

ATP敏感钾通道在硫化氢钠对抗 β -淀粉样肽 诱导细胞损伤中的作用

廖新学¹, 唐小卿³, 郭瑞鲜², 杨春涛¹, 刘 微², 陈培熹², 冯鉴强²

(中山大学 1. 附属第一医院心血管内科, 高血压血管科; 2. 中山医学院生理教研室, 广东 广州 510080;

3. 南华大学生理教研室, 湖南 衡阳 421001)

摘 要:【目的】探讨 ATP 敏感性钾通道 (K_{ATP}) 在硫化氢(H_2S) 对抗 β -淀粉样多肽 ($A\beta$) 诱导嗜铬细胞瘤细胞(PC12)细胞损伤中的作用。【方法】应用硫化氢钠(NaHS)作为 H_2S 的供体, 碘化丙啶(PI) 染色流式细胞技术(FCM) 检测细胞凋亡率, Hoechst 染色检测细胞凋亡的形态学变化, 罗丹明 123 (Rh123) 染色 FCM 检测细胞线粒体膜电位(MMP), 双氢罗丹明 123 染色 FCM 检测细胞内活性氧(ROS) 的含量。【结果】20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 能明显地诱导 PC12 细胞凋亡, 增加细胞凋亡率, 并能明显地抑制 PC12 细胞 MMP 及增加细胞内 ROS 生成; 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 本身不损伤 PC12 细胞, 但能明显地抑制 $A\beta_{25-35}$ 的致细胞凋亡作用, 降低 PC12 细胞的凋亡率, 并能显著地抑制 $A\beta_{25-35}$ 引起的 MMP 降低及胞内 ROS 水平增多; 在应用 NaHS 与 $A\beta_{25-35}$ 作用 PC12 细胞之前 30 min, 应用 K_{ATP} 抑制剂 Glybenclamide (Gly) (10 $\mu\text{mol/L}$) 对 PC12 细胞进行预处理, 能部分地对抗 NaHS 的细胞保护作用, 使 PC12 细胞凋亡率增加, MMP 降低及 ROS 生成增多。【结论】NaHS 能明显对抗 $A\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞的损伤作用, 此细胞保护作用可能与 NaHS 保护 PC12 细胞的 MMP 及抑制胞内 ROS 生成有关; K_{ATP} 通道抑制剂 Gly 能部分地阻断 NaHS 的细胞保护作用, 提示 K_{ATP} 通道开放可能是 NaHS 对抗 $A\beta_{25-35}$ 损伤作用的机制之一。

关键词: 硫化氢; β -淀粉样多肽; 线粒体膜电位; 活性氧; ATP 敏感性钾通道

中图分类号: R322

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)03-0258-06

Role of ATP-Sensitive K^+ Channels in Protection of NaHS against β -amyloid Peptide-Induced Damage in PC12 Cells

LIAO Xin-xue¹, TANG Xiao-qing³, GUO Rui-xian², YANG Chun-tao¹, LIU Wei²,
CHEN Pei-xi², FENG Jian-qiang²

(1. Department of Cardiovasculology and Department of Hypertension and Vascular Diseases, The First Affiliated Hospital, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Physiology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Physiology, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

Abstract: 【Objective】To explore the role of ATP-sensitive K^+ channels in the protection of hydrogen sulfide (H_2S) against β -amyloid-induced injury in PC12 cells. 【Methods】Sodium hydrosulfide (NaHS) was used as a H_2S donor. The percentage of apoptotic cells was assessed by propidium iodide stain flow cytometry (FCM). The morphological change of apoptotic cells was tested by using the chromatin dye Hoechst 33258. The mitochondrial membrane potential (MMP) was analyzed by rhodamine 123 stain FCM. The level of reactive oxygen species (ROS) in PC12 cells was measured by dihydrohodamine 123 stain FCM. 【Results】Amyloid β -peptide 25~35 ($A\beta_{25-35}$) at 20 $\mu\text{mol/L}$ and 40 $\mu\text{mol/L}$ significantly induces PC12 cells apoptosis; and inhibits MMP and induces ROS in PC12 cells. NaHS at 100 $\mu\text{mol/L}$ or 200 $\mu\text{mol/L}$ alone did not damage PC12 cells, but obviously attenuated $A\beta_{25-35}$ induced apoptosis, and blocked the dissipation of MMP and the over-production of ROS induced by $A\beta_{25-35}$; The

收稿日期: 2007-11-06

基金项目: 广东省科技计划基金(2004B30601016), 广东省自然科学基金(5001676)

作者简介: 廖新学(1965-), 男, 广东五华人, 医学博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事心血管内科等方面的临床与实验研究; 冯鉴强, 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: fengjq-sums@163.com

ATP-sensitive K^+ channel (K_{ATP}) inhibitor, glybenclamide (Gly), which was pretreated 30 min before co-administration of NaHS and $A\beta_{25-35}$, obviously and partly blocked the cytoprotection of NaHS, increasing the percentage of apoptosis; Furthermore, Gly at 10 $\mu\text{mol/L}$ partly and significantly blocked the preservation of MMP and inhibition of overproduction of ROS afforded by NaHS. 【Conclusion】 NaHS obviously protected PC12 cells against the damage induced by $A\beta_{25-35}$, the cytoprotection of NaHS was associated with the preservation of MMP and inhibition of ROS over-production; K_{ATP} channel inhibitor, Gly, significantly partly blocked the cytoprotection of NaHS, indicating that K_{ATP} channels activation played an important role in the protection of NaHS against PC12 cells damage induced by $A\beta_{25-35}$.

Key words: hydrogen sulfide; β -amyloid peptide; mitochondrial membrane potential; reactive oxygen species; ATP-sensitive K^+ channels

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2008, 29(3): 258-263]

近年,内源性气体信号分子如一氧化氮(nitric oxide, NO)^[1]和一氧化碳(carbon monoxide, CO)^[2]在体内病理生理过程中的重要作用日益受到重视;目前,越来越多的证据支持内源性硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是体内第3种气体信号分子^[3],它具有多种的生理作用,例如调节突触活动,影响海马长时程增强(long term potentiation, LTP)^[4]及舒张血管^[5]等。有研究指出,脑内 H_2S 的浓度可达到 50~160 $\mu\text{mol/L}$ ^[4]。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者脑内的 H_2S 水平约降低 55%^[6],提示 H_2S 可能涉及 AD 的发生发展过程。

现已证实,AD 患者脑内存在老年斑块(senile plaques),其主要成分是 β -淀粉样肽(amyloid β -peptide, $A\beta$)。 $A\beta$ 通过诱发氧化应激和神经细胞凋亡(apoptosis)在 AD 的发病机制中起着重要的作用^[7,8]。最近,我们观察到,硫化氢钠(sodium hydrosulfide, NaHS, H_2S 的供体)能对抗 $A\beta$ 诱导大鼠嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 (pheochromocytoma cells, PC12 细胞)凋亡^[9],但其机制尚未明了。 H_2S 被认为是内源性 ATP 敏感性钾通道的开放剂(ATP-sensitive K^+ channels opener),因此,本文旨在探讨 ATP 敏感性钾通道(ATP-sensitive K^+ channels, K_{ATP})在 H_2S 对抗 $A\beta$ -诱导 PC12 细胞损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

碘化丙啶(PI)、Rnase A、甲氮甲唑蓝(MTT)、罗丹明 123(Rh1233)、双氢罗丹明(DHR)、 $A\beta_{25-35}$ 、ATP 敏感性钾通道抑制剂 Glybenclamide 与 NaHS 购自 Sigma 公司;RPMI-1640 培养基、马血

清、胎牛血清购自 Gibco BRL 公司(NY USA)。

1.2 细胞培养和实验分组

PC12 细胞由中山大学实验动物中心提供,培养于含 100 mL/L 马血清、50 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 条件下培养,选取对数生长期细胞进行实验。

实验分为①空白对照组;②不同浓度 $A\beta_{25-35}$ 损伤组:分别应用 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 作用 PC12 细胞 24 h;③不同浓度 NaHS 单纯作用组:分别应用 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 孵育 PC12 细胞 24 h;④NaHS+ $A\beta_{25-35}$ 共同作用组:分别应用不同浓度(100 $\mu\text{mol/L}$ 与 200 $\mu\text{mol/L}$) NaHS 与不同浓度(20 $\mu\text{mol/L}$ 与 40 $\mu\text{mol/L}$) $A\beta_{25-35}$ 共同作用 PC12 细胞 24 h;⑤ATP 敏感性钾通道抑制剂+NaHS+ $A\beta_{25-35}$ 作用组。

1.3 PI 染色流式细胞仪(FCM)检测 PC12 细胞凋亡

收集多组细胞,用 PBS 洗 2 遍,用 700 mL/L 乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,取 10^6 已固定的细胞,用 PBS 洗两遍,去上清后加入 300 μL DNA 染液(内含 PI 100 $\mu\text{g/mL}$ 和 Rnase A 20 单位/mL),于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 45 min,300 目尼龙网过滤,上流式细胞仪(美国 BENKMAN-COULTER 公司出品)检测(激发波长:488 nm;发射波长:610 nm)细胞 DNA 的含量。以 DNA 组方图中低于 G1 期 DNA 含量的亚 G1 峰的大小代表凋亡细胞数的多少。

1.4 Hoechst 染色检测细胞凋亡

把 PC12 细胞接种于 24 孔板内,按实验分组要求给以下不同的处理因素作用一定时间,加入新鲜配制的 40 g/L 多聚甲醛,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定细胞 10 min,加入 5 mg/L Hoechst 33258 染色液作用 10 min, PBS 冲洗,荧光显微镜下观察、摄片。正常细

胞核呈弥漫均匀的低强度荧光,细胞核呈浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光,记为凋亡细胞。

1.5 细胞线粒体膜电位的检测

Rh123 是一种为线粒体所吸收的荧光染色,其吸收值随线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 的改变而呈相应的变化,从而改变细胞的荧光强度。因此,可通过检测细胞 Rh123 的荧光强度反映细胞的 MMP。药物处理 24 h 后,用 0.25 g/L 胰蛋白酶消化贴壁的 PC12 细胞,收集 1×10^6 细胞,用 PBS 洗两次。取储存于 -20°C 溶于 DMSO 的 1 g/L Rh123,用不含小牛血清的 RPMI-1640 稀释至 100 $\mu\text{g/L}$,重悬上述细胞,避光于 37°C 孵育 45 min 后进行流式细胞仪测定(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm),测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理。计数 10 000 个活细胞,以阳性细胞的平均荧光强度 (MFI) 表示 MMP。

1.6 细胞内 ROS 含量的检测

按前文^[9]介绍的方法测定细胞 ROS 的含量,即用双氢罗丹明处理 PC12 细胞 12 h 后倾去陈旧培养基,用无血清的 RPMI-1640 洗 2 次,加入用无血清的 RPMI-1640 稀释的终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的双氢罗丹明,避光于 37°C 孵育 1 h 后,收集细胞, PBS 洗 1 次,制成 $1 \times 10^8/\text{L}$ 的悬液,上流式细胞仪检测(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm),测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理。每个样品测定 10 000 个活细胞,直方图分析 Rh123 的平均荧光强度 (MFI),该值即代表细胞 ROS 的水平。

1.7 统计分析

全部数据经 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析,数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 检验,有统计学意义后用最小有意义差异检验 (least significant difference, LSD) 进行均数间的多重比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 NaHS 抑制 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的细胞凋亡

Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡的结果显示, 20 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞 24 h 后, PC12 细胞呈现明显的凋亡特征,如细胞核浓

缩等(图 1C)。100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 自身不引起 PC12 细胞凋亡(图 1B), 但其与 20 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 共同处理 PC12 细胞 24 h, 能使 $\text{A}\beta_{25-35}$ 引起的具有凋亡特征的细胞数目明显减少(图 1D)。FCM 检测的实验结果统计分析也显示, 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 均能显著地降低 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 引起的 PC12 细胞凋亡率 ($P < 0.01$, 图 1)。

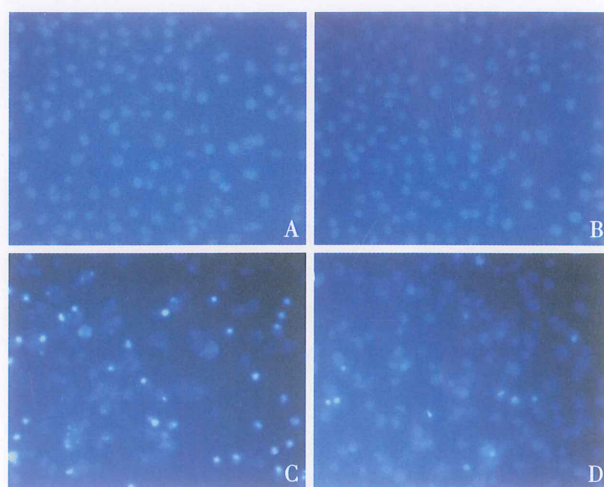


图 1 H_2S 保护 PC12 细胞对抗 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的细胞凋亡

Fig.1 H_2S protects PC 12 cells against apoptosis induced by $\text{A}\beta_{25-35}$

A-D: Hoechst 33258 nuclear staining for assessment of apoptosis ($\times 400$). A: control group; B: 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS group; C: 20 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ group; D: NaHS + $\text{A}\beta_{25-35}$ group. The histogram showing the results from propidium iodide stain flow cytometry (FCM). $F=31.449$, $P < 0.01$. 1) vs control, $P < 0.01$; 2) vs 20 $\mu\text{mol/L}$ or 40 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ group, $P < 0.01$.

2.2 K_{ATP} 通道抑制剂拮抗 NaHS 引起的抗细胞凋亡作用

H_2S 被认为是 K_{ATP} 通道的开放剂 (Opener), 为

了探讨 K_{ATP} 通道开放是否与 NaHS 对抗 $A\beta_{25-35}$ 引起 PC12 细胞凋亡的作用有关。本文在应用 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 与 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 作用 PC12 细胞之前 30 min, 应用 10 $\mu\text{mol/L}$ K_{ATP} 通道的抑制剂 Glybenclamide (Gly) 对 PC12 细胞进行预处理 (pretreatment)。图 2 的结果显示, 10 $\mu\text{mol/L}$ Gly 自身不影响 PC12 细胞的凋亡率, 但是却能显著地部分地拮抗 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 对抗 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 的致凋亡作用 ($P < 0.01$), 提示 NaHS 的细胞保护作用可能与其开放 K_{ATP} 通道有关。

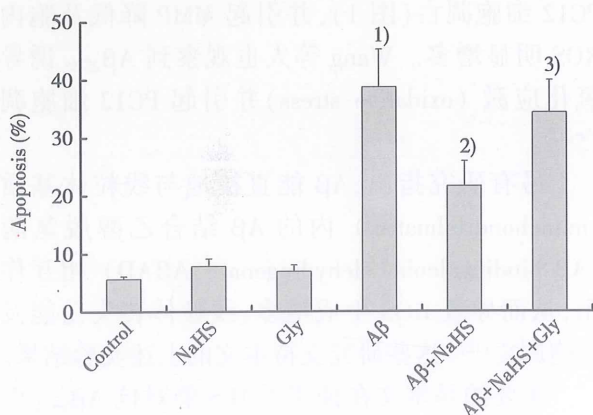


图 2 K_{ATP} 通道抑制剂拮抗 NaHS 引起的抗细胞凋亡作用

Fig.2 ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP}) inhibitor blocks the anti-apoptotic effect of NaHS

The percent of apoptosis was tested by PI FCM. 1) vs control, $P < 0.01$; 2) vs $A\beta_{25-35}$ (20 $\mu\text{mol/L}$) group, $P < 0.01$; 3) vs $A\beta$ +NaHS group, $P < 0.01$. Gly: 10 $\mu\text{mol/L}$ Glybenclamide; NaHS: 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS; $A\beta$: 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$; $n=4$. $F = 42.276$, $P < 0.01$.

2.3 K_{ATP} 通道抑制剂拮抗 NaHS 抑制 $A\beta_{25-35}$ 降低 MMP 的作用

MMP 降低是细胞凋亡早期的一个重要特征。Rh123 荧光染色法可检测荧光强度的大小反映 MMP 的改变。图 3 显示, PC12 细胞经 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 作用 6 h 后, MMP 明显降低 (图 3D), 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 本身不影响 Rh123 荧光强度 (图 3B), 但当其与 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 共同作用 PC12 细胞 6 h 后, NaHS 能显著地抑制 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 引起的 MMP 降低 (图 3E)。图 3G 为 FCM 的平均荧光检测强度 (MFI) 的统计结果, 同样显示 NaHS 能明显地抑制 $A\beta_{25-35}$ 引起 PC12 细胞 MMP 降低。

为了探讨 K_{ATP} 通道开放是否参与 H_2S 的保护 MMP 作用, 本文观察 K_{ATP} 通道抑制剂 Gly (10

$\mu\text{mol/L}$) 预处理 (预处理方法与上述的方法相同) 对 H_2S 抑制 $A\beta_{25-35}$ 降低 MMP 作用的影响。图 3C 与 G 的结果表明, 10 $\mu\text{mol/L}$ Gly 本身对 PC12 细胞的 MMP 无明显影响, 但是能明显地部分地阻断 NaHS 抑制 MMP 降低的作用 (图 3F 和 G, $P < 0.01$), 提示 NaHS 抑制 $A\beta_{25-35}$ 降低 MMP 作用的机制之一可能与其开放 K_{ATP} 通道有关。

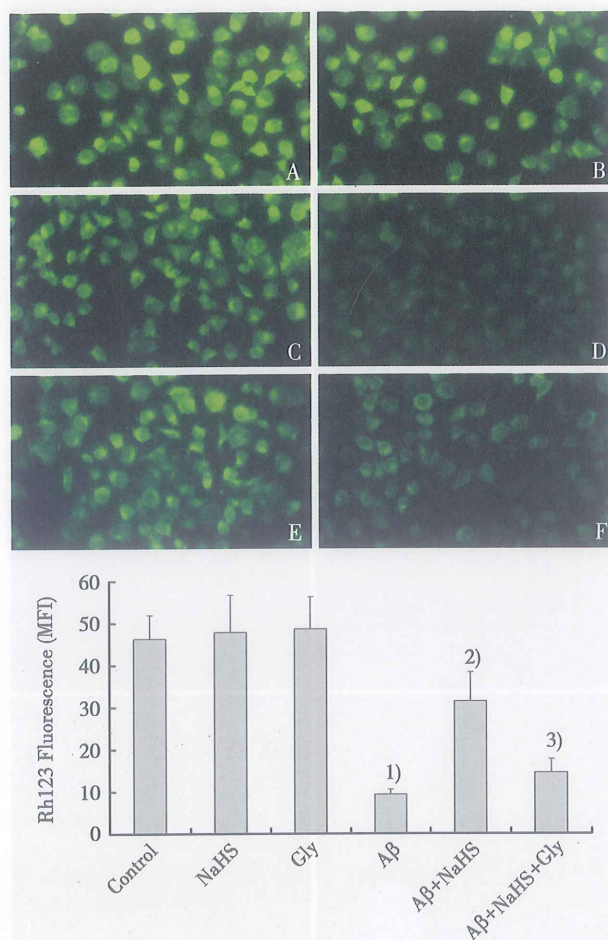


图 3 K_{ATP} 通道抑制剂对 NaHS 抑制 MMP 降低作用的影响

Fig.3 Effect of ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP}) inhibitor on the preservation of mitochondria membrane potential (MMP) by NaHS ($\times 400$)

A: the control group; B: 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS group; C: 10 $\mu\text{mol/L}$ K_{ATP} inhibitor Glybenclamide (Gly) group; D: 10 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ group; E: NaHS+ $A\beta_{25-35}$ group; F: Gly+NaHS+ $A\beta_{25-35}$ group; G: showing the data of RH 123 MFI. 1) vs control, $P < 0.01$; 2) vs $A\beta$ group, $P < 0.01$; 3) vs $A\beta$ +NaHS group, $P < 0.01$, $n=3$. $F = 24.628$, $P < 0.01$.

2.4 K_{ATP} 通道抑制剂对 NaHS 抑制 ROS 生成增多的影响

图 4 显示 PC12 细胞被 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 处理 3 h 后, 其胞内的双氢罗丹明荧光强度明显增多

(图 4D 与正常对照组图 4A 比较),提示 $A\beta_{25-35}$ 引起胞内 ROS 生成增多。然而当自身不影响 ROS 生成(图 4B)的 $100\ \mu\text{mol/L}$ NaHS 与 $20\ \mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 共同作用于 PC12 细胞 3 h 后,胞内的双氢罗丹明荧光强度显著减小(图 4E),提示 NaHS 能抑制 $A\beta_{25-35}$ 引起的 PC12 细胞 ROS 生成增多。值得注意的是, K_{ATP} 通道抑制剂 Gly($10\ \mu\text{mol/L}$) 预处理能明显地拮抗 NaHS 抑制 ROS 生成作用(图 4F),提示 K_{ATP} 通道开放可能在 H_2S 抑制胞内 ROS 生成中起着一定的作用。 $10\ \mu\text{mol/L}$ Gly 本身不影响 ROS 水平(图 4C)。

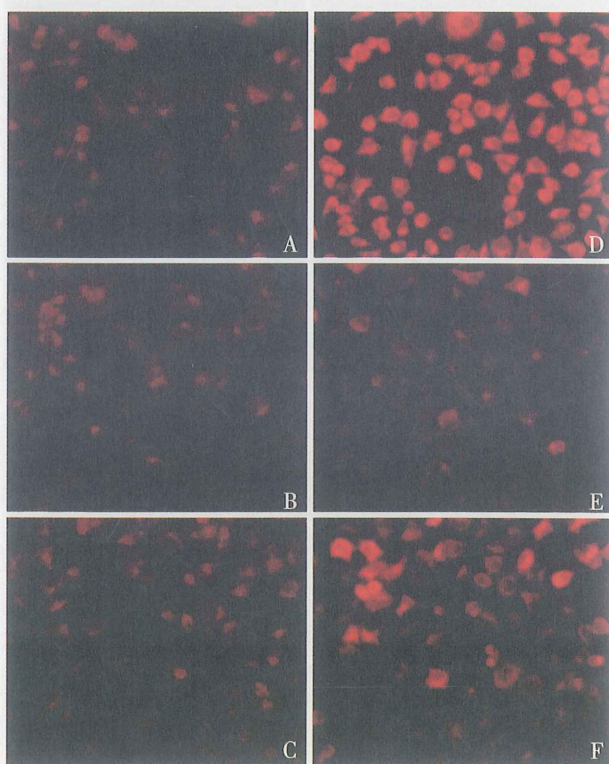


图 4 NaHS 抑制 $A\beta_{25-35}$ 引起胞内 ROS 生成及 K_{ATP} 通道抑制剂对 NaHS 作用的影响

Fig. 4 NaHS inhibits $A\beta_{25-35}$ -induced reactive oxygen species (ROS) overproduction and influence of K_{ATP} inhibitor on the effect of NaHS ($\times 400$)

A: control group; B: $100\ \mu\text{mol/L}$ NaHS group; C: $10\ \mu\text{mol/L}$ Glybenclamide (Gly) group; D: $20\ \mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ group; E: NaHS + $A\beta_{25-35}$ group; F: Gly + NaHS + $A\beta_{25-35}$ group.

3 讨论

老年性痴呆(AD)是一种神经性退行性疾病,其病理特征是脑内呈现老年斑(senile plaques)。 $A\beta$ 是细胞外老年斑的主要成分。 $A\beta$ 来源于淀粉

样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的蛋白水解物,具有 39~43 个氨基酸,其中 25~35 片段被认为具有神经毒性,很可能是 AD 病理机制的关键^[10]。

为了探讨 H_2S 能否对抗 $A\beta$ 引起神经元损伤及其作用机制,本文在具有神经元的形态及功能特征的 PC12 细胞建立 $A\beta_{25-35}$ 致细胞损伤模型,应用 NaHS 作为 H_2S 的供体,观察不同浓度 NaHS 对 $A\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞作用的影响。本文的研究结果表明, $20\ \mu\text{mol/L}$ ~ $40\ \mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 能明显引起 PC12 细胞凋亡(图 1),并引起 MMP 降低及胞内 ROS 明显增多。Wang 等人也观察到 $A\beta_{25-35}$ 诱导氧化应激(oxidative stress)并引起 PC12 细胞凋亡^[11]。

另有研究指出, $A\beta$ 能直接地与线粒体基质(mitochondrial matrix)内的 $A\beta$ 结合乙醇脱氢酶($A\beta$ -binding alcohol dehydrogenase, ABAD)相互作用,从而导致 ROS 生成增多、线粒体丧失功能及细胞凋亡^[12]。这些研究支持本文的上述实验结果。

重要的是本文在证实了 H_2S 能对抗 $A\beta_{25-35}$ 引起的细胞凋亡、MMP 降低及 ROS 升高等损伤作用的基础上,进一步探讨了 K_{ATP} 通道在 NaHS 抗氧化应激的细胞保护机制中的作用。

H_2S 是一种作用较强的内源性 ATP 敏感的钾通道开放剂(ATP-sensitive K^+ channel opener)^[13]。 K_{ATP} 通道开放能保护心肌细胞对抗氧化应激引起的凋亡^[14]。本文观察到 K_{ATP} 通道抑制剂 Glybenclamide (Gly) 能明显地部分地阻断 H_2S 抑制 $A\beta_{25-35}$ 的细胞损伤作用,使凋亡率显著增加,并能部分地拮抗 H_2S 保护 MMP 及抑制 ROS 生成作用,提示 K_{ATP} 通道开放可能是 H_2S 对抗 $A\beta_{25-35}$ 细胞损伤作用的重要机制之一,值得今后进一步探讨。

参考文献:

- [1] Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger [J]. *Neuron*, 1992, 8(1): 3-11.
- [2] Verma A, Hirsch DJ, Glat CE, et al. Carbon monoxide: A putative neuronal messenger [J]. *Science*, 1993, 259(5093): 381-384.
- [3] Wang R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? [J]. *FASEB J*, 2002; 16(13): 1792-1798.
- [4] Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator [J]. *J Neurosci*,

- 1996,16(3):1066-1071.
- [5] Zhao W, Zhang J, Lu Y, et al. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener [J]. *EMBO J*, 2001,20(21):6008-6016.
- [6] Eto K, Asada T, Makifuchi T, et al. Brain hydrogen sulfide is severely decrease in Alzheimer's disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002,293(5):1485-1488.
- [7] 李国营,胡金家,林 贤,等. $A\beta$ 不同片段肽疫苗免疫鼠后血清对 $A\beta_{42}$ 诱导细胞毒性作用的影响[J].*中山大学学报:医学科学版*, 2004,25(2):102-104, 109.
- [8] 高秀萍,祁金顺,乔健天. β -淀粉样蛋白 25-35 片段抑制大鼠皮层神经元大电导钙激活钾通道[J].*中华神经医学杂志*, 2006,5(5):458-461.
- [9] 陈秀琴,唐小卿,李景田,等.硫化氢对 β -淀粉样蛋白诱导 PC12 细胞凋亡的影响 [J].*解剖学研究*, 2007, 29(2):107-110.
- [10] Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides [J]. *Science*, 1990,250 (4978): 279-282.
- [11] Wang H, Xu H, Dyck LE, Li XM. Olanzapine and quetiapine protect PC12 cells from beta-amyloid peptide (25-35)-induced oxidative stress and the ensuing apoptosis [J]. *J Neurosci Res*, 2005,81(4):572-580.
- [12] Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, et al. ABAD directly links A β to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease [J]. *Science*, 2004,304(5669):448-452.
- [13] Tang G, Wu L, Liang W, et al. Direct stimulation of K_{ATP} channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2005,68(6):1757-1764.
- [14] Akao M, Ohler A, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells[J]. *Circ Res*, 2001,88(12):1267-1275.

(编辑 孙慧兰)

(上接 251 页 from page 251)

明对照组肿瘤组织明显较雷帕霉素组增殖活跃,而体外 walker-256 肿瘤细胞培养相关检测亦表明,雷帕霉素组大量肿瘤细胞停滞于 G_1/G_0 期,肿瘤细胞生长受抑。此外,体外实验亦表明,雷帕霉素可下调肿瘤细胞 Vascular endothelial growth factor mRNA 表达,抑制促肿瘤血管生长因素,从而抑制肿瘤血管生成。其具体机制仍有待进一步阐明。故推断这与雷帕霉素抑制免疫细胞的同时,也抑制已成功黏附滞留的肿瘤细胞增殖及瘤性血管生成,延长了肿瘤增殖、生长、扩张的过程所需时间,从而延长宿主荷瘤生存期。

虽然雷帕霉素对降低免疫抑制下的肿瘤复发率作用不明显,但能明显抑制肿瘤生长速度。因此对于移植术后发生肿瘤复发者,使用雷帕霉素可延长带瘤生存时间。而雷帕霉素使用的时机、方案以及剂量调整对肿瘤复发及荷瘤生存期的影响仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Vignot S, Faivre S, Aguirre D, et al. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives[J]. *J Ann Oncol*, 2005,16(4):525-537.
- [2] 陈颖华,蔡常洁,陆敏强,等.建立符合肝癌肝移植术后肝癌复发规律的大鼠模型 [J].*中山大学学报:医学科学版*, 2006,27(6):38-41.
- [3] 陈规划,杨 扬,陆敏强,等.肝移植治疗原发性肝癌 60 例 [J]. *中华外科杂志*, 2004, 42(7):413-416.
- [4] 李锦清,李国辉,张亚奇,等.降低原发性肝癌术后复发率的研究 [J]. *中山医科大学学报*, 1997,18(3):161-164.
- [5] 刘允怡.肝移植在肝癌治疗中的地位与评价[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2003, 9(5):265-267.
- [6] Karakayali H, Moray G, Sozen H. Expanded criteria for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Transplant Proc*, 2006,38(2):575-578.
- [7] Olthoff KM. Surgical options for hepatocellular carcinoma: resection and transplantation [J]. *Liver Transpl Surg*, 1998, 4(5 Suppl 1):98-104.
- [8] Yokoyama I, Carr B, Saito H, et al. Results of a Multicenter Study Accelerated growth rates of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation [J]. *Cancer*, 1991,68(4):2095-2097.
- [9] Fu L, Minoru H, Mary M, et al. Rapamycin Blocks tumor progression: unlinking immunosuppression from antitumor efficacy [J]. *Transplantation*, 2002,73(3):1565-1572.
- [10] Soliman G. The mammalian target of rapamycin signaling network and gene regulation [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2005, 16(3):317-323.
- [11] 高忠显,许树旭.现代肿瘤诊断治疗学 [M]. 北京:科学技术文献出版社,1997:37-43.
- [12] 王 征,范 嘉,周 俭,等.免疫抑制剂对肝癌细胞增殖、运动侵袭的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2006,23(3):291-292.

(编辑 徐 杰)