两次, 重悬上述细胞, 进行流式细胞仪测定 (激发波长为 488 nm; 发射波长为 525 nm), 测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理。计数 10000 个活细胞, 以阳性细胞的平均荧光强度 (MFI) 表示

$\Delta\Psi_m$ 。

1.8 图像分析和统计学处理

全部荧光图片经荧光显微镜观察,用 Pixera Camera 图像分析系统采集;电泳条带用 UVP 型凝胶图像分析系统采集;所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用方差分析及 *t* 检验,由 SPSS 11.0 统计软件完成,*P* < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 H₂S 呈浓度依赖性抑制 ox-LDL 诱导的 HU-VEC 凋亡

Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡的结果显示,ox-LDL 处理组出现大量的核呈浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光的凋亡细胞(图 1F);25 μmol/L NaHS 预处理组可见少量浓染致密的细胞核(图 1B),其余浓度的 NaHS 预处理组细胞染色质分布均匀,为弥漫均匀的低强度荧光(图 1C, D, E),说明 NaHS 预处理明显减少了 ox-LDL 诱导的细胞凋亡。

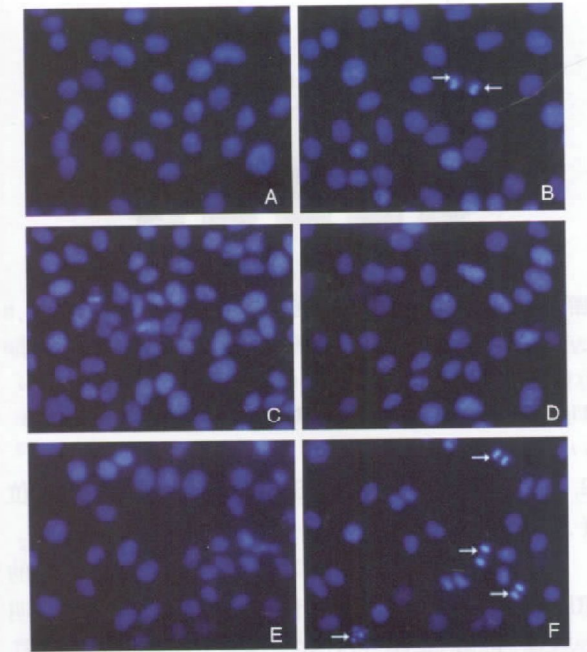


图 1. 不同浓度 H₂S 预处理对 ox-LDL 诱导 HUVEC 凋亡核形态的影响(×400) 荧光显微镜下观察,凋亡细胞由于出现核固缩,呈现强荧光颗粒,如箭头所指。A 为对照组,B、C、D、E 为不同浓度 NaHS(25、50、100、200 μmol/L)预处理组(NaHS + ox-LDL),F 为 100 mg/L ox-LDL 处理组。

Figure 1. Effect of pre-treated with different concentrations of H₂S on shape of nucleus in HUVEC

与对照组相比,ox-LDL 处理组细胞凋亡率(13.1% ± 1.5%)明显增加(*P* < 0.01),25 μmol/L NaHS 预处理组细胞凋亡率(2.6% ± 0.8%)也有所增加(*P* < 0.05);25、50、100、200 μmol/L NaHS 预处理 HUVEC 凋亡率(2.6% ± 0.8%、1.9% ± 0.9%、1.5% ± 1.2%、1.0% ± 0.7%)明显低于 ox-LDL 处理组(*P* < 0.01,图 2)。

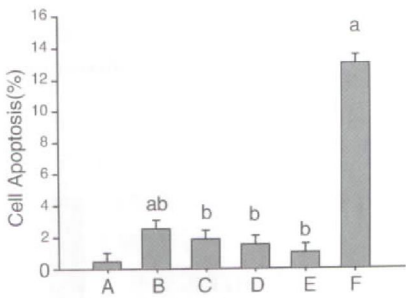


图 2. 不同浓度 H₂S 预处理对 ox-LDL 诱导 HUVEC 凋亡率的影响 A 为对照组,B、C、D、E 为不同浓度 NaHS(25、50、100、200 μmol/L)预处理组(NaHS + ox-LDL),F 为 ox-LDL 处理组(*n* = 3, $\bar{x} \pm s$)。a 为 *P* < 0.05,与对照组相比;b 为 *P* < 0.01,与 ox-LDL 组比较。

Figure 2. Effect of pre-treated with different concentrations of H₂S on apoptosis of HUVEC induced by ox-LDL

2.2 H₂S 呈时间依赖性抑制 ox-LDL 诱导的 HU-VEC 凋亡

正常组的细胞染色质分布均匀,为弥漫均匀的低强度荧光(图 3A);100 mg/L ox-LDL 处理组中出现大量的核呈浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光的凋亡细胞(图 3E);50 μmol/L NaHS 预处理 6 h 和 12 h 组可见少量细胞凋亡(核呈浓染致密的固缩形态),50 μmol/L NaHS 预处理 24 h 组细胞染色质分布均匀,为弥漫均匀的低强度荧光(图 3B,C,D)。

与正常对照组相比,ox-LDL 处理组细胞凋亡率(11.3% ± 1.4%)明显增加(*P* < 0.01),NaHS 预处理 6 h、12 h 组细胞凋亡率(2.3% ± 0.6%、2.2% ± 0.5%)也有所增加(*P* < 0.05);NaHS 预处理 HUVEC 6、12、24 h 凋亡率(2.3% ± 0.6%、2.2% ± 0.5%、1.8% ± 1.0%)明显低于 ox-LDL 处理组(*P* < 0.01),说明 50 μmol/L NaHS 预处理不同时间均能抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡,其中以 NaHS 预处理 24 h 组抗凋亡作用最明显(图 4)。

2.3 H₂S 对 ox-LDL 诱导 HUVEC ROS 生成的影响

100 mg/L ox-LDL 作用 24 h 后,HUVEC 的 DHR123 荧光强度较对照组明显增强(图 5C),而用

50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 或 1 mmol/L NAC 预处理 HUVEC 24 h 再加入 100 mg/L ox-LDL 作用 24 h 后, HUVEC

的 DHR123 荧光强度较 100 mg/L ox-LDL 处理组明显减弱(图 5B, D)。

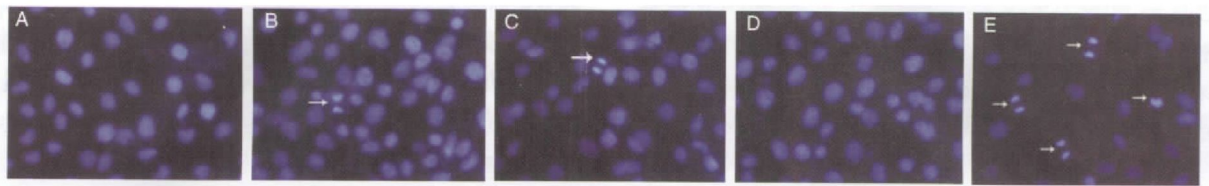


图 3. H_2S 预处理不同时间对 ox-LDL 诱导 HUVECs 凋亡核形态的影响 ($\times 400$) 荧光显微镜下观察, 凋亡细胞由于出现核固缩, 呈现强荧光颗粒, 如箭头所指。A 为对照组, B、C、D 为 NaHS 预处理组不同时间 (6、12、24h) 组 (NaHS + ox-LDL), E 为 100 mg/L ox-LDL 处理组。

Figure 3. Effect of pre-treated with different times of H_2S on shape of nucleus in HUVEC

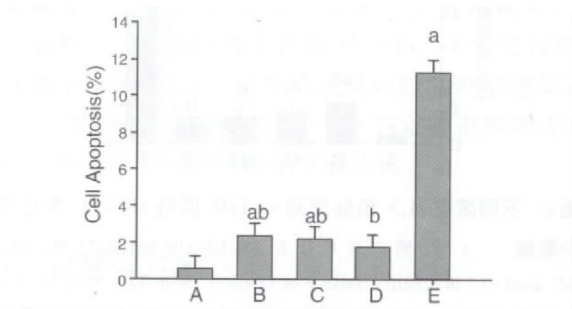


图 4. H_2S 预处理不同时间对 ox-LDL 诱导 HUVEC 凋亡率的影响 A 为对照组, B、C、D 为 NaHS 预处理组不同时间 (6、12、24h) 组 (NaHS + ox-LDL), E 为 100 mg/L ox-LDL 处理组 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)。a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组相比。

Figure 4. Effect of pre-treated with different times of H_2S on apoptosis of HUVECs induced by ox-LDL

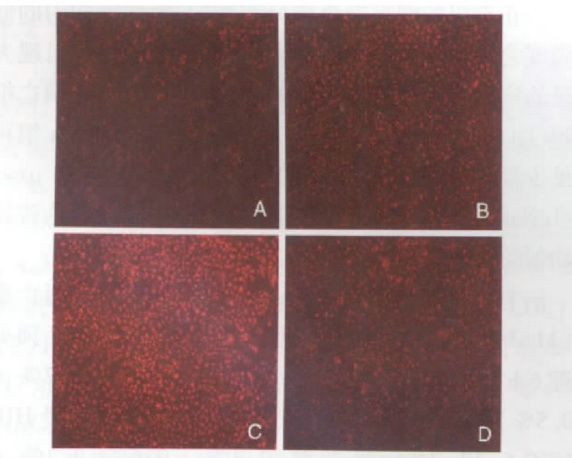


图 5. H_2S 对 ox-LDL 诱导 HUVEC ROS 生成的影响 ($\times 100$)

A 为对照组, B 为 NaHS + ox-LDL 组, 50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 孵育 HUVECs 24 h 后再加入 100 mg/L ox-LDL 孵育 24 h, C 为 ox-LDL 组, 100 mg/L ox-LDL 孵育 24 h, D 为 NAC + ox-LDL 组, 1 mmol/L NAC 孵育 HUVECs 24 h 后再加入 100 mg/L ox-LDL 孵育 24 h。

Figure 5. Effect of H_2S on ROS generation in HUVEC induced by ox-LDL

经 100 mg/L ox-LDL 作用 24 h 后, HUVEC 的 DHR123 平均荧光强度 (13.68 ± 2.58) 较对照组 (4.15 ± 1.04) 明显升高 ($P < 0.05$), 而用 50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 或 1 mmol/L NAC 预处理组的 DHR123 平均荧光强度 ($5.03 \pm 1.42, 4.5 \pm 1.35$) 较 100 mg/L ox-LDL 处理组明显降低 ($P < 0.05$; 图 6)。

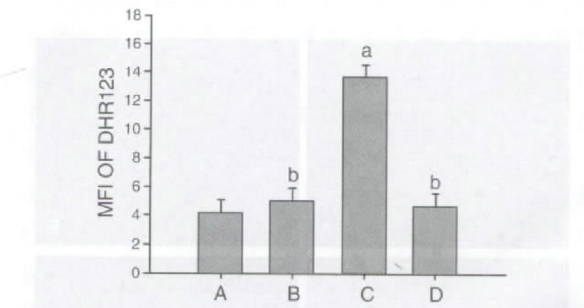


图 6. H_2S 对 HUVEC 细胞内活性氧的影响 A 为对照组, B 为 NaHS + ox-LDL 组, C 为 ox-LDL 组, D 为 NAC + ox-LDL 组; a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 处理组相比。

Figure 6. Effect of H_2S on ROS in HUVECs ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

2.4 H_2S 对 ox-LDL 降低 HUVEC 线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的影响

100 mg/L ox-LDL 作用 24 h 后, HUVEC 的 Rh123 荧光强度较对照组明显减弱(图 7C), 表明 ox-LDL 可降低 HUVEC 的 $\Delta\Psi_m$, 而用 50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 或 1 mmol/L NAC 预处理 HUVEC 24 h 再加入 100 mg/L ox-LDL 作用 24 h 后, HUVEC 的 Rh123 荧光强度较 100 mg/L ox-LDL 处理组明显增强(图 7B, D)。

100 mg/L ox-LDL 作用 24 h 后, HUVEC 的 Rh123 平均荧光强度 (8.22 ± 3.45) 较对照组 (18.7 ± 4.42) 明显降低 ($P < 0.05$), 而用 50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 或 1 mmol/L NAC 预处理组, HUVEC 的 Rh123 平均荧光强度 ($16.81 \pm 2.35, 18.57 \pm 4.32$) 较 100

mg/L ox-LDL 处理组明显升高($P < 0.05$; 图 8)。

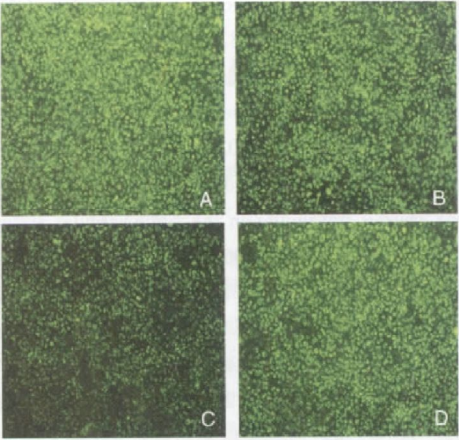


图 7. H₂S 对 ox-LDL 降低 HUVEC 线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的影响 ($\times 10$) A 为对照组, B 为 NaHS + ox-LDL 组, C 为 ox-LDL 组, D 为 NAC + ox-LDL 组。

Figure 7. Effect of H₂S on $\Delta\Psi_m$ decrease in HUVEC induced by ox-LDL

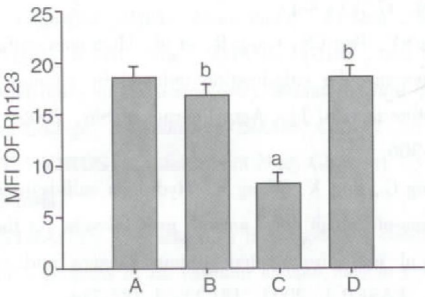


图 8. H₂S 对 HUVEC 线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的影响 A 为对照组, B 为 NaHS + ox-LDL 组, C 为 ox-LDL 组, D 为 NAC + ox-LDL 组。a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组相比。

Figure 8. Effect of H₂S on $\Delta\Psi_m$ in HUVEC ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

3 讨 论

动脉粥样硬化是由于大中型动脉内膜和内膜下发生脂质沉着,并伴有中层平滑肌细胞向内膜移行增殖,内膜增厚而形成粥样病灶或纤维脂质斑块。其发生机理与血管壁损伤、脂质浸润和微血栓形成有关^[7]。血管内皮细胞的凋亡在动脉粥样硬化的发生、发展过程中具有重要作用。

Ox-LDL 被认为是致动脉粥样硬化的重要危险因素,它的增加可以导致构成血管壁的所有细胞发生病理改变,促进血栓形成,还能刺激多种细胞因子产生,引起脂质过氧化反应产生大量 ROS,引起包括凋亡在内的血管内皮细胞损伤和内皮细胞功能障碍,

通过多种途径在动脉粥样硬化的起始和进展中发挥重要作用^[8,9]。

硫化氢是“一种具有臭鸡蛋气味的气体”,是继一氧化氮和一氧化碳之后的又一气体信号分子^[3-5,10]。H₂S 通过抑制血管重构、舒张血管、抑制平滑肌细胞增殖、抑制血管钙化、负性肌力等机制发挥其心血管保护作用。内源性生成或外源性供给 H₂S 能在不同系统以多种方式调节细胞的增殖与凋亡。Yang 等^[11]发现,抑制内源性 H₂S 产生,外源性给予 50 $\mu\text{mol/L}$ H₂S 就能诱导人主动脉血管平滑肌细胞 (human aorta smooth muscle cells, HASMC) 凋亡,当浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,这种作用更加明显。其机制与激活 ERK 和 p38 MAPK 信号通路,上调含半胱氨酸的天冬氨酸特异的蛋白酶 (caspase-3) 的活性有关。而 H₂S 是否影响血管内皮细胞的凋亡尚未见文献报道。

首先,开展了 H₂S 是否对 ox-LDL 刺激的 HUVEC 凋亡有影响的探索。以不同浓度 NaHS 处理 HUVEC 24 h,再加入 ox-LDL 处理 24 h,经 Hoechst33258 染色和 FCM 检测,结果发现 ox-LDL 处理组细胞凋亡明显增多,不同浓度 NaHS 预处理都对 ox-LDL 刺激的 HUVEC 凋亡有拮抗作用,其中以 50 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 抑制细胞凋亡效果较好。用 NaHS 处理 HUVEC 不同时间,再加入 ox-LDL 处理 24 h,经 Hoechst33258 染色和 FCM 检测,结果发现,NaHS 预处理不同时间都对 ox-LDL 刺激的 HUVEC 凋亡有保护作用,其中以 24 h 的保护作用最为明显。以上结果显示,不同浓度 NaHS 和 NaHS 孵育不同时间对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡都有拮抗作用。我们也根据此结果设定 50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 预处理 24 h 作为本实验后续 NaHS 处理浓度和时间。

H₂S 抗 ox-LDL 刺激的 HUVEC 凋亡的作用机制尚不十分清楚,为进一步探讨其机制,我们在前面实验结果的基础上,利用 ox-LDL 诱导 HUVEC 凋亡,探讨外源性 H₂S 抗凋亡的作用机制。

Ox-LDL 引起内皮细胞凋亡的机制众多,其中氧化应激 (oxidative stress) 及随后产生的 ROS 的作用十分重要。氧化应激是指机体组织或细胞内氧自由基生成增加和 (或) 清除能力降低,导致 ROS 在体内或细胞内蓄积而引起的氧化损伤过程。血管壁内可产生多种 ROS,它们独自或联合参与了动脉粥样硬化的发生与发展过程。那么应用荧光探针 DHR123 观察 H₂S 是否可清除细胞内过多的 ROS 具有重要的意义。结果显示经 50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 或 1 mmol/L

NAC 预处理后, HUVEC 的 DHR123 平均荧光强度较 ox-LDL 损伤组明显降低, 表明 H₂S 确实可清除细胞内 ROS。

正常 $\Delta\Psi_m$ 的形成与保持是氧化磷酸化中的必要过程, $\Delta\Psi_m$ 可以调控线粒体内膜对各种物质的选择性和通透性, 从而维持线粒体的正常结构与功能^[12], 多数凋亡发生过程中都伴有线粒体 $\Delta\Psi_m$ 的异常^[13]。ROS 的增加可直接或间接损伤线粒体膜而使 $\Delta\Psi_m$ 降低^[14], 使线粒体膜上通透性转换孔(permeability transition pores, PTP) 开放, 线粒体内容物如凋亡诱导因子和细胞色素 C 释放入胞质, 从而激活下游的核酸内切酶和半胱氨酸蛋白酶, 导致染色质 DNA 断裂和蛋白质的水解, 最终引起细胞凋亡。为此, 我们观察了 H₂S 对细胞线粒体功能的影响。细胞经 Rh123 染色, 分别通过荧光显微镜镜下观察和流式细胞仪检测 Rh123 的荧光强度, 结果发现, 50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 或 1 mmol/L NAC 预处理可抑制 ox-LDL 引起的 Rh123 的平均荧光强度的下降, 表明 H₂S 可有效地维持线粒体正常膜电位, 稳定线粒体功能, 防止细胞发生凋亡。由此一来, 我们可以推测 H₂S 对氧化应激损伤 HUVEC 的保护作用可能是通过清除 ROS, 进而抑制 $\Delta\Psi_m$ 的降低而实现的。

综合上述实验结果, 我们验证了 H₂S 对 ox-LDL 诱导 HUVEC 凋亡具有很好的拮抗作用, 其机制可能是通过清除细胞内过多的 ROS, 维持正常的 $\Delta\Psi_m$ 而实现的。这些实验结果在一定意义上可为动脉粥样硬化的治疗提供新的发展方向, 但由于动脉粥样硬化的病因及发病机制尚未完全明确, 而我们只是对 H₂S 抗内皮细胞凋亡的关系做了初步研究, 对 H₂S 抗凋亡作用的靶点还有待进一步深入研究, 从而为动脉粥样硬化的治疗提供更为重要的科学依据。

[参考文献]

[1] Kavurma MM, Bhindi R, Lowe HC, et al. Vessel wall apoptosis and atherosclerotic plaque instability [J]. *Thromb Haemost*, 2005, 3: 465-472.
[2] Dimmeler S, Hermann C, Zeiher A M. Apoptosis of endothelial cells: contribution to the pathophysiology of athero-

sclerosis [J]. *Eur Cytokine Netw*, 1998, 9 (4): 697-698.
[3] Wang R. Two's company, three's a crowd: Can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter [J]. *FASEB J*, 2002, 16 (13): 1 792-798.
[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] Tang C, Li X, Du J. Hydrogen sulfide as a new endogenous gaseous transmitter in the cardiovascular system [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2006, 4 (1): 17-22.
[6] Hu LF, Lu M, Wu ZY, et al. Hydrogen sulfide inhibits rotenone-induced apoptosis via preservation of mitochondrial function [J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75, 27-34.
[7] 杨永宗, 阮长耿, 唐朝枢, 等. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2004, 50-51.
[8] 陈修平, 赵海誉, 钟章锋, 等. “氧化型低密度脂蛋白—凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1—活性氧”信号通路参与泡沫细胞的形成 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18 (7): 577-581.
[9] Itabe H. Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2009, 37 (1): 4-11.
[10] Wu SY, Pan CS, Geng B, et al. Hydrogen sulfide ameliorates vascular calcification induced by vitamin D₃ plus nicotine in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27 (3): 299-306.
[11] Yang G, Sun X, Wang R. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3 [J]. *FASEB J*, 2004, 18 (2): 1 782-784.
[12] Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis [J]. *FEBS Lett*, 1996, 384 (1): 53-57.
[13] Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, et al. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butyl-hydroperoxide [J]. *Biochem J*, 1995, 307 (Pt1): 99-106.
[14] Tang XQ, Shen XT, Huang YE, et al. Hydrogen sulfide antagonizes homocysteine-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. *Neurosci Res*, 2010, 68 (3): 241-249.

(此文编辑 李小玲)