

# H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>通过钙稳态失调诱导小鼠胚胎肝细胞凋亡

赵培<sup>1</sup> 闫晓凤<sup>2</sup> 王晓玲<sup>2\*</sup><sup>1</sup>上海中医药大学教学实验中心, 上海 201203; <sup>2</sup>上海中医药大学基础医学院生物教研室, 上海 201203)

**摘要** 该文研究了体外培养肝细胞内钙离子浓度改变对细胞存活率、凋亡和增殖的影响。建立了H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导小鼠胚胎肝细胞损伤模型, CCK-8检测细胞存活率, Fura-2/AM负载检测细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; 免疫荧光和Western blot分别检测STIM1和Orai1在细胞内的定位和含量; 流式细胞术检测细胞凋亡; Brdu掺入检测细胞增殖。结果显示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激后细胞存活率降低为对照组的73%, 凋亡细胞比例增加, 增殖细胞数目显著减少, 细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高, STIM1和Orai1蛋白质水平增加, 且STIM1可与Orai1蛋白质共定位。2-APB预处理组可以降低细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, 减少STIM1和Orai1蛋白质表达水平, 抑制STIM1和Orai1蛋白质的相互作用。结果表明, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可通过影响细胞内钙离子稳态导致细胞凋亡。

**关键词** 肝细胞; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 钙离子稳态; 细胞凋亡

## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induced Hepatocyte Apoptosis by Intracellular Calcium Homeostasis

Zhao Pei<sup>1</sup>, Yan Xiaofeng<sup>2</sup>, Wang Xiaoling<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Experiment Center for Teaching & Learning, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;<sup>2</sup>Department of Biology, School of Basic Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Abstract** This work was aim to investigate the effect of intracellular calcium homeostasis on apoptosis in hepatocytes. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used to induce hepatocyte injury, CCK-8 assay was used to measure cell viability. Cytosolic free calcium ion concentration was determined by Fura-2/AM. The cell proliferation and intracellular colocalization of STIM1 and Orai1 were detected by immunofluorescence. The expressions of STIM1, Orai1, Bax were evaluated by Western blot. Apoptosis was assayed with flow cytometry. Our results indicated that after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cell viability reduced to 73%, the number of apoptotic cells increased but proliferating cells reduced. Compared with the control, the intracellular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells was significantly increased, protein expression of STIM1 and Orai1 was up-regulated, colocalization of STIM1 and Orai1 was increased; while the 2-APB treatment could reduce [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, down-regulate protein expression of STIM1 and Orai1 and decrease the colocalization of STIM1 and Orai1. Our study suggested that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could induce cell apoptosis by cellular calcium homeostasis.

**Keywords** hepatocyte; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; calcium homeostasis; apoptosis

在非兴奋细胞中, 钙池操纵的钙离子通道(store-operated Ca<sup>2+</sup> channels, SOCs)是细胞外钙离子进入细胞内的主要通道。内质网上的钙离子感

受体基质交感分子1(stromal interaction molecules 1, STIM1)和细胞质膜上的钙离子释放激活钙离子通道蛋白Orai1, 是构成SOCS的主要成分<sup>[1]</sup>。2-氨

收稿日期: 2015-04-14 接受日期: 2015-07-14

上海市教委预算内项目(批准号: 2014YSN22、2014YSN03)和上海中医药大学教师学术共同体项目(批准号: p304030105)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-51322585, E-mail: wxlzzx@sohu.com

Received: April 14, 2015 Accepted: July 14, 2015

This work was supported by the Budget Research Project of Shanghai Education Commission (Grant No.2014YSN22, 2014YSN03) and Faculty Academic Community of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (Grant No.p304030105)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-51322585, E-mail: wxlzzx@sohu.com

网络出版时间: 2015-09-06 17:00:01

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150906.1700.002.html>

基乙酯二苯基硼酸(2-aminoethoxydiphenyl borate, 2-APB)可直接抑制SOCs的表达,从而阻断细胞外钙离子的内流,因此,2-APB是该通道的特异抑制剂<sup>[2]</sup>。钙离子是细胞内重要的第二信使,细胞内钙稳态对细胞的正常生理活动非常重要,当某些因素导致细胞内钙稳态失调时,可造成细胞各种功能改变,甚至诱导细胞凋亡<sup>[3-4]</sup>。细胞凋亡与细胞内钙稳态失调密切相关。

细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)是细胞内代谢过程的重要中间产物,体内过量的ROS可激发细胞凋亡<sup>[5]</sup>,其诱发凋亡可发生在凋亡过程的各环节。细胞凋亡过程中同时存在胞内Ca<sup>2+</sup>浓度上升和ROS的过度产生,虽然Ca<sup>2+</sup>水平的升高和ROS堆积都是细胞凋亡中的重要事件,但ROS是否可促发Ca<sup>2+</sup>内流仍存在争议。本研究利用过氧化氢(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)刺激小鼠胚胎肝细胞,观察细胞损伤时钙离子通过SOCs的内流以及细胞内钙稳态对细胞凋亡的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

小鼠胚胎肝细胞(BNL.Cl<sub>2</sub>)购自中国科学院上海细胞库;DMEM高糖培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司;钙离子荧光探针Fura-2/AM和CCK8购自日本株式会社同仁化学研究所;30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(1001218)购自国药公司;BCA蛋白定量试剂盒(P0010)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、蛋白预染Marker、ECL化学发光试剂盒、4'-二脒基-2-苯基吲哚(4'-diamidino-2-phenylindole, DAPI)购自碧云天生物技术研究所;STIM1抗体和GAPDH购自Cell Signaling公司;Orai1抗体购自Abcam公司;辣根标记山羊抗兔IgG二抗和5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, Brdu)、2-APB购自美国Sigma公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 CCK-8测定细胞存活率 将细胞接种于96孔板(2 000/孔),24 h后用不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(100, 200, 300, 400, 500 μmol/L)处理4 h;选择400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在不同时间点(0, 1, 2, 3, 4 h)处理细胞。每组设4个复孔,每个实验重复3次。每孔加入10 μL CCK-8溶液,于37 °C孵箱内孵育2 h后再用酶标仪测吸光度(D<sub>450</sub>),细胞存活率=(处理组吸光度-空白对照组吸光度)/(正常对照组吸光度-空白对照组吸光度)×100%。

1.2.2 钙离子成像系统检测[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 细胞接种于激光共聚焦培养皿,培养24 h后弃培养液,Hank's液洗涤2次;加入Fura-2/AM工作液(终浓度5 μmol/L),避光,37 °C孵育30 min;弃工作液,Hank's液洗涤1次;再加入Hank's液洗涤20 min。将细胞放入显微镜载物台上,应用双波长340 nm和380 nm激发,发射波长510 nm,每隔10 s扫描一次,F<sub>0</sub>表示基线稳定时340/380的比值,F表示每次扫描的340/380比值,以F/F<sub>0</sub>来反映钙离子荧光强度,实验重复3次。

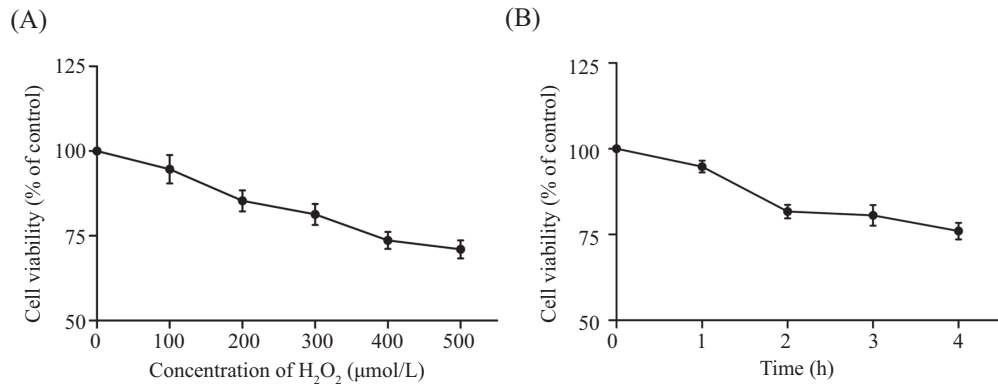
1.2.3 细胞免疫荧光检测STIM1、Orai1共定位和细胞增殖 400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激2 h后,弃培养液,PBS洗细胞2次,4%多聚赖氨酸室温固定30 min;加入0.2% Triton X-100室温透化30 min;马血清室温封闭30 min;加入一抗(STIM1 1:100、Orai1 1:20),4 °C孵育过夜;加入二抗(1:200),37 °C孵育2 h;DAPI室温染核2 min;抗淬灭剂30 μL封片;荧光显微镜下观察,拍照。

细胞接种于96孔培养板(2 000/孔),经400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激2 h,弃上清,加入Brdu处理24 h后,4%多聚赖氨酸固定细胞,加一抗,4 °C过夜,PBS洗涤,二抗室温孵育30 min,PBS洗涤,DAPI染核,加抗淬灭剂30 μL,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4 Western blot检测STIM1、Orai1、Bax蛋白水平 400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激2 h后,用预冷的PBS洗涤细胞2次,加入RIPA裂解细胞,BCA试剂盒测定总蛋白浓度。SDS-PAGE电泳,湿法转膜转印蛋白质至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,加入相应一抗(STIM1 1:1 000,Orai1 1:500,Bax 1:1 000,GAPDH 1:3 000),4 °C孵育过夜,TBST洗涤3次,加入HRP标记的二抗(1:3 000)室温孵育2 h,TBST洗涤3次,ECL发光显影,运用Image J图像分析软件对条带进行灰度分析,目的蛋白与内参GAPDH/β-actin的灰度比值来代表各自的蛋白质含量。实验重复3次。

1.2.5 流式细胞检测 将细胞接种在直径为60 mm的培养皿中,400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激2 h后,PBS洗涤细胞,0.25%胰蛋白酶消化细胞,离心后,将细胞重悬在1×Annexin V binding buffer中(确保细胞浓度1×10<sup>6</sup>/mL),加入5 μL Annexin V和5 μL PI,室温避光孵育15 min,置冰上,轻轻混匀,1 h内上机检测。

1.2.6 统计学分析 实验数据采用SPSS 15.0软件进行分析,结果以平均值±标准差表示,组间均数比较采用单因素分析(ANOVA),P<0.05表示差异具有统计学意义。



A: 不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理小鼠胚胎肝细胞4 h后的细胞存活率; B: 400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理小鼠胚胎肝细胞不同时间的细胞存活率。

A: the viability of hepatocytes treated with different concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 4 h; B: the viability of hepatocytes treated with 400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated hepatocytes for different time.

图1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对肝细胞存活率的影响

Fig.1 The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on hepatocytes viability

## 2 结果

### 2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对细胞存活率的影响

如图1A所示, 不同浓度(100, 200, 300, 400, 500 μmol/L) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理小鼠胚胎肝细胞4 h, 细胞存活率分别为正常对照组的89.9%、84.4%、81.1%、73%和70%, 随H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的升高小鼠胚胎肝细胞的存活率逐渐下降。以400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理小鼠胚胎肝细胞不同时间(1, 2, 3, 4 h), 结果发现, 细胞的存活率分别为正常对照组的93.9%、81.3%、77.5%和73%, 随着时间的延长, 小鼠胚胎肝细胞的存活率逐渐下降(图1B)。结果表明, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对小鼠胚胎肝细胞的存活率影响呈剂量和时间依赖性。

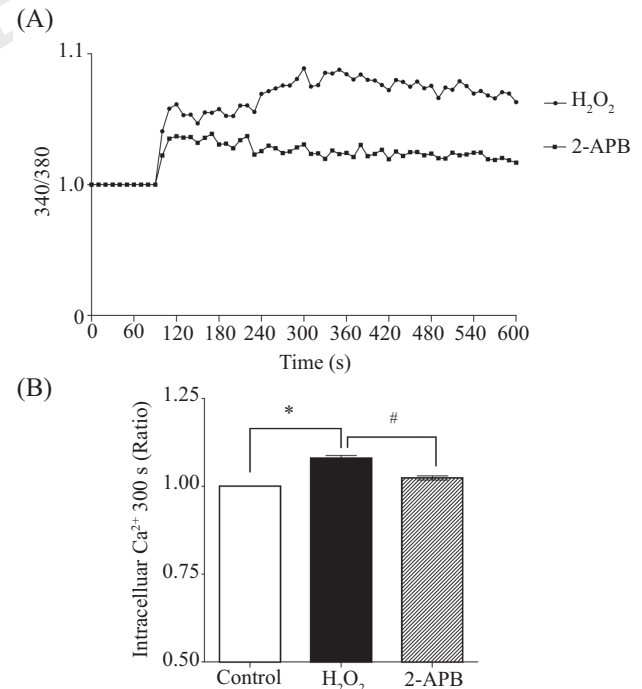
### 2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激对细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的影响

为了检测H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对细胞内钙离子浓度的影响, 采用钙离子荧光探针Fura-2/AM在波长340/380的荧光强度比值代表钙离子的浓度。细胞内基础钙离子浓度稳定后, 加入400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>于培养液中, 可见340/380比值随时间进程明显上升, 提示细胞内钙离子浓度持续增加; 与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较, 2-APB显著降低H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激增高的细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>水平。选择300 s记录的340/380比值进行统计学分析, 并与细胞内基础钙离子浓度比较, 发现H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>显著增加, 而2-APB组较H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>明显降低( $P < 0.05$ )(图2)。

### 2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对细胞STIM1和Orai1蛋白质定位的影响

STIM1在细胞内定位于内质网, Orai1定位于细胞膜。当STIM1移位到质膜附近与质膜上的Orai1蛋白结合, 可促使SOCs通道开放, 发生细胞外钙离子内流。对照组中STIM1与Orai1表达水平较低, 且共

定位不明显; 而H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组STIM1与Orai1不仅表达水平增加, 且明显发生共定位, 表明H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用后, STIM1由细胞内均匀分布逐渐移向细胞膜, 且与膜蛋白质Orai1结合; 2-APB预处理组STIM1和Orai1蛋白质表达水平显著降低并且二者的共定位也不明显(图3)。



A: 基线稳定后, 400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>加入培养上清液, 每10 s扫描一次荧光强度; B: 300 s时荧光强度比值, \* $P < 0.05$ , # $P < 0.05$ 。

A: 400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added to medium after the baseline was stable, the fluorescence intensity was acquired at 10 s intervals; B: the ratio of fluorescence intensity at 300 s,  $P < 0.05$ , # $P < 0.05$ .

图2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和2-APB对细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的影响

Fig.2 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 2-APB on intracellular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>



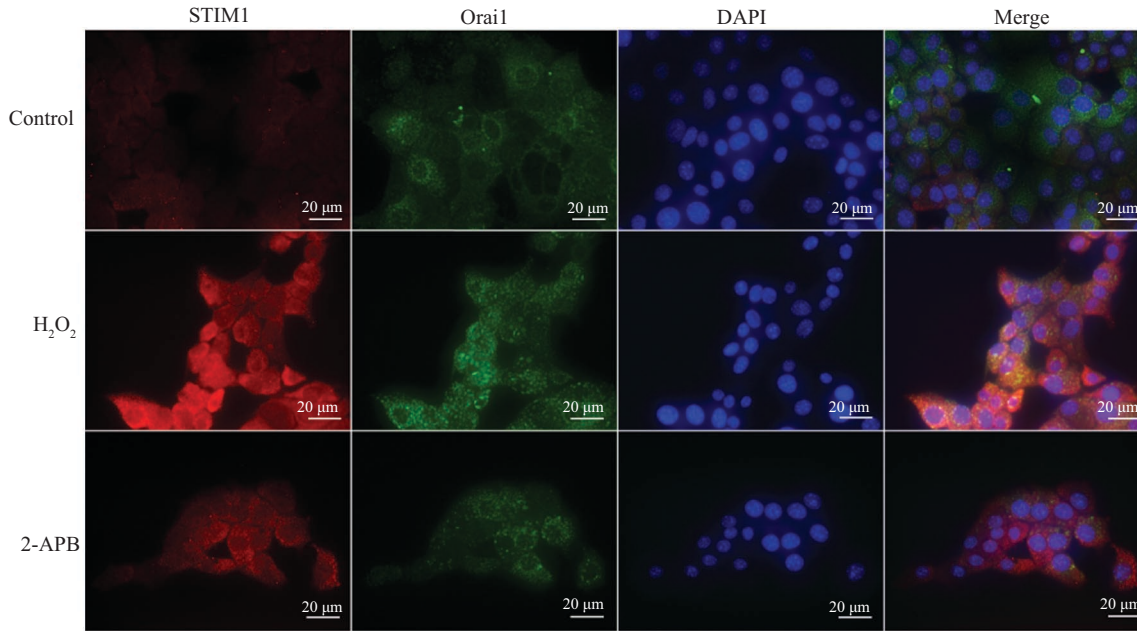
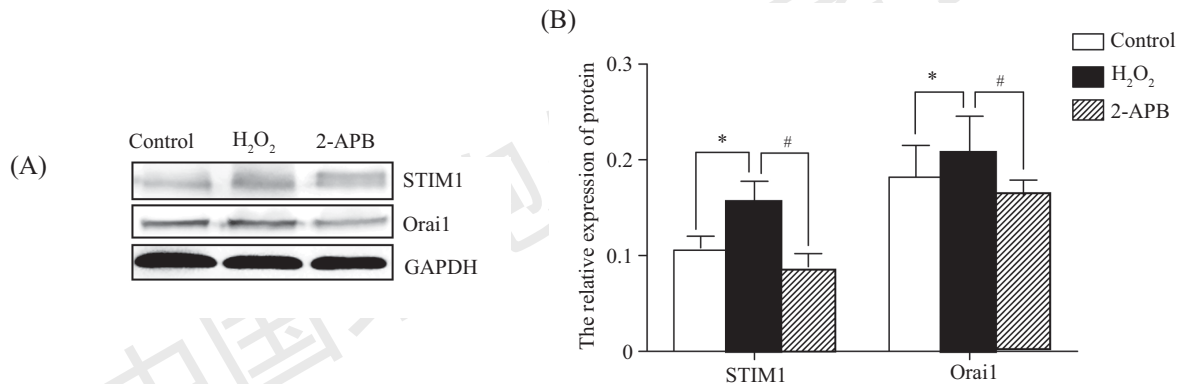


图3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导STIM1从胞质到质膜与Orai1结合

Fig.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced STIM1 from plasma to membrane and combined with Orai1



A: Western blot检测STIM1和Orai1蛋白质表达水平; B: STIM1和Orai1蛋白质条带的定量分析, \* $P < 0.05$ , # $P < 0.05$ 。

A: the expressions of STIM1 and Orai1 in hepatocytes detected by Western blot; B: quantitative analysis of optical densities of STIM1 and Orai1 levels and normalized to the expression of GAPDH, \* $P < 0.05$ , # $P < 0.05$ 。

图4 Western blot检测STIM1和Orai1表达的变化

Fig.4 The changes of STIM1 and Orai1 detected by Western blot

## 2.4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对细胞SOCs通道蛋白质表达水平的影响

与对照组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激组明显增加细胞STIM1及Orai1蛋白质表达水平( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 2-APB预处理组明显降低H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激升高的STIM1及Orai1蛋白质表达水平(图4)。

## 2.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对细胞凋亡的影响

对照组细胞早期和晚期凋亡率分别为0.72%和3.76%, 经400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后, 细胞的早期凋亡率增加到3.39%, 晚期凋亡率增加到10.57%, 显示凋亡细胞数目增加。Bax是Bcl-2家族的促凋亡蛋白质, 也是细胞损伤和刺激的传感器, Western blot结果显

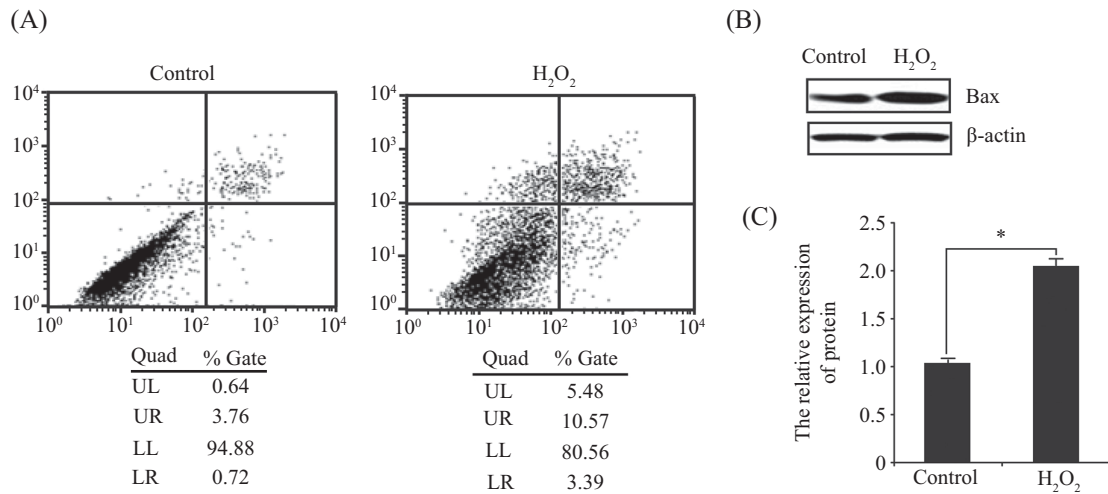
示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激后细胞Bax蛋白质水平显著升高(图5)。

## 2.6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对细胞增殖的影响

BrdU掺入正在合成DNA的细胞, 而DAPI可染色细胞核, 共定位结果可见H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用后, 增殖的肝细胞数目明显较正常对照组细胞数目减少(图6)。

## 3 讨论

在我国, 除了有1.2亿病毒性肝炎携带者外, 酒精性和非酒精性肝炎、脂肪肝、肝硬化、肝癌等肝脏疾病的发病率也非常高, 严重威胁人们的健康。肝细胞是肝脏中含量最丰富的实质细胞, 因此, 肝细



A: 流式细胞术检测肝细胞凋亡; B: Western blot检测Bax蛋白质变化; C: 灰度比值分析, \*P<0.05。

A: flow cytometry analysis of cell apoptosis in hepatocytes; B: Bax levels detected by Western blot; C: quantitative analysis of optical densities of Bax levels and normalized to the expression of β-actin, \*P<0.05.

图5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导肝细胞凋亡

Fig.5 Apoptosis in hepatocytes induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

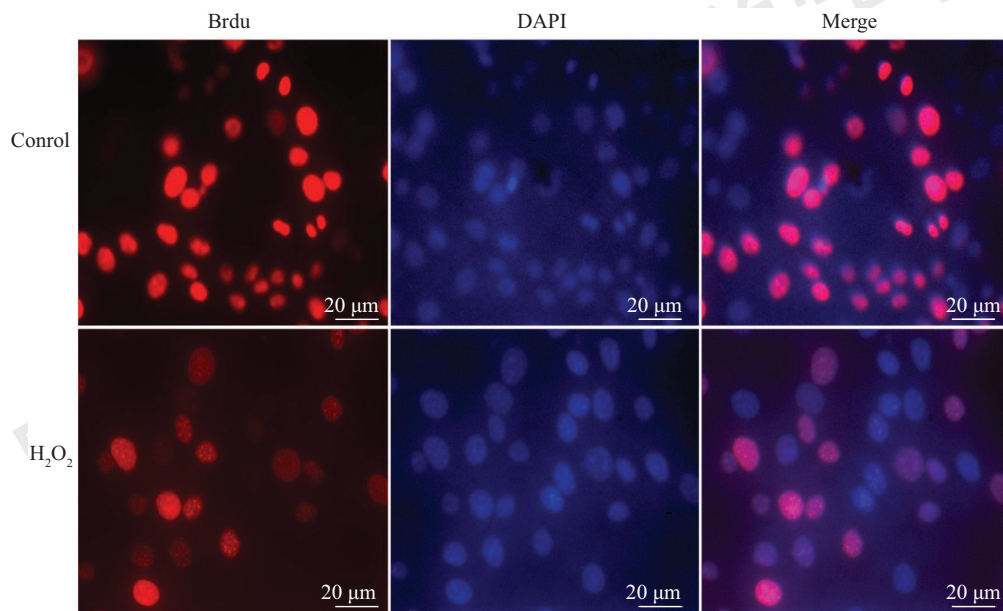


图6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>抑制肝细胞增殖

Fig.6 Proliferation in hepatocytes induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

胞损伤是各种肝脏疾病常见的病理基础。在众多导致肝细胞损伤的因素中, ROS引发的过氧化损伤在肝细胞损伤中起着非常重要的作用。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是一种强氧化剂, 是ROS重要的一员, 常被应用于诱导过氧化损伤的实验模型中<sup>[6-7]</sup>。在本实验中, 400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激肝细胞, 发现细胞存活率显著降低, 细胞增殖减少, 细胞凋亡增加。

有研究表明, 过氧化损伤可使细胞内钙离子浓度增加, 进而加速细胞的损伤<sup>[8-9]</sup>。神经元、心肌等

可兴奋细胞中Ca<sup>2+</sup>通道的研究比较成熟, 但非兴奋细胞Ca<sup>2+</sup>通道研究较少且尚无成熟理论。SOCs是包括肝细胞在内的非兴奋细胞胞外钙离子内流的主要通道。STIM1和Orai1是构成SOCs的关键分子。在细胞静息时, STIM1和Orai1分别均匀分布在内质网和质膜上, STIM1可结合Ca<sup>2+</sup>; 当内质网Ca<sup>2+</sup>浓度降低时, STIM1与Ca<sup>2+</sup>解离, 导致构象改变, 继而迅速引起多个STIM1分子相互结合形成STIM1寡聚体。这些STIM1寡聚体在其C-末端富含碱性氨基酸靶向细

胞膜序列引导下易位至ER(内质网)-PM(细胞膜)连接处, 聚集分布, 形成STIM1斑点。STIM1斑点直接或者通过某种分子激活Orai1, 使Orai1聚合至STIM1斑点的胞膜对应处, 形成STIM1/Orai1复合物继而SOCs通道开放, 引起细胞外钙离子内流<sup>[10]</sup>。本研究发现, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可诱导Ca<sup>2+</sup>浓度增高, 增加STIM1和Orai1蛋白质水平, 并促使STIM1蛋白质易位至ER-PM连接处与Orai1蛋白质相互作用, 提示钙离子的内流与SOCs通道开放有关。

钙离子通道阻断剂2-APB是一种具有细胞膜通透性的有机化合物, 是研究钙离子通道的重要工具药物。有研究认为, 2-APB可以直接与SOCs相互作用, 对SOCs的选择性很强, 对其他钙通道没有明显作用<sup>[11]</sup>。黄昌州等<sup>[12]</sup>通过将不同浓度的2-APB直接加至肝细胞周围, 发现Isoc(SOCs电流)被2-APB抑制并呈浓度依赖性增强, 提示2-APB能直接抑制人肝细胞的Isoc。另有文献报道, 2-APB可抑制STIM1易位到ER-PM连接处形成STIM1斑点, 直接阻断Orai1介导的Ca<sup>2+</sup>内流<sup>[13]</sup>。我们的研究发现, 2-APB可减少STIM1和Orai1蛋白质的表达水平, 抑制STIM1蛋白易位与Orai1蛋白相互作用, 进而抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的Ca<sup>2+</sup>内流, 提示H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的Ca<sup>2+</sup>内流可通过SOCs通道实现。

总之, 本研究结果显示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激可诱导肝细胞增加SOCs通道蛋白分子STIM1和Orai1的表达, 促进STIM1移位至细胞膜并与膜上的Orai1相互作用, 导致SOCs通道开放, 细胞外Ca<sup>2+</sup>流入细胞内, 使细胞内钙离子浓度增高——钙稳态失调, 最终不仅使肝细胞增殖能力降低, 而且促使肝细胞凋亡。

### 参考文献 (References)

- 1 Chang WC, Parekh AB. Close functional coupling between Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels, arachidonic acid release, and leukotriene C4 secretion. *J Biol Chem* 2004; 279(29): 29994-9.
- 2 Dobrydneva Y, Blackmore P. 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits store-operated calcium entry channels in human platelets. *Mol Pharmacol* 2001; 60(3): 541-52.
- 3 Zhang J, Li Y, Jiang S, Yu H, An W. Enhanced endoplasmic reticulum SERCA activity by overexpression of hepatic stimulator substance gene prevents hepatic cells from ER stress-induced apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014; 306(3): C279-C90.
- 4 Borahay MA, Kilic GS, Yallampalli C, Snyder RR, Hankins GD, Al-Hendy A, *et al.* Simvastatin potently induces calcium-dependent apoptosis of human leiomyoma cells. *J Biol Chem* 2014; 289(51): 35075-86.
- 5 Hwang GH, Jeon YJ, Han HJ, Park SH, Baek KM, Chang W, *et al.* Protective effect of butylated hydroxyanisole against hydrogen peroxide-induced apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. *J Vet Sci* 2015; 16(1): 17-23.
- 6 Gerich FJ, Funke F, Hildebrandt B, Fasshauer M, Muller M. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated modulation of cytosolic signaling and organelle function in rat hippocampus. *Pflugers Arch* 2009; 458(5): 937-52.
- 7 Hecquet CM, Malik AB. Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thromb Haemost* 2009; 101(4): 619-25.
- 8 Hinshaw DB, Miller MT, Omann GM, Beals TF, Hyslop PA. A cellular model of oxidant-mediated neuronal injury. *Brain Res* 1993; 615(1):13-26.
- 9 Starke PE, Hoek JB, Farber JL. Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of irreversible cell injury in cultured hepatocytes. *J Biol Chem* 1986; 261(7): 3006-12.
- 10 Redondo PC, Rosado JA. Store-operated calcium entry: Unveiling the calcium handling signalplex. *Int Rev Cell Mol Biol* 2015; 316: 183-226.
- 11 Gregory RB, Rychkov G, Barritt GJ. Evidence that 2-Aminoethoxydiphenyl Borate is a novel inhibitor of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels in liver cells, and act through a mechanism which does not involve inositol trisphosphate receptors. *Biochem J* 2001; 354: 285-90.
- 12 黄昌州, 张辉, 赵中辛, 张宗明, 裘法祖. 钙通道抑制剂对人肝细胞钙池操纵钙通道电流的影响. *中华实验外科杂志* (Huang Changzhou, Zhang Hui, Zhao Zhongxin, Zhang Zongming, Qiu Fazu. Effects of 2-APB on store-operated Ca<sup>2+</sup> channels currents in human hepatocytes. *Chin J Exp Surg* 2006; 7(23): 821-2.
- 13 DeHaven WII, Smyth JT, Boyles RR, Bird GS, Putney JW Jr. Complex actions of 2-aminoethoxydiphenyl borate on store-operated calcium entry. *J Biol Chem* 2008; 283(28): 19265-73.