

硫化氢通过CaMKK β -AMPK信号通路延缓大鼠主动脉内皮细胞老化

李 岩¹ 李洪民¹ 刘 磊¹ 乔伟丽¹ 崔 洁¹ 张 琳² 闫长栋^{1*}

(¹徐州医科大学生理学系, 徐州 221004; ²徐州医科大学病理学系, 徐州 221004)

摘要 该研究探讨了硫化氢(H₂S)延缓大鼠主动脉内皮细胞(rat aortic endothelial cells, RAECs)老化的机制。原代RAECs传代培养至第4代为年轻组, 传代至第12代为老年组。从第4代起, 给予H₂S的供体NaHS培养至第12代为NaHS组; 从第4代起培养至第12代, 在提取处理细胞前6 h加入CaMKK β (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β)特异性抑制剂STO-609共培养, 即STO-609组; 从第4代起, 给予H₂S的供体NaHS培养至第12代, 在提取处理细胞前6 h加入STO-609共培养, 即NaHS+STO-609组。采用SA- β -gal(senescence-associated β -galactosidase)染色法和DAPI荧光染色法检测细胞的老化程度和老化相关异染色质(senescence-associated heterochromatin foci, SAHF)的表达变化。通过化学比色法检测RAECs的NO(nitric oxide)含量。应用Western blot方法检测细胞CaMKK β 、AMPK(AMP-activated protein kinase)和p-AMPK蛋白的表达。结果显示, 与年轻组相比, 老年组细胞老化程度明显增加, 细胞中SA- β -gal阳性率和SAHF形成率显著增加($P<0.01$), NO含量明显下降($P<0.01$)。与老年组相比, NaHS处理组的SA- β -gal阳性率和SAHF形成率明显下降, 同时NO含量上升($P<0.01$)。与年轻组相比, 老年组CaMKK β 、AMPK和p-AMPK蛋白质水平明显降低($P<0.01$), 而给予NaHS处理后, CaMKK β 、AMPK和p-AMPK增加($P<0.05$)。给予STO-609阻断CaMKK β 信号通路, 能够降低或消除NaHS的细胞保护作用($P<0.01$)。结果表明, 外源性H₂S通过影响CaMKK β -AMPK信号通路减轻RAECs的衰老过程, 延缓了细胞老化的进程。

关键词 硫化氢; 大鼠主动脉内皮细胞; 老化; CaMKK β ; AMPK

The Exogenous H₂S Delays the Rat Aortic Endothelial Cells Senescence via CaMKK β -AMPK Signaling Pathway

Li Yan¹, Li Hongmin¹, Liu Lei¹, Qiao Weili¹, Cui Jie¹, Zhang Lin², Yan Changdong^{1*}

(¹Department of Physiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China;

²Department of Pathology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China)

Abstract To investigate the effect of the exogenous H₂S on RAECs (rat aortic endothelial cells) senescence and the underlying mechanisms, RAECs were cultured at fourth and twelfth passages as young and

收稿日期: 2016-02-20 接受日期: 2016-03-24

江苏省自然科学基金(批准号: BK20131119)、国家自然科学基金(批准号: 81200250)和江苏省研究生创新计划项目(批准号: KYLX14-1444)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0516-83262619, E-mail: yancd55@163.com

Received: February 20, 2016 Accepted: March 24, 2016

This work was supported by the National Science Found of Jiangsu Province (Grant No.BK20131119), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81200250) and Graduate Innovation Program of Jiangsu Province (Grant No.KYLX14-1444)

*Coresponding author. Tel: +86-516-83262619, E-mail: yancd55@163.com

网络出版时间: 2016-05-26 16:14:31 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160526.1614.006.html>

old groups, respectively. Cultured RAECs from the fourth to twelfth passage with NaHS (a H₂S donor) was taken as NaHS group. STO-609 [a specific inhibitor of CaMKK β (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β)] added into the old group and NaHS group for 6 h before extracting the protein from the two groups as STO-609 and NaHS+STO-609 groups, respectively. The status of senescence of RAECs was measured by SA- β -gal (senescence-associated β -galactosidase) staining, and SAHF (senescence-associated heterochromatin foci) formation was detected by DAPI fluorescent dying. Colorimetric methods were used to evaluate NO content of RAECs. The protein levels of CaMKK β and AMPK (AMP-activated protein kinase) and p-AMPK (phosphorylation AMP-activated protein kinase) were analyzed by Western blot in RAECs. The results showed that the levels of SA- β -gal positive cell numbers and SAHF formation rates in NaHS group were both lower than those in old group ($P<0.01$), but higher than those in young group ($P<0.01$), and the levels of NO were elevated in NaHS group compared to the old group ($P<0.01$), but lower than that in young group ($P<0.01$). STO-609 inhibited the effects of NaHS on the RAECs. Moreover, the protein levels of CaMKK β , AMPK and p-AMPK in NaHS group were increased compared to the old group, but lower than that in young group ($P<0.05$), and STO-609 reversed the protective effects of NaHS on RAECs. These results indicate that H₂S delays senescence of RAECs via CaMKK β and AMPK signaling pathway.

Keywords hydrogen sulfide; rat aortic endothelial cells; senescence; CaMKK β ; AMPK

衰老引起的血管结构和功能发生退行性变化是心血管疾病的病理基础, 血管内皮细胞出现的功能障碍是心血管疾病发生的始动环节^[1]。血管内皮细胞是血管内表面的一层薄细胞, 构成管腔内血液与血管壁之间的界面, 通过合成和释放一氧化氮(nitric oxide, NO)与其他活性调节因子(如内皮源性极化因子和一氧化碳等)发挥血管屏障保护作用^[2]。血管内皮细胞合成和释放的NO减少是造成内皮细胞功能紊乱的主要原因^[3]。因此, 设法维持血管内皮细胞的完整性对于血管结构和功能的稳定具有至关重要的作用。如何防止和减少由血管内皮细胞功能障碍引发的心血管疾病的发生对于维护老年人的身体健康具有重要意义。

硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是参与机体生理功能调节的一种重要的气体信号分子, 在心血管系统中, H₂S参与舒张血管、调节血压、保护线粒体功能、对抗氧化应激、抑制平滑肌细胞增殖和抑制心肌细胞凋亡等生理过程^[4]。据文献报道, H₂S在心血管系统中可以减少平滑肌细胞中的环腺苷酸、增加内皮细胞NO的合成与生物利用度^[5]。另有文献报道, H₂S在细胞中可以与S-亚硝基硫醇反应生成HSNO(thionitrous acid), HSNO可以作为反应底物生成NO^[6]。NO通过调节血管收缩与舒张、抗血小板

聚集、减轻心肌细胞缺血/再灌注损伤等发挥保护作用^[7], 因此, 增加内皮细胞NO的合成与释放对心血管系统功能的正常发挥具有重要意义。

腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是一种重要的蛋白激酶, 在机体内发挥着多种调控作用。有文献报道, AMPK是一种能量平衡调控因子, 其过程涉及脂肪酸氧化、葡萄糖转运、抗氧化机制和炎症过程的调节, 因其能量平衡调节的功能, AMPK所在信号通路中, 若其中一个环节出现功能紊乱, 则该环节可能成为致病因素, 所以AMPK成为治疗代谢类疾病的潜在靶点备受关注^[8]。在AMPK参与调节内皮细胞NO的合成和释放的过程中, 增加小鼠主动脉AMPK的磷酸化水平可以明显增加内皮细胞NO的合成^[9], 从而对心血管系统的功能起到保护作用。研究发现, AMPK通过调节p53、NF- κ B、沉默信息调节因子T1(silent information regulator T1, SirT1)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)等下游信号分子影响机体的老化进程^[10]。其中, SirT1在机体衰老过程中的作用备受关注, SirT1是一种NAD⁺依赖的去乙酰化酶, 与血管内皮细胞功能的发挥关系密切。SirT1可以增加内皮细胞NO的生成进而促进血管内皮依赖性舒张反应, 起到抗血管老化

作用^[11]。我们在前期的研究中发现,给予外源性H₂S处理可以明显延缓培养的人脐静脉内皮细胞的老化进程,其作用机制主要是通过上调SirT1的表达,增加内皮细胞NO的合成和释放,抑制老化进程中的氧化应激对内皮细胞的损伤作用,延缓了内皮细胞的老化进程^[12]。然而,促进SirT1表达的上游信号通路在H₂S保护内皮细胞中的作用如何,值得进一步研究。

CaMKK β (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β)参与调控许多重要生理病理过程,如能量平衡、肥胖、糖稳态、造血功能、免疫功能和癌症^[13]。有研究表明, CaMKK β 通过调控其下游信号分子AMPK的活性发挥作用^[14]。Xie等^[15]发现, H₂S可以通过激活AMPK来对抗心肌细胞的缺血/再灌注损伤。AMPK作为重要的能量平衡调控因子,同时受H₂S影响。在血管老化的进程中, H₂S可能通过CaMKK β 调控AMPK的活性来维持内皮细胞中的氧化应激状态的平衡,从而延缓或逆转血管老化的进程和发展。本实验通过培养的主动脉内皮细胞,观察外源性H₂S对内皮细胞老化的影响,探讨CaMKK β -AMPK信号通路在H₂S延缓内皮细胞老化中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

RAECs(rat aortic endothelial cells)购自北京北纳创联生物技术研究院。1640低糖干粉培养基、胎牛血清、购自Gibco公司。分析纯NaHS、胰蛋白酶(0.25% Trypsin-EDTA)购自Sigma公司。细胞衰老 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal)染色试剂盒、DAPI(4,6-diamino-2-phenylindole)荧光染色染液试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。一氧化氮(nitric monoxide, NO)测试盒购自南京建成生物工程研究所。山羊源抗体CaMKK β 、STO-609购自Santa Cruz公司。兔源抗体AMPK、p-AMPK、GAPDH和发光液Biodlight™ Western购自Bioworld公司。BCA蛋白定量检测试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司。RIPA裂解液、SDS-PAGE凝胶配置试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 内皮细胞培养方法和实验分组

从液氮中取RAECs解冻复苏后,在超净工作台中进行无菌操作,将其移入细胞培养瓶中,加入含10%胎牛血清的1640培养基,将培养瓶置于37 °C、5% CO₂培养箱中静置培养。待细胞生长融合密度达到一定程度后,弃去瓶中培养基,加入适量的0.25%胰蛋白酶消化、吹打,使细胞均匀分散开,再加入含10%胎牛血清的1640培养基制成细胞悬液。将细胞密度调整为1 $\times$ 10⁶/mL,接种于细胞培养瓶中,再置于37 °C、5% CO₂培养箱中继续静置培养。取处于对数生长期的细胞进行实验。实验分为,(1)年轻组(Young group):将原代RAECs培养至第4代即为年轻组;(2)老年组(Old group):年轻组传代至第12代即为老年组;(3)NaHS组(NaHS group):从第4代开始,在培养基中加入NaHS(使其在培养基中浓度为10 μ mol/L),培养至第12代;(4)STO-609组(STO-609 group):传代至第12代的细胞在使用之前6 h加入STO-609,使其在培养基中的浓度为0.1 μ g/mL(DMSO在培养基中浓度为0.01%);(5)NaHS+STO-609组(NaHS+STO-609 group):加入NaHS培养并传代至第12代的细胞在使用之前6 h加入STO-609,使其在培养基中的浓度为0.1 μ g/mL(DMSO在培养基中浓度为0.01%);(6)DMSO组(DMSO group):传代至第12代的细胞在使用之前6 h加入DMSO,使其在培养基中的浓度为0.01%。培养瓶中的培养基每隔48 h需更换1次。

1.3 SA- β -gal染色法检测细胞老化程度

将各组细胞培养于24孔板中,传代培养至满足使用条件,用PBS(pH7.2)洗单层细胞1次,之后用0.5%戊二醛溶液固定5 min,然后用PBS(pH7.2,内含1 mmol/L MgCl₂)洗1次,最后用新配的X-gal染液(1 g/L X-gal溶于PBS,另内含0.12 mmol/L K₃Fe[CN]₆、0.12 mmol/L K₄Fe[CN]₆、1 mmol/L MgCl₂, pH6.0)于37 °C环境中染色12~16 h。在Olympus BX51光学显微镜下观察,胞质呈蓝绿色者为阳性细胞,表示细胞处于衰老状态。SA- β -gal染色阳性率的计算方法为:在400倍镜下每孔中随机选取10个视野,计算阳性细胞数占总细胞数的百分比。

1.4 DAPI荧光染色法检测细胞老化相关异染色质位点(SAHF)的形成

将各组细胞培养于24孔板中,传代培养至满

足使用条件,用PBS轻洗2次,之后4%多聚甲醛(溶于PBS, pH7.4),室温固定15 min,再用PBS轻洗2次,加入10 $\mu\text{g/mL}$ DAPI(4,6-二氨基-2-苯基吡啶, 荧光性DNA结合染料, 使用含0.2% Triton的PBS溶解配制而成),于37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中孵育30 min。在Olympus BX51荧光显微镜下,用400 nm激发光、455 nm发射光观察。细胞SAHF的计算方法为:400倍镜下每孔中随机选取10个视野,计算出SAHF细胞总数占总细胞数的百分率。

1.5 化学比色法检测内皮细胞NO含量

NO本身半衰期极短,遇氧和水会生成硝酸盐和亚硝酸盐,后两者遇硝酸盐显色剂会生成淡红色偶氮化合物,通过与标准品比色可间接测得NO浓度。按照NO测试试剂盒说明书描述步骤检测细胞培养基中的NO含量,在550 nm用可见分光光度计测其吸光度值,利用比色法计算出相应的NO含量。

1.6 Western blot方法检测CaMKK β 、AMPK和p-AMPK蛋白表达

各组细胞用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液裂解细胞后提取细胞的总蛋白,然后BCA法测定蛋白浓度。取等量蛋白质样品经10% SDS-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)分离后,以湿转法电转至PVDF膜上,转移后的PVDF膜经含1%血清的TBST封闭2 h,然后加入一抗室温摇床孵育4 h或4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。一抗孵育时间充足后,TBST洗膜3次,加入到相应的二抗

中,室温孵育2 h。二抗孵育时间充足后,TBST洗膜后进入暗室用发光液BiodlightTM Western进行曝光。胶片用扫描机扫描后,用PhotoShop对Western blot结果进行分析,计算出各组的灰度值后,以目的蛋白与相应的GAPDH的灰度比值表示目的蛋白的相对含量。

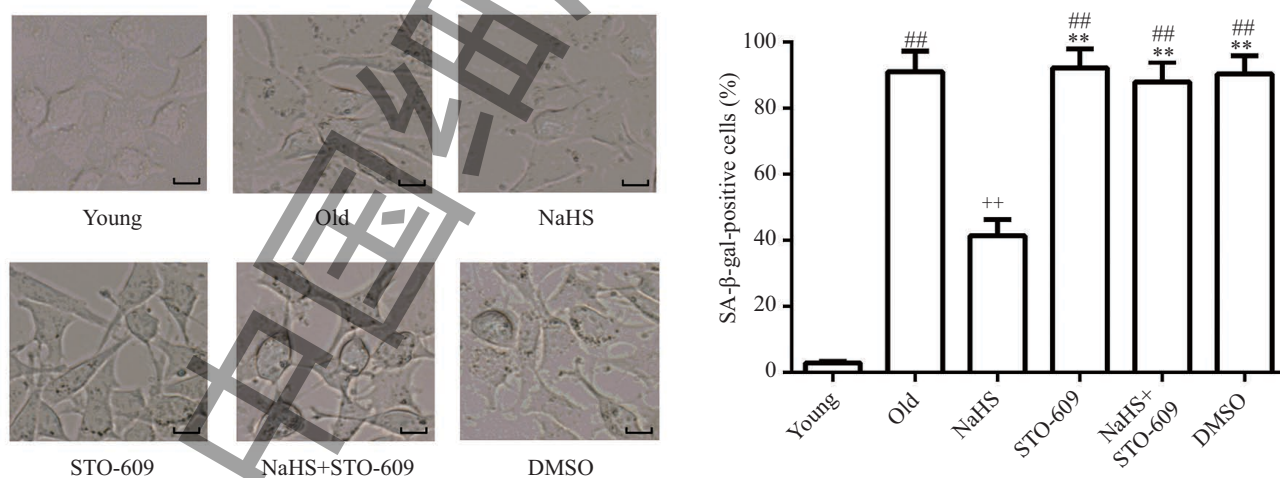
1.7 统计分析

用GraphPad Prism 5统计软件进行数据分析,计量资料以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 表示,多组之间比较采用方差分析,随后两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NaHS对大鼠主动脉内皮细胞老化的影响

结果显示,与年轻组相比,老年组内皮细胞的SA- β -gal阳性率明显增加($P < 0.01$),给予外源性H₂S供体NaHS处理后,与单纯老年组相比,NaHS处理能够显著减少内皮细胞的SA- β -gal阳性率($P < 0.01$);给予CaMKK β 阻断剂STO-609后,与NaHS组相比,NaHS+STO-609组内皮细胞的SA- β -gal阳性率明显升高($P < 0.01$)。而老年组、STO-609组、NaHS+STO-609组和DMSO组间SA- β -gal阳性率比较,其差异没有统计学意义。结果表明,NaHS处理能够延缓RAECs的老化,STO-609阻断CaMKK β 信号通路能够减弱NaHS的细胞保护作用(图1)。

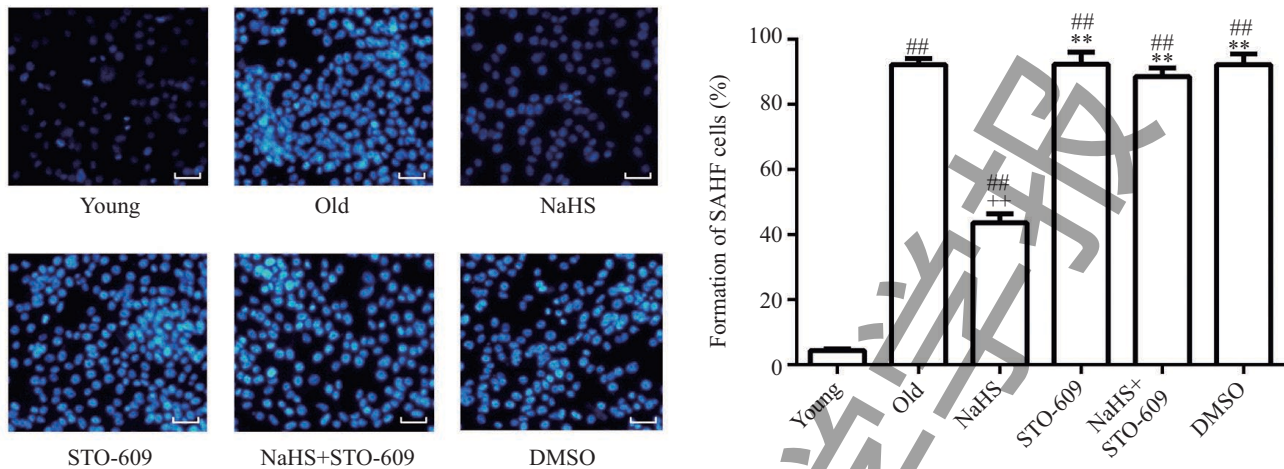


各组SA- β -gal的阳性率。 $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, 与年轻组比较; $^{++}P < 0.01$, 与老年组比较; $^{**}P < 0.01$, 与NaHS组比较。标尺=50 μm 。

The positive rates of SA- β -gal in each group. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ vs Young group; $^{++}P < 0.01$ vs Old group; $^{**}P < 0.01$ vs NaHS group. Scale bars=50 μm .

图1 NaHS对大鼠主动脉内皮细胞老化的影响

Fig.1 Effect of NaHS on the senescence of rats aortic endothelial cells



各组SAHF的表达。^{##} $P<0.01$,与年轻组比较; ⁺⁺ $P<0.01$,与老年组比较; ^{**} $P<0.01$,与NaHS组比较。标尺=50 μm 。

The expression levels of SAHF in each group. ^{##} $P<0.01$ vs Young group; ⁺⁺ $P<0.01$ vs Old group; ^{**} $P<0.01$ vs NaHS group. Scale bars=50 μm .

图2 NaHS对大鼠主动脉内皮细胞老化相关异染色质位点(SAHF)形成的影响

Fig.2 Effect of NaHS on the senescence associated heterochromatin foci (SAHF) formation in rats aortic endothelial cells

2.2 NaHS对内皮细胞老化相关异染色质位点(SAHF)的影响

DAPI能够与双链DNA的A-T碱基结合,细胞衰老时,核异染色质表达相应增加。实验结果显示,与年轻组相比,老年组SAHF表达明显增加($P<0.01$)。与单纯老年组相比,NaHS处理能够显著减少内皮细胞SAHF的表达($P<0.01$)。STO-609阻断CaMKK β 后,内皮细胞SAHF的表达明显升高($P<0.01$)。而老年组、STO-609组、NaHS+STO-609组和DMSO组间SAHF的形成比较,其差异没有统计学意义。结果表明,NaHS处理能够延缓RAECs老化相关异染色质位点的形成,STO-609阻断CaMKK β 信号分子能够使

NaHS的细胞保护作用减弱(图2)。

2.3 NaHS对大鼠主动脉内皮细胞NO含量的影响

结果显示,与年轻组相比,老年组内皮细胞NO含量明显减少($P<0.01$)。与老年组相比,NaHS处理能够增加内皮细胞NO的含量($P<0.01$),给予CaMKK β 阻断剂STO-609能够减少内皮细胞NO的产生($P<0.01$)。而老年组、STO-609组、NaHS+STO-609组和DMSO组间NO含量比较,其差异没有统计学意义。结果表明,NaHS处理通过增加内皮细胞NO的产生量延缓内皮细胞的老化进程,阻断CaMKK β 信号通路能够减弱H₂S的抗细胞老化作用(表1)。

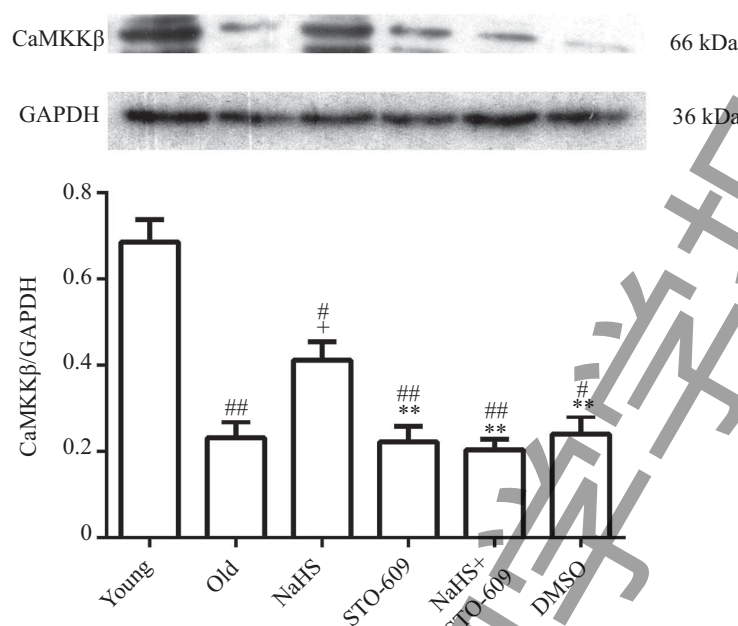
表1 NaHS对大鼠主动脉内皮细胞NO含量的影响

Table 1 Effect of NaHS on the contents of NO in rats aortic endothelial cells

组别 Group	NO浓度($\mu\text{mol/L}$) NO concentration ($\mu\text{mol/L}$)
Young	3.405 $\pm$ 0.820
Old	0.752 $\pm$ 0.464 ^{##}
NaHS	3.465 $\pm$ 0.828 ⁺⁺
STO-609	0.819 $\pm$ 0.546 ^{###}
NaHS+STO-609	1.074 $\pm$ 0.498 ^{###}
DMSO	1.279 $\pm$ 0.788 ^{###}

数据用均数 $\pm$ 标准差表示, $n=6$ (进行6次平行试验)。^{##} $P<0.01$,与年轻组相比; ⁺⁺ $P<0.01$,与老年组相比; ^{###} $P<0.01$,与NaHS组相比。

Data are shown as mean $\pm$ S.D., $n=6$ (six parallel experiment was carried out). ^{##} $P<0.01$ vs Young group; ⁺⁺ $P<0.01$ vs Old group; ^{###} $P<0.01$ vs NaHS group.



数据用均数 $\pm$ 标准差表示, $n=3$ 。# $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与年轻组相比; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与老年组相比; ** $P<0.01$, 与NaHS组相比。

Data are shown as mean $\pm$ S.D., $n=3$. # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs Young group; * $P<0.05$ vs Old group; ** $P<0.01$ vs NaHS group.

图3 NaHS处理对大鼠主动脉内皮细胞CaMKK β 蛋白质水平的影响

Fig.3 Effect of NaHS on the protein levels of CaMKK β in rats aortic endothelial cells

2.4 NaHS对大鼠主动脉内皮细胞的CaMKK β 蛋白质水平的影响

Western blot结果显示, 与年轻组相比, 老年组CaMKK β 表达减少($P<0.01$), NaHS处理能够增加内皮细胞CaMKK β 的表达($P<0.05$), STO-609阻断CaMKK β 后, CaMKK β 蛋白质相当含量显著减少($P<0.01$)。老年组、STO-609组和NaHS+STO-609组间CaMKK β 蛋白质水平比较, 其差异没有统计学意义。结果表明, NaHS预处理通过上调CaMKK β 蛋白质水平从而延缓内皮细胞的老化(图3)。

2.5 NaHS增加大鼠主动脉内皮细胞的AMPK蛋白质水平

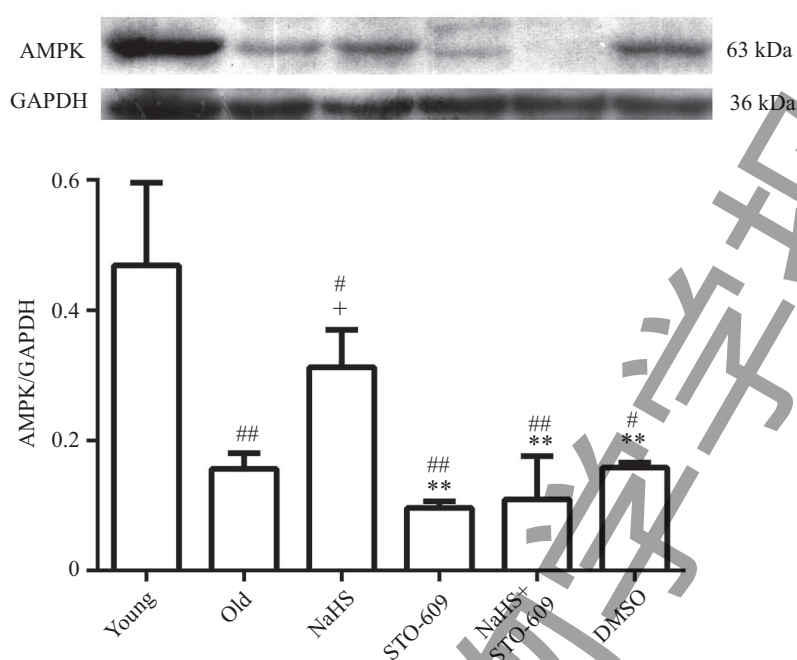
Western blot结果显示, 与年轻组相比, 老年组AMPK蛋白质水平明显减少($P<0.01$), NaHS处理组的AMPK表达比老年组明显增加($P<0.05$), STO-609阻断CaMKK β 后, AMPK的蛋白质水平显著减少($P<0.01$)。而老年组、STO-609组、NaHS+STO-609组和DMSO组间AMPK蛋白质水平比较, 其差异没有统计学意义。结果表明, NaHS处理通过上调AMPK蛋白质水平延缓内皮细胞的老化(图4)。

2.6 NaHS增加大鼠主动脉内皮细胞的p-AMPK蛋白质水平

Western blot结果显示, 老年组p-AMPK蛋白质水平比年轻组明显减少($P<0.01$), NaHS处理组的p-AMPK蛋白质水平比老年组明显增加($P<0.01$), STO-609阻断CaMKK β 后, p-AMPK蛋白质水平显著减少($P<0.01$)。而老年组、STO-609组、NaHS+STO-609组和DMSO组间p-AMPK蛋白质水平比较, 其差异没有统计学意义。结果表明, NaHS处理通过增加p-AMPK蛋白质水平延缓内皮细胞的老化进程(图5)。

3 讨论

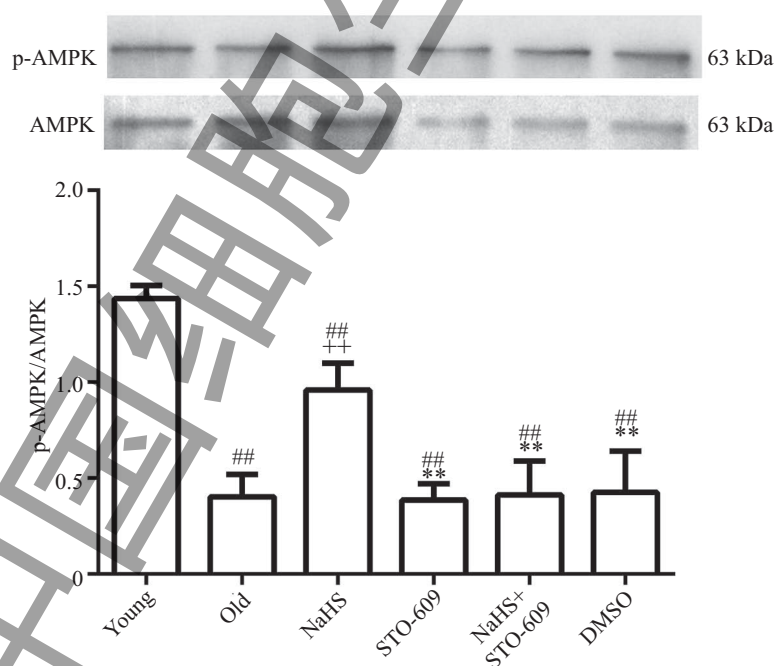
本研究结果显示, 外源性H₂S能够延缓RAECs的老化进程。H₂S能使表达SA- β -gal细胞的阳性率明显降低, 同时H₂S明显减少老化相关SHAF的生成, 增加内皮细胞NO的含量。我们在前期的研究中发现, H₂S是通过上调SirT1的表达对抗氧化应激作用, 从而达到延缓内皮细胞的老化作用。本文进一步发现, H₂S上调SirT1的表达可能是通过改变CaMKK β -AMPK信号通路机制从而实现其延缓大鼠主动脉内



数据用均数±标准差表示, $n=3$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与年轻组相比; + $P<0.05$, 与老年组相比; ** $P<0.01$, 与NaHS组相比。
Data are shown as mean±S.D., $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Young group; + $P<0.05$ vs Old group; ** $P<0.01$ vs NaHS group.

图4 NaHS处理对大鼠主动脉内皮细胞AMPK蛋白质水平的影响

Fig.4 Effect of NaHS on the protein levels of AMPK in rats aortic endothelial cells



数据用均数±标准差表示, $n=3$ 。## $P<0.01$, 与年轻组相比; + $P<0.01$, 与老年组相比; ** $P<0.01$, 与NaHS组相比。
Data are shown as mean±S.D., $n=3$. ## $P<0.01$ vs Young group; + $P<0.01$ vs Old group; ** $P<0.01$ vs NaHS group.

图5 NaHS处理对大鼠主动脉内皮细胞p-AMPK蛋白质水平的影响

Fig.5 Effect of NaHS on the protein levels of p-AMPK in rats aortic endothelial cells

皮细胞老化作用的。

随着年龄的增长, 人的机体不断衰老, 因机体老化引起的疾病所造成的威胁会愈发凸现出来, 其中威胁老年人身体健康的心血管疾病是最危险的因素之一。由于其发病率和死亡率较高, 无时无刻不在威胁着老年人的健康^[16]。研究表明, 心血管疾病的主要病理学表现是血管内皮细胞功能紊乱, 一方面造成血管舒张反应降低、血管管径变小、管壁顺应性降低而张力增加; 另一方面影响内皮细胞血管活性物质的释放, 造成内皮细胞NO的产生减少, 由于血管活性物质释放的减少反过来影响血管功能的发挥, 进一步形成恶性循环, 导致血管结构和功能障碍的发生, 加速了机体衰老的进程^[17]。由此可见, 血管内皮细胞的结构和功能稳定对于维持心血管系统的稳态具有重要作用。Scherner等^[18]发现, 在高脂、高胆固醇饮食的小鼠动脉粥样硬化模型中, 内皮细胞功能的缺失会加快动脉粥样硬化的形成。在保护血管内皮细胞功能完整性方面, 内皮细胞释放的NO作用主要体现在两方面, 一是舒缓血管内皮, 减少血管内皮细胞功能紊乱; 二是减轻因内皮细胞老化引起的氧化应激反应^[19]。因此, 血管内皮细胞NO合成减少是造成血管内皮细胞功能紊乱的主要因素之一。我们在实验中观察到, 老年组的NO含量明显低于年轻组, 由此提示我们, 在老年组主动脉内皮细胞中, 随着细胞老化程度的增加, 内皮细胞的功能发生障碍, NO的合成和释放大幅减少。我们在前期的在体实验中也已证明, 老年大鼠动脉内皮细胞的NO产生减少^[20]。因此, 内皮细胞NO合成量的多寡可以作为衡量内皮细胞老化程度的重要指标。内皮细胞老化时的主要特征表现是SA- β -gal阳性细胞的出现、老化相关的异染色质(SAHF)的形成、细胞周期调节因子的表达、端粒的缩短以及端粒酶活性的降低^[21-22]。在形态学上, 老年组细胞SA- β -gal阳性率明显高于年轻组, 老年组SAHF生成明显多于年轻组, 结果提示, 由内皮细胞发生的功能障碍影响了内皮细胞的结构完整性, 老化加速了细胞衰老的进程。因此, 设法促进血管内皮细胞活性物质的释放将能够减缓内皮细胞的衰老, 进而减轻内皮细胞的功能障碍, 将会减少由内皮细胞功能障碍引发的心血管疾病的发生和发展。

H₂S作为近年来新发现的气体信号分子, 在延缓细胞老化进程和防治心血管疾病方面已经成为基础医学和临床医学研究的热点。在神经系统中, 生理浓度的H₂S具有保护神经元的作用, 外源性H₂S能够抑制在阿尔兹海默病发病中起到关键作用的淀粉样蛋白沉淀。在呼吸系统中, 给予外源性H₂S处理能够使肺动脉压降低, 减轻肺血管的重塑。在消化系统中, 给予外源性H₂S处理可以有效减轻大鼠胃黏膜缺血/再灌注引起的损伤, 减少胃黏膜损伤面积和损伤深度^[23]。在心血管系统中, H₂S具有舒张血管、调节血压、抑制平滑肌细胞增殖、抑制心肌细胞凋亡和对抗氧化应激等功能。由此可见, H₂S在人体器官和组织正常生理功能的发挥中起到保护作用。我们前期的研究证实, 采用10 μ mol/L的NaHS对细胞进行处理, 结果显示, H₂S能够有效延缓大鼠主动脉内皮细胞的老化进程, 起到良好的细胞保护作用。我们进一步的研究发现, H₂S一方面通过上调SirT1信号通路实现其细胞保护作用, 另一方面通过增加内皮细胞NO的合成, 增强内皮细胞的功能来延缓细胞的老化进程^[12]。这提示我们, H₂S的抗老化作用与其激活内皮细胞SirT1信号通路有关, 那么, H₂S是如何调控SirT1信号通路、影响内皮细胞结构和功能的完整性, 进而延缓内皮细胞老化的进程, 尚无定论。

CaMKK β 涉及多种病理生理学进程, 如能量代谢、糖和脂肪代谢及癌症的发生等均与其有关联^[24]。目前, CaMKK β 的激活机制尚不明确, 但其表达受Ca²⁺浓度的影响^[25-26]。有研究表明, H₂S能够调节细胞内Ca²⁺浓度^[27], 这提示H₂S可能是通过调节Ca²⁺浓度来实现对CaMKK β 表达的调控。此外, CaMKK β 的表达具有细胞特异性, 在中枢神经系统中大量表达^[28], 由于在心血管系统中的作用尚不明确, 对此展开研究具有非常重要的意义。有研究发现, 用线粒体靶向的七叶树原可以通过AMPK介导eNOS磷酸化使人主动脉内皮细胞的NO生成量增加, 从而有效防止由过氧化氢和血管紧张素II引起的内皮细胞死亡^[29], 提示AMPK在心血管系统的保护中起到重要作用。Green等^[30]发现, AMPK是CaMKK β 的下游信号分子, 在HEK 293a细胞中, 用RNA干扰细胞内CaMKK β 的表达可完全阻断AMPK的激活。本研究发现, 用STO-609阻断CaMKK β 信号通路, NaHS处

理引起的细胞保护作用明显减弱, 内皮细胞衰老加速。如前所述, H_2S 可以通过上调AMPK的下游信号分子SirT1来增加NO合成, 进而延缓细胞衰老。同时, Shang等^[31]在研究二甲双胍和替米沙坦对心血管的保护作用时发现, AMPK的磷酸化可以增加SirT1的表达。因此, 我们认为, H_2S 很可能是通过调节 Ca^{2+} 浓度引起CaMKK β -AMPK信号通路蛋白质水平变化, 增加AMPK磷酸化水平, 从而影响内皮细胞活性物质的合成与释放, 减少老化引起的内皮细胞的功能障碍, 延缓了内皮细胞的老化进程。但 H_2S 如何调控CaMKK β 的确切分子机制还有待研究证实。

综上所述, 外源性 H_2S 处理能够延缓大鼠主动脉内皮细胞老化的进程, 其机制是通过调节细胞内CaMKK β 表达, 进而上调AMPK的表达, 增加AMPK的磷酸化, 促进内皮细胞NO的释放, 改善了内皮细胞的结构和功能, 延缓了内皮细胞的老化进程。

参考文献 (References)

- Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino acids* 2004; 26(3): 243-54.
- Vita JA. Endothelial function. *Circulation* 2011; 124(25): e906-12.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial dysfunction and vascular disease—a thirtieth anniversary update. *Acta physiol (Oxf)* 2015; doi: 10.1111/apha.12646.
- Liu YH, Yan CD, Bian JS. Hydrogen sulfide: A novel signaling molecule in the vascular system. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; 58(6): 560-9.
- Nagpure BV, Bian JS. Interaction of hydrogen sulfide with nitric oxide in the cardiovascular system. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 6904327.
- Filipovic MR, Miljkovic J, Nauser T, Royzen M, Klos K, Shubina T, *et al.* Chemical characterization of the smallest S-nitrosothiol, HSNO; cellular cross-talk of H_2S and S-nitrosothiols. *J Am Chem Soc* 2012; 134(29): 12016-27.
- Yong QC, Hu LF, Wang S, Huang D, Bian JS. Hydrogen sulfide interacts with nitric oxide in the heart: Possible involvement of nitroxyl. *Cardiovasc Res* 2010; 88(3): 482-91.
- Cotan D, Paz MV, Alcocer-Gomez E, Garrido-Maraver J, Oropesa-Avila M, de la Mata M, *et al.* AMPK as a target in rare diseases. *Curr Drug Targets* 2016; 17(8): 921-31.
- Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis *in vivo* by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes* 2006; 55(2): 496-505.
- Salminen A, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Res Rev* 2012; 11(2): 230-41.
- Leung SW, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization: Age, gender and blood pressure, do they matter? *Acta physiol (Oxf)* 2015; doi: 10.1111/apha.12628.
- 齐洪娜, 崔洁, 刘磊, 卢飞飞, 宋成洁, 闫长栋, 等. 外源性硫化氢预处理通过减轻氧化应激延缓人脐静脉内皮细胞老化. *生理学报* (Qi Hongna, Cui Jie, Liu Lei, Lu Feifei, Song Chengjie, Yan Changdong, *et al.* Exogenous hydrogen sulfide delays the senescence of human umbilical vein endothelial cells by lessening oxidative stress. *Acta Physiologica Sinica*) 2012; 64(4): 425-32.
- Racioppi L, Means AR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: Roles in signaling and pathophysiology. *J Biol Chem* 2012; 287(38): 31658-65.
- Ma Y, Yang F, Wang Y, Du Z, Liu D, Guo H, *et al.* CaMKK β is involved in AMP-activated protein kinase activation by baicalin in LKB1 deficient cell lines. *PLoS One* 2012; 7(10): e47900.
- Xie H, Xu Q, Jia J, Ao G, Sun Y, Hu L, *et al.* Hydrogen sulfide protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by activating AMP-activated protein kinase to restore autophagic flux. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 458(3): 632-8.
- Chaudhary R, Roy K, Kanwar RK, Walder K, Kanwar JR. Engineered atherosclerosis-specific zinc ferrite nanocomplex-based MRI contrast agents. *J Nanobiotechnology* 2016; 14(1): 6.
- Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A. Mechanisms of vascular aging: New perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010; 65(10): 1028-41.
- Schermer B, Benzing T. Endothelial cilia protect against atherosclerosis. *EMBO Rep* 2016; 17(2): 125-6.
- Rodrigo J, Alonso D, Bentura ML, Castro-Blanco S, Encinas JM, Fernandez AP, *et al.* Physiology and pathophysiology of nitric oxide in the nervous system, with special mention of the islands of Calleja and the circumventricular organs. *Histol Histopathol* 2002; 17(3): 973-1003.
- Sun D, Huang A, Yan EH, Wu Z, Yan C, Kaminski PM, *et al.* Reduced release of nitric oxide to shear stress in mesenteric arteries of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286(6): H2249-56.
- Chen J, Goligorsky MS. Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(5): H1729-39.
- Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003; 113(6): 703-16.
- Cui J, Liu L, Zou J, Qiao W, Liu H, Qi Y, *et al.* Protective effect of endogenous hydrogen sulfide against oxidative stress in gastric ischemia-reperfusion injury. *Exp Ther Med* 2013; 5(3): 689-94.
- Racioppi L, Means AR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: Roles in signaling and pathophysiology. *J Biol Chem* 2012; 287(38): 31658-65.
- Hurley RL, Anderson KA, Franzoni JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA. The Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 2005; 280(32): 29060-6.
- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM,

- et al.* Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2005; 2(1): 9-19.
- 27 Munaron L, Avanzato D, Moccia F, Mancardi D. Hydrogen sulfide as a regulator of calcium channels. *Cell Calcium* 2013; 53(2): 77-84.
- 28 Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, *et al.* A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 2003; 425(6961): 917-25.
- 29 Karnewar S, Vasamsetti SB, Gopaju R, Kanugula AK, Ganji SK, Prabhakar S, *et al.* Mitochondria-targeted esculetin alleviates mitochondrial dysfunction by AMPK-mediated nitric oxide and SIRT3 regulation in endothelial cells: Potential implications in atherosclerosis. *Sci Rep* 2016; 6: 24108.
- 30 Green MF, Anderson KA, Means AR. Characterization of the CaMKKbeta-AMPK signaling complex. *Cell Signal* 2011; 23(12): 2005-12.
- 31 Shang F, Zhang J, Li Z, Zhang J, Yin Y, Wang Y, *et al.* Cardiovascular protective effect of metformin and telmisartan: Reduction of PARP1 activity via the AMPK-PARP1 cascade. *PLoS One* 2016; 11(3): e0151845.