技术与方法 文章编号:0253-3626(2011)07-0836-06

微电极阵列芯片技术研究不同发育阶段 C57 小鼠心肌细胞的电生理特性

张 玲[1],孙 娟[2],时 利[3],侯月梅[1]

(1. 新疆医科大学第一附属医院心律失常实验室,乌鲁木齐 830054;2. 新疆自治区人民医院神经内科,乌鲁木齐 830001;3. 中国人民解放军总医院肿瘤科,北京 100853)

【摘 要】目的:微电极阵列芯片技术研究不同发育阶段 C57 小鼠心肌细胞的电生理特性。方法:分离 13.5~19.5 d 胎鼠和 2 d 乳鼠的心室肌细胞并培养于微电极阵列(Microelectrode arrays,MEA)电极盘中 48 h,通过倒置相差显微镜,透射电镜、扫描电镜观察其形态,免疫组化鉴定并用 MEA 技术研究其电生理特性。并对生后 1、7、14、21、28、35、>60 d 的意识清醒未麻醉的小鼠行心电图(Electrocardiogram,ECG)和心率变异性(Heart rate variability,HRV)记录。结果:胎鼠心室肌细胞场电位时程(Field potential duration,FPd)随发育而增加($P<0.01$),乳鼠的突然明显缩短($P<0.01$)。胎鼠心室肌细胞的搏动频率随发育而减慢。出生后小鼠的心律是窦性心律,平均 PR、RR、QRS、QT、JT 间期随发育逐渐缩短,7 d 组比 1 d 组减少的差异有统计学意义($P<0.01$),而 14、21、28、35 和>60 d 之间差异无统计学意义。J-S-T 段在 1 d 小鼠明显抬高,7 d 组和 14 d 组逐渐降低,到 35 d 则基本回到基线。HRV 随发育逐渐增加。结论:C57 小鼠胎鼠心肌细胞 FP 电生理特性的变化和生后小鼠 ECG 间期和形态随发育的变化可能为小鼠心脏随发育的电生理特性提供有用的信息。

【关键词】微电极阵列;小鼠;发育;电生理特性

【中国图书分类法分类号】R329 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-05-06

作者介绍:张 玲(1982-),女,博士,研究方向:心律失常的诊断、治疗和机制研究。

通信作者:侯月梅,女,教授,Email:houyuemei@sina.com。

基金项目:新疆高新技术发展资助项目(编号:201010105);新疆维吾尔自治区心血管病研究重点实验室开放课题资助项目(编号:XJDX0903-2009-03)。

的作用,并且期望能通过调节四环素的浓度,调控阻抑蛋白对四环素操纵子下游的 S 基因表达的的调控。结果表明,转染后未加四环素诱导的细胞上清中,表达 HBsAg水平极低,其 S/N 值未达到阳性标准;而加不同量四环素进行诱导后,细胞上清中 HBsAg 表达量随着时间的延长逐渐增加,以 72 h 后最明显,但在同一时间点表达量与四环素的浓度似乎关系不大。

本实验构建了 S 基因的四环素调控表达载体,在体外的研究中,该重组载体实现了四环素对 HBsAg 表达的调控作用,即加入四环素后启动了目的基因的表达,但没有实现不同浓度四环素对目的基因表达量的精确调控。这方面还需要进行深入的研究,比如开发新的调控表达载体,改变 TO/TR 的比例,实现目的基因最佳的调控表达,以期用于临床进行基因治疗。

参 考 文 献

[1] Clackson T.Regulated gene expression system gene therapy[J].2000,7(2):120-125.

[2] Agha-Mohammadi S,O'Malley M,Etemad A.Second-generation tetracycline-regulatable promoter:repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness[J].J Gene Med,2004,6(7):817-828.

[3] Gossen M,Bujard H.Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoter[J].Proc Natl Acad Sci USA,1992,89(12):5547-5551.

[4] Yao F,Svensjox T,Winkler T.Tetracycline repressor,-tetR,rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives,regulates inducible gene expression in mammalian cells[J].Hum Gene Ther,1998,9(13):1939-1950.

[5] Xu Z L,Mizuguzhi H,Mayumi T.Regulated gene expression from adenovirus vector:a systematic comparison of various inducible system Gene[J].2003,309(2):145-151.

[6] 周 智,倪 艳.四环素双表达调控表达载体的构建、鉴定[J].重庆医科大学学报,2006,31(1):23-25.

(责任编辑:张学颖)

Study on electrophysiological characteristics of cardiomyocytes at different developmental stages from C57 mice by microelectrodes arrays

ZHANG Ling[1], SUN Juan[2], SHI Li[3], HOU Yue-mei[1]

(1. Laboratory of Arrhythmia, the First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University;

2. Department of Neurology, the People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region;

3. Department of Oncology, Chinese PLA General Hospital)

【Abstract】*Objective*: To explore electrophysiological characteristics of cardiomyocytes at different developmental stages from C57 mice by microelectrodes arrays. *Methods*: The single ventricular cardiomyocytes from fetal in 13.5~19.5 d and neonatal in 2 d C57 mice were obtained and cultured in MEA(microelectrode arrays)plates about 48 h respectively, and to be observed through the methods of inverted phase contrast microscope, transmission electron microscope, scanning electron microscope, and identified through immunocytochemistry and MEA which investigated the electrophysiological properties.ECGs and heart rate variability(HRV)were recorded in conscious, unsedated C57 mice at different postnatal days(days 1,7,14,21,28,35,>60). *Results*: The field potential duration prolonged with the increase of gestational age in cultured ventricular cardiomyocytes ($P<0.01$), then decreased in neonatal ($P<0.01$).And the beat frequence decreased with development in ventricular cardiomyocytes from embryotal mice.In postnatal mice, the heart rhythm was sinus rhythm, mean PR, RR, QRS, QT, JT interval decreased with development, there was significant difference on day 1 and day 7($P<0.01$), and without significant difference on day 14, 21, 28, 35 and > 60.The J-S-T segment was elevated in day 1 neonatal, resolved by day 14 and disappeared in 35 day.The HRV increased with development. *Conclusion*: The field potential properties of embryonic cardiomyocytes and ECG intervals and morphological changes during the normal postnatal mice with development may provide some useful information for exploration the development of electrophysiology characteristics in heart from C57 mice.

【Key words】microelectrode array ; mice ; development ; electrophysiology characteristics

小鼠是心血管领域及转基因研究重要的模型动物，是评估心血管基因或基因突变对心血管表型和心血管疾病的影响的有用工具。以往主要用膜片钳技术对其进行电生理特性的研究，局限于单个细胞，不能反映细胞间电活动传导状况，且有创、很难进行长时程检测。Li Wang 等用膜片钳技术发现孕 18 d、生后 1、3 d 和成年 FVB 小鼠的钾电流及出生后心电图存在发育性的变化[1-3]，本实验首次采用微电极阵列(Microelectrode arrays, MEA)标测技术[4-8](60 个位点同步、动态无创长程记录)结合心电图(Electrocardiogram, ECG)对 C57 小鼠心室肌细胞从孕 13.5 d 到成年心脏随发育变化的电生理特性进行分析和比较。为小鼠胎鼠心肌细胞的发育、生理特性、毒性实验、药物筛选提供手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取 2 月龄 C57 BL/6 孕小鼠 12 只，孕龄 13.5、14.5~19.5 d[9]，每段孕龄各取 2 只。出生 1、3、7、14、21、35、>60 d 龄 C57 BL/6 小鼠共 315 只，雌雄不拘，分为 1 d 龄(35 只)、3 d 龄(33 只)、7 d 龄(33 只)、14 d 龄(26 只)、21 d 龄(25 只)、28 d 龄(75 只)、35 d 龄(68 只)。成年小鼠(>60 d 龄 20 只)。来源于新疆医科大学实验动物中心[SCXK(新)2003-0001]。

1.1.2 主要试剂 高糖 DMEM(Hyclone，批号 SH30022.01B)，胎牛血清(FBS, Gibco 批号：619559)，生长液：10% FBS 的高糖 DMEM 液，消化液：0.05%胰蛋白酶(trypsin, Gibco 批号 25300-054)，抗兔 α-actin(1:200，北京博奥森生物技术有限公司，批号：010186)。

1.1.3 主要仪器 lead-2000 锦江电生理仪(频响范围 0.05~30 Hz，采样频率 3 960 Hz，16 bit/通道)，Cardio win 谷山丰心电工作站。倒置显微镜(Olympus)，倒置荧光显维镜(Zeiss MIC01562)，显微照相系统(Zeiss AxioVision 4.1)。

1.2 方法

1.2.1 心室肌细胞分离和培养 分别取孕 13.5~19.5 d 胎鼠心室中下 1/3 处，将心室肌移至 DMEM 液切为 1 mm^3 左右的组织块，用 0.05 %的胰蛋白酶反复消化分离为单个细胞。用含 15% FBS 的高糖 DMEM 混悬置于 60 mm 培养皿内，于 37℃ 5% CO_2 饱和湿度的培养箱内 45 min 差速贴壁法去除成纤维细胞，吸出上层细胞悬液，离心后弃上清，1~2 ml 生长液混悬，台盼蓝染色计数，以 5×10^5 个/ml 的细胞密度分别接种到 6孔细胞培养板及 MEA 盘中培养 48 h[10]，观察细胞的形态及自发搏动频率和 FP。

1.2.2 心室肌细胞一般特性的观察及鉴定 对培养 48 h 的心室肌细胞分别行倒置相差显微镜、扫描电镜、透射电镜观察。通过抗 α-actin 单克隆抗体的免疫组化检测行心肌细胞的纯度鉴定。

电生理鉴定(MEA 观察)：小鼠胎鼠心室肌细胞在盛有生长液的 MEA 电极盘中铺成细胞单层，MEA 盘包括 60 个电极(电极间距为 100 μm，电极直径 10 μm)。待心室肌细胞培养 48 h 后，先将接种心室肌细胞的 MEA 盘置于 MEA 1060 放大器中，接温控仪，在 37℃下 60 个微电极同步标测培养的心室肌细胞局部场电位时程及搏动频率的变化。软件 MC-Rack 对场电位信号进行采样，采样数据显示于屏幕并储存于计算机，以备离线分析[11,12]。

1.2.3　小鼠心电图的记录、测量和分析　采用 lead 2000 锦江电生理仪将 14、21、28、35、>60 d 龄小鼠置于保定器中，银针电极插于四肢皮下。用胶布将 1、7 d 龄固定于台上。待小鼠安静 5~10 min 后，用 lead 2000 锦江电生理仪记录同步标准肢体六导心电图。并分析心率(HR)、P-R 间期、Q-T 间期和 QRS 时限、JT 间期、QRS 振幅。所得数据为连续 5 个 P-QRS-T 波群的平均值[13,14]。

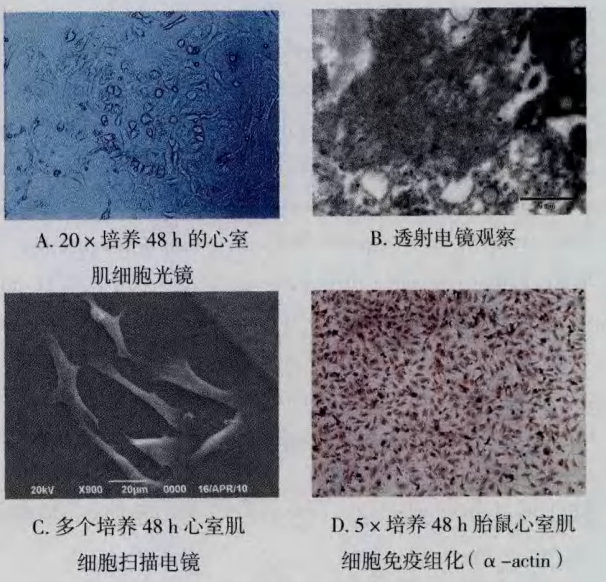
1.2.4　HRV 测量和分析　采用 cardio 心电工作站，接Ⅱ导心电图记录 10 min 行心率变异性记录和分析。

1.2.5　统计分析方法　数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，使用 SPSS 16.0 软件包分析，组间比较采用单因素方差分析，取 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。多组间比较采用 *Dunnett* 法。

2　结　果

2.1　心肌细胞的一般特征

用倒置相差显微镜观察可见消化后的心室肌细胞为圆形，培养 1 h 后开始贴壁生长，伸展为梭形及分叉状(图 1A)。12 h 后少数细胞自发搏动，但搏动频率和节律不同。24 h 大部分细胞可生长为单层，搏动频率为 30~90 次/min。48 h 后细胞铺展更加明显且伸出伪足相互接触交织成网，搏动可呈同步性，搏动频率 30~130 次/min，日龄越小，细胞搏动频率相对越快。透射电镜观察培养的心肌细胞尚未发育成熟，无典型的心肌细胞特点，未见明显的细胞膜、细胞核和肌小节。可见原始的肌丝较发达，游离的核糖体、糖原丰富(图 1B)。扫描电镜观察细胞大多数呈梭形、三足形、多角形，细胞中心较厚向周边逐渐变薄，细胞逐渐伸长伸出伪足并相互形成连接(图 1C)，心肌细胞由单个的独立跳动转为同步搏动。因心肌细胞有肌动蛋白，故用抗 α-actin 单克隆抗体做免疫组化检查对心肌细胞进行鉴定，可见胞浆呈棕黄色染色的细胞为心肌细胞，而非心肌细胞胞浆染色呈阴性。结果显示几乎 98% 的细胞呈现胞浆阳性(图 1D)。说明此时心肌细胞较纯，同时从整体也证明了此细胞是心肌细胞。



A. 20× 培养 48 h 的心室肌细胞光镜　B. 透射电镜观察

C. 多个培养 48 h 心室肌细胞扫描电镜　D. 5× 培养 48 h 胎鼠心室肌细胞免疫组化（α-actin）

图 1　14.5 d 龄胎鼠培养 48 h 心室肌细胞

2.2　MEA 观察

心室肌细胞接种并培养于 MEA 盘内，可见细胞在 MEA 盘的 60 个电极上及电极周围生长爬片。通过 MEA 盘与放大器连接后可记录到 60 个电极处的心室肌细胞细胞外场电位信号。

24 h 后可见开始有散在、不同步的细胞搏动和点状场电位信号，由于培养心室肌细胞 FPs 传导以及心肌细胞与微电极端贴靠状况的差异，并非所有的微电极都能记录到稳定的

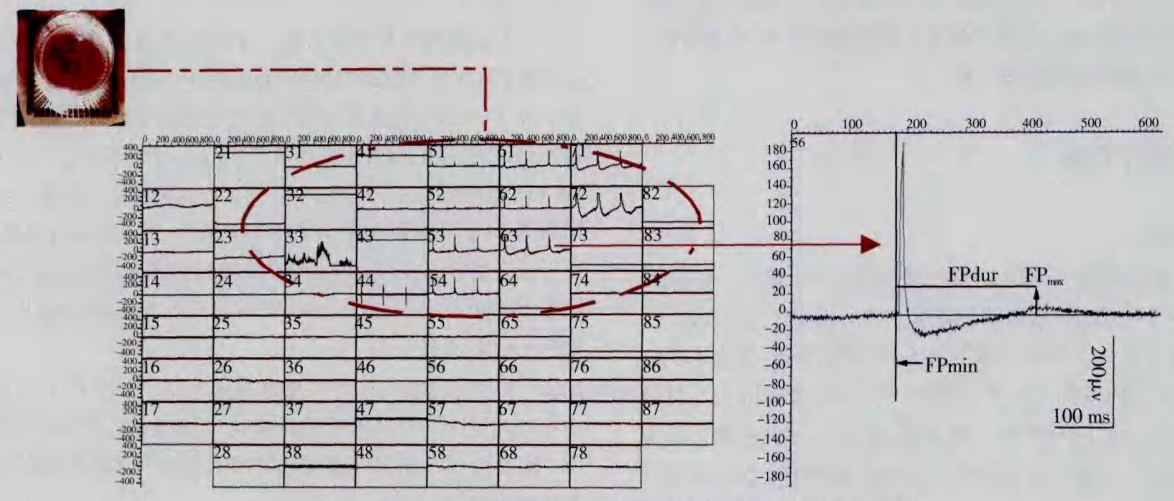


图 2　孕 14.5 d 小鼠培养 48 h 心室肌细胞的 MEA 场电位时程记录

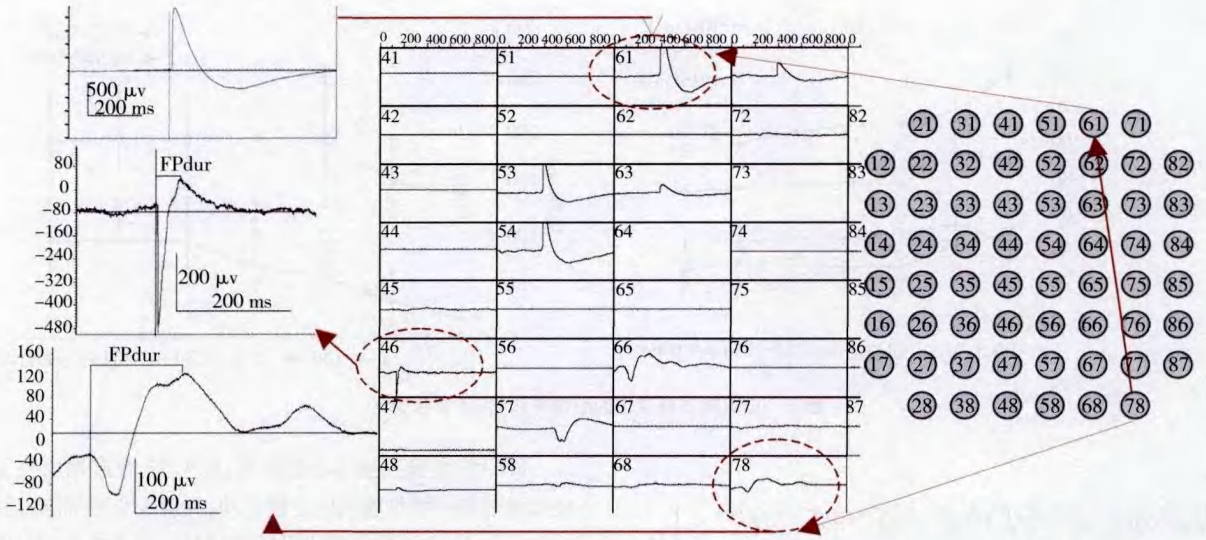
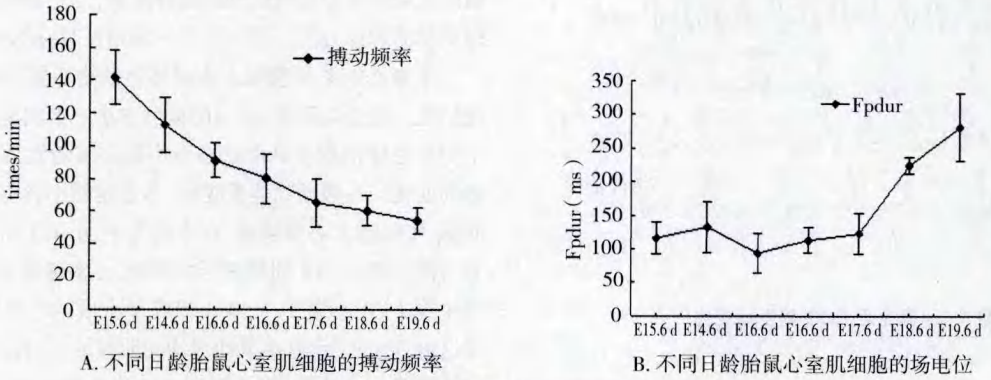


图 3 孕 19 d 培养在 MEA 电极盘上 48 h 后心室肌细胞场电位图



A. 不同日龄胎鼠心室肌细胞的搏动频率　　B. 不同日龄胎鼠心室肌细胞的场电位

图 4 不同日龄胎鼠心室肌细胞的搏动频率和场电位

FPs信号。48 h 后细胞融合部分电极开始记录到基本同步的群动和多位点的场电位(FP field potential)，培养心肌自发搏动频率平均 30~90 次/min。场电位的形态类似于动作电位，方向呈正向或倒置，场电位记录有如下几个参数：FPpre 是第 1 个正向峰值；FPmin 是场电位的第 1 个负向波峰值，即最小场电位；FPmax 是场电位的最后 1 个正向波的峰值，即最大场电位；FPrise 是自基线部位到最小场电位(FPmin)之间 10%至 90%位置的时间；FPdur 被定义为 FPmin 和 FPmax 之间的时间。可见场电位类似于细胞的动作电位，其场电位时程和动作电位及心电图的 QT 间期相对应，因此能反映细胞的除极和复极时间(图 2)。

因为 MEA 是 60 个电极同步记录，因此，可以根据其除极出现的时间来判断其最早激动的点，从图 3 可见 78 号电极细胞激动较早，61 号电极激动最晚，激动从 78 号电极传导到 61 号电极。说明胚胎心肌细胞早在 13.5 d 就表现出了自律性、收缩性、传导性。同时发现胎龄越小这种不同记录电极间的传导差异性越小，可能跟 If 电流在胎心非自律细胞都有表达，随着发育 If 在非自律细胞表达减弱，同时在自律细胞越来越强，从而产生从最高自律性的起搏点下传的同步收缩。

取信号强且稳定处的数据为研究对象，可见随着胎鼠孕龄的增加，心室肌场电位时程逐渐延长，到出生前最后 1 d (19.5)的场电位时程最长，出生后又降低(图 4A)。心室肌细胞的搏动频率从孕 13.5 d 到生后逐渐减低(图 4B)。

2.3 各鼠龄组小鼠心电指标分析

各鼠龄组小鼠的心律均为窦性心律，常可见窦性心律不齐。平均心率约为(422.16±63.32)次/min。

本研究 7、14、21、28、35 d 龄小鼠 RR、PR、QRS、QT、JT 间期呈逐渐减少趋势(图 5)，且各组和 1 d 龄组相比差异均有统计学意义($P<0.01$)。HRV 随 d 龄增加逐渐增大(图 5)。QRS 振幅 7 d 龄较 1 d 龄明显增加，后又逐渐缓慢降低，且各组和 1 d 龄组相比差异均有统计学意义($P<0.01$)。所有小鼠心电图 P 波形态为Ⅱ导联向上，avR 导联向下，波形分界清晰，无明显 PR 段。1 月龄前的小鼠均无明显 S 波，QRS 除极不完全，在 R 波降支即出现 J 波，后接较小的负向波即 T 波。1 月龄之后部分小鼠出现 S 波，早期复极现象消失。可见小鼠心电图明显的年龄相关性的改变，整个 J-ST-T 复合波时限随发育逐渐缩短，小鼠心电图 ST-T 抬高的平台部分随日龄逐渐降低，到 1 月龄已接近等电位线(图 6)。和 Li Wang 等研究 FBS 小鼠的结果一致[2]。

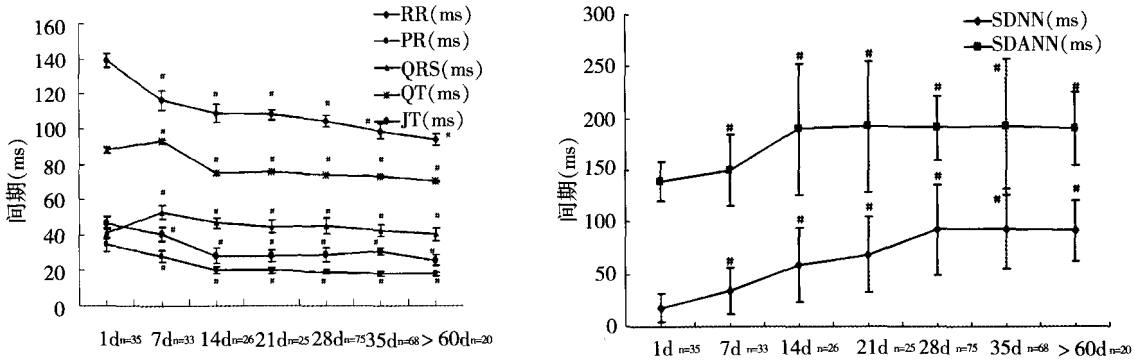


图 5 小鼠随发育变化的心电图和 HRV 参数变化

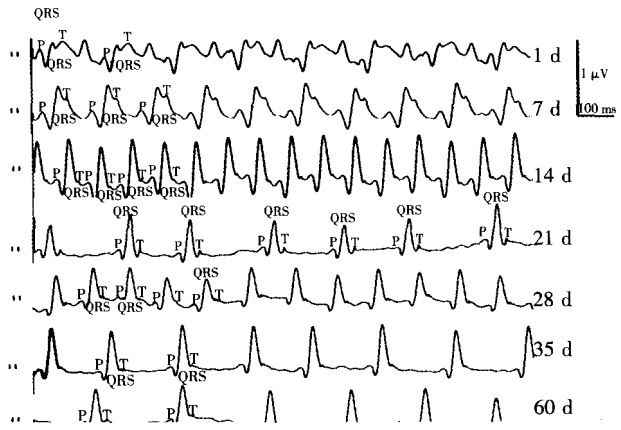


图 6 小鼠生后 ECG 随发育变化

3 讨 论

C57 小鼠作为国内外心血管疾病研究及转基因研究重要的实验模型动物，关于其心脏电生理特性的研究主要来自于膜片钳单细胞水平的研究，不能反映细胞间电活动传导状况。1972 年 Thomas 首次报道了用来检测细胞外电兴奋性细胞活动的多电极阵列，他们记录了培养的鸡心肌细胞自发收缩组织的场电势[15]。为研究 C57 小鼠心脏随发育变化的电生理特性，本文在国内首次对不同胎龄的胎鼠心肌细胞分离后培养于 MEA 中，研究其随发育变化的搏动情况和场电位变化和传导情况。在国内首次对清醒状态未麻醉出生后的 C57 小鼠行随周龄变化的心电图记录，为研究小鼠心脏发育生理学建立一种新的模式。

通过 MEA 记录的场电位形态和动作电位具有可比性，二者形态相似，方向相同或倒置。二者都属于细胞贴附式细胞外记录，动作电位反应的是单个细胞的变化，MEA 除可以反应单个细胞的电位，尚可反应细胞之间的传导和相互联系，且非损伤性易于长时程记录。本实验首次记录的培养胎鼠心室肌场电位时程随着发育逐渐延长，细胞的搏动频率逐渐减低。由于尚未进一步行膜片钳验证离子的变化，尚待进一步研究探索。

MEA 的电极直接与心脏贴附，更忠实、直接地反映了电极接触部位心肌细胞的电生理活动，且属于心肌细胞直接接触细胞外 60 个电极二维水平同步记录，利于多点 FPs 的长时程记录，并可反映细胞与细胞之间的信息传递。而非心电图的反应整体心脏电活动的综合向量，是一种研究心脏电生理活动的理想方法。但三者有一定相互对应的关系[6,16-19]。

体表心电图是获取人体或整体动物心脏去极化和复极化信息一种最为简便、易行的检测方法。本实验进一步研究了生后在体清醒非麻醉状态下小鼠心脏随发育变化的心电图的变化。一般动物体重越轻、年龄越幼小者有心率越快的倾向，年龄越大心率越慢。在本研究中，小鼠生后随着生长发育日龄的增加，RR 间期进行性缩短，心率逐渐增快。Li Wang 等也在 FVB 小鼠 1、7、14 d 和成年小鼠的心电图上观察到了这种现象[2]。所有小鼠幼鼠均无明显的 ST 段，QRS 波群之后紧接着一个快速、向上显著的正向波即 J 波，随后接以一个较慢的、波幅很小的负向 T 波。可见小鼠心电图明显的年龄相关性的改变，整个 J-ST-T 复合波时限随发育逐渐缩短，小鼠心电图 J-ST-T 抬高的平台部分随日龄逐渐降低，到 1 月龄已接近等电位线。Antzelevitch 通过对心室肌内膜、中层、外膜的动作电位分析和电生理研究提出心室肌瞬时外向钾电流的分布离散是 J 波产生的基础。心外膜和 M 层心肌细胞复极过程中 2 相平台期消失，一部分心室肌 2 相复极提前，甚至消失，其细胞学基础是细胞内 Ca^{2+} 浓度升高[20]。心率变异性则增加，可能随着小鼠的生长发育，由交感神经系统占优势转为由迷走神经系统占优势。刚出生小鼠迷走神经发育和功能近成熟，而交感神经发育尚远未成熟，结合和储存去甲肾上腺的能力不全，基础代谢率高、基础心率较快、心率变异性低，说明神经体液因素对心脏电生理活动的调节是在发育过程中逐渐成熟的。

7、14、21、28、35 d 小鼠心率、PR、QRS、QT、JT 间期均较 1 d 组减低，与文献报导相似。可能由于 Ito 和 IK1 随发育的变化导致心脏动作电位的改变。IKr 是胎鼠心室肌的主要的复极电流，AP 有平台期，但在生后早期表达改变，到发育成年就消失，而以 Ito 作为主要复极电流，使 AP 平台消失，AP 明显缩短[1-3]。

本文通过 MEA 技术结合心电图系统地研究了小鼠随发

育的心脏电生理特性，为研究小鼠心脏发育生理学建立一种新的模式。本研究未行膜片钳的研究，如能结合膜片钳对细胞动作电位及细胞内离子水平随发育变化进一步研究，将更有利于小鼠心脏发育机制的阐明。

参 考 文 献

[1] Wang L,Duff H J.Identification and characteristics of delayed rectifier K^+ current in fetal mouse ventricular myocytes[J].Am J Physiol Heart Circ Physiol,1996,270(6 Pt 2):H2088-2093.

[2] Wang L,Swirp S,Duff H.Age-dependent response of the electrocardiogram to K^+ channel blockers in mice[J].Am J Physiol Cell Physiol,2000,278(1):C73-80.

[3] Wang L,Feng Z P,Kondo C S,et al.Duff HJ.Developmental changes in the delayed rectifier K^+ channels in mouse heart[J].Circ Res,1996,79(1):79-85.

[4] Reppel M,Pillekamp F,Lu Z J,et al.Microelectrode arrays:a new tool to measure embryonic heart activity[J].J Electrocardiol,2004,37(s1):104-109.

[5] Asai Y,Tada M,Otsuji T G,et al.Combination of functional cardiomyocytes derived from human stem cells and a highly-efficient microelectrode array system:an ideal hybrid model assay for drug development[J].Curr Stem Cell Res Ther,2010,5(3):227-232.

[6] Ide A N,Andruska A,Boehler M,et al.Chronic network stimulation enhances evoked action potentials[J].J Neural Eng,2010,7(1):16008.

[7] Liang H,Matzkies M,Schunkert H,et al.Human and murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes serve together as a valuable model for drug safety screening[J].Cell Physiol Biochem,2010,25(4-5):459-466.

[8] Varghese K,Molnar P,Das M,et al.A new target for amyloid beta toxicity validated by standard and high-throughput electrophysiology[J].PLoS ONE,2010,5(1):8643.

[9] Christoffels V M,Habets P E,Franco D,et al.Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart[J].Dev Biol,2000,223(2):266-278.

[10] Bursac N,Parker K K,Iravanian S,et al.Cardiomyocyte cultures with controlled macroscopic anisotropy:a model for functional electrophysiological studies of cardiac muscle[J].Circ Res,2002,91(12):45-54.

[11] 侯月梅，娜几娜，热依兰·艾沙.微电极阵芯片技术在整体心脏、心肌组织片和培养心肌中的应用[J].中华心血管病杂志，2008，36(10)：944-946.

[12] 侯月梅，娜几娜，马 丽，等.微电极阵对多非利特干预豚鼠心室肌场电位的研究[J].中华心血管病杂志，2006，34(12)：1131-1132.

[13] 张 玲，张 彦，段明军，等.清醒状态昆明小鼠随日龄变化的心电图分析[J].中国实验动物学报，2010，18(2)：113-117.

[14] Mitchell G F,Jeron A,Koren G.Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse[J].Am J Physiol,1998,274(3 Pt 2):747-751.

[15] Thomas C A J,Springer P A,Loeb G E,et al.A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells[J].Exp Cell Res,1972,74(1):61-66.

[16] Halbach M,Egert U,Hescheler J,et al.Estimation of action potential changes from field potential recordings in multicellular mouse cardiac myocyte cultures[J].Cell Physiol Biochem,2003,13(5):271-284.

[17] Liang H,Halbach M,Hannes T,et al.Electrophysiological basis of the first heart beats[J].Cell Physiol Biochem,2010,25(6):561-570.

[18] Hai A,Shappir J,Spira M E.Long-term,multi-site,parallel,in-cell recording and stimulation by an array of extracellular microelectrodes[J].J Neurophysiol,2010,104(1):559-568.

[19] Chan Y C,Tse H F,Siu C W,et al.Automaticity and conduction properties of bio-artificial pacemakers assessed in an in vitro monolayer model of neonatal rat ventricular myocytes[J].Europace,2010,12(8):1178-1187.

[20] Yan G X,Antzelevitch C.Cellular basis for the electrocardiographic J wave[J].Circulation,1996,93(2):372-379.

（责任编辑：冉明会）

欢迎投稿，敬请订阅

《重庆医科大学学报》

邮发代号 78-132