

兔窦房结细胞的分离方法及其起搏电流特征性探讨

王 腾¹, 吴平亚², 范新荣¹, 陈勇军¹, 陈 卉¹, 黄从新¹

1. 武汉大学人民医院心内科, 武汉 430060

2. 武汉市洪山区张家湾社区卫生服务中心, 武汉 430070

摘要 探讨了家兔窦房结(Sino-Atrial Node, SAN)细胞的分离方法及其形态和起搏电流(Funny Current, I_f)的特征。通过打结定位法确定了带有“中心结区”的家兔 SAN 组织条, 双酶法分离 SAN 细胞, 利用全细胞穿孔膜片钳技术记录 SAN 细胞的 I_f 。结果显示, SAN 组织为上宽下窄的枣核型, 区域体积约为 $6.25\text{mm} \times 2.23\text{mm} \times 0.26\text{mm}$, 或 $6\text{mm} \times 2\text{mm} \times 0.1\text{mm}$ — $6\text{mm} \times 2\text{mm} \times 3.3\text{mm}$ 。SAN 细胞成狭长梭形, 无清晰横纹, 细胞长 $(65.3 \pm 7.8)\mu\text{m}$, 宽为 $(7.2 \pm 3.1)\mu\text{m}$ 。在正常 Tyrode 液中, 可恢复规则自律性搏动, 频率为 (187.3 ± 5.6) 次/min, 典型 SAN 细胞数量占整个分离细胞的 2%—5%。根据电压钳制方案, I_f 电流被引出, 呈内向性斜坡状, 随着钳制电压降低, 起搏电流逐渐增大, 并随钳制时间延长, 倾斜度也增大。 I_f 带有明显尾电流, 也随着超级化激活电位降低, 逐渐增大。根据二者电流大小拟合的电流-电压曲线, 呈典型横向 Y 形。本法获得 SAN 细胞形态典型, 状态和活性良好, 能够记录具有特征性的 I_f , 可供心血管领域有关针对 SAN 细胞 I_f 研究的技术借鉴。

关键词 窦房结; 细胞形态学; 超级化激活起搏电流

中图分类号 R329.27

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.23.002

Sino-atrial Node Cell Dissociation Method and Pacemaker Current Characteristics in Rabbits

WANG Teng¹, WU Pingya², FAN Xinrong¹, CHEN Yongjun¹, CHEN Hui¹, HUANG Congxin¹

1. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

2. Community Health Service Center, Zhangjianguan Street, Hongshan District, Wuhan 430070, China

Abstract The isolation means and properties of morphology and pacemaker current I_f in Sino-Atrial Node (SAN) cells of rabbits are investigated. In the present study, the SAN trip containing "the central nodal region" is located by tagging superior vena cava with black fine thread as a mark in right atrium of rabbit. The beating pacemaker cell of the SAN is spontaneously isolated by two different enzymatic digestions. Hyperpolarization-activated pacemaker current is recorded by using whole-cell perforated patch technique in SAN cells. The results show that SAN tissue which include the "central nodal region" is shaped with superior wide and inferior narrow, and with an volume size that is approximately $6.25\text{mm} \times 2.23\text{mm} \times 0.26\text{mm}$ or $6\text{mm} \times 2\text{mm} \times 0.1\text{mm}$ — $6\text{mm} \times 2\text{mm} \times 3.3\text{mm}$. SAN cells are long thin spindle-shaped with faint cross-striations. They are measured with $(65.3 \pm 7.8)\mu\text{m}$ in length and $(7.2 \pm 3.1)\mu\text{m}$ in width. In normal Tyrode's solution, the typical SAN cells which are 2%—5% in yielded all of them are recovered spontaneous beating with frequency of (187.3 ± 5.6) times/min. According to voltage clamp protocol, I_f is elicited as the inward ramp current, and becomes larger as soon as is activated more rapidly with the increasingly negative potential. The tail current of I_f has similar characteristics in same conditions. The current-voltage curve of I_f and tail is appearing as a typical horizontal "Y" according to their current density and clamp potential. It could be identified that the isolated SAN cells have typical morphological properties and activity, therefore could be completely elicited inward ramp I_f , the fact could contribute to the different investigations on I_f in SAN cells in cardiovascular areas.

Keywords sino-atrial node; cell morphology; hyperpolarization-activated pacemaker current

收稿日期: 2011-06-08; 修回日期: 2011-07-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(30600337)

作者简介: 王腾, 副主任技师, 研究方向为人体生理学、离子通道病、心脏电生理等, 电子信箱: wangteng@whu.edu.cn

0 引言

窦房结(Sino-Atrial Node, SAN)细胞是心脏自动节律收缩生物时钟,通过自动舒张去极化调控着人体心脏每天大约 10^5 次规律跳动,而承担这种“艰辛工作”主要是 SAN 细胞的超极化激活起搏电流(Hyperpolarization-Activated Pacemaker Current,又叫 Funny Current, I_f)^[1]。但是要记录到 SAN 细胞的典型 I_f 却不易^[2],这因为 SAN 是一个在形态学和电学特征上区域不同的复杂组织,它在右心房的“中心结区”很难定位^[3];另外, SAN 是细胞置入在一个由纤维网相较链的致密 SAN 区域中^[4],组成其单个 SAN 细胞的分离技术要求比较高,这些不利因素限制了 SAN 细胞 I_f 的记录。为了研究和突破这些障碍,本文在家兔种属上通过打结定位法确定了 SAN 区域,双酶法分离 SAN 细胞,利用全细胞穿孔膜片钳技术(Whole-Cell Perforated Patch)记录 I_f 。

1 材料与方法

1.1 实验动物与溶液试剂

本实验遵从武汉大学医学院实验动物管理与使用的指南。动物为新西兰大耳白家兔(武汉大学医学院实验动物养殖中心提供),体重 600—900g。正常 Tyrode 液成分(mmol/L): NaCl 135.0, KCl 5.4, CaCl_2 1.8, MgCl_2 1.0, NaH_2PO_4 0.3, HEPES 10.0, Glucose 10.0, pH 值用 NaOH 调至 7.35。无钙 Tyrode 液为 Tyrode 液中不加 CaCl_2 。KB 液(mmol/L): KOH 70, KCl 40, MgCl_2 3, KH_2PO_4 20, EGTA 0.5, L-谷氨酸 50, 牛磺酸 20, HEPES 10, 葡萄糖 10, pH 值用 KOH 调至 7.4。电极内液(mmol/L): KCl 140.0, MgSO_4 3.0, K_2ATP 3.0, GTP 0.4, ATP 5.0, HEPES 11.0, pH 值用 KOH 调至 7.2。用作穿孔膜片钳的电极内液配制:将 3mg 的 Amphotericin B 粉剂加入 50 μL 的 DMSO 试剂制成母液。取 20 μL 母液加入到 5mL 记录 I_f 的电极内液,使 Amphotericin B 的浓度在电极液内为 260 $\mu\text{mol/L}$ 。胶原酶 I、蛋白酶 E、小牛血清白蛋白(BSA)、HEPES、EGTA、L-谷氨酸、牛磺酸、 K_2ATP 、GTP、ATP、CsCl 均为 Sigma 产品;其他试剂为国产分析纯。

1.2 SAN 细胞的分离

参照文献[5]—[6]并作改良。首先给兔耳缘静脉注射肝素 2000U/kg, 5min 后用 20%氨基甲酸乙酯水溶液(1g/kg)静脉麻醉, 10min 后迅速开胸取出心脏,在 4℃生理盐水中洗净残血,保留上、下静脉,并用黑细线给上腔静脉打结作为标记,分离主动脉并插管,用改进的离体心脏循环灌流装置(专利申请号:200820191402.4)对心脏进行逆行灌流,灌流速度为 18—20mL/min。先用正常 Tyrode 液灌流心脏 5min,使心脏恢复正常跳动,并排除心脏内残血,后用无 Ca^{2+} 的 Tyrode 液灌流 3min,再用含 I 型胶原酶 0.33mmol/L、蛋白酶 E 0.25mmol/L 和 BSA 0.25g/L 的无 Ca^{2+} Tyrode 液循环灌流 10min,以消化心肌,然后用无 Ca^{2+} Tyrode 液冲洗数分钟终止反应。取下心脏,除去左、右心室和左心房,留取右心房及其周围组织,主要包

括界嵴、SAN 区域、房间隔、上下腔静脉、右心房组织,后沿着界嵴,平行上下腔静脉,剪下 3mm×5mm 带有 SAN 小块组织,置于一个小烧杯中,加入少许上述循环的消化酶液和无 Ca^{2+} 的 Tyrode 液进行稀释,并继续在 37℃水浴箱中孵育,搅拌、用吸管吹打,直到带有 SAN 区域组织几乎完全消化成单个细胞,低速离心,弃去上清液,沉淀物用 KB 液稀释成细胞悬液,4℃下静置保存供膜片钳使用。

1.3 穿孔膜片钳记录

在室温条件下(22—26℃)分别吸数滴细胞悬液至容积为 1—1.5mL 的细胞记录槽中(专利申请号:200820191403.9),将细胞记录槽置于倒置显微镜(日本 Olympus, IX 70-122)载物台。等细胞静置沉底贴壁后,观察边缘整齐、表面无颗粒、有模糊横纹和规律跳动细胞以及有清晰横纹、无收缩细胞的形态、大小、状态。用正常 Tyrode 液(100%氧饱和)冲灌加入到细胞记录槽中的 SAN 细胞, 10min 后,用全细胞穿孔膜片钳技术对细胞进行钳制。电压和电流信号由 Pulse+Pulsefit 软件(version 8.31, 德国 HEKA 电子公司)发放和采集,中间经 EPC-9 放大器(德国 HEKA 公司)收集和放大,并通过 Ag-AgCl 电极丝和填充记录 I_f 电极内液的玻璃微电极导入细胞,产生的电流信号经 EPC-9 放大器转换,由 Pulse 软件收集并存储于计算机的硬盘中。采用 Igor Pro 分析软件(version 3.31, 美国)对实验图形进行拟合分析。玻璃微电极用玻璃管毛胚(GG-17, 中国科学院上海植物生理生态研究所)经微电极拉制器(Narishige, PP-83)二步拉制尖端为 1—1.5 μm 而成,电极充灌电极内液入水后电阻为 2.5—3.5M Ω 。补偿液接电位,调节三维操纵器(Narishige, MN-3 和 MO-203)使电极尖端移向细胞表面,对细胞进行封接。当封接电阻达 1G Ω 以上,作全细胞穿孔膜片钳记录,并作快、慢电容和漏电容补偿。

1.4 I_f 和尾电流的记录与电流-电压曲线绘制

在电压钳制方式下,钳制电位-30mV,指令电位由-30mV 超极化负向钳制到-140mV,跌阶为 10mV,持续时间 2s。然后,每个指令电位后紧跟一个去极化到+10mV,持续时间为 1s 指令电位,再回到钳制电位-30mV。此时可记录到一组随着超极化电压增加,和随钳制时间的增加而增大的内向电流。当记录到稳定电流后作为观察数据保存到计算机,为消除每个细胞大小给统计结果造成的误差,电流大小用电流密度(pA/pF)表示。记录超极化激活内向电流的电流-电压($I-V$)曲线的绘制是指令电位为横坐标,以每个指令电位下的电流密度为纵坐标得到^[7]。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Origin 6.0(Microcal 公司, USA)统计软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 SAN 区域组织确定

通过打结定位法确定家兔 SAN 所在区域。实验发现,心

脏经酶消化,心肌组织变得灰白、透亮、羽化,很多结构失去了原有的解剖特征,尤其是心房肌组织较薄,经过消化,剪下后很难再辨认其是上腔静脉,还是下腔静脉,因此只有在心脏还未消化前,在右心房上腔静脉作一个标记,才能在剪下右心房后,辨认出整个右心房解剖结构,这样再定位 SAN 就非常容易。图 1 模拟了 SAN 解剖区域,SAN 在右心房上靠近上腔静脉根部的心外膜部,在右心房经过酶消化剪下,置于清澈 KB 液中,在聚光手术灯下,隐约可见一个暗色区域,这可能是 SAN 所在区域。剪下含有这块“中心结区”右心房组织,它成上宽下窄的枣核型,区域体积约为 $6.25\text{mm}\times 2.23\text{mm}\times 0.26\text{mm}$,或 $6\text{mm}\times 2\text{mm}\times 0.1\text{mm}$ — $6\text{mm}\times 2\text{mm}\times 3.3\text{mm}$ 。

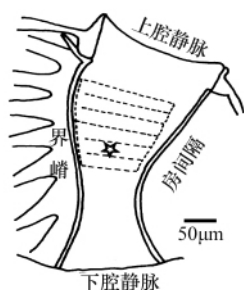


图 1 剪取实验所需 SAN 所在区域示意
Fig. 1 Illustration of the node region used in the experiments

注:虚线部分为剪取部分,☆形为中心结区。

Notes: The dashed lines show where cuts were are, ☆ represents central nodal area.

2.2 细胞形态学特征

在相差显微镜下,SAN 细胞和心房肌细胞形态有相似部分:它们均为两头尖细长梭形,边缘整齐,有折光性,胞体无颗粒,细胞核所在中心位置向外略微膨出。完全不同的是心房肌细胞有清晰横纹,而典型的 SAN 细胞没有横纹,或者仅为模糊、无规则的横纹(图 2);大多数 SAN 细胞弯曲,呈蚯蚓状,而心房肌细胞平直;SAN 细胞长 $(65.3\pm 7.8)\mu\text{m}$,宽 $(7.2\pm 3.1)\mu\text{m}$ 。当 SAN 细胞转移至正常 Tyrode 液后(35°C),恢复规则自律性,呈自动缓慢舒张去极化形式,跳动频率为 (187.3 ± 5.6) 次/min,持续时间可超过 2h,大约占整个分离细胞的 2%—5%。实验中穿孔膜片钳选取的 SAN 细胞均来自于这些自动收缩细胞,这些细胞一旦高阻抗封接后,就不再收缩,适合穿孔膜片钳制。

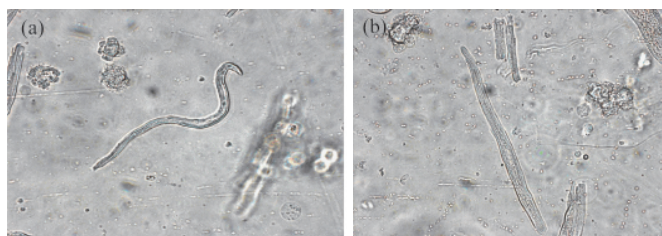


图 2 SAN 细胞(a)和心房肌细胞(b)(40×10)
Fig. 2 SAN cells (a) and strial cells (b) (40×10)

2.3 SAN 细胞 I_f 的特征

实验发现,SAN 细胞在给定钳制方案下,出现一组缓慢超级化激活内向电流,这组内向电流在 -50mV 开始出现, -60mV 完全激活,随着钳制电压逐步降低,引起电流相应增大(图 3);但当 SAN 细胞经含有 2mmol/L CsCl 正常 Tyrode 液灌流 5min 后,内向电流被阻滞,此时按同一钳制方案记录,并不能引出内向电流(电流图没有给出),表明该超级化激活内向电流为 I_f 。 I_f 呈斜坡状,随钳制时间延长(2s 内),倾斜度增大,当钳制电位为 -140mV 时, I_f 电流密度为 $(-9.1\pm 2.4)\text{pA/pF}$ 。当在每个钳制电位之后给予去极化 $+10\text{mV}$ 指令电位,再回到 -30mV 钳制电位后,可在 I_f 后出现一组尾电流,这组 I_f 尾电流随着超级化激活电位增加而逐渐增大。当在不同钳制电压下,测量 I_f 电流密度和尾电流并拟合 $I-V$ 曲线时,可发现 I_f 及其尾电流具有明显电压和时间依赖性,两条曲线形成典型横向 Y 形。

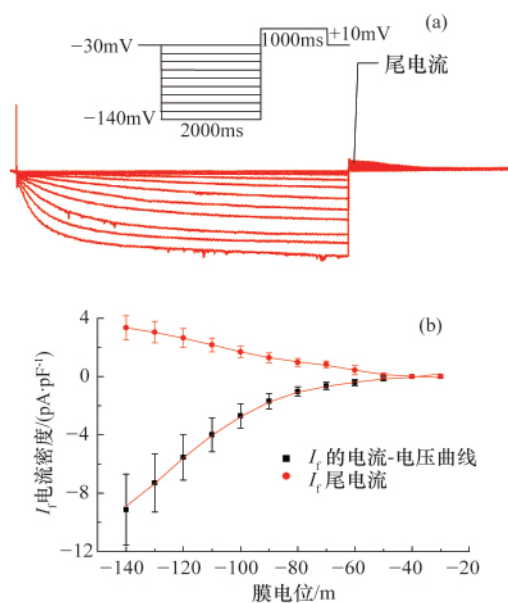


图 3 记录 I_f 及其尾电流(a)和拟合 I_f 的 $I-V$ 曲线(b)
Fig. 3 Record of I_f with its tail (a) and fitting curve of $I-V$ (b)

3 讨论

研究中,首先通过打结定位法确定了含有“中心结区”家兔 SAN 组织大致位置;通过双酶解法分离出形态典型的家兔 SAN 细胞;在超级化激活电压钳制下,记录家兔 SAN 细胞的典型 I_f 及其尾电流,并拟合成 $I-V$ 曲线,呈横向 Y 形。

SAN 是一个具有非常复杂形态学和电生理学特征的特殊组织,其形状并不典型,解剖位置不明确,只是大致位于右心房靠近上腔静脉根部端的心外膜上。当带有这样一个特殊区域右心房经过胶原酶完全消化后,变得羽化、灰白、模糊,失去了原有的右心房结构,这种情况下,再去找 SAN 的区域非常困难,因此,从家兔体内取出心脏后,预先作一个标志性

记号显得尤其关键,即打结定位法,该方法就是在心脏取出后,迅速在上腔静脉上用细黑线打一个结作为标记,再上Langendorff灌流装置进行消化,这样当右心房完全被酶消化后,能准确剪取含有SAN的“中心结区”大致区域。本研究发现,当右心房经过酶消化剪下并置于清澈KB液后,剪取的含有SAN“中心结区”右心房组织为上宽下窄的枣核型,区域体积为 $6.25\text{mm}\times 2.23\text{mm}\times 0.26\text{mm}$,或 $6\text{mm}\times 2\text{mm}\times 0.1\text{mm}$ — $6\text{mm}\times 2\text{mm}\times 3.3\text{mm}$ 。经本实验研究,提出了打结定位法。

只有确定了带有“中心结区”SAN组织条大致位置,分离单个SAN细胞才有更多保障,因为SAN细胞占比例非常少。本研究发现,SAN细胞占整个剪下组织所分离单个细胞的2%—5%左右。SAN是由致密纤维网铰链组成,单个SAN细胞在这个区域中比例很少,其分离显得特别困难。尤其在分离SAN细胞过程中,需要用正常 Ca^{2+} -free的Tyrode液(Ca^{2+} 浓度低于 10^{-5}mol/L)灌流,低浓度 Ca^{2+} 是胶原酶消化心肌细胞间连接必须的,但当低浓度 Ca^{2+} 中的SAN细胞加入到含正常 Ca^{2+} (1.8mmol/L)Tyrode液后,出现 Ca^{2+} 耐受问题,而且SAN细胞容易聚集成对或肿胀,漂浮到细胞外液中,给钳制细胞造成了困难。通过实验发现:(1)家兔重量最好不要超过 1.0kg ;(2)采用双酶消化,且酶浓度比分离心室肌时大,时间要长;(3)分离出的细胞应置入KB液中保存,这样分离出的SAN细胞特征明确,搏动均匀,在正常Tyrode液(35°C)中,搏动频率为 $(187.3\pm 5.6)\text{次}/\text{min}$,在相差显微镜下,典型的SAN细胞没有横纹,或者仅为模糊、无规则的横纹,细胞弯曲呈蚯蚓状,其长 $(65.3\pm 7.8)\mu\text{m}$,宽 $(7.2\pm 3.1)\mu\text{m}$ 。

在SAN细胞上, I_f 是一个内向电流,通常在负向最大舒张电位下被激活,但在实际研究中,有报道称^[9]SAN细胞上 I_f 可能不能完全出现,或者仅仅出现在50%的分离细胞中,另有学者报道^[4], I_f 在正常钳制电位下,持续被激活。究其原因,可能是这些学者在使用全细胞膜片钳技术记录 I_f 过程中,出现电流衰减,或者分离SAN细胞过程中出现 Ca^{2+} 反常,或者选取记录 I_f 细胞为“中心结区”的过渡细胞而非典型SAN细胞,或者使用记录 I_f 的电极内液成分不同,影响 I_f 的激活范围。为了克服这些不利因素,本实验采用全细胞穿孔膜片钳技术,在电极外液中加入EGTA,缩短记录时间,避免电流衰减,其他解决因素在上述报道分别提到。总之,通过本实验研究得出,当选取典型狭长梭形的无横纹的SAN细胞记录 I_f 时,在负向超级化激活的电压钳制方案下,可记录一组缓慢超级化激活内向电流,它被CsCl完全阻滞,表明这组内向电流为 I_f ,因为CsCl为 I_f 的特性性阻滞剂^[9]。 I_f 呈斜坡状,随着钳制时间延长,倾斜度逐渐增大,并带有明显尾电流,对二者拟合成 $I-V$ 曲线时,均具有明显电压和时间依赖性,两条曲线形成典型横向Y形。

研究发现^[10-11], I_f 与心脏自律活动产生密切相关,受到超级化激活的环核苷酸门控(Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated,HCN)基因编码调控,在神经递质 β -肾上腺素能和/或毒蕈碱能刺激下,改变着心脏舒张去极的斜率和起

搏频率,使得 I_f 在临床实践中自然成为选择性改变心率药物瞄准靶点。

4 结论

当开展 I_f 研究时,需突破记录典型 I_f 这个方法学瓶颈,确定带有“中心结区”的SAN组织条、SAN细胞分离及其 I_f 的记录和形态特征识别,这是一项复杂困难工作,需要耐心和全方位综合解决。通过本实验研究,能够得到形态典型、状态和活性良好的SAN细胞,记录出具有特征性的 I_f ,值得心血管领域针对SAN细胞 I_f 研究的技术借鉴。

参考文献 (References)

- [1] Thollon C, Vilaine J P. I_f inhibition in cardiovascular diseases [J]. *Adv Pharmacol*, 2010, 59: 53-92.
- [2] Verkerk A O, Wilders R, van Borren M M, et al. Pacemaker current (I_f) in the human sinoatrial node[J]. *Eur Heart J*, 2007, 28(20): 2472-2478.
- [3] DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity[J]. *Circ Res*, 2010, 106(3): 434-446.
- [4] Denyer J C, Brown H F. Rabbit sino-atrial node cells: Isolation and electrophysiological properties[J]. *J Physiol*, 1990, 428: 405-424.
- [5] 王腾, 唐其柱, 甘文云, 等. 大鼠心肌细胞的分离技术和电生理鉴定[J]. 科技导报, 2009, 27(3): 80-82.
Wang Teng, Tang Qizhu, Gan Wenyun, et al. *Science and Technology Review*, 2009, 27(3): 80-82.
- [6] Belardinelli L, Giles W R, West A. Ionic mechanisms of adenosine actions in pacemaker cells from rabbit heart[J]. *J Physiol*, 1988, 405: 615-633.
- [7] Hamill O P, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches[J]. *Pflügers Arch*, 1981, 391(2): 85-100.
- [8] Liu J, Noble P J, Xiao G, et al. Role of pacemaking current in cardiac nodes: Insights from a comparative study of sinoatrial node and atrioventricular node[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2008, 96(1-3): 294-304.
- [9] Verkerk A O, van Borren M M G, Peters R J G, et al. Single cells isolated from human sinoatrial node: action potentials and numerical reconstruction of pacemaker current[C]. 29th Annual International Conference of the IEEE, Lyon, France, Aug 22-26, 2007.
- [10] Baruscotti M, Barbuti A, Bucchi A. The cardiac pacemaker current[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(1): 55-64.
- [11] Zhang Q, Huang A, Lin Y C, et al. Associated changes in HCN2 and HCN4 transcripts and I_f pacemaker current in myocytes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(5): 1138-1147.

(责任编辑 吴晓丽)

《科技导报》征集“封面文章”

为快速反映我国最新科技研究成果,《科技导报》拟利用刊物最显著位置——封面将最新科研成果第一时间予以突出报道。来稿要求:研究成果具创新性或新颖性;反映该领域我国乃至世界前沿研究水平;可以图片形式予以反映,图片美观、清晰、分辨率超过300dpi;文章篇幅不限,要说明研究的背景、方法、取得的结果,以及结论。在线投稿:www.kjdb.org。