

• 研究论文 •

大鼠心室肌 M_3 受体与间隙连接蛋白 43 作为抗心律失常药物靶点的综合研究

张 勇, 岳 朋, 肖 静, 于海雁, 潘振伟, 林道红, 吕延杰, 杨宝峰*

(哈尔滨医科大学 药理教研室 黑龙江省生物医药重点实验室 省部共建国家重点实验室培育基地, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 目的 在蛋白质分子水平研究心律失常相关蛋白质 M_3 受体与间隙连接蛋白 43 之间的结构相互作用, 并为其作为筛选药物靶点提供依据。方法 通过免疫组化结合激光共聚焦显微镜, 及免疫沉淀与免疫印迹技术, 研究 M 受体与间隙连接蛋白 43 的结构性共定位关系。结果 证实了大鼠心室肌细胞膜蛋白中 $M_1 \sim M_5$ 等 5 个亚型的存在; 观察到大鼠单个心肌细胞膜上 M_3 受体与间隙连接蛋白 43 的结构性共定位; 发现 M 受体各亚型与间隙连接蛋白 43 均存在结构整合, 且一定浓度离子型去垢剂可破坏 M_3 受体与间隙连接蛋白 43 的结构整合关系, 并进一步发现参与 M_3 受体结构整合的是间隙连接蛋白 43 的磷酸化形式。结论 大鼠心室肌 M 受体亚型与间隙连接蛋白 43 的磷酸化形式存在结构性共定位关系, 且可被一定浓度离子型去垢剂破坏。

关键词: 心室肌细胞膜; M 受体; 间隙连接蛋白 43; 结构整合

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)05 - 0395 - 06

Integration between M_3 muscarinic acetylcholine receptor and connexin 43 as antiarrhythmic targets in rat ventricular myocardium

ZHANG Yong, YUE Peng, XIAO Jing, YU Haiyan, PAN Zhen-wei, LIN Dao-hong,
LÜ Yan-jie, YANG Bao-feng*

(Department of Pharmacology, Bio-pharmaceutical Key Laboratory of Heilongjiang Province-Incubator of State Key Laboratory, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract: **Aim** To optimize the method of investigating structural integration between proteins and study the integration between arrhythmia related proteins in molecular level. **Methods** Immunostaining the normal ventricular myocytes was used to observe the distribution of connexin 43 and muscarinic acetylcholine receptor (mAChR). The five mAChR subtypes were precipitated using immunoprecipitation. Then, SDS-PAGE and Western blotting with the anti-connexin 43 antibody were performed to observe whether they were structurally integrated. Further, different concentrations of detergent were used to observe whether this relationship could be broken. **Results** The five subtypes of mAChR existed in the cardiac myocyte of the rat, and all the five mAChR subtypes combined with connexin 43. In the normal rat ventricular myocyte membrane, connexin 43 and M_3 receptor are co-located. When adding certain concentration of detergent to the membrane protein, the integration between M_3 receptor and connexin 43 was broken, and the phosphorylated form of connexin 43 integrated with M_3 receptor. **Conclusion** The results indicated that the structural integration between mAChR and phosphorylation of connexin 43 existed in rat ventricular myocardium, and this integration could be broken by certain concentration of detergent.

Key words: ventricular myocyte membrane; muscarinic acetylcholine receptor; connexin 43; structural integration

收稿日期: 2005-09-13.

基金项目: 国家重大基础研究前期专项资助项目 (2004CCA06700); 国家自然科学基金重点资助项目 (30430780).

* 通讯作者 Tel: 86 - 451 - 86671354, Fax: 86 - 451 - 86675769, E-mail: yangbf@ems.hrbmu.edu.cn

对于心律失常病因与治疗靶点的研究,过去主要集中在相关离子通道功能异常,数目上调或下调,使动作电位时程(APD)缩短或延长从而诱发心脏节律异常^[1],并认为与心律失常相关的离子通道为抗心律失常药物的靶点,在心律失常发生发展中起主要作用的通道为抗心律失常药物作用的最佳靶点^[2]。随着人们在分子水平对心脏认识的逐渐加深,有关心肌细胞间信号与神经递质传导及电偶联状态改变的研究已成为热点,这为人们探索心律失常的本质提供了新的研究方向,给抗心律失常药物靶点研究开辟了新的领域。

有研究表明,刺激迷走神经可阻止间隙连接蛋白43含量降低,从而对抗缺血性心律失常,发挥心脏保护作用^[3]。迷走神经兴奋可释放胆碱能神经递质,为了进一步阐明心肌M受体尤其是M₃受体的保护性功能调节作用,本实验首先在受体蛋白质细胞结构表达定位方面加以研究,观察M受体与间隙连接蛋白43在大鼠心室肌细胞膜上的结构共定位关系,为深入探索心律失常相关蛋白质间调控机制提供理论依据。

材料与方 法

实验动物 Wistar大鼠,雄性,体重190~210g,由哈尔滨医科大学附属第二医院动物中心提供。

实验药品与试剂 BCA蛋白定量试剂盒购自Pierce公司;Western blotting封闭蛋白干粉为博士德生物工程有限公司产品;M₁, M₂, M₃, M₄和 M₅受体的多克隆抗体(兔),间隙连接蛋白43的单克隆抗体(鼠)及酪氨酸磷酸化蛋白质的单克隆抗体p-Tyr(鼠)均购自Santa Cruz生物技术公司;红外荧光标记的二抗(Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594)购自Molecular Probes公司;PVDF膜为BIO-RAD公司产品;免疫沉淀用Protein A-Agarose购自Santa Cruz生物技术公司;蛋白质分子质量标准、蛋白酶抑制剂、蛋白电泳液、转膜液和SDS-PAGE考马斯亮蓝染液均购自华特生生物技术公司。

仪器 蛋白电泳仪为BIO-RAD公司产品;半干转印系统为瑞典Amersham Pharmacia Biotech公司产品;差速离心机为日本Hitachi公司产品;Odyssey红外荧光扫描成像系统为美国LI-COR公司产品;激光共聚焦显微镜为日本Olympus公司产品。

心肌M₁~M₅受体与间隙连接蛋白43的免疫印迹 差速离心方法^[4,5]提取的大鼠心室肌细胞膜蛋白,BCA(二喹啉甲酸)法进行定量,每孔上样100

μg,用10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,并用半干法转移到PVDF膜上,转膜后用PBS缓冲液洗膜10min,然后将膜在含5%封闭蛋白干粉的TBS溶液中4℃封闭过夜。分别用M₁(1:200), M₂(1:200), M₃(1:200), M₄(1:200)或M₅(1:200)的多克隆抗体,间隙连接蛋白43(1:250)的单克隆抗体对膜孵育1h后,用含0.05% Tween-20的PBS缓冲液洗膜3次,每次15min,然后用1:4000稀释的红外荧光标记二抗(Alexa Fluor 700)对膜避光孵育1h,以含0.05% Tween-20的PBS缓冲液洗膜3次,每次15min,再用PBS缓冲液洗膜15min,以洗去Tween-20降低背景,以上过程避光。Odyssey红外荧光扫描成像系统对膜上蛋白质进行检测。

M受体与间隙连接蛋白43结构共定位研究 取膜蛋白400μg,用RIPA溶液定容至1mL,分别加入兔抗M₁, M₂, M₃, M₄或M₅的多克隆抗体5μL,混悬3h,再各加入Protein A-Agarose 30μL混悬,过夜。将混悬液在2500r·min⁻¹离心30s,弃去上清液,沉淀用RIPA溶液0.5mL洗2次后加入2×SDS上样缓冲液20μL,煮样5min后于2500r·min⁻¹离心30s,将上清液加入样品孔中电泳。半干法转膜后用PBS缓冲液洗膜10min,然后将膜在含5%封闭蛋白干粉的TBS溶液中4℃封闭过夜。以间隙连接蛋白43(1:250)的单克隆抗体对膜孵育1h,用含0.05% Tween-20的PBS缓冲液洗膜3次,每次15min,然后用1:4000稀释的红外荧光标记二抗(Alexa Fluor 700)对膜避光孵育1h,以含0.05% Tween-20的PBS缓冲液洗膜3次,每次15min,再用PBS缓冲液洗膜15min,以洗去Tween-20降低背景,以上过程避光。Odyssey红外荧光扫描成像系统对膜上蛋白质进行检测。

激光共聚焦显微镜观察大鼠心肌细胞M₃受体与间隙连接蛋白43结构性共定位 取急性分离的大鼠心室肌细胞^[6],移入装有载玻片的6孔板待细胞爬片,4%多聚甲醛固定7min,取出载玻片做抗原修复,然后加穿透液(0.3% Triton X-100)作用1h后用3% BSA溶液封闭5h,以M₃与间隙连接蛋白43的特异性抗体4℃孵育过夜,荧光标记的二抗(Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG与Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG)孵育1h,激光共聚焦显微镜取纹理清楚的单个细胞进行观察。

不同浓度离子型去垢剂对大鼠心肌M₃受体与间隙连接蛋白43结构整合的影响 分2组,取膜蛋白400μg,用含4%,10%或20% SDS的RIPA溶液

定容至 1 mL。第 1 组煮样 5 min 后加入兔抗 M₃ 多克隆抗体 5 μL; 第 2 组直接加入兔抗 M₃ 多克隆抗体 5 μL。将 2 组同时混悬 3 h, 再各加入 Protein A-Agarose 30 μL 混悬过夜。于 2 500 r·min⁻¹ 离心 30 s (d 2), 弃去上清液, 沉淀用 RIPA 溶液 0.5 mL 洗 2 次后加入 2 × SDS 上样缓冲液 20 μL, 煮样 5 min 后 2 500 r·min⁻¹ 离心 30 s, 将上清液加入样品孔中电泳。转膜后按前述方法做免疫印迹检测间隙连接蛋白 43。

结果

1 大鼠心肌 M 受体各亚型的免疫印迹结果

心肌膜蛋白提取液经蛋白定量后测得其含量为 10.94 mg·mL⁻¹。将蛋白质按每孔 100 μg 点样进行变性 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以 M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ 和间隙连接蛋白 43 的特异性单克隆抗体做免疫印迹, 检测得 5 种亚型的 M 受体条带 M₁ ≈ 52 kD, M₂ ≈ 110 kD, M₃ ≈ 67 kD 和 115 kD, M₄ ≈ 53 kD, M₅ ≈ 59 kD, 间隙连接蛋白 43 的 3 条带 connexin 43 ≈ 41 ~ 46 kD (图 1)。

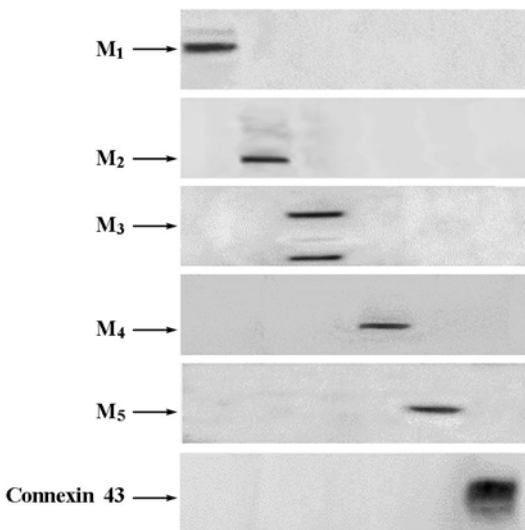


Figure 1 Western blotting of rat cardiocyte membrane protein with the anti-M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ and connexin 43 antibody revealed prominent protein bands at 52, 110, 67 and 115, 53, 59 and 41 - 46 kD, respectively

2 大鼠心肌 M 受体 5 种亚型与间隙连接蛋白 43 存在结构性共定位关系

应用免疫沉淀技术分别以 M₁, M₂, M₃, M₄ 或 M₅ 的多克隆抗体与心肌膜蛋白提取液中的相应抗原结合, 再加入 Protein A-Agarose 对目的抗原-抗体复合

物进行免疫沉淀, 煮样后进行变性 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜后以间隙连接蛋白 43 的单克隆抗体进行检测, 在约 46 kD 处显示出间隙连接蛋白 43 分别与 M 受体 5 种亚型的结构性共定位关系 (图 2)。

应用免疫细胞化学分别以 M₃ 受体和间隙连接蛋白 43 的特异性抗体对分离的大鼠心肌细胞进行标记, 激光共聚焦显微镜观察 (图 3)。图 3A 中绿色部分为 M₃ 受体; 图 3B 中红色部分为间隙连接蛋白 43; 图 3C 示此心肌细胞形态; 图 3D 为将 A 与 B 合

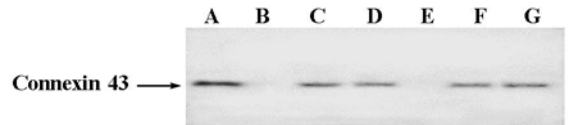


Figure 2 The rat heart membrane protein was immunoprecipitated with the M₁ - M₅ polyclonal antibody, and Western blotting was performed using the connexin 43 monoclonal antibody to detect whether the five subtypes of mAChR were co-located with connexin 43. The bands detected on the PVDF membrane were at 46 kD. M₂ and M₃ polyclonal antibody was used as control. A: M₁ (immunoprecipitation, IP), Connexin 43 (Western blotting, WB); B: M₂ antibody; C: IP M₂, WB Connexin 43; D: IP M₃, WB Connexin 43; E: M₃ antibody; F: IP M₄, WB Connexin 43; G: IP M₅, WB Connexin 43

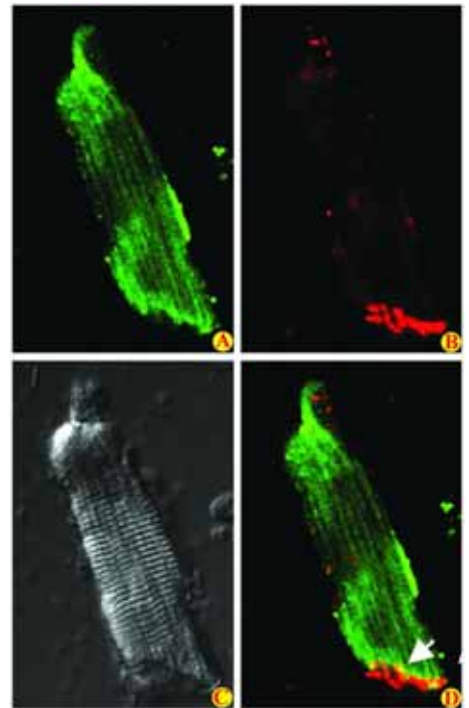


Figure 3 Immunostaining with the M₃ and connexin 43 antibody, confocal microscopy showed the collocation between M₃ and connexin 43 in single cardiac myocyte. A: M₃; B: Connexin 43; C: Differential interference contrast image; D: Merge A and B

并,其中黄色部分可明显观察到心肌细胞 M_3 受体与间隙连接蛋白 43存在结构性共定位关系。

3 一定浓度离子型去垢剂可破坏大鼠心肌 M_3 受体与间隙连接蛋白 43的结构性共定位关系

为探索 M_3 受体与间隙连接蛋白 43的共定位整合类型并排除非特异结合,对心肌膜蛋白提取液给予不同浓度的离子型去垢剂 SDS。同时将心肌膜蛋白提取液先进行煮样,然后以相同的步骤做免疫沉淀,作为阴性对照组。结果发现去垢剂浓度为 4%时,间隙连接蛋白 43可以与 M_3 受体共同沉淀而被检测,在大约 46 kD处有明显条带;当去垢剂浓度为 10%和 20%时,间隙连接蛋白 43已不能与 M_3 受体共同沉淀,说明去垢剂达到一定浓度时,可破坏心肌 M_3 受体与间隙连接蛋白 43的结构性共定位关系(图 4)。

4 与 M_3 受体在心肌细胞膜上共定位的是间隙连接蛋白 43的磷酸化形式

应用鼠抗酪氨酸磷酸化形式蛋白质的单克隆抗体 p-Tyr(1:200),对与 M_3 受体共沉淀的蛋白质进行免疫印迹,除其他磷酸化形式蛋白质条带外,在 46 kD处可见 1条带(图 5),与用间隙连接蛋白 43的

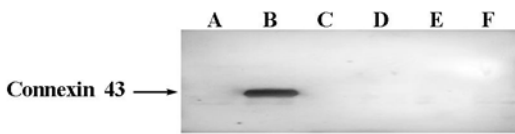


Figure 4 Immunoprecipitation with the M_3 polyclonal antibody, and connexin 43 was detected at 46 kD with its monoclonal antibody. Different concentrations of SDS showed effect on the co-location between M_3 and connexin 43, and boiling the protein was performed before immunoprecipitation as control. A: 4% SDS, boiled; B: 4% SDS, unboiled; C: 10% SDS, boiled; D: 10% SDS, unboiled; E: 20% SDS, boiled; F: 20% SDS, unboiled

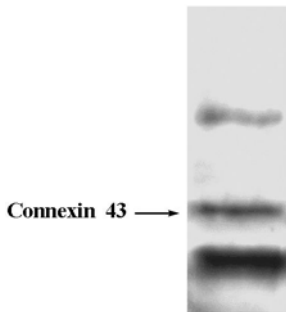


Figure 5 Immunoprecipitation with the M_3 polyclonal antibody, and Western blotting was performed to detect tyrosine phosphorylated protein. The phosphorylation form of connexin 43 was detected at 46 kD prominently

单克隆抗体所检测到的条带重合,说明与 M_3 受体在心肌细胞膜上共定位的是间隙连接蛋白 43的磷酸化形式。

讨论

心律失常的致病因素很多,而由于心肌缺血所导致的心肌细胞缝隙连接形态结构异常,最终影响功能形成病理症状是被公认的主要因素之一^[7,8]。间隙连接蛋白 43是构成心肌细胞间通道和缝隙连接的最基本的蛋白质之一,由它构成的离子通道不但在细胞通讯、代谢偶联、早期胚胎发育及细胞分化过程中起作用,还在心肌缺血再灌注损伤及闰盘重构过程中起着非常重要的作用^[9,10]。在心肌缺血^[11]及心力衰竭^[12]发病过程中,心室间隙连接蛋白 43的含量降低;基因打靶技术证明减少间隙连接蛋白 43的表达可增加室性心动过速的发生^[13],并能在急性心肌缺血过程中明显降低传导速率^[14]。以上结果表明间隙连接蛋白 43在致死性心律失常发病过程中起重要作用。

随着近年来对心脏 M受体各亚型认识的逐渐加深,M受体在心脏功能调节方面作用的研究已经成为寻找治疗心脏缺血性疾病和缺血性心律失常的最佳靶点之一,作者提出的抗心律失常最佳靶点学说^[15,16]更强调 M_3 受体在心肌缺血过程中的保护性调节机制及意义。 M_3 受体激动剂胆碱可明显对抗结扎大鼠冠状动脉前降支所致心律失常,而其阻断剂 4DAMP却加重其作用^[17];匹鲁卡品激动 M_3 受体可介导一种新的延迟整流 K^+ 电流 (I_{KM3}),作者对其生理特性及功能进行研究,首次证明 $M_3 R/I_{KM3}$ 具有降低心肌自律性、抑制心肌细胞膜超极化及抗缺血性心律失常作用^[18,19];进一步研究发现,激动心肌 M_3 受体还可激活 Bcl-2和 ERK等抗凋亡信号分子,并抑制凋亡前体蛋白 Fas和 p38 MAPK的表达,减少细胞内 Ca^{2+} 超载,从而发挥对心肌细胞的保护作用^[19],但其细胞内信号转导机制尚不清楚。

本实验首次发现大鼠心肌 M_3 受体与间隙连接蛋白 43的结构性共定位关系。应用 M受体的特异性抗体对心肌膜蛋白的免疫印迹,检测发现大鼠心肌 5种亚型的 M受体 (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 和 M_5)的条带分子量位置与根据这些蛋白质的氨基酸序列推测分子量所得的结果大致相符,打破了传统认为心肌只存在 M_2 受体的观点,证实大鼠心肌 M受体 5种亚型是共存的。另外,结果中 M_3 受体存在两条带,这可能是其在心肌细胞膜上不同形式的表现,作者

推测其中可能有糖基化或磷酸化修饰的蛋白质,而且不同形式的蛋白质可能在缺血心肌的保护作用中发挥不同作用。应用间隙连接蛋白 43 的特异性抗体,对心肌膜蛋白的免疫印迹检测到其在 40 ~ 46 kD 存在 3 条带,这与在其他组织的研究结果^[20]相似,有文献^[21]报道 41 kD 为其去磷酸化形式,44 及 46 kD 处为其磷酸化形式,其中可能也有糖基化的形式存在,而这些形式的蛋白质在心肌细胞间解耦联过程中的意义也有待进一步探索。

在本实验中,主要探讨大鼠心肌细胞单位膜上 M₃受体与间隙连接蛋白 43 的结构性共定位关系。应用 M 受体 5 种亚型的特异性抗体做免疫沉淀,再以间隙连接蛋白 43 的特异性抗体对与 M 受体共沉淀下的蛋白质进行免疫印迹,在 46 kD 处可以很清楚的发现间隙连接蛋白 43 的 1 条带,这与上述间隙连接蛋白 43 的免疫印迹结果并不矛盾,作者认为并非所有 3 种形式的间隙连接蛋白都与心肌 M 受体结构整合,而是其中的某一种形式参与了心肌的保护作用。激光共聚焦显微镜的结果更直观地证实了大鼠心肌 M₃受体与间隙连接蛋白 43 的结构性共定位关系,间隙连接蛋白 43 主要分布于闰盘,而心肌 M₃受体在细胞膜上呈非均一性分布,但是两者在某些单位膜结构上是相互整合的,这与免疫沉淀结合免疫印迹所得的结果相符。为进一步揭示何种形式的间隙连接蛋白 43 参与了与 M 受体的结构性共定位,作者应用酪氨酸磷酸化形式蛋白质的特异性抗体对与 M₃受体共沉淀的蛋白质进行标记,结果在 46 kD 处同样出现了条带,这说明参与 M₃受体结构整合的是间隙连接蛋白 43 的磷酸化形式。

为深入探索心肌 M 受体与间隙连接蛋白的结构性共定位关系,并排除非特异性蛋白质结合,本实验中采用了逐渐加大离子型去垢剂浓度,观察去垢剂对此结构整合关系的影响。结果发现 SDS 浓度为 4% 时,间隙连接蛋白 43 可以被心肌 M₃受体共沉淀,而当 SDS 浓度达到 10% 时,间隙连接蛋白 43 已不能与心肌 M₃受体共同沉淀。SDS 是一种离子型去垢剂,当其达到一定浓度时,可破坏蛋白质间的非共价键整合关系,这说明间隙连接蛋白 43 与 M₃受体的结构性共定位关系是建立在非共价键关系上的,具体整合方式还有待在结构生物学水平进一步研究。本文的研究旨在发现存在于间隙连接蛋白 43 与 M₃受体之间的关系,而这一关系正是建立在两者作为抗心律失常药物靶点的基础上的,只有发现了这一关系,才能为进一步筛选药物及做出评价

提供理论依据。结构是功能的基础,对生物大分子和生物大分子聚集体的精细结构和功能的深入研究有助于在分子层次上探索细胞生命活动更加本质的规律。关于心肌 M 受体与间隙连接蛋白 43 的互相调节及其在缺血性心律失常发生发展中的作用和药物调节靶点及最佳靶点,将在今后的实验中做进一步研究。

References

- [1] Yang BF, Sun JP, Li GR, et al. Effects of novel class III antiarrhythmic drug RP58866 on I_{K1} and I_{to} in guinea pig and canine ventricular myocytes [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1999, 34: 730 - 733.
- [2] Yang BF, Shan HL, Gong DM, et al. Study on the best targets of antiarrhythmic drugs [J]. J Harbin Univ Commer (Nat Sci) (哈尔滨商业大学学报 自然科学版), 2002, 18: 1 - 5.
- [3] Ando M, Katare RG, Kakinuma Y, et al. Efferent vagal nerve stimulation protects heart against ischemia-induced arrhythmias by preserving connexin 43 protein [J]. Circulation, 2005, 112: 164 - 170.
- [4] Wang HZ, Han H, Zhang LM, et al. Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart [J]. Mol Pharmacol, 2001, 59: 1029 - 1036.
- [5] Xiao J, Yue P, Pan ZW, et al. Optimized method for extracting membrane proteins from the myocardium and its application under ischemia [J]. J Harbin Med Univ (哈尔滨医科大学学报), 2005, 39: 474 - 478.
- [6] Li BX, Yang BF, Zhou J, et al. Inhibitory effects of berberine on I_{K1} , I_K and HERG channels of cardiac myocytes [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2001, 22: 125 - 131.
- [7] Saffitz JE, Schuessler RB, Yamada KA. Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias [J]. Cardiovasc Res, 1999, 42: 309 - 317.
- [8] Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, et al. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin 43 during electrical uncoupling induced by ischemia [J]. Circ Res, 2000, 87: 656 - 662.
- [9] Schulz R, Heusch G. Connexin 43 and ischemic preconditioning [J]. Cardiovasc Res, 2004, 62: 335 - 344.
- [10] Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, et al. Disturbed connexin 43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia [J]. Circulation, 1997, 95: 988 - 996.
- [11] Kaprielian RR, Gunning M, Dupont E, et al. Downregulation of immunodetectable connexin 43 and decreased gap junction size in the pathogenesis of chronic

- hibernation in the human left ventricle [J]. Circulation, 1998, 97: 651 - 660.
- [12] Poelzing S, Rosenbaum DS. Altered connexin 43 expression produces arrhythmia substrate in heart failure [J]. Am J Physiol, 2004, 287: H1762 - H1770.
- [13] Lemer DL, Yamada KA, Schuessler RB, et al. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice [J]. Circulation, 2000, 101: 547 - 552.
- [14] Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, et al. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin 43 [J]. Circ Res, 2001, 88: 333 - 339.
- [15] Liu Y, Sun HL, Wu H, et al. Protective effect of M₃ receptor on H₂O₂-induced apoptosis of rat myocardial cells *in vitro* [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2004, 39: 887 - 891.
- [16] Li L, Liu Y, Li HL, et al. Protective effects of M₃ receptor on rat cardiomyocytes [J]. J Harbin Med Univ (哈尔滨医科大学学报), 2004, 38: 416 - 420.
- [17] Liu Y, Xu CQ, Jiao JD, et al. M₃-R/I_{KM3} — a new target of antiarrhythmic agents [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2005, 40: 8 - 12.
- [18] Wang HZ, Shi H, Lu YJ, et al. Pilocarpine modulates the cellular electrical properties of mammalian hearts by activating a cardiac M₃ receptor and a K⁺ current [J]. Br J Pharmacol, 1999, 126: 1725 - 1734.
- [19] Yang BF, Lin HX, Xu CQ, et al. Improvement of control function and promotion of cardiomyocyte survival in ischemic hearts: evidence for the role of cardiac M₃ subtype muscarinic acetylcholine receptors [J]. Cell Physiol Biochem, 2005, 16: 163 - 174.
- [20] Li W, Hertzberg EL, Spray DC, et al. Regulation of connexin 43-protein binding in astrocytes in response to chemical ischemia/hypoxia [J]. J Biol Chem, 2005, 280: 7941 - 7948.
- [21] Beardslee MA, Lemer DL, Tadros PN, et al. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin 43 during electrical uncoupling induced by ischemia [J]. Circ Res, 2000, 87: 656 - 662.