

论著

文章编号:1000-5404(2013)19-2060-05

外源性硫化氢对原代神经元早老素1和β淀粉样蛋白的影响

陈筱山,何选丽,朱丽娟,张华,冯飞,晏勇 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科)

[摘要] **目的** 探讨外源性 H₂S 对原代培养皮质神经元早老素 1 (presenilin 1, PS1) 和 β 淀粉样蛋白 (β-amyloid peptide, Aβ) 的影响及机制。**方法** ①NaHS 为外源性 H₂S 的供体,不同浓度 NaHS(0、5、10、20、30、40、50 μmol/L) 作用于原代培养的皮质神经元,TUNEL 法检测细胞凋亡,酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测 Aβ₁₋₄₂ 水平,Western blot 检测 PS1 蛋白表达水平。②神经元分为对照组(0 μmol/L NaHS)、20 μmol/L NaHS 组、A 干预组(NaHS 20 μmol/L 加 PI3K 通路阻断剂 LY294002 20 μmol/L) 和 B 干预组(NaHS 20 μmol/L 加 MAPK 通路阻断剂 PD98059 20 μmol/L),Western blot 检测 PS1 蛋白表达。**结果** ①5~20 μmol/L 浓度 NaHS 干预时,不引起明显神经元凋亡;30~50 μmol/L 时,神经元凋亡明显增加 ($P < 0.05$);10、20 μmol/L 浓度 NaHS 显著降低 Aβ₁₋₄₂ 水平和 PS1 蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。②与对照组相比,20 μmol/L NaHS 组和 B 干预组 PS1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$),而 A 干预组 PS1 蛋白表达无改变 ($P > 0.05$);而 20 μmol/L NaHS 组和 B 干预组间无差异 ($P > 0.05$);与 A 干预组相比,B 干预组 PS1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 低浓度外源性 H₂S (30 μmol/L 浓度 NaHS 范围内) 不引起神经元明显凋亡,降低 Aβ₁₋₄₂ 水平和 PS1 蛋白表达,并可能通过 PI3K 信号通路发挥降低 PS1 蛋白表达的作用。

[关键词] 硫化氢;原代神经元;早老素 1

[中图分类号] R329.28; R338.1; R914.3

[文献标志码] A

Effects of exogenous hydrogen sulfide on expression of presenilin 1 and β-amyloid in primary cultured neurons

Chen Xiaoshan, He Xuanli, Zhu Lijuan, Zhang Hua, Feng Fei, Yan Yong (Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of exogenous hydrogen sulfide (H₂S) on the expression of presenilin 1 (PS1) and β-amyloid (Aβ) in primary cultured neurons. **Methods** Sodium hydrosulfide (NaHS), as H₂S donor, was used to treat primary cultured cortical neurons derived from newborn SD rats at a dose of 0, 5, 10, 20, 30, 40 and 50 μmol/L respectively for 24 h. Cell apoptosis was observed by TUNEL assay. Aβ₁₋₄₂ level in the supernatant was measured by ELISA. The expression of PS1 protein was determined by Western blotting. The neurons was treated respectively by 0 μmol/L NaHS (control), 20 μmol/L NaHS, 20 μmol/L NaHS + 20 μmol/L LY294002 (PI3K signal inhibitor), and 20 μmol/L NaHS + 20 μmol/L PD98059B (MAPK signal inhibitor). Western blotting was used to detect the protein level of PS1. **Results** The apoptotic rate had no obvious change when the dose of NaHS was 5, 10 and 20 μmol/L, and was significantly increased at the dose of 30–50 μmol/L ($P < 0.05$). NaHS treatment at 10 and 20 μmol/L resulted in a decrease in Aβ₁₋₄₂ concentration in the supernatant ($P < 0.05$) and in the protein level of PS1 ($P < 0.05$). Compared to the control, the expression of PS1 in the neurons treated by 20 μmol/L NaHS in presence or absence of PD98059B was significantly decreased ($P < 0.05$), but had no change in the cells treated in presence of LY294002 ($P > 0.05$). There was also no difference in the protein level between the cells in presence or absence of PD98059B ($P > 0.05$). The PS1 protein level was decreased in the cells treated by

[基金项目] 国家自然科学基金(81271222)

[通信作者] 晏勇, E-mail: yyanpro@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130516.1138.008.html>(2013-05-16)

PD98059B than those by LY294002. **Conclusion** Low-dosed exogenous H₂S (<30 μmol/L NaHS) does not induce obvious apoptosis, and decreases the protein levels of Aβ₁₋₄₂ and PS1 in primary cultured neurons, which probably through PI3K signal pathway.

[**Key words**] hydrogen sulfide; primary culture neurons; presenilin 1

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81271222). Corresponding author: Yan Yong, E-mail: yyanpro@163.com

在中枢神经系统,新型气体信号分子 H₂S 发挥神经保护和神经调质的作用,保护神经细胞免受炎症、凋亡和氧化应激损伤,增强海马长时程电位(long term potential, LTP)^[1]。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是常见的神经变性疾病,以记忆力下降并伴其他认知功能减退为主要表现,病理特征为细胞外老年斑(senile plaques, SPs)形成,细胞内 Tau 蛋白变性,神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)以及神经元丧失。Aβ 是老年斑的主要成分,Aβ 在脑内的异常沉积是 AD 发病的始动环节。在 AD 患者脑和血浆中,H₂S 水平明显降低,同型半胱氨酸水平增高,H₂S 水平下降程度与 AD 的严重程度相关^[2-3]。γ 分泌酶是由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor peptide, APP)代谢,产生毒性 Aβ 最后阶段的裂解酶,而 PS1 是构成 γ 分泌酶的重要组成部分。PS1 基因突变增加 Aβ 的生成,与早发型家族性痴呆(early-onset familial Alzheimer's disease, FAD)密切相关。目前少见 H₂S 与 PS1 代谢关系的报道。本研究以原代神经元为研究对象,NaHS 为 H₂S 的供体,旨在探讨外源性 H₂S 对 PS1 和 Aβ 的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

NaHS(Sigma-Aldrich,美国),胎牛血清、Neurobasal 培养液、DMEM/F12 培养液、B27 添加物、谷氨酰胺、青链霉素双抗(Gibco,美国),Aβ₁₋₄₂ 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(USCN,美国),TUNEL 细胞原位检测试剂盒(凯基,中国),LY294002、PD98059(碧云天,中国),一抗羊抗兔 MAP-2(Protein tech,美国),一抗鼠单克隆抗体 PS-1(Abcam,美国),二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG(碧云天,中国)。细胞培养箱(Thermo forma,美国)。

1.2 原代神经元培养、鉴定

参照文献[4],24 h 内新生 SD 大鼠(重庆医科大学实验动物中心提供),断头,去除颅骨及脑膜,分离皮质神经元,剪碎脑组织至 1 mm³ 大小,0.125% 胰酶消化 30 min,种植培养液(DMEM/F12 培养液+10% 胎牛血清+青、链霉素双抗)中止消化,缓慢吹打,种植培养液重悬细胞,计数后接种于多聚赖氨酸铺板的 6 孔和 24 孔培养板,12 h 后全量更换为维持培养液

(Neurobasal 培养液+B27 添加物+青链霉素双抗),每 2 天更换一半培养液。按照以上相同方法培养原代、纯化及用 MAP-2 抗体鉴定原代神经元。培养 5~7 d 的神经元,以 NaHS 为外源性 H₂S 的供体,三蒸水配制不同浓度的 NaHS,按比例加入培养液,使终浓度达到 0、5、10、20、30、40、50 μmol/L,以加三蒸水组(0 μmol/L)为对照组。

1.3 TUNEL 法检测神经元凋亡

参照文献[5]及 TUNEL 试剂盒说明书操作,4% 多聚甲醛固定神经元(细胞计数 3×10⁵/mL),1% Triton 通透,3% H₂O₂,室温封闭 10 min;DNase I 反应液制阳性片;TdT 反应液标记,避光 60 min,荧光显微镜检测;使用 POD 偶联的抗荧光素抗体(POD-conjugated-Anti-FITC)标记,避光,30 min,37℃;二氨基联苯胺(DAB)显色;苏木精轻度复染,脱水封片。光镜下观察:细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。每张玻片计数 5 个高倍镜视野(×200),取平均值即为凋亡细胞数。

1.4 ELISA 检测 Aβ₁₋₄₂

培养 5~7 d 的神经元,给予不同浓度 NaHS 干预 24 h,收集培养液,以 2 000 r/min 速度离心 20 min,收集上清液。按照试剂盒说明书配制不同稀释浓度 Aβ₁₋₄₂ 的标准品,在酶标板上设标准孔、空白对照孔,加入不同浓度 100 μL 标准液,设样品孔,加入不同浓度的样品 100 μL,加上覆膜后 37℃ 温育 2 h,每孔加入检测溶液 A 100 μL,孵育 1 h,洗涤后加入检测溶液 B 100 μL,孵育 30 min,洗板甩干酶标板,加入底物溶液 90 μL,加覆膜后 37℃ 避光显色 10 min,当标准孔有梯度蓝色时,每孔加终止液 50 μL,450 nm 波长检测各孔的 OD 值,以标准品的 OD 值与浓度建立标准曲线,计算出不同浓度 NaHS 干预后 Aβ₁₋₄₂ 的分泌量。

1.5 Western blot

培养 5~7 d 的神经元[细胞计数(1~2)×10⁶/mL],不同浓度 NaHS 处理神经元 24 h,全蛋白提取试剂盒提取各组蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。按照每孔 20 μg 上样量进行 SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白转印至 PVDF 膜上,5% 的脱脂牛奶封闭 1 h,加入 PS1 一抗(稀释比例 1:5 000),4℃ 过夜;二抗 37℃ 孵育 2 h;TBST 洗涤,ECL 发光,应用 Bio-Rad 凝胶图像成像系统采集图像,Quantity One 软件进行扫描分析。GAPDH 作为内参。每组实验重复 3 次。

1.6 加入阻断剂干预后 Western blot 检测

培养 5~7 d 的神经元,分为对照组、20 μmol/L NaHS 组,在 20 μmol/L 浓度 NaHS 干预神经元前 30 min,培养液中分别加入 PI3K 信号通路阻断剂 LY294002 20 μL(A 干预组)和 MAPK 信号通路 PD98059 20 μL(B 干预组),24 h 后收集蛋白,

进行 Western blot, 步骤同 1.5。

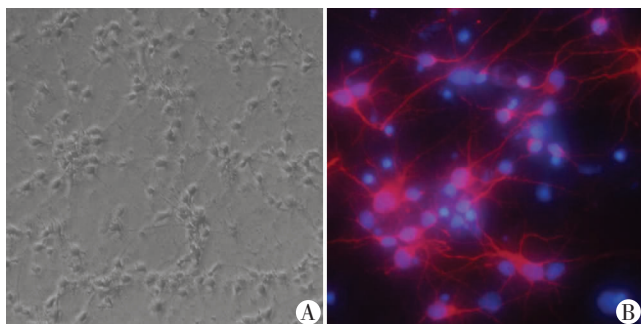
1.7 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 原代神经元培养鉴定

倒置相差显微镜观察培养 7 d 的神经元: 细胞贴壁生长, 部分生长成簇, 立体感强, 神经元突起生长好, 连成网状, 可见少量残留胶质 (图 1A); MAP-2 抗体免疫荧光鉴定神经元, 神经元突起生长好, 连成网状 (图 1B)。对每一观察视野内 MAP-2 染色阳性细胞占总细胞数计算, 神经元阳性率在 95% 以上。

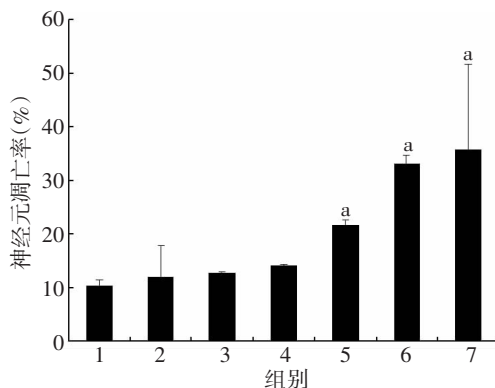


A: 倒置显微镜 ($\times 100$); B: 荧光显微镜 (免疫荧光 $\times 200$)

图 1 原代神经元的培养鉴定

2.2 NaHS 对原代神经元凋亡的影响

不同浓度 NaHS 作用于神经元后, 凋亡神经元开始增加, 在 5 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 浓度时, 凋亡逐渐增加, 在 10 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可见少量染成棕黄色的凋亡细胞, 但凋亡率无明显增加 ($P > 0.05$); 30 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 时, H_2S 诱导神经元凋亡增加 ($P < 0.05$), 在 40 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 时凋亡率显著增加 ($P < 0.05$)。见图 2、3。



a: $P < 0.05$, 与对照组比较

1: 对照组; 2~7: 分别为 5、10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 浓度组

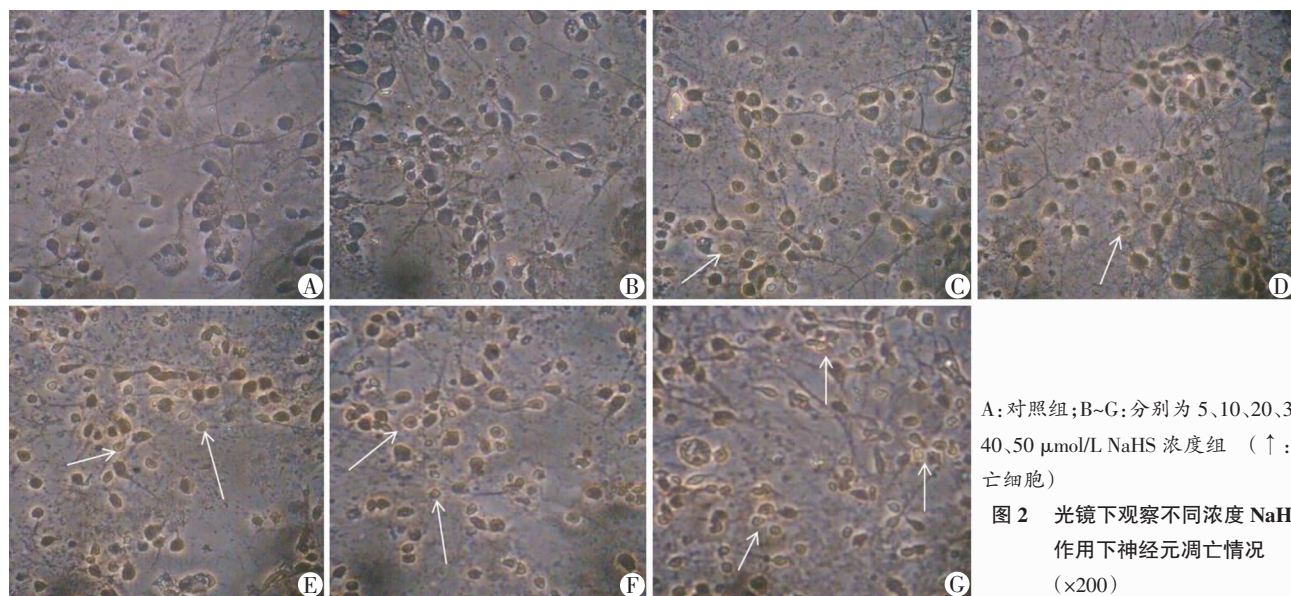
图 3 不同浓度 NaHS 对神经元凋亡率的影响

2.3 NaHS 对 A β 1-42 水平的影响

在 NaHS 的作用下, A β 1-42 表达水平逐渐降低, 在 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 NaHS 时, 与对照组相比, A β 1-42 水平显著降低 ($P < 0.05$), NaHS 浓度在 30 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, A β 1-42 水平渐升高, 但与对照组相比, 无统计学差异 ($P > 0.05$)。见图 4。

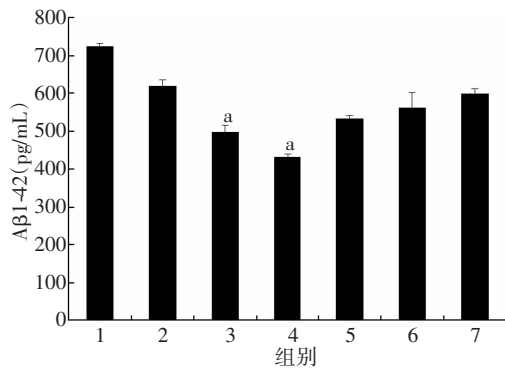
2.4 NaHS 对 PS1 蛋白表达的影响

Western blot 检测不同浓度 NaHS 对原代神经元 PS1 蛋白表达的影响, 结果显示: 从 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 NaHS 开始, PS1 蛋白表达降低, 与对照组 (1.10 ± 0.04) 相比, 10 $\mu\text{mol/L}$ (0.85 ± 0.07) 和 20 $\mu\text{mol/L}$ (0.81 ± 0.12) 浓度 NaHS 时, PS1 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 在 30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 (0.91 ± 0.05) NaHS 时, PS1 蛋白表达仍降低 ($P < 0.05$), 在 40 $\mu\text{mol/L}$ (0.98 ± 0.14) 到 50 $\mu\text{mol/L}$ (1.05 ± 0.07) 时, PS1 仍低于对照组, 但呈逐渐增高的趋势, 与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。



A: 对照组; B~G: 分别为 5、10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 浓度组 (\uparrow : 凋亡细胞)

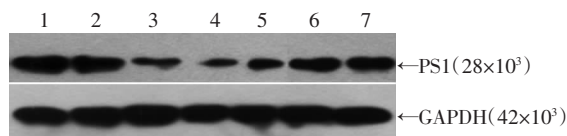
图 2 光镜下观察不同浓度 NaHS 作用下神经元凋亡情况 ($\times 200$)



a: $P < 0.05$, 与对照组比较

1: 对照组; 2~7: 分别为 5、10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 浓度组

图4 ELISA 检测不同浓度 NaHS 对 A β 1-42 的影响

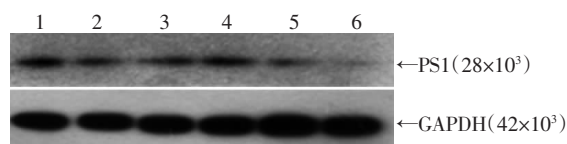


1: 对照组; 2~7: 分别为 5、10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 浓度组

图5 Western blot 检测不同浓度 NaHS 对 PS1 蛋白表达的影响

2.5 PI3K 和 MAPK 信号通路在 NaHS 对 PS1 蛋白表达中的作用

与对照组(1.12 ± 0.01)相比,20 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组(0.65 ± 0.40)和 B 干预组(0.62 ± 0.09)显著降低 PS1 蛋白表达($P < 0.05$),而 20 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组与 B 干预组间无统计学差异($P > 0.05$),对照组与 A 干预组(0.93 ± 0.05)相比,PS1 表达无统计学差异($P > 0.05$);与 A 干预组相比,B 干预组(0.62 ± 0.09) PS1 蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。见图 6。



1: 对照组; 2: 20 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组; 3~4: A 干预组; 5~6: B 干预组

图6 Western blot 检测各组 PS1 蛋白表达

3 讨论

本课题组前期研究表明,NaHS 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 时显著降低 PC12 细胞的 A β 1-42 水平,降低 PC12 细胞 BACE-1 mRNA 及蛋白表达水平^[6]。该研究没有 NaHS 对 PC12 细胞凋亡的报道,即是否在 NaHS 引起 PC12 细胞凋亡的情况下,引起 A β 和 BACE-1 水平下降? 考虑到 PC12 在生长特性、对坏死、凋亡的耐受性方面强于原代神经元^[7]。因此,本研究以 50 $\mu\text{mol/L}$

NaHS 作为干预原代神经元的最大浓度,观察在 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 NaHS 时对原代神经元凋亡的影响。

本研究采用 NaHS 为外源性 H₂S 的供体,NaHS 溶解在水中时,释放出 HS-并与 H₂O 的 H⁺ 结合,形成 H₂S,约占 NaHS 33% 的 H₂S 被释放出来。使用 TUNEL 方法观察,NaHS 在 30 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时,凋亡神经元显著增加,在 20 $\mu\text{mol/L}$ 范围内未引起神经元凋亡改变。在 Cheung 等^[8]的研究中,原代培养的神经元在 NaHS 浓度小于 200 $\mu\text{mol/L}$ 时即引起神经元凋亡,大于 200 $\mu\text{mol/L}$ 时引起神经元死亡。而 Kurokawa 等^[9]研究则表明,NaHS 浓度在大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时神经元活性明显下降,在小于 30 $\mu\text{mol/L}$ 时神经元凋亡无明显增加。尽管已有研究表明脑内的 H₂S 浓度在 50 ~ 160 $\mu\text{mol/L}$ 范围内^[10],但 Furne 等^[11]使用气象色谱法,检测脑内 H₂S 含量只有 15 nmol/L。综上,结合我们的研究,H₂S 在脑内的浓度可能很低,在极低的范围内发挥生物学作用。

A β 是在一系列蛋白水解酶作用下产生的,有 α 和 β 两条代谢途径。 β 代谢途径为淀粉样代谢途径,APP 在 β 分泌酶(β -secretase)和 γ 分泌酶(γ -secretase)作用下产生毒性、不可溶的 A β 1-42。而 α 代谢途径是非淀粉样代谢途径,APP 分别被 α 分泌酶(α -secretase)和 γ 分泌酶裂解,产生具有营养作用的 A β 。AD 发生时, β 代谢途径激活,产生过多有毒性的 A β ,在脑内沉积,形成老年斑、氧化应激、炎症、Tau 蛋白代谢异常及神经元纤维缠结^[12]。作为 A β 代谢途径必经的裂解酶, γ -分泌酶由 PS、前咽缺陷蛋白(Aph-1)、早老素蛋白增强子-2(Pen-2)和单过性跨膜蛋白(nicastrin, NCT)组成。PS 包括 PS1 和 PS2 两种同源物,现阶段研究认为,PS1 在 γ -分泌酶中具有重要的作用。在 PS1 基因突变和敲除的实验中,A β 生成明显减少^[13]。因此,干预 PS1,降低 γ -分泌酶的活性,减少 A β 生成,成为治疗 AD 的途径之一。

本实验中,NaHS 浓度在 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 时显著减少 A β 1-42 的分泌水平,而 Western blot 检测结果也表明,在 10、20 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 时,PS1 蛋白表达水平显著降低。而自 30 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 浓度起,降低 A β 1-42 和 PS1 蛋白水平的作用减低,且出现 A β 1-42 和 PS1 蛋白表达逐渐升高的趋势。分析可能在 20 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 范围内,H₂S 不引起神经元活力降低及凋亡,低浓度 H₂S 发挥降低 A β 1-42 和 PS1 蛋白的作用。当 NaHS 浓度增高时,H₂S 对神经元毒性增加,诱导凋亡增加,

加剧了神经元的损伤,引起 A β 1-42 和 PS1 表达增加。

磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)通路通过激活下游效应器 Akt 促进细胞存活和交流,FAD 中 PI3K 突变,抑制依赖 PS1 的 PI3K/Akt 的激活,从而促进 GSK-3 的活性和 Tau 蛋白磷酸化^[14]。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路主要与炎症和细胞凋亡等应激反应有关。也有研究发现,MAPK 通路在 AD 转基因鼠中激活,与 A β 沉积相关^[15]。我们课题组也发现,H₂S 通过 PI3K 通路而不是 MAPK 信号通路影响 BACE1 蛋白表达^[6]。作为前期实验的延续,H₂S 是否同样通过 PI3K 通路影响 PS1 代谢?为此,本实验使用显著降低 A β 1-42 和 PS1 的 20 μ mol/L 为 NaHS 干预浓度。在给 NaHS 干预神经元的同时,加入 PI3K 通路和 MAPK 信号通路的阻断剂,发现与对照组相比,20 μ mol/L NaHS 同时加 PI3K 通路阻断剂后,PS1 蛋白表达未降低,而在加入 MAPK 阻断剂后,PS1 蛋白表达显著降低,与加入 20 μ mol/L 浓度 NaHS 后作用相同。说明 H₂S 可能通过 PI3K 通路降低 PS1 蛋白的表达。

利用外源性 H₂S 保护神经元的氧化应激损伤、凋亡炎症损伤的作用,有体内实验证实,外源性 H₂S 能减轻脂多糖诱导的神经炎症反应,改善实验鼠的认知功能^[16]。韩晓伟等^[17]研究也表明,外源性 H₂S 通过上调产生 H₂S 的胱硫醚 β 合成酶(cystathionine β synthase, CBS)表达改善癫痫大鼠的认知功能。而我们的研究从 H₂S 影响 A β 代谢的角度,发现 H₂S 低浓度时,对神经元活力无明显影响,不引起明显凋亡,可以降低 A β 1-42 的水平,并可能通过 PI3K 通路影响 PS1 蛋白表达。本实验从新的角度说明了 H₂S 的抗淀粉样蛋白物质(amyloidosis)形成的作用,为 H₂S 在 AD 治疗中的应用提供了证据,但 H₂S 对 PS1 及 γ -分泌酶的其他作用,还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Hu L F, Lu M, Hon-Wong P T, *et al.* Hydrogen sulfide: neurophysiology and neuropathology[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(2): 405-419.
- [2] Eto K, Asada T, Arima K, *et al.* Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293(5): 1485-1488.
- [3] 刘祥琴,刘小琦,蒋萍,等.阿尔茨海默病和血管性痴呆患者血浆硫化氢与同型半胱氨酸水平的变化及意义[J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(32): 2246-2249.
- [4] Brewer G J, Torricelli J R. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(6): 1490-1498.
- [5] Santiago A R, Cristovao A J, Santos P F, *et al.* High glucose induces caspase-independent cell death in retinal neural cells[J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 25(3): 464-472.
- [6] Zhang H, Gao Y, Zhao F, *et al.* Hydrogen sulfide reduces mRNA and protein levels of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 in PC12 cells[J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(2): 169-175.
- [7] Reimann-Philipp U, Ovase R, Weigel P H, *et al.* Mechanisms of cell death in primary cortical neurons and PC12 cells[J]. *J Neurosci Res*, 2001, 64(6): 654-660.
- [8] Cheung N S, Peng Z F, Chen M J, *et al.* Hydrogen sulfide induced neuronal death occurs via glutamate receptor and is associated with calpain activation and lysosomal rupture in mouse primary cortical neurons [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 53(4): 505-514.
- [9] Kurokawa Y, Sekiguchi F, Kubo S, *et al.* Involvement of ERK in NMDA receptor-independent cortical neurotoxicity of hydrogen sulfide[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 414(4): 727-732.
- [10] Savage J C, Gould D H. Determination of sulfide in brain tissue and rumen fluid by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr*, 1990, 526(2): 540-545.
- [11] Furne J, Saeed A, Levitt M D. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 295(5): R1479-R1485.
- [12] Haass C, Selkoe D J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(2): 101-112.
- [13] Schuessel K, Frey C, Jourdan C, *et al.* Aging sensitizes toward ROS formation and lipid peroxidation in PS1M146L transgenic mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(5): 850-862.
- [14] Baki L, Shioi J, Wen P, *et al.* PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations [J]. *EMBO J*, 2004, 23(13): 2586-2596.
- [15] Savage M J, Lin Y G, Ciallella J R, *et al.* Activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 in an Alzheimer's disease model is associated with amyloid deposition [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(9): 3376-3385.
- [16] Gong Q H, Wang Q, Pan L L, *et al.* S-propargyl-cysteine, a novel hydrogen sulfide-modulated agent, attenuates lipopolysaccharide-induced spatial learning and memory impairment: involvement of TNF signaling and NF- κ B pathway in rats[J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(1): 110-119.
- [17] 韩晓伟,段茂海,陈远寿,等.外源性硫化氢改善癫痫大鼠脑认知功能障碍[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(13): 1269-1272.

(收稿:2013-03-12;修回:2013-04-28)

(编辑 王小寒)