

· 论 著 ·

CD147 超表达对 γ 分泌酶影响的临床研究*张锦巍, 井丽娟, 孙亚平, 李 聪, 董贵成[△]

(内蒙古科技大学包头师范学院, 内蒙古包头 014030)

摘要:目的 探讨 CD147 在小鼠胚胎成纤维细胞中超表达对 γ 分泌酶活性的影响。方法 CD147 cDNA 转染敲除淀粉样前体蛋白表达基因的小鼠胚胎成纤维细胞系, 以梯度浓度 G418 筛选 CD147 表达量最高的细胞, 并提取实验组样本 E1、E2 及 IPE2 和对照组 C1、C2 和 IPC2 中 γ 分泌酶复合物。蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 CD147 的表达量, 酶联免疫吸附测定(ELISA)分析样品 A β 40 和 A β 42 的产量。结果 样本 E1、E2 及 IPE2 中 CD147 表达量较相应对照组样本 C1、C2 和 IPC2 分别上升(11.0±5.5)%($P=0.08$), (28.2±9.1)%($P<0.01$)及(50.0±9.8)%($P<0.002$), γ 分泌酶活性分别下降(61.8±3.0)%($P=0.25$), (82.9±5.0)%($P<0.001$), (190±7)%($P<0.001$)。结论 CD147 是 γ 分泌酶复合物的负调控因子。

关键词:阿尔茨海默病; 抗原, CD147; γ 分泌酶; DNA 超表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.36.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)36-3801-03

Effect of over expressed CD147 on γ -secretase*Zhang Jinwei, Jing Lijuan, Sun Yaping, Li Cong, Dong Guicheng[△]

(Baotou Teachers' College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014030, China)

Abstract: Objective Construct the model of CD147 over-expression and research the effect of CD147's over expression in mouse embryonic fibroblasts [APP knockout mouse embryonic fibroblasts MEF(KO)] on γ -secretase. Methods MEF(KO) with the amyloid precursor protein gene knockout was transfected with CD147 cDNA. Use the G418 to choose the cells with the most expressed CD147, and then extract γ -secretase from E1, E2 and IPE2 in the experiment group and C1, C2 and IPC2 in the control group. The protein levels of CD147 were detected by Western blotting, the output of A β 40 and A β 42 were detected by ELISA. Results Compared with C1, C2 and IPC2, the protein levels of CD147 in E1, E2 and IPE2 were respectively increased by (11.0±5.5)%($P=0.08$), (28.2±9.1)%($P<0.01$) and (50.0±9.8)%($P<0.002$). However, activity of γ -secretase was respectively declined by (61.8±3.0)%($P=0.25$), (82.9±5.0)%($P<0.001$) and (190±7)%($P<0.001$). Conclusion CD147 is a negative regulator of the γ -secretase complex.

Key words: Alzheimer disease, antigens, CD147; γ -secretase; DNA transfection

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是神经系统进行性退行性疾病, 临床特征表现为高级认知功能、记忆功能障碍和行为异常等^[1]。主要病理改变包括大脑皮层和海马区胞外老年斑沉积和胞内神经纤维缠结, 老年斑块的主要成分是淀粉样蛋白 A β 40 和 A β 42^[2-4]。 γ 分泌酶切割底物 C99 生成强自聚性的 A β , γ 分泌酶是产生 A β 的最后一步也是限速步骤。因此, 研究 γ 分泌酶的活性调控因子, 对于寻找 AD 的治疗药物有一定指导和借鉴意义。

γ 分泌酶由 PS、NCT、APH 及 Pen2 四大核心部分组成的具有复杂空间结构和一定活性中心的复合物^[5-7], 主要参与 APP 和 Notch 等重要跨膜蛋白的切割。可切割 APP 经 β -分泌酶切割的产物 C99 而生成多种 A β ^[8]。

CD147 是一种高度糖基化的球蛋白, 编码基因位于人 19 号染色体编码 269 个氨基酸^[9]。CD147 在体内分布广泛, 同时表现为高糖型 CD147[相对分子质量为(40~66)×10³]和低糖型 CD147[相对分子质量为 33×10³]。本文通过 CD147 cDNA 转染 MEF(KO), 以研究其对 γ 分泌酶活性的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料 MEF(KO)由康斯坦茨大学提供、FBS、MEF、脂质体转染培养基、G418、CD147 cDNA、胰酶、混合型酶抑制剂、CHAPSO、预清洁 ProteinG Beads、载有 PS-1 抗体的 ProteinA Beads、CD147 一抗、CD147 二抗、PVDF 膜、ECL 试剂、底物

C99、A β peptide40 与 A β 42 的酶联免疫吸附测定(ELISA)反应试剂盒、CO₂ 培养箱、转膜仪、显微镜等。

1.2 方 法

1.2.1 选择生长活力强的细胞 将 MEF(KO)在 100 mm×20 mm 的平板上培养成为几个梯度。选择 36 h 内覆盖率达 70%~90%的进行下一步实验。

1.2.2 CD147 cDNA 转染 (1)吸取 CD147 cDNA 25 μ g 加入到 1 mL OPTI-MEM 低血清培养基混匀, 记做 A, 室温静置 10 min。(2)吸取脂质体 60 μ L 加入到 1 mL OPTI-MEM 低血清培养基混匀, 记作 B, 室温下静置 10 min。(3)将上述 A、B 溶液混合均匀, 室温静置 15 min。(4)吸出 MEF(KO)细胞培养平板的 MEF, 用未加抗菌药物的选择培养基洗涤 3 次。(5)将 A、B 混合溶液加入覆盖 80%~90%的平板并再加 8 mL 选择培养基。(6)培养 12 h 以后换成不含抗生素含 10%FBS 的 MEF。(7)培养 36 h 后将 1 个平板的细胞分成 2 个平板进行培养。(8)培养 72 h 后可进行第 2 次转染, 方法同上。(9)96 h 后收集经过 CD147 cDNA 转染的细胞。(10)转染后的细胞进行蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测。

1.2.3 G418 筛选 CD147 超表达转染细胞 配制梯度浓度分别为 150、300、600、1 200 mg/mL, 以确定 G418 的最佳筛选浓度。将 CD147 cDNA 转染后的细胞接种到含 G418 的培养基中, 24 h 后吸出上浮死掉的细胞, 并再次更换培养, 10~15 d

表 1 CD147 的表达量($\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\mu\text{L}, n=9$)

组别	MEF(KO)细胞培养 10 d 后 CD147 的表达量									
C1	31.6±0.5	33.5±0.3	29.7±0.2	27.4±0.1	28.3±0.3	31.3±0.2	30.4±0.3	28.5±0.4	32.4±0.1	
E1	34.9±0.7	36.7±0.6	34.1±0.7	30.0±0.5	31.5±0.6	34.4±0.5	34.0±0.4	32.6±0.3	31.7±0.3	
C2	35.1±0.2	34.5±0.9	33.9±0.4	32.8±0.2	33.6±0.3	31.0±0.4	32.5±0.5	32.6±0.2	32.9±0.2	
E2	44.7±0.2	45.3±0.4	42.7±0.3	41.6±0.2	42.5±0.2	39.8±0.4	44.2±0.5	42.3±0.4	42.4±0.1	
IPC2	45.3±0.9	48.0±0.5	46.6±0.4	47.2±0.3	44.8±0.7	46.3±0.9	47.7±0.5	49.0±0.4	44.9±0.7	
IPE2	67.7±0.9	70.0±0.8	69.1±0.7	69.7±0.6	67.3±0.5	69.3±0.4	69.5±0.3	70.0±0.2	67.4±0.1	

表 2 A β 40 和 A β 42 的生成量总含量($\bar{x} \pm s, \text{pg}/\text{mL}, n=9$)

组别	样本与 C99 反应 7 h 生成的 A β 40 和 A β 42 的总含量									
C1	380.0±5.0	375.0±6.0	360.0±5.0	385.0±7.0	370.0±3.0	368.0±2.0	366.0±6.0	379.0±7.0	371.0±5.0	
E1	145.0±3.0	140.0±4.0	139.0±3.0	142.0±5.0	147.0±2.0	143.0±1.0	141.0±3.0	140.0±6.0	138.0±4.0	
C2	175.0±3.0	177.0±3.0	168.0±2.0	173.0±2.0	175.0±1.0	170.0±6.0	180.0±5.0	175.0±3.0	172.0±2.0	
E2	35.0±1.0	35.0±2.0	29.0±3.0	33.0±4.0	30.0±2.0	34.0±3.0	31.0±2.0	34.0±2.0	32.0±3.0	
IPC2	125.0±4.0	124.0±3.0	126.0±3.0	120.0±2.0	121.0±2.0	124.0±3.0	126.0±4.0	123.0±5.0	120.0±3.0	
IPE2	25.0±1.0	26.0±2.0	24.0±3.0	25.0±1.0	21.0±2.0	27.0±1.0	24.0±3.0	28.0±3.0	27.0±2.0	

后将细胞移至 96 孔板扩大培养。15 d 后用胰蛋白酶溶解处理细胞,移至皿中培养,并加入含 G418 的培养液,10 d 后收集细胞,用于 Western blotting,以筛选 CD147 最高表达的细胞。

1.2.4 收集细胞并分离纯化蛋白 处理实验组(E)和对照组(C)细胞,并收集纯化含 γ 分泌酶的样本:(1)细胞破碎制备全蛋白 C1 和 E1;(2)加入 CHAPSO 彻底溶解后,超速离心制备 C2 和 E2;(3)用 PS-1 抗体纯化 C2 或 E2 制备 IPC2 和 IPE2。实验步骤:将 E 组和 C 组的细胞分别收集到 2 mL 的离心管,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,13 000 r/min 4 °C 离心 2 min 去液。加入 0.5 mL 匀浆缓冲液后,用细胞破碎针头破碎 40~50 次,3 000 r/min 离心 5 min。取 0.5 mL 上清液,加入 0.5 mL 匀浆缓冲液,再破碎一次,保留上清液 1 mL,分别取上清液 0.2 mL,记为 E1 或 C1,加入 CHAPSO 的 HEPES buffer 备用,将剩余上清液 0.8 mL 移入超速离心管,50 000 r/min 离心 60 min,以沉淀蛋白,加入含 1% CHAPSO 的 HEPES buffer 0.2 mL。混合物于 4 °C 空摇 90 min,35 000 r/min 离心 30 min,取 0.2 mL 上清液,分别记为 E2 或 C2。在所剩 0.8 mL 上清液中,加入 30 μL ProteinG Beads,经 4 °C 摇动 90 min,然后 13 000 r/min 离心 2 min,以弃除 ProteinG Beads。上清液中加入 2 μL PS1 抗体与 30 μL ProteinA Beads,置于垂直混合旋转器上于 4 °C 放置 24 h 经 13 000 r/min 离心 2 min 得 ProteinA Beads,用含 CHAPSO 的 HEPES buffer 清洗 4 次。吸附在 ProteinA Beads 上的蛋白即为 γ 分泌酶复合物,分别记为 IPC2 和 IPE2。Western blotting 分析 C1、E1、C2、E2、IPC2、IPE2 中 CD147 的量。

1.2.5 ELISA 分析样品 C1、E1、C2、E2、IPC2 及 IPE2 中 γ 分泌酶复合物活性 取上述样本 E1、C1、E2 或 C2 0.1 mL(蛋白浓度 1.5 mg/mL),加入 3 μL 底物 C99(终浓度 0.5 $\mu\text{mol/L}$),于 37 °C 反应 7 h。将 100 μL 含 CHAPSO 的 HEPES buffer,3 μL C99 加入 IPE2 和 IPC2 中于 37 °C 进行同样反应 7 h。将上述反应液 50 μL 以及 A β 40 与 A β 42 的标准品分别加酶标板中,加一抗 50 μL 于 37 °C 孵育 4 h。将上清液吸出,洗脱 3 次后,加入已配好的二抗稀释液 150 μL 37 °C 反应 60 min。再一次将上清液吸出,洗脱 4 次。然后加入稳定发色液 150 μL 37 °C 放置 60 min,加入等量的终止液。混匀后测产物。

1.3 统计学处理 采用 Western blotting 及 ELISA 所得数据分别来自 9 次独立实验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间计量数据的比较采

用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Western blotting 分析 CD147 表达量 实验组 E1、E2 及 IPE2 中 CD147 表达量较相对对照组样本 C1、C2 和 IPC2 分别上升(11±5.5)%,差异无统计学意义($P=0.08$),上升(28.2±9.1)%,差异有统计学意义($P < 0.01$)及上升(50.0±9.8)%,差异有统计学意义($P < 0.002$),见表 1。

2.2 ELISA 分析 A β 40 和 A β 42 的生成量 实验组所得 E1、E2 及 IPE2 与饱和浓度底物 C99 反应生成的 A β 40 和 A β 42 总量均明显低于同样方法从对照组细胞制备所得样本 C1、C2 及 IPC2。参照样本 C1、C2 及 IPC2,经 CD147 转染,样本 E1、E2 及 IPE2 中所含 γ 分泌酶活性分别降低(61.8±3)%,差异无统计学意义($P=0.25$),降低(82.9±5)%,差异有统计学意义($P < 0.001$),降低(190±7)%,差异有统计学意义($P < 0.001$)。比较对照组样本 C1、C2 及 IPC2,在相同的条件下,样本 IPE2 催化生成的短肽 A β 40 和 A β 42 含量最低,见表 2。

2.3 经 CD147 超表达处理后 MEF(KO)中 CD147 表达情况 见图 1。

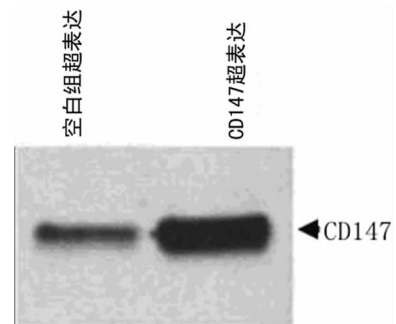


图 1 CD147 超表达后蛋白质 Western blotting 分析结果

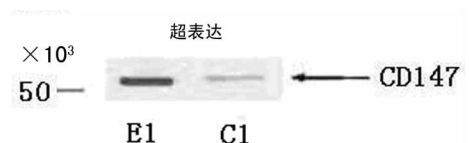


图 2 C1 和 E1 中 CD147 蛋白质含量的 Western blotting 分析结果

2.4 C1、C2 和 E1、E2 中 CD147 蛋白质含量的 Western blot-

ting 分析结果 CD147 cDNA 超表达后实验组 CD147 表达量增加,见图 2、3。

2.5 IPC2 和 IPE2 中 CD147 蛋白质含量的 Western blotting 分析结果 C2 与 E2 经 PS-1 特异性抗体免疫沉淀所得 IPC2 和 IPE2, γ 分泌酶复合物得到进一步纯化,见图 4。

2.6 ELISA 检测样本中所含 γ 分泌酶活性 随着 CD147 的表达的进一步增加, $A\beta$ 的表达量减少,可知 γ 分泌酶活性随 CD147 表达量增高而负增长,见图 5。

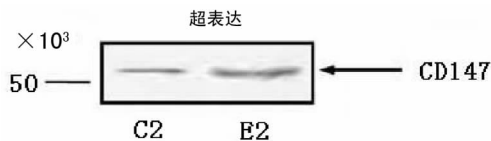


图 3 C2 和 E2 中 CD147 蛋白质含量的 Western blotting 分析结果

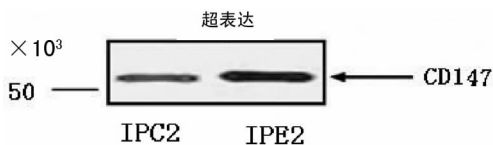


图 4 IPC2 和 IPE2 中 CD147 蛋白质含量的 Western blotting 分析结果

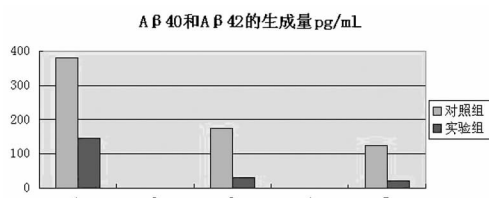


图 5 ELISA 检测样本 (C1、E1、C2、E2、IPC2 和 IPE2) 中所含 γ 分泌酶活性

3 讨 论

由于 γ 分泌酶切割 C99 是生成 $A\beta$ 的最后一步也是限速步骤^[10],所以近期对 γ 分泌酶抑制剂的研究一直是个热点,同时也是个难点。突出表现为抑制剂选择性差。首先,淀粉斑块是以 $A\beta_{42}$ 为核心,周围聚集 $A\beta_{40}$ 。 $A\beta_{42}$ 极难溶解,但占 $A\beta$ 的比例很小,而 $A\beta_{40}$ 是可溶的且还有其他未知的作用^[11-12]。而选择性差的抑制剂对于抑制 $A\beta_{40}$ 的生成作用强于 $A\beta_{42}$ 。其次, γ 分泌酶在作用 APP 的同时也作用其他神经递质,一旦生成或分解受阻,就会引起神经系统中毒,其不良反应远远大于预期结果。现阶段, γ 分泌酶抑制剂主要包括抑制 γ 分泌酶解 APP 和抑制 PS 蛋白酶,实际上只是当作工具药来研究酶本身的结构和功能^[13]。选择性、稳定性、血脑屏障的穿越和细胞摄取等,都是研究抑制剂所必须考虑的。

既然 $A\beta_{42}$ 占 $A\beta$ 总量的比例很小,只要使 γ 分泌酶的活性降低一定的值,就能相对减少 $A\beta_{42}$ 的生成量,达到理想的效果。如果抑制剂本身就是 γ 分泌酶复合体的组成成分且能调控 γ 分泌酶的活性,以上的一切问题就迎刃而解了。

研究证明蛋白 CD147 能够调节导致淀粉样斑块的产生^[14-15]。利用靶向的 RNA 沉默细胞中的 CD147,而 γ 分泌酶的组成亚基以及淀粉样前体蛋白都不受这种沉默的影响。当 CD147 被沉默时, $A\beta$ 的产量显著增加了。

本实验通过第一步 Western blotting 检测 CD147 蛋白的表达量,证明超表达细胞模型构建成功。第二步的数据显示超

表达细胞模型可稳定、高效的表达目的蛋白。第三步 CHAP-SO 溶解膜蛋白复合物、超速离心使 CD147 得到了纯化,证明 CD147 和跨膜蛋白结合紧密。特异性 PS1 抗体沉淀,使样品进一步纯化,说明 CD147 可能是 γ 分泌酶的调控亚基。为进一步研究其对 γ 分泌酶活性的影响奠定了基础。

ELISA 分析表明,随着 CD147 的表达量增高, $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 的产量下降,证明 CD147 是 γ 分泌酶的负调控因子。

参考文献:

- [1] Kaether C, Haass C, Steiner H. Assembly, trafficking and function of gamma-secretase[J]. Neurodegener Dis, 2006, 3(4/5):275-283.
- [2] Kodam A, Vetrivel KS, Thinakaran G, et al. Cellular distribution of γ -secretase subunit nicastrin in the developing and adult rat brains. [J] Neurobiol Aging, 2008, 29(5): 724-738.
- [3] Xu GW, Wang JP, Huang XM. Assembly of γ -secretase for production of β -amyloid. [J] Chinese Bulletin of Life Sciences, 2007, 19(2): 214-219.
- [4] Lazarov VK, Fraering PC, Ye W, et al. Electron microscopic structure of purified, active gamma-secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(18): 6889-6894.
- [5] Wolfe MS. The gamma-secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble [J]. Biochemistry, 2006, 45(26): 7931-7939.
- [6] Siemers ER, Dean RA, Friedrich S, et al. Safety, tolerability, and effects on plasma and cerebrospinal fluid amyloid- β after inhibition of γ -secretase. [J] Clin Neuropharmacol, 2007, 30(6): 317-325.
- [7] Wolfe MS. Inhibition and modulation of γ -secretase for Alzheimer's disease. [J] Neurotherapeutics, 2008, 5(3): 29-32.
- [8] 梁平, 潘阳杏. 早老素 1 基因在转染 CHO 细胞中的表达及其与 γ -分泌酶的关系 [J]. 中华病理学杂志, 2005, 34(5): 297.
- [9] 黄灵芝, 王宇玲. CD147 的研究进展 [J]. 生物技术通讯杂志, 2007, 18(3): 472-473.
- [10] 陈新平, 陈彪. 阿尔茨海默病病因学及发病机制研究进展 [J]. 中国现代神经疾病杂志, 2005, 5(3): 152-155.
- [11] Hutter-Paier B, Huttunen HJ, Pugielli L, et al. The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Neuron, 2004, 44(2): 227-238.
- [12] Zimmermann M, Gardoni F, DiLuca M. Molecular rationale for the pharmacological treatment of Alzheimer's disease [J]. Drugs Aging, 2005, 22 Suppl: 27-37.
- [13] Hoyer A, Bardenheuer HJ, Martin E, et al. Amyloid precursor protein (APP) and its derivatives change after cellular energy depletion [J]. Neural Transmission, 2005, 112(2): 239-253.

本研究结果显示, B 组大鼠烧伤后 CK 和 LDH 12 h 即达峰值, AST 24 h 达峰值, 随后逐渐下降。而给予 Gly 后心肌酶谱升高程度明显低于 B 组, 提示 Gly 能有效阻止酶的漏出, 减轻心肌细胞的进一步损伤。其机制可能是: Gly 通过维护细胞膜稳定性, 防止心肌重要酶类流失, 维护细胞能量代谢。血清 CK、AST 和 LDH 均为细胞内的酶类, 参与细胞的正常代谢过程, 在一定程度上其漏出多少可反映组织、细胞的损伤程度。CK 位于线粒体内, 是线粒体三磷酸腺苷(ATP)产生、利用、转换和贮存的关键酶; LDH 催化糖酵解产物丙酮酸与乳酸相互转化以保证细胞内能量代谢的正常进行; AST 催化谷氨酸与草酰乙酸之间的转氨作用, 对于谷氨酰胺的代谢具有重要意义。烧伤后细胞代谢状态异常, 糖酵解产物乳酸的堆积和脂质过氧化损伤等原因引起心肌细胞膜通透性升高, 促使酶从细胞内释放进入血循环, 胞内重要酶的丢失导致细胞能量代谢障碍^[6-7]。而 Gly 可以防止 ATP 耗竭引起的细胞膜通透性增加, 抑制磷脂酶 A2 的激活, 防止细胞膜降解从而保护细胞膜完整性。

本研究采用的心肌力学指标主要包括 AOSP、AODP、LVSP 和 +dp/dtmax。其中 AOSP 和 AODP 主要反映心脏压力后负荷状态和外周血管阻力情况, LVSP 反映心肌最大收缩力, +dp/dtmax 则反映心肌最大收缩速度。本研究结果提示, 伤后 12 h AODP 即处于较低水平, 24 h 达谷底; AOSP 随时相持续下降, 48 h 达谷底并开始升高, 但 72 h 仍较低; LVSP 随时相下降程度进行性加重, 72 h 达谷底; +dp/dtmax 随时相持续下降, 72 h 达最低。而给予 Gly 后烧伤大鼠心肌力学指标下降程度均有所缓解, 提示 Gly 能减轻心肌细胞的损害, 维护心肌收缩力。其可能机制为: (1) 维护心肌细胞膜稳定性。大鼠心肌细胞可能存在 Gly 受体^[8], Gly 与受体结合后稳定了心肌细胞膜电位, 减轻心肌细胞钙离子超载, 进而维护细胞膜的稳定性^[9-10]。(2) 改善心肌细胞能量代谢。高能磷酸化合物作为细胞直接能量物质影响心肌细胞的活性和收缩功能, 烧伤后由于心肌血流灌注不足导致心肌缺血缺氧, 再灌注时心肌组织产生大量的活性自由基可以直接攻击线粒体蛋白巯基, 影响线粒体氧化代谢, 导致烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)减少, ATP 合成障碍^[11]。此外, 缺氧状态下, 心肌细胞在无氧酵解代偿能量代谢障碍的过程中会使得代谢产物乳酸的堆积, 造成细胞进一步损伤^[12]。本研究前期显示, 严重烧伤大鼠给予 Gly 后乳酸含量明显降低, 同时 ATP 明显增加。

烧伤早期即出现心肌损害, 心肌收缩功能受抑, 泵血能力下降导致有效循环血量减少, 从而诱发或加重休克, 进一步造成全身其他组织器官缺血缺氧性损害。本研究表明, Gly 能减轻烧伤后心肌损害, 改善心肌能量代谢, 维护心肌收缩功能。

参考文献:

- [1] Zhong Z, Wheeler MD, Li X, et al. L-Glycine: a novel anti-inflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003, 6(2): 229-240.
- [2] Qi RB, Zhang JY, Lu DX, et al. Glycine receptors contribute to cytoprotection of glycine in myocardial cells[J]. *Chin Med J*, 2007, 120(10): 915-921.
- [3] 陈梦飞, 陆大祥, 戚仁斌, 等. 甘氨酸脂质体对心肌细胞线粒体膜电位及凋亡的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(7): 1254-1258.
- [4] Huang YS, Yang ZC, Yan BG, et al. Pathogenesis of early cardiac myocyte damage after severe burns[J]. *J Trauma*, 1999, 46(3): 428-432.
- [5] Lopaschuk G. Regulation of carbohydrate metabolism in ischemia and Reperfusion[J]. *Am Heart J*, 2000, 139(2 Pt 3): 115-119.
- [6] 方华, 李昌熙, 王泉云, 等. 体外循环中应用吡咯烷二硫氨基甲酸酯对犬心肌能量代谢的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(8): 1387-1390.
- [7] 周军利, 黄跃生, 党永明, 等. 甘氨酸对缺血缺氧心肌细胞能量代谢的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2008, 8(6): 1093-1095.
- [8] 赵雪, 陆大祥, 戚仁斌, 等. 甘氨酸受体在甘氨酸抗心肌细胞缺氧/复氧损伤中的作用机制研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(11): 2113-2118.
- [9] 唐昱. 热休克蛋白 70 与心肌保护的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2006, 27(11): 1028-1030.
- [10] Kuzumoto M, Takeuchi A, Nakai H, et al. Simulation analysis of Intracellular Na⁺ and Cl⁻ homeostasis during beta1 adrenergic stimulation of cardiac myocyte[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2008, 96(1/3): 171-186.
- [11] Lee HL, Chen CL, Steve T, et al. Biphasic modulation of the mitochondrial electron transport chain in myocardial ischemia and reperfusion[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 302(7): 1410-1422.
- [12] 刘媛媛, 辛武, 周婷. 烧伤患者心肌酶谱的结果分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(5): 624.

(收稿日期: 2012-07-09 修回日期: 2012-09-22)

(上接第 3803 页)

- [14] 陈翔, 颜克香. CD147 siRNA 表达载体的构建与鉴定[J]. *中华皮肤科杂志*, 2006, 38(6): 368-369.
- [15] Kirk P, Wilson MC, Heddle C, et al. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and

facilitates their cell surface expression[J]. *EMBO*, 2000, 19(15): 3896-3904.

(收稿日期: 2012-07-09 修回日期: 2012-08-30)