

# 硫化氢通过调控 p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制阿霉素引起的心肌细胞损伤

徐文明<sup>1</sup>, 郭润民<sup>2</sup>, 林建聪<sup>1</sup>, 沈 宁<sup>2</sup>, 陈培熹<sup>2</sup>, 冯鉴强<sup>2</sup>

(中山大学 1. 附属第一医院黄埔院区内科, 2. 中山医学院生理教研室, 广东省广州市 510080)

[ 关键词 ] 硫化氢; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 阿霉素; 心肌细胞; 活性氧; 细胞凋亡

[ 摘 要 ] **目的** 研究硫化氢(H<sub>2</sub>S)是否通过调控 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路保护 H9c2 心肌细胞对抗阿霉素(DOX)引起的损伤。**方法** 应用 DOX 处理心肌细胞建立心肌细胞损伤模型。为观察 H<sub>2</sub>S 的保护作用,在 DOX 处理心肌细胞前,应用 400 μmol/L 硫氢化钠(NaHS,为 H<sub>2</sub>S 的供体)预处理细胞 30 min。Western blot 法测定 p38MAPK 蛋白的表达水平;应用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)比色法测定细胞存活率;Hoechst 33258 核染色法观察细胞凋亡的形态学改变;双氯荧光素(DCFH-DA)染色荧光显微镜照相测定细胞内活性氧(ROS)水平。**结果** 在 15 ~ 60 min 的时间范围内,5 μmol/L DOX 呈时间依赖性地上调心肌细胞磷酸化 p38MAPK 的表达水平;在 DOX 作用心肌细胞前,400 μmol/L NaHS 预处理 30 min 能明显地抑制 DOX 对 p-p38MAPK 表达的上调作用,并能显著地阻断 DOX 引起的心肌细胞损伤,使细胞存活率升高、凋亡细胞数量和 ROS 生成均减少;与 NaHS 的保护作用相似,p38MAPK 的抑制剂 SB203580(3 μmol/L)预处理 60 min 能保护 H9c2 心肌细胞对抗 DOX 引起的损伤。**结论** p38MAPK 通路参与 DOX 对心肌细胞的损伤作用;H<sub>2</sub>S 可通过抑制 p38MAPK 通路保护心肌细胞对抗 DOX 诱导的损伤。

[ 中图分类号 ] R96 [ 文献标识码 ] A

## Hydrogen Sulfide Inhibits Doxorubicin-induced Injury by Modulating p38MAPK in H9c2 Cells

XU Wen-Ming<sup>1</sup>, GUO Run-Min<sup>2</sup>, LIN Jian-Cong<sup>1</sup>, SHEN Ning<sup>2</sup>, CHEN Pei-Xi<sup>2</sup>, and FENG Jian-Qiang<sup>2</sup>

(1. Department of Internal Medicine, Huangpu Division of the First Affiliated Hospital; 2. Department of Physiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[ KEY WORDS ] Hydrogen Sulfide; p38 Mitogen-Activated Kinase; Doxorubicin; Cardiomyocyte; Reactive Oxygen Species; Apoptosis

[ ABSTRACT ] **Aim** To explore whether hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) protects H9c2 cells against doxorubicin-induced injury by modulating p38 mitogen-activated protein kinase(MAPK) pathway. **Methods** H9c2 cells were treated with doxorubicin(DOX) to establish the model of cardiac cell injury; In order to explore the protective effect of H<sub>2</sub>S, cells were pretreated with 400 μmol/L NaHS (a donor of H<sub>2</sub>S) for 30 min before exposure to DOX. The expression level of p38MAPK protein was tested by Western blot; Cell viability was measured by cell counter kit-8 (CCK-8); Morphological changes of apoptotic cells were detected by Hoechst 33258 staining; Intracellular level of reactive oxygen species (ROS) was measured by DCFH-DA staining and photofluorography. **Results** At range of 15 to 60 min, DOX at 5 μmol/L time-dependently upregulated expression level of phosphorylated(p) p38MAPK. Pretreatment with 400 μmol/L NaHS for 30 min before exposure of H9c2 cells to DOX not only obviously inhibited upregulation of p-p38MAPK expression induced by DOX, but also significantly blocked DOX-induced cardiomyocyte injuries, as evidenced by an increase in cell viability, decreases in amount of apoptotic cells and intracellular ROS generation. Similar to the cardioprotective effect of NaHS, pretreatment with SB203580 (an inhibitor of p38MAPK) for 60 min also protected H9c2 cardiac cells against DOX-induced injury. **Conclusion** p38MAPK pathway participates in DOX-induced cardiomyocyte damage; H<sub>2</sub>S may protect cardio-

[ 收稿日期 ] 2013-03-14  
[ 基金项目 ] 广东省科技计划基金项目(2010B080701035 和 2012B031800358)  
[ 作者简介 ] 徐文明, 硕士, 研究方向为内分泌与心血管疾病的基础与临床, E-mail 为 XWM920018@163.com。通讯作者冯鉴强, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为细胞保护及其机制, E-mail 为 fengjq-sums@163.com。

myocyte against DOX-induced injury by inhibiting p38MAPK pathway.

阿霉素(doxorubicin, DOX)是一种抗癌效果显著的药物,常被用来治疗血癌及多种实体性肿瘤,然而,由于 DOX 能引起剂量依赖性的心肌毒性<sup>[1, 2]</sup>,故限制了它在临床上的应用。目前的初步研究证实,氧化应激与心肌细胞凋亡可能在 DOX 的心肌毒性中起重要作用<sup>[3-5]</sup>。另有报道指出,DOX 可通过激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族中的一个成员 p38MAPK,继而引起心肌细胞凋亡<sup>[6]</sup>。此外,DOX 能激活分离培养的心肌细胞 p38MAPK,从而激活促凋亡蛋白 Bax<sup>[7]</sup>和共转录因子 300(transcriptional co-activator 300)<sup>[8]</sup>导致心肌细胞损伤。这些结果提示 p38MAPK 通路可能参与 DOX 心肌毒性<sup>[6-8]</sup>,然而 p38MAPK 通路在 DOX 心肌毒性中的具体作用和机制尚不完全清楚。最近,本研究小组证实,新型的气体信号分子硫化氢(hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)具有心肌细胞保护作用,不仅能保护 H9c2 心肌细胞对抗化学性缺氧引起的损伤<sup>[9]</sup>,还能对抗 DOX 引起的心肌细胞毒性<sup>[3]</sup>,此作用可能与 H<sub>2</sub>S 抑制氧化应激及内质网应激有关<sup>[3]</sup>。最近, Su 等<sup>[10]</sup>人指出,内源性 H<sub>2</sub>S 生成减少可能与 DOX 引起的心肌病有关。上述研究提示 H<sub>2</sub>S 能抑制 DOX 的心肌毒性。由于我们已发现 H<sub>2</sub>S 能抑制 p38MAPK<sup>[11]</sup>,所以推测 H<sub>2</sub>S 可通过抑制 p38MAPK 通路对抗 DOX 引起的心肌毒性。为了验证上述推断,本研究应用 DOX 处理 H9c2 心肌细胞以建立 DOX 心肌毒性的实验模型<sup>[3]</sup>,着重探讨:(1)DOX 对心肌细胞 p38MAPK 表达的影响;(2)p38MAPK 通路在 DOX 引起的心肌毒性中的作用;(3)H<sub>2</sub>S 能否通过调控 p38MAPK 通路保护心肌细胞对抗 DOX 引起的损伤,以便为深入阐明 H<sub>2</sub>S 对抗 DOX 引起的心肌毒性机制提供新颖的实验资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

DOX、NaHS、Hoechst 33258、双氯荧光素(DCF-HDA)购自 Sigma Aldrich 公司(USA),细胞计数试剂盒 8(cell counter kit-8, CCK-8)由 Dojindo Lab(日本)提供,蛋白预览 Marker(10~170 kDa)购自 Ferment 公司,DMEM-F12 培养基以及特级胎牛血清(FBS)购自 Gibco BRL(USA),抗 p38、p-p38 抗体及 SB203580(p38MAPK 抑制剂)购自 Cell Signaling technology Inc (CST)。

### 1.2 CCK-8 测定细胞存活率

H9c2 心肌细胞接种于 96 孔培养板中,当细胞生长到培养孔约 80% 面积时,根据实验需要进行不同的分组处理:(1)正常对照组;(2)DOX 损伤组:5 μmol/L DOX 培养 24 h;(3)NaHS + DOX 组:400 μmol/L NaHS 提前 30 min 加入培养基中作为预处理,然后更换成 5 μmol/L DOX 培养 24 h;(4)SB203580 + DOX 组:3 μmol/L SB203580 预处理 60 min,接着用 5 μmol/L DOX 培养 24 h;(5)NaHS 组:400 μmol/L NaHS 单独处理 H9c2 心肌细胞 30 min;(6)SB203580 组:3 μmol/L SB203580 单独处理 H9c2 心肌细胞 60 min。每个处理因素设 4 个复孔。终止培养后,每孔加入 10 μL CCK-8,轻摇,37℃ 孵育 2 h,用酶标仪(λ=450 nm)记录各孔吸光度(OD)。取 4 孔 OD 值的平均数,按下列公式计算细胞存活率:细胞存活率(%) =  $\frac{OD_{\text{处理组}}}{OD_{\text{对照组}}} \times 100\%$ ,重复 3 次。

### 1.3 Hoechst 33258 核染色法检测细胞凋亡

H9c2 心肌细胞经不同因素处理后(分组及处理同细胞存活率实验),小心弃去培养基,PBS 洗 1 遍,4% 多聚甲醛固定 10 min,PBS 漂洗后,加入 5 mg/L Hoechst 33258 试剂,室温轻摇 30 min。在荧光显微镜(BX50-FLA, Olympus, Japan)下摄片,染色质均匀分布,核被染成均匀蓝色的细胞认为是正常细胞,核呈浓缩、碎裂的明亮蓝色细胞认为是凋亡细胞,随机选取视野在荧光显微镜下摄片。

### 1.4 细胞内活性氧水平的测定

将赖氨酸包被的盖玻片置于 6 孔培养板内,H9c2 心肌细胞被均匀地接种于盖玻片上。当细胞生长到约为培养孔 80% 面积时,根据实验需要共分为 6 组给予相应的处理(具体的分组及处理同上)。每组均包括 3 个复孔。处理完成后,用 PBS 漂洗盖玻片 2 次,用 10 μmol/L DCFH-DA 染液于 37℃ 孵育 30 min。在荧光显微镜下随机选取 5 个不重复区摄片,用 Image J 1.41o 软件分析 5 个视野绿色荧光强度的平均值,再对每组的各样本进行统计分析。

### 1.5 Western blot 测定 p38MAPK 蛋白的表达

为观察 DOX 处理 H9c2 心肌细胞不同时间(15 min、30 min、60 min)对 p38MAPK 表达的影响,实验分为 4 组:即正常对照组、15 min 处理组、30 min 处理组和 60 min 处理组;探讨 NaHS 对 DOX 激活 p38MAPK 效应的作用时,分为以下 4 组:正常对照组;NaHS 组,即单独应用 400 μmol/L NaHS 处理 H9c2 心肌细胞 30 min;DOX 损伤组,即应用 5

μmol/L DOX 处理 H9c2 心肌细胞 60 min; NaHS + DOX 组, 即在 DOX 处理 H9c2 心肌细胞前给予 400 μmol/L NaHS 预处理 30 min。H9c2 心肌细胞接种于 60 mm 培养皿中, 各实验组给予不同的处理因素后, 用预冷的 PBS 洗 2 次, 加入细胞裂解液, 4℃ 静置 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 采用 BCA 法进行蛋白定量。总蛋白经 SDS-PAGE 分离后, 转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h, 随后加入抗 p38、p-p38 抗体 (1: 1000), 4℃ 过夜, 用 TBST 洗 3 次, 10 min/次。将 PVDF 膜用发光试剂 ECL 显色, 暗室曝光到 X 线片上, 凝胶成像系统扫描分析结果。

1.6 统计学方法

所有结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 用 LSD-t 进行均数之间的比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阿霉素时间依赖性地上调心肌细胞磷酸化 p38MAPK 的表达

正常 H9c2 心肌细胞存在少量 p-p38MAPK 表达。应用 5 μmol/L DOX 处理 H9c2 心肌细胞 15 min 时, 可明显地增加 p-p38MAPK 的表达水平 ( $P < 0.05$ ); 当处理时间分别延长至 30 min、60 min 时, DOX 可进一步增加 p-p38MAPK 的表达 ( $P < 0.01$ ; 图 1)。

2.2 硫化氢抑制阿霉素对磷酸化 p38MAPK 表达的上调作用

应用 5 μmol/L DOX 处理心肌细胞 60 min 可使 p-p38MAPK 的表达明显增多 ( $P < 0.01$ ), 但对总 (t) p38MAPK 的表达无明显影响。400 μmol/L NaHS ( $H_2S$  的供体) 预处理 H9c2 心肌细胞 30 min 对 p-p38MAPK 的基础表达无影响 ( $P > 0.05$ ), 但是却能显著拮抗 DOX 对 p-p38MAPK 表达的促进作用, 与 DOX 损伤组比, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ; 图 2)。

2.3 硫化氢和 p38MAPK 抑制剂抑制阿霉素引起的心肌细胞毒性

5 μmol/L DOX 处理 H9c2 心肌细胞 24 h 能使细胞存活率明显降低。应用 3 μmol/L SB203580 (p38MAPK 抑制剂) 预处理心肌细胞 60 min 能显著抑制 DOX 对细胞存活率的抑制作用, 与 DOX 损伤组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。3 μmol/L SB203580 本身不影响心肌细胞存活率。与 p38MAPK 抑制剂的作用相似, 400 μmol/L NaHS 预处理心肌细胞 30 min 也能抑制 DOX 对细胞存活率

的抑制作用 (图 3)。

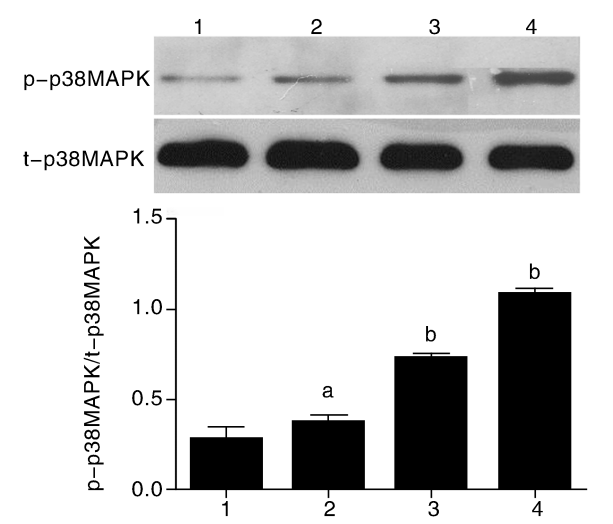


图 1 阿霉素时间依赖性地上调心肌细胞 p-p38MAPK 的表达 1 为正常对照组, 2~4 分别为 DOX 处理 15 min、30 min 和 60 min。a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较。

Figure 1. DOX time-dependently upregulates expression of phosphorylated p38MAPK in H9c2 cells

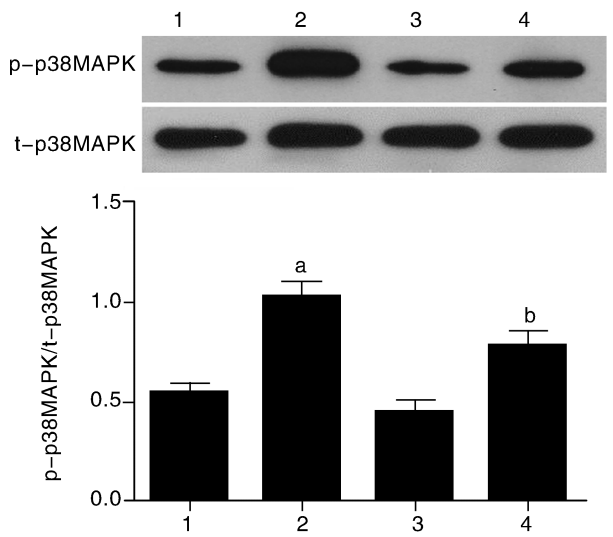


图 2 硫化氢抑制阿霉素对 p-p38MAPK 表达的上调作用 1 为正常对照组, 2 为 DOX 损伤组, 3 为 NaHS 组, 4 为 NaHS + DOX 组。a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 DOX 损伤组比较。

Figure 2. Hydrogen sulfide inhibit doxorubicin-induced up-regulation of p-p38MAPK expression in H9c2 cells

2.4 硫化氢和 p38MAPK 抑制剂抑制阿霉素引起的心肌细胞凋亡

与正常对照组比, 5 μmol/L DOX 处理 H9c2 心肌细胞 24 h 能使凋亡细胞数量明显增多 ( $P < 0.01$ )。应用 3 μmol/L SB203580 (p38MAPK 抑制剂) 预处理心肌细胞 60 min 不引起心肌细胞凋亡, 却能明显

地抑制 DOX 的致细胞凋亡作用,使凋亡细胞数量减少,与 DOX 损伤组比,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与 p38MAPK 抑制剂的作用相同,400  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 预处理心肌细胞 30 min 也明显地抑制 DOX 的致细胞凋亡作用 ( $P < 0.01$ )。400  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 本身不影响心肌细胞凋亡(图 4)。

2.5 硫化氢和 p38MAPK 抑制剂抑制阿霉素引起的心肌细胞内 ROS 堆积

正常心肌细胞内 ROS 水平较低。应用 5  $\mu\text{mol/L}$  DOX 处理 H9c2 心肌细胞 24 h 胞内 ROS 水平明显升高,与正常对照组比较,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。3  $\mu\text{mol/L}$  SB203580 处理 60 min 本身对心肌细胞内 ROS 生成无明显影响,但是却能抑制 DOX 引起的 ROS 生成增多,与 DOX 损伤组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。同样地,400  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 预处理 30 min 也显著抑制 DOX 引起的胞内

ROS 堆积 ( $P < 0.01$ ; 图 5)。

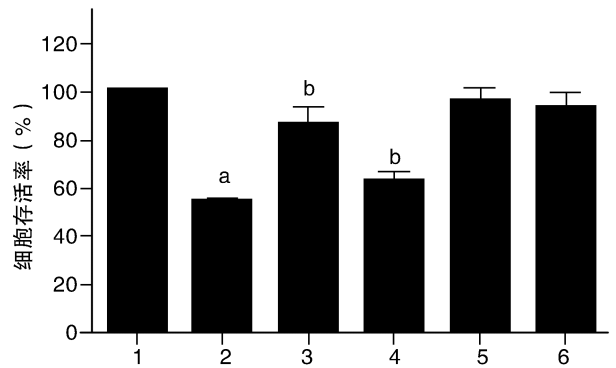


图 3. 硫化氢和 p38MAPK 抑制剂抑制阿霉素引起的心肌细胞毒性 1 为正常对照组,2 为 DOX 损伤组,3 为 NaHS + DOX 组,4 为 SB203580 + DOX 组,5 为 NaHS 组,6 为 SB203580 组。a 为  $P < 0.01$ ,与正常对照组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与 DOX 损伤组比较。

Figure 3. Both  $\text{H}_2\text{S}$  and p38MAPK inhibitor inhibit cardiac cytotoxicity induced by doxorubicin

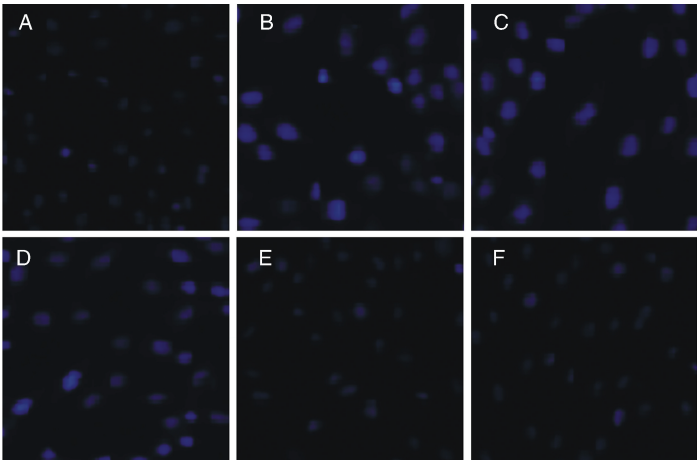
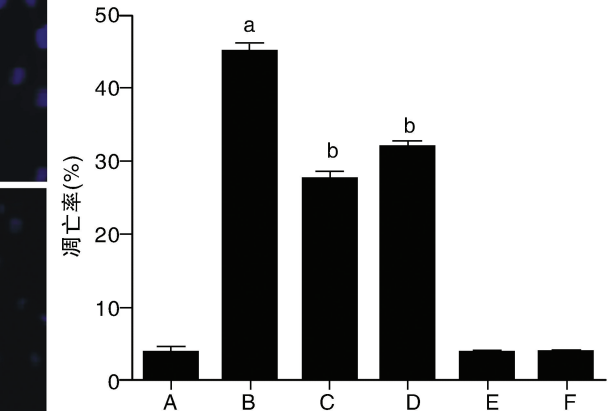


图 4. 硫化氢和 p38MAPK 抑制剂抑制阿霉素引起的心肌细胞凋亡 ( $\times 200$ ) ( $n = 5$ ) A 为正常对照组,B 为 DOX 损伤组,C 为 NaHS + DOX 组,D 为 SB203580 + DOX 组,E 为 NaHS 组,F 为 SB203580 组。a 为  $P < 0.01$ ,与正常对照组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与 DOX 损伤组比较。

Figure 4. Both  $\text{H}_2\text{S}$  and p38MAPK inhibitor inhibit the doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells

3 讨论

$\text{H}_2\text{S}$  是继气体分子一氧化氮 (NO) 和一氧化碳 (CO) 之后被发现的第 3 种内源性气体信号分子<sup>[12]</sup>。近年越来越多的研究证实, $\text{H}_2\text{S}$  参与生理性和病理生理性的心血管功能调节。在离体大鼠心脏和心肌细胞发现,抑制内源性  $\text{H}_2\text{S}$  生成可减弱缺血预处理引起的心肌保护作用<sup>[13]</sup>。近年,本研究小组证实  $\text{H}_2\text{S}$  可通过抑制 ROS 生成<sup>[9]</sup> 及上调热休克蛋白 90 (HSP90) 表达<sup>[14]</sup> 等机制保护 H9c2 心肌细胞对抗化学性缺氧引起的损伤。值得注意的是,  $\text{H}_2\text{S}$  也能保护心肌细胞对抗化疗药物 DOX 引起的



心肌毒性<sup>[3,10]</sup>,此心肌保护作用可能与  $\text{H}_2\text{S}$  抑制氧化应激及内质网应激有关<sup>[3]</sup>。

本文进一步探讨 p38MAPK 在 DOX 引起的心肌毒性及  $\text{H}_2\text{S}$  心肌保护中的作用。研究结果表明, DOX 能上调心肌细胞 p-p38MAPK 表达。p38MAPK 能被细胞应激激活,被认为参与心肌细胞凋亡。Lou 等<sup>[7]</sup> 报道,DOX 能激活离体心肌细胞 p38MAPK,这与本文的研究结果相似。但是,Lou 等人并没有观察 p38MAPK 抑制剂对 DOX 心肌毒性的影响,所以未能明确 p38MAPK 的激活与 DOX 心肌毒性的关系。针对这个问题,本研究观察到 p38MAPK 抑制剂 SB203580 不仅能抑制 DOX 引起的心肌细胞毒性



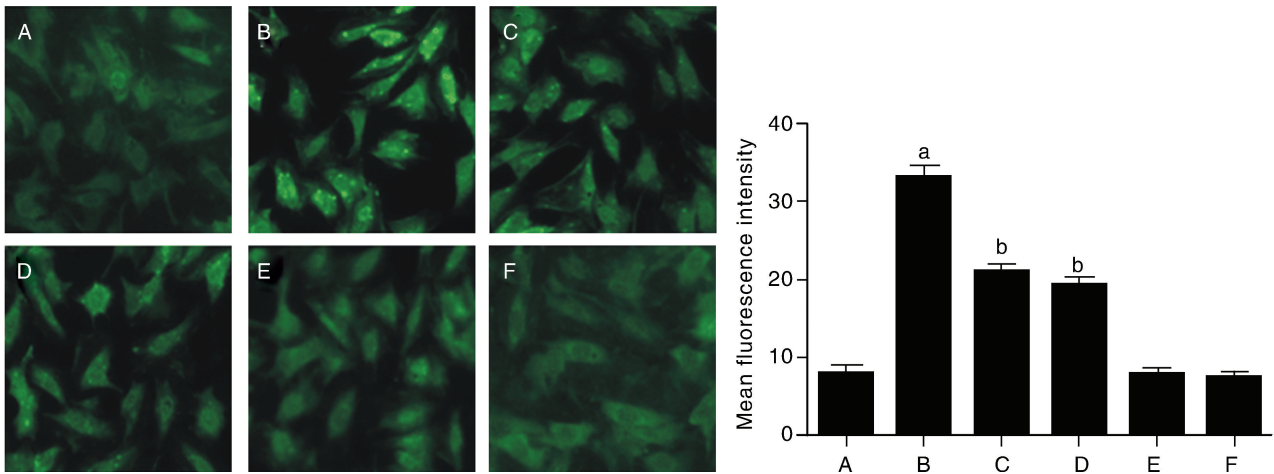


图 5. 硫化氢和 p38MAPK 抑制剂抑制阿霉素引起的心肌细胞内 ROS 堆积(×200)(n=5) A 为正常对照组,B 为 DOX 损伤组,C 为 SB203580 + DOX 组,D 为 NaHS + DOX 组,E 为 SB203580 组,F 为 NaHS 组。a 为 P<0.01,与正常对照组比较;b 为 P<0.01,与 DOX 损伤组比较。

Figure 5. Hydrogen sulfide and p38MAPK inhibitor attenuate doxorubicin-induced ROS accumulation in H9c2 cells

和细胞凋亡,而且能抑制 DOX 引起的 ROS 生成增多,提示 p38MAPK 通路可通过多种作用方式参与 DOX 的心肌毒性作用。

重要的是,本研究证实,H<sub>2</sub>S 在保护心肌细胞对抗 DOX 引起的损伤作用的同时,能抑制 DOX 对心肌细胞 p38MAPK 的激活作用,提示通过抑制 p38MAPK 通路可能是 H<sub>2</sub>S 对抗 DOX 心肌毒性的作用机制之一。在 PC12 细胞,H<sub>2</sub>S 可通过抑制 p-p38MAPK 表达对抗化学性缺氧引起的损伤<sup>[11]</sup>。在人的粒细胞,H<sub>2</sub>S 可通过抑制 p38MAPK 和 Caspase-3 来提高细胞存活率<sup>[15]</sup>。这些研究均支持本文的研究结果。

综上所述,本文率先证实 H<sub>2</sub>S 可通过抑制心肌细胞 p38MAPK 通路来对抗 DOX 引起的心肌毒性,为深入阐明 H<sub>2</sub>S 的心肌保护作用提供了新颖的实验依据,为防治 DOX 的心肌毒性提供了新的治疗靶点。

[参考文献]

[1] Scully RE, Lipshultz SE. Anthracycline cardiotoxicity in long-term survivors of childhood cancer[J]. Cardiovasc Toxicol, 2007, 7 (2): 122-128.

[2] Hrdina R, Gersl V, Klimtova I, et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity[J]. Acta Medica (Hradec Kralove), 2000, 43(3): 75-82.

[3] Wang XY, Yang CT, Zheng DD, et al. Hydrogen sulfide protects H9c2 cells against doxorubicin-induced cardiotoxicity through inhibition of endoplasmic reticulum stress[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 363(1-2): 419-426.

[4] 林连枝, 程飞, 张辉, 等. 依达拉奉对阿霉素诱导的心肌细胞毒性的影响及其机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(8): 603-606.

[5] 郑东诞, 王秀玉, 杨春涛, 等. 氧化应激通过抑制胱硫醚-γ-裂解酶介导阿霉素的心肌毒性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (12): 969-972.

[6] Lou H, Danelisen I, Singal PK. Involvement of mitogen-activated protein kinases in adriamycin-induced cardiomyopathy[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(4): H1 925-930.

[7] Lou H, Kaur K, Sharma AK, et al. Adriamycin-induced oxidative stress, activation of MAP kinases and apoptosis in isolated cardiomyocytes[J]. Pathophysiology, 2006, 13(2): 103-109.

[8] Poizat C, Puri PL, Bai Y, et al. Phosphorylation-dependent degradation of p300 by doxorubicin-activated p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac cells[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25: 2 673-687.

[9] 廖新学, 杨春涛, 杨战利, 等. 硫化氢对抗化学性缺氧引起的心肌细胞损伤及其机制[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(8): 1 012-017.

[10] Su YW, Liang C, Jin HF, et al. Hydrogen sulfide regulates cardiac function and tructure in adriamycin-induced cardiomyopathy[J]. Circ J, 2009, 73: 741-749.

[11] 兰爱平, 梅卫义, 孟金兰, 等. 硫化氢通过抑制 p38MAPK 保护 PC12 细胞对抗化学性缺氧损伤[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(10): 1 339-343.

[12] Wang R. Twoś company, threeś a crowd; can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter[J]. FASEB J, 2002, 16(13): 1 792-798.

[13] Bian JS, Yong QC, Pan TT, et al. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316(2): 670-678.

[14] Yang Z, Yang C, Xiao L, et al. Novel insights into the role of HSP90 in cytoprotection of H<sub>2</sub>S against chemical hypoxia-induced injury in H9c2 cardiac myocytes[J]. Int J Mol Med, 2011, 28 (3): 397-403.

[15] Rinaldi L, Gobbi G, Pambianco M, et al. Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3[J]. Lab Invest, 2006, 86(4): 391-397.

(此文编辑 许雪梅)