

# 动作电位参数作为区分狗心室肌三种细胞的可行性研究

王焱 巩燕 黄卫斌 王挹青

**摘要** 应用细胞膜片钳技术测定狗心室肌细胞的电生理特征、动作电位 (AP) 以及收缩的参数,并用统计学方法评价所测量的参数是否可将心内、外膜及中层 (M) 细胞有效地区分开。结果:获取 52 个混合的有 3 种心肌细胞的 AP,以 AP 穹隆的高度以及 AP 切迹的膜电位水平和穹隆上升的速度将其分三组细胞。以穹隆的膜电位水平能有效区分心外膜与其他两种细胞 ( $P < 0.05$ ),但不能有效区分心内膜和 M 细胞 ( $P > 0.05$ )。以 AP 时程 (APD) 可以有效区分 M 细胞与其他两种细胞 ( $P < 0.05$ ),但不能有效区分心内膜和心外膜细胞 ( $P > 0.05$ )。尖峰-切迹时间以及收缩参数均不能有效区分三种心室肌细胞 ( $P > 0.05$ )。结论:狗心室单个细胞 AP 的一些参数,可以作为辨别心内、外膜、M 细胞的依据。

**关键词** 电生理学 动作电位 心内膜细胞 心外膜细胞 心肌中层 M 细胞

中图分类号 R331.3<sup>+</sup>8 文献标识码 A 文章编号 1007-2659(2005)06-0472-04

**WANG Yan, GONG Yan, HUANG Wei-bin, et al. The Feasibility of Differentiating Three Types of Action Potentials by Qualified Action Potential Parameters in Canine Ventricle** To determine whether some parameters in the action potentials (AP) can be used to separate the three types of canine ventricular myocytes, the AP of canine ventricular myocyte was studied by patch-clamp system in fifty-two ventricular myocytes. Statistically analyzed whether some parameters of AP can be used to differentiate epicardial and endocardial myocytes. Results: 52 ventricular myocytes were divided into three groups of myocytes by the amplitude of the dome notch level as well as in the upward slope of the dome. There was a significant difference between Em levels of the dome in epicardial type and M type as well as between epicardial type and endocardial type ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference between M and endocardial type ( $P > 0.05$ ). There was a significant difference in AP duration between M type and epicardial type as well as endocardial type ( $P < 0.05$ ), but no significant difference between epicardial and endocardial type ( $P > 0.05$ ). And there was neither significant difference in spike to notch time nor in the contraction parameter among the three groups ( $P > 0.05$ ). Conclusion: Instead of anatomical methods, certain parameters in the AP can be used to distinguish epicardial, midmyocardial (M) and endocardial myocytes [*Chinese Journal of Cardiac Pacing and Electrophysiology*, 2005, 19(6): 472~475]

*Electrophysiology Action potential Epicardial myocyte Mid-myocyte Endocardial myocytes*

多年来在单个心室肌细胞分离工作中,始终存在一个方法学上困扰研究者的一个共同问题:经胶原酶消化的心室肌细胞无法明确分辨心内膜、心外膜和中层 (M) 细胞。研究表明,在对心室肌细胞的电异质性的研究中存在电生理特性不同的三种心室肌细胞,笔者试图对三种不同心室肌细胞表现在动作电位和收缩曲线上的一些特定参数进行统计分析,旨在用特定的参数从分离出混合的心室肌细胞

群中区分出心室肌的心内膜、心外膜和 M 细胞。

## 1 材料与方 法

**1.1 单个心室肌细胞的分离** 25 条雄性成年杂种家犬,由美国 Oklahoma 大学基础动物实验室提供。体重  $20 \pm 3$  kg, pentobarbital 静脉麻醉 ( $30$  mg/kg), 静脉注射肝素 ( $100$  U/kg) 及心得安 ( $0.5$  mg/kg) 后迅速取出心脏,立即置于  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $8$  mmol/L KCl 的氧饱和生理液中。立即插管于冠状动脉左前降支 (LAD) 并用 Langendorff 灌注系统顺序灌注:  $37^{\circ}\text{C}$  生理液和无钙生理液各  $10$  min,  $37^{\circ}\text{C}$  含胶原酶 (collagenase,  $1$  mg/ml 型, Worthington Biochemical Co, NJ) 的低钙 ( $60$   $\mu\text{mol/L}$ ) 生理液  $30$  min,  $37^{\circ}\text{C}$  生理液  $5$  min, 约在灌注  $3$  min collagenase 后心脏表面呈现蜂蜜样 (Honey like) 液,为组织开始被消化的标志。将 LAD 灌注的局部组织切碎成悬浮液,并以  $200$   $\mu\text{m}$  直径孔的尼龙网过滤,生理液反复冲洗 (约  $5$  次) 后存放在

作者单位:厦门大学医学院 厦门中山医院心脏中心 (福建厦门 361004)

Xiamen Heart Center Xiamen Zhongshan Hospital of Xiamen University Xiamen 361004, China

作者简介:王焱 (1967-), 男 (汉族), 辽宁人, 副教授, 副主任医师, 博士, 从事心血管疾病的基础与临床工作。

37℃含青霉素的特殊生理液(MEM Hanks G ibco#41600-73)中待用,存放液(mmol/L)中含有:  $\text{NaHCO}_3$  24, taurine 10, ribose 5, allantoin 0.1, Penicillin (100 000 u/L), pH值 7.36 用 5%  $\text{CO}_2$ 平衡。

**1.2 全细胞膜片钳技术** 将一滴细胞悬浮液滴入温控37℃,容积为0.5 ml的水循环槽内,置于倒置的显微镜(Nikon TMS-F, Japan)工作台上,待细胞沉底附壁后,以3 ml/min的速度灌注生理液。工作台与一摄影机(Panasonic GP-CD60)及视频监控器(Panasonic TR 124-MA)相连。选择柱状、细胞质清晰、表面无颗粒,纹理明显的细胞进行试验。直径1.0 mm 钳片专用的硼硅酸盐微电极(World Precision Instruments Inc, PG 52150-4)用程序化电极拉制器(Sutter Instruments Co Model P-87)制作。自身阻抗在1.5~3.5 M $\Omega$ ,接入阻抗为 $13 \pm 3$  M $\Omega$ 。轻压在细胞表面,稍加负压即可形成1 G $\Omega$ 水平以上的高阻抗封接,再用较大负压吸破细胞膜,补偿电容电流和电极串联电阻,形成全细胞记录形式。实验过程由Pclamp 9.0软件(Axon Instruments, CA)控制脉冲信号,经数模转换后由放大器输出。电流信号经Ag/AgCl电极引导,由膜片钳放大器(Axon Instruments Inc Foster City CA)记录并分析。

### 1.3 观察指标

**1.3.1 动作电位(AP)** 钳电流的模式下记录AP。直立的方形脉冲阈刺激,脉宽3 ms用以引发APs。用PCM 2A/D VCR转换器(Medical Systems Corp Greenvale, NY)数字化AP信号,可即时分析,并储存在录影带以便离线分析。细胞膜片钳使用仪器:Axopatch-1C unit(Axon Instruments Inc Foster City CA), TL-1AD/DA转换器(LabMaster DNA, Scientific Solution Inc OH), Pentim PC (Gateway2000), Pclamp 9.0软件包(Axon Instruments Ca)。

**1.3.2 细胞收缩和舒张** 摄影机(Panasonic GP-CD60 Panasonic Industrial Co Secaucus NJ)安装在显微镜(Nikon TMS-F, Nikon Inc Melville NJ)侧端。用光感双端探测器(Electronics UT, USA)同步记录细胞的短缩,录影带储存以便离线分析。AP和细胞收缩舒张可用可储存示波器(Tektronix Inc Beaverton, Oregon, USA)和视频监控器(Panasonic)观察。

**1.4 溶液与试剂** 标准生理液成分(mmol/L):  $\text{NaCl}$  140.0,  $\text{KCl}$  4.0,  $\text{CaCl}_2$  1.8,  $\text{MgCl}_2$  1.0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.0, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid (HEPES) 15.0, Glucose 11.0。无钙液:用MEM Joklik标准液(Gibco#22300-016)。标准电极内液(mmol/L):  $\text{KCl}$  130.0,  $\text{NaCl}$  10.0, ATP 1.5, HEPES 5.0, pH用KOH调节至7.36, 37℃。以上试剂均为Sigma产品。

**1.5 统计学分析** 统计软件为Jandel科学 Signastat 5.1, *F*检验,配对*T*检验和非配对性*T*检验, oneway ANOVA用以分析正态分布数据,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, mannwhitney rank sum 检验用以分析非正态分布数据,结果用中位数表示。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

从混杂的细胞悬浮液中任意提取52个细胞,每个细胞分别给予1.0 Hz的阈刺激,稳定状态下随机抽取记录5个AP。观察它们的AP和收缩曲线的特征,发现在形态学上存在明显的差异,其中以AP穹隆的大小差异最为显著。故首先根据形态学的差异命名为三类不同的AP,分别为大穹隆(18个)、小穹隆(21个)、无穹隆AP(13个)分别为图1中的1, 2, 3组显示的动作电位。

将52个细胞在1.0 Hz刺激稳定状态下,每个细胞随机抽取5个AP,并分别测量这260个AP的以上各项参数,见图2。除AP时程(APD)为对称分布(用均数 $\pm$ 标准差表示)外,其余数据均为非对称分布,分别按相应的箱柜(bins)生成柱状图(histogram),结果用中位数(表1所示), 25%及75%数值(表1未显示)表示,并进行相应的统计学分析,结果如表1所示。

三类形态学不同的细胞的收缩曲线参数: A-D, D-E及E-F时间(图2)各组间无差异( $P > 0.05$ )。

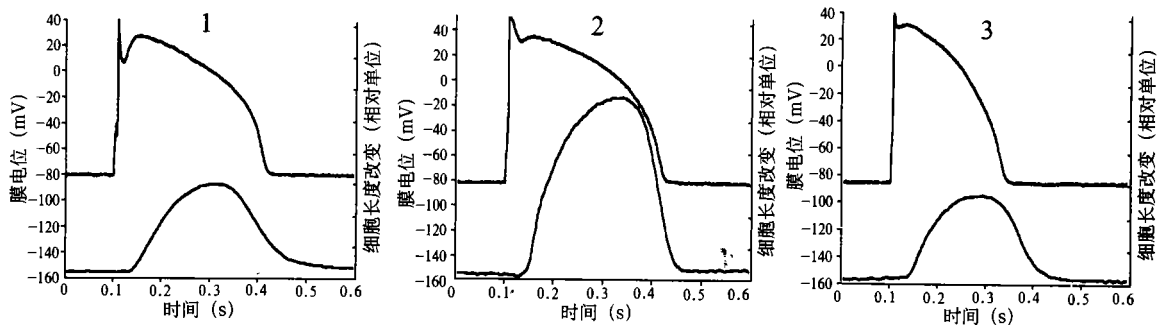


图1 三类形态学不同的犬心室肌细胞动作电位和收缩曲线 1:大穹隆AP; 2:小穹隆AP; 3:无穹隆AP

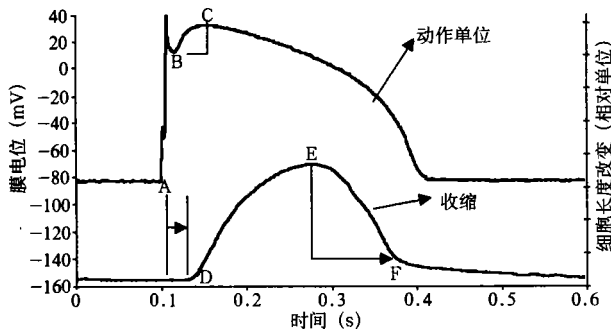


图 2 AP 和收缩曲线的测量参数 切迹的膜电位水平: B (mV); 穹隆的膜电位水平: C(mV); 穹隆的高度: C-B 电压差 (mV); 尖峰切迹时间: Spk<sub>0.5</sub>B (ms); 穹隆上升坡度: Slope B-C (mV/ms); AP 开始到收缩开始时间: A-D (ms); 收缩时间: D-E (ms); 舒张时间: E-F (ms); 动作电位时程: APD

表 1 三类形态学不同的动作电位参数指标比较

组别	例数	C-B 电压差 (mV)*	B (mV)*	C (mV)	Spk <sub>0.5</sub> B (ms)	Slope B (mV/ms)*	APD (ms)
1组	18	23.3	2.8	29.5 <sup>Δ</sup>	13.0 <sup>Δ</sup>	722.5	302.0 ± 22.7 <sup>▲</sup>
2组	21	7.1	24.8	32.3	15.5	290.0	357.7 ± 25.3
3组	13	3.1	29.5	32.5	16.5	157.5	297.7 ± 19.9 <sup>▲</sup>

注: 三组两两比较, \* P < 0.05 分别与 2、3组比较, ΔP < 0.05; 与 2组比较, ▲P < 0.05

滞和折返的重要机制<sup>[5]</sup>。

以往的研究所谓的三种细胞是以解剖定位为基础的。研究表明, M 细胞上的 I<sub>Ks</sub> 的电流幅值仅有内膜和外膜细胞的 1/2。复极时, M 细胞净外向电流减少, 复极减慢, 这就决定了 M 的 APD<sub>90</sub> 明显长于外膜和内膜细胞。AP 的切迹 (notch) 是 4-aminopyridine 敏感型短暂外向钾离子流 I<sub>1</sub> 形成的。外膜细胞 I<sub>1</sub> 的含量明显超过它在其他两种细胞的含量。引起 I<sub>1</sub> 分布差异主要是由于在心肌细胞上编码 I<sub>1</sub> 的两个基因。KV 4.2 和 KV 4.3 在 M 及外膜细胞上的表达明显高于内膜<sup>[6]</sup>。I<sub>1</sub> 主要决定动作电位的复极 1 相, 所以 M 及外膜的动作电位表现为突出的 1 相切迹。根据以上理论, 可以将我们所观察到的三类细胞——大穹隆、小穹隆和无穹隆细胞归类为外膜、M 和内膜细胞。

实验结果显示大穹隆细胞比小穹隆和无穹隆细胞切迹更深, 切迹膜电位水平 (中位数) 分别为 2.75, 21.50 和 28.50 mV。各细胞间数值无重叠, 且有显著性差异, 这与有关报道正常兔、大鼠、犬、猪和人类心室肌细胞 I<sub>1</sub> 在 M 及外膜细胞相近, 且远远大于内膜相一致<sup>[7-9]</sup>, 因此是用以区分三种细胞的可靠依据。但三种细胞却显示相似的 I<sub>1</sub> 作用时间 (spike to notch time), 约 14 ms。

### 3 讨论

近 10 年来学者们对心室肌细胞的电异质性的研究取得了突破性进展。电异质性的定义为不同部位的心室肌细胞表现为不同的电活动特性以及对药物和病理学状态的不同反应<sup>[1-3]</sup>。动物和人体心内膜、心外膜以及 M 心室肌细胞的电生理和对药物反应异质性处于研究阶段。Liu 和 Antzelevitch<sup>[4]</sup> 的研究指出: 心室肌 M 细胞的特点是 APD 相对长和慢频率依赖性 AP 时间延长的特点 (相对于心内膜和心外膜心室肌细胞), 是构成电生理异质性的主体。M 细胞的各离子电流分布不同于内、外膜下, 这可能是导致心室肌存在显著的跨室壁复极异质性的主要原因。心室肌 AP 的异质性以及由此造成的透壁心室肌复极离散 (TDR) 是致心律失常性单向阻

AP 穹隆的形成是因为当内向电流 I<sub>Ca</sub> 超过 I<sub>0</sub> 的强度时, 膜电位转向去极化。大穹隆细胞的穹隆膜电位水平 (32.2 mV) 高于其他两种细胞 (27.5 mV)。但不如 notch 水平各组间的差别显著。穹隆的上升坡度以外膜细胞最大 (722.5 V/s) 明显高于其他两种细胞。提示 I<sub>Ca</sub> 在外膜细胞的含量高于在其他两种细胞的含量。其次, 穹隆的高度三种细胞也呈现显著性差异, 以外膜细胞最显著。

心室肌 M 细胞的 APD (357.7 ± 4.6 ms), 明显长于其他两种细胞的 APD (323.6 ± 4.1, 287.7 ± 3.6 ms) 这与 Liu 和 Antzelevitch<sup>[4]</sup> 的研究基本一致。M 细胞较长的复极时间与 I<sub>Ks</sub> 在 M 细胞的含量相对于在外膜和内膜细胞的含量少有关。电活动特性上的差异为我们提供了辨别三种细胞的依据。外膜、内膜细胞和 M 细胞在收缩活动上的差异不显著, 表现为相似的电机械延迟以及近似的收缩和舒张形式。心室肌三种细胞本无解剖学分界线, 在心室肌细胞分离的过程中, 因为胶原酶的消化作用使得三层细胞几乎融为一体而无法分辨。但不同细胞在 AP 特性上的显著差异为研究心室肌细胞电异质性的方法学提供了可靠依据。

目前的研究提出心室肌 M 细胞的分布并非呈整齐的层状, 而是呈岛形分布。因此, 从解剖学角度

分辨心室肌细胞的种类存在局限性,我们从混合的心室肌细胞电生理特性上研究三种细胞间的区别,试图用 AP 某些参数作为区别三种细胞的标准。这种以电生理特性为根据的分类方法与解剖学分类不一定有完全的对应关系,但从研究性质上看,电生理分类可能更准确、更易于理解心律失常的性质。

心外膜细胞切迹膜电位水平最低,穹隆幅度最大,穹隆上升速度也最大。M 细胞 APD 最长,穹隆大小介于心内膜和心外膜细胞之间。心内膜细胞几乎无切迹和穹隆,且与心外膜细胞具有相似的 APD。

狗心室单个细胞 AP 的参数,如切迹和穹隆的膜电位水平、穹隆高度、穹隆上升速度及 APD 可以作为辨别心内膜、外膜、M 细胞的依据。因此可以省略解剖学分辨三层心肌细胞的过程,在分离出单个心肌细胞后直接以 AP 的特性进行区分。

#### 参考文献

- 1 Antzelevitch C. The M cell. Invited editorial comment[ J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther 1997, 2: 73
- 2 Antzelevitch C, Sicouri SH, Litovsky A, et al. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial

- al. endocardial and M cell[ J]. Circ Res 1991, 69: 1427
- 3 Anyukhovsky EP, Sosunov EA, Cainullin RZ, et al. The controversial M cell[ J]. J Cardiovasc Electrophysiol 1999, 10: 244
- 4 Liu DW, Antzelevitch C. Characteristics of the delayed rectifier current (I<sub>Kr</sub> and I<sub>Ks</sub>) in canine ventricular epicardial myocytes and endocardial myocytes. A weaker I<sub>Ks</sub> contributes to the longer action potential of the M cell[ J]. Circ Res 1995, 76: 351
- 5 Francis LB, Stuart MC. Dispersion of ventricular repolarization and refractory period[ J]. Circ Res 2001, 50: 10
- 6 Anyukhovsky EP, Sosunov EA, Rosen MR. Regional differences in electrophysiological properties of epicardium, midmyocardium, and endocardium. In vitro and in vivo correlations[ J]. Circulation 1996, 94: 1981
- 7 Gintant GA. Regional differences in I<sub>K</sub> density in canine left ventricle. Role of I<sub>Ks</sub> in electrical heterogeneity[ J]. Am J Physiol 1995, 268: 604
- 8 Huang B, Qin D, ElSherif N. Spatial alterations of K<sub>v</sub> channels expression and K<sup>+</sup> currents in postMI remodeled rat heart[ J]. Cardiovasc Res 2001, 52: 246
- 9 Anyukhovsky EP, Sosunov EA, Feinmark SJ, et al. Effects of guinidine on repolarization in canine epicardium, midmyocardium, and endocardium: II. In vivo study[ J]. Circulation 1997, 96: 4019

(2005-04-25 收稿)

(向晋涛编辑)

## 2005年欧洲心脏学会年会报道概况

余国膺

欧洲心脏病学会 2005 年年会于 9 月 3~7 日在瑞典斯德哥尔摩市召开。参加者近 20 000 人。收到交流论文摘要 9 000 余篇。会议的组织格局基本与历届相似。今年的一个特色是学术交流与 ESC 创建的《Women at Heart》相结合;另一特点是:设专题诠释新公布的欧洲心力衰竭(简称心衰)指南;设专题讨论心衰的再同步、起搏除颤、抗血小板药物、心衰病人体力锻炼等临床问题。基础方面,对于干细胞、细胞治疗心脏肥大、重塑等时下热点。组织多场专题交流与讨论,内容更贴近实际,有助于研究者们考虑得失,跨出清楚的下一步。

《Women at Heart》与美国的《Go Red for Women》遥相呼应。通过流行病学、临床诸方面大量调查和分析,学者们发现心血管病的男、女之别,发现了知识盲区。从学会的角度,组织《Women at Heart》、《Go Red for Women》呼吁加强妇女心血管病的关注。它们是知识转换为社会效益,研究成果转换为行动的具体表现。用我们习用的话说,是科研为建设服务的具体途径。学会在其中起中心作用,而学会是由科学家组成的。

妇女心脏病虽然不是全新的问题,但性别之差开拓心脏学的一个新的领域,将带来概念的改变、学科的深入,带来诊疗水平的提高。催生《Women at Heart》的流行病学、临床研究,并非尖端技术,其结果能够发挥很好的社会功能。这使我联想起不久前荣获本年度诺贝尔的幽门螺杆菌。蛋白质时代,病原微生物研究已不再占医学研究的主流位置。与分子生物学、干细胞、细胞因子等领域比,已冷落多时,许多人眼里,已远离“时尚”,最平凡不过。它的获奖再次昭示:医学研究需要各个不同层面的钻研。关键能否推动学科进步,使人群受益。