

- [17] 蒋艳,王仙园,罗向东. 富组蛋白 1 促进皮肤创伤愈合的细胞学研究[J]. 解放军护理杂志, 2012, 29(3B): 24-26.
- [18] 杨荣, 嵇武. 防御素的生物学活性及与疾病的关系[J]. 肠外与肠内营养, 2011, 18(3): 185-188.
- [19] Hoq MI, Niyonsaba F, Ushio H, et al. Human cathelicidin enhances migration and proliferation of normal human epidermal keratinocytes[J]. J Dermatol Sci, 2011, 64(2): 108-118.
- [20] Aarbiou J, Verhoosel RM, Van Wetering S, et al. Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 30(2): 193-201.
- [21] Zhou L, Beuerman RW, Huang L, et al. Proteomic analysis of rabbit tear fluid; Defensin levels after an experiment[J]. J Cell Biochem, 2007, 7(17): 3194-3206.
- [22] Otte JM, Werner I, Brand S, et al. Human beta defensin 2 promotes intestinal wound healing in vitro[J]. J Cell Biochem, 2008, 104(6): 2286-2297.
- [23] 王兴顺, 耿艺介, 李文楚, 等. 抗菌肽抗菌机制及其应用研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2012, 40(4): 70-76.
- [24] Seo MD, Won HS, Kim JH, et al. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review [J]. Molecules, 2012, 17(10): 12276-12286.
- [25] Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing[J]. J Dent Res, 2010, 89(3): 219-229.

(收稿日期: 2014-08-08 修回日期: 2014-09-28)

• 综述 • doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.048

内源性硫化氢含量与帕金森病的相关性研究

郭晶晶 综述, 晏 勇[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院神经内科/重庆市神经病学重点实验室 400016)

关键词: 帕金森病; 内源性硫化氢; 相关性

中图分类号: R741

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)33-4549-03

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种神经退行性疾病,其主要病理改变为黑质致密部多巴胺(dopamine, DA)能神经元进行性缺失及残存神经细胞浆内路易小体(lewy body)形成。其主要机制包括蛋白质异常聚集、氧化应激、线粒体功能障碍、神经毒性、炎症反应及细胞凋亡^[1]。硫化氢(H₂S)是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之后发现的第3种内源性气体信号分子,具有抗氧化应激、细胞凋亡及神经系统炎症等作用,而这些生理作用对防治PD和阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)等神经退行性疾病有着重要意义。本文就内源性H₂S与PD的相关性研究进行简要综述。

1 内源性 H₂S 体内合成分解及其生理作用

1.1 H₂S 在体内的合成与分解 H₂S 的合成与 3 种酶相关: 胱硫醚-C-裂解酶(CSE)、胱硫醚-B-合酶(CBS)和一组串联酶包括天门冬氨酸转氨酶(AAT)和巯基丙酮酸硫基转移酶(MPST)^[2]。Lee 等^[3]发现,体外培养的星形胶质细胞以每小时 15.06 μmol/g 蛋白质的速度合成 H₂S,其合成速度是小胶质细胞的 7.57 倍,SH-SY5Y 细胞株(人神经母细胞瘤细胞株)的 10.27 倍,NT-2 细胞株的 11.32 倍。实验提示,人血管内皮细胞 H₂S 的合成主要依赖于 CSE 而非 CBS,敲除 CSE 基因会导致血清、心肌、主动脉中 H₂S 的合成降低,而 CBS 基因敲除后则会导致脑组织内 H₂S 合成障碍^[3]。因此,CBS 在脑组织内高表达,而 CSE 主要表达于心血管系统,此外,MPST 主要表达于神经元和血管内皮中^[2]。内源性 H₂S 主要由 L-半胱氨酸 L-cysteine, Cys)和同型半胱氨酸(Hcy)在 CBS、CSE 催化下产生,脑组织合成 H₂S 的主要酶是 CBS。第 1 种酶 CBS 以磷酸吡哆醛(PLP)为辅因子催化半胱氨酸合成 H₂S,包括 β 键的移除反应、β 键的替换反应和(或)α、β 键同时移除反应^[4]。第 2 种酶 CSE 不依赖于磷酸吡哆醛(PLP)就可催化半胱氨酸合成 H₂S。研究表明, H₂S 分解存在 3 种途径:(1) H₂S 在线粒

体内被氧化为硫代硫酸盐(S₂O₃²⁻)、亚硫酸盐(SO₃²⁻)和硫酸盐(SO₄²⁻),然后从尿液排出^[5]。(2) 硫醇甲基转移酶(TSMT)催化 H₂S 甲基化生成单二甲基硫醚和双二甲基硫醚。(3) H₂S 与高铁血红蛋白结合生成硫合血红蛋白。此外, H₂S 还可通过与 NO 发生反应被分解。还有报道称 H₂S 可穿过肺泡膜释放^[6]。

1.2 H₂S 的生理作用 H₂S 在大部分组织和血清中的浓度为 50 μmol/L。其中枢系统中的生理作用主要表现在 4 个方面:(1) 促进海马长时程增强效应(long-term potentiation, LTP)。一般来说,较弱电刺激作用于海马不能引出 LTP, H₂S 能促进该刺激引发 LTP,这一效应与单纯施加一个强直性电刺激所引发的 LTP 具有等效性。(2) 强化 NMDA 受体所介导的应答反应。神经细胞 NMDA 受体是 H₂S 靶受体之一,生理剂量的 H₂S 能显著增加神经细胞 NMDA 受体中谷氨酸转运。Mustafa 等^[7]发现, GAPDH(H₂S 的另一个靶受体)能通过半胱氨酸中硫键断裂形成 SSH 键,使酶活性提高 6 倍,揭示了一个中枢神经系统内的全新的 H₂S 依赖性的细胞能量代谢机制。(3) 诱导改变神经细胞钙通道。单独的 H₂S 能诱发星形胶质细胞内钙波的产生,增强胶质细胞通过钙波与周围细胞进行信息交换,从而介导神经元细胞和星形胶质细胞之间的信号传递,调节突触活动。(4) 神经元保护作用,其途径主要有 3 种,一是提高细胞内谷胱甘肽(glutathione, GSH)的水平, GSH 作为细胞内重要的抗氧化物质,可阻断氧化反应的产生;二是活化 ATP 敏感性钾通道(KATP channels),这类通道的开放可增强神经元和星形胶质细胞对抗缺血、创伤或神经毒性物质的侵害;三是通过活化腺苷酸环化酶增加胞内环腺苷酸浓度,阻断炎症因子 mRNA 的转录,对抗神经炎症^[8-9]。最新研究提示,释放 H₂S 的非甾体类或左旋多巴的衍生物,即 H₂S 供体的抗氧化及抗炎作用可能更强^[10-12]。

2 内源性 H₂S 在 PD 治疗研究中的进展

目前,PD 发病机制未完全明确,线粒体功能障碍、氧化应激、GSH 水平下降及金属蛋白蓄积都会导致神经细胞凋亡,诱导 PD 产生。近几年实验研究表明,H₂S 及其衍生物对 PD 具有潜在的治疗作用^[1]。

2.1 H₂S 应用于 PD 机制研究中的进展 Lee 等^[13]检测了 4 种 H₂S 供体(ACS48、ACS5、ACS81 和 ADT-OH)和 4 种左旋多巴供体(ACS83、ACS84、ACS85 和 ACDS86)的抗氧化抗炎作用。该实验采用 3 种神经细胞株:人单核细胞型淋巴瘤细胞株(THP-1)、人神经母细胞瘤细胞株(SH-SY5Y)和人脑胶质瘤细胞株(U373)。上述供体化合物可被人小胶质细胞、星形胶质细胞及 THP-1、U373 细胞株所摄取,生成内源性 H₂S,发挥神经保护作用,其机制可能是:(1)提高经典抗氧化物质内源性 GSH 的细胞浓度;(2)对抗单胺氧化酶 B(MAO B);(3)降低神经毒素诱发的炎症反应;(4)抑制促炎介质,如肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、IL-6 及铁蛋白的释放。阻断 γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ-glutamylcysteine)会阻断 GSH 生成,导致胶质细胞炎症及毒性反应^[8]。H₂S 能阻断 GSH 失活,升高 GSH 水平,降低氧化应激。而且,H₂S 可使自由基直接或间接的从氧化左旋多巴化合物中解离出来,阻断氧化应激介导的细胞死亡。MAO B 可加速体内多巴胺的分解,而这类供体化合物(H₂S 衍生物)可对抗 MAO B,使脑组织中多巴胺浓度升高。因此,H₂S 能提高多巴胺及 GSH 水平,对神经退行性疾病可能有潜在的治疗作用。神经炎症是 PD 病因机制之一,黑质体中小胶质细胞及星形胶质细胞活化可导致神经炎症,帕金森动物模型中存在类似的活化机制^[14-15]。流行病学调查发现,服用非甾体抗感染药的患者,尤其是同时饮用咖啡的人群,患 PD 的可能性减小,由此证明抗感染治疗能降低胶质活化改善神经退变^[16]。Lee 等^[13]的实验证明,H₂S 能减少 TNF-α、IL-6 及 NO 释放,保护小胶质细胞、星形胶质细胞及 THP-1、U373 细胞,并且能降低细胞活化产生的毒素对 SH-SY5Y 细胞的毒性作用。Lee 等^[3]发现,胶质细胞炎症会抑制内源性 H₂S 生成,造成其抗感染作用降低,而外源性添加 NaHS 能部分减轻这种抑制作用,改善炎症刺激造成的神经细胞毒性,证明了 H₂S 作为一种抗氧化物,具有直接的神经保护作用。此外,该试验还证实了 H₂S 通过阻断核转录因子 kappa B(NF-κB)降低胶质活化,但其阻断机制目前仍需进一步研究。总之,H₂S 不仅能提高组织内 GSH 及多巴胺水平,而且作为有效的抗氧化物质,能阻断炎症介质的释放、降低细胞活化,发挥直接的神经保护作用。Bae 等^[17]从分子基因角度对内源性 H₂S 和 PD 做了进一步研究。该研究在双光子显微成像技术(TPM)的基础上,利用定位于细胞线粒体的双原子探针(mitochondria-localized two-photon probe,SHS-M2)探测活胶质细胞及脑组织内的 H₂S。结果提示,内源性 H₂S 的浓度与脑组织内 CBS 的表达有关。实验将小鼠胶质细胞和脑组织中的 DJ-1 基因(一种 PD 基因)敲除后作为实验组,与对照组小鼠相比,DJ-1 基因的缺失会导致 CBS 表达水平降低,内源性 H₂S 合成降低。实验发现,胶质细胞内 H₂S 水平降低可导致 PD 的进展;此外,SHS-M2 可能会成为一种新的可用于检测包括 PD 在内的神经退行性疾病发病风险的标志物。

2.2 H₂S 应用于 PD 动物实验的研究进展 实验证明,6-羟胺(6-OHDA)能显著抑制 CBS,降低内源性 H₂S 合成,造成帕金森症候群^[18]。Xie 等^[19]应用 6-OHDA 诱导帕金森大鼠模型来研究左旋多巴供体衍生物-ACS84(同时可释放 H₂S)的神经保护作用。结果提示,相比于等浓度的左旋多巴和 NaHS,

ACS84 改善 6-OHDA 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤和氧化应激的效果更显著,其机制可能是:(1)ACS84 释放 H₂S 的速度较慢,能以更低的浓度达到更好的保护作用;(2)ACS84 在细胞内通过线粒体释放 H₂S,进一步加强了内源性 H₂S 作用的有效性;(3)ACS84 与内源性 H₂S 或 CBS 相互作用,产生更强的保护作用^[20]。GSH-半胱氨酸连接酶(Gcl)和血红素氧合酶(HO-1)是与细胞应激防御系统相关的抗氧化酶,这两种酶的编码基因都包含抗氧化反应元件(ARE)。在抗氧化酶的表达过程中,转录因子 NF-E2 相关因子 2(Nrf2)被活化,从胞质易位至细胞核绑定 ARE^[21]。ACS84 能诱导 Nrf-2 向细胞核移位,提高 GclC、GclM 和 HO-1 的基因转录,证明了 ACS84 可通过激发 Nrf-2/ARE 通路增加抗氧化酶的表达,降低细胞氧化应激。此外,H₂S 可抑制尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶,有效降低活性氧(ROS)^[22]。因此,上述实验证实外源性添加 H₂S 能够有效降低神经氧化应激,发挥有效的神经保护作用。

部分研究证明,PD 患者体内高同型半胱氨酸血症的血清浓度升高^[23]。Kamat 等^[24]研究了 H₂S 在 Hcy 和神经血管功能障碍方面的神经保护作用。实验采用 8~10 周的野生型(WT)雄性小鼠构建实验模型,分为对照组、人工脑脊液组(aCSF)、Hcy 和 Hcy 联合 NaHS 组。与对照组和 aCSF 组相比:(1)Hcy 注射后能显著升高丙二醛、亚硝酸、乙酰胆碱酯酶活性、TNF-α、IL-6、胶原纤维酸性蛋白、NO 合成酶、内皮细胞 NO 合成酶,降低 GSH 水平,导致氧化、氮化反应,引起神经炎症。(2)Hcy 注射后导致神经烯醇化酶 S100 高表达和神经突触蛋白低表达也会引起神经退变。(3)Hcy 会引起白鼠大脑皮层及脑室周围区域的细胞损伤,进而导致细胞凋亡和神经退变。(4)Hcy 组小鼠体内基质金属蛋白酶(MMP)9 和 MMP2 高表达和金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)、TIMP-2 及其绑定蛋白表达降低,导致神经血管重构^[25]。试验结论得出,PD 患者脑组织内源性 H₂S 合成减少,造成氧化应激水平升高,神经细胞不能正常摄取左旋多巴,导致神经退变。而外源性加入 H₂S 能显著降低 Hcy 介导的氧化应激、记忆缺失、神经退变、神经炎症及神经血管重构。

神经毒素 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,MPTP)现象可能是黑质体炎症反应的潜在因素。暴露于 MPTP 的药瘾者患有进行性加重的帕金森症候群,尸解结果表明接触 MPTP 后所产生的炎症反应可持续 17 年之久。用猴子进行的模拟实验结果显示,最后一次毒物接触后猴脑黑质的炎症反应持续时间为 14 年,证明黑质炎症反应一旦被诱发就可能持续存在。Kida 等^[26]用 MPTP 诱导帕金森小鼠模型研究内源性 H₂S 的神经保护作用。发现内源性 H₂S 能有效降低运动障碍发生率,提高神经元对抗炎症能力,还可激发 Nrf-2/ARE 通路,上调抗氧化酶的表达。作者认为,内源性 H₂S 可阻断 MPTP 诱导的神经退变,其机制可能与阻断黑质及纹状体内多巴胺能神经元的细胞凋亡有关。

3 结论及展望

内源性 H₂S 作为体内重要的气体信号分子,在神经系统中发挥重要的生理作用,包括促进海马 LTP,增强 NMDA 受体所介导的应答反应,诱导改变神经细胞钙通道和保护神经元等。大量实验证实,H₂S 在对抗氧化应激、神经炎症反应、记忆障碍、神经血管重构、神经退变等方面具有重要的神经保护作用,提示 H₂S 对神经退变性疾病有潜在治疗作用。

尽管目前全球掀起了 H₂S 与人体疾病研究的热潮,但目

前对 H₂S 与 PD 的相关性研究还很少,多处于初期探索阶段。很多问题亟待明确,如内源性 H₂S 降低是否为 PD 的发病机制之一;通过什么途径导致 PD,补充 H₂S 是否能缓解或治疗 PD,其作用靶点是什么;每日补充多大剂量 H₂S 供体或达到什么血液浓度为佳;如何控制气体信号分子药物发挥作用的多元性;随着这些问题的破解,PD 的防治定能揭开新的篇章。

参考文献:

- [1] Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease; a target for neuroprotection[J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8(4): 382-397.
- [2] Kashfi K, Olson KR. Biology and therapeutic potential of hydrogen sulfide and hydrogen sulfide-releasing chimeras[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(5): 689-703.
- [3] Lee M, Schwab C, Yu S, et al. Astrocytes produce the anti-inflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide[J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(10): 1523-1534.
- [4] Singh S, Padovani D, Leslie RA, et al. Relative contributions of cystathionine β -synthase and γ -cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(33): 22457-22466.
- [5] Qu K, Lee SW, Bian JS, et al. Hydrogen sulfide; neurochemistry and neurobiology[J]. *Neurochem Int*, 2008, 52(1/2): 155-165.
- [6] Insko MA, Deckwerth TL, Hill P, et al. Detection of exhaled hydrogen sulphide gas in rats exposed to intravenous sodium sulphide[J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157(6): 944-951.
- [7] Mustafa AK, Gadalla MM, Snyder SH. Signaling by gasotransmitters[J]. *Sci Signal*, 2009, 2(68): re2.
- [8] Lee M, Cho T, Jantarotnotai N, et al. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity; relevance to aging and degenerative neurological diseases[J]. *FASEB J*, 2010, 24(7): 2533-2545.
- [9] Yang YJ, Zhang S, Ding JH, et al. Iptakalim protects against MPP1-induced degeneration of dopaminergic neurons in association with astrocyte activation[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2009, 12(3): 317-327.
- [10] Lee M, Sparatore A, Del Soldato P, et al. Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs attenuate neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation[J]. *Glia*, 2010, 58(1): 103-113.
- [11] Lee M, McGeer E, Kodela R, et al. NOSH-aspirin (NBS-1120), a novel nitric oxide and hydrogen sulfide releasing hybrid, attenuates neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation: a new candidate for treatment of neurodegenerative disorders[J]. *Glia*, 2013, 61(10): 1724-1734.
- [12] Sabens EA, Distler AM, Mieyal JJ. Levodopa deactivates enzymes that regulate thiol-disulfide homeostasis and promotes neuronal cell death; implications for therapy of Parkinson's disease[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(12): 2715-2724.
- [13] Lee M, Tazzari V, Giustarini D, et al. Effects of hydrogen sulfide-releasing L-DOPA derivatives on glial activation[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(23): 17318-17328.
- [14] McGeer PL, McGeer EG. History of innate immunity in neurodegenerative disorders[J]. *Front Pharmacol*, 2011, 2: 77.
- [15] Miyazaki I, Asanuma M, Murakami S, et al. Targeting 5-HT(1A) receptors in astrocytes to protect dopaminergic neurons in Parkinsonian models[J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 59: 244-256.
- [16] Powers KM, Smith-Weller T, Franklin GM, et al. Dietary fats, cholesterol and iron as risk factors for Parkinson's disease[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2009, 15(1): 47-52.
- [17] Bae SK, Heo CH, Choi DJ, et al. A ratiometric two-photon fluorescent probe reveals reduction in mitochondrial H₂S production in Parkinson's disease gene knockout astrocytes[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(26): 9915-9923.
- [18] Hu LF, Lu M, Tiong CX, et al. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models[J]. *Aging Cell*, 2010, 9(2): 135-146.
- [19] Xie L, Hu LF, Teo XQ, et al. Therapeutic effect of hydrogen sulfide-releasing L-Dopa derivative ACS84 on 6-OH-DA-induced Parkinson's disease rat model[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60200.
- [20] Sparatore A, Santus G, Giustarini D, et al. Therapeutic potential of new hydrogen sulfide-releasing hybrids[J]. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 2011, 4: 109-121.
- [21] Cao TT, Ma L, Kandpal G, et al. Increased nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 activity protects SH-SY5Y cells against oxidative damage[J]. *J Neurochem*, 2005, 95: 406-417.
- [22] Hu LF, Lu M, Wu ZY, et al. Hydrogen sulfide inhibits rotenone-induced apoptosis via preservation of mitochondrial function[J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75: 27-34.
- [23] Zoccollella S, dell'Aquila C, Abruzzese G, et al. Hyperhomocysteinemia in levodopa-treated patients with Parkinson's disease dementia[J]. *Mov Disord*, 2009, 24(7): 1028-1033.
- [24] Kamat PK, Kalani A, Givvimani S, et al. Hydrogen sulfide attenuates neurodegeneration and neurovascular dysfunction induced by intracerebral-administered homocysteine in mice[J]. *Neuroscience*, 2013, 252: 302-319.
- [25] Yang G, Wu L, Jiang B, et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant; hypertension in mice with deletion of cystathionine-gamma-lyase[J]. *Science*, 2008, 322(5901): 587-590.
- [26] Kida K, Yamada M, Tokuda K, et al. Inhaled hydrogen sulfide prevents neurodegeneration and movement disorder in a mouse model of Parkinson's disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(2): 343-352.