

本文引用: 苑聪, 罗新园, 熊淑珊, 等. H₂S 拮抗 HUVEC 衰老与促进 SIRT1 巯基化和减少 FOXO1 乙酰化有关[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(9): 746-753. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.09.002.

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2023)31-09-0746-08

H₂S 拮抗 HUVEC 衰老与促进 SIRT1 巯基化和减少 FOXO1 乙酰化有关

苑聪^{1#}, 罗新园^{2#}, 熊淑珊³, 谢楠¹, 任重², 吴洁⁴, 姜志胜²

(1. 长沙市第一医院心血管内科, 湖南省长沙市 410000; 2. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病国际科技创新合作基地, 湖南省衡阳市 421001; 3. 长沙市第一医院健康管理中心/干部保健科, 湖南省长沙市 410000; 4. 南华大学附属第一医院心血管内科, 湖南省衡阳市 421001)

[摘要] **[目的]** 探讨沉默信息调节因子 1(SIRT1)/叉头转录因子 O1(FOXO1)在 H₂S 拮抗 H₂O₂ 诱导内皮细胞衰老过程中的作用。**[方法]** 建立内皮细胞衰老模型,通过衰老相关 β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色在光学显微镜下观察到的蓝染细胞数(即衰老细胞)计算阳性细胞率。采用 Western blot 检测细胞 P21、P53、纤溶酶原激活物抑制剂 1(PAI-1)、叉头转录因子 O1(FOXO1)、乙酰化 FOXO1(ac-FOXO1)、锰超氧化物歧化酶(MnSOD)及过氧化氢酶的蛋白表达水平,采用生物素转染法测定 S-巯基化 SIRT1 的表达,采用活性氧(ROS)检测定量评估细胞内 ROS 水平。**[结果]** 经 100 μmol/L H₂O₂ 处理可显著提高 SA-β-gal 染色阳性细胞率和 P21、P53、PAI-1 的蛋白表达,提示衰老细胞模型成功建立,而 100 μmol/L NaHS 可明显拮抗这一作用,SA-β-gal 染色阳性细胞数明显下降($P<0.01$),P21、P53、PAI-1 的蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与对照组相比,H₂O₂ 组 SIRT1、FOXO1、ac-FOXO1、MnSOD 及过氧化氢酶的蛋白表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),ac-FOXO1/FOXO1 比值显著增加($P<0.01$),ROS 水平明显升高($P<0.01$)。与 H₂O₂ 组相比,NaHS+H₂O₂ 组 SIRT1、S-巯基化 SIRT1、FOXO1、ac-FOXO1、MnSOD 及过氧化氢酶的蛋白表达显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),ac-FOXO1/FOXO1 比值显著下降($P<0.01$),ROS 水平明显降低($P<0.05$)。**[结论]** H₂S 可拮抗 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 衰老,其机制与促进 SIRT1 巯基化和减少 FOXO1 乙酰化有关。

[关键词] 硫化氢; 沉默信息调节因子 1; S-巯基化; 叉头转录因子 O1; 内皮细胞衰老

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

The antagonist role of H₂S against senescence of HUVEC may involve activation of SIRT1 S-sulphydrylation and reduction of FOXO1 acetylation

YUAN Cong^{1#}, LUO Xinyuan^{2#}, XIONG Shushan³, XIE Nan¹, REN Zhong², WU Jie⁴, JIANG Zhisheng²

(1. Department of Cardiology, the First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410000, China; 2. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & International Joint Laboratory for Arteriosclerotic Disease Research of Hunan Province, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. Health Management Center/Cadre Health Department, the First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410000, China; 4. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[ABSTRACT] **Aim** To explore the role of silent information regulator 1(SIRT1)/forkhead transcription factor O1(FOXO1) in H₂S antagonism of H₂O₂-induced endothelial cell senescence. **Methods** The positive cell rate was calculated by the number of blue-stained cells (senescent cells) observed under the light microscope by senescence-associated β-gal (SA-β-gal) staining. Western blot was used to detect the expression levels of P21, P53, plasminogen activator in-

[收稿日期] 2023-07-30

[修回日期] 2023-09-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(91839103 和 81170277)

[作者简介] 苑聪,主治医师,研究方向为心血管疾病的基础与临床,E-mail:yuancong@vip.sina.cn。罗新园,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治。通信作者姜志胜,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化及发病机制,E-mail:zsjiang2005@163.com。#为并列第一作者。

hibitor-1 (PAI-1), FOXO1, acetylated FOXO1 (ac-FOXO1), manganese superoxide dismutase (MnSOD) and catalase proteins, and biotin-switch assay was used to measure the expression of S-sulfhydration of SIRT1, and ROS detection was used to quantitatively evaluate intracellular reactive oxygen species (ROS) level. **Results** Treatment with 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 significantly increased the SA- β -gal staining-positive cell rate and the expression of P21, P53 and PAI-1 proteins, suggesting that the senescent cell model was successfully established, whereas 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS significantly antagonized this effect, and the number of SA- β -gal staining-positive cells decreased significantly ($P<0.01$), and the expression of P21, P53 and PAI-1 proteins significantly reduced ($P<0.01$). Compared with the control group, the expression of SIRT1, FOXO1, ac-FOXO1, MnSOD and catalase proteins in the H_2O_2 group significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), the ac-FOXO1/FOXO1 ratio significantly increased ($P<0.01$), and the ROS level significantly increased ($P<0.01$). Compared with H_2O_2 group, the expression of SIRT1, S-sulfhydration of SIRT1, FOXO1, ac-FOXO1, MnSOD and catalase proteins in the NaHS+ H_2O_2 group was significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the ac-FOXO1/FOXO1 ratio was significantly decreased ($P<0.01$), while the ROS level was significantly reduced ($P<0.01$). **Conclusion** H_2S can antagonize H_2O_2 -induced senescence of HUVEC by a mechanism related to promoting SIRT1 sulfhydration and reducing FOXO1 acetylation.

[**KEY WORDS**] hydrogen sulfide; silent information regulator 1; S-sulfhydration; forkhead transcription factor O1; endothelial cell senescence

硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)在心血管等多个系统中发挥着广泛的生物学效应,是一重要的内源性气体信号分子^[1-2]。目前, H_2S 在抑制动脉粥样硬化、逆转血管重塑以及抗氧化应激等心血管效应方面获得了大量的基础医学研究证据^[2-5]。尽管国内外的研究业已证明 H_2S 可延缓内皮细胞衰老,并在一定程度上可使受损的内皮细胞功能得到恢复^[6],但其具体机制仍不明确。

衰老构成了癌症和心血管疾病等年龄相关疾病的关键风险因素。沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)在心血管系统拮抗内皮衰老中扮演重要角色,翻译后修饰可调节其活性作用^[7-8]。由 H_2S 参与介导靶蛋白的 S-巯基化则是在特定半胱氨酸残基上发生的一种新型翻译后修饰。目前,有关 H_2S 是否能够通过靶蛋白 SIRT1 的 S-巯基化来拮抗氧化应激延缓内皮细胞衰老方面仍需更多的研究证据支持。众所周知,叉头转录因子 O1(forkhead transcription factor O1, FOXO1)是 SIRT1 脱乙酰基的重要转录因子,也是衰老和长寿的重要决定因素^[9-10]。研究表明, SIRT1 通过 FOXO1 依赖性机制抵抗氧化应激反应从而延缓心脏衰老^[11]。具体而言, SIRT1 主要是通过 FOXO1 去乙酰化、增强转录活性以及上调抗氧化酶的表达来抵抗细胞氧化应激。

因此,本研究作了一个假说,即 H_2S 可通过 S-巯基化 SIRT1 导致 FOXO1 去乙酰化,拮抗氧化应激反应从而发挥拮抗内皮细胞衰老的有益心血管效应。为了验证这一假说,开展了本实验研究,拟

为 H_2S 在抗心血管衰老方面提供新的基础医学研究证据。

1 材料和方法

1.1 细胞和试剂

人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)购自中国科学院细胞库;胰蛋白酶购自 Gibco 公司;DMEM 培养基、胎牛血清购自 HyClone 公司;外源性 H_2S 供体硫氢化钠(NaHS)、 H_2O_2 购自 Sigma-Aldrich 公司;衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal)染色试剂盒购自 Cell Signaling Technology 公司;P21、P53、纤溶酶原激活物抑制剂 1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、SIRT1、锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)、过氧化氢酶多克隆抗体购自 Proteintech Group 公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞分离、培养与实验分组

细胞贴壁生长于无菌细胞培养瓶中,结合细胞的生长情况、培养基的状态等综合情况定期更换新鲜培养基。按照相关操作技术规范进行消化、传代,取生长至亚融合状态的细胞进行实验,实验前需要更换新鲜的培养基再给予处理因素预处理。在后续实验研究中,将细胞随机分为对照组、 H_2O_2 组和 H_2O_2 +NaHS 组。

1.3 内皮细胞衰老模型的建立

采用 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 预处理细胞后,在形态学方面通过 SA- β -gal 染色,在蛋白质分子层面通过 Western blot 检测 P21、P53、PAI-1 衰老相关蛋白的表达,综合确定 H_2O_2 诱导 HUVEC 衰老模型是否成功建立。其中,SA- β -gal 染色是在衰老特异性 β -半乳糖苷酶催化下生成蓝色产物,在光学显微镜下可观察到蓝染的衰老细胞,即阳性细胞,并计算阳性细胞率,阳性细胞率=(染色阳性细胞数/总细胞数) $\times 100\%$ 。

1.4 Western blot 检测 P21、P53、PAI-1、FOXO1、ac-FOXO1、MnSOD 及过氧化氢酶的蛋白表达

使用 RIPA 蛋白提取试剂裂解细胞,取细胞中的总蛋白质,BCA 法测定蛋白浓度、电泳、转膜和封闭。将膜与抗体 P21(1:1 000)、P53(1:1 000)、PAI-1(1:1 000)、FOXO1(1:1 000)、ac-FOXO1(1:1 000)、MnSOD(1:1 000)、过氧化氢酶(1:1 000)和 GAPDH(1:1 000)孵育过夜。孵育结束后用稀释好的二抗共同孵育,滴加 ECL 化学发光剂通过成像分析系统显影、拍照,采用图像分析系统分析。本研究均采用 GAPDH 作内参。

1.5 ROS 检测

ROS 检测是一种定量的、利用 DCFH-DA 来评价胞内 ROS 水平的方法。DCFH-DA 探针本身不带有荧光,在胞内可被酯酶水解生成 DCFH(不能穿透包膜),而胞内的 ROS 又可将无荧光的 DCFH 氧化为有荧光的 DCF,最终通过倒置荧光相差显微镜观察 DCF 的荧光强度可判断胞内 ROS 水平。将细胞进行传代培养并接种于 6 孔板中,予以处理因素干预后弃旧培养基,加入 DCFH-DA,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 20 min 后用无血清培养基洗涤除去未进入细胞内的 DCFH-DA,利用倒置荧光相差显微镜进行观察并拍照,所得结果采用 Image-Pro Plus 软件进行分析。

1.6 生物素转换实验

生物素转换实验是一种可以用来检测蛋白质 S-巯基化的生物素标记方法。其是将未发生修饰的自由巯基封闭,将 S-巯基化的巯基在抗坏血酸的作用下逆转为自由巯基,使蛋白被生物素标记,后者利用生物素抗体进行 Western blot 进行分析:1)按常规提取细胞蛋白;2)加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 10% CHAPS,混匀后加入封闭液于 50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min;3)加入预冷的丙酮于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 20 min,离心后

弃上清液留沉淀;4)加入 4 μL biotin-HPDP 溶液,再加入 0.8 μL 抗坏血酸钠溶液充分混匀,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h;5)加入 250 μL 预冷的丙酮于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 20 min,离心后弃上清,加少量的预冷丙酮清洗管壁及沉淀表面以去除残留的 biotin-HPDP;6)加入 HENS buffer 80 μL 使蛋白尽量溶解不留沉淀,然后加入 160 μL 中和液,再加入 20 μL streptavidin-agarose 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转过夜;7)加入洗涤液洗涤 5 次,弃上清留沉淀;8)最后 1 次吸尽上清,加入 10 μL 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,冷却后使用 Western blot 检测。

1.7 统计学分析

应用 GraphPad Prism 5.0 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 t 检验或单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 衰老细胞模型

HUVEC 分别予以 0、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理,经 SA- β -gal 染色,与 0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组相比,100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组阳性细胞数明显增加,差异具有统计学意义($P<0.01$;图 1)。Western blot 检测显示,100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组 P21、P53 和 PAI-1 的蛋白表达均有显著增加,分别是 0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组的 6.8 倍、1.6 倍和 2.6 倍,差异均有统计学意义($P<0.01$;图 2)。因此,将 100 $\mu\text{mol/L}$ 作为本研究中 H_2O_2 诱导 HUVEC 衰老的浓度。

2.2 H_2S 对 H_2O_2 诱导 HUVEC 衰老的影响

与 H_2O_2 + 0 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组相比, H_2O_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组、 H_2O_2 + 200 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组的阳性细胞数明显下降,分别下降了 43.8% 和 46.6% ($P<0.01$),但 H_2O_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组与 H_2O_2 + 200 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组之间无明显差异(图 3)。Western blot 检测显示,与 H_2O_2 + 0 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组相比, H_2O_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组、 H_2O_2 + 200 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组 P21、P53 和 PAI-1 的蛋白表达显著降低,其中 H_2O_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组 P21、P53、PAI-1 的蛋白表达分别降低了 49.4%、49.7% 和 67.6% ($P<0.01$), H_2O_2 + 200 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组 P21、P53、PAI-1 的蛋白表达分别降低了 83.9%、89.6% 和 63.8% ($P<0.01$;图 4)。因此,将 100 $\mu\text{mol/L}$ 作为 NaHS 处理浓度。

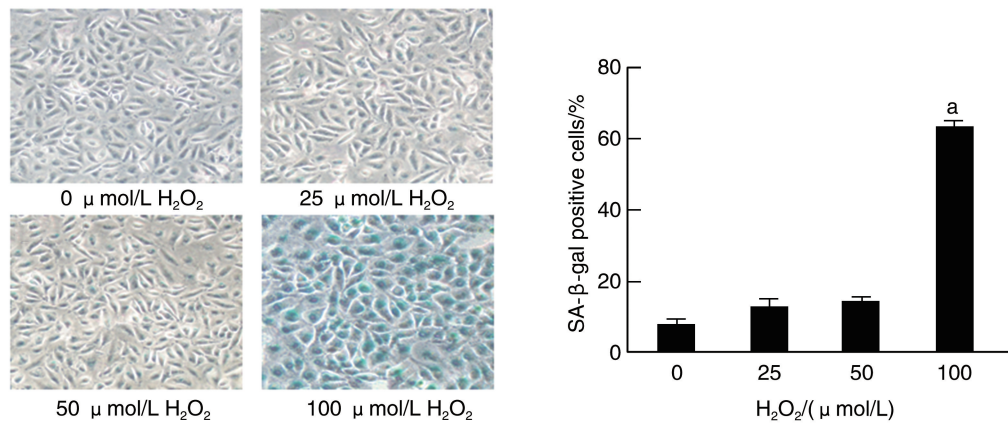


图 1. 衰老细胞模型的建立 ($n=5$)

左图为倒置相差显微镜下的 SA- β -gal 染色结果 (10×10), 镜下蓝染细胞即衰老细胞; 右图为 SA- β -gal 阳性细胞率的分析统计图。

a 为 $P<0.01$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组比较。

Figure 1. Establishment of a senescence cell model ($n=5$)

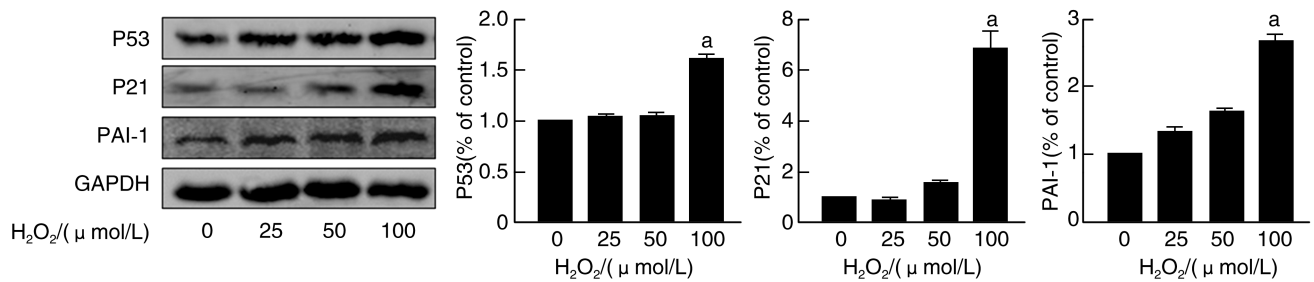


图 2. 不同浓度 H_2O_2 对 P21、P53 和 PAI-1 蛋白表达的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.01$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组比较。

Figure 2. The effect of different concentrations of H_2O_2 on the expression of P21, P53 and PAI-1 proteins ($n=3$)

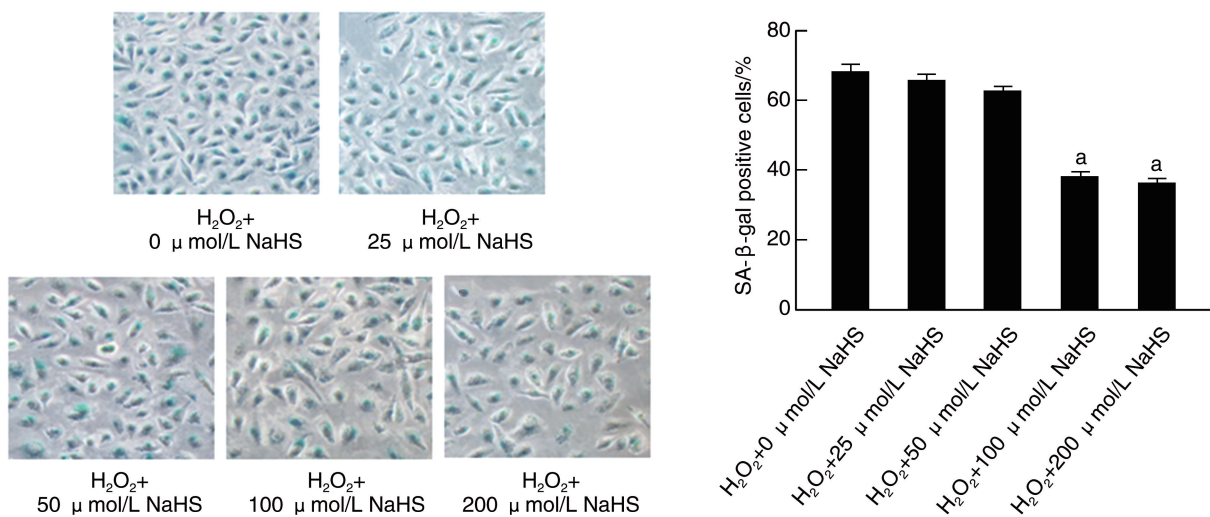


图 3. 不同浓度 NaHS 对 H_2O_2 诱导的 HUVEC 衰老的影响 ($n=5$)

左图为倒置相差显微镜下的 SA- β -gal 染色结果 (10×10), 右图为 SA- β -gal 阳性细胞率的分析统计图。

a 为 $P<0.01$, 与 H_2O_2 + 0 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组比较。

Figure 3. The effect of different concentrations of NaHS on H_2O_2 -induced senescence of in HUVEC ($n=5$)

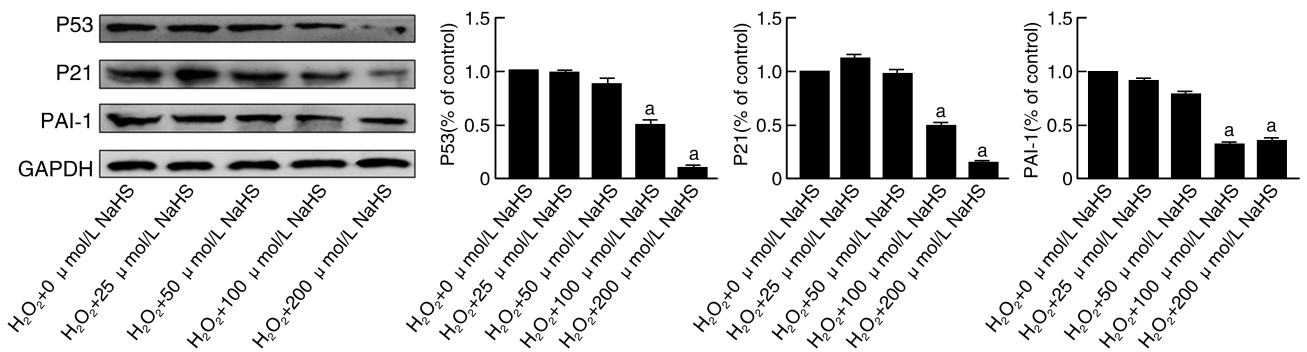


图 4. 不同浓度 NaHS 对 P21、P53、PAI-1 蛋白表达的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.01$, 与 H₂O₂+0 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组比较。

Figure 4. The effect of different concentrations of NaHS on the expression of P21, P53 and PAI-1 proteins ($n=3$)

2.3 H₂S 拮抗 HUVEC 衰老过程中对 SIRT1 蛋白表达及其 S-巯基化的影响

与对照组相比, H₂O₂ 组 SIRT1 蛋白表达降低了 61.4% ($P<0.01$), 而 H₂O₂+NaHS 组 SIRT1 蛋白表达比 H₂O₂ 组增加 2.2 倍 ($P<0.01$)。S-巯基化 SIRT1 在对照组和 H₂O₂ 组中均未明显检测到, 但在加入 NaHS 后 S-巯基化 SIRT1 蛋白表达明显增加 ($P<0.01$; 图 5)。以上提示 H₂S 可显著增加 SIRT1 和 S-巯基化 SIRT1 蛋白的表达。

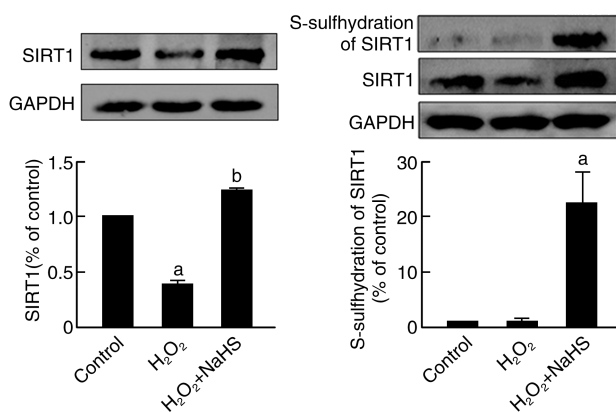


图 5. NaHS 对内皮细胞衰老模型中 SIRT1 蛋白表达及其 S-巯基化的影响 ($n=3$)

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

Figure 5. The effect of NaHS on the expression of SIRT1 protein and S-sulfhydrated SIRT1 in endothelial cell senescence model ($n=3$)

2.4 H₂S 拮抗 HUVEC 衰老过程中对 FOXO1、ac-FOXO1 蛋白表达和 ac-FOXO1/FOXO1 比值的影响

与对照组相比, H₂O₂ 组 FOXO1、ac-FOXO1 蛋白的表达显著降低, 分别降低了 28.3%、73.8% ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), ac-FOXO1/FOXO1 比值增加了

84% ($P<0.01$); 与 H₂O₂ 组相比, H₂O₂+NaHS 组 FOXO1 蛋白表达增加了 84.1% ($P<0.01$), ac-FOXO1 蛋白表达明显增加 ($P<0.01$), ac-FOXO1/FOXO1 比值下降了 48.4% ($P<0.01$; 图 6)。

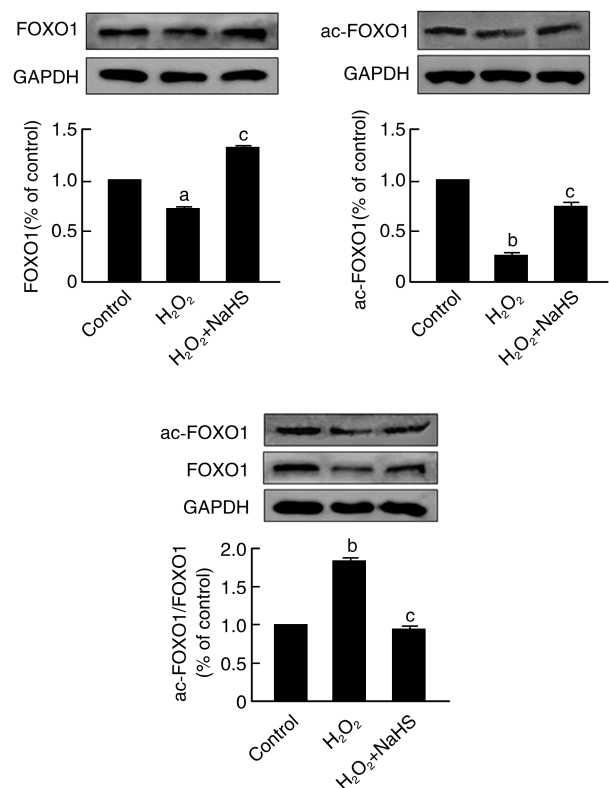


图 6. NaHS 对内皮细胞衰老模型中 FOXO1、ac-FOXO1 蛋白表达及 ac-FOXO1/FOXO1 比值的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较;

c 为 $P<0.01$, 与 H₂O₂ 组比较。

Figure 6. The effect of NaHS on the expression of FOXO1, ac-FOXO1 proteins and ac-FOXO1/FOXO1 ratio in endothelial cell senescence model ($n=3$)

2.5 H₂S 拮抗 HUVEC 衰老过程中对 MnSOD、过氧化氢酶蛋白表达和 ROS 水平的影响

与对照组相比, H₂O₂ 组 MnSOD、过氧化氢酶蛋白表达显著降低, 分别降低了 43.9% 和 45.4% ($P < 0.01$), 细胞 ROS 水平升高 3.8 倍 ($P < 0.01$); 而在

加入 NaHS 后, MnSOD、过氧化氢酶蛋白表达较 H₂O₂ 组明显升高, 分别升高了 38% 和 38.7% ($P < 0.05$), 细胞 ROS 水平则降低了 46.2% ($P < 0.05$; 图 7 和图 8)。

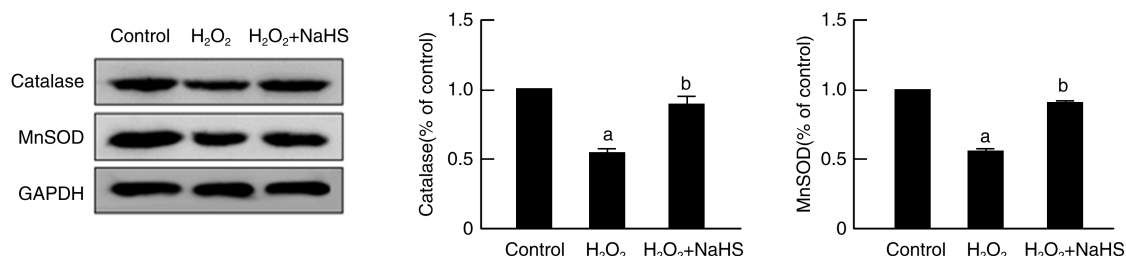


图 7. NaHS 对内皮细胞衰老模型中 MnSOD、过氧化氢酶蛋白表达的影响 ($n=3$)

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

Figure 7. The effect of NaHS on the expression of MnSOD and catalase proteins in endothelial cell senescence model ($n=3$)

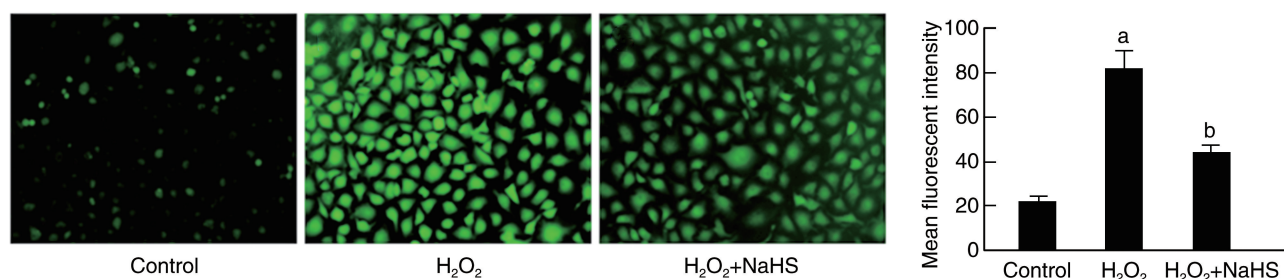


图 8. NaHS 对内皮细胞衰老模型中 ROS 水平的影响 ($n=3$)

左图为倒置荧光相差显微镜下 ROS 检测结果 (10×20), 右图为 Image-Pro Plus 软件分析 DCF 的平均荧光强度。

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

Figure 8. The effect of NaHS on ROS levels in endothelial cell senescence model ($n=3$)

3 讨论

衰老在细胞水平上的发展被描述为“细胞衰老”。细胞衰老可由衰老、DNA 损伤或 ROS 水平升高等因素所诱发^[12]。不同的心血管细胞类型衰老与多种心血管疾病相关, 包括动脉粥样硬化^[13]、瓣膜性心脏病^[14]、心肌病^[15]以及心律失常^[16]。深入了解细胞衰老对如何防治心血管疾病至关重要。

内皮细胞约占心脏中非心肌细胞的 60% 左右^[17]。内皮细胞通过分泌血管活性化合物和生长因子来调节血管舒张和血管张力^[18]。在动脉粥样硬化斑块、衰竭心脏 (特别是舒张功能不全) 和房颤心脏中均可观察到大量衰老的内皮细胞。H₂O₂ 诱导的 HUVEC 衰老是一成熟的衰老细胞模型。利用

SA-β-gal 染色观察阳性细胞率是用来鉴定细胞衰老的经典形态学方法。衰老机制的关键信号成分, 如 P21 和 P53 作为干细胞功能的关键调节因子对于不可逆的生长停滞和衰老细胞极其重要^[19-20]。P21、P53 蛋白表达水平的增加可间接作为评价细胞衰老的有效指标^[21-22]。PAI-1 是衰老相关的关键成分和调节细胞衰老的直接介质^[23], 也是目前被广泛用于评价细胞衰老的可靠指标之一。基于上述评价指标的确立, 本研究成功复制了 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 衰老模型。

本课题组前期研究表明, H₂S 可有效抵抗 H₂O₂ 诱导的内皮细胞衰老^[24]。本研究再次得到了一致性的结论, 且本研究在机制方面进行了新的探索。SIRT1 一直以来被认为是一种长寿基因, 与生物体

的寿命具有密切联系,在抵抗氧化应激反应、延缓心血管衰老等方面具有重要的生物学效应。沉默 SIRT1 基因可以诱导内皮细胞衰老,而 SIRT1 蛋白表达的增加是抵抗细胞衰老的有效途径^[8]。除了增加其表达,SIRT1 的活性还同时受到其翻译后修饰的影响。S-巯基化则是其中一种非常普遍的蛋白质翻译后修饰,目标蛋白通过 S-巯基化后通常可增加其反应性^[25]。而由 H₂S 介导的 S-巯基化是一种在靶蛋白特定半胱氨酸残基上发生的翻译后修饰,研究发现其参与了机体广泛的细胞功能和代谢途径^[26]。H₂S 可诱导心血管系统中的某些酶或受体、转录因子和离子通道发生 S-巯基化^[27],这些靶蛋白特定半胱氨酸残基上的 S-巯基化改变与众多相关心血管疾病的发展密切相关^[28]。Xie 等^[29]的研究表明,H₂S 可通过 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Keap1) 的 151 位半胱氨酸残基发生 S-巯基化以及激活核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 信号通路来抑制氧化应激反应。Huang 等^[30]新近研究发现,H₂S 提高了 Keap1 的 S-巯基化作用继而减少了动物体内的氧化应激。那么,H₂S 是否能够通过 S-巯基化 SIRT1 来抵抗氧化应激,从而延缓内皮细胞衰老是本研究有待探索的问题。本研究发现,在加入 NaHS 后能明显促进 S-巯基化 SIRT1 的表达。

SIRT1 可通过 FOXO1 抵抗氧化应激从而延缓衰老^[11,31]。FOXO1 在内皮细胞中高度表达^[32],同时也是 SIRT1 脱乙酰基的重要转录因子。SIRT1 通过与 FOXO1 结合使其达到去乙酰化状态使其增强活性,增加一系列抗氧化酶的表达来抵抗氧化应激从而延缓衰老。本研究发现,H₂O₂ 明显降低了 FOXO1 蛋白的表达,而 NaHS 能够显著抑制这一作用。值得注意的是,H₂O₂ 还同时降低了 ac-FOXO1 蛋白的表达,并且通过 NaHS 的预处理在一定程度上拮抗了 ac-FOXO1 蛋白表达水平降低的趋势。由这项研究结果所推断的结论与本研究组之前的假说似乎是矛盾的,但 ac-FOXO1/FOXO1 比值的变化值得我们重新去思考和解读。结果表明,H₂O₂ 可提高 ac-FOXO1/FOXO1 比值,而 NaHS 明显降低其比值。换言之,H₂O₂ 能促进 FOXO1 蛋白乙酰化,而 H₂S 则降低 FOXO1 乙酰化水平。Cui 等^[33]的研究表明,FOXO1 的乙酰化可导致 ROS 生成增多。而进一步的研究提示,SIRT1 通过减少靶蛋白 FOXO1 的乙酰化改变了其下游靶基因 MnSOD、过氧化氢酶的转录活性,从而减少了 ROS 的积累^[34]。本研究也显示,H₂S 降低了 FOXO1 的乙酰化水平,明显增

加了抗氧化酶 MnSOD、过氧化氢酶蛋白的表达,最终降低细胞内 ROS 水平。

综上所述,H₂S 可拮抗内皮细胞衰老,其机制与促进 SIRT1 巯基化和降低 FOXO1 乙酰化有关。上述结果为阐明 H₂S 防治心血管疾病的机制提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] KOLLURU, SHEN G K R E S. Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(2): 109-125.
- [2] MA J S, CHEN J, HUANG H. Role and mechanism of hydrogen sulfide in vascular calcification[J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2022, 74(6): 903-912.
- [3] LI Z, POLHEMUS D Z, LEFER D J. Evolution of hydrogen sulfide therapeutics to treat cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2018, 123(5): 590-600.
- [4] POLHEMUS D J, LEFER D J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2014, 114(4): 730-737.
- [5] 吴忱昊, 谢志忠. 线粒体源性硫化氢及其对线粒体功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(4): 277-285.
- [6] WU C H, XIE Z Z. Mitochondrial hydrogen sulfide and its effect on mitochondrial function[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(4): 277-285.
- [7] TESTAI L, CITI V, MARTELLI A, et al. Role of hydrogen sulfide in cardiovascular ageing[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160: 105125.
- [8] MENGGOZZI A, COSTANTINO S, PANENI F, et al. Targeting SIRT1 rescues age- and obesity-induced microvascular dysfunction in Ex vivo human vessels[J]. *Circ Res*, 2022, 131(6): 476-491.
- [9] LUO X Y, QU S L, TANG Z H, et al. SIRT1 in cardiovascular aging[J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 437: 106-114.
- [10] MARTINS R, LITHGOW G, LINK W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity[J]. *Aging Cell*, 2016, 15(2): 196-207.
- [11] BRUNET A, GOODELL M A, RANDO T A. Ageing and rejuvenation of tissue stem cells and their niches[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(1): 45-62.
- [12] ALCENDOR R R, GAO S, ZHAI P, et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart[J]. *Circ Res*, 2007, 100(10): 1512-1521.
- [13] DAVALLI P, MITIC T, CAPORALI A, et al. ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 3565127.
- [14] WANG J C, BENNETT M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence[J]. *Circ Res*, 2012, 111(2): 245-259.
- [15] DAS D, HOLMAS A, MURPHY G A, et al. TGF-beta1-induced MAPK activation promotes collagen synthesis, nodule formation, redox stress and cellular senescence in porcine aortic valve interstitial cells[J]. *J Heart Valve Dis*, 2013, 22(5): 621-630.
- [16] LEE J, TERMGLINCHAN V, DIECKE S, et al. Activation of PDGF

- pathway links LMNA mutation to dilated cardiomyopathy[J]. *Nature*, 2019, 572(7769): 335-340.
- [16] CHADDA K R, AJIJOLA O A, VASEGHI M, et al. Ageing, the autonomic nervous system and arrhythmia; from brain to heart[J]. *Ageing Res Rev*, 2018, 48: 40-50.
- [17] PINTO A R, ILINYKH A, IVEY M J, et al. Revisiting cardiac cellular composition[J]. *Circ Res*, 2016, 118(3): 400-409.
- [18] COLLIVA A, BRAGA L, GIACCA M, et al. Endothelial cell-cardiomyocyte crosstalk in heart development and disease[J]. *J Physiol*, 2020, 598(14): 2923-2939.
- [19] MILANOVIC M, FAN DNY, BELENKI D, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness [J]. *Nature*, 2018, 553(7686): 96-100.
- [20] SHIMIZU I, MINAMINO T. Cellular senescence in cardiac diseases[J]. *J Cardiol*, 2019, 74(4): 313-319.
- [21] JIANG C S, LIU G, LUCKHARDT T, et al. Serpine 1 induces alveolar type II cell senescence through activating p53-p21-Rb pathway in fibrotic lung disease [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(5): 1114-1124.
- [22] CHEN M S, LEE R T, GARBERN J C. Senescence mechanisms and targets in the heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(5): 1173-1187.
- [23] KHAN S S, SHAH S J, KLYACHKO E, et al. A null mutation in SERPINE1 protects against biological aging in humans[J]. *Sci Adv*, 2017, 3(11): eaal1617.
- [24] SUO R, ZHAO Z Z, TANG Z H, et al. Hydrogen sulfide prevents H₂O₂-induced senescence in human umbilical vein endothelial cells through SIRT1 activation[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(6): 1865-1870.
- [25] JU Y, FU M, STOKES E, et al. H₂S-mediated protein S-sulfhydration; a prediction for its formation and regulation[J]. *Molecules*, 2017, 22(8): 1334.
- [26] BIBLI S I, HU J, LOOSO M, et al. Mapping the endothelial cell S-sulphydrome highlights the crucial role of integrin sulfhydration in vascular function[J]. *Circulation*, 2021, 143(9): 935-948.
- [27] MENG G, ZHAO S, XIE L, et al. Protein S-sulfhydration by hydrogen sulfide in cardiovascular system [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(8): 1146-1156.
- [28] LUO S, KONG C, ZHAO S, et al. Endothelial HDAC1-ZEB2-NuRD complex drives aortic aneurysm and dissection through regulation of protein S-sulfhydration [J]. *Circulation*, 2023, 147(18): 1382-1403.
- [29] XIE L P, GU Y, WEN M L, et al. Hydrogen sulfide induces Keap1 S-sulfhydration and suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via Nrf2 activation [J]. *Diabetes*, 2016, 65(10): 3171-3184.
- [30] HUANG P, SHEN Z, LIU J, et al. Hydrogen sulfide inhibits high-salt diet-induced renal oxidative stress and kidney injury in dahl rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 2807490.
- [31] MORTUZA R, CHEN S, FENG B, et al. High glucose induced alteration of SIRT1s in endothelial cells causes rapid aging in a p300 and FOXO regulated pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54514.
- [32] WILHELM K, HAPPEL K, EELEN G, et al. FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium[J]. *Nature*, 2016, 529(7585): 216-220.
- [33] CUI C, LI T, XIE Y, et al. Enhancing Acl4 in absence of mTORC2/Rictor drove beta-cell dedifferentiation via inhibiting FoxO1 and promoting ROS production[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(12): 166261.
- [34] LI S T, ZHU Z X, XUE M, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and dysfunction via SIRT1[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(6): 1241-1252.
- (此文编辑 文玉珊)

(上接第 745 页)

- [58] 于克英, 沈娟娟, 张敏, 等. 基于内质网自噬的豁痰解毒通络饮干预兔颈动脉粥样硬化机制研究[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(5): 1888-1892.
- YU K Y, SHEN J J, ZHANG M, et al. Mechanism research of Huotan Jiedu Tongluo decoction interventional treatment of rabbit carotid atherosclerosis based on endoplasmic reticulum autophagy [J]. *Chin J Trad Chin Med Pharm*, 2019, 34(5): 1888-1892.
- [59] ZHANG Y, WANG Y, XU J N, et al. Melatonin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via improving mitochondrial fusion/mitophagy and activating the AMPK-OPA1 signaling pathways [J]. *J Pineal Res*, 2019, 66(2): e12542.
- [60] 周宏. UBL3 类泛素化修饰 MAPK15 诱导 PEX5 磷酸化增强过氧化物酶体自噬介导 Apelin-13/APJ 促血管平滑肌细胞增殖 [D]. 衡阳: 南华大学, 2020: 1-161.
- ZHOU H. UBL3 ubiquitinates MAPK15 and induces the phosphorylation of PEX5 enhancing pexophagy that mediates Apelin-13/APJ promoting the proliferation of vascular smooth muscle cells [D]. Hengyang: University of South China, 2020: 1-161.
- [61] MOOKHERJEE D, DAS S, MUKHERJEE R, et al. RETREG1/FAM134B mediated autophagosomal degradation of AMFR/GP78 and OPA1-a dual organellar turnover mechanism[J]. *Autophagy*, 2021, 17(7): 1729-1752.
- (此文编辑 许雪梅)