基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001216

钙敏感受体在大鼠轴型皮瓣缺血再灌注损伤模型中的表达和意义

高立娜，季　平，王　俊，管　超，时恩来，黄育萌，李　勇，刘　平，
曾　琳，李　显，邹四海，鲁　琦，朱露颖，张富贵
（重庆医科大学附属口腔医院、口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室、
重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室，重庆　401147）

【摘　要】**目的**：研究钙敏感受体（calcium-sensing receptor，CaSR）在轴型皮瓣血管内皮细胞的表达，并探讨 CaSR 在皮瓣缺血再灌注损伤过程中的重要作用。**方法**：构建以腹壁下浅动、静脉为蒂的大鼠轴型皮瓣，使用微动脉夹夹闭血管 3 h 建立轴型皮瓣缺血再灌注（ischemia/reperfusion，I/R）损伤模型。随后大鼠被随机分为 3 组（每组 10 只），分别通过股静脉给予 $CaCl_2$、NPS2143+$CaCl_2$ 和生理盐水（normal saline，NS）治疗。再灌注 2 h 和 7 d 后，采用计算机辅助面积测量法评估皮瓣坏死；HE 染色观察皮瓣血管形态学变化；TUNEL 染色检测细胞凋亡；RT-PCR、免疫组化法分别检测血管内皮细胞中 CaSR、Cleaved Casepase-3、Bax 和 Bcl-2 的表达情况。**结果**：与 NS 对照组和 NPS2143+$CaCl_2$ 组相比，$CaCl_2$ 组皮瓣坏死率增多的同时[(14.87 ± 1.02)%，P=0.000]，TUNEL 染色阳性细胞增多（2 h：46.960 ± 1.965，7 d：48.855 ± 3.550，P=0.000），CaSR（2 h：0.157 ± 0.011，7 d：0.129 ± 0.015，P_{IHC}=0.000；P_{PR-PCR}=0.000）、Cleaved Casepase-3（2 h：0.101 ± 0.020，7 d：0.098 ± 0.011，P_{NS}=0.046，$P_{NPS2143+CaCl_2}$=0.000）表达升高，并且 Bax 存在明显棕黄色染色，而 Bcl-2 几乎无表达。但是 NPS2143+$CaCl_2$ 组与 NS 对照比相比，结果刚好相反。**结论**：CaSR 在大鼠轴型皮瓣的血管内皮细胞中具有功能性表达，其表达水平与轴型皮瓣 I/R 损伤程度密切相关，并且抑制 CaSR 表达能减轻轴型皮瓣 I/R 损伤。

【关键词】钙敏感受体；缺血再灌注损伤；轴型皮瓣
【中图分类号】R739.8　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-11-02

Expression of calcium-sensing receptor in ischemia/reperfusion injury model of rat axial skin flaps transplantation and its significance

Gao Lina, Ji Ping, Wang Jun, Guan Chao, Shi Enlai, Huang Yumeng, Li Yong, Liu Ping, Zeng Lin, Li Xian, Zou Sihai, Lu Qi, Zhu Luying, Zhang Fugui
(*Stomatological Hospital of Chongqing Medical University; Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences; Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the expression of calcium sensing receptor (CaSR) in vascular endothelial cells and the role of CaSR expression in ischemia-reperfusion (I/R) injury model of rat axial flaps transplantation. ***Methods***: I/R injury model was established on SD rats axial skin flaps based on superficial inferior epigastric vessels. After 3 h ischemia, all flaps were randomly divided into 3 groups (n=10 per group): $CaCl_2$, NPS2143+$CaCl_2$ and normal saline (NS). The necrosis ratios of skin flaps were evaluated; morphological changes were observed by HE staining; cell apoptosis was assessed by TUNEL staining. The expressions of CaSR, Cleaved Casepase-3, Bax and Bcl-2 were detected by RT-PCR and immunohistochemistry, respectively, at 2 h and on 7 d after reperfusion. ***Results***: Compared with the NS control group and NPS2143+$CaCl_2$ group, $CaCl_2$ group acquired significantly more flap necrosis[(14.87 ± 1.02)%, P=0.000], TUNEL staining-positive cells (2 h: 46.960 ± 1.965, 7 d: 48.855 ± 3.550, P=0.000), consistent with higher protein expression of CaSR (2 h: 0.157 ± 0.011, 7 d: 0.129 ± 0.015, P_{IHC}=0.000; P_{PR-PCR}=0.000), Cleaved Casepase-3 (2 h: 0.101 ± 0.020, 7 d: 0.098 ± 0.011, P_{NS}=0.046, $P_{NPS2143+CaCl_2}$=0.000) and obvious brown staining of Bax, while

作者介绍：高立娜，Email：linayouth@163.com，研究方向：口腔临床医学。
通信作者：张富贵，Email：zhangfg0607@126.com。
基金项目：国家自然科学基金青年基金资助项目（编号：81400493）；重庆市卫生局重点项目专项资助项目（编号：2013-1-030）；2016年重庆高校创新团队建设计划资助项目（编号：CXTDG201602006）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170313.1523.092.html（2017-03-13）

almost no expression of Bcl-2. However compared with the NS control, NPS2143+$CaCl_2$ group manifested an anti-injury effect. ***Conclusion***: The activation of CaSR in the vascular endothelial cells may aggravate the I/R injury of of axial skin flaps while inhibition of CaSR could deprive skin flaps of I/R injury.

【Key words】calcium-sensing receptor; ischemia/reperfusion injury; axial skin flaps

外科皮瓣被广泛用于各种良、恶性肿瘤切除术后创面修复、畸形矫正、功能重建和某些器官再造，同时皮瓣移植又有很好的美学价值，用于头面部等暴露部位，常能达到既治疗疾病，又保持较好功能和形态的目的。因此，外科皮瓣具有其他治疗手段不能替代的作用[1-2]。但是，缺血再灌注（ischemia/reperfusion，I/R）损伤是造成皮瓣移植术后频繁发生早期部分或全部坏死、创伤后器官再灌注及低温低压麻醉后组织再灌注损伤的主要原因之一[3]。

钙敏感受体（calcium-sensing receptor，CaSR）是G蛋白偶联受体家族成员，广泛表达于心肌、脑、肝脏、肾等组织[4-5]，被 Brown 等[6]在 1993 年由从牛甲状旁腺细胞首次克隆出来。大量研究表明，CaSR 与心肌 I/R 导致的细胞凋亡有密切关系[7-8]。最近研究发现 CaSR 同样表达于血管平滑肌细胞和人脐静脉内皮细胞[9-10]。

本实验通过构建大鼠轴型皮瓣 I/R 损伤模型，旨在探讨 CaSR 是否在轴型皮瓣血管内皮细胞具有功能性表达，并探索 CaSR 激活造成轴型皮瓣 I/R 损伤的防治方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及器材

$CaCl_2$（CaSR 激动剂，21115，Sigma，美国），NPS2143（CaSR 抑制剂，S2633，Selleck，美国），Image-Pro Plus 软件（版本5.0，美国），TRNzol 试剂（DP424，天根，中国），逆转录（RR047A，Takara，日本），实时荧光定量 PCR 试剂盒（RR820A，Takara，日本），SP 超敏试剂盒（福州迈新生物技术公司，中国），TUNEL 试剂盒（11684817910，Roche，瑞士）。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠腹部轴型皮瓣模型及分组 本实验符合重庆医科大学动物伦理委员会相关规定。健康 SD 雄性大鼠 30 只，SPF 级，体质量 220~280 g，由重庆医科大学动物实验中心提供。戊巴比妥钠（30 mg/kg）行腹腔麻醉[11]，完全游离右腹部皮瓣，大小约 5 cm×6 cm，保留右侧腹壁下浅动、静脉为蒂部，结扎对侧腹壁下浅血管[12]，皮瓣包括皮肤及皮下筋膜层，如本实验组前期实验所示[13]。SD 大鼠根据注射药物不同随机分为 A、B、C 3 组（每组 10 只），即 $CaCl_2$ 组（0.1 mL/kg）、NPS2143（1 mg/kg）+$CaCl_2$ 组和 NS（normal saline）对照组；从股静脉给药，药物注射间隔为 10 min，最后一个药物注射 10 min 后，2 个微动脉夹钳住皮瓣血管蒂 3 h 模拟皮瓣缺血[14]，3 h 后去除微动脉夹模拟再灌注，用 5-0 医用聚酰胺缝合线间断原位缝合皮瓣。再灌注 2 h 或 7 d 后过量戊巴比妥钠安乐死 SD 大鼠（每组 5 只），收集皮瓣与受植床交界处组织用于分子学检测。

1.2.2 皮瓣成活的评估 术后第 7 天采用同一数码相机同样参数拍摄大鼠腹部轴型皮瓣。皮瓣成活的评估采用盲评法观察皮瓣的总体外观、颜色、切割出血和焦痂覆盖的区域。皮瓣的坏死面积和总面积使用 Image-Pro Plus 软件测量，皮瓣坏死率为坏死面积与总面积的百分比[13]。

1.2.3 HE 和 IHC 染色 术后 2 h 和 7 d 采集的皮瓣组织经过常规组织学处理后制成 5 μm 厚石蜡切片[15]。将上述石蜡切片分别采用苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色进行形态学研究和链菌素抗生物素蛋白-过氧化物酶（S-P）法的免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）染色检测 Bax（1:100，abcam）、Bcl-2（1:250，Santa cruz）以及 Cleaved Caspase-3（1:300，Cell Signaling Technology）的表达。IHC 图片使用 Image-Pro Plus 软件测量分析，结果采用平均光密度值（average optical density，AOD）表示。所有图片均在光镜 400× 下观察与分析。

1.2.4 CaSR 表达的检测 本实验组采用 IHC[15]和 RT-PCR[16]的方法检测再灌注 2 h 和 7 d 后 CaSR 在血管内皮细胞的表达。依照 TRNzol 试剂说明书从上述收集的组织中提取总 RNA，使用 Takara 试剂盒进行后续逆转录和 PCR 反应。CaSR 和 GAPDH 引物序列如下：CaSR-F：5'-TGGCTCCCT-GATCGGCTATACC-3'，CaSR-R：5'-GGGAAGGCTTGAAG-AGGATAATGTA-3'。GAPDH-F：5'-GACATGCCGCCTGGA-GAAAC-3'，GAPDH-R：5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'。根据 ΔCt（ΔΔCt）方法计算 CaSR 相对 mRNA 表达水平，目标基因量=$2^{-\Delta\Delta Q}$[17]。GAPDH 作为内部对照。IHC 实验方法同 1.2.3[15]，在石蜡切片上进行 Anti-CaSR（1:500，Bioword technology）染色和分析。

1.2.5 细胞凋亡的检测 原位细胞凋亡检测试剂盒是基于标记 DNA 链断裂处（游离 3-OH 末端）及后续的 IHC 原理来检测凋亡细胞[18]。简而言之，将 5 μm 厚的石蜡切片作常规 IHC 处理；然后依次在玻片上滴加 TUNEL 反应混合物、POD 转换液与底物溶液 DAB；最后在光学显微镜下观察凋亡细

胞，即 TUNEL 染色阳性的棕色细胞核细胞[19]。

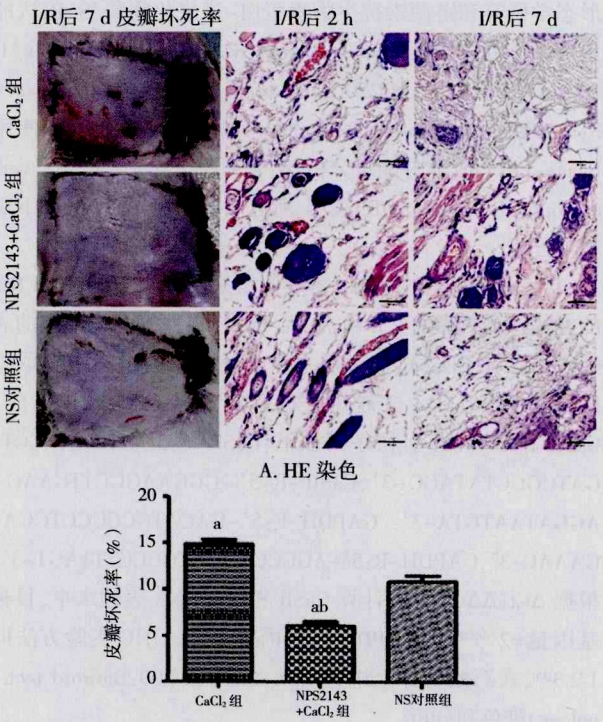
1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0(SPSS Inc,IL)统计软件进行评估，所有数据表示为平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)。通过单因素方差分析(其两两比较采用 LSD-t 方法)和析因设计方差分析处理比较，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 皮瓣成活的评估

I/R 后 2 h 皮瓣外观差异不明显。术后 1~2 d，各组皮瓣呈现苍白和不同程度的肿胀，柔韧性变差，并且从皮瓣的边缘和远端开始出现深灰色或黑色焦痂样坏死。第 7 天坏死趋于成熟稳定，术区伤口随着焦痂形成有不同程度的挛缩。术后第 7 天使用数码相机采集皮瓣图片并通过计算机辅助面积测量法计算坏死面积与皮瓣总表面积的百分比作为皮瓣坏死率。如图 1 所示，黑色或灰色的焦痂代表皮瓣坏死。3 个实验组($CaCl_2$、NPS2143+$CaCl_2$ 和 NS 对照组)的坏死率分别为(14.87 ± 1.02)%、(6.08 ± 0.92)%和(10.88 ± 1.35)%。与$CaCl_2$ 组和 NS 对照组相比，NPS2143+$CaCl_2$ 组的坏死率最低(P=0.000)，而 $CaCl_2$ 组的坏死率明显高于 NS 对照组(P=0.000)，如图 1 所示。



A. HE 染色

a:与 NS 对照组相比，P<0.001；b:与 $CaCl_2$ 组相比，P<0.001

B. 柱状图

图 1 I/R 后 7 d 的皮瓣成活情况和 I/R 后 2 h 和 7 d 皮瓣组织 HE 染色(400×)

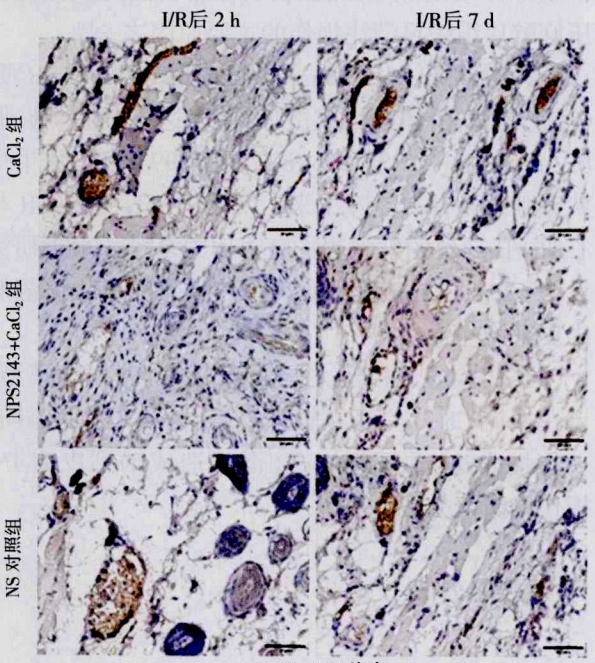
Fig.1 Flaps survival at 7 d after I/R and HE staining at 2 h and on 7 d after I/R(400×)

2.2 HE 染色

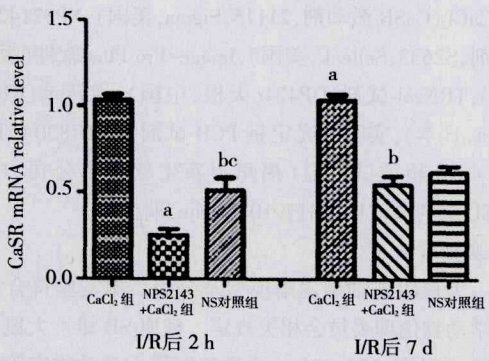
本实验组选取 I/R 后 2 h 和 7 d 2 个时间点对皮瓣血管进行形态学的观察。如图 1 所示，与 NS 对照组比较，$CaCl_2$ 组血管壁内皮细胞脱落现象普遍且数目明显减少，部分细胞核呈梭形或多角形。而 NPS2143+$CaCl_2$ 组及 NS 对照组管壁及管腔血管内皮细胞充盈，胞核多呈圆形或卵圆形。

2.3 CaSR 表达的检测

如图 2 及表 1 所示，CaSR 的 IHC 检测结果表明 CaSR 在 $CaCl_2$ 组的表达水平明显高于 NPS2143+$CaCl_2$ 和 NS 对照组(P=0.000、P=0.000)，而在 NPS2143+$CaCl_2$ 组的表达明显低于 NS 对照组(P=0.000)。经析因设计方差分析发现(表 1)，在大鼠 CaSR 的 IHC 表达上，各分组间有统计学差异(F=307.057，P=0.000)，而时间上无统计学差异(F=3.547，P=0.072)，两者交互效应有统计学差异(F=6.562，P=0.005)。



A. CaSR IHC 染色



a:与 NS 对照组相比，P<0.001；b:与 $CaCl_2$ 组相比，P<0.001；c:与 NS 对照组相比，P<0.01

B. 柱状图

图 2 CaSR 在 VECs 的表达

Fig.2 Expression of CaSR in VECs

2 h 时 RT-PCR 检测结果与 IHC 结果一致。RT-PCR 结果也表明，相较于 NPS2143+$CaCl_2$ 和 NS 对照组，CaSR mRNA 表达水平在 $CaCl_2$ 组最高（P=0.000、P=0.000），NPS2143+$CaCl_2$ 组较 NS 对照组明显降低（P=0.008）。但是，NPS2143+$CaCl_2$ 组与 NS 对照组在 7 d 时 CaSR mRNA 表达水平无统计学差异（P=0.206）。经析因设计方差分析发现（表 1），在大鼠CaSR 的 RT-PCR 表达上，各分组间有统计学差异（F=71.673，P=0.000），时间上也有统计学差异（F=12.898，P=0.004），但是两者交互效应无统计学差异（F=4.824，P=0.029）。

2.4 IHC 染色

IHC 染色用于检测 I/R 后 2 h 和 7 d Cleaved Casepase-3、Bax 和 Bcl-2 的表达。$CaCl_2$ 组 Cleaved Casepase-3 的表达量最高（P=0.046），而 NPS2143+$CaCl_2$ 组表达量最低（P=0.000），NS 对照组居中（图 3）。经析因设计方差分析发现（表 2），在大鼠 CaSR 的 Cleaved Casepase-3 表达上，各分组间有统计学差异（F=119.506，P=0.000），时间上无统计学差异（F=0.019，P=0.890），两者交互效应也无统计学差异（F=1.593，P=0.224）。

Bax 在 I/R 后 2 h 各组的染色结果显示，NPS2143+$CaCl_2$ 组仅可见微弱的表达甚至无表达，而 $CaCl_2$ 组可见明显棕黄色染色。而 Bcl-2 的表达与之相反，在 NPS2143+$CaCl_2$ 组可见明显棕黄色染色，而 $CaCl_2$ 组无表达或仅有微弱的黄染色。I/R 后 7 d 与 2 h 呈现相同表达结果（图 4）。

2.5 细胞凋亡的检测

TUNEL 染色结果表明细胞核呈棕色为凋亡细胞，呈蓝色则为非凋亡细胞。如图 3 所示，选取 I/R 后 2 h 和 7 d 2 个时间点进行凋亡检测，并观察血管内皮细胞的 TUNEL 染色阳性细胞。在这 2 个时间点得到相同的结论，即 $CaCl_2$ 组凋亡细胞最多（P=0.000），NS 对照组和 NPS2143+$CaCl_2$ 组凋亡细胞依次减少（P=0.000）（图 3）。经析因设计方差分析发现（表 2），在大鼠 CaSR 的 TUNEL 凋亡检测表达上，各分组间有统计学差异（F=190.230，P=0.000），时间上无统计学差异（P=0.509，F=0.449），两者交互效应有统计学差异（P=0.010，F=5.601）。

表 1 I/R 后 2 h 及 7 d 大鼠 CaSR 的 IHC 及 RT-PCR 检测结果

Tab.1 Results of IHC and RT-PCR detection of CaSR at 2 h and on 7 d after I/R in rats

分组	IHC检测结果（AOD，n=5）		RT-PCR 检测结果（n=3）	
	I/R后 2 h	I/R后 7 d	I/R后 2 h	I/R后 7 d
$CaCl_2$ 组	0.157 ± 0.011^{a}	0.129 ± 0.015^{a}	1.000 ± 0.000^{a}	1.000 ± 0.000^{a}
NPS2143+$CaCl_2$ 组	0.025 ± 0.010^{ab}	0.027 ± 0.012^{ab}	0.253 ± 0.059^{bc}	0.567 ± 0.123^{b}
NS 对照组	0.082 ± 0.007	0.086 ± 0.007	0.514 ± 0.127	0.646 ± 0.108

注：a，与 NS 对照组相比，P<0.001；b：与 $CaCl_2$ 组相比，P<0.001；c：与 NS 对照组相比，P<0.05

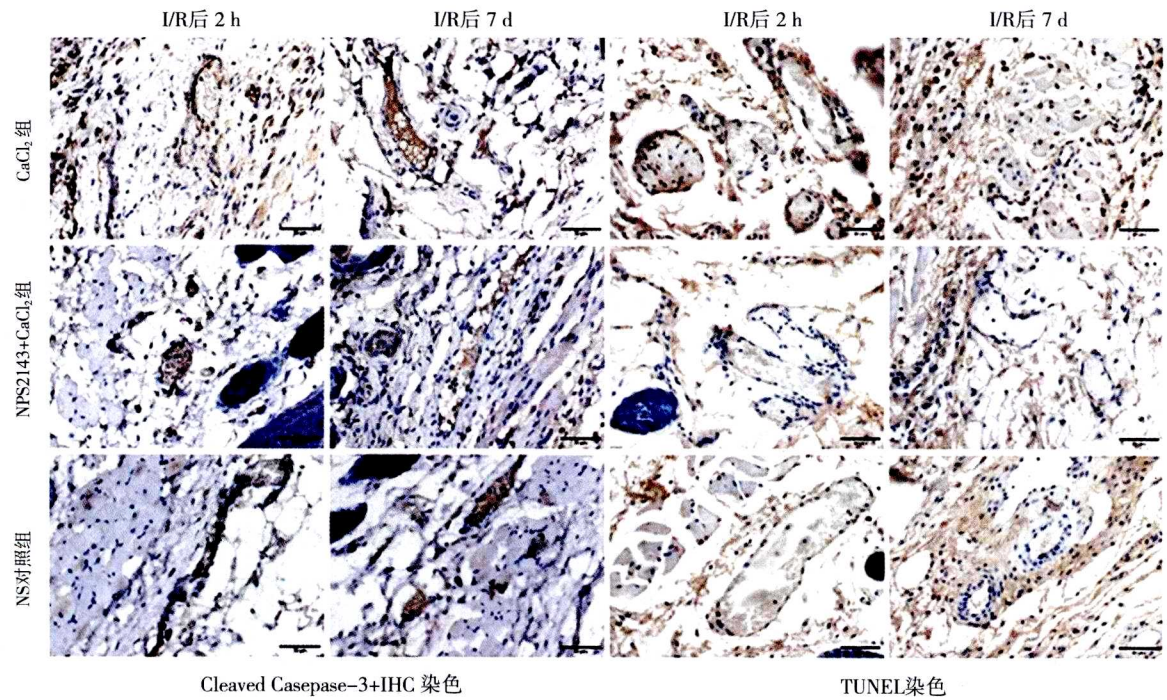


图 3 I/R 后 2 h 和 7 d IHC 染色检测 Cleaved Casepase-3 的表达以及 TUNEL 染色检测凋亡细胞

Fig.3 IHC staining of Cleaved Casepase-3 and TUNEL staining at 2 h and on 7 d after I/R

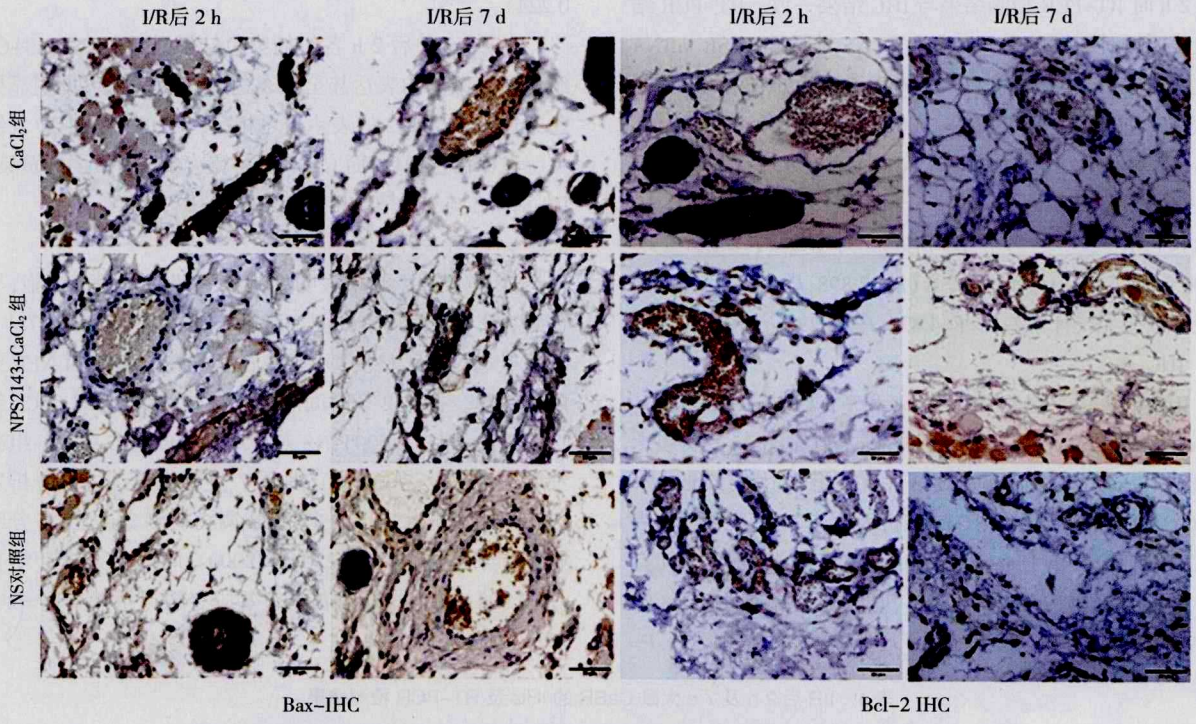


图 4　Bax、Bcl-2 在 I/R 后 2 h 和 7 d 的 IHC 染色例图

Fig.4　IHC staining of Bax, Bcl-2 at 2 h and on 7 d after I/R

表 2　I/R 后 2 h 及 7 d 大鼠 Cleaved Casepase-3 及 TUNEL 凋亡检测结果（$\bar{x} \pm s$, n=5）

Tab.2　Results of Cleaved Casepase-3 and TUNEL apoptosis detection at 2 h and on 7 d after I/R in rats（$\bar{x} \pm s$, n=5）

分组	Cleaved Casepase-3 结果（AOD）		TUNEL凋亡检测（%）	
	I/R后 2 h	I/R后 7 d	I/R后 2 h	I/R后 7 d
$CaCl_2$ 组	0.101 ± 0.020^{c}	0.098 ± 0.011^{c}	46.960 ± 1.965^{a}	48.855 ± 3.550^{a}
NPS2143+$CaCl_2$ 组	0.014 ± 0.006^{ab}	0.025 ± 0.011^{ab}	25.824 ± 1.480^{ab}	21.883 ± 3.260^{ab}
NS 对照组	0.046 ± 0.007	0.039 ± 0.008	36.218 ± 9.081	36.896 ± 12.059

注：a，与 NS 对照组相比，P<0.001；b：与 $CaCl_2$ 组相比，P<0.001；c：与 NS 对照组相比，P<0.05

3　讨　论

皮瓣移植术后坏死是临床上常见的难题之一。皮瓣部分坏死或全部坏死将严重影响患者的生活质量，同时会延长患者的住院时间，增加手术次数，从而加重患者的医疗负担。I/R 损伤是导致皮瓣移植术后坏死的主要机制之一[3,17]。本文采用 SD 大鼠腹壁下浅动、静脉为蒂的轴型皮瓣模拟皮瓣移植，并使用微动脉夹夹闭血管模拟 I/R，成功构建 SD 大鼠轴型皮瓣 I/R 损伤模型。研究表明 CaSR 激活可以通过“钙超载”导致心肌 I/R 损伤，加重脑、肝脏、肾等组织 I/R 损伤[4-5,20-21]。本研究使用的 $CaCl_2$ 是 CaSR 的一种典型激动剂[7]，NPS2143 是 CaSR 的代表性抑制剂[8]，旨在探讨 CaSR 表达在皮瓣移植 I/R 损伤病理生理过程的潜在作用和机制。根据实验分组 $CaCl_2$（CaSR 激动剂）组、NPS2143（CaSR 抑制剂）+ $CaCl_2$ 组、NS 对照组的结果推断 CaSR 在皮瓣血管内皮细胞中广泛表达，其表达水平可能与 I/R 损伤程度密切相关。本研究证明 CaSR 的高表达水平意味着皮瓣严重的 I/R 损伤，而低表达水平表示轻度或无 I/R 损伤。HE 染色结果显示，在高 Ca^{2+} 影响下血管内皮细胞数目减少且部分细胞核形态变异呈梭形或多角，管腔充盈明显减少。在 $CaCl_2$ 组中 CaSR mRNA 和蛋白表达水平最高，皮瓣术后坏死率最高，TUNEL 染色阳性细胞最多，促凋亡蛋白（Cleaved

Casepase-3 和 Bax）高表达及抗凋亡蛋白（Bcl-2）微表达。而 NPS2143+$CaCl_2$ 组的结果完全相反，即 CaSR 低表达，较低的皮瓣术后坏死率与较少的细胞凋亡。但是这些结果在轴型皮瓣 I/R 2 h 时具有明显差异，而在 7 d 时无统计学差异，表明潜在的刺激血运重建的缺氧信号通路可能不再存在，因为血运重建过程在 7 d 或以后已趋于停止[22]。

综上所述，本研究结果表明 CaSR 在大鼠轴型皮瓣血管内皮细胞中广泛表达，并且 CaSR 的表达水平与轴型皮瓣 I/R 损伤程度密切相关，尤其是在缺血早期。再灌注液中 Ca^{2+}可以诱导 CaSR 的活化，而 NPS2143 几乎可以中和由 Ca^{2+}引起的促凋亡作用。因此，阻断 CaSR 激活可能对临床提高皮瓣移植术后成活率具有极其重要的意义。但是，CaSR 激活促进轴型皮瓣 I/R 损伤的分子机制仍然有待阐明。

参 考 文 献

[1] Lubiatowski P, Goldman CK, Gurunluoglu R, et al. Enhancement of epigastric skin flap survival by adenovirus-mediated VEGF gene therapy[J]. Plast Reconstr Surg, 2002, 109(6): 1986-1993.

[2] Sofiadellis F, Liu DS, Webb A, et al. Fasciocutaneous free flaps are more reliable than muscle free flaps in lower limb trauma reconstruction: experience in a single trauma center[J]. J Reconstr Microsurg, 2012, 28(5): 333-340.

[3] Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Update on ischemia-reperfusion injury for the plastic surgeon: 2011[J]. Plast Reconstr Surg, 2011, 128(6): 685-692.

[4] Xing WJ, Kong FJ, Li GW, et al. Calcium-sensing receptors induce apoptosis during simulated ischaemia-reperfusion in Buffalo rat liver cells[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011, 38(9): 605-612.

[5] Zhen Y, Ding C, Sun J, et al. Activation of the calcium-sensing receptor promotes apoptosis by modulating the JNK/p38 MAPK pathway in focal cerebral ischemia-reperfusion in mice[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(2): 911-921.

[6] Brown EM, Gamba G, Riccardi D, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid [J]. Nature, 1993, 366(6544): 575-580.

[7] Wang R, Xu C, Zhao W, et al. Calcium and polyamine regulated calcium-sensing receptors in cardiac tissues[J]. Eur J Biochem, 2003, 270(12): 2680-2688.

[8] Zhang W, Xu C. Calcium sensing receptor and heart diseases[J]. Pathophysiology, 2009, 16(4): 317-323.

[9] Li GW, Wang QS, Hao JH, et al. The functional expression of extracellular calcium-sensing receptor in rat pulmonary artery smooth muscle cells[J]. J Biomed Sci, 2011, 18: 16.

[10] Bonomini M, Giardinelli A, Morabito C, et al. Calcimimetic R-568 and its enantiomer S-568 increase nitric oxide release in human endothelial cells[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30682.

[11] Yao Y, Hua C, Tang X, et al. Angiogenesis and osteogenesis of non-vascularised autogenous bone graft with arterial pedicle implantation[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2010, 63(3): 467-473.

[12] Xiao YD, Liu YQ, Li JL, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning inhibits skin flap apoptosis in a rat ischemia-reperfusion model[J]. J Surg Res, 2015, 199(2): 732-739.

[13] Zhang FG, Yao Y, Feng Y, et al. Mesenchymal stem cells transduced by stromal cell-derived factor-1alpha augment ischemic free flaps' survival[J]. Ann Plast Surg, 2011, 66(1): 92-97.

[14] Tang YH, Pennington LA, Scordino JW, et al. Dynamics of early stem cell recruitment in skin flaps subjected to ischemia reperfusion injury[J]. Pathophysiology, 2016, 23(3): 221-228.

[15] Deng Y, Zhang J, Wang Z, et al. Antibiotic monensin synergizes with EGFR inhibitors and oxaliplatin to suppress the proliferation of human ovarian cancer cells[J]. Sci Rep, 2015, 5: 17523.

[16] Li Y, Wagner ER, Yan Z, et al. The calcium-binding protein S100A6 accelerates human osteosarcoma growth by promoting cell proliferation and inhibiting osteogenic differentiation[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(6): 2375-2392.

[17] Eisenhardt SU, Schmidt Y, Karaxha G, et al. Monitoring molecular changes induced by ischemia/reperfusion in human free muscle flap tissue samples[J]. Ann Plast Surg, 2012, 68(2): 202-208.

[18] Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(8): 1093-1107.

[19] Song K, Zhang M, Hu J, et al. Methane-rich saline attenuates ischemia/reperfusion injury of abdominal skin flaps in rats via regulating apoptosis level[J]. BMC Surg, 2015, 15: 92.

[20] Yan L, Zhu TB, Wang LS, et al. Inhibitory effect of hepatocyte growth factor on cardiomyocytes apoptosis is partly related to reduced calcium sensing receptor expression during a model of simulated ischemia/reperfusion[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(4): 2695-2701.

[21] Zheng H, Liu J, Liu C, et al. Calcium-sensing receptor activating phosphorylation of PKCdelta translocation on mitochondria to induce cardiomyocyte apoptosis during ischemia/reperfusion[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 358(1-2): 335-343.

[22] Capla JM, Ceradini DJ, Tepper OM, et al. Skin graft vascularization involves precisely regulated regression and replacement of endothelial cells through both angiogenesis and vasculogenesis[J]. Plast Reconstr Surg, 2006, 117(3): 836-844.

（责任编辑：张辉洁）