

# RIP1/3 对创伤性脑损伤后神经元的作用及其机制研究

王宏斌 郑新瑞 袁华 何芳梅

**【摘要】 目的** 探讨 RIP1/3 对创伤性脑损伤(TBI)后神经元的影响及其作用机制。**方法** 将体外培养的皮层神经元分为 4 组:siRIP 组、Nec-1 预处理组、阴性质粒转染组和对照组。通过慢病毒转染法分别干涉 RIP1、RIP3 表达,建立离体 TBI 损伤模型,通过流式细胞学检测划伤后神经元存活情况。对体外培养的皮层神经元敲除 RIP1/3,建立谷氨酸诱导神经元损伤模型,通过流式细胞学检测谷氨酸刺激后神经元存活情况。**结果** siRIP 组及 Nec-1 预处理组机械性损伤后神经元存活率高于阴性质粒转染组和对照组。Nec-1 预处理组谷氨酸损伤后神经元存活率高于对照组,而 siRIP 组存活率与对照组和阴性转染组比较未见显著差异。**结论** RIP1 和 RIP3 可能对 TBI 诱导后神经元死亡有作用,而 RIP1 抑制剂 Nec-1 可能对 TBI 具有脑保护作用。RIP1/3 与谷氨酸兴奋毒性诱导细胞死亡无关,而 Nec-1 对于谷氨酸损伤具有潜在保护作用,并可能存在特异性靶点。

**【关键词】** 创伤性脑损伤 受体相互作用蛋白 1/3 神经元 谷氨酸

**【中图分类号】** R741 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)01-0045-06

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.01.012

**The effect and mechanism of RIP1/3 on neurons after traumatic brain injury** Wang Hongbin, Zheng Xinrui, Yuan Hua, et al. Department of Rehabilitation and Physiotherapy, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect and mechanism of RIP1/3 on neurons after traumatic brain injury (TBI). **Methods** The cultured cortical neurons were divided into four groups: siRIP group, Nec-1 pretreatment group, negative plasmid transfection group and control group. The TBI damage model was established by interfering with the expression of RIP1 and RIP3 through lentiviral transfection, respectively. The RIP3 damage model was established, and the survival rate of neurons was detected by flow cytometry. **Results** After mechanical injury, the survival rate of neurons in the siRIP group and in the Nec-1 pretreatment group was higher than that in the negative plasmid transfection group and in the control group. After glutamate stimulation, the survival rate of neurons in the Nec-1 pretreatment group was higher than that in the control group. siRIP3 group or siRIP1 group showed no significant difference in the survival rate of neurons when contrasted with the negative control transfection group. **Conclusion** RIP1 and RIP3 may play a role in neuronal death induced by TBI, RIP1 inhibitor Nec-1 may have a function in brain protection for TBI. RIP1 and RIP3 have no effect on neuron cell death induced by glutamate excitotoxicity. Nec-1 has a potential protective effect on glutamate injury, probably suggesting a specific target.

**【Key words】** Traumatic brain injury RIP1/3 Neuron Glutamate

创伤性脑损伤(Traumatic brain injury, TBI)是

常见的外科损伤,也是神经外科的重要临床疾病之一。全世界每年有近 1 亿人因 TBI 而死亡或者住院,在目前现存人口中大约有 60 亿人次曾经历过 TBI<sup>[1-3]</sup>,这给社会及民众都造成了巨大的经济和精神负担。颅脑外伤中脑组织会先后经历初次脑损伤和二次脑损伤。初次脑损伤往往时间迅速、难以防治,但相对的危害也较小,而继发性脑损伤其中包括初次创伤后机体所发生的一系列病理生理反应如细

基金项目: 国家科技部国际合作专项项目(编号 2013DFA32610);国家自然科学基金资助项目(81271450);陕西省国际科技合作与交流计划项目(2015KW-035)

作者单位: 710032 西安,第四军医大学西京医院康复理疗科 [王宏斌(共同第一作者,硕士在读) 袁华(通讯作者)], 神经外科 [郑新瑞(共同第一作者)]; 西安交通大学医学部研究生院康复与理疗专业 [何芳梅]

胞凋亡、坏死、兴奋性神经递质毒性释放、炎症反应、氧自由基生成、神经脱髓鞘、白质病变以及癫痫等,因其机制复杂,并且易产生级联效应,因而危害更大,可导致长期的运动和认知功能障碍。

受体相互作用蛋白(RIP)家族中的 RIP1 和 RIP3 可以诱导多种不同的细胞转归。已有研究证实其在细胞坏死与凋亡中发挥着重要作用,在炎症因子等因素的刺激下 RIP 激活自身丝苏氨酸激酶活性,从而介导细胞死亡。已有研究证实 RIP 蛋白在神经系统缺血和退行性变中有作用,但关于其对 TBI 的影响,因为机制复杂,而鲜有研究。因此,本研究的目的旨在初步探索 TBI 后 RIP1 及 RIP3 的表达变化以及 RIP 分子对于 TBI 后神经元的影响及作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及主要仪器

试验孕 2 周昆明小鼠(25~30 g)培养于第四军医大学动物中心;FBS、Neurobasal 培养液、10%胎牛血清、B27 添加剂、DMEM 购自美国 Gibco 公司;PBS 购自西安化学试剂厂;PLL、L-谷氨酰胺、多聚赖氨酸、胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司;NF200 多克隆抗体购自武汉博士得公司;LDH 检测试剂盒购自美国 BioVision 公司;5% CO<sub>2</sub> 孵箱购自美国 Forma 公司;高速低温离心机购自美国 Beckman 公司;光学解剖显微镜购自德国 Leica 公司;恒温孵箱购自上海市仪器厂;电热恒温水浴锅购自上海市医疗仪器厂;纯水机购自美国 Millipore 公司;精密电子天平购自瑞士 Mteeler 公司;医用离心机购自上海医疗仪器厂;透射电镜购自日本 Olympus 公司;倒置相差显微镜购自德国 Leica 公司;UV2300 分光光度计购自上海天美科学仪器厂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

于光学解剖显微镜下逐一剥离胎鼠的皮层结构。在 4℃ 预冷的新鲜 PBS 液中剥去软、硬脑膜和周围血管组织;剥离后用 D-Hanks 液漂洗皮层,时间为 5 min;用眼科剪剪碎漂洗过的组织,加入胰蛋白酶消化液(1.25 g/L, 2 mL),置于 CO<sub>2</sub> 浓度为 5% 的 38℃ 恒温孵箱中进行细胞消化,时间为 20 min;室温条件下用移液器吸去上层剩余的消化液,将消化后的脑组织转移至含有 DMEM 与 20% 胎牛血清的无菌离心管中,静置 10 min,静置后终止消化,用

DMEM 培养液再次漂洗细胞,时间 5 min;使用胶头滴管室温下在 DMEM 细胞培养液(含 20% 胎牛血清)中将消化后的脑组织碎片缓慢吹打成为细胞悬液,静置 5 min 后显微镜下观察滴于细胞悬液计数板并计数细胞;预先用多聚赖氨酸包被 60 mm 培养皿 1 d,之后用 PBS 液反复漂洗 3~4 遍,室温下晾干备用,以  $4 \times 10^5/\text{cm}^2$  将细胞接种于 35 mm 培养皿上,培养液中加入终浓度为 100 000 U/L 的青-链霉素和谷氨酰胺(0.6 mmol/L);将细胞置于恒温孵箱(设定同上)中进行培养,时间 24 h,次日弃去青-链霉素培养液,用的 DMEM 培养液 38℃ 下漂洗细胞 2 次,并更换为等量的含 B27(20 ml/L)的 Neurobasal 培养液;每日于显微镜下观察神经元生长状况并拍照记录;每隔 3 d 半量更换 Neurobasal 培养液。

#### 1.2.2 建立离体 TBI 损伤模型

神经元体外培养第 6 d 将培养液替换成新鲜的不含抗生素的完全培养液;24 h 后对于 35 mm 培养皿培养的神经元,将  $1 \times 10^9 \text{ TU/ml}$  siRIP1 或  $1 \times 10^9 \text{ TU/ml}$  siRIP3 分别加入到 10  $\mu\text{L}$  病毒稀释液中,轻轻混匀,然后在细胞培养液中缓慢加入转染试剂复合物并均匀混合,随后 38℃ 下 50 ml/L CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 72 h 以上。对照组仅替换培养液继续培养。神经元培养在第 11 d 将对照组和基因转染组再各分 2 组,一半提前 1 d 加入使用浓度为 50  $\mu\text{M}$  的 necrostatin-1,各组进行相应的试验干预处理,每组 6 个培养皿;神经元在转染空载体或 siRIP1/3 后 72 h 进行损伤;损伤方法采用 Faden 等的实验方法<sup>[4]</sup>,用 10  $\mu\text{L}$  微量移液器塑料枪头,快速地机械性划割,划伤速度与力度尽量保持一致,以保证各组神经元损伤程度和范围大体相同;采用本法造成的损伤模型具有较高的稳定性,能够近似地在神经元上模拟机械性脑损伤的各种病理生理过程<sup>[5]</sup>。由此离体神经元 TBI 损伤模型分为 4 个小组,分别是 siRIP 组(分为 RIP1 干扰质粒转染组及 RIP3 干扰质粒转染组)、Nec-1 预处理组、阴性质粒转染组和单纯损伤组。

#### 1.2.3 转染 siRIP1/3 后对神经元 TBI 损伤后细胞死亡率研究分析

神经元转染 siRIP1 与 siRIP 并进行损伤 24 h 后采用 Cell titer glo 试剂盒检测,此试剂盒是利用对 ATP 水平的检测来表明细胞存活率,具体方法如下:于 96 孔培养板中需要检测的孔内加入 20  $\mu\text{L}$

的 Cell titer glo 试剂,摇床上震荡 5 min,静置 10 min 后用多功能酶标仪检测化学发光。

#### 1.2.4 流式细胞术检测机械损伤神经元凋亡和坏死

用 6 孔板培养细胞,神经元培养成功后根据各组要求建模,继续培养,待细胞生长达到 50%~70%;将培养液移至离心管内,用 PBS 洗涤贴壁细胞 1 次,并加入适量胰酶消化细胞;室温孵育,可使贴壁细胞轻轻吹打下来时吸除细胞消化液;务必避免胰酶过度消化细胞;贴壁细胞 2 000 r/min 消化离心 5 min 并收集;用 PBS 洗涤细胞 2 次 2 000 r/min 离心 5 min 收集  $1\sim5\times10^5$  细胞;加入 100  $\mu\text{L}$  的  $1\times\text{Binding Buffer}$  以悬浮细胞;加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-PE 和 10  $\mu\text{L}$  7-AAD 染液混匀,室温、避光、反应 15 min;补加 380  $\mu\text{L}$  的  $1\times\text{Binding Buffer}$ ,混匀;在 1 h 内进行流式细胞仪的观察和检测。

#### 1.2.5 体外模型中干涉 RIP1/3 对谷氨酸诱导神经元死亡模型的影响

将体外培养的皮层神经元敲除 RIP1/3。建立谷氨酸诱导神经元损伤模型。神经元培养的第 11 d 将对照组和基因转染组再各分 2 组,各组进行相应的试验干预处理,每组 6 个培养皿;神经元在转染空载体或 siRIP1/3 后 72 h 进行谷氨酸损伤;加入谷氨酸 500  $\mu\text{mol/L}$  与 10  $\mu\text{mol/L}$  甘氨酸预处理 12 h 的混合液刺激神经元 15 min 后更换为正常培养液,过夜培养;转染 siRIP1/3 后对神经元谷氨酸损伤后细胞死亡率进行分析。

#### 1.2.6 统计学处理

TBI 损伤模型干预试验采用多样本均数间方差分析检验,每组数据用  $\bar{x}\pm s$  表示,数据间的两两比较用 SNK- $q$  检验。谷氨酸损伤模型干预实验均重复 4 次以上,统计学差异采用  $t$ -test,  $P<0.01$  表示有显著差异。

## 2 结果

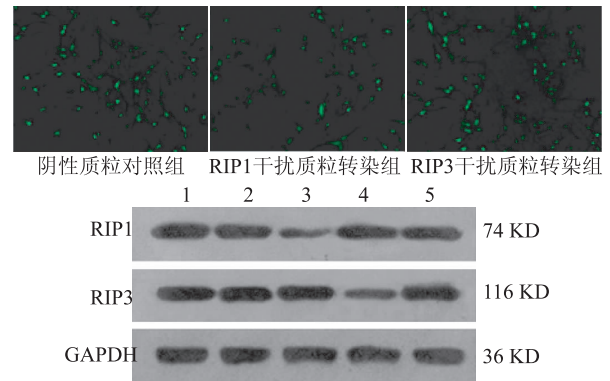
### 2.1 RIP1/3 干扰质粒转染神经元

通过使用干扰 RIP1 与 RIP3 慢病毒载体转染神经元发现,绿色荧光显示病毒干扰效率较高,WB 显示过慢病毒干扰后 RIP1 与 RIP3 表达明显下调(图 1)。

### 2.2 神经元存活情况

TBI 后阴性质粒转染组存活细胞明显减少( $36\pm3.8\%$ ),而干扰 RIP1 或 RIP3 都可使存活率增加(72%,68%)。同时,使用 Nec-1 也有明显效果( $P$

$<0.05$ )(图 2)。



注:1 为单纯损伤组;2 为阴性质粒转染组;3 为 RIP1 干扰质粒转染组;4 为 RIP3 干扰质粒转染组;5 为 Nec-1 处理组

图 1 RIP1/3 干扰质粒转染神经元分析

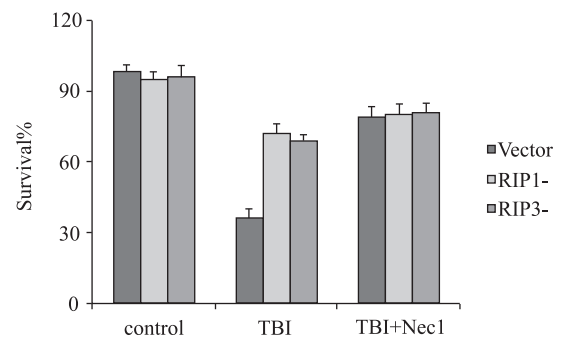


图 2 RIP1/3 干扰质粒转染神经元后细胞存活情况

### 2.3 流式细胞术检测

流式细胞术检测显示阴性质粒转染组与单纯损伤组无显著差异,干扰 RIP1 与 RIP3 后细胞凋亡与坏死与损伤组相比显著减少( $P<0.01$ ),而使用 Nec-1 组细胞存活率较干扰组更高( $P<0.05$ )(图 3)。

### 2.4 谷氨酸诱导神经元死亡模型的细胞生存率

在对外神经元以谷氨酸刺激后神经元生存率明显下降( $17.8\pm2\%$ ),同时可以看到干扰 RIP1 或干扰 RIP3 对于神经元谷氨酸损伤细胞死亡率都无明显影响,而同时添加 Nec-1 预处理组死亡率明显下降( $P<0.01$ )。使用炎症因子 TNF- $\alpha$  诱导离体神经元凋亡模型中干扰 RIP1 与干扰 RIP3 组生存率都明显上升( $P<0.01$ ),与 Nec-1 保护效果无显著差异(图 4~5)。

## 3 讨论

TBI 是神经外科的常见病、多发病,约占全身各处损伤的 10%~15%。临床上拥有极高的致残、致

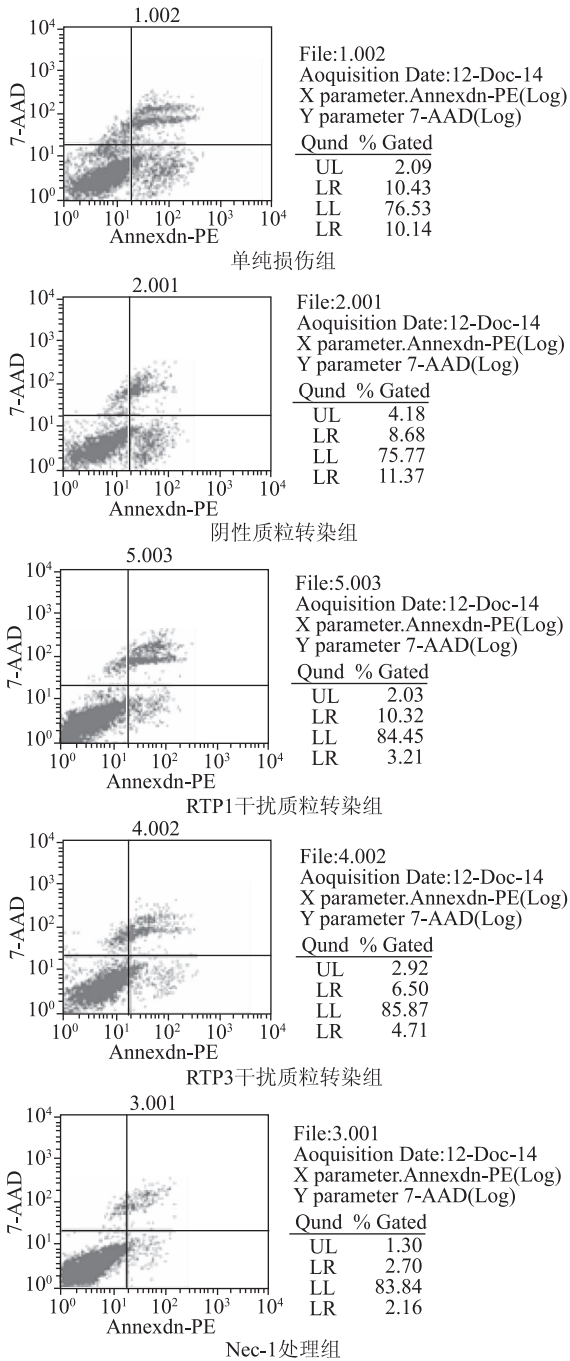


图3 神经元损伤后流式细胞术检测

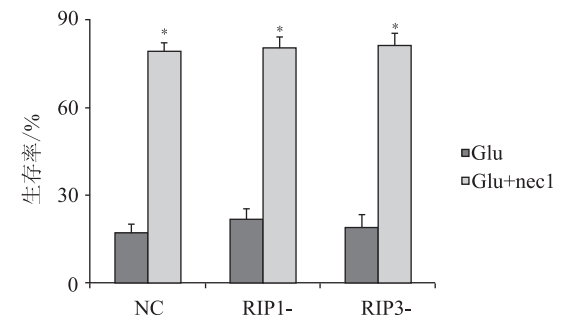


图4 谷氨酸模型中RIP1/3干扰质粒转染神经元存活情况

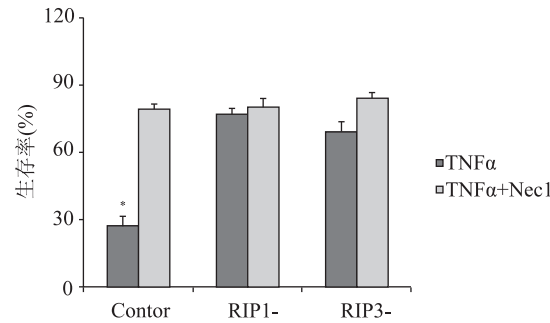


图5 炎症因子TNF-α诱导凋亡模型中RIP1/3干扰质粒转染神经元存活情况

死亡率。尤其是在战创伤中颅脑损伤所致阵亡比例居首<sup>[6]</sup>。在美国每年因TBI而致死、致残人数高达50,000和90,000人。在欧盟TBI的发生率高达100~800例/10万人,颅脑损伤每年入院人数超过100万例<sup>[7-9]</sup>。我国在上世纪80年代初TBI病死率高达10%左右<sup>[10-11]</sup>。目前随着社会的发展,交通和生产事故不断增加,TBI在我国的发生率也呈不断上升的趋势。所以,TBI后神经细胞的损伤机制值得我们深入研究。

TBI后脑组织主要的病理变化就是神经元和胶质细胞的坏死和凋亡。Rink等人于1995年发现,在大鼠颅脑外伤模型中大脑皮质、白质区,海马组织、齿状回等结构中出现了大量包括神经元等的凋亡现象<sup>[12]</sup>。Conti等人发现在TBI后1和7d分别存在2个不同的凋亡高峰,并且星形胶质细胞(astrocyte)和少突胶质细胞(oligodendroglia)等神经胶质细胞也参与到了神经元的凋亡活动中<sup>[13]</sup>。Williams等的研究表明,在TBI 1年后大脑白质区内仍能明显地发现神经细胞凋亡<sup>[14]</sup>。

创伤后短时间内造成的神经元大量死亡多为直接损伤因素所导致的坏死,随后细胞凋亡与坏死则同时存在于创伤区的组织中。TBI后大脑的血液循环受到影响,导致脑组织发生缺血缺氧反应,神经元与胶质细胞的生物膜功能出现障碍。这些病理反应反过来会使血管和细胞毒性的脑水肿发生,进一步加重了脑损伤。缺血与缺氧环境下亦可造成神经元的能量代谢失衡与各类兴奋性氨基酸的过量释放。神经元内Ca<sup>2+</sup>失衡,脂质、过氧化物和氧化自由基等也会发生变化。以上神经细胞微环境的改变促使调控细胞凋亡的基因如bcl-2和P53等表达上调或下调,激活Caspase及RIP蛋白家族等<sup>[15]</sup>,最终启动了细胞的自杀程序。



2005 年 Degterevs 关于缺血性脑损伤模型的细胞死亡机制探讨中发现了 necrostatin-1 (Nec-1)。Nec-1 是一种生物小分子,它可以抑制 Fas/TNFR 1 的一种下游通路,即受体相互作用蛋白 1 (receptor interacting protein 1, RIP 1) 所介导的细胞坏死,但却不能抑制 Fas/TNFR 1 依赖性的细胞凋亡。说明存在某种也可以受相应的分子调控的细胞坏死。由此一条可介导细胞程序性坏死的调控分子被发现了,而它被证明位于 DD 下游的信号通路<sup>[16]</sup>。Nec-1 则被认为是这种程序性坏死的特异性阻断剂,广泛使用在相关实验中。Nec-1 作用于 RIP 1 与 RIP 3 的丝/苏氨酸激酶活性位点,抑制了 RIP 1 与 RIP 3 的相互磷酸化。进一步阻碍了 RIP1-RIP3-TNFR 复合体 II 的形成,从而抑制细胞坏死<sup>[17]</sup>。在谷氨酸诱导的海马神经元坏死<sup>[18]</sup>、小鼠大脑皮层神经元的缺血-再损伤灌注<sup>[19]</sup>、视网膜缺血损伤<sup>[20]</sup>以及阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease)、帕金森氏综合征 (Parkinson's disease) 和亨廷顿氏舞蹈病 (Huntington's disease) 等多种神经疾病中都证实存在这种 RIP1-RIP3 蛋白所影响的程序性坏死<sup>[21-23]</sup>。

本实验研究显示,不论是干扰 RIP1 或 RIP3 都对 TBI 后神经元具有明显的保护作用,其保护机制尚不清楚,可能通过多种途径影响神经细胞损伤后凋亡、坏死、自噬与存活;同时 RIP1 的抑制剂 Nec-1 也具有神经保护作用,进一步说明受体相互作用蛋白在 TBI 后调节神经元死亡具有重要作用。Nec-1 对于神经元的保护作用比单纯干扰 RIP 蛋白更强,提示 Nec-1 可能还存在着其他神经保护作用。

谷氨酸是大脑皮层内最具代表性的兴奋性神经递质;它与神经元的发育、死亡、信息传递和突触的可塑性以及神经系统疾病密切相关。TBI 后谷氨酸大量释放产生神经毒性,在神经系统损伤中发挥着独特作用,是其他系统损伤所少有的。一直以来 Necrostatin-1 都被认为是 RIP1/3 蛋白磷酸化的特异性抑制剂<sup>[24]</sup>。其作为特异性的程序性坏死抑制剂而被广泛应用。Xu 等发现 nec-1 在 HT-22 海马神经元系中可以抑制谷氨酸引起神经兴奋毒性<sup>[19]</sup>。也有实验证实 Nec-1 对于脑缺血模型具有保护作用。但是通过上述实验可以看出 RIP1/3 蛋白对于谷氨酸诱导的神经细胞死亡不具有保护作用,因此 nec-1 对于谷氨酸神经兴奋毒性的保护靶点可能不是 RIP1/3。这与之前报道的推断存在矛盾。同时干涉 RIP1/3 并未降低谷氨酸细胞毒性,也说明

RIP1/3 可能不是神经兴奋性毒性的下游作用分子 (图 6)。王玉田院士研究小组发现谷氨酸对 GABA 受体有增强变构作用,研究发现神经元损伤后释放大谷氨酸达到一定阈值时谷氨酸会与抑制性 GABA 受体结合,产生神经抑制效果,有益于保护神经元生存<sup>[25]</sup>。Nec-1 对谷氨酸损伤性神经元模型的保护作用,是否是其促进谷氨酸与 GABA 受体结合导致,有待进一步系统研究。

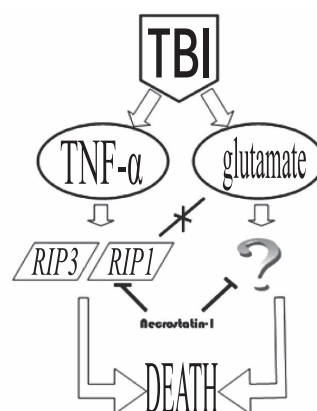


图 6 Nec-1 对 TBI 后不同细胞凋亡通路的影响模型

TBI 后脑组织尤其是神经元的反应十分复杂,有研究认为最初的创伤可能导致损伤级联效应,引发多种病理生理过程。本研究证实 RIP1 与 RIP3 所诱导的细胞凋亡或程序性坏死也参与其中,并且这种死亡方式与谷氨酸的兴奋性神经毒性无关,而 RIP1 的抑制剂 necrostatin-1 对于谷氨酸损伤的保护作用提示其不仅仅是 RIP 蛋白的特异性抑制剂,其在 TBI 中可能存在其他的作用靶点。以上研究结果为进一步探究 TBI 后细胞分子生物学机制提供了一些参考。在这一方面的后续研究将对于临床开发创伤性颅脑损伤防治药物具有重要意义。

## 参 考 文 献

- [1] Moretti L, Cristofori I, Weaver SM, et al. Cognitive decline in older adults with a history of traumatic brain injury[J]. The Lancet Neurology, 2012, 11(12): 1103-1112.
- [2] Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview[J]. J Head Trauma Rehabil, 2006, 21(5): 375-378.
- [3] Graham DI, McIntosh TK, Maxwell WL, et al. Recent advances in neurotrauma[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2000, 59(8): 641-651.
- [4] Ai FD, O'leary DM, fan L, Bao W, mullins PG, movsesyan VA [J]. Selective blockade of the mGluR1 trauma. Exp Neurol, 2001, 167(2): 435-444.

(上接第 49 页)

- [5] Huang WD, Fei Z, Zhang X. Traumatic injury induced homer-1a gene expression in cultured cortical neurons of rat[J]. *Neurosci Lett*, 2005, 389(1): 46-50.
- [6] Rosonke S, Legome E. Head trauma[J]. *J emerg Med*, 2006, 31(4): 421-425.
- [7] 费舟. 现代颅脑损伤学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007.
- [8] Federal Interagency Head Injury Task Force Report, Washington[Z], 1989.
- [9] Langlois JA, Rutland-Brown W, Tomas K. Traumatic brain injury in the United States: emergency department visits hospitalization and deaths[Z], 2004.
- [10] Thurman DJ, Alverson C, Dunn KA, et al. Traumatic brain injury in the United States: A public health perspective[J]. *J Head Trauma Rehabil*, 1999, 14(6): 602-615.
- [11] Zhao YD, Wang W. Neurosurgical trauma in People's Republic of China[J]. *World J Surg*, 2001, 25(9): 1202-1204.
- [12] Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, et al. Evidence of apoptosis cell death after experience traumatic brain injury in rat[J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(6): 1575.
- [13] Conti AC, Raghupathi R, Trojanowski JQ, et al. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(15): 5663-5672.
- [14] Williams S, Raghupathi R, Mackinnon MA, et al. In situ DNA fragmentation occurs in white matter up to 12 months after head injury in man[J]. *Acta Neuropathol*, 2001, 102(6): 581-590.
- [15] 雪亮, 杨树源. 人脑创伤后神经元凋亡及调节机制的观察[J]. *中华创伤杂志*, 2003, 19(3): 160-163.
- [16] Degterev A, Huang ZH, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury[J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(2): 112-119.
- [17] Han WD, Xie JS, Li L, et al. Necrostatin-1 reverts shikonin-induced necroptosis to apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2009, 14(5): 674-686.
- [18] Xu X, Chua CC, Kong J, et al. Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells[J]. *J Neurochem*, 2007, 103(5): 2004-2014.
- [19] Xu X, Chua KW, Chua CC, et al. Synergistic protective effects of humanin and necrostatin-1 on hypoxia and ischemia/reperfusion injury[J]. *Brain Res*, 2010, 1355(2): 189-194.
- [20] Rosenbaum DM, Degterev A, David J, et al. Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell death, contributes to neuronal damage in a retinal ischemia-reperfusion injury model[J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(7): 1569-1576.
- [21] Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. *Nature*, 2006, 443(7113): 787-795.
- [22] Li Y, Yang X, Ma C, et al. Necroptosis contributes to the NMDA-induced excitotoxicity in rat's cultured cortical neurons[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 447(2/3): 120-123.
- [23] Zhu S, Zhang Y, Bai G, et al. Necrostatin-1 ameliorates symptoms in R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease[J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2(1): e115.
- [24] Pascual MJ, Reeds PJ. In vivo glucose contribution to glutamate synthesis is maintained while its contribution to acetyl CoA is lowered in adult mice fed a restricted amount of carbohydrate J[J]. *Nutr*, 1998, 128(128): 733-739.
- [25] Liu J, Wu DC, Wang YT. Allosteric potentiation of glycine receptor chloride currents by glutamate[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(10): 1225-1232.

(2016-07-17 收稿)