

Cameleon测钙系统在H₂O₂诱导的A549细胞凋亡过程中的应用

张四洋¹ 于 淼¹ 高 建¹ 邱雪杉² 崔泽实^{1*}

(¹中国医科大学实验技术中心, 沈阳 110001; ²中国医科大学病理学教研室, 沈阳 110001)

摘要 观察Cameleon测钙系统在H₂O₂诱导的A549细胞凋亡过程中的应用, 实时测定胞浆Ca²⁺浓度([Ca²⁺]_i), 并探讨[Ca²⁺]_i与细胞凋亡和Pyk2磷酸化的关系。采用Ca²⁺指示器Cameleon YC3.6转染A549细胞, 24 h后用50 mmol/L H₂O₂刺激细胞, 激光扫描共聚焦显微镜实时测定选取细胞的[Ca²⁺]_i变化。采用Western blot检测H₂O₂刺激的细胞中Pyk2-tyr402磷酸化水平。采用DAPI染色试剂盒观察H₂O₂刺激后细胞凋亡情况。结果发现, 在H₂O₂作用下, A549细胞胞浆内游离[Ca²⁺]_i迅速升高, 同时Pyk2-tyr402磷酸化水平显著升高($P < 0.05$), 凋亡细胞百分比显著增加($P < 0.01$)。因此, H₂O₂促进A549细胞内Ca²⁺释放, 可能通过活化Pyk2诱导细胞凋亡。

关键词 H₂O₂; Ca²⁺; Cameleon YC3.6; Pyk2; 细胞凋亡

Application of the Cameleon Monitoring System of Ca²⁺ in the Process of H₂O₂ Induced Apoptosis of A549 Cells

Zhang Siyang¹, Yu Miao¹, Gao Jian¹, Qiu Xueshan², Cui Zeshi^{1*}

(¹Center of Laboratory Technology and Experimental Medicine, China Medical University, Shenyang 110001, China;

²Department of Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract The aim was to evaluate the Cameleon monitoring system of Ca²⁺ in the process of H₂O₂ induced the apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cells. The cytoplasmic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) was determined in real-time, and the correlations between [Ca²⁺]_i and cell apoptosis as well as proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) phosphorylation were explored. The Ca²⁺ indicator Cameleon YC3.6 was transfected into A549 cells, and cells were stimulated with 50 mmol/L H₂O₂ 24 h later. Laser scanning confocal microscope was applied to perform real-time monitoring on the variation of [Ca²⁺]_i in selected cells. Western blot assay was used to evaluate the activation of Pyk2-tyr402, and DAPI staining was used to observe apoptosis in H₂O₂ treated cells. Our results showed that the cytoplasmic free [Ca²⁺]_i was rapidly elevated in H₂O₂ stimulated A549 cells. Pyk2-tyr402 was significantly phosphorylated, and the apoptotic rate was increased in H₂O₂ treated cells, compared with untreated ones ($P < 0.01$). In summary, H₂O₂ promoted Ca²⁺ release in A549 cells, and induced cell apoptosis probably by activating Pyk2.

Key words H₂O₂; Ca²⁺; Cameleon YC3.6; Pyk2; apoptosis

收稿日期: 2013-05-15 接受日期: 2013-08-08

国家自然科学基金(批准号: 81101599)、沈阳市科学技术项目(批准号: F11-241-00、F12-264-4-01)和辽宁省科学事业研究公益基金(批准号: 2012006005)资助的课题

*通讯作者。Tel/Fax: 024-23261099, E-mail: labczs@mail.cmu.edu.cn

Received: May 15, 2013 Accepted: August 8, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81101599), the Science and Technology Project of Shenyang (Grant No.F11-241-00, F12-264-4-01) and the Public Welfare Foundation Project of Science Enterprise Investigation in Liaoning Province (Grant No.2012006005)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-24-23261099, E-mail: labczs@mail.cmu.edu.cn

网络出版时间: 2013-09-26 09:57 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130926.0957.003.html>

Ca²⁺是重要的细胞内第二信使,参与肌细胞收缩、腺细胞分泌、神经递质释放、细胞分化和凋亡等过程。细胞内生理Ca²⁺浓度为10~100 nmol/L, Ca²⁺超载时浓度为基础浓度的10倍左右,与高血压、脑缺血、肿瘤等多种疾病密切相关^[1]。H₂O₂是常见的活性氧分子,向细胞外液加入H₂O₂,可以使细胞处于氧化应激状态,而Ca²⁺介导了H₂O₂作用下的大鼠胰腺腺泡AR42J细胞的凋亡^[2]。Pyk2被称为依赖Ca²⁺的酪氨酸激酶(Ca²⁺-dependent tyrosine kinase, CADTK),参与调节Ca²⁺流动介导的信号通路的活化。胞浆[Ca²⁺]_i升高可以使Pyk2磷酸化,引起一系列细胞生物学效应,如细胞凋亡^[3]。对心血管疾病的研究发现,H₂O₂处理的血管平滑肌细胞Pyk2磷酸化水平升高^[4],钙调蛋白拮抗剂Calmidazolium能阻断H₂O₂诱导的Pyk2磷酸化^[5]。然而在胰腺腺泡细胞损伤和胰腺炎过程中,H₂O₂并不影响细胞内[Ca²⁺]_i,而是通过磷酸化接头蛋白CrkII,促进Pyk2与CrkII形成蛋白复合体而活化^[6]。

Cameleon YC3.6是基于绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)结合荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术的Ca²⁺指示器。根据FRET原理,Horikawa等^[7]研制出Ca²⁺检测系统,被命名为Cameleon。Cameleon是利用基因重组手段构建的蛋白质复合体,包括四个部分:钙调蛋白(calmodulin, CaM),在细胞内与Ca²⁺结合;M13,是肌球蛋白轻链激酶的26个氨基酸序列,与CaM结合;荧光供体CFP(cyan fluorescence protein)和受体YFP(yellow fluorescence protein)。CaM的一端连接CFP,另一端通过M13连接YFP。CaM分子呈哑铃形,结合Ca²⁺后发生构象变化,其两端的“球形结构”向中间靠拢,以M13为纽带,YFP和CFP间距离减小从而发生FRET。这样,当用440 nm波长的激光激发时,CFP发出的青色荧光(480 nm)减弱而YFP发出的黄色荧光(530 nm)增强,利用YFP和CFP荧光强度的比值(FYFP/FCFP)便可以间接测定细胞内钙信号的变化。

本研究拟利用Cameleon YC3.6检测系统作为Ca²⁺指示器,观察H₂O₂处理的肺癌A549细胞中[Ca²⁺]_i的变化,并探讨在H₂O₂作用下Pyk2磷酸化和细胞凋亡情况。

1 材料与方 法

1.1 试剂

Cameleon YC3.6质粒(由Prof. Atsushi Miyawaki 惠赠, Laboratory for Cell Function Dynamics, RIKEN

Brain Science Institute, Japan)、激光扫描共聚焦显微镜专用培养皿(35 mm, NEST)、细胞转染试剂TransIII(KeyGen)、H₂O₂(国产)、肺癌A549细胞(KeyGen)、单克隆小鼠抗人Pyk2、Pyk2-Tyr402(Cell Signaling)、β-actin抗体(Santa Cruz)、细胞凋亡DAPI染色试剂盒(KeyGen)、ECL发光液(KeyGen)。

1.2 细胞培养和转染

肺癌A549细胞使用高糖DMEM培养基,添加10% FBS,在37 °C、5% CO₂条件下培养,转染前24 h给细胞传代。首先制备转染复合物,取无血清无双抗DMEM培养基与Cameleon YC3.6质粒充分混匀,再加入转染试剂TransIII室温静置孵育15 min。细胞弃去培养基,用PBS漂洗3次,加入转染复合物过夜。第2天给细胞换无钙细胞外液(135 mmol/L NaCl、2 mmol/L KCl、2 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L HEPES、4 g/L葡萄糖)。

1.3 [Ca²⁺]_i测定

在FV1000型激光扫描共聚焦显微镜(Olympus, Japan)下观察选择贴壁良好、形态伸展、荧光强度较亮的细胞,设置扫描条件为激发波长440 nm、CFP/YFP双通道、5%激光强度、PMT(CFP 890, YFP 774)、Pinhole(500 μm)、同时采集DIC图像,每5 s采集一幅,共采集22 min。扫描图像待荧光强度曲线稳定后,向细胞外液加入H₂O₂(50 mmol/L);待曲线不再变化时,向细胞外液加入EGTA(4 mmol/L)+Ionomycin(5 μmol/L),待曲线稳定后,向细胞外液加入CaCl₂(工作浓度5 mmol/L),至曲线再一次稳定后中止实验。[Ca²⁺]_i计算公式为Kd[(R-Rmin)/(Rmax-R)]^{1/n},其中Kd=250 nmol/L, n=1.7, R=530/480^[8](n为hill coefficient, 是对于一个结合反应的协同作用大小的描述。n=1时,是不依赖于协同作用的结合反应; n>1时,需要协同作用,即一个配体结合后有助于其他配体与受体多聚复合物结合。对于cameleon YC3.6来说, n是常数)。

1.4 Western blot

细胞用冰冷的PBS漂洗3次,置于冰上裂解,裂解液成份包括20 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、50 mmol/L NaCl、50 mmol/L NaF、1 mmol/L Na₃VO₄、1% Triton X-100和1 mmol/L PMSF。4 °C下,15 000 r/min离心30 min,取上清,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。80 μg总蛋白采用8% SDS-PAGE电泳分离,并转移至PVDF膜。5% BSA室温封闭2 h后,小鼠抗人Pyk2、Pyk2-Tyr402和β-actin一抗于4 °C孵育过夜,山羊抗小鼠IgG于37 °C孵育2 h, ECL发光成像。实验重复3

次,对Pyk2-tyr402磷酸化条带和Pyk2蛋白条带分别采用Image Pro-Plus 6.0软件进行积分光密度值(IOD)分析,再利用 $IOD_{\text{Pyk2-tyr402}}/IOD_{\text{Pyk2}}$ 的比值来比较对照组和H₂O₂处理组细胞Pyk2-tyr402磷酸化水平是否有差异。

1.5 DAPI染色检测细胞凋亡

细胞经H₂O₂处理10 min后,用4%多聚甲醛室温固定10 min,加入DAPI染色液避光孵育30 min,在倒置荧光显微镜下观察,随机选取5个200×镜下视野,计算凋亡细胞百分比。

1.6 统计学分析

采用SPSS 13.0统计学软件进行数据分析及处理。应用Chi-square比较凋亡细胞百分比,应用配对*t*-test评价Pyk2磷酸化水平的变化, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂O₂处理的细胞[Ca²⁺]_i变化

Cameleon YC3.6质粒转染后的细胞在440 nm激发光激发下发出明亮的绿色荧光,调节CFP通道PMT并加伪彩使细胞呈现较强的青色荧光(图1A),调节YFP通道PMT并加伪彩使细胞呈现微弱的黄色荧光(图1B),同时采集细胞DIC图像(图1C)和双通道融合图像(图1D)。向细胞外液加入H₂O₂后,荧光强度曲线

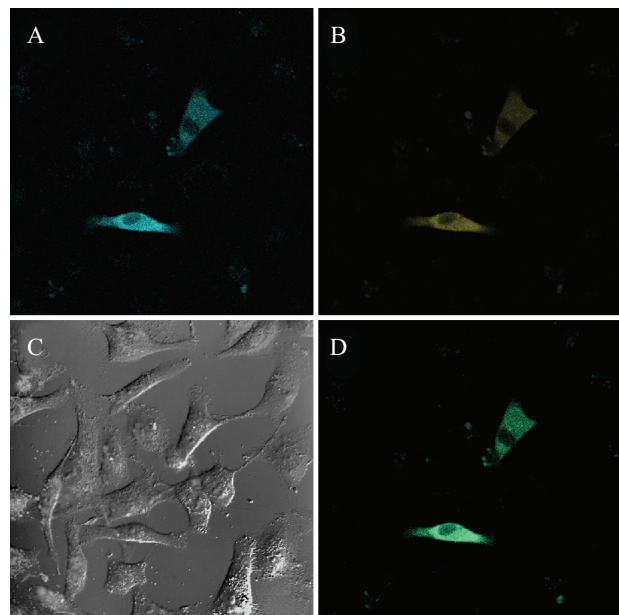
(图2E)发生变化,青色荧光强度逐渐减弱,黄色荧光强度逐渐增强,R值(530/480)曲线(图2F)逐渐升高,后下降至稳定。在加入EGTA(4 mmol/L)+Ionomycin(5 μmol/L)后,R值(530/480)出现短暂升高,之后逐渐减小至最小值(Rmin)至曲线稳定。最后加入5 mmol/L CaCl₂,青色荧光强度迅速减弱,黄色荧光强度再次增强,R值(530/480)逐渐增大达最大值(Rmax),后下降至稳定不再变化。通过公式计算得到其中一个细胞的[Ca²⁺]_i变化范围是42.28~918.12 nmol/L(图2),另一个细胞的[Ca²⁺]_i变化范围是6.30~122.45 nmol/L(图3)。

2.2 H₂O₂处理的细胞检测到Pyk2-tyr402磷酸化

有文献报道,细胞在氧化应激条件下,Pyk2-tyr402位点发生磷酸化与细胞内Ca²⁺的作用密切相关^[4]。我们采用Western blot方法检测H₂O₂处理的A549细胞中Pyk2-tyr402磷酸化水平的变化。统计学分析结果显示,对照组和H₂O₂处理组 $IOD_{\text{Pyk2-tyr402}}/IOD_{\text{Pyk2}}$ 比值分别为 $0.160 1\pm 0.040 4$ 和 $0.474 7\pm 0.074 9$,差异有统计学意义($P=0.042$),表明在H₂O₂作用下Pyk2-tyr402磷酸化水平升高(图4)。

2.3 H₂O₂处理的细胞发生凋亡

实时观察细胞DIC图像,发现加入H₂O₂之前,细胞贴壁良好、形态伸展,可见明显的细胞核及核

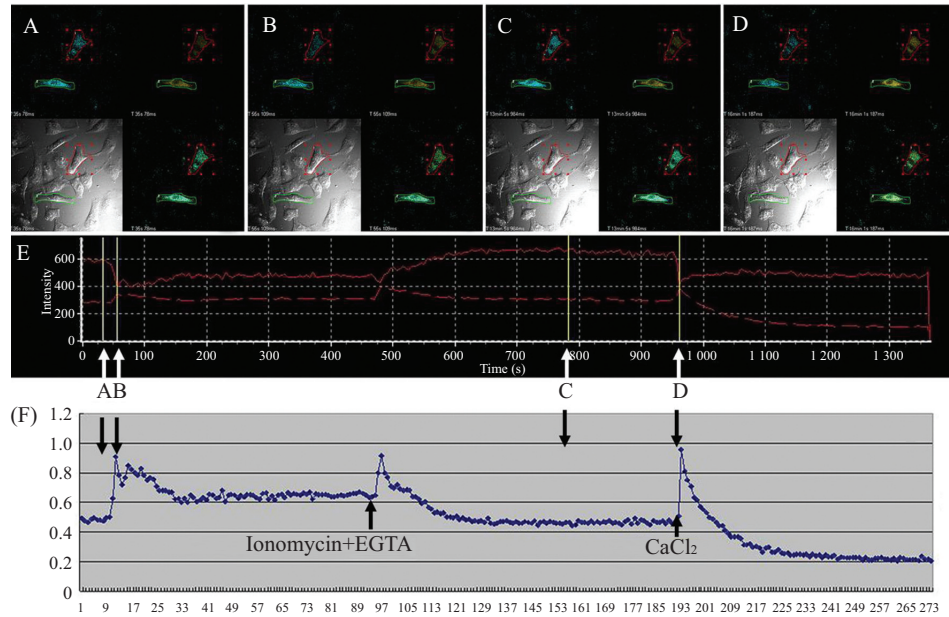


A: 在440 nm激发下细胞发出明亮的绿色荧光,调节CFP通道PMT并加伪彩使细胞呈现较强的青色荧光; B: 调节YFP通道PMT并加伪彩使细胞呈现微弱的黄色荧光; C: 细胞DIC图像; D: 双通道融合图像。

A: the bright green fluorescence was observed under 440 nm excitation, and the image of CFP was pseudocolored with cyan after PMT modulation; B: the image of YFP was pseudocolored with faint yellow after PMT modulation; C: the DIC image of cells; D: the overlap image of both CFP and YFP channels.

图1 转染Cameleon YC3.6的A549细胞,表达Ca²⁺指示蛋白

Fig.1 The Ca²⁺ indicator is expressed after the transfection of Cameleon YC3.6 in A549 cells

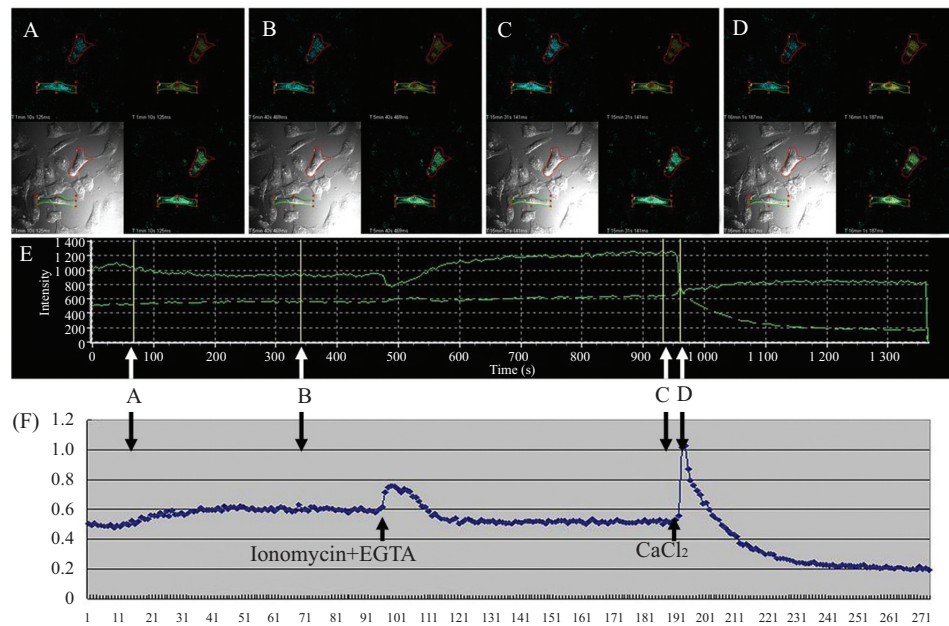


A: 未加H₂O₂时各通道图像; B: 加入H₂O₂后, 细胞内[Ca²⁺]_i升至最大时各通道图像; C: 加入Ionomycin+EGTA后, 细胞内[Ca²⁺]_i下降至最小时各通道图像; D: 加入CaCl₂后, 细胞内[Ca²⁺]_i升高至最大值时各通道图像; E: 红色实线为青色荧光强度变化曲线, 红色虚线为黄色荧光强度变化曲线; F: R值变化曲线。

A: cells without H₂O₂ treatment; B: [Ca²⁺]_i was increased to the top after adding H₂O₂; C: [Ca²⁺]_i was increased to the bottom after adding Ionomycin and EGTA; D: [Ca²⁺]_i was increased to the top after adding CaCl₂; E: the red solid line represented cyan fluorescence curve, and the red dash line was yellow fluorescence curve; F: the ratio curve.

图2 激光扫描共聚焦显微镜实时监测[Ca²⁺]_i变化

Fig.2 The time-lapse monitoring of [Ca²⁺]_i by laserscanning confocal microscope in the red circled cells



A: 未加H₂O₂时各通道图像; B: 加入H₂O₂后, 细胞内[Ca²⁺]_i升至最大时各通道图像; C: 加入Ionomycin+EGTA后, 细胞内[Ca²⁺]_i下降至最小时各通道图像; D: 加入CaCl₂后, 细胞内[Ca²⁺]_i升高至最大值时各通道图像; E: 绿色实线为青色荧光强度变化曲线, 绿色虚线为黄色荧光强度变化曲线; F: R值变化曲线。

A: cells without H₂O₂ treatment; B: [Ca²⁺]_i was increased to the top after adding H₂O₂; C: [Ca²⁺]_i was increased to the bottom after adding Ionomycin and EGTA; D: [Ca²⁺]_i was increased to the top after adding CaCl₂; E: the green solid line represented cyan fluorescence curve, and the green dash line was yellow fluorescence curve; F: the ratio curve.

图3 结合激光扫描共聚焦显微镜进行[Ca²⁺]_i测定

Fig.3 The measurement of [Ca²⁺]_i by laser scanning confocal microscope in the green circled cells

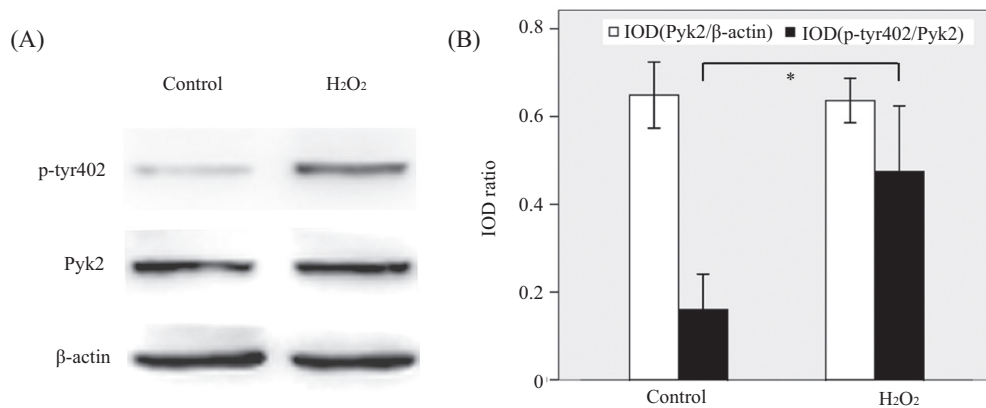
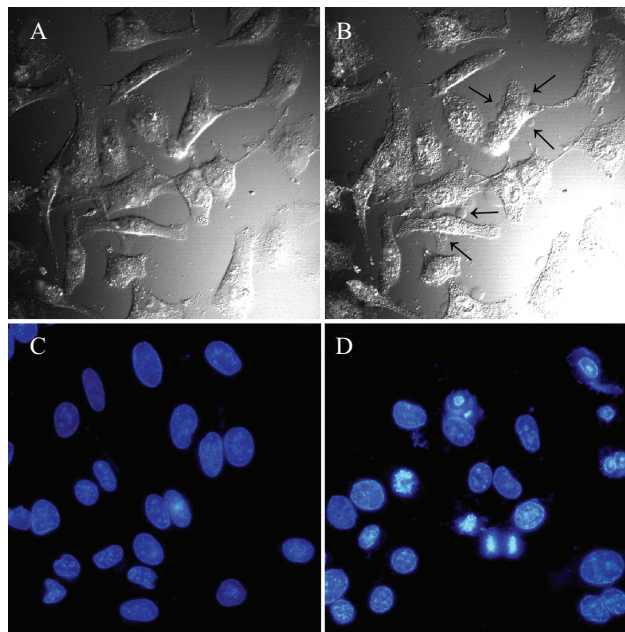


图4 H₂O₂处理的A549细胞中Pyk2-tyr402磷酸化水平升高

Fig.4 The phosphorylation of Pyk2-tyr402 was increased in H₂O₂ treated A549 cells



A: H₂O₂处理前的细胞; B: 经H₂O₂处理后的细胞, 可见细胞皱缩、体积变小、折光性增强, 有细胞膜出泡现象(箭头所示); C: 未经H₂O₂处理的细胞; D: H₂O₂处理的细胞, 可见核固缩、染色体凝集以及核碎裂。

A: cells before H₂O₂ treatment; B: cells were found smaller in size and shrunk with strong refraction, showing vesicular membrane was bulging (arrowhead) after H₂O₂ treatment; C: cells without H₂O₂ treatment; D: karyopyknosis, chromatic condensation and nuclear fragmentation were observed in H₂O₂ treated cells.

图5 H₂O₂促进A549细胞凋亡

Fig.5 H₂O₂ promoted the apoptosis of A549 cells

仁, 无明显颗粒(图5A)。细胞经H₂O₂处理后[Ca²⁺]_i升高, 并可见细胞皱缩、体积变小、折光性增强, 有明显的细胞膜出泡现象(图5B), 提示细胞发生凋亡。在相同条件下, 细胞经H₂O₂处理后固定, DAPI染色后发现, 凋亡细胞呈现核固缩且染色加深, 核染色质聚集于核膜一边, 或核碎裂成大小不等的圆形小体, 出现凋亡小体(图5D), 而对照组细胞核形态规则、染色均匀, 呈蓝白色荧光(图5C)。结果显示与对照组细胞相比, H₂O₂处理的细胞凋亡率显著

增加(11.5%±4.0% vs. 60.0%±8.5%), 有统计学意义(P=0.000)。我们在实时观察过程中还发现, 细胞开始出现皱缩、细胞膜出泡时, 这两个细胞的[Ca²⁺]_i分别为197.16 nmol/L和106.92 nmol/L, 这可能是引起细胞凋亡的最小[Ca²⁺]_i, 与细胞本身状态和对H₂O₂刺激的耐受能力有关。

3 讨论

本研究发现, 在H₂O₂作用下, 细胞内[Ca²⁺]_i升高,

诱导A549细胞凋亡,同时Pyk2蛋白出现磷酸化。在实验过程中,细胞外液不含有Ca²⁺,因此在H₂O₂作用下[Ca²⁺]_i升高应该是由细胞内钙库(如内质网)释放出大量Ca²⁺,可能是细胞内质网的氧化应激反应诱导了细胞凋亡^[9]。最初发现Pyk2是一种依赖于Ca²⁺的蛋白激酶,当细胞内[Ca²⁺]_i升高时,可能通过与钙调蛋白结合介导Pyk2磷酸化^[10],引起下游一系列信号通路的活化,参与细胞生命活动^[11]。在本研究中,我们也发现H₂O₂处理的A549细胞中,Pyk2-tyr402磷酸化水平显著升高,提示与细胞内[Ca²⁺]_i升高有关。研究显示,H₂O₂诱导细胞凋亡与钙超载密切相关^[12],我们的结果表明H₂O₂可能通过促进A549细胞内钙库释放Ca²⁺,诱导细胞凋亡,而活化的Pyk2可能参与了H₂O₂诱导的细胞凋亡过程。文献报道Pyk2主要参与细胞因子刺激活化的细胞存活信号通路,其磷酸化与细胞凋亡的关系目前还不清楚,Pyk2的活化与凋亡信号通路的关系还有待于深入研究。在本研究中,可能由于肿瘤细胞不像神经、心肌细胞等生理Ca²⁺含量丰富,预实验时使用较低浓度的H₂O₂时(5 mmol/L、10 mmol/L)时,没有观察到显著的[Ca²⁺]_i变化,也可能是由于实时观察时间不够长,因此使用了较高浓度的H₂O₂,低浓度的H₂O₂是否影响A549细胞其他生物学行为还有待于进一步研究。

此外,本研究利用Cameleon YC3.6质粒转染肺癌A549细胞表达Ca²⁺指示蛋白,采用激光扫描共聚焦显微镜实时观察H₂O₂作用下细胞内[Ca²⁺]_i变化,选取两个细胞中计算得到的[Ca²⁺]_i变化范围不太一致,可能是由于细胞状态的差异造成对H₂O₂刺激的反应不同。我们还发现,加入H₂O₂后R值增大但不会稳定在最高水平,推测可能是由于细胞内Ca²⁺与CaM的结合是不稳定的,与Cameleon测钙系统的动力学有关。而加入Ionomycin+EGTA后,R值出现短暂增大,我们分析原因可能是钙库中[Ca²⁺]_i仍高于胞浆时,Ca²⁺在Ionomycin作用下,继续向胞浆转运导致胞浆内[Ca²⁺]_i的短暂升高。我们的结果表明,Ca²⁺指示蛋白Cameleon YC3.6检测[Ca²⁺]_i变化的灵敏度较高,而且能对细胞内[Ca²⁺]_i进行定量,得到细胞内[Ca²⁺]_i变化范围。在[Ca²⁺]_i测定过程中,还应该注意一些问题:(1)发生FRET是Cameleon ratio测定[Ca²⁺]_i的重要前提,因此细胞状态要非常好,否则会影响转染效果和荧光强度,可能即使[Ca²⁺]_i有变化也观察不到FRET现象;(2)选择合适的刺激因素及其浓度很重要;(3)使用5%激光强度,尽量减少光漂

白效应;(4)选择2个以上发出较强荧光的细胞;(5)同时采集细胞DIC图像,用于观察细胞状态以及是否发生漂移,辅以监测荧光强度基线的稳定。

致谢——

在此特别感谢Prof. Atsushi Miyawaki (Laboratory for Cell Function Dynamics, RIKEN Brain Science Institute, Japan)赠予我们Cameleon YC3.6质粒。

参考文献 (References)

- 薛全福,王振纲.钙超载的危害和新型钙阻断剂的研发.中国药理学杂志(Xue Quanfu, Wang Zhengang. Calcium overload hazard and new type calcium antagonist investigations. Chinese Pharmaceutical Journal) 2009; 44(2): 150-2.
- Morgado S, Granados MP, Bejarano I, Lopez JJ, Salido GM, Gonzalez A, *et al.* Role of intracellular calcium on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pancreatic acinar AR42J cells. J Appl Biomed 2008; 6(4): 211-24.
- Melendez J, Turner C, Avraham H, Steinberg SF, Schaefer E, Sussman MA. Cardiomyocyte apoptosis triggered by RAFTK/pyk2 via Src kinase is antagonized by paxillin. J Biol Chem 2004; 279(51): 53516-23.
- Azar ZM, Mehdi MZ, Srivastava AK. Activation of insulin-like growth factor type-1 receptor is required for H₂O₂-induced PKB phosphorylation in vascular smooth muscle cells. Can J Physiol Pharmacol 2006; 84(7): 777-86.
- Bouallegue A, Pandey NR, Srivastava AK. CaMKII knockdown attenuates H₂O₂-induced phosphorylation of ERK1/2, PKB/Akt, and IGF-1R in vascular smooth muscle cells. Free Radic Biol Med 2009; 47(6): 858-66.
- Andreolotti AG, Bragado MJ, Tapia JA, Jensen RT, Garcia-Marin LJ. Adapter protein CRKII signaling is involved in the rat pancreatic acini response to reactive oxygen species. J Cell Biochem 2006; 97(2): 359-67.
- Horikawa K, Yamada Y, Matsuda T, Kobayashi K, Hashimoto M, Matsu-ura T, *et al.* Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca²⁺ indicators, yellow Cameleon-Nano. Nat Methods 2010; 7(9): 729-32.
- Min SK, Lee SK, Park JS, Lee J, Paeng JY, Lee SI, *et al.* Endoplasmic reticulum stress is involved in hydrogen peroxide induced apoptosis in immortalized and malignant human oral keratinocytes. J Oral Pathol Med 2008; 37(8): 490-8.
- 杨琦,刘洁,崔泽实.荧光钙离子测定技术在医学研究中的意义及应用.中国医学装备(Yang Qi, Liu Jie, Cui Zeshi. The application of the fluorescence calcium measurement technique in medical experimental research. China Medical Equipment) 2005; 2(9): 11-13,14.
- Schaller MD. Calcium-dependent Pyk2 activation: A role for calmodulin? Biochem J 2008; 410(3): e3-4.
- Zhang X, Xu LH, Yu Q. Cell aggregation induces phosphorylation of PECAM-1 and Pyk2 and promotes tumor cell anchorage-independent growth. Mol Cancer 2010; 9: 7.
- Li GY, Fan B, Zheng YC. Calcium overload is a critical step in programmed necrosis of ARPE-19 cells induced by high-concentration H₂O₂. Biomed Environ Sci 2010; 23(5): 371-7.