

培养新生大鼠心肌细胞的电信号传导：多电极记录研究

张溥明¹, 赖 颖², 陈爱华³, 赵 强², 梁培基¹

(1. 上海交通大学生物医学工程系, 上海 200030; 2. 复旦大学中山医院, 上海 200032;
3. 中国科学院上海生命科学研究院, 上海 200031)

摘要: 利用多电极阵列同步记录技术对培养的新生大鼠单层心肌细胞的电活动进行胞外记录, 观察心肌细胞在自发搏动和电刺激情况下信号在细胞间的传导模式。通过对记录信号的处理和分析, 能获得诸如起搏细胞的数量和位置、动作电位的传导速度和途径以及不同起搏细胞间的相互影响等信息。研究还发现, 心肌细胞阈下刺激会影响细胞的搏动和信号传导。

关键词: 多电极记录; 培养心肌细胞; 信号传导
中图分类号: R331.38

1 引言

心脏的功能依赖于心肌细胞有规律的兴奋和兴奋在心肌细胞之间有规律的传导。关于心肌细胞搏动节律及其机制的研究已经非常广泛。既往的研究^[1-3]多采用单细胞记录技术, 考察单个心肌细胞在生理条件或外加刺激条件下的兴奋活动的规律和机制。而兴奋信号在心肌细胞间的传导也是影响心脏功能的一个重要方面, 传导发生异常, 如传导阻滞、折返等, 将可能导致心律不齐等症状。因此, 研究心肌细胞间电信号的传导具有重要意义。但是, 由于实验技术条件的限制, 这类问题的研究进展还不尽如人意, 理论和实验之间还存在差距。

多电极同步记录技术的发展, 为研究心肌细胞间电信号的传导特性提供了一个新的有效方法。通过对多个心肌细胞电活动的同步记录, 可以了解信号在细胞之间传递的情况。国外已经有研究者利用该技术对培养的心肌细胞进行兴奋传导、阻滞、复极化等方面的研究^[4,5]。此类研究将为心律失常等心脏疾病的临床研究提供生物学依据。

心肌梗塞后存活心肌细胞数量下降而导致最终的心功能不全, 这已经成为心肌梗塞患者死亡的主要原因。如何提高梗塞区内心肌细胞存活数量已经成为一个重要的课题。目前认为可通过细胞移植治疗由缺血和心肌梗死各种原因所致心肌细胞减少。比较常见的移植至心脏的细胞有心肌细胞、骨髓基质干细胞和骨骼肌成肌母细胞。目前我们对骨骼肌细胞移植治疗心肌损伤工作开展研究, 主要考察骨骼肌与心肌在混合培养情况下, 细胞间电信号

的传导机制。作为前期工作, 我们首先研究了心肌细胞间电信号的传导特性。本研究应用多电极阵列同步记录系统, 对培养的单层心肌细胞进行胞外记录, 建立了相应的分析方法, 通过对记录信号的分析, 考察心肌细胞自发搏动和在外加电刺激作用下的兴奋传导模式。通过对记录信号的处理和分析, 获得诸如起搏细胞的数量和位置、动作电位的传导速度和途径, 以及不同起搏细胞间的相互影响等信息。同时, 研究还发现, 心肌细胞阈下刺激会影响细胞的搏动和信号传导。

2 实验方法

应用多电极阵列 (Multi-electrode array, MEA, Multi Channel Systems GmbH, 德国) 对培养的心肌细胞进行胞外记录。多电极阵列的底板是 50 mm×50 mm 的透明石英玻璃, 中央 0.78 mm×0.78 mm 区域镶有 60 条绝缘金属导线 (从放大器连接处一直延伸至电极矩阵中心) (图 1A)。电极由导线的尖端形成, 直径 10 μm, 用做记录或刺激。60 个电极呈正方形排列, 相邻电极间距 100 μm (图 1B)。电极阵列由玻璃环塑封, 形成灌流腔。

收稿日期: 2005-02-02

基金项目: 上海市科委基础研究重点项目 (02JC14008),
国家自然科学基金青年科学基金项目 (30400088)

通讯作者: 梁培基, 电话/传真: (021)64070495,

E-mail: pjliang@sjtu.edu.cn

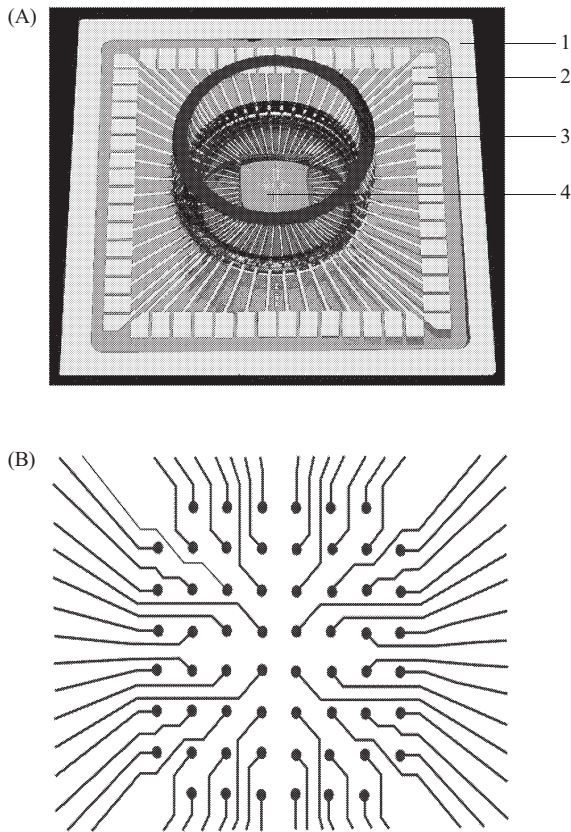


Fig.1 The multi-electrode array. (A) The microelectrode array. 1: The quartz glass; 2: The connecting pads; 3: The glass ring; 4: The patterned area containing the electrodes; (B) The detailed arrangement of electrode in the array

取出新生第一天的 SD 大鼠的心脏，取心尖，

用 0.2 % 的胰蛋白酶在 37℃ 下用分次消化法消化，制成细胞悬液，以 10^6 细胞 / mL 的密度接种于多电极阵列中，在 5% CO_2 、95% O_2 、37℃ 培养箱中进行培养。在培养 24 h 以后通过相差显微镜可以看到贴壁生长的心肌细胞已开始搏动。

本研究考察的对象是培养 24 h 以后的心肌细胞。将多电极阵列从培养箱中取出，接入多电极记录系统，用培养液（含 10% 胎牛血清的 DMEM, Dulbecco's modified eagle medium）灌流，灌流速度为 0.8 ml/min，灌流腔用温控仪（Thermostat HC-X, Multi Channel Systems GmbH, 德国）维持在 37℃，同时将 Ag/AgCl 小块置于灌流液作为参考电极。电刺激信号是由刺激器（Nihon Kohden, 日本）给出的正负双向电压信号，通过特定电极直接刺激细胞。心肌细胞的电活动通过电极阵列进行同步记录，经过 60 道通路的放大器（单端放大，带宽 10~3 400 Hz，放大倍数 1 200，输入阻抗大于 $10^{10} \Omega$ ，输出阻抗 330 Ω ），然后由商业软件（MCRack）对细胞电活动信号进行采样。采样率为 20 kHz，采样信息显示于屏幕，同时存储于计算机，以备离线分析。

3 实验信号分析方法与结果

原始记录信号如图 2 所示，每个窗口显示的是相应电极所记录的信号，时间窗大小为 1 s（其中有 8 个电极因为噪声太大而被关闭）。

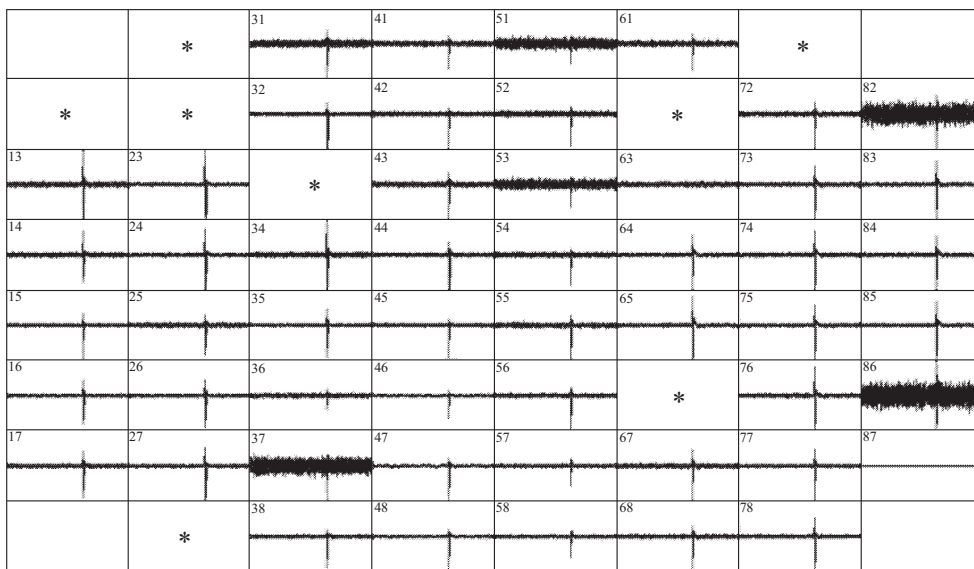


Fig.2 Screenshot of the multi-electrode recording software. Each data window represents the recording from one electrode; Time window is 1 second (*: the 8 electrodes were switched off because of noise)

对原始记录信号进行 200 Hz 高通滤波之后, 通过阈值检测, 获得各个电极上记录的动作电位序列, 进行后续分析。下文中所示的实验结果均来自同一皿培养细胞。

3.1 心肌细胞的自发搏动

培养的心肌细胞在开始接种于多电极阵列中时, 单个细胞各自自发搏动, 随着培养时间的延长, 细胞之间逐渐融合, 自发搏动的细胞个数逐渐减少。因此培养时间长短不同的心肌细胞中起搏细胞的个数可能不同, 电信号的传导情况也不同。通过对多电极阵列同步记录信号的处理和分析, 可以获得很多信息, 如起搏细胞的数量和位置、动作电位的传导速度和途径, 以及不同起搏细胞间的相互影响等。

对动作电位序列的时间模式进行分析:

$$ISI_n = t_{n+1} - t_n \quad (1)$$

式中, t_n 和 t_{n+1} 代表某个电极记录的动作电位序列中第 n 和 $n+1$ 个动作电位产生的时刻; ISI_n 代表相继动作电位之间的时间间隔 (inter-spike interval, ISI)。分别以 ISI_n 与 ISI_{n+1} 为横坐标和纵坐标, 得到动作电位时间间隔回归图。这种回归图体现了动作电位之间的时间相位关系, 不但能揭示搏动节律和起搏细胞的数量, 而且还能反映传导阻滞的情况^[4]。

图 3A 显示的是某个电极 (E62, 位置在第 6 列第 2 行的电极) 记录的动作电位时间间隔回归图。

由于相继动作电位的时间间隔变化比较大, 所以图 3A 中数据点比较散乱, 难以从中直接判断起搏细胞的个数。针对这种情况, 我们借助其它的方法来进一步对数据进行分析 and 判断。

在心肌细胞中, 兴奋是从起搏细胞开始向其周围的细胞逐渐传播的, 同一个起搏细胞产生的兴奋传导到不同的电极, 需要的时间不同。

$$Latency_{ij} = T_i - T_j \quad (2)$$

式中, T_i 和 T_j 代表电极 i 和 j 记录的动作电位时间序列; $Latency_{ij}$ 代表电极 i 与电极 j 记录的动作电位发生的时间差异。

根据这种时间差异, 可以计算出兴奋的传播方向、途径、及传导速度。如果一皿心肌细胞中有多个起搏细胞, 则由于距离的差异以及细胞间连接程度的差异, 各个起搏细胞产生的兴奋传导到同一个电极的时间也将有一定的差异, 根据这种时间差异, 可以判断起搏细胞的数量。同时, 通过比较所

有电极记录的动作电位发生的时间差异, 可以判断各个起搏细胞所处的相应位置。

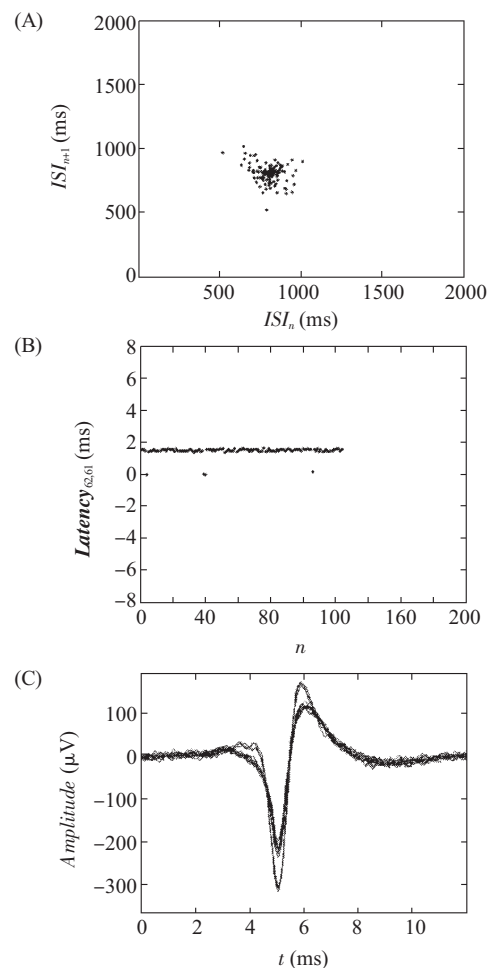


Fig.3 Data processing results of one electrode's recording when spontaneous beating. (A) Phase plane histogram depicting the spike interval n versus interval $n+1$; (B) Latency between E62 and E61; (C) The waveform of spikes recorded by E62

图 3B 显示的是 E61 和 E62 两个相邻电极记录到的细胞兴奋的时间差异 ($Latency_{62,61}$)。从图中可以看到, 在所分析的这段信号中, 细胞一共产生了 130 次动作电位, 其中有 126 次细胞的兴奋先被电极 E61 记录到, 然后才被 E62 记录到, 时间差异约 1.8 ms, 还有 4 次兴奋为两个电极所记录到的时间差异几乎为 0 ms。因此我们推测, 在所观察的这皿培养细胞中, 存在 2 个起搏细胞。由于其中一个起搏细胞的兴奋次数明显多于另外一个, 而且单个起搏细胞所产生的相继动作电位之间的时间间隔变化较大, 所以在动作电位时间间隔回归图 (图 3A) 中无法判断出起搏细胞的数量。

为了进一步证实上述判断,我们将电极 E62 上记录的动作电位信号叠加绘制,得到图 3C。显然,该电极上记录到两种完全不同的波形,其中峰值较大的波形对应的是图 3B 中 4 次同时到达两个电极的信号。这种情况进一步证实了存在 2 个起搏细胞的可能性。波形的不一致,可能是由于两个起搏细胞的位置不同,由于培养心肌细胞的各向异性,电极 E62 记录的细胞接受从两个方向传递来的兴奋而产生不同波形的响应。

以电极 E61 为参考电极,计算其它电极与 E61 记录到的细胞兴奋的时间差异,我们得到两个起搏细胞的大概位置,占主导的起搏细胞在 E78 附近,另一个在 E36 附近。对缺少记录数据的电极,我们对之进行线性插值以后,根据各个电极与 E61 记录的细胞兴奋的时间差异分别绘制了对应于两个起搏细胞的兴奋传导图。图 4A 所示为占主导的起搏细胞的兴奋传导图,显示了该起搏细胞产生的兴

奋信号从 E78 处向四周扩散传播过程中的时间梯度分布,反应了信号传导的速度和基本途径。按照各个电极与起搏细胞距离的差异和细胞间连接情况的不同,信号传到各个电极所需时间从 0~31 ms 非均匀分布。图 4B 所示为另外一个起搏细胞的兴奋传导图,该起搏细胞产生的兴奋信号从 E36 处向四周扩散传播,传到各个记录电极所需时间从 0~22 ms 非均匀分布。

3.2 电刺激对自发搏动的影响

已经有研究者发现,对心肌细胞施加周期刺激,可以改变心肌细胞搏动节律,而且心肌细胞的搏动节律模式可以随着外加刺激参数的变化而变化^[6]。此外,心肌细胞由外加刺激而诱发产生的兴奋的传导模式与其自发产生的兴奋的传导模式不同,两者之间的对比,对于研究心肌细胞间的缝隙连接形成过程具有一定的意义^[9]。因此,这种外加刺激的实验方法可以考察心肌细胞间连接的建立程度以及调节心肌细胞搏动节律的手段等。既往的研究中对心肌施加的刺激均为阈上刺激,即能够诱发心肌产生动作电位。本研究中我们对心肌施加阈下刺激,应用 3.1 中的分析方法,比较刺激前、刺激中和刺激后心肌搏动情况的差异,考察阈下电刺激对心肌自发搏动的影响。

实验中使用多电极阵列,60 个电极都可以作为刺激电极对心肌细胞施加刺激。我们任意选取电极 E82 对细胞进行刺激,刺激信号的幅度为 ± 400 mV,频率为 0.2 Hz,时间为 50 s。

从图 5 的对比可以看出,在施加电刺激以前,动作电位时间间隔的变化比较大,动作电位时间间隔回归图中显示出较大的变化范围,动作电位的平均发放周期为 800 ms,电极 E61 和 E62 记录到细胞兴奋的时间差异分别为 1.8 ms (占主导地位的起搏细胞引起的兴奋) 和 0 ms (另一个起搏细胞引起的兴奋);而在施加电刺激结束 3 min 之后,动作电位时间间隔的变化减小,动作电位时间间隔回归图中显示的变化范围明显缩小,动作电位的平均发放周期为 510 ms,电极 E61 和 E62 记录到细胞兴奋的时间差异为 1.6 ms,而弱势起搏细胞的影响消失。可见,施加的电刺激能够使得心肌细胞动作电位发放更加整齐,周期变小,传导速度加快,而且使弱势的起搏细胞的影响消失(类似的实验结果一共有两例)。

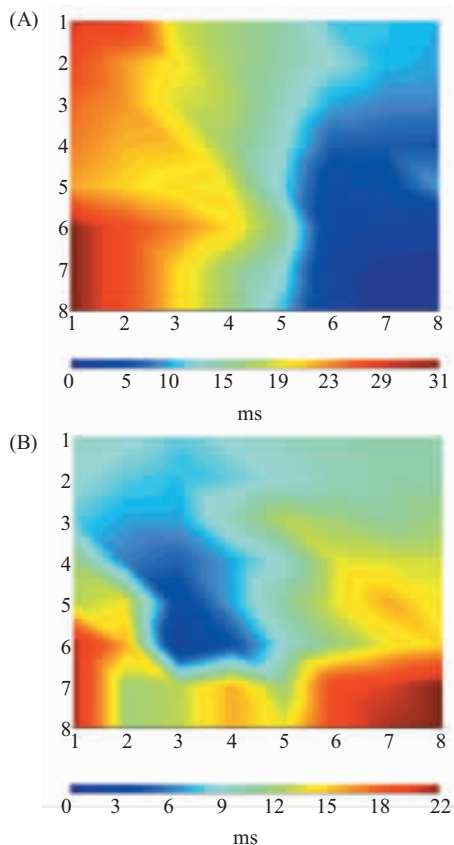


Fig.4 Activation map constructed from the latency at each electrode. (A) Activation map of the main pacemaker who is near E78; (B) Activation map of the other pacemaker who is near E36

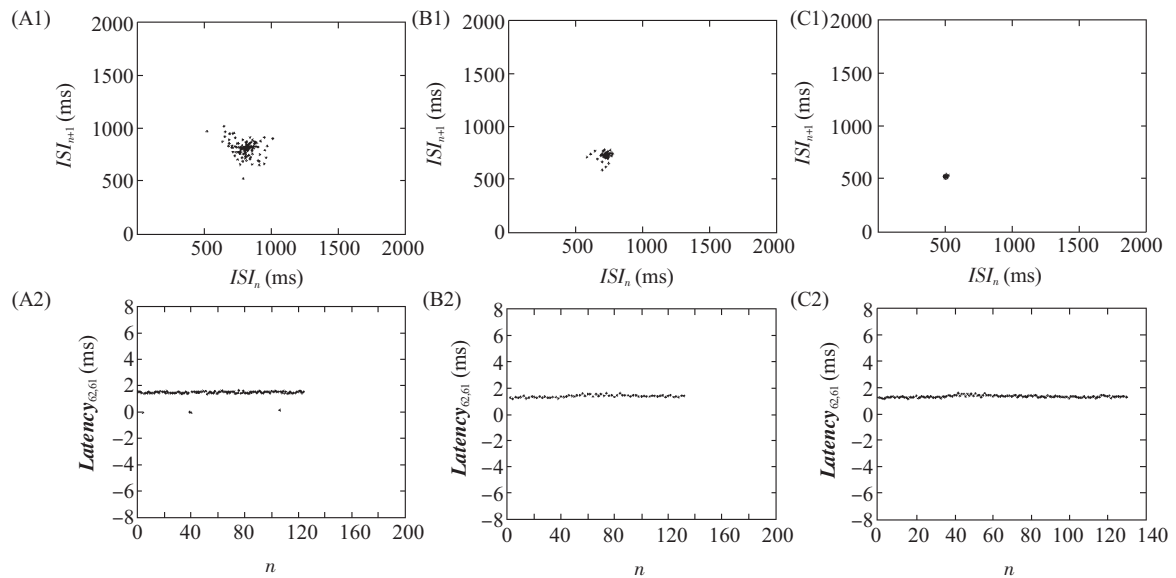


Fig.5 The effect of under-threshold stimuli on the beating rhythm (Stimuli frequency: 0.2 Hz; Voltage: ± 400 mV; Duration: 50 s; E82 was used as the stimulation electrode). (A) Phase plane histogram when spontaneous beating (A1) and the latency between E62 and E61 (A2); (B) Phase plane histogram when being stimulated (B1) and the latency between E62 and E61 (B2); (C) Phase plane histogram 3 minutes later after stopping stimulation (C1) and the latency between E62 and E61 (C2)

4 结论与讨论

多电极阵列同步记录技术为心肌电生理研究提供了一种新的方法。利用多电极阵列同步记录技术, 可以长时间、同步检测多个细胞的电活动情况, 对于研究细胞间电信号的传导机制问题具有一定的优势。虽然离体培养的细胞与在体细胞存在差异, 但是对于研究信号传导的基本问题仍然具有重要借鉴意义。

本研究利用多电极阵列同步记录技术对培养的新生大鼠心肌细胞的电活动进行胞外记录, 考察了培养的单层心肌细胞在自发搏动和电刺激情况下的信号传导模式。通过对记录信号的处理和分析, 获得了起搏细胞的数量和位置、动作电位的传导速度和途径, 以及不同起搏细胞间的相互影响等信息。特别是针对实验中数据复杂、无法通过单一的动作电位时间间隔回归图方法对起搏细胞的数量进行判断的情况, 我们联合多种分析方法进行判断, 获得了比较可靠的结果。

实验中, 受限于实验条件, 我们尝试了设备允许的最大外加刺激电压 (± 4 V), 都没有成功诱发心肌细胞产生动作电位。对比文献报道的成功诱发

电位的实验设备^[5], 我们没有诱发心肌细胞产生动作电位的原因是因为记录电极非常小, 直径为 $10 \mu\text{m}$, 电阻很大, 加到心肌细胞上的刺激电流太小, 没有达到诱发动作电位的阈值, 所以无法诱发心肌细胞产生动作电位。但是我们发现, 这种阈下刺激仍然对心肌的搏动产生了影响。目前对产生这一现象的内在机制仍然不清楚, 下一步工作将进一步开展生理和药理实验, 对此进行探究。

在本项研究中应用的各种分析方法为研究细胞发育过程中缝隙连接形成的过程以及在生理、病理状态及刺激模式下细胞的兴奋传导和阻滞等问题提供了有效的工具, 为以后进一步进行药理实验和机制研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 刘志强, 古华光, 杨明浩, 范少光, 杨芬, 任维. 心肌细胞自发性搏动节律的分岔和混沌现象. 生物物理学报, 2003, 19(3):279~285
- [2] 刘志强, 古华光, 杨明浩, 李莉, 刘红菊, 范少光, 任维. 心肌细胞团搏动的整数倍节律的实验观察. 生物物理学报, 2004,20(5):355~362
- [3] 刘志强, 古华光, 杨明浩, 李莉, 刘红菊, 范少光, 任维. 心肌细胞团搏动整数倍节律的非线性动力学机制. 生物物理学报, 2004,20(5):363~370
- [4] Igelmund P, Fleischmann BK, Fischer IR, Soest J,

- Gryschchenko O, Bohm-Pinger MM, Sauer H, Liu Q, Hescheler J. Action potential propagation failures in long-term recordings from embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in tissue culture. *Eur J Physiol*, 1999,437(5):669~679
- [5] Meiry G, Reisner Y, Feld Y, Goldberg S, Rosen M, Ziv N, Binah O. Evolution of action potential propagation and repolarization in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Cardiovascular Electrophysiology*, 2001,12(11):1269~1277
- [6] Chialvo DR, Gilmour RF, Jalife J. Low dimensional chaos in cardiac tissue. *Nature*, 1990,343(6259):653~657

SIGNAL PROPAGATION IN CULTURED NEONATAL RAT CARDIAC MYOCYTES: MULTI-ELECTRODE RECORDING STUDY

ZHANG Pu-ming¹, LAI Hao², CHEN Ai-hua³, ZHAO Qiang², LIANG Pei-ji¹

(1. Department of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China;

2. Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

3. Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: The signal propagation in cultured neonatal rat cardiac myocytes has been investigated to determine signal propagation patterns when the cells were spontaneously beating or being stimulated. Extracellular recordings of the population action potentials of cardiac myocytes clusters were made using multi-electrode array (MEA). MEA simultaneously recorded electrical activities from various cells and provided information about the number of pacemaker cells, action potential propagation velocity and route, and interactions between different pacemakers. The experiments revealed that the activation of pacemakers and the signal propagation were both affected by the under-threshold stimuli.

Key Words: Multi-electrode recording; Cultured cardiac myocytes; Signal propagation