

线粒体源性硫化氢及其对线粒体功能的影响

吴忱昊, 谢志忠

(湖南省分子靶标新药研究协同创新中心 肿瘤微环境响应药物研究湖南省重点实验室 南华大学, 湖南省衡阳市 421001)

[专家简介] 谢志忠, 医学博士, 药理学教授, 硕士研究生导师, 2011 年 7 月至 2013 年 12 月在新加坡国立大学从事博士后研究, 主要研究方向为心脑血管疾病及药物干预。近年来主持国家自然科学基金 1 项、教育部归国留学人员科研启动基金 1 项、湖南省自然科学基金 1 项以及其他省厅级科研项目多项。以第一或通信作者在 *Antioxid Redox Signal*、*Oxid Med Cell Longev*、*Atherosclerosis* 等杂志发表论文 10 余篇, 获湖南省自然科学奖三等奖 1 项(排名第二)。

[关键词] 硫化氢; 线粒体; 硫化氢供体

[摘要] 作为继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之外的第三个气体信号分子, 硫化氢(H₂S)被证实具有舒张血管、保护神经系统、调节昼夜节律以及抗衰老等多种生物学效应。近来研究发现, 细胞质中除了由胱硫醚-β-合酶(CBS)和胱硫醚-γ-裂解酶(CGL或CSE)介导的H₂S合成方式之外, 还存在独立的线粒体途径的H₂S合成方式。已有报道证实线粒体靶向的H₂S供体AP39和AP123较经典的无机盐供体NaHS显示出更强的细胞保护作用 and 更少的细胞毒性, 揭示了线粒体源性H₂S作用的特殊性。本文重点介绍线粒体中H₂S的生成与代谢、H₂S对线粒体功能的影响以及新型线粒体靶向H₂S供体的研究进展, 以期对H₂S的功能提供更加全面的认识。

[中图分类号] R966;R5

[文献标识码] A



Mitochondrial hydrogen sulfide and its effect on mitochondrial function

WU Chenhao, XIE Zhizhong

(Hunan Provincial Cooperative Innovation Centre for Molecular Target New Drug Study & Hunan Provincial Key Laboratory of Tumour Microenvironment Responsive Drug Research & University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] hydrogen sulfide; mitochondria; hydrogen sulfide donors

[ABSTRACT] Hydrogen sulfide (H₂S) is now recognized as the third “gasotransmitters” along with nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) and has been proved to have many biological effects, such as vasodilation, neuroprotection, circadian rhythm regulation and anti-aging. Recent studies have revealed an independent mitochondrial H₂S synthesis pathway, which is different from the cytoplasmic H₂S synthesis mediated by cystathionine beta synthase (CBS) and cystathionine gamma lyase (CGL or CSE). It has been reported that two mitochondrial targeted H₂S donors AP39 and AP123 show stronger cell protection and less cytotoxicity than classical inorganic salt donor NaHS, indicating the particularity of mitochondrial H₂S. This review mainly introduced mitochondrial H₂S about its generation, metabolism and effects on mitochondria. Recent progress of the new mitochondrial targeting H₂S donors are also discussed in this paper, in order to provide a more comprehensive understanding of hydrogen sulfide.

硫是生物组成的基础元素之一, 广泛存在于蛋白质、tRNA 和抗生素等多种生物分子中^[1]。简单含硫气体分子硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)和一氧

化氮(nitric oxide, NO)、一氧化碳(carbon monoxide, CO)并称为三大气体信号分子, 已被证明具有舒张血管、保护神经系统、调节昼夜节律以及抗衰老等

[收稿日期] 2020-12-30

[修回日期] 2021-03-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81541097);湖南省自然科学基金项目(2019JJ40251)

[作者简介] 吴忱昊, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病发病机制及药物干预, E-mail 为 1006647573@qq.com。通信作者 谢志忠, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病发病机制及药物干预, E-mail 为 zhizhongx@126.com。

多种生物学效应^[2-6]。一般认为 H₂S 主要在细胞质中由胱硫醚-β-合酶 (cystathionine β synthase, CBS) 和胱硫醚-γ-裂解酶 (cystathionine γ-lyase, CGL or CSE) 催化含硫氨基酸(半胱氨酸和同型半胱氨酸)产生^[7-8]。近年来的研究发现线粒体不仅是 H₂S 代谢的主要场所^[9],同时存在独立的线粒体途径的 H₂S 合成方式^[10-11],使得人们对线粒体源性 H₂S 及其功能充满了兴趣。本文系统回顾了线粒体源性 H₂S 的产生及其代谢途径,并重点讨论了线粒体源性 H₂S 的功能和线粒体靶向 H₂S 供体的最新进展,以期对 H₂S 功能有更加全面的认识。

1 线粒体中 H₂S 的来源及代谢

1.1 线粒体中 H₂S 的来源

通常情况下,体内的 H₂S 主要是由细胞质中 CBS 和 CSE 催化含硫氨基酸产生。由于循环中的 H₂S 可以自由穿梭生物膜进入线粒体^[12],因而线粒体存在一定水平的 H₂S 的现象一直以来为人们所忽视。近来人们发现在胞质的线粒体中还存在着不依赖 CBS 和 CSE 的独立的 H₂S 合成方式:L-半胱氨酸和 α-酮戊二酸在线粒体中的半胱氨酸转氨酶 (cysteine aminotransferase, CAT) 催化下,生成 3-巯基丙酮酸 (3-mercaptopyruvate, 3-MP),后者被同样位于线粒体中的 H₂S 合成酶 3-巯基丙酮酸硫转移酶 (3-mercaptopyruvate sulfur transferase, 3-MST) 所作用,进一步代谢生成丙酮酸和多种过硫化物,所生成的过硫化物最终被硫氧化还原蛋白 (thioredoxin, Trx) 或硫醌氧化还原酶 (sulfide-quinone oxidoreductase, SQR) 还原,释放 H₂S (图 1 中黑色实线箭头所示)^[10-11,13]。此外,Shibuya 等^[14]报道在小脑和肾脏组织中还存在一种 DAO-3MST 途径的线粒体 H₂S 合成方式。与经典的以 3-MST 介导的 L-半胱氨酸为底物的 H₂S 合成不同,DAO-3MST 途径的 H₂S 合成借助于过氧化物酶体内的 D-氨基酸氧化酶 (D-amino acid oxidase, DAO),以 D-半胱氨酸为底物生成 3-MP,通过囊泡运输到线粒体后再在 3-MST 的帮助下合成 H₂S^[15],据报道此种 D-半胱氨酸来源的 H₂S 对神经元氧化应激损伤和肾脏缺血再灌注损伤的保护作用甚至强于 L-半胱氨酸来源的 H₂S^[14]。

一般认为,CSE 和 CBS 主要存在于线粒体外的胞质中,而 CAT 和 3-MST 既存在于胞质中也存在于线粒体中,是线粒体 H₂S 主要合成酶。但是有报道胞质中线粒体外的 CSE 和 CBS 在某些特定情况下

也会向线粒体内转移,参与线粒体 H₂S 的合成。当细胞内钙水平升高时,CSE 可以通过线粒体外膜转运酶 20 (translocase of the outer membrane 20, TOM20) 进入线粒体导致线粒体中 H₂S 的水平增高^[12]。而在缺血或缺氧条件下,大鼠肝细胞线粒体中 CBS 量显著增加^[16],但 CBS 进入线粒体的方式到目前为止尚不清楚。

此外,线粒体中也存在非酶促途径生成 H₂S,如元素硫、3-MP 和过硫化物等含硫化合物可以被葡萄糖氧化代谢过程中产生的还原当量、NADPH、谷胱甘肽、二氢硫辛酸等还原性物质非酶促释放 H₂S^[17]。但这种高度氧化还原环境下线粒体中非酶促途径生成的 H₂S 及其生理/病理作用目前人们还所知甚少,期待着进一步的研究。

1.2 线粒体中 H₂S 的代谢

机体需要一套完备的 H₂S 清除系统来维持 H₂S 稳态的生理水平,这也是 H₂S 成为信号分子的必要前提。目前发现哺乳动物体内 H₂S 的代谢方式有氧化、甲基化以及与其他生物分子反应等^[18-19]。此外,过多的 H₂S 还可以气体形式经肺或者肠道排出体外,这也是 H₂S 中毒者经呼吸道呼出或经肠道排出的气体有臭鸡蛋味的原因。

上述代谢方式中,酶介导的氧化代谢是 H₂S 在线粒体中代谢的主要方式。相关的酶有四种,分别是 SQR、硫代硫酸盐硫转移酶 (thiosulfate sulfurtransferase, TST)、过硫化双加氧酶 (sulfur dioxygenase or ethylmalonic encephalopathy 1 protein, ETHE1) 和亚硫酸盐氧化酶 (sulfite oxidase, SO)。其中, SQR 将 H₂S 氧化为硫代硫酸盐^[9],后者或在 TST 作用下生成过硫化物^[20],或被 ETHE1 氧化成亚硫酸盐^[21]。而生成的亚硫酸盐既可以被 SO 进一步氧化为硫酸盐,也可以被 SQR 重新转化为硫代硫酸盐^[22]。上述硫代硫酸盐、亚硫酸盐和硫酸盐等 H₂S 代谢产物最终将通过解偶联蛋白 UCP5 和 UCP6 从线粒体基质排出(图 1 中红色实线箭头所示)^[23]。需要指出的是,不仅仅 H₂S 本身,其体内的一些代谢产物(如多硫化物)也具有类似 H₂S 的生物学效应^[24]。

2 H₂S 对线粒体相关功能的影响

2.1 H₂S 对线粒体氧自由基水平的调节

线粒体呼吸链是氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 的主要来源之一,氧自由基过度生成和/或机体清除 ROS 能力下降导致的体内氧化应激水

平增高被公认为是动脉粥样硬化、心肌缺血和神经退行性变等疾病的重要致病因素。多项研究表明 H₂S 参与对线粒体中氧化应激的调控^[25-27], 其机制与促进 ROS 的清除和/或抑制 ROS 的生成有关。

有报道认为 H₂S 本身即为一种还原性分子, 可直接淬灭体内过多的 ROS 发挥抗氧化应激作用, 但生理水平 H₂S 浓度较低(仅在纳摩尔水平^[28]), 直接淬灭作用不足以完全解释 H₂S 的抗氧化作用。Khatua 等^[29]报道 H₂S 可通过激活核转录因子 Nrf2 和 NF-κB, 进而上调谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和相关抗氧化酶, 如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶的合成, 增强对 ROS 的清除能力。我们课题组进一步发现 H₂S 通过 S-过硫化修饰 p66Shc 的 CH1 结构域第 59 位半胱氨酸, 抑制 p66Shc 磷酸化, 从而减少线粒体途径的 ROS 生成^[30]。此外, H₂S 通过调控 SIRT3 去乙酰化修饰线粒体复合物 I、III, 提高电子运输效率, 也可减少线粒体 ROS^[31-32]。

2.2 H₂S 调节线粒体能量代谢

线粒体是三羧酸循环和氧化磷酸化的重要场所。已有实验证实线粒体源性 H₂S 还参与线粒体能量代谢的调节: ①H₂S 可作为一种无机电子供体促进线粒体 ATP 生成。作为 SQR 的底物, 线粒体中 H₂S 在被 SQR 氧化过程中将释放 2 个电子, 后者可经 CoQ 传递给线粒体复合物 III, 参与呼吸链的电子传递过程^[22], 且由于 H₂S 是无机物, 此过程中并不会生成过多的 ROS。②通过调节线粒体复合物 IV 功能促进线粒体 ATP 生成。Covarrubias 等^[26]报道 H₂S 预处理可以增加缺氧情况下人滋养层原代细胞的线粒体复合物 IV 的活性和表达, 增加线粒体 ATP 的生成。③Módos 等^[33]则报道 H₂S 既可通过 S-硫化修饰 ATP 合酶的第 244 和 294 位半胱氨酸残基, 提高酶活性, 促进 ATP 合成, 也可以通过抑制磷酸二酯酶 PDE2A 活性, 减少 cAMP 降解, 增加 PKA 介导的线粒体氧化磷酸化^[34]。

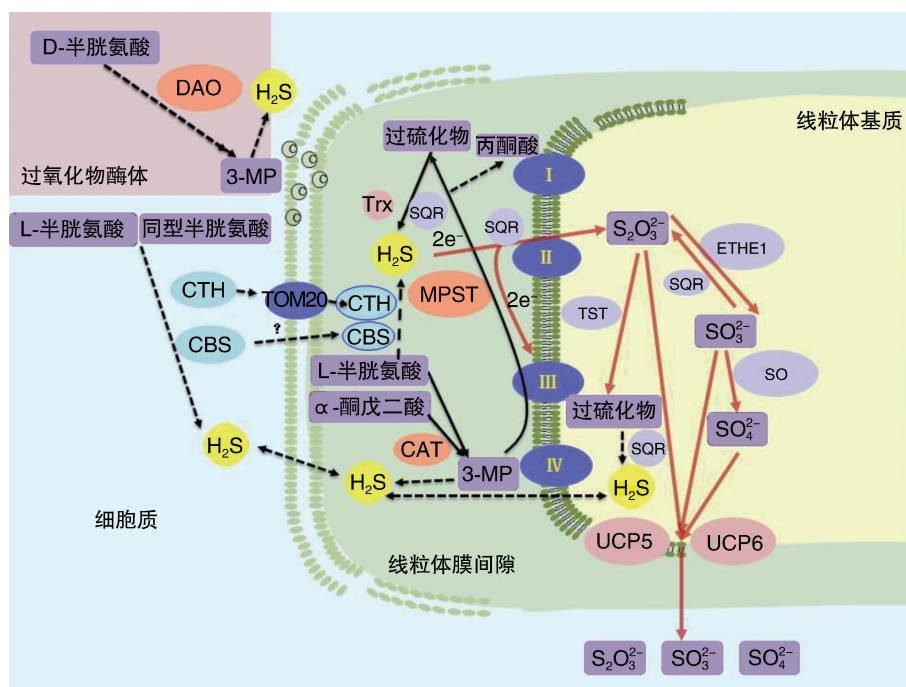


图 1. 哺乳动物线粒体中 H₂S 的生成和代谢

Figure 1. The production and metabolism of H₂S in mammalian mitochondria

2.3 H₂S 调节线粒体 DNA 复制、转录和修复

线粒体是半自主细胞器, 拥有独立的线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA), 但由于线粒体中持续不断地产生活性氧, 而本身 GSH 水平较低, 对 ROS 清除能力较弱, 加之 mtDNA 缺乏组蛋白和染色质结构的保护, 以及较核 DNA 而言简陋的修复体系

等原因, mtDNA 具有较高的突变率^[35]。

H₂S 参与 mtDNA 复制和转录的调控。线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 可特异性结合 mtDNA 重链和轻链启动子的序列, 激活 mtDNA 转录, 是维持 mtDNA 拷贝数的重要调节因子。Li 等^[36]报道 H₂S 通过 S-硫化修饰干

扰素调节因子1(interferon regulatory factor-1, IRF-1)以促进其和DNA甲基转移酶3a(DNA methyltransferase 3a, Dnmt3a)的启动子结合,抑制Dnmt3a转录,进而抑制TFAM甲基化,增强TFAM介导的mtDNA复制。此外,作为TFAM相关信号通路上游的关键分子,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α)可通过磷酸化激活核呼吸因子1(nuclear respiratory factor-1, NRF-1),促进TFAM表达^[37]。已有结果证实, H₂S 还可通过AMPK/PGC-1 α 通路^[38-39]或Sirt1/PGC-1 α 通路^[40]增强TFAM介导的mtDNA复制^[41]。

H₂S 同样参与了mtDNA修复的调控。通常情况下, mtDNA的修复途径包括碱基切除修复、错配修复、双链断裂修复、直接修复和损伤容忍等^[42]。其中碱基切除修复途径是mtDNA主要修复方式,其通过8-羟基鸟嘌呤DNA糖苷酶1(8-oxoguanine DNA glycosylase 1, OGG1)等DNA糖基化酶去除DNA中异常碱基,再在各种裂解酶和AP内切核酸酶作用下切除剩余的无碱基核苷酸,经线粒体定位的核酸酶EXO G和FEN1处理后由DNA聚合酶 β (DNA polymerase β , Pol B)和/或DNA聚合酶 γ (DNA polymerase γ , Pol G)介导核苷酸间隙修复,最后通过DNA连接酶3(DNA ligase 3, LIG3)密封切口完成修复^[43]。有证据表明H₂S可通过S-硫化修饰线粒体特有的DNA修复酶EXO G的第76位半胱氨酸残基,促进EXO G和PolG的组装,增强mtDNA修复^[44]。此外,碱基切除修复的关键酶OGG1受到SIRT家族成员尤其是SIRT3的调控^[45],而H₂S促进SIRT3的表达、增强SIRT3启动子活性的作用也被越来越多的实验证实^[31-32,46],暗示H₂S也可以通过SIRT3/OGG1途径促进mtDNA修复。

2.4 H₂S 调节线粒体未折叠蛋白反应

未折叠蛋白反应(unfolded-protein response, UPR)本指内质网中未折叠好或错误折叠的蛋白质大量积累引发的一种自我修复机制,包括暂时减少蛋白质合成、分泌特定的蛋白酶降解这些错误的蛋白质,增加蛋白质分子伴侣表达以协助蛋白质正确折叠。近来研究发现线粒体中也存在独立于内质网UPR的线粒体UPR(mitochondrial UPR, mtUPR),且这种线粒体激活的对细胞核DNA编码的相关蛋白质(包括蛋白酶、分子伴侣)进行逆行调控的应激反应是线粒体保持其自身内部蛋白质平衡的主要方式,与线粒体相关衰老有关^[47]。

CCAAT/增强子结合蛋白 β (CCAAT/enhancer-binding protein- β , C/EBP- β)是一种真核细胞转录调控因子,可以和线粒体内的热休克蛋白(heat shock protein, HSP)如HSP60、HSP10、mtDnaJ和线粒体蛋白酶ClpP的启动子结合,促进其蛋白的表达以实现mtUPR^[48]。Untereiner等^[38]报道外源性H₂S可以增加转录因子C/EBP- β 的表达,暗示H₂S参与对mtUPR的调节。通过蛋白质组学研究发现,H₂S可能参与mtUPR相关蛋白如HSP、蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)等多种分子伴侣的S-硫化修饰^[49]。此外,H₂S已被证明可直接上调HSP70和HSP90的表达^[50-52],且H₂S代谢酶SQR对H₂S介导的线粒体应激有抑制作用^[53]。但需要说明的是,目前关于H₂S直接调控mtUPR的报道还比较少,尽管C/EBP- β 在mtUPR中起关键作用,但同时它也是炎症反应、肿瘤细胞增殖等多种疾病的信号调控枢纽,因此单独C/EBP- β 水平的增加并不一定代表mtUPR启动,H₂S调控mtUPR的具体机制需要更多的研究以揭开其神秘的面纱。

2.5 其他

线粒体同时也是细胞凋亡的调控中心,大量研究证实H₂S可以通过多个环节调控线粒体途径凋亡。例如,H₂S可以通过诱导GSK-3 β 的Ser9磷酸化抑制mPTP开放^[54],或通过促进ATP敏感的线粒体钾通道开放以减少mtROS生成^[55],对抗心肌细胞凋亡。H₂S也可以通过S-过硫化修饰NF- κ B,促进相关抗凋亡因子的基因表达发挥抗凋亡作用^[56]。此外,Wang等^[57]报道H₂S预处理可以下调Bax/Bcl-2比值,抑制Caspase-3活性,减少细胞色素C的释放,改善H₂O₂诱导的人肺上皮A549细胞凋亡。最后,H₂S还可以通过上调OPA1、MFN2、Mfn2,下调DRP1,促进线粒体裂变-融合转变^[58-60],以及直接^[61]或间接^[62]增强Parkin的活性,增加线粒体自噬以维持线粒体形态和功能的稳定^[63]。

值得指出的是,H₂S对线粒体功能的调控是双向的且与H₂S的浓度有关。如H₂S过高时,将竞争线粒体复合物IV的血红素a₃和CuB中心,抑制其活性,影响线粒体呼吸链功能,且缺氧情况下其作用进一步增强^[64-65]。有报道高浓度H₂S通过抑制小鼠的线粒体功能和机体代谢水平,诱导小鼠产生类似于全身麻醉的“假死”状态^[66]。

3 3-MST/H₂S 与疾病

截止到目前,人们对生理或病理下线粒体源性

H₂S 的浓度、调节机制及其与疾病之间的关系还认识较少。鉴于 3-MST 是线粒体合成 H₂S 的最主要的酶,目前已有研究主要集中在 3-MST/3-MST 来源 H₂S 的功能及其与疾病之间的关系上。

与 CBS 和 CSE 不同,3-MST 为非 5'-磷酸吡哆醛 (pyridoxal-5'-phosphate, PLP) 依赖的 H₂S 合成酶,以 3-MP 为底物(而不能直接用 L-半胱氨酸)合成 H₂S。目前哺乳动物体内存在两种 3-MST 亚型,其中 3-MST-1 定位于胞质,3-MST-2 定位于胞质和线粒体^[67]。3-MST-2 的相对分子质量为 33.2 kDa,其 N 端包含 25 个氨基酸(比 3-MST-1 少 20 个氨基酸),结构中共含有 5 个半胱氨酸(Cys64、Cys154、Cys247、Cys254 及 Cys263),其中 Cys247 位于催化结构域的 C 端,是催化 H₂S 合成的关键位点,能接受从 3-MP 传递过来的硫以生成过硫化物,并最终被还原释放出 H₂S^[68]。

3-MST 活性受线粒体内氧化还原水平的影响。Nagahara 等^[68]研究发现,当氧化应激水平增高时,小鼠 3-MST 表面的第 154、247 和 263 位的半胱氨酸残基容易被氧化形成分子内或分子间二硫键,导致酶活性下降甚至失活, H₂S 合成减少,而 Trx、NADPH 等还原性物质则能恢复 3-MST 活性。Zuhra 等^[69]也报道,抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸可以上调 SW480 结肠癌细胞中 3-MST 蛋白的表达,促进线粒体 H₂S 生成。

已有结果表明 3-MST 及其合成的 H₂S 与动脉硬化、肿瘤、唐氏综合征等疾病密切相关。研究发现,高脂饲养 16 周后小鼠肝 3-MST 的表达明显减少(此时,肝和肺中 CSE 表达减少,但肝和肾内 CBS 表达却显著增加)。同时,尽管血浆中 H₂S 水平没有明显变化,但小鼠离体肝、肾、肺 H₂S 合成能力下降,特别是以 3-MP 为底物的 H₂S 合成显著降低。值得注意的是,这些动物的血清淀粉样蛋白 A 和 C 反应蛋白的水平正常,血管的组织学表现没有明显的动脉硬化迹象,表明上述 3-MST/H₂S 的变化可能被认为发生在动脉硬化发生之前^[70]。

肿瘤细胞中也同样表达 3-MST,与动脉硬化不同的是,多数肿瘤细胞中 3-MST 的表达上调, H₂S 的水平也较正常细胞显著增高,且 3-MST 而非 CSE 被认为是肿瘤细胞内 H₂S 增加的主要原因,在肿瘤的增殖、能量代谢以及耐药过程中发挥着重要作用^[71]。此外, Panagaki 等^[72]研究证明,唐氏综合征患者成纤维细胞的线粒体中 3-MST 的表达显著上调,采用 3-MST 抑制剂可以减少 H₂S 的合成、促进

线粒体能量合成和细胞增殖。

4 线粒体靶向的 H₂S 供体

H₂S 供体繁多,目前研究中最常用的是含硫无机盐如硫化钠和硫化氢钠。生活中,大蒜素在空气中可转变为烯丙基硫化物,如二烯丙基二硫醚(diallyl disulfide, DADS),进而释放低浓度 H₂S,也被常用作 H₂S 供体。但上述 H₂S 供体存在 H₂S 释放过程的不可控和作用时间过短等问题,于是人们研发出 H₂S 缓释剂 GYY4137,并显示出了较硫化氢钠更好的作用。此外,非甾体抗炎药的硫化氢衍生物,如阿司匹林硫化氢衍生物(ACS-14)和“超级”阿司匹林(NOSH-阿司匹林)的成功研发,掀起了多功能 H₂S 供体的研发高潮。而鉴于线粒体源性 H₂S 对线粒体功能调节的独特调节作用,线粒体靶向的 H₂S 供体的研发成为近来研究的新热点。

AP39 是 2014 年开发的第一个线粒体靶向的 H₂S 供体^[73](其结构参见表 1)。AP39 由释放 H₂S 的官能团 5-对羟基苯基-3H-1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮(anethole dithiolethione, ADT-OH)通过十碳链与靶向线粒体的官能团 TPP⁺组成,利用线粒体具有外正内负的膜电势(150 ~ 180 mV),通过结合亲脂阳离子 TPP⁺靶向线粒体。已有研究证实 AP39 可以减轻高葡萄糖刺激的内皮细胞线粒体氧化应激^[73-74]、改善心脏骤停后小鼠的神经功能^[75]、减少 AD 小鼠模型神经元中 A β 沉积以保护神经元功能^[76]、对抗低氧诱导的先兆子痫胎盘中的血管生成失衡和氧化应激损伤^[26]、恢复线粒体功能障碍秀丽隐杆线虫菌株的线粒体功能^[77]。此外,加入 AP39 的保存液可以更好地保护移植时心脏^[78]。

AP123 是 AP39 的改进型。由于 AP39 结构中 ADT-OH 基团在线粒体中代谢生成 H₂S 步骤复杂,而且可能受到线粒体中高氧化还原环境的干扰,因此人们试着用 4-羟基硫代苯甲酰胺(4-hydroxythio-benzamide, HTB)基团去取代 ADT-OH。HTB 作为常用 H₂S 释放基团,比 ADT-OH 稳定安全,目前拼合 HTB 的非甾体类抗炎药 ATB-346 已进入临床试验阶段^[79]。实验证实 AP123(30 ~ 300 nmol/L)可以抑制高糖时内皮细胞中线粒体 ROS 的产生,其作用与 AP39 类似但毒性明显降低^[74]。

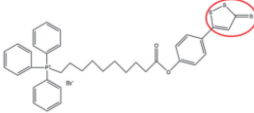
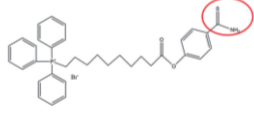
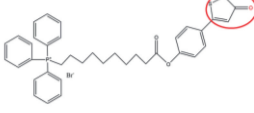
另外两种线粒体靶向的 H₂S 供体正在实验中。其中 RT01 是 AP39 的体内水解代谢产物,结构上与 AP39 唯一不同在于根据生物电子等排原则将 H₂S

释放部位 ADT-OH 上的硫原子换为氧原子。另一种化合物 RTP-10 则是通过线粒体靶向信号肽 (mitochondrial targeting signal peptide, MTSP) 增加线粒体中 H_2S 浓度。目前已有实验证实上述两种线粒

体靶向的 H_2S 供体均可有效逆转高糖诱导的鼠微血管内皮细胞线粒体损伤^[80], 但更多作用有待于进一步研究。

表 1. 线粒体靶向的 H_2S 供体

Table 1. Mitochondria-targeted hydrogen sulfide donors

名称	靶向线粒体官能团	硫化氢释放官能团	结构式
AP39	TPP	ADT-OH	
AP123	TPP	HTB	
RT01	TPP	ADT-OH 衍生物	
RTP-10	MTSP	不明	不明

5 结语与展望

随着人们对 H_2S 研究的逐步深入, H_2S 显示出来的舒张血管平滑肌、抗炎、抗氧化、抗衰老等多重生物学效应也受到人们越来越多的重视。但一直以来人们所忽略的一个问题就是, 体内/细胞内 H_2S 水平主要取决于胞质中非线粒体来源的 H_2S 还是线粒体源性的 H_2S ? 或者说发挥上述作用最重要的是胞质中非线粒体来源的 H_2S 还是线粒体源性的 H_2S ? 从目前已有的细胞或动物水平实验结果来看, 体内/细胞内 H_2S 水平降低和/或 CBS 和 CSE (介导胞质中 H_2S 合成的两个关键酶) 表达下降被证实与高血压、心脏缺血再灌注损伤、动脉栓塞性疾病等密切相关, 充分证明了胞质中非线粒体来源的 H_2S 的重要性。但是 Gerö 等^[74] 利用线粒体靶向的 H_2S 供体 AP39 和 AP123 在小鼠脑微血管内皮细胞株 b. End3 上, 不仅取得了和一般非线粒体特异性的 H_2S 供体类似的抗氧化应激损伤的作用, 同时这些线粒体靶向的 H_2S 供体的用量极低 (30 ~ 300 nmol/L), 仅为 NaHS 或 NaS 等常用 H_2S 无机盐供体剂量 (多在 30 ~ 300 μ mol/L) 的千分之一, 提示线粒体源性的 H_2S 具有更高的效率和更低的不良反应。此外, 据报道线粒体中用于 H_2S 合成的主要底物 L-半胱氨酸水平是胞质中的 3 倍^[12], 也暗示着某些特

殊情况下线粒体源性 H_2S 可能是细胞内 H_2S 更为重要的来源途径。当然, 研发出一种检测方法能准确测量出线粒体途径 H_2S 和非线粒体途径 H_2S 的量, 并能追踪不同来源 H_2S 在细胞内移动的踪迹, 才能帮助我们回答上述问题, 但遗憾的是目前的水平还达不到上述要求。

同时, 尽管已有线粒体靶向 H_2S 供体的药理学作用如前所述显示出更强的作用, 但在结构上它们主要以 TPP 偶联类为主, 只在线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 改变时才能进入线粒体, 可能具有一定的细胞毒性, 这也许是这类药物一直未能运用于临床的重要原因。未来科学家或许可以将目光投向其他靶向线粒体的新型技术, 如蛋白质转导结构域、SS 肽和选择性电子接受剂等, 设计并筛选出更多更有效的 H_2S 供体。

[参考文献]

- [1] Pokorna D, Zabranska J. Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology[J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(6 Pt 2): 1246-1259.
- [2] La Fuente JM, Sevilleja-Ortiz A, García-Rojo E, et al. Erectile dysfunction is associated with defective L-cysteine/hydrogen sulfide pathway in human corpus cavernosum and penile arteries[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 884: 173370.
- [3] Di Cesare ML, Lucarini E, Micheli L, et al. Effects of natural and synthetic isothiocyanate-based H_2S -releasers against chemotherapy-induced neuropathic pain: Role of Kv7 potassium channels[J].

- Neuropharmacology, 2017, 121: 49-59.
- [4] Parsanathan R, Jain SK. Hydrogen sulfide regulates circadian-clock genes in C2C12 myotubes and the muscle of high-fat-diet-fed mice [J]. Arch Biochem Biophys, 2019, 672: 108054.
- [5] Zivanovic J, Kouroussis E, Kohl JB, et al. Selective persulfide detection reveals evolutionarily conserved antiaging effects of S-sulfhydration[J]. Cell Metab, 2020, 31(1): 207.
- [6] Latorre E, Torregrossa R, Wood ME, et al. Mitochondria-targeted hydrogen sulfide attenuates endothelial senescence by selective induction of splicing factors HNRNPD and SRSF2[J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(7): 1666-1681.
- [7] Fantel AM, Myrianthopoulos V, Georgoulis A, et al. Screening of heteroaromatic scaffolds against cystathionine beta-synthase enables identification of substituted pyrazolo[3,4-c]pyridines as potent and selective orthosteric inhibitors[J]. Molecules, 2020, 25(16): 3739.
- [8] Rahman M, Cumming BM, Addicott KW, et al. Hydrogen sulfide dysregulates the immune response by suppressing central carbon metabolism to promote tuberculosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(12): 6663-6674.
- [9] Beaumont M, Andriamihaja M, Lan A, et al. Detrimental effects for colonocytes of an increased exposure to luminal hydrogen sulfide: The adaptive response [J]. Free Radic Biol Med, 2016, 93: 155-164.
- [10] Módis K, Asimakopoulou A, Coletta C, et al. Oxidative stress suppresses the cellular bioenergetic effect of the 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase/hydrogen sulfide pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 433(4): 401-407.
- [11] Fräsdorf B, Radon C, Leimkühler S. Characterization and interaction studies of two isoforms of the dual localized 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase TUM1 from humans[J]. J Biol Chem, 2014, 289(50): 34543-34556.
- [12] Fu M, Zhang W, Wu L, et al. Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(8): 2943-2948.
- [13] Wedmann R, Onderka C, Wei S, et al. Improved tag-switch method reveals that thioredoxin acts as depersulfidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation[J]. Chem Sci, 2016, 7(5): 3414-3426.
- [14] Shibuya N, Koike S, Tanaka M, et al. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1366.
- [15] Schumann U, Subramani S. Special delivery from mitochondria to peroxisomes[J]. Trends Cell Biol, 2008, 18(6): 253-256.
- [16] Teng H, Wu B, Zhao K, et al. Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine β-synthase mediated by Lon protease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(31): 12679-12684.
- [17] Wang R. Two's company, three's a crowd; can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter[J]. FASEB J, 2002, 16(13): 1792-1798.
- [18] Vitvitsky V, Yadav PK, Kurthen A, et al. Sulfide oxidation by a noncanonical pathway in red blood cells generates thiosulfate and polysulfides[J]. J Biol Chem, 2015, 290(13): 8310-8320.
- [19] Filipovic MR, Miljkovic J, Nausner T, et al. Chemical characterization of the smallest S-nitrosothiol, HSNO; cellular cross-talk of H₂S and S-nitrosothiols[J]. J Am Chem Soc, 2012, 134(29): 12016-12027.
- [20] Kruithof PD, Lunev S, Aguilar LS, et al. Unraveling the role of thiosulfate sulfurtransferase in metabolic diseases [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(6): 165716.
- [21] Bronowicka-Adamska P, Wróbel M, Magierowski M, et al. Hydrogen sulphide production in healthy and ulcerated gastric mucosa of rats[J]. Molecules, 2017, 22(4): 530.
- [22] Goubern M, Andriamihaja M, Nübel T, et al. Sulfide, the first inorganic substrate for human cells[J]. FASEB J, 2007, 21(8): 1699-1706.
- [23] Gorgoglione R, Porcelli V, Santoro A, et al. The human uncoupling proteins 5 and 6 (UCP5/SLC25A14 and UCP6/SLC25A30) transport Sulfur oxyanions, phosphate and dicarboxylates[J]. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2019, 1860(9): 724-733.
- [24] Olson KR, Briggs A, Devireddy M, et al. Green tea polyphenolic antioxidants oxidize hydrogen sulfide to thiosulfate and polysulfides: a possible new mechanism underpinning their biological action[J]. Redox Biol, 2020, 37: 101731.
- [25] 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.
- [26] Covarrubias AE, Lecarpentier E, Lo A, et al. AP39, a modulator of mitochondrial bioenergetics, reduces antiangiogenic response and oxidative stress in hypoxia-exposed trophoblasts: relevance for pre-eclampsia pathogenesis [J]. Am J Pathol, 2019, 189(1): 104-114.
- [27] Suzuki K, Olah G, Modis K, et al. Hydrogen sulfide replacement therapy protects the vascular endothelium in hyperglycemia by preserving mitochondrial function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(33): 13829-13834.
- [28] Furne J, Saeed A, Levitt MD. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 295(5): R1479-R1485.
- [29] Khatua TN, Dinda AK, Putcha UK, et al. Diallyl disulfide ameliorates isoproterenol induced cardiac hypertrophy activating mitochondrial biogenesis via eNOS-Nrf2-Tfam pathway in rats[J]. Biochem Biophys Rep, 2016, 5: 77-88.
- [30] 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): 2531-2542.
- [31] Sun Y, Tian Z, Liu N, et al. Exogenous H₂S switches cardiac energy substrate metabolism by regulating SIRT3 expression in db/db mice[J]. J Mol Med (Berl), 2018, 96(3/4): 281-299.
- [32] 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): 1126-1145.
- [33] Módis K, Ju Y, Ahmad A, et al. S-sulfhydration of ATP synthase by hydrogen sulfide stimulates mitochondrial bioenergetics [J].

- Pharmacol Res, 2016, 113 (Pt A): 116-124.
- [34] Módis K, Panopoulos P, Coletta C, et al. Hydrogen sulfide-mediated stimulation of mitochondrial electron transport involves inhibition of the mitochondrial phosphodiesterase 2A, elevation of cAMP and activation of protein kinase A[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(9): 1311-1319.
- [35] Saki M, Prakash A. DNA damage related crosstalk between the nucleus and mitochondria[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 107: 216-227.
- [36] Li S, Yang G. Hydrogen sulfide maintains mitochondrial DNA replication via demethylation of TFAM[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 23(7): 630-642.
- [37] Li PA, Hou X, Hao S. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration[J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(10): 2025-2029.
- [38] Untereiner AA, Wang R, Ju Y, et al. Decreased gluconeogenesis in the absence of cystathionine gamma-lyase and the underlying mechanisms[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 24(3): 129-140.
- [39] Shimizu Y, Polavarapu R, Eskla KL, et al. Hydrogen sulfide regulates cardiac mitochondrial biogenesis via the activation of AMPK [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 116: 29-40.
- [40] Hu MZ, Zhou B, Mao HY, et al. Exogenous hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts from ischemia/reperfusion injury through Sirt1/PGC-1 α signaling pathway[J]. *Int Heart J*, 2016, 57(4): 477-482.
- [41] Untereiner AA, Fu M, Módis K, et al. Stimulatory effect of CSE-generated H₂S on hepatic mitochondrial biogenesis and the underlying mechanisms[J]. *Nitric Oxide*, 2016, 58: 67-76.
- [42] Boesch P, Weber-Lotfi F, Ibrahim N, et al. DNA repair in organelles: Pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(1): 186-200.
- [43] Kaufman BA, Van Houten B. POLB: a new role of DNA polymerase beta in mitochondrial base excision repair [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2017, 60: A1-A5.
- [44] Szczesny B, Marcatti M, Zatarain JR, et al. Inhibition of hydrogen sulfide biosynthesis sensitizes lung adenocarcinoma to chemotherapeutic drugs by inhibiting mitochondrial DNA repair and suppressing cellular bioenergetics[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36125.
- [45] Cheng Y, Ren X, Gowda AS, et al. Interaction of Sirt3 with OGG1 contributes to repair of mitochondrial DNA and protects from apoptotic cell death under oxidative stress [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(7): e731.
- [46] Lin Z, Altaf N, Li C, et al. Hydrogen sulfide attenuates oxidative stress-induced NLRP3 inflammasome activation via S-sulfhydrating c-Jun at Cys269 in macrophages[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(9 Pt B): 2890-2900.
- [47] Wu Z, Senchuk MM, Dues DJ, et al. Mitochondrial unfolded protein response transcription factor ATFS-1 promotes longevity in a long-lived mitochondrial mutant through activation of stress response pathways[J]. *BMC Biol*, 2018, 16(1): 147.
- [48] Horibe T, Hoogenraad NJ. The chop gene contains an element for the positive regulation of the mitochondrial unfolded protein response[J]. *PLoS One*, 2007, 2(9): e835.
- [49] Longen S, Richter F, Köhler Y, et al. Quantitative persulfide site identification (qPerS-SID) reveals protein targets of H₂S releasing donors in mammalian cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29808.
- [50] Du Y, Liu XH, Zhu HC, et al. Hydrogen sulfide treatment protects against renal ischemia-reperfusion injury via induction of heat shock proteins in rats[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2019, 22(1): 99-105.
- [51] Ji K, Xue L, Cheng J, et al. Preconditioning of H₂S inhalation protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by induction of HSP70 through PI3K/Akt/Nrf2 pathway[J]. *Brain Res Bull*, 2016, 121: 68-74.
- [52] Ke X, Chen J, Peng L, et al. Heat shock protein 90/Akt pathway participates in the cardioprotective effect of exogenous hydrogen sulfide against high glucose-induced injury to H9c2 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(4): 1001-1010.
- [53] Horsman JW, Miller DL. Mitochondrial sulfide quinone oxidoreductase prevents activation of the unfolded protein response in hydrogen sulfide[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(10): 5320-5325.
- [54] Yao LL, Huang XW, Wang YG, et al. Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by preventing GSK-3 β -dependent opening of mPTP [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(5): H1310-H1319.
- [55] Liang W, Chen J, Mo L, et al. ATP-sensitive K⁺ channels contribute to the protective effects of exogenous hydrogen sulfide against high glucose-induced injury in H9c2 cardiac cells[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(3): 763-772.
- [56] Yi J, Yuan Y, Zheng J, et al. Hydrogen sulfide alleviates uranium-induced kidney cell apoptosis mediated by ER stress via 20S proteasome involving in Akt/GSK-3 β /Fyn-Nrf2 signaling[J]. *Free Radic Res*, 2018, 52(9): 1020-1029.
- [57] Wang M, Cao X, Luan C, et al. Hydrogen sulfide attenuates hydrogen peroxide-induced injury in human lung epithelial A549 cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16): 3975.
- [58] Chakraborty PK, Murphy B, Mustafi SB, et al. Cystathionine β -synthase regulates mitochondrial morphogenesis in ovarian cancer [J]. *FASEB J*, 2018, 32(8): 4145-4157.
- [59] Qiao P, Zhao F, Liu M, et al. Hydrogen sulfide inhibits mitochondrial fission in neuroblastoma N2a cells through the Drp1/ERK1/2 signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(1): 971-977.
- [60] Xu M, Hua Y, Qi Y, et al. Exogenous hydrogen sulphide supplement accelerates skin wound healing via oxidative stress inhibition and vascular endothelial growth factor enhancement[J]. *Exp Dermatol*, 2019, 28(7): 776-785.
- [61] Vandiver MS, Paul BD, Xu R, et al. Sulfhydration mediates neuroprotective actions of parkin[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1626.
- [62] Sun Y, Lu F, Yu X, et al. Exogenous H₂S promoted USP8 sulfhydration to regulate mitophagy in the hearts of db/db mice [J]. *Aging Dis*, 2020, 11(2): 269-285.
- [63] Liu N, Wu J, Zhang L, et al. Hydrogen sulphide modulating mitochondrial morphology to promote mitophagy in endothelial cells under high-glucose and high-palmitate[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(12): 3190-3203.
- [64] 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.
- [65] Leschelle X, Gubern M, Andriamihaja M, et al. Adaptive metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1725(2): 201-212.
- [66] Blackstone E, Morrison M, Roth MB. H₂S induces a suspended animation-like state in mice[J]. *Science*, 2005, 308(5721): 518.
- [67] Nagahara N. Multiple role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase: antioxidative function, H₂S and polysulfide production and possible SO_x production[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(4): 577-589.
- [68] Nagahara N, Katayama A. Post-translational regulation of mercaptopyruvate sulfurtransferase via a low redox potential cysteine-sulfenate in the maintenance of redox homeostasis[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(41): 34569-34576.
- [69] Zuhra K, Tomé CS, Masi L, et al. N-acetylcysteine serves as substrate of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and stimulates sulfide metabolism in colon cancer cells[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 828.
- [70] Nagahara N, Nagano M, Ito T, et al. Redox regulation of mammalian 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase[J]. *Methods Enzymol*, 2015, 554: 229-254.
- [71] Augsburger F, Szabo C. Potential role of the 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST)-hydrogen sulfide (H₂S) pathway in cancer cells[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 154: 104083.
- [72] Panagaki T, Randi EB, Szabo C. Role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the regulation of proliferation and cellular bioenergetics in human down syndrome fibroblasts [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 653.
- [73] Szczesny B, Módis K, Yanagi K, et al. AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro[J]. *Nitric Oxide*, 2014, 41: 120-130.
- [74] Gerö D, Torregrossa R, Perry A, et al. The novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide (H₂S) donors AP123 and AP39 protect against hyperglycemic injury in microvascular endothelial cells in vitro[J]. *Pharmacol Res*, 2016, 113(Pt A): 186-198.
- [75] Ikeda K, Marutani E, Hirai S, et al. Mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor AP39 improves neurological outcomes after cardiac arrest in mice[J]. *Nitric Oxide*, 2015, 49: 90-96.
- [76] Zhao FL, Fang F, Qiao PF, et al. AP39, a mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, supports cellular bioenergetics and protects against Alzheimer's disease by preserving mitochondrial function in APP/PS1 mice and neurons [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016: 8360738.
- [77] Fox BC, Slade L, Torregrossa R, et al. The mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor AP39 improves health and mitochondrial function in a *C. elegans* primary mitochondrial disease model[J]. *J Inher Metab Dis*, 2020. DOI: 10.1002/jimd.12345.
- [78] Zhu C, Su Y, Juriasingani S, et al. Supplementing preservation solution with mitochondria-targeted H₂S donor AP39 protects cardiac grafts from prolonged cold ischemia-reperfusion injury in heart transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2019, 19(11): 3139-3148.
- [79] Wallace JL, Wang R. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(5): 329-345.
- [80] Waters A, Torregrossa R, Gero D, et al. RT01, A novel derivative of the mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor AP39, reversed hyperglycaemia-induced mitochondrial dysfunction in murine brain microvascular endothelial cells[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, 112: 157-158.

(此文编辑 文玉珊)