引文格式:罗鑫,刘太祥,任荟璇,罗艳. 硫化氢对 H_2O_2 诱导的视网膜神经节细胞氧化损伤的保护作用[J]. 眼科新进展,2017,37(6):515-518. doi:10.13389/j.cnki.rao.2017.0130

【实验研究】

硫化氢对 H_2O_2 诱导的视网膜神经节细胞氧化损伤的保护作用△

罗鑫 刘太祥 任荟璇 罗艳

作者简介:罗鑫,女,1976年8月出生,贵州遵义人,医学博士,副主任医师。E-mail:luoliu2005@163.com;ORCID:0000-0002-4510-2700
作者简介:刘太祥,男,1974年10月出生,贵州遵义人,医学博士,副主任医师。E-mail:0852.ltx@163.com;ORCID:0000-0003-0573-8349
注:罗鑫和刘太祥同为第一作者!

About LUO Xin: Female, born in August, 1976. Doctor degree, associate chief physician. E-mail: luoliu2005@163.com; ORCID: 0000-0002-4510-2700
About LIU Tai-Xiang: Male, born in October, 1974. Doctor degree, associate chief physician. E-mail: 0852.ltx@163.com; ORCID: 0000-0003-0573-8349

收稿日期:2016-12-07
修回日期:2017-01-30
本文编辑:董建军
△**基金项目**:贵州省科学技术基金资助(编号:20147588);遵义医学院博士启动基金(编号:201307)
作者单位:563003 贵州省遵义市,遵义医学院附属医院贵州省眼科医院
Received date: Dec 7, 2016
Accepted date: Jan 30, 2017
Foundation item: Guizhou Science and Technology Foundation (No: 20147588); Doctor's Initial Funding of Zunyi Medical College (No:201307)
From the *Guizhou Eye Hospital, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi* 563003, *Guizhou Province, China*

Protective effects of H_2S against H_2O_2-induced oxidative injury in RGC

LUO Xin, LIU Tai-Xiang, REN Hui-Xuan, LUO Yan

【Key words】 oxidative stress; retinal ganglion cell; hydrogen sulfide; optic atrophy 1

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effects and possible mechanism of hydrogen sulfide (H_2S) against oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) in retinal ganglion cell-5 (RGC-5). **Methods** RGC-5 cells were divided into four groups: RGC-5 group (normal control group), RGC-5 + H_2O_2 (RGC-5 were cultured in 500 μmol·L^{-1} H_2O_2 for 24 hours) group, RGC-5 + NaHS (RGC-5 were cultured in 50 μmol·L^{-1} NaHS for 30 minutes) + H_2O_2 (RGC-5 were cultured in 500 μmol·L^{-1} H_2O_2 for 24 hours) group, and RGC-5 + NaHS (RGC-5 were cultured in 50 μmol·L^{-1} NaHS for 30 minutes) group. Western blots were applied to measure the expression of cytochrome c (Cyt. c) and optic atrophy 1 (OPA1). The fluorescent dye JC-1 assay was chosen to detect the mitochondrial membrane potential (ΔΨm). Furthermore, transmission electron microscope was used to observe the morphology of mitochondria. **Results** Compared with RGC-5 group, the expression of Cyt. c in RGC-5 + H_2O_2 group decreased in mitochondria, and increased in cytoplasm (all $P<0.05$), but there was no statistical difference between RGC-5 group and RGC-5 + NaHS + H_2O_2 group (all $P>0.05$). Compared with RGC-5 group, the expression of Cyt. c in RGC-5 + NaHS group increased in mitochondria, and decreased in cytoplasm (all $P<0.05$). Compared with RGC-5 group, the expression of OPA1 in RGC-5 + H_2O_2 group decreased in mitochondria, and increased in cytoplasm (all $P<0.05$). In RGC-5 + NaHS + H_2O_2 group and RGC-5 + NaHS group, the expression of OPA1 within and outside the mitochondria had no significant difference compared with RGC-5 group (all $P>0.05$). Compared with other three groups, the mitochondrial membrane potential in RGC-5 + H_2O_2 group obviously decreased, but there was no statistical difference among other three groups ($P>0.05$). The mitochondria were globular swelled in RGC-5 group, but in other three groups, the mitochondria had slightly swelled. **Conclusion** H_2S can protect the mitochondrial morphology and functions of RGC? 5 from H_2O_2-induced oxidative stress via preventing OPA1 release from mitochondria.

【中图分类号】 R774
【关键词】 氧化应激;视网膜神经节细胞;硫化氢;视神经萎缩蛋白1

【摘要】 **目的** 探讨硫化氢对 H_2O_2 诱导的视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)-5氧化损伤的保护作用及可能机制。**方法** 将RGC-5分为4组,RGC-5组为正常对照组;RGC-5 + H_2O_2 组:RGC-5在500 μmol·L^{-1} H_2O_2 中培养24 h诱导氧化损伤;RGC-5 + NaHS + H_2O_2 组:RGC-5置于50 μmol·L^{-1} NaHS中30 min后在500 μmol·L^{-1} H_2O_2 中培养24 h;RGC-5 + NaHS组:RGC-5置于50 μmol·L^{-1} NaHS中30 min。Western blot检测线粒体内、外细胞色素C和视神经萎缩蛋白1(optic atrophy 1, OPA1)表达;用荧光探针JC-1检测线粒体膜电位,用透射电镜观察线粒体形态。**结果** 与RGC-5组相比,RGC-5 + H_2O_2 组RGC-5细胞质内细胞色素C表达增加,而线粒体内的OPA1表达减少(均为$P<0.05$)。RGC-5组和RGC-5 + NaHS + H_2O_2 组线粒体内、外细胞色素C的表达差异均无统计学意义(均为$P>0.05$)。与RGC-5组相比,RGC-5 + NaHS组细胞质内细胞色素C表达减少,而线粒体内的细胞色素C表达增加(均为$P<0.05$)。与RGC-5组相比,RGC-5 + H_2O_2 组RGC-5细胞质内OPA1表达显著增加,而线粒体内的OPA1表达减少(均为$P<0.05$)。RGC-5 + NaHS + H_2O_2 组和RGC-5 + NaHS组RGC-5线粒体内、外OPA1的表达与RGC-5组相似,差异均无统计学意义(均为$P>0.05$)。RGC-5 + H_2O_2 组线粒体膜电位与其他3组比较明显下降,其余3组间线粒体膜电位比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。RGC-5 + H_2O_2 组线粒体肿胀呈球状,而其余3组线粒体肿胀不明显。**结论** 硫化氢可能通过阻止线粒体释放OPA1来减轻 H_2O_2 导致的RGC-5氧化损伤。

大鼠视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)含有丰富的能产生活性氧的线粒体。在高眼压或低氧状态下,细胞清除活性氧的能力下降,直接或间接损伤线粒体膜,降低线粒体膜电位并促进细胞色素 C 释放和 Caspase-3 激活,导致细胞凋亡[1-2]。硫化氢是一种重要的气体信号分子,可以中和超氧阴离子、H_2O_2[3]、过氧硝酸盐[4]及次氯酸盐[5]等氧化还原体系。研究表明,硫化氢作为一种强效的抗氧化剂是通过保护线粒体功能来防止心脏平滑肌和神经细胞遭受氧化应激损伤的[6]。在视网膜缺血再灌注前用硫化氢预处理,可以显著减少细胞色素 C 的释放并下调 Caspase-3 的表达[7]。目前,有关硫化氢保护 RGC 的线粒体通路机制仍然不清楚。本研究中,我们通过检测硫化氢预处理后 RGC-5 视神经萎缩蛋白 1(optic atrophy 1, OPA1)表达、线粒体膜电位以及线粒体形态学等方面的变化,来探讨硫化氢在 H_2O_2 诱导的 RGC-5 氧化损伤中的保护作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验分组 将 RGC-5 分为 4 组,RGC-5 组为正常对照组;RGC-5 + H_2O_2 组:RGC-5 在 500 μmol · L^{-1} H_2O_2 中培养 24 h 诱导氧化损伤[8];RGC-5 + NaHS + H_2O_2 组:RGC-5 置于 50 μmol · L^{-1} NaHS 中 30 min 后在 500 μmol · L^{-1} H_2O_2 中培养 24 h;RGC-5 + NaHS 组:RGC-5 置于 50 μmol · L^{-1} NaHS 中 30 min。

1.1.2 试剂及仪器 RGC-5(广州莱德尔生物科技有限公司);体积分数 10% 胎牛血清、100 U · mL^{-1} 青霉素及 100 μg · mL^{-1} 链霉素、DMEM 高糖培养基、PBS 液(Hyclone 公司);OPA1 蛋白(美国 Epitomics 公司);JC-1 荧光探针(Beyotime 公司);10 g · L^{-1} 锇酸固定液、30 g · L^{-1} 醋酸铀-枸橼酸铅(上海抚生实业有限公司);细胞线粒体分离试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);二氧化碳培养箱(深圳爱特尔电子科技有限公司);倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司);透射电镜(美国 FEI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 RGC-5 的复苏及培养 将水浴锅预热至 37 ℃,取出冻存管迅速解冻,投入到已经预热的水浴锅中迅速解冻后将细胞转移至 15 mL 离心管内;在低速离心机上,以 800 r · min^{-1} 离心 5 min;吸去上清液,用 1 mL 培养基重悬细胞;将细胞悬液分装入培养皿内,放入 37 ℃、含体积分数 5% CO_2、饱和湿度的二氧化碳培养箱内培养。

1.2.2 细胞色素 C 和 OPA1 的检测 取 1.0 ~ 2.5 mL 线粒体分离试剂加至 20×10^6 ~ 50×10^6 个细胞中,轻轻悬浮细胞,冰浴放置 10 ~ 15 min,匀浆后离心,沉淀为细胞线粒体,再次离心上清液后取出,即为去除线粒体的细胞浆蛋白。Western blot 检测线粒体内和去除线粒体的细胞浆内细胞色素 C 和 OPA1 蛋白。

1.2.3 线粒体膜电位检测 将不同处理的细胞收集在 6 孔板中,用 PBS 液洗涤 2 次,并加到 1 mL 无血清 DMEM 培养基中,然后注入 1 mL 10 μg · mL^{-1} 的 JC-1 荧光探针染色工作溶液。红色荧光代表 JC-1 线粒体聚集,表明高线粒体膜电位。绿色荧光代表 JC-1 的单体形式,表明线粒体膜电位的耗散。

1.2.4 线粒体形态检测 RGC-5 细胞用 10 g · L^{-1} 锇酸固定液固定 2 ~ 3 h,包埋固定后切成 50 ~ 60 nm 超薄切片,30 g · L^{-1} 醋酸铀-枸橼酸铅双染色后用透射电镜观察线粒体形态。

1.3 统计学处理 所有实验均重复检测 3 次。用 SPSS 17.0 中的 One-Way ANOVA 进行组间差异比较,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞色素 C 的表达 与 RGC-5 组相比,RGC-5 + H_2O_2 组中 RGC-5 细胞质内细胞色素 C 表达增加,而线粒体内的细胞色素 C 表达减少(均为 $P < 0.05$)。RGC-5 组和 RGC-5 + NaHS + H_2O_2 组 RGC-5 线粒体内、外细胞色素 C 的表达差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。RGC-5 + NaHS 组 RGC-5 细胞质内细胞色素 C 表达减少,而线粒体内的细胞色素 C 表达增加(均为 $P < 0.05$,见图 1)。

图 1 各组细胞中细胞色素 C 相对表达量的比较。* $P < 0.05$

2.2 OPA1 的表达 与 RGC-5 组相比,RGC-5 + H_2O_2 组 RGC-5 细胞质内 OPA1 表达显著增加,而线粒体内 OPA1 表达减少(均为 $P < 0.05$)。RGC-5 + NaHS + H_2O_2 组和 RGC-5 + NaHS 组 RGC-5 线粒体内、外 OPA1 的表达与 RGC-5 组相似,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$,见图 2)。

2.3 线粒体功能和形态的变化 红色和绿色的相对荧光比例代表膜电位的变化,比值越高表明膜电位越高。RGC-5 + H_2O_2 组线粒体膜电位与其他3组比较明显下降,其余3组间线粒体膜电位比较,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$,见图3 - 图4)。RGC-5 + H_2O_2 组线粒体肿胀呈球状,而其余3组线粒体肿胀不明显(图5)。

图2 各组细胞线粒体内、外 OPA1 相对表达量的比较

图3 各组倒置荧光显微镜下线粒体荧光染色结果。A:RGC-5 组;B:RGC + H_2O_2 组;C:RGC + NaHS + H_2O_2 组;D:RGC + NaHS 组

图4 各组倒置荧光显微镜下线粒体荧光强度比较

3 讨论

RGCs 凋亡是青光眼等致盲性眼病最主要的病理改变。而氧化应激是导致其凋亡或功能障碍的主要因素[9]。本研究中我们分析了硫化氢对 H_2O_2 诱导的 RGC-5 氧化损伤细胞线粒体膜电位和线粒体形态改变的影响,结果表明硫化氢能减少 H_2O_2 诱导 RGC-5 细胞线粒体膜电位的降低和线粒体肿胀。硫化氢能在 RGC-5 细胞受到氧化应激损伤时起到保护作用。

细胞色素 C 是重要的细胞凋亡激活因子[10]。有研究表明,在视网膜缺血再灌注前硫化氢预处理,可以显著减少细胞色素 C 从线粒体内释放[7],减少细胞凋亡。

线粒体途径是细胞凋亡的主要途径和中心环节。OPA1 蛋白位于线粒体膜间隙处,参与线粒体内膜融合,对维持线粒体形态、功能有重要作用[11]。该蛋白过度表达会促进线粒体网络化或在细胞核旁聚集成束;抑制 OPA1 蛋白表达则导致线粒体片段化及线粒体嵴紊乱[12],线粒体膜电位耗散,而后细胞色素 C 释放[13]。本研究发现,OPA1 在线粒体内、外的分布变化与细胞色素 C 一致,即 H_2O_2 处理后 RGC-5 线粒体中细胞色素 C 与 OPA1 显著下降、同时出现线粒体膜电位异常,线粒体肿胀。而 RGC-5 细胞经过硫化氢预处理后,OPA1 在线粒体内、外分布接近正常对照组并维持线粒体形态和线粒体膜电位不变。由此,我们推测硫化氢预处理可以阻止 OPA1 从

图5 透射电镜下各组线粒体形态(箭头,×30 000)。A:RGC-5 组;B:RGC-5 + H_2O_2 组;C:RGC-5 + NaHS + H_2O_2 组;D:RGC-5 + NaHS 组

线粒体释放到细胞质内,维持线粒体内 OPA1,从而维持线粒体膜电位以及减轻线粒体水肿,抑制细胞色素 C 释放,减少细胞凋亡。

本研究结果表明,H_2O_2 可以导致 OPA1 从线粒体内大量释放进入细胞质,破坏线粒体结构和功能。然而,硫化氢预处理可以通过调节 OPA1 的分布,维持线粒体的形态和功能,阻止细胞色素 C 从线粒体内外流,最终减轻 H_2O_2 对 RGC-5 的氧化应激损伤。推测硫化氢可以通过调节 OPA1 表达及分布保护线粒体功能和形态以减轻 H_2O_2 对 RGC-5 的氧化损伤。硫化氢调节 OPA1 释放的分子机制仍需进一步研究。

参考文献

[1] ARNOULT D, GRODET A, LEE YJ, ESTAQUIER J, BLACKSTONE C. Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(42):35742-35750.

[2] CHEN H, CHOMYN A, CHAN DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(28):26185-26192.

[3] GENG B, CHANG L, PAN C, QI Y, ZHAO J, PANG Y, *et al*. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318(3):756-763.

[4] WHITEMAN M, ARMSTRONG JS, CHU SH, JIA-LING S, WONG BS, CHEUNG NS, *et al*. The novel neuromodulator hydrogen sulfide An endogenous peroxynitrite "scavenger"[J]. *J Neurochem*, 2004, 90(3):765-768.

[5] WHITEMAN M, CHEUNG NS, ZHU YZ, CHU SH, SIAU JL, WONG BS, *et al*. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326(4):794-798.

[6] ELROD JW, CALVERT JW, MORRISON J, DOELLER JE, KRAUS DQ, TAO L, *et al*. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(39):15560-15565.

[7] BIERMANN J, LAGREZE WA, SCHALLNER N, SCHWER CI, GOEBEL U. Inhalative preconditioning with hydrogen sulfide attenuated apoptosis after retinal ischemia/reperfusion injury[J]. *Mol Vis*, 2011, 17(143):1275-1286.

[8] FAN B, LI GY, LI YP, CUI JZ. Neuroprotective effect of epigailocatechin gallate on oxidative-stress-injured retinal ganglion cells[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008, 88(24):1711-1714.

[9] GALETOVIC D, BOJIC L, BUCAN K, KARLICA D, LESIN M, ZNAOR L. The role of oxidative stress after retinallaser photocoagulation in nonproliferative diabeticretinopathy[J]. *Coll Antropol*, 2011, 35(3):835-840.

[10] LI P, NIJHAWAN D, BUDIHARDJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES, *et al*. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade[J]. *Cell*, 1997, 91(4):479-489.

[11] OLICHON A, ELACHOURI G, BARICAULT L, DELETTRE C, BELENGUER P, LENAERS G. OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(4):682-692.

[12] GRIPARIC L, VAN DER WEL NN, OROZCO IJ, PETERS PJ, VAN DER BLIEK AM. Loss of the intermembrane space protein MGM1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(4):18792-18798.

[13] OLICHON A, BARICAULT L, GAS N, GUILLOU E, VALETTE A, BELENGUER P. *et al*. Loss of OPA1 perturbates the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome C release and apoptosis[J]. *Biol Chem*, 2003, 278(2):7743-7746.