doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.30.001

·基础研究·

# KCa3.1 通道参与调控星形胶质细胞糖氧剥夺诱导的内质网应激 *

易梦妮 韦天娇 陆 琴 高小玲 虞志华△

（上海交通大学医学院药理学教研室 上海 200025）

**摘要 目的**：研究 KCa3.1 在糖氧剥夺诱导的原代星形胶质细胞内质网应激（ERS）中的调控作用。**方法**：通过构建原代星形胶质细胞糖氧剥夺（OGD）模型，应用 cck-8 法、免疫荧光技术、western blotting 等分子生物学技术研究 KCa3.1 在 OGD 引起的原代星形胶质细胞内质网应激中的作用。**结果**：OGD 4 h 处理后星形胶质细胞内 KCa3.1 的表达明显上调。OGD 处理后星形胶质细胞的细胞活力显著性降低，且具有时间依赖性。给予 KCa3.1 通道抑制剂 TRAM-34 可提高 OGD 4 h 处理后星形胶质细胞的细胞活力，并具有剂量依赖性。OGD 处理 0.5 h、1 h、3 h、4 h、6 h 后，原代星形胶质细胞内 ERS 信号通路被激活，GRP78、p-eIF-2α 的表达显著性上调。给予 KCa3.1 通道抑制剂 TRAM-34 后，OGD 引起的星形胶质细胞内 GRP78、p-eIF-2α 的上调幅度显著性降低。**结论**：KCa3.1 通道参与了星形胶质细胞内 OGD 引起的内质网应激通路的激活。

**关键词**：KCa3.1；OGD；星形胶质细胞；内质网应激

**中图分类号**：R-33；R966 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273(2017)30-5801-06

# KCa3.1 Channel was involved in the Regulation of Oxygen and Glucose Deprivation - induced Endoplasmic Reticulum Stress in Astrocytes *

*YI Meng-ni, WEI Tian-jiao, LU Qin, GAO Xiao-ling, YU Zhi-hua* △

*(Department of Pharmacology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)*

**ABSTRACT Objective:** To evaluate the regulation of KCa3.1 in oxygen and glucose deprivation-induced endoplasmic reticulum stress in primary astrocytes. **Methods:** The model of oxygen and glucose deprivation in primary astrocytes were constructed to explore the role of Ka3.1 channel on OGD-induced endoplasmic reticulum stress by using cell biology and molecular biology techniques including cck-8, immunofluorescence technique and western blotting. **Results:** Expression of KCa3.1 protein in astrocytes subjected to OGD 4 h was significantly up-regulated. Cell viability of astrocytes subjected to OGD was significantly time-dependent lower. KCa3.1 channel inhibitor, TRAM-34, could improve the cell viability of astrocytes treated with OGD 4 h, which was dose-dependent. ERS signaling pathway was activated in primary astrocytes at 0.5 h, 1 h, 3 h, 4 h, 6 h after OGD. The expression of GRP78 and p-eIF-2α protein was significantly up-regulated. The up-regulation of GRP78 and p-eIF-2α in the TRAM-34 group after OGD treatment was significantly inhibited. **Conclusions:** KCa3.1 channel is involved in the activation of endoplasmic reticulum stress pathway induced by OGD in primary astrocytes.

**Key words:** KCa3.1; OGD; Astrocytes; Endoplasmic reticulum stress

**Chinese Library Classification (CLC): R-33; R966 Document code: A**

**Article ID: 1673-6273(2017)30-5801-06**

## 前言

缺血性脑中风[1,2]是由于脑血管狭窄或闭塞，导致脑血流阻断而使脑组织发生缺血缺氧、软化甚至坏死，致使脑血管功能障碍。溶栓治疗由于狭窄时间窗的限制以及旨在寻找具有减轻脑缺血损伤的神经保护药物的临床试验均以失败而告终，因此寻找新的神经保护靶点及药物显得尤为迫切。

KCa3.1（intermediate-conductance calcium-activated potassium channel）[3-5]为电压非依赖性通道，具有 6 个跨膜区域，在 S5 与 S6 区间内形成孔区，孔区内具有对钾离子具有高度选择性的氨基酸序列 GYG，因此决定了 KCa3.1 对钾离子的高度选择性。KCa3.1 为非电压依赖性的钙激活钾离子通道，对钙信号和膜电位的调节发挥着重要作用。KCa3.1 激活后会导致膜超级化作用，进而为 $Ca^{2+}$ 内流提供驱动力，膜内钙离子升高后又可持续性激活 KCa3.1 通道，最终引起细胞代谢异常[6,7]。内质网应激[8,9]（endoplasmic reticulum stress，ERS）是指由于氧化还原平衡和管腔内 $Ca^{2+}$ 体内平衡被破坏，从而导致未折叠 / 错误折叠的蛋白质积累的内质网应答过程。ERS 的目的是促进蛋白质折

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81373351）；上海市自然科学基金项目（16ZR1418700）

作者简介：易梦妮（1991-），硕士研究生，研究方向：离子通道药理学，电话：18017983669，E-mail: mengniyi@163.com

△ 通讯作者：虞志华，博士，副研究员，主要研究方向：离子通道药理学，E-mail:yuzhihua@shsmu.edu.cn

(收稿日期：2017-05-23 接受日期：2017-06-20)

叠并恢复内质网(endoplasmic reticulum,ER)体内平衡[10,11]。然而,如果没有实现体内平衡,当错误折叠或未折叠蛋白质的积累超过 ER 能力时,caspase-12[12]介导的细胞凋亡途径被激活,就会引起细胞死亡。本课题组前期发现 KCa3.1 通过调节细胞内 $Ca^{2+}$ 参与包括脑创伤[13]、缺血性脑中风和 AD[14,15]在内的病理生理过程中星形胶质细胞的活化过程,但其具体作用机制尚不明确。我们通过构建糖氧剥夺(oxygen and glucose deprivation, OGD)细胞模型,应用 western blotting 技术检测 OGD 后星形胶质细胞内 ERS 信号通路的变化;利用 cck-8 检测 OGD 处理后星形胶质细胞的活力变化;免疫荧光技术检测星形胶质细胞内 KCa3.1 的表达;利用相应抑制剂探讨 KCa3.1 在星形胶质细胞 OGD 诱导的内质网应激中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

GRP78 抗体、彩色预染蛋白分子量标准、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)、RIPA 裂解液、western 一抗稀释液、青霉素 - 链霉素溶液、胰酶细胞消化液购自碧云天公司;Goat anti-rabbit IgG (H+L);HRP conjugated antibody 购自 Promoton 公司;Phospho-eIF2α 抗体购自 CST 公司;β-actin、KCa3.1 的抗体购自 SANTA CRUZ 公司,DMEM/HIGH GLUCOSE、HBSS、PBS 购自 Hyclone 公司, 胎牛血清购自 Glycine 公司, SDS 购自生工生物工程(上海)股份有限公司,Trizma® base 购 SIGMA 公司,TRAM-34 购自 TOCRIS,甲醇(分析纯)购自上海大合化学品有限公司,氯化钠(分析纯)购自江苏彤晟化学试剂有限公司,Cell Counting Kit-8(CCK-8)购自 DOJINDO 公司。

### 1.2 实验仪器

超高速离心机购自美国 Beckman 公司, 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司, 二氧化碳培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,生物安全柜购自美国 Thermo 公司,小型蛋白电泳与转印系统购自美国 Bio-Rad 公司,制胶用玻璃板模具与孔梳购自美国 Bio-Rad 公司, 制冰机购自美国 Scotsman 公司, -80 ℃冰箱购自美国 Thermo 公司。

本实验所使用 KCa3.1 基因敲除(KO)小鼠源于 The Jackson Laboratory。选用健康的 ICR、KO 小鼠,实验动物操作均符合《实验动物管理条例》。

### 1.3 原代星形胶质细胞的培养

分别取 6 mL、6 mL、3 mL 解剖液于三个培养皿中(当一次性取多只小鼠时, 可适当多准备几个 6 mL 解剖液的皿)。取 P0-P2 的小鼠,用酒精喷洒灭菌,用手术剪剪下小鼠的头,将头放置在干净的培养皿中,身体放入另外的培养皿盖中。左手用镊子捏住小鼠的鼻子,右手用手术剪插入脊髓沿耳朵水平剪开头颅,用剪子拉开上头颅,取出完整的脑部组织,放入含 6 mL 解剖液的培养皿中。在显微镜下边观察边分离大脑的左右半球,剥离掉半球表面的血管膜(不能有明显的红血丝,同时要保证大脑皮层的完整性)。将剥离干净的大脑皮层放入新的含 6 mL 解剖液的培养皿中,剥离完所有的大脑平层后,在显微镜下检查新解剖液中的大脑皮层是否剥离干净。检查完后,将大脑皮层取出放入含 3 mL 解剖液的培养皿中, 用剪刀剪碎所有组织(1 mm 左右),加入等体积的胰酶,放入 37 ℃的细胞培养箱中消化 15 min。取出培养皿,用 10 mL 的移液管枪头吸出白色组织放入 15 mL 离心管中,取大于 2 mL 的完全培养基加入离心管中(要完全中止胰酶),移液管套黄色枪头吹打培养液至组织完全混匀,看不见明显的白色物质。将吹打均匀的细胞液于 4 ℃ 800 rpm 离心 10 min,用蓝色枪头吸走上清液,保留沉淀。取 75 cm 的培养瓶, 先加入一定量的完培 (沿培养瓶底脚加入),然后取 8 mL 完全培养基加入有沉淀的 15 mL 离心管中,将沉淀吹打均匀(5-10 次),将其分装到含完全培养基的培养瓶中(插入液面内加入,每个培养瓶加入的量为 2 个小鼠的脑袋,培养基终体积为 10 mL),将培养瓶放置在 37 ℃细胞培养箱中培养。收拾好超净台,放回自己的试剂并扔掉垃圾,用酒精棉球清理好超净台桌面后紫外照射 30 min。第二天换液,一个星期后观察,星形胶质细胞慢慢长起来,以后一星期换一次液,两星期后细胞基本长满。

### 1.4 细胞种板

将长满细胞的 75 cm 瓶取出, 于摇床 37 ℃ 200 rpm 避光彻夜摇动,去除杂细胞。将彻夜摇过的培养瓶取出,弃掉瓶中含杂细胞的培养基,用 PBS 洗两遍。加入 2 mL 胰酶,于细胞培养箱中消化 2 min,显微镜下观察细胞是否完全消化下来,加入完全培养基中止消化。将细胞悬液收集在 15 mL 离心管中,于 4 ℃ 800 rpm 离心 10 min。去上清,加入新的培养基,用 10 mL 移液管套黄色枪头吹打细胞悬液,使细胞单个均匀存在。根据不同实验要求将细胞种在不同规格的板中。

### 1.5 糖氧剥夺(OGD)模型的构建

将原代星形胶质细胞根据不用的实验目的种于不同的板中,待细胞长满后进行 OGD 处理。OGD 之前提前一天撤血清,将无糖培养基(无糖 DMEM+PS)于厌氧培养箱(5 % $CO_2$,95 % $N_2$)中平衡 30 min,将培养板中原有的高糖培养基(DMEM+PS)弃掉,用无糖培养基洗两遍,细胞于无糖培养基中培养,将培养板置于厌氧培养箱中。给予抑制剂处理时,OGD 处理前需提前 30 min 给药,在 OGD 处理的过程中药物一直存在。

### 1.6 细胞免疫荧光染色

(1)爬片

将细胞滴种在用 L- 多聚赖氨酸 (poly-L-Lysine,PLL)包被过的玻片上,待细胞铺满后对细胞进行 OGD 处理。细胞固定:将培养基弃掉, 用 PBS 洗一遍,4 % 的多聚甲醛室温固定 30 min,PBS 洗一遍,于 PBS 中 4 ℃ 保存。

(2)染色

在染色避光盒中放适量的水, 以防止玻片上的液体蒸发。将玻片取出,放置在盒内的载玻台上,滴加封闭液室温封闭 60 min。一抗(KCa3.1(1:20,ALM-051,alomone labs)4 ℃ 避光孵育过夜。将一抗彻夜孵育的玻片取出,PBS 中洗两遍。二抗(Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG;1:400,invitrogen)避光室温孵育 60 min。事先在载玻板上滴加适量稀释好的 DAPI 液, 将盖玻片有细胞的一面盖在载玻板上用指甲油十字封口,于 -20 ℃ 避光保存。共聚焦显微镜观察拍片。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件对荧光照片进行半定量分析[16],应用平均光密度(Mean IOD)表示 KCa3.1 的表达变化。

### 1.7 细胞活力测定

将原代星形胶质细胞按每孔 40000 个细胞的密度种于 96

孔板中(为避免边缘效应,在 96 孔板周围 36 孔中不种细胞,加入 PBS)。待细胞长满后，提前一天撤血清。模型组提前给予 OGD 处理,将 cck-8 按 1:10 的比例与无血清的正常培养基(高糖 DMEM+PS)混合,每孔给予 100 μL 混合好的培养基,在培养箱中于 37℃孵育 1-2 h,酶标仪(波长 450 nm)测定吸光度,检测细胞活力,control 组吸光度接近于 1 停止测定。

### 1.8 免疫印迹法(western blotting)

细胞样本准备:将处理好的细胞取出,弃掉培养基,用预冷的 PBS 洗两遍,吸干 PBS。每个 dish 加入 150 μL 强 RIPA 裂解液(事先加入 PMSF,浓度为 1 mM),于冰上充分裂解后刮取蛋白于 1.5 mL EP 管中，放入事先预冷的高速离心机中 4 ℃ 13500 rpm 离心 5 min,取上清,按照 1:4 的比例加入 5 × SDS 上样缓冲液,100 ℃煮沸变性 10 min,-20 ℃保存样本。

Western:将胶装于蛋白电泳盒中,加入电泳缓冲液,取下梳子,加入 marker 及蛋白样本,于 60 V 下跑完浓缩胶后,将电压调至 80 V,跑完分离胶。将滤纸事先用转膜液浸泡,于 4 ℃预冷。剪取适宜大小的 PVD 膜,用甲醇浸泡 15 s 后,用预冷好的转膜液润湿。取下跑好的 SDS 胶,切除浓缩胶后,置于转膜液中,按照负极 - 滤纸 - 胶 -PVD 膜 - 滤纸 - 正极的顺序排入转膜夹,将其放入转膜槽中,放入冰袋及转膜液,于冰上 200 mA 电流转膜 1.5 h-2.5 h(不同分子量的蛋白转膜时间不同)。转膜结束后,取出 PVD 膜,加入 5 %的脱脂牛奶室温封闭 1 h。一抗孵育:于 4 ℃摇床过夜(抗体用一抗稀释液稀释)。将 PVD 膜取出,回收一抗。用 TBS-T 洗膜三次,每次 5 min。用 5 %的脱脂牛奶稀释二抗（兔抗 1:10000，鼠抗 1:1000），室温孵育 1 h。TBS-T 洗三次,每次 5 min,显影。Image J 分析各目的蛋白的灰度值,用于统计分析。

### 1.9 数据分析

实验所得数据均用 mean ± SEM 表示，采用 t-test 进行差异性检测,通过 Graphpad Prism5 作图;免疫印迹条带应用 ImageJ 软件分析,免疫荧光图片用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行分析。P<0.05 表示有显著性差异(P<0.05 用 "*" 表示,P<0.01 用 "**" 表示,P<0.001 用 "***" 表示)。

## 2 结果

### 2.1 星形胶质细胞 OGD 处理后 KCa3.1 的表达

星形胶质细胞 OGD 4 h 处理后应用免疫荧光技术对 KCa3.1 的表达变化进行检测。结果发现,与对照组(control)相比,KCa3.1 蛋白在 OGD 4 h 处理后表达显著性上调(P<0.01,拍摄区域大小为 290.63 μm * 290.63 μm,图 1)。

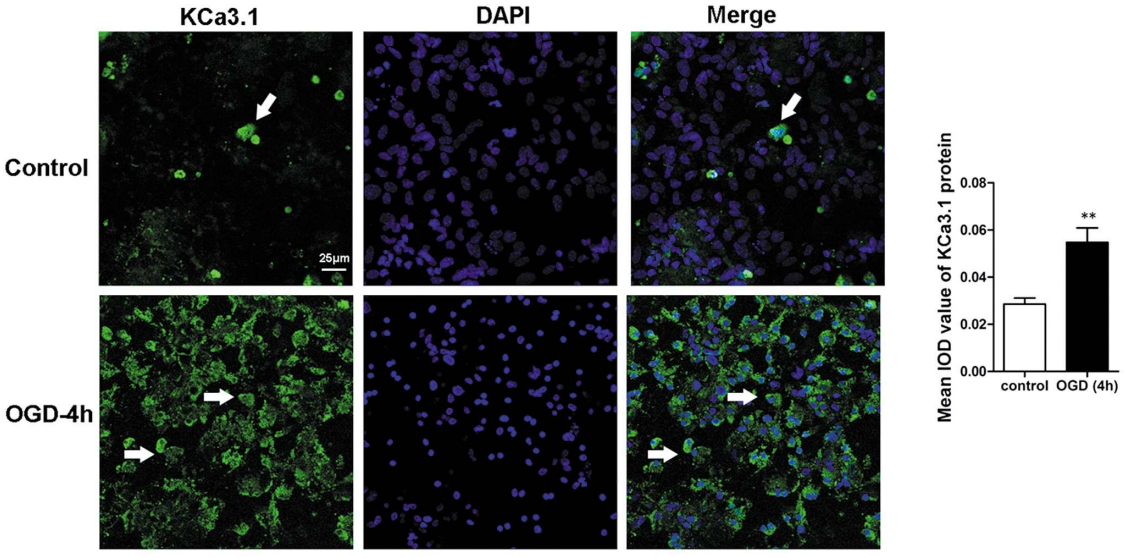


**图 1 星形胶质细胞 OGD 处理后 KCa3.1 的表达(** P<0.01 vs. 正常对照组)**

Fig.1 Expression of KCa3.1 protein in astrocytes treated with OGD. (** P<0.01 vs. control group)

### 2.2 细胞活力测定

cck-8 试剂对细胞的毒性非常低，可与活细胞内的脱氢酶持续反应使溶液颜色不断加深,O.D 值不断增加，且与活细胞数量成正比[17]。cck-8 法检测 OGD 处理后星形胶质细胞的活力变化的实验结果显示:与各自相对应的对照组相比,OGD 处理 1 h、3 h、4 h、6 h、12 h 后星形胶质细胞的细胞活力显著性下降(1 h-12 h: P<0.001, n=5,图 1),其下降程度与 OGD 的时间成正比。

给予 0.01 μM 、0.1 μM 、1 μM 、10 μM 、100 μM 浓度梯度的 KCa3.1 的抑制剂 TRAM-34 可以显著性提高星形胶质细胞 OGD 4 h 处理后的细胞活力(0.01-1 μM:P<0.05;10-100 μM:P<0.001;n=4，图 2 A)，并具有剂量依赖性；在正常情况下，TRAM-34 也可显著性提高星形胶质细胞的细胞活力(0.1-1 μM 和 50-100 μM:P<0.001;10 μM:P<0.01;n=4,图 2 B),并且具有剂量依赖性。以上结果提示 KCa3.1 参与 OGD 诱导的细胞活力的下降。

### 2.3 OGD 处理后 ERS 通路的变化

对原代培养的星形胶质细胞经过不同时间段(0.5 h、1 h、3 h、4 h、6 h)OGD 处理后 ERS 信号通路的表达变化进行检测。实验结果显示，与对照组相比，p-eIF-2α 在 OGD 处理后较对照组显著性上调（0.5 h、1 h 和 6 h:P<0.01;3 h:P<0.05;4 h:P<0.001;图 3 A),其上调幅度呈现先增大后减小的趋势,峰值出现在 OGD 4 h。OGD 处理后的星形胶质细胞中 GRP78 蛋白

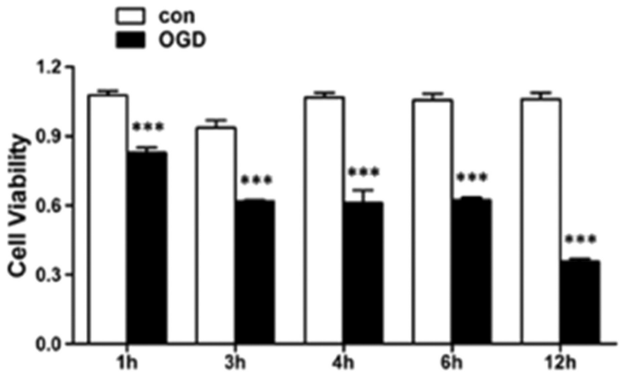


图 2 星形胶质细胞的 OGD 处理后细胞活力测定(*** P<0.001 vs. 正常对照组)

Fig.2 Determination of cell viability in astrocytes treated with OGD. (*** P<0.001 vs. control group)

表达显著性上调(1 h 和 4 h:P<0.01;3 h 和 6 h:P<0.05;图 3 B),且随着 OGD 时间的延长上调幅度增大。以上结果提示 OGD 后星形胶质细胞内的内质网应激通路被激活。

### 2.4 给予 KCa3.1 通道抑制剂 TRAM-34 处理后 ERS 信号通路蛋白的表达

给予 1 μM 以及 10 μM 的 KCa3.1 通道抑制剂 TRAM-34 处理后检测 ERS 的信号通路的变化。结果显示,TRAM-34 处理后可以明显抑制由于 OGD 4 h 处理引起的 p-eIF-2α 的表达上调(1-10 μM:P<0.05,图 4 A),GRP78 的上调幅度也明显降低(1-10 μM:P<0.05,图 4 B),且在 control 情况下给予 TRAM-34 也可明显抑制 GRP78 的表达(1-10 μM:P<0.05,图 4 B)。结果提示抑制 KCa3.1 的表达可以降低 OGD 引起的 ERS 信号通路蛋白 p-eIF-2α 和 GRP78 的上调,减缓内质网应激。

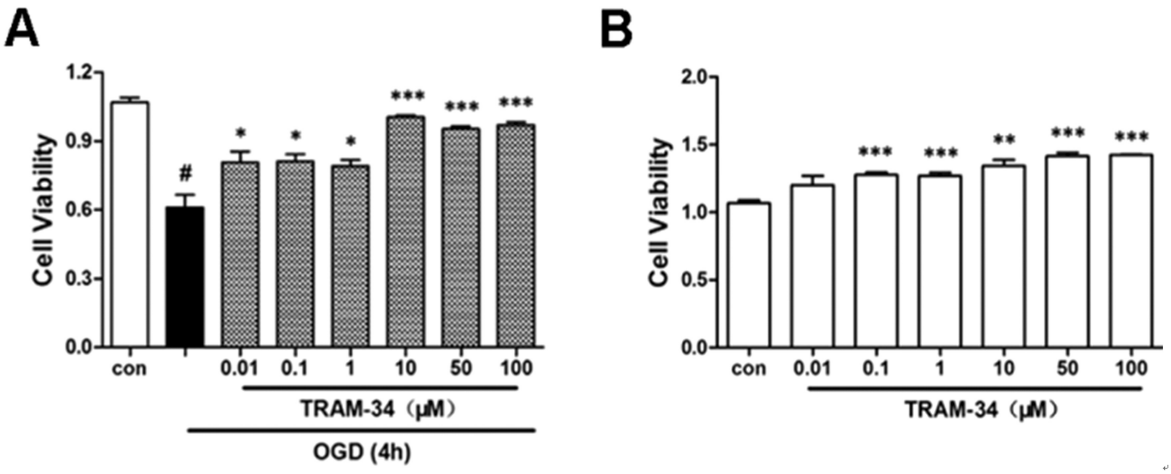


图 3 TRAM-34 给药后星形胶质细胞的细胞活力测定(A:# P<0.05 vs. 对照组;* P<0.05, *** P<0.001 vs. OGD 组. B: *** P<0.001 vs. 对照组)

Fig.3 Determination of cell viability in astrocytes treated with TRAM-34. (A:# P<0.05 vs. control group;* P<0.05, *** P<0.001 vs. OGD group. B: *** P<0.001 vs. control group)

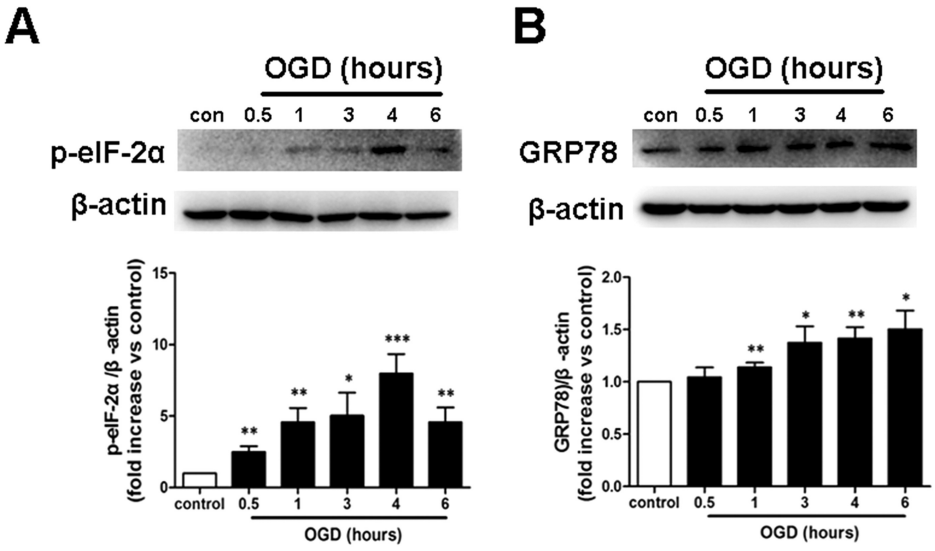


图 4 OGD 处理后星形胶质细胞 ERS 信号通路蛋白的表达(A:* P<0.05,** P<0.01, *** P<0.001 vs. 对照组;B: * P<0.05,** P<0.01 vs. 对照组)

Fig.4 Expression of ERS signal pathway protein in astrocytes subjected to OGD. (A:* P<0.05,** P<0.01, *** P<0.001 vs. control group;B: ** P<0.05,** P<0.01 vs. control group)

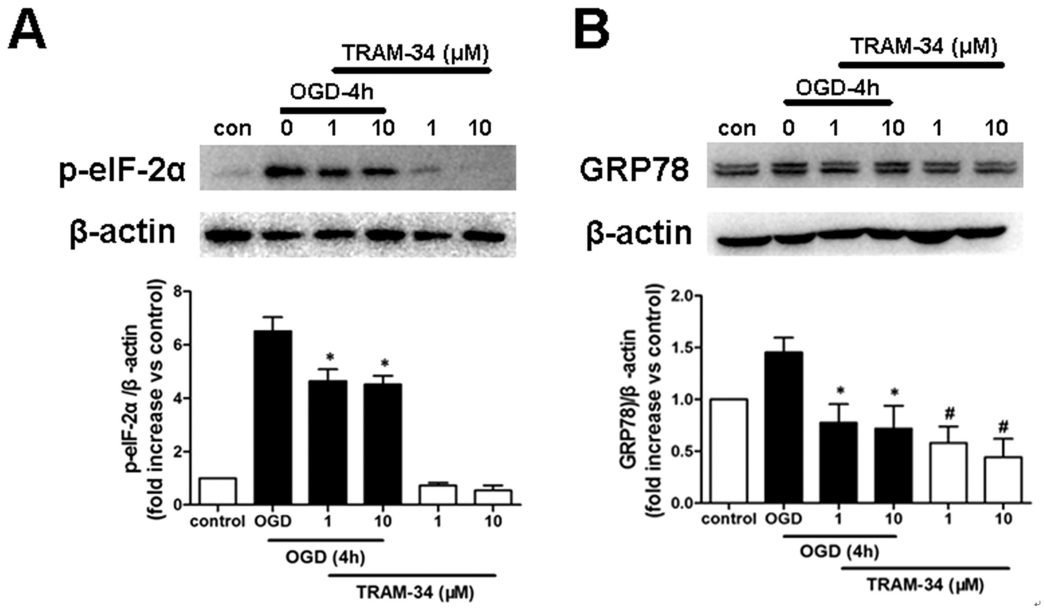


图 5 TRAM-34 给药后星形胶质细胞内 ERS 信号通路蛋白的表达(A:* P<0.05 vs. OGD 模型组.
B: * P<0.05 vs. OGD 模型组;# P<0.05 vs. 对照组)

Fig.5 Expression of ERS signaling protein in astrocytes treated with TRAM-34. (A:* P<0.05 vs. OGD group.
B: * P<0.05 vs. OGD group;# P<0.05 vs. control group)

## 3 讨论

本课题前期的研究已发现,在 AD[14,15]、脑创伤[13]后星形胶质细胞内 KCa3.1 的表达上调,并伴随有星形胶质细胞发生活化,基因敲除 KCa3.1 后星形胶质细胞的活化程度明显降低。在此研究基础上,本研究中通过构建原代星形胶质细胞糖氧剥夺(OGD)模型进一步考察 KCa3.1 在 OGD 诱导的星形胶质细胞内质网应激中的作用,为 KCa3.1 在脑缺血中的调控作用提供了理论依据。

内质网应激是指由于氧化还原平衡和管腔内 $Ca^{2+}$ 体内平衡被破坏,从而导致未折叠 / 错误折叠的蛋白质积累的内质网应答过程。内质网应激主要激活三条信号通路[2,18,19]。其中两条通路是未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)和内质网超负荷反应(endoplasmic reticulum-overload response, E-OR),两条均是蛋白质加工紊乱所致,第三条是固醇调节级联反应,是在内质网表面合成的胆固醇损耗所致。UPR 途径的目的是促进蛋白质折叠并恢复 ER 体内平衡;然而,如果没有实现体内平衡,当错误折叠或未折叠蛋白质的积累超过 ER 能力时,caspase-12 介导的细胞凋亡途径也会被激活,引起细胞死亡。大量研究表明:发生 ERS 的细胞能调节 ERS 相关性促凋亡分子如 CHOP[20]和 caspase-12[21]等和促存活分子如 GADD34 和 BiP[18]等的表达 / 活化,最终决定细胞是适应还是凋亡。脑缺血后,由于缺氧缺糖导致蛋白的错误折叠;以及由于受损组织产生一氧化氮、过氧化物自由基干扰蛋白二硫键的形成,造成蛋白错误折叠,均可引起 ERS[22]。已有研究发现,KCa3.1 可以通过调控内质网应激介导顺铂引起的 HK-2 细胞凋亡[23]。以上研究结果提示 KCa3.1 参与调节 ERS 的过程。

脑缺血后,KCa3.1 被激活,$K^+$ 大量外流引起膜的超级化作用,细胞膜的超级化为钙离子内流提供驱动力,膜内钙离子的升高又会持续性激活 KCa3.1,最终造成细胞膜内钙离子超载,ERS 信号通路的激活,引发一系列细胞级联反应。以往的研究发现 KCa3.1 参与调控了多种生理及病理情况下 ERS 通路。本研究发现 KCa3.1 参与调控 OGD 引起的 ERS 信号通路的激活。应用免疫荧光技术检测 OGD 处理后 KCa3.1 的表达变化,发现 OGD 处理后星形胶质细胞内 KCa3.1 的表达明显上调;利用 western blotting 技术检测 OGD 处理后星形胶质细胞内 ERS 信号通路的变化,结果显示 OGD 出理后星形胶质细胞内 ERS 信号通路蛋白 GRP78、p-eIF-2α 蛋白表达均显著性上调;给予 KCa3.1 的通道抑制剂后其 GRP78 以及 p-eIF-2α 的蛋白表达上调幅度较 OGD 模型组显著性减弱,这提示 KCa3.1 通道参与调控 OGD 引起的星形胶质细胞内 ERS 通路的激活。为了进一步验证 KCa3.1 在脑缺血中的作用机制,利用 cck-8 检测了星形胶质细胞在 OGD 处理后细胞活力的变化,实验结果发现星形胶质细胞在 OGD 处理后活力显著性降低,给予 KCa3.1 通道抑制剂 TRAM-34 可显著性提高 OGD 处理后星形胶质细胞的活力。目前已验证 KCa3.1 通道参与调控 OGD 处理后星形胶质细胞的 ERS 通路的激活,在以后的工作中,将利用 ERS 的抑制剂进一步考察其在星形胶质细胞活化的作用。同时目前对于 OGD 处理后 ERS 信号通路的变化是利用 KCa3.1 通道的抑制剂进行检测,在今后的研究中将进一步利用 KO 小鼠的原代星形胶质细胞检测其对信号通路和 GFAP 的影响。

综上所述,OGD 处理后诱导星形胶质细胞中内质网应激的发生,KCa3.1 参与了 OGD 诱导的原代星形胶质细胞内质网应激过程,为 KCa3.1 通道在脑缺血中的调控机制提供了理论依据,为以后 KCa3.1 作为临床脑中风新的治疗靶点提供了参

考依据。

## 参 考 文 献(References)


[1] Brouns R, De Deyn. PP The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2009, 111(6): 483-495

[2] Zhang L, Wang Y, Pandupuspitasari NS, et al. Endoplasmic reticulum stress, a new wrestler, in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(2): 722-735

[3] Neylon CB, Lang RJ, Fu Y, et al. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca (2+)-activated K (+) channel in vascular smooth muscle: relationship between K(Ca) channel diversity and smooth muscle cell function[J]. Circ Res, 1999, 85(9): e33-e43

[4] Yu Z, Yu P, Chen H, et al. Targeted inhibition of KCa3.1 attenuates TGF-beta-induced reactive astrogliosis through the Smad2/3 signaling pathway[J]. J Neurochem, 2014, 130(1): 41-49

[5] Wulff H, Knaus HG, Pennington M, et al. K+ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity[J]. J Immunol, 2004, 173(2): 776-786

[6] Wandall-Frostholm C, Dalsgaard T, Bajoriunas V, et al. Genetic deficit of KCa 3.1 channels protects against pulmonary circulatory collapse induced by TRPV4 channel activation [J]. Br J Pharmacol, 2015, 172 (18): 4493-4505

[7] Ferreira R, Schlichter LC. Selective activation of KCa3.1 and CRAC channels by P2Y2 receptors promotes Ca(2+) signaling, store refilling and migration of rat microglial cells [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62345

[8] Sukumaran P, Schaar A, Sun Y, et al. Functional role of TRP channels in modulating ER stress and Autophagy [J]. Cell Calcium, 2016, 60 (2): 123-132

[9] Zhu M, Zhou S, Huang Z, et al. Ca2+-Dependent Endoplasmic Reticulum Stress Regulates Mechanical Stress-Mediated Cartilage Thinning[J]. J Dent Res, 2016, 95(8): 889-896

[10] Sovolyova N, Healy S, Samali A, et al. Stressed to death - mechanisms of ER stress-induced cell death[J]. Biol Chem, 2014, 395 (1): 1-13

[11] Hiss DC, Gabriels GA. Implications of endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and apoptosis for molecular cancer therapy. Part I: targeting p53, Mdm2, GADD153/CHOP, GRP78/BiP and heat shock proteins [J]. Expert Opin Drug Discov, 2009, 4(8): 799-821

[12] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta[J]. Nature, 2000, 403(6765): 98-103

[13] Yi M, Dou F, Lu Q, et al. Activation of the KCa3.1 channel contributes to traumatic scratch injury-induced reactive astrogliosis through the JNK/c-Jun signaling pathway [J]. Neurosci Lett, 2016, 624: 62-71

[14] Yi M, Yu P, Lu Q, et al. KCa3.1 constitutes a pharmacological target for astrogliosis associated with Alzheimer's disease [J]. Mol Cell Neurosci, 2016, 76: 21-32

[15] Wei T, Yi, M, Gu, W, et al. The Potassium Channel KCa3.1 Represents a Valid Pharmacological Target for Astrogliosis-Induced Neuronal Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease [J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 528

[16] Sun S, Chen G, Xu M, et al. Differentiation and migration of bone marrow mesenchymal stem cells transplanted through the spleen in rats with portal hypertension[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83523

[17] Huang W, Lv B, Zeng H, et al. Paracrine Factors Secreted by MSCs Promote Astrocyte Survival Associated With GFAP Downregulation After Ischemic Stroke via p38 MAPK and JNK [J]. J Cell Physiol, 2015, 230(10): 2461-2475

[18] Cui FF, Pan YY, Dai YL, et al. Effects of endoplasmic reticulum stress related proteins and their mediated apoptosis in the formation of deep tissue injury of pressure ulcer in rats [J]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi, 2013, 29(5): 448-453

[19] Yu Y, Sun G, Luo Y, et al. Cardioprotective effects of Notoginsenoside R1 against ischemia/reperfusion injuries by regulating oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress- related signaling pathways[J]. Sci Rep, 2016, 6: 21730

[20] Gao J, Zhang Y, Yu C, et al. Spontaneous nonalcoholic fatty liver disease and ER stress in Sidt2 deficiency mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 476(4): 326-332

[21] Zhang Q, Liu J, Chen S, et al. Caspase-12 is involved in stretch-induced apoptosis mediated endoplasmic reticulum stress [J]. Apoptosis, 2016, 21(4): 432-442

[22] Gotoh T, Mori M. Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(7): 1439-1446

[23] Chen CL, Liao JW, Hu OY, et al. Blockade of KCa3.1 potassium channels protects against cisplatin-induced acute kidney injury [J]. Arch Toxicol, 2016, 90(9): 2249-2260