

气体信号分子硫化氢在心肌缺血再灌注损伤中的心肌保护作用

张鹏 王俊 于越 王志农

【摘要】 体外循环技术目前已广泛应用于心脏外科手术,低温缺血导致的心肌缺血再灌注损伤(MIRI)是影响术后心功能恢复的重要因素。该文介绍硫化氢(H_2S)在 MIRI 中的作用和机制。

【关键词】 气体信号分子;硫化氢;心肌缺血再灌注损伤;心肌保护

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2020.01.004

体外循环(CPB)技术已经广泛应用于心脏外科领域,但 CPB 导致的心肌缺血再灌注损伤(MIRI)一直是困扰临床医师的问题^[1]。如何能够降低 MIRI 导致的心肌细胞损伤,有效地保护心肌,改善患者预后,成为当前研究的热点。既往研究证实,内源性硫化氢(H_2S)具有抗氧化、抗凋亡、抗炎等多种生物活性,在心血管系统中发挥重要的病理、生理作用^[2]。

1 H_2S 的生物学特性

1.1 H_2S 的合成和代谢

半胱氨酸和同型半胱氨酸作为哺乳动物体内 H_2S 合成的底物,在半胱硫醚 γ 裂解酶(CSE)、胱硫醚 β 合酶(CBS)、半胱氨酸转移酶(CAT)和 3-巯基丙酮酸转硫酶(3MST)的调控下,通过酶促反应生成内源性 H_2S ^[3]。这些酶的分布具有组织特异性,其中 CSE 高表达于心血管组织,CBS、CAT 和 3MST 则主要分布在中枢神经系统。研究发现,D-氨基酸氧化酶(DAO)也可以调控内源性 H_2S 的合成,DAO 主要分布于肾脏和脑组织^[4-5]。由于参与调控内源性 H_2S 合成的酶分布广泛, H_2S 可在心血管组织、脑组织等机体内大部分组织中生成。生理状态下, H_2S 在体内大多以离子形式 H^+ 和 HS^- 存在,只有小部分以非解离状态下的气体形式存在,在体内处于动态平衡^[6]。在细胞线粒体中, H_2S

能被迅速氧化成硫代硫酸根($S_2O_3^{2-}$),并被转化成亚硫酸根(SO_3^{2-})和更稳定的硫酸根(SO_4^{2-}),后两者是内源性 H_2S 在体内主要的终产物,通过肾脏经尿液排泄。

1.2 H_2S 的生物学功能

H_2S 能够通过调节血管平滑肌,发挥扩张容量血管、降低血压的生物学功能。同时, H_2S 能够通过促进血管平滑肌细胞的凋亡,抑制其增殖,有效抑制单核细胞的迁移及其与内皮细胞的黏附,减少炎症因子的释放,减缓动脉粥样硬化的进展。除了对心血管系统的保护作用外,在神经系统、消化系统、免疫系统中 H_2S 也发挥了重要的作用。既往研究证实,在中枢神经系统中, H_2S 能够选择性易化 N-甲基-D-天冬氨酸受体,促进海马长时程增强效应。此外, H_2S 可以抑制脂多糖对胶质细胞的激活和促炎症因子的生成释放。

2 H_2S 在心血管系统及 MIRI 中的作用

2.1 H_2S 在心血管系统中的作用

H_2S 在心肌损伤后对于心肌的保护作用已被证实,并且外源性 H_2S 与内源性 H_2S 具有相同的心肌保护作用。Predmore 等^[7]的研究证实,内源性 H_2S 不仅可以通过调节血管平滑肌促进血管舒张,而且具有对抗动脉粥样硬化及减轻 MIRI、抑制心血管平滑肌细胞增殖、参与休克时血管的低反应及负性心肌肌力等作用。在一项以自发性高血压大鼠为研究对象的观察性试验中,Wallace 等^[8]发现随着大鼠年龄的增长,体内的 CSE 和 H_2S 的水平降低,这种变化加速了高血压的进展。在给予外源性 H_2S 后,自发性高

基金项目:上海市科学技术委员会西医引导项目(15411960100)

作者单位:200003 上海,海军军医大学(第二军医大学)长征医院胸心外科

通信作者:王志农, E-mail:wangzn007@smmu.edu.cn

血压大鼠的血压明显降低。此外,在对高血压、肺动脉高压、门静脉高压等患者的研究中均能观察到类似现象,即内源性 H_2S 水平明显降低^[9]。为探究 H_2S 在抗炎、抗动脉粥样硬化方面的作用,Wang 等^[10]通过敲除小鼠体内载脂蛋白 E 基因并采用高脂饲料饲养的方法构建小动脉粥样硬化动物模型,发现发生动脉粥样硬化的小鼠体内内源性 H_2S 水平明显降低、炎性介质明显升高;在补充外源性 H_2S 后,动脉粥样硬化的进展明显减慢,且炎性介质水平逐渐降低。 H_2S 在动脉瘤的发生、发展中也有重要作用。Gomez 等^[11]的研究发现,腹主动脉瘤患者体内的前列腺素 E2 (PGE2)、基质金属蛋白酶 (MMP) 1 与 MMP 组织抑制因子 1/2 (TIMP1/2) 的比值明显增加,且体内 CSE 表达和 H_2S 水平明显降低;在给予外源性 H_2S 后,PGE2 和 MMP1/TIMP 的比值较前显著下降,证明了 H_2S 在延缓动脉瘤进展方面的作用。

2.2 H_2S 在 MIRI 中的作用

Sodha 等^[12]研究发现,当发生心肌缺血时,由内源性 H_2S 介导的心肌蛋白化学修饰明显增加,从而更快地激活保护通路,减少心肌缺血对机体造成的损害。Li 等^[13]通过在体与离体动物实验,发现在 MIRI 发生前采用 H_2S 预处理能够显著降低心肌缺血后梗死面积与心肌肌钙蛋白 I 水平,增加心肌细胞活力及心肌收缩力;采用 H_2S 预处理能够降低因 MIRI 导致的心律失常的发生率和持续时间。研究表明,在心肌缺血预处理 (IPC) 中,蛋白激酶 C 信号途径的激活与肌浆网腺苷三磷酸敏感性 K^+ 通道 (KATP) 的开放是内源性 H_2S 调控细胞内信号转导、发挥心肌保护效应的主要途径^[14]。KATP 的开放促使肌浆网摄入更多的 Ca^{2+} ,同时增强 Na^+ / Ca^{2+} 转运、加快 Ca^{2+} 外排,拮抗 MIRI 所致心肌细胞的 Ca^{2+} 超载,避免心肌细胞过度收缩^[15]。此外,在心肌缺血后再灌注阶段给予内源性 H_2S 进行缺血后处理也能产生显著的心肌保护效应,主要表现在缩小再灌注心肌梗死面积、促进心功能恢复等方面^[16]。

3 H_2S 在 MIRI 中的心肌保护机制

3.1 抗细胞凋亡

细胞凋亡是细胞主动耗能的自发性、程序性的死亡过程,该过程受到一系列基因的调控,主要表

现为细胞体积缩小、细胞质密度增加、线粒体膜通透性改变、核质浓缩、核膜核仁破裂、凋亡小体形成等。研究表明,心肌缺血后再灌注阶段的 MIRI 与心肌细胞凋亡关系密切^[17]。尽管细胞凋亡的机制尚未完全明确,但综合现阶段 MIRI 中细胞凋亡信号转导与 H_2S 作用机制的研究结果,发现 H_2S 主要通过线粒体通路、内质网通路途径,抑制 MIRI 时的细胞凋亡。

3.1.1 抑制线粒体通路 线粒体通路又称内源性凋亡途径。既往研究表明,线粒体膜通透性改变是诱发细胞凋亡的主要因素,而线粒体膜通透性改变已经被证实与线粒体内膜、外膜之间存在线粒体通透性转换孔 (mPTP) 密切相关^[18]。 H_2S 能够通过激活胞外信号调节激酶 (ERK) 1/2 和磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 信号通路抑制 mPTP 的开放,进而抑制线粒体膜电位的下降,减轻 MIRI 时心肌细胞凋亡,发挥心肌保护作用^[19]。

3.1.2 抑制内质网通路 内质网通路即内质网应激 (ERS) 引起的细胞凋亡,是近年新发现的一种凋亡途径。内质网是真核细胞中重要的细胞器,主要参与蛋白质的合成与转运、脂类代谢、糖类代谢等过程。此外,作为信号转导的枢纽平台,内质网在 MIRI 导致的心肌损害过程中发挥着重要作用。ERS 指由于病理生理刺激 (缺血缺氧、氧化应激等) 引起的内质网腔内未折叠与错误折叠蛋白聚集, Ca^{2+} 平衡的紊乱^[20]。既往研究显示,适度的 ERS 可通过促进内质网处理未折叠及错误折叠蛋白等降低细胞损伤,而持久或严重的 ERS 则可引起细胞凋亡^[21]。其中未折叠蛋白反应 (UPR) 和胱天蛋白酶-12、c-Jun 氨基端激酶 (JNK)、转录因子同源蛋白 (CHOP) 3 条经典通路的激活是介导 ERS 造成细胞凋亡的主要途径^[22-23]。 H_2S 可能通过下调 MIRI 时心肌细胞 UPR 重要分子 CHOP、葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 的 mRNA 和蛋白表达水平,减少心肌细胞的凋亡^[24]。胱天蛋白酶-12 产生于内质网,仅在 ERS 时被活化,是介导 ERS 凋亡的关键分子。在正常生理情况下,胱天蛋白酶-12 以无活性的酶原形式存在,在 ERS 损伤状态下,胱天蛋白酶-12 酶原特异性激活,并协同其他 ERS 分子激活胱天蛋白酶-9 酶原,再通过胱天蛋白酶-3 途径直接或间接导致细胞凋亡。Sivarajah 等^[25]研究表明, H_2S 能够通过降低胱天蛋白酶-9 酶原的活性和 JNK 磷酸化的

水平,拮抗 MIRI 导致的心肌细胞凋亡过程。

3.2 抗氧化应激

氧化应激是发生 MIRI 的重要原因之一。MIRI 发生时,机体内的促氧化功能增强,而抗氧化功能减弱,心肌组织促氧化和抗氧化功能的动态平衡被打破,导致心肌组织的氧化程度远超出抗氧化系统的清除能力,引起机体氧化应激显著增强,进而导致线粒体功能发生障碍,致使大量氧自由基和超氧阴离子等活性氧(ROS)产生,造成脂质过氧化和各种细胞器的损伤,最终导致心肌损伤^[26]。此外,因氧化应激导致的炎性反应也是造成 MIRI 的重要机制,包括白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF)、IL-6 等多种细胞因子的参与^[27]。Sun 等^[28]在对缺氧/复氧大鼠心肌细胞的研究中发现,H₂S 能够增强超氧化物歧化酶(SOD)的活性,降低 ROS 水平,发挥保护心肌的作用。ROS 主要产生于线粒体中,H₂S 能够通过抑制线粒体复合体 IV 的活性,减少线粒体 ROS 的产生^[29]。心肌缺血发生时,心肌缺血区除伴随炎症细胞的浸润、炎性介质的释放外,还伴随着炎症反应相关转录因子的激活等。其中,核因子 κ B(NF- κ B)激活后进入细胞核启动多种炎症因子的转录是 MIRI 早期炎性介质表达的关键因素^[30]。有研究证实,提高内源性 H₂S 水平可以抑制 NF- κ B 通路,降低炎症因子 IL-1、IL-6 引起的中性粒细胞浸润,从而减轻氧化应激导致的炎性反应,发挥心肌保护作用^[31]。

3.3 抗 Ca²⁺ 超载

既往研究已经证实,心肌细胞内 Ca²⁺ 大量聚集是造成 MIRI 的另一重要因素。当心肌发生缺血再灌注时,为了保持胞浆内 Ca²⁺ 水平的相对稳定,线粒体主动摄取大量的 Ca²⁺ 以降低胞浆内 Ca²⁺ 水平,但大量聚集在线粒体中的 Ca²⁺ 能够激活线粒体膜上的磷脂酶,导致线粒体膜的通透性及基本结构发生改变,造成心肌细胞不可逆的损伤^[32]。蛋白激酶 C(PKC)是一种多功能丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt),PKC α 、PKC ϵ 、PKC δ 是主要分布于心肌组织中的 3 种 PKC 亚型。当发生 MIRI 时,内源性 H₂S 通过激活 PKC 途径,进一步提高肌浆网上 Ca²⁺ ATP 酶的活性,同时加速浆膜 Na⁺/Ca²⁺ 交换体介导的离子交换,从而降低胞浆内 Ca²⁺ 水平,减少心肌细胞内 Ca²⁺ 超载的发生,发挥心肌保护的作

用^[24]。此外,H₂S 可以通过促进 ATP 敏感性钾通道(K_{ATP})的开放,使肌浆网摄入更多的 Ca²⁺,进而抵抗心肌细胞内 Ca²⁺ 超载;H₂S 还具有抑制 L 型 Ca²⁺ 通道开放的作用,从而避免心肌细胞过度收缩,减少 MIRI 导致的心肌损伤^[33]。

4 小结与展望

H₂S 在心血管系统及减轻 MIRI 等心肌保护方面的作用已经得到大量研究的证实,但对于 H₂S 减轻 MIRI 的具体机制还未完全明确。内源性 H₂S 在体内的分布具有器官特异性,在心肌组织中 H₂S 主要由高表达的 CSE 调控合成。在 MIRI 的过程中,H₂S 主要通过抗细胞凋亡(抑制线粒体通路、抑制内质网通路等途径),抗氧化应激,抗 Ca²⁺ 超载等机制发挥心肌保护作用。随着基础研究的不断深入,对于 H₂S 减轻 MIRI 的具体机制也在进一步完善。Hackfort 等^[34]研究发现,H₂S 可能通过上调或下调特定的微小 RNA 改善心脏功能障碍。Wu 等^[35]指出,H₂S 与 NO 在 MIRI 中可能通过特定的转导通路和信号机制发挥交互调节的功能,产生心肌保护的作用。

尽管现有的研究已经证实 H₂S 对心血管系统及 MIRI 的积极作用,但具有剧毒、水溶性不稳定、与空气混合易爆炸等理化性质阻碍了其作为药物应用于临床。目前,对 H₂S 供体药物的研究主要围绕外源性与内源性 H₂S 两方面展开,前者以 2008 年首次合成的新型水溶性 H₂S 缓释剂 GYY4137 为代表^[13];后者则主要围绕纳米载体靶向给药技术开展研究。通过构建 CSE 的缺血心肌组织靶向给药系统,使其特异性过表达于缺血心肌组织,上调内源性 H₂S 表达。

综上所述,对 H₂S 在 MIRI 中心肌保护作用机制的深入研究将为临床心肌保护策略的制定、心脏外科手术的发展提供支持。

参 考 文 献

- [1] McGuinness SP, Parke RL, Drummond K, et al. A multicenter, randomized, controlled phase II b trial of avoidance of hyperoxemia during cardiopulmonary bypass[J]. *Anesthesiology*, 2016, 125(3):465-473.
- [2] Xu D, Jin H, Wen J, et al. Hydrogen sulfide protects against endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury in nucleus pulposus cells and ameliorates intervertebral disc degeneration [J]. *Pharmacological Research*, 2017, 117: 357-369.

- [3] Polhemus DJ, Lefer DJ. Emergence of Hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2014, 114(4):730-737.
- [4] 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.
- [5] Kimura H. Signaling molecules; Hydrogen sulfide and polysulfide [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22 (5): 362-376.
- [6] Li N, Wang MJ, Jin S, et al. The H₂S donor NaHS changes the expression pattern of H₂S-producing enzymes after myocardial infarction [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016;6492469.
- [7] Predmore BL, Lefer DJ. Hydrogen sulfide-mediated myocardial pre- and post-conditioning[J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2011, 4(1):83-96.
- [8] Wallace JL, Wang R. Hydrogen sulfide-based therapeutics; exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(5):329-345.
- [9] Meng G, Ma Y, Xie L, et al. Emerging role of hydrogen sulfide in hypertension and related cardiovascular diseases [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(23):5501-5511.
- [10] 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.
- [11] Gomez I, Ozen G, Deschildre C, et al. Reverse regulatory pathway (H₂S /PGE₂ /MMP) in human aortic aneurysm and saphenous vein varicosity [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (6);e0158421.
- [12] Sodha NR, Clements RT, Feng J, et al. Hydrogen sulfide therapy attenuates the inflammatory response in a porcine model of myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 138(4):977-984.
- [13] Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a novel, water-soluble Hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of Hydrogen sulfide[J]. *Circulation*, 2008, 117(18):2351-2360.
- [14] Pan TT, Neo KL, Hu LF, et al. H₂S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular Calcium handling in rat cardiomyocytes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(1):C169-C177.
- [15] Zhang L, Cao S, Deng S, et al. Ischemic postconditioning and pinacidil suppress Calcium overload in anoxia-reoxygenation cardiomyocytes via down-regulation of the calcium-sensing receptor[J]. *PeerJ*, 2016, 4:e2612.
- [16] 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.
- [17] Yu HT, Zhen J, Pang B, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates oxidative stress and myocardial apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015, 16 (5):344-354.
- [18] Ji L, Fu F, Zhang L, et al. Insulin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via reducing oxidative/nitrative stress[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298(4): E871-E880.
- [19] Wu D, Hu Q, Liu X, et al. Hydrogen sulfide protects against apoptosis under oxidative stress through SIRT1 pathway in H9c2 cardiomyocytes[J]. *Nitric Oxide*, 2015, 46:204-212.
- [20] Wu HL, Duan ZT, Jiang ZD, et al. Increased endoplasmic reticulum stress response is involved in clopidogrel-induced apoptosis of gastric epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (9):e74381.
- [21] Zhang Y, Liu W, Zhou Y, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in restraint stress-induced hippocampal apoptosis and cognitive impairments in rats [J]. *Physiol Behav*, 2014, 131:41-48.
- [22] White-Gilbertson S, Hua Y, Liu B. The role of endoplasmic reticulum stress in maintaining and targeting multiple myeloma: a double-edged sword of adaptation and apoptosis [J]. *Front Genet*, 2013, 4:109.
- [23] Minamino T, Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(6):1105-1110.
- [24] Citi V, Piragine E, Testai L, et al. The role of Hydrogen sulfide and H₂S-donors in myocardial protection against ischemia/reperfusion injury[J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25 (34):4380-4401.
- [25] 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.
- [26] Mei Y, Thompson MD, Cohen RA, et al. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2):243-251.
- [27] Yao BJ, He XQ, Lin YH, et al. Cardioprotective effects of anisodamine against myocardial ischemia/reperfusion injury through the inhibition of oxidative stress, inflammation and apoptosis[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1):1253-1260.
- [28] 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 (2):164-169.
- [29] 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.
- [30] Lu M, Tang F, Zhang J, et al. Astragaloside IV attenuates injury caused by myocardial ischemia/reperfusion in rats via regulation of toll-like receptor 4/nuclear factor-κB signaling pathway[J]. *Phytother Res*, 2015, 29(4):599-606.
- [31] Pan LL, Liu XH, Gong QH, et al. S-propargyl-cysteine (SPRC) attenuated lipopolysaccharide-induced inflammatory

response in H9c2 cells involved in a Hydrogen sulfide-dependent mechanism [J]. *Amino Acids*, 2011, 41 (1): 205-215.

[32] 陈景瑞, 魏静, 施洋, 等. 心肌缺血再灌注与线粒体功能障碍研究进展 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31 (18): 1886-1888.

[33] Abd Elmoneim H, Sharabi F, Mohy El Din M, et al. Potassium channels modulate the action but not the synthesis of hydrogen sulfide in rat corpus cavernosum [J]. *Life Sci*, 2017, 189:39-43.

[34] 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-H812.

[35] Wu D, Hu Q, Zhu D. An update on Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in the cardiovascular system [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 9:4579140.

(收稿:2019-07-25 修回:2019-11-07)

(本文编辑:丁媛媛)

《国际心血管病杂志》2020 年征订启事

《国际心血管病杂志》(原名:国外医学·心血管疾病分册)是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、卫生系列高级职称评审期刊和华东地区优秀期刊。《国际心血管病杂志》设综述、基础研究、临床研究、经验交流、短篇论著等栏目。办刊宗旨为:执行党和国家的卫生工作政策,贯彻理论与实践、普及与提高相结合的方针,及时反映国内外心血管领域临床、科研、防治工作的重大进展,促进国内外心血管领域学术交流,服务于心血管专业的中高级临床、教学和科研工作者。

《国际心血管病杂志》为双月刊,逢单月 25 日出版,大 16 开本,全国各地邮局订购,邮发代号 4-188。

定价 12.0 元/期,全年 72.0 元。编辑部常年接受个人邮购,免收邮费。

地址:200031,上海市建国西路 602 号《国际心血管病杂志》编辑部

电话:021-33262055

E-mail: xin_xg@aliyun.com