

应用Ca²⁺荧光探针fluo-3和fluo-4测定H₂O₂诱导的A549细胞凋亡过程中的[Ca²⁺]_i变化

张四洋 李春艳 高建 邱雪杉 崔泽实

【摘要】背景与目的 肺癌是世界范围内常见的恶性肿瘤，Ca²⁺对于肿瘤细胞凋亡有重要的调控作用。实时监测肺癌细胞内Ca²⁺水平，有助于深入研究Ca²⁺介导肺癌细胞凋亡的分子机制。本研究旨在观察Ca²⁺荧光探针fluo-3和fluo-4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），探讨[Ca²⁺]_i与细胞凋亡的关系，并比较两种Ca²⁺探针在荧光强度及[Ca²⁺]_i测定值方面的差异。**方法** 采用Ca²⁺荧光探针fluo-3和fluo-4负载细胞，1 h后用不同浓度的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DAPI染色试剂盒观察H₂O₂刺激后细胞凋亡情况。**结果** 在相同的探针浓度、负载时间和相同的图像采集参数的条件下，选定细胞内fluo-4平均荧光强度高于fluo-3。50 mM H₂O₂刺激后，A549细胞胞浆内[Ca²⁺]_i迅速升高，通过公式计算发现采用fluo-3探针负载的选定细胞中[Ca²⁺]_i变化范围是112.2 nM-1,069.6 nM，采用fluo-4探针负载的选定细胞中[Ca²⁺]_i变化范围是7.6 nM-505.4 nM。同时发现经H₂O₂刺激后，凋亡细胞百分比明显增加（P<0.01）。**结论** H₂O₂促进A549细胞内Ca²⁺释放，诱导细胞凋亡。Ca²⁺探针fluo-4可能更适合于监测含量较低的细胞中[Ca²⁺]_i变化。

【关键词】 Fluo-3; Fluo-4; Ca²⁺; H₂O₂; 细胞凋亡

Application of the Ca²⁺ Indicator Fluo-3 and Fluo-4 in the Process of H₂O₂ Induced Apoptosis of A549 Cell

Siyang ZHANG¹, Chunyan LI¹, Jian GAO¹, Xueshan QIU², Zeshi CUI¹

¹Center of Laboratory Technology and Experimental Medicine; ²Department of Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: Zeshi CUI, E-mail: labczs@mail.cmu.edu.cn

【Abstract】 **Background and objective** Lung cancer is a common malignant tumor all over the world, and Ca²⁺ is a critical regulator for apoptosis of cancer cells. The monitoring of cytoplasmic Ca²⁺ level in real-time will contribute to further investigate the molecular mechanisms of apoptosis mediated by Ca²⁺ in lung cancer cells. To evaluate the Ca²⁺ indicator fluo-3 and fluo-4 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 were investigated. The differences in fluorescence intensity and measured value were compared between the two Ca²⁺ indicators. **Methods** Cells were loaded with the Ca²⁺ indicator fluo-3 or fluo-4 for 1 h, and then stimulated with 50 mM H₂O₂. Laser scanning confocal microscope was applied to perform real-time monitoring on the variation of [Ca²⁺]_i in selected cells. DAPI staining was used to observe apoptosis in H₂O₂ treated cells. **Results** Our results showed that the fluorescence intensity of fluo-4 was stronger than that of fluo-3 in the same condition of dye concentration, loading time and image acquisition parameters before or after H₂O₂ stimulation. The cytoplasmic [Ca²⁺]_i was rapidly elevated in H₂O₂ stimulated A549 cells. The range of [Ca²⁺]_i in selected cells loaded with fluo-3 was 112.2 nM-1,069.6 nM, and that in selected cells loaded with fluo-4 was 7.6 nM-505.4 nM. Moreover, the apoptotic rate was significantly increased in H₂O₂ treated cells, compared with untreated ones (P<0.01). **Conclusion** In summary, H₂O₂ promoted Ca²⁺ release in A549 cells, and induced cell apoptosis. Ca²⁺ indicator fluo-4 was probably more applicable to measure [Ca²⁺]_i in cells with less content of Ca²⁺.

本研究受国家自然科学基金项目（No.81101599）、沈阳市科学技术项目（No.F11-241-00, No.F12-264-4-01）和辽宁省科学事业研究公益基金项目（No.2012006005）资助

作者单位：110001 沈阳，中国医科大学实验技术中心（张四洋，李春艳，高建，崔泽实）；病理学教研室（邱雪杉）（通讯作者：崔泽实，E-mail: labczs@mail.cmu.edu.cn）

【Key words】 Fluo-3; Fluo-4; Ca^{2+} ; H_2O_2 ; Apoptosis

This study was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (to Siyang ZHANG)(No.81101599), the Science and Technology Project of Shenyang (to Zeshi CUI)(No.F11-241-00, No.F12-264-4-01) and the Public Welfare Foundation Project of Science Enterprise Investigation in Liaoning Province (to Zeshi CUI)(No.2012006005).

Ca^{2+} 是非常重要的细胞内第二信使,参与肌细胞收缩、神经递质释放、细胞分化和细胞凋亡等生理、病理过程。细胞内生理 Ca^{2+} 浓度为10 nM-100 nM, Ca^{2+} 超载时浓度为基础浓度的10倍左右,与心脏疾病、神经损伤、肿瘤发生等多种疾病的发生发展密切相关^[1]。 H_2O_2 是常见的活性氧分子,向细胞外液加入 H_2O_2 ,可以使细胞处于氧化应激状态,文献^[2]报道 Ca^{2+} 介导了 H_2O_2 作用下的大鼠胰腺腺泡AR42J细胞的凋亡。肺癌是世界范围内常见的恶性肿瘤,研究^[3-5]表明,引起胞浆 Ca^{2+} 浓度升高的刺激通过依赖线粒体途径的caspases通路或内质网应激途径,诱导肺癌细胞发生凋亡。实时监测肺癌细胞内 Ca^{2+} 浓度和胞浆内 Ca^{2+} 水平,有助于深入研究 Ca^{2+} 介导肺癌细胞凋亡的分子机制,以寻找促进肺癌细胞凋亡的有效方法。

自1989年开始,应用荧光染料fluo-3对细胞内 Ca^{2+} 成像,揭示了很多涉及 Ca^{2+} 信号时空变化的细胞生物学功能。Fluo-3也结合流式细胞仪用于检测 Ca^{2+} 作为第二信使参与信号转导和细胞药理学筛选等实验研究。Fluo-3用于监测活细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化,其最主要的优势在于利用488 nm的氩离子激光源,可以在激光扫描共聚焦显微镜下观察,fluo-3与 Ca^{2+} 结合后其荧光强度迅速增强。Fluo-4是fluo-3的衍生物,用F取代了fluo-3分子中的2个Cl。其激发波长较fluo-3更接近488 nm,产生更强、更稳定的荧光信号,适合于多数配置氩离子激光器的激光扫描共聚焦显微镜观察^[6],也可以用于流式细胞仪检测,以及利用多功能酶标仪读取荧光信号^[7]。

本研究采用目前实验室常用的 Ca^{2+} 荧光探针fluo-3和fluo-4负载人肺癌A549细胞,观察 H_2O_2 处理的A549细胞中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化,对fluo-3和fluo-4的荧光强度和 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 测定值进行比较和分析,并探讨在 H_2O_2 作用下细胞凋亡情况。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 Fluo-3 AM (Biotium公司,纯度95%) 和fluo-4 AM (DOJINDO公司,纯度98%),均用DMSO溶解,0.22 μm 滤膜过滤除菌,贮存液浓度为1

mM, -20 °C避光保存。RPMI-1640培养基和胎牛血清为Hyclone公司产品,激光共聚焦显微镜专用培养皿(35 mm)购自NEST公司, Ionomycin和细胞固定液均为碧云天公司产品, DAPI细胞凋亡染色试剂盒购自凯基公司, H_2O_2 为国产分析纯。

1.2 细胞培养 采用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基,于37 °C、5% CO_2 培养箱中培养肺癌细胞A549, 0.25%胰酶-EDTA消化传代,所有实验均采用对数生长期细胞。

1.3 探针负载细胞并观察 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化 荧光探针fluo-3 AM和fluo-4 AM负载细胞时用无 Ca^{2+} 细胞外液(135 mM NaCl、2 mM KCl、2 mM MgCl_2 、10 mM HEPES、4 g/L葡萄糖)稀释成工作浓度5 μM 。细胞传代24 h后,弃去培养基,用PBS漂洗3次,向细胞中加入fluo-3 (5 μM)或fluo-4 (5 μM)工作液,避光37 °C孵育40 min。弃去荧光探针,更换新的无 Ca^{2+} 细胞外液,避光37 °C继续孵育20 min,保证AM在细胞内被充分水解。在FV1000型激光共聚焦显微镜(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488 nm波长激发、39%激光强度、PMT (790)、Pinhole (310 μm)、同时采集DIC图像,每5 s采集一幅,共采集40 min左右。首先扫描10幅待荧光强度曲线稳定后,向细胞中加入不同浓度的 H_2O_2 (5 mM、10 mM或50 mM);曲线稳定后,向细胞中加入EGTA (4 mM) + Ionomycin (5 μM);曲线再一次稳定后,向细胞中加入 CaCl_2 (10 mM),曲线稳定后中止实验。钙离子浓度计算公式为 $\text{Kd}(\text{F}-\text{Fmin})/(\text{Fmax}-\text{F})$ ^[8],其中fluo-3探针 $\text{Kd}=400$ nM, fluo-4探针 $\text{Kd}=360$ nM。

1.4 DAPI染色检测细胞凋亡 细胞经 H_2O_2 处理30 min后,用细胞固定液4%多聚甲醛室温固定10 min,加入DAPI染色液避光孵育20 min,在倒置荧光显微镜下观察,随机选取5个200 \times 镜下视野,计算凋亡细胞百分比。

1.5 统计学分析 采用SPSS13.0统计学软件,进行数据分析及处理。应用t检验比较fluo-3和fluo-4平均荧光强度的差异,应用 χ^2 检验比较凋亡细胞百分比, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

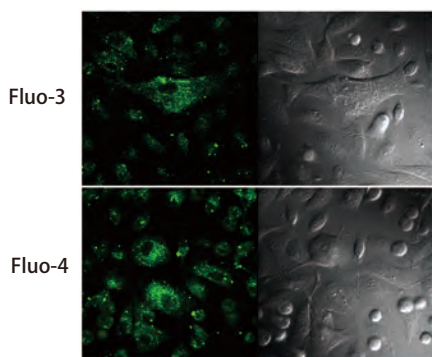


图1 H₂O₂刺激前，负载fluo-3或fluo-4的细胞荧光强度比较。66 mm×58 mm (300×300 DPI)。

Fig 1 The comparison of fluorescence intensity in cells loaded with fluo-3 or fluo-4 before H₂O₂ stimulation. 66 mm×58 mm (300×300 DPI).

2 结果

2.1 未经H₂O₂刺激前细胞中fluo-3和fluo-4染色结果比较在相同的细胞负载和图像采集条件下，未加H₂O₂处理时，fluo-3染色后的细胞在488 nm激发光激发下发出较弱的绿色荧光（图1）。Fluo-4染色后的细胞在488 nm激发光激发下发出较强的绿色荧光（图1）。

2.2 H₂O₂处理的细胞[Ca²⁺]_i变化 在5 mM或10 mM H₂O₂作用下，fluo-3和fluo-4荧光强度均无明显变化（结果未显示）。加入50 mM H₂O₂后，细胞荧光强度逐渐增强（图2），观察至40 min左右时，荧光强度曲线稳定不再变化（图3）。在实时观察[Ca²⁺]_i变化过程中，荧光探针fluo-3和fluo-4均未出现光漂白现象。观察结束时，fluo-3荧光强度增加至3.0倍，fluo-4荧光强度增加至2.6倍。H₂O₂刺激前，fluo-4荧光强度约是fluo-3荧光强度的2.0倍，而H₂O₂刺激后fluo-4荧光强度约是fluo-3荧光强度的1.8倍（表1）。通过公式计算发现采用fluo-3探针负载的选定细胞中[Ca²⁺]_i变化范围是112.2 nM-1,069.6 nM，采用fluo-4探针负载的选定细胞中[Ca²⁺]_i变化范围是7.6 nM-505.4 nM。

2.3 H₂O₂诱导细胞凋亡 细胞经H₂O₂刺激后固定，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（图4B），而对照组细胞核形态规则、染色均匀，呈蓝白色荧光（图4A）。结果显示与对照组细胞相比，H₂O₂处理的细胞凋亡率明显增加（12.2%±2.3% vs 33.4%±3.2%），有统计学意义（P<0.001）。

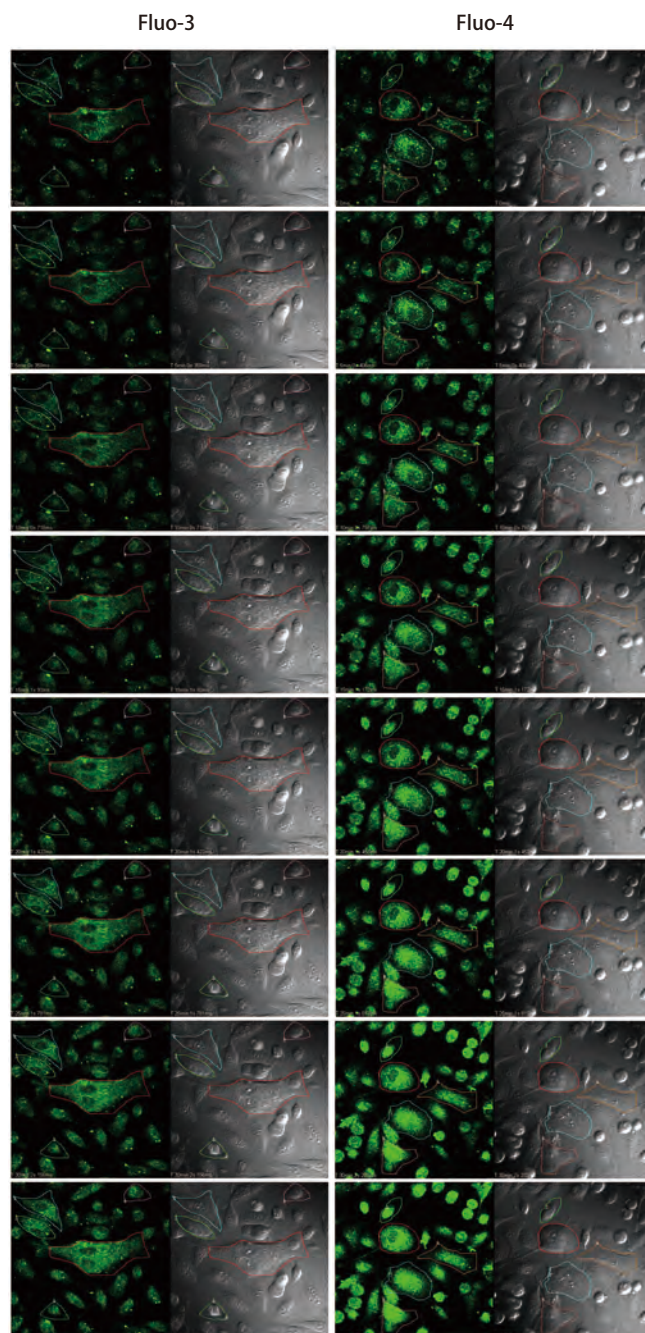


图2 H₂O₂刺激后，实时观察细胞中fluo-3和fluo-4荧光强度变化。141 mm×305 mm (300×300 DPI)。

Fig 2 The real-time observation of the fluorescence intensity in selected cells loaded with fluo-3 or fluo-4 after H₂O₂ stimulation. 141 mm×305 mm (300×300 DPI).

3 讨论

本研究在对Ca²⁺信号实时观察的过程中发现，较高浓度的H₂O₂（50 mM）诱导细胞内[Ca²⁺]_i迅速升高。由于细胞外液不含有Ca²⁺，因此[Ca²⁺]_i升高可能是由于细

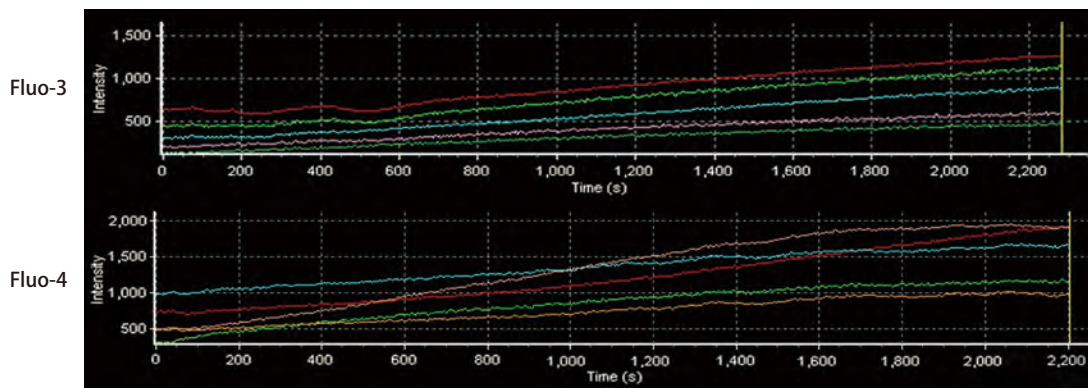


图3 H₂O₂刺激后, 选定细胞的fluo-3或fluo-4荧光强度变化曲线。145 mm×50 mm (300×300 DPI)。

Fig 3 The fluorescence intensity curve of selected cells loaded with fluo-3 or fluo-4 after H₂O₂ stimulation. 145 mm×50 mm (300×300 DPI).

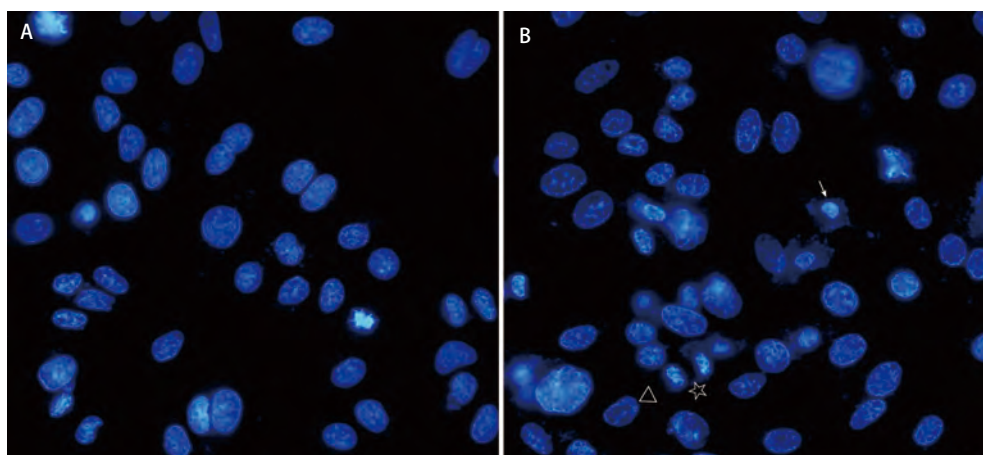


图4 H₂O₂促进A549细胞凋亡。A: 未经H₂O₂处理的细胞; B: H₂O₂处理的细胞, 可见核固缩 (→)、染色质边集 (△) 以及核碎裂 (☆)。65 mm×32 mm (300×300 DPI)。

Fig 4 H₂O₂ promoted the apoptosis of A549 cells. H₂O₂: cells without H₂O₂ treatment; B: karyopyknosis (→), chromatic condensation (△) and nuclear fragmentation (☆) were observed in H₂O₂ treated cells. 65 mm×32 mm (300×300 DPI).

表1 H₂O₂刺激前后, 选定细胞中fluo-3和fluo-4的平均荧光强度值

Table 1 The mean value of fluorescence intensity in selected cells loaded with fluo-3 or fluo-4 before and after H₂O₂ treatment

	Fluo-3		Fluo-4	
	Mean fluorescence intensity	Standard deviation	Mean fluorescence intensity	Standard deviation
Before stimulation	290.42	151.34	594.71	261.41
After stimulation	867.32	415.66	1558.48	437.54

胞的氧化应激反应, 导致细胞内钙库 (如内质网) 释放造成的。有研究^[9]表明, H₂O₂诱导细胞凋亡与钙超载密切相关, 氧化应激诱导细胞凋亡的分子机制非常复杂, 涉及很多信号转导通路, 包括经典的线粒体途径^[10]和死亡受体途径^[11], 以及机制仍不太明确的内质网途径^[12]。近年来, 对内质网凋亡途径的研究发现, 内质网应激导

致的非折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 扮演着重要角色。研究^[13]显示, 细胞的氧化应激损伤, 导致内质网释放大量Ca²⁺, 同时伴有内质网应激, 引发UPR, 用于ER正常功能的重建。如果细胞内Ca²⁺浓度持续升高, 内质网应激持续时间较长或非常严重, 将激活依赖Ca²⁺的激酶和磷酸酶^[14], 如calpain、caspase-12

和caspase-3级联反应,最终导致细胞凋亡^[15]。本研究发现,肺癌细胞A549在较高浓度的H₂O₂作用下,细胞内Ca²⁺浓度明显升高,同时发现细胞短时间内即发生凋亡,推测可能与内质网应激有关,calpains或caspases信号通路是否被Ca²⁺激活导致细胞凋亡,还有待于进一步深入研究。本研究中,可能由于肿瘤细胞的生理Ca²⁺含量较低,或实时观察时间有限,预实验时使用较低浓度的H₂O₂时(5 mM, 10 mM)时,没有观察到明显的[Ca²⁺]_i变化,因此我们采用较高浓度的H₂O₂刺激细胞,低浓度H₂O₂对A549细胞其他生物学行为的影响还有待于进一步研究。

Fluo-3和fluo-4是目前实验室中常用的Ca²⁺荧光染料,与Ca²⁺特异性结合后荧光强度明显增加。本研究对fluo-3和fluo-4在H₂O₂诱导的A549细胞凋亡过程中监测[Ca²⁺]_i变化的应用情况进行了比较。结果发现,在相同的负载浓度、孵育时间、细胞密度、刺激因素和图像采集条件下,fluo-4的荧光强度更强,大约是fluo-3的2倍左右,这提示我们当细胞内Ca²⁺信号较强时,用fluo-3或fluo-4都可以观察到明显的荧光强度的变化,但如果细胞内Ca²⁺信号较弱时,使用fluo-4探针可能更具优势。细胞经H₂O₂处理后,fluo-3荧光强度的变化范围大于fluo-4,可能由于荧光探针的Kd值不同,具有较大Kd值的fluo-3与Ca²⁺的亲合力较低,适合于检测较宽范围的[Ca²⁺]_i变化。我们还发现,采用荧光探针fluo-3或fluo-4,通过公式计算测定的细胞内[Ca²⁺]_i变化范围不是很一致,可能与选择的细胞有关,不同的细胞对H₂O₂刺激的反应不同,再多重复几次实验,可能会得到比较一致的结果。

Fluo-3和fluo-4进入细胞的方式均为酯负载法。Fluo-3和fluo-4与具有细胞膜通透性的乙酰甲酯(AM)相连形成Fluo-3 AM和fluo-4 AM复合物,穿过细胞膜后在细胞内被非特异性酯酶水解生成相应的Ca²⁺荧光探针,与Ca²⁺结合检测细胞内[Ca²⁺]_i变化。我们在实验过程中发现,含血清的培养基会影响fluo-3和fluo-4的负载,在激光共聚焦显微镜下观察荧光非常微弱,采集不到良好的荧光信号,这可能是由于含血清的培养基能阻止荧光染料进入细胞。使用标准的无钙细胞外液,由于没有血清和培养液的营养支持,对细胞状态和活性的影响较大,细胞可能在观察过程中逐渐皱缩、脱壁或凋亡,不能对细胞进行长时间检测。

近几年还出现了荧光强度更强、检测范围更宽、更灵敏的Ca²⁺荧光染料,如fluo-5F、fluo-5N、fluo-4FF,均为fluo-4的类似物,但与Ca²⁺结合的亲合力较低,更适合

于检测1 μM-1 mM范围内的Ca²⁺水平变化。Fluo-3和fluo-4测定的Ca²⁺饱和浓度为≥5 μM,当[Ca²⁺]_i升高超过5 μM时,即使有更多的Ca²⁺出现在细胞中,fluo-3和fluo-4也检测不到,而fluo-5F、fluo-5N、fluo-4FF测定的Ca²⁺饱和浓度为≥1 mM,这些新的Ca²⁺探针可以检测到更多的Ca²⁺,在检测高水平的Ca²⁺信号时更具优势。Fluo-5F、fluo-4FF的Kd值分别为2.3 μM和9.7 μM,而fluo-5N的Kd值高达90 μM,适合检测更高浓度的Ca²⁺变化^[16]。研究表明应根据细胞内[Ca²⁺]_i的变化水平选择合适的Ca²⁺荧光探针,当待测Ca²⁺浓度在荧光染料Kd值的0.1倍-10倍范围之内时其荧光强度与[Ca²⁺]_i呈良好的线性关系,检测结果最准确。

Fluo-3和fluo-4及其类似物均为化学合成的Ca²⁺荧光染料,与Ca²⁺有较高的亲合力,通过负载方式很容易进入细胞,但不能在亚细胞水平精确定位,而且可能出现光漂白现象,长时间观察时对细胞活性有影响。除了Ca²⁺荧光染料,近年来还出现了水母发光蛋白和Cameleon等^[17]基于生物发光的Ca²⁺荧光蛋白探针,需要通过基因转染方式进入细胞,与细胞器特异性基因连接表达重组蛋白,可实现精确的亚细胞定位,长时间观察其荧光强度稳定不会淬灭。目前我们已应用Ca²⁺荧光蛋白Cameleon YC3.6对H₂O₂刺激后A549细胞中[Ca²⁺]_i进行了测定^[18],但在比较化学合成的Ca²⁺荧光探针或Ca²⁺荧光蛋白这两种不同的检测方法方面,还有待于进一步研究。我们应根据实验目的、细胞种类、刺激因素以及检测条件选择合适的Ca²⁺荧光探针,以帮助我们深入研究不同刺激条件下肿瘤细胞内[Ca²⁺]_i变化, Ca²⁺信号转导的相关分子机制,以及对肿瘤细胞生物学行为的影响。

参考文献

- Xue QF, Wang ZG. Calcium overload hazard and new type calcium antagonist investigations. *Zhongguo Yao Xue Za Zhi*, 2009, 44(2): 150-152. [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*, 2009, 44(2): 150-152.]
- Morgado S, Granados MP, Bejarano I, et al. Role of intracellular calcium on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pancreatic acinar AR42J cells. *J Applied Biomed*, 2008, 6(4): 211-224.
- Wu SH, Hang LW, Yang JS, et al. Curcumin induces apoptosis in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells through ER stress and caspase cascade- and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Res*, 2010, 30(6): 2125-2133.
- Hung JY, Hsu YL, Ni WC, et al. Oxidative and endoplasmic reticulum stress signaling are involved in dehydrocostuslactone-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer*, 2010, 68(3): 355-365.
- Yang H, Zhang Q, He J, et al. Regulation of calcium signaling in lung cancer. *J*

- Thorac Dis, 2010, 2(1): 52-56.
- 6 Guatimosim S, Guatimosim C, Song LS. Imaging calcium sparks in cardiac myocytes. *Methods Mol Biol*, 2011, 689: 205-214.
 - 7 Robinson JA, Jenkins NS, Holman NA, *et al*. Ratiometric and nonratiometric Ca²⁺ indicators for the assessment of intracellular free Ca²⁺ in a breast cancer cell line using a fluorescence microplate reader. *J Biochem Biophys Methods*, 2004, 58(3): 227-237.
 - 8 Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 1985, 260(6): 3440-3450.
 - 9 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): 371-377.
 - 10 Chiara F, Gambalunga A, Sciacovelli M, *et al*. Chemotherapeutic induction of mitochondrial oxidative stress activates GSK-3 α/β and Bax, leading to permeability transition pore opening and tumor cell death. *Cell Death Dis*, 2012, 3: e444.
 - 11 Gómez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, *et al*. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 2008, 283(21): 14581-14589.
 - 12 Ip SW, Wu SY, Yu CC, *et al*. Induction of apoptotic death by curcumin in human tongue squamous cell carcinoma SCC-4 cells is mediated through endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathways. *Cell Biochem Funct*, 2011, 29(8): 641-650.
 - 13 Djalila Mekahli, Geert Bultynck, Jan B. Parys, *et al*. Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(6): a004317.
 - 14 Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(12): 1013-1030.
 - 15 Das A, Banik NL, Ray SK. Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids. *Int J Cancer*, 2006, 119(11): 2575-2585.
 - 16 Wu X, Bers D M. Sarcoplasmic reticulum and nuclear envelope are one highly interconnected Ca²⁺ store throughout cardiac myocyte. *Circ Res*, 2006, 99(3): 283-291.
 - 17 Horikawa K, Yamada Y, Matsuda T, *et al*. Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca(2+) indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nat Methods*, 2010, 7(9): 729-732.
 - 18 Zhang SY, Yu M, Gao J, *et al*. Application of the Cameleon monitoring system of Ca²⁺ in the process of H₂O₂ induced apoptosis of A549 cells. *Zhongguo Xi Bao Sheng Wu Xue Xue Bao*, 2013, 35(10): 1453-1458. [张四洋, 于淼, 高建, 等. Cameleon测钙系统在H₂O₂诱导的A549细胞凋亡过程中的应用. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(10): 1453-1458.]

(收稿: 2013-11-11 修回: 2013-11-29)

(本文编辑 南娟)



Cite this article as: Zhang SY, Li CY, Gao J, *et al*. Application of the Ca²⁺ indicator Fluo-3 and Fluo-4 in the process of H₂O₂ induced apoptosis of A549 cell. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2014, 17(3): 197-202. [张四洋, 李春艳, 高建, 等. 应用Ca²⁺荧光探针fluo-3和fluo-4测定H₂O₂诱导的A549细胞凋亡过程中的[Ca²⁺]变化. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(3): 197-202.] doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2014.03.03.