

Thapsigargin 对心肌细胞钙释放和肌浆网钙容量的时间效应

沈建新^{1,2}, 王世强³, 程和平³, 韩太真¹

(1. 西安交通大学医学院生理学教研室, 陕西 西安 710061; 2. 汕头大学医学院生理学教研室, 广东 汕头 515041; 3. 北京大学生命科学学院膜与膜生物工程国家实验室, 北京 100871)

摘要:【目的】肌浆网钙泵抑制剂 thapsigargin (TG) 常被用于耗减肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)的钙容量。本课题旨在探讨 TG ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对源自 SR 的胞内钙释放和 SR 钙容量耗减的时间效应以及 SR 内钙对 SR 钙释放的调节机理。【方法】局部场刺激作用于成年大鼠心肌细胞, 使其产生动作电位, 进而诱发胞内钙瞬变(action-potential-induced Ca^{2+} transients, ACT)。由 ACT 可估测胞内钙释放。SR 钙容量可由咖啡因($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)诱发的钙瞬变(caffeine-induced Ca^{2+} transients, CCT)估测。实验结果用激光共聚焦显微镜系统记录。【结果】TG 对 ACT 峰值(可衡量钙瞬变的大小)的时间效应如下: 0 min, 5.55 ± 0.28 (单位为标准钙荧光强度即 F/F_0 , F_0 为静息钙荧光强度); 10 min, 4.89 ± 0.36 ; 17 min, 2.58 ± 0.38 ; 25 min, 2.11 ± 0.19 ; 35 min, 2.22 ± 0.17 ; 50 min, 2.27 ± 0.27 。TG 对 CCT 峰值的时间效应如下: 0 min, 6.73 ± 0.17 ; 10 min, 6.60 ± 0.59 ; 17 min, 6.24 ± 0.44 ; 25 min, 3.99 ± 0.28 ; 35 min, 2.24 ± 0.37 ; 50 min, 1.14 ± 0.01 。以 CCT 为自变量, ACT 为因变量的曲线呈“J”形。【结论】TG 对心肌胞内钙释放和 SR 钙容量呈非线性的时间依赖效应。SR 内钙部分耗减即可明显减少钙释放, 说明 SR 内钙对胞内钙释放具有重要的调节作用。

关键词: thapsigargin; 肌浆网; 钙离子; 细胞, 心肌

中图分类号: R363

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)01-0019-05

Time-dependent Effects of Thapsigargin on Cardiac Intracellular Ca^{2+} Release and Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Content

SHEN Jian-xin^{1,2}, WANG Shi-qiang³, CHENG He-ping³, HAN Tai-zhen¹

(1. Department of Physiology, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China, 2. Department of Physiology, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China, 3. National Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, College of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: 【Objective】Thapsigargin (TG), a sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase inhibitor, is commonly employed to deplete SR Ca^{2+} content. In this study, we investigated the time effects of TG ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) on SR Ca^{2+} content and SR Ca^{2+} release, and the relationship between them. 【Methods】Local field stimulation was delivered to freshly isolated rat single cardiac myocytes to generate action potential-induced Ca^{2+} transients (ACT) for assessing intracellular Ca^{2+} release. Caffeine ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)-induced Ca^{2+} transients (CCT) was used to estimate the SR Ca^{2+} content. Results were recorded by confocal Ca^{2+} imaging with a Zeiss LSM-410 confocal microscopic system. 【Results】Time-dependent effects of TG on ACT peak were: 5.55 ± 0.28 (in F/F_0 , the normalized fluorescence, where F_0 denotes the resting fluorescence), 0 min; 4.89 ± 0.36 , 10 min; 2.58 ± 0.38 , 17 min; 2.11 ± 0.19 , 25 min; 2.22 ± 0.17 , 35 min; and 2.27 ± 0.27 , 50 min.

收稿日期: 2003-09-27

基金项目: 国家重大基础研究发展基金资助项目(G2000057002); 西安交通大学重点基金资助项目(X160,082003); 广东省卫生厅“五个一”工程重点基金资助项目(413626)

作者简介: 沈建新(1969-), 男, 广东潮州人, 讲师, 中山医科大学1995届硕士, 现在汕头大学生理学教研室工作(515041), 在职攻读西安交通大学博士课程(博士生)。E-mail: jxshen@stu.edu.cn

Time-dependent effects of TG on CCT peak were: 6.73 ± 0.17 , 0 min; 6.60 ± 0.59 , 10 min; 6.24 ± 0.44 , 17 min; 3.99 ± 0.28 , 25 min; 2.24 ± 0.37 , 35 min; and 1.14 ± 0.01 , 50 min. Curve of ACT as a function of CCT displayed a steep "J"-like shape. 【Conclusion】TG demonstrates a nonlinear time-dependence on cardiac intracellular Ca^{2+} release and SR Ca^{2+} content. Partial depletion of SR Ca^{2+} content severely diminishes Ca^{2+} release, suggesting that SR Ca^{2+} release is tightly regulated by Ca^{2+} from the luminal side of the SR.

Key words: thapsigargin; sarcoplasmic reticulum; calcium; myocytes, cardiac

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(1):19-23]

第二信使钙离子 (Ca^{2+}) 在心肌细胞的兴奋-收缩耦联中起重要作用^[1]。在生理条件下, 心肌细胞产生的钙瞬变 (calcium transients) 中, 约有 92% 的钙来自肌浆网 (sarcoplasmic reticulum, SR)^[2]。SR 释放钙的过程受多种因素的精细调节^[1]。SR 内的钙容量可能是其中重要的一种。SR 内钙增多可提高 SR 释放钙的敏感性并增加钙释放量。这方面的研究较多^[1,3]。但有关降低 SR 的钙容量对钙释放影响的研究则不多见。为降低 SR 钙容量, 一般使用 SR 钙泵抑制剂 thapsigargin (TG) 阻断 SR 从胞浆摄取钙。研究者通常使用高浓度的 TG (如 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在短时间内 (如 $< 2 \text{ min}$) 将 SR 的钙泵完全阻断^[4]。Song 等^[5]曾探讨在较低的浓度下, 不同浓度的 TG 在作用 10 min 时对 SR 钙容量的不同耗减作用。但关于较低浓度的 TG 对 SR 钙容量以及胞内钙释放的时间效应尚未见有系统研究。本研究的目的在于通过分析较低浓度的 TG ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 SR 钙容量和胞内钙释放的时间效应, 进而探讨 SR 内钙对 SR 释放钙的调节机理。

1 材料与方 法

1.1 心肌单细胞分离

心室肌单细胞取自成年 SD 大鼠 (2~3 月龄, 体质量 200~300 g)。采用通用标准酶解分离技术^[6]。简要过程如下: ①麻醉动物, 按 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射戊巴比妥钠; ②打开胸腔取出心脏; ③用胶原酶 (Worthington type II, $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 以 Langendorff 法经主动脉逆向灌流心脏; ④切碎心肌并经适当震荡即可获得单个的心肌细胞。分离过程使用的 HEPES 缓冲液成分如下 (单位为 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.2 MgCl_2 , 1.2 NaH_2PO_4 , 1 CaCl_2 , 10 glucose 和 20 HEPES; pH 用 NaOH 调至 7.4。

1.2 共聚焦显微镜钙成像

分离好的心肌单细胞先与钙荧光指示剂 fluo-4AM (浓度为 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (Molecular Probes, Inc.) 共同孵育 5 min, 之后以正常胞外液灌流 10 min, 以便除去胞外多余的荧光染料并使进入胞内的 fluo-4-AM 除去 AM 基团。适合进行实验的细胞必需符合以下标准: ①横纹清晰; ②呈杆状; ③表面干净平整; ④观察 1 min 无自发收缩。加载好荧光染料的细胞置于 Zeiss LSM-410 倒置共聚焦显微镜系统的载物台上。此系统的配置为: 波长 488 nm 的氩激光, 40 倍、数值孔径 (numerical aperture, NA) 为 1.3 的油浸镜头; 其纵向和水平的分辨率分别为 $1.0 \mu\text{m}$ 和 $0.5 \mu\text{m}$ 。共聚焦显微镜的成像方式为线扫描, 采样速率为 $2.09 \text{ ms}/\text{线}$, 空间分辨率为 $0.31 \mu\text{m}/\text{像素}$ 。扫描线置于细胞长轴纵向正中切面的中央。在有 TG 存在的情况下, 任何一个选定的细胞都只受到一次局部场刺激或被喷一次咖啡因, 同时以线扫描的方式记录一幅钙瞬变图像。所有实验均在室温 ($23 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$) 条件下进行^[5]。

1.3 给药方式

实验过程中, TG (终浓度为 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 购自 Calbiochem-Novabiochem Corporation) 随细胞外灌流液作用于心肌细胞。灌流液的成分为 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 137 NaCl, 1 CaCl_2 , 4.9 KCl, 1 MgCl_2 , 1.2 NaH_2PO_4 , 15 glucose 和 20 HEPES; pH 用 NaOH 调至 7.4。

1.4 局部场刺激诱发钙瞬变的记录

局部场刺激 (local field stimulation) 由电子刺激器通过一对刺激电极 (末端为裸露的白金丝) 以 1.5 倍于阈强度的脉冲电刺激 (约 15 V) 加于心肌细胞的两侧 (图 1), 从而触发细胞产生钙瞬变。共聚焦线扫描在局部场刺激开始前 200 ms 即开始, 起始部分作为刺激前的本底对照。

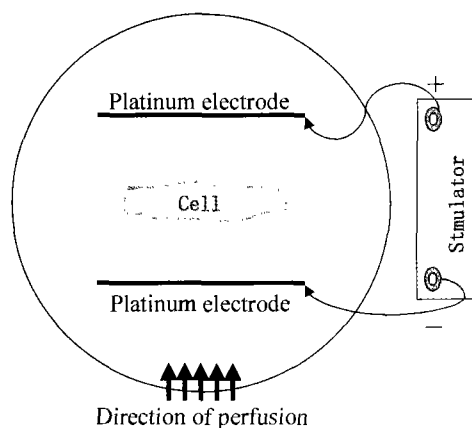


图1 局部场刺激诱发心肌细胞钙瞬变示意图

Fig.1 Diagram showing local field stimulation to evoke cardiac myocyte Ca^{2+} transients

A pair of electrodes with bare platinum ends was placed on both sides of a selected cell and was connected to a stimulator to provide local field stimulation for estimating Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum (SR)

1.5 SR 钙容量的记录

SR 钙容量越大,则 SR 内可释放的钙量也越大。而 SR 内可释放的钙量可通过喷射咖啡因的方法测量^[5,7]。咖啡因 (Sigma Corporation) 浓度为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 喷射时程为 500 ms。喷射装置为一尖端直径约 $4 \mu\text{m}$ 的微玻管, 其另一端与微量喷射器相连 (Picospritzer, General Valve Co., NJ, USA)。微玻管先置于目标细胞下游约 $200 \mu\text{m}$ 处, 喷射前则快速移至目标细胞下游 $100 \mu\text{m}$ 处 (图 2)。共聚焦线扫描在喷射咖啡因前 200 ms 即开始, 起始部分作为喷射前的本底对照。

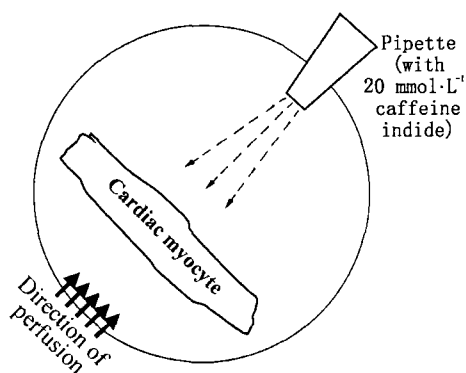


图2 喷射咖啡因估测 SR 内钙容量方法示意图

Fig.2 Diagram showing caffeine application to estimate the SR Ca^{2+} content

Releasable SR Ca^{2+} content was determined by applying a 500 ms puff of $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine delivered through a micropipette. ($\approx 4 \mu\text{m}$ at tip), which located downstream of the cell

1.6 图像处理和数据分析

记录到的图像用自编的程序处理, 编程语言为 IDL (Research Systems, Inc.)。钙瞬变的大小以标准荧光强度 (normalized fluorescence) 即 F/F_0 表示, 其中 F_0 表示静息状态的荧光强度^[8]。数据以 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ 表示。统计方法为 Student t -test, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 TG 对胞内钙释放的时间效应

局部场刺激诱发的钙瞬变即动作电位诱发的钙瞬变 (action-potential-induced Ca^{2+} transients, ACT), 可作为一个心动周期中钙释放量的指标。在典型的细胞中 (图 3A), 对照组 (即 TG 作用时间为 0 min, 下同) 的 ACT 峰值为 5.71 (单位为 F/F_0), 10 min 组 (即 TG 作用时间为 10 min, 余类推) 为 4.89, 17 min 组为 2.53, 25 min 组为 2.11, 35 min 组为 1.80, 50 min 组为 1.86; 各组平均的 ACT 强度 (反映一定时间内钙释放的总量) 依次 (从对照组到 50 min 组, 单位均为 F/F_0 , 下同) 为: 3.36 ± 0.06 , 3.39 ± 0.04 , 2.22 ± 0.01 , 1.92 ± 0.01 , 1.71 ± 0.01 and 1.76 ± 0.01 。ACT 的平均峰值依次为: 5.55 ± 0.28 ($n=48$), 4.89 ± 0.36 ($n=15$), 2.58 ± 0.38 ($n=10$), 2.11 ± 0.19 ($n=16$), 2.22 ± 0.17 ($n=15$) and 2.27 ± 0.27 ($n=12$) (图 3B)。

以上数据说明 ACT 随着 TG 灌流时间的延长而衰减, 且呈非线性变化。也就是说, TG 对胞内钙释放的效应为非线性的时间依赖效应。

2.2 TG 对 SR 内钙容量的时间效应

咖啡因诱发的钙瞬变 (caffeine-induced Ca^{2+} transients, CCT) 是反映静息状态下 SR 可释放钙容量的常用指标。在典型的细胞中 (图 4A), 对照组的 CCT 峰值为 8.46, 10 min 组为 6.64, 17 min 组为 6.36, 25 min 组为 4.30, 35 min 组为 1.92, 50 min 组为 1.08; 各组平均的 CCT 强度 (反映一定时间内咖啡因诱发的可释放钙的总量) 依次为: 7.28 ± 0.06 , 6.32 ± 0.05 , 5.57 ± 0.05 , 3.79 ± 0.03 , 1.76 ± 0.01 和 1.01 ± 0.01 。CCT 的平均峰值依次为: 6.73 ± 0.17 ($n=70$), 6.60 ± 0.59 ($n=15$), 6.24 ± 0.44 ($n=10$), 3.99 ± 0.28 ($n=16$), 2.24 ± 0.37 ($n=12$) 和 1.14 ± 0.01 ($n=11$) (图 4B)。

以上数据说明 CCT 随着 TG 灌流时间的延长而衰减,也呈非线性变化。也就是说, TG 对 SR 内钙容量的效应为非线性的时间依赖效应。

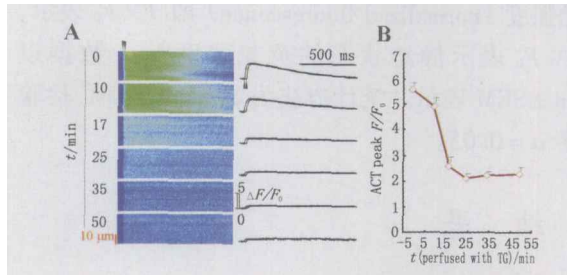


图 3 Thapsigargin 对动作电位诱发的钙瞬变的时间依赖效应

Fig. 3 Time-dependent effect of thapsigargin on cardiac myocyte action potential (AP) induced Ca^{2+} transients

A. Representative results of Ca^{2+} transients for each group. From top to bottom: group 0 min, group 10 min, group 17 min, group 25 min, group 35 min, and group 50 min. Left: Confocal linescan images. Right: Time course of the corresponding Ca^{2+} transients. Arrow showing the beginning of AP-induced

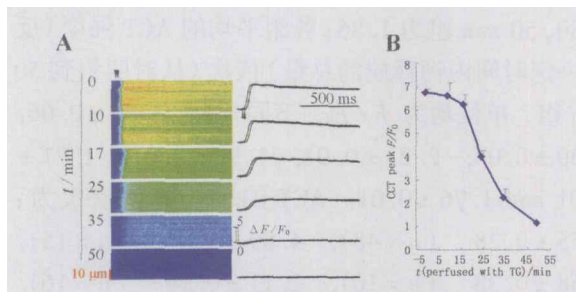


图 4 Thapsigargin 对咖啡因诱发的 SR 可释放钙量的时间依赖效应

Fig. 4 Time-dependent effect of thapsigargin on cardiac myocyte caffeine-induced releasable SR Ca^{2+} content

A. Representative results of caffeine-induced releasable SR Ca^{2+} transients for each group. From top to bottom: group 0 min, group 10 min, group 17 min, group 25 min, group 35 min, and group 50 min. Left: Confocal linescan images. Right: Time course of the corresponding caffeine-induced Ca^{2+} transients. Arrow showing the beginning of caffeine-induced Ca^{2+} transients. B. Averaged caffeine-induced Ca^{2+} transients (CCT) peaks from each group showing as a function of time after TG application

2.3 胞内钙释放与 SR 钙容量的关系

将 TG 作用不同时间后测得的对应的典型细胞的 ACT 和 CCT 的标准荧光强度 - 时间曲线结合在一起即成图 5A。而相应的 ACT 和 CCT 的平均峰值相对于 TG 的作用时间作图即成图 5B。从结果发现当 TG 的作用时间少于 35 min 时, ACT 的峰值总是小于相应的 CCT 的峰值 ($P < 0.05$)。随着 TG 作

用时间的延长, ACT 的峰值逐渐接近 CCT 的峰值 (如 35 min 组) 甚至超过 CCT 的峰值 (如 50 min 组) ($P < 0.05$)。这些结果表明, TG 对 ACT 的时间依赖衰减效应与对 CCT 的效应是不成比例关系的。如果以 CCT 的平均峰值为横坐标, 以相应的 ACT 的平均峰值为纵坐标作图, 可得一陡峭的“J”形曲线 (图 5C)。由于 ACT 中包含了 SR 释放的钙和通过 L 型钙通道内流的钙^[2], 因此曲线的平整部分反映了对 SR 钙容量耗减不敏感的钙内流成分。曲线的斜率较大表明在心肌细胞兴奋 - 收缩耦联过程中 SR 的少量耗减即可导致钙释放量的显著减少。

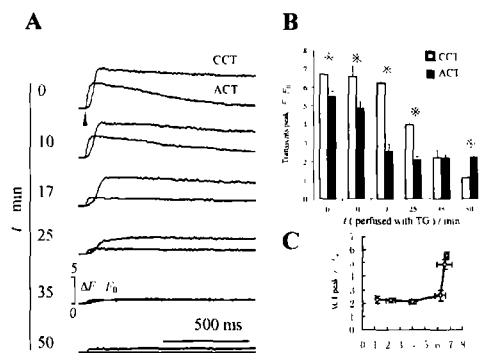


图 5 ACT 与 CCT 之间的相互关系

Fig. 5 Relationship between action potential induced Ca^{2+} transients and Caffeine-induced Ca^{2+} transients

A. Comparison of the time course of transients between corresponding ACT and CCT (data from Fig. 3A & Fig. 4A). B. Comparison of averaged ACT peaks and CCT peaks. \ast , $P < 0.05$. C. ACT peaks as a function of CCT peaks (data from Fig. 5B)

3 讨论

动作电位诱发的钙瞬变 (ACT) 中包含两种成分: 一是 SR 释放的钙, 约占 92%; 二是通过电压依赖性 L 型钙通道内流的钙, 占 7% ~ 8%^[2]。我们的结果表明, 在正常情况下, ACT 总是小于相应的 CCT (图 5A & B, 0 min 组)。这说明, 在正常的心动周期中, 钙释放量只是 SR 中可释放钙量的一部分。这与有关研究是一致的^[9]。

SR 钙容量主要决定于 SR 膜上的钙泵对胞浆钙的摄取。TG 是一种广泛应用的 SR 钙泵的强力抑制剂。它对 SR 钙泵的亲力和选择性均较强。用 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG 灌流完整的心肌细胞, 60 s 内即可阻断高达 95% 的钙泵功能, 而 90 s 可完全阻断^[4]。较

低浓度的 TG ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可慢慢耗减 SR 的钙容量, 便于探讨 SR 不同钙容量对兴奋-收缩耦联的调节作用。TG 对钙泵的高亲和力 ($K_d < 2 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[10] 导致 TG 的作用实质上是不可逆的。这就是为什么在灌流 TG 后一个细胞只作一次实验、记录一幅图像的原因。一旦所有或部分可释放的钙自 SR 中释出, 由于 TG 对钙泵的阻断作用, SR 很难再从胞浆中摄取钙。实际上, 只要作用的时间足够长, 低浓度的 TG 同样能够使 SR 中的钙耗减到几乎与胞浆同样的水平。对本文中使用的 TG ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 来说约为 50 min (图 4B)。这些事实提示, TG 与 SR 钙泵的结合可逐渐使越来越多的钙泵失去功能, 这可能是我们所观察到的 TG 作用具有时间依赖性的原因(图 3 & 4)。TG 的时间依赖效应可深化我们对 TG 的认识, 从而正确使用 TG 以操控 SR 的钙容量。不过 TG 的时间依赖效应的确切机理尚需进一步的实验研究。

通过分析 ACT 和 CCT 之间的相互关系(图 5) 可知 SR 释放钙有重要调节作用。在 TG 作用于 SR 钙泵后 10 min, ACT 为 4.89 ± 0.36 , 而 17 min 时则急剧下降至 2.58 ± 0.38 ; 相对应的 CCT 分别为 6.60 ± 0.59 和 6.24 ± 0.44 。说明轻微耗减即可使钙的释放量不成比例地快速减少。此现象可能与 SR 钙容量下降到某个临界值而使 SR 释放钙的能力明显下降有关^[11]。SR 钙容量耗减到一定程度时, 通过 L 型钙通道内流的钙即无法再触发 SR 释放钙, 虽然此时 SR 腔内钙浓度仍高于胞浆的钙浓度(图 5B, 25 min)。此时记录到的微弱的 ACT 即对应于“J”型曲线的平整部分(图 5C)。我们有另外的实验(数据未发表)证明, L 型钙通道的阻断剂尼卡地平 ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可使此微弱的 ACT 不再出现。由此可知, 此钙瞬变即是通过 L 型钙通道的内流钙。以往的实验已证明, 通过 L 型钙通道的内流钙是 SR 释放钙的主要触发因素^[1]。随着 SR 钙容量的耗减, 钙释放量随之减少, 但通过 L 型钙通道的钙内流保持不变或有所增大。因为此时来自 SR 的钙对内流钙的抑制作用减弱^[1]。可见, SR 钙容量的部分耗减即可明显降低 SR 钙释放对内流钙的敏感性。

总之, TG 可致 SR 内钙容量产生非线性的时间依赖耗减效应, 也可致动作电位诱发的 SR 钙释放呈非线性的时间依赖衰减效应。SR 钙容量对钙

容量释放有重要的调节作用。正常情况下, SR 钙容量轻微下降, 即可导致钙释放量的明显减少。

参考文献:

- [1] Bers D M. Cardiac excitation-contraction coupling[J]. *Nature*, 2002, 415(6868): 198-205.
- [2] Delbridge L M, Satoh H, Yuan W, *et al.* Cardiac myocyte volume, Ca^{2+} fluxes, and sarcoplasmic reticulum loading in pressure-overload hypertrophy[J]. *Am J Physiol*, 1997, 272(5 Pt 2): H2425-35.
- [3] Bers D M, Li L, Satoh H, *et al.* Factors that control sarcoplasmic reticulum calcium release in intact ventricular myocytes[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 853(1): 157-77.
- [4] Bassani J W, Yuan W, Bers D M. Fractional SR Ca^{2+} release is regulated by trigger Ca^{2+} and SR Ca^{2+} content in cardiac myocytes[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1995, 268 (5 Pt 1): C1313-9.
- [5] Song L S, Stern M D, Lakatta E G, *et al.* Partial depletion of sarcoplasmic reticulum calcium does not prevent calcium sparks in rat ventricular myocytes[J]. *Physiol*, 1997, 505(Pt 3): 665-75.
- [6] Santana L F, Cheng H, Gomez A M, *et al.* Relationship between the sarcolemmal calcium current and calcium sparks and local control of cardiac excitation-contraction coupling[J]. *Circ Res*, 1996, 78(1): 166-71.
- [7] Song L S, Wang S Q, Xiao R P, *et al.* β -adrenergic stimulation synchronizes intracellular Ca^{2+} release during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes[J]. *Circ Res*, 2001, 88(8): 794-801.
- [8] Wang S Q, Song L S, Lakatta E G, *et al.* Ca^{2+} Signaling between single L-type Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in heart cells[J]. *Nature*, 2001, 410(6828): 592-6.
- [9] Shannon T R, Ginsburg K S, Bers D M. Potentiation of fractional sarcoplasmic reticulum calcium release by total and free intra-sarcoplasmic reticulum calcium concentration[J]. *Biophys J*, 2000, 78(1): 334-43.
- [10] Davidson G A, Varhol R J. Kinetics of thapsigargin- Ca^{2+} -ATPase (sarcoplasmic reticulum) interaction reveals a two-step binding mechanism and picomolar inhibition[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(20): 11731-4.
- [11] Bers D M. Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes[J]. *Front Biosci*, 2002, 7: d 1697-711.

(编辑 张敏瑞)