

给孕激素($E_5 + P_1$ 组, $E_5 + P_3$ 组), 子宫内膜与这4种凝集素的结合均比单独应用雌或孕激素更强。

参 考 文 献

- [1] Lee MC. et al., 1983, *Histochemistry*, 79 (3):365—75.
[2] Chavez DJ. et al., 1985, *Biology Reprod*, 32:1135—1142.

- [3] Johnson MH. et al., 1975, *Nature*, 257: 321—2.
[4] 陈惠玲等, 1988, *生理学报*, 40(2):202—6.
[5] 张保真编译, 1986, *免疫组织化学理论与技术*, 西安医科大学出版, pp. 279—81.
[6] 张保真编译, 1986, *免疫组织化学理论与技术*, 西安医科大学出版, pp. 15—16.
[7] Ogata S. et al., 1975, *J. Biochem*, (Tokyo), 78(4):687—96.
[8] Kornfeld K. et al., 1981, *J. Biol. Chem.*, 256:6633—40.

培养的小鼠心室肌细胞动作电位的波型分析

江 岩 苗智慧 王雪青

(河北省医科学院病生理室)

刘 京 生

(河北省医科学院微生物室)

大鼠的心室肌细胞在培养过程中, 由快反应非自律细胞转变成慢反应自律细胞, 因而发放慢反应动作电位, 使群落呈现自发性搏动^[1]。这一模型已被广泛用于与慢通道有关的生理、药理、病理生理等各学科的实验研究。而培养的小鼠心室肌细胞虽更易呈现自发性搏动, 但因其快、慢细胞相混^[2], 动作电位波型变异大, 使得实验结果不易分析, 而少有应用。本实验旨在从波型变化多端的培养小鼠心室肌细胞动作电位中找出规律, 以建立自发性发放快反应动作电位的培养心室肌细胞模型, 以适应于与快通道有关的研究需要。

方 法

一、心肌细胞培养^[3]

取新生昆明种小鼠全心室, 剪成约1 mm³碎片, 用0.1%胰蛋白酶(1:250 Difco)加机械搅拌的方法分离心肌细胞。将心肌细胞的培养基悬液, 分装于塑料培养瓶(Falcon 25 cm²), 在36.5℃、5%CO₂+95%空气的孵箱内培养。培养基为MEM(GIBCO, USA)加20%小牛血清(北京红星生化厂)。每3天更换一次培养基。

二、动作电位记录^[4]

启开培养瓶上壁, 将瓶放置于恒温循环槽内, 周围通以95%氧气和5%CO₂气体, 整个实验过程保持

温度在36.5℃、pH 7.2的条件下进行。按微电极电生理技术常规胞内引导心肌细胞动作电位及其时间常数。待微电极刺入细胞内稳定2分钟, 用微机联机采样分析动作电位波幅(APA)、超射(OS)、最大舒张电位(MDP)、阈电位(TP)、最大除极速度(V_{max})、复极10%; 50%; 90%水平的动作电位波宽(APD₁₀, APD₅₀, APD₉₀)以及动作电位发放频率(F)。

结 果

一、小鼠心室肌细胞动作电位的类型

共培养7瓶心肌细胞, 每个培养瓶中的心肌细胞取材于3个小鼠的全心室。于培养的第4天记录动作电位。

如图1所示, 动作电位表现3种类型:

1. 慢反应自律细胞动作电位: O期除极速度慢, 幅度低; 1.2.3期互相移行, 界限不明显; 4期呈舒张期自动除极化。
2. 快反应非自律细胞动作电位: O期除极速度快, 幅度高; 1.2.3期互相移行, 界限不明显; 无舒张期自动除极化。
3. 快反应自律细胞动作电位: O期除极速度快, 幅度高; 1.2.3期分界较清, 有明显的1期峰形电位; 动作电位波宽较窄。

除上述典型快反应与慢反应动作电位外, 还有介于两者之间的中间过渡型动作电位。我

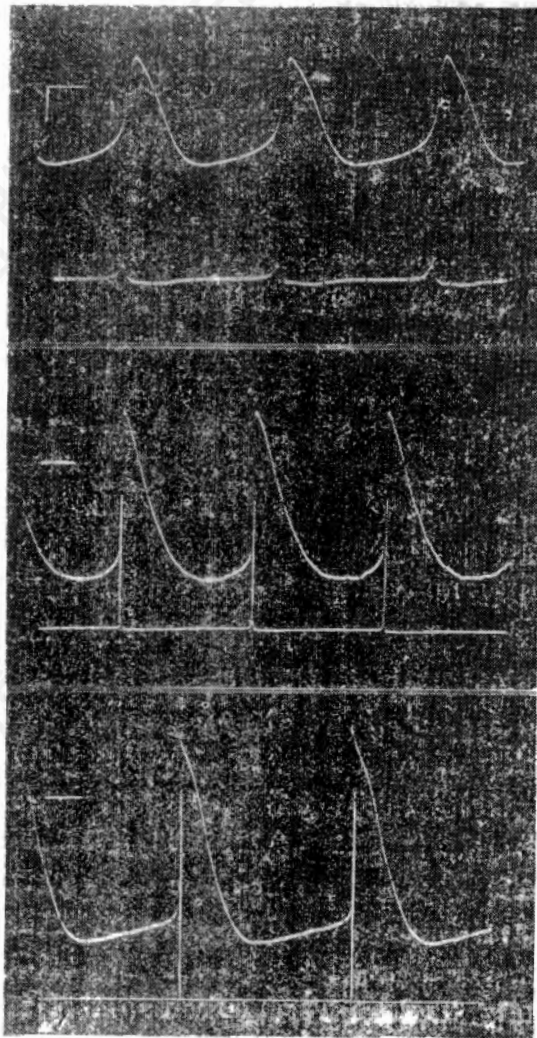


图1 培养小鼠心肌细胞动作电位的典型记录

A. 慢反应自律细胞动作电位(扫线1)及其时间导数(扫线2)

B. 快反应非自律细胞动作电位(扫线1)及其时间导数(扫线2)

C. 快反应自律细胞动作电位(扫线1)及其时间导数(扫线2)

水平标尺: 100 ms 及零电位线

垂直标尺: 20 mV 及 20 V/s

们把自7个培养瓶,随机引导的63个动作电位,根据 V_{max} 的区别分为3类: $V_{max} > 80 \text{ V/s}$ 的为快反应心室肌细胞动作电位; $79 \text{ V/s} > V_{max} > 36 \text{ V/s}$ 的为中间过渡型心室肌细胞动作电位; $V_{max} < 35 \text{ V/s}$ 的为慢反应心室肌细胞动作电位。其中快反应心室肌细胞动作电位中

$APD_{10} < 3 \text{ ms}$ 的为浦顷野纤维动作电位。各组参数汇于表1。数据用t测验统计。

二、心室不同部位各类动作电位比值

按取材部位的不同,将小鼠心肌细胞分两组培养。1. 心尖部:约占心室的1/6,不剪破心室腔,不含心内膜,以尽少掺入浦顷野纤维。每个培养瓶用6个心尖部组织。2. 心室大部:除心尖部外的5/6心室,带有心内膜。每个培养瓶用3个心室大部组织。

在培养第4天时,普查所有搏动群落的心肌细胞动作电位。如前所述,根据 V_{max} 与 APD_{10} 进行分类。最后,算出各类动作电位在动作电位总数中所占的百分比值,用 χ^2 检验组间差异。心尖部心室肌细胞动作电位与浦顷野纤维动作电位,在该组170个动作电位中分别占96.5%与3.5%。两类电位在心室大部的163个动作电位中分别占78.53%与21.47%(图2右)。在心室肌细胞动作电位中的快反应、中间过渡型、慢反应三类动作电位,在心

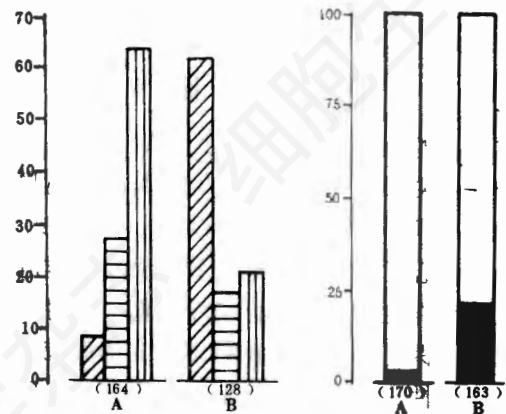


图2 小鼠心室不同部位各类动作电位的出现率

纵座标: 各类动作电位所占的百分比值

A. 心尖部

B. 心室大部

(N). 普查的心肌细胞动作电位总数(右图)及其中的心室肌细胞动作电位总数(左图)

白色柱: 心室肌细胞动作电位

黑色柱: 浦顷野纤维动作电位

斜线柱: 快反应心室肌细胞动作电位

横线柱: 中间过渡型心室肌细胞动作电位

竖线柱: 慢反应心室肌细胞动作电位

表 1 各型培养小鼠心肌细胞动作电位的参数

	APA (mV)	OS (mV)	MDP (mV)	TP (mV)	Vmax (V/s)	APD 10 (ms)	APD 50 (ms)	APD 90 (ms)	F (bpm)
慢	74.3±0.5 ^{***} (20)	20.9±0.8 ^{**} (20)	53.4±0.8 ^{**} (20)	26.9±1.5 ^{***} (20)	11.9±0.9 ^{***} (20)	11.4±0.6 (20)	43.5±2.2 (20)	76.6±2.9 (20)	233.5±16.4 (20)
中	80.2±1.8 [*] (12)	22.0±1.5 [*] (12)	58.2±2.0 (12)	44.3±2.1 (12)	54.0±3.9 ^{***} (12)	13.4±1.3 (12)	45.1±4.4 (12)	75.4±5.0 (12)	197.3±19.6 (12)
快	88.2±2.3 (21)	27.1±1.6 (21)	61.1±2.4 (21)	48.2±2.2 (21)	112.2±5.3 (21)	10.5±1.1 (21)	40.0±2.8 (21)	70.5±2.4 (21)	233.5±19.0 (21)
浦	96.0±2.7 (10)	32.1±1.9 (10)	63.9±2.0 (10)	51.3±2.2 (10)	172.8±14.8 ^{***} (10)	1.8±0.2 ^{***} (10)	22.8±1.6 ^{***} (10)	55.5±2.0 ^{***} (10)	252.6±27.7 (10)

MEAN±SE, (N): 记录电位的心肌细胞数; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ VS 快

尖部分为 9%、28%、63%，在心室大部分为 61%、21%、18% (图 2 左)。浦野纤维动作电位在心室大部的电位总数中所占的百分比值，显著地高于心尖部 ($P<0.001$)。相应地，心室肌细胞动作电位中的快反应电位，在心室大部所占的百分比值也显著地高于心尖部 ($P<0.001$)。这反映了，快反应心室肌细胞动作电位的出现率与培养心肌细胞中浦野纤维的含量一致。

讨 论

本实验以跨膜电活动为指标证明：自新生小鼠心尖部以外的 5/6 心室分离心肌细胞，用 80% MEM + 20% 小牛血清培养 4 天，约 60% 的搏动心肌细胞自发地发放快反应动作电位。这些动作电位无 4 期自动除极化，说明其所属细胞仍保持着在体心室肌细胞的快反应非自律性的特性。正适用于快通道的研究，特别是从药理学的角度研究快通道的需要。

快反应心室肌细胞动作电位的出现率与浦野纤维的含量一致。这提示快反应非自律心室肌细胞的自发性电位发放，可能也和和在体心室一样，是由浦野纤维驱动的。

另外，我们根据 V_{max} 把培养的小鼠心肌细胞动作电位分为 3 类：快反应心室肌细胞动作电位；中间过渡型心室肌细胞动作电位；慢反应心室肌细胞动作电位。其中快反应动作电

位中，我们又把 $APD_{10}<3ms$ 的定为浦野纤维动作电位。这些类型动作电位的同时存在表明：在培养的小鼠心肌细胞中，浦野纤维与心室肌细胞混合存在，而且它们又都处于由快反应细胞向慢反应细胞转化的不同程度。

心肌细胞在培养过程中，出现由快反应细胞向慢反应细胞的转化，是由于膜的除极化^[6]，已无异议。至于为什么出现膜的除极化历来有三种说法：1. 培养的心肌细胞反分化至胚胎状态^[6]；2. 培养的心肌细胞中掺有成纤维细胞；造成分流^[7]；3. 培养过程中对心肌细胞膜的损伤^[8]。我们的前期实验支持第三种说法，证明培养心肌细胞膜的除极化，与培养心肌细胞的损伤密切相关；并证明当膜除极化至快通道失活时，出现快反应非自律细胞向慢反应自律细胞的转化^[1,2]。

摘 要

本实验自新生昆明小鼠心室分离心肌细胞，用 80% MEM + 20% 小牛血清培养四天，成功地制备了保持在体心室肌细胞电生理特性，并能自发发放快反应动作电位的培养心肌细胞模型；并根据 V_{max} 的区别，把培养的小鼠心肌细胞动作电位分为快反应，中间过渡型与慢反应三种类型。

参 考 文 献

- [1] 江岩等, 1987, 应用生理学杂志, 3:76—81。

- [2] 刘京生等, 1989, 河北省医学科学院学报, 13:45—47.
- [3] Schanne OF, 1972, *Can J Physiol Pharmacol*, 50:527—532.
- [4] Schanne OF et al., 1977, *J Mol Cell Cardiol*, 9: 269—287.
- [5] Schanne OF et al., 1981, *Can J Physiol Pharmacol*, 59(5):443—467.
- [6] Mark GE et al., 1966, *Exp Cell Res*, 44: 217—233.
- [7] Athias P et al., 1979, *J Mol Cell Cardiol*, 11:755—762.
- [8] Fermini B et al., 1983, *Adv Myocardiol*, 6:26—36.

背角无齿蚌心肌纤维的超微结构观察

胡兴昌 张德永 张慧绮 卢碧林

(上海师范大学生物系)

关于心肌纤维超微结构的研究, 在脊椎动物等方面研究的比较多, 而且均比较系统和全面, 但是对无脊椎动物心肌纤维的超微结构研究并不多, 尤其是对于水生低等变温动物的心肌超微结构的报道更是少见。为了了解软体动物与脊椎动物心肌超微结构之间的异同, 我们选用了在我国分布较广的淡水贝类——背角无齿蚌(*Anodonta Woodiana*)为实验材料, 较系统地对其心肌纤维的超微结构进行了分析、比较, 现将有关资料报道如下。

材料与 方法

选取重约 500 克左右活的河蚌, 用双面刀片切断其前后闭壳肌, 打开蚌壳, 剪破围心腔, 暴露心脏, 将完整心脏取出放入 5% 戊二醛溶液固定, 将直径约 2.5 厘米的心脏, 均等地切成十条, 每一条再切成一立方毫米小块, 处理过程如下: (1) 标本在 5% 戊二醛磷酸缓冲液中固定 1.5 小时; (2) 用磷酸缓冲液洗涤三次, 每次 30 分钟; (3) 2% 四氧化锇固定 1.5 小时; (4) 用磷酸缓冲液洗涤一次; (5) 分级乙醇脱水; (6) Epon 812 包埋; (7) 用 Reichert Jung(ULTRACUT E)超薄切片机切片; (8) H-600 电子显微镜观察。

结 果

整个心脏各部固定的超薄切片依次经电镜观察, 心肌纤维的结构特征基本一致。

1. 在肌原纤维之间有许多线粒体和脂褐

素, 分布在粗丝和细丝的周围, 线粒体的形状有椭圆形, 圆形和不规则形三类, 其内具有明显的嵴, 部分线粒体呈空泡状, 线粒体长约 $0.5\sim 3\mu\text{m}$, 宽约 $0.3\sim 0.9\mu\text{m}$, 脂褐素颗粒位于线粒体之间, 外包有单位膜, 有圆形和椭圆形二种类型, 直径约 $0.8\sim 1.2\mu\text{m}$ 。在心肌纤维间还可以见到贯穿河蚌心脏的直肠及其内容见图版图 1。

2. 在纵切面上肌球蛋白丝(粗丝)和肌动蛋白丝(细丝)排列平行有序, 无周期性横纹, 不显肌节见图版图 2。

3. 在横切面上整条心肌纤维几乎都被粗丝和细丝占据, 在心肌纤维的中央紧密的排列着许多线粒体, 其周围被粗丝和细丝包围, 在粗丝和细丝之间还可观察到明显的密体或密斑, 粗丝的直径约 $35\sim 60\text{nm}$, 大多数粗丝的直径分布在 $45\sim 55\text{nm}$ 之间, 细丝的直径约 $15\sim 25\text{nm}$, 绝大多数细丝的直径分布在 20nm 周围见图版图 3。

4. 相邻心肌细胞在纵向连接处细胞膜形成波纹或皱褶, 形似指状交叉式相嵌, 显有裂隙, 在心肌细胞的周缘有多个显著的突起, 其内含有线粒体和脂褐素颗粒见图版图 4。

本研究得到我校实验中心电镜室张哲夫 副研究员热情帮助, 谨此致谢。