



心肌细胞横管-肌质网耦联与钙信号调控

邢昕, 梁景辉, 王世强*

北京大学生命科学学院膜生物学国家重点实验室, 北京 100871

* 联系人, E-mail: wsq@pku.edu.cn

收稿日期: 2021-07-13; 接受日期: 2021-08-05; 网络版发表日期: 2021-10-26

国家自然科学基金(批准号: 91854209, 31630035)资助

摘要 心肌细胞的兴奋沿横管传入细胞深处并激活L型钙通道, 进而通过钙致钙释放机制激活肌质网ryanodine受体钙释放通道, 由此产生的钙火花叠加成为细胞钙瞬变, 引发心肌细胞同步化收缩. β_1 型肾上腺素受体介导的广域cAMP信号通过磷酸化L型钙通道、ryanodine受体、肌质网受磷蛋白, 分别上调钙内流、钙释放和肌质网钙泵的钙回收速率, 从而增强心脏泵血能力. β_2 型肾上腺素受体一方面通过局域cAMP信号磷酸化L型钙通道, 另一方面通过G蛋白耦联受体激酶-2介导的“越位阻隔”抑制 β_1 受体对肌质网钙释放和钙回收的调控. 心力衰竭病理过程中, 由于锚定横管与肌质网的junctophilin-2下调, 横管与肌质网发生结构和功能脱耦联, 造成心脏泵血能力低下. 冬眠动物能通过转录因子myocardin上调junctophilin-2和caveolin-3, 增强横管与肌质网的结构和功能耦联, 从而保证冬眠状态下的心脏泵血能力. 进一步探明横管与肌质网间钙致钙释放稳态调控的分子机制将为有关心脏疾病的防治提供新思路.

关键词 横管, 肌质网, 钙信号, β 肾上腺素受体, 心力衰竭, 冬眠

心脏的节律性收缩和舒张是维持机体氧气和营养物质供应、带走代谢终产物的重要保障. 在心肌细胞兴奋期, 钙离子从细胞膜及其特化结构横管(transverse tubule, TT)上的电压敏感性L型钙通道(L-type calcium channel, LCC)流入细胞, 引发肌质网(sarcoplasmic reticulum, SR)通过ryanodine受体(ryanodine receptor, RyR)大量释放钙离子, 使胞质中的钙离子浓度由静息水平的约100 nmol/L瞬间升高到1~10 μ mol/L, 产生整个细胞的同步钙信号“钙瞬变(Ca^{2+} transient)”. 此时, 胞质中增加的钙离子与肌原纤维中的肌钙蛋白C(troponin C)结合引起后者构象发生改变, 导致原肌

球蛋白位移, 使得粗肌丝的横桥能够与细肌丝的活性位点结合, 从而产生肌丝滑行, 心肌细胞发生收缩(图1). 这种肌细胞兴奋通过肌质网钙释放导致肌细胞收缩的过程称为兴奋收缩耦联(excitation-contraction coupling)^[1]. 心肌细胞膜或横管膜与肌质网之间的结构和功能互作是兴奋收缩耦联的基础.

1 横纹肌细胞中横管与肌质网的耦联结构

横管是横纹肌(包括骨骼肌和心肌)细胞的细胞膜向细胞内延伸形成的管状结构. 横纹肌有整齐的肌小

引用格式: 邢昕, 梁景辉, 王世强. 心肌细胞横管-肌质网耦联与钙信号调控. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 5-16

Xing X, Liang J H, Wang S Q. Couplings between transverse tubules and sarcoplasmic reticulum: roles in calcium signaling (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 5-16, doi: [10.1360/SSV-2021-0249](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0249)

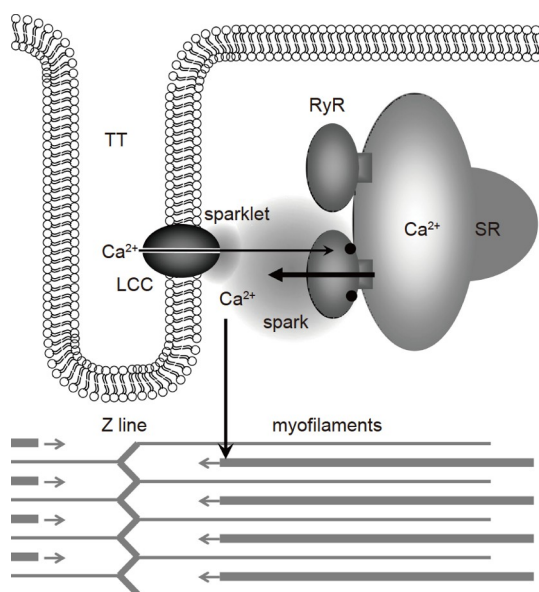


图1 心肌细胞横管与肌质网之间的钙致钙释放

Figure 1 Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release between TT and SR in cardiomyocytes.

节排列, 其中细肌丝从Z线向两侧出发, 与从M线发出的粗肌丝交叠, 并在钙离子的作用下相互滑行。骨骼肌细胞的横管一般位于Z线两侧, 因此一个肌小节平均有两条横管; 心肌细胞的横管位于Z线, 一个肌小节平均只有一条横管(图2)。由于成熟的横纹肌细胞非常大(心肌细胞一般长 $100\sim 200\ \mu\text{m}$, 粗 $20\sim 40\ \mu\text{m}$; 骨骼肌细胞通常由很多细胞融合而成, 比心肌细胞又粗大很多), 横管的重要作用是将细胞膜的兴奋迅速传到细胞内所有肌小节, 保证肌细胞收缩的同步性^[2]。肌细胞收缩的同步性对保证肌肉的收缩力和收缩的爆发性均至关重要。

触发横纹肌收缩的钙离子主要是从肌质网释放出来。从与细胞膜或横管膜的关系角度, 肌质网可以分为连接型肌质网(junctional SR, JSR)和纵行肌质网(longitudinal SR, LSR)(图2)。纵行肌质网呈网状包绕着每个肌小节中的肌原纤维, 有大量肌质网钙泵(sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA), 在细胞钙回收中发挥主要作用。纵行肌质网延伸到横管附近时过渡为连接型肌质网。连接型肌质网与横管膜平行排列, 二者的间隙约为 $10\sim 12\ \text{nm}$ ^[3]。骨骼肌的连接型肌质网很发达, 在横管两侧均形成连续的囊状结构, 从而产生了肌质网-横管-肌质网的三联体(triad)结构; 心肌细胞的连接型肌质网是离散的, 较少有横管两侧都耦联肌质网的情况, 因此心肌细胞横管-肌质网耦联结构一般称为二联体(dyad)^[4]。横管膜(心肌细胞也有一些细胞膜)与连接型肌质网形成的耦联结构又称为耦联子(couplon, 图2)^[3,5], 是兴奋收缩耦联期间产生钙信号的基本单位。

心肌和骨骼肌的兴奋收缩耦联机制有所不同。骨骼肌的LCC是 $\text{Ca}_v1.1$, 激活后产生的钙内流很弱, 主要是通过其 β 亚基结构域的构象变化直接耦合到 RyR1 ^[6], 因而骨骼肌的 RyR1 钙释放的激活是通过横管膜 $\text{Ca}_v1.1$ 与肌质网 RyR1 的分子间互作来控制; 而心肌细胞的LCC是 $\text{Ca}_v1.2$, 虽然与肌质网 RyR2 也很近, 但没有直接互作, 而是通过 $\text{Ca}_v1.2$ 在膜电位去极化激活后产生钙内流触发 RyR2 开放从而从肌质网释放钙离子(图1), 这个过程称为钙致钙释放(calcium induced calcium release, CICR), 是Fabiato等人^[7]在1975年通过去膜心肌细胞(skinned cardiomyocyte)的高难度实验发现的。

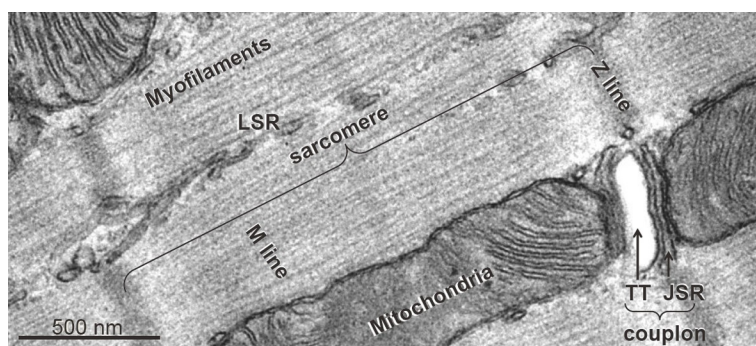


图2 心肌细胞超微结构

Figure 2 Ultrastructural elements in a cardiomyocyte

2 心肌细胞横管-肌质网之间钙致钙释放的分子过程

钙离子作为重要的信使分子, 参与突触形成、囊泡释放、学习记忆等诸多生物学过程^[8]. 钙致钙释放是很多细胞产生和放大钙信号的基本方式. 不同细胞的钙致钙释放中提供钙内流的细胞膜钙通道与产生钙释放的肌质网或内质网通道各不相同. 例如, 在成纤维细胞迁移中存在的钙致钙释放是机械敏感TRPM7通道产生的钙内流引发内质网三磷酸肌醇受体(inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, IP₃R)钙释放所致^[9]. 钙致钙释放具有内在的正反馈属性. 这种正反馈过程如果占据主导地位, 细胞的钙释放将是“全或无(all-or-none)”的. 本实验室^[10]在星形胶质细胞观察到全或无的细胞钙振荡.

然而, 心肌细胞的收缩活动受到钙瞬变幅度与时程的精细调控. 为了解释一个正反馈系统如何实现精细可控, Stern^[11]提出局部控制理论(local-control theory), 他认为心肌细胞的钙致钙释放需要有两个基本性质才能实现稳定控制: (i) 钙释放单位(Ca²⁺ release unit)离散分布, 每个钙释放单位中肌质网RyR由横管/细胞膜LCC局部控制; (ii) RyR对钙离子的敏感性足够低, 从而其钙释放不足以引发临近RyR的连锁反应. 1993年, 程和平等人^[12]利用当时先进的激光共聚焦电子显微镜和Minta等人^[13]发明的快动力学钙离子荧光探针Fluo-3首次探测到心肌细胞中局部发生的微小的RyR钙释放事件——钙火花(Ca²⁺ spark)(图1). 钙火花作为局部钙信号的存在为钙致钙释放的局部控制理论提供了有力证据. 更重要的是, 钙火花很快被证明是细胞钙瞬变的基本单位^[14]. 心肌细胞膜和横管膜兴奋同步触发的数千个钙火花总合形成细胞钙瞬变, 启动心脏收缩. 因此钙火花的发现将钙致钙释放的认识推进到分子水平.

根据钙火花幅度的相对一致性等特点, 钙火花起初被认为是RyR的单通道钙释放事件^[12](图1). 后来钙火花幅度的一致性又被很多学者解释为单个钙释放单位中数十个RyR开放的统计学特征^[15,16]. 要探讨钙致钙释放以及钙火花的分子过程, 关键是实现细胞膜单个钙通道和肌质网单位钙释放(即钙火花)的同时记录. 当时本领域的难题是, 膜片钳电极封接导致细胞膜变形, 破坏了细胞膜通道与肌质网之间~15 nm的精细结

构, 不能触发局部钙释放. 于是, 我们^[17]着手探讨是否可能不用膜片钳, 而用激光共聚焦显微技术, 通过荧光探针来探测流过单个通道的钙信号. 通过大量探索, 优化实验条件, 最终成功看到了由单个钙离子通道活动产生的极其微弱的局部钙信号, 并将其命名为Ca²⁺ sparklet(钙火星)(图1). 我们^[18]证明, 钙火星在时间和幅度上与单通道离子电流成正比. 这种定量关系第一次确定了光学方法作为单个离子通道活动的观测手段. 通过将钙火星与钙火花的信号强度进行对比, 确定钙火花相应的钙释放电流平均为2~3 pA, 并且呈现量子化分布, 每一“份”约为1.2 pA, 可能来自一个RyR, 这样一个钙火花可能对应1~7个RyR2的随机开放. 由于一个钙释放单位通常包含几十个RyR, 为什么只有少数RyR被激活, 而其他RyR没有通过钙致钙释放激活? 这是一个非常有挑战性的问题. 未来只有回答了这个问题才能阐明钙火花的分子本质和钙致钙释放的微观控制过程.

在钙火星记录技术的基础上, 我们设计了一种“松钳(loose-patch)”的实验方案同时记录LCC的钙火星及其触发的RyR局部钙释放, 发现钙火星可以在几毫秒内迅速激活肌质网RyR, 产生比钙火星强两个数量级的钙火花. 这是第一次在分子水平上记录到钙致钙释放. 统计分析表明, 钙火星触发局部钙释放的潜伏期符合规则的一阶指数分布, 这意味着细胞膜单个LCC激活肌质网RyR的分子过程属于马尔可夫随机过程. 正是因为这一随机性, 钙火星并不总能触发钙释放. 但一旦钙火花被触发, 此后的触发概率便显著下降, 表明RyR钙释放具有不应期^[17], 纠正了以往人们认为局部钙释放没有不应期^[19]的论断. 钙火星触发钙火花的随机性和不应期揭示了横管/细胞膜单个LCC与肌质网RyR之间钙致钙释放的分子动力学性质.

3 交感神经递质和肾上腺素对钙致钙释放的调控

钙致钙释放是心肌细胞兴奋收缩耦联和心脏泵血能力调控的关键. 当交感神经兴奋时, 交感神经末梢分泌去甲肾上腺素. 去甲肾上腺素与心肌细胞膜或横管膜的 β 肾上腺素受体(β adrenergic receptor, β AR)结合激活腺苷酸环化酶产生cAMP信使, 继而通过激活蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)磷酸化横管膜LCC以

及肌质网RyR(图3A)和受磷蛋白(phospholamban)等。LCC的磷酸化增加LCC开放概率, 从而为钙致钙释放提供更强的触发信号; 受磷蛋白是SERCA的抑制因子, 其磷酸化可解除对SERCA的抑制, 从而提高肌质网的钙回收速率, 并增加下一个兴奋收缩耦联周期可供释放的钙储量。因此, 在 β AR刺激下, 心肌细胞钙瞬变更强、更同步^[20]。

由于横管膜LCC和肌质网受磷蛋白磷酸化都能够增加兴奋收缩耦联期间的钙释放, β AR介导的RyR磷酸化是否直接调控其钙释放长期未能确定^[21]。由于RyR是位于细胞内的离子通道, 不能用膜片钳技术直接进行电生理学研究, 多个实验室将RyR提取后重组到人工脂膜上进行研究, 得到不同的实验结果: 有的实验室认为PKA对RyR功能没有影响^[22], 有的则坚持PKA对RyR不仅有重要调控, 且在心力衰竭和心率失常中发挥关键作用^[23]。本实验室认为, 不同实验室得出不同结论的关键原因是体外重组的实验不能有效模拟RyR在肌质网原位的生理环境和状态, 如FK506结合蛋白对RyR的调节^[24]。为了能够在细胞原位研究 β AR-cAMP-PKA信号通路对RyR分子生理学行为的影响, 本实验室^[25]采用松钳技术, 通过对细胞膜片的去极化激活细胞膜LCC产生钙火星, 再由LCC激活肌质网RyR产生钙火花。通过测量钙火星与钙火花之间的时间差发现, β AR通过cAMP-PKA信号途径能够提高肌质网RyR钙释放(图3A)对横管LCC的响应速率和同

步性, 而且这一效应是独立于 β AR对LCC和肌质网钙回收调控的新机制。因此, β AR介导的LCC、RyR和受磷蛋白磷酸化三种机制共同增加了交感神经调控下的心肌细胞钙释放, 从而增加心脏的泵血能力。

心肌细胞存在的 β AR主要是 β_1 AR和 β_2 AR。其中 β_1 AR主要与刺激型G蛋白(stimulatory G protein, G_s)耦联, 产生的cAMP信号迅速扩散到整个细胞, 产生对LCC、RyR和SERCA的上述调控作用。与 β_1 AR不同, β_2 AR同时与 G_s 和抑制型G蛋白(inhibitory G protein, G_i)耦联(图3B)。 β_2 AR将磷酸二酯酶4(phosphodiesterases-4, PDE-4)募集到膜下, 水解向肌质网扩散的cAMP。因此, 相对于 β_1 AR能够升高整个细胞质的cAMP水平从而产生广域调控作用, 心肌细胞的 β_2 AR通常只能磷酸化横管膜LCC, 却不能磷酸化肌质网受磷蛋白^[26], SERCA的活性并不增加^[27], 肌质网回收钙离子的速率以及可供钙释放的肌质网钙储量不受 β_2 AR的调控^[28]。这种现象显示 β_2 AR的信号转导是局域化(localization)或隔室化(compartmentalization)的^[29]。

RyR是否受到 β_2 AR的调控呢? 与SERCA大多分布于纵行肌质网^[30,31]不同, RyR主要分布于连接型肌质网, 离横管膜/细胞膜只有~15 nm(图3)。根据颜宁实验室^[32]解析的结构, RyR在胞质侧的高度就有~13 nm, 而且RyR的磷酸化位点位于分子顶端, 紧贴细胞膜(图3)。然而, 本实验室发现, β_2 AR激动剂虽然显著增加LCC钙内流, 却几乎不增加充分激活的钙瞬变, 也不改变

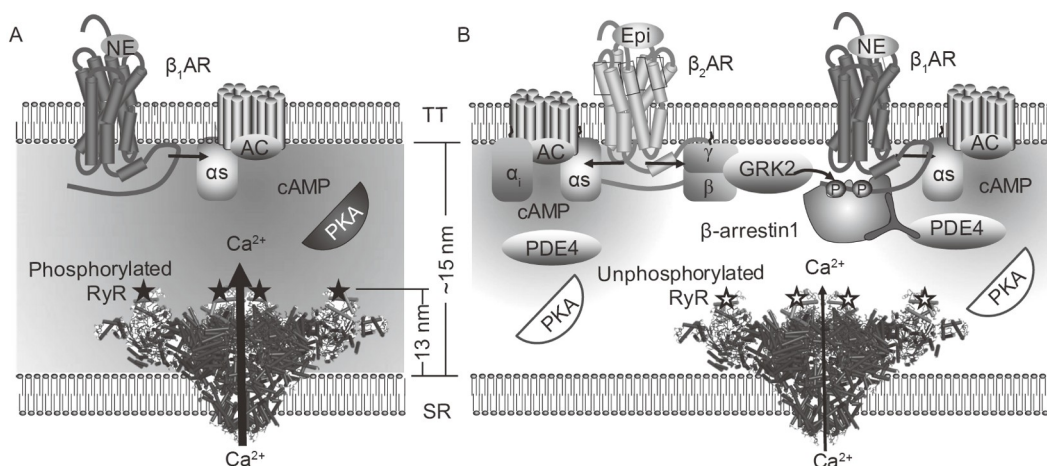


图3 横管 β 肾上腺素受体调控肌质网RyR的信号转导。A: β_1 受体介导的广域cAMP信号使RyR磷酸化(五角星)。B: β_2 受体介导局域cAMP信号, 而且阻止 β_1 受体对RyR的磷酸化

Figure 3 Signaling between β -ARs on TTs and RyRs on the SR. A: β_1 AR-induced global cAMP-PKA signaling that phosphorylate RyRs (stars). B: β_2 ARs induce local cAMP signaling and prevent β_1 ARs from phosphorylating RyRs

钙火花形态^[28]。用松钳技术测量LCC钙火花与RyR钙火花之间的时间差,也证明 β_2 AR的确不能调控RyR对触发钙信号的敏感性。生物化学实验表明,饱和剂量 β_2 AR激动剂引起的RyR磷酸化程度显著低于 β_1 AR的效应^[29]。

如果 β_2 AR只是一个“简配版”的 β AR,那么它为什么存在呢?这个问题一直困惑着心脏调控研究领域的学者。最近,本实验室发现, β_2 AR激活竟然能够通过G蛋白耦联受体激酶2(G protein-coupled receptor kinase 2, GRK2)磷酸化 β_1 AR的C末端,从而使 β_1 受体也能够通过 β 脚手架蛋白1(β -arrestin 1)募集PDE4,将原本广域的 β_1 AR-cAMP信号阻隔于纳米尺度的膜下微区^[29],阻止了 β_1 AR对肌质网RyR和SERCA的调控(图3B)。这种现象称为越界阻隔(offside compartmentalization)。血液中存在一定水平的肾上腺素和去甲肾上腺素等儿茶酚胺物质。由于 β_2 AR对肾上腺素相对敏感,肾上腺素对 β_2 AR的激活作用可使 β_1 AR信号通路处于相对抑制的常态,有利于防止血液中的儿茶酚胺激活 β_1 AR产生自由基、细胞凋亡等毒性作用。当交感神经兴奋时,交感递质对 β_1 AR的压倒性激活则可突破 β_2 AR带来的信号阻隔。 β_2 AR对 β_1 AR的越界阻隔效应为不同应激状态下交感神经对横管LCC与肌质网RyR之间的钙致钙释放调控提供了差异信号。

4 心衰和冬眠对钙致钙释放效率的相反调控

与交感神经调控下心肌细胞钙瞬变增快、增强相反,心力衰竭(简称心衰)病理条件下心肌细胞钙瞬变变弱、变慢。心衰是心脏收缩或舒张功能障碍导致射血能力不足或心室充盈异常的临床综合征。心衰是多种心血管疾病发展的终末阶段,也是心脏病患者的主要死亡因素之一^[33,34]。心衰的发展是一个渐变过程。当心肌梗死、心肌病、血液动力学负荷过重、炎症或遗传因素引起心肌受损时,心肌细胞数目减少或收缩能力下降,但心肌细胞有可能通过增加自身体积代偿其功能不足,这便是代偿期心肌肥厚阶段^[35]。当诱发因素持续存在时,进一步引起心肌细胞死亡,导致心室壁变薄,心脏收缩力进行性下降,继而进入心功能的去代偿阶段,并最终因泵血能力不足威胁生命^[36]。导致心衰病理条件下泵血能力低下的原因有很多,如

冠脉梗阻后心肌细胞死亡使肌肉组织减少、组织纤维化使心脏收缩阻力增加等,但心肌细胞钙瞬变变弱使心肌细胞自身收缩力下降是独立于这些因素之外的另一关键原因。

心肌细胞钙瞬变变弱需要从钙致钙释放各环节上找原因。因心衰原因不同或模型而异,LCC的钙内流有增加、减小和不变报道。但即使在LCC钙内流不变的心衰模型中,兴奋收缩耦联期间的钙释放也显著下降^[37]。本实验室^[38]在分析LCC触发肌质网钙释放分子过程后发现,单个LCC产生的钙火花触发肌质网RyR产生钙火花的概率显著下降、时间显著延长。与此相一致,几乎在所有测试过的心衰病人或动物模型中,心衰细胞横管系统发生结构重塑,表现为沿着肌小节Z线的横向成分显著减少,而沿着细胞长轴的纵向成分增多^[39-43],使很多RyR失去LCC的控制^[44]。本实验室^[45]的超微结构分析发现,心衰细胞中横管-肌质网耦联子的数量显著减少、单个耦联子的耦联面积显著减小。这些结构变化会引起LCC-RyR之间的钙致钙释放要么在某些位点缺失,要么触发时间延长,从而造成钙火花空间上分布不均、时间上去同步化,最终导致钙瞬变幅度和细胞收缩力下降。

值得注意的是,LCC-RyR分子间钙致钙释放效率的下降不仅发生在心衰阶段,也出现在心衰前的代偿期。在代偿期心肌肥厚阶段,当心脏和细胞收缩都正常时,LCC-RyR钙信号转导效率已经下降。Xu等人^[38]由此提出“稳定余量(stability margin)”理论。实验事实和数学模型均证明,稳定余量的存在是钙致钙释放系统保持功能稳态的前提。在代偿期心肌肥厚阶段,横管LCC与肌质网RyR之间的分子耦联效率降低在一定范围内先是消耗稳定余量,不会引起细胞和整体功能的变化;当稳定余量最终被耗竭后,分子间耦联效率的进行性下降才表现为细胞钙信号和心脏收缩功能的不断恶化,这便是去代偿的心衰阶段。这一理论解释了心肌肥厚到心衰的病理演变规律,也提示了心力衰竭早期诊断的必要性和可能思路。

与心衰下调钙致钙释放效率导致心脏收缩力下降相反,本实验室^[46]最近发现,冬眠动物可上调心肌细胞钙致钙释放效率,从而保证冬眠时强有力的泵血能力,以应对血液黏度在低温下大幅上升的情况。冬眠是多种小型哺乳类、鸟类动物适应寒冷缺食的冬季演化产生的节能行为。例如,黄鼠可以像人一样保持37℃

左右的恒定体温,但在冬季可以将体温降低到环境温度附近,甚至0℃以下^[47]。一般哺乳动物的心脏在25~15℃发生细胞钙超载(calcium overload),导致严重心律失常、舒张障碍,并逐渐丧失收缩能力。冬眠动物避免心肌细胞在深低体温下出现钙超载的适应性调节之一就是减少LCC的表达,从而减少从LCC流入细胞的钙离子^[48]。

从钙致钙释放原理来看,LCC钙内流的减少将直接导致钙释放的减少。然而,本实验室^[46]发现,冬眠态黄鼠的心脏比清醒态黄鼠的心脏即使在相同实验温度下仍具有更强的收缩力。这种钙致钙释放效率的增高在微观层面表现为细胞膜LCC触发肌质网RyR的时间显著缩短。超微结构分析显示,冬眠状态下,心肌细胞中肌质网体积密度上调^[49]、横管-肌质网耦联子的数量增多、单个耦联子的耦联面积增加。这些结构变化改善了钙火花在空间上的均一性、时间上的同步性,因而即使在LCC钙内流减少的情况下仍保持较强的钙瞬变幅度和细胞收缩力^[46]。

冬眠动物提高钙致钙释放效率的能力正是心衰竭研究领域追求的目标。因此,研究冬眠动物LCC-RyR信号转导调控原理不仅是对冬眠适应机制的解释,还将为医学上防治心衰提供思路。

5 横管与肌质网耦联结构的分子调控

在哺乳动物的心肌细胞中,横管系统以及横管与肌质网互作结构是随着心肌细胞发育逐步形成的^[50-52]。大鼠和小鼠出生后2周是其心肌细胞横管-肌质网耦联形成的关键时期^[53]。多种分子在横管-肌质网耦联结构的发育、维持、病变中发挥关键作用。

BIN1是一类具有香蕉形曲率的蛋白质分子。BIN1在不同种类的细胞中存在多种不同的剪切变体,部分剪切变体与管状膜结构的形成密切相关。BIN1敲除导致骨骼肌细胞横管缺失,动物出生后因呼吸功能低下而死亡,因此BIN1被认为与骨骼肌横管形成有关^[54]。BIN1基因的突变以及可变剪切体的变化与退行性肌萎缩密切相关^[55-57]。在心肌细胞,BIN1能够将微管锚定在横管膜上,促进多种离子通道在横管的运输和定位^[58,59]。在研究BIN1与心肌细胞横管形成的关系时,本实验室^[60]从心肌细胞中克隆出6种剪切变体,包括两种含有磷酸肌醇结合域(外显子11)且原先被认为只

在骨骼肌中表达的pBIN1,两种含有外显子13且只在心肌细胞表达的cBIN1,以及两种不包含外显子11和13但在多种细胞广泛存在的uBIN1。实验观察到,pBIN1的表达产物会诱导新生鼠心肌细胞产生大量杂乱无章的管状膜结构。相反,缺少磷酸肌醇结合域的uBIN1表达于心肌细胞Z盘结构,但不能形成管状结构^[60]。为了弄清不同BIN1剪切体的分子性质,在硅芯片上设计了具有不同曲率的条状纳米结构,并在其上培养表达不同BIN1剪切体的细胞。结果表明,pBIN1富集于高曲率的纳米条两端,而uBIN1弥散于细胞质。惊奇的是当两类剪切体共表达时,uBIN1被pBIN1募集到纳米条高曲率的两端,而uBIN也能将pBIN1形成的管状膜结构铆定到心肌细胞的Z盘(图4)。因此,本实验室提出了横管膜形态发生和定位的comboBIN1理论:pBIN1通过与磷酸肌醇的结合组织细胞膜泡形成横管膜,并通过与uBIN的嵌合由uBIN1的SH3结构域铆定于Z盘,形成与肌质网的结构耦联。两种BIN1剪切体通过功能互补的结构互作形成心肌细胞整齐排列的横管膜结构^[60]。

CAV3(caveolin-3)是与胞膜窖形成相关的膜蛋白,是另一个在横管形态发生和维持中可能发挥作用的分子。胞膜窖是细胞膜内陷形成的直径为50~100 nm的烧瓶状结构^[61,62],富含胆固醇和鞘磷脂。心肌细胞的胞膜窖上分布有LCC等多种钠、钾、钙离子通道^[63,64]以及 β_2 AR等膜受体^[65]。CAV3还与junctophilin相互作用参与横管-肌质网耦联子的形成^[66](图4)。

Junctophilin是一类定位于肌质网或内质网但又与细胞膜或横管膜相联系的蛋白^[67]。现已发现JPH1, JPH2, JPH3, JPH4共4个junctophilin基因,它们的表达有组织特异性。其中,骨骼肌主要表达JPH1,心肌只表达JPH2,脑组织中表达JPH3和JPH4^[66,68]。不同亚型junctophilin蛋白均包含MORN(membrane occupation recognition nexus)结构基序、MORN结构基序间的连接域、 α 螺旋结构域、可变区域以及位于肌质网或内质网的跨膜结构域^[69]。其中MORN结构基序高度保守,对细胞膜、横管膜的磷脂有亲和力,并与CAV3有相互作用,使junctophilin具有横管膜-肌质网膜结构耦联的作用。 α 螺旋结构域大约由70~100个氨基酸组成,形成10~15 nm的空间跨度,可能与横管膜与肌质网膜之间的距离有关。

JPH2作为心肌中唯一表达的junctophilin亚型,在

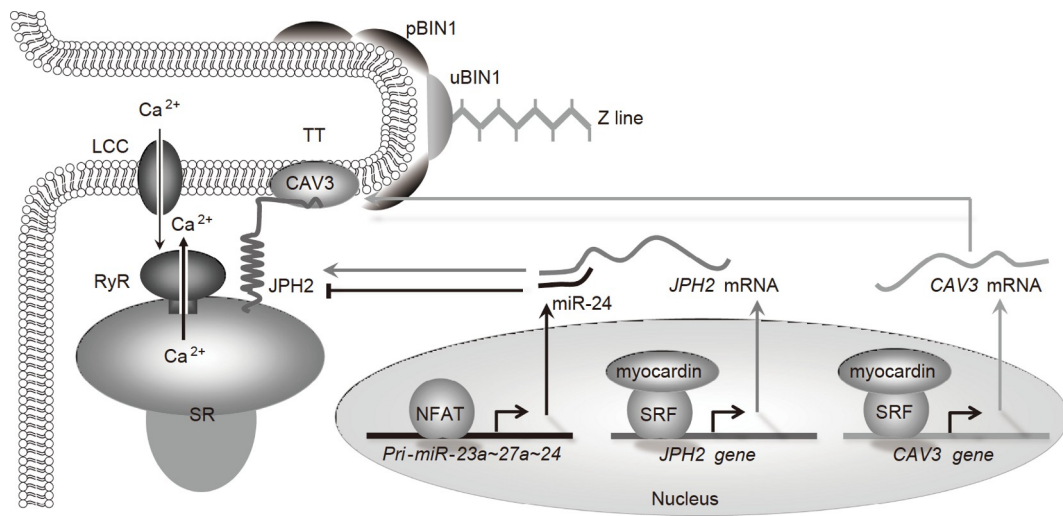


图 4 横管形态及横管-肌质网耦联结构的多种分子调控机制

Figure 4 Molecular mechanisms that regulate TT morphology and TT-SR couplon.

心肌细胞横管与肌质网耦联结构维持中担当着重要角色。小鼠心肌细胞的横管在出生后第10天左右开始显著增加,到出生后20天横管密度与成年小鼠接近。与此相吻合,JPH2蛋白表达量在出生后第14天左右达到顶峰,之后基本恒定^[70,71]。在小鼠心脏特异性敲低JPH2明显抑制横管的发育。相反,过表达JPH2的小鼠心脏横管密度在出生后8天显著高于野生型小鼠^[72]。在成年心肌细胞中敲减JPH2,导致横管密度下降的同时,横管-肌质网耦联子的数量和大小都显著下降,同时钙致钙释放效率和钙瞬变幅度均显著下降^[45]。这些事实这说明,JPH2对心肌细胞横管-肌质网耦联结构及钙致钙释放功能具有决定性影响。

JPH2的表达和突变与心脏收缩疾病密切相关。在多种心肌肥厚和心衰模型以及心衰病人的样品中,JPH2的表达显著下降^[38,43,66,73~75]。在小鼠中特异性敲减JPH2导致心肌细胞横管减少、与肌质网耦联结构缺失,出现左心室扩张、心肌收缩幅度和射血分数下降等心衰症状^[72,76]。过表达JPH2的小鼠虽然正常心脏功能不变,但在同等的压力负荷模型中更不容易发生心衰^[77]。

病理因素导致的JPH2下调有多种机制。在翻译后调控方面,心肌细胞钙超载会激活calpain,而calpain可在特异性酶切位点切割JPH2^[73,78,79]。有趣的是,JPH2被切下的N端序列具有入核信号,进入细胞核后可以调控众多基因转录^[80]。在转录后调控方面,本实

验室^[81]发现,JPH2的3'非翻译区有两个保守的miR24结合位点。心衰病理过程中miR24表达量显著升高,能够显著下调JPH2 mRNA和蛋白表达(图4)。紧接着,本实验室^[82]设计能通过注射导入细胞的核酸药物antagoMiR抑制miR24,发现antagoMiR虽然不能防止压力负荷导致的心肌肥厚,但能有效地避免钙致钙释放耦联效率的下降,阻止了代偿性心肌肥厚向心衰的转变。

与心衰细胞中JPH2表达下降相反,冬眠动物冬眠时心肌细胞JPH2表达上升,与JPH2相互作用的CAV3也有所上调。为了寻找JPH2表达上调的机制,本实验室^[46]研究了JPH2的转录调控系统,发现JPH2启动子存在类CArG Box并结合SRF-myocardin转录因子复合体(图4)。有趣的是,CAV3启动子也存在类CArG Box并结合SRF-myocardin转录因子复合体(图4)。这一“协奏转录(concerted transcription)”新原理为保证互作蛋白的化学配比(stoichiometry)提供了优化方案。冬眠状态下,myocardin表达增加,同时上调JPH2和CAV3,从而使横管与肌质网耦联距离缩短、耦联面积增加,提高了LCC-RyR间钙致钙释放效率^[46],从而在LCC钙内流减少的情况下保证了心脏的收缩力。这个myocardin-JPH2调控轴机制虽然是通过冬眠动物发现的,却是心肌细胞横管-肌质网结构和功能耦联调控的普适性关键机制。因此,是否可以通过这一机制改善心衰等病理条件下的心脏收缩功能值得进一步探索。

6 总结

细胞膜或横管膜与肌质网之间的耦联是心肌细胞钙信号产生、放大并决定其收缩力的结构基础。参与形成这一耦联的JPH2等关键分子的表达调控决定着

心脏泵血功能的健康和疾病状态。尽管LCC与RyR之间的钙致钙释放已经发现了近半个世纪, 但钙离子如何通过RyR与其他分子的协作快速释放, 又如何能防止钙致钙释放的正反馈自激, 维持稳定、可控的心脏功能, 仍是这个领域需要致力攻克的难题。

参考文献

- 1 Bers D M. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. Dordrecht: Springer, 2001
- 2 Hong T T, Shaw R M. Cardiac T-tubule microanatomy and function. *Physiol Rev*, 2017, 97: 227–252
- 3 Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V. Shape, size, and distribution of Ca^{2+} release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys J*, 1999, 77: 1528–1539
- 4 Lu F, Pu W T. The architecture and function of cardiac dyads. *Biophys Rev*, 2020, 12: 1007–1017
- 5 Stern M D, Pizarro G, Ríos E. Local control model of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Gen Physiol*, 1997, 110: 415–440
- 6 Hernández-Ochoa E O, Olojo R O, Rebbeck R T, et al. $\beta 1\text{a}490\text{--}508$, a 19-residue peptide from C-terminal tail of Cav1.1 $\beta 1\text{a}$ subunit, potentiates voltage-dependent calcium release in adult skeletal muscle fibers. *Biophys J*, 2014, 106: 535–547
- 7 Fabiato A, Fabiato F. Dependence of the contractile activation of skinned cardiac cells on the sarcomere length. *Nature*, 1975, 256: 54–56
- 8 Berridge M J, Bootman M D, Roderick H L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 517–529
- 9 Wei C, Wang X, Chen M, et al. Calcium flickers steer cell migration. *Nature*, 2009, 457: 901–905
- 10 Wang T, Zhou C, Tang A, et al. Cellular mechanism for spontaneous calcium oscillations in astrocytes. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27: 861–868
- 11 Stern M D. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J*, 1992, 63: 497–517
- 12 Cheng H, Lederer W J, Cannell M B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 1993, 262: 740–744
- 13 Minta A, Kao J P Y, Tsien R Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem*, 1989, 264: 8171–8178
- 14 López-López J R, Shacklock P S, Balke C W, et al. Local, stochastic release of Ca^{2+} in voltage-clamped rat heart cells: visualization with confocal microscopy. *J Physiol*, 1994, 480: 21–29
- 15 Cannell M B, Cheng H, Lederer W J. Spatial non-uniformities in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Biophys J*, 1994, 67: 1942–1956
- 16 Walker M A, Williams G S B, Kohl T, et al. Superresolution modeling of calcium release in the heart. *Biophys J*, 2014, 107: 3018–3029
- 17 Wang S Q, Song L S, Lakatta E G, et al. Ca^{2+} signalling between single L-type Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in heart cells. *Nature*, 2001, 410: 592–596
- 18 Wang S Q, Stern M D, Ríos E, et al. The quantal nature of Ca^{2+} sparks and *in situ* operation of the ryanodine receptor array in cardiac cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 3979–3984
- 19 DelPrincipe F, Egger M, Niggli E. Calcium signalling in cardiac muscle: refractoriness revealed by coherent activation. *Nat Cell Biol*, 1999, 1: 323–329
- 20 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. *Circ Res*, 2001, 88: 794–801
- 21 Kushnir A, Betzenhauser M J, Marks A R. Ryanodine receptor studies using genetically engineered mice. *FEBS Lett*, 2010, 584: 1956–1965
- 22 Xiao B, Sutherland C, Walsh M P, et al. Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca^{2+} -release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ Res*, 2004, 94: 487–495

- 23 Marx S O, Reiken S, Hisamatsu Y, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor). *Cell*, 2000, 101: 365–376
- 24 Zhao Y T, Guo Y B, Gu L, et al. Sensitized signalling between L-type Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in the absence or inhibition of FKBP12.6 in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 2017, 113: 332–342
- 25 Zhou P, Zhao Y T, Guo Y B, et al. β -Adrenergic signaling accelerates and synchronizes cardiac ryanodine receptor response to a single L-type Ca^{2+} channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 18028–18033
- 26 Kuschel M, Zhou Y Y, Spurgeon H A, et al. β_2 -Adrenergic cAMP signaling is uncoupled from phosphorylation of cytoplasmic proteins in canine heart. *Circulation*, 1999, 99: 2458–2465
- 27 Kuschel M, Zhou Y Y, Cheng H, et al. Gi protein-mediated functional compartmentalization of cardiac β_2 -adrenergic signaling. *J Biol Chem*, 1999, 274: 22048–22052
- 28 Yang H Q, Zhou P, Wang L P, et al. Compartmentalized β_1 -adrenergic signalling synchronizes excitation-contraction coupling without modulating individual Ca^{2+} sparks in healthy and hypertrophied cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 2020, 116: 2069–2080
- 29 Yang H Q, Wang L P, Gong Y Y, et al. β_2 -Adrenergic stimulation compartmentalizes β_1 signaling into nanoscale local domains by targeting the C-terminus of β_1 -adrenoceptors. *Circ Res*, 2019, 124: 1350–1359
- 30 Vangheluwe P, Louch W E, Ver Heyen M, et al. Ca^{2+} transport ATPase isoforms SERCA2a and SERCA2b are targeted to the same sites in the murine heart. *Cell Calcium*, 2003, 34: 457–464
- 31 Dally S, Corvazier E, Bredoux R, et al. Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA₂ and SERCA₃ isoforms in nonfailing and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48: 633–644
- 32 Peng W, Shen H, Wu J, et al. Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2. *Science*, 2016, 354: aah5324
- 33 Braunwald E, Bristow M R. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation*, 2000, 102: IV14–23
- 34 Hunter J J, Chien K R. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*, 1999, 341: 1276–1283
- 35 Mann D L, Bristow M R. Mechanisms and models in heart failure. *Circulation*, 2005, 111: 2837–2849
- 36 Diwan A, Dorn Li G W. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology*, 2007, 22: 56–64
- 37 Gómez A M, Valdivia H H, Cheng H, et al. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science*, 1997, 276: 800–806
- 38 Xu M, Zhou P, Xu S M, et al. Intermolecular failure of L-type Ca^{2+} channel and ryanodine receptor signaling in hypertrophy. *PLoS Biol*, 2007, 5: e21
- 39 Anversa P, Vitali-Mazza L, Visioliet O, et al. Experimental cardiac hypertrophy: a quantitative ultrastructural study in the compensatory stage. *J Mol Cell Cardiol*, 1971, 3: 213–218
- 40 Maron B J, Ferrans V J, Roberts W C. Ultrastructural features of degenerated cardiac muscle cells in patients with cardiac hypertrophy. *Am J Pathol*, 1975, 79: 387–434
- 41 He J, Conklin M W, Foell J D, et al. Reduction in density of transverse tubules and L-type Ca^{2+} channels in canine tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res*, 2001, 49: 298–307
- 42 Lyon A R, MacLeod K T, Zhang Y, et al. Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 6854–6859
- 43 Wei S, Guo A, Chen B, et al. T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure. *Circ Res*, 2010, 107: 520–531
- 44 Song L S, Sobie E A, McCulle S, et al. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 4305–4310
- 45 Wu H D, Xu M, Li R C, et al. Ultrastructural remodelling of Ca^{2+} signalling apparatus in failing heart cells. *Cardiovasc Res*, 2012, 95: 430–438
- 46 Yang L, Li R C, Xiang B, et al. Transcriptional regulation of intermolecular Ca^{2+} signaling in hibernating ground squirrel cardiomyocytes: the myocardin-junctophilin axis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2025333118
- 47 Barnes B M. Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0°C in an Arctic hibernator. *Science*, 1989, 244: 1593–1595
- 48 Wang S Q, Lakatta E G, Cheng H, et al. Adaptive mechanisms of intracellular calcium homeostasis in mammalian hibernators. *J Exp Biol*, 2002,

205: 2957–2962

- 49 Tang Y J, Wang S Q, Zhou Z Q. Seasonal variation in the ultrastructure and calcium uptake rate of cardiac sarcoplasmic reticulum in ground squirrel (in Chinese). *Acta Physiol Sin*, 1995, 47: 478–484 [唐亚骏, 王世强, 周曾铨. 黄鼠心肌肌质网超微结构及摄钙速率的季节性变化. *生理学报*, 1995, 47: 478–484]
- 50 Hoerter J. Perinatal growth of the rabbit cardiac cell: possible implications for the mechanism of relaxation. *J Mol Cell Cardiol*, 1981, 13: 725–740
- 51 Haddock P S, Coetzee W A, Cho E, et al. Subcellular $[Ca^{2+}]_i$ gradients during excitation-contraction coupling in newborn rabbit ventricular myocytes. *Circ Res*, 1999, 85: 415–427
- 52 Seki S, Nagashima M, Yamada Y, et al. Fetal and postnatal development of Ca^{2+} transients and Ca^{2+} sparks in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 2003, 58: 535–548
- 53 Di Maio A, Karko K, Snopko R M, et al. T-tubule formation in cardiacmyocytes: two possible mechanisms? *J Muscle Res Cell Motil*, 2007, 28: 231–241
- 54 Lee E, Marcucci M, Daniell L, et al. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science*, 2002, 297: 1193–1196
- 55 Toussaint A, Nicot A S, Mandel J L, et al. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Med Sci (Paris)*, 2007, 23: 1080–1082
- 56 Nicot A S, Toussaint A, Tosch V, et al. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet*, 2007, 39: 1134–1139
- 57 Böhm J, Vasli N, Maurer M, et al. Altered splicing of the BIN1 muscle-specific exon in humans and dogs with highly progressive centronuclear myopathy. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003430
- 58 Hong T T, Smyth J W, Gao D, et al. BIN1 localizes the L-type calcium channel to cardiac T-tubules. *PLoS Biol*, 2010, 8: e1000312
- 59 Hong T T, Smyth J W, Chu K Y, et al. BIN1 is reduced and Cav1.2 trafficking is impaired in human failing cardiomyocytes. *Heart Rhythm*, 2012, 9: 812–820
- 60 Li L L, Guo Q J, Lou H Y, et al. Nanobar array assay revealed complementary roles of BIN1 splice isoforms in cardiac T-tubule morphogenesis. *Nano Lett*, 2020, 20: 6387–6395
- 61 Bender F, Montoya M, Monardes V, et al. Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease: identification of downstream targets for the tumor suppressor protein caveolin-1. *Biol Res*, 2002, 35: 151
- 62 Lisanti M P, Scherer P E, Tang Z L, et al. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol*, 1994, 4: 231–235
- 63 Parton R G, Way M, Zorzi N, et al. Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol*, 1997, 136: 137–154
- 64 Balijepalli R C, Kamp T J. Caveolae, ion channels and cardiac arrhythmias. *Prog Biophys Mol Biol*, 2008, 98: 149–160
- 65 Wright P T, Nikolaev V O, O'Hara T, et al. Caveolin-3 regulates compartmentation of cardiomyocyte beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 67: 38–48
- 66 Minamisawa S, Oshikawa J, Takeshima H, et al. Junctophilin type 2 is associated with caveolin-3 and is down-regulated in the hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325: 852–856
- 67 Takeshima H, Komazaki S, Nishi M, et al. Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol Cell*, 2000, 6: 11–22
- 68 Ito K, Komazaki S, Sasamoto K, et al. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J Cell Biol*, 2001, 154: 1059–1068
- 69 Garbino A, Wehrens X H T. Emerging role of junctophilin-2 as a regulator of calcium handling in the heart. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31: 1019–1021
- 70 Chen B, Guo A, Zhang C, et al. Critical roles of junctophilin-2 in T-tubule and excitation-contraction coupling maturation during postnatal development. *Cardiovasc Res*, 2013, 100: 54–62

- 71 Han J, Wu H D, Wang Q W, et al. Morphogenesis of T-tubules in heart cells: the role of junctophilin-2 (in Chinese). *Sci China Life Sci*, 2013, 56: 647–652 [韩晶, 吴昊迪, 王其伟, 等. 心肌细胞横管的形态发生: Junctophilin-2的作用. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 738–744]
- 72 Reynolds J O, Chiang D Y, Wang W, et al. Junctophilin-2 is necessary for T-tubule maturation during mouse heart development. *Cardiovasc Res*, 2013, 100: 44–53
- 73 Murphy R M, Dutka T L, Horvath D, et al. Ca^{2+} -dependent proteolysis of junctophilin-1 and junctophilin-2 in skeletal and cardiac muscle. *J Physiol*, 2013, 591: 719–729
- 74 Landstrom A P, Kellen C A, Dixit S S, et al. Junctophilin-2 expression silencing causes cardiocyte hypertrophy and abnormal intracellular calcium-handling. *Circ Heart Fail*, 2011, 4: 214–223
- 75 Zhang H B, Li R C, Xu M, et al. Ultrastructural uncoupling between T-tubules and sarcoplasmic reticulum in human heart failure. *Cardiovasc Res*, 2013, 98: 269–276
- 76 van Oort R J, Garbino A, Wang W, et al. Disrupted junctional membrane complexes and hyperactive ryanodine receptors after acute junctophilin knockdown in mice. *Circulation*, 2011, 123: 979–988
- 77 Guo A, Zhang X, Iyer V R, et al. Overexpression of junctophilin-2 does not enhance baseline function but attenuates heart failure development after cardiac stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 12240–12245
- 78 Wu C Y C, Chen B, Jiang Y P, et al. Calpain-dependent cleavage of junctophilin-2 and T-tubule remodeling in a mouse model of reversible heart failure. *J Am Heart Assoc*, 2014, 3
- 79 Guo A, Hall D, Zhang C, et al. Molecular determinants of calpain-dependent cleavage of Junctophilin-2 protein in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 2015, 290: 17946–17955
- 80 Guo A, Wang Y, Chen B, et al. E-C coupling structural protein junctophilin-2 encodes a stress-adaptive transcription regulator. *Science*, 2018, 362: eaan3303
- 81 Xu M, Wu H D, Li R C, et al. Mir-24 regulates junctophilin-2 expression in cardiomyocytes. *Circ Res*, 2012, 111: 837–841
- 82 Li R C, Tao J, Guo Y B, et al. *In vivo* suppression of microRNA-24 prevents the transition toward decompensated hypertrophy in aortic-constricted mice. *Circ Res*, 2013, 112: 601–605

Couplons between transverse tubules and sarcoplasmic reticulum: roles in calcium signaling

XING Xin, LIANG JingHui & WANG ShiQiang

State Key Laboratory of Membrane Biology, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

In cardiomyocytes, the excitation signal propagates along transverse tubules (TTs) and excites L-type calcium channels (LCCs), which in turn activate ryanodine receptor (RyR) calcium release from the sarcoplasmic reticulum (SR) *via* the calcium-induced calcium release (CICR) mechanism. This process induces calcium sparks, which sum up into a calcium transient that drives synchronized heart cell contraction. The global signaling of β_1 adrenergic receptors, by phosphorylating LCCs, RyRs and phospholamban, up-regulates calcium influx, release and uptake, and enhances blood pumping power. In contrast, β_2 adrenoceptors mediate local cAMP signaling that phosphorylates LCCs, but keep β_1 receptors from regulating calcium release/uptake via an “offside compartmentalization” mechanism mediated by G-protein coupled receptor kinase. During heart failure, the down-regulation of junctophilin-2 (JPH2) uncouples TTs and SRs, leading to compromised blood pumping power. During hibernation, however, the concerted up-regulation of JPH2 and caveolin-3 tightens TT-SR coupons, and enhances myocardial pumping capacity. Further exploration of the molecular mechanisms that regulate the CICR between LCCs and RyRs will provide new ideas for treating heart diseases.

transverse tubule, sarcoplasmic reticulum, calcium signaling, β adrenergic receptor, heart failure, hibernation

doi: [10.1360/SSV-2021-0249](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0249)