

豚鼠乳头肌单细胞动作电位0期去极化跨膜离子电流的相平面曲线分析

生理学研究室

李震元 朱平军

生理学教研室

内容提要 本文根据相平面曲线分析原理,借助电子计算机首次分析了豚鼠乳头肌单细胞动作电位0期去极化跨膜离子电流密度,观察了钙通道阻断剂戊脉安对这种跨膜离子电流的影响,并结合有关文献进行了讨论。

关键词 豚鼠乳头肌 0期去极化 跨膜离子电流 相平面曲线 戊脉安

心脏活动时分析单细胞的跨膜离子电流,在心脏电生理研究中是一个相当活跃的领域。电压钳制术(Voltage clamp)是近十余年来发展迅速的研究离子电流的方法之一。但该方法的建立和应用有一定的难度,且有一定的局限性。在心脏组织,只有少量的标本适合做电压钳实验⁽¹⁾。因此,常规的微电极细胞内记录,仍然是研究心脏细胞电特性的重要手段。

动作电位振幅(Action potential amplitude, APA)和时程(Action potential duration, APD)是频率依赖的⁽²⁾。除了常用的以电位一时间来表示动作电位外,尚有基于膜电位的一阶时间导数与膜电位之间的函数关系导出的相平面曲线分析法(Phase-plane trajectories)。这种技术由Jenerick(1963, 1964)^(3,4)提出,Paes de Carvalho(1969)首次应用于心房组织⁽⁵⁾。这是除电压钳外,基于常规微电极技术的又一种研究跨细胞膜离子电流的方法。以往利用该方法进行离子电流研究的有关报道,均局限于心房细胞,且均由复杂的电子线路来实现^(6~8)。本文在记录豚鼠乳头肌单细胞动作电位(AP)的基础上,编

写相应程序,用电子计算机对AP 0期跨膜离子电流进行计算和分析。并观察了戊脉安(Verapamil)对该跨膜离子电流的作用,结合有关文献进行了比较和讨论。

方法与原理

实验动物豚鼠,♀♂不拘,体重350~500g。用木锤猛击其头部致昏,迅速取出心脏浸于通有95%O₂ + 5%CO₂的台氏液中。打开心腔,小心剪取右心室乳头肌,用不锈钢针固定于恒温浴槽底部的硅橡皮上。微电极电阻10~20MΩ。台氏液成分及刺激、记录装置均见前文^(9~11)。

Jenerick(1963)关于相平面曲线分析法的提出,是基于这样的假设:用微电极穿刺到的一个心肌细胞,是一束功能性细胞的一部分,而这一束功能性细胞则显示线性电缆特性。如此记录到的AP,将符合下述线性电缆等式:

$$\frac{1}{k_1} \cdot \frac{d^2v}{dt^2} - \frac{dv}{dt} = \frac{J_i}{C_m}$$

亦即:

$$J_i = C_m \cdot \left(\frac{1}{k_1} \cdot \frac{d^2v}{dt^2} - \frac{dv}{dt} \right) \quad (1)$$

这里J_i代表跨膜离子电流密度(mA/

cm^2), C_m 为单位面积的膜电容 ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$), dv/dt 表示动作电位 0 期跨膜电位随时间呈指数变化的一阶导数。这种变化的最初过程呈一直线, 该直线的斜率即为速率系数 k_1 。在达到发火电位 $\dot{V}^*$ 后, dv/dt 偏离线性, 并逐渐达到峰值 ($\dot{V}_{\max}$)。弹导曲线的下降支与电压轴相交于某一点, 该点相当于 0 期上升相的平衡电位 (E) (图 1)。因此, 根据 (1) 式, 得:

$$J_i = C_m \cdot \frac{dv}{dt} \cdot \left(\frac{1}{k_1} \cdot m - 1 \right) \quad (2)$$

这里, $m = \frac{d^2v}{dt^2} \cdot \frac{dt}{dv} = d(dv/dt)/dv$, 亦即表示曲线上任何一点所显示的斜率。这样, 从 (2) 式引出:

$$J_i = C_m \cdot \dot{V} \cdot \left(\frac{1}{k_1} \cdot m - 1 \right) \quad (3)$$

本文取 C_m 为 $2.25 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 。利用计算

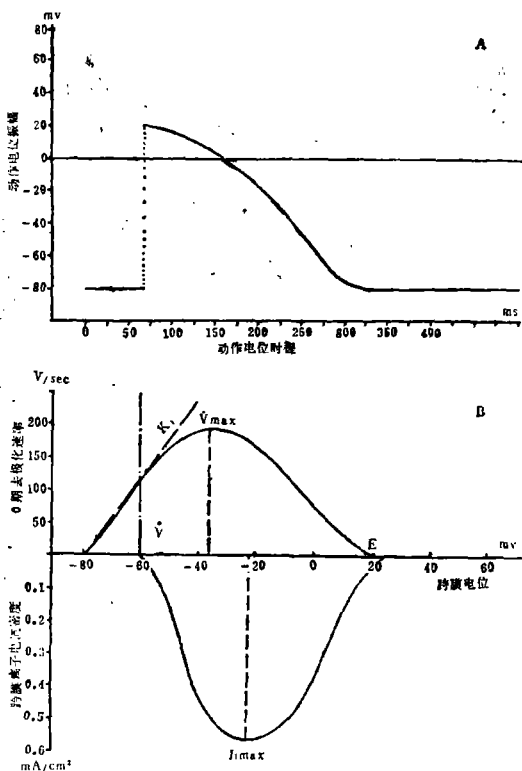


图 1 正常豚鼠乳头肌单细胞动作电位 (A), 及其 0 期去极化速率 (dv/dt) 和跨膜离子电流曲线 (B)

机的高速采样性能, 对 0 期进行间隔 $16 \mu\text{s}$ 或 $50 \mu\text{s}$ 采样一点, 逐点进行比较和分析, 以确定 dv/dt (即 $\dot{V}$), 进而计算出 m 和 k_1 , 得出离子电流 J_i 。

数据经几何均数转化后进行配对资料 t 检验。均以相对数表示, 对照为 $\lg(\bar{X} \pm \text{SD}) = 2 \pm 0$, $\bar{X} = 100$ 。

结 果

一、正常豚鼠乳头肌 AP 0 期去极化的 dv/dt 和跨膜离子电流曲线:

图 1 表示实际测定的一例正常豚鼠乳头肌细胞 AP 及其 0 期去极化速率 (dv/dt)、离子电流 J_i 与膜电位之间的函数曲线。观察到在 0 期去极化期, 随着去极化过程的进行, dv/dt 逐渐增加, 曲线在这一部分是线性的。在到达发火电位 (阈电位) $\dot{V}^*$ 后 (在图中约为 -60mv), 曲线开始转弯, 并在膜电位约为 -39mv 时达到最大值, $\dot{V}_{\max}$ 约为 190v/s 。

离子电流 J_i 在 $\dot{V}^*$ 以前事实上为 0, 随后逐渐增加。在 dv/dt 达到最大值时, J_i 并未到达最大, 而必须在跨膜电位负度进一步减小, 约在膜电位为 -21mv 时 (见图 1), J_i 达到最大值 ($J_{i\max}$), 在图中约为 $0.55 \text{mA}/\text{cm}^2$ 。此后, J_i 复又逐渐减小。显然, $\dot{V}_{\max}$ 和 $J_{i\max}$ 并不出现在同一膜电位水平, 后者较前者的负度为小。

图 2 表示连续二次 AP 的计算机重叠采样, 以及 dv/dt 和离子电流曲线, 可见彼此吻合良好。

二、戊脉安 (Ver) 对 AP 以及 dv/dt 、离子电流曲线的影响:

Ver ($6.6 \times 10^{-6} \text{M}$) 可使 AP 传导减慢; 复极化到不同程度的 AP 时程 (包括 APD_{10} 、 APD_{50} 、 APD_{90} 等) 明显缩短; 0 期最大上升速率 ($\dot{V}_{\max}$) 减小。9 例标本的结果列于附表。

由于 Ver 使 dv/dt 减少, 故离子电流也

附表 Ver作用30min对豚鼠乳头肌AP各参数的影响

	APD ₁₀	APD ₅₀	APD ₉₀	APA	$\dot{V}_{\max}$	J _{max}	S ₂ 折返	S ₃ 折返	K ₁
lg($\bar{x} \pm SD$)	1.76 $\pm$ 0.23	1.89 $\pm$ 0.06	1.95 $\pm$ 0.04	1.95 $\pm$ 0.09	1.89 $\pm$ 0.09	1.12 $\pm$ 0.08	2.12 $\pm$ 0.08	1.85 $\pm$ 0.19	1.88 $\pm$ 0.08
$\bar{x}$	58.08*	77.45*	89.43*	89.31***	77.98*	96.6*	133.35*	71.20**	77.09*

注: 对照均为lg($\bar{x} \pm SD$) = 2 ± 0 , $\bar{x} = 100$, 用药后30min与对照相比较, * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p > 0.05$

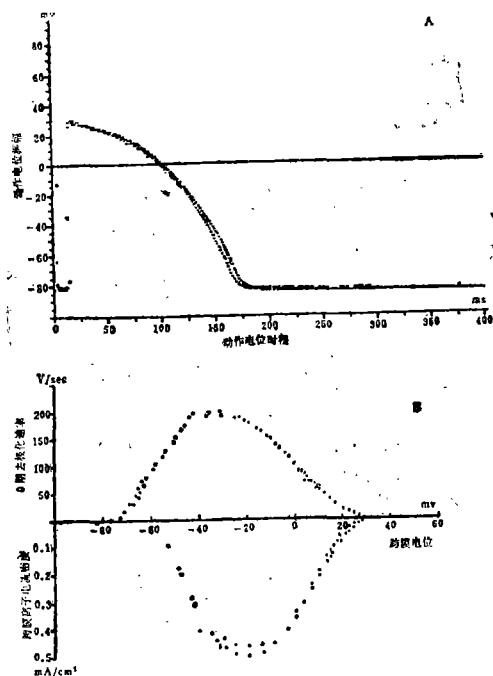


图2 连续二次AP的计算机重叠采样(A), 及其0期去极化速率和跨膜离子电流曲线(B), 可见彼此重合良好

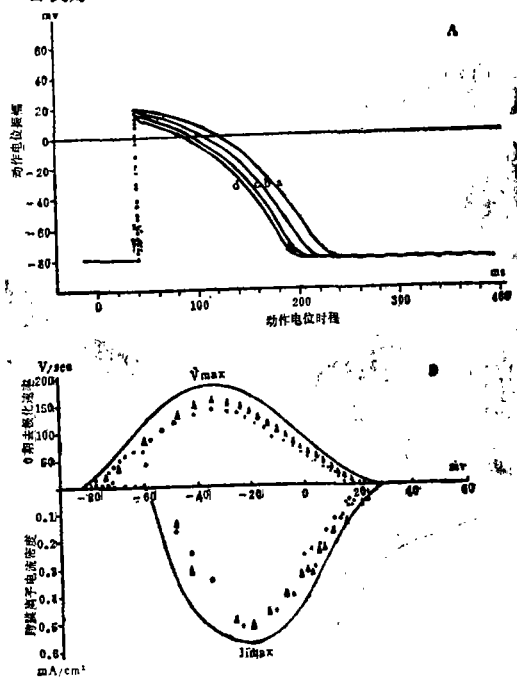


图3

戊脉安(Ver)对豚鼠乳头肌细胞AP及其0期去极化速率和跨膜离子电流的影响。A, a为对照, b, c, d分别为Ver作用10, 20和30min时的记录; B, 实线为对照, ▲, Ver作用25min; ●, Ver作用30min

相应减小。可从对照的 $0.55 \pm 0.12 \text{ mA/cm}^2$ 降低到 $0.46 \pm 0.13 \text{ mA/cm}^2$ ($P < 0.01$)，图3表示实际测定的一例标本在Ver作用不同时间时的AP及 dv/dt 、离子电流曲线与对照的比较。

讨 论

利用相平面曲线来测定AP 0期去极化跨膜电位的一阶时间导数(dv/dt)及 J_i 曲线与膜电位之间的函数关系，可以把电位和电流随时间的变化过程扩展开来，借助计算机的高速采样特点，逐点进行比较和计算。这是除电压钳外的又一个易推广和实用的检测手段。

本文所得结果与用复杂的电子线路完成的工作完全一致。我们在9例标本上得到正常豚鼠乳头肌AP 0期去极化 $J_{i\max}$ 为 $0.55 \pm 0.12 \text{ mA/cm}^2$ ；Freeman⁽⁷⁾在豚鼠心房里上得到的 $J_{i\max}$ 在 $0.41 \sim 0.63 \text{ mA/cm}^2$ 之间。事实上，用该方法在平滑肌细胞上得到的结果，是与用电压钳得到的结果相吻合的⁽¹²⁾。

心肌细胞单位面积的膜电容 C_m 与细胞半径(a)，传导速度(θ)及胞浆电阻(R_i)

有关。即 $C_m = \frac{ak_i}{2R_i\theta^2}$ 。Paes de Carvalho⁽⁶⁾ (1969)观察到，当 $R_i = 104 \Omega \text{ cm}$ ，

$a = 4 \times 10^{-4} \text{ cm}$ 时，豚鼠心房肌细胞的 C_m 为 $2.1 \mu \text{ F/cm}^2$ 。这接近于Fozzard⁽¹³⁾ (1966)在浦肯野纤维上得到的 C_m 为 $2.4 \mu \text{ F/cm}^2$ 的数值。考虑到心室肌细胞的大小介于心房肌和浦肯野纤维之间，故本文取 C_m 为二者的中间值，即 $2.25 \mu \text{ F/cm}^2$ 。这当然是一个假定值，可能会存在系统误差，但不会影响前后结果的比较。事实上，即使是同一类型的心室肌细胞，大小也有差异，其 C_m 的绝对值也不可能是完全相同的。

大多数哺乳动物的心肌细胞，其AP 0期去极化有二个成分组成，这是二种独立的离子通道起作用的结果⁽¹⁴⁾。第一个成分为

初期发展较快，持续时间较短的快钠内向电流(I_{Na})；随后是发展较缓慢的去极化成分，慢钙内向电流(I_{si})，该成分在初期往往被前面的快成分所掩盖，但持续时间较长，组成AP的超射部分，然后缓慢移行入平台期⁽¹⁵⁾。Ver是一个钙通道阻断剂⁽¹⁶⁾，我们也在大鼠心室肌细胞上观察它对 I_{si} 的阻断作用⁽⁹⁾。本文观察到Ver使APD缩短，2期斜率(S_2)增加和3期斜率(S_3)减小，平台期振幅明显减小和 $\dot{V}_{\max}$ 降低，都表明其对 Ca^{++} 内流(I_{si})的阻断作用，并表现出使 dv/dt 、 J_i 曲线均较对照为小。另外，Ver使 k_1 从对照的 5.0 ± 1.3 减小到 3.9 ± 0.9 (如相对表示，则 $\lg(\bar{X} \pm SD)$ 从 2.0 ± 0 减小到 1.88 ± 0.08 , $P < 0.01$)， k_1 的减小表示传导减慢⁽⁸⁾。

图3中在Ver作用30min以后剩下的 J_i 曲线，应该说主要是快钠内向电流 I_{Na} 了。这也再一次证明，在豚鼠心室肌细胞AP的早期，就存在 I_{si} 的广泛激活。

Ver使 $\dot{V}_{\max}$ 减小，存在二种可能性。一是0期最大上升速率 $\dot{V}_{\max}$ 不仅决定于 I_{Na} ， Ca^{++} 内流也可能参予一定的作用，故当 Ca^{++} 内流阻断时， $\dot{V}_{\max}$ 下降。这种假设的必然推理，是 $\dot{V}_{\max}$ 和 $J_{i\max}$ 应该在同一膜电位水平，或十分接近，但事实是后者较前者的负度小20mv (见结果一)。这与Freeman^(7,8)，Paes de Carvalho⁽⁶⁾的结果完全一致。另一种可能性是，Ver不仅抑制 Ca^{++} 内流，也可能对 I_{Na} 起部分抑制作用。考虑到Ver缺乏特异性，特别是在高浓度的情形下⁽¹⁾，而且也有人注意到大多数哺乳动物的慢内向电流是由 Ca^{++} 和 Na^+ 一起携带的⁽¹⁷⁾。因此，我们认为，在正常情形下，有部分 Na^+ 内流是通过钙通道进入的。在钙通道被Ver阻断后， $\dot{V}_{\max}$ 必然减小。

$\dot{V}_{\max}$ 与 $J_{i\max}$ 的膜电位水平相差20mv

乙型肝炎病毒母婴传播途径的研究

传染病研究所 周绍聪 金建华 章明太 陈 智 张秀芝 何南祥

浙江省望江山疗养院 王引福 闵志立 周朗生

附属妇产科医院 邱燕莹 袁冬生

传染病教研室 孔慧琴

内容提要 应用HBV-DNA斑点杂交、SPRIA及ELISA等方法检测新生儿出生48小时内外周血HBV标志, 50名HBsAg阳性母亲的新生儿中, HBsAg阳性5名(10%), 抗-HBc阳性48名(96%), 抗-HBs和抗-HBcIgM均阴性。34名HBeAg(ID)阳性母亲的婴儿中, 具有HBV子宫内感染血清学标志者3名(8.82%)。SPRIA检测HBsAg是目前诊断新生儿HBV感染较为敏感的方法。介绍新生儿HBV子宫内感染的临床特点。

关键词 乙型肝炎病毒 母婴传播 子宫内感染

乙型肝炎母婴传播是乙肝高发区人群中慢性HBsAg携带者存在的重要原因⁽¹⁾。多数学者认为HBV母婴传播主要通过分娩期传播; 近年国内采用HBV-DNA核酸杂交和免疫组织化学技术, 证实存在HBV子宫

内感染^(2,3), 但对新生儿HBV子宫内感染的诊断方法和发生率的研究罕见报道。本文用HBV-DNA斑点杂交法、SPRIA及ELISA等方法, 对50名HBsAg阳性母亲的新生儿, 检测其出生后48小时内外周血HBV-

左右, 这表明在 $\dot{V}_{max}$ 时(主要决定于 I_{Na}), 0期内向离子电流并未达到最大值, 必须在 Ca^{++} 内流充分起作用时, J_i 才达到最大(J_{imax})。一个有意义的现象是, 在发火电位 $\dot{V}$ 前, J_i 事实上为0, 随后 J_i 出现并随膜电位负度减小而增加, 这种现象的生理学意义尚需作深入的研究。

参 考 文 献

1. Ruiz-Ceretti E, et al. In: Methods in studying cardiac membrane, Vol 2. Ed. Dhalla NS, 1984 by CRC press Inc, Boca Ratou, Florida.
2. Hoffman BF, et al. Electrophysiology of the heart. McGraw-Hill. New York, 1960.
3. Jenerick HP, Biophys J 1963; 3(5):363.
4. Jenerick HP, et al. ibid. 1964; 4(2):77.
5. Paes de Carvalho A, et al. J Gen Physiol. 1968; 54(3):607.

6. Sperelakis N, et al. J Electrocardiol 1968; 1(1):31.
7. Freeman SE, et al. Cardiovascular Res. 1974; 8(4):451.
8. Freeman SE, et al. ibid. 1984; 18(2):223.
9. 李震元. 中国药理学报. 1982; 3(3):172.
10. 李震元. 中国药理学报. 1984; 5(3):170.
11. 李震元. 中国药理学报. 1986; 7(1):47.
12. Specht PC, Pfluegers Arch Eur J Physiol. 1976; 367(1):89.
13. Fozzard HA. J Physiol 1966; 182(2):255.
14. Trautwein W. Physiol Rev 1973; 53(4):793.
15. Paes de Carvalho A, et al. Nature (London). 1966; 211(5052):938.
16. Cranefield PF, et al. Circ Res 1974; 34(2):204.
17. Carmeliet E, et al. In: Handbook of physiology. Berne RM, et al. Eds. American Physiological Society, Bethesda, Md., 1979, Chap 7.

HBV INTRAUTERINE INFECTION

Zhou Chaocong, et al. Study on the Mother-Infant Transmission Route of HBV Infection. *J Zhejiang Med Univ* 1987; 16(4): 149.

This study recommends the detection of HBV markers through the HBV-DNA spot test, SPRIA and ELISA in the peripheral blood of neonates within 48 hours after birth. Of 60 neonates born to HBsAg positive mothers were vaccinated with hepatitis B vaccine soon after birth to find 5 (10%) positive for HBsAg, and 48 (96%) positive for anti-HBc, but all were negative for anti-HBs and anti-HBe IgM.

During 1, 3, 6, 12 months follow-up for infants, HBV markers, 7 infants became chronic HBsAg carriers whose mothers were all HBeAg positive, of whom 4 were infected by HBV at delivery, and the remaining 3 infants (0.62%) probably caught their infection in utero. According to this study, SPRIA seems to be a more sensitive method for detecting HBsAg in the diagnosis of HBV infection in neonates. The characteristics of HBV intrauterine infection are: ① infants born to HBsAg and HBeAg positive mothers, ② positive HBsAg in their peripheral serum soon after delivery with gradual increase in HBsAg titers at 1 or 3 months of age and a ratio of S/N ≥ 10 , ③ unable to immunoprecipitate with hepatitis B vaccine for infants, ④ development into chronic HBsAg carrier.

HYDROQUINONE MONOBENZYL ETHER SYNTHESIS CATALYTIC TRANSFER HYDROGENATION

Li Guanghua, et al. Improvement in Synthesis of Hydroquinone Monobenzyl Ether. *J Zhejiang Med Univ* 1987; 16(4): 166.

This paper describes an improved method for the synthesis of hydroquinone monobenzyl ether.

The mixture compounds of hydroquinone monobenzyl and dibenzyl ether were synthesized through the reaction of hydroquinone with benzyl chloride and sodium hydroxide in the presence of phase-transfer catalyst PEG 400. When by-product of dibenzyl ether from reaction to a benzyl group was converted to monobenzyl ether through catalytic transfer hydrogenation with Pd-C and tetraline, the total yield of monobenzyl ether was as high as 93%.

PAPILLARY MUSCLE PHASE O DEPOLARIZATION TRANSMEMBRANE IONIC CURRENT PHASE-PLANE TRAJECTORY

Li Zhenyuan and Chu Pingchang. Analysis of Phase Plane Trajectory of Transmembrane Ionic Current at Depolarized Phase O of Action Potential in Single Cell of Papillary Muscle of Guinea Pig. *J Zhejiang Med Univ* 1987; 16(4): 146.

On the principle of phase-plane trajectory, the ionic current density of action potential depolarization of the single myocardium cell was first calculated and analysed with microcomputers. The results obtained were similar to those of the atrium muscle cell measured by the complex electronic circuit and voltage clamp method. The maximum ionic current density was $0.65 \pm 0.12 \text{ mA/cm}^2$ ($n=9$). The verapamil, a blockage of calcium channel, not only inhibited the V_{max} but also decreased the transmembrane ionic current density from $0.65 \pm 0.12 \text{ mA/cm}^2$ (control) to $0.46 \pm 0.13 \text{ mA/cm}^2$ (Ver. 30min, $p < 0.01$).

Therefore, it is an available technique based on the conventional microelectrode method for measuring the transmembrane ionic current besides the voltage clamp.

MAT DROSOPHILA TERATOGENIC EFFECTS

Zhu Weijun, et al. Teratogenic Effects of N', N'-methylenebis-(2-amino-1,3,4-thiadiazole) (MAT) in Drosophila Melanogaster. *J Zhejiang Med Univ* 1987; 16(4): 152.

MAT has been identified to be able to exert teratogenic effects on mice. This paper reports its effect on the external morphology of *Drosophila melanogaster*. Different abnormalities in D. melanogaster caused by MAT has been discovered in this study, such as uninflated wings, wing notches, dark spots instead of banding on the abdominal tergites, irregular dark banding on the abdominal tergites and extra bristles. When the delayed effect of MAT on D. melanogaster was examined, one fly was found to have severe twisted thorax and truncated wings and the other to have extra winglike tissue on the abdominal sternite. The problem about solvent has been discussed in the paper and 0.5% polysorbate 80 is recommended as a desirable concentration for non-water-soluble chemical in the teratogenic test of D. melanogaster.