·论　著·

栝楼桂枝颗粒对神经元兴奋性毒性损伤后钙信号通路的影响

张玉琴，樊李明，王宏运，李煌，南丽红，徐伟，褚克丹*(福建中医药大学药学院，福州 350122)

摘要：目的　研究栝楼桂枝颗粒对 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(*N*-methyl-*D*-aspartic acid，NMDA)诱导神经元兴奋性毒性损伤后钙信号通路的影响，并探讨其可能的机制。**方法**　建立 NMDA 诱导神经元兴奋性毒性损伤模型，栝楼桂枝颗粒干预后，采用 MTT、LDH 法检测神经元活性，免疫荧光染色法检测神经元特异性指标 MAP-2 蛋白的表达。Real-time PCR 法检测神经元中 CaMKII、CREB mRNA 的表达，Western blot 法检测 p-CREB、p-CaMKII、CaMKII、CREB 及 CaM 蛋白的表达。**结果**　与 NMDA 组比较，栝楼桂枝颗粒(200，300 μg·mL^{-1})组可显著提高细胞活力，降低 LDH 浓度(P<0.05 或 P<0.01)，明显升高 CREB、CaMKII mRNA 水平(P<0.05 或 P<0.01)，明显升高 MAP-2、p-CREB、p-CaMKII 及 CREB 水平(P<0.01)，而显著降低 CaM 水平(P<0.01)。**结论**　栝楼桂枝颗粒对 NMDA 诱导的神经元兴奋性毒性损伤具有保护作用，此作用可能与促进 CREB、CaMKII 的磷酸化，抑制 CaM 的表达有关。

关键词：栝楼桂枝颗粒；*N*-甲基-*D*-天冬氨酸；CREB；CaMKII；CaM
中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2019)11-1317-05
DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.11.001
引用本文：张玉琴, 樊李明, 王宏运, 等. 栝楼桂枝颗粒对神经元兴奋性毒性损伤后钙信号通路的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(11): 1317-1321.

Effect of Gualou Guizhi Granule on Calcium Signaling Pathway after Excitotoxicity Injury of Neurons

ZHANG Yuqin, FAN Liming, WANG Hongyun, LI Huang, NAN Lihong, XU Wei, CHU Kedan* (*Pharmacy College of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE　To study the effect of Gualou Guizhi granule on the calcium signal pathway in *N*-methyl-*D*-aspartic acid(NMDA)-induced neuronal excitability toxicity, intend to illustrate its possible mechanism. **METHODS**　The excitotoxicity damage model of neurons induced by NMDA was established. The activity of neuron was detected by MTT and LDH, and the expression of MAP-2 protein was detected by immunofluorescence staining after administering with the Gualou Guizhi granule. Real-time PCR was used to detect the expression of CaMKII and CREB in neurons. And the expression of p-CREB, p-CaMKII, CaMKII, CREB and CaM protein were detected by Western blot. **RESULTS**　Compared with NMDA group, Gualou Guizhi granule (200，300 μg·mL^{-1}) group significantly increased cell viability and decreased LDH concentration (P<0.05 or P<0.01), significantly increased the mRNA levels of CREB and CaMKII(P<0.05 or P<0.01), significantly increased the levels of MAP-2, p-CREB, p-CaMKII and CREB(P<0.01), and significantly decreased CaM level(P<0.01). **CONCLUSION** Gualou Guizhi granule have protective effect on the excitotoxicity damage induced by NMDA, which may be related to the phosphorylation of CREB and CaMKII and the inhibition of the expression of CaM.
KEYWORDS: Gualou Guizhi granule; *N*-methyl-*D*-aspartic acid(NMDA); CREB; CaMKII; CaM

N-甲基-*D*-天冬氨酸(*N*-methyl-*D*-aspartic acid，NMDA)是脑内的一种兴奋性氨基酸，其诱导神经元凋亡在脑缺血、神经变性等神经元损伤中发挥重要作用。研究表明[1-3]，由缺氧、缺血造成的脑部损伤可以引起兴奋性神经递质的过度释放，从而使突触后膜处于一种持续性去极化状态，造成大量钙离子内流，引发细胞内一系列钙离子的生化反应，导致神经细胞凋亡。钙信号通路在细胞存活、增殖、代谢中起到了至关重要的作用，其作用机制为 Ca^{2+}进入细胞内，与 CaM 结合形成 Ca^{2+}-CaM，活化 CaMKII[4]。磷酸化的 CaMKII 可以直接活化 CREB，进一步调节细胞骨架蛋白和突触蛋白合成，CREB 通过磷酸化激活下游抗凋亡蛋白，减弱神经元凋亡，促进神经元形成。

基金项目：国家自然科学基金项目(81803768，81674046)；福建省卫生计生科研人才项目(2017-1-71)；福建省教育厅资助省属高校科研专项(JK2017023)
作者简介：张玉琴，女，博士，讲师　Tel: (0591)22861135　E-mail: zyqfj@hotmail.com　***通信作者：**褚克丹，女，教授　Tel: (0591)22861661　E-mail: 2008002@fjtcm.edu.cn

课题组及文献[5-8]报道，栝楼桂枝汤在临床上对中风患者的运动功能、痉挛状态以及日常活动能力均有明显的改善作用，疗效良好。同时课题组前期研究[9-10]发现，栝楼桂枝汤能够提高脑缺血再灌注损伤大鼠的网屏抓握能力及肌力、H-反射，抑制兴奋性氨基酸(谷氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸)的释放，改善脑缺血再灌注损伤大鼠的痉挛状态。同时研究[11-14]发现，栝楼桂枝汤能够抑制神经元凋亡，抑制谷氨酸、NMDA 诱导的兴奋性毒性损伤。其相关制剂——栝楼桂枝颗粒(批件号：2013S0001)也经批准为福建省第二人民医院院内制剂，但其作用机制尚不明确。因此，本实验建立 NMDA 诱导神经元兴奋性毒性损伤模型，根据前期研究结果[14]，选取 3 个浓度(100，200，300 μg·mL^{-1})栝楼桂枝颗粒，研究其对 NMDA 诱导神经元兴奋性毒性损伤后钙信号通路的影响，探讨其作用机制，为栝楼桂枝颗粒临床治疗缺血性脑卒中提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

EVOS FL 倒置荧光数码显微镜(美国 AMG 公司)；Infinite M200 Pro 多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司)；ChemiDoc XRS+凝胶成像分析系统、C1000 PCR 扩增仪均来自美国 Bio Rad 公司；7900HT 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2 试剂

栝楼桂枝颗粒(福建中医药大学附属第二人民医院药学部，批号：20160809)；0.2%木瓜蛋白酶(Sigma，货号：LS003119)；Neurobasal® medium(货号：211030490)、B-27® serum-free supplement(货号：17504-044)、100×GlutaMAXTM-1(货号：35050-061)均购自 Life technologies；MAP-2 antibody(Santa Cruz，货号：sc-74421)；mouse anti-goat IgG-FITC(北京中杉金桥有限公司，货号：ZF-0311)；NMDA(Sigma，货号：M3262)；乳酸脱氢酶试剂盒(碧云天生物技术有限公司，货号：C0017)；CaMKII(Abcam，货号：Ab22609)；p-CREB(货号：#9198)、p-CaMKII(货号：#3361)、CREB(货号：#9197)、β-actin 抗体(批号：#4960)均购自美国 CST 公司；RNeasy® Mini Kit (QIAGEN，货号：74104)；RevertAid First strand cDNA Synthsis Kit(货号：K1622)、Power SYBR® Green PCR Master Mix(货号：4367659)均购自 Thermo Fisher Scientific。

1.3 动物

24 h 内新生清洁级 Sprague-Dawley(SD)大鼠，♀♂不限，购自吴氏实验动物，许可证号：SCXK(闽)2012-0001。

2 方法

2.1 海马神经元的分离、培养与鉴定

根据前期研究[13]进行海马神经元的分离、培养与鉴定。将分离得到的神经元接种至多聚赖氨酸包被过的培养板中，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养，每 3 d 半量换液 1 次。生长至第 7 天的细胞用于后续实验。

2.2 神经元活性检测

将神经元接种于多聚赖氨酸包被过的 96 孔板中，37 ℃、5% CO_2 培养，培养至第 7 天时，分为空白组、NMDA 组、栝楼桂枝颗粒(100，200，300 μg·mL^{-1})组。每组给予相应的培养基或含有药物的培养基孵育 24 h 后，用 MTT 和 LDH 法检测各组细胞活力。试验重复 3 次，每次试验每组分别设 6 个复孔。

MTT 法：每孔加入 10 μL MTT，37 ℃培养 4 h 后弃上清液，每孔中加入 100 μL 二甲基亚砜，用酶标仪检测 570 nm 处各孔的吸光度(*A* 值)。同时设置不加细胞的空白孔调零。细胞存活率=实验组 *A* 值/空白组 *A* 值×100%，其中空白组存活率为100%。

按照乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase，LDH)法：每组给予相应的培养基或含有药物的培养基孵育 24 h 后，LDH 试剂盒说明书进行 LDH 活性测定。

2.3 免疫荧光法检测 MAP-2 蛋白的表达

每组给予相应的培养基或含有药物的培养基，孵育 24 h 后吸去细胞培养基，4%多聚甲醛固定细胞，15 min 后加入 PBS 进行洗涤，随后加入 MAP-2 一抗(1∶500)，4 ℃孵育过夜；PBS 漂洗后加入对应的二抗(1∶500)，室温孵育 1 h；PBS 漂洗后加入 DAPI 染液(10 μg·mL^{-1})室温孵育染色，10 min 后加入进行 PBS 洗涤，封片，荧光显微镜下进行观察、拍摄。

2.4 Real-time PCR 检测 CaMKII、CREB mRNA 的表达

细胞培养后，用 PBS 洗涤，采用 RNeasy® Mini Kit 试剂盒提取细胞总 RNA，测定 RNA 浓度，采用 RevertAid First strand cDNA Synthsis Kit 试剂盒进行逆转录反应，各目的基因的扩增引物序列见

表 1。反应体系在荧光定量 PCR 仪上进行，扩增条件如下：50 ℃预热 2 min，95 ℃预热 10 min，95 ℃变性 15 s，60 ℃退火 30 s，60 ℃延伸 30 s，共 40 个循环；采用 ABI 7900 荧光定量 PCR 仪上的软件进行数据的分析处理，计算目的基因 mRNA 相对表达水平。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

基因		引物序列
CREB	Forward	5’-GAG GCA GCT TGA ACA ACA AC-3’
	Reverse	5’-TAC CCA GGG AGG AGC AAT AC-3’
CaMKII	Forward	5’-GGT TTT CAA AAT AGA ATC GAT G-3’
	Reverse	5’-GAA GCC ATA AGC AAT GGA GA-3’
GADPH	Forward	5’-AGC CCA GAA CAT CAT CCC TG-3’
	Reverse	5’-CAC CAC CTT CTT GAT GTC ATC-3’

2.5 Western blot 检测 p-CREB、p-CaMKII、CaMKII、CREB 和 CaM 蛋白的表达

细胞培养后，每孔加入含有苯甲基磺酰氟的 RIPA 裂解液裂解，收集裂解液，在 4 ℃下离心 15 min，收集上清液，BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶分离蛋白，经 PVDF 膜转膜，再用脱脂牛奶进行 2 h 的封闭。分别加入鼠抗 p-CREB、p-CaMKII、CaMKII、CREB 单克隆抗体(1∶1 000)以及 CaM 单克隆抗体(1∶500)，孵育过夜，温度为 4 ℃，用 TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，洗涤后加入经 HRP 标记的羊抗兔二抗(1∶7 000)，孵育 2 h，再由 TBST 洗涤 3 次，各 10 min。完毕后条带经 Bio-Rad 凝胶分析仪进行图像扫描分析，p-CREB、p-CaMKII、CaMKII、CREB、CaM 与 β-actin 的灰度值各自的比值表示 p-CREB、p-CaMKII、CaMKII、CREB 和 CaM 蛋白相对表达量。

2.6 统计学分析

实验数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 20.0 软件进行分析，采用单因素方差分析进行组间差异分析，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 栝楼桂枝颗粒对神经元活性的影响

NMDA 诱导原代海马神经元 6 h 后，细胞活力明显降低，LDH 释放水平显著升高($P<0.01$)。不同浓度的栝楼桂枝颗粒孵育 24 h 可提高细胞活力，其中 200，300 μg·mL^{-1} 与 NMDA 组比较有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。不同浓度(100，200，300 μg·mL^{-1})的栝楼桂枝颗粒孵育 24 h 可显著降低 LDH 浓度($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 1。

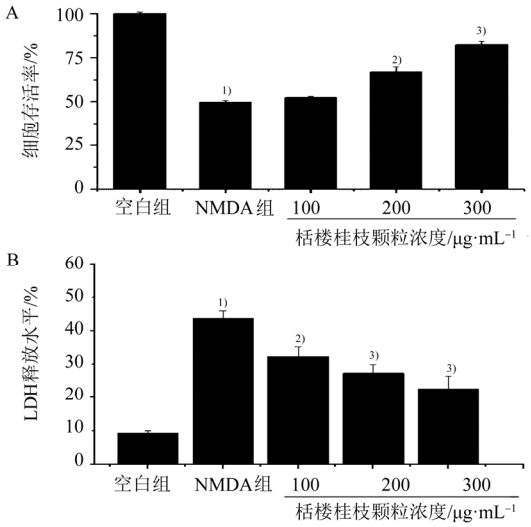

图 1 栝楼桂枝颗粒对神经元活性的影响

A–MTT 法；B–LDH 法；与空白组比较，[1)]$P<0.01$；与 NMDA 组比较，[2)]$P<0.05$，[3)]$P<0.01$。

Fig. 1 Effect of Gualou Guizhi granule on neuron activity

A–MTT method; B–LDH method; compared with blank group, [1)]$P<0.01$; compared with NMDA group, [2)]$P<0.05$, [3)]$P<0.01$.

3.2 栝楼桂枝颗粒对 MAP-2 蛋白表达的影响

荧光显微镜下观察，MAP-2 蛋白主要表达在树突与胞体上。与空白组相比，NMDA 组 MAP-2 阳性表达细胞数明显减少($P<0.01$)，且纤维结构紊乱，突起中断；与 NMDA 组相比，栝楼桂枝颗粒组 MAP-2 阳性表达细胞数明显增加($P<0.01$)。结果见图 2。

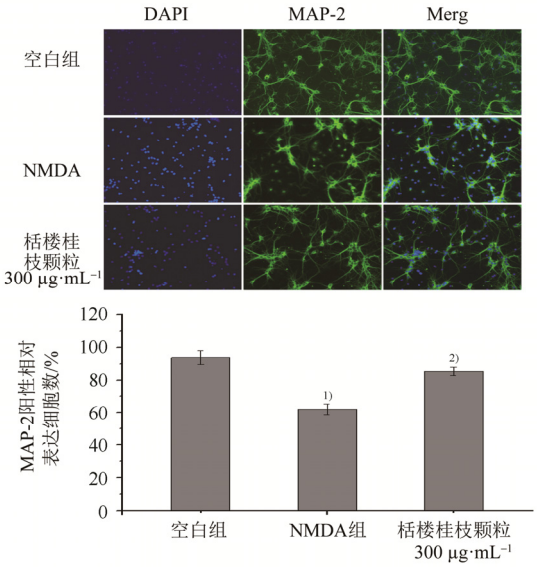

图 2 栝楼桂枝颗粒对 MAP-2 蛋白表达的影响(免疫荧光染色，400×)

与空白组比较，[1)]$P<0.01$；与 NMDA 组比较，[2)]$P<0.01$。

Fig. 2 Effect of Gualou Guizhi granule on expression of MAP-2 protein(immunofluorescence staining, 400×)

Compared with blank group, [1)]$P<0.01$; compared with NMDA group, [2)]$P<0.01$.

3.3 栝楼桂枝颗粒对 CaMKII、CREB mRNA 表达的影响

Real-time PCR 分析结果显示，与空白组相比，NMDA 组 CREB mRNA 表达降低，CaMKII mRNA 表达增强，但无统计学意义。给予栝楼桂枝颗粒后，与 NMDA 组相比，CREB mRNA 表达增加，其中栝楼桂枝颗粒 200，300 μg·mL^{-1} 组有统计学意义(P<0.01)，栝楼桂枝颗粒 100，200，300 μg·mL^{-1} 组显著性升高 CaMKII mRNA 水平(P<0.05 或 P<0.01)。结果见图 3。

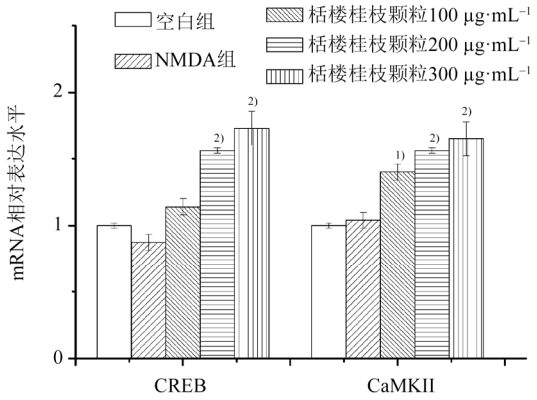

图 3 栝楼桂枝颗粒对神经元中 CREB、CaMKII 的影响

与 NMDA 组比较，$^{1)}P$<0.05，$^{2)}P$<0.01。

Fig. 3 Effects of Gualou Guizhi granule on CREB and CaMKII in neurons

Compared with NMDA group, $^{1)}P$<0.05, $^{2)}P$<0.01.

3.4 栝楼桂枝颗粒对 p-CREB、p-CaMKII、CaMKII、CREB 和 CaM 蛋白表达的影响

Western blot 分析结果显示，与空白组相比，NMDA 组中 CaM 表达量显著增高(P<0.01)，p-CREB、CREB 表达水平显著降低(P<0.01)。与 NMDA 组相比，栝楼桂枝颗粒各组可下调 CaM 蛋白表达水平，上调 CREB、p-CREB、p-CaMKII 蛋白表达水平，其中栝楼桂枝颗粒 100，200，300 μg·mL^{-1} 组均显著上调 p-CREB、p-CaMKII 蛋白表达水平(P<0.01)，栝楼桂枝颗粒 200，300 μg·mL^{-1} 组显著上调 CREB 蛋白表达水平(P<0.01)，对 CaMKII 蛋白影响不大。结果见图 4。

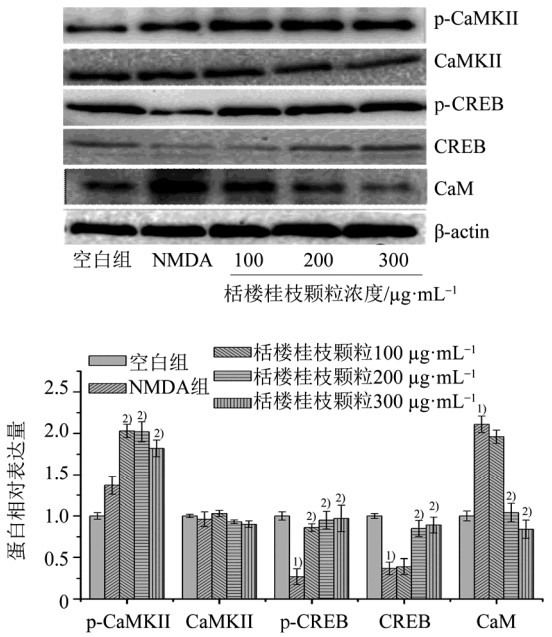

图 4 栝楼桂枝颗粒对神经元中 p-CREB、p-CaMKII、CREB、CaMKII 以及 CaM 蛋白的影响

与空白组比较，$^{1)}P$<0.01；与 NMDA 组比较，$^{2)}P$<0.01。

Fig. 4 Effects of Gualou Guizhi granule on p-CREB, p-CaMKII, CREB, CaMKII and CaM protein in neurons

Compared with blank group, $^{1)}P$<0.01; compared with NMDA group, $^{2)}P$<0.01.

4 讨论

缺血性脑卒中现已成为当今世界最主要的致死、致残疾病[15]，是严重威胁人类身体健康的常见疾病之一。目前对缺血、缺氧性脑损伤后神经元的死亡机制尚未完全阐明，学说也多种多样[16]，其中之一为兴奋性氨基酸的细胞不良反应，即经轴突末端接收到缺血信号后释放大量的兴奋性神经递质(包括谷氨酸和其他兴奋毒性因子)，激活 NMDA 受体对神经元产生神经不良反应，在大脑的快速发育期，NMDA 受体处于过度敏感期，使表达 NMDA 受体的神经元对 NMDA 受体的活性过度敏感，过度激活 NMDA 受体可使大脑产生包括神经元坏死和细胞凋亡在内的神经损害，导致神经元细胞凋亡。此外，由缺氧、缺血造成的脑部损伤可以引起兴奋性神经递质的过度释放，从而使突触后膜处于一种持续性去极化状态，造成大量 Ca^{2+}内流，引发细胞内一系列 Ca^{2+}的生化反应，导致神经细胞凋亡。NMDA 作为兴奋毒性氨基酸参与多种神经疾病的发生、发展过程，特别是脑缺血再灌注损伤。实验[17-19]表明，Ca^{2+}参与神经元的凋亡过程。

Ca^{2+}信号通路在细胞存活、增殖、代谢中起到了至关重要的作用，其作用机制[4]为 Ca^{2+}进入细胞内，激活各种 Ca^{2+}依赖性酶(如 CaMKⅡ、一氧化氮合酶、钙调神经磷酸酶)，与 CaM 结合形成 Ca^{2+}-CaM，活化 CaMKII。CaMKII 作为海马内含量最高的一种蛋白，磷酸化后可以直接活化 CREB，进一步调节细胞骨架蛋白和突触蛋白合成，CREB 通过磷酸化激活下游抗凋亡蛋白，减弱

神经元凋亡，促进神经元形成。

栝楼桂枝方来源于《金匮要略》卷上，“痉湿暍病脉证治第二篇”，由天花粉、白芍、桂枝、生姜、甘草、大枣组成，配伍结构严谨，气血双调，能够解肌和营，生津柔筋。近年来研究发现其具有抗氧化、抗炎及抗兴奋性氨基酸毒性损伤等神经保护作用[9-14]。然而目前还尚未清楚其作用机制。本实验结果显示，栝楼桂枝颗粒干预后，细胞活力升高，MAP-2 表达显著增加，说明栝楼桂枝颗粒可抑制 NMDA 诱导神经元兴奋性毒性损伤。同时实验中发现，NMDA 组中 p-CaMKII 蛋白表达升高，但是 p-CREB 蛋白表达降低。这可能是因为神经元在应激损伤时的自我保护机制使得 NMDA 组 p-CaMKII 蛋白表达升高，但是由于 NMDA 诱导神经元兴奋性毒性损伤严重，对细胞结构造成了较严重损伤，造成细胞内 Ca^{2+}超载严重，启动细胞内凋亡机制，最终造成了神经元损伤或凋亡增加，使得 p-CREB 蛋白表达结果是降低的。此外，蛋白结果显示 CaMKII 随给药组剂量升高而降低，但 CaMKII mRNA 的表达是随剂量升高而升高的，且 p-CREB、p-CaMKII 随给药组剂量升高而升高，此现象可能是存在翻译后修饰调控，这些问题有待进一步研究。

综上，栝楼桂枝颗粒对 NMDA 诱导神经元兴奋性毒性损伤具有保护作用，此作用可能与促进 CREB、CaMKII 的磷酸化，抑制 CaM 的表达有关。

致谢：本实验在福建省科技厅福建省中药学重点实验室，福建省中药资源研究与开发利用重点实验室完成。

REFERENCES

[1] TAKANO H, FUKUSHI H, MORISHIMA Y, et al. Calmodulin and calmodulin-dependent kinase II mediate neuronal cell death induced by depolarization [J]. Brain Res, 2003, 962(1/2): 41-47.

[2] VALERA E, SÁNCHEZ-MARTÍN F J, FERRER-MONTIEL A V, et al. NMDA-induced neuroprotection in hippocampal neurons is mediated through the protein kinase A and CREB (cAMP-response element-binding protein) pathway [J]. Neurochem Int, 2008, 53(5): 148-154.

[3] ZHANG C, DU F, SHI M, et al. Ginsenoside Rd protects neurons against glutamate-induced excitotoxicity by inhibiting Ca^{2+} influx [J]. Cell Mol Neurobiol, 2012, 32(1): 121-128.

[4] REDMOND L, KASHANI A H, GHOSH A. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription [J]. Neuron, 2002, 34(6): 999-1010.

[5] 杨春梅, 陈立典, 陶静. 古方今用瓜蒌桂枝汤[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(8): 1599-1600.

[6] CHEN Y L, CHEN L D, TAO J. Clinical research on treating limbs spasm from cerebral apoplexy with the Gualou Guizhi decoction [J]. Clin J Chin Med(中医临床研究), 2013, 5(4): 7-9.

[7] ZHU Y P. Clinical effect analysis of *Trichosanthes kirilowii* Cassia twig decoction for treatment of lower limb spasm after cerebral apoplexy patients [J]. Guid China Med(中国医药指南), 2015, 13(29): 27-28.

[8] 战美玲. 脑卒中后下肢痉挛应用栝楼桂枝汤治疗的效果分析[J]. 双足与保健, 2017(11): 160-161.

[9] CHEN X W, LI H, HUANG M Q, et al. Effect of Gua Lou Gui Zhi decoction on focal cerebral ischemia-reperfusion injury through regulating the expression of excitatory amino acids and their receptors [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(1): 248-254.

[10] HUANG J, TAO J, XUE X H, et al. Gua Lou Gui Zhi decoction exerts neuroprotective effects on post-stroke spasticity via the modulation of glutamate levels and AMPA receptor expression [J]. Int J Mol Med, 2013, 31(4): 841-848.

[11] LI Z F, LIN R H, MAO J J, et al. Protective effect of Gualou Guizhi decoction on BV-2 cells injuried by glutamate [J]. J Fujian Univ Tradit Chin Med(福建中医药大学学报), 2013, 23(5): 14-17.

[12] ZENG J, ZHANG Y Q, WANG H Y, et al. Mechanism of Gualou Guizhi granule inhibits neuronal cell apoptosis in MCAO rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(7): 1007-1011.

[13] LI Z F, HU H X, LIN R H, et al. Neuroprotective effects of Gua Lou Gui Zhi decoction against glutamate-induced apoptosis in BV-2 cells [J]. Int J Mol Med, 2014, 33(3): 597-604.

[14] WANG H Y, ZHANG Y Q, LI H, et al. Neuroprotective effect of Gualou Guizhi granule on NMDA-induced hippocampal neuron excitotoxicity toxicity model [J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2017, 32(9): 4115-4120.

[15] CORBYN Z. Statistics: a growing global burden [J]. Nature, 2014, 510(7506): S2-S3.

[16] WU Y M, TAO R Y, MENG X B, et al. Research progress on mechanism of ischemic stroke injury [J]. Jilin J Tradit Chin Med(吉林中医药), 2018, 38(3): 368-372.

[17] PAN J Y, CAI R X, CHEN Y, et al. Analysis the effect of hyperbaric oxygen preconditioning on neuronal apoptosis, Ca^{2+} concentration and caspases expression after spinal cord injury in rats [J]. Eur Rev Med Pharm Sci, 2018, 22(11): 3467-3473.

[18] POON A D, MCGILL S H, BHUPANAPADU SUNKESULA S R, et al. Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II and Dimethyl Sulfoxide affect the sealing frequencies of transected hippocampal neurons [J]. J Neurosci Res, 2018, 96(7): 1208-1222.

[19] RUIZ A, ALBERDI E, MATUTE C. Mitochondrial division inhibitor 1 (mdivi-1) protects neurons against excitotoxicity through the modulation of mitochondrial function and intracellular Ca^{2+} signaling [J]. Front Mol Neurosci, 2018(11): 3.

收稿日期：2018-08-31

(本文责编：李艳芳)