

热休克蛋白 70 对缺血 / 缺氧嗜铬细胞瘤细胞 细胞膜钙通道的调节机制

郭璐璐 贾超 曲彦 刘媛 宋砚坤 王奉涛 胡丹

266000 山东青岛, 青岛大学医学院附属青岛市市立医院重症医学科

通讯作者: 胡丹, Email: hudanicu@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.04.005

【摘要】 目的 探讨慢病毒介导的热休克蛋白 70 (HSP70) 表达对缺血 / 缺氧神经细胞细胞膜钙离子通道的影响及其机制。**方法** 取对数生长期的嗜铬细胞瘤细胞 (PC12), 以缺氧 6 h、复氧 12 h 刺激 PC12 细胞模拟体内神经细胞遭受缺血 / 再灌注时的病理过程, 将细胞分为非感染组, 感染含绿色荧光蛋白 (GFP) 基因但不含 HSP70 基因的慢病毒对照组 (GFP 慢病毒对照组), 及感染含重组 HSP70 和 GFP 基因的慢病毒实验组 (HSP 重组慢病毒感染组)。采用实时荧光定量反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 及蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测 L 型钙通道 *cav1.2*、*cav1.3* 亚基, 受体门控通道 NR1、NR2 亚基, 及 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换体 (NCX) 的 mRNA 和蛋白表达。**结果** 缺氧 / 复氧处理后, HSP70 重组慢病毒感染组细胞 *cav1.2*、NR1、NR2 的 mRNA 及蛋白表达均明显低于 GFP 慢病毒对照组和非感染组 [*cav1.2* mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.13 ± 0.46 比 5.12 ± 0.52 、 5.13 ± 0.66 , NR1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.61 ± 0.44 比 3.23 ± 0.82 、 3.31 ± 0.78 , NR2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.09 ± 0.41 比 3.91 ± 0.64 、 3.88 ± 0.62 ; *cav1.2* 蛋白 (灰度值): 2.82 ± 0.39 比 3.98 ± 0.23 、 3.96 ± 0.24 , NR1 蛋白 (灰度值): 1.84 ± 0.35 比 2.79 ± 0.21 、 2.86 ± 0.23 , NR2 蛋白 (灰度值): 0.87 ± 0.24 比 1.57 ± 0.31 、 1.33 ± 0.44 ; 均 $P < 0.01$]; 而 GFP 慢病毒对照组与非感染组间细胞 *cav1.2*、NR1、NR2 的 mRNA 及蛋白表达差异均无统计学意义 (均 $P > 0.01$)。非感染组、GFP 慢病毒对照组和 HSP70 重组慢病毒感染组间细胞 *cav1.3*、NCX 的 mRNA 和蛋白表达差异均无统计学意义 [*cav1.3* mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 4.82 ± 0.32 、 4.72 ± 0.36 、 4.82 ± 0.29 , NCX mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.49 ± 0.78 、 3.47 ± 0.71 、 3.56 ± 0.65 ; *cav1.3* 蛋白 (灰度值): 2.63 ± 0.40 、 2.64 ± 0.39 、 2.68 ± 0.39 , NCX 蛋白 (灰度值): 3.27 ± 0.48 、 3.34 ± 0.48 、 3.31 ± 0.42 ; 均 $P > 0.01$]。**结论** 外源性 HSP70 可能通过抑制 PC12 细胞膜 L 型钙通道 *cav1.2* 亚基及受体门控通道 NR1、NR2 亚基的表达, 对缺血 / 缺氧引起的 PC12 细胞损伤具有保护作用。

【关键词】 热休克蛋白 70; 慢病毒; 缺血 / 缺氧; L 型钙通道; 受体门控通道; $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换体; 嗜铬细胞瘤细胞

基金项目: 国家自然科学基金 (81571938, 81501706); 山东省自然科学基金 (Y2007C133); 山东省青岛市医疗卫生重点学科建设项目 (2014-8); 山东省青岛市市南区科技发展项目 (2014-14-041-YY); 山东省临床重点专科建设项目 (2013-26)

The modulatory effects of heat shock protein 70 on membrane calcium homeostasis of PC12 cells induced by ischemic/hypoxia Guo Lulu, Jia Chao, Qu Yan, Liu Yuan, Song Yankun, Wang Fengtao, Hu Dan

Department of Critical Care Medicine, Qingdao Municipal Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong, China

Corresponding author: Hu Dan, Email: hudanicu@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of lentivirus-mediated heat shock protein 70 (HSP70) gene on voltage-gated calcium channels on the cell membrane of pheochromocytoma cell 12 (PC12 cells) induced by ischemic/hypoxia and its mechanisms. **Methods** PC12 cells at logarithmic phase were collected, which were challenged with hypoxia for 6 hours and reoxygenation for 12 hours to stimulate the nerve cells suffered ischemia/reperfusion pathological process *in vitro*. PC12 cells were divided into non-infection group, infected by lentivirus containing green fluorescent protein (GFP) without HSP70 gene lentivirus control group (GFP lentivirus control group), and infected by lentivirus containing HSP70 and GFP gene recombined lentiviral infection group (HSP70 recombined lentiviral infection group). Real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot were used to determine mRNA and protein expressions of L-type voltage-gated Ca^{2+} channel subunits *cav1.2* and *cav1.3*, receptor gated channel subunits NR1 and NR2, and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange (NCX) in PC12 cells. **Results** After being challenged with hypoxia/reoxygenation, the mRNA and protein expressions of *cav1.2*, NR1 and NR2 in the PC12 cells

were significantly lower in HSP70 recombined lentiviral infection group than those of GFP lentivirus control group and non-infection group [cav1.2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 3.13 ± 0.46 vs. 5.12 ± 0.52 , 5.13 ± 0.66 ; NR1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 1.61 ± 0.44 vs. 3.23 ± 0.82 , 3.31 ± 0.78 ; NR2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 2.09 ± 0.41 vs. 3.91 ± 0.64 , 3.88 ± 0.62 ; cav1.2 protein (gray value): 2.82 ± 0.39 vs. 3.98 ± 0.23 , 3.96 ± 0.24 ; NR1 protein (gray value): 1.84 ± 0.35 vs. 2.79 ± 0.21 , 2.86 ± 0.23 ; NR2 protein (gray value): 0.87 ± 0.24 vs. 1.57 ± 0.31 , 1.33 ± 0.44 ; all $P < 0.01$]. But there were no statistical differences in the mRNA and protein expressions of cav1.2, NR1 and NR2 between GFP lentivirus control group and non-infection group (all $P > 0.01$). There were no statistical differences in the mRNA and protein expressions of cav1.3 and NCX among non-infection group, GFP lentivirus control group and HSP70 recombined lentiviral infection group [cav1.3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 4.82 ± 0.32 , 4.72 ± 0.36 , 4.82 ± 0.29 ; NCX mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 3.49 ± 0.78 , 3.47 ± 0.71 , 3.56 ± 0.65 ; cav1.3 protein (gray value): 2.63 ± 0.40 , 2.64 ± 0.39 , 2.68 ± 0.39 ; NCX protein (gray value): 3.27 ± 0.48 , 3.34 ± 0.48 , 3.31 ± 0.42 ; all $P > 0.01$]. **Conclusion** Exogenous HSP70 affects the expression of L-type voltage-gated Ca^{2+} channel subunit cav1.2 and receptor gated channel subunits NR1 and NR2, which may protect PC12 cells from the injury caused by ischemic/hypoxia.

【Key words】 Heat shock protein 70; Lentivirus; Ischemic/hypoxia; L-type voltage-gated Ca^{2+} channel; Receptor gated channel; $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange; Pheochromocytoma cell 12

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81571938, 81501706); Natural Science Foundation of Shandong Province of China (Y2007C133); Qingdao Medical Key Subject Construction Project of Shandong Province (2014-8); Shinan District Science and Technology Development Project in Qingdao of Shandong Province (2014-14-041-YY); Shandong Provincial Clinical Key Specialty Construction Project of China (2013-26)

危重患者容易发生脑缺血 / 再灌注 (I/R) 损伤, 其机制为脑 I/R 损伤时钙离子超载触发的一系列下游反应而最终导致神经元损伤和死亡。L 型钙通道属于神经系统电压门控钙离子通道, 其离子通透性孔道由蛋白 $\alpha_1\text{C}$ 或 $\alpha_1\text{D}$ 亚基 (cav1.2 或 cav1.3) 构成^[1], 与神经生长和死亡关系密切。N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 为谷氨酸离子型受体通道, 主要由两个谷氨酸受体 1A (NR1) 和两个谷氨酸受体 2A (NR2) 亚基组成, 具有较高的 Ca^{2+} 渗透性。 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换体 (NCX) 是分布在神经细胞膜上的双向转运体, 既有钙内流模式, 又有钙外流模式。正常生理状态时, 细胞通过钙泵或 NCX 将 Ca^{2+} 排出细胞^[2], 而 Ca^{2+} 内流主要由细胞膜电压门控钙通道及 NMDA 离子型受体门控通道介导。已经有实验证明, 在缺血 / 缺氧时 L 型钙通道、NMDA 离子型受体门控通道相关蛋白及 NCX 的表达均增加^[3-8]。热休克蛋白 70 (HSP70) 是一种应激蛋白, 在脑缺血等应激状态下, 通过抑制异常蛋白聚集及减少氧自由基等毒性作用对抗缺血损伤。本课题组前期研究已证实, HSP70 能够抑制缺血 / 缺氧神经细胞的钙超载^[9], 且外源性 HSP70 能够维持嗜铬细胞瘤细胞 (PC12) 内质网钙稳态, 从而对损伤细胞发挥保护作用^[10]。但脑缺血时 HSP70 过表达对神经细胞膜钙通道的影响如何尚未明确, 本研究利用实时荧光定量反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 和蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 等技术, 试图阐明外源性 HSP70

对缺血 / 缺氧神经细胞膜钙转运的影响机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: PC 细胞由青岛大学生理教研室提供。DMEM 高糖培养基、低糖培养基、胎牛血清为美国 Hyclone 公司产品; cav1.2、cav1.3、NR1、NR2、NCX 抗体为美国 Abcam 公司产品; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗兔或小鼠二抗为武汉博士德生物工程有限公司产品; RIPA 裂解液为北京索莱宝科技有限公司产品。

1.2 细胞培养与实验分组: 应用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 PC12 细胞, 取对数生长期细胞用于实验。参照本课题组前期研究中的方法构建重组慢病毒载体 vLe-HSP70 转染体外 PC12 细胞^[7-8], 并加入灭瘟菌素进行定期筛选。将筛选合格的细胞分为非感染组 (不予转染), 感染含绿色荧光蛋白 (GFP) 基因但不含 HSP70 基因的慢病毒对照组 (GFP 慢病毒对照组), 感染含重组 HSP70 和 GFP 基因的慢病毒实验组 (HSP70 重组慢病毒感染组), 各组细胞终密度均为 $5 \times 10^8/\text{L}$ 。

1.3 细胞缺血 / 缺氧和再灌注模型制备: 在无菌条件下将 3 组细胞换为无血清培养液, 置于密闭容器中, 充入 95% N_2 和 5% CO_2 气体、5 L/min, 4 ~ 5 min 后容器内达到无氧状态, 置于 37 °C 孵箱培养 6 h, 再加入含 10% 胎牛血清的培养基置于培养箱中 12 h。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 实时荧光定量 RT-PCR 检测 mRNA 表达:

表 1 外源性 HSP70 基因转染对缺氧 / 复氧 PC12 细胞 L 型钙通道亚基、受体门控通道亚基及 NCX mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)				
		cav1.2	cav1.3	NR1	NR2	NCX
非感染组	9	5.13 ± 0.66	4.82 ± 0.32	3.31 ± 0.78	3.88 ± 0.62	3.49 ± 0.78
GFP 慢病毒对照组	9	5.12 ± 0.52	4.72 ± 0.36	3.23 ± 0.82	3.91 ± 0.64	3.47 ± 0.71
HSP70 重组慢病毒感染组	9	3.13 ± 0.46 ^{ab}	4.82 ± 0.29	1.61 ± 0.44 ^{ab}	2.09 ± 0.41 ^{ab}	3.56 ± 0.65
F 值		38.921	0.324	16.990	30.723	0.152
P 值		0.003	0.491	0.007	0.005	0.784

组别	样本数 (孔)	蛋白表达 (灰度值)				
		cav1.2	cav1.3	NR1	NR2	NCX
非感染组	3	3.96 ± 0.24	2.63 ± 0.40	2.86 ± 0.23	1.33 ± 0.44	3.27 ± 0.48
GFP 慢病毒对照组	3	3.98 ± 0.23	2.64 ± 0.39	2.79 ± 0.21	1.57 ± 0.31	3.34 ± 0.48
HSP70 重组慢病毒感染组	3	2.82 ± 0.39 ^{ab}	2.68 ± 0.39	1.84 ± 0.35 ^{ab}	0.87 ± 0.24 ^{ab}	3.31 ± 0.42
F 值		28.880	0.023	27.521	11.313	0.032
P 值		0.005	0.821	0.007	0.008	0.694

注: HSP70 为热休克蛋白 70, PC12 细胞为嗜铬细胞瘤细胞, cav1.2、cav1.3 为 L 型钙通道亚基, NR1、NR2 为受体门控通道亚基, NCX 为 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换体; 与非感染组比较, ^a $P < 0.01$; 与 GFP 慢病毒对照组比较, ^b $P < 0.01$

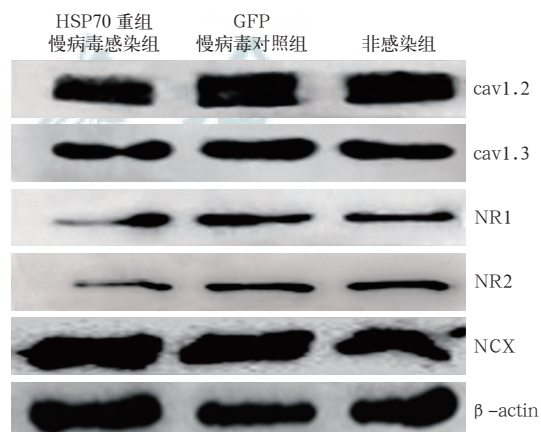
采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 测定 RNA 纯度并定量, 合成 cDNA。Cav1.2、cav1.3、NR1、NR2、NCX 及内参照 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 的 PCR 扩增引物由南京金斯瑞生物科技有限公司设计并合成。扩增条件: 预变性 95 °C 30 s, 1 个循环; PCR 反应: 95 °C 5 s, 61.6 °C 30 s, 共 40 个循环。目的基因 mRNA 表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.4.2 Western Blot 检测蛋白表达: RIPA 裂解液裂解 PC12 细胞后, 4 °C 离心取上清, 将上清蛋白调至 2 g/L。用 10% 分离胶和 8% 浓缩胶进行蛋白电泳, 蛋白转至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 加入 cav1.2 抗体 (1:200)、cav1.3 抗体 (1:200) 及 NCX、NR1、NR2 抗体 (1:1000), 4 °C 孵育过夜, 次日采用含吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗涤 3 次, 每次 15 min; 加 HRP 标记的羊抗小鼠或兔溶液 (1:20000), 室温孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 15 min; 免疫化学荧光 (ECL) 法显影、扫描。采用 Bio-Rad Quantity One 软件分析灰度值, 结果以待测蛋白与内参照 β -肌动蛋白 (β -actin) 的灰度值比值表示。

1.5 统计学处理: 应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组变量间比较采用单因素方差分析, 两组变量间比较采用独立样本 t 检验; $P < 0.01$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

表 1 和图 1 结果显示, 缺氧 / 复氧 12 h 感染携带有外源性基因 HSP70 的重组慢病毒组 PC12 细胞 cav1.2、NR1、NR2 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显低于 GFP 慢病毒对照组及非感染组 (均 $P < 0.01$), 而后两组间差异无统计学意义 (均 $P > 0.01$)。各组 PC12 细胞 cav1.3、NCX 的 mRNA 和蛋白表达水平差异均无统计学意义 (均 $P > 0.01$)。



HSP70 为热休克蛋白 70, PC12 细胞为嗜铬细胞瘤细胞, NCX 为 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换体, GFP 为绿色荧光蛋白, cav1.2、cav1.3 为 L 型钙通道亚基, NR1、NR2 为受体门控通道亚基, β -actin 为 β -肌动蛋白

图 1 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测外源性 HSP70 转染对缺氧 / 复氧 12 h PC12 细胞 L 型钙通道亚基、受体门控通道亚基及 NCX 蛋白表达的影响

3 讨论

HSP70 是在缺血性脑损伤中研究最为广泛的 HSP 家族成员。它作为主要的伴侣蛋白,可与新生、未折叠、错折叠或聚集的蛋白质结合,加快正常蛋白质的合成,从而有效补充热休克时由于蛋白变性而导致的蛋白量减少,并促进某些变性蛋白的降解和清除,维持或重新激活某些酶的作用,保护细胞功能。Sun 等^[11]发现 HSP70 的 C 末端功能是其神经保护作用的关键部位,而不是其与蛋白折叠及分子伴侣相互作用的 N 末端,提示可能有其他机制参与了 HSP70 的神经保护作用。目前对脑缺氧损伤及继发性脑损害的分子机制研究已涉及兴奋性氨基酸、钙离子稳态失衡、自由基形成、蛋白酶激活及基因表达改变等方面^[12-15],而钙超载是神经细胞缺血/缺氧后继发性损伤的重要环节,是诸多原因引起细胞损害的“最后共同通路”^[16]。

已有研究证实钙在脑缺血损伤中发挥着关键作用^[17]。缺血/缺氧诱导的钙离子超载主要来自细胞内外钙离子转运异常和细胞内储存钙离子释放两个方面。研究发现,脑缺血/缺氧时细胞内钙超载可能与细胞内外钙离子转运失衡有关^[18-19]。脑 I/R 损伤时,三磷酸腺苷(ATP)生成迅速减少,钙泵或 NCX 功能减弱,导致钙排出减少;同时缺血时可能使钙离子内流增加,应用电压门控通道阻滞剂能够显著改善外伤性脑损伤后缺血/缺氧导致的细胞功能障碍和钙聚集^[20],提示电压门控钙通道可能是脑缺血/缺氧时钙聚集的原因之一。此外,缺血引起谷氨酸大量增加,激活谷氨酸受体,尤其是 NMDA 受体,导致受体依赖性钙通道开放,加剧钙聚集^[21-22]。研究证实,脑缺血可使敏感区的神经元钙离子内流,细胞内游离钙离子($[Ca^{2+}]_i$)增加幅度更大,在缺血 6~8 min 内 CA1 区神经元 $[Ca^{2+}]_i$ 升至 30 $\mu\text{mol/L}$,而对缺血有抵抗力的 CA3 区神经元仅升至 10 $\mu\text{mol/L}$,其机制可能与 CA1 区 NMDA 受体比其他区域丰富有关^[23],提示 NMDA 受体在细胞超载中具有重要作用。

那么 HSP70 是否通过影响神经细胞的跨膜钙转运发挥神经保护作用呢?有研究发现 HSP70 可以增加细胞对过氧化氢(H_2O_2)损伤的耐受性,减少 Ca^{2+} 进入细胞^[24-25],从而保护细胞免受 Ca^{2+} 内流所引起的细胞毒性和细胞死亡^[26];外源性 HSP70 也可影响神经细胞的跨膜钙转运^[27],提示脑缺血/缺氧时 HSP70 可能通过调节 Ca^{2+} 的细胞膜转运影响

$[Ca^{2+}]_i$ 水平。本课题组前期研究证实,当神经细胞缺血/缺氧时, HSP70 能够减轻钙离子超载^[9],且可以通过调节细胞内质网钙通道活性,从而对神经细胞起到保护作用^[10]。但 HSP70 对细胞膜钙通道的影响尚不明确。本实验中采用含外源性 HSP70 基因的慢病毒感染 PC12 细胞,观察外源性 HSP70 在 PC12 细胞内对细胞膜钙通道及 NCX 的影响。结果显示:在同样缺血/缺氧的条件下, HSP70 重组慢病毒感染组细胞 L 型钙通道 $\text{cav}1.2$ 亚基以及受体门控通道 NMDA 亚基 NR1、NR2 的 mRNA 和蛋白表达均明显低于非感染组和 GFP 慢病毒对照组,而 L 型钙通道 $\text{cav}1.3$ 亚基及 NCX 的表达量则均无差异;同时非感染组和 GFP 慢病毒对照组细胞各指标的表达量均无差异。因此我们推测:外源性 HSP70 通过抑制细胞膜电压门控钙通道及受体门控通道的表达发挥了对神经细胞的保护作用。由于神经细胞的不可分裂性,病毒载体对于神经系统疾病的基因治疗显得无能为力,慢病毒载体因其能够感染非分裂期细胞,并整合到宿主细胞 DNA 中而具有独特的优势。在携带强 GFP 的重组慢病毒感染原代神经细胞的研究中发现,重组慢病毒感染对神经元和胶质细胞都具有稳定的转染能力^[28]。

综上,本研究显示, HSP70 过表达通过下调缺血/缺氧神经细胞 L 型电压门控通道 $\text{cav}1.2$ 亚基及受体门控通道 NMDA 亚基 NR1、NR2 的表达维持 PC 细胞钙稳态,从而发挥对神经细胞的保护作用,但 HSP70 对 NCX 的活性是否有影响, NCX、NMDA 受体、VGCC 间的相互作用及其机制尚未完全阐明,有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Catterall WA, de Jongh K, Rotman E, et al. Molecular properties of calcium channels in skeletal muscle and neurons [J]. Ann N Y Acad Sci, 1993, 681 : 342-355. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb22913.x.
- [2] DiPolo R, Beaugé L. Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions [J]. Physiol Rev, 2006, 86 (1): 155-203. DOI: 10.1152/physrev.00018.2005.
- [3] 马丽华, 吕昕瞳, 刘雅静, 等. Cav1.2 和钙调蛋白在自发性遗传性癫痫大鼠小脑中的异常表达 [J]. 解剖科学进展, 2013, 19 (1): 27-31.
Ma LH, Lyu XT, Liu YJ, et al. Abnormal expressions of Cav1.2 and calmodulin in the cerebellum of genetic epileptic rats [J]. Prog Anat Sci, 2013, 19 (1): 27-31.
- [4] Wang X, Zheng H, Liu C, et al. Ciliary neurotrophic factor-treated astrocyte conditioned medium regulates the L-type calcium channel activity in rat cortical neurons [J]. Neurochem Res, 2008, 33 (5): 826-832. DOI: 10.1007/s11064-007-9514-7.
- [5] 闵冬雨. $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{Cav}1.2/\text{CaMK II}$ 信号通路在阿尔茨海默病和血管性痴呆模型中的变化研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2012.

- Min DY. The alterations of $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{Cav}1.2/\text{CaMK II}$ signaling in experimental models of Alzheimer's disease and vascular dementia [D]. Shenyang: China Medical University, 2012.
- [6] Westenbroek RE, Bausch SB, Lin RC, et al. Upregulation of L-type Ca^{2+} channels in reactive astrocytes after brain injury, hypomyelination, and ischemia [J]. *J Neurosci*, 1998, 18 (7): 2321–2334.
 - [7] Takahashi H, Shin Y, Cho SJ, et al. Hypoxia enhances S-nitrosylation-mediated NMDA receptor inhibition via a thiol oxygen sensor motif [J]. *Neuron*, 2007, 53 (1): 53–64. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.11.023.
 - [8] 吴涛, 王忱. NMDA 受体亚基的研究进展 [J]. 医学综述, 2009, 15 (6): 819–821. DOI: 10.3969/j.issn.1006–2084.2009.06.007.
 - Wu T, Wang C. Research Progress of NMDA Receptor Subunits [J]. *Med Recapitulate*, 2009, 15 (6): 819–821. DOI: 10.3969/j.issn.1006–2084.2009.06.007.
 - [9] 胡艳宁, 李庆淑, 李智, 等. 慢病毒介导的热休克蛋白 70 基因对缺血 / 缺氧嗜铬细胞瘤细胞钙稳态的影响及机制研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (4): 295–299. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2015.04.014.
 - Hu YN, Li QS, Li Z, et al. Effects of lentivirus-mediated heat shock protein 70 gene on calcium homeostasis in PC12 cells undergone ischemia and hypoxia [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (4): 295–299. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2015.04.014.
 - [10] 刘媛, 关纯, 郭璐璐, 等. 慢病毒介导的热休克蛋白 70 基因对缺血 / 缺氧诱导嗜铬细胞瘤细胞钙通道调节机制的研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (3): 34–39. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2016.03.003.
 - Liu Y, Guan C, Guo LL, et al. Effects of lentivirus-mediated heat shock protein 70 gene on endoplasmic reticulum calcium homeostasis and calcium channels of PC12 cells induced by ischemia and hypoxia [J]. *Chin Crit Care Med*, 2016, 28 (3): 34–39. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2016.03.003.
 - [11] Sun Y, Ouyang YB, Xu L, et al. The carboxyl-terminal domain of inducible Hsp70 protects from ischemic injury in vivo and in vitro [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26 (7): 937–950. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600246.
 - [12] 李国福, 贾佳, 符加红, 等. 异氟烷预处理或后处理对大鼠局灶性脑缺血 / 再灌注损伤的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (6): 431–435. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2014.06.013.
 - Li GF, Jia J, Fu JH, et al. The effects of preconditioning and postconditioning with isoflurane on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Chin Crit Care Med*, 2014, 26 (6): 431–435. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2014.06.013.
 - [13] 周晓峰, 黄丁丁, 王迪芬, 等. 丙泊酚预处理对谷氨酸损伤大鼠脑组织的保护作用研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2012, 24 (12): 750–753. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003–0603.2012.12.015.
 - Zhou XF, Huang DD, Wang DF, et al. The protective effect of propofol pretreatment on glutamate injury of neonatal rat brain slices [J]. *Chin Crit Care Med*, 2012, 24 (12): 750–753. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003–0603.2012.12.015.
 - [14] 宋曦, 王迪芬, 姚娜, 等. 依达拉奉联合异丙酚后处理对乳鼠离体脑皮质细胞缺血 / 再灌注损伤保护作用的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (1): 30–34. DOI: 10.3969/j.issn.1008–9691.2013.01.011.
 - Song X, Wang DF, Yao N, et al. A study on protection of edaravone combined with propofol postconditioning against cerebral ischemia/reperfusion injury in cultured brain cortical cells of suckling rat [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2013, 20 (1): 30–34. DOI: 10.3969/j.issn.1008–9691.2013.01.011.
 - [15] 战丽, 孙圣凯, 侯志勇, 等. 消脱止 -M 对创伤性脑损伤后脑部微循环和神经功能的保护作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (3): 149–152. DOI: 10.3969/j.issn.1008–9691.2013.03.008.
 - Zhan L, Sun SK, Hou ZY, et al. The protective effects of melilotus extract tablet on neurological function and cerebral microcirculation after traumatic brain injury in rats [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2013, 20 (3): 149–152. DOI: 10.3969/j.issn.1008–9691.2013.03.008.
 - [16] Schanne FA, Kane AB, Young EE, et al. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway [J]. *Science*, 1979, 206 (4419): 700–702. DOI: 10.1126/science.386513.
 - [17] Kumar VS, Gopalakrishnan A, Naziroğlu, et al. Calcium ion—the key player in cerebral ischemia [J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21 (18): 2065–2075. DOI: 10.2174/0929867321666131228204246.
 - [18] Silver IA, Erecińska. Intracellular and extracellular changes of $[\text{Ca}^{2+}]$ in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo [J]. *J Gen Physiol*, 1990, 95 (5): 837–866. DOI: 10.1085/jgp.95.5.837.
 - [19] Nakamura T, Minamisawa H, Katayama Y, et al. Increased intracellular Ca^{2+} concentration in the hippocampal CA1 area during global ischemia and reperfusion in the rat: a possible cause of delayed neuronal death [J]. *Neuroscience*, 1999, 88 (1): 57–67. DOI: 10.1016/S0306–4522(98)00207–3.
 - [20] Shahlaie K, Gurkoff GG, Lyeth BG, et al. Neuroprotective effects of SNX-185 in an in vitro model of TBI with a second insult [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2013, 31 (2): 141–153. DOI: 10.3233/RNN-120243.
 - [21] Fukuda A, Muramatsu K, Okabe A, et al. NMDA receptor-mediated differential laminar susceptibility to the intracellular Ca^{2+} accumulation induced by oxygen-glucose deprivation in rat neocortical slices [J]. *J Neurophysiol*, 1998, 79 (1): 430–438.
 - [22] Guo J, Meng F, Fu X, et al. N-methyl-D-aspartate receptor and L-type voltage-gated Ca^{2+} channel activation mediate proline-rich tyrosine kinase 2 phosphorylation during cerebral ischemia in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 355 (3): 177–180. DOI: 10.1016/j.neulet.2003.10.076.
 - [23] Bickler PE, Hansen BM. Hypoxia-tolerant neonatal CA1 neurons: relationship of survival to evoked glutamate release and glutamate receptor-mediated calcium changes in hippocampal slices [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 1998, 106 (1–2): 57–69. DOI: 10.1016/S0165–3806(97)00189–2.
 - [24] Nishimura RN, Dwyer BE, Clegg K, et al. Comparison of the heat shock response in cultured cortical neurons and astrocytes [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1991, 9 (1–2): 39–45. DOI: 10.1016/0169–328X(91)90128–K.
 - [25] Polla BS, Kantengwa S, François D, et al. Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93 (13): 6458–6463. DOI: 10.1073/pnas.93.13.6458.
 - [26] 李晓鲁, 彭毅志, 袁志强, 等. HSP70 基因转染对缺氧 / 再复氧肠上皮细胞生长能力影响的研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2003, 15 (2): 81–83. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003–0603.2003.02.005.
 - Li XL, Peng YZ, Yuan ZQ, et al. Protection on proliferation of intestinal epithelial cells against hypoxia-reoxygenation through recombinant heat shock protein 70 adenovirus transfection [J]. *Chin Crit Care Med*, 2003, 15 (2): 81–83. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003–0603.2003.02.005.
 - [27] Smith PJ, Hammar K, Tytell M. Effects of exogenous heat shock protein (hsp70) on neuronal calcium flux [J]. *Biol Bull*, 1995, 189 (2): 209–210. DOI: 10.2307/1542468.
 - [28] 张阳. 慢病毒载体的研究进展 [J]. 福建医科大学学报, 2014, 48 (6): 407–410.
 - Zhang Y. Research progress of slow virus vector [J]. *J Fujian Med Univ*, 2014, 48 (6): 407–410.

(收稿日期: 2016-03-07)

(本文编辑: 孙茜, 李银平)