

# 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

牛海名, 宋志明, 彭沛, 刘勇, 郝宝顺, 朱洁明, 陈璘, 钱孝贤\*  
(1 中山大学附属第三医院心血管内科, 广东广州 510630)

**摘要:**【目的】探讨硫化氢(H<sub>2</sub>S)对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导的人脐静脉内皮细胞衰老的影响及其抗氧化机制。【方法】建立 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人脐静脉内皮细胞衰老模型,采用不同浓度的硫氢化钠(NaHS)预处理内皮细胞,观察其对衰老的作用。【结果】与对照组相比,60 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 预处理后,能显著提高细胞 SA β-gal 阳性率和血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)的表达,同时增加丙二醛(MDA)含量,但减少过氧化物歧化酶 1(SOD1)的表达。而 NaHS 的预处理可以显著减少细胞 SA β-gal 阳性率和 PAI-1 的表达,减少 MDA 的含量,增加 SOD1 的表达。【结论】NaHS 可以逆转 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的内皮细胞衰老,其机制与抗氧化应激有关。

【关键词】硫化氢;内皮细胞;过氧化氢;衰老;氧化应激

中图分类号:R339.3+8 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2014)03-0346-06

## Hydrogen Sulfide Reverses Human Umbilical Vein Endothelial Cells Senescence Induced by Hydrogen Peroxide

NIU Hai-Ming, SONG Zhi-Ming, PENG Pei, LIU Yong, HAO Bao-Shun, ZHU Jie-Ming, CHEN Lin,  
QIAN Xiao-Xian\*

(Department of Cardiology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sun University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effect of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) senescence established by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 【Methods】 The senescence was established by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the effects of NaHS on the senescence was investigated. 【Results】 Compared with the control group, after treated with 60 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the number of SA β-gal positive cells and the expression of PAI-1 significantly increased. Meantime, MDA concentration increased but the expression of SOD1 decreased in the senescent cells. However, after pretreatment of NaHS, the ratio of SA β-gal positive cells, the expression of PAI-1 and the MDA concentration decreased significantly, but the expression of SOD1 increased. 【Conclusion】 NaHS could reverse HUVEC senescence induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The anti-peroxide effects of NaHS appears to be particular importance.

**Key words:** hydrogen sulfide; human umbilical vein endothelial cells; hydrogen peroxide; senescence; oxidative stress

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(3):346-351]

动脉粥样硬化是导致心血管疾病的发生率与死亡率居高不下的主要原因,严重危害人们生命健康,而内皮细胞的衰老在其中有重要作用。随着衰老的发生,内皮细胞形态上表现为体积增大,扁平,胞质内颗粒增多;功能上表现为细胞增殖,迁移或者舒张反应减弱,从而导致内皮依赖功能受损<sup>[1]</sup>。衰老的内皮细胞与年龄相关性血管疾

病如动脉粥样硬化等密切相关<sup>[2]</sup>。更有研究表明内皮细胞衰老以及功能障碍能诱发各种心血管损伤,因此,逆转内皮细胞早期衰老对于动脉粥样硬化有着重要的意义<sup>[3-4]</sup>。硫化氢(H<sub>2</sub>S)是继一氧化氮(nitric oxide, NO)和一氧化碳(carbon monoxide, CO)后发现的第 3 个内源性气体信使<sup>[5]</sup>。大量研究发现,硫化氢可以缩小动脉粥样硬化斑块,延缓动

收稿日期:2014-01-21

基金项目:国家自然科学基金项目(81370447);广东省科技计划项目(2011B031800024);广州市科技计划项目(2011B031800155)

作者简介:牛海名,硕士研究生,研究方向:动脉粥样硬化的防治, E-mail:nhmlyzh@qq.com。\* 通信作者:钱孝贤,教授,博士生导师,研究方向:动脉粥样硬化和心肌缺血的防治研究, E-mail:xiaoxianq@tom.com

脉粥样硬化斑块的形成,并且体内  $H_2S$  水平的下降是动脉粥样硬化形成的重要原因之一<sup>[6]</sup>。国内外的研究也已经证实  $H_2S$  可以对抗诱导的内皮细胞的衰老,然而对于  $H_2S$  对抗细胞老化的作用及其机制,至今尚未完全阐明。研究资料表明, $H_2S$  在多种组织中发挥抗氧化应激和细胞保护作用<sup>[7-8]</sup>, $H_2S$  可通过降低细胞内 ROS 水平和阻止线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)下降来保护细胞免于氧化应激损伤<sup>[9]</sup>。因此,本实验采用过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)衰老模型,观察外源性  $H_2S$  对衰老的影响,并进一步探讨  $H_2S$  对抗人脐静脉内皮细胞早衰的机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

人原代脐静脉内皮细胞(HUVEC,脐带取自中山大学附属第三医院产科健康剖宫产产妇),第二至四代用于实验。细胞培养试剂包括胎牛血清,无血清培养基, M199 培养基, I 型胶原酶, 0.05% EDTA 胰酶购自于 GIBCO 公司, 内皮细胞生长添加剂(ECGS)购自于 BD 公司。硫化氢( $NaHS$ )购自于 Sigma 公司, 30%过氧化氢、SA  $\beta$ -gal 衰老染色相关试剂购自于广州化学试剂厂。NO 测试盒和 MDA 测试盒购自于南京建成生物工程研究所。

### 1.2 HUVEC 原代提取及培养

取健康新生儿脐带, 在无菌条件下用 PBS 冲洗 3 遍, 然后用 0.1%胶原酶(1 型)消化 15 min, 收集胶原酶细胞混合液, 离心后弃上清, 加完全培养基(20%FBS, 20%SFEM 和 60  $\mu$ g/mL ECGS)混匀种于培养瓶培养。

在显微镜下观察细胞形态, 细胞呈“铺路石”样。同时取第 1 代细胞, 消化收集后交由中山大学附属第三医院中心实验室检测细胞表面标志物 CD31。在建立过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞衰老模型时, 细胞分为空白对照组(0  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$ )和模型组(60  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$ ); 在探讨硫化氢逆转内皮细胞早衰及其机制时分为: 空白对照组(0  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$ )、模型组(60  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$ )、50  $\mu$ mol/L  $NaHS$  干预组、100  $\mu$ mol/L  $NaHS$  干预组和 200  $\mu$ mol/L  $NaHS$  干预组。

### 1.3 硫化氢( $NaHS$ )对细胞增殖的影响

指数生长期 HUVEC 以每孔 4000 个细胞密度接种于 96 孔板中。不同浓度  $NaHS$  处理 24 h 后, 向每孔加入 MTT 20  $\mu$ L(5 mg/mL), 继续培养 4 h, 弃去孔内上清液, 每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L, 在摇床上低速振荡 15 min, 使结晶物充分溶解, 在酶联免疫检测仪 490nm 处测吸光值。

### 1.4 丙二醛(MDA)含量

取各组细胞的培养液, 按照南京建成生物工程研究所提供的试剂盒操作规范进行检测。

### 1.5 Western Blot

预先配好蛋白提取液, 按南京凯基生物有限公司全蛋白提取试剂盒说明书操作, 每 700  $\mu$ L 裂解液加入 7  $\mu$ L 磷酸酶抑制、3.5  $\mu$ L PMSF 和 0.7  $\mu$ L 蛋白酶抑制剂。用 PBS 清洗细胞 2 次, 按照培养孔底面积的大小加入不同体积蛋白提取液, 冰上裂解 10 min, 以细胞刮轻轻刮下细胞, 将细胞提取液吸至预先标记的预冷 EP 管, 冰上以摇床混匀裂解 15 min; 4  $^{\circ}C$  14 000  $\times g$  离心 15 min; 小心吸取上清至新的 EP 管, 为蛋白提取液, 以 BCA 法测定蛋白浓度, 分装保存于 -80  $^{\circ}C$  冰箱。

各泳道蛋白上样总量为 20  $\mu$ g, 样品蛋白经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移至偏聚二氟乙烯(PVDF)膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加一抗, 放入 4  $^{\circ}C$  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, 然后加二抗室温孵育 1 h, 弃去二抗, 1 $\times$ TBST 摇床上清洗 3 次, ECL 显影, Quantity One 软件分析蛋白条带

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS19.0 分析软件, 定量数据以均数 $\pm$ 标准差(mean  $\pm$  SD)表示, 均数间差异采用方差分析和  $t$  检验,  $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结 果

### 2.1 HUVEC 的鉴定

经流式细胞术检测细胞表面 CD31, 结果显示所取细胞的第一代细胞 CD31 表达率 98.99%, 均符合内皮细胞特性(图 1)。

### 2.2 衰老模型的建立

根据相关文献报道<sup>[10-11]</sup>, 30-100  $\mu$ 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明显凋亡。当细胞生长至约 70%时, 加入

60  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  刺 1 h, 后换成正常培养基培养 24 h。我们发现 60  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理组与对照组相比, 细胞生长缓慢, 失去铺路石样排列外观, 形态改变, 细胞呈扁平状, 漂浮细胞增多, 贴壁细胞数目减少(图 2)。同时, 我们又进行了 SA  $\beta$ -gal 衰老染色, 我们发现与对照相比, 60  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激组衰老细胞率明显增多(图 3)。为了进一步验证细胞衰老模型, 我们检测了另一个衰老标志物 PAI-1。如图 4 所示, 与对照组相比, 60  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  组 PAI-1 表达明显增加。另外为了排除凋亡对本实验的影响, 我们进行了凋亡实验, 从图 5 可以看出, 60  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理组与对照组相比较, 早调细胞比率无统计学意义的差别( $P > 0.05$ )。

### 2.3 硫化氢对内皮细胞生长的影响

为了排除硫化氢对人脐静脉内皮细胞生长的影响, 我们进行了 MTT 检测, 如图 6 所示: 与对照组相比, 50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$  及 200  $\mu\text{mol/L}$  硫化氢钠预孵育 24 h 后, 细胞活性无统计学差异( $P > 0.05$ )。所以我们可以认为 50  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  及 200  $\mu\text{mol/L}$  硫化氢钠预孵育 24 h 对人脐静脉内皮细胞的生长没有影响。

### 2.4 硫化氢对内皮细胞衰老的影响

为了探讨硫化氢是否具有抗衰老的作用, 我们用不同浓度的硫化氢钠预处理细胞 24 h 后, 再加入 60  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激细胞 1 h, 培养 24 h 后, 收集各组蛋白进行 PAI-1 蛋白水平的测定。从图 7 可以看出, 与对照组相比, 60  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激组 PAI-1 表达增加( $P < 0.05$ ), 而加入 50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$  及 200  $\mu\text{mol/L}$  硫化氢钠预孵育 24 h 组能减少 PAI-1 蛋白水平表达( $P < 0.05$ ), 其减轻程度具有浓度梯度性。同样, 在图 8 衰老染色中, 我们可以看到, 与对照组相比, 衰老模型组 SA  $\beta$ -gal 阳性率明显增加( $P < 0.01$ ); 各浓度 NaHS 组细胞 SA  $\beta$ -gal 阳性率明显低于衰老模型组( $P < 0.05$ ), 也同时提示 NaHS 可减轻内皮细胞的衰老其减轻程度具有浓度梯度性(图 8)。

### 2.5 NaHS 对 SOD 活性的影响

与对照组相比, 60  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激组 SOD-1 表达明显减少( $P < 0.01$ ), 与早衰模型组相比, 50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$  及 200  $\mu\text{mol/L}$  硫化氢钠预孵育 24 h 组 SOD-1 蛋白表达显著增加( $P < 0.01$ ), 其增加程度具有硫化氢钠浓度梯度性。提示 NaHS 可提高老年内皮细胞的 SOD-1 活性, 进而

我们推测 NaHS 可提高老年内皮细胞的 SOD 的活性, 从而增强清除细胞内氧自由基的作用(图 9)。

### 2.6 NaHS 对 MDA 含量的影响

MDA 是脂质过氧化反应的中间产物, 其高低间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度。如图 10 所示, 与对照组相比, 模型组细胞 MDA 含量显著升高( $P < 0.01$ ), 而加入 50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$  及 200  $\mu\text{mol/L}$  硫化氢钠预孵育 24 h 组能减少模型组衰老细胞 MDA 含量( $P < 0.05$ ), 其减少程度具有硫化氢钠浓度梯度性。

## 3 讨论

实验结果显示外源性硫化氢可以降低 PAI-1 蛋白表达, 减少 SA  $\beta$ -gal 阳性率的细胞, 即成功延缓了人脐静脉内皮细胞的老化过程。这主要是通过减轻细胞的氧化应激, 上调了细胞 SOD-1 蛋白的表达, 提高 SOD 活性, 并减少细胞 MDA 含量和增加 NO 的产生。

氧化应激是指机体组织或细胞内氧自由基生成增加和(或)清除能力降低, 导致 ROS 在体内或细胞内蓄积而引起的氧化损伤过程。血管壁内可产生多种 ROS, 它们独自或联合参与了动脉粥样硬化的发生与发展过程, 并且造成。体内 ROS 的生成和清除是由 NADPH 氧化酶、线粒体呼吸链酶复合体、NOS 和 SOD 等多种酶系统参与完成。众所周知, SOD 是催化超氧阴离子生成过氧化氢的抗氧化酶<sup>[12]</sup>。它可以消除机体内氧自由基和抗脂质过氧化, 阻断氧自由基对组织的进一步损伤<sup>[13]</sup>, 它的异常表达与生命长短有关<sup>[14]</sup>。在给予外源性过氧化氢后, SOD 的活性以及表达减少也见于其他过氧化氢损伤模型的研究<sup>[15-16]</sup>。而 MDA 是脂质过氧化反应的中间产物, 其高低也间接地反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度。有研究显示,  $\text{H}_2\text{S}$  可以抑制凋亡来减轻高糖诱导的内皮细胞损伤<sup>[17]</sup>, 并且能作为抗氧化剂, 通过减少氧自由基、MDA 水平和增加 SOD 的活性减轻高糖引起的 HUVEC 的凋亡<sup>[18]</sup>。

在我们试验中, 衰老 HUVEC 模型与对照组相比, 细胞内脂质过氧化终产物 MDA 增加, 而抗氧化酶 SOD-1 表达减少, 这些结果也都证实了衰老的自由基学说<sup>[19-20]</sup>。也证实了我们的实验体系是适合于检测硫化氢通过氧化应激途径抗衰老的。

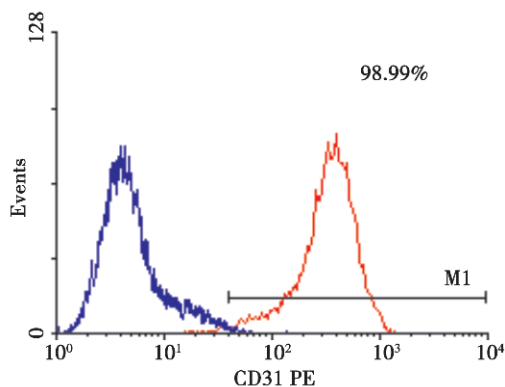
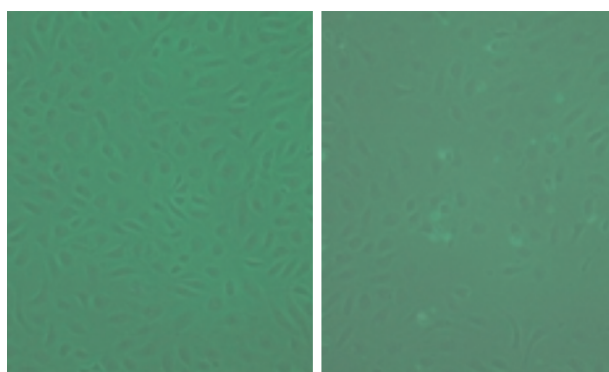


图 1 流式细胞术鉴定内皮细胞

Fig.1 The identification of HUVEC with flow cytometry



Control

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60 μmol/L

图 2 加入 60 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 HUVEC1h 后再换培养基培养 24 h 后的细胞形态 × 10

Fig.2 Representative cell morphology of HUVEC after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> × 10

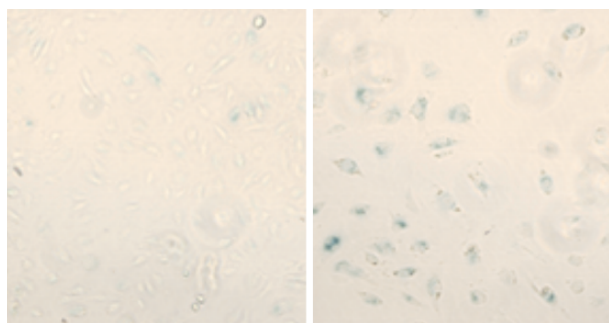


图 3 60 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 HUVEC1h 后再换培养基培养 24 h 后的细胞衰老染色图像 × 10

Fig.3 SA β-gal staining of HUVEC after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> × 10

既往的研究表明硫化氢能通过升高抗氧化酶的活性间接起到清除 ROS 的作用 [21], 尽管是模型不同,但实验结果与我们的很一致。本实验中,与衰

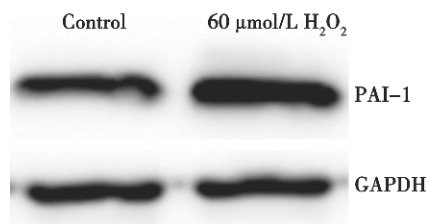


图 4 60 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 HUVEC1h 后再换培养基培养 24 h 后的细胞 PAI-1 蛋白表达

Fig.4 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreatment on the expression level of PAI-1 in HUVEC

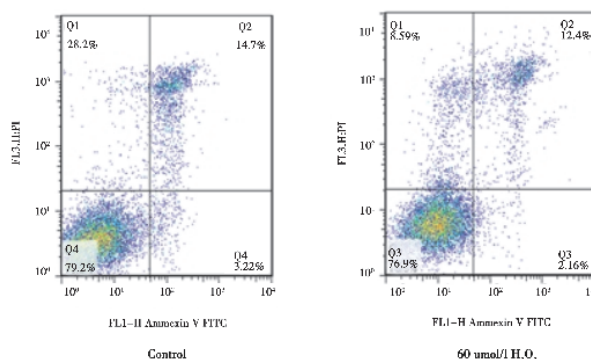


图 5 60 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对细胞凋亡的影响

Fig.5 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreatment on cellular apoptosis of HUVEC

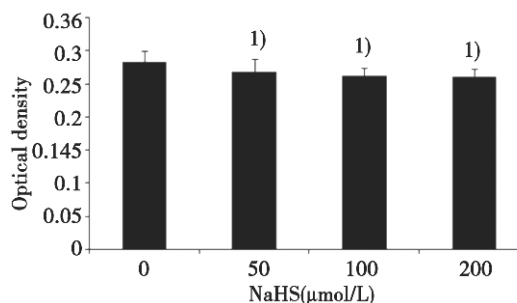


图 6 不同浓度 NaHS 对人脐静脉内皮细胞生长增殖的影响

Fig.6 Effect of NaHS pretreatment on growth proliferation of HUVEC

Mean ± SD, n = 6. 1)P > 0.05 vs Control

老模型组相比,加入不同浓度硫化氢预保护组细胞内 MDA 含量减少,SOD-1 表达增加,可以推测 SOD 的活性会增加,也间接地反应了对细胞内 ROS 清除的增加,从而发挥其抗氧化应激的作用来逆转衰老。

以上结果表明 H<sub>2</sub>S 预处理可以逆转 HUVEC 的衰老,这种保护作用的机制可能与 H<sub>2</sub>S 降低氧

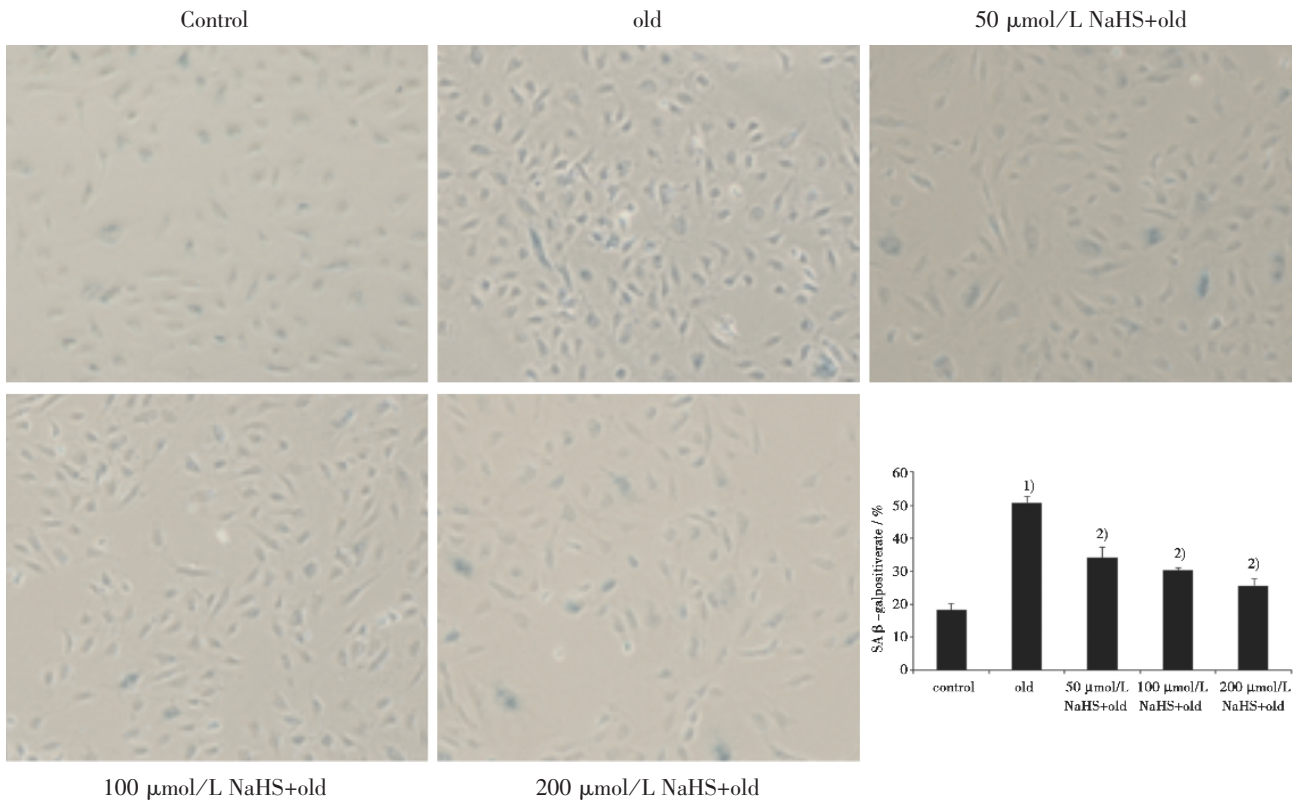


图 8 不同浓度 NaHS 预处理对各组细胞 SA β-gal 衰老染色的影响

Fig.8 Effect of NaHS pretreatment on the senescence of HUVEC detected by SA β-gal staining

SA β-gal-positive cells were stained blue. Mean±SD, n=3. 1)P<0.01 vs Control, 2)P<0.05 vs Old × 10.

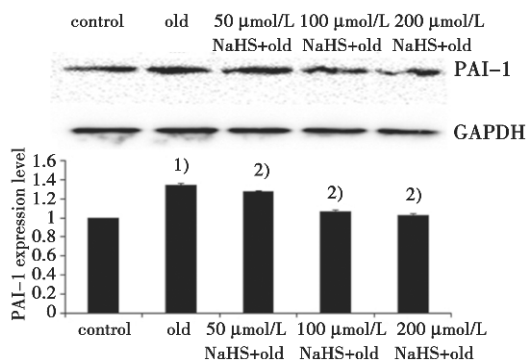


图 7 不同浓度 NaHS 预处理对各组细胞 PAI-1 蛋白表达的影响

Fig.7 Effect of NaHS pretreatment on the expression level of PAI-1 in HUVEC detected by Western blot

Mean±SD, n=3. 1)P<0.05 vs Control, 2)P<0.05 vs Old.

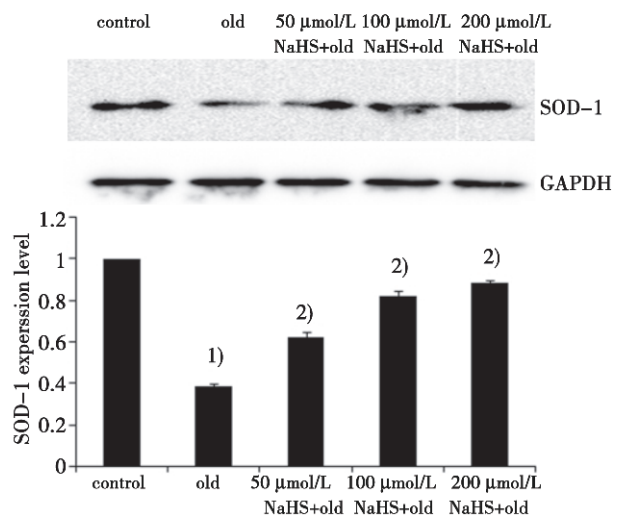


图 9 不同浓度 NaHS 预处理对各组细胞 SOD-1 蛋白表达的影响

Fig.9 Effect of NaHS pretreatment on the expression level of SOD-1 in HUVEC detected by Western blot

Mean±SD, n=3. 1)P<0.01 vs Control, 2)P<0.01 vs Old

化应激水平发挥抗老化的作用有关。本课题证实了硫化氢防治内皮细胞衰老的可行性以及可能机制，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。

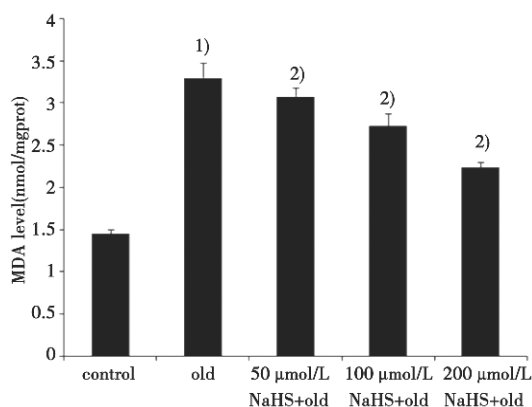


图10 不同浓度NaHS预处理对各组细胞MDA含量的影响  
Fig.10 Effect of NaHS pretreatment on the cellular level of MDA in HUVEC

Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . 1)  $P < 0.01$  vs Control, 2)  $P < 0.05$  vs Old.

#### 参考文献

- [1] Sato I, Morita I, Kaji K, et al. Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 195 (12): 1070-1076.
- [2] Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, et al. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction [J]. *Circulation*, 2002, 105(13): 1541-1544.
- [3] Marx N, Grant PJ. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease—the lull before the storm[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2007, 4(2): 82-83.
- [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 H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter [J]. *Fasebj*, 2002, 16(13): 1792-1798.
- [6] 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.
- [7] Kimura Y, Goto Y, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(1): 1-13.
- [8] Kimura Y, Dargusch R, Schubert D, et al. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(3-4): 661-670.
- [9] Chen SL, Yang CT, Yang ZL, et al. Hydrogen sulfide protects H9c2 cells against chemical hypoxia-induced injury[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(3): 316-321.
- [10] Oeseburg H, Iusuf D, Van DHP, et al. Bradykinin protects against oxidative stress-induced endothelial cell senescence[J]. *Hypertension*, 2009, 53(2): 417-422.
- [11] Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism[J]. *Trends Cell Biol*, 2001, 11(11): 27-31.
- [12] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression [J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33(3): 337-349.
- [13] Slemmer JE, Shacka JJ, Sweeney MI, et al. Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging[J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15(4): 404-414.
- [14] Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation [J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126(3): 365-379.
- [15] Liu CS, Chen NH, Zhang JT. Protection of PC12 cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity by salvianolic acid B, a new compound isolated from *Radix Salviae miltiorrhizae* [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(7-8): 492-497.
- [16] Shang YZ, Qin BW, Cheng JJ, et al. Prevention of oxidative injury by flavonoids from stems and leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi in PC12 cells [J]. *Phytother Res*, 2006, 20(1): 53-57.
- [17] 张媛, 韩辉, 高聆, 等. 硫化氢抑制高糖诱导的内皮细胞损伤的研究[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2012, 50(5): 1-4.
- [18] Zhang Y, Han H, Gao LY, et al. Mechanisms of hydrogen sulfide that attenuate high glucose-induced injury in endothelial cells [J]. *J Shandong Univers (Health Sci)*, 2012, 50(5): 1-4.
- [19] Guan Q, Zhang Y, Yu C, et al. Hydrogen sulfide protects against high glucose-induced apoptosis in endothelial cells[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011, 59(2): 188-193.
- [20] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry[J]. *Gerontol*, 1956, 11(3): 298-300.
- [21] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging [J]. *Nature*, 2000, 408(6809): 239-247.
- [22] 齐洪娜, 崔洁, 刘磊, 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[J]. *生理学报*, 2012, 64(4): 425-432.
- [23] Qi HN, Cui J, Liu L, et al. Exogenous hydrogen sulfide delays the senescence of human umbilical vein endothelial cells by lessening oxidative stress [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2012, 64(4): 425-432.

(编辑 孙慧兰)