



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102809593 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 02

(21) 申请号 201210289749. 3

(22) 申请日 2012. 08. 15

(73) 专利权人 西安交通大学

地址 710049 陕西省西安市咸宁西路 28 号

(72) 发明人 张镇西 王晶 徐正红 梅建生  
隆弢

(74) 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任  
公司 61200

代理人 徐文权

(51) Int. Cl.

G01N 27/26(2006. 01)

(56) 对比文件

US 5239998 A, 1993. 08. 31, 全文.

JP 特开平 9-5243 A, 1997. 01. 10, 全文.

US 2008/0257726 A1, 2008. 10. 23, 全文.

CN 102119331 A, 2011. 07. 06, 全文.

CN 201277972 Y, 2009. 07. 22, 全文.

陆源等. 离体家兔心脏 Langendorff 灌流. 《生理科学实验教程》. 2004, 第 292-294 页.

Peter Lee et al.. Single-sensor system for spatially resolved, continuous, and multiparametric optical mapping of cardiac

tissue. 《Heart Rhythm》. 2011, 第 8 卷 (第 9 期), 1482-1490.

张虹等. 心肌膜电位的光学标测技术及实验研究. 《光子学报》. 2008, 第 37 卷 (第 3 期), 528-532.

王晶等. 基于 ANEP 染料荧光光谱迁移的单波长心脏光学标测系统. 《光谱学与光谱分析》. 2008, 第 28 卷 (第 3 期), 617-620.

王晶等. 基于 ANEP 染料荧光光谱迁移的单波长心脏光学标测系统. 《光谱学与光谱分析》. 2008, 第 28 卷 (第 3 期), 617-620.

张镇西等. 基于 CCD 相机的心脏电活动光学标测系统. 《中国科学 G 辑: 物理学 力学 天文学》. 2007, 第 37 卷 86-93.

张镇西等. 基于 CCD 相机的心脏电活动光学标测系统. 《中国科学 G 辑: 物理学 力学 天文学》. 2007, 第 37 卷 86-93.

David Tang et al.. Characteristics of a charged-coupled-device-based optical mapping system for the study of cardiac arrhythmias. 《Journal of Biomedical Optics》. 2005, 第 10 卷 (第 2 期), 1-7.

审查员 吴爱坪

权利要求书1页 说明书7页 附图3页

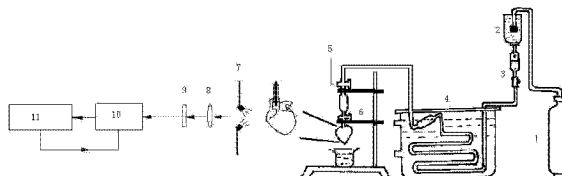
(54) 发明名称

用于测定或者监测组织或细胞跨膜电位变化的方法及装置

(57) 摘要

本发明公开了一种用于测定或者监测组织或细胞跨膜电位变化的方法及装置,其首先将细胞跨膜电位变化转变成荧光信号,检测荧光信号光强的变化量  $\Delta F$  与细胞跨膜电位的变化  $\Delta V_m$ ,然后计算光学动作电位,计算得到每个点的动作电位,当计算出一帧图像中每个点的动作电位,则能够重构出某个时刻的等电势图;利用简化算法先得到平均静息电位荧光图像,然后从得到的荧光图像直接减去背景图像,最后计算得到等电势图。本发明可以满足大多数电生理研究的需要。外围支持系统可将染料灌注到细胞膜上,在待测时间

内保持基本稳定,并在实验期间维持细胞活性。



1. 一种用于测定或者监测组织或细胞跨膜电位变化的方法,其特征在于:首先将细胞跨膜电位变化转变成荧光信号,检测荧光信号光强的变化量  $\Delta F$  与细胞跨膜电位的变化  $\Delta V_m$ ,按照下式计算光学动作电位:

$$V_n = -(F_n - \bar{F}) / \bar{F}$$

上式中,  $V_n$  表示第  $n$  帧中某点的细胞跨膜电位,  $F_n$  表示该帧中该点荧光强度,  $\bar{F}$  表示该细胞静息时刻的平均荧光强度;

通过上式计算得到每个点的动作电位,当计算出一帧图像中每个点的动作电位,则能够重构出某个时刻的等电势图;然后利用简化算法先得到平均静息电位荧光图像,从中直接减去背景图像,最后计算得到等电势图;所述简化算法具体为:采用阈值法确定静息时刻荧光强度,选定某点荧光强度的最大值与最小值,二者的差就是膜电位的最大变化范围;然后设定两个阈值,在这两个阈值之间的为细胞静息时刻,将这些采样时刻的荧光平均后就是该点细胞静息时刻的平均荧光强度;利用求导法和阈值法对得到的等电势图综合计算重构得到心脏的动作电位时程图。

2. 根据权利要求 1 所述的用于测定或者监测组织或细胞跨膜电位变化的方法,其特征在于,利用所述动作电位时程图计算得到的兴奋波前传导和复极图,重构出等时图。

3. 一种实现权利要求 1 所述用于测定或者监测组织或细胞跨膜电位变化的方法的装置,其特征在于,包括:

外围支持系统:维持组织细胞活性并能够灌注染料;

处理控制单元:将荧光信号的变化与细胞跨膜电位相关联;

光路检测系统:通过荧光激发的方式将待测细胞或者组织跨膜电位转变成光学信号并记录,并将光学信号传送给处理控制单元。

4. 根据权利要求 3 所述的装置,其特征在于,所述外围支持系统包括内设有蛇形盘管的水浴加热装置(4)、气瓶(1)、气液混合瓶(2)、莫菲氏滴管(3)、支架、第一三通阀(5)和第二三通阀(6);所述气液混合瓶(2)没有瓶底且倒置,所述气瓶(1)的接出管出口由气液混合瓶(2)上端敞口伸入至内,所述气液混合瓶(2)的下端连接莫菲氏滴管(3)的进口,所述莫菲氏滴管(3)的出口连接至水浴加热装置(4)的蛇形盘管进口;水浴加热装置(4)的蛇形盘管的出口连接第一三通阀(5),第一三通阀(5)通过管道连接有第二三通阀(6);所述第二三通阀(6)的出口连接至组织细胞。

5. 根据权利要求 4 所述的装置,其特征在于,在所述第一三通阀(5)和第二三通阀(6)之间还连接有另外一套莫菲氏滴管;所述水浴加热装置(4)的蛇形盘管的出口上也连接有一套莫菲氏滴管;所述第一三通阀(5)连接有蠕动泵。

6. 根据权利要求 4 所述的装置,其特征在于,所述光路检测系统包括荧光激发光源(7)、滤光光路和荧光检测系统(10);

所述荧光激发光源(7)采用 LED 阵列做为光源,设置在组织细胞附近;

所述滤光光路包括透镜(8)和滤光片(9),所述透镜(8)和滤光片(9)依次设置在由荧光激发光源照射组织细胞而反射的光路上;

所述荧光检测系统(10)为 CCD 相机,所述 CCD 相机的镜头对准所述滤光片(9)的出射光。

7. 根据权利要求 4 所述的装置,其特征在于,所述处理控制单元为计算机。

## 用于测定或者监测组织或细胞跨膜电位变化的方法及装置

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学工程领域,涉及可用于生理或病理学细胞膜电位检测的技术,利用电压敏感染料将细胞或组织的膜电位变化信号转化成光学信息进行记录并重构出功能图像。是在生物医学工程领域将光学技术、图像信息处理技术相结合而发明的一项应用研究,尤其是一种用于测定或者监测组织或细胞跨膜电位变化的方法及装置。

### 背景技术

[0002] 生物体在生命活动过程中所表现的电现象称为生物电(bioelectricity),几乎所有生理功能的实现都伴随有某种生物电的变化。这些生物电的常用检测仪器有近红外光内源信号成像(Near Infrared, NIR),功能核磁共振成像(functional Magnetic Resonance Imaging, fMRI),正电子发射断层成像(Positron Emission Computed Tomography, PET),X光断层成像(Computed Tomography, CT),心电图(Electrocardiogram, ECG),脑电图(Electroencephalogram, EEG),脑磁图(Magnetoencephalogram, MEG),膜片钳(Patch Clamp)等,他们在人们的生理病理检查中起到相当重要的作用,从宏观到微观揭示了生命的奥秘。但是由于生命现象的复杂性,对于重要生命过程的信息,需要快速实时的观察动态过程,实时记录电生理的变化,比如在心脏电击除颤时刻心肌动作电位的变化和心肌表面电场分布情况,老鼠胡须探索障碍物时与大脑皮层中对应信号的关系等等。在研究这些生理机制的动态过程中,在空间分辨率上需要我们同时研究局部的微观变化(微米/纳米级)和整个组织的整体响应(厘米级),在时间分辨率上需要我们同时研究细胞膜内外电信号的变化(微秒级),以及整个组织的电生理功能响应(分钟量级)。上述设备在某些领域表现非凡,但是难以同时满足这些要求,比如PET、fMRI、ECG/EEG等在组织/器官水平应用广泛,而膜片钳和电镜则是从分子、细胞水平进行研究,人们迫切需要同时从宏观和微观的水平上动态、连续的观察细胞膜动作电位的变化以及整个组织中电兴奋的传导过程,满足研究人员的要求。近年来一种新的研究探测手段:基于电压敏感染料(Voltage-Sensitive Dyes, VSDs)的荧光功能成像标测技术迅速的发展起来。

[0003] 光学标测(Optical Mapping)技术是利用电压敏感染料将细胞膜电位的变化转化成光学信号进行记录的一种新的光学功能成像(optical imaging)技术。其基本原理是将电压敏感染料作为分子转换器(Molecular Transducer)对记录细胞或者目标组织进行灌注染色,当膜电位变化而造成膜两侧电场力变化时,嵌在膜上的染料分子价键也随电场的作用发生细微的改变,从而造成染料的发射光谱随之移动,这样就可以通过记录荧光强度的变化而间接计算得到膜电位变化。该技术作为电生理研究的一种新的记录方法有以下特点:

[0004] 1. 多位点同时记录:可以同时测量多个细胞(细胞群)或从多侧面记录单个细胞的电活动,动态显示膜电位的传导过程;

[0005] 2. 时间分辨率高:时间分辨率跨度超过9个数量级,可以从微秒级到小时级;

[0006] 3. 空间分辨率高:空间分辨率跨度超过5个数量级,可以从微米量级到分米级,可

以记录细胞与细胞间的电传导；

[0007] 4. 广泛适用性：可以同时从不同层次着手研究：分子水平、细胞水平、组织水平到整个神经中枢，可以用于各种细胞和组织的电生理研究，并能克服电刺激造成的伪迹，研究心脏除颤中电场对细胞的影响，膜局部极化与激动波之间复杂的作用机制，可为电除颤和心律失常的临床治疗提供重要的指导性建议。这种方法还可通过脑部动作电位来在体研究视觉神经、嗅觉神经编码，提高人们对脑结构和功能的科学认知水平，为研究人员提供一个极为有力的技术工具，提供其他方法无法比拟的更加丰富的信息。

[0008] 目前国内尚无该方面的专利。国外专利中美国专利 No. 7611863 德国申请，2009 年 11 月 3 日授权，美国专利 No. 7173130，美国申请，2007 年 2 月 6 日授权，这些方法或者关注于染料的合成方法，或者使用复杂的荧光共振能量转移来进行检测。近年来国外的一些公开发表的文献比如 Tang D, Li Y, Wong J, et al. “Characteristics of a charged-coupled-device-based optical mapping system for the study of cardiac arrhythmias”. J Biomed Opt, 2005, 10(2):1-7. 使用激光和氙灯作为光源，Brown NH, Dobrovolsky HM, Gauthier DJ, et al “A fiber-based ratiometric optical cardiac mapping channel using a diffraction grating and split detector”. Biophys j, 2007, 93:254-263 利用光纤和光栅来进行波长选择，系统比较复杂。这些都未能实现系统的简便易用，造价昂贵，使得该技术的应用得到了限制。

## 发明内容

[0009] 本发明的目的在于克服上述现有技术的缺点，提供一种用于测定或者监测组织或细胞跨膜电位变化的方法及装置，本发明根据实验测得的电压敏感染料光谱迁移，设计并实现一套单波长探测的细胞膜电位光学标测方法及装置。

[0010] 本发明的目的是通过以下技术方案来解决的：

[0011] 这种用于测定或者监测组织或细胞跨膜电位变化的方法：首先将细胞跨膜电位变化转变成荧光信号，检测荧光信号光强的变化量  $\Delta F$  与细胞跨膜电位的变化  $\Delta V_m$ ，按照下式计算光学动作电位：

$$[0012] \quad V_n = -(F_n - \bar{F}) / \bar{F}$$

[0013] 上式中， $V_n$  表示第  $n$  帧中某点的细胞跨膜电位， $F_n$  表示该帧中该点荧光强度， $\bar{F}$  表示该细胞静息时刻的平均荧光强度；

[0014] 通过上式计算得到每个点的动作电位，当计算出一帧图像中每个点的动作电位，则能够重构出某个时刻的等电势图；利用简化算法先得到平均静息电位荧光图像，然后从得到的荧光图像直接减去背景图像，最后计算得到等电势图。

[0015] 进一步，利用求导法和阈值法对得到的等电势图综合计算重构得到心脏的动作电位时程图。

[0016] 进一步，利用所述动作电位时程图计算得到的兴奋波前传导和复极图，重构出等时图。

[0017] 本发明还提出一种实现上述用于测定或者监测组织或细胞跨膜电位变化的方法的装置，包括：

[0018] 外围支持系统：维持组织细胞活性并能够灌注染料；

[0019] 处理控制单元:将荧光信号的变化与细胞跨膜电位相关联;

[0020] 光路检测系统:通过荧光激发的方式将待测细胞或者组织跨膜电位转变成光学信号并记录,并将光学信号传送给处理控制单元。

[0021] 上述外围支持系统包括内设有蛇形盘管的水浴加热装置、气瓶、气液混合瓶、莫菲氏滴管、支架、第一三通阀和第二三通阀;所述气液混合瓶没有瓶底且倒置,所述气瓶的接出管出口由气液混合瓶上端敞口伸入至内,所述气液混合瓶的下端连接莫菲氏滴管的进口,所述莫菲氏滴管的出口连接至水浴加热装置的蛇形盘管进口;水浴加热装置的蛇形盘管的出口连接第一三通阀,第一三通阀通过管道连接有第二三通阀;所述第二三通阀的出口连接至组织细胞。

[0022] 在上述第一三通阀和第二三通阀之间还连接有另外一套莫菲氏滴管;所述水浴加热装置的蛇形盘管的出口上也连接有套莫菲氏滴管;所述第一三通阀连接有蠕动泵。

[0023] 上述光路检测系统包括荧光激发光源、滤光光路和荧光检测系统;所述荧光激发光源采用 LED 阵列做为光源,设置在组织细胞附近;所述滤光光路包括透镜和滤光片,所述透镜和滤光片依次设置在由荧光激发光源照射组织细胞而反射的光路上;所述荧光检测系统为 CCD 相机,所述 CCD 相机的镜头对准所述滤光片的出射光。所述处理控制单元为计算机。

[0024] 本发明具有以下有益效果:

[0025] 1. 多位点同时记录:可以同时测量多个细胞(细胞群)或从多侧面记录单个细胞的电活动,动态显示膜电位的传导过程;

[0026] 2. 时间分辨率高:时间分辨率跨度超过 9 个数量级,可以从微秒级到小时级;

[0027] 3. 空间分辨率高:空间分辨率跨度超过 5 个数量级,可以从微米量级到分米级,可以记录细胞与细胞间的电传导;

[0028] 4. 广泛适用性:可以同时从不同层次着手研究:分子水平、细胞水平、组织水平到整个神经中枢,可以用于各种细胞和组织的电生理研究,并能克服电刺激造成的伪迹,研究心脏除颤中电场对细胞的影响,膜局部极化与激动波之间复杂的作用机制,可为电除颤和心律失常的临床治疗提供重要的指导性建议。这种方法还可通过脑部动作电位来在体研究视觉神经、嗅觉神经编码,提高人们对脑结构和功能的科学认知水平,为研究人员提供一个极为有力的技术工具,提供其他方法无法比拟的更加丰富的信息。

[0029] 本发明装置可以给研究人员直观的提供各种实时功能图像,计算动作电位时程变化等参数,同时灌注系统经过优化,不但能保证实验期间心肌细胞的生理活性,还可以完成染料加注以及复灌,消除长时间实验中光漂白的影晌。

## 附图说明

[0030] 图 1 是本发明结构示意图。

[0031] 图 2 是本发明荧光图像实时采集与处理流程图。

[0032] 图 3 是本发明重构得到的各种功能图像。

[0033] 图 4-5 是本发明在电生理研究中的一些应用,包括组织和器官层次的家兔心脏缺血研究(图 4)以及细胞层次的培养心肌细胞自主节律研究(图 5)。

## 具体实施方式

[0034] 本发明用于测定或者监测组织或细胞跨膜电位变化的方法为：首先将细胞跨膜电位变化转变成荧光信号，检测荧光信号光强的变化量  $\Delta F$  与细胞跨膜电位的变化  $\Delta V_m$ ，按照下式计算光学动作电位：

$$[0035] \quad V_n = -(F_n - \bar{F}) / \bar{F}$$

[0036] 上式中， $V_n$  表示第  $n$  帧中某点的细胞跨膜电位， $F_n$  表示该帧中该点荧光强度， $\bar{F}$  表示该细胞静息时刻的平均荧光强度；

[0037] 通过上式计算得到每个点的动作电位，当计算出一帧图像中每个点的动作电位，则能够重构出某个时刻的等电势图；利用简化算法先得到平均静息电位荧光图像，然后从得到的荧光图像直接减去背景图像，最后计算得到等电势图。

[0038] 另外，本发明还可以利用求导法和阈值法对得到的等电势图综合计算重构得到心脏的动作电位时程图。然后利用所述动作电位时程图计算得到的兴奋波前传导和复极图，重构出等时图。

[0039] 所述简化算法具体为：快速计算细胞静息时刻的平均荧光强度，理论上应该先计算得到跨膜电位，然后才能确定静息时刻，这样计算会很复杂。我们在实际中采用阈值法快速确定静息时刻荧光强度，选定某点荧光强度的最大值与最小值，二者的差就是膜电位的最大变化范围。然后设定两个阈值，在这两个阈值之间的为细胞静息时刻，将这些采样时刻的荧光平均后就是该点细胞静息时刻的平均荧光强度。

[0040] 下面结合附图对本发明做进一步详细描述：

[0041] 参照图 1，本发明提出一种用于实现上述方法的装置，该装置包括：外围支持系统，维持组织细胞活性并能够灌注染料；处理控制单元，将荧光信号的变化与细胞跨膜电位相关联；光路检测系统，通过荧光激发的方式将待测细胞或者组织跨膜电位转变成光学信号并记录，并将光学信号传送给处理控制单元。

[0042] 其中外围支持系统由 1-6 组成，包括内设有蛇形盘管的水浴加热装置 4、气瓶 1、气液混合瓶 2、莫菲氏滴管 3、支架、第一三通阀 5 和第二三通阀 6；气液混合瓶 2 没有瓶底且倒置，气瓶 1 的接出管出口由气液混合瓶 2 上端敞口伸入至内，气液混合瓶 2 的下端连接莫菲氏滴管 3 的进口，莫菲氏滴管 3 的出口连接至水浴加热装置 4 的蛇形盘管进口；水浴加热装置 4 的蛇形盘管的出口连接第一三通阀 5，第一三通阀 5 通过管道连接有第二三通阀 6；第二三通阀 6 的出口连接至组织细胞。其中，如图所示，第一三通阀 5 和第二三通阀 6 均设置在支架上，心脏等组织细胞也被固定设置在支架上。所述第一三通阀 5 和第二三通阀 6 连接有蠕动泵。

[0043] 在本发明的较佳实施例中，为了避免管道中存在气泡，在第一三通阀 5 和第二三通阀 6 之间还连接有另外一套莫菲氏滴管；水浴加热装置 4 的蛇形盘管的出口上也连接有套莫菲氏滴管。

[0044] 本发明的光路检测系统包括荧光激发光源 7、滤光光路和荧光检测系统 10。其中荧光激发光源 7 采用 LED 阵列做为光源，设置在组织细胞附近，如图 1 所示，LED 阵列成环状照射心脏的一侧，从而使由心脏反射回来的光能够通过环形阵列被滤光光路所捕获。本发明利用 LED 阵列，可以实现快速的波长切换，稳定的激发强度，从而得到很高的信噪比。只要直流稳压电源的输出电压的稳定度好，LED 阵列光源就是一种光强稳定的光源。同时，当

采用 LED 阵列光源的时候,可以通过电子开关来取代光学快门,降低光照时间,减小实验中的染料光毒性和光漂白等现象。

[0045] 滤光光路包括透镜 8 和滤光片 9,透镜 8 和滤光片 9 依次设置在由荧光激发光源照射组织细胞而反射的光路上。

[0046] 本发明的荧光检测系统 10 为 CCD 相机,该 CCD 相机的镜头对准滤光片 9 的出射光。本发明的处理控制单元为计算机 11,CCD 相机与计算机 11 连接。最终的功能图像与数据分析从计算机 11 获取。具体实施过程如下:维持离体心脏或者心肌组织活性并保证染料均匀的灌注由外围支持系统完成,其中设备 1-4 将台氏液或者 K 氏液等离体灌注液加热到体温 37-37.5 度并维持恒定,并和 95% 氧气与 5% 二氧化碳气体混合,然后经过第一三通阀 5 与第二三通阀 6 与电压敏感染料混合稀释后灌注到离体心脏或者心肌组织中。并利用第一三通阀 5 和第二三通阀 6 完成复灌与排气等作用,以消除光漂白等影响。在染料灌注 15-20 分钟后,打开荧光激发光源 7,LED 阵列组成的激发光源可根据染料的激发波长,由一个或者数个波长 LED 组成,系统通过程序控制实时选择某个波长作为激发波长,相应灌注电压敏感染料的细胞膜电位荧光信号经过透镜 8 放大与滤光片 9 后被高速 CCD 相机记录,计算机 11 根据采集得到的荧光图像,计算得到不同膜电位的染料光谱迁移,反解出实时细胞膜电位的变化,并根据这些变化,重构出等时图、等势图、激动波前图、动作电位时程图以及相位图等功能图像。在 CCD 相机和计算机 11 之间通过控制算法完成高速荧光图像的实时采集与传输控制。

[0047] 参照图 2,计算机系统主程序包括一个主线程和两个采集线程,主线程完成线程同步、资源初始化以及显示功能,两个采集线程交替采集和传输,以提高采集效率。采集线程完成数据从 CCD 相机到采集卡内存以及从采集卡内存到 PC 内存的传输,这个过程很少占用 CPU 时间。显示线程处理未被采集线程占用的 PC 内存中的数据,生成功能图像并实时显示。CCD 相机初始化成功以后,程序按照相机配置文件,初始化两块同样大小的采集卡内存,提供给两个采集线程交替使用。因为相机每秒产生的数据量高达 120MB,而采集卡最大的采集速度是 130MB/s,几乎接近采集卡上限。这样当单线程采集的时候,传输上一帧图像的时候会丢失下一帧图像的同步信号而降低采集速度。因此本发明使用双采集线程交替采集传输来提高采集性能。当采集线程完成一帧数据的采集和传输后,向主线程发送消息,消息包括刚刚完成传输的内存编号和线程标志信息,主线程按照顺序对采集到的荧光图像进行显示和处理。显示线程设计并完成一些简单功能图像的实时计算和显示,包括荧光图像中某几点的光学动作电位的重构和显示,单点动作电位的滤波和等电势图的重构等。

[0048] 各种功能图像如图 3 所示。图 3 中各种功能图像从左至右分别为原始采集得到的荧光图像(a),计算得到的等电势图(b),动作电位幅度图(c),相位图(d),等时图(e)以及等动作电位时程图。

[0049] 这其中,等电势图是重构其他功能图像的基础。等电势图中某个点代表某个细胞或者细胞群的实时跨膜电位变化。光标检测到的荧光光强的变化量  $\Delta F$  与细胞跨膜电位的变化  $\Delta V_m$  成线性关系,因此可以通过  $\Delta F/F$  反解出光学动作电位。使用

$$[0050] \quad V_n = -(F_n - \bar{F}) / \bar{F}$$

[0051] 来计算光学动作电位,其中  $V_n$  表示第 n 帧中某点的细胞跨膜电位,  $F_n$  表示该帧中该点荧光强度,  $\bar{F}$  表示该细胞静息时刻的平均荧光强度。通过公式可以计算得到每个点的

动作电位,当计算出一帧图像中每个点的动作电位,就可以重构出某个时刻的等电势图。

[0052] 在等电势图的基础上,可以重构得到动作电位时程图 APD。在静息电位基础上,心肌受阈上刺激后膜电位出现迅速的倒转和恢复称为动作电位。由于滤波无法完全滤去噪声,因此二阶差分最大值可以结合阈值法共同计算复极时间。与 APD 最大幅度 90% 阈值最接近的二阶导数最大值即为所求最大值。因为散射的影响,在心脏光学标测实验中,利用求导法确定的 APD 往往比利用幅度法确定的 APD 可靠,特别是在深层组织出现折返波的情况下。

[0053] 将 APD 图经过归一化,对按照时间顺序排列的不同图像进行重构后,将兴奋波前传导或者 APD 按照相对某帧图像的延迟大小进行重构,可以提供一帧可以直观快速反应心脏表面激动顺序的功能图像,就是等时图(isochronal map)。

[0054] 理论上的研究表明,自激动系统可以由相空间中激动核和恢复变量之间的关系来描述,但是在光学标测实验中,只有一个变量即跨膜电位可供观测。可以利用时间延迟创建了第二个变量, $F(t)$  和时间延迟信号  $F(t+\tau)$ ,利用这两个变量研究相空间的变化。相位图(phase map)就是  $F(t)$  和  $F(t+\tau)$  之间的相位变化。延时的选择就非常重要了,如果延时选择太小,这样在动作电位的 0 期和 3 期,相位都会有剧烈变化,而在 2 期和 4 期,相位变化趋近于 0。通过选择相位,可以重构出直观反映存在病理情况的相位图。相位图中相位剧烈变化的奇异点就是实际实验中折返发生的区域,奇异点代表该区域某些点既存在动作电位的 0 期,也存在动作电位的 3 期。

[0055] 各种功能图像如图 3 所示。

[0056] 图 4 至图 5 为本系统在定量电生理研究中的一些应用。

[0057] 图 4 为光学标测系统在家兔心脏急性全局性心肌缺血研究中的应用。实验挑选 2kg 左右的家兔(雌雄不限),耳外侧静脉注射麻醉药戊巴比妥钠(35mg/kg)及肝素(1000 单位/kg)。麻醉后开胸剪开心包,取出心脏,注意要留出一定长度的主动脉。将取出心脏迅速置于预先备好的 4℃ 灌注液使其停搏,并用手指轻压心室以利于排出残留血液,防止凝血形成血块。

[0058] 心脏停跳后,打开灌注系统的流量控制开关,将主动脉和灌流系统插管结扎固定,灌注首先采用 37℃ 不含 BDM 的普通台氏液(浓度 mM, NaCl 130, KCl 4.0, CaCl<sub>2</sub> 21.8, MgCl<sub>2</sub> 1.0, NaHCO<sub>3</sub> 24, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, 葡萄糖 5.6。实验前调整灌注液的 PH 值为 7.4),心脏经温暖的充氧灌注液灌流后,一般可立即恢复跳动,但起初心率较慢并常伴有心律不齐,以后逐步恢复正常并稳定。用 32 导生理参数记录仪(Cadwell Easy II)观察并记录三导联心电信号。观察电极记录的心电图,主要是查看心率。等心脏跳动稳定后再换用含 BDM 的灌注液,使心脏停止收缩但还保留电活动。加入 BDM 后不应立即加入染料,而应该观察一段时间,等待心电图上观察到的心率逐步恢复且稳定后再加注电压敏感染料 di-4-ANEPPS 0.4 μl (5mg 染料溶于 4 μl DMSO 中)。灌注染料后 15—20 分钟后开始记录数据,并将灌流速度降低到正常速度的 30%,同时记录时间,一段时间以后恢复灌流速度,观察缺血再灌注的现象。为了降低染料的光漂白,在不记录数据的时刻关闭光源开关。所有功能图像都如图 3 所述方法重构的。

[0059] 从图中可以看出,随着缺血时间的延长,APD 呈逐渐缩短的趋势,急性全心脏缺血导致动作电位幅度有所降低,除极速度变慢,动作电位上升沿斜率降低,同时动作电位平台



期有所缩短,但是复极速度没有明显变化。

[0060] 图 5 光学标测系统在培养小鼠心室肌细胞中的应用。心室肌细胞通过胰酶消化获得细胞悬液,经过染色后通过荧光显微镜获取原始荧光图像,其功能图像如图 3 所述各方法重构得到。图中可看到刚出生小鼠分离出来的心室肌细胞仍然具有自律性。

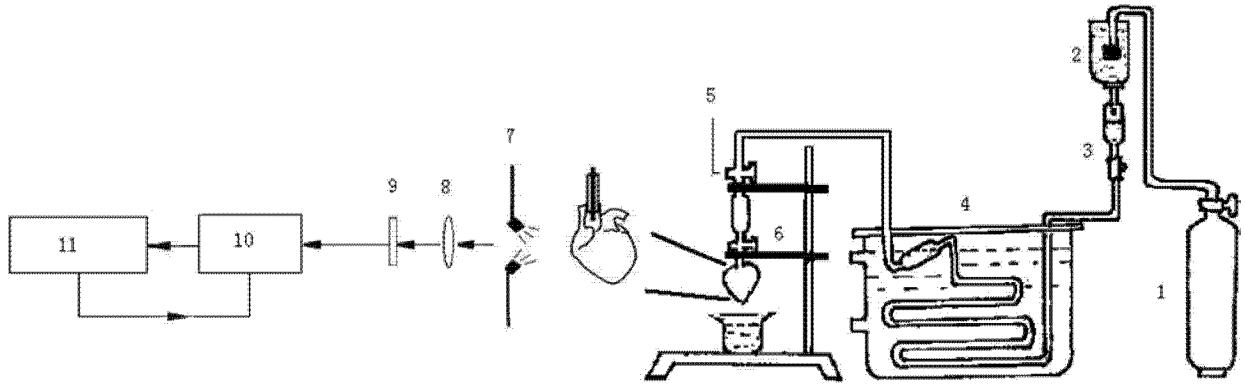


图 1

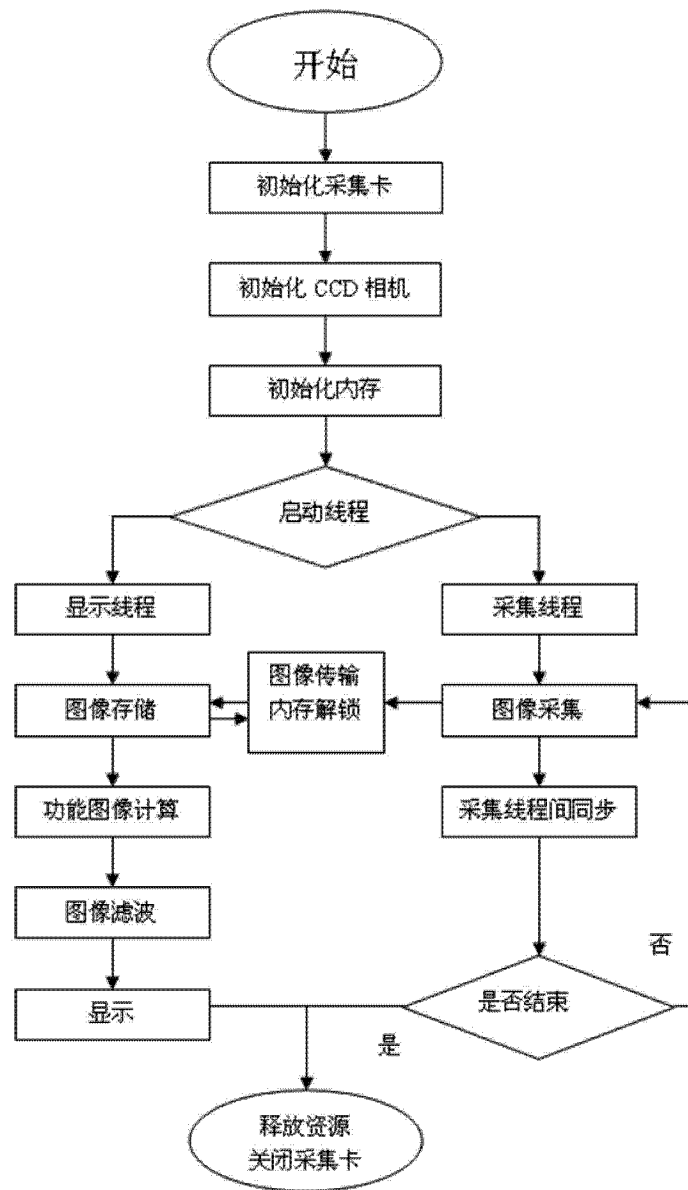


图 2

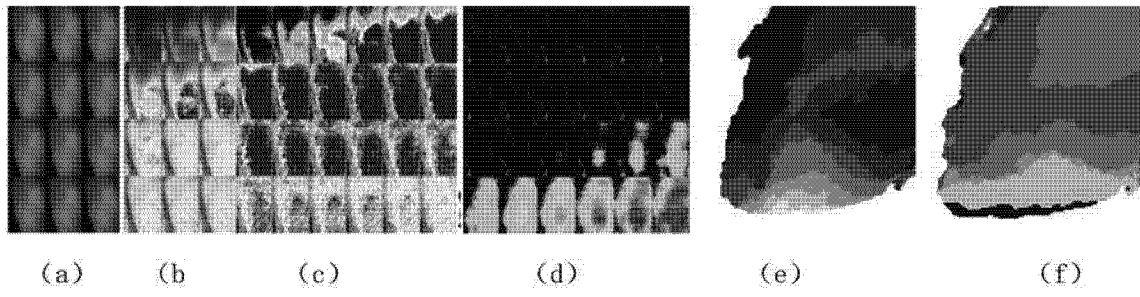


图 3

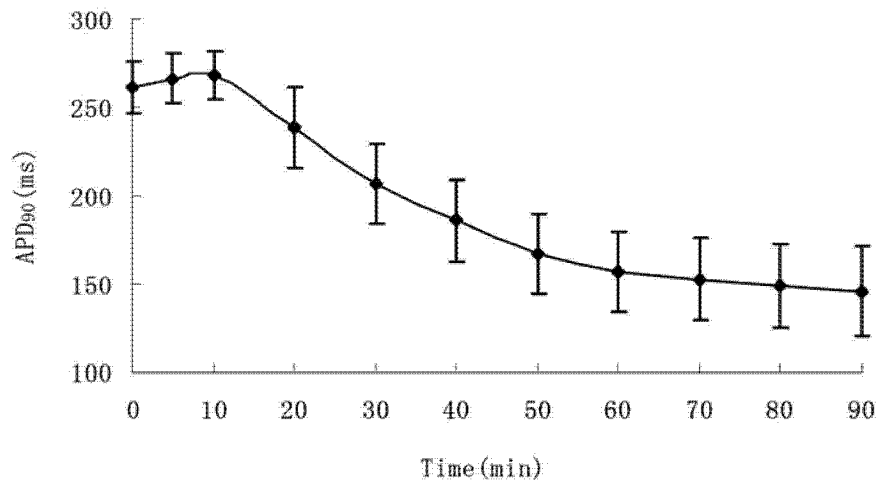


图 4

