

酮体 β -羟基丁酸减轻炎症状态下血管内皮细胞 线粒体氧化应激的机制研究*

戴力维^{1,2}, 邓艳², 李涛^{1,2 Δ}

1. 西南医科大学附属医院麻醉科(泸州 646000); 2. 四川大学华西医院线粒体与代谢医学研究室麻醉手术中心(成都 610041)

【摘要】目的 探讨酮体 β -羟基丁酸(β -OHB)对炎症状态下人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)线粒体氧化应激的调控作用及机制。方法 用脂多糖(LPS)和三磷酸腺苷(ATP)诱导巨噬细胞释放促炎因子,收集培养基上清液作为条件培养基(macrophage-conditioned medium, MCM)培养HUVECs。研究共设置7组HUVECs细胞。①对照组:正常培养的HUVECs;②MCM组:MCM培养的HUVECs;③~⑦组为加入不同试剂的HUVECs共培养组,包括:③MCM+ β -OHB组,④MCM+N-乙酰半胱氨酸(NAC)组,⑤MCM+ β -OHB+NAC组,⑥MCM+ β -OHB+组蛋白去乙酰化酶激动剂ITSA1组,⑦MCM+ β -OHB+组蛋白去乙酰化酶抑制剂Entinostat组。MitoSOX免疫荧光染色分析线粒体超氧化物水平,实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测抗氧化基因mRNA表达,并以Seahorse线粒体能量分析仪测定线粒体有氧呼吸能力。结果 与对照组相比,MCM培养的HUVECs细胞线粒体超氧化物生成明显增多,而 β -OHB处理可明显抑制线粒体超氧化物生成,并伴随抗氧化基因mRNA表达水平上升,以及线粒体基础耗氧率和呼吸储备能力的显著提高。NAC处理并未进一步提高 β -OHB对线粒体功能的保护作用。并且,ITSA1处理可完全取消 β -OHB的抗氧化和线粒体保护作用,而Entinostat处理后上述作用仍然维持。结论 酮体 β -OHB通过抑制组蛋白去乙酰化酶活性,激活抗氧化通路,减轻血管内皮细胞的线粒体氧化应激。

【关键词】 炎症 氧化应激 线粒体功能 内皮细胞

Effect of Ketone Body β -Hydroxybutyrate to Attenuate Inflammation-Induced Mitochondrial Oxidative Stress in Vascular Endothelial Cells Ji Li-wei^{1,2}, DENG Yan², LI Tao^{1,2 Δ} . 1. Department of Anesthesiology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Laboratory of Mitochondria and Metabolism, Anesthesia and Operation Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Δ Corresponding author, E-mail: scutaoli1981@scu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the regulatory function and mechanism of β -hydroxybutyrate (β -OHB), a ketone body, on the mitochondrial oxidative stress of inflammatory human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** Lipopolysaccharide (LPS) and adenosine triphosphate (ATP) were used to induce macrophages to release proinflammatory factors, and the culture supernatant was collected as a macrophage-conditioned medium (MCM) to culture HUVECs. A total of 7 groups of cells were used in the study: ①control group, or normal cultured HUVECs; ②MCM group, or the MCM-cultured HUVECs; groups ③ to ⑦ were all HUVECs co-cultured with different reagents, including ③MCM+ β -OHB group, ④MCM+N-acetylcysteine (NAC) group, ⑤MCM+ β -OHB+NAC group, ⑥MCM+ β -OHB+histone deacetylase agonist ITSA1 group, and ⑦MCM+ β -OHB+histone deacetylase inhibitor Entinostat group. MitoSOX immunofluorescence staining was conducted to analyze the mitochondrial superoxide levels, real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed to examine the mRNA expression of antioxidant genes, and Seahorse mitochondrial energy analyzer was used to measure mitochondrial aerobic respiration capacity. **Results** Compared with the control group, mitochondrial superoxide production was significantly increased in the MCM cultured HUVECs cells, while β -OHB treatment significantly inhibited mitochondrial superoxide production, which was accompanied by an increase in the mRNA expression of antioxidant genes, and significant increase in the basal mitochondrial oxygen consumption rate and respiratory reserve capacity. NAC treatment did not further enhance the protective effect of β -OHB on mitochondrial functions. In addition, ITSA1 treatment could completely offset the antioxidant and mitochondrial protective effects of β -OHB, and these stated effects were still maintained after Entinostat treatment. **Conclusion** The ketone body β -OHB attenuates the mitochondrial oxidative stress of vascular endothelial cells through activating the antioxidant pathway and inhibiting histone deacetylase activity.

【Key words】 Inflammation Oxidative stress Mitochondrial function Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

* 国家自然科学基金面上项目(No. 81770815, No. 81970715)和四川省科技厅重点研发项目(No. 2019YFS0222, No. 2019YFS0252)资助

Δ 通信作者, E-mail: scutaoli1981@scu.edu.cn

氧化应激是活性氧(自由基)的产生与抗氧化防御之间的平衡失调,进而导致细胞功能障碍和组织损伤^[1-3]。多种途径参与细胞活性氧生成,包括线粒体呼吸电子传递链(ETC)、炎症信号传导和内质网应激^[2,4]。细胞内线粒体不仅是各种营养物质氧化供能的主要部位,也是活性氧产生最主要的场所,包括氧自由基、过氧化物和超氧化物等^[4-5]。活性氧的爆发会破坏细胞组分(如蛋白质、脂质和DNA),已经被证明与帕金森病、阿尔茨海默病、癌症等发病机理有关^[3,6]。内皮细胞作为心血管系统的固有组分,可控制血管通透性、调节血管张力、保障物质运输,在面对各种损伤刺激时也可作为屏障起到保护作用^[7]。内皮细胞过度激活、氧化应激增强是许多炎症性疾病的致病机理^[7-9]。因此,改善炎症导致的氧化应激,维持线粒体活性氧水平的正常,保护血管内皮细胞功能显得尤为重要。研究发现,酮体 β -羟基丁酸(β -OHB)可通过抑制炎症小体激活,发挥抗氧化应激的作用^[10]。但是对于炎症发生之后, β -OHB对细胞氧化应激是否有改善作用尚不清楚。本研究采用人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)作为研究对象,以富含炎症因子的巨噬细胞条件培养基(macrophage-conditioned medium, MCM)共培养,构建炎症内皮细胞模型^[10-11],进而探讨 β -OHB对炎症导致的内皮细胞线粒体氧化应激的影响及相关机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

Raw264.7小鼠巨噬细胞株(美国ATCC公司)以含10%胎牛血清(FBS,美国Biological Industries公司)和1%青霉素-链霉素(美国HyClone公司)的高糖DMEM培养基(美国HyClone公司)培养。HUVECs细胞株(美国ATCC公司)以含10%FBS和1%青霉素-链霉素的低糖DMEM培养基(美国HyClone公司)培养。上述细胞均于37℃、体积分数5%CO₂细胞培养箱中培养,每2~3 d换液,用0.25%胰酶消化、传至第二代收集细胞。

1.2 MCM的制备

Raw264.7细胞培养至80%密度,换液,添加200 ng/mL脂多糖(LPS,美国Sigma公司)继续培养6 h,再添加2 mmol/L三磷酸腺苷(ATP,美国Sigma公司)作用20 min。收集培养基,于2 000 r/min、4℃离心10 min,过滤后即MCM,留存备用。后续均采用体积分数10% MCM进行实验。

1.3 细胞实验分组

实验分组为①对照组:正常培养的HUVECs;

②MCM组:MCM培养的HUVECs;③~⑦组均为加入不同试剂的HUVECs共培养组,包括:③MCM+ β -OHB组,④MCM+N-乙酰半胱氨酸(NAC)组,⑤MCM+ β -OHB+NAC组,⑥MCM+ β -OHB+组蛋白去乙酰化酶(HDAC)激动剂ITSA1组,⑦MCM+ β -OHB+HDAC抑制剂Entinostat组。其中MCM均为体积分数10%, β -OHB(美国Sigma公司)终浓度均为5 mmol/L,NAC(美国Sigma公司)终浓度均为5 mmol/L,ITSA1(美国MCE公司)终浓度均为10 μ mol/L,Entinostat(美国Selleck公司)终浓度均为250 nmol/L。条件培养基及各组药物作用时间均为24 h。

1.4 实验方法

1.4.1 线粒体活性氧检测 细胞线粒体氧化应激的强弱可以通过线粒体超氧化物的生成量来反映。本研究首先采用MitoSOX免疫荧光染色,线粒体内超氧化物产生红色荧光。将对照、MCM、MCM+ β -OHB、MCM+ β -OHB+ITSA1和MCM+ β -OHB+Entinostat这5组的细胞分别接种于6孔板,每孔加入1 mL Hoechst33258(中国碧云天生物技术公司)覆盖细胞,37℃避光孵育20 min,PBS洗涤细胞后加入0.5%二甲亚砜(DMSO,美国Sigma公司)制备的5 μ mol/L MitoSOXTM Red(美国Invitrogen公司)覆盖细胞,37℃避光孵育10 min,PBS洗涤细胞后,在荧光显微镜(型号IX83,日本Olympus公司)激发波长346 nm观察细胞核,激发波长510 nm观察线粒体超氧化物生成情况。同时,各组细胞接种于96孔板,加入5 μ mol/L MitoSOXTM Red,37℃避光孵育30 min,酶标仪(美国BioTek公司,21261610)于580 nm定量测定荧光强度值,直接反映活性氧水平。

1.4.2 细胞线粒体呼吸功能检测 使用Seahorse XF24能量分析仪(美国Agilent公司)对全部7组细胞进行线粒体呼吸功能检测。细胞板每孔接种1 \times 10⁴细胞,培养过夜,使其贴壁。提前1天在24孔探针板(美国Agilent公司)中加入1 mL/孔水化液(美国Agilent公司),37℃不含CO₂的恒温箱过夜。用Seahorse基础培养基(美国Agilent公司)配置测试培养基(含2 mmol/L谷氨酰胺,1 mmol/L丙酮酸盐,10 mmol/L葡萄糖),混匀加热至37℃,用5 mmol/L NaOH调pH为7.4。测试前30 min,将细胞培养基更换为测试培养基,再次在37℃无CO₂恒温箱孵育30 min;探针板ABC孔中分别加入A(5 μ mol/L oligomycin A);B[3 μ mol/L trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenylhydrazine (FCCP)];C(1 μ mol/L rotenone和1 μ mol/L antimycin A),A、B、C孔的试剂均来自于美国Sigma公司。上机校准探针后放入细胞板进行测试,得到

线粒体单位时间耗氧量(oxygen consumption rate, OCR)反映线粒体呼吸功能,结果以每孔细胞数做均一化处理,单位为 $(\text{pmol O}_2 \cdot \text{min})^{-1}/10^4 \text{ cells}$ 。加入oligomycin A前的OCR值即为线粒体基础耗氧率,加入FCCP激发后的最大OCR值减去基础耗氧率即为呼吸储备能力。

1.4.3 实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 检测 使用Trizol(南京诺唯赞生物科技有限公司)提取对照、MCM、MCM+ β -OHB、MCM+ β -OHB+ITS A1和MCM+ β -OHB+Entinostat这5组细胞的总RNA。按试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)说明进行逆转录:42 °C反转录2 min, 50 °C 15 min灭活反转录酶;85 °C保持2 min。按下列程序设置RT-qPCR参数:95 °C变性3 min;三步反应:95 °C 12 s, 6 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40个循环;采集荧光信号。各目的基因及内参GAPDH基因引物见表1。引物合成自北京擎科生物技术有限公司。目的基因表达以GAPDH为内参照,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因mRNA的相对表达量。

1.5 统计学方法

所有数据都以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方

表 1 RT-qPCR引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequence

Gene	Primer sequence (5'-3')	Product length/bp
FoxO3a	F: AGGACCTGCTCACTTCGGACTC	210
	R: CAAGGCTGCTGGACTCACTCAAG	
Mt2	F: ATGGATCCCAACTGCTCCTG	124
	R: CGACGCCCTTTGCAGAT	
GAPDH	F: GAAGGTGAAGTCCGGAGTC	123
	R: GAAGATGGTGATGGGATTTTC	

FoxO3a: Forkhead box O3; Mt2: Metallothionein 2A.

差检验,两组间比较采用非配对双尾t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 酮体 β -OHB减少MCM诱导的HUVECs线粒体超氧化物生成,改善线粒体呼吸功能

MitoSOX免疫荧光染色结果显示,与对照组相比,MCM培养的HUVECs细胞线粒体红色荧光增强,给予 β -OHB后减弱(图1A)。通过酶标仪定量分析荧光强度后发现,MCM培养的HUVECs细胞线粒体MitoSOX荧光信号较对照组增强($P < 0.001$),给予 β -OHB后线粒体

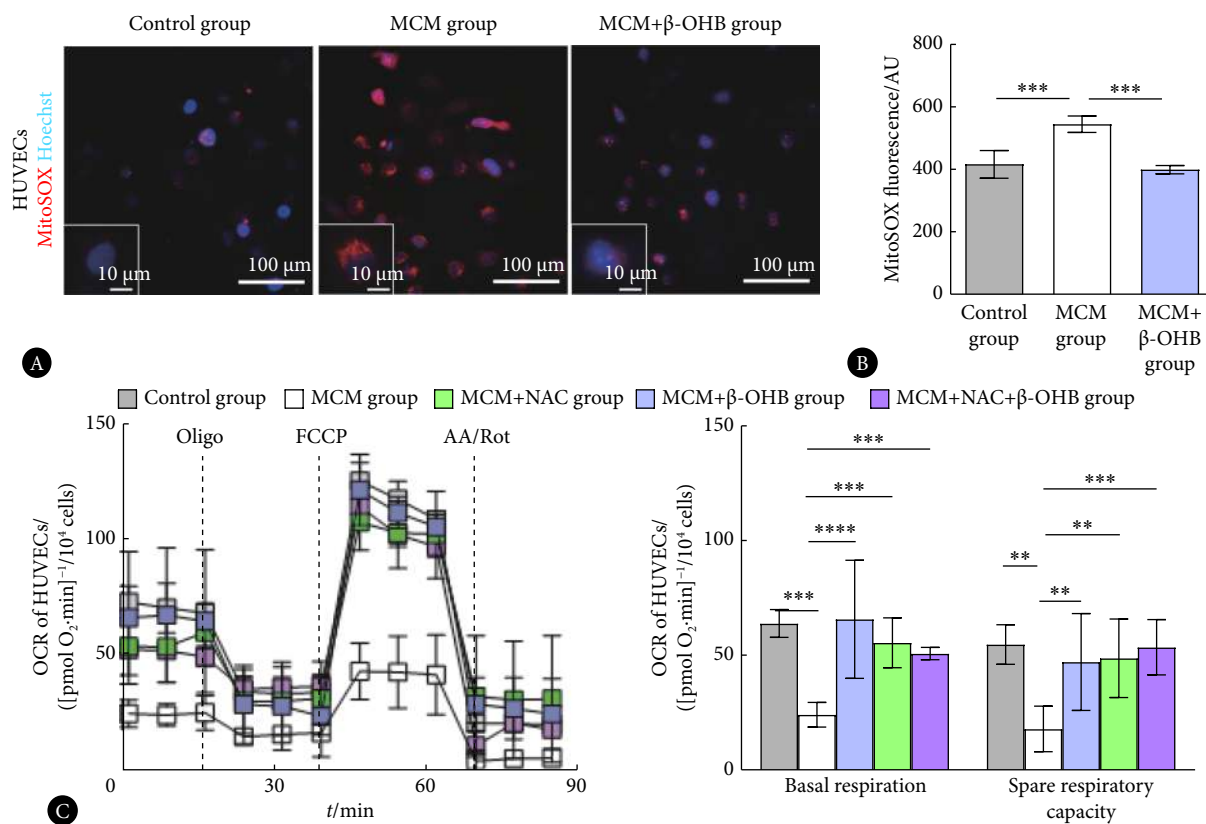


图 1 各组HUVECs细胞线粒体超氧化物检测和细胞呼吸功能测定

Fig 1 Examination of mitochondrial superoxide and cellular respiratory function of HUVECs in each group

A: Representative fluorescent images of the HUVECs stained with MitoSOX red after the indicated treatments; B: The fluorescent intensity of the MitoSOX-stained HUVECs after the indicated treatments ($n=4$ per group); C: HUVECs cell respiration oxygen consumption curve, basic respiration and respiration spare capacity ($n=3$ per group). Oligo: Oligomycin A; FCCP: Trifluoromethoxy carbonylcyanide phenylhydrazone; AA/Rot: Antimycin A and rotenone. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

MitoSOX荧光信号减弱($P<0.001$),表明 β -OHB可显著抑制MCM导致的HUVECs细胞线粒体超氧化物生成(图1B)。进一步,Seahorse线粒体功能分析结果显示,MCM组细胞基础呼吸和呼吸储备能力均低于对照组($P<0.001$ 和 $P<0.01$;图1C), β -OHB处理后,MCM培养的细胞基础呼吸和呼吸储备能力均显著提高($P<0.0001$ 和 $P<0.01$;图1C);NAC对线粒体功能的改善作用与 β -OHB基本一致,且两者联用未见协同作用(图1C)。

2.2 酮体 β -OHB通过抑制HDAC上调HUVECs细胞抗氧化基因*FoxO3a*和*Mt2* mRNA表达

RT-qPCR检测HUVECs细胞*FoxO3a*和*Mt2*的表达水平,发现与对照组相比,MCM组*Mt2* mRNA表达水平没有改变,但是*FoxO3a* mRNA表达下降($P<0.05$)。 β -OHB处理后,MCM培养的HUVECs细胞的*FoxO3a*和*Mt2* mRNA表达均显著上调(与MCM组相比, $P<0.0001$ 和 $P<0.001$)(图2)。此外,ITSA1处理可完全取消 β -OHB对*FoxO3a*和*Mt2* mRNA表达的上调作用(与MCM+ β -OHB组相比, $P<0.0001$),而Entinostat处理后并不取消 β -

OHB对上述基因的调控作用(与MCM+ β -OHB+ITSA1组相比, $P<0.001$ 或 $P<0.01$,而与MCM+ β -OHB组相比,差异无统计学意义)。

2.3 酮体 β -OHB通过抑制HDAC改善HUVECs的线粒体氧化应激和呼吸功能

MitoSOX染色结果显示, β -OHB处理可显著减少HUVECs的线粒体MitoSOX红色荧光,该结果与前述发现一致。更重要的是,ITSA1处理可取消该抑制作用(与MCM+ β -OHB组相比, $P<0.001$),而Entinostat处理后该抑制作用仍然维持(与MCM+ β -OHB+ITSA1组相比, $P<0.001$,而与MCM+ β -OHB组相比,差异无统计学意义)(图3A和图3B)。Seahorse线粒体功能检测结果显示, β -OHB可提高MCM暴露HUVECs的线粒体基础呼吸和呼吸储备能力,MCM+ β -OHB组与MCM组相比,差异有统计学意义($P<0.001$)。与MCM+ β -OHB组相比,MCM+ β -OHB+ITSA1组细胞线粒体基础呼吸和呼吸储备能力减弱($P<0.001$),而MCM+ β -OHB+Entinostat组细胞线粒体基础呼吸和呼吸储备能力仍维持在较高水平,与MCM+ β -OHB组相比差异无统计学意义(图3C)。

3 讨论

酮体是生命活动的重要能量来源,包括 β -OHB、乙酰乙酸酯和丙酮,其中 β -OHB约占循环中酮体总量的70%^[12]。酮体可以在营养缺乏和低碳水化合物饮食的过程中作为大脑、心脏、骨骼肌等肝外组织的替代能源。并且,酮体还可以作为信号分子,在调节蛋白质翻译后修饰以及炎症和氧化应激过程中发挥重要作用^[12-13]。生理条件下,人血液中 β -OHB浓度维持在0.02~0.1 mmol/L,禁食48~72 h β -OHB浓度提升至2~3 mmol/L,更长时间的禁食或生酮喂养会进一步增加血中 β -OHB浓度至5~8 mmol/L,且该范围的高浓度 β -OHB可发挥显著的细胞保护效应^[10,14-16]。文献报道, β -OHB可以呈剂量依赖性地抑制ATP和LPS诱导的小鼠骨髓巨噬细胞(BMDM)炎症小体的激活,减少炎症因子的释放^[10]。此外, β -OHB减少炎症小体组装的作用也在心衰动物模型上得到了证实^[16]。也有文献发现在人胚胎肾细胞(HEK293), β -OHB可以通过激活抗氧化通路,减轻细胞氧化应激损伤^[15]。事实上,全身炎症状态时,血管内皮细胞既是炎症过程的参与者,也是炎症过程的调节者^[7,17]。炎症刺激导致线粒体活性氧生成过多,与内皮细胞功能障碍密切相关,参与了高血压、糖尿病和动脉粥样硬化等几种心血管疾病的发生发展^[9,18-19]。因此探讨炎症反应后, β -OHB对内皮细胞氧化应激的保护作用和机制研究显得尤为重要。

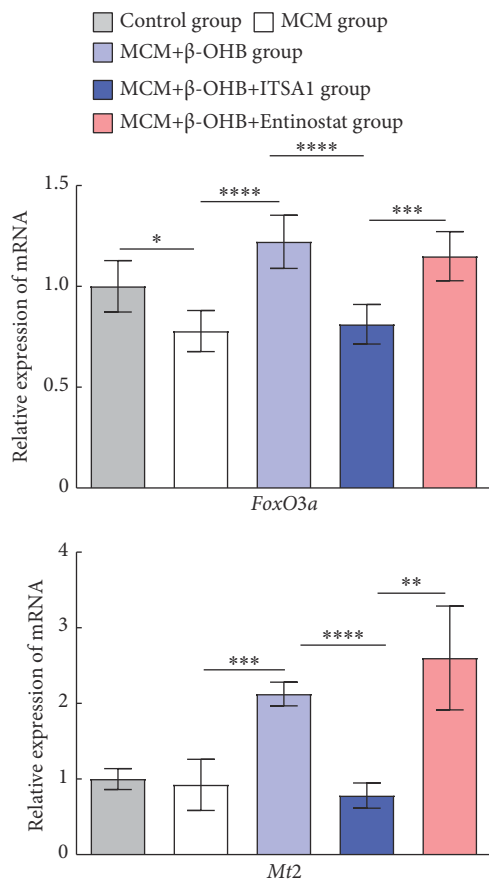


图2 各组抗氧化基因*FoxO3a*和*Mt2* mRNA表达水平

Fig 2 The mRNA expression levels of antioxidant genes *FoxO3a* and *Mt2* in each group

Control group and MCM group, $n=7$; other groups, $n=8$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

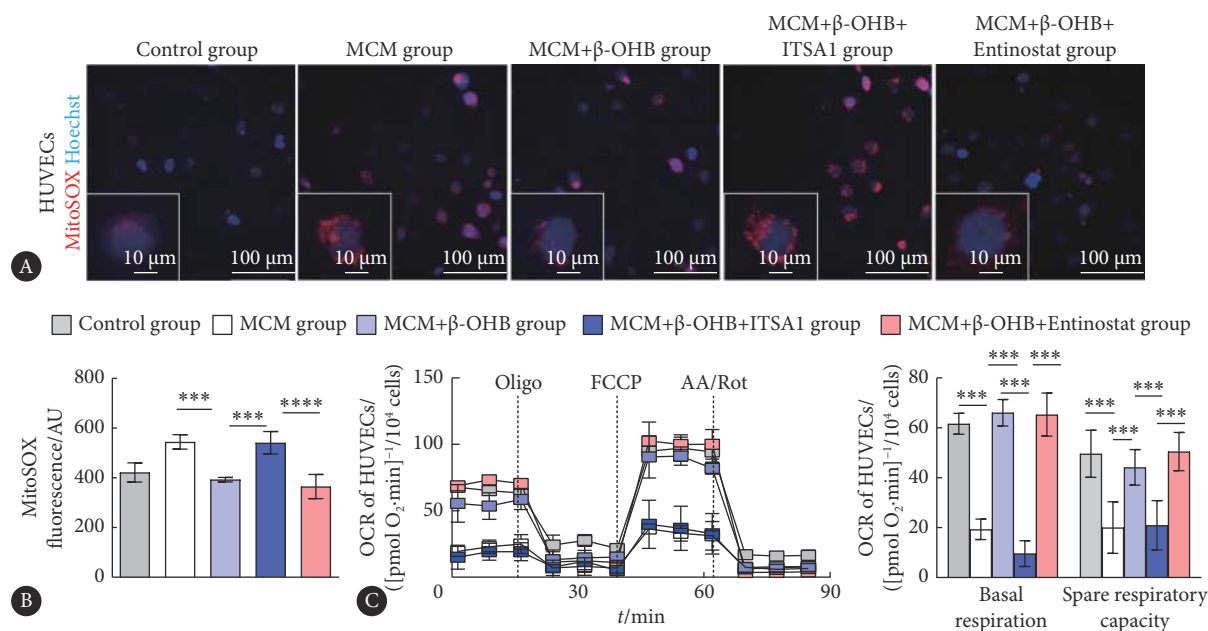


图3 各组HUVECs细胞线粒体超氧化物和细胞呼吸功能测定结果

Fig 3 Results of mitochondrial superoxide examination and cellular respiratory function measurements of HUVECs in each group

A: Representative fluorescent images of the HUVECs stained with MitoSOX red after indicated treatments; B: The fluorescent intensity of the MitoSOX-stained HUVECs after indicated treatments; C: HUVECs cell respiration oxygen consumption curve, basic respiration and respiration spare capacity. Oligo: Oligomycin A; FCCP: Trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenylhydrazine; AA/Rot: Antimycin A and rotenone. Control group, MCM+β-OHB+ITSA1 group, $n=4$; other groups, $n=3$. *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

本研究发现, MCM暴露后的HUVECs细胞, 线粒体超氧化物生成明显增多, 证明炎症因子的确可诱导内皮细胞线粒体氧化应激。文献显示, 细胞内线粒体可通过三羧酸循环和氧化磷酸化消耗各种底物生成ATP供能, 同时也是活性氧生成的最主要部位^[4, 20]。活性氧爆发会诱发氧化应激, 造成线粒体氧化供能障碍, 最终损害细胞正常功能^[5]。低水平的活性氧有助于血管扩张、降低血压和血管重塑, 然而活性氧生成过多使得细胞因子和趋化因子聚集导致血管收缩、内皮功能障碍、高血压和促炎状态, 是动脉粥样硬化和动脉瘤的病理机制之一^[20]。因此减轻氧化应激是许多疾病治疗的有效途径^[3, 20]。本研究中, β-OHB处理可显著减少MCM诱导的HUVECs细胞线粒体超氧化物生成, 并改善线粒体呼吸功能。为明确上述线粒体保护作用是否是由于减少了氧化应激, 我们加入抗氧化剂NAC处理MCM暴露的HUVECs细胞, 发现NAC对线粒体功能的改善作用与β-OHB基本一致, 且两者联用未见协同作用, 提示β-OHB可能是通过抑制氧化应激发挥线粒体保护作用。

生理条件下, 氧化应激与抗氧化机制处于动态平衡^[5, 21]。活性氧生成过多时, 抗氧化通路被激活以清除增多的活性氧, 使细胞内活性氧处于正常水平, 以维持细胞正常功能^[4, 18, 21]。实际上, 抗氧化防御系统在细胞内无处不在,

*FoxO3a*和*Mt2*两种基因可编码抗氧化蛋白, 如超氧化物歧化酶和过氧化氢酶等, 从而提高细胞抵御氧化应激的能力^[20]。为阐明β-OHB改善线粒体氧化应激的作用机制, 本研究通过RT-qPCR检测HUVECs细胞抗氧化基因*FoxO3a*和*Mt2*的水平变化, 发现β-OHB可通过上调上述基因表达, 减轻线粒体氧化应激, 改善线粒体功能。文献报道, 组蛋白乙酰化修饰可增强*FoxO3a*和*Mt2*与启动子结合, 而促进其表达^[22-23]。组蛋白乙酰化水平同时受HDAC和HAT(组蛋白乙酰基转移酶)调控^[22, 24], 而*FoxO3a*和*Mt2*的表达主要受HDAC活性调控^[15, 22]。因此本研究使用HDAC激活剂ITSA1和抑制剂Entinostat来验证β-OHB的作用机制, 发现ITSA1能够阻断β-OHB对*FoxO3a*和*Mt2*表达的调控, 逆转其抗氧化应激作用; 相反, Entinostat并不影响β-OHB发挥上述保护作用。由此可见, β-OHB对上述抗氧化基因的调控作用同HDAC激动剂作用相反, 而与HDAC抑制剂的效应一致, 即通过增强组蛋白乙酰化修饰来促进*FoxO3a*和*Mt2*表达, 起到抗氧化应激的效果。以上结果证实, β-OHB可通过调控表观遗传而发挥生物学活性, 将细胞代谢状态和转录调控联系起来, 与文献报道的一致^[15]。综上所述, 本研究结果证实, 酮体β-OHB可通过抑制HDAC, 促进抗氧化基因*FoxO3a*和*Mt2*表达, 减轻炎症导致的HUVECs线粒体氧化

应激和线粒体功能障碍。

但本实验也有诸多不足之处: β -OHB对于炎症状态下氧化应激的改善作用, 还需在动物在体水平进行多器官多组织的验证; 另外, 从实验的完整性出发, β -OHB促进组蛋白乙酰化的具体位点还需要染色质免疫共沉淀实验进一步解析。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] SIES H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, 2015, 4: 180–183.
- [2] MURPHY M P, HOLMGREN A, LARSSON N G, *et al*. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab*, 2011, 13(4): 361–366.
- [3] PIZZINO G, IRRERA N, CUCINOTTA M, *et al*. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 8416763[2021-03-09]. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.
- [4] SHADEL G S, HORVATH T L. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell*, 2015, 163(3): 560–569.
- [5] WILLEMS P H, ROSSIGNOL R, DIETEREN C E, *et al*. Redox homeostasis and mitochondrial dynamics. *Cell Metab*, 2015, 22(2): 207–218.
- [6] POPRAC P, JOMOVA K, SIMUNKOVA M, *et al*. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38(7): 592–607.
- [7] STEVEN S, FRENIS K, OELZE M, *et al*. Vascular inflammation and oxidative stress: Major triggers for cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 7092151[2021-03-09]. <https://doi.org/10.1155/2019/7092151>.
- [8] SHAO Y, SAREDY J, YANG W Y, *et al*. Vascular endothelial cells and innate immunity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(6): e138–e152[2021-03-11]. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314330>.
- [9] BRETON-ROMERO R, LAMAS S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biol*, 2014, 2: 529–534[2021-03-09]. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.005>.
- [10] YOUM Y H, NGUYEN K Y, GRANT R W, *et al*. The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat Med*, 2015, 21(3): 263–269.
- [11] DAYANG E Z, PLANTINGA J, TER ELLEN B, *et al*. Identification of LPS-activated endothelial subpopulations with distinct inflammatory phenotypes and regulatory signaling mechanisms. *Front Immunol*, 2019, 10: 1169021-03-09]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01169>.
- [12] PUCHALSKA P, CRAWFORD P A. Multi-dimensional roles of ketone bodies in fuel metabolism, signaling, and therapeutics. *Cell Metab*, 2017, 25(2): 262–284.
- [13] CHENG C W, BITON M, HABER A L, *et al*. Ketone body signaling mediates intestinal stem cell homeostasis and adaptation to diet. *Cell*, 2019, 178(5): 1115–1131.e1115.
- [14] COX P J, KIRK T, ASHMORE T, *et al*. Nutritional ketosis alters fuel preference and thereby endurance performance in athletes. *Cell Metab*, 2016, 24(2): 256–268.
- [15] SHIMAZU T, HIRSCHEY M D, NEWMAN J, *et al*. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*, 2013, 339(6116): 211–214.
- [16] DENG Y, XIE M, LI Q, *et al*. Targeting mitochondria-inflammation circuit by beta-hydroxybutyrate mitigates HFpEF. *Circ Res*, 2021, 128(2): 232–245.
- [17] RAFII S, BUTLER J M, DING B S. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature*, 2016, 529(7586): 316–325.
- [18] ANGELOVA P R, ABRAMOV A Y. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. *Free Radic Biol Med*, 2016, 100: 81–85.
- [19] SUGAMURA K, KEANEY J F, Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(5): 978–992.
- [20] SIES H, JONES D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 363–383.
- [21] BHATTACHARYA S. Reactive oxygen species and cellular defense system//Free radicals in human health and disease. New Delhi:Springer, 2015:17–29. .
- [22] MENZIES K J, ZHANG H, KATSYUBA E, *et al*. Protein acetylation in metabolism—Metabolites and cofactors. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(1): 43–60.
- [23] KLOTZ L O, SANCHEZ-RAMOS C, PRIETO-ARROYO I, *et al*. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol*, 2015, 6: 51–72.
- [24] PIETROCOLA F, GALLUZZI L, BRAVO-SAN PEDRO J M, *et al*. Acetyl coenzyme A: A central metabolite and second messenger. *Cell Metab*, 2015, 21(6): 805–821.

(2021-04-09收稿, 2021-11-12修回)

编辑 吕 熙