

基于 ANEP 染料荧光光谱迁移的单波长心脏光学标测系统

王 晶¹, 张镇西^{1*}, 徐正红^{1,2}, 金妍姝¹, 季晓璐¹, 金印彬^{1,2}

1. 生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安交通大学生命科学与技术学院生物医学分析技术与仪器研究所, 陕西 西安 710049
2. 西安交通大学电气工程学院, 陕西 西安 710049

摘 要 近几年来, 光学标测技术已经成为心脏电生理研究中一种非常重要的手段。它利用对嵌在细胞膜上的电压敏感染料随着膜电位变化而产生的荧光光谱迁移进行成像, 来进行心律失常与电击除颤等电生理研究。文章测量了常用的电压敏感染料 di 4 ANEPPS 的荧光光谱, 并根据该染料的光谱迁移, 设计了一套包括一个通用 CCD 相机的单波长光学标测系统, 可以达到较高的时空分辨率。记录心肌细胞中的电兴奋传导过程, 从而可以为今后国内心律失常作用机制的研究工作提供一个有力的工具。

关键词 光学标测技术; 电压敏感染料; di 4 ANEPPS; 荧光光谱; CCD 相机

中图分类号: TP391 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2008)03-0617-04

引 言

光学标测(Optical mapping)技术是借助于电压敏感染料(voltage sensitive dyes, VSDs)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功能成像技术, 是“细胞分子电生理”研究中观测微观电兴奋传导(Microscopic impulse propagation)唯一的不接触不穿刺的工具。它不仅可以多位点、同步、无损地记录心肌细胞群的膜电位变化, 测量细胞与细胞间的电传导, 而且可以记录全心脏的电活动, 并转化为细胞动作电位以及除极、复极等时图、等势图和动作电位时程(APD)图等彩色的图像显示^[1]。特别是由于微电极无法记录电击除颤时刻的电信号, 使得光学标测技术成为研究电击除颤最有力的工具之一。国外近十年来研究热点集中在利用光学标测来探讨心律失常的发生机制、电击除颤的机理、电场诱导心肌电活动及机械电反馈作用的影响等方面, 研究主要在美国开展, 取得了不少意义非凡的研究成果, 但国内鲜有报道。

目前最常用的电压敏感染料之一是 di 4 ANEPPS, 其荧光光谱会随着膜电位的改变而移动^[2-6], 荧光光谱迁移越明显, 则相同膜电位变化下荧光强度变化越明显, 通过测量其荧光强度变化, 便可以还原细胞膜电位的变化。本文研究了 di 4 ANEPPS 的光谱移动特性, 并根据荧光光谱的变化与膜电位变化的关系, 设计了一套快速荧光成像系统。

1 染料的光谱特性

电压敏感染料是可以把灌注组织或者可激动细胞表面膜电位变化转换为近似线性变化的光学信号的分子荧光探针。快反应染料目前应用范围最广的是 ANEP(amino naphthyl ethenyl pyridinium)染料 di 4 ANEPPS 和 di 8 ANEPPS, 1985 年 Loew 等发现它们的荧光光谱可以被膜电位强度所调制^[5], 1992 年 Loew 等研究了它们在细胞膜、细胞、灌注组织等不同模型上的光学特性^[6]。通过这些研究, 大家发现 ANEP 染料具有很高的时间响应速度, 每 100 mV 会导致 10% 的荧光强度改变, 光稳定性很高, 而光毒性非常的小, 对于心脏电生理方面的应用, 是非常理想的, 在细胞膜上的稳定度更高^[7]。图 1 所示是 di 4 ANEPPS 和 di 8 ANEPPS 的结构图^[8]。

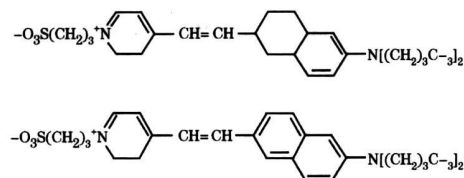


Fig 1 Structures of ANEP dyes, the upper one is di 4 ANEPPS, the other is di 8 ANEPPS

di 4 ANEPPS 和 di 8 ANEPPS 的荧光光谱受外界环境的影响非常大, 因此当细胞膜内外电位发生改变的时候, 染

收稿日期: 2006-09-09, 修订日期: 2006-12-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(60378018, 60578026)资助

作者简介: 王 晶, 1978 年生, 西安交通大学生命科学与技术学院博士研究生 * 通讯联系人 e-mail: zxzhang@mail.xjtu.edu.cn

©1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

料的结构由于电场力的作用而发生细微的变化, 从而造成光谱迁移。图 2 所示为 $\text{di} 4 \text{ ANEPPS}$ 在不同心肌细胞膜中的光谱特性, 显示的是不同心肌细胞静息膜电位差异下的染料荧光光谱迁移。实验中采用的仪器设备是 HITACHI F 4500 荧光分光光度计和 JASCO V-550 紫外-可见分光光度计。实验中使用 3 只 2 kg 左右的家兔的心脏, 离体采用 Langendorff 法灌注(台式液, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl 130, KCl 4.0, CaCl_2 1.8, MgCl_2 1.0, NaHCO_3 24, NaH_2PO_4 1.2, 葡萄糖 5.6,

充入 95% 氧气与 5% 二氧化碳的混合气), 灌注 20 min 后加入电压敏感染料 $\text{di} 4 \text{ ANEPPS}$ 350 μL (5 mg $\text{di} 4 \text{ ANEPPS}$ 溶解于 4 mL DMSO), 灌注 1 h 后分别将左右心房心室组织切片, 测量激发光谱和发射光谱, 观察到心室组织的最大激发峰在 $(485.45 \pm 0.12) \text{ nm}$, 最大荧光峰在 $(574.05 \pm 0.33) \text{ nm}$ 处; 而心房组织的最大激发峰在 $(482.58 \pm 0.64) \text{ nm}$, 最大荧光峰为 $(570.10 \pm 0.45) \text{ nm}$ 。

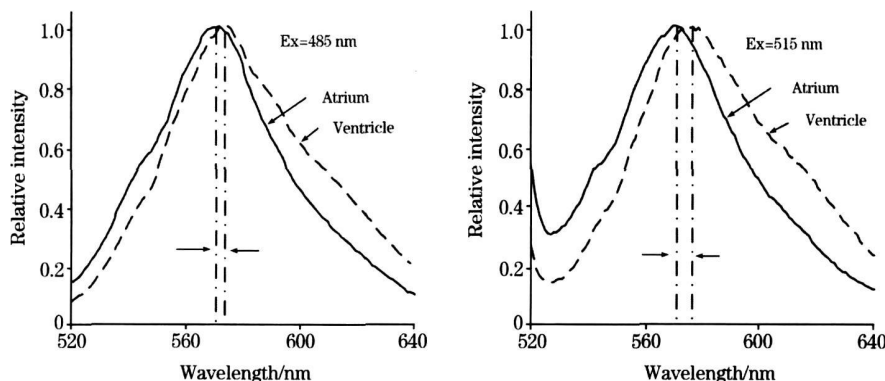


Fig 2 Shifts of dye fluorescence emission spectra of ventricles and atriums with excitation at different wavelengths. The dashed lines show the peaks of the fluorescence emission spectra

当膜电位改变的时候, $\text{di} 4 \text{ ANEPPS}$ 和 $\text{di} 8 \text{ ANEPPS}$ 的荧光光谱也发生迁移, 随着膜电位的增大, 荧光光谱发生蓝移, 如图 2 所示。因为测量用的是新鲜心肌组织, 其细胞膜存在静息电位。兔心房的平均静息电位为 -67 mV 而心室是 -74 mV , 可以发现心房组织的最大荧光峰波长小于心室组织。而且激发波长越大, 其光谱迁移越明显。激发波长 515 nm 时, 心房心室组织的发射光谱差异(可视为平均 7 mV 的膜电位变化)明显大于 485 nm 激发^[9,10]。根据实验中测得光谱结果, 当激发波长大于 515 nm 时, 荧光信号明显减弱。参考 Entcheva 等的研究, 当激发光波长小于 535 nm 的时候, 荧光强度和信噪比有着明显下降^[11], 选择 515 nm 作为激发波长时, 系统信噪比会得到提高。Kao 等利用膜片钳技术, 得到不同膜电位下荧光的差分光谱(Difference spectra), 当波长小于 570 nm 时, 随着电压的增大, 荧光强度增加, 而大于 570 nm 时则荧光强度随着电压增大而减小, 而差分光谱的峰值在 550 和 630 nm^[2]。荧光的差分光谱峰值 630 nm, 则意味着荧光强度随电压的变化在 630 nm 附近最大, 所以选择荧光中心波长在 630 nm 附近。

2 单光源光学标测系统

根据 $\text{di} 8 \text{ ANEPPS}$ 的荧光光谱迁移, 我们设计了一套单光源光学标测系统, 如图 3 所示。光源采用中心波长 515 nm 的 LED 阵列, 经过滤光(Omega optical, XF1019, $520 \pm 30 \text{ nm}$)和二向色镜(Omega optical, XF2016, $> 580 \text{ nm}$ 通过), 照射到灌注电压敏感染料的离体动物心脏上, 荧光信号经过二向色镜 XF2016 和滤光片(Omega optical, XF3015,

$> 620 \text{ nm}$)后被 CCD 相机(DALSA, 16K5H)采集。

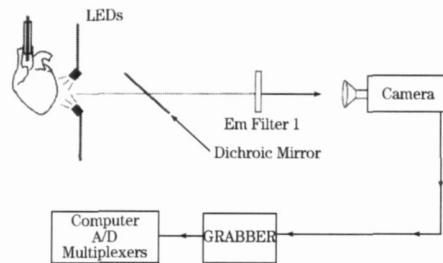


Fig 3 Optical mapping system. We use 515 nm LEDs as light resource, fluorescence of wavelength longer than 610 nm is passed to an emission filter and imaging by a CCD camera

一般人心电信号的采样频率在 250 Hz 以上, 而家兔的心率比人快的多, 则动物实验中的数据采样频率至少要 300 Hz, 也就是 CCD 相机的帧速要达到每秒 300 帧以上, 一般心室肌电兴奋的传播速度为 $0.5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, 实验中的待测区域为 $20 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$, 则在 300 帧的采集速度下, 在一个周期内, 可以采集到 12 帧有效信号。我们采用 DALSA 16K5H 相机, 数据采集卡是 METROX METTOR DIG/II, 自编基于 Mil lite7.5 和 Visual c++ 6.0 的双线程图像采集程序可以实现图像每秒 300 帧连续采集存储, 最大采集速度为每秒 768 帧, 每帧 128×128 像素, 12 级灰度图像, 动态范围 1 600:1。根据记录下来的膜电位变化, 我们可以重构出目标区域的各种功能图像。

3 结果与讨论

实验中在离体家兔心脏灌注染料 20~30 min 后拍摄荧光图像(灌注方法如前)。相机采集速度 300 fps, 结果存储为 16 位灰度 tiff 格式。图 4 为拍摄到的荧光图像, 第一帧图像为原始荧光图像(由于计算机只能显示 8 位灰度, 因此选择显示 12 位灰度图像中的低 8 位), 后面的图像是减去第一帧图像后的荧光强度变化图。实验中家兔心率一般在每分钟 130 次以上, 图 4 中所示为每隔 4 帧显示 1 帧, 则可以在 140 帧(28×5)图像中观察到心室不同区域交替兴奋的过程(中间

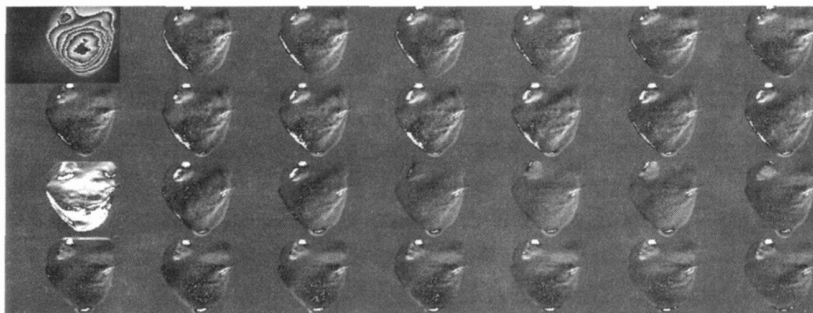


Fig 4 Optical mapping of action potential with an intact heart. It is 28 frames of 140 consecutive frames

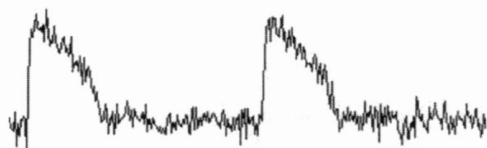


Fig 5 The APD map, based on $\Delta F/F$

由于心肌细胞收缩会引起运动伪迹, 所以在实验中必须加入钙阻断剂 BDM, 但是无法从根本上消除由于细胞兴奋时光学参数的改变所造成的伪迹。由于染料溶剂会对细胞电活动造成部分影响, 因此还需要进一步实验来摸索染料灌注方法, 寻找合适灌注时间和速度。根据染料的荧光光谱漂

移, 当波长小于 570 nm 的时候, 染料荧光强度的变化随着膜电位的升高而增大, 与波长大于 570 nm 的情况正好相反, 因此我们可以利用这一特性, 在今后的研究中, 采用双波长检测, 利用不同荧光波长对膜电位改变的响应不同, 来减小伪迹, 从而提高整个系统的信噪比。

基于 CCD 相机的快速荧光检测技术在生物医学中的应用越来越广泛^[12-14], 本文介绍了一种心电信号荧光检测系统, 基于电压敏感染料 di 4 ANEPSS 的荧光光谱迁移, 利用一个 CCD 相机, 可以对离体灌注的家兔心脏进行荧光成像, 根据得到的荧光图像, 得到动作电位时程图, 可以对心律失常等复杂电生理模型进行研究, 为电生理研究提供一个有力的工具。

参 考 文 献

- [1] XU Zheng-hong, ZHANG Zhen-xi, WANG Jing, et al. Proceedings of SPIE., 2003, 5254: 452.
- [2] Kao W Y, Davis C E, Kim Y I, et al. Biophys. J., 2001, 81: 1163.
- [3] Efimov I R, Cheng Y N. Quantitative Cardiac Electrophysiology, USA: Marcel Dekker. Inc., 2002.
- [4] Baxter W T, Mironov S F, Zaitsev A V, et al. Biophys. J., 2001, 80: 516.
- [5] Loew L M, Cohen L B, Salzberg B M. Biophys. J., 1985, 47: 71.
- [6] Loew L M, Cohen L B, Dix J, et al. J. Membr. Biol., 1992, 130: 1.
- [7] Bullen A, Saggau P. Biophys. J., 1999, 76: 2272.
- [8] Richard P Haugland. The handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes. ISBN 0-9710636-4-8, Invitrogen Corp. 973.
- [9] XU Zheng-hong, ZHANG Zhen-xi, WANG Jing, et al(徐正红, 张镇西, 王 晶, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(7): 1363.
- [10] LI Bi-hong, XIE Shu-sen(李步洪, 谢树森). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(7): 1083.
- [11] Entcheva E, Kostov Y, Tchernev E, et al. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2004, 51(2): 333.
- [12] LIN Dan-ying, SUN Yun-xu, MA Wan-yun, et al(林丹樱, 孙云旭, 马万云, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(5): 917.
- [13] XU Zheng-hong, ZHANG Zhen-xi, JIN Yi-bin, et al. Computers in Biology and Medicine, 2007, 37(5): 732.
- [14] XU Zheng-hong, JIN Yi-bin, ZHANG Zhen-xi, et al(徐正红, 金印彬, 张镇西, 等). Journal of Xi'an Jiaotong University(西安交通大学学报), 2006, 40(10): 1157.

An Optical Mapping System Based on Spectral Shift of Voltage-Sensitive Dyes

WANG Jing¹, ZHANG Zhen-xi^{1*}, XU Zheng-hong^{1,2}, JIN Yan-shu¹, JI Xiao-lu¹, JIN Yi-bin^{1,2}

1. The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, and Institute of Biomedical Analytical Technology and Instrumentation, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China
2. College of Electrical Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

Abstract Recently, non-invasive optical methods to monitor transmembrane electrical potential using voltage sensitive dyes have been applied widely in the studies of normal and pathological heart rhythms and defibrillation. In the present paper, the authors measured the excitation and the emission spectra of the voltage sensitive dyes Di-4-ANEPPS bound to phospholipid bilayer membranes. And according to the spectral shift of Di-4-ANEPPS, the authors presented an optical mapping system combining a DA-L-SA CCD camera and a LED light source. Using this optical mapping system, the authors could record the action potential duration of the heart cells with high spatial and temporal resolutions. It can be a powerful tool in the study of cardiac arrhythmia mechanisms.

Keywords Optical mapping; Voltage sensitive dyes; Di-4-ANEPPS; Fluorescence spectral shift; CCD camera

(Received Sep. 9, 2006; accepted Dec. 16, 2006)

* Corresponding author