



## 论文

# 内皮素-1 通过 L-型钙通道的 $\text{Ca}^{2+}$ 内流和钙致钙释放诱导心肌细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的增加

曾庆华<sup>①\*</sup>, 李星婷<sup>①</sup>, 张文杰<sup>②</sup>, 钟国赣<sup>②</sup>, 孙成文<sup>③</sup>

① 东北师范大学生命科学学院分子细胞生理学实验室, 长春 130024;

② 吉林大学基础医学院生理教研室, 长春 130021;

③ Department of Pharmaceutical Sciences, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA

\* 联系人, E-mail: zengqh707@gmail.com

收稿日期: 2008-06-25; 接受日期: 2008-08-21

国家自然科学基金(批准号: 30870910)资助项目

**摘要** 本研究利用 fura-2-AM 荧光成像和膜片钳技术, 发现内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)可显著提高大鼠分离心肌细胞内钙离子水平( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), 激活心肌细胞钙通道.  $\text{ET}_A$  受体阻滞剂 BQ123 能够消除 ET-1 提高  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的效应, 而  $\text{ET}_B$  受体阻滞剂 BQ788 对该效应无影响. 用 ryanodine 受体阻断剂 ryanodine(10  $\mu\text{mol/L}$ )预处理, 可以使 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加抑制 46.7%. 蛋白激酶 A(PKA)的抑制剂、蛋白激酶 C(PKC)的抑制剂和血管紧张素 I 型受体(AT1 receptor)的抑制剂都能够抑制 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加. 本研究发现 ET-1 能够提高全细胞 L-型钙通道电流的幅度, 增加 L-型钙通道单通道的开放概率. 并且 BQ123 完全阻止了 ET-1 诱导的 L-型钙通道开放概率增加的效应. 本研究证明了 ET-1 通过一系列机制调节钙超载, 包括 L-型钙通道的激活, 钙致钙释放(CICR),  $\text{ET}_A$  受体, PKC, PKA 和血管紧张素 I 型受体也参与到了这个途径中.

**关键词**内皮素-1(ET-1)  
心肌细胞  
细胞内钙浓度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )  
L-钙通道电流( $I_{\text{CaL}}$ )  
钙致钙释放(CICR)  
 $\text{ET}_A$  受体  
PKC  
PKA  
AT1 受体

内皮素-1 (Endothelin-1, ET-1)是一种有效的持续性的缩血管多肽, 由血管内皮细胞分泌, 调节循环、神经、呼吸和泌尿系统. 它也是一种生长因子、一种激素调节多肽和一种神经多肽<sup>[1,2]</sup>. ET-1 也可在心脏中表达并被内皮、血管平滑肌和心肌细胞释放, 特别是在各种心血管疾病中, 包括充血性心衰、心肌肥厚和缺血性心脏病<sup>[3-6]</sup>. 血浆 ET-1 水平对保持正常的心血管功能十分重要, 它的调节失常导致高血压、心律不齐和心衰<sup>[7]</sup>. 另外 ET-1 是自发高血压大鼠平滑肌细胞的有丝分裂原<sup>[8]</sup>, 高血压大鼠氧化皮质酮乙酸诱导的心肌组织纤维化至少部分由 ET-1 介导<sup>[9,10]</sup>. 因此研究者们致力于寻求确定涉及 ET-1 的病理生理回路.

尽管该领域的研究有重大进展, ET-1 导致的心血管疾病发病的分子细胞机制仍不完全清楚. 最近的研究结果表明该机制可能与钙超载有关. Kuhlmann 等人<sup>[11]</sup>报道 ET-1(10 nmol/L)可致人内皮细胞内钙离子浓度显著增加( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Mohacsi 等人<sup>[12]</sup>报道 ET-1 的致心律失常作用可能与胞内钙释放、IP<sub>3</sub> 的产生、和由  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换器的激发导致的酸中毒有关.

在心肌细胞中, L-型钙电流是主要的去极化电流, 参与动作电位平台期和内质网钙释放的调节<sup>[13]</sup>. 这一通道被许多第二信使调节, 这就解释了为什么它能调节许多激素和神经介质, 包括 ET-1. 然而 ET-1 对  $I_{\text{CaL}}$  的效应仍不清楚. 例如, 一些关于 ET-1 的研究

**引用格式:** 曾庆华, 李星婷, 张文杰, 等. 内皮素-1 通过 L-型钙通道的  $\text{Ca}^{2+}$  内流和钙致钙释放诱导心肌细胞内  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39(4): 352-361

发现  $I_{CaL}$  增加<sup>[14~16]</sup>, 而其他则发现  $I_{CaL}$  降低<sup>[17,18]</sup>或无变化<sup>[19]</sup>. 这些有争议的数据可能是由实验条件的差异导致的, 包括不同的物种、组织和制备. 另外测量  $I_{CaL}$  的方法可能是保持 ET-1 生理应答的最重要因素. 许多早期研究使用破膜式膜片钳, 相反细胞吸附式单通道记录允许描述  $I_{CaL}$  而不改变胞内组分. 所以, 检测 ET-1 对完整心肌细胞  $I_{CaL}$  的作用和其潜在机制非常重要. 然而, ET-1 介导的  $[Ca^{2+}]_i$  增加的详细机制和通路还没有被完全揭示. 本研究应用 fura-2-AM 荧光成像技术和膜片钳技术, 聚焦于揭示 ET-1 造成的钙超载的信号转导机制, 试图阐明 ET-1 对心肌细胞内  $Ca^{2+}$  水平和  $Ca^{2+}$  通道电流的影响, 并检测 PKA, PKC 和 AT1 受体是否参与到 ET-1 诱导  $[Ca^{2+}]_i$  增加的信号通路中.

## 1 材料和方法

### 1.1 动物

实验所用成年雌性或雄性大鼠购于吉林大学动物实验中心, 于温度自动控制的房间中喂养.

### 1.2 大鼠心室肌细胞分离

向体重 200~300 g 的大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠 (20 mg/kg) 麻醉, 快速将心脏取出, 于 4°C 台式液中冷却. 然后利用 Langendorff 灌流装置于 41°C 下从主动脉灌流心脏. 首先用含钙台式液 (1.8 mmol/L  $CaCl_2$ ) 灌流 2 min 以洗净残余的血液, 接着用无钙台式液灌流 5 min. 最后用含 15 mg/100 mL 胶原酶的无钙台式液灌流 50 min. 灌流之后剪下心室, 在 KB 液中剪成 1 mm<sup>3</sup> 的小块, 37°C 水浴 10 min. 分离下来的细胞 4°C 下储存于 KB 液中备用.

### 1.3 细胞内钙离子浓度的测定 ( $[Ca^{2+}]_i$ )

为测定 ET-1 对心肌细胞钙浓度的影响, 用 fura-2/AM 荧光测定法测定  $[Ca^{2+}]_i$ . 将盖玻片粘贴于细胞浴槽上, 加入分离的心室肌细胞, 悬浮于含 1.25 mol/L fura-2/AM 和 pluronic F-127 (0.025% W/V) 的台式液中, 37°C 下负载 30 min. 将细胞浴槽放置于连接有氙灯和 CCD 摄像头 (CoolSNAP DG-4, Photometrics, USA) 的荧光倒置显微镜 (Nikon TE2000S, 日本) 下, 待测. 采用 Lambda DG4 超高速激发光波长切换器, 使激发光在 340 和 380 nm 快速转换, 得到 510

nm 下的荧光强度, 通过 340/380 的比值计算  $[Ca^{2+}]_i$ . 为增加实验的可信度, 用 Fura-2 Calcium Imaging Calibration Kit (Invitrogen) 绘制了  $[Ca^{2+}]_i$  标准校正曲线 (图 1). 使用 MetaMorph/Fluor software (Molecular Devices Co., 美国) 进行分析和记录.

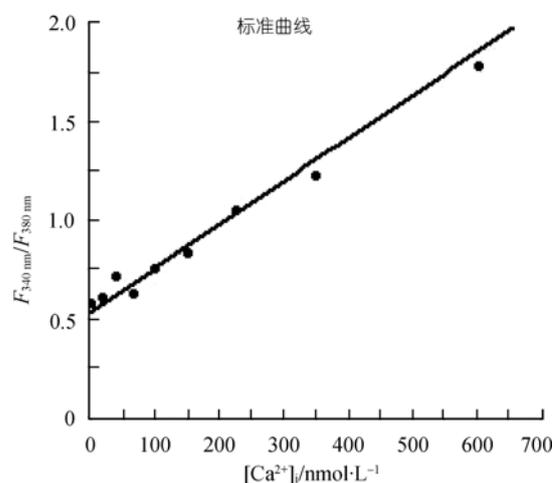


图 1  $[Ca^{2+}]_i$  标准校正曲线.

用 Fura-2 Calcium Imaging Calibration Kit (Invitrogen) 绘制了  $[Ca^{2+}]_i$  标准校正曲线, 使用 MetaMorph/Fluor software (Molecular Devices Co., 美国) 进行分析和记录.

### 1.4 全细胞 L-型钙通道电流记录

用 Axon-patch 200B 放大器 (Axon Instruments Inc., USA) 记录全细胞钙电流. 数据通过 PClamp 软件 (Axon Instruments Inc, USA) 在 2 kHz 下获得. 用二阶控制器控制电极, 电极尖端电阻为 2~4 MΩ. 获得串联电阻和电容补偿. 250 ms 去极化脉冲从钳制电压 -50 mV 阶跃至 -50~+60 mV, 增量为 10 mV, 引发钙内流. -40 mV (30 ms) 前脉冲用于使电压依赖性  $Na^+$  通道失活.

### 1.5 L-型单通道钙电流记录

L-型单通道钙通道的活性用细胞吸附式膜片钳技术测定. 三阶控制器 (Zeitz, Augsburg, Germany) 控制玻璃微电极, 抛光, 电极尖端电阻为 2~5 MΩ. 细胞浸于溶液中, 用电极内液充灌电极. 封接形成前电极内液和细胞溶液之间的电极电压调到 0. 电极和细胞间的千兆封接形成后, 钳制电压从 -60 mV 阶跃至 10 mV 诱发 L-型钙通道的激活, 时间间隔 256 ms, 频

率 0.5 Hz. 单通道钙电流用 L/MPC 膜片钳放大器记录(List, Darmstadt, 德国). 用 pClamp 6.0 软件(Axon Instruments)分析单一电流, 结果以开放概率(NPo)的形式表达. NPo 是通道开放时间和总时间的比值. 单一电流的平均幅度是通过 Gauss 曲线拟合每次实验的电流相继密度得到的.

记录出电流后, 为观察钙通道电流的变化, 应用药物于细胞, 包括钙离子通道的抑制剂 verapamil、激动剂 Bay K 8644, ET-1 等. 随后, 用细胞溶液冲洗细胞 2~3 次(流速, 2~3 mL/min).

## 1.6 溶液

台式液成分: 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 20 mmol/L glucose, 10 mmol/L taurine 和 10 mmol/L MOPS(pH 7.2). 细胞储存液成分: 70 mmol/L KOH, 50 mmol/L L-glutamic acid, 40 mmol/L KCl, 20 mmol/L taurine, 20 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 10 mmol/L glucose, 10 mmol/L HEPES 和 0.5 mmol/L EGTA(pH 7.4). 用于记录全细胞钙电流的细胞溶液成分: 2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 135 mmol/L TEA-Cl, 5 mmol/L 4-AP, 1 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 10 mmol/L glucose 和 10 mmol/L HEPES(pH 7.4). 用于记录全细胞钙电流的电极内液成分: 85 mmol/L L-aspartic acid, 85 mmol/L CsOH, 20 mmol/L TEA-Cl, 10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L EGTA, 2 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 4 mmol/L MgATP, 0.1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{GTP}$  和 5 mmol/L  $\text{Na}_2\text{creatine phosphate}$ (pH 7.4). 用于记录 L-型钙通道单通道电流的细胞溶液成分: 140 mmol/L potassium aspartate, 10 mmol/L EGTA 和 10 mmol/L HEPES(pH 7.4). 用于记录 L-型钙通道单通道电流的电极内液成分: 110 mmol/L  $\text{BaCl}_2$  和 10 mmol/L HEPES(pH 7.4).

Fura-2/AM, F-127, ET-1, BQ-123, BQ-788, chelerythrine, H-89 dihydrochloride hydrate, teimisartan, nifedipine, ryanodine 等购买于 Sigma 公司. verapamil 和 Bay K 8644 购买于 Calbiochem Co., 美国.

## 1.7 统计学

所有数据用平均值 $\pm$ SE 形式表示. 两组间的差异显著性通过 *t*-test 或 ANOVA 接着用 Newman-Keuls test 评估.  $P < 0.05$  被认为具有差异显著性.

## 2 结果

### 2.1 ET-1 通过 $\text{ET}_A$ 受体升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$

为观察 ET-1 对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的作用并确定哪种受体参与该效应, 测定了  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . 用 ET-1(20, 40, 60, 100 nmol/L)处理心肌细胞, 与正常组相比,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  剂量依赖性增加(图 2(A)). 在不同的浓度 ET-1 作用下,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  分别增加 5.33%, 8.51%, 12.29% 和 16.32%. ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )处理分离的心肌细胞, 造成了  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的显著增加. BQ123(1  $\mu\text{mol/L}$ ) 加入细胞浴槽后, 这个效应被显著抑制(图 2(B)). 分离下来的心肌细胞分别用下列方式处理: vehicle control, ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ ), ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )+BQ123(1  $\mu\text{mol/L}$ ), 或 ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )+BQ788(1  $\mu\text{mol/L}$ ) 孵育 30 min. ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )处理组导致  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加了 19.23%. 该效应被  $\text{ET}_A$  内皮素受体阻断剂 BQ123(1  $\mu\text{mol/L}$ )阻滞了 73.48%. 然而  $\text{ET}_B$  内皮素受体阻断剂 BQ788(1  $\mu\text{mol/L}$ )对 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加没有影响(图 2(C)).

### 2.2 钙致钙释放参与了 ET-1 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的增加

为检测 ET-1 对钙致钙释放(CICR)的影响, 用高浓度的 ryanodine(10  $\mu\text{mol/L}$ , ryanodine 受体阻断剂)处理心肌细胞 30 min. 然后加入 ET-1(0.1 nmol/L), ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加被 ryanodine(10  $\mu\text{mol/L}$ )消除了 46.7%(图 3).

### 2.3 PKC, PKA 和 $\text{AT}_1$ 受体参与了 ET-1 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的增加

为进一步研究 PKA, PKC 和  $\text{AT}_1$  受体是否参与了 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加, 分离的大鼠心肌细胞用 ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )+chelerythrine(5  $\mu\text{mol/L}$ , PKC 抑制剂), ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )+H-89 dihydrochloride hydrate(5  $\mu\text{mol/L}$ , PKA 抑制剂) 和 ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )+teimisartan (5  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\text{AT}_1$  受体抑制剂)处理 30 min. chelerythrine, H-89 dihydrochloride hydrate 和 teimisartan 使 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加分别降低 36.61%, 35.40% 和 42.68%(图 4).

### 2.4 ET-1 对全细胞 L-型 $\text{Ca}^{2+}$ 通道电流的影响

大量实验表明 ET-1 对心肌具有正性变力和变时

作用. 为检测外源 ET-1 对全细胞 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道电流 ( $I_{\text{CaL}}$ ) 的修饰作用, 进行了大鼠心肌细胞全细胞膜片钳实验. 细胞浸于含 5 nmol/L, 10 nmol/L, 15 nmol/L 和 50 nmol/L ET-1 的溶液中. 为保证所记录的电流是 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  电流, 膜电压 ( $V_m$ ) 被钳制在 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道的激活电压内. 即 250 ms 去极化脉冲从钳制电压 -50 mV 阶跃至 -50~+60 mV, 增量为 10 mV, 引发钙内流. 此外, 用 L-型钙通道阻断剂 (verapamil) 和激动剂 (Bay K 8644) 对所记录电流进行鉴定 (图 5). 在此基础上

记录 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道电流.

不同浓度的 ET-1 使峰电流从  $(-251.0 \pm 32.85)$  pA 分别升高至  $(-261.3 \pm 38.21)$  pA (4.10%,  $n=10$ ,  $P<0.01$ ),  $(-272.5 \pm 42.56)$  pA (8.57%,  $P<0.01$ ),  $(-382.8 \pm 44.21)$  pA (52.51%,  $n=10$ ,  $P<0.01$ ), 和  $(-423.6 \pm 48.56)$  pA (68.76%,  $n=10$ ,  $P<0.01$ ). 然而, 对动作电位和反转电位没有影响. 200 ms 去极化脉冲从钳制电压 -50 mV 阶跃至 -50~+60 mV, 增量为 10 mV, 引发钙内流. 然后, 用不含 ET-1 的细胞浴液冲洗掉 ET-1. 5 min 后, 峰

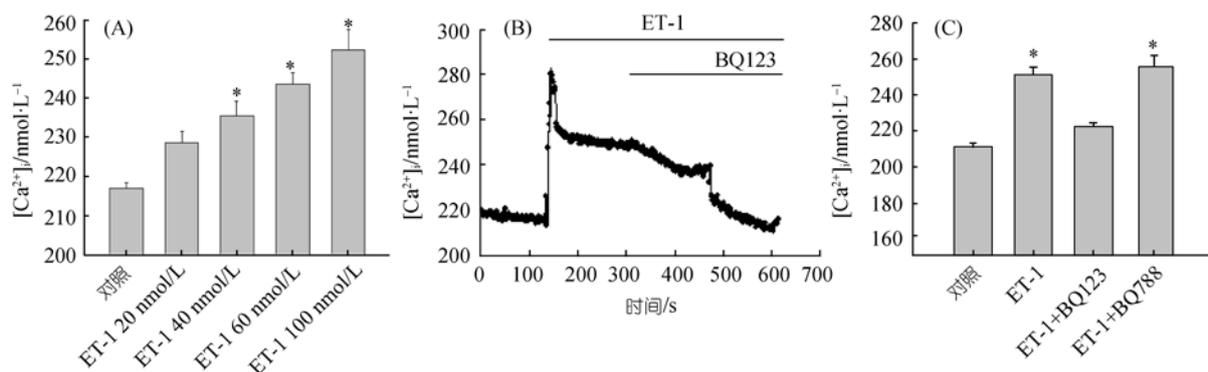


图 2 ET-1 对大鼠心肌细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的影响.

(A) 用 ET-1 (20, 40, 60, 100 nmol/L) 处理心肌细胞, 与正常组相比,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  剂量依赖性地增加; (B) ET-1 诱导的一个代表性细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的升高, 用 fura-2/Am 荧光成像的方法测定细胞内钙浓度, ET-1 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 显著升高  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ETA 受体抑制剂 BQ123 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 完全阻断了该效应. 细胞外液含  $\text{Ca}^{2+}$  (1.8 mmol/L); (C) ET-1 对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的影响, 分离下来的心肌细胞分别用下列方式处理, 对照, ET-1 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ), ET-1 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) + BQ123 (1  $\mu\text{mol/L}$ ), 或 ET-1 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) + BQ788 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 孵育 30 min, 每个处理组中至少测定 3 个实验的 21~23 个细胞. 数据以平均值  $\pm$  SE 的形式表示, \* 示与对照组相比差异显著 ( $P<0.05$ )

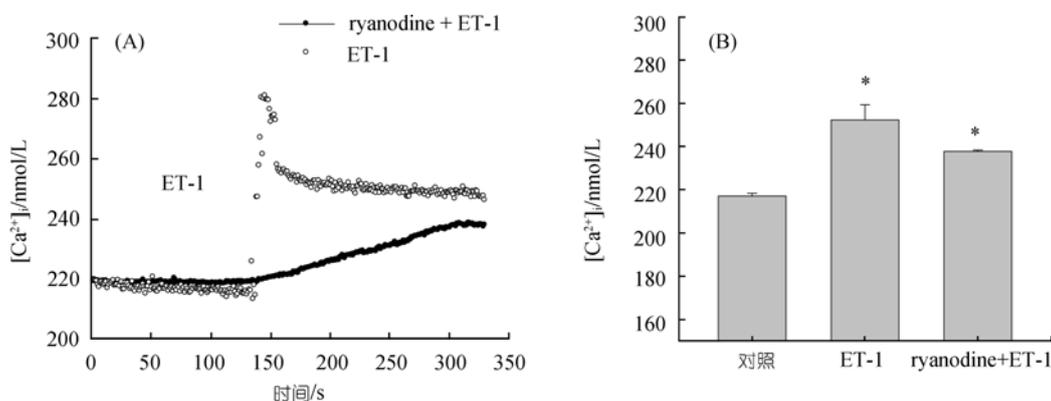


图 3 ryanodine 对 ET-1 诱导  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加的影响

(A) 一个代表性的细胞用 ryanodine 处理后, ET-1 诱导  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加, 用高浓度的 ryanodine (10  $\mu\text{mol/L}$ , ryanodine 受体阻断剂) 处理心肌细胞 30 min, 用 Fura-2/Am 荧光成像的方法测定细胞内钙浓度. ET-1 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 显著升高  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加被 ryanodine (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 消除了 46.7%. (B) ET-1 和 ryanodine + ET-1 处理后  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的柱形图, 选择 ET-1 加入后  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  变化的平台期的值作柱形图, 每个处理组中至少测定 3 个实验的 21~23 个细胞. 数据以平均值  $\pm$  SE 的形式表示, \* 示与对照组相比差异显著 ( $P<0.05$ )

电流达到  $(-301.4 \pm 35.41)$  pA, 没有完全恢复至正常水平. 图 6 表示加 ET-1 后代表性的细胞全细胞  $I_{\text{CaL}}$  的变化. 结果表明, ET-1 使全细胞 L-型钙电流显著增加, 并呈现剂量依赖性.

## 2.5 ET-1 对 L-型钙通道单通道电流的影响

为检测 ET-1 对 L-型钙通道单通道的影响, 用细胞吸附式膜片钳单通道记录技术在不破坏细胞内环境的情况下检测了 ET-1 对成年大鼠心肌细胞  $I_{\text{CaL}}$  的

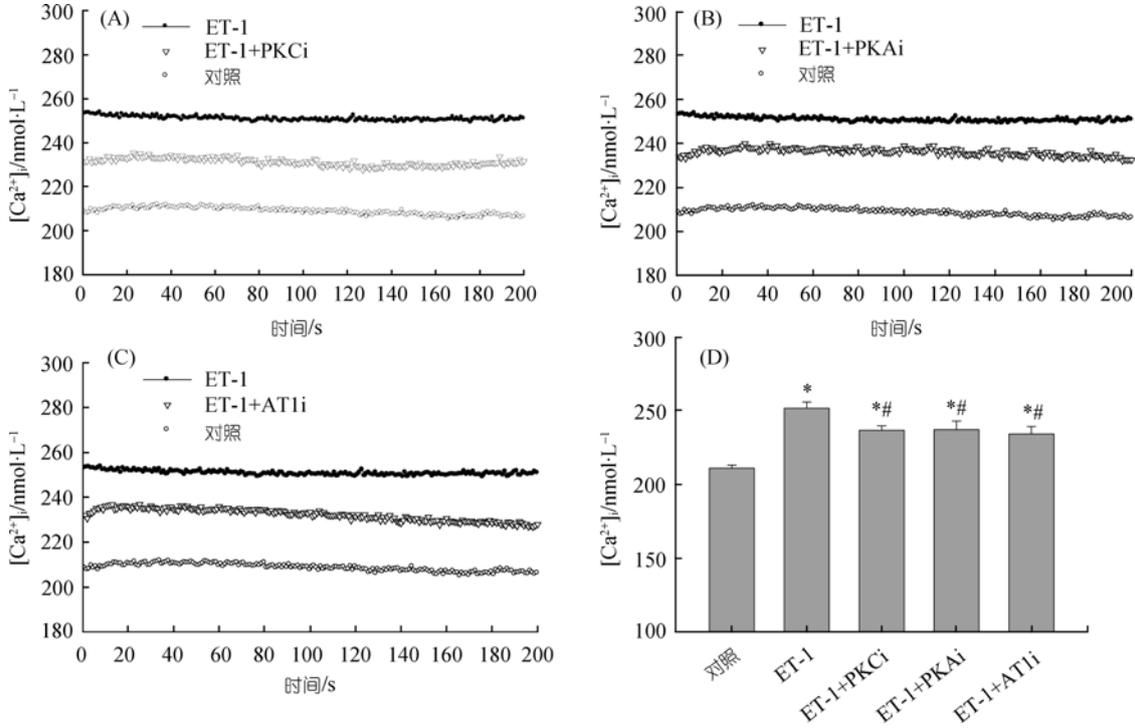


图 4 PKC 抑制剂(PKCi, Chelerythrine), PKA 抑制剂(PKAi, H-89 dihydrochloride hydrate)和 AT1 受体抑制剂(AT1i, Teimisartan)减弱 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的升高

(A) 在有代表性的细胞中, PKCi(5  $\mu\text{mol/L}$ )显著抑制 ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的升高; (B)在有代表性的细胞中, PKAi(5  $\mu\text{mol/L}$ )显著抑制 ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的升高; (C)在有代表性的细胞中, AT1i(5  $\mu\text{mol/L}$ )显著抑制 ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的升高; (D) 用 ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ ), ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) + PKCi(5  $\mu\text{mol/L}$ ), ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) + PKAi(5  $\mu\text{mol/L}$ )或 ET-1(0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) + AT1i(5  $\mu\text{mol/L}$ )处理细胞后,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的柱形图. ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加分别被 PKCi, PKAi 和 AT1i 抑制了 36.61%, 35.40%和 42.68%. 每个处理组中至少测定 3 个实验的 21~23 个细胞. 数据以平均值 $\pm$ SE 的形式表示, \* 示与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ). # ET-1+PKCi, ET-1+PKAi 和 ET-1+AT1i 与 ET-1 相比差异显著 ( $P < 0.05$ )

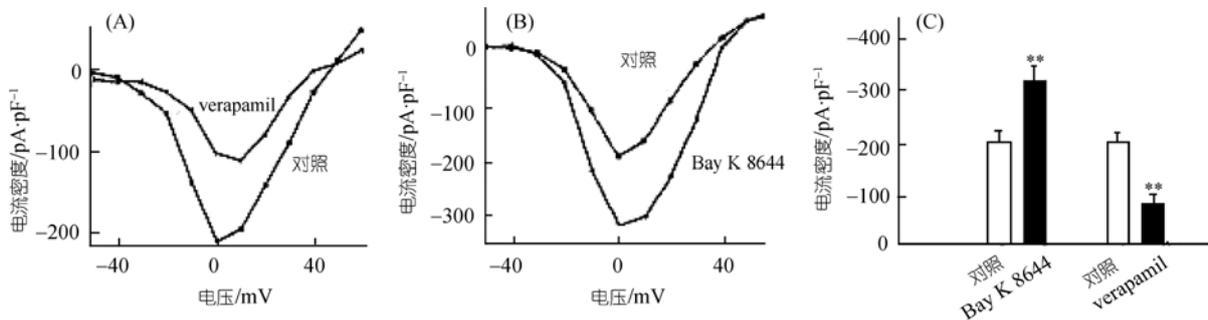


图 5 L-型钙通道电流的鉴定

250 ms 电压脉冲从钳制电压  $-50$  mV 阶跃至  $-50$ ~ $+60$  mV, 增量为 10 mV. (A) 用 verapamil 79  $\mu\text{mol/L}$  处理时  $I_{\text{CaL}}$  电流-电压关系; (B) Bay K 8644 5  $\mu\text{mol/L}$  处理时  $I_{\text{CaL}}$  电流-电压关系; (C) 图(A)和(B)描述了电流的柱形图. \*\* 示与对照相比差异显著 ( $P < 0.01$ )

作用. ET-1(10 nmol/L)引起了钙通道开放概率的显著增加(NPo, 图 7(B)). ET-1(10 nmol/L)使开放时间从(2.95±0.33) ms 延长至(4.74±0.42) ms( $n=11, P<0.05$ ), 而关闭时间从(88.40±14.73) ms 缩短至(35.31±12.41) ms( $n=11, P<0.05$ ). 然而, ET-1(10 nmol/L)不显著改变单一电流的幅度, 如图 7(A)所示(加入 ET-1 前后, 电流幅度分别为(1.42±0.02)和(1.40±0.18) pA). 在另一个实验中 Bay K 8644(100 nmol/L)显著增加  $I_{CaL}$  的 NPo, 不改变单一电流的幅度, 与 ET-1 对心肌细胞钙通道的作用十分相似(图 7(C)和(D)). 另外, 加入

nifedipine(0.3  $\mu\text{mol/L}$ , L-型  $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻断剂)后 ET-1(10 nmol/L)对  $I_{CaL}$  的 NPo 不产生任何影响(图 7(E)和(F))

$\text{ET}_A$  和  $\text{ET}_B$  受体在心肌细胞中都有表达. 本研究用二者各自的阻断剂研究了内皮素受体参与 ET-1 对 L-型钙电流的效应的情况. 如图 8 所示,  $\text{ET}_A$  阻断剂 BQ123(1  $\mu\text{mol/L}$ )完全阻断了 ET-1 诱导的 NPo 的增加. 相反, 在同样的处理下,  $\text{ET}_B$  阻断剂 BQ788(1  $\mu\text{mol/L}$ )没有改变 ET-1 对钙电流的作用. 在这些实验中, 单独应用 BQ123 或 BQ788 不能显著改变钙通道的基本活性.

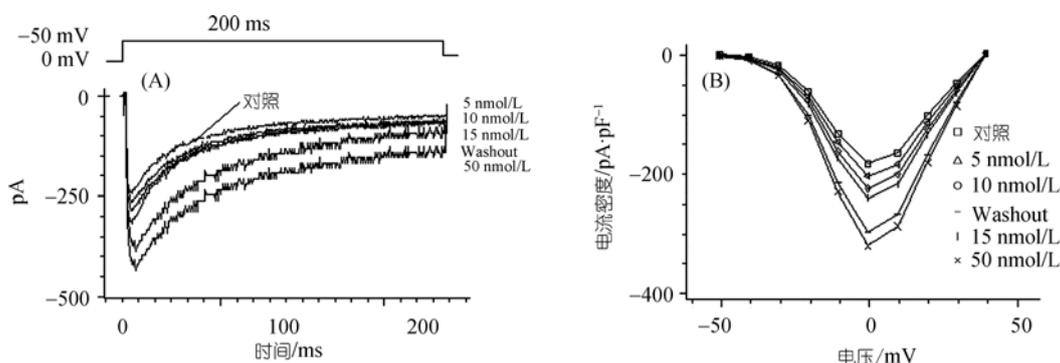


图 6 ET-1 对全细胞 L-型钙电流的影响

ET-1 剂量依赖性地增加钙电流. (A) 不同浓度 ET-1(5 nmol/L, 10 nmol/L, 15 nmol/L, 50 nmol/L 和 0 nmol/L)作用下代表性的细胞全细胞的  $I_{CaL}$ . 数据以平均值  $\pm$ SE 的形式表示( $n=10$ ), \*\* 示  $P<0.01$ ; (B) 电流-电压关系曲线

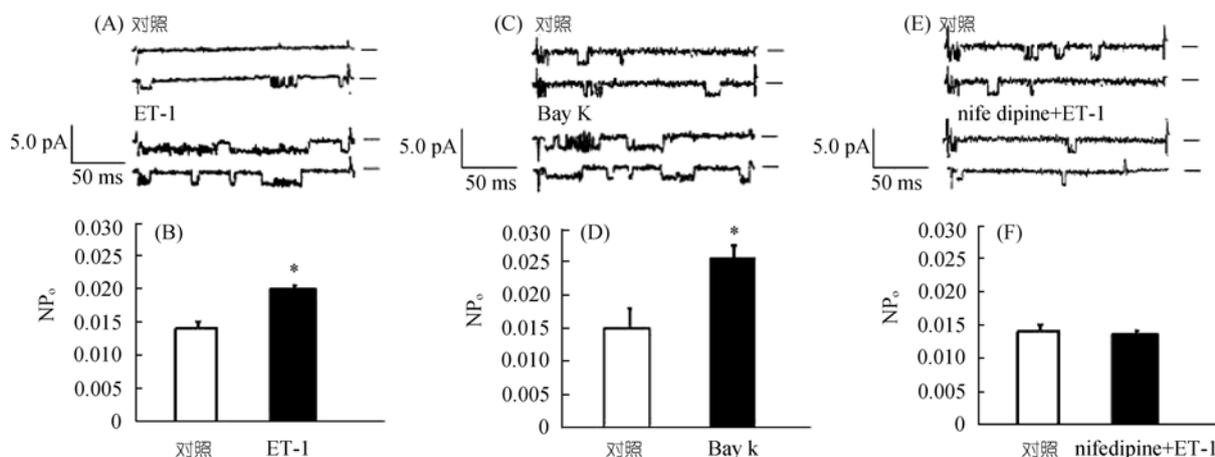


图 7 ET-1 心肌细胞  $I_{CaL}$  的影响

(A) 加入 ET-1(10 nmol/L)前后一个代表性的细胞中记录的  $I_{CaL}$  的轨迹, 短线表示基线( $I_{CaL}$  关闭状态), 细胞膜从钳制电压 -60 mV 去极化至 10 mV, 256 ms; (B) 加入 ET-1(10 nmol/L)前后  $I_{CaL}$  的开放概率( $n=11$ )的柱形图, \*  $P<0.01$ ; (C) 正常状态和加入 Bay K 8644(Bay K, 100 nmol/L)后一个代表性的细胞中记录的  $I_{CaL}$  的轨迹, 短线表示  $I_{CaL}$  关闭状态; (D) 加入 Bay K(100 nmol/L)前后  $I_{CaL}$  的开放概率( $n=12$ )的柱形图, \*  $P<0.05$ ; (E) 加入 ET-1(10 nmol/L)+nifedipine(0.3  $\mu\text{mol/L}$ )前后一个代表性的细胞中记录的  $I_{CaL}$  的轨迹. 短线表示  $I_{CaL}$  关闭状态; (F) 加入 ET-1(10 nmol/L)+nifedipine(0.3  $\mu\text{mol/L}$ )前后  $I_{CaL}$  的开放概率( $n=12$ )的柱形图

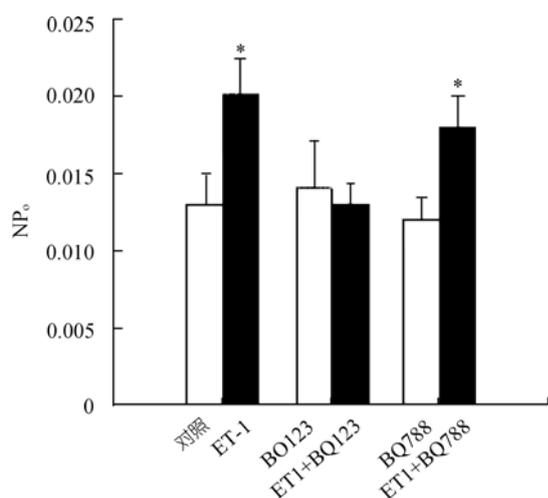


图 8  $\text{ET}_A$  和  $\text{ET}_B$  受体在 ET-1 诱导的心肌细胞  $I_{\text{CaL}}$  增加的效应。

柱形图示  $\text{ET}_A$  受体阻断剂 BQ123(1  $\mu\text{mol/L}$ )和  $\text{ET}_B$  受体阻断剂 BQ788(1  $\mu\text{mol/L}$ )对 ET-1 诱导的  $I_{\text{CaL}}$  的作用。按下列方式处理细胞: 对照, ET-1 (10 nmol/L), BQ123 或 BQ788, 和 BQ123+ET-1 或 BQ788+ET-1。数据以平均值 $\pm$ SE 的形式表示( $n=7, 8$ ), \* 示与各组的对照相比  $P<0.05$

### 3 讨论

本研究为 ET-1 通过 L-型钙通道的激活(即 ET-1 增加 L-型钙通道单通道  $\text{NP}_0$ , 全细胞 L-型钙通道电流和钙致钙释放)诱导  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加的假说提供了证据。实验结果首次描述了  $\text{ET}_A$  受体, PKC, PKA 和  $\text{AT}_1$  受体都参与了 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加。

一系列的证据证明, ET-1 能够诱导  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高的假说, 并且提出诱导  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高的通路和相关因子。Ko 等人<sup>[20]</sup>的研究表明, 刚分离的兔的肺动脉平滑肌细胞中, ET-1 诱导细胞内钙离子浓度瞬时增加, 随后返回初始的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。作者揭示了  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加归因于 ryanodine 和 1, 4, 5-三磷酸肌醇-敏感的细胞内钙库的钙离子释放。Minowa 等人<sup>[21]</sup>用 Wister 大鼠分离的动脉平滑肌细胞研究 ET-1 对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的作用, 发现 ET-1 能够引起一个  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的峰和一个继后的平台期, 并且 NO 供体 SNP(10 mmol/L)可以消除这一效应, NO 通过 cGMP 信号通路抑制 ET-1 的作用。Zima 等人<sup>[22]</sup>报道 ET-1 增加了完整的猫动脉细胞基础的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加动作电位, 引发钙瞬变, 改变钙瞬变幅度, 并且以钙火花和致心律失常性  $\text{Ca}^{2+}$  波的形式异化自发的肌质网(SR)钙释放。本实验为这些报道进一步

提供了证据, 一般来说, ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加包括两个时相: 一个瞬时增加相跟随一个持续增加相。人们一般认为瞬时相是由专门的受体介导的, 并且和肌质网钙释放有关; 而持续相依赖于钙通道的激活。

尽管大量研究集中于 ET-1 诱导的细胞内钙超载, 但是学者们没有达成共识。为证明我们的假说, 用 Fura-2/AM 荧光成像直接观察 ET-1 对心肌细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的影响。发现 ET-1 诱导了  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加, 该效应被  $\text{ET}_A$  内皮素受体阻断剂 BQ123(1  $\mu\text{mol/L}$ )减弱了 73.48%。然而  $\text{ET}_B$  受体阻断剂 BQ788(1  $\mu\text{mol/L}$ )对 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加没有影响。所以,  $\text{ET}_A$  可能对 ET-1 的强心刺激效应更重要, 而  $\text{ET}_B$  不参与 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加。

大量研究考察了 PKC 和 PKA 在 ET-1 对心肌细胞作用途径中可能的作用, 用 Fura-2/AM 荧光成像, Xu 等人<sup>[23]</sup>发现在原代培养的乳鼠心肌细胞中, 蛋白激酶 C 非特异性抑制剂(stauroporine, 100 nmol/L)和选择性抑制剂(NPC15437, 20 mmol/L)显著加强了 ET-1 对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的作用。然而, Chu 等人<sup>[24]</sup>报道 ET-1 的正性肌力效应(PIE)肌丝对钙离子敏感性的增加和钙瞬变小幅度的增加有关, 需要 PKA 和 PKC 的激活。所以, PKA 和 PKC 在 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加中的作用仍然不确定。本研究应用 PKC 抑制剂(chelerythrine)和 PKA 抑制剂(H-89 dihydrochloride hydrate)检测了它们对 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加的作用, 发现 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加分别被 chelerythrine 和 H-89 减弱了 36.61%和 35.40%。这表明 PKA 和 PKC 参与了 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加的途径中。

ET 和 Ang 系统有相互作用。一些报道表明, Ang 介导的  $\text{AT}_1$  受体激活诱导了 ET-1 的合成和释放, 继而激活  $\text{ET}_A$  受体<sup>[25,26]</sup>。的确, 慢性的  $\text{ET}_A$  受体的阻滞可以部分阻止大鼠 Ang 介导的心肌肥厚<sup>[27]</sup>。本研究表明, ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加被  $\text{AT}_1$  受体抑制剂 teimisartan 减弱了 42.68%, 为研究两个系统的相互作用提供了新的证据。

实验数据表明, PKC, PKA 和  $\text{AT}_1$  受体可能参与 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加的效应。然而, 3 种抑制剂都不能完全抑制该效应, 这表明该效应也可能涉及其他的通路。

对于 ET-1 诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  持续相增加的机制仍然

不确定. 一般认为与膜离子通道有关, 但离子通道的种类仍需要阐明<sup>[28,29]</sup>.

实验关键的问题是解决 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道是否参与 ET-1 诱导的细胞内钙离子浓度的增加. 这个领域存在矛盾的观点. 心肌细胞膜主要有两种钙通道——L 和 T 型<sup>[30-33]</sup>, 这两种钙通道有不同的电生理和药理学特征<sup>[34,35]</sup>. T-型钙通道一般只存在于胚胎和乳鼠心室肌细胞, 后天发育过程中逐渐消失<sup>[36]</sup>. 成年体内 T-型钙通道特异性地存在于浦肯野细胞、心房肌细胞、窦房结细胞和静脉窦细胞, 但不存在于大鼠、兔、和各种其他动物的心室肌细胞. 而且, 低电导率的 T-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道工作细胞基本没有作用. Toshiaki 等人<sup>[37]</sup>报道了 T-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道在心肌组织中可能引起细胞分裂和增长, 通过诱导  $\text{Ca}^{2+}$  内流, 并且在 ET-1 引起的心衰中重新出现. 相反 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道广泛分布于心肌中, 参与心肌动作电位的形成和兴奋收缩偶联<sup>[31-35]</sup>, 其单通道电阻较大. 比较两种钙离子通道发现 L-型钙离子通道更有可能是参与 ET-1 诱导细胞内钙浓度升高的通道. Furukawa 等人<sup>[29]</sup>的研究发现 ET-1(10 nmol/L)可能通过 PKC 诱导大鼠心室肌细胞 T-型钙电流的增加, 但对 L-型钙电流没有影响. 所以, 他们认为 T-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道参与 ET-1 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加, 而 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道不参与. 另外 Tohse 等人<sup>[19]</sup>重复了该实验, 应用全细胞膜片钳技术观察 ET-1 对 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道电流的影响. 他们发现 ET-1(250 nmol/L)可能减少豚鼠分裂心肌细胞 L-型钙电流幅度, 这一效应被 1  $\mu\text{mol/L}$  的 ryanodine 消除. Habuchi 等人<sup>[38]</sup>报道 ET-1(3 nmol/L)对 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道电流没有影响. 相反, Lu<sup>[39]</sup>利用全细胞膜片钳技术发现 ET-1(1~50 nmol/L)可能增加豚鼠心室肌细胞 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道电流幅度. 许多报道主张 ET-1 导致 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道电流的变化. Banasz 等人<sup>[40]</sup>报道未处理的犬心室肌细胞中, +5 mV 下, ET-1 显著降低  $I_{\text{CaL}}$  峰电流  $32.3 \pm 4.8\%$  ( $P < 0.05$ ). 正常人心室肌细胞中, Magyar 等人<sup>[41]</sup>发现 ET-1 显著降低  $I_{\text{CaL}}$ , +5 mV 下从  $10.2 \pm 0.6$  降至  $6.8 \pm 0.8$  pA/pF(66.7%

对照,  $P < 0.05$ ,  $n=5$ ), 并且峰电流的降低伴随着失活时间的延长. Boixel C 等人心房肌细胞, ET-1(10 nmol/L)使  $I_{\text{CaL}}$  幅度的增加  $99 \pm 7\%$  或降低  $33 \pm 2\%$ . 这个效应主要发生于低电流密度的  $I_{\text{CaL}}$  ( $2.3 \pm 0.2$  pA/pF), 而高电流密度的  $I_{\text{CaL}}$  ( $5.8 \pm 0.3$  pA/pF)被 ET-1 抑制<sup>[42]</sup>.

本研究检测了 ET-1 对 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道, 包括全细胞和单通道的影响. 结果表明, ET-1 剂量依赖性地显著增加全细胞钙电流, 也增加单通道的 NPo, 延长开放时间、缩短关闭时间. 然而, 这些观察不能排除其他非选择性离子的影响.

这些实验结果的矛盾可能是由不同物种、不同 ET-1 浓度及不同的实验记录方法导致的. 当应用破膜的膜片钳技术时, 允许信号分子从胞内透析, 而本研究的细胞吸附式膜片钳允许电流进入, 而不破坏细胞. 如先前应用穿孔膜片钳的研究(轻微破裂)表明, ET-1 导致了  $I_{\text{CaL}}$  25% 的增加<sup>[14]</sup>, 但用破膜膜片钳时没有任何效应<sup>[19]</sup>. 并且, Lauerde 等人<sup>[16]</sup>报道只有在电极液中含有 GTP 时, ET-1 才能引起  $I_{\text{CaL}}$  的增加, 否则 ET-1 造成  $I_{\text{CaL}}$  的降低. 另一方面, 最近许多研究提示 ET 受体具有多个亚型,  $\text{ET}_A$  和  $\text{ET}_B$  存在于心肌细胞中.  $\text{ET}_A$  受体更丰富(90%), 并且被认为在 ET-1 对  $I_{\text{CaL}}$  的效应中更重要.  $\text{ET}_B$  受体可能对 ET-1 对  $I_{\text{CaL}}$  的效应没有影响, 也不参与 ET-1 的抑制效应<sup>[43]</sup>.  $\text{ET}_A$  和  $\text{ET}_B$  在心肌细胞中的比例可能在各物种中不同, 这可能是导致在观察 ET-1 对  $I_{\text{CaL}}$  的效应时结果不一致的另一原因.

本研究提出了参与 ET-1 诱导的心肌细胞钙超负载过程的一系列事件. ET-1 诱导的钙超负载依赖于 L-型钙通道的激活和肌质网的钙释放. 结果表明, L-型钙通道单通道 NPo 和全细胞 L-型钙通道电流幅度的增加对 ET-1 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的升高至关重要. Ryanodine 使 ET-1 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加减弱了 46.7%, 表明 CICR 也参与了 ET-1 的作用. ET-1 通过刺激心肌细胞细胞吸附膜片上的  $\text{ET}_A$  受体, 激活  $I_{\text{CaL}}$ . PKC, PKA 和 AT1 受体也介导了 ET-1 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加.

## 参考文献

- 1 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature, 1988, 332: 411—415 [\[DOI\]](#)
- 2 Tang J. Endocrine function of circulation system (in Chinese). Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical

College Press, 1989

- 3 Wainwright C L, McCabe C, Kane K A. Endothelin and the ischaemic heart. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005, 3(4): 333—341 [\[DOI\]](#)
- 4 Suzuki Y J, Nagase H, Nie K, et al. Redox control of growth factor signaling: recent advances in cardiovascular medicine. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(5-6): 829—834 [\[DOI\]](#)
- 5 Moe G W, Rouleau J L, Nguyen Q T, et al. Role of endothelins in congestive heart failure. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003, 81(6): 588—597 [\[DOI\]](#)
- 6 Angerio A D. The role of endothelin in heart failure. *Crit Care Nurs Q*, 2005, 28(4): 355—359
- 7 Stewart D J, Kubac G, Costello K B, et al. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 1991, 18: 38—43
- 8 Liu G X, Wang H, Ou D M. Endothelin-1, an important mitogen of smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Chin Med J*, 2002, 115: 750—752
- 9 Ammarguella F, Larouche I, Schiffrin E L. Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET (A) receptor antagonism. *Circulation*, 2001, 103: 319—324
- 10 Ammarguella F Z, Gannon P O, Amiri F, et al. Fibrosis, matrix metalloproteinases, and inflammation in the heart of DOCA-salt hypertensive rats: role of ET(A) receptors. *Hypertension*, 2002, 39: 679—684 [\[DOI\]](#)
- 11 Kuhlmann C R, Most A K, Li F, et al. Endothelin-1-induced proliferation of human endothelial cells depends on activation of  $\text{K}^+$  channels and  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Acta Physiol Scand* 2005, 183: 161—169 [\[DOI\]](#)
- 12 Mohacsi A, Magyar J, Tamas B, et al. Effects of endothelins on cardiac and vascular cells: new therapeutic target for the future? *Curr Vasc Pharmacol*, 2004, 2(1): 53—63 [\[DOI\]](#)
- 13 Cleemann L, Morad M. Role of  $\text{Ca}^{2+}$  channel in cardiac excitation-contraction coupling in the rat: evidence from  $\text{Ca}^{2+}$  transients and contraction. *J Physiol*, 1991, 432: 283—312
- 14 He J Q, Pi Y, Walker J W, et al. Endothelin-1 and photoreleased diacylglycerol increase L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current by activation of protein kinase C in rat ventricular myocytes. *J Physiol*, 2000, 524 Pt 3: 807—820
- 15 Boixel C, Dinanian S, Lang-Lazdunski L, et al. Characterization of effects of endothelin-1 on the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in human atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 281(2): H764—773
- 16 Lauer M R, Gunn M D, Clusin W T. Endothelin activates voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  current by a G protein-dependent mechanism in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol*, 1992, 448: 729—747
- 17 Ono K, Eto K, Sakamoto A, et al. Negative chronotropic effect of endothelin 1 mediated through ETA receptors in guinea pig atria. *Circ Res*, 1995, 76(2): 284—292
- 18 Cheng T H, Chang C Y, Wei J, et al. Effects of endothelin 1 on calcium and sodium currents in isolated human cardiac myocytes. *Can J Physiol Pharmacol*, 1995, 73(12): 1774—1783
- 19 Tohse N, Hattori Y, Nakaya H, et al. Inability of endothelin to increase  $\text{Ca}^{2+}$  current in guinea-pig heart cells. *Br J Pharmacol*, 1990, 99(3): 437—438
- 20 Ko E A, Park W S, Ko J H, et al. Endothelin-1 increases intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells through phospholipase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(4): H1551—1559 [\[DOI\]](#)
- 21 Minowa T, Miwa S, Kobayashi S, et al. Inhibitory effect of nitrovasodilators and cyclic GMP on ET-1-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable non-selective cation channel in rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 1997, 120: 1536—1544 [\[DOI\]](#)
- 22 Zima A V, Blatter L A. Inositol-1, 4, 5-trisphosphate-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in cat atrial excitation-contraction coupling and arrhythmias. *J Physiol*, 2004, 555: 607—615 [\[DOI\]](#)
- 23 Xu Y, Sandirasegarane L, Gopalakrishnan V. Protein kinase C inhibitors enhance endothelin-1 and attenuate vasopressin and angiotensin II evoked  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation in the rat cardiomyocyte. *Br J Pharmacol*, 1993, 108(1): 6—8
- 24 Chu L, Takahashi R, Norota I, et al. Signal Transduction and  $\text{Ca}^{2+}$  Signaling in contractile regulation induced by crosstalk between endothelin-1 and norepinephrine in dog ventricular myocardium. *Circ Res*, 2003, 92(9): 1024—1032 [\[DOI\]](#)
- 25 Moreau P, d'Uscio L V, Shaw S, et al. Angiotensin increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor blocker. *Circulation*, 1997, 96(5): 1593—1597
- 26 Rajagopalan S, Laursen J B, Borthayre A, et al. Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension*, 1997, 30(1 Pt 1): 29—34
- 27 d'Uscio L V, Moreau P, Shaw S, et al. Effects of chronic ETA-receptor blockade in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*, 1997,

- 29(1 Pt 2): 435—441
- 28 Bkaily G, Wang S, Bui M, et al. ET-1 stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  current in cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995, 26: 293—296
- 29 Furukawa T, Ito H, Nitta J, et al. Endothelin-1 enhances calcium entry through T-type calcium channels in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res*, 1992, 71: 1242—1253
- 30 Nowycky M C, Fox A P, Tsien R W. Three types of neurohal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 1985, 316: 440—443 [\[DOI\]](#)
- 31 Rosenberg R L, Hess P, Tsien R W. Cardiac calcium channels in planar lipid bilayers. L-type channels and calcium-permeable channels open at negative membrane potentials. *J Gen Physiol*, 1988, 92: 27—54 [\[DOI\]](#)
- 32 Coulombe A, Lefevre I A, Baro I, et al. Barium-and calcium-permeable channels open at negative membrane potentials in rat ventricular myocytes. *J Membr Biol*, 1989, 111: 57—67 [\[DOI\]](#)
- 33 Reuter H, Stevens C F, Tsien R W, et al. Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. *Nature*, 1982, 297: 501—504 [\[DOI\]](#)
- 34 Nilius B, Hess P, Lansman J B, et al. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cell. *Nature*, 1985, 316: 443—446 [\[DOI\]](#)
- 35 Bean B P. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol*, 1985, 86: 1—30 [\[DOI\]](#)
- 36 Zhou Z, Lipsius S L. T-type Calcium current in latent pacemaker cells isolated from cat right atrium. *J Mol Cell Cardiol*, 1994, 26: 1211—1219 [\[DOI\]](#)
- 37 Izumi T, Kihara Y, Sarai N, et al. Reinduction of T-type calcium channels by endothelin-1 in failing hearts *in vivo* and in adult rat ventricular myocytes *in vitro*. *Circulation*, 2003, 108: 2530—2535 [\[DOI\]](#)
- 38 Habuchi Y, Tanaka H, Furukawa T, et al. Endothelin enhances delayed potassium current via phospholipase C in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 1992, 262: H345—354
- 39 Lu T, Huang Y, Jiang W. The electrophysiologic effects of endothelin a patch clamp study in guinea pig ventricular myocytes. *Chin Med J*, 1995, 108: 618—625
- 40 Banyasz T, Magyar J, Kortvely A, et al. Different effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in canine ventricular cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2001, 363(4): 383—390 [\[DOI\]](#)
- 41 Magyar J, Iost N, Kortvely A, et al. Effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in undiseased human ventricular myocytes. *Pflugers Arch*, 2000, 441(1): 144—149 [\[DOI\]](#)
- 42 Boixel C, Dinanian S, Lang-Lazdunski L, et al. Characterization of effects of endothelin-1 on the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in human atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 281(2): H764—773
- 43 Kedzierski R M, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001, 41: 851—876 [\[DOI\]](#)