

心肌细胞钙波随机性研究*

唐爱辉 王世强**

(北京大学生命科学院生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 钙波作为一种胞内的钙释放通道相互触发而产生的连锁反应广泛存在于多种细胞。在心肌中, 由于与心律失常的发生有关, 心肌细胞中的钙波近年来引起广泛关注。为了在微观上研究钙波的产生和传播过程, 利用激光共聚焦钙成像技术对心肌细胞中的钙波进行了成像。实验和分析发现, 钙波的起始是钙火花连续随机募集的过程, 因此正常细胞中钙波发生概率很低。钙波传播过程中相邻位点开放的时间间隔接近正态分布, 显示传播过程具有较大的随机性。且钙波速度越慢, 位点间时间间隔的离散度越高。为了进一步研究这种随机性产生的内在机制, 构建了一个数值模型对心肌细胞中的钙波进行模拟。研究证明, 钙释放位点开放的随机性能够完整地解释实验中观察到的钙波传播的随机行为。实验分析和数值模拟相互印证, 首次明确证明, 钙波起始和传播过程的随机性, 并揭示了该随机性与钙释放位点开放概率的关系。

关键词 钙波, 心肌细胞, 随机过程, 模型

学科分类号 Q4, Q6

钙离子是一种重要的信使物质, 对各种各样的细胞活动发挥着重要的调节作用^[1]。为完成不同的生命活动, 细胞产生具有不同幅度、不同时间空间特性的钙信号^[1]。钙致钙释放(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR)过程通常作为一种放大钙信号的机制广泛存在于多种细胞中^[1]。在心肌中, 细胞兴奋-收缩耦联所需的大多数钙离子来源于胞内钙库的释放, 其幅度受到由参与释放的钙释放位点(Ca^{2+} release unite, CRU)的数量决定^[2]。在一般情况下, CRU 的开放只局部受控于与其相邻细胞膜上的 L 型钙通道^[3,4]。但是, 由于 CICR 具有正反馈性质, 所以存在相邻 CRU 相互触发开放的可能性, 即形成钙波^[5,6]。在一些钙库过饱和的病理情况下, 这种可能性将大大增加^[5,7]。已有的研究表明, 心肌细胞中的钙波能够引起心律失常的发生^[8,9]。因此, 深入了解钙波的性质将具有重要的临床意义。

我们之前的研究发现, 细胞膜上的 L 型钙通道与相邻的肌质网 CRU 之间的触发耦联过程并不是决定性的, 而是一个随机过程^[10]。这种不确定性在本质上是由 CRU 开放的随机性造成的, 因此, 钙波传播过程其实是 CRU 之间的一种依次的随机触发过程。那么, 这种随机性对钙波的传播将产生什么影响呢? 以往对心肌细胞钙波的实验研究主要

集中在其与心律失常之间的关系上, 对其传播过程本身的研究很少^[9]。在相关的数值模拟研究中, CRU 的开放条件往往设定为确定的阈值, 由此产生的钙波也不存在随机性^[11,12]。Izu 等^[13]的研究首次将 CRU 的开放概率引入模型, 但其研究仅仅证明了存在随机性的系统中能够产生钙波, 对钙波行为受 CRU 随机性的影响并未做出深入研究。我们的实验研究证实钙波传播过程中前沿 CRU 的募集的确存在随机性, 因此有必要将 CRU 耦联的随机性引入模型, 探讨其对钙波行为的影响。本研究结合实验观察和数值模拟, 对钙波传播过程中的随机性及其受钙释放位点性质的影响作一深入探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用心肌细胞来自成年 SD 大鼠(体重 200~300 g), 由标准酶解方法分离得到^[14,15]。首

* 国家重点基础研究发展规划(973)(2004CB720007), 国家高技术研究发展计划(863)(2007AA02Z457), 国家自然科学基金(30721064, 30730013, 30425035)和美国 NIH(R01 TW007269)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62755002, E-mail: wsq@pku.edu.cn

收稿日期: 2007-12-06, 接受日期: 2008-06-16

先, 将心脏快速从麻醉动物中取出并使用 37℃ 无钙缓冲液灌注 5 min, 缓冲液成分如下: 110 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L MgCl₂, 1.2 mmol/L NaH₂PO₄, 20 mmol/L NaHCO₃, 30 mmol/L 牛磺酸, 10 mmol/L 葡萄糖, pH 7.35. 溶液用 95% O₂、5% CO₂ 混合气连续充灌. 之后组织用含有 0.5 g/L 胶原酶(Sigma, Type 1A)、1% 牛血清白蛋白(Sigma, fraction V)和 75 μmol/L Ca²⁺ 的缓冲液灌流 15 min. 然后切下左心室并在消化液中剪碎. 最后将收获的细胞储存于室温的 Tyrode 溶液中, 溶液成分如下: 135 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L CaCl₂, 1.2 mmol/L MgCl₂, 1.2 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L 葡萄糖, 5 mmol/L HEPES, pH 7.35.

1.2 方法

1.2.1 钙荧光成像. 将分离的心肌细胞置于含有 2.5 μmol/L fluo-4 AM (Molecular Probes) 的 Tyrode 溶液中, 在 37℃ 静置 5 min 使染料进入细胞^[15, 16]. 钙荧光成像使用 Zeiss LSM510 meta 激光共聚焦显微镜完成, 使用 40 倍 1.3 N.A. 物镜, 激发光波长 488 nm, 对波长大于 505 nm 的发射光进行采集成像. 扫描线平行于心肌细胞纵轴, 避开细胞核, 扫描图像大小为 512 × 960(时间轴×空间轴), 时间分辨率为 0.768 ms, 空间分辨率为 0.045 μm, 断层厚度为 1.5 μm. 实验中所用细胞外液为含有 1 mmol/L Ca²⁺ 的 Tyrode 溶液, 所有实验均在室温下完成(23~25℃).

1.2.2 松钳膜片钳. 电极内液与细胞外液成分相同, 入液电阻控制在 3~5 MΩ, 在电极内无负压条件下建立细胞贴附式膜片钳, 封接电阻 10~15 MΩ. 在共聚焦扫描成像的同时对局部膜片进行去极化刺激, 刺激模式为电压钳阶跃方波, 波宽 400 ms. 去极化电位为^[10, 16]: 去极化电位=静息膜电位+阶跃电位×(1-电极电阻/封接电阻).

1.2.3 图像分析. 为了分辨线扫描图像中单个 CRU 的活动, 我们对图像进行如下处理: 首先对原始图像 I 进行平滑降噪得到 I' . 然后, 为了增强时间轴上对 CRU 开放事件的分辨率, 对 I' 在时间上进行间隔为 10 ms 的微分处理得到 I_t , 为了增强空间上对局部信号的分辨率, 从 I' 扣除在空间上以 2 μm 范围平滑得到的本底, 从而得到 I_s . 最后, 将经过时间和空间信号强化处理的图像相乘再除以原图像, 就得到能够清晰分辨单个 CRU 活动的图像 I_{CRU} , 即 $I_{CRU} = I_t \cdot I_s / I'$. 分析过程由编写的 IDL 程序运算完成.

1.2.4 数值模型. 我们的模型基于已有的 FDF 模型建立^[11, 17, 18]. 这是一个描述心肌细胞胞内钙库钙释放活动的简化模型. 分别进行了一维和二维模拟, 以下叙述主要针对二维模型, 将其中 y 方向参数删去即为一维模型. x 和 y 方向分别代表心肌细胞长轴方向和横管方向, 这两个方向上 CRU 之间的间隔分别为 2.0 μm 和 1.0 μm^[19, 20]. 细胞中钙离子浓度 u 随时间 t 的变化可由以下微分方程描述:

$$\frac{\partial u(x, y)}{\partial t} = -\frac{vu(x, y)^4}{k^4 + u(x, y)^4} + D_x \frac{\partial^2 u(x, y)}{\partial x^2} + D_y \frac{\partial^2 u(x, y)}{\partial y^2} + \sum_m \sum_{i,j} \delta(x-x_i) \delta(y-y_j) \eta(t-T_n^m) + J_{\text{leak}}$$

其中, 等号后第一项表示胞质钙离子被清除的过程, 主要由 SERCA 来完成, v 表示钙泵的最大回收钙流, k 表示钙泵与钙离子的半结合浓度. 第二、三项代表扩散项, D_x , D_y 为钙离子在 x 和 y 方向的扩散系数. 第四项代表钙释放通道的行为. 最后一项表示 SR 漏钙的速率, 这里为了控制运算成本将其简化为一个常数. 第四项的意思是 (x_i, y_j) 处的钙释放位点满足 T_n^m 的条件时发生一次 η 函数形式的释放活动. 对于恒定阈值条件来说, T_n^m 条件为该处钙浓度 u 大于设定阈值 u_c 且钙浓度处于上升阶段, 即 $u_{t+i} > u_t$. 后一个条件是为了保证钙波波前的单向传播. 对于随机开放条件来说, T_n^m 表示为一个概率函数, CRU 开放概率为 $p = p_{\text{Max}} / (1 + (K/u)^{\text{Hill}})^{[7]}$, 其中 p_{Max} 为最大开放概率, K 为半最大概率时的钙离子浓度, Hill 为希尔系数. η 函数表示一个钙释放通道的开放过程: 以方波的形式, 开放 τ 时间, 释放总强度为 σ 的钙离子. 模拟过程中所用参数如表 1 所列.

Table 1 Parameters used in the simulation

Parameters	Description	Value in 2-D model	Value in 1-D model
u	Intracellular Ca ²⁺ concentration	μmol/L	μmol/L
D_x	Ca ²⁺ diffusion constant in x direction	30 μm ² /s ^[12]	600 μm ² /s
D_y	Ca ²⁺ diffusion constant in y direction	15 μm ² /s ^[12]	-
h	Spatial pace	0.05 μm	0.1 μm
Δt	Temporal step	0.01 ms	0.01 ms
u_c	Threshold u for CRU open	0.2 μmol/L ^[12]	0.2 μmol/L
σ	CRU releasing strength	1 μmol/L μm ² ^[11]	2.5 μmol/L μm
τ	CRU open time	10 ms ^[7]	10 ms
v	Maximal remove velocity	8 μmol/(L·S) ⁻¹ ^[11]	8 μmol/(L·S) ⁻¹
k	Binding ability of Ca ²⁺ to pump	0.2 μmol/L ^[11]	0.2 μmol/L

2 结 果

2.1 钙波起始的随机性

为了探测正常细胞中 CRU 的活动, 我们使用松钳膜片钳的方法使局部膜上的 L 型钙通道开放进而触发钙火花^[10, 16]. 为观察钙波的起始, 使用了阻抗较低(1.5~2 M Ω)、直径较粗的电极. 和以前的报道类似, 当将膜片去极化到 0 mV 时, 膜下的钙释放位点能够被触发开放形成钙火花(图 1a). 我们也观察到, 部分实验中, 最初的钙火花能够进一步触发相邻 CRU 产生继发性钙火花(图 1b). 在约 5% 的概率下这一过程循环发生进而形成一次钙波(图 1c).

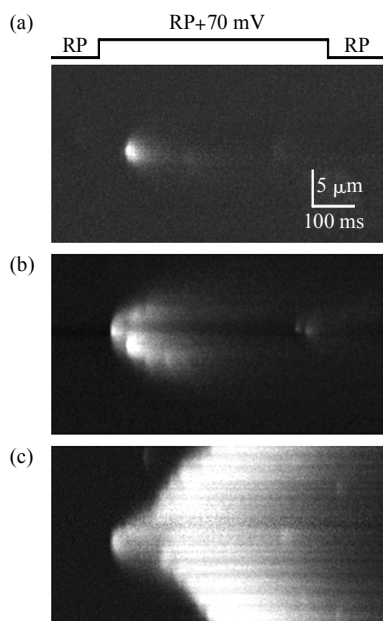


Fig. 1 Ca^{2+} release events triggered by local depolarization through loose-patch

(a) Single Ca^{2+} spark. (b) Multiple Ca^{2+} sparks. (c) A cell-wide Ca^{2+} wave.

2.2 钙波传播过程中波前的随机性

激光共聚焦显微镜的线扫描模式能够对钙波的传播过程作出高时间和空间分辨率的成像, 在这种情况下, 我们可以看到, 钙波在心肌细胞中并非像在神经胶质细胞中那样是均匀连续地传播, 而是在钙释放位点之间进行“跳跃式”传播^[11](图 2a). 经过对空间上的不均一(图 2b)和时间上的变化(图 2c)进行增强处理, 单个 CRU 的开放行为更加清晰(图 2d, 具体方法参见方法部分). 将采自 39 个细胞中的钙波前沿, 沿传播方向每步进一个 CRU 所需的“等待”时间(即图 2d 中的 Δt)做一个统计,

发现它符合一个近似于正态的分布(图 2e). 这说明, 钙波传播过程中, 波前募集钙释放位点的过程具有内在的随机性.

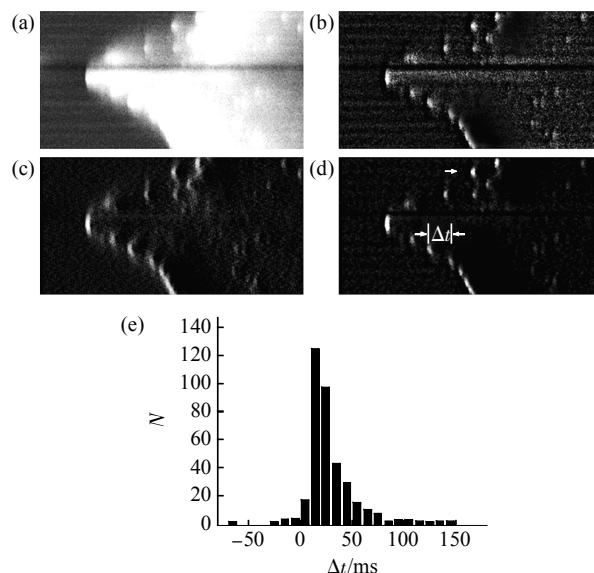


Fig. 2 Stochastic recruitment of Ca^{2+} release unites during propagation of Ca^{2+} waves

(a) Image of a Ca^{2+} wave in line-scan mode. (b) Spatial inhomogeneity enhancement of wave image in (a). (c) Time differential of image in (a). (d) Integration of images in (a), (b) and (c) (see method for detail), in which the precise location and timing of the firing CRUs can be taken. The arrowhead denotes a firing CRU when leap-like propagation happens. (e) Distribution of the waiting time (Δt) along the propagation direction.

大量的“等待”时间分布在 20~30 ms 的范围内. 如果沿细胞长轴方向相邻位点之间的间距取为 1.8 μm ^[21], 可以反推出大部分钙波的平均速度为 60~90 $\mu\text{m/s}$. 在这个“等待”时间的分布中还有少量的负值, 这表明, 在钙波前进过程中, 有时离波前较远的 CRU 先于邻近的 CRU 被触发. 在实验记录得到的线扫描图像中, 钙波的这种“跨越式”传播行为普遍存在(图 2d 中箭头所示).

2.3 波前随机性与钙波速度的关系

在不同细胞中, 钙波传播的速度有所不同, 同时, Δt 的分布也有所差异, 有的细胞中波前推进过程相对稳定因而 Δt 变化不大, 而有的细胞中 Δt 离散性较大. 为了研究钙波波前募集 CRU 的微观过程与整体钙波行为之间的关系, 对不同细胞中钙波平均速度和 CRU 募集的随机性(这里用 Δt 的变异系数表示)之间的关系做了统计. 我们发现, 对于每个钙波来说, 其平均波速与其“等待”时间的

变异系数成负相关(图 3)。这说明, 钙波波速越快, 其波前 CRU 募集过程的随机性越小。

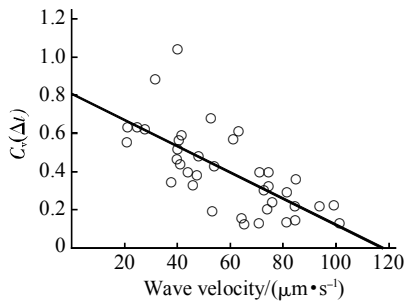


Fig. 3 Relation of the average wave speed and the coefficient of variation (C_v) of Δt . The line denotes a negative correlation.

2.4 钙波传播的模拟研究

钙波波前 CRU 募集过程的离散性是如何产生的呢? 单纯用 CRU 开放的随机性能否解释这一现象呢? 为了解答这些问题, 我们建立了一个简化的心肌细胞钙活动的一维数值模型对钙波的传播进行了研究。

由于这是一个一维模型, 因此其中 Ca^{2+} 的扩散系数等参数相对二维模拟做了调整^[11, 12]。当系统中采用恒定的 CRU 开放条件(即当局部 Ca^{2+} 浓度超过一确定阈值后相应 CRU 开放)时, 钙波传播的速度恒定不变(图 4a), 此时钙波传播过程不具有随机性。之后我们对模型中的 CRU 的开放过程引入随机性, 用一个 S 形曲线来描述 CRU 开放概率 p 对钙离子浓度 u 的敏感性, 即 $p = p_{\text{Max}} / (1 + (K/u)^{\text{Hill}})$ 。此时波前的推进过程明显产生随机性(图 4b)。在二维模拟系统中, 也得到了类似结果(图 4b, c)。这些结果表明, 心肌细胞中钙释放位点开放的或然性能够解释钙波传播过程中的随机性。

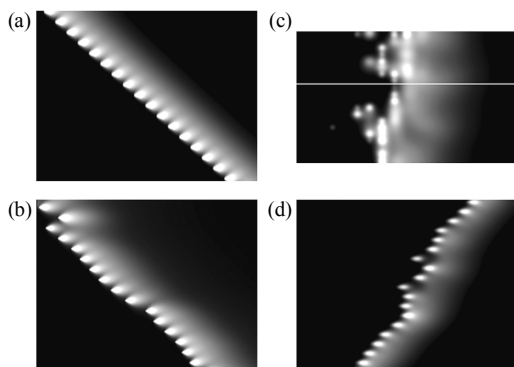


Fig. 4 Simulation of Ca^{2+} wave propagation in cardiac myocytes (a) One-dimensional simulation of Ca^{2+} wave when constant trigger threshold of CRU is used. (b) One-dimensional simulation of Ca^{2+} wave when stochastic behavior of CRU is introduced. (c) A snapshot of two-dimensional simulation of Ca^{2+} wave. (d) Reconstructed line-scan image along the line in (c).

此时, 系统中有三个因素影响 CRU 在一定 Ca^{2+} 浓度下的开放概率, 即最大释放概率 p_{Max} , 半最大概率浓度 K 和希尔系数 Hill 。其中哪些因素的变化是造成钙波在不同细胞中传播行为不一致的主要因素呢? 我们分别改变这些参数, 进而分析钙波整体和局部传播行为的变化。研究发现, 通过增加希尔系数 n 而增加钙敏感性曲线的陡度使之更接近一个方波之后, 虽然“等待”时间的离散度因此而大幅度降低($P < 0.05$, two-way ANOVA, 图 5b, d), 但波速并没有随之而发生显著性变化($P > 0.05$, two-way ANOVA, 图 5a, c), K 的取值可以很大程度上影响波速($P < 0.05$, three-way ANOVA, 图 5a, c), 但对“等待”时间的离散度没有显著影响($P > 0.05$, three-way ANOVA, 图 5b, d), 增加 p_{Max} 能够在增加平均波速的同时减小“等待”时间的离散度($P < 0.01$, two-way ANOVA, 图 5a~d)。由此可见, 钙释放位点最大开放概率的差异可能是导致钙波在不同细胞中传播行为不一致的主要因素。的确, 由于 p_{Max} 的不同, 在各种 K 和 Hill 的条件下都能够产生类似于实验结果的速度与离散度之间的负相关关系(图 5e, f 和图 3)。

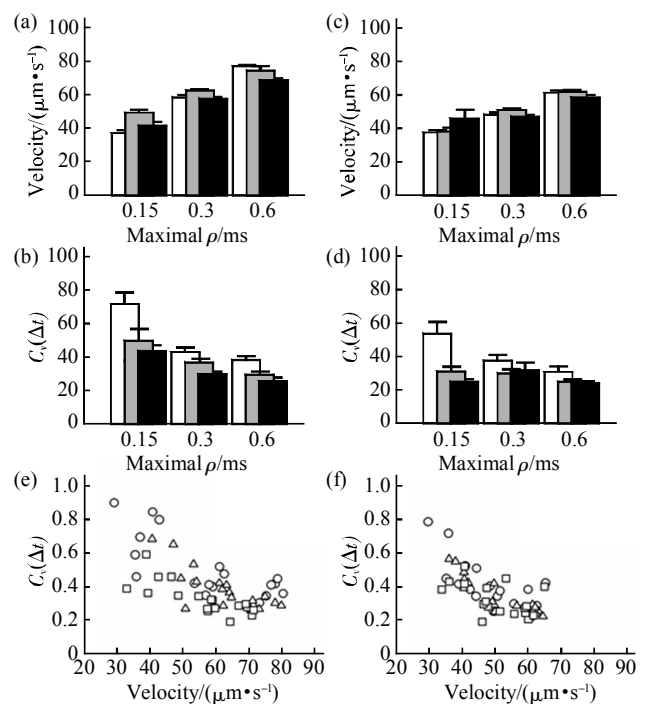


Fig. 5 Effects of Ca^{2+} sensitivity of CRU on the property of Ca^{2+} wave

(a) and (c) Effects of p_{Max} and Hill on speed of Ca^{2+} waves. (b) and (d) Effects of p_{Max} and Hill on the coefficient of variation (C_v) of the waiting time. $\square$: $\text{Hill}=2$; $\blacksquare$: $\text{Hill}=4$; $\blacksquare$: $\text{Hill}=6$. (e) and (f) Relation of wave speed and C_v of the waiting time. The K in (a), (b) and (e) is $0.2 \mu\text{mol/L}$. That in (c), (d) and (f) is $0.25 \mu\text{mol/L}$. $\circ$: $\text{Hill}=2$; $\triangle$: $\text{Hill}=4$; $\square$: $\text{Hill}=6$.

3 讨 论

作为心肌细胞中钙活动的基本单位, 钙火花在一般情况下孤立存在而不会触发相邻钙释放位点开放^[3]. 但在特殊情况下, 如肌质网钙库过度充盈时, 这种局部控制状态会被打破从而发生钙火花的连锁触发反应, 形成钙波^[5, 6]. 由于与心律失常的发生有关^[8, 9], 心肌细胞中的钙波近年来引起广泛关注. 然而, 对于在微观上钙火花如何相互触发这一基本问题, 已有的研究并未深入涉及. 本文的主要发现有二: a. 心肌细胞中的钙波起始于钙火花随机的相互触发过程; b. 钙波传播过程中 CRU 的募集过程存在随机性, 而且这种随机性主要源于 CRU 的开放过程本身.

关于钙波的起始过程, 以往的研究较少. 这主要受限于缺少一种合适的实验技术来对钙波的起始过程进行高时空分辨率的观察. 传统的二维成像技术的成像速度太低, 很难捕捉到一些快速的钙活动, 如钙火花. 尽管激光共聚焦显微镜的线扫描模式具有足够的时间分辨率, 但由于一次线扫描的成像范围仅仅是细胞体积的大约 1%, 而钙波在细胞中的起始位置却是不可预期的, 因而用线扫描模式对自发钙波的起始过程进行成像的成功率太低^[5]. 在我们的研究中, 由于使用松钳膜片钳的方法来触发钙火花并进一步触发钙波的形成, 其位置是人为确定的, 因此线扫描成像能够很好地捕捉钙波形成过程中的细节. 我们发现, 钙波的确起始于相邻 CRU 之间的相互触发, 而这一过程完全是由最初的一个钙火花所诱发的, 这和之前研究的预期一致^[9]. 关于这一过程的进一步的微观机制, 有待我们进一步研究.

在钙波传播过程中, 前沿沿传播方向每步进入一个释放位点所需的“等待”时间 Δt 是不确定的. 如果只考虑钙释放位点开放的随机性, 则 Δt 的分布取决于以下两个因素: a. 钙波前沿前方位点上的钙离子浓度变化. 总体来说, 这一变化在该位点被触发之前是呈上升趋势的. 这一上升过程主要由之前位点的释放强度和扩散过程决定. 之前位点的释放强度越大, 扩散到这一位点上钙离子浓度也将变大^[13]. 扩散系数的增加则可以加快这一上升过程^[11]. b. 钙释放位点在不同钙离子浓度下的开放概率. 对于一个钙释放位点来说, 如果该处钙离子浓度阶跃式升高为 C , 对应的开放概率为 p ($0 < p < 1$), 则其开放的潜伏期符合一个时间常数为 $1/p$

的单指数曲线, 呈下降趋势^[10]. 因而, 在钙波传播过程中, 作为这两个变化趋势相反的因素综合作用的结果, 钙波波前每步进入一个释放位点所需的“等待”时间 Δt 应该符合一个钟形分布, 和实验统计的结果一致.

不同细胞中钙波传播行为有较大差别, 这一现象必然对应于钙信号通路中一些关键环节的性质的差异, 如钙释放位点性质的差异. 然而, 由于实验手段的限制, 我们很难分别改变细胞中 CRU 的状态来研究其对钙波行为的影响. 这时, 建立相应的数学模型并研究其中参数的变化对钙波整体性质的影响将有助于我们快捷深入地认识其中的内在机理.

在以往对心肌细胞钙活动的研究中, 数值模拟揭示了大量影响钙信号性质的关键因素, 如 CRU 的离散分布^[20]、钙离子扩散的各向异性^[21]、CRU 的开放时间及其释放强度等^[13]. 然而, 目前尚未见到相关数值模拟来深入分析 CRU 开放随机性对钙波性质的影响. 我们的模型基于 Izu 等^[13]的综合模型, 充分考虑了心肌细胞钙活动的离散性、各向异性和随机性等特点. 通过用一个 S 形曲线来描述 CRU 的开放概率^[7], 系统分析了该曲线的各个参数对钙波宏观和微观性质(平均速度和前沿随机性)的作用. 通过与实验结果相比较, 我们发现, 钙释放位点的最大开放概率 p_{Max} 的增加能够同时解释钙波波速增加和钙波前沿离散度减小的现象. 据此我们认为, p_{Max} 的不同可能是不同细胞中钙波传播行为不同的内在机制之一. 目前已知的很多因素可以影响钙释放位点的敏感性(即在相同钙离子浓度下的开放概率), 比如肌质网钙离子充盈度以及磷酸化水平等^[24-27], 而且, 这些性质的改变的确对细胞中钙波的产生有较大影响^[25].

除了钙释放位点本身性质的变化, 改变以上所说的两个因素中的第一个因素, 也可能产生同样的作用. 比如, 如果钙火花幅度增加, 即一次钙火花释放的钙离子总量增加, 那么扩散到相邻位点上的钙离子浓度也相应增加^[13], 这等效于释放位点的开放概率增加. 在心肌细胞中, 每个钙释放位点每次钙火花释放的钙离子总量并不恒定^[6], 所以, 这也是导致钙波前沿随机性的不可忽视的因素之一. 需要指出的是, 以上对钙波传播的分析, 都基于心肌细胞是均匀介质的假设. 但是, 心肌细胞胞质并不是完全均质的, 这种不均一性不仅包括结构的不均一, 还包括与钙信号相关的蛋白质分布的不完全均

—^[19,20]. 这些不均一性必然也会对钙波的传播造成影响.

参 考 文 献

- Berridge M J. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol*, 1997, **499** (Pt 2): 291~306
- Bers D M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 2002, **415**(6868): 198~205
- Cheng H, Lederer W J, Cannell M B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 1993, **262**(5134): 740~744
- Stern M D. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J*, 1992, **63**(2): 497~517
- Cheng H, Lederer M R, Lederer W J, *et al.* Calcium sparks and $[Ca^{2+}]_i$ waves in cardiac myocytes. *Am J Physiol*, 1996, **270**(1 Pt 1): C148~159
- Takamatsu T, Wier W G. Calcium waves in mammalian heart: quantification of origin, magnitude, waveform, and velocity. *Faseb J*, 1990, **4**(5): 1519~1525
- Lukyanenko V, Subramanian S, Gyorke I, *et al.* The role of luminal Ca^{2+} in the generation of Ca^{2+} waves in rat ventricular myocytes. *J Physiol*, 1999, **518**(1): 173~186
- Schlotthauer K, Bers D M. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release causes myocyte depolarization-Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials. *Cir Res*, 2000, **87**(9): 774~780
- ter Keurs H E D J, Boyden P A. Calcium and arrhythmogenesis. *Physiol Res*, 2007, **87**(2): 457~506
- 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**(6828): 592~596
- Keizer J, Smith G D, Ponce-Dawson S, *et al.* Saltatory propagation of Ca^{2+} waves by Ca^{2+} sparks. *Biophys J*, 1998, **75**(2): 595~600
- Smith G D, Keizer J E, Stern M D, *et al.* A simple numerical model of calcium spark formation and detection in cardiac myocytes. *Biophys J*, 1998, **75**(1): 15~32
- Izu L T, Wier W G, Balke C W. Evolution of cardiac calcium waves from stochastic calcium sparks. *Biophys J*, 2001, **80**(1): 103~120
- Wang S Q, Song L S, Xu L, *et al.* Thermodynamically irreversible gating of ryanodine receptors *in situ* revealed by stereotyped duration of release in Ca^{2+} sparks. *Biophys J*, 2002, **83**(1): 242~251
- 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**(2): e21
- Wang S Q, Stern M D, Rios 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**(11): 3979~3984
- Coombes S, Timofeeva Y. Sparks and waves in a stochastic fire-diffuse-fire model of Ca^{2+} release. *Physical Review E*, 2003, **68** (2 Pt 1): 021915
- Dawson S P, Keizer J, Pearson J E. Fire-diffuse-fire model of dynamics of intracellular calcium waves. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(11): 6060~6063
- Chen-Izu Y, McCulle S L, Ward C W, *et al.* Three-dimensional distribution of ryanodine receptor clusters in cardiac myocytes. *Biophys J*, 2006, **91**(1): 1~13
- Izu L T, Means S A, Shadid J N, *et al.* Interplay of ryanodine receptor distribution and calcium dynamics. *Biophys J*, 2006, **91**(1): 95~112
- 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**(3): 1528~1539
- Bugrim A E, Zhabotinsky A M, Epstein I R. Calcium waves in a model with a random spatially discrete distribution of Ca^{2+} release sites. *Biophys J*, 1997, **73**(6): 2897~2906
- Kargacin G, Fay F S. Ca^{2+} movement in smooth muscle cells studied with one- and two-dimensional diffusion models. *Biophys J*, 1991, **60**(5): 1088~1100
- Fill M, Copello J A. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev*, 2002, **82**(4): 893~922
- Keller M, Kao J P, Egger M, *et al.* Calcium waves driven by "sensitization" wave-fronts. *Cardiovasc Res*, 2007, **74**(1): 39~45
- Marx S O, Reiken S, Hisamatsu Y, *et al.* PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 2000, **101**(4): 365~376
- Xu L, Meissner G. Regulation of cardiac muscle Ca^{2+} release channel by sarcoplasmic reticulum luminal Ca^{2+} . *Biophys J*, 1998, **75** (5): 2302~2312

Stochastic Initiation and Propagation of Intracellular Ca^{2+} Wave in Cardiac Myocytes*

TANG Ai-Hui, WANG Shi-Qiang**

(State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract The Ca^{2+} wave is a chain reaction of intracellular Ca^{2+} release channels through a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism. In cardiac myocytes, Ca^{2+} wave has drawn much attention because it is found to induce arrhythmia genesis. To investigate the microscopic process of wave propagation, Ca^{2+} imaging was performed with high spatial and temporal resolution *via* a laser-scanning confocal microscope combined with loose-seal patch clamp. These observation and analysis revealed that Ca^{2+} waves originated from a stochastic recruiting of Ca^{2+} release units (CRUs) by a pioneer Ca^{2+} spark, which had a low possibility in normal cells. During wave propagation, the ‘waiting’ time that the wave propagate between two neighboring CRUs along propagation direction distributed normally, and cells with a lower speed had a more dispersive distribution of ‘waiting’ time. To study the cause of the randomness, the wave propagation was simulated with a numerical model. The simulation showed that the intrinsic stochastic open process of CRUs can fully explain the above phenomenon. Increasing the maximal open probability of CRUs reduced the randomness of wavefront propagation and enhanced the average velocity of wave meantime. These experimental and numerical results provided an unequivocal quantification for the stochastic behavior of wave initiation and propagation.

Key words Ca^{2+} wave, cardiac myocyte, stochastic process, model

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China(2004CB720007), Hi-Tech Research and Development Program of China (2007AA02Z457). The National Science Foundation of China (30721064, 30730013, 30425035) and National Institutes of Health, USA (R01 TW007269).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62755002, E-mail: wsq@pku.edu.cn

Received: December 6, 2007 Accepted: June 16, 2008