

# 低氧损伤下调大鼠脑血管内皮细胞中硫化氢及其介导的 RhoA-ROCK 通路激活

王良芳 陈志武

**摘要** 目的 观察大鼠脑血管内皮细胞中内皮源性硫化氢( $H_2S$ )、一氧化氮(NO)及 Ras 同源基因家族成员 A-Rho 相关的卷曲螺旋激酶(RhoA-ROCK)信号通路在低氧性损伤中的动态变化,并探讨内皮源性 $H_2S$ 对 RhoA-ROCK 通路的影响。方法 胶原酶消化法原代培养大鼠脑血管内皮细胞,内皮细胞分别低氧培养 1、2、4、8、24 h 后,测定 $H_2S$ 和 NO 含量,ELISA 检测 RhoA 活性,细胞裂解后对相关蛋白进行免疫印迹分析。结果 低氧 1 h 后 $H_2S$ 含量显著下降;NO 含量在低氧 4 h 后开始显著下降;RhoA 活性低氧 8 h 后才有显著增加。低氧 4 h 时内源性 $H_2S$ 合成酶胱硫醚 $\gamma$ -裂解酶(CSE)表达就有了显著下降;低氧 8 h 后内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)才开始明显降低;低氧 8 h 时 Rho 激酶 ROCK1、ROCK2 表达显著增加。内源性和外源性 $H_2S$ 均可抑制 RhoA 的激活。结论 在大鼠脑血管内皮细胞低氧损伤过程中,内皮源性 $H_2S$ 降低发生最早,其次为 NO,而 RhoA-ROCK 通路激活发生在后,可能是继发于 $H_2S$ 的降低。

**关键词** 内皮细胞;低氧;硫化氢;RhoA-ROCK 通路

中图分类号 R 965

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)01-0050-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.010

缺血性损伤脑血管疾病是全球性的重大公共卫生问题,研究脑缺血损伤的机制一直是临床和基础研究较为关注的课题之一。内皮源性硫化氢(hydrogen sulfide,  $H_2S$ )和一氧化氮(nitric oxide, NO)均可由脑血管内皮细胞产生和释放并参与缺血性脑损伤过程<sup>[1-3]</sup>。有研究<sup>[4-5]</sup>表明缺血性脑损伤可激活 RhoA-ROCK(Ras homolog gene family, member A/Rho associated coiled coil-forming kinase)通路,并且内皮源性 NO 可抑制 RhoA-ROCK 通路的活性,但迄今尚不清楚缺血性脑损伤中,内皮源性 $H_2S$ 、NO 及 RhoA-ROCK 通路三者中,孰是最先改变的原发

因素以及内皮源性 $H_2S$ 是否也可抑制 RhoA-ROCK 通路的活性。因此,该文观察了大鼠脑血管内皮细胞中内皮源性 $H_2S$ 、NO 及 RhoA-ROCK 通路三者者在低氧性损伤中的动态变化,并探讨了内皮源性 $H_2S$ 对 RhoA-ROCK 通路活性的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** DMEM 培养基、内皮细胞生长添加剂、胶原酶 II 购自美国 Sigma 公司; CCK-8 试剂盒、NO 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; RhoA 活性测定试剂盒购自美国骨架细胞公司;胎牛血清、RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;小鼠抗 $\beta$ -actin 多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Anti-Von Willebrand Factor antibody、兔抗 ROCK1 和 ROCK2 抗体、eNOS 抗体、CSE 抗体购自美国 Abcam 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 大鼠脑血管内皮细胞原代培养实验动物** SD 大鼠,雌雄各半,200~300 g,饲养温度在(22±2)℃,通风良好,可自由饮水进食。取大鼠 5 只,10%水合氯醛麻醉后置 75%乙醇浸泡 3 min。将大鼠置无菌操作台上,心脏灌流无菌 PBS,直至肝脏和舌头发白。无菌状态下迅速断头取脑,显微镜下小心剥离脑血管后转移至超净台中预先加有胶原酶 II(工作浓度为 2 mg/ml)的 EP 管中,用眼科镊将脑血管反复剪碎后 37℃水浴消化 30 min,之后离心弃上清液,加入含内皮细胞生长添加剂和 20%新生牛血清的 DMEM 培养液重悬后接种于培养皿,CO<sub>2</sub> 恒温恒湿孵育箱内培养,24 h 后换液去除未贴壁和坏死细胞,之后视细胞生长状态换液;待 80%细胞融合时,选取生长状态良好的细胞进行传代,之后按要求分组实验。

**1.2.2 免疫荧光染色检测培养细胞 vWF 表达** 倒置显微镜下进行细胞形态学观察;vWF 免疫荧光标记染色:取第二代状态良好的内皮细胞,胰酶消化后接种于放有载玻片的培养皿中;待细胞爬满载玻片 80%时,吸弃细胞培养液;用预冷 PBS 清洗 3 次,加

2018-09-12 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81374002)

作者单位:安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

作者简介:王良芳,女,硕士研究生;

陈志武,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:

chpharmzw@163.com

入预冷的4%多聚甲醛4℃固定30 min; PBS清洗3次。0.1% Triton-100室温处理10 min; PBS清洗3次。加入封闭液室温孵育1 h; 加入羊抗大鼠vWF多克隆抗体(1:100)4℃过夜; 次日PBS清洗后, 加入荧光二抗室温孵育1 h; PBS清洗3次, 加入DAPI染色5 min, 荧光封片剂封片后激光共聚焦显微镜下观察细胞染色情况并拍照。

**1.2.3 低氧模型制备** 低氧24 h前培养基换成厌氧培养基, 将细胞置于37℃、N<sub>2</sub> 95%、CO<sub>2</sub> 5%的可控厌氧室中。

**1.2.4 CCK-8法检测细胞活力** 培养瓶中细胞长满后, 经胰酶消化离心重悬后制成单细胞悬液, 10% FBS培养液调节细胞浓度为 $8 \times 10^4$ /ml, 每孔100 μl接种于5块96孔板, 每板设置空白对照, 每组设5个复孔培养, 待细胞80%融合, 吸弃培养液, PBS清洗2次, 加无血清培养液培养24 h后放入N<sub>2</sub> 95%、CO<sub>2</sub> 5%厌氧培养箱, 分别在1、2、4、8、24 h各取出1块, 并取出相应的空白对照板; 向每孔加入10 μl CCK-8溶液, 震荡混匀后室温下孵育1~3 h, 酶标仪于450 nm波长处读取吸光度(optical density, OD)值。细胞活力(%) = (加药细胞OD - 空白OD) / (对照细胞OD - 空白OD) × 100%。

**1.2.5 亚硝酸还原法检测NO含量** 细胞培养液中NO代谢产物NO<sub>3</sub>在硝酸还原酶的作用下生成NO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>酸性条件下与α-萘胺及对-氨基苯磺酸生成红色偶氮化合物。按说明书要求将试剂和待测样品分别加入各管后静置10 min, 双蒸水调零, 酶标仪于波长550 nm处测各管OD值。

**1.2.6 亚甲基蓝分光光度法测定H<sub>2</sub>S含量** 醋酸锌可以吸收硫化氢生成硫化锌沉淀, 酸性条件下硫离子可与三氯化铁(FeCl<sub>3</sub>)和N,N-二甲基-对苯二胺硫酸盐(NDPA)反应, 室温下生成稳定的亚甲基蓝, 在波长670 nm处测其OD, 根据标准曲线计算出H<sub>2</sub>S的浓度。

**1.2.7 G-LISA检测RhoA活性** 按实验要求分组, 待大鼠脑血管内皮细胞长满约80%后, 置于冰上加冰冷裂解液提取蛋白; 用蛋白质测定试剂测定蛋白质浓度, 平衡各样本浓度; 蛋白质提取物转移到Rho-GTP-结合蛋白预包装的平板上; 400 r/min的振荡器上4℃孵育30 min, 洗涤液常温洗2次, 每次甩干; 加RhoA一抗, 400 r/min的振荡器上室温孵育45 min, 洗涤液常温洗2次, 每次甩干; 加二抗振荡器400 r/min室温孵育45 min, 洗涤液常温洗2次, 每次甩干; 每孔加HRP AB液室温下15 min后, 加

入HRP终止缓冲液; 酶标仪在波长490 nm处读取OD值。

**1.2.8 Western blot检测不同低氧时间胱硫醚γ-裂解酶(CSE)、内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)、Rho激酶ROCK1和ROCK2蛋白含量变化** 分别于规定的低氧时间收集相应细胞, 加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液提取蛋白。用BCA试剂盒测定总蛋白含量, 各组取30 μg等量蛋白煮沸变性, 行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 封闭后加入兔抗鼠ROCK、eNOS、CSE多克隆抗体一抗(1:1000)孵育; 4℃过夜, 次日洗膜后加入二抗室温孵育1 h, 洗膜后加入显色液显影曝光内皮细胞L显色, Image J定量分析灰度值。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 16.0软件进行分析。两组之间独立样本进行t检验, 多组之间单因素方差分析, P < 0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 原代培养内皮细胞鉴定** 光镜下原代培养的内皮细胞为梭形或多边形, 旋涡状生长, 呈聚集状, 贴壁牢固(图1A)。免疫荧光染色显示: 细胞核DAPI染色为蓝色荧光, 超过90%的细胞胞质存在红色荧光, 说明内皮细胞纯度达90%(图1B)。

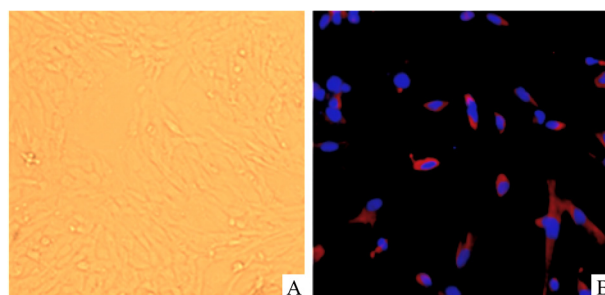


图1 原代培养的大鼠脑血管内皮细胞和免疫荧光鉴定

A: ×200; B: ×400

**2.2 不同低氧时间对大鼠脑血管内皮细胞活力的影响** 与control组比较, 低氧时间延长细胞活力明显下降。低氧8 h细胞活力下降了(39.3 ± 4.3)%, 低氧24 h后细胞活力下降(60.9 ± 6.1)%, 差异均有统计学意义, 表明低氧可致大鼠脑血管内皮细胞活力下降。见图2。

**2.3 大鼠脑血管内皮细胞低氧后NO、H<sub>2</sub>S含量及RhoA活性的动态变化** 大鼠脑血管内皮细胞低氧1、2、4、8、24 h后分别检测H<sub>2</sub>S、NO含量及RhoA活性变化, 与control组比较, 低氧1 h后H<sub>2</sub>S含量显著

下降 ( $F = 4.23, P < 0.01$ ) ; NO 含量在低氧 4 h 后才开始显著下降 ( $F = 3.19, P < 0.05$ ) ; RhoA 活性低氧 8 h 后显著增加 ( $F = 7.31, P < 0.01$ ) 。上述三者变化差距随时间延长而显著加大。见图 3。因此定量结果表明在大鼠脑血管内皮细胞低氧中 ,H<sub>2</sub>S 降低最早 ,NO 次之 ,RhoA 活性增加再次之。

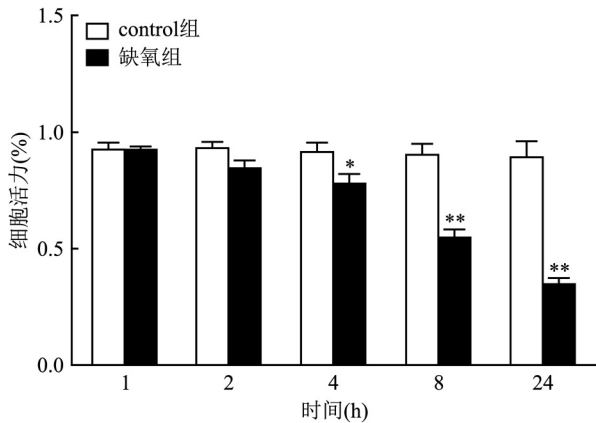


图 2 不同低氧时间对大鼠脑血管细胞活力的影响 (  $n = 6, \bar{x} \pm s$  ) 与 control 组比较: \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$

**2.4 低氧不同时间对大鼠脑血管内皮细胞 CSE、eNOS、ROCK1 和 ROCK2 蛋白表达的影响** Western blot 结果显示: CSE 和 eNOS 蛋白随低氧时间延长呈持续下降趋势 ,低氧 4 h 时 CSE 蛋白表达较正常组有了显著下降;低氧 8 h 后 eNOS 蛋白才开始明显降低;相反 ROCK1、ROCK2 蛋白表达随低氧时间延长呈上升趋势 ,低氧 8 h 时 ROCK1、ROCK2 蛋白表达显著增加。见图 4。上述各蛋白的变化随低氧时间延长而显著加大。

**2.5 H<sub>2</sub>S 对大鼠脑血管内皮细胞中 RhoA 活性的影响**

**2.5.1 内源性 H<sub>2</sub>S 对 RhoA 活性的影响** 与 control 组比较 ,RhoA 特异性抑制剂 C3 转移酶 ( C3 Transferase ,C3 TF) ( 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ,8 h) 可显著抑制 RhoA 活性 ,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) ,但 CSE 抑制剂 DL-炔丙基甘氨酸 ( DL-propargylglycine , PPG) ( 10  $\text{mmol}/\text{L}$  4 h) 可显著加 RhoA 活性 ,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) ,提示内源性 H<sub>2</sub>S 可抑制 RhoA 的激活。见图 5。

**2.5.2 内源性和外源性 H<sub>2</sub>S 对 C3 转移酶诱导的 RhoA 活性降低的影响** 与 C3TF 组比较 ,PPG 组 ( 10  $\text{mmol}/\text{L}$  4 h) 可显著抑制 C3TF 诱导的 RhoA 活性降低 ,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) 提示内源性 H<sub>2</sub>S 均可增强 C3TF 诱导的 RhoA 活性降低。H<sub>2</sub>S 供体 NaHS

( 50  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、30 min) 可直接增强 C3TF 诱导的 RhoA 活性降低 ,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) 。见图 5。

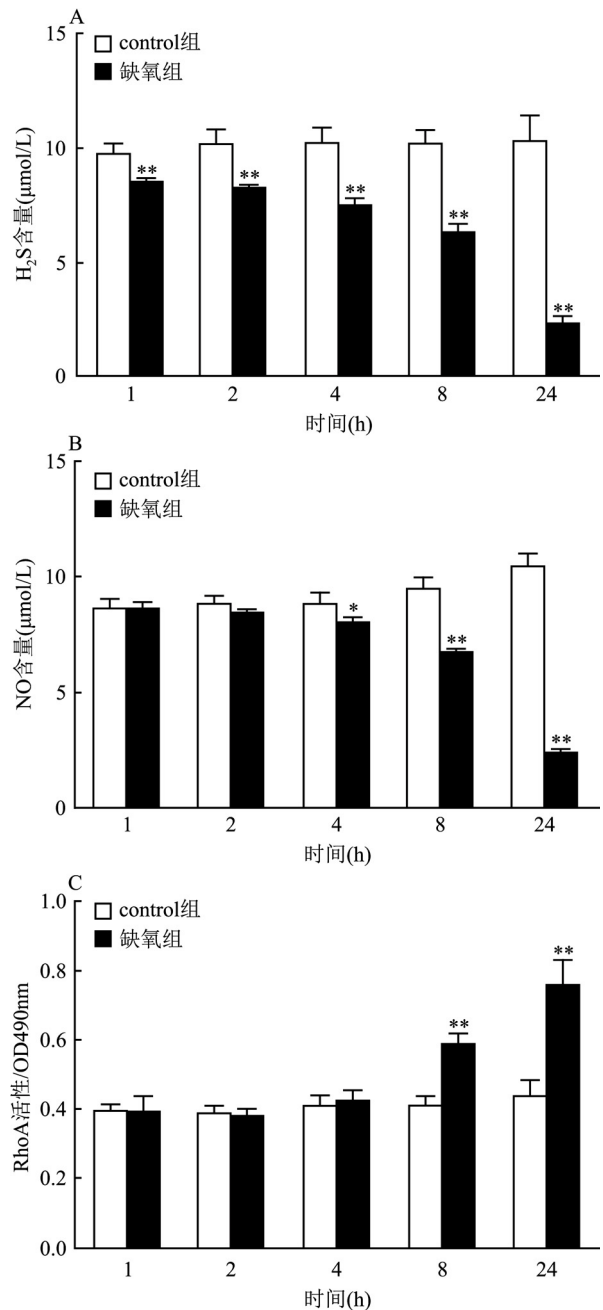


图 3 大鼠脑血管内皮细胞低氧 H<sub>2</sub>S、NO 的含量和 RhoA 活性的动态变化 (  $n = 3$  )

A: H<sub>2</sub>S 含量动态变化; B: NO 含量动态变化; C: RhoA 活性动态变化; 与 control 组比较: \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$

**2.5.3 外源性 H<sub>2</sub>S 对 RhoA 活性的影响** 外源性 H<sub>2</sub>S 供体硫化钠 ( sodium hydrosulfide ,NaHS) 10、50 和 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$  处理 30 min ,与 control 组比较差异有统计学意义 ,可明显并呈一定的浓度依赖性地

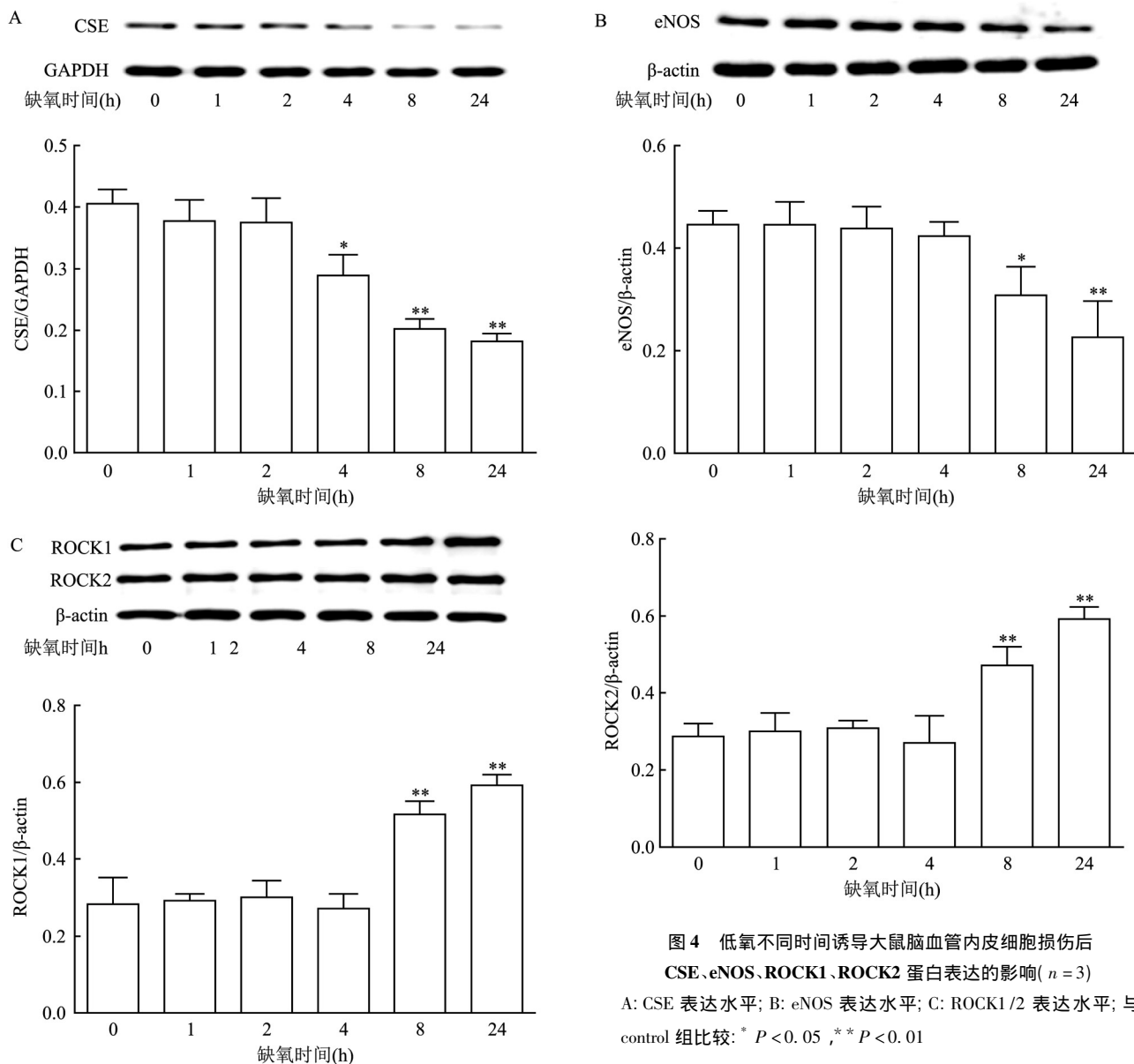


图4 低氧不同时间诱导大鼠脑血管内皮细胞损伤后 CSE、eNOS、ROCK1、ROCK2 蛋白表达的影响 (n=3)

A: CSE 表达水平; B: eNOS 表达水平; C: ROCK1/2 表达水平; 与 control 组比较: \* P<0.05, \*\* P<0.01

降低 RhoA 活性 提示外源性 H<sub>2</sub>S 也可抑制 RhoA 的激活。见图 6。

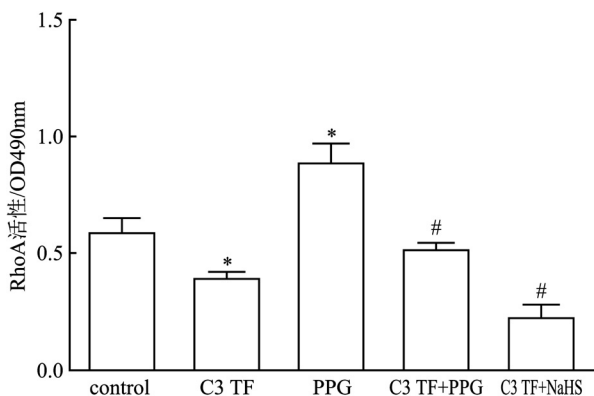


图5 PPG 对大鼠脑血管内皮细胞中 RhoA 活性的影响 (n=3) 与 control 组比较: \* P<0.05; 与 C3 TF 组比较: #P<0.05

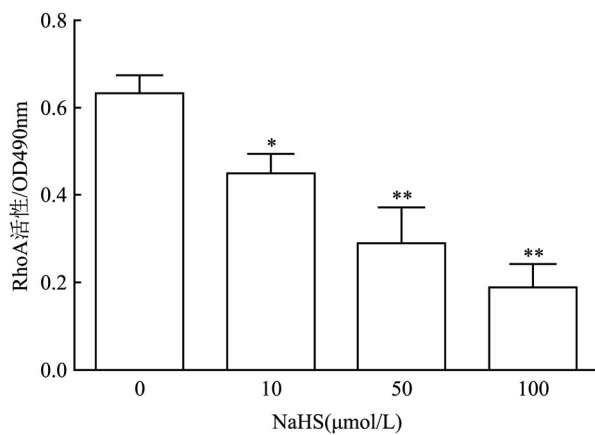


图6 NaHS 对大鼠脑血管内皮细胞中 RhoA 活性的影响 (n=3) 与 control 组比较: \* P<0.05, \*\* P<0.01

### 3 讨论

小 G 蛋白的 Rho 家族包括 RhoA、Rac1 和 Cdc42<sup>[6-7]</sup> 其中 RhoA 是最具特色的蛋白质,它作为分子开关在无活性的 GDP 结合和活性 GTP 结构之间循环,与下游靶点相互作用以引发各种细胞反应。研究<sup>[8]</sup>表明,RhoA-ROCK 通路心血管疾病发病机制有关,如冠状动脉粥样硬化性心脏病、高血压、心力衰竭等,其抑制剂法舒地尔(fasudil)可以治疗许多心血管疾病。

缺血性脑损伤是一严重危害人类健康的脑血管疾病,脑血管内皮与缺血性脑损伤的发生密切相关。内皮源性 NO 和 H<sub>2</sub>S 是调节脑血管内皮舒张功能的两种重要的血管内皮舒张因子,其改变参与了脑缺血损伤过程。在急性脑缺血动物模型中,有研究<sup>[9]</sup>显示脑缺血可激活 ROCK,而 ROCK 抑制剂 fasudil 或 Y-27632 可抑制 ROCK 的激活,并减少脑梗死面积。因此,RhoA-ROCK 通路的激活也是脑缺血损伤过程中的一个因素。本研究表明在大鼠脑血管内皮细胞低氧损伤过程中,内皮源性 H<sub>2</sub>S 和内皮源性 NO 分别在低氧 1 h 和 4 h 时发生了明显降低,而 RhoA-ROCK 通路活性在 8 h 时才有明显增加。并且 Western blot 检测结果也表明内皮源性 H<sub>2</sub>S 合成酶 CSE 和内皮源性合酶 eNOS 蛋白表达的降低及 ROCK 蛋白表达的增高分别发生在大鼠脑血管内皮细胞低氧的 4 h、8 h 和 8 h 时,也支持着内皮源性 H<sub>2</sub>S 降低发生最早。上述的实验结果还表明内皮源性 H<sub>2</sub>S 在低氧 1 h 时就明显降低了,但其合成酶 CSE 蛋白表达在 4 h 时才显著降低,提示在大鼠脑血管内皮细胞低氧过程中,H<sub>2</sub>S 合成酶 CSE 的活性也有显著降低,并且早于其蛋白表达的下降。因此,本研究结果表明在大鼠脑血管内皮细胞低氧损伤过程中,内皮源性 H<sub>2</sub>S 降低发生最早,其次为 NO,而 RhoA-ROCK 通路的激活迟于前二者。

在低氧损伤过程中,大鼠脑血管内皮中 RhoA-ROCK 通路改变迟于 NO 和 H<sub>2</sub>S 的降低,但前者的改变是否由 NO 和 H<sub>2</sub>S 降低引起的呢? 有研究<sup>[10]</sup>表明 NO 可阻止 RhoA 从细胞质转位到细胞膜上,从

而抑制 RhoA 的活化。研究表明内源性 H<sub>2</sub>S 和外源性 H<sub>2</sub>S 均可抑制 RhoA 的激活。并且内源性和外源性 H<sub>2</sub>S 均可增强 C3 TF 诱导的 RhoA 活性降低,也支持着 H<sub>2</sub>S 可抑制 RhoA 的激活。因此,结合前述的内皮源性 H<sub>2</sub>S 降低发生在前,RhoA-ROCK 通路激活发生在后,可以认为在低氧损伤过程中,大鼠脑血管内皮细胞中 RhoA-ROCK 通路的激活可能是继发于 H<sub>2</sub>S 的降低。至于内皮源性 H<sub>2</sub>S 与 NO 的相互作用已有大量文献报道,此处不再赘述了。

综上所述,在大鼠脑血管内皮细胞低氧损伤过程中,内皮源性 H<sub>2</sub>S 降低发生最早,其次为 NO,而 RhoA-ROCK 通路激活发生在后,可能是继发于 H<sub>2</sub>S 的降低。

### 参考文献

- [1] Cui J, Liu L, Zou J, et al. Protective effect of endogenous hydrogen sulfide against oxidative stress in gastric ischemia-reperfusion injury [J]. *Exp Ther Med* 2013, 5(3): 689-94.
- [2] Le Gal L, Alonso F, Mazzolai L, et al. Interplay between connexin40 and nitric oxide signaling during hypertension [J]. *Hypertension* 2015, 65(4): 910-5.
- [3] Liu H, Li J, Zhao F, et al. Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury [J]. *Rev Neurosci* 2015, 26(1): 105-17.
- [4] Rikitake Y, Kim H H, Huang Z, et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection [J]. *Stroke* 2005, 36(10): 2251-7.
- [5] Shin H K, Salomone S, Potts E M, et al. Rho-kinase inhibition acutely augments blood flow in focal cerebral ischemia via endothelial mechanisms [J]. *Cereb Blood Flow Metab* 2007, 27(5): 998-1009.
- [6] Fukata Y, Amano M. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells [J]. *Trends Pharmacol Sci* 2001, 22(1): 32-9.
- [7] Loirand G. The role of Rho protein signaling in hypertension [J]. *Nat Rev Cardiol* 2010, 7(11): 637-47.
- [8] Wettschreck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2002, 80(10): 629-38.
- [9] Rikitake Y, Kim H H, Huang Z, et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection [J]. *Stroke* 2005, 36(10): 2251-7.
- [10] Maruhashi T, Noma K, Iwamoto Y, et al. Critical role of exogenous nitric oxide in ROCK activity in vascular smooth muscle cells [J]. *PLoS One* 2014, 9(10): e109017.

## Anoxic injury down-regulates hydrogen sulfide in rat cerebrovascular endothelial cells and H<sub>2</sub>S-mediated activation of RhoA-ROCK pathway

Wang Liangfang, Chen Zhiwu

(Dept of Pharmacology Anhui Medical University Hefei 230032)

**Abstract Objective** To observe the effect of different hypoxic time on hydrogen sulfide(H<sub>2</sub>S), nitric oxide(NO)

## CD47 抗体对低氧/复氧大鼠心肌细胞的保护作用

黄伟<sup>1,2</sup>, 王邦宁<sup>1</sup>, 赵韧<sup>1</sup>, 朱继田<sup>2</sup>, 李倩<sup>2</sup>, 侯道荣<sup>3</sup>

**摘要** 目的 观察 CD47 抗体对大鼠原代心肌细胞低氧/复氧(H/R)损伤的保护作用,并探讨其可能的作用机制。方法

利用原代培养的 Wistar 乳鼠心肌细胞建立模拟心肌缺血再灌注模型。实验分为正常对照组、模型组(H/R组)、CD47+H/R组。测定培养细胞上清液乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)含量;使用 Annexin-V 与 PI 双染法及流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率;DHE 染色检测心肌细胞活性氧(ROS)水平;Western blot 检测心肌细胞 CD47、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和磷酸化一氧化氮合酶(p-eNOS)的表达。结果 与对照组比较,模型组心肌细胞的凋亡率明显升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,CD47 抗体可显著降低细胞凋亡率( $P < 0.01$ )。与对照组比较,模型组 LDH、CK、MDA 和 ROS 水平显著升高( $P < 0.01$ ),SOD 和 NO 含量水平显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,CD47 抗体 SOD 和 NO 水平显著提高( $P < 0.01$ ),LDH、CK、MDA 以及 ROS 水平显著降低( $P < 0.01$ )。Western blot 结果显示,与对照组比较,模型组 CD47 表达显著升高( $P < 0.01$ ),p-eNOS 表达显著降低

( $P < 0.01$ );与模型组比较,CD47+H/R 组 CD47 表达明显降低( $P < 0.01$ ),p-eNOS 表达明显升高( $P < 0.05$ )。结论 封闭 CD47 对大鼠原代心肌细胞低氧/复氧损伤具有保护作用,其机制可能与激活 eNOS/NO 通路使心肌细胞 NO 表达上调有关。

**关键词** CD47 抗体;心肌细胞;低氧复氧;抗氧化;抗凋亡;NO;eNOS

中图分类号 R 363.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)01-0055-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.011

心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是临床上心脏内科和心脏外科常见的病理生理现象,比如急性心肌梗死患者接受溶栓或介入治疗及血运重建均会造成 I/R 损伤<sup>[1-2]</sup>。心肌缺血再灌注损伤是缺血的心肌恢复血液供应后心肌细胞在形态、功能、代谢和电生理学表现等方面发生一系列的损伤表现<sup>[3]</sup>。这种损伤会激活细胞凋亡和自噬,导致细胞死亡<sup>[4]</sup>。通过有效的干预手段来减轻或预防 I/R 损伤是重要的临床课题。有研究<sup>[5]</sup>表明使用抗 CD47 单克隆抗体阻断 TSP1/CD47 信号,或者敲除 CD47,可以减轻小鼠心脏、肾脏、肝脏和组织皮瓣损伤。该研究采用大鼠原代心肌细胞低氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤模型,从抗氧化及抗凋亡等方面探讨抗体封闭 CD47 对体外培养心肌细胞 H/R 损伤的作用及其机制,旨在为其临床应

2018-08-24 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81600286)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院心内科,合肥 230022

<sup>2</sup>安徽省宿州市立医院心内科,宿州 234000

<sup>3</sup>南京医科大学医药实验动物中心,南京 211166

作者简介:黄伟,男,主治医师,硕士研究生;

王邦宁,女,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wangbangning@medmail.com.cn

and Ras homolog gene family, member A/Rho associated coiled coil-forming kinase(RhoA-ROCK) pathway in rat cerebrovascular endothelial cells(EC), and investigate the effect of dermatogenous H<sub>2</sub>S on the RhoA-ROCK pathway. **Methods** Rat brain vascular EC was cultured by collagenase digestion. The EC was measured for H<sub>2</sub>S and NO after hypoxia for 1, 2, 4, 8 and 24 h respectively. G-LISA was used to detect RhoA activity. Proteins expression changes were detected by Western blot. **Results** After 1 hour of hypoxia, the content of H<sub>2</sub>S decreased significantly, the NO content decreased significantly after hypoxia of 4 hours, the activity of RhoA increased significantly after hypoxia of 8 h. The expression of CSE protein decreased significantly after 4 h of hypoxia, the expression level of eNOS protein decreased significantly after 8 h of hypoxia, and the expression of ROCK1 and ROCK2 increased significantly at 8 h of hypoxia. Both endogenous and exogenous H<sub>2</sub>S inhibited RhoA activity. **Conclusion** During the hypoxic injury of rat cerebrovascular endothelial cells. The decrease of endogenous H<sub>2</sub>S occurred first, followed by NO, and the activation of RhoA-ROCK pathway occurred later, which may be secondary to the decrease of H<sub>2</sub>S. **Key words** endothelial cell; hypoxia; hydrogen sulfide; RhoA-ROCK pathway