

## 不同频率电刺激膈神经导致膈肌肌浆网 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 和 $\text{Ca}^{2+}$ 释放-摄取动力学改变

张睢扬\*, 刘刚, 王东林, 郭先健, 钱桂生

(第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所, 重庆 400037)

**摘要:** 研究不同频率慢性电刺激(CES)后兔膈肌肌浆网(SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性以及 SR  $\text{Ca}^{2+}$  摄取-释放动力学对不同频率 CES 的适应性变化。建立不同频率 CES 组; 用定磷法测定 SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性; 用 Fura-2 荧光法测定 SR  $\text{Ca}^{2+}$  摄取-释放动力学。与对照组比较, 慢性低频电刺激 10 Hz 和 20 Hz 组的 SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性明显降低 ( $P < 0.01$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  释放-摄取动力学也显著降低 ( $P < 0.01$ ); 慢性高频电刺激 50 Hz 和 100 Hz 组的 SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性则显著升高 ( $P < 0.01$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  释放-摄取动力学亦明显升高 ( $P < 0.01$ )。实验提示, CES 后不同频率 CES 导致膈肌 SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase、 $\text{Ca}^{2+}$  摄取-释放动力学产生不同的适应性变化; 对不同功能状态的膈肌应用不同频谱的慢性电刺激可能具有重要的临床意义。

**关键词:** 膈肌;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; 动力学; 慢性电刺激;

**学科分类号:** Q55; Q244

## Changes in SR $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity, $\text{Ca}^{2+}$ release and uptake kinetics of diaphragm muscle after different-frequency chronic electrical stimulation of diaphragmatic nerve

ZHANG Sui-Yang\*, LIU Gang, WANG Dong-Lin, GUO Xian-Jian, QIAN Gui-Sheng

(Institute of Respiratory Medicine of Xinqiao Hospital,

Third Military Medical University, Chongqing 400037)

**Abstract:** To study adaptation of rabbit diaphragm muscle after different-frequency chronic electrical stimulation,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and  $\text{Ca}^{2+}$  release-uptake kinetics of sarcoplasmic reticulum (SR) were respectively measured by detecting inorganic phosphorus ion and Fura-2 fluorescence. SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of the low-frequency stimulation group was significantly lower than that of the control group ( $P < 0.01$ ), but it was significantly higher in the high-frequency stimulation group against control ( $P < 0.01$ ). The kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  release and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was significantly lower in low-frequency group than that of the control ( $P < 0.01$ ), but the kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  release and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was significantly higher than that of the control ( $P < 0.01$ ). It is thought that different frequency electrical stimulation induced different adaptative changes in SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity, and  $\text{Ca}^{2+}$  release and uptake kinetics of rabbit diaphragm muscle.

**Key words:** diaphragm muscle;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; kinetics; chronic electrical stimulation

膈肌慢性电刺激(chronic electrical stimulation, CES)在高位截瘫引起的膈肌麻痹、中枢性通气不足、长期机械通气引起的膈肌废用性萎缩的治疗和在慢性阻塞性肺病的膈肌康复中起重要作用。已发现不同频率 CES 后膈肌肌纤维各亚型间比例发生变

化<sup>[1,2]</sup>, 但对不同频率膈肌 CES 后肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性和  $\text{Ca}^{2+}$  摄取-释放动力学的适应性变化未见报道。为此, 本文研究了不同频率 CES 后膈肌 SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 和  $\text{Ca}^{2+}$  摄取-释放动力学的适应性变化, 旨在探讨不同功能状

Received 2000-09-18 Accepted 2000-12-21

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39470325).

\* Corresponding author. Tel: 010-66343161, E-mail: suiyangzhang@yahoo.com

态的膈肌使用不同频率 CES 的可能性。

## 1 材料和方法

**1.1 仪器及试剂** 国泰 TTC-4 电刺激仪和恒温水浴箱购自上海, 高速低温离心机购自湖南湘仪厂, Luminescence spectromeyer LS 50B 购自美国 PE 公司。ATP-Na<sub>2</sub>、HEPS、Fura-2、EGTA、NaN<sub>3</sub> 等购自 Sigma 公司; 其它化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物及 CES 模型的建立** 采用日本大白兔 30 只(1.5~1.75 kg), 雌雄不拘。常规麻醉消毒后, 在肩胛举肌和胸头肌下 1/3 与斜方肌的交接处和胸骨旁二、三肋间的胸大肌处, 分别切开皮肤 1~1.5 cm, 钝性分离皮下组织; 将铂金刺激电极置于肩胛举肌和胸头肌下 1/3 与斜方肌交接处的颈部膈神经上, 无关电极置于胸部皮下; 电极导线从皮下潜行至颈后皮肤切口处引出、固定。电极呈圆型, 约 0.56 cm<sup>2</sup>。术后 1 周, 随机分为正常对照组、10 Hz、20 Hz、50 Hz 和 100 Hz 组, 每组 6 只; 以正常膈神经发放的冲动频率 30~40 Hz 为准, 10 Hz 和 20 Hz 为低频电刺激组 (chronic low-frequency electrical stimulation, CLFES), 50 Hz 和 100 Hz 为高频电刺激组 (chronic high-frequency electrical stimulation, CHFES)。CES 参数为主频 0.75 s, 串长 0.25 ms, 波宽 0.2 ms, 3~6 strains/次, 45 beats/min, 电压 10~20 V, 以调节到胸腹最佳运动为准。对照组不刺激。刺激时间 2×2 h/日, 每周刺激 6 d, 休息 1 d, 连续刺激 5 周。

**1.2.2 SR 标本的提取** 基本参照 Carl 法<sup>[3]</sup>, 并有所改进。将 20 mg/kg 戊巴比妥钠兔耳静脉注入麻醉后, 取肋膈肌标本。标本用预冷的标准 Hank's 液冲洗 3 次, 再置于预冷的 5 倍体积(重量比容量)SR 蛋白囊 (protein capsule) 提取缓冲液中。SR 蛋白囊缓冲液含蔗糖 0.25 mol/L, Tris HCl 10 mmol/L, pH 7, EDTA-Na<sub>2</sub> 0.1 mmol/L。膈肌剪碎, 高速匀浆 30 s×2 次, 间隔 30 s。组织匀浆经四层纱布过滤, 离心 1000 g, 20 min, 保留上清液。沉淀肌丸再加 5 倍体积 SR 蛋白囊提取缓冲液, 重复前述匀浆离心过程, 收集混合 2 次上清液, 弃沉淀肌丸。离心 40000 g, 90 min, 弃上清, 沉淀用 0.6 mol/L KCl 混悬, 冰上静置 15 min; 离心 40000 g, 90 min。最后沉淀的 SR 蛋白囊用不含 EDTA 的上述 SR 蛋白囊提取缓冲液混悬, Lorry 法蛋白定量, 调蛋白浓度至 2 mg/ml, 用液氮速冻后, 置于 -70℃ 冰箱保存备用。

**1.2.3 SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性测定** 用定磷法测定。

反应液含 (mmol/L) Tris-HCl 20, pH 6.8, KCl 100, MgCl<sub>2</sub> 5, ATP-Na<sub>2</sub> 4, CaCl<sub>2</sub> 0.1, NaN<sub>3</sub> 5 和 SR 蛋白囊 0.5 mg, 反应终体积为 1 ml。加入 ATP 后将反应液置 37℃ 水浴 30 min, 用 1 ml 15% 三氯醋酸中止反应。离心 20000 g, 15 min, 取 1 ml 上清液分别加 2 ml 显色剂和 1 ml 水于 700 nm 比色测定 ATP 水解后的无机磷含量。显色剂含 4% FeSO<sub>4</sub> 和 1% 钼酸铵。酶活性以 μmol/L pi/mg protein·h<sup>-1</sup> 表示。

**1.2.4 SR Ca<sup>2+</sup> 摄取-释放功能测定** Ca<sup>2+</sup> 摄取按 Kangacin 等法<sup>[4, 5]</sup> 测定。反应液含 (mmol/L): Tris-HCl 20, pH 6.8, KCl 100, MgCl<sub>2</sub> 5, 草酸钾 5, CaCl<sub>2</sub> 0.1, ATP-Na<sub>2</sub> 4, Fura-2 2 μmol/L 和 SR 蛋白囊 5 μg/ml, 反应总体积为 2 ml。22~24℃ 孵育 3 min, 置反应液于荧光分光计石英杯中。样品用杯中旋转的磁力搅拌棒混均, 待其基线平衡后, 用 CaCl<sub>2</sub> 10 mmol/L 10 μl 触发反应, 测定 340/380 nm 比率表示 Ca<sup>2+</sup> 摄取绝对值。Ca<sup>2+</sup> 释放按 Ritucci 等法测定<sup>[6]</sup>。反应液含 (mmol/L): KCl 150, MOPS 20, pH 6.8, MgCl<sub>2</sub> 0.5, Fura-2 2 μmol/L 和 SR 蛋白囊 10 μg/ml, 反应体积为 2 ml。反应液 37℃ 孵化 5 min, 倒入荧光分光光度计石英杯中, 加 CaCl<sub>2</sub> 25 mmol/L, 待其摄取平衡后, 用咖啡因 4 mmol/L 20 μl 触发释放反应, 测定 340/380 nm 比率表示 Ca<sup>2+</sup> 释放绝对值。

**1.3 统计分析** 用 *t* 检验和方差分析进行相应处理, 数据以 mean ± SD 表示。

## 2 结果

### 2.1 各组 SR Ca<sup>2+</sup> ATPase 活性变化 (表 1)

从表 1 可见, 同对照组比较, CLFES 10 Hz 和 20

表 1. 不同频率慢性电刺激后膈肌 SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 的活性变化

Table 1. Changes in the SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of diaphragm muscle after different-frequency chronic electrical stimulation (mean ± SD)

Group	Parameter of Ca <sup>2+</sup> -ATPase (μmol/L pi/mg Pr·h <sup>-1</sup> )
Control	70.13 ± 13.25**
10 Hz	53.87 ± 8.22***
20 Hz	59.07 ± 4.85***
50 Hz	83.15 ± 10.89**
100 Hz	94.62 ± 12.92**

\*\**P* < 0.01 compared with control group; \*\*\**P* < 0.01, compared with CHFES groups, *n* = 6.

Hz 组的  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 活性明显降低 ( $P < 0.01$ ), 而 CHFES 50 Hz 和 100 Hz 组的  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 活性显著升高 ( $P < 0.01$ )。

## 2.2 各组 SR $\text{Ca}^{2+}$ 释放-摄取动力学变化

同对照组比较, CLFES 组 SR  $\text{Ca}^{2+}$  释放量明显减

少 ( $P < 0.01$ ), 波幅降低,  $\text{Ca}^{2+}$  摄取速度明显减慢 ( $P < 0.01$ ), 摄取时间明显延长; 而 CHFES 组 SR  $\text{Ca}^{2+}$  释放量明显增加 ( $P < 0.01$ ), 波幅升高;  $\text{Ca}^{2+}$  摄取速度明显加快 ( $P < 0.01$ ), 摄取时间明显缩短 (表 2、3 和图 1、2)。

表 2. 不同频率慢性电刺激后膈肌 SR  $\text{Ca}^{2+}$  释放的变化

Table 2. Changes in  $\text{Ca}^{2+}$  release of diaphragm muscle SR after different-frequency chronic electrical stimulation (mean  $\pm$  SD) (340/380 nm rate)

Time (s)	Group				
	Control	10 Hz	20 Hz	50 Hz	100 Hz
5	2.26 $\pm$ 0.19	1.89 $\pm$ 0.08****	2.17 $\pm$ 0.06**	2.36 $\pm$ 0.06	3.13 $\pm$ 0.20**
10	3.49 $\pm$ 0.11	2.37 $\pm$ 0.06****	2.60 $\pm$ 0.11****	3.35 $\pm$ 0.10	4.18 $\pm$ 0.27**
15	3.63 $\pm$ 0.13	2.71 $\pm$ 0.09****	3.20 $\pm$ 0.09****	4.49 $\pm$ 0.12**	5.38 $\pm$ 0.25**
20	3.99 $\pm$ 0.09	3.16 $\pm$ 0.06****	3.33 $\pm$ 0.10****	5.24 $\pm$ 0.17**	6.68 $\pm$ 0.09**
25	4.65 $\pm$ 0.05	3.16 $\pm$ 0.05****	4.12 $\pm$ 0.05****	5.63 $\pm$ 0.15**	6.83 $\pm$ 0.04**
30	4.87 $\pm$ 0.05	3.16 $\pm$ 0.05****	4.12 $\pm$ 0.05****	6.11 $\pm$ 0.08**	6.83 $\pm$ 0.03**

\*\* $P < 0.01$ , compared with control; \*\* $P < 0.01$ , compared with CHFES groups,  $n = 6$ .

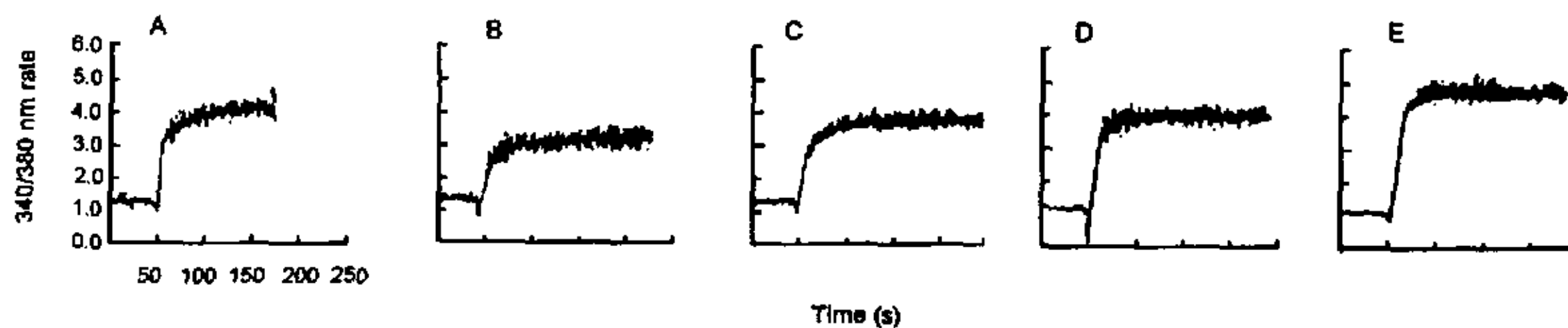


图 1. 不同频率慢性电刺激后膈肌 SR  $\text{Ca}^{2+}$  释放的变化曲线

Fig. 1.  $\text{Ca}^{2+}$  release curve of rabbit diaphragm muscle SR after different-frequency chronic electrical stimulation. A. Control; B. 10 Hz; C. 20 Hz; D. 50 Hz; E. 100 Hz. Scales of x and y axes in Fig. 1B ~ E are the same as that in Fig. 1A.

表 3. 不同频率慢性电刺激后膈肌 SR  $\text{Ca}^{2+}$  摄取变化

Table 3. Changes in  $\text{Ca}^{2+}$  uptake of diaphragm muscle SR after different-frequency chronic electrical stimulation (mean  $\pm$  SD) (340/380 nm rate)

Time (s)	Group				
	Control	10 Hz	20 Hz	50 Hz	100 Hz
0	9.37 $\pm$ 0.10	9.40 $\pm$ 0.10	9.72 $\pm$ 0.13	8.27 $\pm$ 0.12*	8.39 $\pm$ 0.11*
50	7.40 $\pm$ 0.19	8.85 $\pm$ 0.20****	9.01 $\pm$ 0.08****	5.65 $\pm$ 0.12**	5.29 $\pm$ 0.11**
100	4.30 $\pm$ 0.13	8.36 $\pm$ 0.21****	6.75 $\pm$ 0.12****	1.49 $\pm$ 0.11**	1.56 $\pm$ 0.12**
150	2.35 $\pm$ 0.40	7.19 $\pm$ 0.11****	5.08 $\pm$ 0.17****	0.81 $\pm$ 0.07**	0.94 $\pm$ 0.08**
200	1.87 $\pm$ 0.21	5.66 $\pm$ 0.13****	4.03 $\pm$ 0.09****	0.40 $\pm$ 0.06**	0.55 $\pm$ 0.10**
250	1.92 $\pm$ 0.08	3.74 $\pm$ 0.14****	3.65 $\pm$ 0.15****	0.30 $\pm$ 0.04**	0.28 $\pm$ 0.04**
300	1.91 $\pm$ 0.08	3.37 $\pm$ 0.17****	3.69 $\pm$ 0.13****	0.21 $\pm$ 0.03**	0.14 $\pm$ 0.04**
350	1.87 $\pm$ 0.08	3.22 $\pm$ 0.09****	3.65 $\pm$ 0.15****	0.12 $\pm$ 0.02**	0.10 $\pm$ 0.04**
400	1.77 $\pm$ 0.10	2.46 $\pm$ 0.09****	3.27 $\pm$ 0.14****	0.09 $\pm$ 0.01**	0.10 $\pm$ 0.04**

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared with control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared with CHFES groups;  $n = 6$ .

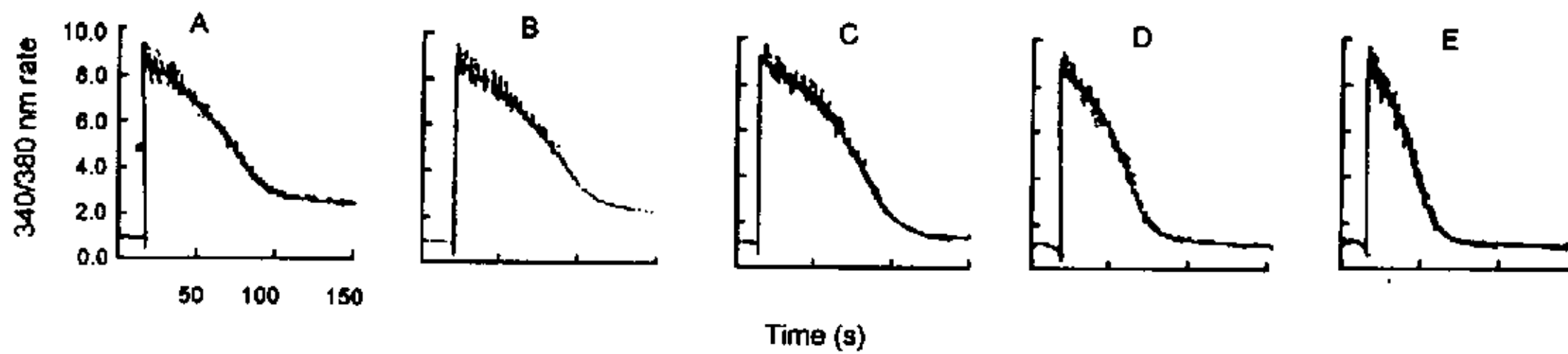


图 2. 不同频率慢性电刺激后膈肌 SR  $\text{Ca}^{2+}$  摄取变化曲线

Fig. 2.  $\text{Ca}^{2+}$  uptake curve of rabbit diaphragm muscle SR after different-frequency chronic electrical stimulation. A. Control; B. 10 Hz; C. 20 Hz; D. 50 Hz; E. 100 Hz. Scales of x and y axes in Fig. 2B ~ E are the same as that in Fig. 2A.

### 3 讨论

#### 3.1 兔膈肌 SR $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的适应性改变

本研究发现,兔膈肌 SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性在不同频谱 CES 后产生不同的适应性变化。CLFES 组表现为 SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的明显降低 ( $P < 0.05$ ),以 10 Hz 组最为明显;而 CHFES 组则表现为 SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的显著升高 ( $P < 0.05$ ),以 100 Hz 组最为显著。结合不同频率对二氢嘧啶受体 (dihydropyridine receptor, DHPR) 和 Ryanodine 受体 (RyR) 表达的影响,提示不同频率电脉冲可能影响了  $\text{Ca}^{2+}$  信号基本单位依赖的不同刺激释放浓度的等级体系,建立了一个频率兴奋性刺激敏感的  $\text{Ca}^{2+}$  振荡,表现出  $\text{Ca}^{2+}$  信号的频率调节性<sup>[7]</sup>。

兔膈肌由大约 22.9% 的 I 型肌纤维、48.1% 的 II A 肌纤维和 27.9% 的 II B 肌纤维构成,有两种  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 亚型,即 SERCA<sub>1a</sub> 和 SERCA<sub>2a</sub><sup>[8,9]</sup>。I 型肌纤维是慢收缩纤维,II B 肌纤维是快收缩纤维,II A 肌纤维介于 I 型和 II B 肌纤维之间。Lunde 等发现<sup>[16]</sup>,相同重量下,快肌纤维 RyR 的含量是慢肌纤维的 3~4 倍;快肌纤维 RyR 与  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 分子的比例是 1:400,而慢肌纤维 RyR 与  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的比值为 1:200;同时快肌纤维中 II B 肌纤维的 RyR 和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 含量又高于 II A 肌纤维, SERCA<sub>1a</sub> 的活性高于 SERCA<sub>2a</sub>。在不同频率 CES 后,膈肌肌纤维亚型的比例发生改变,表现为 CLFES 时兔膈肌氧化代谢 I 型肌纤维明显增加,II B 肌纤维明显减少;CHFES 时则 II B 肌纤维明显增加,I 型肌纤维明显减少;不同频率引起  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的变化同肌纤维的变化相一致,提示  $\text{Ca}^{2+}$  调节蛋白和收缩蛋白变化的一致性,也进一步支持了对不同功能状态膈肌的训练和康复应采用不同频率 CES 的设想<sup>[10]</sup>。

#### 3.2 $\text{Ca}^{2+}$ 释放-摄取动力学的适应性改变

膈肌钙释放单位中 DHPR、RyR 和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

活性决定了 SR  $\text{Ca}^{2+}$  释放-摄取动力学<sup>[13,14]</sup>。本研究中 CLFES 组  $\text{Ca}^{2+}$  释放-摄取速度均明显降低,CHFES 组则明显升高。这种改变无疑与钙释放单位中 DHPR、RyR 和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性改变密切相关<sup>[9-12]</sup>。在 CLFES 组,由于 RyR<sub>1</sub> 表达下调,RyR<sub>2</sub> 出现表达,同时骨骼肌 DHPR 表达下降和可能的心肌型 DHPR 表达升高,SR 萎缩变小,钙释放单位由骨骼肌型向心肌型转化,E-C 耦联时  $\text{Ca}^{2+}$  主要由细胞外进入细胞内, $\text{Ca}^{2+}$  瞬时变慢,出现 SR  $\text{Ca}^{2+}$  释放减少、波幅降低,表现为慢肌型  $\text{Ca}^{2+}$  释放特征。CLFES 使  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的 SERCA<sub>1a</sub> 亚型表达下调和 SERCA<sub>2a</sub> 亚型可能表达上调<sup>[15]</sup>,而且慢肌中 SERCA<sub>2a</sub> 的数量又明显低于快肌中的 SERCA<sub>1a</sub>,SERCA<sub>2a</sub> 摄取  $\text{Ca}^{2+}$  的速率又明显慢于 SERCA<sub>1a</sub><sup>[16]</sup>,导致 SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性降低, $\text{Ca}^{2+}$  摄取明显减慢。CHFES 组则恰好相反,RyR<sub>1</sub> 和骨骼肌型 DHPR 表达升高, $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性增加,表现为快肌型钙释放单位特征和摄取速率, $\text{Ca}^{2+}$  释放-摄取加速,同时对细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  变化的敏感性降低<sup>[17]</sup>。CLFES 组和 CHFES 组肌条力学特征同  $\text{Ca}^{2+}$  释放-摄取动力学特征相一致的现象支持这些推断<sup>[17]</sup>,其适应性变化的差异性可能在临床应用中起重要作用。

### 参 考 文 献

- [1] Pette D, Vrbov G. What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve*, 1999, 22 (6):666 ~ 677.
- [2] Pette D. Adaptation of skeletal muscle to increased neuromuscular activity as induced by chronic low frequency stimulation. *Scand J Rehabil Med Suppl*, 1994, 30:7 ~ 8.
- [3] Carl SL, Felix K, Caswell AH. Immunolocalization of triadin, DHP receptors and ryanodine receptors in adult and developing skeletal muscle of rats. *Muscle Nerve*, 1995, 18: 1232 ~ 1243.
- [4] Kargacin ME, Scheid CR, Honeman TW. Continuous monitoring of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in membrane vesicles with fura-2. *Am*

- J Physiol*, 1988, 245(24):C694 ~ C698.
- [5] Kargacin ME, Kargacin GJ. Methods for determining cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump kinetics from fura-2 measurements. *Am J Physiol*, 1994, 267(4 Pt 1):C1145 ~ C1151.
- [6] Ritucci NA, Corbett AM. Effect of  $\text{Mg}^{2+}$  and ATP on depolarization-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in isolated triads. *Am J Physiol*, 1995, 269(1 Pt 1):C85 ~ C95.
- [7] Zhang SY (张睢扬), Guo XJ (郭先健). Elementary events and characteristics of calcium signaling. *Prog Physiol Sci (生理科学进展)*, 2000, 31(2):109 ~ 114 (Chinese).
- [8] Kilarskiand W, Sjostrom M. Systematic distribution of muscle fibre types in the rat and rabbit diaphragm: a morphometric and ultrastructural analysis. *J Anat*, 1990, 168:13 ~ 30.
- [9] Gea JG. Myosin gene expression in the respiratory muscle. *Eur Respir J*, 1997, 10:2404 ~ 2410.
- [10] Eberstein A, Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Med Sci Sports Exerc*, 1996, 28(12):1463 ~ 1469.
- [11] Kelbl BM, Ayoub AT, Pette D. Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Lett*, 1998, 422:381 ~ 384.
- [12] Perenon Y, Navarro J, Hamilton M *et al.* Chronic stimulation differentially modulates expression of mRNA for dihydropyridine receptor isoforms in rat fast twitch skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 235:217 ~ 222.
- [13] Zhang SY (张睢扬), Liu G (刘刚), Wang DL (王东林) *et al.* mRNA and protein expression of skeletal DHPR $\alpha$ 1 and RyRs in diaphragm muscle of rabbits. *Acta Physiol Sin (生理学报)*, 2000, 52(6):497 ~ 501 (Chinese, English abstract).
- [14] Zhang SY (张睢扬), Wang DL (王东林), Liu G (刘刚) *et al.*  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and  $\text{Ca}^{2+}$  transport in sarcoplasmic reticulum of rabbit diaphragm. *Basic Med Sci Clin (基础医学与临床)*, 2000, 20(5):61 ~ 64 (Chinese, English abstract).
- [15] Zhang KM, Hu P, Wang SW *et al.* Fast- and slow-twitch isoforms (SERCA $_{1a}$  and SERCA $_{2a}$ ) of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase are expressed simultaneously in chronically stimulated muscle fibers. *Pflugers Arch*, 1997, 433(6):766 ~ 772.
- [16] Lund PK, Sejersted OM. Intercellular calcium signalling in striated muscle cells. *Scand J Clin Lab Invest*, 1997, 57:559 ~ 568.
- [17] Zhang SY (张睢扬), Wang DL (王东林), Liu G (刘刚) *et al.* Adaptation of diaphragm muscle strip mechanics to chronic electrical stimulation and the effect of change in extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in rabbit. *Chin Appl Physiol J (中国应用生理学杂志)*, 2000, 16(4):305 ~ 309 (Chinese, English abstract).