



论文

胞内高钙诱发豚鼠心室肌细胞电紊乱

范新荣^{①③}, 马季骅^{①*}, 万伟^①, 张培华^①, 王超^①, 吴林^②

① 武汉科技大学医学院心脏电生理研究室, 武汉 430081;

② Department of Biology, Gilead Sciences, Inc., Palo Alto, CA 94304, USA.

③ 武汉大学人民医院心血管内科, 武汉 430060

* 联系人, E-mail: mjhua@wust.edu.cn

收稿日期: 2010-12-13; 接受日期: 2010-12-21

国家自然科学基金(批准号: 30870912)和美国吉利德科学公司生命科学部资助项目

摘要 众多研究表明, 各种心肌病理状态及心律失常的发生都与细胞内钙离子($[Ca^{2+}]_i$)调控失衡及钙超载有着十分密切的关系. 为了进一步揭示细胞内急性钙超载对心室肌细胞电生理特性的影响, 通过调节 $[Ca^{2+}]_i$ (对照组为 65~100 nmol/L, 胞内高钙组为 1 μ mol/L)模拟胞内钙超载状态, 应用全细胞膜片钳技术记录细胞跨膜动作电位及各种离子电流变化, 探讨胞内高钙引发心肌细胞电活动紊乱机制. 结果表明, 胞内高钙显著缩短动作电位时程(APD), 减小动作电位幅值(APA)和最大除极速率(v_{max}), 降低静息膜电位(RMP), 并可引发迟发后除极(DADs)和触发激动; 胞内高钙呈时间依赖性地增大晚钠电流(I_{NaL})及快速延迟整流钾电流(I_{Kr}), 减小 L 型钙电流和内向整流钾电流(I_{K1}), 但对缓慢延迟整流钾电流(I_{Ks})无明显影响. 本研究表明, 胞内高钙可调节上述诸离子流活动导致细胞跨膜电位异常进而引发心室肌细胞电紊乱, 为钙超载所致室性心律失常的机制提供了理论依据.

关键词细胞内钙
心律失常
动作电位
离子流
心肌细胞

无机钙离子是生物体内最广泛而又最重要的信使物质之一, 参与细胞一系列生命活动的信息传递与调节, 在各种生理活动中起着十分重要的作用^[1]. 目前大量研究表明, 细胞内钙离子($[Ca^{2+}]_i$)调控失衡所致细胞内高浓度钙离子(简称胞内高钙), 即钙超载与许多心肌病理状态下发生的心律失常有着十分密切的关系, 如心肌缺血/再灌注损伤^[2]、心力衰竭^[3]、咖啡因^[4]与洋地黄中毒^[5]、高钙血症^[6]以及致心律失常性药物的使用^[7-9]. 此外, 氧自由基的增加也可导致细胞内钙超载及室性心律失常的发生^[10,11].

正常心肌细胞胞浆钙浓度在静息状态下大约为 1×10^{-7} mol/L, 而在去极后的 1~5 ms 可快速上升为 1×10^{-5} mol/L. 有文献报道, 在动物和人的心肌细胞

中, 细胞内钙超载与房性和室性心律失常的发生和维持密切相关, 其中包括致死性的室性心动过速和心室颤动^[7,11,12]. 钙离子介导心律失常的主要机制可能与其改变细胞膜离子流从而缩短动作电位时程(APD)及有效不应期(ERP), 进而易于形成折返活动等有关^[10,13].

目前, 通过建立各种病理模型来研究钙超载对各种膜电流的影响已有报道, 如提高细胞外钙浓度^[6]、增加细胞内钠浓度^[14]、建立心力衰竭^[15]或心肌缺血/再灌注模型^[2]以及使用咖啡因^[4]或洋地黄^[5]等药物诱导等. 另外, 还有一部分集中于依赖钙离子作为第二信使的细胞信号转导机制, 如 CaMK II^[15,16], Ras^[17], PKC^[18,19]等, 对各种通道电流影响的研究取得了实质

性的进展. 但这些模拟钙超载状态建立的病理模型在提高 $[Ca^{2+}]_i$ 时, 都伴随一系列细胞生理生化反应的发生, 而这些因素很可能干扰了钙超载对研究对象的其他作用效应, 导致所得的一些结论趋于矛盾. 通过上述研究很难确定这些跨膜电位及各种离子流的变化是由胞内高钙的直接作用还是细胞内的生理生化反应所致. 事实上, 目前用直接升高细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 建立钙超载模型的研究还很少.

单纯的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高可能调节心肌细胞膜离子流, 并与心律失常的产生有密切的关系. 因此, 应用全细胞膜片钳技术并通过调节电极内液中钙离子的浓度来改变 $[Ca^{2+}]_i$, 从而建立细胞内急性钙超载模型, 研究胞内高钙对各种膜电流与动作电位的影响, 及其对心律失常的评价. 选择 $1 \mu\text{mol/L}$ 的钙离子浓度为胞内高钙标准, 该浓度为心肌细胞静息状态下的 10 倍^[20].

1 材料与方法

1.1 心肌细胞的分离

成年健康豚鼠(*Cavia porcellus*), 体重 250~300 g, 由武汉科技大学实验动物中心提供. 先腹腔注射肝素 2000 U, 20 min 后用 20%氨基甲酸乙酯水溶液(1000 mg/kg)腹腔麻醉. 待麻醉成功后, 迅速打开胸腔, 取出心脏, 置于 37°C 无钙台式液中修剪后行主动脉逆行插管, 固定于 Langendorff 灌流装置上, 先用无钙台式液灌流冲洗残血, 然后改用含胶原酶 I 型 0.2 mg/mL 、小牛血清白蛋白(BSA) 0.5 mg/mL 的无钙台式液消化 30 min, 接着用 KB 液灌流 5 min 后取下心脏, 剪下心室肌, 在 KB 液里剪碎过滤, 剪取的单个细胞在 4°C 静置 1 h 后使用. 分离过程中, 灌流温度保持在 $36\sim 37^\circ\text{C}$, 灌流液用 O_2 饱和. 台式液(mmol/L): NaCl 135, KCl 5.4, MgCl_2 1, CaCl_2 1.8, NaHPO_4 0.33, HEPES 10, 葡萄糖 10, 用 NaOH 调 pH 至 7.4; 无钙台式液为台式液不加 CaCl_2 ; KB 液(mmol/L): KOH 70, KCl 40, MgCl_2 3, KH_2PO_4 20, EGTA 0.5, *L*-谷氨酸 50, 牛磺酸 20, HEPES 10, 葡萄糖 10, 用 KOH 调 pH 至 7.4. 实验操作符合湖北省实验动物管理条例.

1.2 全细胞膜片钳记录方法

采用全细胞膜片钳记录方法, 在电流钳模式下记录跨膜电位; 在电压钳模式下记录膜电流. 膜片钳放大器(EPC-10 USB, HEKA Electronic, German)与计

算机连接. 刺激信号及电压输入信号的采集均由软件(Master+FitMaster)控制. 取 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液加到灌流槽内, 静置 5 min 使细胞紧密贴壁, 在倒置显微镜下选择边缘整齐、表面无颗粒、横纹清楚、无收缩的细胞进行实验. 记录时封接电阻达到吉欧姆以上, 并将串联电阻补偿至 80%而不产生振荡. 漏电流及电容电流采用 P/4 方案减除. 信号频率为 10 kHz, 经四阶贝塞尔低通滤波器滤波至 1 kHz, 并储存在电脑硬盘中供分析使用. 所有实验均在室温($22\sim 24^\circ\text{C}$)下进行.

1.3 对照组与胞内高钙组的建立

利用全细胞膜片钳技术, 使电极内液与细胞内液相连通致离子平衡, 可以通过调节电极内液钙离子浓度达到快速钳制细胞内钙水平. 正常对照组, 电极内液加入 $0.65\sim 1 \text{ mmol/L}$ CaCl_2 及 $10\sim 11 \text{ mmol/L}$ EGTA, 经下述公式计算 $[Ca^{2+}]_i$ 为 $65\sim 100 \text{ nmol/L}$. 公式为 $[Ca^{2+}]_p = (1+k([EGTA]_p + [Ca^{2+}]_i) \times [Ca^{2+}]_i) / (1 + [Ca^{2+}]_i \times k)$, $[Ca^{2+}]_p$ 和 $[EGTA]_p$ 为加入电极内液中的钙离子和 EGTA 浓度, k 为钙离子和 EGTA 的结合常数. 急性胞内高钙组则在电极内液中加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 钙离子, 而不加入 EGTA^[21].

1.4 跨膜动作电位及各离子流的记录

测定动作电位(AP)的电极内液(mmol/L): KCl 120, CaCl_2 1, MgCl_2 5, Na_2ATP 5, EGTA 11, HEPES 10, 葡萄糖 10, 用 KOH 调 pH 至 7.3, 细胞外液为台式液. 在电流钳模式下, 给予 5 ms, 1 Hz, 1.5 倍阈强度的去极化电流, 诱导单个心室肌细胞的动作电位.

记录晚钠电流(I_{NaL})的电极内液(mmol/L): CsCl_2 120, CaCl_2 1, MgCl_2 5, Na_2ATP 5, TEACl 10, EGTA 11, HEPES 10, 用 CsOH 调 pH 至 7.3, 细胞外液(mmol/L): NaCl 135, CaCl_2 1, MgCl_2 2, CdCl_2 0.05, HEPES 10, 葡萄糖 10, 用 NaOH 调 pH 至 7.4. 在电压钳模式下将细胞钳制在 -120 mV , 一步去极化到 -30 mV , 持续时间为 2.5 s, $I_{\text{Na-P}}$ 的测量取测试脉冲 200~2500 ms 之间的平均值.

记录 *L* 型钙电流(I_{CaL})的电极内液(mmol/L): CsCl_2 80, CsOH 60, 天门冬氨酸 40, CaCl_2 0.65, HEPES 5, EGTA 10, MgATP 5, 磷酸肌酸二钠 5, 用 CsOH 调 pH 至 7.2. 细胞外液用台式液并加 $50 \mu\text{mol/L}$ TTX 阻断 I_{Na} ; 细胞保持电位为 -40 mV , 施予 200 ms、阶跃 10 mV , $-40 \text{ mV} \sim +60 \text{ mV}$ 的系列去极化脉冲, 频率 0.2 Hz , 取

10 mV 时 I_{CaL} 的电流值用于统计分析。

记录钾电流的电极内液(mmol/L): KOH 60, KCl 80, 天门冬氨酸 40, $CaCl_2$ 0.65, HEPES 5, EGTA 10, MgATP 5, 磷酸肌酸二钠 5, 用 KOH 调 pH 至 7.2, 记录内向整流钾电流(I_{K1})的细胞外液为台式液加 3 μ mol/L 尼索地平阻断 I_{Ca} , 记录延迟整流钾电流(I_K)的细胞外液为无钠无钾的 NMG 溶液(mmol/L): N-甲基-D-葡萄糖胺 149, $MgCl_2$ 5, $CaCl_2$ 0.9, HEPES 5, 用 HCl 调 pH 至 7.4, 并加 3 μ mol/L 尼索地平阻断 I_{Ca} . 加入 10 μ mol/L E-4031 阻断 I_{Kr} 可记录 I_{Ks} , 而加入 30 μ mol/L 色原烷醇 293B 阻断 I_{Ks} 可记录 I_{Kr} . 记录 I_{K1} 的刺激程序为保持电位-40 mV, 施以 300 ms, 阶跃 10 mV, -100 ~ -10 mV 的方波脉冲刺激, 得到一系列稳态电流, 在超极化时内向电流, 电流幅值较大, 去极化时该电流转变为外向电流, 呈现很强的内向整流特性, 并为 $BaCl_2$ 选择性阻滞, 该电流即为 I_{K1} . 记录 I_{K1} 时, 选择接近静息电位下测试脉冲为-80 mV 的电流密度作为数据. 而记录 I_K 的程序为保持电位为-50 mV, 采用从-40 ~ +40 mV, 阶跃 10 mV, 持续 1.5 s 的去极化脉冲记录 I_{K-step} , 脉冲再复极至-40 mV 时, 记录 I_{K-tail} , 该电流在 10 μ mol/L E-4031 和 30 μ mol/L 色原烷醇 293B 共同作用下可被完全阻断。

1.5 药品与试剂

胶原酶 I 购于 GIBCO 公司, BSA 购于 Roche 公司, $CsCl_2$, HEPES 购于 Amresco 公司, TEACl, Na_2ATP , MgATP, EGTA 购于 Sigma 公司, TTX 购于河北水产研究所, 其他试剂均为 Sigma 公司产品。

1.6 数据分析

所有数据用 FitMaster(v2x32, HEKA), SPSS13.0 进行统计分析, 使用 Origin(V7.0, OriginLab, MA, USA)作图. 为了消除细胞间误差, 使用电流密度, 即电流幅值除以细胞膜电容做为统计指标. 数据结果用 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 统计分析用 t 检验(t -test)和单因素方差分析(one-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为统计学有显著性差异。

2 结果

2.1 胞内高钙对心肌跨膜电位的影响

稳定记录心肌细胞跨膜电位 10 min, 对照组

($n=15$)AP 相关参数为: RMP (-80 ± 2.5) mV, APA (120 ± 8) mV, v_{max} (213 ± 22) V/s, APD₉₀ (317 ± 27) ms, APD₅₀ (270 ± 23) ms, APD₃₀ (202 ± 19) ms, 随记录时间无明显变化. 而胞内高钙组($n=11$)中, 从吸破细胞膜后 1 min 时记录的结果显示, RMP, APA 及 v_{max} 分别为 (-78 ± 1.5) mV, (116 ± 9) mV 和 (201 ± 18) V/s, RMP 减小 2.5% ($P < 0.05$). APD₉₀, APD₅₀, APD₃₀ 等也显著变化, 分别缩短 26%, 21% 和 9%. 到破膜后 5 min 时, 各参数均有显著性变化, RMP 降低 18%, APA 减小 18%, v_{max} 减小 17%, APD₉₀, APD₅₀ 和 APD₃₀ 分别缩短 68%, 72% 和 77%. 各参数在记录大约 5 min 左右后, 再无明显变化. 各组跨膜电位相关参数见表 1. 此外, 在同时给予刺激间隔为 100 ms, 刺激个数分别为 3, 5 或 10 个去极电流后, 胞内高钙组可记录到延迟后除极(DADs)($n=5$)和触发激动($n=3$)(图 1)。

2.2 胞内高钙对诸离子流作用的时程分析

对照组中, I_{NaL} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{Kr} 及 I_{Ks} 的电流密度分别为(-0.58 ± 0.05)($n=7$), (-10.85 ± 1.33)($n=7$), (-14.36 ± 0.62)($n=6$), (0.48 ± 0.03)($n=5$)及(1.26 ± 0.09) pA/pF($n=5$), 各参数随时间无明显变化(图 2, $P > 0.05$). 而胞内高钙组中, 在破膜后 5 min 内, I_{NaL} , I_{CaL} , I_{K1} , I_{Kr} 的电流密度随时间出现显著变化, 在 1-8 min, I_{CaL} 和 I_{K1} 逐渐减小, 而 I_{NaL} 与 I_{Kr} 持续增大, I_{Ks} 则无明显改变(图 2, $P < 0.05 \sim 0.01$).

2.3 胞内高钙对诸离子流的影响

胞内高钙使 I_{NaL} 的幅值从(-0.60 ± 0.06) pA/pF 增加到(-1.04 ± 0.08) pA/pF(图 3, $n=7$, $P < 0.01$), 而使用 2 μ mol/L TTX 可抑制该电流的增大, 使 I_{NaL} 减小到(-0.14 ± 0.02) pA/pF. 而胞内高钙却使 I_{CaL} 的幅值从

表 1 急性胞内高钙对豚鼠心室肌细胞跨膜电位各参数的影响^{a)}

参数时间 (min)	对照组($n=15$)		胞内高钙组($n=11$)	
	1	5	1	5
RMP(mV)	-80 ± 2.5	-80 ± 1.6	$-78 \pm 1.5^*$	$-67 \pm 3.5^{**\#}$
APA(mV)	120 ± 8	117 ± 11	116 ± 9	$98 \pm 5^{**\#}$
v_{max} (V/s)	213 ± 22	206 ± 27	201 ± 18	$176 \pm 15^{**\#}$
APD ₉₀ (ms)	317 ± 27	305 ± 33	$235 \pm 22^{**}$	$101 \pm 15^{**\#}$
APD ₅₀ (ms)	270 ± 23	266 ± 28	$212 \pm 21^{**}$	$73 \pm 14^{**\#}$
APD ₃₀ (ms)	202 ± 19	193 ± 26	$183 \pm 21^*$	$46 \pm 10^{**\#}$

a) 与对照组相比, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; 与胞内高钙组 1 min 时相比, #: $P < 0.01$

(-10.85 ± 1.33) pA/pF 减小到(-3.04 ± 0.29) pA/pF(图 4, $n=7$, $P<0.01$), 并使 I_{K1} 也从(-13.76 ± 0.58) pA/pF 减小到(-9.70 ± 0.18) pA/pF(图 5, $n=8$, $P<0.01$). 同时, 胞内高钙将 I_K 从(1.24 ± 0.09) pA/pF 增加到(2.03 ± 0.22) pA/pF(图 6, $n=10$, $P<0.01$), 其中 $I_{K\text{-step}}$ 与 $I_{K\text{-tail}}$ 分别从

(0.31 ± 0.02)和(0.52 ± 0.03) pA/pF 增加到(0.70 ± 0.04)及(1.19 ± 0.11) pA/pF(图 6, $n=7$, $P<0.01$), 而 I_{Ks} 却基本保持不变, 1 min 时 $I_{Ks\text{-step}}$ 与 $I_{Ks\text{-tail}}$ 为(2.72 ± 0.19)与(1.22 ± 0.09) pA/pF, 5 min 时仍为(2.61 ± 0.21)和(1.25 ± 0.08) pA/pF(图 6, $n=7$, $P>0.05$).

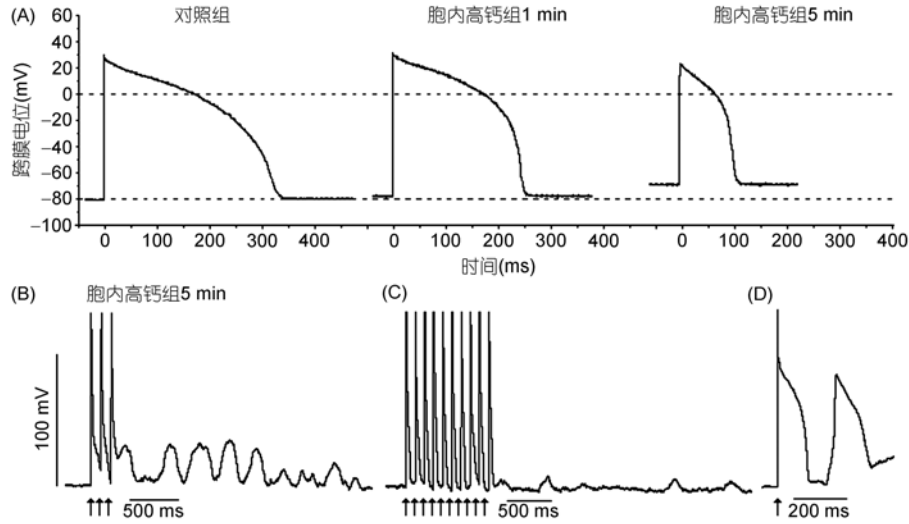


图 1 动作电位(AP)、迟发后除极(DAD)及触发激动(TA)的记录图形

(A) 对照组, 胞内高钙组 1 和 5 min 时 AP 图形; (B)~(D) 胞内高钙组记录到的 DADs 及 TA, 箭头为施加的刺激

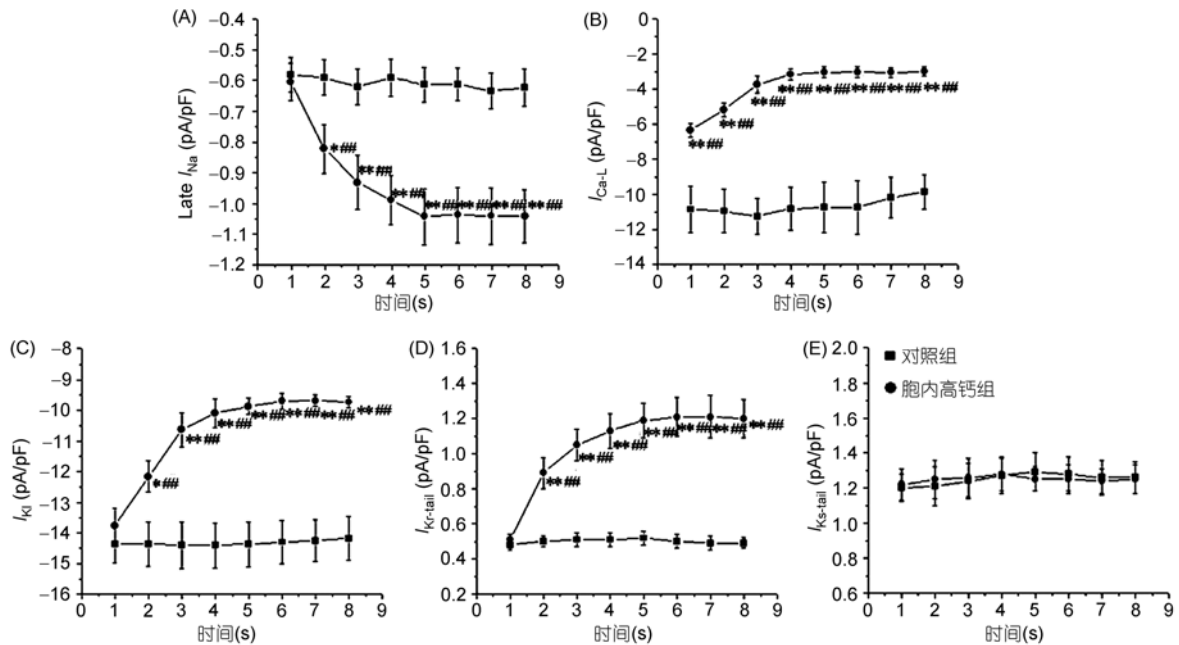


图 2 胞内高钙对晚钠电流(A)、L 型钙电流(B)、内向整流钾电流(C)、快速延迟整流钾电流(D)及缓慢延迟整流钾电流(E)作用的时程分析

与对照组相比, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; 与胞内高钙组 1 min 时相比较, #: $P<0.05$; ##: $P<0.01$

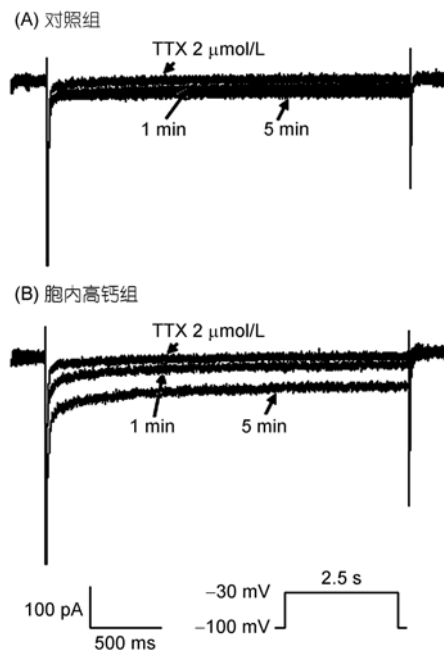


图3 对照组(A)与胞内高钙组(B)的 I_{NaL} 图形

3 讨论

上述研究发现, 胞内高钙可减小 RMP, APA 及 v_{max} , 并缩短 APD, 调控诸离子通道, 包括增大 I_{NaL} 及 I_{Kr} , 减小 I_{CaL} 和 I_{K1} 及促使心肌产生迟发后除极及触发激动. 因此, 细胞内钙稳态失衡, 即胞内高钙可调节细胞膜离子电流密度进而引起细胞电活动紊乱.

瞬时钠电流(I_{NaT})是心室肌细胞的主要除极电流, 是产生动作电位 0 期的重要成分. 最近有研究表明, 增加细胞内钙离子浓度可导致 I_{NaT} 减小, 主要是由于减小了钠通道的电导所致^[3]. 而本实验表明, 胞内高钙可减小 APA 与 v_{max} , 与上述研究结论一致. 此外, Maltsev 等人^[21]报道, 增加电极内液的钙离子浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$, 在正常及心力衰竭的心肌细胞中胞内高钙使钠电流的失活曲线右移, 可引起 I_{NaL} 的增大. 本实验中, 胞内高钙($1 \mu\text{mol/L}$)增大 I_{NaL} , 与他们的结果相一致.

Richard 等人^[22]发现, 肌浆网中的钙离子释放引

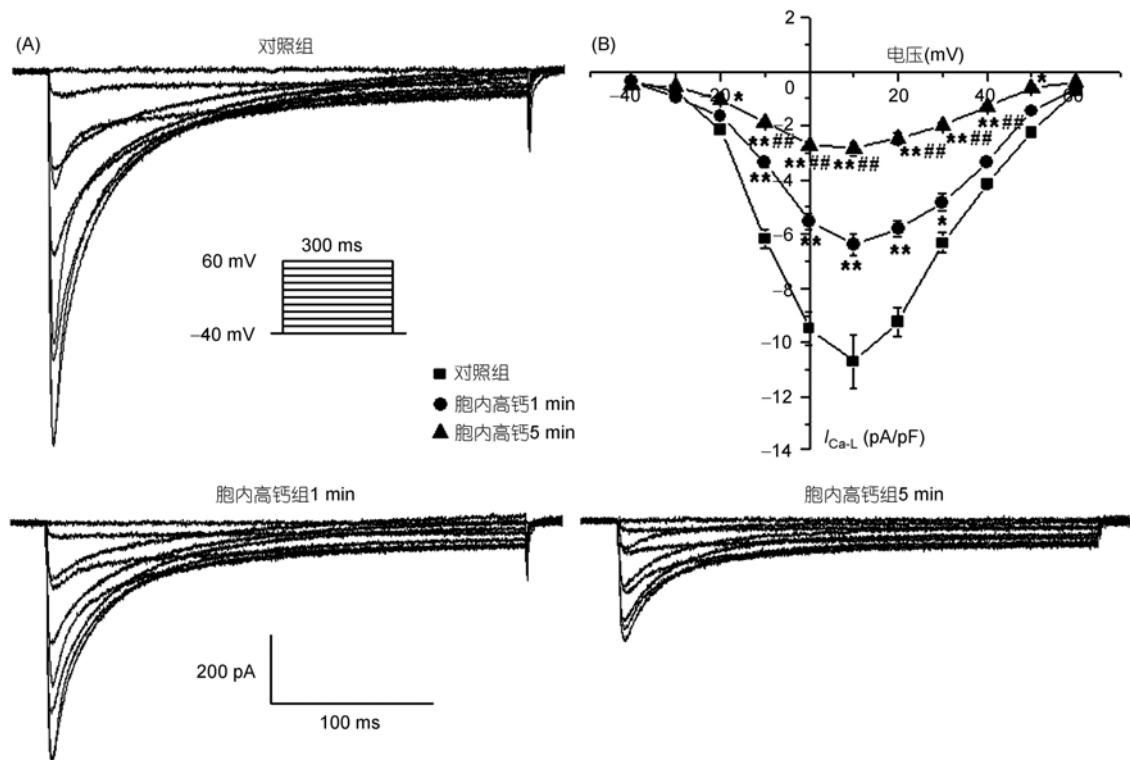


图4 记录 I_{CaL} 图形(A)及电流-电压关系曲线(B)

与对照组相比, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; 与胞内高钙组 1 min 时相比较, #: $P<0.05$; ##: $P<0.01$

起的胞内高钙可引起钙离子介导的钙通道失活, 进而减小钙电流. 该结果与本实验室所发现的在增加细胞内钙离子浓度 1 min 内, I_{CaL} 就显著减小的结果相符合. 同时, 胞内高钙却使 I_{Kr} 增大, 这两种电流

的改变加速了心室肌细胞复极从而导致动作电位时程缩短, 而胞内高钙减小 I_{K1} 则导致静息膜电位减小. 本研究显示, 这些离子流的变化引起了其心肌细胞动作电位及静息电位的异常. 此外, 文献报道, 发生

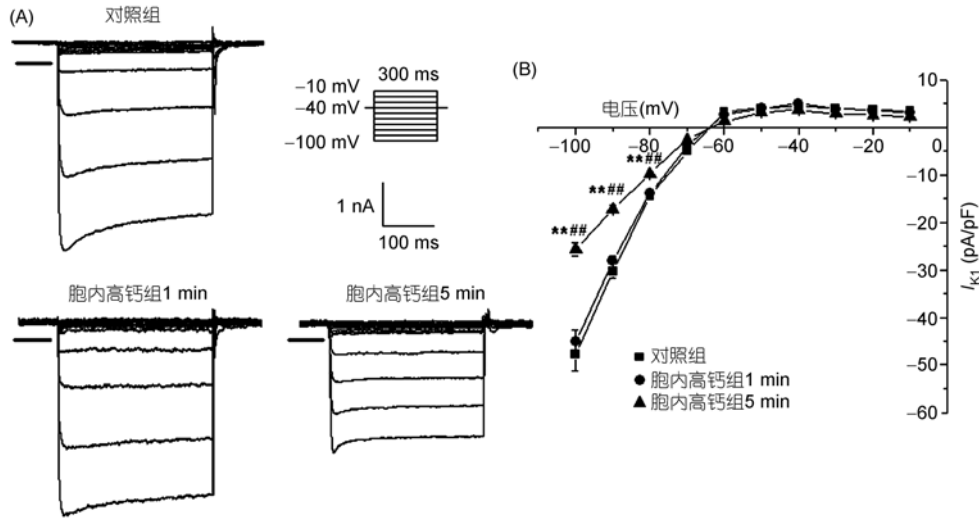


图 5 记录 I_{K1} 图形(A)及电流-电压关系曲线(B)

与对照组相比, **: $P < 0.01$; 与胞内高钙组 1 min 时相比较, ##: $P < 0.01$

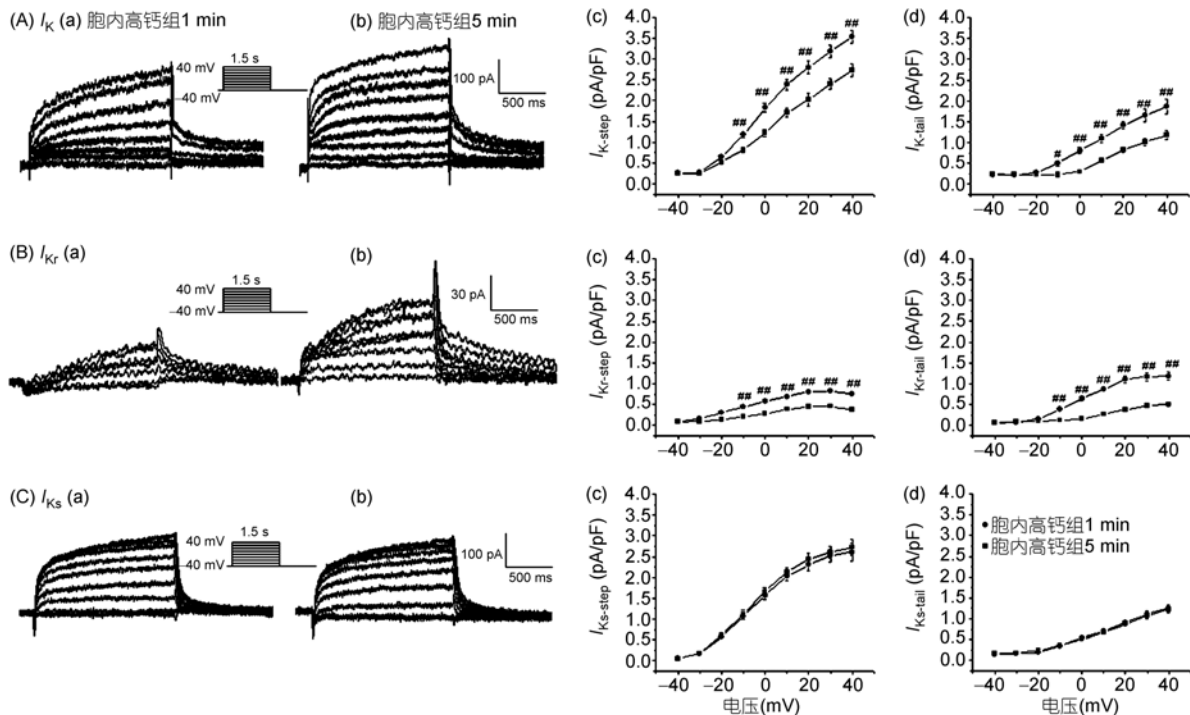


图 6 记录 I_K (A), I_{Kr} (B) 及 I_{Ks} (C) 图形及电流电压曲线

与胞内高钙组 1 min 时相比较, #: $P < 0.05$; ##: $P < 0.01$

钙超载等病理状态的心肌细胞可出现电活动异常, 如在心衰的心室肌细胞中, I_{CaL} 和 I_{K1} 的幅值显著减小^[23-25], 而增加胞内钙离子可呈浓度依赖性的增大 I_K ^[26,27]. 临床上, 洋地黄类中毒^[28]或钙通道突变致其功能缺失所引起继发性短 QT 综合征^[29]均与胞内高钙密切相关.

作为重要的第二信使, 细胞内钙离子可通过参与细胞内信号转导机制从而调节多种膜通道的基因表达及蛋白合成^[30]. 提高细胞内钙离子可激活钙/钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (CaMK II) 以及蛋白激酶 C(PKC)系统, 进而调节多种离子通道, 如钠通道, 钙通道及钾通道等^[16,18,31,32]. 如钙离子激活 CaMK II 与 PKC 可引起 *SCN5A* 基因表达增加以及 I_{NaL} 增大. 因此, 胞内高钙增大 I_{NaL} 是通过细胞内信号转导机制作用的. 然而, 胞内高钙增大 I_{NaL} 应导致 APD 的延长^[33], 但由于 I_{Kr} 增大以及 I_{CaL} 减小抵消了 I_{NaL} 的作用, 从而使 APD 显著缩短.

心室肌细胞上离子流的上调或下调可引起电生理特性的异常, 从而导致严重的电活动紊乱及心律失常的发生. 心肌静息电位下降影响了钠通道的活性, 使得 0 期除极速度和幅度减小, 引起心室肌传导减慢, 严重时可形成兴奋的折返, 诱发心律失常. 此外, 复极时外向电流 I_{Kr} 的增大及内向电流 I_{CaL} 的显著减小导致异常的快速复极, 即 APD 异常缩短, 产

生类似于短 QT 综合征的继发性 QT 间期缩短, 引起动作电位不应期的异常缩短及心肌细胞复极离散度增加, 也易诱发心室内折返, 导致心律失常的发生. 胞内钙超载诱发各种瞬内向电流的增大^[34], 即生电的钠钙交换电流(I_{NCX})^[35]、钙激活氯电流^[36]等, 这些电流可引起频繁的迟发后除极和触发激动, 进而引起心室内异位激动, 干扰正常的动作电位传导, 诱发心律失常.

细胞内钙超载或胞内高钙存在于机体多种病理状态中^[2-10]. 胞内高钙增大 I_{NaL} 进而增加细胞内钠离子浓度, 而后通过激活反向钠/钙交换体, 进一步增加细胞内钙离子浓度, 从而使该过程形成一个恶性循环^[37,38]. 这在室性心律失常, 心源性猝死的发生中可能起着十分重要的作用. III类抗心律失常药或 ranolazine(一种 I_{NaL} 抑制剂)对抗钙超载所致心律失常有显著效果, 提示抑制 I_{NaL} 在阻断该作用通路中具有重要的意义^[33,39].

4 结论

急性胞内高钙可增大 I_{NaL} 与 I_{Kr} , 减小 I_{CaL} 和 I_{K1} , 同时减小 APD, APA, v_{max} 及 RMP, 并诱发心律失常. 这些结果揭示了临床上及实验研究中钙超载引发室性心律失常的相关机制.

参考文献

- Berridge M J. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol*, 1997, 499(Pt 2): 291-306
- de Diego C, Pai R K, Chen F, et al. Electrophysiological consequences of acute regional ischemia/reperfusion in neonatal rat ventricular myocyte monolayers. *Circulation*, 2008, 118: 2330-2337
- Casini S, Verkerk A O, van Borren M M, et al. Intracellular calcium modulation of voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, 2009, 81: 72-81
- Koster O F, Szegedi G P, Beuckelmann D J. Characterization of a $[Ca^{2+}]_i$ -dependent current in human atrial and ventricular cardiomyocytes in the absence of Na^+ and K^+ . *Cardiovasc Res*, 1999, 41: 175-187
- Rocchetti M, Besana A, Mostacciolo G, et al. Diverse toxicity associated with cardiac Na^+/K^+ pump inhibition: evaluation of electrophysiological mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 305: 765-771
- Shutt R H, Ferrier G R, Howlett S E. Increases in diastolic $[Ca^{2+}]$ can contribute to positive inotropy in guinea pig ventricular myocytes in the absence of changes in amplitudes of Ca^{2+} transients. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291: H1623-1634
- Kihara Y, Morgan J P. Intracellular calcium and ventricular fibrillation. Studies in the aequorin-loaded isovolumic ferret heart. *Circ Res*, 1991, 68: 1378-1389
- Zaugg C E, Wu S T, Lee R J, et al. Importance of calcium for the vulnerability to ventricular fibrillation detected by premature ventricular stimulation: single pulse versus sequential pulse methods. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28: 1059-1072
- Lakatta E G, Capogrossi M C, Kort A A, et al. Spontaneous myocardial calcium oscillations: overview with emphasis on ryanodine and caffeine. *Fed Proc*, 1985, 44: 2977-2983
- Song Y, Shryock J C, Wagner S, et al. Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318: 214-222

- 11 Xie L H, Chen F, Karagueuzian H S, et al. Oxidative-stress-induced afterdepolarizations and calmodulin kinase II signaling. *Circ Res*, 2009, 104: 79–86
- 12 Karin R. S. Calcium overload, spontaneous calcium release, and ventricular arrhythmias. *Heart Rhythm*, 2006, 3: 977–979
- 13 Clusin W T. Calcium and cardiac arrhythmias: DADs, EADs, and alternans. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2003, 40: 337–375
- 14 Nakajima I, Watanabe H, Iino K, et al. Ca^{2+} overload evokes a transient outward current in guinea-pig ventricular myocytes. *Circ J*, 2002, 66: 87–92
- 15 Wang Y, Tandan S, Cheng J, et al. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II-dependent remodeling of Ca^{2+} current in pressure overload heart failure. *J Biol Chem*, 2008, 283: 25524–25532
- 16 Livshitz L M, Rudy Y. Regulation of Ca^{2+} and electrical alternans in cardiac myocytes: role of CAMKII and repolarizing currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292: H2854–2866
- 17 Ho P D, Fan J S, Hayes N L, et al. Ras reduces L-type calcium channel current in cardiac myocytes. Corrective effects of L-channels and SERCA2 on $[\text{Ca}(2+)](i)$ regulation and cell morphology. *Circ Res*, 2001, 88: 63–69
- 18 Heath B M, Terrar D A. Protein kinase C enhances the rapidly activating delayed rectifier potassium current, IKr , through a reduction in C-type inactivation in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*, 2000, 522(Pt 3): 391–402
- 19 Walsh K B, Zhang J. Neonatal rat cardiac fibroblasts express three types of voltage-gated K^+ channels: regulation of a transient outward current by protein kinase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294: H1010–1017
- 20 McGuigan J A, Luthi D, Buri A. Calcium buffer solutions and how to make them: a do it yourself guide. *Can J Physiol Pharmacol*, 1991, 69: 1733–1749
- 21 Maltsev V A, Reznikov V, Undrovinas N A, et al. Modulation of late sodium current by Ca^{2+} , calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294: H1597–1608
- 22 Richard S, Perrier E, Fauconnier J, et al. ‘ $\text{Ca}(2+)$ -induced $\text{Ca}(2+)$ entry’ or how the L-type $\text{Ca}(2+)$ channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. *Prog Biophys Mol Biol*, 2006, 90: 118–135
- 23 Tsuji Y, Ophhof T, Kamiya K, et al. Pacing-induced heart failure causes a reduction of delayed rectifier potassium currents along with decreases in calcium and transient outward currents in rabbit ventricle. *Cardiovasc Res*, 2000, 48: 300–309
- 24 Mukherjee R, Hewett K W, Spinale F G. Myocyte electrophysiological properties following the development of supraventricular tachycardia-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27: 1333–1348
- 25 Fauconnier J, Lacampagne A, Rauzier J M, et al. Ca^{2+} -dependent reduction of IK1 in rat ventricular cells: a novel paradigm for arrhythmia in heart failure? *Cardiovasc Res*, 2005, 68: 204–212
- 26 Nitta J, Furukawa T, Marumo F, et al. Subcellular mechanism for $\text{Ca}(2+)$ -dependent enhancement of delayed rectifier K^+ current in isolated membrane patches of guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res*, 1994, 74: 96–104
- 27 Klockner U, Isenberg G. Calmodulin antagonists depress calcium and potassium currents in ventricular and vascular myocytes. *Am J Physiol*, 1987, 253: H1601–1611
- 28 Cheng T O. Digitalis administration: an underappreciated but common cause of short QT interval. *Circulation*, 2004, 109: e152; author reply e152
- 29 Schimpf R, Borggreffe M, Wolpert C. Clinical and molecular genetics of the short QT syndrome. *Curr Opin Cardiol*, 2008, 23: 192–198
- 30 Vlasblom R, Muller A, Musters R J, et al. Contractile arrest reveals calcium-dependent stimulation of SERCA2a mRNA expression in cultured ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 2004, 63: 537–544
- 31 Tohse N, Kameyama M, Sekiguchi K, et al. Protein kinase C activation enhances the delayed rectifier potassium current in guinea-pig heart cells. *J Mol Cell Cardiol*, 1990, 22: 725–734
- 32 O-Uchi J, Sasaki H, Morimoto S, et al. Interaction of $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes with different G proteins induces opposite effects on cardiac L-type Ca^{2+} channel. *Circ Res*, 2008, 102: 1378–1388
- 33 Zaza A, Belardinelli L, Shryock J C. Pathophysiology and pharmacology of the cardiac “late sodium current.” *Pharmacol Ther*, 2008, 119: 326–339
- 34 Berlin J R, Cannell M B, Lederer W J. Cellular origins of the transient inward current in cardiac myocytes. Role of fluctuations and waves of elevated intracellular calcium. *Circ Res*, 1989, 65: 115–126
- 35 Goldhaber J I. Free radicals enhance $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 1996, 271: H823–833
- 36 Zygmunt A C, Gibbons W R. Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res*, 1991, 68: 424–437
- 37 Noble D, Noble P J. Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload. *Heart*, 2006, 92: iv1–iv5
- 38 Levi A J, Dalton G R, Hancox J C, et al. Role of intracellular sodium overload in the genesis of cardiac arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1997, 8: 700–721
- 39 Belardinelli L, Shryock J C, Fraser H. Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. *Heart*, 2006, 92: iv6–iv14