

硫化氢的心血管效应及分子机制

赵战芝^{1,2}, 任重¹, 唐志晗¹, 姜志胜¹

(南华大学医学院 1. 心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 2. 机能学实验中心, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 硫化氢; 心血管效应; 分子机制

[摘要] 硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是一种新型的内源性气体信号分子, 它的生理和病理意义得到了越来越多的认识。在心血管系统, H₂S 具有舒张血管, 调节血压、血管新生、平滑肌细胞增殖或凋亡, 抗氧化应激和保护心肌等多种生物学效应, 其分子机制与诱导 S-巯基化修饰, 调节自噬, 改变 miRNA、离子通道、SIRT1 和 Nrf2 活性, 交联 NO 和 CO 信号等有密切关系。内源性 H₂S 生成减少参与许多心血管疾病如高血压、动脉粥样硬化、心肌缺血再灌注损伤、心力衰竭的病理过程, 调节内源性 H₂S 生成或给以外源性 H₂S 对心血管疾病的防治具有重要意义。文章对 H₂S 的心血管效应和分子机制的研究进展进行了综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The role and molecular mechanisms of hydrogen sulfide in cardiovascular system

ZHAO Zhan-Zhi^{1,2}, REN Zhong¹, TANG Zhi-Han¹, JIANG Zhi-Sheng¹

(1. Institute of Cardiovascular Disease & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China; 2. Functional Laboratory, School of Medicine, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Hydrogen sulfide; Cardiovascular system; Molecular mechanism

[ABSTRACT] Hydrogen sulfide (H₂S) is a novel endogenous gaseous signal molecule, and plays important role in both physiological and pathophysiological processes including vasodilation, regulation of blood pressure and angiogenesis, anti-oxidation and cardioprotection. The underlying mechanisms involve in induction of S-sulphydration, modulation of autophagy and miRNA expression, regulation of ion channels, SIRT1 and Nrf2 activity, interaction with NO and CO signaling. It has been shown that decrease of endogenous H₂S level links to a variety of cardiovascular diseases such as hypertension, atherosclerosis, myocardial ischemia and reperfusion injury and heart failure. Increased endogenous H₂S production or administration of exogenous H₂S is a new strategy for prevention and treatment of the cardiovascular diseases. This review mainly focuses on the recent progress about the role and mechanisms of hydrogen sulfide in cardiovascular system.

硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是自然界中一种无色有毒、具有臭鸡蛋气味的气体。上世纪九十年代末期, H₂S 被证实可由哺乳动物细胞酶性合成。合成 H₂S 的酶分别是胱硫醚 γ -裂解酶(cystathionine- γ -lyase, CSE)、胱硫醚- β 合酶(cystathionine β -synthase, CBS)和巯基丙酮酸转硫酶(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, 3MST)。其中, CSE 和 CBS 通过催化 L-半胱氨酸合成 H₂S, 这两种酶大量地表达于各种器官, 并具有一定的器官特异性。CBS 是神经系统中 H₂S 的主要合成酶, 在海马、小脑、大脑、脑干等

部位均有表达^[1]。CSE 主要表达于心血管系统。Yang 等^[2]用遗传学方法制备 CSE 基因缺乏小鼠, 测其主动脉、小动脉的 H₂S 含量分别较野生型小鼠减少约 50%~80%, 血清 H₂S 水平也减少 50%, 表明 CSE 是心血管系统 H₂S 的主要来源。而肝、肾、胰腺、回肠、子宫和胎盘组织中 CSE 和 CBS 均有表达。3MST 主要表达于脑组织和血管内皮, 其催化生成的 H₂S 大多数以巯烷硫结合形式存在, 小部分以内源性 H₂S 的形式贮存^[1,3]。与一氧化氮(nitric oxide, NO)一样, 内源性 H₂S 以单纯扩散的方式自由穿透细胞膜, 无需

[收稿日期] 2018-01-19

[修回日期] 2018-02-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81100214、81470435、81670429 和 81170277); 南华大学“双一流”建设重点建设项目(基础医学创新团队)

[作者简介] 赵战芝, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制和防治, E-mail 为 zhaozz99@126.com。通讯作者姜志胜, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病病因发病学和防治, E-mail 为 zsjiang2005@163.com。

特别的膜受体,在心血管系统和中枢神经系统具有广泛的生理学效应^[1],被认为是继 NO 和一氧化碳(carbon monoxide, CO)之后的第三个内源性气体信号分子。它的生物学效应受到了广泛的关注。本文就 H₂S 的心血管效应、对心血管疾病的影响及其作用机制作一综述。

1 H₂S 的心血管效应

已证明, H₂S 在心血管系统具有广泛的生理学效应,如舒张血管,调节血压、血管新生、平滑肌细胞生长或凋亡,抗氧化及保护心肌等。

1.1 调节血管舒张和血压

早在 1997 年, Hosoki 等发现 H₂S 具有舒张门静脉和胸主动脉的作用。随后, Zhao 等^[4]报道 H₂S 可短暂地降低 SD 大鼠动脉血压,并呈剂量依赖性舒张苯肾上腺素预收缩的 SD 大鼠主动脉,此动脉舒张效应是依赖于 ATP 敏感性 K⁺ 离子(adenosine triphosphate-sensitive potassium channel, K_{ATP})通道的开放。在离体的血管平滑肌细胞,给予 H₂S 直接增加 K_{ATP}通道电流。除了主动脉, H₂S 也可舒张肠系膜动脉等小阻力血管。Yang 等^[2]发现 CSE^{-/-}小鼠血压显著降低,表明 H₂S 是一种生理性血管舒张剂和血压调节者。

H₂S 诱导血管舒张效应主要通过非内皮依赖方式,小部分通过内皮依赖机制^[5]。非内皮依赖方式包括活化血管平滑肌 K⁺通道,降低细胞内 pH 和代谢抑制^[5-7]。活化 K⁺通道尤其是活化 K_{ATP}通道是 H₂S 诱导血管舒张效应的主要机制之一^[4]。细胞内酸化是 H₂S 导致血管舒张的另一个机制。H₂S 激活氯/碳酸氢根离子(Cl⁻/HCO₃⁻)交换器,从而降低细胞内 pH。Lee 等^[6]报道,外源性硫化氢(sodium hydrosulfide, NaHS)可呈剂量依赖方式减少血管平滑肌细胞内 pH,如抑制 Cl⁻/HCO₃⁻交换器则削弱 NaHS 诱导的细胞内酸化,并减轻 NaHS 诱导的 SD 大鼠主动脉环舒张效应。Wang 等^[8]报道,细胞内酸化可激活血管平滑肌细胞 K_{ATP}亚型 Kir6.1/SUR2B 通道电流,而抑制 K_{ATP}通道活性可逆转高碳酸性酸中毒诱导的肠系膜动脉舒张。提示 H₂S、K_{ATP}通道和细胞内酸化在调节血管张力时存在环路。内皮依赖机制与 NO 相关^[5]。在大鼠主动脉组织,去除内皮和阻断一氧化氮合酶均可削弱 H₂S 诱导的血管舒张效应^[9]。表明 H₂S 的舒血管效应部分依赖于内皮和 NO。

1.2 调节血管新生

血管新生是从原有血管系统形成一个新的毛细血管生长过程。该过程始于局部基质的降解,随后内皮细胞增殖、迁移和毛细血管萌芽^[10]。

大量文献报道 H₂S 可促进血管新生。在小鼠后肢缺血模型, H₂S 促进新生血管形成^[11]。Longchamp 等^[12]对股动脉结扎的 CSE^{-/-}小鼠研究发现,缺血组织毛细血管密度低, H₂S 生成减少;而局部高表达 CSE 增加了缺血组织 H₂S 产率和血管密度。该效应不依赖于任何其它致血管新生刺激因素,表明 CSE/H₂S 可诱导在体血管新生。离体实验发现,无论是 CSE 抑制剂炔丙基甘氨酸(DL-propargylglycine, PPG)处理的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)还是 CSE^{-/-}内皮细胞,其出芽长度均降低,表明体外血管新生也依赖于 CSE/H₂S。H₂S 的血管新生效应部分通过抑制线粒体电子传递和氧化磷酸化,增加糖摄取和糖酵解性 ATP 产生。在注射了血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的野生型小鼠,缺血组织毛细血管密度显著增加;而注射 VEGF 的 CSE^{-/-}小鼠无此效应。表明 CSE 参与 VEGF 诱导的血管新生。

1.3 调节血管老化

衰老过程中机体出现的重要改变之一是血管内皮细胞的数量和功能下降。而机体和组织极其依赖微血管网络以维持氧供、交换热量和营养物质,排出代谢废物。血管功能的衰退是衰老和衰老相关性疾病的主要原因^[13]。

Qabazard 等^[14]报道, H₂S 可以延长秀丽隐杆线虫的寿命,提示该气体分子可能是衰老的一个内源性调节者。本课题组前期研究发现,给衰老的 HUVEC(采用 H₂O₂诱导细胞衰老)供以 NaHS,可以显著减少衰老标志物衰老相关性 β-半乳糖苷酶(senescence-associated β-galactosidase, SA-β-gal)的活性、上调 Sirtuin 1(SIRT1)活性、及改善内皮细胞功能;而 SIRT1 抑制剂削弱了 H₂S 对衰老的抑制作用。表明 H₂S 通过上调 SIRT1 活性而防止血管内皮衰老^[15-16]。

内皮细胞凋亡和氧化应激程度增加是衰老促使血管新生功能下降的主要原因。Das 等^[13]报道, H₂S 可逆转血管衰老。NaHS 单独处理 HUVEC 可增加 SIRT1 蛋白表达、细胞内烟酰胺二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)水平、内皮细胞迁移能力和出芽长度,显著降低 H₂O₂诱导的主动脉内皮细胞和 HUVEC 凋亡,并协同烟酰胺单核苷

酸(nicotinamide mononucleotide, NMN)增强对内皮细胞凋亡的抑制作用。用 NaHS 与 NMN(NAD 供体)共处理 32 月龄小鼠 4 周可以明显增加其股四头肌毛细血管密度、改善血流和对运动的耐受能力。然而内皮特异性 SIRT1 基因敲除逆转了 NaHS 的促血管新生和改善对运动的耐受能力。在 6 月龄的内皮特异性 SIRT1 基因敲除小鼠,下肢肌肉毛细血管的密度和数量低于年龄性别匹配的野生型小鼠。这进一步表明 H₂S 逆转血管衰老依赖于 SIRT1。

1.4 调节血管平滑肌细胞增殖与凋亡

血管平滑肌参与血管收缩过程。在病理情况下,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)也可迁移入内膜转变成泡沫细胞,促进动脉粥样硬化的发生发展。大量的研究表明 H₂S 可抑制 VSMC 的增殖。

Yang 等^[17]报道,来自 CSE^{-/-}小鼠的平滑肌细胞迁移和生长能力较野生型小鼠增强,应用 NaHS 可显著抑制平滑肌细胞的迁移和生长能力。在高糖处理的大鼠胸主动脉平滑肌细胞,CSE 活性和内源性 H₂S 水平降低;给予 NaHS 显著逆转高糖引起的 VSMC 增殖^[18]。在高糖诱导的人肺主动脉平滑肌细胞,NaHS 可保持线粒体静止、防止其裂变,并抑制平滑肌细胞增殖和迁移^[19]。Shuang 等^[20]报道,NaHS 可减弱胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)与 IGF-1R 的结合,并抑制 IGF-1 诱导的 VSMC 增殖。转录因子 SP-1(specificity protein-1, SP-1)可结合 CSE 的启动子区,促进平滑肌细胞表型转变^[21]。动物实验发现,钙敏感性受体活化后上调内源性 H₂S 产生,防止糖尿病大鼠肠系膜动脉内膜-中膜增厚^[18];NaHS 可逆转 CSE^{-/-}小鼠颈动脉结扎诱导的新生内膜形成^[17]。

除了抑制 VSMC 增殖,外源性 H₂S 和 CSE 过表达均可诱导人主动脉平滑肌细胞凋亡,其机制与 ERK 和 p38 MAPK 的激活、p21 的表达上调及 Cyclin D1 表达下调有关^[22]。

1.5 抗氧化应激

氧化应激是一种细胞内代谢过程,它发生于氧化和抗氧化系统之间的不平衡,导致超氧阴离子(O₂⁻)、羟自由基(OH⁻)、过氧亚硝酸根(ONOO⁻)和过氧化氢(H₂O₂)等活性氧的过量产生^[23]。

许多证据表明,活性氧(reactive oxygen species, ROS)与心血管疾病的发生有关,如心肌缺血再灌注(myocardial ischemia and reperfusion, MI/R)损伤、心肌肥厚等。ROS 的存在会导致脂质过氧化、蛋白质

氧化和 DNA 损伤,这些都会改变正常的细胞功能^[24]。研究发现,NaHS 不仅可抑制血管紧张素 II(Ang II)诱导的大鼠心肌细胞肥大和线粒体功能损害、上调 FoxO3a 和 SOD2 表达,也可抑制主动脉缩窄术诱导的小鼠心肌肥厚和氧化应激,并改善线粒体超微结构和增加线粒体数量,此效应依赖于 SIRT3。表明 H₂S 抑制心肌肥大过程中的氧化应激^[25]。在主动脉缩窄术诱导的压力超负荷心力衰竭小鼠,心脏特异性 CSE 转基因可增强 NO/cGMP 信号和线粒体稳态,减少氧化应激反应,较好地保存心脏结构和功能^[26]。Ng 等^[27]报道,NaHS 降低糖尿病小鼠主动脉 NADPH 氧化酶活性,恢复其内皮功能。在 β 肾上腺素激动剂异丙肾上腺素诱导的心肌病 SD 大鼠,NaHS 通过降低 NADPH 氧化酶活性、ROS 生成而抑制氧化应激,改善其心脏功能^[28]。在高盐所致氧化应激和心肌肥厚大鼠,NaHS 抑制心肌组织氧化应激反应并降低其心肌肥大程度^[29]。上述实验表明,减轻氧化应激和线粒体损伤在 H₂S 保护内皮功能和心脏效应中起关键作用。

H₂S 的抗氧化功能部分归功于直接清除 ROS 和/或抑制 ROS 生成。如 Geng 等^[30]报道,在异丙肾上腺素诱导损伤的心肌,H₂S 通过清除 O₂⁻和 H₂O₂ 来降低脂质过氧化作用。在缺氧/复氧的大鼠心肌细胞,H₂S 通过抑制线粒体复合体 IV 活性、增强超氧化物歧化酶(superoxide dismutases, SOD)活性(如 Mn-SOD 和 CuZn-SOD),减少心肌细胞 ROS 水平,保护心肌细胞^[31]。

线粒体是细胞内 ROS 的主要来源。H₂S 可减少线粒体 ROS 产生^[32]。它的抗氧化功能还依赖于核因子红细胞 2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor-2, Nrf2)介导的信号通路^[33]。Nrf2 是核碱性亮氨酸拉链转录因子 NF-E2(nuclear factor-erythroid 2)家族的成员,可调节多种酶的基因表达,如血红素加氧酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)、硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)、硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)和过氧化氢酶(catalase)^[23]。Calvert 等^[33]认为,外源性 H₂S 在心肌梗死时诱导心肌细胞 Nrf2 转位至细胞核,上调 Trx 1 和 HO-1 的表达。

1.6 心肌保护作用

H₂S 除了具有血管保护功能,还可保护心肌免受缺血再灌注和心力衰竭过程中的损伤。Xiao

等^[34]在新生大鼠心肌细胞缺氧复氧模型上发现,给予 H₂S 可增加心肌细胞的存活力,减少乳酸脱氢酶(LDH)的释放。表明 H₂S 可保护心肌免受缺氧复氧损伤。外源性 H₂S 预处理或心肌梗死后给予 H₂S 处理均可保护心肌细胞,减少梗死面积,改善左心室功能。H₂S 的心肌保护效应与其保护线粒体结构、开放 K_{ATP} 通道、抑制 JNK 和降低 ROS 水平有关^[10,35]。Liu 等^[36]报道,NaHS 预处理通过 PI3K/Akt/FoxO3a 通路减轻阿霉素(doxorubicin)诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡,发挥心肌保护效应。

2 H₂S 与心血管疾病

H₂S 除可调节体内许多生理过程,还在多个系统包括心血管系统、神经系统等的疾病发生发展中具有重要的病理生理意义,此处就 H₂S 与心血管系统疾病的关系作一介绍。

2.1 H₂S 与高血压

大量研究表明,内源性 H₂S 生成减少或酶的缺乏促进高血压的发生。Yang 等^[2]报道 CSE^{-/-}小鼠表现出内皮依赖性血管舒张作用显著减弱和高血压,其血清、心脏、主动脉和其他组织中的 H₂S 水平均显著降低。在盐敏感性大鼠,高盐诱导内源性 H₂S 水平降低和高血压,而 H₂S 供体可拮抗盐敏感性高血压,逆转主动脉结构重构^[37]。在自发性高血压大鼠,血浆 H₂S 水平降低,平均动脉血压较野生型显著增加,使用 NaHS 可降低血压和氧化应激、改善肾血流动力学^[38]。类似的结果还见于原发性高血压患儿。与血压正常的健康儿童比,原发性高血压患儿血浆 H₂S 水平显著降低,收缩压与血浆 H₂S/Hcy(硫化氢/同型半胱氨酸)比值呈负相关^[39]。以上结果表明血浆 H₂S 水平降低可促进高血压的发生。

2.2 H₂S 与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是一种发生于大、中型动脉壁的慢性炎症性病变。大量研究报道 H₂S 在动脉粥样硬化发病中具有重要的病理生理意义。

在 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化模型,血浆 H₂S 水平显著降低;CSE 抑制剂 PPG 进一步降低血浆 H₂S 水平,提高主动脉、血浆细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)水平,增加主动脉根部病变面积;供以 NaHS 增加血浆 H₂S 浓度,降低主动脉和血浆 ICAM-1 水平,减少主动脉根部病变面积^[40]。但 ApoE^{-/-}小鼠主动脉根部病变面积小于 ApoE^{-/-}/CSE^{-/-}小鼠^[41]。表明 CSE 缺失促

进动脉粥样硬化发生发展,上调 H₂S 水平则抑制动脉粥样硬化的形成,CSE/H₂S 是防治动脉粥样硬化的一个重要干预靶点。

在链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的 LDLR^{-/-}糖尿病小鼠模型,给以 H₂S 供体 GYY4137 明显降低主动脉粥样硬化斑块面积和主动脉 ROS 水平。但 GYY4137 不能缩小 LDLR^{-/-}/Nrf2^{-/-}双敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块面积,亦不能抑制 Nrf2^{-/-}小鼠腹腔巨噬细胞源性泡沫细胞形成和氧化应激,表明 H₂S 抑制糖尿病性动脉粥样硬化形成依赖于 Nrf2^[42]。

总之,CSE/H₂S 拮抗动脉粥样硬化的机制包括减弱内皮功能障碍、抗氧化应激损伤、调控细胞凋亡、抑制炎症因子的产生、减少巨噬细胞在病变部位的积累、抑制泡沫细胞形成^[43]、增加调节性 T 细胞数量^[44]等。

2.3 H₂S 与心肌缺血及缺血再灌注损伤

众多研究表明,外源性 H₂S 可拮抗心肌缺血再灌注损伤。King 等^[45]发现,在 CSE^{-/-}小鼠,心肌缺血再灌注损伤较对照组加重,机制与内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)失活,NO 水平降低,氧化应激程度增高有关;外源性 H₂S 可恢复 CSE^{-/-}小鼠心肌的 eNOS 活性和 NO 水平,减轻氧化应激和心肌损伤程度,表明 CSE 缺乏加重心肌缺血再灌注损伤,而外源性 H₂S 可拮抗心肌缺血再灌注损伤。

Calvert 等^[33]发现 H₂S 预处理可显著拮抗心肌缺血损伤,减少心肌梗死面积、降低循环肌钙蛋白(troponin)-I 和氧化应激水平。进一步研究发现,在预处理早期 H₂S 可增加 Nrf2 核转位,上调 PKC ϵ 和 STAT-3 磷酸化;在预处理后期可增加 HO-1、硫氧还蛋白 1、热休克蛋白 90 等的表达,降低促凋亡因子活性。

本课题组^[46]及 Elrod 等^[35]报道,再灌注期给予 H₂S 也可显著拮抗心肌缺血再灌注损伤,减少心肌梗死面积,保护左心室功能。其机制与抑制心肌炎症和保护线粒体结构和功能相关。进一步给予心肌特异性高表达 CSE,更加显著拮抗心肌缺血再灌注损伤、减少心肌梗死面积。这些结果表明,无论给予外源性 H₂S 或上调内源性 H₂S 水平均可减轻心肌缺血再灌注损伤。

另有报道,NaHS 减少大鼠局部心肌缺血再灌注时心肌细胞 Caspase-9 活性、上调 Bcl-2 表达,降低 p38 MAPK(p38 mitogen-activated protein kinase)和 JNK(Jun N-terminal kinase)磷酸化及 NF- κ B p65

(nuclear factor-kappa B p65) 亚基的核转位,拮抗心肌缺血再灌注损伤^[47]。给以 H₂S 供体 ADT 可增加 AMPK 活性,减少大鼠心肌缺血再灌注后心肌梗死面积^[48]。Li 等^[49]报道,缺血再灌注损伤大鼠的心脏 H₂S 生成和 CSE 表达减少,心肌细胞凋亡和心肌梗死明显;缺血后处理增加 H₂S 产率和 CSE 表达,减轻年轻大鼠心脏缺血再灌注损伤;NaHS 可抑制氧化应激,上调 PI3K-Akt-GSK-3 β 通路,增强缺血后处理对年老心脏的保护作用。

二烯丙基三硫(diallyl trisulfide, DATS)是大蒜油中的一种多硫化物成分,可释放 H₂S。给缺血再灌注小鼠注射 200 μ g/kg DATS 后,通过上调 H₂S 水平减少心肌梗死面积、降低心肌肌钙蛋白 I 水平、改善心肌收缩功能,减轻心肌缺血再灌注损伤;在细胞水平, DATS 以浓度依赖性方式减少线粒体呼吸,改善再灌注后线粒体偶联,同时激活 eNOS,提高 NO 的生物利用度^[50]。上述结果为 H₂S 供体应用于临床拮抗心肌缺血再灌注损伤提供了实验依据。

2.4 H₂S 与心力衰竭

在主动脉缩窄诱导的心力衰竭模型中,心肌和循环 H₂S 水平显著降低;与野生型小鼠相比, CSE^{-/-}小鼠在主动脉缩窄后表现出更严重的心脏扩大和功能障碍。而心肌特异性 CSE 转基因小鼠在主动脉缩窄后可维持心脏结构和功能。这些结果表明,心力衰竭时 H₂S 水平降低,而上调 CSE、增加 H₂S 水平可保护心力衰竭动物的心功能^[26]。

Calvert 等^[51]发现,心肌过表达 CSE 的心力衰竭小鼠心脏结构和功能较对照组明显改善;在再灌注时或心肌缺血后的 7 天内每日给予 H₂S 供体 Na₂S 也可通过减轻氧化应激和线粒体功能障碍、增加 AKT 的磷酸化和 Nf 2 核转位,抑制左心室结构和功能恶化。表明外源性 H₂S 对缺血所致心力衰竭有一定的疗效。

在主动脉缩窄术诱导的压力超负荷心力衰竭模型,使用 H₂S 供体 DATS 可改善左心室重构,保护左心室功能。DATS 可增加心肌 VEGF 的表达,减少血管生成抑制因子血管抑素(angiotatin)的表达,增加心肌血管密度。表明 H₂S 可通过促进血管新生改善心力衰竭时左心室重构和左心室功能障碍^[52]。

3 H₂S 心血管效应的分子机制

H₂S 广泛的心血管效应涉及到许多信号通路。该气体信号分子可诱导 S-巯基化(S-sulfhydration),

调节 miRNA 活性和自噬,改变离子通道活性、SIRT1 和 Nrf2 活性,交联 NO 和 CO 介导的信号,上调激酶、磷酸酶与转录因子的活性等(图 1)。

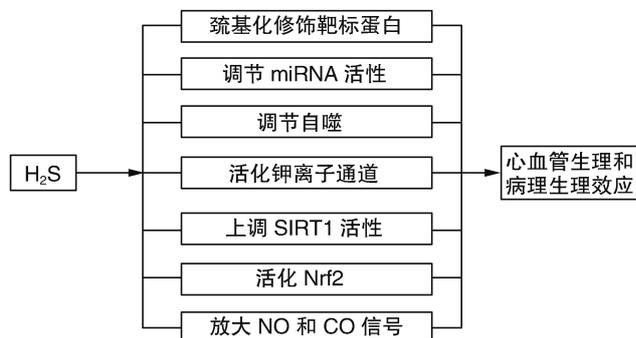


图 1. H₂S 介导心血管效应的分子机制

Figure 1. The molecular mechanisms of H₂S induced cardiovascular effect

3.1 S-巯基化修饰

巯基化修饰是 H₂S 在细胞内对蛋白质进行的一种翻译后修饰,即 H₂S 将靶蛋白的一个游离半胱氨酸残基(-SH)修饰成-S-SH^[53]。蛋白质一经巯基化修饰,将影响自身功能、在细胞内的定位及对氧化应激的抵抗程度^[54-55]。

大量研究表明, H₂S 巯基化修饰靶蛋白是其发挥心血管保护效应的一个新机制。在人脐静脉内皮细胞,采用 CBS 抑制剂或沉默 *cbs* 表达使 H₂S 生成减少后,显著减少转录因子 SP-1 在 Cys68 和 Cys755 位点的 S-巯基化、下调 VEGFR-2 表达;给予 H₂S 可回升 CBS^{-/-}内皮细胞 SP-1 水平及 SP-1 与 VEGFR-2 启动子的结合活性,增强 VEGFR-2 表达及 VEGFR-2 依赖性增殖和迁移功能。表明 H₂S 可通过 S-巯基化修饰 SP-1 维持血管内皮功能^[56]。在大鼠心肌细胞, H₂S 供体 GYY4137 增加细胞 SP-1 Cys664 位点的 S-巯基化,降低 SP-1 和 KLF5 (kruppel-like factor 5) 启动子的结合活性,降低 KLF5 mRNA 表达,从而抑制心肌细胞肥大。在自发性高血压大鼠也已证实,使用该供体 4 周可抑制心肌肥大,减少肥大心肌细胞中 KLF5 的表达,增加 SP-1 S-巯基化修饰^[57]。

蛋白质酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase, PTP1B) 在内质网应激中发挥重要作用。蛋白激酶样内质网激酶 (protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 可磷酸化真核翻译起始因子 2 (eukaryotic translational initiation factor

2),抑制蛋白翻译。PTP1B可调节PERK活性,从而调节蛋白质翻译。H₂S可使PTP1B的半胱氨酸残基(Cys215)发生巯基化修饰,从而可逆性的灭活PTP1B。当细胞处于内质网应激时,CSE/H₂S巯基化修饰PTP1B,抑制其活性,因此上调PERK的活性,促进内质网重新进入稳态^[58]。

Nrf2和Keap1是调节氧化应激的重要因子。CSE^{-/-}小鼠胚胎成纤维细胞较野生型细胞的氧化应激增强,细胞衰老加速,给以NaHS可S-巯基化修饰CSE^{-/-}小鼠胚胎成纤维细胞的Keap1,诱导Nrf2从Keap1解离,增强Nrf2核转位,刺激Nrf2下游基因谷氨酸半胱氨酸连接酶(glutamate-cysteine ligase)和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase)mRNA表达,从而延缓细胞衰老^[59]。在STZ诱导的LDLR^{-/-}糖尿病小鼠,H₂S同样可增加Keap1 S-巯基化修饰,促进Nrf2/Keap1解离和Nrf2核转位,抑制O₂⁻的产生,减少主动脉ROS水平和动脉粥样硬化斑块形成。上述结果表明,H₂S对Keap1进行的S-巯基化修饰可能是防治糖尿病性动脉粥样硬化一个新的干预靶点^[42]。

NF-κB是一个多功能的转录因子。H₂S可增强巨噬细胞p65的S-巯基化,发挥抗凋亡或抗炎效应。Sen等^[60]发现,肿瘤坏死因子可以增加巨噬细胞p65与抗凋亡基因启动子的结合,CSE^{-/-}小鼠巨噬细胞不具有抗凋亡效应,而cse高表达或给以外源性H₂S则显著改善CSE^{-/-}小鼠巨噬细胞的抗凋亡效应。这与H₂S S-巯基化修饰p65(在Cys38残基),增加它对抗凋亡基因的转录活性有关。

H₂S也可诱导离子通道S-巯基化,从而调节离子通道活性^[61]。Naik等^[62]报道,Na₂S可通过提高主动脉内皮细胞TRPV4通道的巯基化水平、上调TRPV4活性,介导血管舒张,其机制与H₂S激活内皮细胞TRPV4依赖的Ca²⁺内流和BK通道活化有关。

Kir6.1是ATP敏感性钾通道的一个亚单位,在CSE缺乏或突变的情况下,Kir6.1不被S-巯基化,在CSE过表达后则发生S-巯基化修饰,使更多的磷脂酰肌醇4,5二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)结合Kir6.1,从而促进K_{ATP}通道活化、改善血管舒张^[63]。

Cheung等^[64]在ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化模型中发现,H₂S增加主动脉蛋白质S-巯基化修饰。这些修饰的蛋白质的功能与抗氧化反应、生物调节、代谢尤其是脂代谢等相关。在70个S-巯基化修饰的蛋白质中,谷胱甘肽过氧化物酶1(GPx1)S-巯

基化水平显著增加。与此一致的是,GPx1大量表达于H₂S处理小鼠的主动脉根部,其血浆GPx1活性也较对照小鼠高2.4倍。表明S-巯基化提高GPx1水平和活性,后者可拮抗机体氧化损伤。这些结果提示H₂S可通过调节脂代谢和抗氧化反应减轻动脉粥样硬化。

3.2 对miRNA的影响

MicroRNA(miRNA)是RNA中包含约22个核苷酸的小非编码分子,参与RNA沉默和基因表达的转录后调控。miRNA参与许多生理与病理生理效应,对心血管疾病或相关病变如高血压、心肌梗死、心力衰竭和动脉粥样硬化等的发生发展发挥重要影响。最近的研究表明H₂S在上述疾病过程中可以调控miRNA的表达。

在小鼠心肌缺血和炎症损伤模型中,Na₂S通过诱导miR-21表达,抑制心肌细胞凋亡和坏死,抑制心肌缺血再灌注损伤后心肌炎症反应、缩小梗死面积^[65]。miR-133a在糖尿病心力衰竭患者表达下调。在新生大鼠心肌细胞,给予NaHS(100 μmol/L)可上调miR-133a,抑制苯肾上腺素诱导的心肌细胞肥大^[66]。给予Na₂S(30 μmol/L)可增加miR-133a水平,抑制高同型半胱氨酸血症诱导的心肌细胞肥大^[67]。提示H₂S通过上调miR-21和miR-133a,拮抗心肌细胞损伤,抑制多种病理因素引起的心肌细胞肥大。Kang等^[68]发现,缺氧复氧使新生大鼠心肌细胞凋亡增加,miR-1表达上调,Bcl-2表达下降。H₂S预处理则下调miR-1表达,上调Bcl-2表达,减轻心肌细胞凋亡和LDH释放,提高心肌细胞存活力。H₂S还可减轻SD大鼠心脏缺血再灌注损伤诱导的心肌细胞凋亡,miR-1通过下调Bcl-2表达而削弱H₂S对心肌细胞的保护作用。这些结果表明抑制miR-1表达可能是H₂S发挥心肌保护作用的重要机制。miR-122在冠状动脉疾病患者表达上调,DATS可呈剂量依赖方式下调miR-122水平^[50]。提示miRNA-122可成为H₂S干预心血管疾病发生发展的新靶点。

有研究表明,不仅H₂S可以调节miRNA表达,病理情况下miRNA也可调节CSE表达。在人THP-1巨噬细胞模型,miR-186可直接抑制CSE蛋白和mRNA表达,增加巨噬细胞脂质蓄积^[69];而miR-216a可下调CSE和ATP结合盒转运体A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)表达,减少THP-1巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出^[70]。主动脉平滑肌细胞过表达miR-21抑制CSE和SP-1的蛋白表达,抑

制 H₂S 产生,刺激平滑肌细胞增殖,下调平滑肌细胞分化相关基因的表达,通过靶向 SP-1 参与 CSE/H₂S 对平滑肌细胞的增殖和分化的调节^[71]。

Shen 等^[72]发现,抑制 miR-30 可上调缺血再灌注大鼠心肌 CSE 表达和 H₂S 的产生,拮抗心肌缺血损伤。在大鼠去卵巢模型,心肌 miR-22 水平增高,雌激素 E2 治疗使 miR-22 表达回归正常,同时,雌激素 E2 经雌激素受体 α 上调 SP-1 转录,后者直接结合 CSE 的启动子区上调 CSE 转录和 H₂S 生物合成。miR-22 通过抑制雌激素受体 α 和 SP-1 而下调 CSE 转录。这些研究表明 miRNA 可调节 CSE 表达和 H₂S 的生成^[73-74]。

3.3 对自噬的影响

自噬是一个细胞内的分解代谢过程,在这个过程中细胞质成分(如聚合蛋白质)和功能失调的细胞器被一层双重的膜包围,形成自噬体。后者被转运到溶酶体降解和再循环利用^[75]。当遇到来自细胞内外的各种应激如营养缺乏、激素治疗、病原体感染、蛋白质错误折叠和细胞器受损时,自噬则成为一种补救机制,经溶酶体驱动的降解,回收利用胞质的物质和保存能量^[54]。自噬的完成涉及到一组进化上保守的基因产物,被称为 Atg (autophagy-related gene) 蛋白。这些蛋白通常与自噬体的蓄积密切相关^[54]。自噬功能障碍可以诱发多种人类疾病,而 H₂S 可影响(既可促进又可抑制)自噬的发生。

给予 H₂S 可下调缺氧复氧心肌细胞自噬相关基因 Beclin1 和 LC3-II,上调 p-mTOR 水平,增加心肌细胞的存活力,减少 LDH 的释放。这些结果与自噬抑制剂 3-MA 的效应类似,mTOR 抑制剂雷帕霉素削弱 H₂S 的上述作用。表明心肌细胞在缺氧复氧损伤期间发生了自噬,通过 H₂S 活化 mTOR、抑制自噬,减轻心肌细胞的缺氧复氧损伤^[34]。Jiang 等^[76]在同样的缺氧复氧心肌细胞模型上发现,H₂S 可能通过 PI3K/SGK1/GSK3 β 信号通路抑制自噬、增加心肌细胞的存活力。在大鼠心肌缺血再灌注模型,给以 H₂S 供体 ADT 可增加 AMPK 活性,减少心肌梗死面积,减弱缺血再灌注诱导的自噬体蓄积(表现为 LC3-II/LC3-I 比值增加,Beclin-1 和 P62 上调,LAMP-2 下调),表明 H₂S 可恢复缺血再灌注期间损坏的自噬流^[48]。

Chen 等^[77]在老龄离体大鼠心脏和老化心肌细胞模型上观察到,外源性 H₂S 显著恢复缺血后处理对心肌的保护作用,如减少心肌损伤、梗死面积、凋亡,改善心肌功能,增加心肌细胞的存活力和自噬,

上调 AMPK/mTOR 通路。自噬抑制剂(3-MA)削弱上述作用。以上结果表明,H₂S 可通过激活 AMPK/mTOR 通路、上调自噬,促进缺血后处理对老化心肌的保护作用。

在 db/db 大鼠主动脉和葡萄糖处理的大鼠主动脉内皮细胞,外源性 H₂S 减轻黏附分子的表达,抑制内皮细胞凋亡,上调 SOD 和 CAT 表达与活性,增加 ATP 产生,降低 p-AMPK/AMPK 比值,降低自噬水平,增加细胞核 Nrf2 水平。提示外源性 H₂S 可通过 Nrf2-ROS-AMPK 信号通路抑制氧化应激诱导的自噬保护内皮细胞^[78]。纤维化是糖尿病心肌损害的主要病理特征。给以糖尿病大鼠 NaHS 处理,心肌纤维化和自噬减轻,PI3K/AKT1 信号通路上调。表明 NaHS 可能通过上调 PI3K/AKT1 信号通路、减轻自噬而抑制糖尿病诱导的心肌纤维化^[79]。

3.4 对离子通道的影响

H₂S 可通过活化 K⁺ 通道发挥心血管效应。例如,H₂S 通过开放 K_{ATP} 通道,诱导血管舒张。该通道是由四个 Kir6.x 亚单位组成的蛋白复合物。四个 Kir6.x 亚单位形成离子通道小孔,被四个磺酰脲受体围绕。Kir6.1 或 Kir6.2 亚单位属于弱内向整流电压独立钾通道。一些化合物可作用于磺酰脲受体调节通道的活性——使通道关闭或者开放^[23]。

H₂S 是血管平滑肌细胞 K_{ATP} 通道的活化因子^[4],它可直接增加平滑肌细胞 K_{ATP} 通道电流、使膜超极化。Zhao 等^[4]报道,静脉注射 H₂S 供体的大鼠血压迅速降低 12~30 mmHg,K_{ATP} 通道抑制剂逆转 H₂S 的上述作用;H₂S 也以 K_{ATP} 通道依赖性方式舒张离体主动脉组织;还可增加肠系膜动脉平滑肌细胞 K_{ATP} 通道电流,呈浓度依赖性舒张大鼠肠系膜动脉;格列苯脲可抑制这一效应。进一步研究表明,K_{ATP} 通道在 H₂S 血管效应中的作用因组织而异。大鼠肠系膜动脉对 H₂S 的敏感性比主动脉组织高 5 倍,其次为冠状动脉^[80]。尽管文献报道 K_{ATP} 通道活化是 H₂S 舒张血管的主要机制,但 Martelli 等^[81]发现,H₂S 使 CHO 细胞 kv7.4 通道开放阈值降低,使离体主动脉环舒张,促进人血管平滑肌细胞膜超极化,而 kv7.4 电压门控钾通道选择性抑制削弱 H₂S 的上述作用。表明 kv7.4 通道的激活在 H₂S 舒血管效应中也起重要作用。

H₂S 也通过活化 K_{ATP} 通道发挥心肌保护效应。给予心肌缺血大鼠 H₂S 可激活心肌细胞膜上的 K_{ATP} (sarcolemmal K_{ATP}) 通道,拮抗心肌缺血性损伤,提高细胞的生存能力、保护细胞功能。应用非选择

性抑制剂格列苯脲和细胞膜 K_{ATP} 通道抑制剂可以显著削弱 H_2S 的保护作用^[82]。NaHS 处理局部心肌缺血再灌注大鼠能保护其心肌细胞功能,线粒体膜 K_{ATP} (mitochondrial K_{ATP}) 通道抑制剂 5-羟色胺 (5-hydroxydeconoate) 逆转 NaHS 的保护作用。这些研究表明, H_2S 除了调节细胞膜 K_{ATP} 通道,也调节线粒体膜 K_{ATP} 通道活性^[47]。

在离体培养的心室肌细胞,给予 0.03 mmol/L ATP 使 K_{ATP} 通道活性下降 41%,而给予 H_2S (100 μ mol/L) 可显著升高 K_{ATP} 通道活性,并拮抗大剂量 ATP (3 mmol/L) 对 K_{ATP} 通道的阻滞效应。表明 H_2S 可调节 K_{ATP} 通道对 ATP 的敏感性^[23]。

有报道, K_{ATP} 通道开放后激活 PKC,使肌浆网-内质网钙离子-ATP 酶 (sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA) 激活,促进肌浆网摄取 Ca^{2+} 增加^[83]。

迄今, H_2S 活化 K_{ATP} 通道的确切机制尚未完全阐明。文献报道提示:① H_2S 可直接开放平滑肌细胞 K_{ATP} 通道;② H_2S 与 K_{ATP} 通道蛋白直接相互作用,诱导通道的二硫键还原;③ H_2S 可 S-巯基化 K_{ATP} 通道 Kir6.1 亚单位^[23]。

3.5 H_2S 和 SIRT1

SIRT1 是一个组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase),通过使功能蛋白质乙酰化,起抗衰老和抗动脉粥样硬化效应。我们前期研究发现 H_2S 可上调血管内皮细胞 SIRT1 活性,抑制 H_2O_2 诱导的内皮细胞衰老^[15]。

最近, Du 等^[84] 报道, H_2S 供体 (NaHS 或 GY 4137) 可降低 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块面积,减少巨噬细胞浸润和主动脉炎症反应,增加主动脉和肝脏 SIRT1 mRNA 的表达;内源性 H_2S 可直接 S-巯基化修饰 SIRT1,增强其与锌离子结合,并提高 SIRT1 的去乙酰化活性和稳定性,从而减少动脉粥样硬化斑块形成。

3.6 H_2S 和 Nrf2 及其它信号通路

Nrf2 是一个重要的抗氧化应激转录因子,调节众多抗氧化基因和细胞保护基因的表达。ROS 是心血管疾病的一个重要危险因素,可导致内皮细胞凋亡;激活 NF- κ B,增加黏附分子和细胞因子表达,增强单核细胞黏附;使线粒体功能障碍^[1,85]。

Xie 等^[42] 报道, H_2S 可活化 Nrf2 信号抑制氧化应激,从而抑制糖尿病诱导的动脉粥样硬化。外源性 H_2S 通过 Nrf2-ROS-AMPK 信号通路抑制氧化应激诱导的内皮细胞自噬^[78]。 H_2S 预处理可激活心肌缺血小鼠的 Nrf2 信号,上调抗氧化蛋白 HO-1 和

硫氧还蛋白 1 的表达,减轻心肌缺血损伤^[33]。

此外, H_2S 还通过调节转录因子 (NF- κ B、KELCH、SP-1 等)、细胞内蛋白质或酶 (例如 p66shc、磷酸化蛋白酪氨酸磷酸酶 1B、有丝分裂原激活的细胞外信号调节激酶 1、ATP 合成酶亚基 A、PKA、PKC 等)、膜受体 (VEGFR-2、胰岛素受体和 IGF1R) 等参与心血管各种生理过程和疾病的调节。

3.7 H_2S 和 NO、CO 相互作用

大量文献显示 H_2S 、NO 和 CO 之间存在相互作用,对心脏保护起协同效应。 H_2S 通过放大心脏和循环中 NO 和 CO 信号可能是其另一个细胞保护机制。

内皮细胞中的 NO 由 eNOS 合成,它的作用受鸟苷酸环化酶和第二信使 cGMP 调节。研究发现,抑制 eNOS 或去内皮可减轻 H_2S 对大鼠主动脉的舒张作用^[9]。在心肌保护效应方面,NO 和 H_2S 在产生和信号转导途径上也存在相互影响。King 等^[45] 报道, CSE^{-/-} 小鼠的 eNOS 功能和 NO 水平降低,加重心肌缺血再灌注损伤;而供以外源性 H_2S 可上调 CSE^{-/-} 小鼠的 eNOS 活性,显著增加 NO 的生物利用度,减轻心肌缺血再灌注损伤。但 H_2S 不能减轻 eNOS 突变 (S1179A) 小鼠心肌缺血再灌注损伤。说明 H_2S 介导的心肌缺血再灌注损伤拮抗效应部分依赖于 eNOS 活性和 NO 产生。在主动脉缩窄的 CSE^{-/-} 小鼠,予以 H_2S 处理可激活 VEGF-Akt-eNOS-NO-cGMP 信号通路,减少氧化应激、增加心肌血管密度,具有明显的心脏保护作用^[26]。

目前的文献表明, H_2S 调节 NO 生成主要通过诱导 eNOS 表达、上调 eNOS 活性和调节 eNOS 磷酸化三种机制。NaHS 可以减少内皮细胞 eNOS 抑制位点 Thr495 的磷酸化,增强 eNOS 活化位点 Ser1177 的磷酸化。 H_2S 也可通过上调 eNOS 源性 NO 的产生,经 NO/cGMP 信号发挥心血管效应^[86]。

Donnarumma 等^[87] 报道,NO 也可调节 H_2S 的生成。给缺血诱导的慢性心力衰竭小鼠予以 NO 供体亚硝酸钠 (NaNO₂) 治疗 4 周, CSE 和 CBS 活性显著上调, H_2S 产率明显增加,进而激活 Nrf2 信号通路,明显改善左心室功能。

ZYZ-803 是一种新合成的 H_2S -NO 供体,它可剂量依赖性地改善异丙肾上腺素诱导的心力衰竭动物左心室重构和左心室功能,其心脏保护效应强于 H_2S 和 NO 单独处理组。阻断 CSE 或 eNOS 活性可抑制 ZYZ-803 诱导的 H_2S 和 NO 产生及心脏保护效应。表明 H_2S 和 NO 可协同改善心力衰竭时的左心室重构^[88]。

H_2S 和 CO 的协同作用在缺氧性肺动脉高压

(hypoxic pulmonary hypertension, HPH) 动物模型上得到证实。外源性 H₂S 可降低肺动脉压,上调血浆 CO 水平和肺动脉内 HO-1 蛋白及 mRNA 的表达; CSE 抑制剂 PPG 则降低血浆 H₂S 和 CO 水平、下调肺动脉内 HO-1 蛋白和 mRNA 表达,同时加重 HPH。表明 H₂S 可能通过上调 CO/HO 通路拮抗 HPH^[89]。

4 结 语

H₂S 具有广泛的生物学效应,在生理过程中起着重要的调节作用。同时,该气体信号分子也对缺血性心脏病、动脉粥样硬化、心力衰竭、高血压等心血管疾病的发生发展具有重要的影响,是防治这些心血管疾病的一个重要的、极具前景的干预靶点。加强对 H₂S 的基础与转化医学研究可望为心血管疾病的发病机制提供新的认识,为其防治带来新的策略,具有重要的理论与应用价值。

[参考文献]

- [1] Shefa U, Kim MS, Jeong NY, et al. Antioxidant and cell-signaling functions of hydrogen sulfide in the central nervous system[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 1873962.
- [2] Yang G, Wu L, Jiang B, et al. H₂S as a physiological relaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase[J]. *Science*, 2008, 322(5901): 587-590.
- [3] Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, et al. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(4): 703-714.
- [4] Zhao W, Zhang J, Lu Y, et al. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener[J]. *EMBO J*, 2001, 20(21): 6 008-016.
- [5] Gheibi S, Jeddi S, Kashfi K, et al. Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: implications in hypertension [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 149: 42-59.
- [6] Lee SW, Cheng Y, Moore PK, et al. Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358(4): 1 142-147.
- [7] Kiss L, Deitch EA, Szabo C. Hydrogen sulfide decreases adenosine triphosphate levels in aortic rings and leads to vasorelaxation via metabolic inhibition[J]. *Life Sci*, 2008, 83: 589-594.
- [8] Wang X, Wu J, Li L, et al. Hypercapnic acidosis activates KATP channels in vascular smooth muscles[J]. *Circ Res*, 2003, 92(11): 1 225-232.
- [9] Zhao W, Wang R. H(2)S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283(2): H474-480.
- [10] Wang MJ, Cai WJ, Zhu YC. Hydrogen sulphide in cardiovascular system: cascade from interaction between sulphur atoms and signaling molecules[J]. *Life Sci*, 2016, 153: 188-197.
- [11] Bir SC, Kolluru GK, McCarthy P, et al. Hydrogen sulfide stimulates ischemic vascular remodeling through nitric oxide synthase and nitrite reduction activity regulating hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis[J]. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(5): e004093.
- [12] Longchamp A, Mirabella T, Arduini A, et al. Amino acid restriction triggers angiogenesis via GCN2/ATF4 regulation of VEGF and H₂S production[J]. *Cell*, 2018, 173(1): 117-129.
- [13] Das A, Huang GX, Bonkowski MS, et al. Impairment of an endothelial NAD⁺-H₂S signaling network is a reversible cause of vascular aging[J]. *Cell*, 2018, 173(1): 74-89.
- [14] Qabazard B, Li L, Gruber J, et al. Hydrogen sulfide is an endogenous regulator of aging in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20: 2 621-630.
- [15] Suo R, Zhao ZZ, Tang ZH, et al. Hydrogen sulfide prevents H₂O₂-induced senescence in human umbilical vein endothelial cells through SIRT1 activation[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(6): 1 865-870.
- [16] Zhang Y, Tang ZH, Ren Z, et al. Hydrogen sulfide, the next potent preventive and therapeutic agent in aging and age-associated diseases[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(6): 1 104-113.
- [17] Yang G, Li H, Tang G, et al. Increased neointimal formation in cystathionine gamma-lyase deficient mice: role of hydrogen sulfide in α 5 β 1-integrin and matrix metalloproteinase-2 expression in smooth muscle cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(3): 677-688.
- [18] Zhong Y, Wang J, Wu A, et al. Calcium sensing receptor regulating smooth muscle cells proliferation through initiating cystathionine-gamma-lyase/hydrogen sulfide pathway in diabetic rat Cell [J]. *Physiol Biochem*, 2015, 35: 1 582-598.
- [19] Sun A, Wang Y, Liu J, et al. Exogenous H₂S modulates mitochondrial fusion-fission to inhibit vascular smooth muscle cell proliferation in a hyperglycemic state[J]. *Cell Biosci*, 2016, 6: 36.
- [20] Shuang T, Fu M, Yang G, et al. The interaction of IGF-1/IGF-1R and hydrogen sulfide on the proliferation of mouse primary vascular smooth muscle cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 149: 143-152.
- [21] Yang G, Pei Y, Teng H, et al. Specity protein-1 as a critical regulator of human cystathionine gamma-lyase in smooth muscle cells[J]. *Biol Chem*, 2011, 286: 26 450-460.
- [22] Yang G, Wu L, Wang R, et al. Pro-apoptotic effect of endogenous H₂S on human aorta smooth muscle cells[J]. *FASEB J*, 2006, 20(3): 553-555.
- [23] Donnarumma E, Trivedi RK, Lefer DJ. Protective actions of H₂S in acute myocardial infarction and heart failure [J]. *Compr Physiol*, 2017, 7(2): 583-602.
- [24] Venardos KM, Perkins A, Headrick J, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review[J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14: 1 539-549.
- [25] Meng G, Liu J, Liu S, et al. Hydrogen sulfide pretreatment improves mitochondrial function in myocardial hypertrophy via a SIRT3-dependent manner[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(8): 1 126-145.
- [26] Kondo K, Bhushan S, King AL, et al. H₂S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase[J]. *Circulation*, 2013, 127(10): 1 116-127.
- [27] Ng HH, Yildiz GS, Ku JM, et al. Chronic NaHS treatment decrea-

- ses oxidative stress and improves endothelial function in diabetic mice[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2017, 14(3): 246-253.
- [28] Zhang Z, Jin S, Teng X, et al. Hydrogen sulfide attenuates cardiac injury in takotsubo cardiomyopathy by alleviating oxidative stress [J]. *Nitric Oxide*, 2017, 67: 10-25.
- [29] Huang P, Shen Z, Yu W, et al. Hydrogen sulfide inhibits high-salt diet-induced myocardial oxidative stress and myocardial hypertrophy in Dahl rats[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 128.
- [30] 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: 756-763.
- [31] Sun WH, Liu F, Chen Y, et al. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421: 164-169.
- [32] Xie ZZ, Shi MM, Xie L, et al. Sulfhydration of p66Shc at cysteine59 mediates the antioxidant effect of hydrogen sulfide [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(18): 2531-542.
- [33] Calvert JW, Jha S, Gundewar S, et al. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling[J]. *Circ Res*, 2009, 105(4): 365-374.
- [34] Xiao J, Zhu X, Kang B, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial hypoxia-reoxygenation injury by inhibiting autophagy via mTOR activation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(6): 2444-453.
- [35] 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.
- [36] Liu MH, Zhang Y, He J, et al. Hydrogen sulfide protects H9c2 cardiac cells against doxorubicin-induced cytotoxicity through the PI3K/Akt/FoxO3a pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(6): 1661-668.
- [37] Huang P, Chen S, Wang Y, et al. Down-regulated CBS/H2S pathway is involved in high-salt-induced hypertension in Dahl rats [J]. *Nitric Oxide*, 2015, 46: 192-203.
- [38] Ahmad FU, Sattar MA, Rathore HA, et al. Hydrogen sulphide and tempol treatments improve the blood pressure and renal excretory responses in spontaneously hypertensive rats[J]. *Ren Fail*, 2014, 36(4): 598-605.
- [39] Chen L, Ingrid S, Ding YG, et al. Imbalance of endogenous homocysteine and Hydrogen sulfide metabolic pathway in essential hypertensive children [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(5): 389-393.
- [40] Wang Y, Zhao X, Jin H, et al. Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(2): 173-179.
- [41] Mani S, Li H, Untereiner A, et al. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2013, 127(25): 2523-534.
- [42] Xie L, Gu Y, Wen M, et al. Hydrogen sulfide induces Keap1 S-sulfhydration and suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via Nrf2 activation[J]. *Diabetes*, 2016, 65(10): 3171-184.
- [43] Zhao ZZ, Wang Z, Li GH, et al. Hydrogen sulfide inhibits macrophage-derived foam cell formation[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236(2): 169-176.
- [44] Pan LL, Qin M, Liu XH, et al. The role of hydrogen sulfide on cardiovascular homeostasis: an overview with update on immunomodulation[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 686.
- [45] King AL, Polhemus DJ, Bhushan S, et al. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(8): 3182-187.
- [46] Huang YE, Tang ZH, Xie W, et al. Endogenous hydrogen sulfide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning in the early reperfusion phase[J]. *Exp Ther Med*, 2012, 4(6): 1117-123.
- [47] Sivarajah A, Collino M, Yasin M, et al. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R[J]. *Shock*, 2009, 31(3): 267-274.
- [48] Xie H, Xu Q, Jia J, et al. Hydrogen sulfide protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by activating AMP-activated protein kinase to restore autophagic flux[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458(3): 632-638.
- [49] Li H, Wang Y, Wei C, et al. Mediation of exogenous hydrogen sulfide in recovery of ischemic post-conditioning-induced cardioprotection via down-regulating oxidative stress and up-regulating PI3K/Akt/GSK-3 β pathway in isolated aging rat hearts[J]. *Cell Biosci*, 2015, 5: 11.
- [50] Predmore BL, Kondo K, Bhushan S, et al. The polysulfide diallyl-trisulfide protects the ischemic myocardium by preservation of endogenous hydrogen sulfide and increasing nitric oxide bioavailability [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 302(11): H2410-418.
- [51] Calvert JW, Elston M, Nicholson CK, et al. Genetic and pharmacologic hydrogen sulfide therapy attenuates ischemia-induced heart failure in mice[J]. *Circulation*, 2010, 122(1): 11-19.
- [52] Polhemus D, Kondo K, Bhushan S, et al. Hydrogen sulfide attenuates cardiac dysfunction after heart failure via induction of angiogenesis[J]. *Circ Heart Fail*, 2013, 6(5): 1077-086.
- [53] Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, et al. H₂S signals through protein S-sulfhydration[J]. *Sci Signal*, 2009, 2(96): ra72.
- [54] Sen N. Functional and molecular insights of hydrogen sulfide signaling and protein sulfhydration[J]. *J Mol Biol*, 2017, 429(4): 543-561.
- [55] Paul BD, Snyder SH. H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 499-507.
- [56] Saha S, Chakraborty PK, Xiong X, et al. Cystathionine β -synthase regulates endothelial function via protein S-sulfhydration [J]. *FASEB J*, 2016, 30(1): 441-456.
- [57] Meng G, Xiao Y, Ma Y, et al. Hydrogen sulfide regulates kruppel-like factor 5 transcription activity via specificity protein 1 S-Sulfhydration at Cys664 to prevent myocardial hypertrophy [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(9): e004160.
- [58] Krishnan N, Fu C, Pappin DJ, et al. H₂S-induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response[J]. *Sci Signal*, 2011, 4(203): ra86.

- [59] Yang G, Zhao K, Ju Y, et al. Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulfhydration of Keap1 and activation of Nrf2[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(15): 1906-919.
- [60] Sen N, Paul BD, Gadalla MM, et al. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions[J]. *Mol Cell*, 2012, 45(1): 13-24.
- [61] Meng G, Zhao S, Xie L, et al. Protein S-sulfhydration by hydrogen sulfide in cardiovascular system[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(8): 1146-156.
- [62] Naik JS, Osmond JM, Walker BR, et al. Hydrogen sulfide-induced vasodilation mediated by endothelial TRPV4 channels[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 311(6): H1437-444.
- [63] Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, et al. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels[J]. *Circ Res*, 2011, 109(11): 1259-268.
- [64] Cheung SH, Lau JYW. Hydrogen sulfide mediates athero-protection against oxidative stress via S-sulfhydration[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194176.
- [65] Toldo S, Das A, Mezzaroma E, et al. Induction of microRNA-21 with exogenous hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemic and inflammatory injury in mice[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2014, 7(3): 311-320.
- [66] Liu J, Hao DD, Zhang JS, et al. Hydrogen sulphide inhibits cardiomyocyte hypertrophy by up-regulating miR-133a[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 413: 342-347.
- [67] Kesharwani V, Nandi SS, Sharawat SK, et al. Hydrogen sulfide mitigates homocysteine-mediated pathological remodeling by inducing miR-133a in cardiomyocytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 404: 241-250.
- [68] Kang B, Hong J, Xiao J, et al. Involvement of miR-1 in the protective effect of hydrogen sulfide against cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia/reperfusion[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(10): 6845-853.
- [69] Yao Y, Zhang X, Chen HP, et al. MicroRNA-186 promotes macrophage lipid accumulation and secretion of pro-inflammatory cytokines by targeting cystathionine γ -lyase in THP-1 macrophages[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 250: 122-132.
- [70] Gong D, Cheng HP, Xie W, et al. Cystathionine γ -lyase (CSE)/hydrogen sulfide system is regulated by miR-216a and influences cholesterol efflux in macrophages via the PI3K/AKT/ABCA1 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470(1): 107-116.
- [71] Yang G, Pei Y, Cao Q, et al. MicroRNA-21 represses human cystathionine gamma-lyase expression by targeting at specificity protein-1 in smooth muscle cells[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(9): 3192-200.
- [72] Shen Y, Shen Z, Miao L, et al. miRNA-30 family inhibition protects against cardiac ischemic injury by regulating cystathionine-gamma-lyase expression[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22: 224-240.
- [73] Hackfort BT, Mishra PK. Emerging role of hydrogen sulfide-microRNA crosstalk in cardiovascular diseases[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(7): H802-812.
- [74] Wang L, Tang ZP, Zhao W, et al. MiR-22/Sp-1 links estrogens with the up-regulation of cystathionine gamma-lyase in myocardium, which contributes to estrogenic cardioprotection against oxidative stress[J]. *Endocrinology*, 2015, 156: 2124-137.
- [75] Murrow L, Debnath J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease[J]. *Annu Rev Pathol*, 2013, 8: 105-137.
- [76] Jiang H, Xiao J, Kang B, et al. PI3K/SGK1/GSK3 β signaling pathway is involved in inhibition of autophagy in neonatal rat cardiomyocytes exposed to hypoxia/reoxygenation by hydrogen sulfide[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 345(2): 134-140.
- [77] Chen J, Gao J, Sun W, et al. Involvement of exogenous H₂S in recovery of cardioprotection from ischemic post-conditioning via increase of autophagy in the aged hearts[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 220: 681-692.
- [78] Liu J, Wu J, Sun A, et al. Hydrogen sulfide decreases high glucose/palmitate-induced autophagy in endothelial cells by the Nrf2-ROS-AMPK signaling pathway[J]. *Cell Biosci*, 2016, 6: 33.
- [79] Xiao T, Luo J, Wu Z, et al. Effects of hydrogen sulfide on myocardial fibrosis and PI3K/AKT1-regulated autophagy in diabetic rats[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1765-773.
- [80] Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, et al. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(5): H2316-323.
- [81] Martelli A, Testai L, Breschi MC, et al. Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels[J]. *Pharmacol Res*, 2013, 70(1): 27-34.
- [82] 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: 670-678.
- [83] Usachev YM, Marsh AJ, Johanns TM, et al. Activation of protein kinase C in sensory neurons accelerates Ca²⁺ uptake into the endoplasmic reticulum[J]. *J Neurosci*, 2006, 26: 311-318.
- [84] Du C, Lin X, Xu W, et al. Sulfhydrated sirtuin-1 increasing its deacetylation activity is an essential epigenetics mechanism of anti-atherogenesis by hydrogen sulfide[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, doi: 10.1089/ars.2017.7195.
- [85] Satta S, Mahmoud AM, Wilkinson FL, et al. The role of Nrf2 in cardiovascular function and disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 9237263.
- [86] Cao X, Wu Z, Xiong S, et al. The role of hydrogen sulfide in cyclic nucleotide signaling[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 149: 20-28.
- [87] Donnarumma E, Bhushan S, Bradley JM, et al. Nitrite therapy ameliorates myocardial dysfunction via H₂S and nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)-dependent signaling in chronic heart failure[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(8): e003551.
- [88] Wu D, Hu Q, Xiong Y, et al. Novel H₂S-NO hybrid molecule (ZYZ-803) promoted synergistic effects against heart failure[J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 243-252.
- [89] Qingyou Z, Junbao D, Weijin Z, et al. Impact of hydrogen sulfide on carbon monoxide/heme oxygenase pathway in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317(1): 30-37.