

## β-羟基丁酸对糖氧剥夺原代神经元的保护作用及其机制研究

王瑞<sup>1</sup>, 李玉<sup>2</sup>, 王波<sup>2</sup>, 马继龙<sup>1</sup>, 喂二所凹<sup>1</sup>, 王崇谦<sup>2</sup>

1. 昆明医科大学, 云南省昆明市 650500

2. 昆明医科大学第一附属医院, 云南省昆明市 650000

**摘要:**目的 探讨β-羟基丁酸(BHB)对SD大鼠神经元细胞缺氧损伤的保护作用及其机制。方法 原代培养SD大鼠神经元细胞,不同浓度(2 mM、5 mM、10 mM、20 mM和50 mM)BHB预处理24 h,三气培养箱糖氧剥夺培养2 h,线粒体超氧化物探针检测细胞线粒体氧化应激状态,CCK8检测细胞活力变化,QPCR测Na<sup>+</sup>偶联单羧酸转运体1(SMCT1)、caspase3和Cytochrome C的mRNA表达,Western Blot测SMCT1、caspase3、细胞色素C(Cytochrome C)、ERK1/2和p-ERK1/2(T202/204)蛋白表达。结果 2 mM、5 mM和10 mM浓度BHB对神经元细胞活力无显著影响( $P > 0.05$ ),20 mM和50 mM浓度BHB可致神经元活力显著降低( $P < 0.05$ )。神经元缺氧培养后,活力降低( $P < 0.05$ ),线粒体氧化应激反应增强( $P < 0.05$ ),SMCT1的mRNA水平和蛋白水平显著降低( $P < 0.05$ ),caspase3与Cytochrome C的mRNA水平和蛋白水平明显增强( $P < 0.05$ ),ERK1/2的蛋白磷酸化水平降低( $P < 0.05$ )。BHB预处理缺氧神经元,低浓度对细胞无明显影响( $P > 0.05$ );浓度增至10 mM,相比单纯缺氧组,神经元活力显著改善( $P < 0.05$ ),线粒体氧化应激状态降低( $P < 0.05$ ),SMCT1的mRNA水平和蛋白水平显著增加( $P < 0.05$ ),caspase3与Cytochrome C的mRNA水平和蛋白水平明显降低( $P < 0.05$ ),ERK1/2的蛋白磷酸化水平升高( $P < 0.05$ )。结论 高浓度(>20 mM)BHB对神经元细胞有毒性作用;低浓度(<5 mM)BHB对糖氧剥夺的神经元细胞无明显作用;10 mM浓度的BHB预处理可增加SMCT1转运体的表达,通过启动ERK1/2信号通路,降低神经元线粒体的氧化应激,减少凋亡,从而对糖氧剥夺的原代神经元细胞发挥保护作用。

**关键词:**β-羟基丁酸;神经元细胞;缺氧损伤;Na<sup>+</sup>偶联单羧酸转运体1;ERK1/2信号通路;大鼠

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2018.01.014

## Protective effect of β-hydroxybutyrate on primary neurons with glucose-oxygen deprivation and related mechanism

WANG Rui, LI Yu, WANG Bo, MA Ji-Long, Gen-Er-Suo-Ao, WANG Chong-Qian. Kunming Medical University, Kunming 650500, China

Corresponding author: WANG Chong-Qian, E-mail: 1571769534@qq.com

**Abstract: Objective** To investigate the protective effect of β-hydroxybutyrate (BHB) against hypoxic injury in neurons of Sprague-Dawley (SD) rats and related mechanism. **Methods** Primary cultured neurons of SD rats were pretreated with BHB at various concentrations (2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, and 50 mM) for 24 hours and then put in a tri-gas incubator for glucose-oxygen deprivation for 2 hours. A mitochondrial superoxide probe was used to examine mitochondrial oxidative stress in neurons; CCK-8 assay was used to measure the change in cell viability; QPCR was used to measure the mRNA expression of sodium-coupled monocarboxylate transporter 1 (SMCT1), caspase-3, and cytochrome C, and Western blot was used to measure the protein expression of SMCT1, caspase-3, cytochrome C, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) (T202/204). **Results** BHB at concentrations of 2 mM, 5 mM, and 10 mM had no significant influence on the viability of neurons ( $P > 0.05$ ), while BHB at concentrations of 20 mM and 50 mM caused a significant reduction in the viability of neurons ( $P < 0.05$ ). After hypoxic culture of the neurons, there was a significant reduction in viability ( $P < 0.05$ ), a significant increase in mitochondrial oxidative stress

基金项目:云南省科技厅—昆明医科大学应用基础研究联合专项(014FZ011)

收稿日期:2017-10-10;修回日期:2018-01-09

作者简介:王瑞(1991-),男,住院医师,硕士,昆明医科大学在读研究生,主要研究领域为脑血管疾病和脑肿瘤的外科治疗。

通信作者:王崇谦(1963-),男,副主任医师,学士,主要研究领域为脑血管疾病和癫痫的外科治疗。E-mail:1571769534@qq.com。

( $P < 0.05$ ), significant reductions in the mRNA and protein expression of SMCT1 ( $P < 0.05$ ), significant increases in the mRNA and protein expression of caspase-3 and cytochrome C ( $P < 0.05$ ), and a significant reduction in the phosphorylation level of ERK1/2 ( $P < 0.05$ ). As for the hypoxic neurons pretreated with BHB, a low concentration of BHB had no significant influence on neurons ( $P > 0.05$ ); compared with the simple hypoxia group, the 10 mM-BHB group had a significant improvement in the viability of neurons ( $P < 0.05$ ), a significant reduction in mitochondrial oxidative stress ( $P < 0.05$ ), significant increases in the mRNA and protein expression of SMCT1 ( $P < 0.05$ ), significant reductions in the mRNA and protein expression of caspase-3 and cytochrome C ( $P < 0.05$ ), and a significant increase in the phosphorylation level of ERK1/2 ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** High concentrations ( $> 20$  mM) of BHB have a toxic effect on neurons; low concentrations ( $< 5$  mM) of BHB have no significant influence on neurons with glucose-oxygen deprivation; BHB at a concentration of 10 mM can increase the expression of SMCT1, reduce mitochondrial oxidative stress and apoptosis by activating the ERK1/2 signaling pathway, and thus exert a protective effect on primary neurons with glucose-oxygen deprivation.

**Key words:**  $\beta$ -hydroxybutyrate; neuron; hypoxic injury; sodium-coupled monocarboxylate transporter 1; extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway; rat

在缺血性脑卒中发生过程中,缺血组织的氧化应激反应会引起神经元 DNA 损伤,引起基因功能缺失,进一步引起胶质细胞和血管细胞的凋亡发生<sup>[1]</sup>。氧化应激导致的神经元损伤和血脑屏障功能障碍是脑卒中治疗的难点<sup>[2]</sup>,在大脑中,乙酰乙酸和  $\beta$ -羟丁酸( $\beta$ -hydroxybutyric, BHB)可代替葡萄糖为大脑提供能量<sup>[3]</sup>,也有研究表明  $\beta$ -羟丁酸可减轻多巴胺能神经元的变性并可改善线粒体呼吸功能<sup>[4]</sup>。通过综合国内外研究,BHB 的脑保护作用机制仍不明确,基于此我们进行体外神经元细胞培养,并制作糖氧剥夺细胞模型,不同浓度 BHB 预处理后观察神经元细胞活力变化和线粒体氧化应激损伤情况,探讨 BHB 发挥神经保护作用的机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 实验动物 孕 28 d 的 SD 大鼠,雌性,购自昆明医科大学实验动物中心,清洁级 SPF 实验动物室饲养,通风良好,循环光照,给予清洁饲料与饮水。

1.1.2 主要试剂与仪器 BHB(上海基实有限公司);Neurobasal-A 培养基、B27 和澳洲源胎牛血清(gibco);EGF 重组蛋白(peprotech);阿糖胞苷(sigma);CCK8 试剂(同仁化学);MitoSOX Red 探针(thermo);PBS 缓冲液和 HBSS 缓冲液(gibco);Trizol 试剂(thermo);cDNA 合成试剂盒(Fermentas);QPCR 试剂盒(SYBR FAST qPCR Master Mix, Kapa);引物合成(invitrogen); $\beta$ -actin 抗体、ERK1/2 抗体、NSE 抗体和 p-erk1/2(T202/204)抗体(CST);SMCT1 抗体、cytochrome-c 抗体和 active-caspase3 抗体(abcam);Dylight 488 标记二抗(jackson Immuno);DAPI 荧光封片剂(中杉);二抗(abmart);HRP 底物显色试

剂盒(millipore);细胞培养级 DMSO(sigma)。

显微手术器械(上海金钟);体式显微镜(olympus);三气培养箱(Healforce);全波长酶标仪(molecular device);QPCR 仪(ABI Stepone);化学发光仪(Bio-Rad);荧光显微镜(Olympus)。

### 1.2 方 法

1.2.1 神经元培养 戊巴比妥钠溶液(30 mg/kg)腹腔注射麻醉孕鼠,75%乙醇消毒腹部,超净台中腹正中切口暴露双侧子宫,取胎鼠,体式显微镜下取皮质放入无菌 PBS 液,吹打 3~5 次制成单细胞悬液,200 目细胞筛过滤,800 rpm 离心 3 min,完全培养基(Neurobasal-A medium + 2% B27 + 10 ng/ml EGF + 10% FBS)重悬后接种至包被多聚赖氨酸孔板中,48 h 后加 5  $\mu$ g/ml 阿糖胞苷培养 24 h,换液为完全培养基培养。

1.2.2 神经元染色鉴定实验 细胞接种至 24 孔爬片(3 孔重复),生长第 11 d,75%乙醇固定,室温 1 h。PBS 洗涤 2 次,0.3% TritonX-100 透化 15 min,PBS 洗涤 2 次,加 NSE 抗体(1:200)孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,加 Dylight 488 标记的二抗(1:2000)室温避光孵育 1 h,PBS 避光洗涤 2 次,DAPI 荧光封片剂封片,荧光显微镜观察细胞着色情况。

1.2.3 不同浓度 BHB 对神经元活力的影响(CCK8 实验) 细胞接种至 96 孔板,生长第 10 d,分组(每组 3 孔重复):正常组(Blank),Blank + 不同浓度(2 mM、5 mM、10 mM、20 mM 和 50 mM) BHB 作用 24 h 组,以观察梯度浓度 BHB 对神经元的毒性作用,24 h 后,每孔加 10  $\mu$ l CCK8 溶液,培养箱孵育 2 h,酶标仪 450 nm 波长测 OD 值。

1.2.4 实验分组及缺氧实验

1.2.4.1 实验分组 ① Blank 组不做处理,正常

培养;②单纯缺氧组在细胞生长对数期,培养基换为 Neurobasal-A 基础培养基(不含 B27 和 EGF 等营养因子),适应性培养 1 h;③2 mM BHB 预处理 24 h + 缺氧组;④5 mM BHB 预处理 24 h + 缺氧组;⑤10 mM BHB 预处理 24 h + 缺氧组。③、④和⑤组在细胞生长对数期,换液为含对应浓度 BHB 的完全培养基作用 24 h 后,换液为含对应浓度 BHB 的 Neurobasal-A 培养基培养 1 h。将细胞放入三气培养箱(气体组成:2% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 93% N<sub>2</sub>)缺氧培养 2 h。

1.2.4.2 缺氧实验及线粒体超氧化物检测 细胞缺氧培养 2 h 后行线粒体超氧化物检测(Mitosox Red 探针);各组缺氧培养后(正常组除外),避光,超净台 HBSS 缓冲液洗涤 2 次,加 Mitosox Red 探针,37℃ 培养箱孵育 10 min;避光,HBSS 缓冲液洗涤 3 次;倒置荧光显微镜观察细胞红色荧光(各孔均一化曝光时间),获取图像用 Image Pro Plus 6.0 软件行荧光强度测定。

1.2.4.3 CCK8 实验 各组细胞每孔加 10 μl CCK8 溶液,培养箱孵育 2 h,酶标仪 450 nm 波长测 OD 值。

1.2.4.4 QPCR 实验 各组细胞用 Trizol 法提取总 RNA,分光光度计测各组 RNA 浓度,总 RNA 上样量 1 μg,cDNA 合成试剂盒合成 cDNA 第一条链,QPCR 试剂盒进行 QPCR 反应,反应体系 10 μl:上游引物 0.5 μl,下游引物 0.5 μl,Master mix 5 μl,模板 cDNA 1 μl,去核酸水 3 μl。反应条件:95℃ 3 min;95℃ 3 s,60℃ 30 s 进行 40 个循环;溶解曲线分析:95℃:15 s;60℃:30 s;95℃:15 s。反应后收集 Ct 值行 2<sup>-ΔΔCt</sup> 值分析。

1.2.4.5 Western Blot 实验 各组细胞 PBS 洗涤 2 次,吸弃液体,加预冷 RIPA 裂解液提取总蛋白。BCA 法测蛋白浓度。沸水加热变性,取 80 μg 蛋白上样、电泳,转膜。5% BSA 封闭 2 h,TBS 溶液洗膜

3 次,每次 5 min。加抗体:β-actin (ACTB,1:2000)、SMCT1 (1:500)、cytochrome-c (1:500)、active-caspase3 (1:2000)、ERK1/2 (1:1000) 和 phospho-ERK1/2 (1:1000),4℃ 孵育过夜,TBST 溶液漂洗 5 次,每次 5 min。加 HRP 标记的二抗,37℃ 孵育 1 h,TBST 溶液洗膜 3 次,每次 5 min。HRP 底物显色试剂盒进行显影,化学发光仪扫描 PVDF 膜,得蛋白条带用 Image J 软件分析灰度值,以与内参 β-actin 条带灰度值比值作为蛋白表达量数据,其中 ERK1/2 蛋白磷酸化计算方法:p-ERK1/2 蛋白表达量/ERK1/2 蛋白表达量,此比值为磷酸化水平数据。

### 1.3 统计学分析

每组均 5 孔重复,所得数据 SPSS 18.0 统计软件包处理,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组数据比较以单因素方差分析(one-way ANOVA)检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 神经元培养与鉴定

神经元生长第 8 天(图 1A),典型样生长,胞体透亮,胞体两侧有长轴突伸出,呈网状;第 11 天,神经元细胞生长至对数期(图 1B)。

神经元生长第 11 天,细胞固定后行神经元标记物(NSE)荧光染色,图 2 可见 NSE 抗体染色阳性,说明培养细胞为神经元。

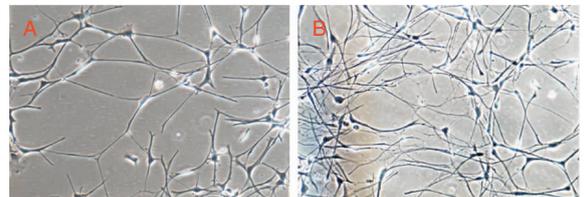


图 1 大鼠神经元原代培养(100 ×)

注:A:神经元生长第 8 天;B:神经元生长第 11 天。

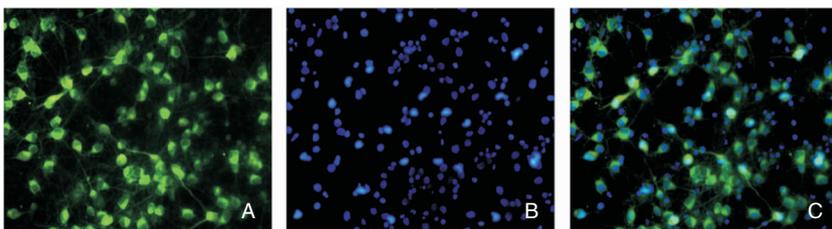


图 2 大鼠神经元细胞鉴定染色(100 ×)

注:A:NSE 染色;B:DAPI 染色;C:Merged。

## 2.2 缺氧实验及阴离子探针染色检测

Blank 组(图 3A 和图 3F)线粒体超氧化物几乎未见,说明细胞状态良好。糖氧剥夺 2 h 后(图 3B),线粒体超氧化物检测阳性细胞数急剧增加,与 Blank 组比有显著差异(图 3F)。在 BHB 预处理后再进行糖氧剥夺处理,与缺氧组比,2 mM 浓度

BHB(图 3C 和图 3F)对缺氧细胞无明显影响( $P > 0.05$ );BHB 在 5 mM 浓度(图 3D 和图 3F)和 10 mM 浓度(图 3E 和图 3F)时显著降低缺氧细胞中线粒体超氧化物生成( $P < 0.05$ );相比 5 mM 浓度,10 mM 浓度 BHB 抗线粒体氧化作用更强( $P < 0.05$ )。

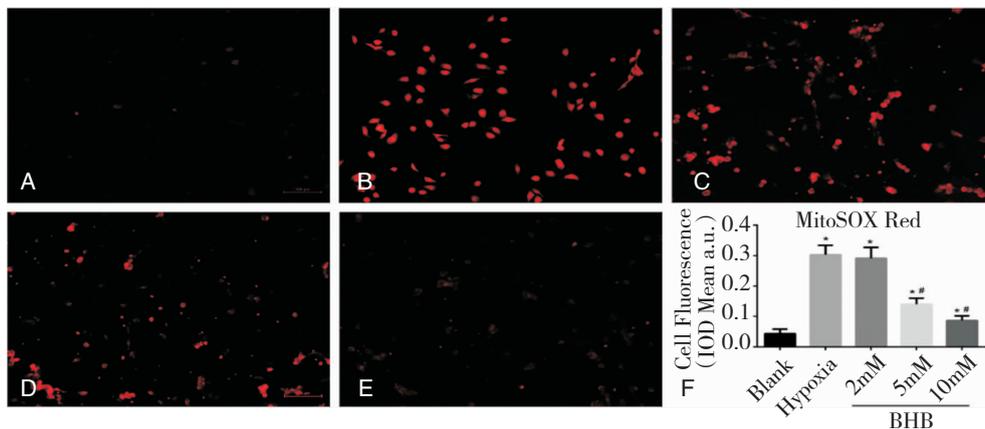


图 3 各组神经元 Mitoxox Red 探针染色图(100 ×)

注:A:Blank 组;B:单纯缺氧组;C:2 mM BHB 预处理 24 h + 缺氧组;D:5 mM BHB 预处理 24 h + 缺氧组;E:10 mM BHB 预处理 24 h + 缺氧组;\* :与 Blank 组比较, $P < 0.05$ ;#:与单纯缺氧组比较, $P < 0.05$ 。

## 2.3 CCK8 实验

为观察 BHB 不同浓度对正常神经元活力影响,设置 2 mM、5 mM、8 mM、10 mM、20 mM 和 50 mM 梯度浓度分别作用神经元 24 h。从图 4A 看出,低浓度(2 mM、5 mM 和 10 mM)BHB 时,神经元活力无明显变化( $P > 0.05$ ),说明这些浓度段 BHB 对神经元无明显毒副作用。高浓度(20 mM 和 50 mM)时,神经元活力出现显著降低( $P < 0.05$ ),说明高浓度 BHB 对神经元活力有毒性作用。

所以我们使用 2 mM、5 mM 和 10 mM 三个浓度进行缺氧实验,观察 BHB 是否发挥神经元保护作用。从图 4B 看出,与 Blank 组比,糖氧剥夺后神经

元活力显著降低( $P < 0.01$ )。给予 2 mM 浓度 BHB 后,相比缺氧组,神经元活力无显著变化( $P > 0.05$ );给予 5 mM 和 10 mM 浓度 BHB 后,相比缺氧组,神经元活力均显著增强( $P < 0.05$ )。

## 2.5 QPCR 实验

从图 5A 看出,与 Blank 组比,糖氧剥夺组 SMCT1 mRNA 表达显著降低( $P < 0.05$ );BHB 预处理后,与单纯缺氧组比,2 mM 组的 SMCT1 mRNA 无明显变化( $P > 0.05$ );5 mM 与 10 mM 组 SMCT1 mRNA 表达显著增强( $P < 0.05$ ),其中 10 mM 组变化最显著。

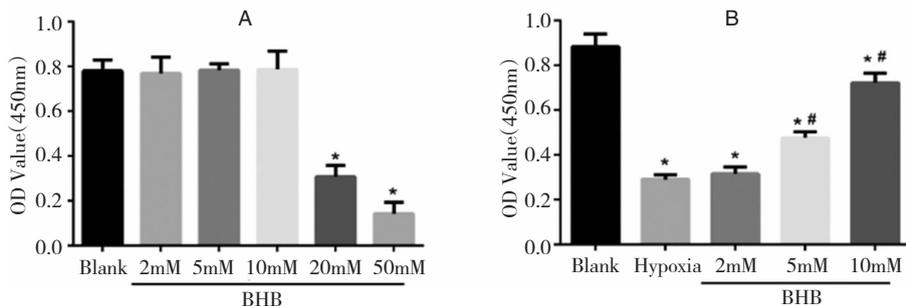


图 4 CCK8 实验

注:A:不同浓度 BHB 对正常神经元活力的影响;B:不同浓度 BHB 对糖氧剥夺神经元活力的影响;\* :与 Blank 组比较, $P < 0.05$ ;#:与单纯缺氧组比较, $P < 0.05$ 。

从图 5B 和图 5C 看出,与正常神经元比,糖氧剥夺组 Cytochrome C 与 caspase 3 mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); BHB 预处理后,与单纯缺氧组比,2 mM 组与 5 mM 组 Cytochrome C 与 caspase 3 mRNA

表达无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 10 mM 组 Cytochrome C 与 caspase 3 mRNA 表达显著降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

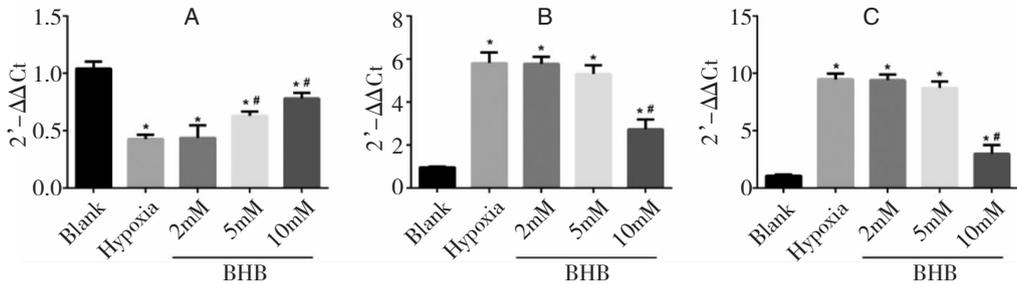


图 5 QPCR 实验(2-ΔΔCt 法)

注:A:各组神经元细胞中 SMCT1/SLC5A8 mRNA 的表达情况;B:各组神经元细胞中细胞色素 C mRNA 的表达情况;C:各组神经元细胞中 caspase 3 mRNA 的表达情况;\* :与 Blank 组比较, $P < 0.05$ ;#:与单纯缺氧组比较, $P < 0.05$ 。

## 2.6 Western Blot 实验

从图 6 和图 7A 看出,与 Blank 组比,单纯缺氧神经元中 SMCT1 蛋白表达急剧下降 ( $P < 0.05$ );与单纯缺氧组比,BHB-2 mM 预处理组 SMCT1 蛋白表达无显著差异 ( $P > 0.05$ );与单纯缺氧组比 BHB-5 mM 与 10 mM 预处理组 SMCT1 蛋白表达均显著升高 ( $P < 0.05$ )。

从图 6 和图 7B 看出,与 Blank 组比,单纯缺氧神经元中 Cytochrome C 蛋白表达有显著升高 ( $P < 0.05$ );与单纯缺氧组比,BHB-2 mM 及 BHB-5 mM 预处理的 Cytochrome C 蛋白表达均无明显差异 ( $P > 0.05$ );与单纯缺氧组比,BHB-10 mM 预处理组 Cytochrome C 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ )。

从图 6 和图 7C 看出,与 Blank 组比,缺氧神经元中活化的 caspase 3 蛋白表达量明显升高 ( $P < 0.05$ );与单纯缺氧组比,BHB-2 mM 预处理组的活化 caspase 3 表达量无显著差异 ( $P > 0.05$ );与单纯缺氧组比,BHB-5 mM 与 10 mM 组的活化 caspase 3 蛋白表达量显著回升 ( $P < 0.05$ ),其中 10 mM 组升高最明显 ( $P < 0.05$ )。

从图 6 和图 7D 看出,与 Blank 组比,缺氧神经

元中 ERK1/2 蛋白磷酸化水平明显降低 ( $P < 0.05$ );与单纯缺氧组比,BHB-2 mM 预处理组的 ERK1/2 蛋白磷酸化水平无显著差异 ( $P > 0.05$ );与单纯缺氧组比,BHB-5 mM 与 10 mM 组的 ERK1/2 蛋白磷酸化水平显著回升 ( $P < 0.05$ ),其中 10 mM 组升高最明显 ( $P < 0.05$ )。

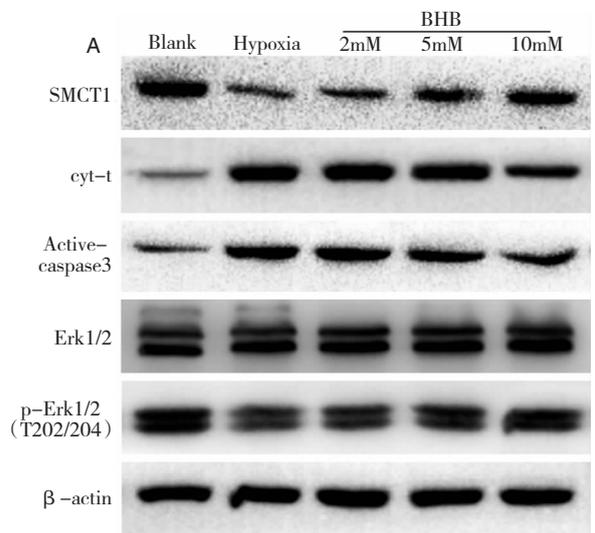


图 6 Western Blot 实验条带图

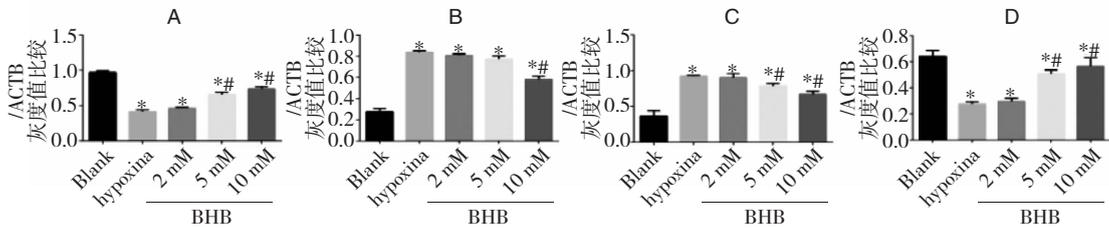


图7 Western Blot 实验柱形图

注:A:各组 SMCT1 蛋白表达差异柱形图;B:各组细胞色素 C 蛋白表达差异柱形图;C:各组细胞 active-caspase 3 蛋白表达差异柱形图;D:各组细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化水平表达差异柱形图;\* :与 Blank 组比较,  $P < 0.05$ ; #:与单纯缺氧组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

在缺血性脑卒中发生过程中,神经元细胞是首先受损单元。细胞线粒体功能障碍、氧化应激<sup>[5]</sup>和蛋白质合成功能障碍等病理反应是导致神经元损伤的首要因素。其中线粒体功能障碍所致能量摄取障碍起核心作用,线粒体通过释放 Cytochrome C 等凋亡因子<sup>[6]</sup>及线粒体自噬等途径诱导细胞凋亡<sup>[7]</sup>。Chen 等<sup>[8]</sup>研究指出,“富裕环境”下脑卒中大鼠神经功能改善明显,且神经元细胞形态,尤其线粒体超微结构改善更明显。Sun 等<sup>[9]</sup>研究表明线粒体通道蛋白 CHCD4 的下调可减少缺氧性脑损伤的脑内神经元细胞凋亡。

钠离子偶联单羧酸转运蛋白 SMCT1 是神经元摄取酮体、乳酸能量的特异通道<sup>[10]</sup>,BHB 经 SMCT1 转运进入胞内,通过  $\beta$ -氧化途径和作为一种组蛋白乙酰化酶的抑制剂发挥作用<sup>[11]</sup>,有研究表明,SMCT1 是 BHB 的特异性转运体蛋白<sup>[11,12]</sup>。在神经系统特别是神经元细胞中发现有 SMCT1 存在,在神经元利用乳酸、酮体等作为能量来源时的主要介导物质<sup>[10]</sup>。在糖尿病大鼠给予酮体饮食的研究中发现,SMCT1 转运蛋白在脑内海马区和皮质均有增多,同时伴随酮体 BHB 氧化供能增加<sup>[13]</sup>。

Forero 等<sup>[14]</sup>研究表明,BHB 通过提高 SMCT1 表达水平,可减少小鼠癫痫样活动。在红藻氨酸诱导的癫痫大鼠模型中,腹腔注射 BHB 可减少大鼠癫痫样活动次数。BHB 还可通过 H3K9BHB 调节 BDNF 表达,改善抑郁小鼠的行为<sup>[15]</sup>。

从我们研究中也发现,在 BHB 预处理组的 SMCT mRNA 与蛋白均有普遍升高,且对 BHB 有剂量依赖性。

本实验中,神经元糖氧剥夺后,神经元细胞活力降低,线粒体超氧化物生成增多,说明糖氧剥夺可引起神经元细胞线粒体的氧化应激,导致功能障

碍。经过 BHB 预处理神经元细胞,在糖氧剥夺实验中细胞活力比对照组表现更好,且有一定剂量依赖性,说明适量 BHB 在体外神经元缺氧模型中可以发挥神经元保护作用。同时在 BHB 预处理组的 SMCT mRNA 与蛋白均有普遍升高,且对 BHB 有剂量依赖性。在低氧发生时,细胞线粒体外膜转运孔发生崩裂,在氧化磷酸化作用下,线粒体基质解偶联膨胀,释放细胞色素 C,细胞色素 C 可进一步激活凋亡诱导因子如 caspase3 和核酸内切酶 G,这些 AIF 又进一步进入胞核引起 DNA 断裂。在神经元细胞中,这个过程还依赖于还原性谷胱甘肽。ERK1/2 信号通路在神经元生成过程中有重要作用<sup>[16]</sup>,在缺氧发生后,ERK 1/2 的蛋白磷酸化失活,导致线粒体功能障碍<sup>[17]</sup>,引起细胞凋亡发生。ROS 抑制剂可通过激活 ERK1/2 信号通路和 GSK3 $\beta$  信号通路,降低葡萄糖缺乏导致的神经毒性。

结合我们的研究可看出,神经细胞发生糖氧剥夺后,细胞氧化应激引起线粒体超氧化物生成增多,线粒体功能障碍导致 Cytochrome C 释放,进而引起细胞凋亡。在这个过程中,ERK1/2 信号通路发挥了关键作用,神经细胞氧化应激损伤移植了 ERK1/2 蛋白的磷酸化,而 BHB 可重新增强 ERK1/2 蛋白信号的磷酸化激活,我们推测,BHB 经 SMCT1 转运体进入神经细胞后,激活胞内 ERK1/2 信号通路,进而进入线粒体影响 Cytochrome C 释放,发挥神经保护作用。

### 参 考 文 献

[1] Li P, Stetler RA, Leak RK, et al. Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery [J]. Neuropharmacology, 2017.

[2] Lv J, Hu W, Yang Z, et al. Focusing on claudin-5: A

- promising candidate in the regulation of BBB to treat ischemic stroke [J]. *Prog Neurobiol*, 2017.
- [3] Itoh T, Quastel JH. Ribonucleic acid biosynthesis in adult and infant rat brain in vitro [J]. *Science*, 1969, 164 (3875): 79-80.
- [4] Tieu K, Perier C, Caspersen C, et al. D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(6): 892-901.
- [5] 陈婵, 邹望远, 王镔, 等. 高压氧与脑缺血再灌注损伤中的氧化应激 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2008, 35(4): 311-314.
- [6] 姜辰, 叶建林. 基于线粒体的缺血性脑卒中病理机制研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2017, 44(3): 323-326.
- [7] Anzell AR, Maizy R, Przyklenk K, et al. Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2017.
- [8] Chen X, Zhang X, Xue L, et al. Treatment with Enriched Environment Reduces Neuronal Apoptosis in the Periinfarct Cortex after Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(4): 1445-1456.
- [9] Sun Y, Li T, Xie C, et al. Haploinsufficiency in the mitochondrial protein CHCHD4 reduces brain injury in a mouse model of neonatal hypoxia-ischemia [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2781.
- [10] Martin PM, Gopal E, Ananth S, et al. Identity of SMCT1 (SLC5A8) as a neuron-specific Na<sup>+</sup>-coupled transporter for active uptake of L-lactate and ketone bodies in the brain [J]. *J Neurochem*, 2006, 98(1): 279-288.
- [11] Stilling RM, van de Wouw M, Clarke G, et al. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis [J]. *Neurochem Int*, 2016, 99: 110-132.
- [12] Dave RA, Morris ME. Semi-mechanistic kidney model incorporating physiologically-relevant fluid reabsorption and transporter-mediated renal reabsorption: pharmacokinetics of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid and L-lactate in rats [J]. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn*, 2015, 42(5): 497-513.
- [13] de Assis AM, da SJS, Rech A, et al. Cerebral Ketone Body Oxidation Is Facilitated by a High Fat Diet Enriched with Advanced Glycation End Products in Normal and Diabetic Rats [J]. *Front Neurosci*, 2016, 10: 509.
- [14] Forero-Quintero LS, Deitmer JW, Becker HM. Reduction of epileptiform activity in ketogenic mice: The role of monocarboxylate transporters [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4900.
- [15] Chen L, Miao Z, Xu X.  $\beta$ -hydroxybutyrate alleviates depressive behaviors in mice possibly by increasing the histone3-lysine9- $\beta$ -hydroxybutyrylation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(2): 117-122.
- [16] Zeng XJ, Yu SP, Zhang L, et al. Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(11): 1773-1783.
- [17] Pucci B, Indelicato M, Paradisi V, et al. ERK-1 MAP kinase prevents TNF-induced apoptosis through bad phosphorylation and inhibition of Bax translocation in HeLa Cells [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 108(5): 1166-1174.