

钙离子信号蛋白 TRPC1 及 Orai1 参与了 HUVEC 经 SOC 和 ROC 介导的钙内流和 NO 生成

王腊梅, 钟 华, 唐 娜, 庞丽娟, 孙志萍, 何 芳

(新疆地方病与民族高发病教育部重点实验室 石河子大学医学院病理生理教研室, 新疆石河子市 832002)

[关键词] 瞬时受体电位通道 1; 钙释放激活钙通道调节分子 1; 钙敏感受体; 钙离子; 一氧化氮

[摘 要] 目的 研究瞬时受体电位通道 1 (TRPC1) 及钙释放激活钙通道调节分子 1 (Orai1) 在人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 经钙池操纵性钙通道 (SOC) 和受体操纵性钙通道 (ROC) 介导的 Ca^{2+} 内流和一氧化氮 (NO) 生成中的作用。方法 取 2~3 代 HUVEC 进行随机分组, 将构建的 TRPC1、Orai1 干扰质粒 (shTRPC1、shOrai1) 分别转染入 HUVEC, 采用 real-time PCR 和 Western blot 检测 TRPC1、Orai1 mRNA 和蛋白的表达及转染抑制效率。将各组细胞分别与钙敏感受体 (CaR) 激动剂精胺、ROC 模拟剂 (TPA) + CaR 负性变构调节剂 Calhex231、蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂 Ro31-8220 与经典 PKCs 和 PKC μ 抑制剂 Go6967 孵育后, 荧光探针 Fura-2/AM 及 DAF-FM 负载方法同步检测 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 NO 生成的变化。结果 与对照组比较, shTRPC1 组和 shOrai1 组 mRNA 表达 (抑制率分别为 84.50%、76.10%) 和蛋白的表达 (抑制率分别为 83.98%、71.73%) 明显降低 ($P < 0.05$)。在 4 种不同药物作用下, shTRPC1 组和 shOrai1 组 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Δ ratio 值和 NO 净荧光强度值均明显降低 ($P < 0.05$)。结论 TRPC1、Orai1 参与了人脐静脉内皮细胞 SOC 和 ROC 介导的钙内流和 NO 生成。

[中图分类号] R364.1+4

[文献标识码] A

Calcium signaling proteins TRPC1 and Orai1 participate in Ca^{2+} entry and NO generation mediated by SOC and ROC in human umbilical vein endothelial cell

WANG La-Mei, ZHONG Hua, TANG Na, PANG Li-Juan, SUN Zhi-Ping, HE Fang

(Ministry of Education Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases and Centre of Medical Functional Experiments, Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China)

[KEY WORDS] Transient receptor potential canonical 1; Calcium release-activated calcium modulator 1; Ca^{2+} -sensing receptor; Ca^{2+} ; Nitric oxide

[ABSTRACT] **Aim** To study the function of TRPC1 and Orai1 in store and receptor-operated Ca^{2+} entry and nitric oxide generation by SOC and ROC in human umbilical vein endothelial cell. **Methods** HUVEC were collected and cultured to the second-third passage. We silenced the expression of their genes in HUVEC by transfection constructed TRPC1 or Orai1 RNA interference plasmids. The interference efficiency of their proteins and mRNA levels were determined by Western blot and real-time PCR, respectively. The cell were incubated with CaR agonist spermine, CaR negative allosteric modulator Calhex231 and ROC analogue TPA, protein kinase C (PKC) inhibitor Ro31-8220, PKCs and PKC μ inhibitor Go6967. Intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was detected using the fluorescence Ca^{2+} indicator Fura-2/AM, the production of NO was determined by DAF-FM of every group in HUVEC. **Results** Compared with control group, shRNA targeted to the TRPC1 or Orai1 genes decreased their mRNA and protein levels, respectively ($P < 0.05$); The results of their mRNA levels by 84.50% and 76.10% and proteins levels were decreased by 83.98% and 71.73%; In four different treatment under the action of factors, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the net NO fluorescence intensity ratio values of transfection of TRPC1shRNA and Orai1shRNA group were significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** TRPC1 and Orai1 participated in CaR-mediated Ca^{2+} influx and NO production activation mediated by SOC and ROC in HUVEC.

[收稿日期] 2017-04-12

[修回日期] 2017-09-07

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (31160239; 81160018)

[作者简介] 王腊梅, 硕士, 实验师, 研究方向为心血管病理生理学, E-mail 为 375770358@qq.com。通讯作者何芳, 博士, 教授, 研究方向为心血管病理生理学, E-mail 为 fangf2002shz@126.com。

细胞内钙离子(Ca^{2+})是多种受体激动后信息传递过程的中心环节,在细胞内外需要先达到或维持一定浓度才能够执行第二信使的功能,完成对细胞各种信号通路的精确调控,如细胞的收缩、分化、凋亡与增殖等^[1]。研究证实在生理条件下,钙池操纵性钙通道(store operated cation channels, SOC)和受体操纵性钙通道(receptor operated channels, ROC)是非兴奋细胞介导外 Ca^{2+} 内流的重要通道,参与多种生理和病理生理过程,对维持细胞内游离 Ca^{2+} 浓度稳定具有重要作用。SOC激活依赖内质网(endoplasmic reticulum, ER)钙库耗竭后ER腔内 Ca^{2+} 浓度下降,对 Ca^{2+} 有高度选择;ROC激活不依赖钙库耗竭,对 Ca^{2+} 缺乏选择性^[2]。最初发现在哺乳动物经典瞬时感受器电位蛋白(canonical transient receptor potential channels, TRPCs)超家族有7个成员表达于内皮细胞,众多学者对于TRPC1作为非选择性钙通道参与SOC的研究开展较早且成熟。虽然也存在TRPC1是ROC的分子组件的报道,但仍被认为是最可能的SOC和ROC分子基础。随后又发现定位于内质网(endoplasmic reticulum, ER)的胞内的基质相互作用分子1(stromal interaction molecule 1, STIM1)是钙库 Ca^{2+} 感受器,通过影响 Ca^{2+} 内流调节细胞功能,将信息传给位于细胞膜上的TRPC1及钙释放激活钙通道调节分子1(calcium release-activated calcium modulator 1, Orai1),介导TRPC1及Orai1通道开放,引起外钙内流。大量文献证实在不同细胞中由TRPCs、STIMs和Orais可以形成二元或三元复合物来调节SOC的活化,如TRPCs、肌浆网钙泵(sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA)和微管结合蛋白(microtubule end binding protein, EBI)等参与了SOC介导的钙池操纵性钙内流,它们可与STIMs、Orais构成钙池操纵性钙内流复合体^[3]。作为SOC主要构成成分,TRPC1与Orai1、STIM1一起作为一个整体可对疾病的发生发展产生作用。

研究证实细胞外钙敏感受体(Ca-sensing receptor, CaR)可以通过感受细胞外 Ca^{2+} 浓度(extracellular Ca^{2+} concentration, $[\text{Ca}^{2+}]_o$)的变化直接调节细胞功能。在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)中加入精胺后可经激活CaR介导 Ca^{2+} 内流和一氧化氮(NO)生成,而这一过程可经SOC(钙池耗竭激活SOC)和ROC[由二脂酰甘油(diacylglycerol, DAG)介导],二者以协同的方式参与CaR激活介导钙内流及NO生

成过程^[4],且目前研究已经证实STIM1、Orai2^[5]和Orai3^[6]为参与上述过程的关键组件之一。本研究拟进一步阐明TRPC1和Orai1是否为CaR经SOC和ROC介导的 Ca^{2+} 内流和NO生成的相关组件,为心血管疾病的预防及临床用药提供新思路。

1 材料和方法

1.1 标本来源

标本取自华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科,产妇及胎儿身体健康(性别、体重不限、无污染),营养状况良好。产妇及家属对实验均知情同意,并经医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂和仪器

新生胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液、青霉素、链霉素均购自Gibco公司;培养基ECM购自Sciencell公司;G418购自Biosharp公司;LipofectamineTM2000、Fura-2/AM与OPTI-MEM购自美国Invitrogen公司;shRNA购自上海吉凯基因化学技术有限公司;引物购自友名生物技术有限公司;逆转录试剂盒与Real time RT-PCR试剂盒购自TaKaRa Biosharp公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒与DAF-FM DA(NO荧光探针)购自Beyotime公司;鼠抗 β -Actin单克隆抗体、鼠抗人TRPC1单克隆抗体与鼠抗人Orai1多克隆抗体购自Abcam公司;二抗购自Protein Tech公司;其它生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

FV300 Ca^{2+} 成像系统、FV300激光共聚焦显微镜和IX-70倒置荧光显微镜购自日本Olympus公司;CX-102型超净工作台购自安徽蚌埠净化设备厂;-80℃超低温冰箱购自Nuaire公司;台式高速低温离心机购自Sigma公司;二氧化碳培养箱购自Thermo Electron Corporation公司;DYY-4型电泳仪和DYY-III 7B型转膜仪购自北京六一仪器厂。

1.3 HUVEC培养和基因转染

按文献[7-8]方法,取健康孕产妇剖宫产胎儿的新鲜脐带。采用胰酶消化法用含10%胎牛血清的ECM培养基(含100 mg/L青霉素、100 mg/L链霉素)培养HUVEC,待细胞生长至90%融合时消化传代,取指数生长期内细胞进行实验。做细胞转染时所用培养基中不加双抗。

重组质粒来源于上海吉凯基因化学技术有限公司设计构建并保存,基因转染步骤参照LipofectamineTM2000试剂盒说明书进行。结合文献[5-6]方法,取对数生长期HUVEC接种于6孔板(取2

个 6 孔板铺板),待细胞融合至 85% 时,用 OPTI-MEM 稀释转染液随后将 TRPC1shRNA 与 Orai1shRNA 分别转染至 HUVEC 中。实验分为对照组(Control 组)、空质粒组(Vehicle 组)、shTRPC1 组和 shOrai1 组,每组 3 孔。分别在转染后 24 h、48 h、72 h 于荧光显微镜下观察 Cy3 和 GFP 荧光。提取转染 48 h、用 G418(200 mg/L)进行筛选 7 天后 HUVEC 总蛋白、总 mRNA,行 1.4 和 1.5 步骤实验。

1.4 Real time RT-PCR 检测 TRPC1、Orai1 mRNA 表达

参考文献[5-6],收集不同处理组 HUVEC,取样后按 Trizol 试剂盒说明书抽提细胞 RNA。实验中采用公司设计合成的引物。TRPC1 上游引物是 5'-ATT CTC GCA TTT CCA GTT AAG-3',下游引物是 5'-TTA CAG ACC AAG GGT TAC CTG CA-3'。β-actin 上游引物是 5'-ACG GTC AGG TCA TCA CTA TCG-3',下游引物是 5'-GGC ATA GAG GTC TTT ACG GAT G-3'。Orai1 上游引物是 5'-ACC GGA GTC ATC GGC AGA A-3',下游引物是 5'-CCA CCA GCA TGA AGT CCT TGA G-3'。分别按逆转录试剂盒与 PCR 试剂盒对 mRNA 进行逆转与多聚酶链反应。用 25 μL 反应体系进行 PCR 扩增,以上每组实验重复 4 次。

1.5 免疫印迹法检测 TRPC1、Orai1 蛋白表达

将 HUVEC 接种于 6 孔板置于恒温孵箱中培养,各转染组加入 G418 稳筛后弃培养基并用预冷 PBS 冲洗,采用细胞刮取法提取细胞总蛋白,各取 5 μL 待测样品用于 BCA 试剂测定蛋白质浓度并标化,以 β-actin 为内参蛋白。上样 30 μg 蛋白提取液 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,湿转、封闭 1 h 后,分别加入 TRPC1、Orai1 稀释抗体(1 : 1000、1 : 1200),抗 β-actin 抗体(1 : 1000)。4 ℃ 摇床上孵育过夜。次日用 TBST 洗膜后加相应入二抗摇床上孵育。按照 ECL 化学发光试剂盒处理,获得实验结果,以上每组实验重复 3 次。

1.6 [Ca²⁺]_i 和 NO 的检测

首先将转染的 HUVEC 接种于放有圆形玻片的小培养皿中,待细胞融合至 85% 时,分别加入药物刺激:CaR 激动剂精胺、ROC 模拟剂 TPA+CaR 负性变构调节剂 Calhex231、PKC 抑制剂 Ro31-8220 与经典型 PKCs 和 PKC 抑制剂 Go6967 刺激,检测 [Ca²⁺]_i 和 NO 浓度。

1.6.1 HUVEC [Ca²⁺]_i 测定 转染 48 h 将 Fura-2/AM 与含钙液以 1 : 499 的比例混合后加入,37℃

孵育细胞后并去酯化处理。激光共聚焦监测荧光的动态变化^[7]。分析得出 340 和 380 处激发光的荧光强度比值的变化(Δratio)即 [Ca²⁺]_i,以上每组实验重复 3 次。

1.6.2 NO 浓度的测定 转染 48 h 后将 DAF-FM DA 荧光探针稀释液稀释 DAF-FM DA 按 1 : 2000 比例加入,37℃ 孵育细胞后室温避光条件下,在细胞层面进行实时、逐时间点检测刺激前后荧光的强弱^[7],并通过 IPA Software 进行分析,以上每组实验重复 3 次。

1.7 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组以上均数比较采用单因素方差分析,方差齐时组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD 法),以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 shTRPC1、shOrai1 成功转染 HUVEC

细胞转染 Cy3 标记的 shTRPC1 后,转染成功的细胞内发出红色荧光;细胞转染 GFP 标记的 shOrai1 后,转染成功的细胞内发出绿色荧光,可反映转染效率(图 1)。转染 48 h 后加入 G418 稳筛后,可获取 90% 以上的阳性克隆细胞。

2.2 HUVEC 中 TRPC1、Orai1 蛋白及 mRNA 的表达和抑制效率

与对照组和空质粒组比较,shTRPC1 组、shOrai1 组中 TRPC1、Orai1 的蛋白表达明显降低(图 2),抑制率分别为 83.98%、71.73% ($P < 0.05$,表 1)。与对照组和空质粒组比较,shTRPC1 组、shOrai1 组中 TRPC1、Orai1 mRNA 表达明显降低(图 2),抑制率分别为 84.50%、76.10% ($P < 0.05$,表 1)。

表 1. 转染后 HUVEC 各组中 TRPC1、Orai1 蛋白和 mRNA 的抑制效率($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1. Inhibition ratio of TRPC1 and Orai1 protein after transfection in HUVEC($\bar{x} \pm s, \%$)

分 组	n	蛋白抑制效率	mRNA 抑制效率
对照组	3	0.00±0.00	0.00±0.00
空质粒组	3	2.20±2.34	3.21±2.28
shTRPC1 组	3	83.98±1.78 ^{ab}	84.50±3.12 ^{ab}
shOrai1 组	3	71.73±1.46 ^{ab}	76.10±1.82 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与空质粒组比较。

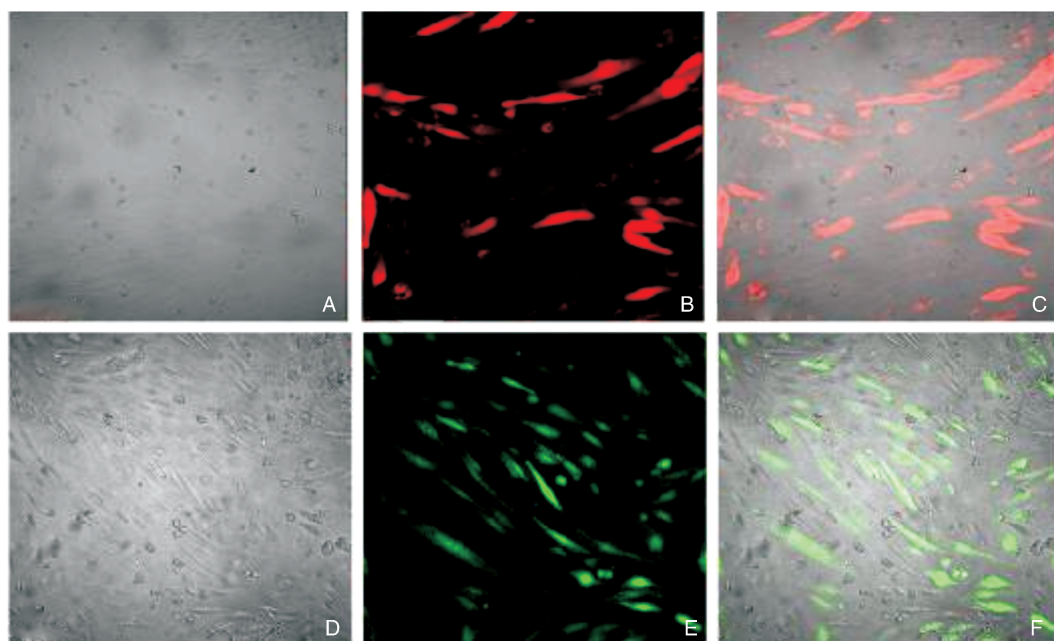


图 1. 特异性转染后 HUVEC 中 Cy3 标记的 shTRPC1 和 GFP 标记的 shOrai1($\times 20$) A~C 为同一视野; D~F 为同一视野,各自在转染 48 h 后加入 G418 筛选 72 h 时拍摄。A、D 在自然光下拍摄,B 红色为 Cy3 阳性着色,E 绿色为 GFP 阳性着色,C、F 为图像叠加。

Figure 1. Cy3-labelled shTRPC1 and GFP-labelled shOrai1 were transfected into HUVEC($\times 20$)

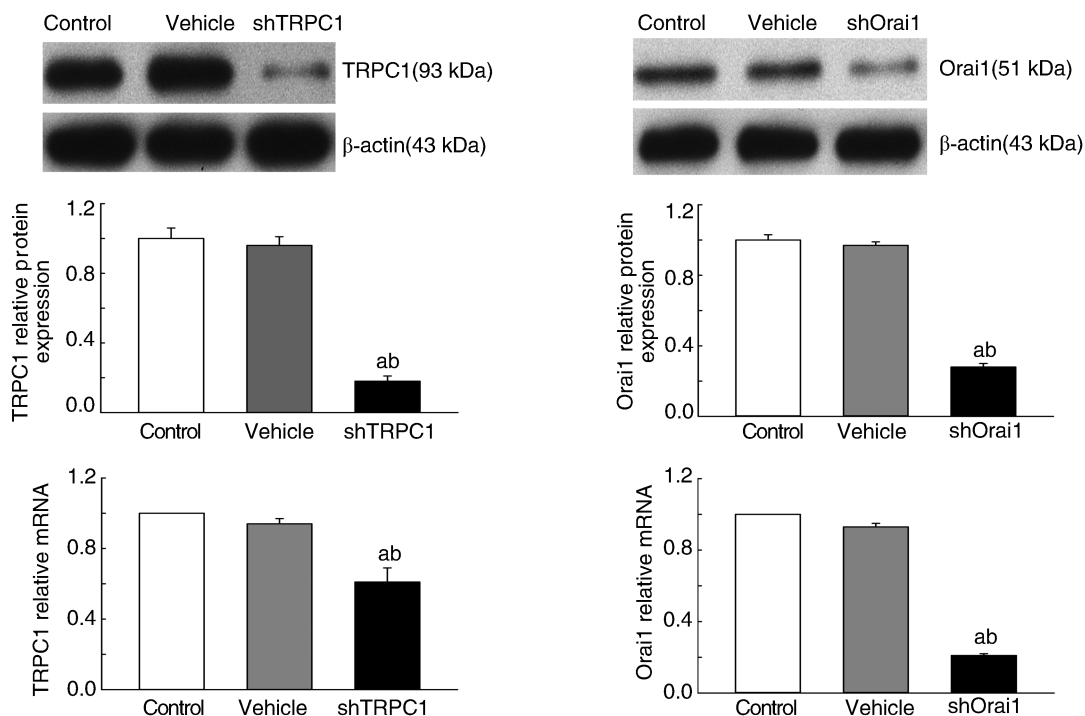


图 2. 特异性转染后 HUVEC 各组中 TRPC1、Orai1 蛋白和 mRNA 的表达 a 为 $P < 0.05$, 与 Control 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Vehicle 组比较。

Figure 2. Expression of TRPC1, Orai1 protein and mRNA after transfected in HUVEC

2.3 不同药物刺激对 HUVEC 中 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 生成的影响

2.3.1 沉默 TRPC1 基因对 SOC 和 ROC 介导的 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 生成的影响 与对照组及空质粒组比较, shTRPC1 组 $[Ca^{2+}]_i$ Δ ratio 值和 NO 净荧光

强度值均明显降低 ($P < 0.05$), 空质粒组与对照组比较均无显著差异 ($P > 0.05$, 图 3)。说明 shRNA 沉默 TRPC1 基因, 能够使 CaR 经 SOC 和 ROC 介导的 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 生成减少。

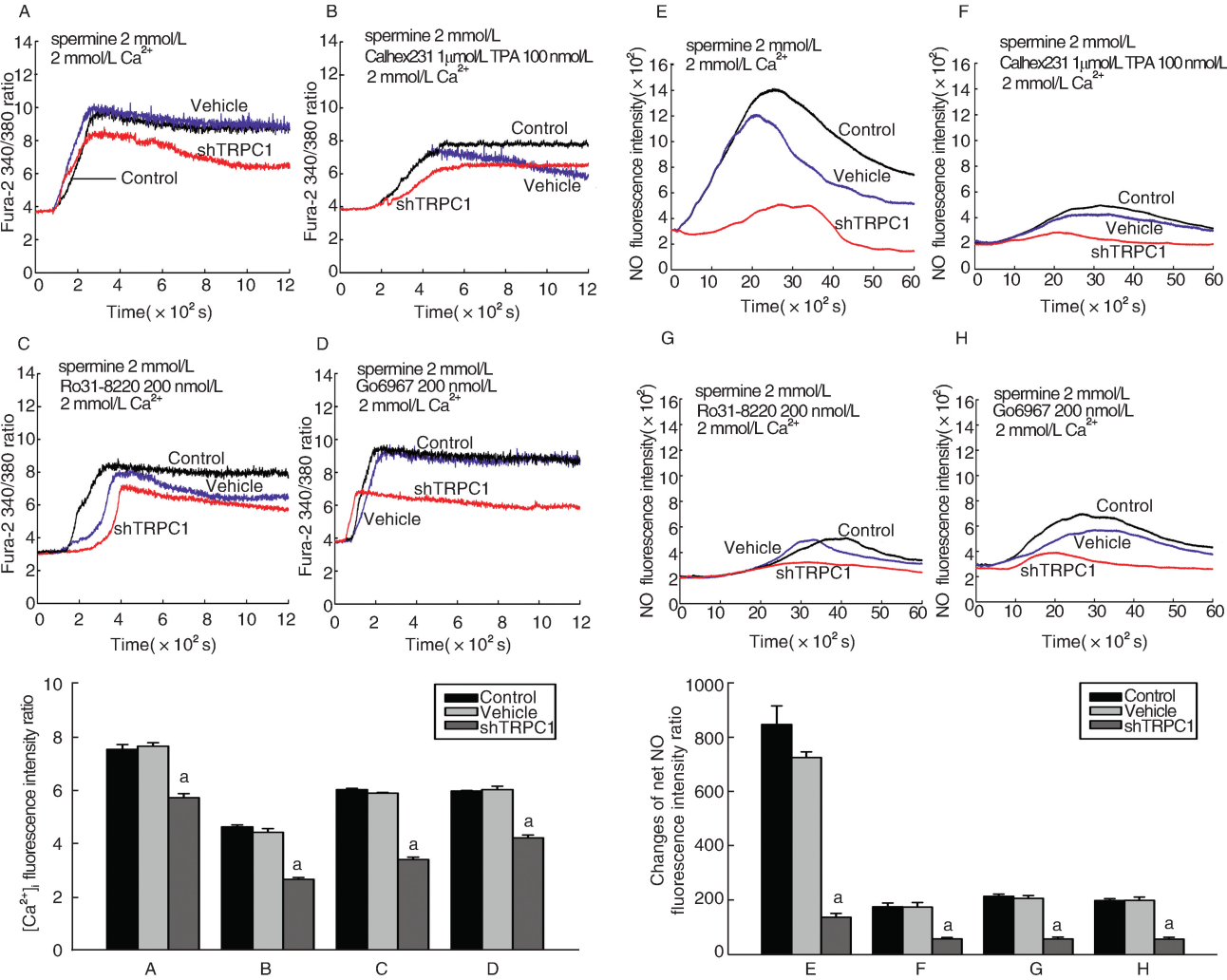


图 3. 不同药物刺激对转染 shTRPC1 的 HUVEC 经 SOC、ROC 产生的 Ca²⁺ 内流和 NO 荧光强度动态变化 (n = 3) A、E 为 CaR 激动剂组; B、F 为 TPA + Calhex231 组; C、G 为 Ro31-8220 组; D、H 为 Go6967 组。a 为 P < 0.05, 与 Control 组比较。

Figure 3. Dynamic changes of the different treatments on calcium and NO fluorescence intensity induced by SOC and ROC in shTRPC1-transfected HUVEC (n = 3)

2.3.2 沉默 Orai1 基因对 SOC 和 ROC 介导的 [Ca²⁺]_i 和 NO 生成的影响 与对照组及空质粒组比较, shOrai1 组 [Ca²⁺]_i Δratio 值和 NO 净荧光强度值均明显降低 (P < 0.05), 空质粒组与对照组比较均无显著差异 (P > 0.05, 图 4)。说明 shRNA 沉默 Orai1 基因, 能够使 CaR 经 SOC 和 ROC 介导的 [Ca²⁺]_i 和 NO 生成减少。

3 讨论

细胞内 Ca²⁺ 是多种受体激动后信息传递过程的中心环节, 在细胞内外需要先达到或维持一定浓度才能够执行第二信使的功能, 完成对细胞各种信号通路的精确调控。存在与细胞膜上的 SOC、ROC 及电压门控性钙通道 (voltage-gated Ca²⁺ channels,

VOC) 等为介导细胞外 Ca²⁺ 内流通道, 其中 SOC 和 ROC 是非兴奋细胞外钙内流的主要通道, 对 CaR 介导的细胞内钙库释放和由各类通道介导的 Ca²⁺ 内流的调节 [Ca²⁺]_i 发挥重要作用。VOC 和 ROC 的特性是在短时间内产生大量的钙内流, SOC 则产生较小的、持续性的钙内流。而 [Ca²⁺]_i 持续升高可调节长期细胞效应, 如细胞内 NO 的生成及细胞生长、分化等, 所以说外 Ca²⁺ 内流在细胞内各种信息传递方面发挥重要的作用^[9], 对于 HUVEC 而言血管内皮细胞持续性的 Ca²⁺ 内流是释放 NO 所必需的。

研究发现对于在序列上高度同源的 Orais (Orai1、Orai2 和 Orai3), 在成纤维细胞、T 淋巴细胞、HEK293 细胞株的胞膜均存在其 mRNA 的表达^[10], 然而各自的功能表现却不同。虽然有学者提出 TRPC1 是 ROC 的分子组件的学说, 但目前仍被认

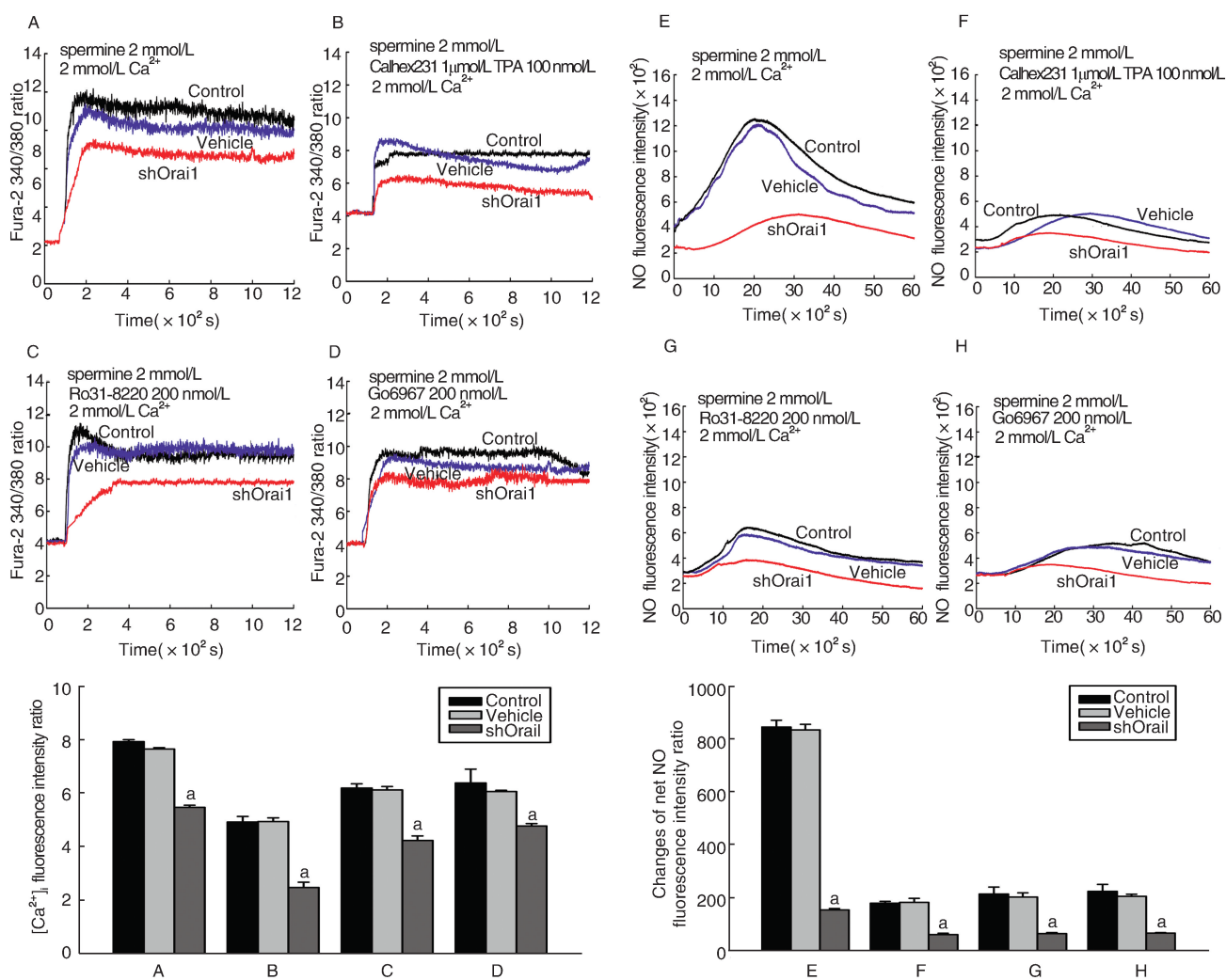


图 4. 不同药物刺激对转染 shOrai1 的 HUVEC 经 SOC、ROC 产生的 Ca²⁺ 内流和 NO 荧光强度动态变化 (n = 3) A、E 为 CaR 激动剂组; B、F 为 TPA + Calhex231 组; C、G 为 Ro31-8220 组; D、H 为 Go6967 组。a 为 P < 0.05, 与 Control 组比较。

Figure 4. Dynamic changes of the different treatments on calcium and NO fluorescence intensity induced by SOC and ROC in shOrai1-transfected HUVEC (n = 3)

为是最可能的构成 SOC 和 ROC 的分子基础。TRPC1 敲除只能部分抑制 SOC 介导 Ca²⁺ 内流和 SOC 电流, Orai1 敲除能完全抑制 SOC 介导 Ca²⁺ 内流和 SOC 电流^[11]。这些结果与 SOC 的多样性一致, 不同的 SOC 均与 Orai1、TRPC1、STIM1 有关。Klejman 等^[12]在小鼠大脑中神经元细胞的研究中发现, STIM 和 Orai 是激活 SOC 的两个重要蛋白质且二者共同参与 SOCE。STIMs、TRPCs、Orais 可以作为单个组件或形成复合物的形式在不同组织细胞中经 ROC 或 SOC 引起生理及病理生理方面的效应^[13]。如 Liao 等^[14]发现 TRPC/Orai 复合物参与 Ca²⁺ 内流, 其中 STIM1 调节下 ROC 和 SOC 的分子组件 TRPC1、Orai1 存在功能上相互作用, 并推测可能 Orai1/TRPCs 组成的复合物在脂筏积聚介导 SOC, 当复合物定位于脂筏外介导 ROC^[15]。而 Jardin

等^[16]在人血小板发现 Orai1 在介导 TRPC1-STIM1 相互作用及 TRPC1 形成钙通道的激活模式 (依赖 SOC 或 ROC) 中发挥重要作用。

心脑血管疾病现已成为危害人类健康和致死的主要因素, 如高血压、冠心病和脑栓塞等心血管系统疾病的发病率呈现逐年上升的趋势, 因此研究心脑血管疾病发病机制研究已然成为热点。随着人们对 TRPC 与 Orai 生物学作用及机制深入研究, 发现其在水心脑血管疾病的发生发展中发挥重要作用。实验研究发现: CaR 在介导 HUVEC Ca²⁺ 内流、eNOS 活性和 NO 生成中起着重要作用, 而钙通道相关蛋白 TRPC1、Orai1 作为单个分子组件在 CaR 激活引发持续 Ca²⁺ 内流和 NO 生成等相关心血管疾病发生、发展机制中的作用尚未阐明, 因此在这一领域的研究工作也显得尤为重要。本实验将前期筛

选出来的抑制效率最高的 TRPC1 和 Orai1shRNA 分别转染 HUVEC, 保证沉默基因有效抑制相关表达, 用精胺与 HUVEC 共孵育激活 SOC 和 ROC 通路, 发现在 HUVEC 中, 沉默 TRPC1 及 Orai1 可抑制 SOC 和 ROC 通路介导的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高和 NO 生成。随后又与 TPA + Calhex231、Ro31-8220、Go6967 共孵育 HUVEC, 分别激活 SOC 或 ROC 通路, 发现沉默 TRPC1、Orai1 既可抑制 SOC 通路又可以抑制 ROC 通路。TRPC1、Orai1 均为 SOC 和 ROC 的关键分子组件, 且二者均参与了 SOC 和 ROC 通路介导 Ca^{2+} 内流及 NO 生成。

在血管系统中 CaR 可通过增加 $[Ca^{2+}]_i$ 调节 NO 的释放和钾通道激活, 在调节血管张力及高血压等心血管疾病的发生发展中起着重要的作用, 而上述研究又为深入认识血管系统中 TRPC1 和 Orai1 调节 CaR 功能的生理和病理作用和机制提供了重要理论基础。与临床而言, 学者可以针对 CaR、TRPC1 与 Orai1 的功能、调节机制及寡聚化模式为进行靶向干预, 无疑将进一步明确 TRPC1、Orai1 与 CaR 在心血管疾病发生和发展中的重要作用和意义, 为临床疾病的治疗提供新的思路和方法。

致谢

衷心感谢华中科技大学同济医学院病理生理学系/卫生部呼吸疾病重点实验室提供实验条件和技术指导。

[参考文献]

- [1] Smyth JT, Dehaven WI, Jones BF, et al. Emerging perspectives in store-operated Ca^{2+} entry: roles of orail, stim and TRP[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763(11): 1 147-160.
- [2] Putney JW. Capacitative calcium entry: from concept to molecules[J]. *Immunol Rev*, 2009, 231(1): 10-22.
- [3] 刘青, 林默君. 钙池操纵性钙通道的激活信号分子与肺动脉高压[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(3): 273-277.
- [4] 梁霄, 罗小林, 钟华, 等. 小干扰 RNA 沉默细胞外钙敏感受体抑制人脐静脉内皮细胞钙内流和 NO 生成[J]. *生理学报*, 2012, 64(3): 289-295.
- [5] 王腊梅, 钟华, 赵慧, 等. Orai2 在 HUVEC 外钙感受体介导钙内流和 NO 生成中的作用[J]. *基础医学与临床*, 2014, 34(5): 595-601.
- [6] 王腊梅, 钟华, 赵慧, 等. Orai3 参与了 HUVEC 外钙感受体介导的钙内流和 NO 生成[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(1): 1-10.
- [7] Ziegelstein RC, Xiong Y, He C, et al. Expression of a functional extracellular calcium-sensing receptor in human aortic endothelial cell[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(1): 153-163.
- [8] 陈玉龙, 贾敏. 香烟提取物对人脐静脉内皮细胞蛋白亚硝基化的影响及机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(9): 889-892.
- [9] Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons[J]. *PNAS USA*, 2002, 99(3): 1 115-122.
- [10] Gwack Y, Srikanth S, Feske S, et al. Biochemical and functional characterization of Orai proteins[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(22): 16 232-243.
- [11] Ong HL, Cheng KT, Liu X, et al. Dynamic assembly of TRPC1/STIM1/Orai1 ternary complex is involved in store operated calcium influx: Evidence for similarities in SOC and CRAC channel components[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(12): 9 105-116.
- [12] Klejman ME, Gruszczynska-Biegala J, Skibinska-Kijek A, et al. Expression of STIM1 in brain and puncta-like co-localization of STIM1 and ORAI1 upon depletion of Ca^{2+} store in neurons[J]. *Neurochem Int*, 2009, 54(1): 49-55.
- [13] Darbellay B, Arnaudeau S, Ceroni D, et al. Human muscle economy myoblast differentiation and excitation-contraction coupling use the same molecular partners, STIM1 and STIM2[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(29): 22 437-447.
- [14] Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, et al. Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels[J]. *PNAS USA*, 2008, 105(8): 2 895-900.
- [15] Liao Y, Plummer NW, George MD, et al. A role for Orai in TRPC-mediated Ca^{2+} entry suggests that a TRPC: Orai complex may mediate store and receptor operated Ca^{2+} entry[J]. *PNAS USA*, 2009, 106(9): 3 202-206.
- [16] Jardin I, Lopez JJ, Salido GM, et al. Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca^{2+} channels[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(37): 25 296-304.

(此文编辑 朱雯霞)