

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.26.048

硫化氢与阿尔茨海默病的研究进展*

甘忻灵 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: 阿尔茨海默病;硫化氢;淀粉样前体蛋白;炎症;细胞凋亡

中图分类号: R749.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)26-3530-03

硫化氢(Hydrogen sulfide, H₂S)是继 NO 和 CO 之后发现的又一新型气体信号分子^[1]。近 20 年的研究已揭示, H₂S 在中枢神经系统中具有重要的生理功能,如保护神经细胞及组织免受 β 淀粉样蛋白(Aβ)、脂多糖、同型半胱氨酸等引起的炎症、细胞凋亡和氧化应激损伤等, H₂S 起着重要的神经调质和神经保护作用。离体和在体实验显示, H₂S 水平降低导致多种代谢通路功能紊乱和细胞损害等组织病理学改变,补充外源性 H₂S 后其病理学改变及临床表现均获得明显改善,说明 H₂S 可能参与了神经变性疾病的发生过程。临床试验中发现,在阿尔茨海默病(AD)和一些神经系统变性疾病患者体内 H₂S 的水平明显下降,且其水平的改变与疾病的严重程度相关^[2]。本文就 H₂S 与 AD 的研究进展做一综述。

1 内源性 H₂S 的合成代谢与神经生理调节作用

1.1 内源性 H₂S 的合成与代谢 自然界中的 H₂S 是一种有臭鸡蛋气味的有毒气体。上世纪 90 年代以后,人们发现内源性 H₂S 广泛存在于哺乳动物的多种组织器官中,并通过多种调节和信号传导的形式在生理、病理过程中发挥重要作用。

在体内,内源性 H₂S 主要以 L-半胱氨酸为底物,由胱硫醚 β 合成酶(CBS)或胱硫醚 γ 裂解酶(CSE)催化生成。产生的 H₂S 也对 CSE 和 CBS 具有负反馈调节作用。CBS 主要分布于星形胶质与小胶质细胞中。CSE 主要分布在外周血管组织中^[1,3]。在对 CBS 基因敲除的小鼠的脑组织匀浆检测后发现, H₂S 的浓度与普通小鼠的脑组织匀浆中的浓度相近,提示脑组织中除 CBS 外,有另一种合成 H₂S 的酶^[4]。后发现,除了 CBS 和 CSE, 3-巯基丙酮酸转硫酶(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, 3-MST)与半胱氨酸转氨酶(cysteine aminotransferase, CAT)也可以以半胱氨酸为底物合成 H₂S^[4]。3-MST 主要表达于神经元和血管内皮中。

1.2 H₂S 的神经保护作用 生理浓度下的 H₂S 对大脑功能的调节有重要的作用。首先, H₂S 可通过调节神经元胞体内的环磷酸腺苷(cAMP)水平增加门冬氨酸(NMDA)受体介导的突触后兴奋性电位,从而易化海马长时程记忆增强(Long term potential, LTP)的产生。其次, H₂S 可通过调节胶质细胞内的钙波而调节胶质细胞与周围细胞进行信息的交换。H₂S 作为一种内源性的还原剂,可通过逆转谷氨酸对胱氨酸的抑制作用,从而使胱氨酸的转运率增高而提高谷胱甘肽(gultathione, GSH)的生成率,从而起到保护神经细胞的作用。

内源性 H₂S 不仅具有生理调节作用,对 AD 等神经系统变性疾病也有潜在的影响。离体实验表明, H₂S 可通过保护神经元低氧损伤、抗氧化以及抑制细胞凋亡等方面发挥重要作用,

从而起到延缓 AD 的发生与发展作用。

2 内源性 H₂S 与 AD 的相关性研究

2.1 H₂S 与淀粉样前体蛋白(amyloid precursor peptide, APP)的代谢 以 Aβ 为核心的老年斑沉积是 AD 特征性病理改变之一。主要通过 APP 经淀粉样代谢途径产生。在淀粉样物质途径中, β-分泌酶即 β 位淀粉样前体蛋白裂解酶(beta-site APP-cleaving enzyme, BACE1)在 Aβ 的 N-末端裂解 APP,产生可溶性片段 sAPPβ 和含膜成分的 C-末端片段 C99。C99 进一步由 γ-分泌酶裂解为 Aβ 和 (APP intracellular domain, AICD)。在对 Aβ 的研究过程中发现, AD 的其他病理变化如 tau 蛋白过度磷酸化、蛋白激酶激活、氧化应激、自由基形成、细胞内钙离子稳态破坏、诱导凋亡、慢性炎症、补体激活等都与 Aβ 毒性作用相关^[5]。且脑内 Aβ 水平增加与认知功能下降呈正相关^[6]。可以推测 Aβ 是 AD 疾病过程中关键的病理因素^[5-7]。那么如果 H₂S 可降低 β 分泌酶和 γ 分泌酶的活性,抑制淀粉样物质代谢途径,就可减少 Aβ 生成,减轻 Aβ 的病理损害,减轻 AD 症状、延缓 AD 进展。为证实以上观点进行了相关研究, Nagpure 等^[8]用 HENECA(选择性 A2A 受体激动剂, 10~200 nmol/L)诱导 SH-SY5Y 细胞产生 Aβ42, 再加用 NaHS(100 μmol/L)后, Aβ42 的浓度有明显的降低^[8]。但通过测量以 BACE1 介导分裂生成的胞嘧啶为末端的 APP 碎片发现, NaHS 对 β 分泌酶无明显影响;再对 HENECA 刺激升高的 γ 分泌酶活性和早老素 mRNA 表达的直接测量表明, NaHS 在细胞中通过抑制 γ 分泌酶而抑制 Aβ42 的生成,同时伴有细胞内 cAMP 水平的降低^[8]。由此作者推测, SH-SY5Y 细胞中, H₂S 是通过 cAMP 依赖的途径抑制 γ 分泌酶而降低 HENECA 诱导的 Aβ42 产生^[8]。那么争对 H₂S 对 BACE1 是否有影响, Zhang 等^[9]对 PC12 细胞中 H₂S 浓度与 BACE1 的表达和 Aβ 的分泌的相关性进行了研究。分别用 NaHS(10、25、50、100、200 μmol/L 的浓度)处理 PC12 细胞。16 h 后利用 PCR 和 Western blot 分别对每组的 BACE1 mRNA 和蛋白质水平进行检测。发现在用 NaHS(10、25、50 μmol/L)处理后的 3 组 PC12 细胞的 BACE1 mRNA 和蛋白质水平呈浓度依赖性降低。然而进一步增加 NaHS 的浓度并不会增加其对 BACE1 的影响。为进一步探寻 NaHS 影响 BACE1 mRNA 和蛋白水平的机制,作者用 50 μmol/L 的 NaHS 对 PC12 进行处理,得到的裂解产物进行 Western blot 分析,发现 H₂S 通过 P13-K/AKT 和 MAPK/ERK 途径影响 BACE1 的表达和 Aβ 的分泌^[9]。APP 不仅有可生成 Aβ 的淀粉样物质代谢途径,还有非

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81271222);重庆市医学科研计划重点项目(2010-1-17)。 作者简介:甘忻灵(1989—),在读硕士研究生,主要从事老年痴呆的研究。 △ 通讯作者, Tel:13983989050; E-mail:yyanpro@163.com。

淀粉样代谢途径, H_2S 是否可通过促进非淀粉样代谢途径来减少 $A\beta$ 的生成, He 等^[10]用 APP/PS1 (APPswe \times PS1De9) 双转基因小鼠进行了研究。给 4 个月龄和 10 个月龄的双转基因小鼠用 NaHS 腹腔注射给药 (50 μ mol/kg, 隔日 1 次, 共 60 d) 后, 与未用 NaHS 处理的小鼠海马及皮质处 $A\beta$ 浓度进行比较时发现前者的 $A\beta$ 浓度有明显的降低。然而用腹腔注射 NaHS (20 μ mol/kg, 隔日 1 次, 共 60 d) 处理后的 6 个月龄和 12 个月龄小鼠海马及皮质处 $A\beta$ 浓度无明显的降低。进一步检测以上小鼠海马及皮质处的 BACE1 的表达发现, 腹腔注射 NaHS (50 μ mol/kg, 隔日 1 次, 共 60 d) 处理后的 6 个月龄双转基因小鼠的 BACE1 的表达有明显的降低, 而分别以 20 μ mol/L 及 50 μ mol/L 的 NaHS 以相同方法处理后的 12 个月龄的双转基因小鼠的 BACE1 水平均有显著降低。且以这两种浓度、相同方法处理后的 6 个月龄及 12 个月龄的双转基因小鼠的 C99 及 PS1 水平均降低。实验结果表明, 一定浓度的外源性的 H_2S 可促进 APP 的非淀粉样代谢途径, 减少 $A\beta$ 的生成^[10]。由上述实验结果可以推测, 外源性 H_2S 可从 BACE1、 γ 分泌酶以及促进 APP 的非淀粉样物质途径代谢 3 方面减少 $A\beta$ 的生成, 减轻其对神经系统的毒性以及 AD 的病理损害。

2.2 H_2S 抗炎作用 在神经系统退行性病变过程中, 炎症反应是普遍的诱因^[11-12]。神经系统炎症对大脑的损伤包含了一系列复杂的反应, 包括胶质细胞激活, 炎症介质释放及外周免疫细胞的浸润。越来越多的实验证明神经系统炎症与 AD 的病理过程有紧密的联系^[13]。小胶质细胞和星形胶质细胞, 补体系统的经典和替代途径、五聚环蛋白、急性期蛋白、神经元烟碱乙酰胆碱受体、过氧化物酶体增殖物激活受体、及“促炎性细胞”的细胞因子和趋化因子等神经炎症组分均与 AD 相关^[14]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 脑室内注射可导致脑内肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1) 蛋白表达显著增加, 引起神经系统炎症, 故常用 LPS 做神经系统炎症模型。基于活体中 H_2S 的抗炎作用, 一些研究者运用实验证明外源性 H_2S 供体 NaHS 是否可防止神经系统炎症所致的认知功能障碍。Gong 等^[15]利用手术的方法将 LPS (5 μ g LPS 溶于 5 μ L 生理盐水) 注射入小鼠的双侧脑室, 再将其分组, 一组连续 12 d 腹腔注射 NaHS (5 μ g/kg, 术前 3 d 以及术后 9 d), 一组予以生理盐水注射。手术后的第五天开始连续进行 5 d 的水迷宫实验, 证实运用 NaHS 处理后的小鼠的认知功能降低不明显, 而未用 NaHS 处理的小鼠认知功能相比于未注射 LPS 的小鼠下降明显^[15]。那么 NaHS 是通过何种机制改善 LPS 引起的神经系统炎症对小鼠认知功能的影响。Gong 等^[15]通过 Western blot 检测 TNF α 以及 TNFR1 蛋白提示, NaHS 可显著降低 LPS 引起的 TNF α 以及 TNFR1 蛋白的升高。他们进一步通过 Western blot 检测核因子 κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65) 的磷酸化发现, NaHS 可显著降低 LPS 诱导的 NF- κ B p65 磷酸化。由此可推测, NaHS 可通过抑制 NF- κ B 的活化抑制 LPS 诱导产生的 TNF- α 以及 TNFR1, 从而抑制神经系统炎症^[15]。 H_2S 可对 TNF- α 以及 TNFR1 产生抑制作用, 那么对白细胞介素 6 (IL-6)、一氧化氮 (NO) 等促炎介质是否有抑制作用呢。在 Lee 等^[16]对 SH-SY5Y 的研究中, 用 LPS 介导 SH-SY5Y 细胞产生 IL-6、NO 等促炎因子后, 再运用 H_2S 的释放物 (茵三硫氢氧化物, S-双氯芬酸, S-阿司匹林) 处理, 最后对 SH-SY5Y 的培养上清液检测发现, 与运用 H_2S 的释放物处理之前细胞培养上清液中 IL-6、NO 等促炎因

子浓度相比, 此时的上清液促炎因子的浓度降低明显。然而直接将上述 3 种 H_2S 释放物用于处理未经 LPS 处理的 SH-SY5Y 细胞中, 却未见明确作用, 表明这几种物质对神经炎症性疾病的治疗有潜在的意义^[16]。可推测, H_2S 对神经系统中主要的促炎因子 TNF- α 、TNFR1 以及 IL-6 等都具有抑制作用, 从而抑制神经系统炎症、降低促发 AD 病理变化的危险因素。

2.3 H_2S 抗凋亡作用 神经元缺失是 AD 重要的病理特征, 而细胞凋亡是神经元缺失的主要途径和形式。缺氧缺糖/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 能诱导神经元细胞中活性氧物质 (reactive oxygen species, ROS) 产生过剩, 过量的 ROS 通过损伤线粒体的功能导致神经元的凋亡。Luo 等^[17]用 OGD/R 处理神经元前先用 NaHS 预处理 30 min、N-乙酰-L-半胱氨酸 (N-acetyl-L-cysteine, NAC) 处理 60 min 后将其在氧浓度为 2% 的环境下温育 4 h, 复氧 12 h 后检测 ROS 的浓度以及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 的活性。发现 H_2S 可防止 OGD/R 引起的细胞内 ROS 的增高以及 caspase-3 的活化, 从而防止神经元的凋亡^[17]。然而在进一步观察 H_2S 对细胞凋亡的抑制的研究中发现, 缓慢释放 H_2S 的供体 5-对羟基苯基-1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮 (ADTOH) 比快速释放 H_2S 的供体 NaHS 更能有效地抑制神经元的凋亡^[18]。表现在: (1) ADTOH 能比 NaHS 更有效地降低 ROS 的水平; (2) ADTOH 比 NaHS 更能有效地防止细胞活力的下降。 (3) ADTOH 更能有效地刺激小鼠视网膜节细胞 (ganglion cells, RGC-5 cells) 内抗氧化物质, 例如谷胱甘肽 (GSH) 水平的升高等方面, 通过有效地抑制氧化应激, 从而达到抑制神经元凋亡的目的^[18]。基于以上体外实验中 H_2S 对神经元凋亡的抑制, 对 AD 模型的小鼠进行研究。Xuan 等^[19]将 $A\beta$ 40 (10 μ mol/L 融入 10 μ L 的 PBS) 注射入海马齿状回表面模拟 AD。连续 12 d 腹腔注射 NaHS [5 mg/(kg \cdot d)], 注射 $A\beta$ 前 3 d 以及后 9 d), 利用 Morris 水迷宫检测其认知能力, 发现 NaHS 预处理后 AD 模型小鼠, 其学习、记忆障碍水平改善明显。NaHS 处理后的 AD 小鼠的海马 CA1 区神经元凋亡情况有明显的改善。利用 Western blot 检测的二基磷酸 p38 促分裂原活化激酶 (MAPK), 二基磷酸 p65 核因子 κ B (phospho-65 nuclear factor- κ B) 以及二基磷酸-c-Jun N 端激酶 (JNK) 的检测发现, 经 NaHS 处理后 p38 蛋白和 p-NF- κ B p65 的磷酸化水平明显降低, 且没有出现 $A\beta$ 注射海马后的 JNK 的磷酸化。由此可见, NaHS 可通过抑制 p38 和 p-NF- κ B p65 活性来改善对小鼠空间学习和记忆功能, 减轻神经元凋亡^[19], 改善 AD 的症状。不仅如此, 在对 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$), 1-甲基-4-苯基吡啶 (MPP+), 6-羟基多巴胺 (6-OHDA), 鱼藤酮, 高半胱氨酸, 和缺氧复氧等各种损伤诱导的 PC12 和 SH-SY5Y 细胞和原代培养的海马神经元的凋亡研究时发现, NaHS 在低浓度 (<300 μ mol/L) 时可明显抑制以上损伤所致的神经元凋亡, 进一步研究发现 H_2S 可通过维持线粒体膜电位稳定和抑制细胞色素 C 释放与 caspase 级联反应的激活等且起到防止神经元死亡的作用^[20-23]。这些证据说明, 外源性增加 H_2S 可从各个方面改善引起 AD 的病理改变以及认知功能障碍, 这为 H_2S 对 AD 的治疗提供了新的依据。

3 展 望

临床和实验证实 AD 患者脑内 H_2S 浓度降低, 离体和在体实验发现降低 H_2S 浓度会引起模型动物氧化应激损伤、 $A\beta$

级联反应和神经元凋亡等,补充外源性 H_2S 供体能使促发 AD 的相关神经递质和神经病理变化显著改善,表明脑内生理浓度的 H_2S 是具有保护神经元的重要气体信号分子。但目前的研究还刚刚起步,很多问题还需要深入探讨,如 H_2S 发挥生理功能和致病作用的靶点有哪些? 近期 Lee 等^[16] 对 SH-SY5Y 细胞的实验中发现, H_2S 与 NO 同时存在时,抗炎能力强于 2 种气体单独存在的时候。已知 H_2S 与 NO 和 CO 有共同的洗涤槽,那么 3 者间的相互作用怎样? H_2S 本身具有神经毒性,超出生理浓度的 H_2S 会产生毒性作用,怎样才能保证外源性 H_2S 供体或药物摄入后在体内释放和维持恰当的 H_2S 生理浓度?

参考文献:

- [1] Hu LF, Lu M, Hon Wong PT, et al. Hydrogen sulfide: neurophysiology and neuropathology[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(2): 405-419.
- [2] Liu XQ, Liu XQ, Jiang P, et al. Plasma levels of endogenous Hydrogen sulfide and homocysteine in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia and the significance thereof[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008, 88(32): 2246-2249.
- [3] Kimura H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions[J]. *Amino acids*, 2011, 41(1): 113-121.
- [4] Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, et al. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces Hydrogen sulfide and bound sulfane Sulfur in the brain[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(4): 703-714.
- [5] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's Disease[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(4): 329-344.
- [6] Laske C, Sopova K, Gkotsis C, et al. Amyloid- β peptides in plasma and cognitive decline after 1 year follow-up in Alzheimer's disease patients[J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 21(4): 1263-1269.
- [7] Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(7): 812-818.
- [8] Nagpure BV, Bian JS. Hydrogen sulfide inhibits A2A adenosine receptor agonist induced β -amyloid production in SH-SY5Y neuroblastoma cells via a cAMP dependent pathway[J]. *PLoS one*, 2014, 9(2): e88508.
- [9] Zhang H, Gao Y, Zhao F, et al. Hydrogen sulfide reduces mRNA and protein levels of β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 in PC12 cells[J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(2): 169-175.
- [10] He XL, Yan N, Zhang H, et al. Hydrogen sulfide improves spatial memory impairment and decreases production of A β in APP/PS1 transgenic mice[J]. *Neurochem Int*, 2014, 67: 1-8.
- [11] Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression[J]. *Trends Immunol*, 2008, 29(8): 357-365.
- [12] Mrak RE. Neuropathology and the neuroinflammation idea[J]. *J Alzheimers Dis*, 2009, 18(3): 473-481.
- [13] Amor S, Puentes F, Baker D, et al. Inflammation in neurodegenerative diseases[J]. *Immunology*, 2010, 129(2): 154-169.
- [14] Jellinger KA. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update[J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(3): 457-487.
- [15] Gong QH, Wang Q, Pan LL, et al. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment: a pro-inflammatory pathway in rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2010, 96(1): 52-58.
- [16] 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.
- [17] Luo Y, Yang X, Zhao S, et al. Hydrogen sulfide prevents OGD/R-induced apoptosis via improving mitochondrial dysfunction and suppressing an ROS-mediated caspase-3 pathway in cortical neurons[J]. *Neurochem Int*, 2013, 63(8): 826-831.
- [18] Majid AS, Majid AM, Yin ZQ, et al. Slow regulated release of H_2S inhibits oxidative stress induced cell death by influencing certain key signaling molecules[J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(7): 1375-1393.
- [19] Xuan A, Long D, Li J, et al. Hydrogen sulfide attenuates spatial memory impairment and hippocampal neuroinflammation in β -amyloid rat model of Alzheimer's disease[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 202.
- [20] Tiong CX, Lu M, Bian JS. Protective effect of Hydrogen sulphide against 6-OHDA-induced cell injury in SH-SY5Y cells involves PKC/PI3K/Akt pathway[J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 161(2): 467-480.
- [21] Shao JL, Wan XH, Chen Y, et al. H_2S protects hippocampal neurons from anoxia-reoxygenation through cAMP-mediated PI3K/Akt/p70S6K cell-survival signaling pathways[J]. *J Mol Neurosci*, 2011, 43(3): 453-460.
- [22] Tang XQ, Shen XT, Huang YE, et al. Hydrogen sulfide antagonizes homocysteine-induced neurotoxicity in PC12 cells[J]. *Neurosci Res*, 2010, 68(3): 241-249.
- [23] Hu LF, Lu M, Wu ZY, et al. Hydrogen sulfide inhibits rotenone-induced apoptosis via preservation of mitochondrial function[J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(1): 27-34.

(收稿日期: 2014-04-20 修回日期: 2014-06-13)