

·基础研究·

外源性硫化氢通过PI3K/Akt/eNOS通路改善过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞衰老

牛海名^{1,2}, 李建伟¹, 陈妙莲¹, 刘定辉^{2,3}, 吴琳², 凌叶盛², 余显冠², 钱孝贤^{2,3}
(1. 中山市人民医院/中山大学附属中山医院重症医学科, 广东 中山 528400; 2. 中山大学附属第三医院心血管内科, 广东 广州 510630; 3. 中山大学中西医结合研究所, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】本研究拟探讨磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B/内皮型一氧化氮合酶(PI3K/Akt/eNOS)通路对硫化氢(H₂S)改善内皮细胞衰老的作用。【方法】建立60 μmol/L过氧化氢(H₂O₂)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)衰老模型;衰老模型的评估及不同浓度硫化氢(NaHS)预处理对衰老的作用均通过检测纤溶酶原激活物抑制剂1(PAI-1)的表达水平和衰老相关β-半乳糖苷酶(SA-β-Gal)染色阳性率来研究评估。同时通过Western blot法检测各组内皮细胞中蛋白激酶B(Akt)蛋白、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)蛋白和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)蛋白的表达,通过硝酸盐还原酶法检测一氧化氮(NO)含量。【结果】与对照组相比,HUVEC经60 μmol/L H₂O₂预处理后,能显著提高细胞SA-β-gal阳性率和PAI-1的表达。而NaHS的预处理可以显著减少PAI-1的表达和细胞SA-β-gal阳性率,但可增加p-Akt蛋白、eNOS蛋白的表达及增加NO含量。【结论】NaHS可以改善H₂O₂诱导的内皮细胞衰老,其机制与PI3K/Akt/eNOS通路有关。

关键词:硫化氢;人脐内皮细胞;过氧化氢;衰老;PI3K/Akt/eNOS通路

中图分类号:R339.3+8 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2021)04-0535-08

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2021.0408

Exogenous Hydrogen Sulfide Improves Hydrogen Peroxide-Induced Senescence of Human Umbilical Vein Endothelial Cells via PI3K/Akt/eNOS Pathway

NIU Hai-ming^{1,2}, LI Jian-wei¹, CHEN Miao-lian¹, LIU Ding-hui^{2,3}, WU Lin², LING Ye-sheng²,
YU Xian-guan², QIAN Xiao-xian^{2,3}

(1. Department of Critical Care, Zhongshan People's Hospital/Zhongshan Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhongshan 528400, China; 2. Department of Cardiology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 3. Institute for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Correspondence to: QIAN Xiao-xian; E-mail: qianxx@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate the role of PI3K/Akt/eNOS signaling pathway in the protective effect of hydrogen sulfide(H₂S) on endothelial cell senescence induced by hydrogen peroxide (H₂O₂).【Methods】Senescence in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was induced by 60 μmol/L H₂O₂ for 1 h, and the effects of NaHS on the senescence were examined by the expression of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and senescence-associated β-galactosidase (SA-β-Gal) staining. Meanwhile, the expression of protein kinase B (Akt), Phospho protein kinase B (p-Akt), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were examined by western blot, and the senescence-related parameters. The content

收稿日期:2021-03-18

基金项目:国家自然科学基金(81370447);广东省省科技计划项目(2016A050502014);中山市社会公益科技基金(2019B1053)

作者简介:牛海名,硕士,主治医师,研究方向:心血管病的防治及脓毒症休克心肺功能损伤的干预,E-mail:nhmlyzh@qq.com;钱孝贤,通信作者,教授,主任医师,研究方向:动脉粥样硬化的防治及中西医结合防治心血管疾病,E-mail:qianxx@mail.sysu.edu.cn

of the nitric oxide (NO) was measured by nitrate reduction method. 【Results】 Compared with the control group, after being treated with 60 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , the number of SA- β -gal positive cells and the expression of PAI-1 were significantly increased. However, after pretreatment of NaHS, the expression of PAI-1, the ratio of SA- β -gal positive cells was significantly decreased, but the expression of p-Akt, eNOS and the NO concentration increased. 【Conclusion】 NaHS could reverse HUVEC senescence induced by H_2O_2 , and this may be highly associated with PI3K/Akt/eNOS signaling pathway.

Key words: hydrogen sulfide; human umbilical vein endothelial cells; hydrogen peroxide; senescence; PI3K/Akt/eNOS signaling pathway

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(4): 535-542]

心血管病是我国城乡居民死亡的首要原因,心血管病患者在今后的10年仍将快速增长^[1],这对人们的生命健康造成了极其严重的危害。从冠心病发生发展机制的不断研究中发现,血管内皮细胞功能的障碍是冠心病发展的主要促动因素^[2];更进一步的研究发现内皮细胞的衰老是心脑血管事件发生的重要因素^[3]。因此,改善内皮细胞早期衰老对于动脉粥样硬化的防治有着重要的意义^[4]。继一氧化碳(carbon monoxide, CO)和一氧化氮(nitric oxide, NO)后,硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是被发现的第3个内源性气体信使^[5],能逆转动脉粥样硬化斑块形成^[6]。国内外的研究已经证实 H_2S 可以对抗被诱导的内皮细胞的衰老,使受损的内皮细胞功能有所恢复^[7],详细的机制并未完全阐明。内皮细胞中的内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)可以促进NO的产生而发挥舒张血管的作用,其活性和表达均受上游相关蛋白通路的调节;脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)通路可以介导eNOS的磷酸化,从而影响NO的含量^[8],发挥抗细胞衰老作用。在细胞的增殖、生长及功能等多方面,PI3K/Akt/eNOS信号通路均具有重要作用^[9]。近期已经有进一步的研究表明高糖导致的内皮细胞损伤可以通过PI3K/Akt/eNOS信号通路被保护和改善^[10]。因此,在内皮细胞的功能调控中,启动PI3K/Akt/eNOS信号通路从而发挥精准靶向作用是至关重要的一个环节,有可能在人类动脉血管病变的防治工作中发挥重要的作用。本研究拟进一步探讨PI3K/Akt/eNOS信号通路在外源性 H_2S 改善过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)衰老中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

原代HUVEC来源于我院产科健康剖宫产产妇的脐带,实验选用第2~4代HUVEC。内皮细胞的提取试剂包括:I型胶原酶(GIBCO公司)、0.05% EDTA胰酶(GIBCO公司);内皮细胞培养试剂包括:M199培养基(GIBCO公司)、无血清培养基(GIBCO公司)、胎牛血清(GIBCO公司),以及从BD公司购买的内皮细胞生长添加剂(endothelial cell growth supplement, ECGS)。硫氢化钠(NaHS)购自于Sigma公司,30% H_2O_2 购自于广州化学试剂厂,衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal)染色相关试剂。全蛋白提取试剂盒、蛋白定量试剂盒(BCA)和NO测试盒分别购买自南京凯基生物有限公司、上海生工生物技术有限公司、南京建成生物工程研究所。从美国的Millipore公司采购PVDF膜、ECL plus超敏免疫印迹检测试剂盒;凝胶电泳中所需要的甲叉双丙烯酰胺和丙烯酰胺购买于美国Bio-Rad公司;牛血清白蛋白(BSA)、十二烷基磺酸钠(SDS)、Tris碱、过硫酸铵(AP)、Tween-20均采购自美国MBCHEM公司。封闭液的主要成分(脱脂奶粉)为中国伊利产品。依照实验所需要的蛋白抗体,从美国Cell Signaling Technology公司购买的eNOS兔抗、Akt兔抗以及p-Akt鼠抗;从美国Santa Cruz公司购买的鼠抗I型抗纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1);从美国Protein Tech Group公司购买的兔抗GAPDH;从武汉博士德公司购买的辣根酶标记羊抗兔IgG,辣根酶标记羊抗鼠IgG;实验所需要的Marker则购买自Fermentas公司。

1.2 方法

1.2.1 HUVEC原代提取及培养 本研究经中山大学附属第三医院及中山大学附属中山医院伦理委员会批准,符合Helsinki宣言中的原则,已取得患者知情同意。原代HUVEC分离提取及培养参照目前经典方法^[11],方法如下:在无菌条件下用PBS冲洗健康新生儿脐带3遍,然后用0.1% I型胶原酶消化15 min,收集胶原酶细胞混合液,300 ×g离心7 min后弃上清,加完全培养基(20% FBS, 20% SFM和60 μg/mL ECGS)混匀种于铺有0.2%明胶的T25培养瓶中,置于37℃,含有体积分数5% CO₂的无菌培养箱中培养。经过一天的培养后,取出培养瓶在超净工作台内用PBS冲洗去掉没有贴壁生长的内皮细胞和残留未洗净的红细胞,然后继续放置于5% CO₂的无菌培养箱中培养。近年来,国际上多采用血小板源内皮细胞粘附分子1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31)来鉴定内皮细胞,因此本实验取第1代细胞,消化收集后交由我院中心实验室对同一批所取HUVEC检测细胞表面标志物CD31;并在普通倒置显微镜下观察细胞。当细胞融合至90%以上时,在超净工作台内用含有EDTA的0.05%胰酶消化传代至T25培养瓶中,并继续传代培养。第2~4代HUVEC将作为我们实验所用的细胞。

1.2.2 衰老模型的建立及细胞分组 建立H₂O₂诱导人脐静脉内皮细胞衰老模型,细胞分为空白对照组(Control)和模型组(60 μmol/L H₂O₂)^[12];当细胞生长至约70%时,加入60 μmol/L H₂O₂刺激1 h,后换成正常培养基培养24 h。通过SA-β-Gal染色、PAI-1表达鉴定模型是否成功。SA-β-Gal染色参照既往方法进行^[13],简要过程如下:用PBS轻轻清洗细胞2次,0.5%戊二醛溶液固定5 min后,每孔加入1 mL染色工作液,用锡箔纸遮盖后将细胞置于37℃下孵育18 h。孵育结束后倒置显微镜下进行计数和拍照,SA-β-Gal染色阳性率计算方法为:连续计数400个细胞,计算出蓝染细胞(即SA-β-Gal染色阳性细胞)数目/400个细胞的百分比。PAI-1蛋白表达检测方法参见Western blot部分;在探讨硫化氢改善内皮细胞早衰及其机制时分为:空白对照组(Control)、衰老模型组(60 μmol/L H₂O₂)、50 μmol/L NaHS干预组、100 μmol/L NaHS干预组和200 μmol/L NaHS干预组。

1.2.3 Western Blot 蛋白提取液预先配置好,严

格按照南京凯基生物有限公司全蛋白提取试剂盒说明书进行操作,将磷酸酶抑制(7 μL)、蛋白酶抑制剂(0.7 μL)和PMSF(3.5 μL)加入到每700 μL裂解液里。实验所需每组细胞均使用PBS清洗2次,将已经配制好的蛋白//取液按照培养孔底面积而计算出相应的量,逐个加入每组细胞培养孔底,并放置于冰面上进行10 min的裂解;到时间后,使用细胞刮逐个板孔刮下每组细胞,再用移液枪将每组细胞提取液吸至预先标记好的预冷EP管内;将装有各组细胞提取液的EP管继续放置冰上于摇床上进行15 min的混匀裂解,结束后于4℃,14 000 ×g离心15 min;进行完以上的提取操作后,应用移液枪吸取每组管内的上清液至新的分别标记的EP管,使用BCA法测定蛋白浓度,分装保存于-80℃冰箱,作为我们实验所用各组蛋白提取液备进行下一步实验。

每个泳道蛋白上样总量为20 μg,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品蛋白,电转移至偏聚二氟乙烯(PVDF)膜上;使用5%脱脂奶粉室温封闭1 h,分别加入下列一抗:PAI-1鼠抗(1:1 000)、eNOS兔抗(1:1 000)、Akt兔抗(1:1 000),以及p-Akt鼠抗(1:2 000),GAPDH(1:10 000),并放置于4℃冰箱摇床上过夜;第二天弃去一抗,用TBST(Tris 50 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, pH7.5, 含1% Tween20)清洗3次(每次5 min),然后分别加入二抗:辣根酶标记羊抗鼠IgG(1:10 000)、辣根酶标记羊抗兔IgG(1:10 000);室温孵育1 h后弃去二抗,放置于1×TBST摇床上清洗3次;使用ECL显影,蛋白条带使用Quantity One软件进行分析。

1.2.4 细胞上清液NO含量测定 严格按照南京建成生物研究所NO试剂盒说明书进行操作。简要的过程如下:收集实验中各组内皮细胞上清液作为待测样本;按照步骤加入样本0.1 mL及混合试剂0.4 mL(试剂一与试剂二1:1混匀配制),37℃水浴60 min;加入试剂三0.2 mL、试剂四0.1 mL,充分漩涡混匀30 s,室温静置40 min,离心10 min;取各组上清液0.5 mL,均加入显色剂0.6 mL混匀,室温静置10 min,波长550 nm,光径0.5 cm,测定各组吸光度值。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0分析软件,定量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;只有两组计量资料时,通过正态性检验确认正态性和方差齐性后使用独立样本t检验;多组计量资料通过正态性检验和方差齐性检验

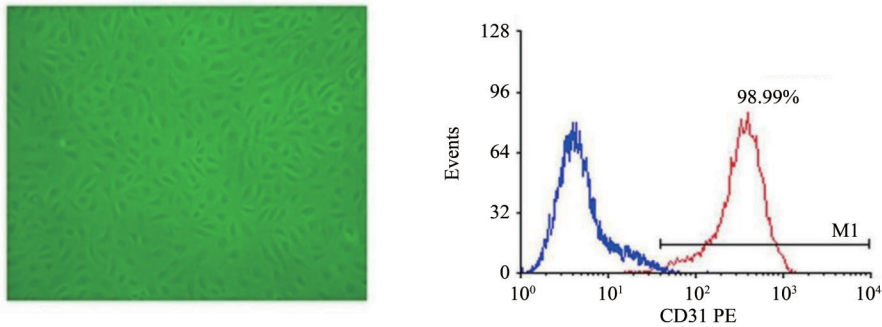
确认为正态分布且方差齐后,数据组间差异性比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),差异有统计学意义时采用LSD-*t*法进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 可认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 内皮细胞的鉴定与衰老模型的建立

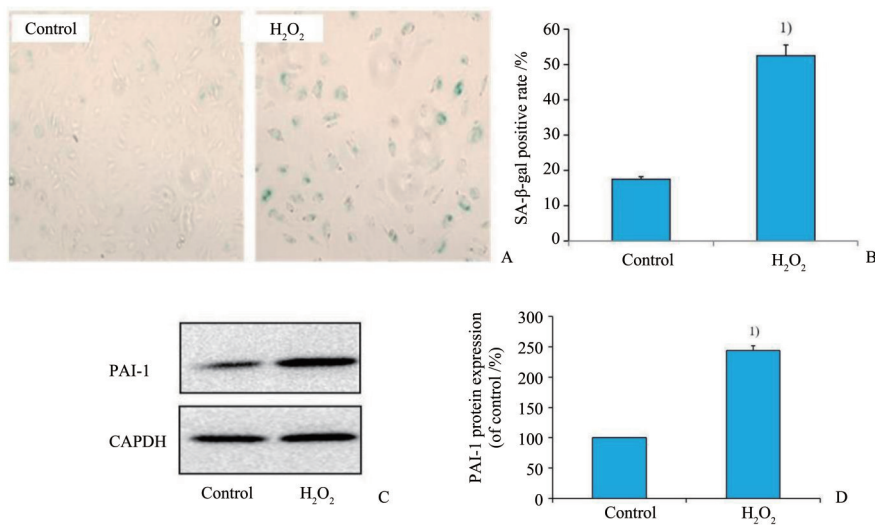
在倒置显微镜下,从脐带静脉消化下来的HUVEC初为圆形,接种24 h后,细胞完全贴壁,早期细胞呈现多角形,胞浆丰富,核清晰,核分裂相多见,细胞融合后,呈典型的铺路石样排列(图1A);48~72 h后原代细胞融合度90%左右,以1:2或者1:3传代。我院中心实验室检测细胞表面标志物CD31

的结果显示所取细胞的第一代细胞CD31表达率98.99%,符合内皮细胞特性(图1B)。按照我们既往的研究成果,选择60 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用于内皮细胞1 h可以有效诱导内皮细胞衰老而不出现明显凋亡^[14]。60 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 加入到生长至约70%的内皮细胞进行刺激,1 h后换成正常培养基再培养24 h。通过SA- β -gal衰老染色(图2A、B),发现60 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激组SA- β -gal阳性率显著增多($P < 0.001$),两组数据满足方差齐性($F = 5.374, P = 0.081$);通过Western blot实验(图2C、D),60 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激组PAI-1表达显著增加($P < 0.001$),两组数据满足方差齐性($F = 4.000, P = 0.116$);均通过*t*检验分析,与正常对照组相比,差异均具有统计学意义。



A: Normal appearance;(×40) B: Flow cytometry.

图1 人脐静脉内皮细胞的鉴定
Fig. 1 The identification of HUVEC



A, B: SA- β -gal staining of HUVEC after treatment with H_2O_2 ($\times 100$). $n = 3/\text{group}$, $t = -20.125, 1) P < 0.001$ vs. Control by *t* test. C, D: Effect of H_2O_2 pretreatment on the expression level of PAI-1 in HUVEC. $n = 3/\text{group}$, $t = -66.395, 1) P < 0.001$ vs. Control by *t* test.

图2 H_2O_2 预处理对细胞衰老的影响
Fig. 2 The effects of H_2O_2 pretreatment on cell senescence

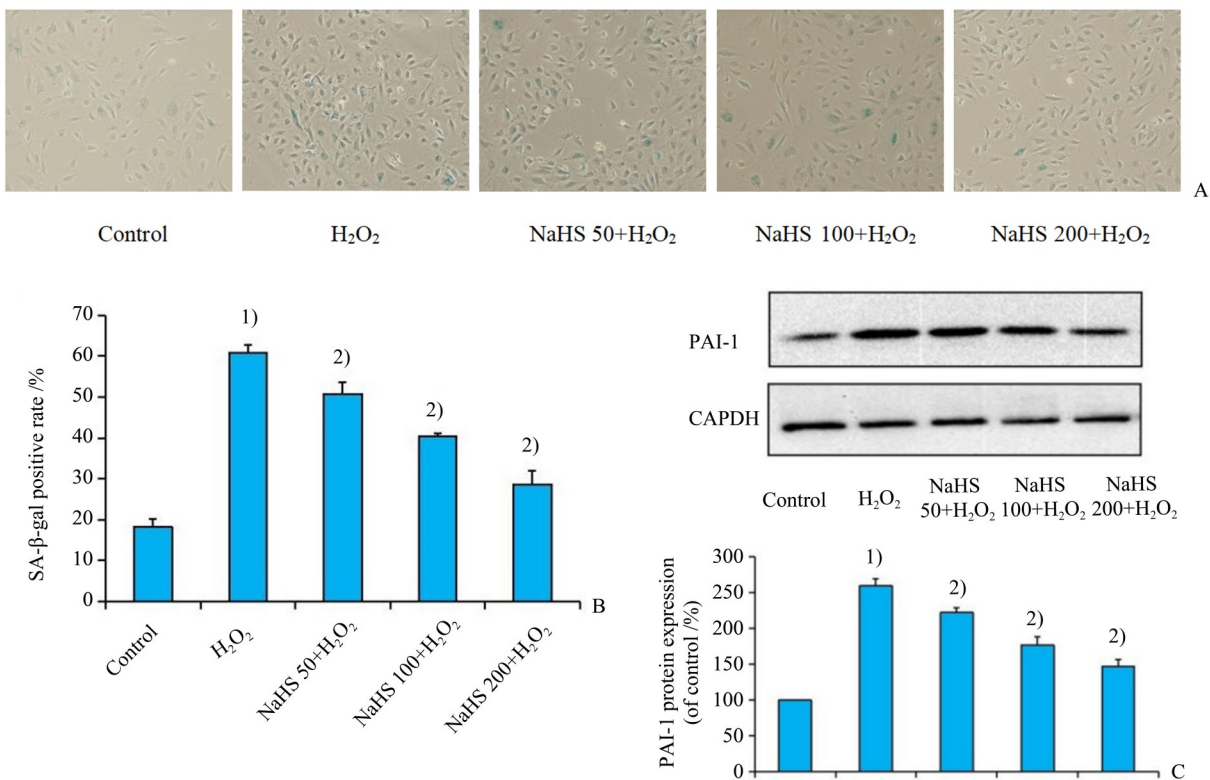
2.2 NaHS对内皮细胞衰老的影响

根据我们既往的分组、研究,用不同浓度的NaHS预处理细胞24 h后,再加入60 μmol/L H₂O₂刺激细胞1 h,并继续培养24 h后,收集组细胞固定后进行SA-β-gal染色,以及各组蛋白进行PAI-1蛋白水平的测定。从图3A、B中可以看出,与对照组相比,60 μmol/L H₂O₂诱导衰老模型组SA-β-gal阳性率明显增加($P < 0.001$),而加入50 μmol/L, 100 μmol/L及200 μmol/L NaHS预孵育24 h组细胞SA-β-gal阳性率明显低于衰老模型组($P < 0.001$),其改善程度具有浓度依赖性。同样,在图3C、D中,60 μmol/L H₂O₂诱导衰老模型组PAI-1表达增加($P < 0.001$),而加入不同浓度NaHS预孵育组能减少PAI-1蛋白水平表达($P < 0.001$),提示NaHS可改善内皮细胞的衰老,其改善程度具有浓度依赖性。

2.3 NaHS预处理对PI3K/Akt/eNOS通路的影响

首先,我们对各组细胞中的p-Akt蛋白进行检测。从图4A、B看出,与对照组相比,60 μmol/L H₂O₂诱导衰老模型组p-Akt蛋白表达增多($P < 0.01$),与衰老模型组相比,50 μmol/L, 100 μmol/L及200 μmol/L NaHS预孵育24 h组p-Akt蛋白表达进一步增多($P < 0.01$),其增加程度具有NaHS浓度依赖性;而各组Akt蛋白表达无明显差别。

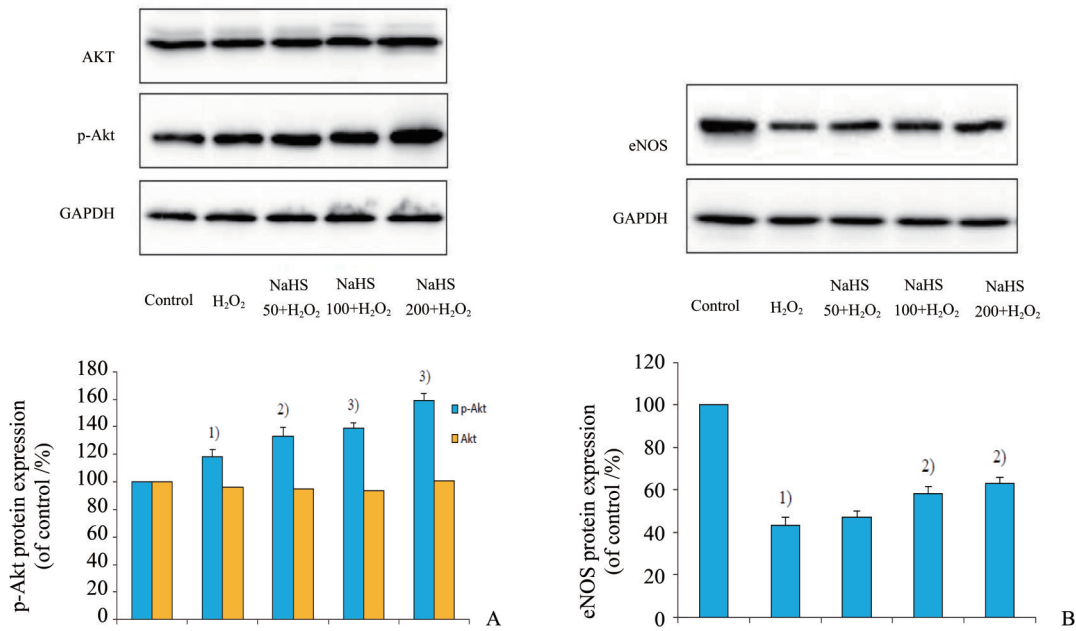
然后我们进行了各组细胞eNOS蛋白的检测。60 μmol/L H₂O₂诱导衰老模型组eNOS蛋白表达明显减少($P < 0.001$),与衰老模型组相比,100 μmol/L及200 μmol/L NaHS预孵育24 h组eNOS蛋白表达显著增加($P < 0.001$),其增加程度具有NaHS浓度依赖性(图4C、D)。提示NaHS可提高老年内皮细胞的eNOS蛋白活性,进而我们推测NaHS可能通过激活PI3K/Akt/eNOS通路来对抗衰老。



A, B: SA-β-gal staining was performed in each group; Senescent cells were stained with blue color (× 100). $n = 3/\text{group}$, $F = 156.183$, $P < 0.001$. 1) $P < 0.001$ vs. Control; 2) $P < 0.001$ vs. H₂O₂ by LSD- t test after ANOVA. C: Western blot for determining the protein levels of PAI-1. $n = 3/\text{group}$, $F = 163.457$, $P < 0.001$. 1) $P < 0.001$ vs. Control; 2) $P < 0.001$ vs. H₂O₂ by LSD- t test after ANOVA.

图3 NaHS预处理对各组细胞衰老的影响

Fig. 3 Effect of NaHS pretreatment on the senescence of HUVEC



A: The effects of NaHS on the protein expression p-Akt in HUVEC detected by Western blot. $n = 3/\text{group}$, $F = 69.547$, $P < 0.001$. 1) $P = 0.001$ vs. Control; 2) $P = 0.002$ vs. H_2O_2 ; 3) $P < 0.001$ vs. H_2O_2 by LSD- t test after ANOVA. B: The effects of NaHS on the protein expression eNOS in HUVEC detected by Western blot. $n = 3/\text{group}$, $F = 115.660$, $P < 0.001$. 1) $P < 0.001$ vs. Control; 2) $P < 0.001$ vs. H_2O_2 by LSD- t test after ANOVA.

图4 NaHS预处理对各组细胞PI3K/Akt/eNOS通路的影响

Fig. 4 Effect of NaHS pretreatment on PI3K/Akt/eNOS signaling pathway in HUVEC

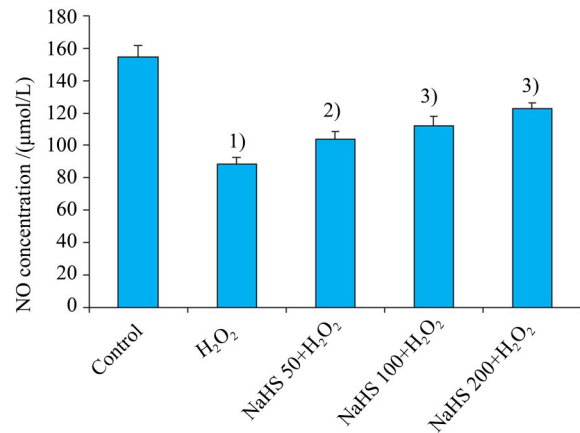
2.4 NaHS预处理对衰老内皮细胞NO含量的影响

为了更加完整的证明和阐述PI3K/Akt/eNOS信号通路可以促进内皮细胞中NO的产生从而发挥舒张血管的作用,我们对每组细胞上清液中的NO含量也进行了相关检测。与对照组相比,60 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导衰老模型组NO含量显著减少($P < 0.001$)。而加入50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$ 及200 $\mu\text{mol/L}$ NaHS预孵育24 h的3组NO含量较早衰模型组升高($P < 0.01$),并且对NO含量的影响具有浓度依赖性(图5)。

3 讨论

我们在本研究中发现, HUVEC衰老模型组中的PAI-1蛋白表达和SA- β -gal阳性细胞率均可被外源性 H_2S 减少,即外源性 H_2S 成功的延缓了HUVEC的衰老过程。NaHS的预处理可以改善 H_2O_2 诱导的HUVEC的衰老,可能是通过激活PI3K/Akt/eNOS通路来发挥其影响衰老的HUVEC的作用。

H_2S 是人体内的第3种气体信号分子,在心血管系统的功能保护中发挥了重要的作用^[14],有研究



$n = 3/\text{group}$, $F = 70.296$, $P < 0.001$. 1) $P < 0.001$ vs. Control; 2) $P = 0.004$ vs. H_2O_2 ; 3) $P < 0.001$ vs. H_2O_2 by LSD- t test after ANOVA.

图5 NaHS预处理对各组细胞内NO含量的影响

Fig. 5 Effect of NaHS pretreatment on NO concentration in HUVEC

发现,硫化氢可以延缓动脉粥样硬化斑块的形成,及减小斑块,动脉粥样硬化形成的其中一个重要原因就是体内 H_2S 水平的下降^[15]。我们课题组既往研究也证实外源性 H_2S 可以通过抗氧化应激^[12]、调控Sirt1/eNOS信号通路^[16]来改善内皮细胞衰老。

另一种气体信号分子NO主要由内eNOS在内皮细胞中产生^[17],可以减少细胞凋亡、抑制白细胞和血小板对血管壁的粘附、舒张血管等。NO可以单独或者与H₂S协同舒张血管平滑肌;血管舒张效应在单独应用H₂S的情况下很微弱,而其舒张效应在有NO存在的情况下可以增加13倍^[18]。

PI3K是一种重要的细胞脂质激酶,它通过磷酸化磷脂酰肌醇将磷脂酰肌醇-4,5二磷酸盐转化为磷脂酰肌醇-3,4,5三磷酸盐,后者作为细胞内重要的二级信使,将Akt招募到质膜上并使其发生磷酸化。Akt在PI3K/Akt信号通路中处于中心环节,可以被上游很多种信号分子激活而被磷酸化,同样,磷酸化的Akt则可进一步调节下游多种效应分子的活化、表达等状态。磷酸化激活的Akt可通过提高凋亡调控蛋白的表达来抑制细胞凋亡^[19],也可以通过抑制磷酸酶和张力蛋白同源物来减轻血管平滑肌细胞存活的抑制,从而保护心肌细胞免受伤害^[20]。eNOS同样是Akt下游重要的一种底物,可以被Akt直接磷酸化其ser177位点而被激活^[21]。磷酸化Akt调节可以通过PI3K/Akt/eNOS信号通路增强eNOS释放NO,发挥舒张血管的作用^[22],小鼠主动脉内皮细胞功能障碍也可以通过PI3K/Akt/eNOS信号通路得到缓解^[23]。目前,国内外关于H₂S

与Akt磷酸化相互关系的研究也逐渐增多,例如H₂S可以抑制Akt过度磷酸化从而延缓内皮细胞的衰老^[24-25],而在另外的研究中发现H₂S促进存活大鼠模型中的新生血管的形成和生长,依赖于血管内皮细胞中PI3K/Akt通道的激活。我们本次的研究也进一步丰富了H₂S改善内皮细胞衰老,尤其是使用H₂O₂诱导的内皮细胞早期衰老的机制。

在我们的实验研究中,衰老模型的p-Akt表达增多,说明Akt能影响衰老的进程,eNOS蛋白表达减少,NO含量减少。而与衰老模型组相比,加入不同浓度硫化氢钠预保护组p-Akt蛋白表达进一步增加,eNOS蛋白表达增加,同时,NO含量也呈现出与H₂S浓度梯度相关的增加。这样的结果,我们推测可能是通过上调PI3K/Akt路径,增加eNOS蛋白的表达,进而出现细胞NO含量的增加,从而发挥抗内皮细胞衰老的作用。本研究经过实验发现NaHS对内皮细胞衰老的改善作用可能与激活PI3K/Akt/eNOS信号通路有关,若要确定该信号通路在NaHS改善衰老中的作用,还需要进一步使用信号通路特异性抑制剂进行验证。综上所述,本次研究进一步证实了H₂S防治内皮细胞衰老的可行性,以及可能作用机制;也为内皮细胞衰老和动脉粥样硬化的临床干预都提供了新的思路和靶点。

参考文献

- [1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告2018》概要[J].中国循环杂志,2019,34(3):209-220.
Hu ST, Gao RL, Liu LS, et al. Summary of the 2018 report on cardiovascular diseases in China [J]. Chin Circ J, 2019, 34(3): 209-220.
- [2] Daiber A, Steven S, Weber A, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction [J]. Br J Pharmacol, 2017, 174(12): 1591-1619.
- [3] Solon-Biet SM, McMahon AC, Ballard JW, et al. The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice [J]. Cell Metab, 2014, 19(3): 418-430.
- [4] Friedewald VE, Giles TD, Pool JL, et al. The Editor's Roundtable: endothelial dysfunction in cardiovascular disease [J]. Am J Cardiol, 2008, 102(4): 418-423.
- [5] 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.
- [6] Zhang Y, Li H, Zhao G, et al. Hydrogen sulfide attenuates the recruitment of CD11b⁺Gr-1⁺ myeloid cells and regulates Bax/Bcl-2 signaling in myocardial ischemia injury [J]. Sci Rep, 2014, 4: 4774.
- [7] Lin J, Chen M, Liu D, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects human umbilical vein endothelial cells against high glucose-induced injury by inhibiting the necroptosis pathway [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(3): 1477-1486.
- [8] Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, et al. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide [J]. Circ Res, 2001, 89(8): 709-715.
- [9] Koide M, Ikeda K, Akakabe Y, et al. Apoptosis regulator through modulating IAP expression (ARIA) con-

- trols the PI3K/Akt pathway in endothelial and endothelial progenitor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 (23): 9472-9477.
- [10] Lin FX, Yang YY, Wei SY, et al. Hydrogen sulfide protects against high glucose-induced human umbilical vein endothelial cell injury through activating PI3K/Akt/eNOS Pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 621-633.
- [11] Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, et al. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(3): 481-485.
- [12] 牛海名, 宋志明, 彭沛, 等. 外源性硫化氢通过抗氧化应激逆转过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞衰老 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2014, 35 (3): 346-351.
- Niu HM, Song ZM, Peng P, et al. Hydrogen sulfide reverses human umbilical vein endothelial cells senescence induced by hydrogen peroxide [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2014, 35 (3): 346-351.
- [13] Song ZM, Liu Y, Hao BS, et al. Ginsenoside Rb1 prevents H₂O₂-induced HUVEC senescence by stimulating sirtuin-1 pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112699.
- [14] Liu YH, Lu M, Hu LF, et al. Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(1): 141-185.
- [15] Wang YF, Zhao X, Jin HF, 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.
- [16] 宋志明, 余舒杰, 杨建涛, 等. 硫化氢通过调节 Sirt1/eNOS 信号通路延缓人脐静脉内皮细胞衰老 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(2): 258-263.
- Song ZM, Yu SJ, Yang JT, et al. Hydrogen sulfide attenuates human umbilical vein endothelial cell senescence via modulation of Sirt1/eNOS pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2018, 34(2): 258-263.
- [17] Liu M, Xiang G, Lu JY, et al. TRAIL protects against endothelium injury in diabetes via Akt-eNOS signaling [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 237 (2): 718-724.
- [18] Kubo S, Doe I, Kurokawa Y, et al. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension [J]. *Toxicology*, 2007, 232(1-2): 138-146.
- [19] Nakano N, Matsuda S, Ichimura M, et al. PI3K/Akt signaling mediated by G protein-coupled receptors is involved in neurodegenerative Parkinson's disease (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39 (2): 253-260.
- [20] Wang S, Cheng ZY, Chen XJ. Promotion of PTEN on apoptosis through PI3K/Akt signal in vascular smooth muscle cells of mice model of coronary heart disease [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14636-14644.
- [21] Martinez-Abundis E, Garcia N, Correa F, et al. Effects of alpha-mangostin on mitochondrial energetic metabolism [J]. *Mitochondrion*, 2010, 10 (2): 151-157.
- [22] Lin XP, Cui HJ, Yang AL, et al. Astragaloside IV improves vasodilatation function by regulating the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway in rat aorta endothelial cells [J]. *J Vasc Res*, 2018, 55(3): 169-176.
- [23] Chen L, Qin LJ, Liu X, et al. CTRP3 alleviates Ox-LDL-induced inflammatory response and endothelial dysfunction in mouse aortic endothelial cells by activating the PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *Inflammation*, 2019, 42(4): 1350-1359.
- [24] 宋志明, 余舒杰, 焦洁, 等. 硫化氢通过抑制蛋白激酶B过度磷酸化延缓内皮细胞衰老 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(4): 652-656.
- Song ZM, Yu SJ, Jiao J, et al. Hydrogen sulfide attenuates human umbilical vein endothelial cell senescence via inhibiting over-phosphorylation of protein kinase B [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2020, 36 (4): 652-656.
- [25] 旷文华, 楼小亮. 同型半胱氨酸、胱硫醚β合酶与卒中 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2013, 39(1): 63-65.
- Kuang WH, Lou XL. Homocysteine and cystathionine β Synthases and stroke [J]. *Chin J Nerv Ment Dis*, 2013, 39(1): 63-65.

(编辑 孙慧兰)