

新型硫化氢供体 8L 通过上调 NF-E2 相关因子 2 的表达拮抗 H₂O₂ 损伤 H9c2 心肌细胞

张鹏¹, 张辉², 杨春涛², 解强¹, 李劲草¹, 黄冰生¹, 卓裕丰¹

(1. 广州市番禺区何贤纪念医院心内科; 2. 广州医科大学番禺校区, 广东省广州市 511400)

[关键词] 硫化氢供体; 心肌保护; NF-E2 相关因子 2; 氧化应激

[摘要] **目的** 探讨新型硫化氢供体 8L 对氧化应激诱导心肌细胞损伤的保护作用及 NF-E2 相关因子 2(Nrf2) 有关的分子机制。**方法** 用活性氧供体过氧化氢(H₂O₂)处理培养的大鼠 H9c2 心肌细胞, 建立心肌细胞损伤的体外模型以模拟急性缺血再灌注诱导的心肌损伤; 在 H₂O₂ 处理前给予 8L 预处理观察其对心肌细胞的保护作用。为了明确 Nrf2 的作用, 在 H₂O₂ 处理或 8L 预处理前给予其选择性抑制剂鸦胆苦醇预处理。细胞计数试剂盒 8 比色法检测细胞存活率, 试剂盒法检测乳酸脱氢酶(LDH)的释放, 罗丹明 123 染色结合荧光照相术检测线粒体膜电位(MMP), Western Blot 法检测核内 Nrf2 的表达。**结果** H9c2 心肌细胞经 0~600 μmol/L H₂O₂ 处理 6 h 可浓度依赖性地降低细胞存活率, 且半数有效浓度约为 400 μmol/L。400 μmol/L H₂O₂ 处理 H9c2 心肌细胞 6 h 可使 LDH 释放增加, MMP 降低, 并增加细胞核内 Nrf2 的表达(*P* 均 < 0.01)。在用 400 μmol/L H₂O₂ 处理前, 先用 50、100 和 200 μmol/L 8L 预处理 1 h, 可将细胞存活率从(52.6 ± 4.3)% 分别提高至(72.5 ± 6.3)%、(83.1 ± 5.2)% 和(85.7 ± 4.9)%。200 μmol/L 8L 预处理 1 h 还可明显抑制 H₂O₂ 诱导的 LDH 释放(*P* < 0.01)及 MMP 受损(*P* < 0.05), 但可易化 H₂O₂ 诱导的 Nrf2 表达上调(*P* < 0.01)。另外, 10 μmol/L 鸦胆苦醇预处理 1 h 不但可加重 H₂O₂ 诱导的心肌细胞损伤(*P* < 0.01), 还可拮抗 8L 的心肌细胞保护作用(*P* < 0.01)。**结论** 硫化氢供体 8L 可减轻氧化应激诱导的 H9c2 心肌细胞损伤, 其机制可能与上调 Nrf2 有关。

[中图分类号] R541, R966

[文献标识码] A

A Novel H₂S Donor 8L Protects H9c2 Cardiomyocytes Against H₂O₂-induced Damage in An NF-E2-related Factor 2-dependent Manner

ZHANG Peng¹, ZHANG Hui², YANG Chun-Tao², XIE Qiang¹, LI Jin-Cao¹, HUANG Bing-Sheng¹, and ZHUO Yu-Feng¹

(1. Department of Cardiology, Hexian Memorial Hospital of Panyu; 2. Campus of Panyu, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 511400, China)

[KEY WORDS] H₂S Donor; Myocardial Protection; NF-E2-related Factor 2; Oxidative Stress

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of a novel H₂S donor (8L) on oxidative stress-induced damage and the mechanisms underlying NF-E2-related factor 2 (Nrf2) in H9c2 cardiomyocytes. **Methods** H9c2 cardiomyocytes were treated with exogenous reactive oxygen species, hydrogen peroxide (H₂O₂), to set up an oxidative injury to mimic the in vitro status induced by acute myocardial ischemia-reperfusion. Prior to the treatment with H₂O₂, the cells were treated with 8L and then its protective action was investigated. In order to test the roles of Nrf2, its selective inhibitor brusatol (BR) was used before H₂O₂ or 8L. Cell counting kit-8 was used to measure cell viability. Lactate dehydrogenase (LDH) release was assessed by a commercial kit, mitochondrial membrane potential (MMP) was observed by rhodamine 123 staining followed by photofluorography and nuclear Nrf2 expression was examined by Western Blot assay. **Results** Exposure of H9c2 cardiomyocytes to H₂O₂ ranging from 0 to 600 μmol/L decreased cell viability in a concentration-depend-

[收稿日期] 2014-08-26

[修回日期] 2014-10-22

[基金项目] 广东省科技计划项目(2012A030400033)

[作者简介] 张鹏, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管病的防治, E-mail 为 skybluebird1980@126.com。张辉, 硕士, 讲师, 研究方向为含硫化合物与细胞保护的关系, E-mail 为 zhangh1218@163.com。通讯作者解强, 主任医师, 教授, 研究方向为心血管疾病的临床与基础, E-mail 为 xieqian2013@126.com。

ent manner with a lethal concentration of 400 $\mu\text{mol/L}$. Treatment of the cells with 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 6 h increased LDH release and nuclear Nrf2 expression, while decreased MMP ($P < 0.01$). Before the treatment with 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , the cells were preconditioned with 8L at 50, 100 and 200 $\mu\text{mol/L}$ for 1 h and the cell viability were enhanced to (72.5 \pm 6.3)%, (83.1 \pm 5.2)% and (85.7 \pm 4.9)% from (52.6 \pm 4.3)%, respectively. The pretreatment with 200 $\mu\text{mol/L}$ 8L for 1 h significantly attenuated H_2O_2 -induced LDH release ($P < 0.01$) and MMP loss ($P < 0.05$), while facilitated H_2O_2 -induced upregulation of nuclear Nrf2 expression ($P < 0.01$). Pretreatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ BR for 1 h not only aggravated H_2O_2 -induced cell injury ($P < 0.01$) but also partially blocked 8L-induced cell protection ($P < 0.01$).

Conclusion The novel H_2S donor 8L mitigates oxidative stress-induced injury and the mechanisms may be associated with the activation of Nrf2.

缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, IR) 损伤是缺血后心肌梗死的重要原因。近年来, 尽管新的技术和药物不断涌现, 然而缺血再灌注诱导的心肌损伤仍无法避免。针对缺血再灌注损伤的分子机制探讨并采取有效的干预措施, 对于急性心肌梗死的防治具有重要的研究价值。氧化应激损伤是缺血再灌注诱导心肌损伤的重要原因, 由活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 如过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 含量增加所致。在缺血区的心肌组织中常存在大量的 ROS 并导致细胞损伤^[1]。硫化氢 (hydrogen sulfide, H_2S) 是继一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和一氧化碳 (carbon monoxide, CO) 之后被发现的第三种气体分子, 其不仅可以直接清除 ROS^[2], 还可以上调内源性的抗氧化系统^[3], 具有降低氧化应激损伤的作用, 因而在临床和基础研究中具有潜在的应用前景。目前, H_2S 的供体包括 NaHS 和 Na_2S 等无机盐, 以及合成的一些有机化合物, 如 GYY4137, 它们均通过自发性的电离、水解等方式释放 H_2S , 无法进行干预。另外, 含 S^{2-} 无机盐在空气中极易被氧化, 而 GYY4137 释放 H_2S 的速率很慢 (约为 NaHS 的 0.1%)^[4]。因而合成稳定的、释放可控的 H_2S 供体具有重要的意义。最近, 本课题组与美国华盛顿州大学化学教研室合作进行了可控性 H_2S 供体的研究, 开发出一种释放可控的、化学性质较为稳定的 H_2S 供体。前期工作已证实, 其可释放 H_2S , 并可改善缺血再灌注诱导的小鼠心肌损伤, 而反应过程中的其他副产物无心肌保护效应^[5]。NF-E2 相关因子 2 (NF-E2-related factor 2, Nrf2) 是调控细胞内抗氧化酶 (血红素加氧酶) 的重要转录因子^[6], 另外, H_2S 增强内源性抗氧化活性与 Nrf2 密切相关^[7]。由于本研究组在前期的报道中尚未涉及这类供体心肌保护的详细细胞和分子机制, 因而本研究在前期工作基础上, 按照文献介绍的方法^[8-9], 用 H_2O_2 处理 H9c2 心肌细胞, 建立缺血再灌注诱导心肌损伤的体外模型, 观察合成的新型

H_2S 供体的心肌细胞保护作用及 Nrf2 有关的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

H_2S 供体 8L 由美国华盛顿州大学化学教研室提供, 50% H_2O_2 购自广州化学试剂厂; 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit 8, CCK-8) 购自上海东仁化学科技有限公司, 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒购自碧云天生物技术研究, 罗丹明 123 (rhodamine 123, Rh123) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; Nrf2 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司, 其抑制剂鹅胆苦醇 (Brusatol, BR) 购自美国 BOC Sciences 公司; DMEM 高糖培养基和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibico 公司。

1.2 心肌细胞培养及处理

H9c2 心肌细胞株由上海中科院典型培养物保藏委员会细胞库提供, 该心肌细胞来源于大鼠胚胎期心脏组织, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的条件下培养于含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基中, 每隔 2 天传代一次。(1) H_2O_2 处理: 将 H9c2 心肌细胞暴露于无 FBS 培养基配制的不同浓度的 H_2O_2 中 6 h, 确定 H_2O_2 对 H9c2 心肌细胞的半数致死浓度; (2) H_2S 供体 8L 预处理: 由于 8L 释放 H_2S 需要巯基化合物的激活 (如还原型谷胱甘肽或半胱氨酸), 而常规培养基仅含胱氨酸不含半胱氨酸, 因而根据反应原理在此阶段需加入 3 倍浓度的半胱氨酸, 预处理阶段各组细胞均使用含相同浓度半胱氨酸的培养基配制, 预处理结束后吸出培养基并用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 漂洗 1 次, 通过观察不同浓度 8L 处理后细胞存活率的改变评价其对半数致死浓度 H_2O_2 损伤的最佳保护效果。在半数致死浓度的 H_2O_2 和/或最佳保护浓度的 8L 预处理 H9c2 心肌细胞后, 通过观察细胞形态, 检测 LDH 的释放、线粒体膜电位 (mi-

tochondria membrane potential, MMP) 和核内 Nrf2 的表达水平(可提示其活化)等方面评价 8L 的心肌细胞保护效果。

1.3 检测细胞存活率和乳酸脱氢酶的释放

将 H9c2 心肌细胞接种于 96 孔培养板中,当细胞生长至培养孔底部约 70% 面积时,进行低血清同步化处理 24 h,然后给予各条件培养基处理 6 h。处理结束后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,轻摇,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续孵育 3 h。用酶标仪记录 450 nm 波长处的吸光度(A),每组 4 个复孔,取其平均值,按如下公式计算细胞存活率,细胞存活率(%) = $(A_{\text{处理组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$,实验重复 6 次。

收集各培养孔内的培养基,并向每孔加入 100 μL 的裂解液裂解细胞,按照试剂盒说明书分别检测培养基中以及细胞内 LDH 的含量,通过如下公式计算 LDH 的释放率,LDH 释放率(%) = $\text{LDH}_{\text{培养基}} / (\text{LDH}_{\text{培养基}} + \text{LDH}_{\text{细胞内}}) \times 100\%$,每组包括 6 个复孔。

1.4 线粒体膜电位的检测

将 H9c2 心肌细胞接种于 12 孔培养板内,生长至 70% 融合时先进行同步化处理而后给予 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 6 h 和/或 200 $\mu\text{mol/L}$ 8L 预处理 1 h。处理结束后,用 PBS 漂洗 1 次,加入无血清培养基配制的 2 mg/L Rh123 染液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。用荧光显微镜随机选取 6 个视野进行摄片,并用 Image J 软件对荧光强度进行半定量分析。

1.5 Western Blot 法检测蛋白的表达

将 H9c2 心肌细胞接种于 35 mm 培养皿内,待细胞生长至 70% 融合时进行同步化处理,随后给予条件培养基。待处理完成后,用预冷的 PBS 漂洗 2 次,按照碧云天生物技术研究所提供的核蛋白提取试剂盒说明书提取核蛋白并用 BCA 法进行蛋白定量。所提蛋白经热变性后电泳分离并转移至聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。随后加入 1:1000 稀释的家兔抗大鼠 Nrf2 或 β -tubulin 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜轻摇。TBS-T 漂洗 3 次,加入相应的二抗,室温孵育 1 h,再经 TBS-T 漂洗 3 次。增强型化学发光法显色后,用 Image J 软件对蛋白条带进行半定量分析。

1.6 统计学方法

实验数据用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 及 LSD-t 检验进行, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 H_2O_2 诱导 H9c2 心肌细胞损伤

将 H9c2 心肌细胞用不同浓度的 H_2O_2 处理 6 h,经 CCK-8 比色法检测细胞存活率,结果显示,在 100、200、400、600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组,细胞存活率分别从对照组的 100.0% \pm 0.0% 降低至 86.2% \pm 5.6%、70.1% \pm 3.8%、52.6% \pm 4.3% 和 28.6% \pm 3.4% (P 均 < 0.05 ,相关系数为 -0.99)。另外,由于 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组的细胞存活率约为对照组的 50%,因而选择此浓度的 H_2O_2 作为有效的损伤浓度进行以下实验。

2.2 H_2S 供体 8L 拮抗 H_2O_2 诱导的细胞损伤

在用 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 6 h 前分别给予 50、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 8L 预处理 1 h,细胞存活率均显著提高,与单独 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组的细胞存活率相比差异有显著性($P < 0.05$;表 1)。

另外,在显微镜下观察 H9c2 心肌细胞形态学变化显示,对照组细胞呈长梭形并紧密排列,经 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理后细胞失去原来的正常形态变为椭圆形,细胞膜不完整,而在 H_2O_2 处理前给予 200 $\mu\text{mol/L}$ 8L 预处理 1 h,细胞的形态和数目均有部分恢复(图 1)。

表 1. 不同浓度 H_2S 供体 8L 对 H_2O_2 诱导的细胞损伤的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effect of 8L with different concentration on H_2O_2 -induced cell damage($\bar{x} \pm s$)

分 组	细胞存活率
H_2O_2 组	52.6% \pm 4.3%
50 $\mu\text{mol/L}$ 8L + H_2O_2 组	72.5% \pm 6.3% ^a
100 $\mu\text{mol/L}$ 8L + H_2O_2 组	83.1% \pm 5.2% ^a
200 $\mu\text{mol/L}$ 8L + H_2O_2 组	85.7% \pm 4.9% ^a

a 为 $P < 0.05$,与 H_2O_2 组比较。

2.3 H_2S 供体 8L 抑制 H_2O_2 诱导的乳酸脱氢酶释放

400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 6 h (H_2O_2 组)可使 H9c2 心肌细胞 LDH 释放率明显增多,与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$);而在 H_2O_2 处理前给予 200 $\mu\text{mol/L}$ 8L 预处理 1 h (8L + H_2O_2 组)可明显抑制 LDH 的释放($P < 0.01$),8L 本身(8L 组)对 LDH 的释放无明显影响(表 2)。

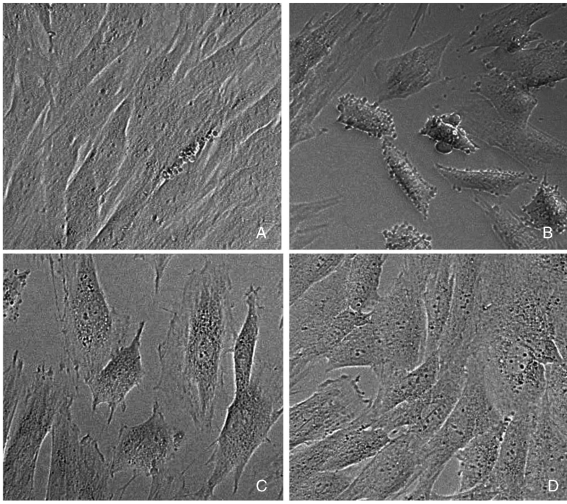


图 1. H₂S 供体 8L 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞形态学改变的影响 A 为对照组(正常培养的 H9c2 细胞),B 为 H₂O₂ 组(400 μmol/L H₂O₂ 处理 6 h),C 为 8L + H₂O₂ 组(200 μmol/L 8L 预处理 1 h 后用 400 μmol/L H₂O₂ 处理 6 h),D 为 8L 组(200 μmol/L 8L 单独处理 1 h 后正常培养 6 h)。

Figure 1. Effects of H₂S donor 8L on the morphological changes of H9c2 cardiomyocytes induced by H₂O₂

2.4 H₂S 供体 8L 抑制 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞线粒体受损

H9c2 心肌细胞在经 400 μmol/L H₂O₂ 处理 6 h (H₂O₂ 组)后 MMP 明显受损,表现为线粒体对荧光染料 Rh123 的摄取能力较对照组明显减弱,二者比较差异有统计学意义($P < 0.01$);而 H₂O₂ 诱导的线粒体损伤可被 200 μmol/L 8L 预处理 1 h(8L + H₂O₂ 组)所改善($P < 0.05$;表 2 和图 2)。

2.5 H₂S 供体 8L 对抗 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤与上调 NF-E2 相关因子 2 有关

H9c2 心肌细胞经 400 μmol/L H₂O₂ 处理 6 h

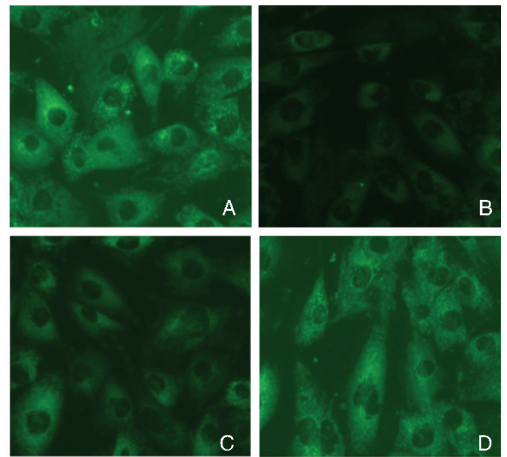


图 2. H₂S 供体 8L 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞线粒体膜电位受损的影响 A 为对照组,B 为 H₂O₂ 组,C 为 8L + H₂O₂ 组,D 为 8L 组。

Figure 2. Effects of H₂S donor 8L on the loss of mitochondrial membrane potential in H9c2 cardiomyocytes

表 2. H₂S 供体 8L 对 H₂O₂ 引起的各指标变化的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2. Effects of H₂S donor 8L on H₂O₂-induced changes of the indicated indexes($\bar{x} \pm s, n = 6$)

指 标	对照组	H ₂ O ₂ 组	8L + H ₂ O ₂ 组	8L 组
LDH 释放率	2.5% ± 1.3%	28.4% ± 5.2% ^a	7.3% ± 2.6% ^c	2.1% ± 0.9%
Rh123 荧光强度	71.5 ± 6.8	32.6 ± 4.4 ^a	48.9 ± 5.1 ^b	73.4 ± 6.2
核内 Nrf2 相对含量	0.37 ± 0.05	0.82 ± 0.09 ^a	1.46 ± 0.15 ^c	0.51 ± 0.03

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与 H₂O₂ 组比较。

3 讨 论

近年来,随着缺血再灌注诱导心肌损伤研究的

(H₂O₂ 组)可使细胞核内 Nrf2 的表达明显增加,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);在 H₂O₂ 处理前给予 200 μmol/L 8L 预处理 1 h(8L + H₂O₂ 组)可使 H₂O₂ 诱导的 Nrf2 表达上调进一步增加,与 H₂O₂ 组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$;表 2 和图 3)。

另外,为了明确核内 Nrf2 的表达上调在 H₂O₂ 损伤 H9c2 心肌细胞中的作用,在 H₂O₂ 处理前给予 10 μmol/L Nrf2 的抑制剂 BR 预处理 1 h,结果显示,BR 可明显加重 H₂O₂ 诱导的心肌细胞损伤,表现为将细胞存活率从 52.6% ± 4.3% 降低至 22.9% ± 3.6%,二者比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。BR 预处理也可拮抗 8L 诱导的心肌保护,使细胞存活率从 85.7% ± 4.9% 降低至 61.9% ± 3.2% ($P < 0.01$)。

不断深入,氧化应激对心脏的损伤作用也逐渐引起人们的重视。组织正常代谢过程中会产生少量的 ROS 并具有一定的细胞内防御作用,但在某些损伤

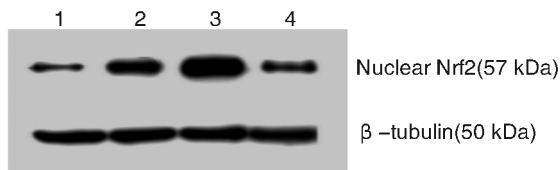


图 3. 不同处理因素对 H9c2 心肌细胞核内 NF-E2 相关因子 2 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为 H₂O₂ 组, 3 为 H₂O₂ + 8L 组, 4 为 8L 组。

Figure 3. Effects of different treatments on the expression of nuclear NF-E2-related factor 2 protein in H9c2 cardiomyocytes

因素作用下,胞内氧化代谢产物增加或清除减弱时,会造成 ROS 堆积并产生细胞毒性。氧化应激在心肌梗死、心力衰竭等过程中具有重要的病理意义,是缺血再灌注诱导心肌损伤的重要原因^[1]。大量堆积的 ROS 常导致细胞膜、胞质成分、酶类以及核酸的氧化损伤,最终导致细胞凋亡或坏死。H₂O₂ 作为一种重要的 ROS,不仅能直接氧化细胞膜脂质和蛋白质而且极易透过细胞膜,造成细胞器损伤。因此本研究采用 H₂O₂ 处理 H9c2 心肌细胞,以模拟缺血再灌注诱导的心肌损伤。结果显示,不同浓度的 H₂O₂ 处理 H9c2 心肌细胞 6 h 后,细胞存活率呈浓度依赖性地降低。不仅在形态学上观察到细胞膜受损,而且在生化指标上也显示胞内心肌酶 LDH 明显外漏至细胞外。另外,在 H₂O₂ 处理心肌细胞的线粒体也存在不同程度的损害,表现为胞内 Rh123 的荧光强度减弱。这与整体动物或急性心肌缺血的患者相比具有一定的类似性,因而认为用 H₂O₂ 处理 H9c2 心肌细胞可以作为缺血再灌注诱导心肌损害的简易体外模型。

H₂S 是近年被广泛研究的气体信号分子,具有确切的抗氧化活性^[2-3]。在体和离体实验均证实, H₂S 具有多种细胞保护效应^[10-13]。目前,常用的 H₂S 供体不外乎含 S²⁻ 无机盐和有机化合物,这些供体由于易被氧化或释放无法控制,其广泛应用往往受到限制。这促使科学家研发性质稳定的、释放可控的 H₂S 供体。本课题组与美国华盛顿州大学化学教研室合作进行了一系列的研究,前期工作证实^[5],合成的 H₂S 供体 8L 在还原型谷胱甘肽或半胱氨酸存在的条件下不仅可以在 PBS 中而且可以在细胞内释放出 H₂S,给予该供体可以减轻缺血再灌注诱导的小鼠心肌细胞损伤。在体内存在大量的还原型谷胱甘肽和半胱氨酸可以保证这种供体进行正常的 H₂S 释放^[14],同时在外界环境中这种供

体不像含 S²⁻ 无机盐那样易被氧化。然而由于当时的研究没有在细胞分子水平观察其对心肌细胞的保护效应,本研究在前期工作基础上进行了适当的拓展。当前结果显示,给予 8L 可以明显减轻 H₂O₂ 处理诱导的 H9c2 心肌细胞损伤,表现为提高细胞的存活率。在形态学上也观察到,8L 处理的细胞较 H₂O₂ 损伤的细胞更接近正常,胞膜更为完整,数目也较多。为了更为详细的检测心肌细胞的胞膜受损情况,又进一步观察了心肌酶谱的改变,发现 8L 可以明显抑制 H₂O₂ 诱导的 LDH 释放,这与 Adlam 等^[15]关于抗氧化可减轻缺血再灌注诱导的心肌损伤和减少 LDH 的释放具有可比性。由于线粒体的氧化损伤是缺血再灌注引起心肌损伤的重要原因^[15],本研究也观察了 8L 对 H₂O₂ 诱导的 MMP 降低的影响,结果显示给予 8L 可以改善线粒体的受损程度,表现为其对 Rh123 的摄取能力增强,Elrod 等^[11]关于 H₂S 通过保存线粒体功能改善缺血再灌注诱导的心肌损伤的报道为此提供了直接支持。这些结果证实, H₂S 供体 8L 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤具有保护效应。

正常情况下, Nrf2 在胞质中与 Keap1 结合处于失活状态;当细胞受刺激时, Keap1 变构导致 Nrf2 解离并活化,进入细胞核,与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合,启动相关基因的表达以抵抗外界刺激诱导的损伤^[6]。为此,本研究首先观察了 Nrf2 在 H₂O₂ 损伤 H9c2 心肌细胞过程中的作用,结果显示, H₂O₂ 处理可使 H9c2 心肌细胞核内 Nrf2 表达水平增加,提示其活化,而给予其抑制剂可加重 H₂O₂ 诱导的心肌细胞损伤,提示 Nrf2 的反应性表达上调在心肌细胞氧化应激损伤过程中起着保护效应。重要的是,给予 8L 可易化 H₂O₂ 诱导的 Nrf2 表达上调,而抑制 Nrf2 则部分阻断了 8L 诱导的细胞保护,这进一步说明 8L 保护 H9c2 心肌细胞对抗氧化应激损伤的效应部分是由 Nrf2 介导的。

总之,本研究证实 H₂O₂ 可在体外模拟缺血再灌注诱导的心肌细胞损伤作用,表现为降低细胞存活率,提高细胞膜通透性,损伤线粒体功能。新型 H₂S 供体 8L 对上述损伤具有明显的改善作用,而这种保护效应可能是通过活化 Nrf2 实现的。

[参考文献]

- [1] Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011, 16 (3-4): 233-238.

- [2] Geng B, Chang L, Pan C, et al. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318 (3): 756-763.
- [3] Kimura Y, Goto Y, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12 (1): 1-13.
- [4] Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide [J]. *Circulation*, 2008, 117 (18): 2351-360.
- [5] Zhao Y, Bhushan S, Yang C, et al. Controllable hydrogen sulfide donors and the activity against myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8 (6): 1283-290.
- [6] Satoh T, McKercher SR, Lipton SA. Reprint of: Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 66: 45-57.
- [7] Peake BF, Nicholson CK, Lambert JP, et al. Hydrogen sulfide preconditions the db/db diabetic mouse heart against ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2 signaling in an Erk-dependent manner [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304 (9): H1215-224.
- [8] Chou HC, Chen YW, Lee TR, et al. Proteomics study of oxidative stress and Src kinase inhibition in H9c2 cardiomyocytes: a cell model of heart ischemia-reperfusion injury and treatment [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49 (1): 96-108.
- [9] Szabo G, Veres G, Radovits T, et al. Cardioprotective effects of hydrogen sulfide [J]. *Nitric Oxide*, 2011, 25 (2): 201-210.
- [10] Chen SL, Yang CT, Yang ZL, et al. Hydrogen sulphide protects H9c2 cells against chemical hypoxia-induced injury [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37 (3): 316-321.
- [11] 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 U S A*, 2007, 104 (39): 15560-565.
- [12] 唐小卿, 杨春涛, 冯鉴强. 第三种气体信号分子硫化氢的神经保护作用研究进展 [J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40 (1): 1-5.
- [13] 胡恒境, 屈顺林, 谭小进, 等. 硫化氢作用于钾通道产生的心血管效应 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21 (2): 182-186.
- [14] Michelet F, Gueguen R, Leroy P, et al. Blood and plasma glutathione measured in healthy subjects by HPLC: relation to sex, aging, biological variables, and life habits [J]. *Clin Chem*, 1995, 41 (10): 1509-517.
- [15] Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, et al. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *FASEB J*, 2005, 19 (9): 1088-095.

(此文编辑 许雪梅)