

研究论文

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

齐洪娜^{1,2,**}, 崔洁^{1,**}, 刘磊¹, 卢飞飞³, 宋成洁¹, 石玥¹, 闫长栋^{1,3,*}

徐州医学院¹生理学教研室; ²心血管研究所; ³江苏省麻醉学重点实验室, 徐州 221002

摘要: 本文旨在观察硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)供体硫氢化钠(NaHS)预处理对人脐静脉内皮细胞老化的影响及机制。原代人脐静脉内皮细胞株(HUVECs)传代培养到第12代为老年组; 自第4代细胞(年轻组)起, 给予NaHS孵育到第12代即为NaHS组。细胞衰老 β -半乳糖苷酶(SA β -gal)染色法检测细胞老化程度, DAPI荧光染色法检测细胞凋亡, 免疫印迹法测定细胞黄嘌呤氧化酶(XOD)、锰-超氧化物歧化酶(Mn-SOD)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶亚单位蛋白表达, 化学比色法检测HUVECs内SOD活性和过氧化氢(H₂O₂)含量。结果显示, 与年轻组相比, 老年组内皮细胞SA β -gal阳性率和凋亡率显著增加($P < 0.01$), 而NaHS预处理能明显减少细胞SA β -gal阳性率和凋亡率($P < 0.01$)。与年轻组相比, 老年组内皮细胞XOD和NADPH氧化酶亚单位p67^{phox}蛋白表达增加, Mn-SOD蛋白表达减少; NaHS组与老年组相比, XOD和p67^{phox}蛋白表达减少, Mn-SOD蛋白表达增加($P < 0.05$)。与年轻组相比, 老年组SOD活性降低, H₂O₂含量增加; NaHS组与老年组相比, SOD活性提高, H₂O₂含量减少($P < 0.01$)。以上结果提示, NaHS预处理能减轻老化HUVECs氧化应激水平, 起到延缓HUVECs老化的作用。

关键词: 硫化氢; 老化; 人脐静脉内皮细胞; 预处理; 氧化应激

中图分类号: R339.3+8

Exogenous hydrogen sulfide delays the senescence of human umbilical vein endothelial cells by lessening oxidative stress

QI Hong-Na^{1,2,**}, CUI Jie^{1,**}, LIU Lei¹, LU Fei-Fei³, SONG Cheng-Jie¹, SHI Yue¹, YAN Chang-Dong^{1,3,*}

¹Department of Physiology; ²Institute of Cardiovascular Disease; ³Jiangsu Province Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China

Abstract: The present study was aimed to investigate the effect of pretreatment with hydrogen sulfide (H₂S) on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) senescence and the underlying mechanism. Cultured HUVECs at twelfth and fourth passages were taken as old and young groups, respectively. Sodium hydrosulfide (NaHS, donor of H₂S) group was treated with NaHS from fourth to twelfth passage. The cell senescence was determined by senescence-associated β -galactosidase (SA β -gal) staining. DAPI fluorescent dye was used to detect cellular apoptosis. Western blot was used to analyze the expression levels of xanthine oxidase (XOD), manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) and the subunits p67^{phox} of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase in the HUVECs. Colorimetric method was used to detect SOD activity and cellular hydrogen peroxide (H₂O₂) level. The results showed that, compared with young group, the old group exhibited higher SA β -gal positive rate and cellular apoptosis, while NaHS pretreatment decreased SA β -gal positive rate and cellular apoptosis. Compared with the young group, the old group showed increased expression levels of XOD and p67^{phox}, as well as lower Mn-SOD expression level. With the pretreatment of NaHS, the up-

Received 2012-03-01 Accepted 2012-06-01

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK2009088) and Graduate Innovation Program of Jiangsu Province, China (No. CX095-0272).

**These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Tel: +86-516-85591016; Fax: +86-516-83262014; E-mail: yancd55@163.com

regulations of XOD and p67^{phox} levels and down-regulation of Mn-SOD level were inhibited. Compared with the young group, the old group showed lower SOD activity and higher H₂O₂ level, whereas NaHS pretreatment reversed the changes of SOD activity and H₂O₂ level. These results suggest that H₂S delays senescence of HUVECs through lessening oxidative stress.

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

衰老, 又称老化, 通常是指在正常情况下生物个体发育成熟后, 随着年龄增长机体的机能发生减退, 内环境稳定能力与应激能力下降, 机体组织结构逐渐退行性变化, 趋向死亡, 不可逆转的现象^[1]。衰老越来越被人们认为是心血管疾病如动脉粥样硬化、高血压和它们的合并症(如心肌梗塞和猝死)发生的独立的危险因素^[2,3]。其中血管内皮细胞的衰老是诱发各种心血管疾病的风险因素之一。随着年龄的增长, 内皮细胞发生功能性障碍而诱发各种心血管疾病^[4]。细胞凋亡是由体内内外因素触发细胞内预存的死亡程序而导致的细胞死亡过程, 又称程序性细胞死亡。细胞凋亡与机体老化过程中组织器官功能的退化、衰老相关疾病的发生、发展密切相关, 是衰老的成因之一^[5]。机体在遭受各种有害因素刺激时, 体内高活性分子如活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)等自由基产生过多, 超出机体对过氧化物的清除能力, 氧化系统和抗氧化系统失衡, 从而导致组织氧化应激损伤。有研究资料显示, 氧化应激导致的衰老除了与细胞诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS), 线粒体酶如烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶增多有关, 还与抗氧化系统酶如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)减少有关^[6]。我们的前期研究结果显示, 老年大鼠肠系膜动脉过氧化物的释放明显多于年轻大鼠^[7]。由于氧化应激损伤与衰老有着密切的联系, 所以现代抗衰老研究的目标是将自由基维持在一个适当的低水平, 维持氧化和抗氧化防御之间的平衡^[8]。因此, 对老化的机制研究, 尤其对氧化应激的研究具有重要的生物学意义和临床应用价值。

硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是继一氧化氮(nitric oxide, NO)和一氧化碳(carbon oxide, CO)之后的第三类气体信号分子^[9]。研究资料表明, H₂S在多种组织中发挥抗氧化应激和细胞保护作用^[10,11], H₂S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^[12]。目前已知ROS在

细胞老化及老化相关疾病的发生、发展中起着重要作用^[13], 然而对于H₂S对细胞老化的作用及其机制, 至今尚未完全阐明。因此, 本实验拟采用人脐静脉内皮细胞(HUVECs)老化模型, 应用H₂S供体硫化钠(NaHS)预处理, 观察外源性H₂S对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)老化程度和抗氧化酶的影响, 探讨H₂S对人脐静脉内皮细胞老化的作用。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 DMEM干粉培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司; NaHS、谷氨酰胺、胰蛋白酶、青霉素、链霉素、胰蛋白酶(0.25% Trypsin-EDTA)购自Sigma公司; 细胞衰老 β -半乳糖苷酶(SA β -gal)染色试剂盒购自上海碧云天生物技术研究, SOD测试盒、过氧化氢(H₂O₂)测试盒购自南京建成生物工程研究所; 兔抗黄嘌呤氧化酶(XOD)、Mn-SOD、NADPH氧化酶亚单位p67^{phox}、 β -actin抗体购自美国Santa Cruz公司; 山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; BCA蛋白定量检测试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; NBT/BCIP显色液购自Promega公司。

1.2 细胞培养和分组 取HUVECs(CC-2517, Lonza公司, 美国)解冻复苏后, 无菌条件下移入细胞培养瓶(25 cm², Corning公司, 美国)中, 加入含有10%胎牛血清的DMEM培养基置37℃、5% CO₂培养箱中静置培养。待细胞生长融合后弃去细胞培养基, 加入适量的0.25%胰蛋白酶消化、吹打分散细胞后, 再加入含10%胎牛血清的DMEM培养基制成细胞悬液, 调整细胞密度为1×10⁶个/mL, 接种于细胞培养瓶中, 置入CO₂培养箱继续培养。参照文献^[14]方法, 取对数生长期的细胞进行实验。分组如下: (1)年轻组: 原代内皮细胞培养到第4代即为年轻组; (2)老年组: 年轻细胞传代到第12代即为老年组; (3)NaHS组: 第4代细胞(年轻细胞)给予10 μ mol/L NaHS孵育到第12代。细胞每48 h更换培养基1次。

1.3 SA β -gal 染色检测细胞老化的程度 实验采

用 Serrano 等^[15]提出的经典衰老细胞鉴定方法。细胞培养瓶中的单层细胞用 PBS (pH 7.2) 洗 1 次, PBS 配制的 0.5% 戊二醛溶液固定 5 min, 随后用 PBS (含 1 mmol/L MgCl₂) 洗 1 次, 最后用 PBS 新鲜配制的 X-gal 染液 (含 1 g/L X-gal, 0.12 mmol/L K₃Fe[CN]₆, 0.12 mmol/L K₄Fe[CN]₆, 1 mmol/L MgCl₂, pH 6.0) 在 37 °C 下染色 12~16 h。荧光显微镜 (日本 Olympus, DP72) 下观察, 胞浆呈蓝色者为阳性细胞, 表示细胞处于衰老状态。SA β -gal 染色阳性率的计算方法为: 400 倍下每孔中随机选取 10 个视野, 计算出的阳性细胞数占总细胞数的百分率。

1.4 DAPI 荧光染色检测细胞凋亡率 将生长于 24 孔培养板中的 HUVECs 用 PBS 溶液轻洗 2 次, 4% 多聚甲醛 (溶于 0.1 mol/L PB, pH 7.4) 室温固定 15 min 后, 再用 PBS 溶液轻洗 2 次, 加入 10 μ g/mL 4,6-二氨基-2-苯基吲哚 (4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, 一种荧光性的 DNA 结合染料, 用含 0.2% Triton 的 PBS 溶解) 37 °C 孵育 30 min。在荧光显微镜 (Olympus) 下以 400 nm 波长激发光, 455 nm 波长发射光观察。细胞发生凋亡的判定方法为: 细胞的胞核边缘不规则, 细胞核染色体浓集, 着色较重, 并伴有细胞核固缩和细胞核碎片增加现象。凋亡率的计算方法为: 400 倍下每孔中随机选取 10 个视野, 计算出的凋亡细胞总数占总细胞数的百分率。

1.5 Western blot 检测 XOD、Mn-SOD 和 p67^{phox} 蛋白水平 倾出培养瓶内的培养基, 用冰冷的 PBS 或 Hank's 液洗细胞 3 遍, 尽量吸尽残余的液体。每瓶中加入 80 μ L 冰冷的匀浆液, 分两次加入, 冰上快速刮取细胞、收集, 液氮冻存储备用。临用前, 把样品从液氮取出后于冰盒中复温, 冰浴中超声破碎 10 s $\times$ 3, 每次破碎时间间隔 30 s~1 min。样品用 BCA 法测定蛋白浓度后备用。等量蛋白样品经 10% SDS-聚丙烯酰胺电泳 (SDS-PAGE) 分离后, 以湿转/半干转法电转至 PVDF 膜上, 半干转法转移电流为 PVDF 膜的面积 $\times$ 2.5 mA, 转膜时间根据相对分子质量的大小而定。转移后的 PVDF 膜经 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 3 h, 加入一抗 (兔抗 XOD、Mn-SOD 和 NADPH 氧化酶的亚单位 p67^{phox} 抗体, 1:500) 室温摇床孵育 4 h 或 4 °C 过夜。TBST 洗膜 3 次后, 换入相应的二抗 (山羊抗兔二抗, 1:2 000), 室温孵育 2 h。TBST 洗膜后以 NBT/BCIP 显色。采用 Image J 图像分析系统对 Western 印迹结果进行

分析, 以目的蛋白与 β -actin 灰度的比值表示目的蛋白的相对含量。

1.6 化学比色法检测总 SOD 活性和 H₂O₂ 含量 实验采用黄嘌呤及 XOD 反应系统产生超氧阴离子自由基, 后者氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显示剂的作用下呈现紫红色, 用可见光分光光度计测其 550 nm 波长处吸光度。当细胞培养上清液中含 SOD 时, 则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用, 利用比色法计算出上清中 SOD 活力, 每毫升反应液中抑制亚硝酸盐形成达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位 (U)。实验步骤参照 SOD 测试试剂盒说明书进行。

H₂O₂ 可以与钼酸作用生成一种络合物, 以 163 mmol/L H₂O₂ 标准品作为标准, 通过检测细胞培养上清液中的 H₂O₂ 含量, 在 405 nm 处用可见光分光光度计测其吸光度值, 利用比色法计算出相应的 H₂O₂ 的量。实验步骤参照 H₂O₂ 测试试剂盒说明书进行。

1.7 统计学处理 实验数据用 mean $\pm$ SD 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析, 多样本均数比较采用方差分析, 两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NaHS预处理降低HUVECs的SA β -gal阳性率

与年轻组相比, 老年组 SA β -gal 阳性率明显增加 ($P < 0.01$); NaHS 组细胞 SA β -gal 阳性率明显低于老年对照组 (NaHS 0 μ mol/L) ($P < 0.01$), 提示 NaHS 可延缓内皮细胞的衰老 (图 1)。

2.2 NaHS预处理降低HUVECs凋亡率

与年轻组相比, 老年组细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.01$); NaHS 组细胞凋亡率明显低于老年对照组 ($P < 0.01$), 提示 NaHS 可减少老年内皮细胞的凋亡 (图 2)。

2.3 NaHS预处理降低HUVECs H₂O₂含量

与年轻组相比, 老年组细胞 H₂O₂ 含量明显增加 ($P < 0.01$); NaHS 组细胞 H₂O₂ 含量明显低于老年对照组 ($P < 0.01$), 提示 NaHS 可减少老年内皮细胞的 H₂O₂ 含量, 从而减少细胞内氧自由基的生成 (图 3)。

2.4 NaHS预处理降低XOD蛋白表达

与年轻组相比, 老年对照组 XOD 蛋白表达增加 57.90% ($P < 0.01$); NaHS 组与老年对照组相比, XOD 蛋白表达降低 27.61% ($P < 0.05$), 表明 H₂S 可降低老年细胞的 XOD 蛋白表达 (图 4)。

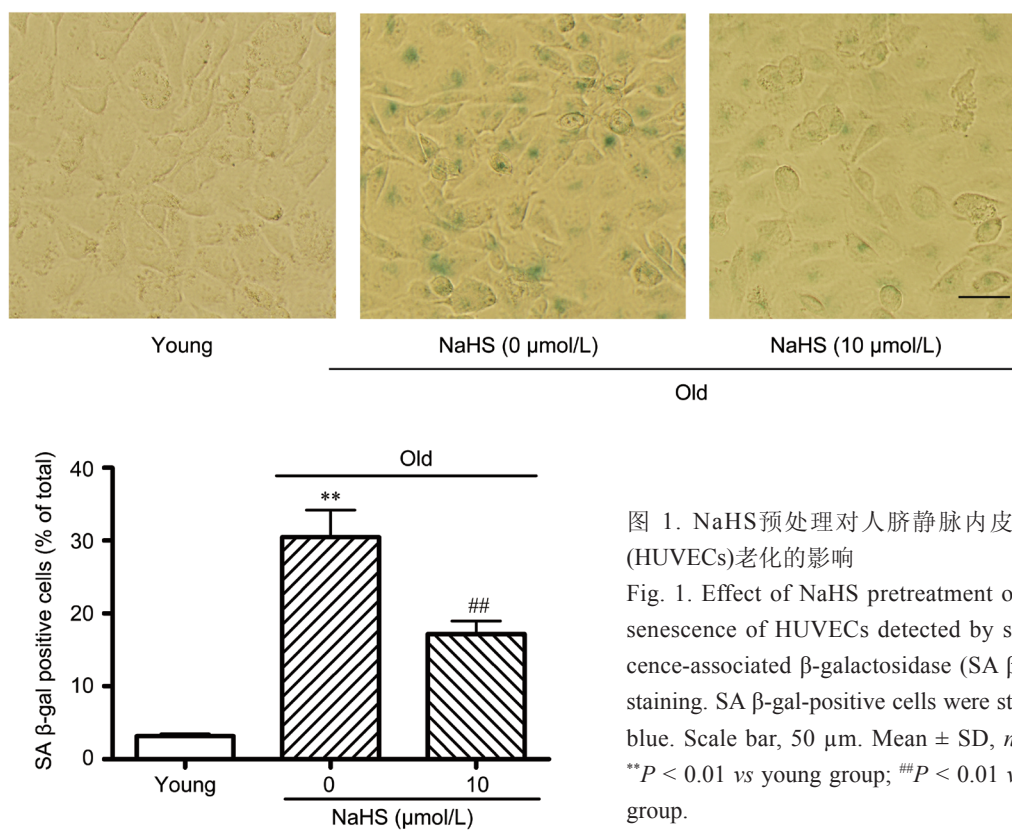


图 1. NaHS预处理对人脐静脉内皮细胞 (HUVECs)老化的影响

Fig. 1. Effect of NaHS pretreatment on the senescence of HUVECs detected by senescence-associated β-galactosidase (SA β-gal) staining. SA β-gal-positive cells were stained blue. Scale bar, 50 μm. Mean ± SD, $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs young group; ## $P < 0.01$ vs old group.

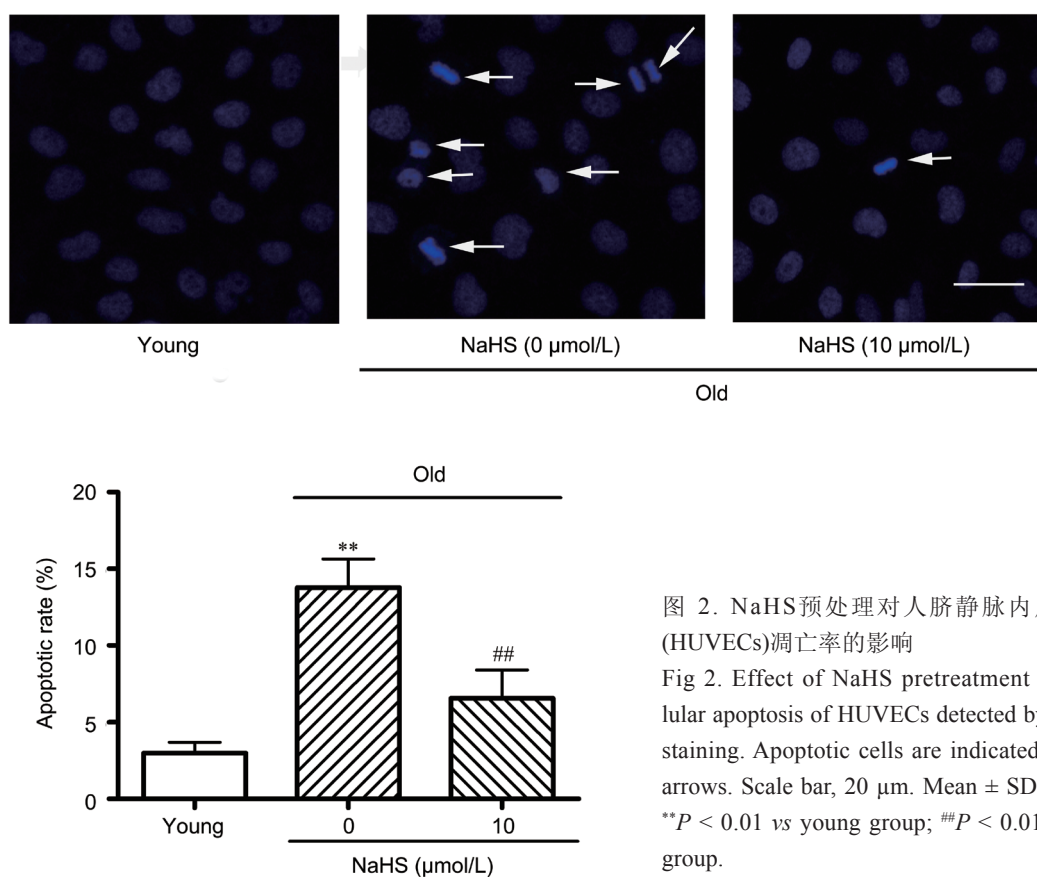


图 2. NaHS预处理对人脐静脉内皮细胞 (HUVECs)凋亡率的影响

Fig 2. Effect of NaHS pretreatment on cellular apoptosis of HUVECs detected by DAPI staining. Apoptotic cells are indicated by the arrows. Scale bar, 20 μm. Mean ± SD, $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs young group; ## $P < 0.01$ vs old group.

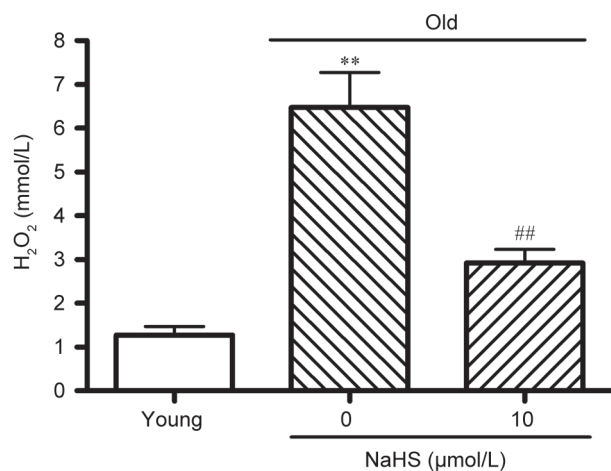


图3. NaHS预处理对人脐静脉内皮细胞(HUVECs) H₂O₂含量的影响

Fig. 3. Effect of NaHS pretreatment on the cellular level of H₂O₂ in HUVECs detected by colorimetric method. Mean $\pm$ SD, $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs young group; ## $P < 0.01$ vs old group.

2.5 NaHS预处理降低NADPH 亚基p67^{phox}蛋白表达

与年轻组相比, 老年对照组 NADPH 亚基 p67^{phox} 蛋白表达增加 64.10% ($P < 0.01$); NaHS 组与老年对照组相比, NADPH 亚基 p67^{phox} 蛋白表达降低 25.22% ($P < 0.01$), 表明 H₂S 可降低老年细胞的 p67^{phox} 蛋白表达 (图 5)。

2.6 NaHS预处理上调Mn-SOD蛋白表达

与年轻组相比, 老年对照组 Mn-SOD 蛋白表达减少 34.19% ($P < 0.01$); NaHS 组与老年对照组相比, Mn-SOD 蛋白表达增加 31.23% ($P < 0.05$), 表明 H₂S 可使老年细胞 Mn-SOD 蛋白表达上调 (图 6)。

2.7 NaHS预处理增加HUVECs SOD活性

与年轻组相比, 老年组细胞 SOD 活性明显下降 ($P < 0.01$); NaHS 组细胞 SOD 活性明显高于老年对照组 ($P < 0.01$), 提示 NaHS 可提高老年内皮细胞的 SOD 活性, 从而增强清除细胞内氧自由基的作用 (图 7)。

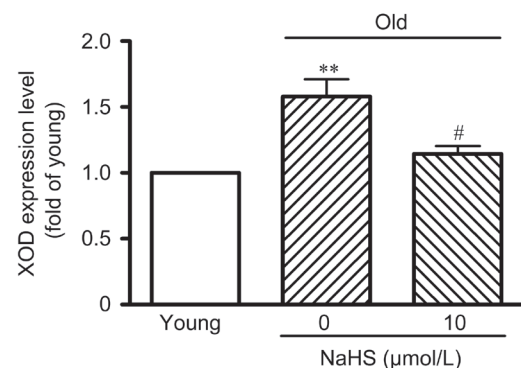
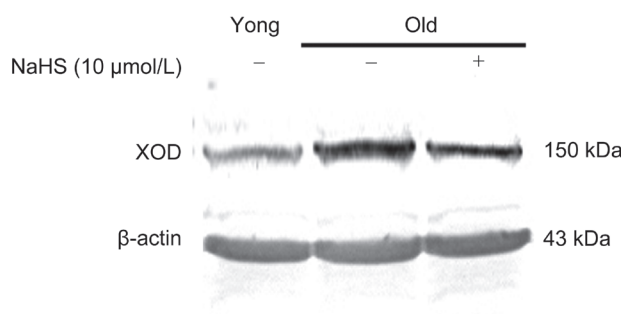


图 4. NaHS预处理对人脐静脉内皮细胞(HUVECs) XOD蛋白表达的影响

Fig. 4. Effect of NaHS pretreatment on the expression level of XOD in HUVECs detected by Western blot. Mean $\pm$ SD, $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs young group; # $P < 0.05$ vs old group.

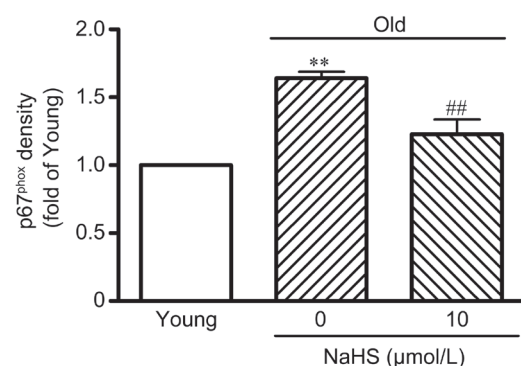
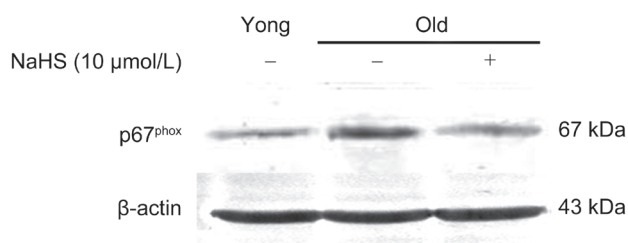


图 5. NaHS预处理对人脐静脉内皮细胞(HUVECs) 亚基p67^{phox}蛋白表达的影响

Fig. 5. Effect of NaHS pretreatment on the expression level of p67^{phox} in HUVECs detected by Western blot. Mean $\pm$ SD, $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs young group; ## $P < 0.01$ vs old group.

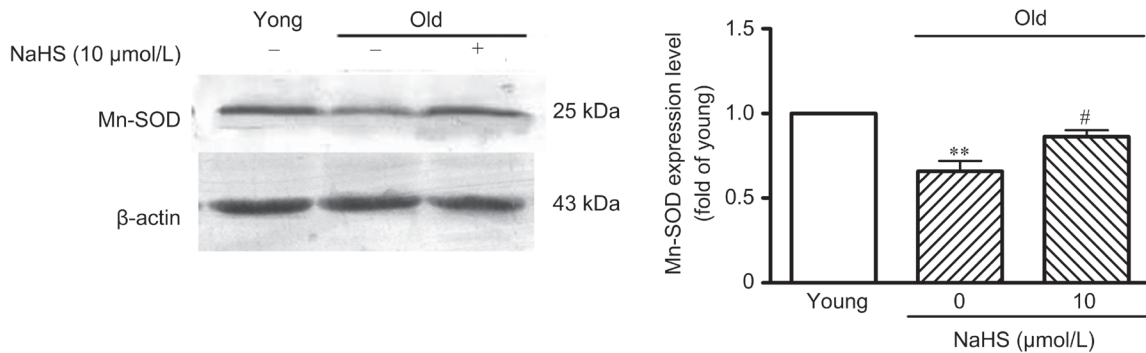


图 6. NaHS 预处理对人脐静脉内皮细胞(HUVECs) Mn-SOD 蛋白表达的影响

Fig 6. Effect of NaHS pretreatment on the expression level of Mn-SOD in HUVECs detected by Western blot. Mean $\pm$ SD, $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs young group; # $P < 0.05$ vs old group.

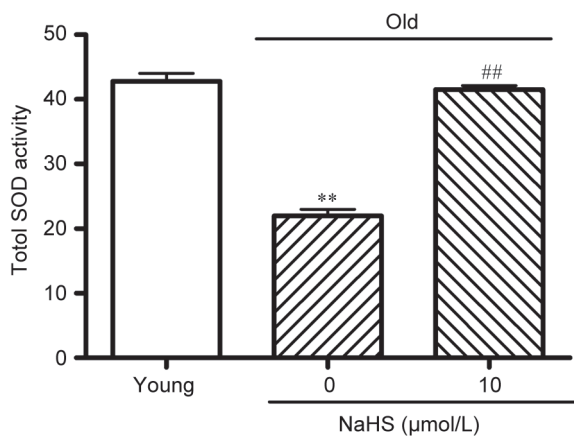


图 7. NaHS 预处理对人脐静脉内皮细胞(HUVECs) SOD 活性的影响

Fig. 7. Effect of NaHS pretreatment on the activity of SOD detected by colorimetric method. Mean $\pm$ SD, $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs young group; ## $P < 0.01$ vs old group.

3 讨论

本实验研究结果显示, H_2S 能使表达 SA β -gal 细胞的阳性率明显降低, 即延缓了体外培养的人脐静脉内皮细胞的老化过程。同时 H_2S 明显减少老化的人脐静脉内皮细胞凋亡率。 H_2S 的作用主要与改变衰老的氧化应激机制有直接的关系, 其降低细胞的 H_2O_2 含量, 减少细胞所受的氧化应激损伤。这种作用主要与 H_2S 上调 Mn-SOD 的表达、提高 SOD 的活性和减少 XOD 和 NADPH 亚基 p67^{phox} 蛋白的生成有关, 表明给予外源性 H_2S 预处理对于延缓人脐静脉内皮细胞老化有十分重要的意义。

长期以来人们对机体衰老的起因、机制进行了不断的探索和研究, 随着生理年龄的增长, 内皮细

胞发生功能性障碍从而诱发各种心血管损伤^[16,17]。而氧化应激是目前较为普遍接受的细胞衰老的外在诱因^[18,19]。我们以前的研究表明, 高压诱导的老年大鼠肠系膜动脉内皮细胞的过氧化物的产生明显高于年轻大鼠^[7]。细胞内的 ROS 主要来自线粒体的有氧呼吸, 高浓度的 ROS 可促进细胞衰老的发生。因此, ROS 是调节细胞衰老的重要信号分子, ROS 增多能促使细胞加快进入衰老状态^[18]。本实验结果也显示, 老年细胞中 H_2O_2 的含量明显高于年轻细胞。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。SOD 是机体内重要的氧自由基清除剂, 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^[20]。我们在实验中观察到, 与年轻组相比, 老年对照组 Mn-SOD 蛋白表达减少, XOD 和 NADPH 亚基 p67^{phox} 蛋白表达增加, 除此之外, 老年对照组 SOD 的活性也有所降低。

越来越多的研究证实, H_2S 作为一种细胞保护物质在人体多个系统中发挥着重要的生理作用, 其中 H_2S 作为一种内源性的抗氧化剂起细胞保护作用。Guan 等^[21] 研究显示, H_2S 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 HUVECs 的凋亡。给予 H_2S 的供体 NaHS 预处理能明显减轻心脏缺血再灌注引起的损伤程度, 而给予 H_2S 合成酶的抑制剂 PPG 后损伤却加重, 表明 H_2S 在缺血再灌注损伤过程中起保护作用^[22], 但 H_2S 是否对 HUVECs 的老化有保护作用目前尚不清楚。本研究结果显示, H_2S 预处理能使表达 SA β -gal 细胞的阳性率明显减少, 细胞凋亡率降低, 减轻 HUVECs 的老化程度, 表明外源性

H₂S 对 HUVECs 的老化起延缓作用。

H₂S 可以通过抑制 p38 和激活 ERK1/2 MAPK 信号通路, 保护 H₂O₂ 诱导的 MC3T3-E1 成骨细胞的氧化应激损伤和对细胞增殖和分化的抑制作用^[23]。有资料显示, H₂S 对 1-甲基-4-苯基-吡啶离子(MPP⁺)通过线降低 MMP 的缺失和增加 ROS 浓度所导致的大鼠嗜铬细胞瘤细胞系 PC12 细胞损伤和凋亡有减轻作用^[24]。本研究的结果显示, H₂S 预处理能减轻 HUVECs 的老化程度, 这种作用主要与其降低细胞氧化应激水平有关, 给予 NaHS 预处理能减少老年细胞的 H₂O₂ 含量, 使 XOD 和 NADPH 氧化酶亚基 p67^{phox} 蛋白表达减少, 并上调 Mn-SOD 蛋白表达。此外, 给予 NaHS 预处理使 SOD 的活性增加, 推测 H₂S 能通过减少氧自由基生成和增强清除氧自由基能力, 从而减轻细胞氧化应激水平而发挥延缓 HUVECs 老化的作用。

综上所述, 研究表明, H₂S 预处理可以延缓 HUVECs 的老化, 这种细胞保护作用机制可能与 H₂S 降低氧化应激水平发挥抗老化作用有关, 一方面, H₂S 通过增加 ROS 清除酶的活性从而增强细胞清除 ROS 的能力, 另一方面, H₂S 通过减少 ROS 的生成从而减轻其对细胞老化的促进作用。因此, 给予适量的外源性 H₂S 或者增加内源性 H₂S 的生成对细胞老化过程能够起到延缓作用。由此可见, H₂S 对于临床预防多种心血管疾病的发生具有一定应用价值, 但有关 H₂S 在整体水平对老化的影响及其详细机制值得进一步深入探讨。

参考文献

- Turnheim K. When drug therapy gets old: pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly. *Exp Gerontol* 2003; 38(8): 843–853.
- Stauffer BL, Westby CM, DeSouza CA. Endothelin-1, aging and hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2008; 23(4): 350–355.
- Santhanam L, Lim HK, Miriel V, Brown T, Patel M, Balanson S, Ryoo S, Anderson M, Irani K, Khanday F, Di Costanzo L, Nyhan D, Hare JM, Christianson DW, Rivers R, Shoukas A, Berkowitz DE. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Circ Res* 2007; 101(7): 692–702.
- Quyyymi AA. Endothelial function in health and diseases: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med* 1998; 105: 32S–39S.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci* 2005; 28(12): 670–676.
- Cosentino F, Francia P, Camici GG, Pelicci PG, Luscher TF, Volpe M. Final common molecular pathways of aging and cardiovascular disease: role of the p66Shc protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(4): 622–628.
- Jacobson A, Yan C, Gao Q, Rincon-Skinner T, Rivera A, Edwards J, Huang A, Kaley G, Sun D. Aging enhances pressure-induced arterial superoxide formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(3): H1344–1350.
- Limoli CL, Kaplan MI, Giedzinski E, Morgan WF. Attenuation of radiation-induced genomic instability by free radical scavengers and cellular proliferation. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(1): 10–19.
- Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002; 16(13): 1792–1798.
- Kimura Y, Goto Y, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12(1): 1–13.
- Kimura Y, Dargusch R, Schubert D, Kimura H. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(3–4): 661–670.
- Chen SL, Yang CT, Yang ZL, Guo RX, Meng JL, Cui Y, Lan AP, Chen PX, Feng JQ. Hydrogen sulfide protects H9c2 cells against chemical hypoxia-induced injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37(3): 316–321.
- Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct* 2012; 2012: 646354.
- Vasa M, Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ Res* 2000; 87: 540–542.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88(5): 593–602.
- Marx N, Grant PJ. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease-the lull before the storm. *Diab Vasc Dis Res* 2007; 4(2): 82–83.
- Friedewald VE, Giles TD, Pool JL, Yancy CW, Roberts WC. The Editor's Roundtable: Endothelial dysfunction in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2008; 102(4): 418–423.
- Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 2005; 120: 497–512.
- Giorqio M, Trinei M, Miqliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(9): 722–728.
- Slemmer JE, Shacka JJ, Sweeney MI, Weber JT. Antioxi-

- dants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Curr Med Chem* 2008; 15: 404–414.
- 21 Guan Q, Zhang Y, Yu C, Liu Y, Gao L, Zhao J. Hydrogen sulfide protects against high glucose-induced apoptosis in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; 59(2): 188–193.
- 22 Pan TT, Feng ZN, Lee SW, Moore PK, Bian JS. Endogenous hydrogen sulfide contributes to the cardioprotection by metabolic inhibition preconditioning in the rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40(1): 119–130.
- 23 Xu ZS, Wang XY, Xiao DM, Hu LF, Lu M, Wu ZY, Bian JS. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H₂O₂-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis. *Free Radic Biol Med* 2011; 50(10): 1314–1323.
- 24 Yin WL, He JQ, Hu B, Jiang ZS, Tang XQ. Hydrogen sulfide inhibits MPP(+)-induced apoptosis in PC12 cells. *Life Sci* 2009; 85(7–8): 269–275.