

## 外源性丙酮酸盐脑保护机制的研究进展

吴树彬 综述 刘晋萍 审校

中国医学科学院阜外心血管病医院 北京市 100037

**摘要:** 丙酮酸盐 (Pyr) 是机体重要的中间代谢产物,糖酵解和三羧酸循环的枢纽。作为有效的能量底物,Pyr 不仅可以为损伤大脑补充能量,改善大脑代谢,而且还可以通过抗炎抗氧化和抑制凋亡等其它机制改善离体和在大脑神经元的存活及预后,为脑损伤的临床治疗提供了新的治疗途径和思路。本文旨在对 Pyr 的脑保护机制做一总结。

**关键词:** 丙酮酸盐;脑保护;氧化应激;炎症;谷氨酸;乳酸中毒;凋亡

脑损伤是患者致残和死亡的重要原因之一。目前,外科手术、亚低温、过度通气及药物是临床治疗各种脑损伤的主要途径,其中药物在缓解脑损伤中具有不可替代的作用。经典的脑损伤机制包括能量代谢障碍<sup>[1]</sup>和兴奋性毒性的激活<sup>[2]</sup>,因此改善大脑能量代谢和降低兴奋性氨基酸,尤其是谷氨酸的神经毒性是临床治疗和科学研究的重要基点。研究表明,丙酮酸盐 (pyruvate, Pyr) 兼具补充大脑能量<sup>[3]</sup>和清除损伤脑组织谷氨酸<sup>[4]</sup>的作用,并因其抗氧化抗炎<sup>[5]</sup>及抑制凋亡<sup>[6]</sup>等效应,Pyr 在失血性休克、外伤性脑损伤、短暂性全大脑缺血、短暂性或永久性大脑局部缺血、心肺复苏、红藻酸或喹啉酸诱导的神经元兴奋毒性、肌萎缩侧索硬化和严重的低血糖症脑损伤等模型中均取得了良好的神经保护效果<sup>[7]</sup>。

### 1 代谢机制

丙酮酸盐是生物体重要的有机小分子,连接糖酵解和三羧酸 (tricarboxylic acid, TCA) 循环的枢纽;作为糖酵解的终产物和 TCA 循环的初始底物,在机体中间代谢过程中起重要的作用。在无氧条件下,乳酸脱氢酶可利用还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH),将 Pyr 转变为乳酸和氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>);在有氧条件下,Pyr 可以进入线粒体,在丙酮酸脱氢酶复合体的催化下进行氧化脱羧,形成乙酰辅酶 A 和 CO<sub>2</sub>,乙酰辅酶 A 进入 TCA 循环进一步氧化产生 ATP。

#### 1.1 有效的能量底物

与葡萄糖相比,Pyr 通过血脑屏障的速率较低,

但是血液 Pyr 浓度较高时可经由单羧酸转运体快速通过血脑屏障。当脑组织 ATP 浓度降低时,大脑可优先利用 Pyr 而非葡萄糖,这是因为利用葡萄糖时需要 ATP 驱动使其磷酸化,而外源性 Pyr 不经糖酵解,可直接进入 TCA 循环氧化产生 ATP。

在葡萄糖耗竭之前用 Pyr 孵育,可增强神经元内在糖原存储、维持葡萄糖耗竭期间 ATP 水平和改善海马区能量缓冲能力<sup>[3]</sup>。Pyr 增强糖原含量的机制可能是高浓度的 Pyr 可经氧化脱羧进入 TCA 循环,增加柠檬酸盐水平。柠檬酸盐可以抑制 6-磷酸果糖激酶-1 的活性,而后者可将 6-磷酸果糖催化为 1,6-双磷酸果糖,因此,可以间接抑制 6-磷酸果糖进入糖酵解途径,使其转向糖原合成。由于糖原分解可以直接为糖酵解添加燃料,糖原作为能量储存形式具有明显优势,并且因为葡萄糖已经被磷酸化,因此糖酵解初始不需要消耗 ATP。由于能量过剩会导致糖原贮积,底物短缺会造成糖原分解,因此,糖原合成时额外的能量消耗和储存是有利的。

Pyr 还可以改变糖酵解和呼吸氧化链中多个关键酶,包括 3-磷酸甘油醛脱氢酶和丙酮酸脱氢酶。外伤性脑损伤会抑制丙酮酸脱氢酶,减缓 Pyr 氧化脱羧进入 TCA 循环,并伴随 NADH 产生所需的还原当量、氧化磷酸化和 ATP 生成的下降;而外源性丙酮酸钠可以提升脑组织 Pyr 含量,激活丙酮酸脱氢酶和自身氧化<sup>[8]</sup>。神经元 Pyr 水平较高时,外伤性脑损伤诱导丙酮酸羧化酶升高介导的回补也会增加线粒体 NADH<sup>[9]</sup>。胞浆 NADH 相对降低伴随线

基金项目:国家自然科学基金(81100178)

收稿日期:2013-09-17;修回日期:2014-01-12

作者简介:吴树彬(1986-),男,硕士研究生,主要从事体外循环脑保护的研究。

通讯作者:刘晋萍,女,现为阜外心血管病医院体外循环科副主任,博士,主任医师,主要从事体外循环脑保护领域的研究。E-mail:jinpingsw@hotmail.com。

粒体跨膜  $H^+$  梯度增加,反映了神经元代谢外源性 Pyr 可以改善线粒体氧化还原状态( $NAD^+/NADH$  或乳酸/丙酮酸比例),有利于线粒体氧化磷酸化。

### 1.2 清除兴奋性氨基酸

在神经变性发生之后,脑脊液和血液谷氨酸水平升高与神经预后不良高度相关。中风可使大脑细胞外液和脑脊液谷氨酸浓度增加 300~400 倍,这不但会加重梗死程度,其进一步扩散还可损伤梗死区外的神经元<sup>[10]</sup>。反之,大鼠大脑中动脉阻断后的死亡率、梗死面积和水肿程度下降与血浆谷氨酸水平降低紧密相关<sup>[11]</sup>。给蛛网膜下腔出血大鼠静注 125 mg/kg 的 Pyr,可以有效清除血液和脑脊液中的谷氨酸,改善神经功能,保护血脑屏障<sup>[12]</sup>。

Pyr 通过降低大脑和血浆中谷氨酸产生脑保护作用,这与其在 TCA 循环中的代谢途径有关。谷氨酸可通过大脑毛细血管内皮细胞管腔对侧的谷氨酸转运体从大脑转运至血液,且谷氨酸外流速度随脑细胞外液-血谷氨酸浓度差的增加而变大<sup>[4]</sup>。血液中的谷丙转氨酶,在 Pyr 浓度升高的条件下,可将谷氨酸转变为  $\alpha$ -酮戊二酸,从而降低血谷氨酸浓度,增加脑-血谷氨酸外流的动力<sup>[4]</sup>,降低大脑谷氨酸水平。阻断大鼠大脑中动脉后,静注 250 mg/kg 的 Pyr 可以有效清除血液和脑脊液中的谷氨酸,然而,静注 31.3 mg/kg 的 Pyr 并未降低大脑谷氨酸水平,而将低剂量 Pyr 与谷丙转氨酶复合注射却取得显著的保护效果<sup>[11]</sup>。低剂量 Pyr 清除谷氨酸能力极其有限,一方面可能是因为 Pyr 在机体表观分布容积较大,导致血液中 Pyr 浓度较低;另一方面可能是因为血浆谷丙转氨酶的含量较低,影响血浆中谷氨酸的转化,导致了谷氨酸清除速率变慢,揭示 Pyr 的脑保护作用可能在部分程度上依赖血液中的生化酶谷丙转氨酶。在 Pyr 静注剂量为 250 mg/kg 时,即使与谷丙转氨酶复合注射也不能进一步降低脑组织谷氨酸浓度和梗死面积<sup>[11]</sup>,提示血浆中谷氨酸清除可能与血浆 Pyr 剂量密切相关。

动物模型中,Pyr 的静脉注射剂量从 62.5 mg/kg<sup>[13]</sup> 到 1000 mg/kg<sup>[7]</sup> 均能显著改善神经预后,说明 Pyr 的有效治疗窗较大,安全性较高。先前有研究表明 Pyr 呈 U 型剂量效应曲线,在剂量超过 250 mg/kg 时就会失去效应<sup>[13]</sup>,这可能是因为大剂量的 Pyr 在糖酵解过程中转化成了乳酸(尤其在无氧条件下),大量的乳酸堆积掩盖了 Pyr 的保护作

用。但在低氧和有氧条件下,Pyr 并未展现出 U 型剂量效应曲线,大剂量注射仍具有保护作用。相较于 500 mg/kg 静脉注射,1000 mg/kg Pyr 的注射剂量在闭合性脑损伤模型脑保护时间明显较长<sup>[7]</sup>,呈现剂量依赖性的保护效应。在 Pyr 剂量为 62.5 mg/kg 到 250 mg/kg 时,无论是腹腔还是静脉注射,均可显著降低脑梗死面积<sup>[13]</sup>,给药方式的灵活性,为其应用提供了便利。

### 1.3 纠正乳酸酸中毒

外伤性脑损伤后丙酮酸脱氢酶会受到抑制,降低 Pyr 氧化脱羧进入 TCA 循环,造成 Pyr 向乳酸转化,引发胞外酸中毒<sup>[14]</sup>。脑组织胞外 pH 降低,无论伴随缺氧与否,是反映大脑代谢紊乱的重要指标,并增加创伤性脑损伤后的死亡率<sup>[15]</sup>。外源性 Pyr 可经由多条途径改善大脑无氧和有氧代谢,缓解乳酸酸中毒。首先,Pyr 可抑制低氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 降解并增强其活性,而 HIF-1 会使乳酸脱氢酶活性增加,因乳酸脱氢酶催化的反应是一个全身碱化的过程,所以会消耗胞外大量  $H^+$ <sup>[8]</sup>。其次,有氧条件下,Pyr 可抑制丙酮酸脱氢酶激酶,恢复受抑制的丙酮酸脱氢酶活性,并增强 TCA 循环的回补反应和氧化代谢,加速堆积的乳酸氧化,且乳酸在 TCA 循环中的氧化也会消耗  $H^+$ <sup>[8]</sup>。再次,有氧条件下,外源性 Pyr 进入细胞时,单羧酸转运体会将其与  $H^+$  同向转运至细胞内,降低胞外  $H^+$  浓度。最后,无氧条件下,胞浆的 Pyr 和乳酸会进行糖异生过程,两者相比,前者会消耗掉更多的  $H^+$ 。综上,Pyr 参与的多种生化过程都可以消耗  $H^+$ ,这是其在有氧和无氧条件下纠正胞外酸中毒的生化基础<sup>[8]</sup>,也可能是 Pyr 脑保护作用的重要机制之一。

## 2 抗氧化应激及抗炎效应

除了作为重要的代谢中间产物氧化供能,Pyr 还是机体内源性活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的清道夫,尤其是  $H_2O_2$ 。大脑氧消耗活性高,因此产生的  $H_2O_2$  相对较多,线粒体电子传递链泄露电子或其它的酶促反应,包括 NADPH 氧化酶和黄嘌呤氧化酶催化的反应,会通过细胞内直接或间接效应,使氧分子部分还原产生  $H_2O_2$ <sup>[16]</sup>。外源性 Pyr 可以通过非酶促氧化脱羧反应清除神经元  $H_2O_2$ ,可能是神经元抵抗氧化应激的重要非酶性防护屏障。

此外,生物体重要的 ROS 还包括  $O_2^{\cdot-}$ 、 $OH^{\cdot}$  和

ONOO<sup>-</sup>。尽管 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 活性不高,却可以脱去一电子形成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或与 NO 反应生成强力的氧化和亚硝化物质 ONOO<sup>-</sup>。此外, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 发生反应会产生高度活性的自由基 OH<sup>·</sup>。由于大脑抗氧化屏障相对较弱、脂类含量尤其是不饱和脂肪酸和儿茶酚胺较高,导致大脑易受自由基攻击。研究表明,自由基在慢性炎症、血管、肿瘤和神经退行性疾病,包括帕金森病、阿尔茨海默病、中风、多发性硬化症、癫痫等病理过程中起重要作用<sup>[17]</sup>。而丙酮酸盐不仅可清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,还可以清除 OH<sup>·</sup> 和 ONOO<sup>-</sup><sup>[16]</sup>,从而缓解脑损伤。Pyr 除了通过非酶促脱羧反应清除 ROS,还可以增强大脑酶促反应防线。谷胱甘肽过氧化物酶是神经元抵抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中重要的酶。氧化应激发生时,TCA 循环利用外源性 Pyr 有利于抑制 3-磷酸甘油醛脱氢酶,将葡萄糖经由磷酸戊糖途径代谢产生谷胱甘肽所需的还原当量,改善谷胱甘肽氧化还原循环(NADP/NADPH),增强谷胱甘肽过氧化物酶的抗氧化屏障<sup>[14]</sup>。

缺血后炎症反应,包括激活 NF-κB 和抑制下游免疫介质,会加重缺血进展<sup>[18]</sup>。在大鼠大脑中动脉闭塞模型中,静脉注射丙酮酸钠可减少脑梗死面积,减少缺血区中性粒细胞浸润和小胶质细胞激活,有效缓解脑缺血和脂多糖介导的炎症中 NF-κB 的活性,降低 NF-κB 与 DNA 的结合能力及减少 NF-κB 调控的基质金属蛋白酶 9 基因的表达<sup>[5]</sup>。在大脑中动脉短暂或永久性闭塞模型中,静注丙酮酸钠还可抑制 NO 和炎症反应标记物的产生<sup>[13]</sup>。

### 3 抗凋亡

氧化应激是造成神经元死亡的重要原因之一,线粒体是细胞内 ROS 产生的根源,因此是氧化应激的主要靶点。脑损伤会导致神经元锌聚集,锌进入线粒体后,通过干扰氧化磷酸化产生 ROS,诱导并激活 NADPH 氧化酶,产生毒性超氧化物,引发氧化应激<sup>[7]</sup>。氧化应激会引起线粒体膜去极化,继之引发细胞色素 C 释放,激活胱天蛋白酶家族(caspase family)<sup>[19]</sup>。其中,激活的 caspase-3 可裂解激活许多靶蛋白,包括聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1[poly(ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1]<sup>[20]</sup>。PARP-1 的正常作用是修复损伤的 DNA,但在氧化应激期间,PARP-1 激活可将 NAD<sup>+</sup> 裂解为尼克酰胺和腺苷二磷酸核糖,导致胞质 NAD<sup>+</sup> 迅速耗竭<sup>[20]</sup>。由于 NAD<sup>+</sup> 为糖酵解过程中的 3-磷酸甘油醛脱氢酶所必需,因此 PARP-1 激活会阻断糖酵

解,使神经元不能利用葡萄糖,即使葡萄糖水平已经恢复至正常水平<sup>[21]</sup>,所以 NAD<sup>+</sup> 耗竭被视为细胞死亡的关键因素。此外,重新合成一个 NAD<sup>+</sup> 需要消耗 4 个 ATP 分子,若以匮乏的 ATP 为代价补充 NAD<sup>+</sup> 会导致能量危机,造成神经元死亡<sup>[20]</sup>。然而,Pyr 却可有效缓解锌和 PARP-1 激活诱导的细胞死亡。体外研究揭示,Pyr 可以作为有效的能量底物<sup>[7]</sup>,通过其抗氧化和清除自由基的能力<sup>[16]</sup>、逆转 NAD<sup>+</sup> 下降和损伤诱导 PARP-1 激活后抑制糖酵解等能力,逆转细胞凋亡。在体失血性休克模型表明,静注 Pyr 可防止失血引起的 NAD<sup>+</sup> 下降和 PARP-1 激活,缓解脂质过氧化和改善神经元生存率<sup>[22]</sup>。在大鼠短暂性全脑缺血模型中,再灌注伊始单次腹腔注射丙酮酸钠,可显著改善大鼠死亡率、神经元 Zn 聚集和神经元死亡<sup>[23]</sup>。

此外,Pyr 还可通过抑制蛋白磷酸酶 2A,使 Ca<sup>2+</sup>/CaMK2 再自体磷酸化,阻断 β 淀粉样蛋白寡聚体导致的长时程增强抑制,减少海马区神经元凋亡<sup>[24]</sup>。PI3K/Akt 通路在神经细胞存活中起重要作用<sup>[6,25]</sup>:在体和离体实验证实,Pyr 可以抑制 HIF-1α 降解,提升细胞内 HIF-1α 亚基的含量。HIF-1α 与 HIF-1β 亚基可形成异二聚体,促进促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)基因表达,其表达产物 EPO 作用于 EPO 受体,进一步激活 Akt 促生存信号通路,保护大脑神经元<sup>[26]</sup>。Pan 等<sup>[27]</sup>也揭示,Pyr 可以降低新生鼠缺血缺氧模型中大脑 Bax 水平,增加 Bcl-2/Bax 比值,激活 PI3K/Akt 促生存信号通路,抑制神经元凋亡。

### 4 小结

Pyr 作为机体重要的中间代谢产物,因其具有多重作用机制,已在临床前研究中表现出积极的脑保护作用<sup>[7]</sup>。其治疗窗较大,安全性较高,尚未有关其任何严重副作用的报道。因此,建议研究人员在掌握 Pyr 药理作用基础上,进一步进行动物在体甚至开展临床研究,以证实其安全性和有效性,为减轻患者脑损伤提供新的治疗思路。

### 参考文献

- [1] Nielsen TH, Bindslev TT, Pedersen SM, et al. Cerebral energy metabolism during induced mitochondrial dysfunction. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2013, 57(2): 229-235.
- [2] Vandresen-Filho S, Martins WC, Bertoldo DB, et al. Atorvastatin prevents cell damage via modulation of oxidative stress, glutamate uptake and glutamine synthetase activity in hipp-

- ocampal slices subjected to oxygen / glucose deprivation. *Neurochem Int* , 2013 , 62 ( 7 ) : 948-955.
- [3] Shetty PK , Sadgrove MP , Galeffi F , et al. Pyruvate incubation enhances glycogen stores and sustains neuronal function during subsequent glucose deprivation. *Neurobiol Dis* , 2012 , 45 ( 1 ) : 177-187.
- [4] Zlotnik A , Sinelnikov I , Gruenbaum BF , et al. Effect of glutamate and blood glutamate scavengers oxaloacetate and pyruvate on neurological outcome and pathohistology of the hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Anesthesiology* , 2012 , 116 ( 1 ) : 73-83.
- [5] Wang Q , van Hoecke M , Tang XN , et al. Pyruvate protects against experimental stroke via an anti-inflammatory mechanism. *Neurobiol Dis* , 2009 , 36 ( 1 ) : 223-231.
- [6] 唐坤裕. PI3K / Akt-eNOS-NO 信号通路在脑缺血后适应的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志* , 2013 , 40 ( 1 ) : 67-70.
- [7] Fukushima M , Lee SM , Moro N , et al. Metabolic and histologic effects of sodium pyruvate treatment in the rat after cortical contusion injury. *J Neurotr* , 2009 , 26 ( 7 ) : 1095-1110.
- [8] Zhou FQ. Pyruvate in the correction of intracellular acidosis : a metabolic basis as a novel superior buffer. *Am J Nephrol* , 2005 , 25 ( 1 ) : 55-63.
- [9] Bartnik BL , Hovda DA , Lee PW. Glucose metabolism after traumatic brain injury : estimation of pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase flux by mass isotopomer analysis. *J Neurotr* , 2007 , 24 ( 1 ) : 181-194.
- [10] Han F , Shioda N , Moriguchi S , et al. Downregulation of glutamate transporters is associated with elevation in extracellular glutamate concentration following rat microsphere embolism. *Neurosci Lett* , 2008 , 430 ( 3 ) : 275-280.
- [11] Boyko M , Zlotnik A , Gruenbaum BF , et al. Pyruvate's blood glutamate scavenging activity contributes to the spectrum of its neuroprotective mechanisms in a rat model of stroke. *Eur J Neurosci* , 2011 , 34 ( 9 ) : 1432-1441.
- [12] Boyko M , Melamed I , Gruenbaum BF , et al. The effect of blood glutamate scavengers oxaloacetate and pyruvate on neurological outcome in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Neurotherapeutics* , 2012 , 9 ( 3 ) : 649-657.
- [13] Yi JS , Kim TY , Kyu Kim D , et al. Systemic pyruvate administration markedly reduces infarcts and motor deficits in rat models of transient and permanent focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* , 2007 , 26 ( 1 ) : 94-104.
- [14] Ralser M , Wamelink MM , Kowald A , et al. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J Biol* , 2007 , 6 ( 4 ) : 10.
- [15] Timofeev I , Nortje J , Al-Rawi PG , et al. Extracellular brain pH with or without hypoxia is a marker of profound metabolic derangement and increased mortality after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* , 2013 , 33 ( 3 ) : 422-427.
- [16] Kao KK , Fink MP. The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. *Biochem Pharmacol* , 2010 , 80 ( 2 ) : 151-159.
- [17] Sirtori LR , Dutra-Filho CS , Fitarelli D , et al. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta* , 2005 , 1740 ( 1 ) : 68-73.
- [18] Wang Q , Tang XN , Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* , 2007 , 184 ( 1-2 ) : 53-68.
- [19] Sikdar S , Mukherjee A , Ghosh S , et al. Condurango glycoside-rich components stimulate DNA damage-induced cell cycle arrest and ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis through inhibition of cell-proliferation in lung cancer , in vitro and in vivo. *Environ Toxicol Pharmacol* , 2013 , 37 ( 1 ) : 300-314.
- [20] Beal MF. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* , 2000 , 23 ( 7 ) : 298-304.
- [21] Amaral AI , Teixeira AP , Sonnewald U , et al. Estimation of intracellular fluxes in cerebellar neurons after hypoglycemia : importance of the pyruvate recycling pathway and glutamine oxidation. *J Neurosci Res* , 2011 , 89 ( 5 ) : 700-710.
- [22] Zeng J , Yang GY , Ying W , et al. Pyruvate improves recovery after PARP-1-associated energy failure induced by oxidative stress in neonatal rat cerebrocortical slices. *J Cereb Blood Flow Metab* , 2007 , 27 ( 2 ) : 304-315.
- [23] Lee JY , Kim YH , Koh JY. Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J Neurosci* , 2001 , 21 ( 20 ) : RC171.
- [24] Wang X , Takata T , Bai X , et al. Pyruvate prevents the inhibition of the long-term potentiation induced by amyloid-beta through protein phosphatase 2A inactivation. *J Alzheimers Dis* , 2012 , 30 ( 3 ) : 665-673.
- [25] 许艺超. PI3K / Akt 信号通路在脑缺血神经元凋亡中作用的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志* , 2012 , 39 ( 6 ) : 530-533.
- [26] Ryou MG , Liu R , Ren M , et al. Pyruvate protects the brain against ischemia-reperfusion injury by activating the erythropoietin signaling pathway. *Stroke* , 2012 , 43 ( 4 ) : 1101-1107.
- [27] Pan R , Rong Z , She Y , et al. Sodium pyruvate reduces hypoxic-ischemic injury to neonatal rat brain. *Pediatr Res* , 2012 , 72 ( 5 ) : 479-489.