

研究论文

模拟失重降低大鼠心肌细胞对异丙肾上腺素的反应性

张琳, 王云英, 余志斌*

第四军医大学航空航天生理教研室, 西安 710032

摘要: 本文旨在研究模拟失重大鼠单个心肌细胞无负荷收缩功能的影响以及对异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)反应性的变化。采用大鼠尾部悬吊法在地面模拟失重状态, 4周后以胶原酶I消化分离心肌细胞, 分别对左、右两心室心肌细胞进行收缩功能测量。结果显示, 悬吊4周大鼠(悬吊组)左、右心室心肌细胞的长度和宽度与正常大鼠(对照组)相比均无显著差异。随刺激频率增加, 对照组与悬吊组大鼠心肌细胞缩短幅值均逐步增加。在1.0、2.0与4.0 Hz刺激下, 对照组大鼠左心室心肌细胞缩短幅值分别为(8.50±1.26)%、(9.00±1.38)%与(9.23±1.83)%, 右心室心肌细胞缩短幅值分别为(9.80±2.48)%、(10.03±2.48)%与(10.28±2.27)%; 与对照组大鼠相比, 在1.0与2.0 Hz刺激下, 悬吊组大鼠左心室心肌细胞无负荷缩短幅值分别降低12.2%、10.9% ($P<0.05$), 右心室则分别降低16.5%、16.3% ($P<0.05$); 但是在4.0 Hz刺激下却无显著性改变。与同一频率刺激下的对照组大鼠相比, 悬吊组大鼠左、右心室心肌细胞达到缩短峰值的时程(time to peak shortening, TPS)明显缩短($P<0.05$); 而从缩短峰值至75%舒张的时程(TR_{75})则明显延长($P<0.05$)。在各刺激频率下, 悬吊组大鼠左、右心室心肌细胞缩短(+dL/dt_{max})与舒张(-dL/dt_{max})速度均未发生明显改变。用1、5、10 nmol/L ISO灌注达稳态水平后, 对照组大鼠心肌细胞缩短幅值分别增加了(10.63±0.83)%、(35.06±5.22)%和(71.64±6.83)%; 而悬吊组大鼠心肌细胞缩短幅值仅增加(5.75±0.76)%、(23.97±4.50)%和(26.38±8.13)%, 均有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$)。用10、50、100 nmol/L forskolin灌注达稳定水平后, 对照组大鼠心肌细胞缩短幅值分别增加了(3.04±0.27)%、(9.81±2.66)%、(20.20±3.47)%; 而悬吊组大鼠心肌细胞缩短幅值仅增加了(1.42±0.53)%、(3.83±1.71)%、(5.49±4.08)%, 均有显著性差异($P<0.05$)。以上结果表明, 模拟失重4周降低大鼠心肌细胞无负荷缩短幅值以及对ISO的反应性。

关键词: 模拟失重; 大鼠; 心肌细胞; 无负荷收缩; 收缩性能

中图分类号: R852.22

Depressed responsiveness of cardiomyocytes to isoproterenol in simulated weightlessness rats

ZHANG Lin, WANG Yun-Ying, YU Zhi-Bin*

Department of Aerospace Physiology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: The present study aimed to observe the changes of contractile function and responsiveness to isoproterenol (ISO) in tail-suspended rat cardiomyocytes under simulated weightlessness condition. Tail-suspended rat model was used to simulate weightlessness on the ground. Twenty-four male Sprague-Dawley rats were randomly divided into the control and tail-suspended groups. After 4 weeks of suspension, the rats were injected with heparin (100 IU/100 g body weight, i.p.) and anesthetized with pentobarbital sodium (40 mg/kg body weight). The hearts were removed and the aortas were cannulated rapidly. The cannulated hearts were mounted on a Langendorff perfusion apparatus and perfused with constant flow. The perfusion pressure was monitored. The hearts were digested by 0.08% collagenase I at 37 °C. The ventricular tissues were chopped and the single myocytes were dispersed gently by a wide-tipped pipette. The contractile function was measured in the Edge Detector system within 6 h after isolation. The length and width of cardiomyocytes were measured without electric stimulation. Contractile curves of the single cardiomyocytes were recorded at stimulation frequency of 1.0, 2.0 and 4.0 Hz. To observe the responsiveness of cardiomyocytes to ISO, 1, 5 and 10 nmol/L ISO in Krebs's solution was perfused at a stimulation frequency of 2.0 Hz. The length and width of the left and right ventricular cardiomyocytes in

Received 2006-09-26 Accepted 2007-06-09

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30370538).

*Corresponding author. Tel: +86-29-84774807; E-mail: yuzhib@fmmu.edu.cn

tail-suspended group had little difference from that in the control group. The unloaded shortening amplitude increased as stimulation frequency elevated in both the control and tail-suspended groups. It was increased by (8.50±1.26)%, (9.00±1.38)%, (9.23±1.83)% in the left ventricular cardiomyocytes, and (9.80±2.48)%, (10.03±2.48)%, (10.28±2.27)% in the right ventricular cardiomyocytes in the control group at stimulation frequency of 1.0, 2.0 and 4.0 Hz. Compared with that in the control group, the unloaded shortening amplitude decreased by 12.2% and 10.9% in the left ventricular cardiomyocytes ($P<0.05$), and 16.5% and 16.3% in the right ventricular cardiomyocytes ($P<0.05$) at stimulation frequency of 1.0 and 2.0 Hz in tail-suspended group. There was no significant difference in unloaded shortening amplitude at stimulation frequency of 4.0 Hz between the control and tail-suspended groups. Time to peak shortening (TPS) in tail-suspended group significantly reduced in both the left and right ventricular cardiomyocytes ($P<0.05$). Time from peak to 75% relaxation (TR_{75}) in tail-suspended group significantly prolonged in both the left and right ventricular cardiomyocytes ($P<0.05$). No significant differences in shortening and relaxation rate ($\pm dL/dt_{max}$) were observed between the control and tail-suspended groups. The unloaded shortening amplitude increased by (10.63±0.83)%, (35.06±5.22)% and (71.64±6.83)% in the control cardiomyocytes, but increased by (5.75±0.76)%, (23.97±4.50)% and (26.38±8.13)% in tail-suspended group during perfusion with 1, 5 and 10 nmol/L ISO ($P<0.05$, $P<0.01$). The unloaded shortening amplitude increased by (3.04±0.27)%, (9.81±2.66)% and (20.20±3.47)% in the control cardiomyocytes, but increased by (1.42±0.53)%, (3.83±1.71)% and (5.49±4.08)% in tail-suspended group during perfusion with 10, 50 and 100 nmol/L forskolin ($P<0.05$). The results obtained suggest that the unloaded shortening amplitude and responsiveness to ISO decrease in rat cardiomyocytes after 4-week tail-suspension.

Key words: simulated weightlessness; rat; cardiomyocyte; unloaded shortening; contractility

在失重条件下, 由于流体静压在人体垂直轴向的梯度消失, 引起体液的头向转移, 经神经-体液性调节, 导致饮水减少与尿量增加, 最终使血容量减少 10%~15%。因此, 在失重环境下的心血管系统处于低动力状态^[1], 引起心血管系统出现适应性变化^[2]。观察模拟失重 1、2、4 及 8 周大鼠心脏乳头肌收缩功能, 发现与同步对照组大鼠相比, 悬吊 4 周后心肌收缩性能出现可恢复性降低, 这可能与模拟失重引起的肌钙蛋白抑制亚基(troponin I, TnI)的 N 末端降解有关^[3]。TnI 的 N 末端包含 β -肾上腺素能受体激动剂介导的两个可磷酸化位点: 23 与 24 位的丝氨酸残基, 可调节心肌细胞的收缩时程与速度^[4]。模拟失重大鼠心肌细胞 TnI 发生 N 末端降解, 可能引起心肌细胞对 β -肾上腺素能受体激动剂的反应性减弱。另外, 有研究报道, 模拟失重 7 d 引起大鼠心肌肌原纤维对 Ca^{2+} 的敏感性降低^[5], 但它对心肌收缩性能的影响目前尚不清楚, 引起这一变化的机理可能亦与 TnI 的 N 末端降解有关。

本研究采用分离大鼠心肌细胞的方法, 排除心脏结缔组织对心肌收缩性能可能产生的影响, 观测模拟失重 4 周大鼠心肌细胞无负荷收缩时, 其缩短幅值与速度以及对异丙肾肾上腺素(isoproterenol, ISO)、腺苷酸环化酶激活剂 forskolin 反应性的变化及其可能机理。

1 材料与方法

1.1 大鼠模拟失重模型、分组与试剂 健康雄性成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 24 只(第四军医大学动物中心提供), 体重 180~200 g, 按体重配对原则随机分为对照组和尾部悬吊组, 每组 12 只。按本实验室已建立的方法进行动物饲养与尾部悬吊^[6], 定期称量大鼠体重。悬吊 4 周后, 在完全相同条件下分离心肌细胞。Joklik's MEM (minimum essential medium Eagle)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)与胶原酶 I 均为 Sigma 公司产品, 其余为国产分析纯试剂。

1.2 大鼠心肌细胞的分离 大鼠腹腔注射肝素 (100 IU/100 g 体重), 20 min 后腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)麻醉, 迅速开胸摘取心脏, 剪除残余肺叶与脂肪组织。依照本实验室已建立的方法^[7], 行主动脉逆行插管, 将心脏悬挂于 Langendorff 灌流装置中, 37°C 恒温恒流灌流心脏, 采用含 0.08% 胶原酶 I 的消化液分离心肌细胞, 以灌流压的变化确定消化的终点, 左、右两心室(室间隔并入左心室)心肌细胞分别收集保存。

1.3 心肌细胞无负荷收缩功能测量 吸取少量心肌细胞悬液至 0.2 mL 灌流槽内, 将灌流槽置 Olympus IX70 倒置显微镜上, 静置 5 min 使心肌细胞贴壁。然后, 采用 HEPES 缓冲液行非循环灌流, HEPES 缓冲液的组成为(mmol/L): NaCl 132.0、KCl 4.8、MgCl₂ 1.2、HEPES 10.0、葡萄糖 10.0、CaCl₂ 1.8, pH 7.30。灌流速度为 0.2 mL/min。在未给

予电场刺激条件下, 测量单个心肌细胞静息时的长度与宽度。使用场刺激引发心肌细胞收缩, 方波刺激, 波宽 5 ms, 刺激电流 10 mA, 刺激频率分别为 1.0、2.0 和 4.0 Hz。采用 Edge Detector 系统 (Crescent, USA) 监测心肌细胞两端的缩短幅度变化, Felix 软件系统 (PTI, USA) 采集与分析心肌细胞无负荷收缩信号。在 2.0 Hz 刺激条件下, 分别给予 1、5、10 nmol/L 的 ISO 灌流, 使其达到平衡, 然后用 HEPES 缓冲液灌流洗脱 ISO, 每组细胞采用单一浓度灌流。在 2.0 Hz 刺激条件下, 分别给予 10、50、100 nmol/L forskolin 灌流, 使其达到平衡, 然后用 HEPES 缓冲液灌流洗脱 forskolin, 每组细胞采用单一浓度灌流。通过分析不同刺激频率下的细胞收缩曲线可得到有关细胞收缩性的指标: 心肌细胞的缩短幅值与静息长度的百分比、缩短速度 ($+dL/dt_{max}$)、舒张速度 ($-dL/dt_{max}$)、收缩达到缩短峰值的时程 (time to peak shortening, TPS) 和从缩短峰值到 75% 舒张的时程 (time from peak to 75% relaxation, TR_{75})。

1.4 数据处理 数据以 $mean \pm SD$ 表示, 使用 SPSS 统计软件进行分析, 对照组与悬吊组之间的比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 心肌细胞长度和宽度的变化

对照组大鼠左心室静息心肌细胞长度和宽度分别为 $(126.79 \pm 4.05) \mu m$ 与 $(23.52 \pm 1.18) \mu m$ ($n=30$ cells), 悬吊 4 周大鼠左心室心肌细胞的长度和宽度分别为 $(134.42 \pm 3.94) \mu m$ 与 $(27.44 \pm 1.02) \mu m$ ($n=30$ cells),

两组间无显著性差异。对照组大鼠右心室心肌细胞长度和宽度分别为 $(131.08 \pm 3.69) \mu m$ 与 $(25.65 \pm 1.03) \mu m$ ($n=30$ cells), 而悬吊组则分别为 $(129.81 \pm 3.87) \mu m$ 与 $(27.69 \pm 1.03) \mu m$ ($n=30$ cells), 两组间也无显著性差异。

2.2 心肌细胞无负荷缩短幅值的变化

在 1.0、2.0 与 4.0 Hz 刺激下, 对照组大鼠左心室心肌细胞缩短幅值分别为 $(8.50 \pm 1.26)\%$ 、 $(9.00 \pm 1.38)\%$ 与 $(9.23 \pm 1.83)\%$, 右心室心肌细胞缩短幅值分别为 $(9.80 \pm 2.48)\%$ 、 $(10.03 \pm 2.48)\%$ 与 $(10.28 \pm 2.27)\%$; 随刺激频率增加, 缩短幅值逐渐增加, 但无统计学差异; 相同刺激频率下左心室与右心室心肌细胞缩短幅值也无显著性差异。悬吊组大鼠左心室心肌细胞缩短幅值分别为 $(7.46 \pm 1.88)\%$ 、 $(8.03 \pm 1.68)\%$ 与 $(8.92 \pm 1.86)\%$, 右心室心肌细胞缩短幅值分别为 $(8.18 \pm 2.39)\%$ 、 $(8.40 \pm 2.37)\%$ 与 $(8.86 \pm 2.38)\%$ 。与对照组大鼠相比, 在 1.0 与 2.0 Hz 刺激下, 悬吊组大鼠左心室心肌细胞无负荷缩短幅值分别降低 12.2%、10.9% ($P < 0.05$), 右心室心肌细胞无负荷缩短幅值分别降低 16.5%、16.3% ($P < 0.05$); 但是在 4.0 Hz 刺激下却无显著性差异 (图 1)。

2.3 心肌细胞无负荷收缩时程的变化

随刺激频率增加, 对照组与悬吊组大鼠左、右心室心肌细胞收缩的 TPS 与 TR_{75} 均呈缩短趋势 (图 2、3)。与对照组大鼠比较, 相同频率下悬吊组大鼠左心室或右心室的 TPS 均明显缩短 ($P < 0.05$), 而 TR_{75} 均明显延长 ($P < 0.05$)。

2.4 心肌细胞无负荷 $\pm dL/dt_{max}$ 的变化

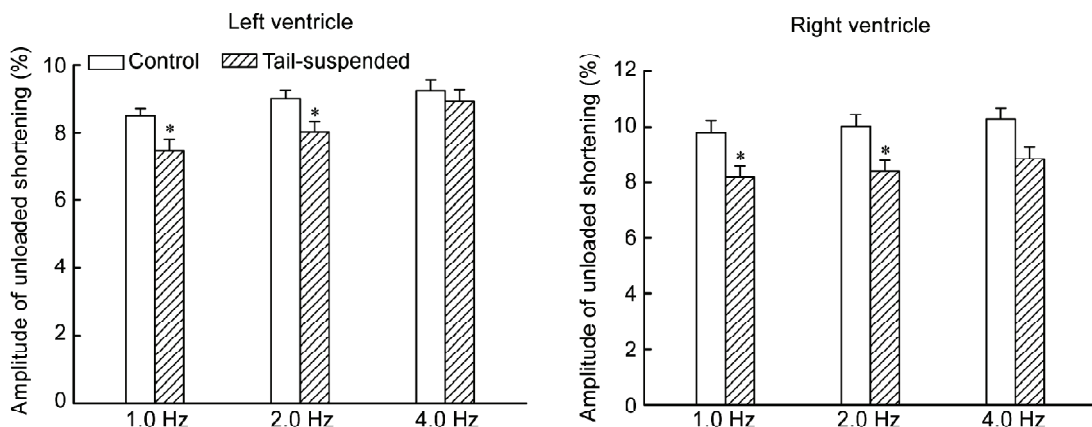


图 1. 对照组与悬吊组大鼠左、右心室心肌细胞的无负荷缩短幅值

Fig. 1. Amplitude of unloaded shortening in left and right ventricular cardiomyocytes from control and 4-week tail-suspended rats. $mean \pm SD$, $n=30$. * $P < 0.05$ vs control.

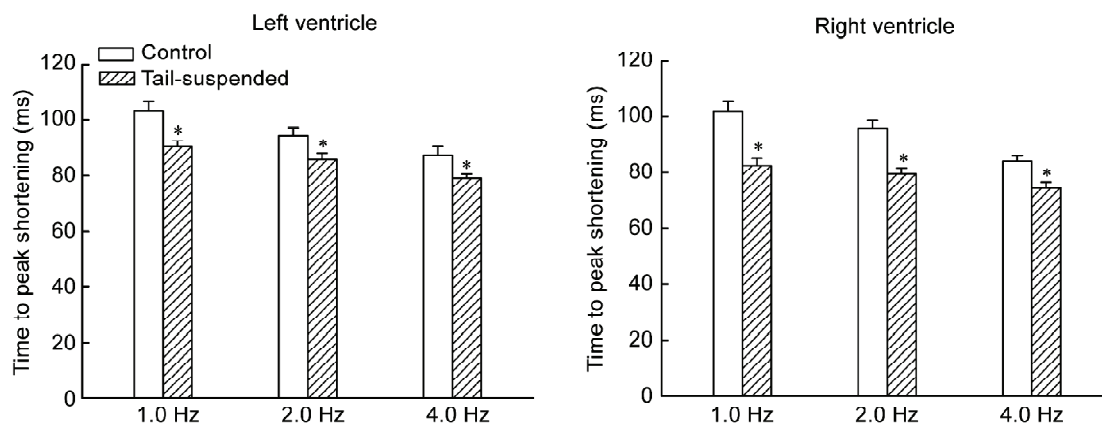


图 2. 对照组和悬吊组大鼠左、右心室心肌细胞达到缩短峰值的时程

Fig. 2. Time to peak shortening (TPS) of unloaded contraction in left and right ventricular cardiomyocytes from control and 4-week-tail-suspended rats. mean \pm SD, $n=30$. * $P<0.05$ vs control.

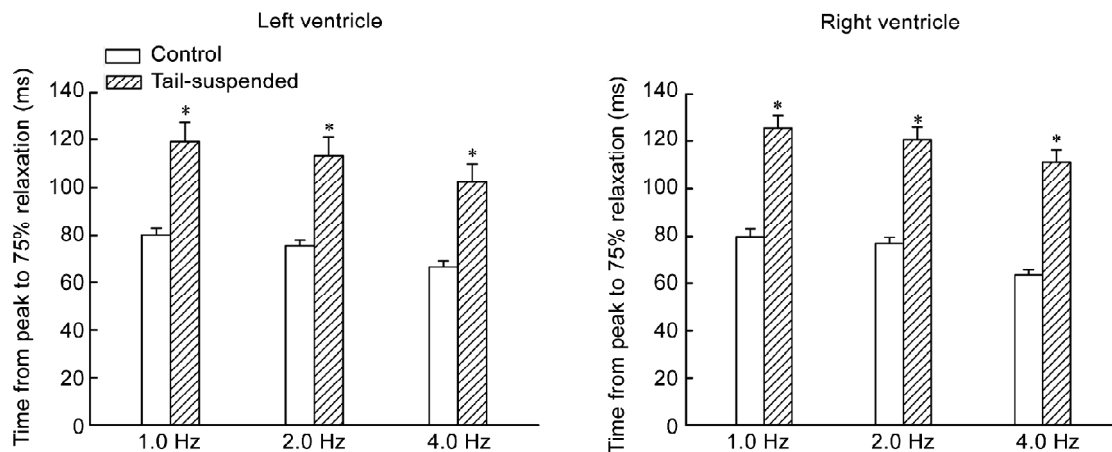


图 3. 对照组和悬吊组大鼠左、右心室心肌细胞的舒张时程

Fig. 3. Time from peak to 75% relaxation (TR_{75}) of unloaded contraction in left and right ventricular cardiomyocytes from control and 4-week tail-suspended rats. mean \pm SD, $n=30$. * $P<0.05$ vs control.

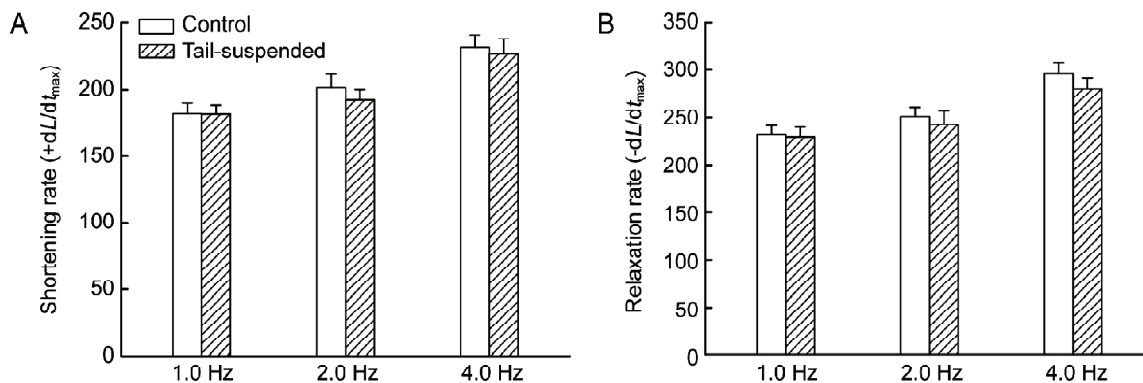


图 4. 对照组和悬吊组大鼠心肌细胞的缩短速度与舒张速度

Fig. 4. Shortening and relaxation rate ($\pm dL/dt_{max}$) of unloaded contraction in ventricular cardiomyocytes from control and 4-week tail-suspended rats. A: $+dL/dt_{max}$. B: $-dL/dt_{max}$. mean \pm SD, $n=30$.

随刺激频率增加, 对照组与悬吊组大鼠心肌细胞的 $\pm dL/dt_{\max}$ 均逐步增加(图4)。与对照组大鼠比较, 相同刺激频率下悬吊组大鼠心肌细胞的 $\pm dL/dt_{\max}$ 均并无显著改变。

2.5 心肌细胞对 ISO 的反应性

在 1、5、10 nmol/L 的 ISO 作用下, 对照组大鼠心肌细胞缩短幅值分别增加了(10.63±0.83)%、(35.06±5.22)%、(71.64±6.83)%; 而悬吊组大鼠心肌细胞缩短幅值仅增加了(5.75±0.76)%、(23.97±4.50)%、(26.38±8.13)% (每组每个浓度 6 个细胞)(图5)。灌流后达到收缩平衡的时间, 对照组大鼠分别为(550±79) s、(400±55) s、(220±38) s, 悬吊组大鼠分别为(600±93) s、(580±71) s、(293±58) s。悬吊组大鼠对 ISO 的反应性明显低于对照组($P<0.05$, $P<0.01$)。

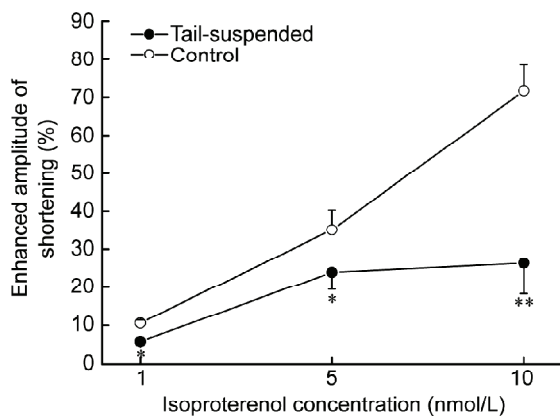


图 5. 对照组和悬吊组大鼠心肌细胞无负荷缩短幅值对异丙肾上腺素的反应性

Fig. 5. Responsiveness of unloaded shortening in ventricular cardiomyocytes to isoproterenol in control and 4-week tail-suspended rats. mean±SD, $n=6$ cells at each concentration in each group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control.

2.6 心肌细胞对 forskolin 的反应性

在 10、50、100 nmol/L 的 forskolin 作用下, 对照组大鼠心肌细胞缩短幅值分别增加了(3.04±0.27)%、(9.81±2.66)%、(20.20±3.47)%; 而悬吊组大鼠心肌细胞缩短幅值仅增加了(1.42±0.53)%、(3.83±1.71)%、(5.49±4.08)% (每组每个浓度 6 个细胞)(表1)。灌流后达到收缩平衡的时间, 对照组大鼠分别为(530±77) s、(446±67) s、(271±53) s, 悬吊组大鼠分别为(570±74) s、(483±59) s、(304±62) s。悬吊组大鼠对 forskolin 的反应性明显低于对照组($P<0.05$)。

表1. 对照组和悬吊组大鼠心肌细胞无负荷缩短幅值对 forskolin 的反应性

Table 1. Responsiveness of unloaded shortening in ventricular cardiomyocytes to forskolin in control and 4-week tail-suspended rats (% increase)

Forskolin (nmol/L)	Control (% increase)	Tail-suspended (% increase)
10	3.04±0.27	1.42±0.53*
50	9.81±2.66	3.83±1.71*
100	20.20±3.47	5.49±4.08*

mean±SD, $n=6$ cells at each concentration in each group. * $P<0.05$ vs control.

3 讨论

本研究采用胶原酶 I 分离大鼠心肌细胞, 观测单个心肌细胞在无负荷条件下的收缩功能。结果发现, 模拟失重 4 周引起大鼠心肌细胞缩短幅值明显降低, TPS 改变, 对 ISO 和 forskolin 的反应性降低。

肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)的 ATP 酶活性与心肌细胞无负荷缩短的最大速度(V_{\max})密切相关, 酶活性高, V_{\max} 增加^[8]。心肌细胞 MHC 存在三种类型的异构体(isoform), 即由两条 α 重链组成的 V_1 型 MHC, 两条 β 重链组成的 V_3 型 MHC, 以及一条 α 与一条 β 重链组成的 V_2 型 MHC。其中 V_1 型的 MHC-ATP 酶活性最高, V_3 型最低, V_2 型居中^[9]。大鼠尾部悬吊 4 周后心肌细胞 MHC 未发生明显的由 V_1 向 V_3 型的转化^[3]。另外, 本实验观测悬吊 4 周大鼠心肌细胞无负荷 $\pm dL/dt_{\max}$ 亦无明显改变。进一步提示在模拟失重条件下, 大鼠心肌细胞 MHC-ATP 酶活性未发生明显改变。

因为心肌细胞横桥每摆动一次的步幅(working stroke)是一个常数^[10], 所以单位时间内横桥摆动的频率就决定着无负荷缩短幅值的大小。单位时间内横桥摆动的频率反应了横桥的动态特征, 受多种因素影响, 但 MHC-ATP 酶活性可能是重要的影响因素之一, 这是因为 MHC-ATP 酶活性较高时, 单位时间内水解 ATP 的速度较快, 横桥摆动次数多, 故缩短幅值较大^[11]。从以上分析可以看出, 在模拟失重条件下心肌细胞的 MHC-ATP 酶活性变化不大, 但大鼠心肌细胞缩短幅值明显降低, 提示可能还存在其它的调节因素。与同步对照组大鼠相比, 悬吊 4 周组大鼠心肌细胞 TPS 明显缩短, 提示可能心肌细胞内肌原纤维对 Ca^{2+} 的敏感性降低, 使得激活横桥需要更高的 Ca^{2+} 浓度, 从而导致缩短幅值减小。

Dunlap 等的研究表明, 尾部悬吊 7 d 即可引起大鼠心肌细胞肌原纤维对 Ca^{2+} 的敏感性降低^[5], 这可能是引起模拟失重 4 周大鼠心肌细胞缩短幅值减小的原因。另一方面, 当刺激频率增大至 4 Hz 时, 可引起心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度增加^[12], 从而消除了肌原纤维对 Ca^{2+} 敏感性降低对缩短幅值的影响, 使悬吊组大鼠心肌细胞无负荷缩短幅值与对照组大鼠无显著差别。

ISO 可作用于心肌细胞膜上的 β - 肾上腺素能受体, 激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA), 而 forskolin 不经膜受体介导可以直接激活腺苷酸环化酶, 提高细胞内 cAMP 的浓度, 激活 PKA。PKA 进而磷酸化受磷蛋白(phospholamban, PLB)及 TnI 等底物, 磷酸化的 PLB 对肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶抑制减弱, 其活性明显增加, 最终加快了心肌细胞舒张; 另一方面, 磷酸化的 TnI 使肌原纤维对 Ca^{2+} 的敏感性降低, 也可缩短舒张的时程^[13]。模拟失重 4 周大鼠心肌 TnI 出现 N 末端降解, 其降解的位点位于第 26、27 与 30 位氨基酸残基^[3]。这导致部分肌节中的 TnI 缺少第 23 与 24 位的丝氨酸残基, 因此不能被 PKA 磷酸化, 从而减弱了心肌细胞对 ISO 和 forskolin 的反应性。反过来, 当缺乏 ISO 或 forskolin 作用时, 通过 PKA 对心肌细胞收缩性能的调节作用进一步减弱, 综合的结果是心肌细胞舒张时程明显延长。模拟失重 4 周大鼠心肌细胞无负荷缩短幅值对 ISO 与 forskolin 的反应性均降低, 提示大鼠心肌细胞 β - 肾上腺素能受体可能不是主要的影响环节, 模拟失重可能引起了 PKA 或 / 和 PKA 后的某些环节发生改变。结合我们以往的研究结果^[3], 推测 PKA 磷酸化的靶点发生了改变, 这需要进行进一步的研究。

参考文献

- Nicogossian AE, Huntoon CL, Pool SL. eds. *Space Physiology and Medicine*. 3rd ed. Malvern: Lea & Febiger Press, 1994.
- Zhang LF. Vascular adaptation to microgravity: what have we learned? *J Appl Physiol* 2001; 91: 1-16
- Yu ZB, Zhang LF, Jin JP. A proteolytic NH_2 -terminal truncation of cardiac troponin I that is up regulated in simulated microgravity. *J Biol Chem* 2001; 276: 15753-15760.
- Zhang R, Zhao J, Potter JD. Phosphorylation of both serine residues in cardiac troponin I is required to decrease the Ca^{2+} affinity of cardiac troponin C. *J Biol Chem* 1995; 270(51): 30773-30780.
- Dunlap AW, Thomason DB, Menon V, Hofmann PA. Decreased Ca^{2+} sensitivity of isometric tension in skinned cardiac myocytes from tail-suspended rats. *J Appl Physiol* 1996; 80(5): 1612-1617.
- Chen J (陈杰), Ma J, Ding ZP, Zhang LF. A modified tail-suspension model for simulating long-term weightlessness. *Chin J Space Sci (空间科学学报)* 1993; 13(2): 159-162 (Chinese, English abstract).
- Wang YY (王云英), Zhang R, Yu ZB. Adult rat cardiomyocytes isolated by constant flow perfusion at low pressure. *Chin J Appl Physiol (中国应用生理学杂志)* 2005; 21(4): 475-479 (Chinese, English abstract)
- Barany M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 1967; 50 (Suppl): 197-218.
- Zak R, Galhotra SS. Contractile and regulatory proteins. In: *Cardiac metabolism*. Drake-Holland AJ, Noble MIM. eds. John Wiley & Sons Ltd., 1983, 339-364.
- Linari M, Lombardi V, Piazzesi G. Cross-bridge kinetics studied with staircase shortening in single fibres from frog skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 1997; 18(1): 91-101.
- Reggiani C, Bottinelli R, Stienen GJ. Sarcomeric myosin isoforms: fine tuning of a molecular motor. *News Physiol Sci* 2000; 15: 26-33.
- Antoons G, Mubagwa K, Nevelsteen I, Sipido KR. Mechanisms underlying the frequency dependence of contraction and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 2002; 543(Pt 3): 889-898.
- Zhang R, Zhao J, Mandveno A, Potter JD. Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ Res* 1995; 76(6): 1028-1035.