

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.25.005

文章编号: 1005-8982(2018)25-0020-06

硫化氢对顺铂诱导近端肾小管 上皮细胞凋亡的干预研究*

杨波¹, 倪倩¹, 朱艳¹, 赵欢顺¹, 杨成², 段绍斌³, 蒋云生³

(1. 南华大学附属第一医院 肾内科, 湖南 衡阳 421001; 2. 长沙医学院 临床系, 湖南 长沙 410219; 3. 中南大学湘雅二医院 肾内科, 湖南 长沙 410011)

摘要: **目的** 探讨硫化氢 H₂S 对顺铂 (DDP) 诱导近端肾小管上皮细胞凋亡的干预作用。 **方法** 研究分为阴性对照组、DDP 组、DDP+ 硫化氢 NaHS 组。 DDP 组: DDP 浓度为 0、1、2、5、10、20 和 40 mg/L; DDP+NaHS 组: NaHS 浓度分别为 0、0.2、0.4、0.5、0.8、1.0 和 2.0 mmol/L, 加 DDP (20 mg/L) 共同作用。 噻唑蓝 (MTT) 实验: DDP 组、DDP+NaHS 组与人近端肾小管上皮细胞株 (HK-2 细胞) 共同培养, 24 h 后测光密度 (OD) 值。 NaHS (0.5 和 1.0 mmol/L) 加 DDP (20 mg/L) 与 HK-2 细胞共同培养 24 h。 4,6- 联脒 -2- 苯基吡啶 (DAPI), Annexin V-FITC/PI 染色通过显微镜观察各组细胞的形态学改变。 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测各组细胞凋亡率。 **结果** MTT 实验: 0、1、2、5、10 和 20 mg/L DDP 浓度的 OD 值分别为 (0.270±0.064)、(0.229±0.022)、(0.198±0.024)、(0.189±0.069)、(0.188±0.030) 和 (0.165±0.012), OD 值随 DDP 浓度上升逐渐下降, 在 20 mg/L 低于阴性对照组 ($P < 0.05$)。 20 mg/L DDP 加浓度分别为 0.2、0.4、0.5、0.8 和 1.0 mmol/L NaHS 的 OD 值分别为 (0.173±0.051)、(0.186±0.023)、(0.259±0.050)、(0.263±0.033) 和 (0.268±0.098), 以上与浓度为 20 mg/L DDP 的 OD 值 (0.153±0.017) 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 DAPI、Annexin V-FITC/PI 染色荧光显微镜显示, 对照组 HK-2 细胞平均凋亡细胞数为 (4.230±1.015), 20 mg/L DDP 影响下为 (35.020±6.079), 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$), DDP 组高于阴性对照组。 DDP+NaHS 组在 0.5 和 1.0 mmol/L 的平均凋亡细胞分别为 (22.550±2.912) 和 (9.780±2.063), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), DDP+NaHS 组低于 DDP 组。 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测, 阴性对照组 HK-2 细胞凋亡率 (5.167±0.612)%, 在 20 mg/L DDP 影响下, 为 (31.598±1.014)%, 细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$)。 合用 NaHS 凋亡减少, 在 0.5 和 1.0 mmol/L 的凋亡率为 (18.375±2.239)% 和 (11.636±1.233)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), DDP+NaHS 组低于 DDP 组。 **结论** NaHS 对 DDP 导致的近端肾小管上皮细胞的凋亡有保护作用。

关键词: 近端肾小管上皮细胞; 硫化氢; 顺铂; 细胞凋亡

中图分类号: R692.6

文献标识码: A

Intervention of hydrogen sulfide on apoptosis of proximal renal tubular epithelial cells induced by cisplatin*

Bo Yang¹, Qian Ni¹, Yan Zhu¹, Huan-shun Zhao¹, Cheng Yang², Shao-bin Duan³, Yun-sheng Jiang³
(1. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Clinical Department, Changsha Medical College, Changsha, Hunan 410219, China;
3. Department of Nephrology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

Abstract: Objective To explore the intervention of hydrogen sulfide (H₂S) on apoptosis of proximal renal tubular epithelial cells induced by cisplatin (DPP). **Methods** The HK-2 cells were randomly assigned into a control group, DPP treated groups (0, 1, 2, 5, 10, 20 and 40 mg/L) and DPP (20 mg/L)+NaHS (0, 0.2, 0.4, 0.5, 0.8, 1.0 and

收稿日期: 2017-12-20

* 基金项目: 湖南省自然科学基金 (No: 13JJ3082)

2.0 mmol/L) treated groups. After the HK-2 cells were co-cultured with DPP or DPP+NaHS for 24 h, MTT assay was used to measure the OD value. Using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and Annexin V-FITC/PI double staining the morphological changes of each group were observed under fluorescence microscope, and flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of each group. **Results** According to MTT, the OD value was (0.270 ± 0.064) , (0.229 ± 0.022) , (0.198 ± 0.024) , (0.189 ± 0.069) , (0.188 ± 0.030) and (0.165 ± 0.012) respectively in the DDP groups with different concentrations (0, 1, 2, 5, 10, and 20 mg/L), DDP accelerated HK-2 cell apoptosis in a concentration-dependent manner, there was significant difference in the OD value between the 20 mg/L DDP group and the control group ($P < 0.05$). Adding H_2S (0.2, 0.4, 0.5, 0.8, and 1.0 mmol/L) and DPP (20 mg/L) into the cells, the OD was (0.173 ± 0.051) , (0.186 ± 0.023) , (0.259 ± 0.050) , (0.263 ± 0.033) and (0.268 ± 0.098) respectively, with significant increases compared to (0.153 ± 0.017) after adding 20 mg/L DDP alone ($P < 0.05$), the protective effect of H_2S was also in a concentration-dependent manner. Through the DAPI, Annexin V-FITC/PI staining, under the effect of 20 mg/L DDP, the average number of apoptotic cells in visual field of HK-2 cells was (35.020 ± 6.079) , while that in the normal negative control group was (4.230 ± 1.015) , there was statistical significance between them ($P < 0.05$). Adding 0.5 and 1.0 mmol/L of NaHS could ameliorate apoptosis, the average number of apoptotic cells in visual field was (22.550 ± 2.912) and (9.780 ± 2.063) , which were significantly lower than that of the DDP group ($P < 0.05$). Flow cytometry revealed that 20 mg/L DDP incubated with HK-2 cells for 24 h led to apoptosis with the rate of $(31.598 \pm 1.014)\%$ which was significantly higher than $(5.167 \pm 0.612)\%$ of the normal negative control group ($P < 0.05$). However, adding NaHS (0.5 and 1.0 mmol/L) could reduce apoptosis, the apoptosis rate were $(18.375 \pm 2.239)\%$, $(11.636 \pm 1.233)\%$, which were statistically lower than that of the DDP group ($P < 0.05$). **Conclusions** The apoptosis of human renal tubular epithelial cells induced by cisplatin can be protected by hydrogen sulfide in a concentration-dependent manner.

Keywords: human renal tubular epithelial cell; hydrogen sulfide, cisplatin; apoptosis

硫化氢 (sulfuretted hydrogen, H_2S) 目前被誉为除一氧化氮和一氧化碳的体内第 3 种气体分子, 其在多种生理病理过程中担任着重要的角色, 具有调节突触活动、舒张血管及抑制红细胞氧化等重要生理功能。 H_2S 可直接清除过氧化氢和超氧阴离子, 具有强大的抗氧化功能。在机体内, H_2S 的功能多样, 包括对抗化学性损伤, 抑制化学性损伤所致心肌细胞和神经细胞的凋亡作用^[1]。

顺铂 (Cisplatinum, DDP) 是广泛用于人类肿瘤化疗的一种药物, 其抗肿瘤细胞作用主要是因为其与增值细胞 DNA 的结合特性。然而顺铂又与许多正常细胞有亲和性, 从而导致毒性, 比如肾毒性、神经毒性、耳毒性、催吐性^[2-3], 故其在化疗治疗中因其诸多的副作用被限制使用。而在这些副作用中, 肾毒性被认为是限制其临床应用的主要方面^[4-5]。使用高剂量顺铂化疗患者, 20% 出现肾功能不全, 顺铂导致的肾毒性主要表现在小管间质性损害^[2-3]。在动物模型中, 顺铂主要损害近端小管。由于顺铂在肿瘤化疗中的重要地位, 有很多研究寻找相应保护方法以减轻其肾毒性。在临床前期研究中, 提示抗氧化剂可以减少顺铂导致的肾毒性。

H_2S 对于顺铂导致的近端肾小管上皮细胞 (human renal tubular epithelial cell, HK-2 细胞) 是否有保护作

用, 目前尚未见报道。本实验用 H_2S 进行干预, 探索其对 HK-2 细胞是否有抗凋亡的作用, 以寻求抗细胞凋亡的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

正常人近端肾小管上皮细胞株 (HK-2 细胞) (美国 ATCC 公司), 胎牛血清为四季青 (浙江天杭生物科技股份有限公司), DMEM/F12 培养基 (美国 Hyclone 公司), 二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) (美国 Sigma 公司), 顺铂为诺欣 (江苏豪森药业股份有限公司), 硫化钠 NaHS (上海紫一试剂厂)。噻唑蓝 [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] (美国 Amresco 公司), Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (上海前程生物科技有限公司), 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 6、24 和 96 孔细胞培养板 (美国 Corning 公司)。

1.2 方法

1.2.1 DDP、NaHS 的配置 将 DDP 配制成 1 mg/ml 溶液, 过滤除菌分装, 置入 $-20^{\circ}C$ 冰箱冷冻保存备用。将 NaHS 配制成 16 mmol/L 溶液, 过滤除菌分装, $-20^{\circ}C$ 冰箱保存备用。

1.2.2 MTT 实验 ①阴性对照组：加入等体积培养基；DDP 组：0、1、2、5、10、20 和 40 mg/L；DDP+NaHS 组：0 mg/L DDP+0 mmol/L NaHS、20 mg/L DDP+0 mmol/L NaHS、20 mg/L DDP+0.2 mmol/L NaHS、20 mg/L DDP+0.4 mmol/L NaHS、20 mg/L DDP+0.5 mmol/L NaHS、20 mg/L DDP+0.8 mmol/L NaHS、20 mg/L DDP+1.0 mmol/L NaHS、20 mg/L DDP+2.0 mmol/L NaHS。②将生长至对数期 HK-2 细胞调整密度为 1×10^4 个/ml。③加入 96 孔板，每孔 100 μ l，阴性对照组(加入等体积培养基)设置调零孔，对照孔，边缘使用 PBS 填充。④在 5% 二氧化碳 CO₂，37℃ 培养，至细胞单层铺满孔底(24 h)，加入上述梯度浓度药物，每孔 100 μ l，设立 5 个复孔。⑤每孔加入 10 μ l MTT 溶液(5 mg/ml)，继续培养 4 h。⑥终止培养，吸弃孔内培养液，使用 PBS 清洗 2、3 遍。⑦每孔加入 100 μ l DMSO，酶联免疫检测仪测量各孔的光密度(optical density, OD)值。细胞存活率(%) = (实验孔 OD 均值 - 空白孔 OD 均值) / (对照孔 OD 均值 - 空白孔 OD 均值) \times 100%。

1.2.3 DAPI、Annexin V/PI 染色检测 HK-2 细胞形态学变化 ①调整 HK-2 细胞密度为 1×10^5 个/ml，接种于 24 孔板(板底铺盖玻片)，每孔 1 ml。②待细胞贴壁后，根据实验分组，予以不同干预，设 3 个复孔，培养 24 h。③吸弃上清，使用 PBS 清洗 3 遍。④使用双蒸水稀释，将 $5 \times$ Binding Buffer 稀释为 $1 \times$ Binding Buffer 工作液，每孔加 500 μ l 工作液重悬细胞。⑤每孔加入 2.5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI，1 μ l DAPI。⑥轻柔涡旋混匀，室温避光 5 min。⑦使用荧光显微镜观察。

1.2.4 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡率 ①调整 HK-2 细胞密度为 5×10^5 个/ml，接种于 6 孔板，每孔 2 ml。②待细胞贴壁后，根据实验分组，予以不同干预，并设置不加干预因素的流式对照，一组无染色剂，一组只有 Annexin V-FITC，一组只加 PI，每组设 3 个复孔，培养 24 h。③培养结束，使用胰酶消化，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，使用 PBS 清洗 2 遍。④使用双蒸水稀释，将 $5 \times$ Binding Buffer 稀释为 $1 \times$ Binding Buffer 工作液，每管加 500 μ l 工作液重悬细胞，调整细胞密度为 5×10^5 个/ml。⑤每管加入 2.5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI。⑥轻柔涡旋混匀，室温避光 5 min。⑦进行流式细胞术分析。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件，计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用单位因素方差分析，两两比较采用 t 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组的 OD 值比较

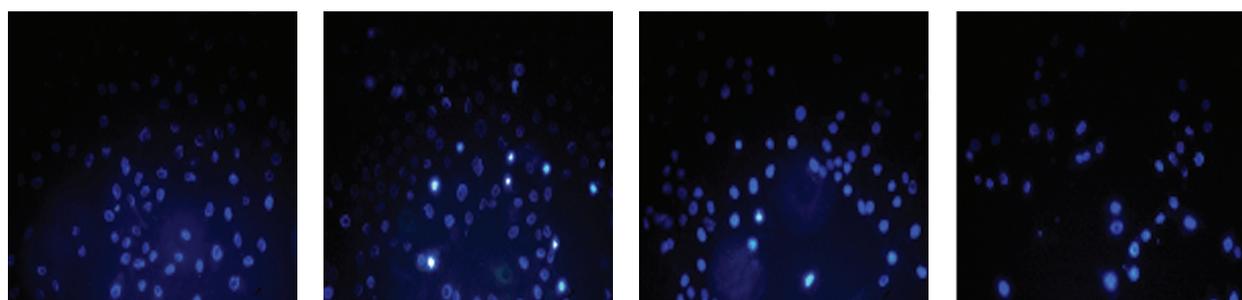
使用 0 ~ 40 mg/L 顺铂对细胞进行处理，结果显示：各组的 OD 值比较，差异有统计学意义($F = 7.969, P = 0.000$)。20 mg/L DDP 组与阴性对照组比较，差异有统计学意义($t = 3.640, P = 0.007$)。而加用 NaHS 后，细胞的 OD 值有所上升，呈剂量改变，在 NaHS 为 0.5 mmol/L 时差异有统计学意义($t = -4.741, P = 0.001$)。但当 NaHS 浓度为 0.5 ~ 1.0 mmol/L，3 组间 OD 值差异无统计学意义($t = 0.024, P = 0.977$)。当 NaHS 为 2.0 mmol/L 时，OD 值较 1.0 mmol/L 下降($t = 3.785, P = 0.005$)。

2.2 各组 HK-2 细胞凋亡比较

荧光显微镜下，20 mg/L DDP 和 HK-2 细胞作用 24 h 后，出现凋亡小体，表现为核固缩，核碎裂，形成大小不等的染色小体，但其包膜完整。DAPI 染色即显示出染色加深，Annexin-V FITC 将凋亡细胞细胞膜染色成绿色(早期凋亡)，PI 可将核染色成红色(晚期凋亡)。当加入 NaHS 后，与 DDP 组比较，凋亡细胞减少，成剂量依赖性，浓度越大，凋亡细胞越少。20 mg/L DDP 组平均凋亡细胞，与阴性对照组比较差异有统计学意义($t = -14.130, P = 0.000$)。加入 NaHS 后，随浓度上升凋亡细胞减少，1.0 mmol/L NaHS+20 mg/L DDP 组与 20 mg/L DDP 组比较差异有统计学意义($t = 11.121, P = 0.000$)。见图 1、2 和表 1。

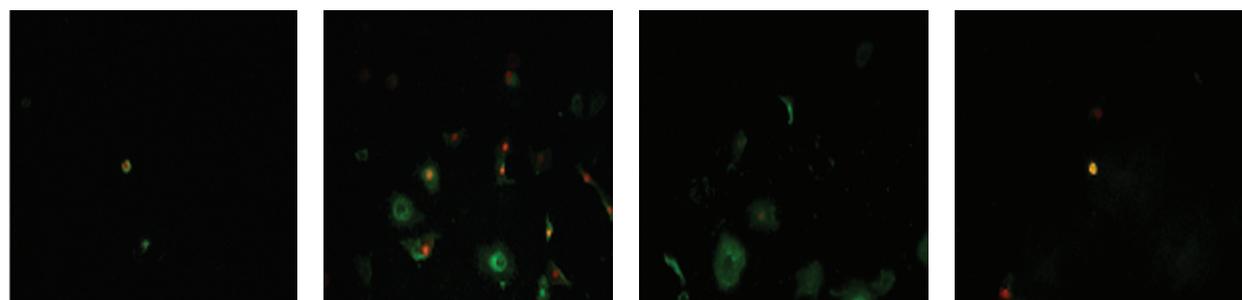
2.3 各组细胞凋亡率比较

活细胞 FITC/PI 均为低染(位于左下区)，凋亡细胞 FITC 高染而 PI 低染(位于右下区)，坏死细胞 FITC/PI 均高染(位于右上区)。DDP 组凋亡率与阴性对照组比较，差异有统计学意义($t = 11.121, P = 0.000$)。DDP 组高于阴性对照组。加 NaHS 后，凋亡率下降，差异有统计学意义($t = 9.320, P = 0.001$)。随着 NaHS 浓度增大，凋亡率降低，20 mg/L DDP+1.0 mmol/L NaHS 组与 20 mg/L DDP+0 mmol/L NaHS 组比较，凋亡率差异有统计学意义($t = 4.568, P = 0.010$)。见表 2 和图 3。



阴性对照组 20 mg/L DDP 组 20 mg/L DDP+0.5 mmol/L NaHS 组 20 mg/L DDP+1.0 mmol/L NaHS 组

图 1 NaHS、DDP 对 HK-2 细胞凋亡的影响 (DAPI 染色 × 400)



阴性对照组 20 mg/L DDP 组 20 mg/L DDP+0.5 mmol/L NaHS 组 20 mg/L DDP+1.0 mmol/L NaHS 组

图 2 NaHS、DDP 对 HK-2 细胞凋亡的影响 (Annexin V/PI 染色 × 400)

表 1 DDP、NaHS 对 HK-2 细胞凋亡的影响
(n=8, 个, $\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡细胞
阴性对照组	4.23 ± 1.015
20 mg/L DDP 组	35.02 ± 6.079
20 mg/L DDP+0.5 mmol/L NaHS 组	22.55 ± 2.912
20 mg/L DDP+1.0 mmol/L NaHS 组	9.78 ± 2.063
F 值	119.353
P 值	0.000

表 2 NaHS、DDP 对 HK-2 细胞增殖的影响
(n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	NaHS/(mmol/L)	凋亡率/%
阴性对照组	0	5.167 ± 0.612
20 mg/L DDP 组	0	31.598 ± 1.014
20 mg/L DDP+0.5 mmol/L NaHS 组	0.5	18.375 ± 2.239
20 mg/L DDP+1.0 mmol/L NaHS 组	1.0	11.636 ± 1.233
F 值		193.344
P 值		0.000

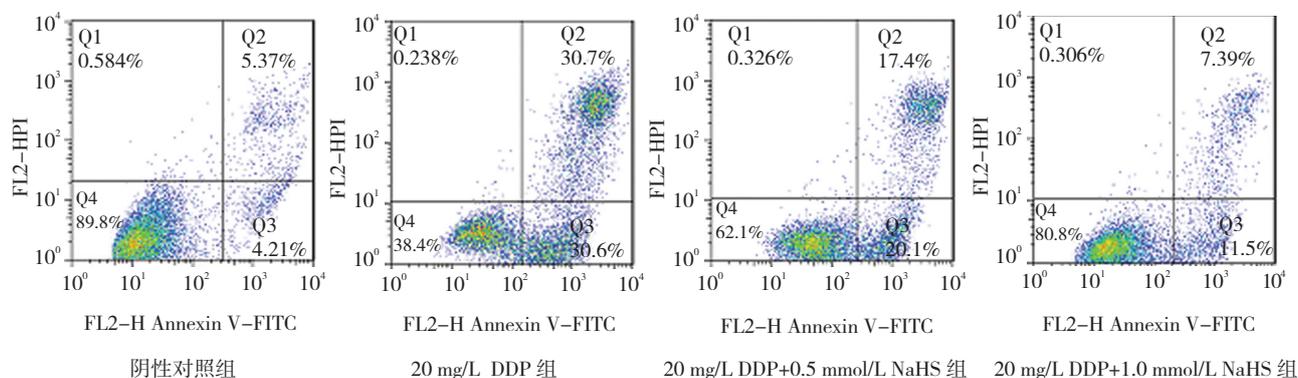


图 3 NaHS、DDP 对 HK-2 细胞凋亡的影响

3 讨论

肾脏疾病作为多发病和常见疾病,有很高的患病率。有最新的流行病学资料显示,我国慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)患病率为 10.8%。原发或继发性因素引起急性或慢性肾损伤。当病程超过 3 个月,则变为不可逆的慢性肾衰竭。WHO 称每年新增肿瘤患者 1 400 万。20 世纪 70 年代以来,DDP 已被广泛用于治疗多种恶性肿瘤,其中包括睾丸癌、膀胱癌、宫颈癌、卵巢癌、头颈部恶性肿瘤,以及小细胞和非小细胞肺癌等,是治疗实体肿瘤最有效和常用的临床药物之一。但由于对正常组织中的严重不良反应常限制了其临床应用。DDP 不良反应有肾毒性、耳毒性、骨髓抑制、胃肠道毒性、变态反应等^[6-7],其中肾毒性最常见,约 1/3 患者出现急性肾损伤^[6,8-9],其剂量相关的肾毒性极大限制了临床应用。肾脏毒性主要发生在肾脏近端小管上皮细胞,神经毒性主要影响神经上下级,耳毒性主要影响耳蜗中掌握机械感觉的外毛细胞。这些都大大限制了 DDP 的应用。肾脏损伤常常发生于使用标准处方量的 DDP 治疗几天后^[10-14],血清肌酐和血清尿素氮水平有所增加。这种肾脏损害可以导致阳离子的浪费,进而发生糖尿和蛋白尿。DDP 治疗过程中最常发生的并发症是低镁血症。在持续 DDP 治疗中,可能会发生进展性和永久性肾脏损害。目前有不少学者正在研究 DDP 的肾毒性发生机制,寻找防治方法及药物。

H₂S 是一种有毒气体,其无色、易溶于水,带有特殊气味。其在 1777 年由一个年轻的瑞典药商命名,在后来的几百年都被认为是一种有毒的气体。它的最大暴露值(PEL)为 10 ppm,当浓度 <400 ppm 时可以导致人骤然死亡。现在 H₂S 被认为是第 3 种气体分子。半胱氨酸的脱巯基酶是哺乳动物 H₂S 的主要来源。该过程是被 CBS 和 CSE 催化。CBS 在大脑中的很多区域表达,特别是中枢神经系统^[15-16]。而 CSE 主要在循环系统表达^[17]。文献指出,H₂S 对神经系统保护^[18-19]、循环系统保护^[20-21]都有很多作用。H₂S 被认为的主要机制是抗氧化作用,这也是研究的一大热点。H₂S 是强大抗氧化剂,可保持内环境稳定,有时也是强大的促氧化剂,可以通过 ROS 活化杀灭肿瘤细胞^[22]。它被发现有两个截然不同的分子机制,抗氧化性和促氧化性,而表现出哪个方面,取决于当时的内环境。简单归纳说,H₂S 可以表现出很多益处,比如对心血管系统的保护作用。而更深层次地说,还可以表现出毒性/

细胞毒性效应。

通过研究发现,H₂S 参与氧化应激效应并不是通过单纯的机制,其中有多种信号通路参与。H₂S 可以通过多种酶类或者非酶类的抗氧化剂清除自由基。H₂S 也会抑制线粒体 ROS 产生,通过抑制 p66Shc 巯基。也可以通过它的化学特性减少氧自由基,其机制十分复杂。

本实验 MTT 比色法检测 DDP 的浓度与 HK-2 细胞培养,随 DDP 浓度上升,OD 逐渐下降,示细胞凋亡增加,发现在 DDP 为 20 mg/L 时,细胞生长被抑制,显示 DDP 对 HK-2 细胞的毒性作用,随剂量增加而加重,与剂量呈正相关。在 DDP 为 20 mg/L 联合使用 NaHS 后,细胞凋亡减少,并且 NaHS 上升后,细胞凋亡逐渐减少。提示 H₂S 可以减轻 DDP 对细胞的毒害,并且与浓度有关。但在 NaHS < 1 mmol/L 时,对 HK-2 细胞的保护作用下降,NaHS 保护作用下降的机制有待进一步研究。

在 DAPI 染色和 Annexin V-FITC/PI 染色,早期凋亡会出现细胞膜被染成绿色,晚期凋亡则是胞核也可以被染成红色。实验显示见 DDP 组的细胞凋亡率高于阴性对照组,在加用 NaHS 后,凋亡率有所下降,并且与剂量相关。Annexin V-FITC/PI 流式细胞术可更准确地反映凋亡情况,可在不同象限更直观精确地反映。在流式细胞术中,可以明显看见 DDP 组凋亡,而加用 NaHS 后,凋亡明显减少,呈剂量依赖性。

氧化还原系统的平衡,对细胞的生存能力和功能有至关重要的作用,是由两个抗氧化系统组成(谷胱甘肽系统和硫氧还蛋白系统)组成的。活性氧系列是细胞新陈代谢正常副产物,比如线粒体新陈代谢或者蛋白质折叠均可产生。硫氧还蛋白系统,包括硫氧还蛋白、硫氧还蛋白还原酶(TrxR)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH),在细胞氧化还原信号转导里扮演着一个重要的角色生长和细胞凋亡。除了氧化还原调控胞内信号,系统也发挥其直接抗氧化防御氧化应激,包括清除活性氧(ROS),减少过氧化物和内源性抗氧化剂回收。DDP 导致的细胞凋亡和 ROS 导致的 p53 活化有关,而 H₂S 也会抑制线粒体 ROS 产生,通过抑制 p66Shc 巯基。但是 H₂S 是否是通过这个通路来抑制 DDP 对细胞的毒性,仍需进一步研究。当 NaHS 浓度 < 1 mmol/L 时,对细胞的保护作用下降,可能与此有关。

DDP 导致的肾损伤机制涉及多种途径,如炎症介

质、氧化应激、坏死及凋亡、自噬等, 目前仍不清楚这些因素最终整合导致肾损伤的具体机制。本实验显示 H₂S 对 DDP 导致的 HK-2 细胞凋亡有保护作用, 但是在人体内, 机制仍不清楚。且需要考虑内源性 H₂S 的作用及药物的分布等。因此对于其进一步应用, 须继续大量体外及体内实验观察。进一步研究既保护正常组织, 又不影响 DDP 抗肿瘤治疗的方法, 将有助于 DDP 在临床抗肿瘤治疗中的广泛应用。

参 考 文 献:

- [1] 郑东诞, 兰爱平, 莫利求, 等. 硫化氢通过抑制 iNOS-NO 通路对抗化学性缺氧引起的 PC12 细胞损伤 [J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2011(6): 741-746.
- [2] KELLAND L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(8): 573-584.
- [3] BARABAS K, MILNER R, LURIE D, et al. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications[J]. *Vet Comp Oncol*, 2008, 6(1): 1-18.
- [4] RYBAK L P. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection[J]. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007, 15(5): 364-369.
- [5] MCWHINNEY S R, GOLDBERG R M, MCLEOD H L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(1): 10-16.
- [6] ARANY I, SAFIRSTEIN R L. Cisplatin nephrotoxicity[J]. *Semin Nephrol*, 2003, 23(5): 460-464.
- [7] SASTRY J, KELLIE S J. Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2005, 22(5): 441-445.
- [8] SIDDIK Z H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance[J]. *Oncogene*, 2003, 22(47): 7265-7279.
- [9] PABLA N, DONG Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies[J]. *Kidney Int*, 2008, 73(9): 994-1007.
- [10] KELLAND L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(8): 573-584.
- [11] BARABAS K, MILNER R, LURIE D, et al. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications[J]. *Vet Comp Oncol*, 2008, 6(1): 1-18.
- [12] MCWHINNEY S R, GOLDBERG R M, MCLEOD H L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(1): 10-16.
- [13] RYBAK L P. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection[J]. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007, 15(5): 364-369.
- [14] AKCAY A, TURKMEN K, LEE D, et al. Update on the diagnosis and management of acute kidney injury[J]. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 2010, 3: 129-140.
- [15] KOTSYUBA E P. Cystathionine beta-synthase in the central nervous system of the shore crab *Hemigrapsus sanguineus*[J]. *Dokl Biol Sci*, 2011, 437: 94-96.
- [16] CHERTOK V M, KOTSIUBA A E, KOTSIUBA E P. Cystathionine beta-synthase in the structural elements of the human brain and spinal cord[J]. *Tsitologiya*, 2011, 53(8): 665-670.
- [17] MISHRA P K, TYAGI N, SEN U, et al. H₂S ameliorates oxidative and proteolytic stresses and protects the heart against adverse remodeling in chronic heart failure[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(2): H451-H456.
- [18] HU L F, LU M, TIONG C X, et al. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models[J]. *Aging Cell*, 2010, 9(2): 135-146.
- [19] LU M, ZHAO F F, TANG J J, et al. The neuroprotection of hydrogen sulfide against MPTP-induced dopaminergic neuron degeneration involves uncoupling protein 2 rather than ATP-sensitive potassium channels[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(6): 849-859.
- [20] PAN T T, CHEN Y Q, BIAN J S. All in the timing: a comparison between the cardioprotection induced by H₂S preconditioning and post-infarction treatment[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 616(1-3): 160-165.
- [21] PAN T T, FENG Z N, LEE S W, et al. Endogenous hydrogen sulfide contributes to the cardioprotection by metabolic inhibition preconditioning in the rat ventricular myocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40(1): 119-130.
- [22] PREDMORE B L, LEFER D J, GOJON G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(1): 119-140.

(张西倩 编辑)