

网络出版时间: 2021-9-7 15:23 网络出版地址: https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210907.1400.006.html

# 基于 RhoA/ROCK 通路研究硫化氢对星形胶质细胞低氧损伤的影响

张 阳, 丁延雨, 文继月, 陈志武

**摘要** 目的 探讨硫化氢( $H_2S$ )对星形胶质细胞反应性增生和凋亡的影响及其 RhoA/ROCK 信号通路抑制机制。方法

构建星形胶质细胞低氧培养(94%  $N_2$ -5%  $CO_2$ -1%  $O_2$ )模型,分别给予硫化氢( $NaHS$ ) (50、100、200  $\mu mol/L$ )和 ROCK 抑制剂 Fasudil (5  $\mu mol/L$ ) 预处理。低氧培养 48 h 后,用 CCK-8 法检测细胞活力,用分光光度法检测乳酸脱氢酶(LDH)活性,流式细胞仪检测细胞凋亡,用钙离子荧光指示剂 fluo-8 检测细胞内  $Ca^{2+}$  浓度的变化,使用 Western blot 法检测细胞中胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、Ras 同源家族成员 A(RhoA)、Rho 蛋白激酶 1(ROCK<sub>1</sub>)和 Rho 蛋白激酶 2(ROCK<sub>2</sub>)蛋白的表达。结果  $NaHS$  (100、200  $\mu mol/L$ )明显提高低氧培养星形胶质细胞的活力、降低培养上清液中 LDH 活性、减少细胞凋亡和细胞内  $Ca^{2+}$  超载,提示  $NaHS$  对星形胶质细胞低氧培养损伤的保护作用;ROCK 抑制剂 Fasudil 也具有类似的保护作用,并且联合应用 Fasudil 和  $NaHS$  对星形胶质细胞的保护作用进一步增强; $NaHS$  (100、200  $\mu mol/L$ )以及 Fasudil 均可抑制低氧损伤所致星形胶质细胞中 GFAP、RhoA、ROCK<sub>1</sub> 和 ROCK<sub>2</sub> 蛋白表达增高,联合应用 Fasudil 和  $NaHS$  对 GFAP、RhoA、ROCK<sub>1</sub> 和 ROCK<sub>2</sub> 蛋白表达的抑制作用更为明显。结论  $H_2S$  对于星形胶质细胞的低氧损伤有明显地保护作用,其作用可能与抑制 RhoA/ROCK 通路的激活有关。

**关键词** 硫化氢;星形胶质细胞;RhoA/ROCK 通路;低氧损伤

中图分类号 R 310.4710

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)11-1707-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.11.006

星形胶质细胞是神经系统中分布最广、数量最多的一类细胞,在生理状态下对神经元细胞起营养、支持和保护作用<sup>[1-2]</sup>。在脑缺血损伤发生时,星形胶质细胞会发生形态、功能和基因表达的改变,促进神经系统损伤修复<sup>[3-4]</sup>,调节星形胶质细胞功能是

治疗缺血性脑损伤和促进神经修复的重要新方向<sup>[5]</sup>。

硫化氢(hydrogen sulfide,  $H_2S$ )是机体内广泛存在的气体信号分子,主要由胱硫醚  $\beta$  合成酶(CBS)、胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶(CSE)和 3-巯基丙酮酸硫转移酶(3-MST)催化合成<sup>[6]</sup>。Rho 激酶(Rho kinase, ROCK)是小 GTP 酶 Ras 同源家族成员 A(Ras homolog gene family member A, RhoA)的主要下游效应因子,包括 Rho 蛋白激酶 1(ROCK<sub>1</sub>)和 Rho 蛋白激酶 2(ROCK<sub>2</sub>)两种亚型<sup>[7]</sup>。法舒地尔(Fasudil)是上市的 ROCK 抑制剂,被证明具有治疗脑梗死效果,改善神经功能的缺损<sup>[8]</sup>。课题组前期研究<sup>[9]</sup>表明,脑血管内皮细胞释放的  $H_2S$  通过抑制血管平滑肌 RhoA/ROCK 信号通路,发挥脑缺血损伤的血管保护作用。因此,该研究通过建立低氧培养星形胶质细胞损伤模型,观察  $H_2S$  对星形胶质细胞低氧损伤的影响,并初步探讨其作用和 RhoA/ROCK 通路的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 大鼠星形胶质细胞 RA(BNCC337745)购自北京北纳创联生物技术研究院;硫化氢( $NaHS$ )购自 Sigma 公司(批号: #SHBF1746V);Fasudil 购自阿拉丁试剂有限公司(批号: F122336);Fluo-8 钙离子荧光探针购自上海复申生物公司(批号: FS1222);ROCK<sub>2</sub> 抗体(批号: ab125025)、ROCK<sub>1</sub> 抗体(批号: ab45171)、Ras 同源家族成员 A(RhoA)抗体均购自 Abcam 公司(批号: ab187027);胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体购自 Affinity 公司(批号: DF6040)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 在恒温培养箱(37  $^{\circ}C$  5%  $CO_2$ )中,细胞在含有 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 青霉素-链霉素的高葡萄糖 DMEM 培养基中培养,通过倒置显微镜观察,待细胞融合度达 90% 时进行传代培养,并分别加入测试药进行试验。

**1.2.2 实验分组及模型建立** 实验分为对照组、模

2021-07-01 接收

基金项目:安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2020A0144);国家自然科学基金(编号: 81973510)

作者单位:安徽医科大学基础医学院药理学教研室,合肥 230032

作者简介:张 阳,男,硕士研究生;

文继月,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: wenjiyue139@aliyun.com

型组、NaHS(50、100、200 μmol/L)组、ROCK 抑制剂 Fasudil(5 μmol/L)组以及 NaHS(200 μmol/L) + Fasudil(5 μmol/L)组。将细胞预处理 4 h,然后在(94% N<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>-1% O<sub>2</sub>)三气培养箱中低氧培养 48 h 后进行后续实验。

**1.2.3 CCK-8 法检测细胞活力** 弃除原有孔板中的培养基,然后将 100 μl 培养基和 10 μl CCK-8 测试溶液添加到细胞培养孔中。在 37 °C 下孵育 2~4 h 后,使用酶标仪读取每个培养孔在 450 nm 处的吸光度值。

**1.2.4 检测培养上清液中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)水平** 将培养基上清液 12 000 r/min 离心 5 min 后,按照试剂盒说明书用酶标仪测定每个样本在 450 nm 处的光密度(OD)值。

**1.2.5 荧光法检测细胞内钙离子水平变化** 弃除细胞培养基,用 PBS 清洗 2 次后,每孔加入 100 μl Fluo-8 荧光染料避光孵育 30 min, PBS 清洗 2 次,然后每孔加 100 μl PBS,使用荧光酶标仪检测,用波长 Ex/Em = 490/520 nm 检测。

**1.2.6 流式细胞仪检测星形胶质细胞凋亡** 不含 EDTA 的胰酶消化分离细胞后,用 400 μl 的 Annexin V 结合液悬浮细胞,并加入 5 μl Annexin 染色液避光孵育 15 min,然后加入 10 μl 碘化丙啶孵育 5 min 后立即检测每组细胞的凋亡率(%)。

**1.2.7 Western blot 检测 RhoA、ROCK<sub>1</sub>、ROCK<sub>2</sub> 和 GFAP 蛋白的表达** 收集各实验组细胞,用 PBS 清洗 2 次后加入适量细胞裂解液,提取蛋白并用 BCA 法测定蛋白含量。每组取 20 μg 蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将目的蛋白转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 溶液漂洗 4 次每次约 5 min, 4 °C 孵育一抗(RhoA: 1:5 000; ROCK<sub>1</sub>: 1:5 000; ROCK<sub>2</sub>: 1:4 000; GFAP: 1:3 000)过夜。次日将 PVDF 膜清洗,放入二抗(1:5 000)中室温孵育 1 h 后显色,采用 Image J 图像处理系统分析结果。

**1.3 统计学处理** 所有数据均以均数 ± 标准误( $\bar{x} \pm s$ )来表示,数据采用 graphpad8 进行分析。两组间差异比较采用两样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 H<sub>2</sub>S 和 Fasudil 对于低氧培养后星形胶质细胞活力及 LDH 活性改变的影响** 如图 1A 所示,相

较于对照组(1.11 ± 0.02),模型组(0.54 ± 0.01)细胞活力降低(*t* = 19.82, *P* < 0.01),同时给予 ROCK 抑制剂 Fasudil(5 μmol/L)、外源性 H<sub>2</sub>S 供体 NaHS(100、200 μmol/L)可提高低氧损伤导致的细胞活力降低(*F* = 61.30, *P* < 0.01);图 1B 显示,相比对照组(213.2 ± 2.44),模型组(426.0 ± 6.69)细胞上清液中 LDH 活性明显提高,提示低氧损伤导致细胞 LDH 漏出增多。相比模型组,ROCK 抑制剂 Fasudil(5 μmol/L)、NaHS(100、200 μmol/L)可降低低氧导致的星形胶质细胞 LDH 的漏出(*F* = 185.5, *P* < 0.01)。结果表明 H<sub>2</sub>S 和 Fasudil 对星形胶质细胞低氧损伤有明显地保护作用。图 1 还显示,与 200 μmol/L NaHS 组相比,联合应用 Fasudil 和 NaHS(200 μmol/L)对低氧损伤诱导的细胞活力降低和上清液中 LDH 活性增高的抑制作用进一步增强(*t*<sub>细胞活力</sub> = 2.241, *t*<sub>LDH</sub> = 11.18, *P* < 0.01)。以上结果表明 H<sub>2</sub>S 和 Fasudil 均可保护星形胶质细胞低氧损伤。

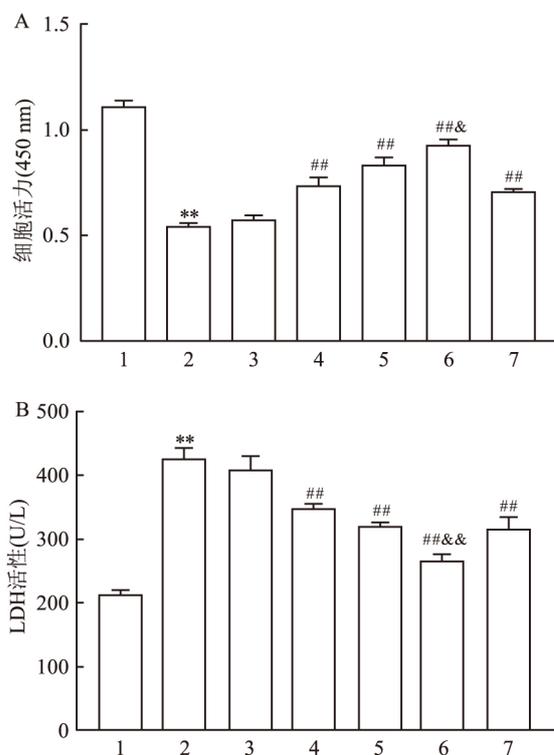


图 1 H<sub>2</sub>S 对细胞活力及 LDH 活性的影响(*n* = 6)

A: 细胞活力; B: LDH 活性; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: NaHS 50 μmol/L; 4: NaHS 100 μmol/L; 5: NaHS 200 μmol/L; 6: NaHS 200 μmol/L + Fasudil 5 μmol/L; 7: Fasudil 5 μmol/L; 与对照组比较: \*\* *P* < 0.01; 与模型组比较: ## *P* < 0.01; 与 NaHS 200 μmol/L 组比较: & *P* < 0.05, && *P* < 0.01

**2.2 H<sub>2</sub>S 和 Fasudil 对于低氧培养后星形胶质细**

胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  改变的影响 如图 2 所示,同对照组 (313.8 ± 13.29) 比较,模型组 (560.0 ± 10.69) 游离  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度增强 ( $t = 14.44, P < 0.01$ ),与模型组相比,给予 ROCK 抑制剂 Fasudil (5 μmol/L) (473.8 ± 8.11)、外源性  $\text{H}_2\text{S}$  供体 NaHS 100 和 200 μmol/L 以及联合应用 Fasudil (5 μmol/L) 和 NaHS (200 μmol/L) (449.2 ± 11.0) 可以降低低氧损伤导致的  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度增高 ( $F = 41.86, P < 0.05, P < 0.01$ )。以上结果表明,  $\text{H}_2\text{S}$  和 Fasudil 对星形胶质细胞低氧损伤保护机制与降低细胞中  $\text{Ca}^{2+}$  超载有关。

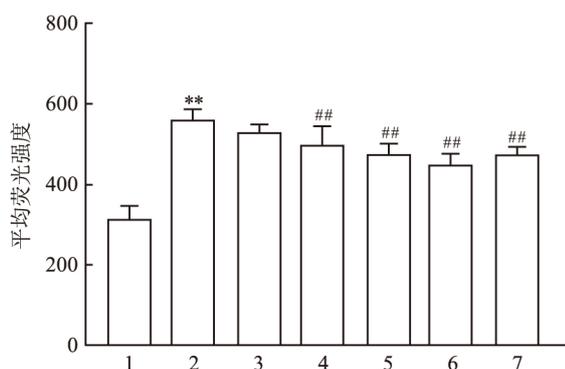


图 2  $\text{H}_2\text{S}$  对低氧星形胶质细胞钙离子的影响 ( $n = 6$ )

1: 对照组; 2: 模型组; 3: NaHS 50 μmol/L; 4: NaHS 100 μmol/L; 5: NaHS 200 μmol/L; 6: NaHS 200 μmol/L + Fasudil 5 μmol/L; 7: Fasudil 5 μmol/L; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**2.3  $\text{H}_2\text{S}$  和 Fasudil 对低氧培养后星形胶质细胞凋亡的影响** 如图 3 所示: 相较于对照组 (6.74 ± 0.31), 模型组 (42.83 ± 1.45) 细胞凋亡率明显升高 ( $t = 24.26, P < 0.01$ ), 与模型组相比, Fasudil (5 μmol/L) (27.70 ± 1.11)、NaHS (100、200 μmol/L) 均可降低低氧对细胞凋亡率的影响 ( $F = 174.1, P < 0.05, P < 0.01$ )。结果表明  $\text{H}_2\text{S}$  以及抑制 ROCK 活性均可抑制低氧损伤导致的星形胶质细胞凋亡。与细胞活力及培养上清液中 LDH 活性的改变相似, 与 200 μmol/L NaHS 组相比, 联合应用 Fasudil 可降低 NaHS (200 μmol/L) 对低氧损伤诱导的星形胶质细胞凋亡的抑制作用 ( $t = 9.287, P < 0.01$ )。

**2.4  $\text{H}_2\text{S}$  和 Fasudil 对低氧培养星形胶质细胞中 RhoA、ROCK<sub>1</sub> 和 ROCK<sub>2</sub> 蛋白表达的影响** 上述研究结果表明, 终浓度为 100、200 μmol/L 的 NaHS 可保护星形胶质细胞低氧损伤, 且呈浓度依赖性。为探讨  $\text{H}_2\text{S}$  对星形胶质细胞损伤的保护机制, 进一步检测了 200 μmol/L 的 NaHS 对星形胶质细胞中

RhoA、ROCK<sub>1</sub>、ROCK<sub>2</sub> 表达的影响。结果如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组星形胶质细胞中 RhoA、ROCK<sub>1</sub> 和 ROCK<sub>2</sub> 蛋白表达明显增高, 差异有统计学意义 ( $t_{\text{RhoA}} = 7.195, t_{\text{ROCK}_1} = 7.086, t_{\text{ROCK}_2} = 5.258, P < 0.01$ ); 而 Fasudil (5 μmol/L)、NaHS (200 μmol/L) 和 Fasudil + 200 μmol/L NaHS 均可抑制星形胶质细胞中 RhoA、ROCK<sub>1</sub> 和 ROCK<sub>2</sub> 蛋白表达的增高 ( $F_{\text{RhoA}} = 21.31, F_{\text{ROCK}_1} = 23.71, F_{\text{ROCK}_2} = 15.18, P < 0.05, P < 0.01$ )。与 200 μmol/L NaHS 组相比, 联合应用 Fasudil 和 NaHS (200 μmol/L) 对低氧损伤诱导的 ROCK<sub>1</sub> 和 ROCK<sub>2</sub> 蛋白表达增高的抑制作用进一步增强 ( $t_{\text{ROCK}_1} = 4.049, t_{\text{ROCK}_2} = 5.09, P < 0.05, P < 0.01$ )。结合上述研究结果, 即  $\text{H}_2\text{S}$  和 Fasudil 对星形胶质细胞低氧损伤具有保护作用, 表明  $\text{H}_2\text{S}$  对星形胶质细胞低氧损伤保护机制与抑制 RhoA/ROCK 通路有关。

**2.5  $\text{H}_2\text{S}$  对于低氧培养后星形胶质细胞中 GFAP 蛋白表达的影响** 为深入探讨  $\text{H}_2\text{S}$  是否影响低氧培养星形胶质细胞活化和反应性增生, 本研究检测了星形胶质细胞活化标志性蛋白 GFAP 的表达, 以及 Fasudil (5 μmol/L) 和 NaHS (200 μmol/L) 的作用。结果如图 5 所示, 与对照组 (0.597 ± 0.001) 相比, 模型组 (1.162 ± 0.046) 星形胶质细胞 GFAP 表达明显增高, 差异有统计学意义 ( $t = 12.32, P < 0.01$ ), 提示低氧损伤可促进星形胶质细胞活化; 而 Fasudil (5 μmol/L) (0.828 ± 0.006)、200 μmol/L NaHS (0.984 ± 0.034) 和 Fasudil + 200 μmol/L NaHS (0.653 ± 0.0171) 均可抑制星形胶质细胞中 GFAP 蛋白表达的增高 ( $F = 74.63, P < 0.05, P < 0.01$ )。与 200 μmol/L NaHS 组相比, 联合应用 Fasudil 可增强 (200 μmol/L) NaHS 对低氧损伤诱导的 GFAP 蛋白表达增高的抑制作用 ( $t = 8.506, P < 0.01$ )。

### 3 讨论

脑缺血是目前临床上常见的一种高致死率、高致残率的缺血性脑血管疾病之一。脑缺血发生后, 星形胶质细胞会表现出胞体增大、增殖、中间丝蛋白包括 GFAP 等表达增加, 即被称为星形胶质细胞活化或反应性星形胶质细胞。活化的星形胶质细胞通过分解糖原生成 ATP 和乳酸为损伤神经元提供能量, 减轻损伤<sup>[10]</sup>。此外, 反应性星形胶质细胞增生, 围绕缺血病变周围形成胶质瘢痕。一方面, 胶质瘢痕可以隔离损伤部位并防止其扩展; 另一方面, 瘢痕中的星形胶质细胞会广泛表达硫酸软骨素蛋白聚糖

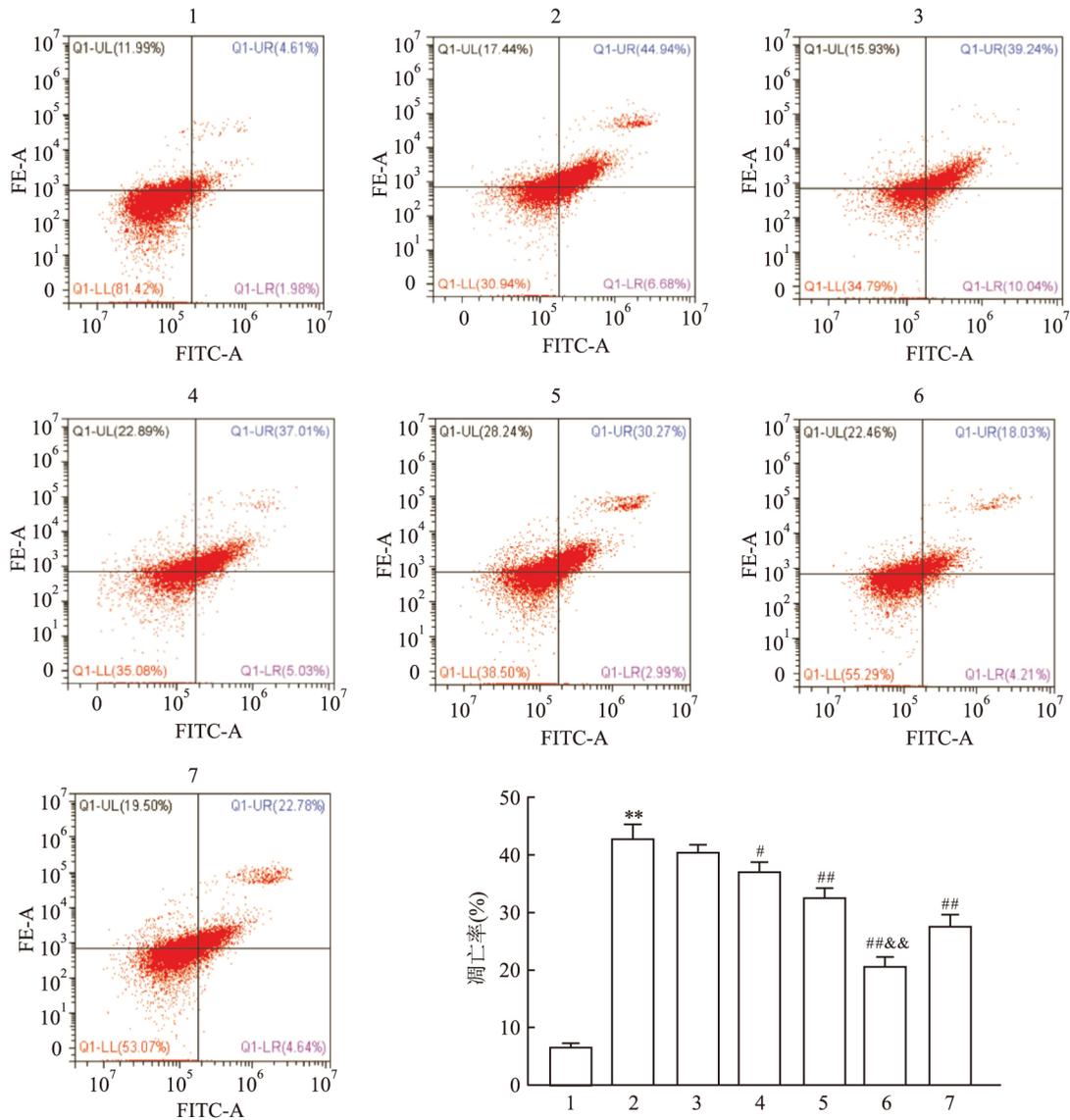


图3 H<sub>2</sub>S对低氧星形胶质细胞凋亡的影响(n=6)

1: 对照组; 2: 模型组; 3: NaHS 50 μmol/L; 4: NaHS 100 μmol/L; 5: NaHS 200 μmol/L; 6: NaHS 200 μmol/L + Fasudil 5 μmol/L; 7: Fasudil 5 μmol/L; 与对照组比较: \*\* P < 0.01; 与模型组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01; 与 NaHS 200 μmol/L 组比较: && P < 0.01

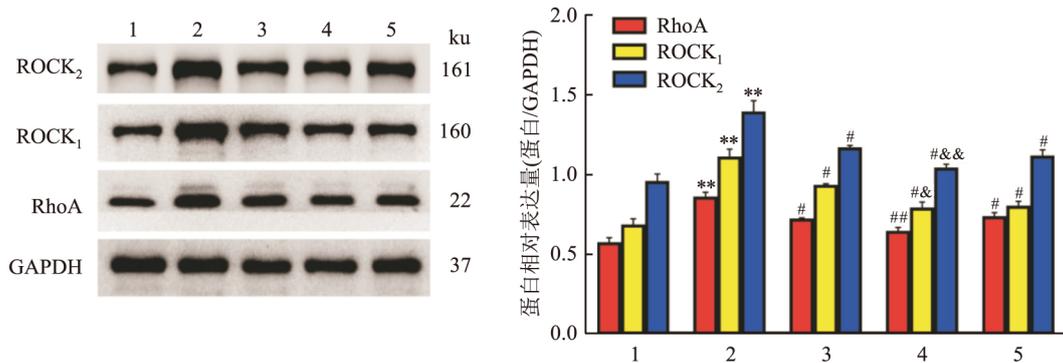


图4 H<sub>2</sub>S对低氧星形胶质细胞 RhoA、ROCK<sub>1</sub> 和 ROCK<sub>2</sub> 蛋白表达的影响(n=3)

1: 对照组; 2: 模型组; 3: NaHS 200 μmol/L; 4: NaHS 200 μmol/L + Fasudil 5 μmol/L; 5: Fasudil 5 μmol/L; 与对照组比较: \*\* P < 0.01; 与模型组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01; 与 NaHS 200 μmol/L 组比较: & P < 0.05, && P < 0.01

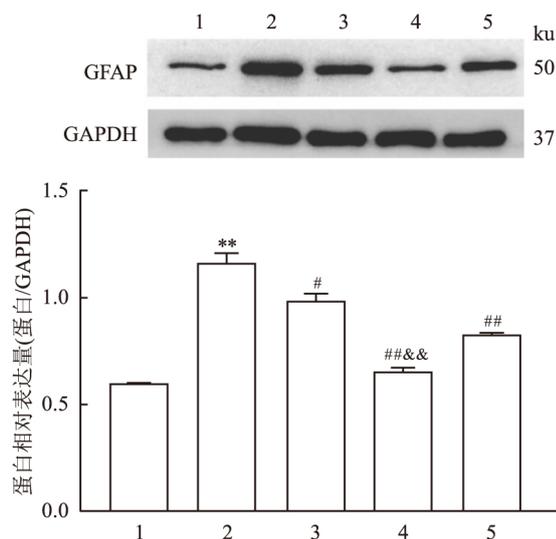


图5 H<sub>2</sub>S对低氧星形胶质细胞GFAP蛋白表达的影响( $n=3$ )

1: 对照组; 2: 模型组; 3: NaHS 200  $\mu\text{mol/L}$ ; 4: NaHS 200  $\mu\text{mol/L}$  + Fasudil 5  $\mu\text{mol/L}$ ; 5: Fasudil 5  $\mu\text{mol/L}$ ; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ; 与 NaHS 200  $\mu\text{mol/L}$  组比较: ##  $P < 0.01$

(CSPGs) 抑制脑缺血后轴突再生和神经功能恢复<sup>[11]</sup>。因此,适度干预星形胶质细胞反应性增生,调节星形胶质细胞功能是治疗缺血性脑损伤和促进神经修复的重要新方向。

脑缺血再灌注及细胞低氧均可导致细胞膜破损,造成细胞内的一些重要酶,比如LDH的外漏<sup>[10]</sup>。本研究在星形胶质细胞低氧培养模型,发现H<sub>2</sub>S供体NaHS 100、200  $\mu\text{mol/L}$ 明显抑制低氧损伤诱导的细胞培养上清液中LDH活性增高,表明H<sub>2</sub>S可抑制低氧损伤导致的星形胶质细胞中LDH的外漏。同时,还发现NaHS还可抑制低氧损伤诱导的星形胶质细胞活力降低,提示H<sub>2</sub>S对星形胶质细胞损伤的保护作用。与H<sub>2</sub>S作用相似,ROCK抑制剂Fasudil也可保护星形胶质细胞低氧损伤。此外,本研究通过流式细胞术检测星形胶质细胞在低氧培养48 h后的凋亡情况,结果表明H<sub>2</sub>S供体NaHS 100、200  $\mu\text{mol/L}$ 以及ROCK抑制剂Fasudil明显抑制星形胶质细胞的凋亡,联合应用Fasudil可提高200  $\mu\text{mol/L}$  NaHS对低氧损伤诱导的细胞凋亡保护作用。进一步明确H<sub>2</sub>S和抑制RhoA/ROCK通路激活可保护星形胶质细胞的低氧损伤。

神经元细胞膜上的电压门控性钙通道对于神经元存活和突触可塑性等至关重要,电压依赖性钙通道也存在于星形胶质细胞的细胞膜上。在缺血刺激后,反应性星形胶质细胞上钙通道上调,细胞内

Ca<sup>2+</sup>超载,加重细胞损伤<sup>[12]</sup>。本研究在星形胶质细胞低氧培养模型中,发现H<sub>2</sub>S供体NaHS 100和200  $\mu\text{mol/L}$ 以及ROCK抑制剂Fasudil明显抑制低氧损伤导致的星形胶质细胞内Ca<sup>2+</sup>超载。提示H<sub>2</sub>S和RhoA/ROCK通路抑制对星形胶质细胞低氧损伤的保护机制可能与降低细胞内Ca<sup>2+</sup>超载有关。

RhoA/ROCK信号转导通路是一种重要的细胞内信号通路,参与了多种细胞功能的调节。近年来的研究<sup>[13]</sup>证实RhoA/ROCK信号通路激活参与了脑梗死、中风及视神经损伤等神经损伤的病理生理过程。局灶性脑梗死后,RhoA/ROCK信号通路被激活,RhoA、ROCK蛋白表达增加,加重脑损伤<sup>[14]</sup>。本研究显示ROCK抑制剂Fasudil以及H<sub>2</sub>S供体NaHS均可降低星形胶质细胞低氧损伤。为了进一步探讨H<sub>2</sub>S和抑制RhoA/ROCK通路激活在星形胶质细胞保护作用中的关系,采用Western blot检测星形胶质细胞中RhoA、ROCK<sub>1</sub>、ROCK<sub>2</sub>及星形胶质细胞活化标志性蛋白GFAP的表达。结果表明低氧损伤可诱导星形胶质细胞中RhoA、ROCK<sub>1</sub>和ROCK<sub>2</sub>表达增高。此外,Western blot结果显示GFAP表达同样升高,提示低氧损伤可诱导星形胶质细胞活化。而给予H<sub>2</sub>S供体NaHS和ROCK抑制剂Fasudil预处理可降低RhoA、ROCK<sub>1</sub>和ROCK<sub>2</sub>以及GFAP的表达。表明H<sub>2</sub>S除了保护星形胶质细胞低氧损伤,还可抑制星形胶质细胞过度活化,其机制与抑制RhoA/ROCK通路激活有关。另外,NaHS与Fasudil联合应用对星形胶质细胞低氧损伤的保护作用明显增强,提示H<sub>2</sub>S对星形胶质细胞的保护机制与抑制RhoA/ROCK通路有关。

综上所述,本研究首次发现H<sub>2</sub>S既可保护星形胶质细胞低氧损伤,也可抑制其过度活化,其机制可能与抑制RhoA/ROCK通路激活有关。

## 参考文献

- [1] Dai D, He L, Chen Y, et al. Astrocyte responses to nanomaterials: functional changes, pathological changes and potential applications[J]. Acta Biomater, 2021, 122: 66-81.
- [2] 刘文学, 张广芬, 王菁, 等. 星形胶质细胞功能障碍在抑郁症发病中的作用研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(6): 1187-90.
- [3] Sims N R, Yew W P. Reactive astrogliosis in stroke: Contributions of astrocytes to recovery of neurological function[J]. Neurochem Int, 2017, 107: 88-103.
- [4] Koizumi S, Hirayama Y, Morizawa Y M. New roles of reactive astrocytes in the brain: an organizer of cerebral ischemia[J]. Neurochem Int, 2018, 119: 107-14.

- [5] Mukherjee N, Nandi S, Garg S, et al. Targeting chondroitin sulfate proteoglycans: An emerging therapeutic strategy to treat CNS injury [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2020, 11(3): 231–2.
- [6] Cao X, Cao L, Ding L, et al. A new hope for a devastating disease: hydrogen sulfide in Parkinson's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(5): 3789–99.
- [7] Li L, Liu B. ROCK inhibitor Y-27632 protects rats against cerebral ischemia/reperfusion-induced behavioral deficits and hippocampal damage [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3395–405.
- [8] 庄礼源. 盐酸法舒地尔在改善脑梗死患者预后中的作用研究 [J]. *中外医学研究*, 2017, 15(9): 101–3.
- [9] Wen J Y, Gao S S, Chen F L, et al. Role of CSE-produced H<sub>2</sub>S on cerebrovascular relaxation *via* RhoA-ROCK inhibition and cerebral ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(3): 1565–74.
- [10] Wu W, Geng P, Zhu J, et al. KLF2 regulates eNOS uncoupling *via* Nr2/HO-1 in endothelial cells under hypoxia and reoxygenation [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 305: 105–11.
- [11] 金齐颖, 吴红芳, 张园园, 等. 慢性不可预见性温和应激对大鼠海马星形胶质细胞凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(8): 1226–30.
- [12] Bisbal M, Remedi M, Quassollo G, et al. Rotenone inhibits axonogenesis *via* an Lfc/RhoA/ROCK pathway in cultured hippocampal neurons [J]. *J Neurochem*, 2018, 146(5): 570–84.
- [13] Gong P, Li R, Jia H Y, et al. Anfibatide preserves blood-brain barrier integrity by inhibiting TLR4/RhoA/ROCK pathway after cerebral ischemia/reperfusion injury in rat [J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(1): 71–83.
- [14] 唐强, 叶涛, 朱路文, 等. 针康法对局灶性脑梗死大鼠神经功能缺损及梗死灶周边区 RhoA、ROCK-II 蛋白表达的影响 [J]. *针灸临床杂志*, 2016, 32(8): 73–7.

## The effect of hydrogen sulfide on hypoxic injury of astrocytes based on RhoA/ROCK pathway

Zhang Yang, Ding Yanyu, Wen Jiyue, et al

(Dept of Pharmacology, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the effect of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on reactive proliferation and apoptosis of astrocytes and the inhibition mechanism of Rho-associated coiled coil-forming protein kinase (RhoA/ROCK) signaling pathway. **Methods** Astrocytes were cultured under hypoxia condition and pretreated with exogenous H<sub>2</sub>S donor, NaHS (50, 100, 200 μmol/L), ROCK inhibitor Fasudil (5 μmol/L), and co-application of NaHS (200 μmol/L) with Fasudil (5 μmol/L). The cell viability was detected by using cell counting kit-8 (CCK-8), the activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture supernatant was detected by spectrophotometry according to the procedures provided by the assay kit. Apoptosis was detected by flow cytometry, the variation of intracellular free Ca<sup>2+</sup> fluorescence was detected by fluorescence enzyme labeling. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), RhoA, ROCK<sub>1</sub> and ROCK<sub>2</sub> protein was detected by Western blot method. **Results** 100, 200 μmol/L NaHS significantly increased the astrocytes viability cultured under hypoxia condition, and decreased the cell apoptosis, Ca<sup>2+</sup> fluorescence and LDH activity released from astrocytes into the culture supernatant, suggesting that the protective effect of NaHS on the astrocytes against the hypoxia injury. In addition, Fasudil, an inhibitor of ROCK had the similarly protective effect on the injured astrocytes. In addition, 100, 200 μmol/L NaHS and Fasudil significantly decreased the expressions of GFAP, RhoA, ROCK<sub>1</sub> and ROCK<sub>2</sub> in astrocytes, and co-application with Fasudil could significantly enhance the protective effect of NaHS on the injured astrocytes and inhibition of the GFAP, ROCK<sub>1</sub> and ROCK<sub>2</sub> expressions. **Conclusion** H<sub>2</sub>S has an obviously protective effect on astrocytes against hypoxia injury, which may be related to the inhibition of the activation of RhoA/ROCK pathway.

**Key words** hydrogen sulfide; astrocytes; RhoA/ROCK; hypoxic damage