

西安交通大学

硕士学位论文

心肌细胞钙信号的检测与分析方法研究及其应用

学位申请人：贺雯瑾

指导教师：谢文俊

学科名称：生物医学工程

2020 年 05 月

Detection and Analysis Methods and Application of Calcium Signals in Cardiomyocyte

A thesis submitted to
Xi'an Jiaotong University
in partial fulfillment of the requirements
for the degree of
Master of Engineering

By
Wenjin He
Supervisor: Prof. Wenjun Xie
Biomedical Engineering
May 2020

摘要

钙离子是维持心肌细胞正常生理功能最重要的离子之一，它不仅是电兴奋与机械收缩之间的耦连因子，还作为第二信使广泛参与细胞代谢、分泌、调控和信号传导等多种生理过程。心肌细胞内钙离子主要储存于“钙库”肌浆网内，其释放主要由肌浆网膜上广泛分布的 Ryanodine 受体 (RyR) 来完成和调控。钙火花 (Ca^{2+} sparks) 是肌浆网钙释放的基本单位，在生理状况下，全细胞肌浆网的钙释放受到动作电位的协调而同步发生形成遍及整个细胞质的钙瞬变 (Ca^{2+} transients)，而极少有自发性钙火花事件的出现。自发性钙火花的增加以及其在细胞内的传播形成的钙波 (Ca^{2+} waves)，往往与心肌细胞的病理状态联系在一起。这些增加的自发性钙释放也被称为肌浆网钙泄漏 (Ca^{2+} leak)，是常见的心脏疾病比如心衰、房颤等的细胞内重要标志。因此，对心肌细胞内钙信号的定量研究，是心脏疾病领域的热点。目前激光共聚焦显微镜配合荧光探针来研究细胞内钙信号已经是钙离子研究的主流方法，但是针对钙信号的定量检测与分析一直缺乏一个统一的标准和相应的配套软件工具，而且传统的方法主要针对心室肌细胞，对近十年兴起的心房肌细胞的研究并不适合。本文在此背景下，对传统的钙信号相关检测分析算法进行了改进并开发出了一套面向用户的全自动检测分析软件，适合于心室肌和心房肌细胞钙信号的定量研究。随后针对传统肌浆网钙泄漏的定量分析方法的不足，提出了一种新的定量研究肌浆网钙泄漏的方法。在此基础上完成了对野生型和病理模型下小鼠心房与心室肌细胞钙信号的对比研究。本文主要研究工作包括：

1. 基于 IDL 平台完成了钙信号全自动检测分析软件的设计与实现。为解决传统算法对高频钙信号检测精度不稳定、检测分析效率不高的问题，本文对荧光强度归一化和检测阈值的计算方法分别进行优化，且对钙火花的时空表现进行拟合，使得软件不仅适用于生理情况下低频的钙火花事件的检测，而且对病理情况下心肌细胞尤其是心房肌细胞中高频的钙信号的检测准确率也得到了大幅提升。另外，软件扩充了钙波和钙瞬变的检测模式，方便使用者在研究过程中快速对检测过程进行切换，以适应不同的研究需求。

2. 开发了一种肌浆网钙泄漏评价的新方法。现阶段对肌浆网钙泄漏的定量评估主要有两种方法：1) 通过丁卡因和咖啡因转换抑制和完全激活 RyR 间接评估相对钙泄漏量。该方法需要特殊溶液抑制细胞膜钙离子内流和外排操作比较复杂，而且精度不高。2) 利用钙火花来评估肌浆网钙泄漏。然而研究表明还有一些比单个钙火花更小的钙释放事件（钙夸克），它们用钙火花检测方法会被忽略掉。基于此，我们在钙火花线扫描图像的基础上，提出了两个新参量：荧光偏差参量 R_fluo 和流量偏差参量 R_flow ，分别对应肌浆网钙信号的总体体量和释放阶段的钙电流总和。这些参量综合考虑了钙火花和钙夸克代表的钙释放事件，而且避免了计算大量钙火花所带来的数据处理上的复

杂度。最后我们通过计算新参量与钙泄漏经典参量之间的相关性，证实了两个新参量在描述肌浆网钙泄漏能力上的有效性。

3. 对心房肌细胞钙信号进行了系统的特征分析。选取野生型和 RyR2 基因突变型两种小鼠，分别获取心房与心室肌细胞并记录三种特征钙信号。我们发现，心房肌细胞释放出的钙火花相较于心室肌细胞而言频率更高，幅度更强，时间参数也有延长，并且这一关系在基因突变型小鼠中被强化。对钙波的研究中，基因突变小鼠钙波的上升时间和半衰时间在心房和心室肌细胞内差异比野生型更为明显。因此我们得出结论，虽然 RyR2-R2474S 基因突变模型的主要表型是室性心律失常，但在细胞层面，其对心房肌细胞的 RyR2 功能产生的影响比在心室肌细胞更为显著，因而通过检测心房肌细胞的活动可能比心室肌细胞的相关检测更能作为心脏疾病早期的诊断标志。

本文的创新点在于，开发了拥有全新算法和全新界面的钙信号自动检测分析软件，以及同时开发了一种评价肌浆网钙泄漏的新方法。最后利用新检测软件和评价方法分析了心房肌细胞的钙信号特征及钙泄漏水平。

关键词：心肌细胞；钙信号；肌浆网钙泄漏；软件开发；新方法

论文类型：应用研究

ABSTRACT

As the most important second messenger in the body, calcium ion directly participates in the coupling of excitatory contraction of cardiomyocytes to affect the contraction and relaxation of cardiomyocytes. The maintenance of its steady state is extremely important to ensure the realization of physiological functions of cardiomyocytes. Therefore, the research on the regulation of calcium ions in cardiomyocytes has always been a research hotspot of researchers. At present, laser confocal microscopy combined with fluorescent probes to study intracellular calcium signals is already the mainstream method of calcium ion research. Under this background, this paper has developed a calcium signal automatic detection and analysis software for laser confocal line scanning fluorescence images. Subsequently, a new parameter describing calcium leakage of the sarcoplasmic reticulum was proposed, and on the basis of this, a comparative study of calcium signals between mouse atrium and ventricular myocytes in wild-type and pathological models was completed. The main research work of this article includes:

1. Completed the design and implementation of the calcium signal automatic analysis software. In order to solve the problems of unstable calcium signal detection accuracy and low detection and analysis efficiency, this paper first developed a calcium signal automatic detection and analysis software based on the IDL platform. In this paper, the fluorescence intensity normalization step and the detection threshold calculation method in the previous detection methods are optimized separately, and the spatiotemporal performance of calcium sparks is simulated, so that the software not only improves the accuracy of calcium spark event detection, but also improves the output parameters Accuracy. In addition, we have expanded the detection mode of calcium wave and calcium transient for the software, so that users can quickly switch the detection process during the research process to adapt to the changing research situation. Therefore, the expansion of the calcium spark detection function greatly improves the practicality of the software, so that the software can be better adapted to more scientific research occasions.

2. Completed the development of new parameters for evaluation of sarcoplasmic reticulum calcium leakage. Based on the current research status of sarcoplasmic reticulum calcium leakage and cardiovascular disease, we have developed two new parameters for describing sarcoplasmic reticulum calcium leakage: fluorescence deviation parameter R_fluo and flow deviation parameter R_flow . The new parameter is based on the histogram fitting of the amplitude distribution of the fluorescence image to estimate the noise level, and then the original signal is subtracted from the noise signal and normalized. This parameter avoids the possible detection errors in the process of calcium spark detection in the calculation, and also avoids the complexity of data processing caused by the calculation of a large number of calcium sparks. Finally, by calculating the correlation between the new parameters and the

classic parameters of calcium sparks, we confirmed the effectiveness of the two new parameters in describing the calcium leakage capacity of the sarcoplasmic reticulum.

3. Comparing the calcium signals of atrium and ventricular myocytes. Two wild-type and RyR2 gene mutant mice were selected to obtain atrial and ventricular myocytes and record three characteristic calcium signals. We found that for calcium sparks, the calcium sparks released by atrial myocytes are more frequent and stronger than ventricular myocytes, and the time parameters are also prolonged, and this relationship is found in mutant mice. Intensification, the difference between atrium and ventricle is more obvious. In calcium transients, the amplitude and rise time of calcium transients in the atria of wild-type mice are higher than those in ventricles, but they do not exist in genetically-mutated mice. In the final study of calcium waves, the rise time and half-life of calcium waves in genetically mutated mice differed more significantly in the atrial and ventricular myocytes than in the wild type. Therefore, we conclude that although the RyR2-R2474S gene mutation model has been considered as one of the causes of catecholamine-sensitive ventricular tachycardia, this gene mutation also has a significant effect on the RyR2 function of atrial myocytes, which may cause Other cardiovascular diseases related to atrial myocytes.

The innovation of this article lies in the development of a calcium signal automatic detection and analysis software with a new algorithm and a new interface, as well as a new method for evaluating calcium leakage of the sarcoplasmic reticulum. Finally, the new detection software and evaluation method were used to analyze the calcium signal characteristics and calcium leakage levels of atrial myocytes.

KEY WORDS: cardiomyocytes, calcium signaling, sarcoplasmic reticulum calcium leak, software development, new method

TYPE OF THESIS: Application Research。

目 录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
1 绪论.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 心肌细胞兴奋收缩耦联.....	2
1.3 心肌细胞内的钙离子通道.....	4
1.4 心肌细胞肌浆网钙信号与研究方法.....	9
1.5 本文主要研究内容及章节安排.....	11
2 传统钙信号检测分析软件开发.....	13
2.1 引言.....	13
2.1.1 激光共聚焦线扫描荧光图像特征.....	13
2.1.2 钙火花图像的主要研究方法.....	14
2.2 钙信号检测原理及算法改进.....	15
2.2.1 钙火花检测原理.....	15
2.2.2 钙火花检测算法的改进与优化.....	16
2.2.3 钙瞬变的检测与分析.....	21
2.2.4 钙波的检测与分析.....	21
2.3 钙信号自动分析软件设计.....	22
2.3.1 软件开发环境的选择.....	22
2.3.2 需求分析.....	23
2.3.3 软件架构设计及功能实现.....	23
2.4 软件系统性能测试.....	26
2.5 本章小结.....	30
3 肌浆网钙泄漏新检测方法研究.....	32
3.1 肌浆网钙泄漏研究背景.....	32
3.1.1 钙泄漏与心血管疾病.....	32
3.1.2 钙泄漏的传统检测方法.....	33
3.2 肌浆网钙泄漏检测新方法.....	36
3.2.1 理论原理.....	37
3.2.2 新参量的计算方法.....	37
3.2.3 新参量的优势.....	40
3.3 新方法有效性评价.....	41
3.3.1 荧光偏差参量的相关性分析.....	41

3.3.2 流量偏差参量相关性分析结果:	42
3.4 本章小结	43
4 心房肌细胞钙信号特征研究	44
4.1 引言	44
4.2 实验材料与方法	45
4.2.1 实验鼠基因型鉴定	45
4.2.2 离体小鼠心肌细胞的制备	47
4.2.3 激光共聚焦显微镜测定细胞内钙信号	47
4.2.4 数据处理	48
4.3 实验结果与讨论	48
4.3.1 心室及心房肌细胞的钙火花比较研究	49
4.3.2 心室及心房肌细胞的钙瞬变比较研究	52
4.3.3 心室及心房肌细胞的钙波比较研究	53
4.3.4 结果讨论	55
4.4 本章小结	56
5 结论与展望	58
5.1 本文成果	58
5.2 展望	59
致 谢	60
参考文献	62
攻读学位期间取得的研究成果	66
声明	

CONTENTS

ABSTRACT (Chinese).....	I
ABSTRACT (English).....	III
1 Preface	1
1.1 Background	1
1.2 Cardiomyocyte excitation-contraction coupling	2
1.3 Calcium channels in Cardiomyocyte.....	4
1.4 Cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum calcium signal and research methods	9
1.5 The main content of this article	11
2 Algorithm improvement and software development of Ca^{2+} signal detection	13
2.1 Introduction	13
2.1.1 Fluorescence image features from Confocal laser scanning microscope.....	13
2.1.2 Main research methods of calcium spark images	14
2.2 Calcium signal detection principle and algorithm improvement	15
2.2.1 Principle of calcium spark detection	15
2.2.2 Improvement of calcium spark detection algorithm.....	16
2.2.3 Detection and analysis of calcium transients	21
2.2.4 Detection and analysis of calcium waves.....	21
2.3 Calcium signal automatic detection and analysis software design.....	22
2.3.1 Selection of software development environment	22
2.3.2 Demand analysis.....	22
2.3.3 Software architecture design and function implementation	23
2.4 Software System Performance Test.....	25
2.5 Summary of this chapter.....	29
3 Research on the new detection method of sarcoplasmic reticulum calcium leakage.....	31
3.1 Research background of sarcoplasmic reticulum calcium leakage	31
3.1.1 Calcium leakage and cardiovascular disease.....	31
3.1.2 Traditional detection methods for calcium leakage.....	32
3.2 New method of calcium leakage detection in sarcoplasmic reticulum	35
3.2.1 Theoretical principles	36
3.2.2 New parameter calculation method	36
3.2.3 Advantages of new parameters	39
3.3 Evaluation of the effectiveness of the new method	40
3.3.1 Correlation analysis results of fluorescence deviation parameters	40
3.3.2 Results of correlation analysis of flow deviation parameters:	41
3.4 Summary of this chapter	42
4 Calcium signal characteristics of atrial myocytes	43
4.1 Introduction	43
4.2 Experimental materials and methods	44

4.2.1 Experimental mouse genotype identification	44
4.2.2 Preparation of isolated mouse cardiomyocytes	46
4.2.3 Determination of intracellular calcium signal by laser confocal microscope	46
4.2.4 Data processing	47
4.3 Experimental results and discussion	47
4.3.1 Comparative study of calcium sparks in ventricular and atrial myocytes	48
4.3.2 Comparative study of calcium transients in ventricular and atrial myocytes.....	52
4.3.3 Comparative study of calcium waves in ventricular and atrial myocytes	54
4.3.4 Discussion of results	55
4.4 Summary of this chapter	56
5 Conclusion and Prospect	58
5.1 Achievements of this article	58
5.2 Outlook	59
Acknowledgements	60
References	62
Research results achieved during the degree study	65

1 绪论

1.1 研究背景

随着社会的不断发展，人们群众的生活方式不断发生着显著变化，尤其伴随着人口老龄化和城市化的加快，我国心血管疾病的患病人数不断增加，并且预计在未来 10 年，我国心血管病的患病人数仍将持续增长。目前，在我国城乡居民的死亡原因中超过 40%死于心血管疾病^[1]，显著高于肿瘤、呼吸疾病等其他疾病因素，并处于首要位置。

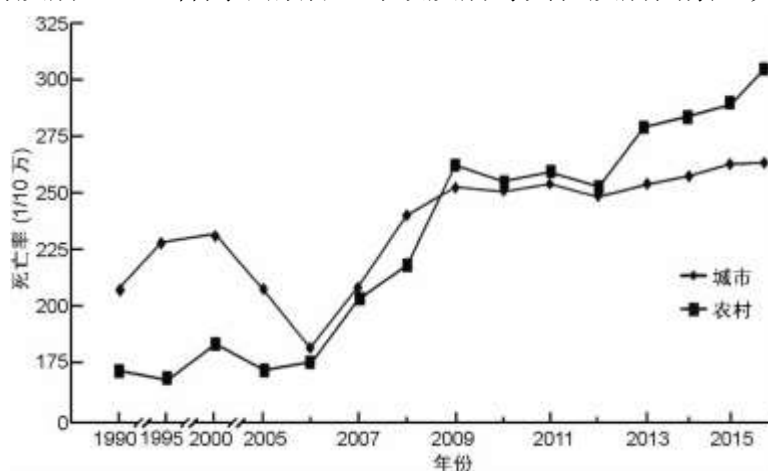


图 1-1 1996-2016 年中国城乡居民心血管病死亡率变化^[1]

心血管疾病已成为我国国民生命健康的最大威胁，对心血管疾病的研究和防治也一直受到广泛的关注。其中，心房颤动 (atrial fibrillation, AF) 和心力衰竭 (heart failure, HF) 是临床上最常见的心血管疾病，其中房颤在中国 35 岁以上人群中的发病率为 0.71%，而慢性心力衰竭的患病率则显示为 0.9%^[2]。

心血管疾病的危险诱因有很多，微观上主要表现为受到钙离子调控的心肌细胞功能异常。钙离子是生物体内非常重要的元素，广泛存在于机体内的各个位置，承担着丰富的生理功能。其中，绝大多数钙都存在于骨骼和牙齿中，其余在血液和细胞等组织内，维持着机体的凝血、肌肉收缩，神经传导等功能的正常运转。在动物细胞内，钙主要有三种存在形式，第一种是固定结合在细胞成分或大分子上；第二种是以离子的形式自由的存在于细胞内，即游离钙。在正常的生理情况下，细胞内外的钙离子浓度差异十分悬殊，细胞膜内的钙离子浓度约为 $10^{-8} \sim 10^{-7} \text{mol/L}$ ，而细胞外的钙离子浓度则达到了 $10^{-3} \sim 10^{-2} \text{mol/L}$ 。第三种是与一些高容量但低亲和力的钙结合蛋白松弛地结合于细胞器内，如肌浆网、线粒体等钙库，在细胞接收到特定的信号后能够将这些钙离子释放到胞浆内，影响胞浆内钙离子浓度。在这三者当中，第三种方式的钙含量占主要地位。细胞内的游离钙虽然只占全部钙含量的很小一部分，但其作为第二信使广泛的分布在机体内的各种组织器官当中，精密的参与并调控着细胞的多种生理生化过程，包括酶

的激活、神经递质的释放、基因的转录、细胞的凋亡等等。

钙离子所参与的钙信号传递是影响心脏生理功能的重要机制，它的正常与否直接决定并调控着心肌细胞的兴奋收缩。在正常生理状况下，细胞内的钙离子传递受着非常严苛而精密的调控，但在非正常情况下，人们常常能观察到一些不受控制的钙信号释放事件，我们将这些非正常的钙释放叫做钙泄漏 (Ca^{2+} leak)。已有研究表明，心律失常、心衰等心血管疾病的发生与心肌细胞肌浆网上的钙泄漏有着密不可分的联系。人们在研究心血管疾病中的钙泄漏时，常用钙火花 (Ca^{2+} Spark) 来描述钙泄漏的程度。钙火花是心肌细胞钙活动的基本单元，其余钙信号则是多个钙火花的共同表现。随着技术的不断发展，现常采用激光共聚焦显微镜扫描获得荧光图像，辅助以计算机软件对图像进行分析测算。因此软件检测在钙火花分析中也占据了重要地位。

1.2 心肌细胞兴奋收缩耦联

心肌细胞在受到窦房结传导而来的电兴奋信号后产生收缩，从而实现心脏整体的收缩泵血，以此支持机体的血液循环和生命活动。心肌细胞的兴奋性是保证心脏生理功能完成的基础，而钙离子是心肌细胞内重要的第二信使，在心肌细胞的兴奋收缩耦联中起到重要的调节作用，精密地调节着细胞的收缩和舒张。

在心肌细胞中，由钙离子所参与并介导的从细胞膜去极化到细胞的肌丝收缩这个过程被称为兴奋-收缩耦联 (excitation-contraction coupling, ECC)，其过程如图 1-2 所示：

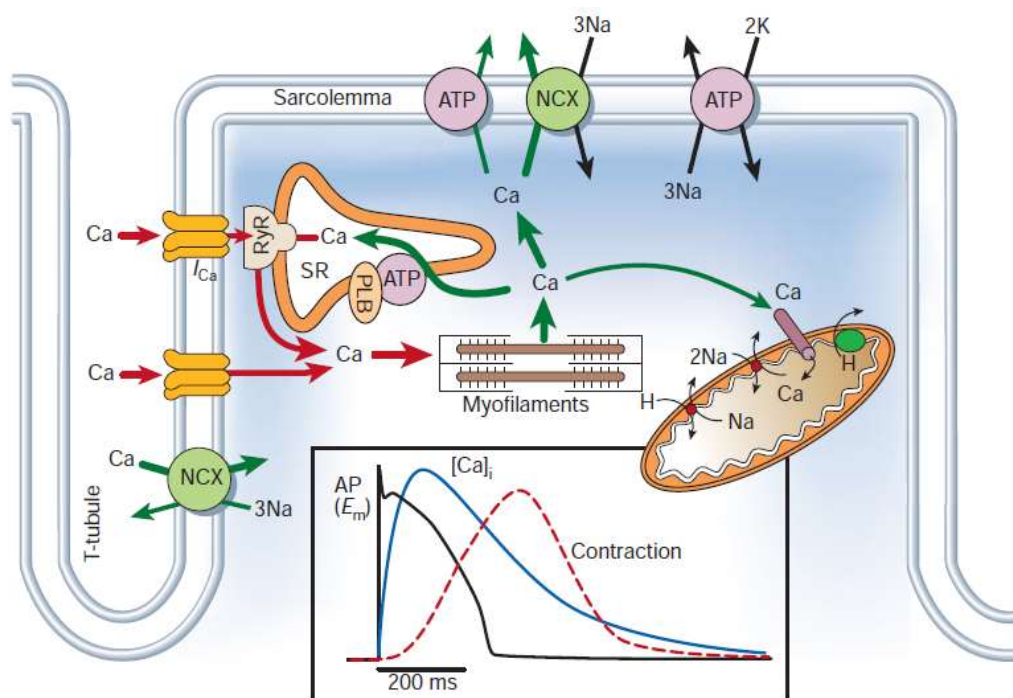


图 1-2 心肌细胞兴奋收缩耦联示意图^[3]

心肌细胞兴奋收缩耦联是心脏兴奋收缩的重要条件，在这个过程中钙离子起到了

至关重要的作用，是心脏能够实现收缩和舒张的关键因素。Masao Endoh 将钙离子对心脏兴奋-收缩偶联的调控根据参与的先后顺序分为了三个阶段^[4]，分别是钙离子动员的上游阶段，钙离子与肌钙蛋白 C 结合的中央阶段，以及横桥循环的下游阶段。

其中在上游阶段里，当心肌细胞受到刺激产生兴奋后，细胞膜外少量的钠离子内流，在细胞膜达到去极化阈电位时使得细胞膜上的钠离子通道被激活开放，从而出现再生性钠离子内流，使膜进一步去极化，形成上升的动作电位。随后钠离子通道快速失活，在动作电位的平台期，心肌细胞膜上的钙离子通道被相继激活，其中部分细胞外的钙离子经过激活的 L 型钙离子通道进入胞浆内部，引起细胞膜内 L-型钙离子通道下狭小空间的钙离子浓度上升，从而触发肌浆网（sarcoplasmic reticulum, SR）上的钙离子通道打开，释放出大量的钙离子形成钙火花（calcium spark）进入胞浆内部，使得胞浆内的钙离子浓度从静息状态的 10^{-7} mol/L 快速的提升至 10^{-6} – 10^{-5} mol/L 的浓度水平。这些释放出来的钙离子扩散至全细胞内，进而形成全细胞性质的钙瞬变（calcium transient）。从 L-型钙离子通道开放形成钙离子内流，到肌浆网释放大量钙离子引起细胞内全局的钙离子浓度升高，这整个过程被称为钙致钙释放（calcium induced calcium release, CICR）。

由钙致钙释放活动引起的细胞内钙离子浓度的整体提升，满足了肌钙蛋白 C 对钙离子结合的条件。肌钙蛋白（troponin, Tn）是肌肉细胞内调节肌肉组织收缩的调控蛋白，主要位于细肌丝上，在肌肉的收缩舒张中起着重要的调节作用。肌钙蛋白有三个亚型，分别是快反应型、慢反应型和心肌肌钙蛋白（cTn）。其中，心肌肌钙蛋白仅存在于心肌细胞内部，是由三个亚基形成的三聚复合体，分别是肌钙蛋白 C（troponin C, TnC）、肌钙蛋白 T（troponin T, TnT）和肌钙蛋白 I（troponin I, TnI）。

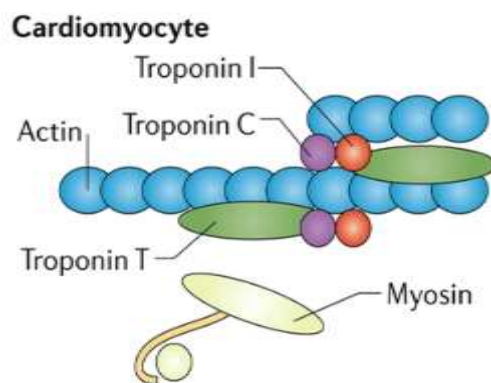


图 1-3 心肌细胞肌钙蛋白结构

在心肌细胞的兴奋-收缩偶联的中央调控过程中，心肌肌钙蛋白起着重要作用。其中肌钙蛋白 I 与肌球蛋白的运动相关，可以在蛋白激酶的作用下调节肌丝对于钙离子的敏感性从而影响心肌细胞的收缩能力^[5]。而肌钙蛋白 C 是心肌细胞内钙离子的结合亚基，在胞浆内钙离子浓度升高以后，cTnC 与钙离子相结合，引起 cTnC 和 cTnI 的构型发生改变，从而进一步使得原肌球蛋白发生定向旋转，暴露出肌动蛋白的结合位点并在 ATP 酶的参与下与肌钙蛋白结合，形成横桥，然后即开始心肌细胞兴奋-收缩偶联的下游调控。横桥形成后，细肌丝与粗肌丝发生滑行，向着肌节收缩，进而引发心肌细

胞收缩。无数个心肌细胞的共同作用，最终形成了全局性的心脏收缩。

1.3 心肌细胞内的钙离子通道

在前文提到的钙离子对心肌细胞的调控当中，细胞膜和细胞器上的几个重要的钙离子通道起到了关键性的作用，其中细胞膜上包括几种电压门控型钙离子通道、顺离子浓度梯度的离子通道等，肌浆网上包括主钙离子释放通道雷诺丁受体通道（ryanodine receptor, RyR），IP₃受体通道、钙离子回摄通道 SERCA 等。其中，细胞膜上的 L-型钙离子通道是钙离子对心肌细胞调控的起始。

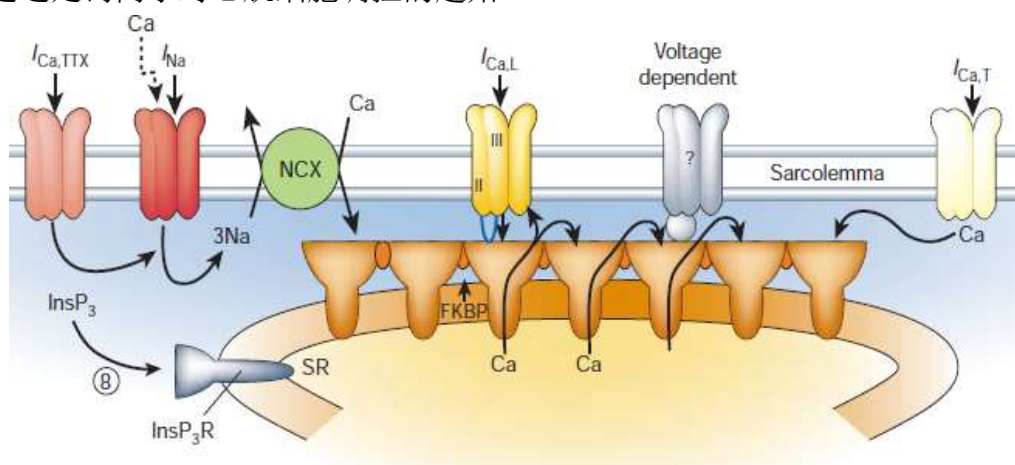


图 1-4 心肌细胞内的钙离子通道

心肌细胞膜上存在两种电压门控钙离子通道（voltage-gated calcium channel, VGCC），分别是 L-型和 T 型钙离子通道。1953 年 Fatt. P 等人在对甲壳动物的肌肉纤维神经冲动的研究中首次发现了电压依赖性内向钙离子电流这一重要生理特征，并认为动作电位依赖于细胞外的钙离子而非钠离子^[6]。而直到 20 世纪 80 年代，人们才第一次在心肌细胞中切实记录到了这两种不同的钙离子通道^[7]，并将他们命名为 **L**（长持续性电流，或大电导）和 **T**（瞬时性电流，或小电导）^[8]。这两种通道都能开放使得细胞外的钙离子进入细胞内，是形成内向的钙离子流的主要途径。这一内向电流同时也参与了动作电位平台期的形成，影响着动作电位时程的长短。Hagiwara.S.等人在对藤壶肌纤维和蛙的心室肌细胞动作电位的研究中明确了钙离子选择性通道的存在和钙离子内流对动作电位平台期的影响^[9]。两种钙离子通道的主要差异体现在 **L-型钙离子通道**的激活电压阈值高，且开放更为持久；而 **T-型钙离子通道**的激活电压阈值更低，且开放时间更短，属于瞬时型离子通道。**L-型钙离子通道**在心脏中表达丰富但相对而言功能单一，大量分布在在心肌细胞内介导细胞的兴奋收缩偶联。而 **T-型钙离子通道**的表达水平在机体发育过程中存在显著变化。在早期的胚胎心脏中，**T-型钙离子通道**大量表达，而随着心脏的发育成熟，由 **T-型钙离子通道**介导的钙离子电流在心室肌细胞中越来越难以被观测到^[10]，在成熟心脏中 **T-型钙离子通道**相对更多表达于心房肌细胞中，心室肌细胞膜上则以 **L-型钙离子通道**为主。同时也有研究者认为，**T-型钙离子通道**可能与心脏多能干细胞分化为不同类型的心肌细胞的调控有关^[11]。从分子结构上看，**L-型钙离子通道**是包含四个亚基的多肽复合体，分别是 α_1 ， α_2 ， δ ， β_2 。其中 α_1 亚单位是主

要形成供钙离子通过的孔道的主要功能亚基，包含能够感知膜电位变化的淡雅感受器、决定何种离子能够通过的离子选择性过滤器以及可以被其他第二信使结合的特异性位点；其余亚单位主要起辅助作用，包括锚定蛋白和提供磷酸化位点等^[12]。

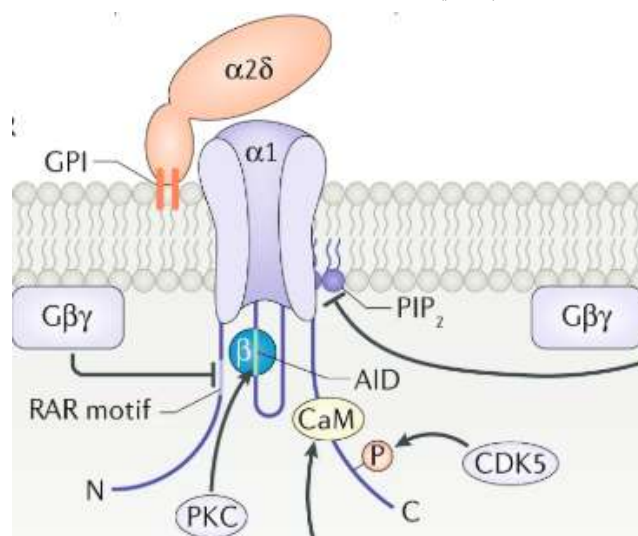


图 1-5L-型钙离子通道结构与功能

L-型钙离子通道有两种开放状态，第一种为短暂开放；第二种为较长时间的开放，此时的 L-型钙离子通道较长时间内处于激活且为完全失活的状态，从而为持续性的钙离子内流提供条件。L-型钙离子通道的失活则是细胞内钙离子浓度依赖性的，向细胞内注入钙离子能显著加快 L-型钙离子通道的失活。由于 L-型钙离子通道在心肌细胞收缩中的重要作用，其异常的活动与许多心血管疾病的发生息息相关，包括心衰、心房纤颤以及一系列缺血性心脏疾病等。此外，L-型钙离子通道还在机体内还广泛表达于各种可兴奋细胞中如骨骼肌细胞，神经细胞等，起到了信号转导、神经递质释放等作用。

心肌细胞膜上的 L-型钙离子通道打开后，内向的钙离子流会激发肌浆网上的钙离子释放通道打开，使得肌浆网内存储的大量钙离子释放进入胞浆内，提升胞浆内钙离子浓度。胞浆内升高的钙离子浓度进一步引起肌丝滑行，从而导致心肌细胞乃至整个心脏产生收缩。有研究表明，心脏收缩期间胞浆内升高的钙离子浓度有 90%是由肌浆网的钙释放导致的^[13]。当心脏舒张时，细胞膜上 L-型钙离子通道和肌浆网上钙释放通道停止了钙离子流入和释放，而细胞膜内升高的钙离子则在肌浆网钙泵 Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 回摄、细胞膜上钠钙交换体 (Na^{+} - Ca^{2+} exchanger, NCX) 交换，和肌膜钙泵排出以及线粒体上钙离子单向转运体摄入几者的共同作用下，引起细胞膜内钙离子浓度降低，从而导致心脏舒张。因此，肌浆网的钙离子平衡是保持心肌细胞和心脏正常生理活动的关键，肌浆网释放的钙离子的减少会造成心肌细胞收缩力的减弱。这样的细胞内钙活动失调是造成房颤、心力衰竭 (HF) 等影响人类健康的重要心血管疾病的主要原因之一。

肌浆网是心肌细胞内最大的钙库，心肌细胞内的钙离子主要存储于肌浆网中，其上最大的钙离子释放通道是雷诺丁受体通道 (Ryanodine Receptor, RyR)。RyR 是由四个相同的单体组成的四聚体复合物，也是目前所知的分子量最大的离子通道^[14]。

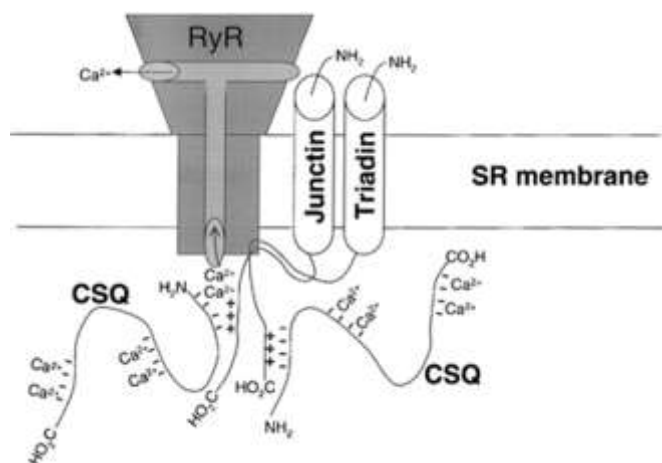


图 1-6 RyR 的结构与功能

RyR 在不同种细胞内存在三种不同的亚型，分别是 RyR1、RyR2、RyR3。他们在机体内分布非常广泛，在肌肉细胞、中枢神经系统，淋巴细胞等中均有表达。其中 RyR1 和 RyR3 主要表达在骨骼肌细胞和大脑中，而 RyR2 主要存在于心肌细胞内。肌浆网上 100 个左右的 RyR2 相近的排列在一起，分布在肌浆网上与细胞膜 T 小管相对应的位置，与 L-型钙离子通道一起构成一个大的钙释放功能复合体。RyR 对钙离子的门控作用受到了很多外部因素的影响，最常见的 RyR 激动剂有三种，分别是钙离子、咖啡因和雷诺丁。钙离子是正常生理状况下最普遍的 RyR 激动剂，它在 $1\sim 100\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内^[15]激活 RyR2。

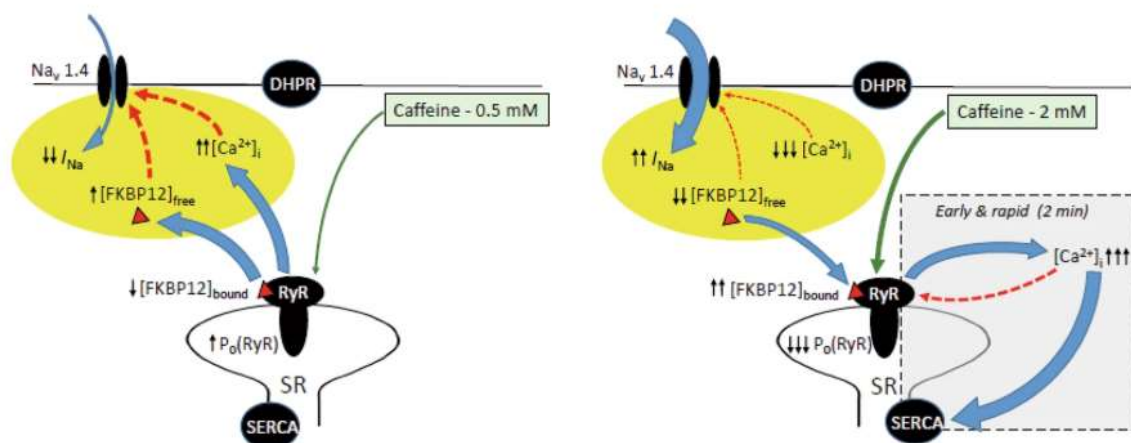


图 1-7 咖啡因对 RyR 通道的影响

此外 ATP 和其他几个腺嘌呤核苷酸也能在生理状况下激发 RyR2 通道的开放，但这几个元素在生理状况下变化不大，因此钙离子浓度的改变才是心肌细胞兴奋收缩偶联中最重要的影响因素。此外也有研究表明^[16]，钙离子对 RyR 的影响也与钙离子浓度的变化速率和变化频率有关。另外，RyR 的开放能够显著被雷诺丁和咖啡因影响。RyR 作为雷诺丁的特异性受体，对其具有高度的特异性和敏感性，雷诺丁在低浓度下能够使得 RyR 持续性开放，而在高浓度下则使得 RyR 完全闭合。咖啡因能够快速而强烈的激活 RyR2 并使通道持续的维持开放状态，使得肌浆网内的钙离子排空^[17]，因此常被

用于测量肌浆网钙离子浓度。

雷诺丁对 RyR 的作用是不可逆转的，但咖啡因的激动作用可逆转。另外，RyR2 大分子复合物上还存在许多关键性的调节蛋白，如钙调蛋白（calmodulin, CaM）和 FK-506 结合蛋白（calstabin 2, FKBP 12.6）、蛋白激酶 A（protein kinase A, PKA）等特异性蛋白，共同参与 RyR2 的调控。其中钙调蛋白是具有钙依赖性的 RyR 功能调控蛋白；FKBP12.6 能够连接 RyR 单体和它相邻的 RyR 四聚体，以保持 RyR 在静息状态下的稳定^[18]；PKA 可以改变 RyR 的门控作用，通过联接蛋白 mAKAP 连接在 RyR 上，并且使得 FKBP12.6 从 RyR 上解离，从而消除了 FKBP 的稳定作用，增加了 RyR 通道的开放概率。这种机制也使得在运动和突然的压力下能够产生更大的心输出量。在病理状况下，肌浆网的钙过载可能会导致 RyR 的异常开放，进而引起心律失常等一系列重要的心脏疾病。

肌浆网上除了 RyR 以外，还存在一个钙离子释放通道，即 1,4,5-三磷酸肌醇受体（1,4,5-trisphosphate receptor, IP₃R）通道。IP₃ 是细胞内的一种第二信使，是在细胞膜上的磷脂酶 C (PLC) 催化下由磷脂酰肌醇（PI）磷酸化产生的磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸（PIP₂）水解产生的。IP₃R 通道是 IP₃ 的特异性受体，可以根据其亚基的不同分为三种不同的亚型。其中，IP₃R1 亚型主要表达在哺乳动物体内的脑浦肯野神经细胞中^[18]、IP₃R2 亚型主要表达于心肌细胞、而 IP₃R3 亚型多表达在胰岛细胞中，不同细胞内的 IP₃R 也发挥着不同的作用，影响着不同的生理进程。IP₃R1 和 IP₃R3 在细胞内主要分布于粗面内质网上，而 IP₃R2 则主要分布在细胞核外层核膜上^[19]。从结构上看，IP₃R 通道与 RyR 通道十分相似，他们都是同源四聚体，都有位于肌浆网或内质网上的跨膜区域作为钙释放通道存在；同时也都有一个球状头部延伸到细胞液中对通道的开启和闭合进行调控。从功能上看，IP₃R 通道和 RyR 通道的调控机制也很相似^[20]，除了特异性受体 IP₃ 以外，钙离子也是 IP₃R 的激动剂之一，在一定浓度范围内，钙离子浓度的升高能够提升 IP₃R 的开放概率，而当钙离子浓度超过一定阈值后，会反而抑制 IP₃R 的开放。但 IP₃ 对于 IP₃R 的激动效果是单向性的，高浓度的 IP₃ 能够引起 IP₃R 的开放，同时伴随通道的快速关闭，进一步增加 IP₃ 的浓度又能使得钙离子进一步释放。在心肌细胞中，肌浆网上 IP₃R 通道的数量远小于 RyR 通道，因此在心脏兴奋收缩偶联中，IP₃R 对钙离子浓度的影响很低，但其在其他生理功能中依然起着很重要的作用。IP₃R 介导的钙释放，能够有效的为线粒体的钙摄取提供支持。线粒体是细胞内的供能场所，因此 IP₃R 所产生的钙信号不仅能调节线粒体的功能，还能对整个细胞的程序性凋亡产生影响。同时，血管平滑肌中的 IP₃R 引起的钙释放能够影响血管平滑肌的收缩水平，也与高血压的产生相关。此外，钙信号传递到细胞核后，可以通过激活或抑制相应的转录因此从而影响基因的表达^[21]，进而产生广泛的生理影响。

心肌细胞在完成细胞收缩之后，需要降低细胞内的钙离子浓度使细胞恢复静息状态，此时细胞膜和细胞器上有许多离子通道共同发挥作用。其中作用效果最显著的是肌浆网上的钙离子回摄通道 Ca²⁺-ATPase（SERCA），有研究表明，在舒张期内，包浆中的钙离子浓度下降有 70% 左右是由 SERCA 的活动造成的^[22]。SERCA 是肌浆网上含量最为丰富的蛋白质之一，它常常以二聚体的形式存在，具有五中不同的亚型，分为

SERCA1、SERCA2 和 SERCA3，而 SERCA1 和 SERCA2 又各分为 a、b 两种，其中的 SERCA2a 主要表达在心肌细胞中，对心肌细胞舒张期的钙离子回摄起到了关键的作用。其余几种亚型则表达于骨骼肌和内皮细胞中，进行各自不同功能的生理活动。有研究表明^[23]，在心脏发育过程中，SERCA2a 首先在心房和心室细胞中表达，并随着心脏的发育表达量逐渐增大。生理状况下，SERCA2a 具有高 Ca 亲和态（E1）和低 Ca 亲和态（E2）两种不同的构象。在心肌细胞收缩时，胞浆内钙离子浓度达到很高水平，此时 SERCA2a 处于 E1 高亲和态与钙离子相结合，SERCA2a 磷酸化后变为 E2 的低亲和态，随着钙离子被转运回肌浆网内，SERCA2a 再次转变回 E1 继续对钙离子进行转运，其工作原理如图 1-8：

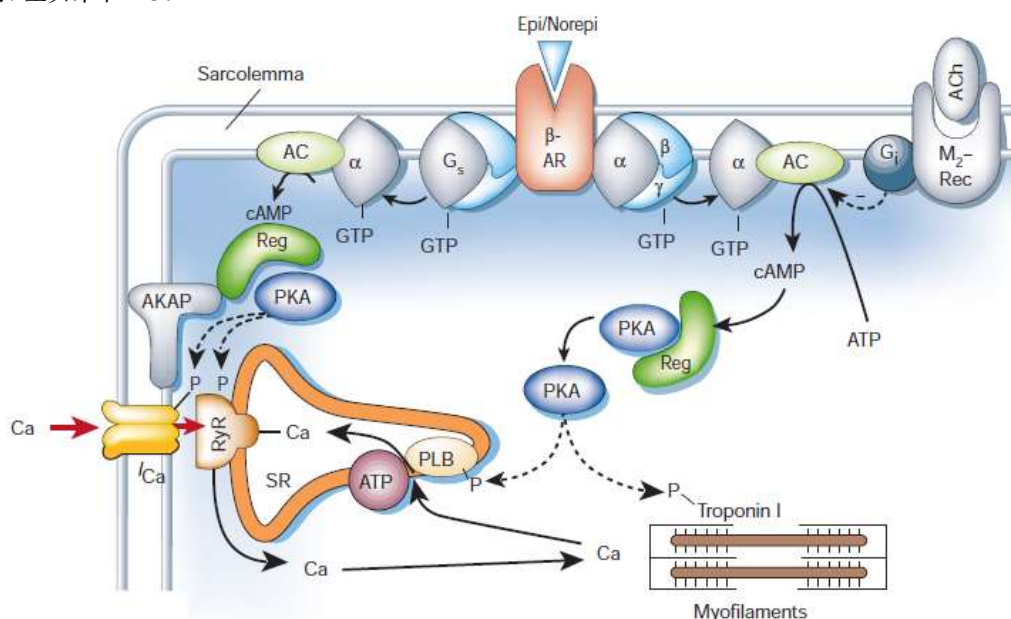


图 1-8 SERCA2a 工作原理示意图^[3]

SERCA 对钙离子的转运是依赖 ATP 进行的，水解一分子 ATP 可以转运两个钙离子。因此 SERCA 对钙离子的转运效率很高，能快速有效降低胞浆内的钙离子浓度。SERCA2a 的活性和表达量的多少都会严重影响肌浆网的钙存储量，进而影响到全细胞的钙平衡，SERCA 的表达与活性降低严重时就会导致心衰等心血管疾病的发生^[24]。SERCA 的活性也受到多种因素的影响，包括一些内源性蛋白、激素和转录因子等。其中受磷蛋白（phospholamban, PLB）是一种重要的内源性的 SERCA 调节剂，去磷酸化后的 PLB 能够与 SERCA2a 相结合以降低其对钙离子的亲和力，从而抑制它的活性；当 PLB 磷酸化时，对 SERCA 的抑制作用消除，因此其活性增加，能够加快肌浆网对钙离子的摄取以减轻细胞中异常的钙超载现象，对心肌细胞的正常生理功能起到保护作用。

在心肌细胞的舒张过程中，细胞膜上的钠钙离子交换体（ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX）也是将胞浆内的钙离子排出的重要通道。NCX 是一个双向转运体，既有将钙离子排出钠离子流入的正向模式（forward mode），也有钙离子内流钠离子排出的反向模式（reverse mode）。NCX 对离子的转运方向与细胞膜内外的离子浓度差相关，是顺浓度梯度进行的，其对 Na^+ 和 Ca^{2+} 的转运比例为 3:1。在正常生理状况下，NCX 主要以正向

模式运转，在心脏的舒张期起到向外排出胞浆钙离子降低胞内钙离子浓度的作用。但是在病理情况下，细胞内的钠离子浓度异常上升，导致钙离子在 NCX 作用下交换内流，造成心肌细胞的钙超载。舒张期的细胞内钙超载是造成心律失常的重要因素。

在心脏舒张初期，胞浆内钙离子浓度还处于较高位时，NCX 是主要工作的钙离子外排通道，占到了细胞外排钙离子总量的约 75%^[25]。当细胞内钙离子浓度降低后，NCX 的作用开始减弱，细胞膜上的钙泵（PMCA）继续将胞浆内的钙离子进一步排出细胞。PMCA 是一种钙离子的主动单向转运蛋白，它每水解一分子 ATP，就能将一个钙离子转运出细胞外。PMCA 对钙离子具有较高的亲和力，但转运速率不高，因此无法完成快速的钙排出功能。但在静息状态下，由于细胞内外的巨大的钙离子浓度差异，少量钙离子会渗透入细胞内，此时 PMCA 就能够有效的排出钙离子，以维持细胞内的钙稳态。

1.4 心肌细胞肌浆网钙信号与研究方法

正常生理状况下，心肌细胞在电兴奋的刺激下产生的钙离子释放活动是全局性的。肌浆网上的钙释放通道在极短的时间内有序的大量开放和关闭，形成钙瞬变（ Ca^{2+} transient），调节着细胞范围内的钙离子浓度。但在一些非正常生理状况下，肌浆网会产生一些不受控的钙离子释放事件，我们将其称为肌浆网钙泄漏（ Ca^{2+} leak）。肌浆网钙泄漏的形式有很多种，包括钙火花（ Ca^{2+} spark）、自发性钙波（ Ca^{2+} wave）和其他微量的钙释放等等。正常生理状况下，舒张期适当的钙泄漏将心肌细胞内的钙离子调解在一个合适的水平^[26]，少量流入胞浆的钙离子也在 SERCA 的作用下被泵回肌浆网。

钙火花是钙信号的基本单元，因此对钙信号的研究大多以钙火花为标准。钙火花描述的是 RyR 产生的快速且小范围的钙释放事件，由单簇 RyR 通道随机开放产生。其峰值钙离子浓度约为 $0.3\mu\text{mol/L}$ ，持续时间约 20ms。一般情况下，自发性钙火花由于钙离子释放量、钙离子扩散和肌浆网钙回摄的影响，其临近区域的钙离子浓度无法到达阈值进而激活临近区域的 RyR 通道。但在一些特殊情况，如胞浆内钙离子浓度过高、或肌浆网内钙离子浓度过高导致 RyR 通道敏感性增加时，某一单簇 RyR 的钙释放也可能激活其相邻部位的其余 RyR 开放，以此将钙信号向外传递形成钙波。因为钙波是由局部自发性钙释放引起的，因此具有跳跃式的波前^[27]。

人们对细胞内游离钙的研究经历了漫长的发展，其进程与生物实验技术的发展息息相关。

上世纪六十年代，人们才第一次在活体细胞内直接观测到钙离子活动。E.B.Ridgway & C.C.Ashley^[28]发现了钙敏感性发光蛋白水母发光蛋白（Aequorin），并将它用于测量藤壶的巨细胞的钙瞬变。这种水母发光蛋白是一种天然的生物荧光指示剂，对钙离子具有高度特异性，不易受到其他离子的影响。他在激发状态下与钙离子以 1:2 的比例短暂结合，在完成发光后蛋白失活并将钙离子释放。这些特性满足了研究者对钙离子初步探测的需求，并且在一定程度上能相对定量的研究钙离子活动。此外，由于水母发光蛋白是生物性蛋白质探针，研究者可以通过添加特定的靶向性序列，使蛋白

选择性定位到不同的细胞区域内,如细胞核、线粒体、肌浆网和分泌囊泡等^[29]。此外还由于它极高的动态范围和信噪比,在对钙离子浓度的定量研究中表现出了更高的准确性^[30],因此现今仍被许多研究者关注并用于钙离子的研究中。后续人们还从海洋腔肠动物瓜水母(*Beroeovata*)中分离得到瓜水母光蛋白(Berovin)以及从腔肠动物蕈枝虫中分离得到的发光蛋白质 obelin,他们都是生物性的发光蛋白,与 Aequorin 有着相近的作用效果。同时随着基因工程的发展,更多的荧光蛋白通过基因编码的技术内用于定位于细胞内亚结构的钙离子研究,如绿色荧光蛋白 Camgaroo^[31]、Ratiometric Pericam^[32]等。

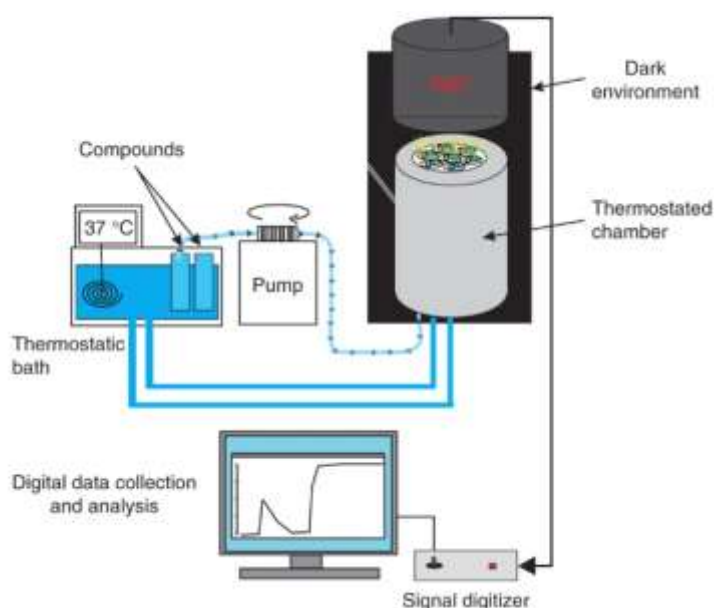


图 1-9 典型的水母发光蛋白信号记录系统

到了上世纪 70 年代,出现了钙离子的选择性微电极测定法^[33]。这种方式是通过将装有对钙离子敏感的电化学敏感器的微电极刺穿细胞,深入细胞内部,借用电位差来测量细胞内的钙离子浓度变换。这种测量方式直观且灵敏,但反应速度较慢,且会对细胞造成损伤。到了 80 年代,随着各种成像技术的发展,出现了更多的钙离子测定方法。其中有用核磁共振法(Nuclear Magnetic Resonance, NMR),向细胞内注入氟代指示剂,然后利用 NMR 波谱图来计算得出钙离子浓度^[34]。这种测定方式具有定量、稳定、可动态观测等优点,但核磁共振实现起来较为复杂,因此我们现在更为常用的是荧光标记检测方法。它是使用紫外光或可见光可激发荧光的荧光探针配合激光共聚焦显微镜实现的。荧光探针是指一类可以与特定离子结合的可发光物质,其荧光强度在结合目标物质前后应有很大变化,从而令研究者能够根据观测荧光强度的变化来研究目标物质的活动。

上世纪 80 年代初期^[35], R.Y. Tsien 等人合成了第一代钙荧光探针 quin-2,证实了它可以有效的测定细胞内钙离子浓度。但是一代荧光探针的解离常数低,适用于测量静息状态的钙离子浓度。并且染色剂浓度需求高,对钙离子的选择性也不是非常强。因此很快就出现了第二代荧光探针 indo-1、fura-2 等。二代荧光探针的荧光强度比一代强很多(30 倍),因此用量更少、测定时间更短,且第二代荧光探针的钙离子的选择性也

比一代高，与钙离子的结合比例为 1:1。但是二代荧光探针存在自发荧光，因此在测量时会受到底噪影响，此外部分报道还说 Fura-2 有分布不均匀的问题。现在更为常用的 Fluo-3，4 是最新一代的荧光指示剂。其最大的特点是在可见光谱激发，不需要用紫外激发，因此降低了外界环境对细胞产生的不必要的损伤。并且在游离状态下，第三代荧光探针自身和结合态下的荧光强度相差 50-100 倍，因此几乎没有自发荧光的干扰。且第三代荧光探针与钙离子亲和力较低，容易解离，适合测定细胞内钙离子快速而微量的变化。荧光探针的检测方法，相较于前面几种方法而言反应速度更快，荧光探针的反应速度在毫秒级，而微电极测量需要几秒，NMR 则需要几分钟。其次，荧光探针容易进入细胞，对细胞为非损伤性。最后其空间分辨率最高，可以实时提供细胞内钙离子分布的二维或三维图像，因此是目前用于研究胞浆钙离子活动的主要方法。

表 1-1 当前流行的细胞内钙离子检测技术对比

探针种类	探针来源	检测技术
Aequorin	基因编码	光度计
Berovin	基因编码	光度计
Obelin	基因编码	光度计
Troponin C biosensor	基因编码	FRET 显微镜
Camgaroo	基因编码	荧光显微镜
Ratiometric Pericam	基因编码	比率荧光显微镜
Calcium Green-1	人工合成	荧光显微镜
Indo-1, Fura-2	人工合成	比率荧光显微镜
Fluo-3, Fluo-4	人工合成	荧光显微镜

由于钙离子对细胞生理过程调控的重要性以及其调控过程只涉及离子在细胞内和胞间的移动，而没有相关的合成或分解，因此相对于 IP_3 、cAMP 等胞浆内其他第二信使而言，钙离子的研究成效最丰。在激光共聚焦显微镜的帮助下，人们将钙离子从 RyR 通道释放后与荧光值实际结合，呈现出突然升高的荧光信号现象称为钙火花，并对记录到的钙火花荧光信号分析测算得出其频率，幅度，FWHM，半衰时间等参数来描述钙离子活动状态。该方法极大的提高了细胞内钙离子活动观测的精度，在钙火花的研究上具有直观性、高分辨性的特点。

1.5 本文主要研究内容及章节安排

鉴于钙离子信号研究的重要生理病理意义，本文首先开发了一个全自动的钙信号自动检测分析软件，给出了对钙火花、钙瞬变及钙波这三种常见钙信号的全自动检测及参数计算的解决方案，旨在解决科研过程中钙信号处理数据量大操作不易精度不高等问题。

随后，本文对心室及心房肌细胞钙信号在生理和病理情况下的差异进行了探索，通过上文开发的钙信号全自动检测软件，分别对野生型和 CPVT 病理模型小鼠的心房及心室肌细胞的自发性钙火花、电刺激下钙瞬变以及自发性钙波进行了有效参数的检

测统计，旨在探究基因突变的病理模型对心室及心房肌细胞的不同影响。

最后，本文开发了两个用于描述肌浆网整体钙泄漏水平的新参量，旨在解决研究肌浆网钙泄漏与病理情况关系时对整体性肌浆网钙泄漏描述的不准确性。

本文共分为五个章节，每个章节的具体章节安排如下：

第一章主要为绪论，系统的介绍了钙离子在心肌细胞内的调控机制、所应用的相应通道以及肌浆网钙泄露的研究意义，并介绍了细胞内钙离子浓度研究方法的发展及现状。

第二章在钙信号研究的功能需求分析的基础上提出了钙信号全自动分析系统的解决方案，建立了软件实现框架和模块化处理步骤，并对方案中不同钙信号，如钙火花、钙瞬变及钙波的不同检测模块原理进行了阐述。最后对软件的功能进行了验证，举例说明了整个分析软件的具体使用步骤和示例分析结果。

第三章开发了两个用于描述肌浆网钙泄漏水平的新参量，详细阐述了该参量的计算方法，并对其与传统参量之间进行了相关性分析，验证了新参量的有效性，最后论述了新参量在描述肌浆网钙泄漏上的优越性。

第四章对比分析了心室及心房肌细胞在生理和病理情况下的钙火花、钙瞬变及钙波三种钙信号的差异，详细阐述了小鼠基因型鉴定及心肌细胞分离与培养的实验方法，分析了统计结果，并对病理性突变对心房及心室肌细胞的不同影响进行了讨论。

第五章为总结与展望，总结了本文所做的工作，并提出了其中的不足之处，同时分析了以后的改进空间。

2 传统钙信号检测分析软件开发

2.1 引言

目前使用激光共聚焦显微镜配合化学荧光指示剂的钙信号检测手段已经成为主流。但钙信号在不同种类和不同生理、病理细胞情况下的表现均有所不同，变化繁多。因此，获取钙信号后的图像处理与分析也是研究人员在钙信号检测中亟待解决的重要问题。

2.1.1 激光共聚焦线扫描荧光图像特征

激光共聚焦显微镜通过移动扫描点来采集图像，排除了传统荧光显微镜下不同焦平面上的荧光信号的干扰，同时又由于他扫描速度快时间间隔短，因此能为观察者获得更高的时间和空间分辨率。典型的激光共聚焦显微镜获取的线扫描钙火花荧光图像如图 2-1:

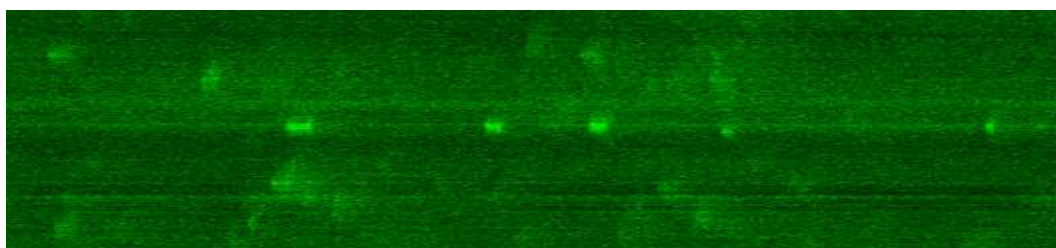


图 2-1 典型的激光共聚焦线扫描荧光图像

该图像具有以下几个特征:

(1) 图像信噪比低

因为钙火花属于微小的钙释放事件，因此在图像中呈现出来的也属于弱信号，常常淹没在图像噪声中。在这里，图像中能观察到的噪声包括几个种类，分别是固有底噪，荧光染料噪声和胞浆游离钙噪声。

其中，固有底噪是由于硬件设备产生的，这种噪声在图像上均匀分布，且不会随着时间的变化而变化。激光共聚焦显微镜因为要保证其极高的分辨率和信号采集率，因此无法将信噪比保持到最高状态，对噪声的控制无可避免的有所妥协。已有研究表明，激光共聚焦显微镜的背景噪声属于高斯白噪，其荧光信号的分布近似于泊松分布，可以用高斯函数很好的表示并预测。

荧光染料噪声的存在是由于荧光指示剂在细胞内分布不均造成的。这种噪声表现在图像上即为荧光强度分布的不均匀性，如图 2-1，图像中或是存在明显的一条亮线，或是一部分区域的荧光强度整体高于另一部分区域。亮线可能是由于荧光探针在细胞内的异常固定发光，属于细胞内的固定脏点。其荧光强度极高(甚至会高于目标信号)，

且不随时间发生变化。而荧光强度分布不均可能是由于荧光探针在细胞内分布不均造成的。这一部分噪声强度高于硬件底噪，但低于目标信号。

胞浆游离钙噪声是由于静息状态下胞浆内钙离子所产生的荧光信号。研究者在研究细胞内钙信号时，更关注的是胞浆钙离子浓度的变化情况，因此相对于由钙离子释放导致胞浆钙浓度升高所产生的荧光信号而言，静息状态下胞浆钙离子所产生的荧光信号也属于噪声信号的一种。这种荧光信号的强度与进入胞浆的荧光指示剂含量有关，常分布较为均匀且变化较小。

(2) 钙火花信号随机出现且形态多样

激光共聚焦线扫描荧光图像中的典型钙火花标准形态如图 2-2 所示。

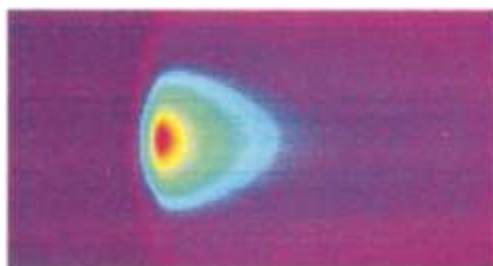


图 2-2 典型钙火花标准形态

钙火花表示的是单一或者一小簇 RyR 通道短暂开放引起的钙离子释放事件。因此在荧光图像上表现为一小片荧光强度高于基线荧光强度的连通区域。观察其具体形态，从横向的时间尺度上可以看到在钙离子释放发生位点的荧光强度在很短的时间内上升到峰值，随后在较长的时间内，随着钙离子在细胞内的扩散，其荧光强度也渐渐降低。从纵向的位置尺度上看，中心位置的钙离子浓度最高，荧光强度最强，而随着钙离子向四周扩散，荧光强度向其左右两侧递减。

钙火花的形态特征能够反映出肌浆网钙离子释放通道 RyR 通道的功能特性。同时，由于 RyR 通道的开放状态还存在一定的随机性，因此，在不同种类、不同状态下细胞中，钙火花的形态存在很大差异。这也为钙火花的检测难度带来很大的提升。

2.1.2 钙火花图像的主要研究方法

在当前的钙离子荧光图像研究方法中，可以根据使用市面上原有的第三方图像处理软件分析和自编程序处理分为两种研究方式。

1) 第三方图像处理软件分析

第一类是使用市面上已有的图像处理软件进行研究，常用的图像处理软件有 ImageJ 等。使用这类软件分析钙火花荧光图像的优势在于，专业图像处理软件功能强大，有多种功能模块可以对图像进行去噪处理，交互界面简洁清晰，且对编程能力无要求，方便很多研究者快速上手使用。但用这种图像处理软件分析也存在很多问题。由于这类软件并不是专门针对处理钙火花荧光图像而开发，因此对于处理钙火花图像信号而言功能冗余。并且用这类图像处理软件，研究者需要手动框选出感兴趣的目标区域，然后对目标区域逐个进行统计分析。此外，仍旧由于软件对钙火花信号的不适配性，软

件无法直接获取钙火花信号的有效参数。研究者若想研究钙火花的特征形态，就还需对软件计算出的参数进行二次处理。因此，专业图像处理软件虽然便于上手，但对处理钙火花数据而言，需要全程需要手动操作，研究者的工作量巨大。

2) 自编图像分析程序

第二类是自编钙火花分析程序进行分析，这也是目前具有编程能力的研究者更多使用的研究办法。此类研究办法的优势在于，通过编程处理钙火花信号，能够有效减少研究者的操作时间，极大的提升研究者的研究效率。使用电脑软件对钙火花图像自动进行识别和目标信号提取，并在后台直接完成特征参数的提取和计算，使得输出的结果可直接用于分析比较。但此方法对于研究者而言具有极大的编程要求，前期对于编程的学习投入极大。而且由于缺少可视化的操作界面，程序无法实时中断以检查分析结果，对结果的修正也较为困难。

2.2 钙信号检测原理及算法改进

2.2.1 钙火花检测原理

目前主流的钙火花检测算法是基于搜索图像上荧光强度高于一一定阈值的连通区域进行的。其检测流程如下：

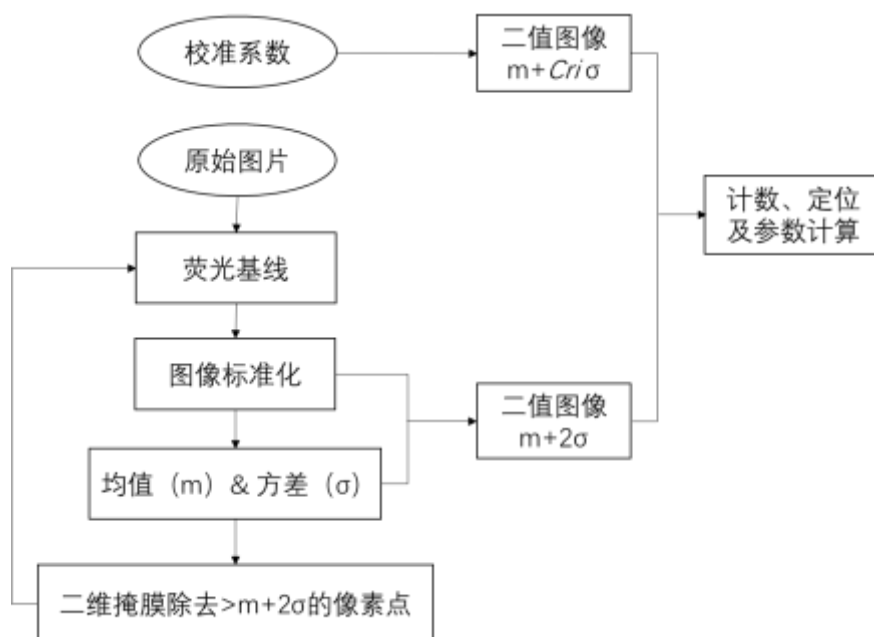


图 2-3 主流钙火花检测算法

在这个检测流程中，主要可以分为输入、图像预处理、目标信号提取以及特征参数计算这四个部分。现对各部分详细描述如下：

(1) 输入：用户需要输入的包括原始图像数据以及一个用于目标信号判别阈值的参数 Cri 。这个参数是一个经验参数，是众多研究者基于对钙火花形态参数的研究总结而来的，常在 3 左右，会随着目标细胞的种类变化而略有不同，不同的研究者对此参数的设定值也各有倾向。

(2) 图像预处理：主要包括荧光强度的归一化，即

$$F = \frac{\Delta F}{F_0} \quad (2-1)$$

其中 ΔF 为各点荧光强度，而 F_0 则为基线荧光强度。

这是由于钙信号荧光强度的绝对值不仅与钙离子的浓度相关，也与荧光染料的浓度相关，甚至还与硬件设备的参数设置有关。而细胞内荧光染料的浓度还会受到细胞状态、染料种类、染料配置浓度、孵育时间等诸多因素的影响。因此为使得判定出的荧光强度具有可比较性，研究者通常需要对荧光强度进行归一化计算，即用表观荧光强度除以基线荧光强度，以获取目标信号的相对荧光强度，用以表征信号的强弱。因此，计算基线荧光强度是图像与处理的重点。在经典算法中，为计算基线荧光强度，首先计算全图荧光强度的均值，随后将图像中高于荧光均值的像素点排出，再次计算均值，并以此作为图像的基线荧光强度，对图像进行归一化处理。

(3) 目标信号提取：在目标信号的提取中，将使用到归一化后图像的均值 m 和图像方差 σ 。其中方差反应的是数据的偏离程度，因此可以表示目标信号与均值的差异性。在具体判定标准上，将使用到 $m+2\sigma$ 和 $m+Cr\sigma$ 两个等级的阈值进行判定。其中较大的 $m+Cr\sigma$ 被用于目标信号的定位，认为高于这一阈值的像素点附近有钙释放事件的发生。而较小的 $m+2\sigma$ 被用于钙火花范围确认，在已确定的位置附近扩大选定范围，并以此范围作为该钙火花的范围。

(4) 特征参数计算：在这一部分中，将对上一步中确定的全部钙火花进行计数，并对每个钙火花分别求取其特征参数。

这个算法的优势在于，能够自动对输入的图像进行归一化分析以及目标钙火花的提取，所输出的参数结果也是研究者所需要的钙火花参数。

但在实际的使用过程中，也发现不少问题。其中最大的问题就是对于高频钙火花的探测不准。在检测高频钙火花时，由于图像上钙火花事件多，因此其荧光强度均值较低频钙火花的图像而言显著增大，这也使得高频图像中钙火花的检测阈值偏大，导致很多钙火花信号的漏检的发生。此外，算法的去噪效果不强，很多信号强度较低的钙火花淹没在噪声信号当中。

2.2.2 钙火花检测算法的改进与优化

针对上文中传统检测算法存在的一些不足，我们主要针对基线荧光强度和钙火花判定阈值的计算两个部分的算法进行了优化。

1) 获取基线荧光强度的算法优化

从图 2-3 中我们可以看到，很多情况下原始图像中的基线荧光强度在整副图像中并不是均匀一致存在的。由于荧光染料分布不均匀等原因，整体荧光强度呈现出条状分布。因此，使用整体均值来代表基线荧光强度的算法并不能很好的处理背景信号。为此，我们对此部分算法进行了优化，整体思路是认为图像上存在一定时间段内不含钙火花信号，以此时间荧光信号均值作为基线荧光信号，并逐行进行归一化计算，具体流

程如图 2-3。

首先我们将图像在空间尺度上进行均值合并，将 x 个扫描位点 t 时间段内的扫描图像矩阵 $P(x,t)$ ，通过对各个 t 时间点上所有 x 位置荧光强度求取均值的方式，合并为单行的 $P_0(1,t)$ 向量，随后计算 P_0 中全部 t 个荧光强度的均值 m ，并在 P_0 中搜索小于均值的点的索引位置。这种计算方法是基于这样一个认知，即存在一些“静息时刻”，即在这些时间区域内，所有扫描位点都没有钙离子释放事件的发生，因此处于“静息时刻”的所有位点荧光强度均值必将小于其他存在钙火花事件的时刻。这一“静息时刻”需要经过几次计算均值-排除高于均值的点-计算均值的循环，直到搜寻到一些数量不过分少，且荧光强度足够低的位置，即为“静息时刻”。

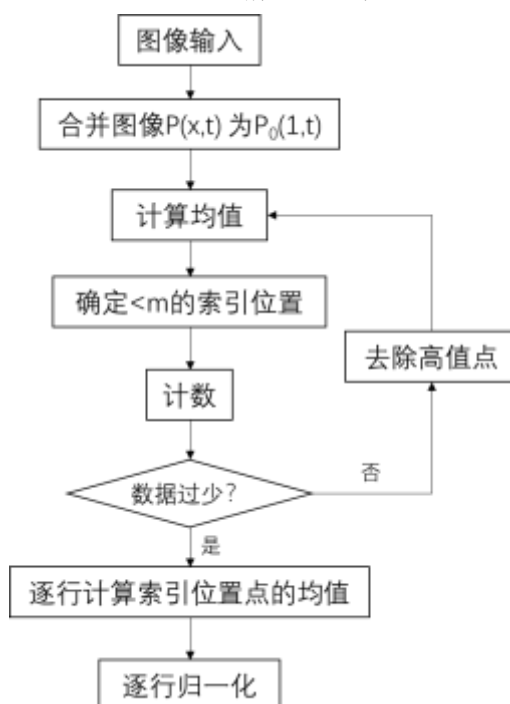
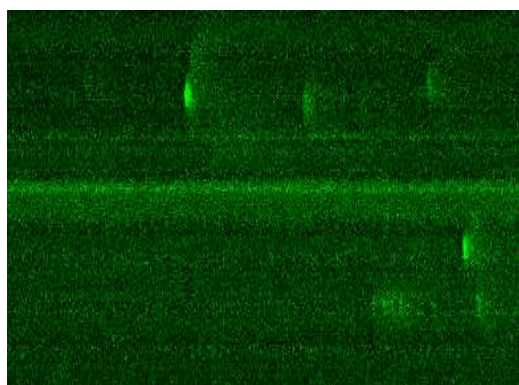
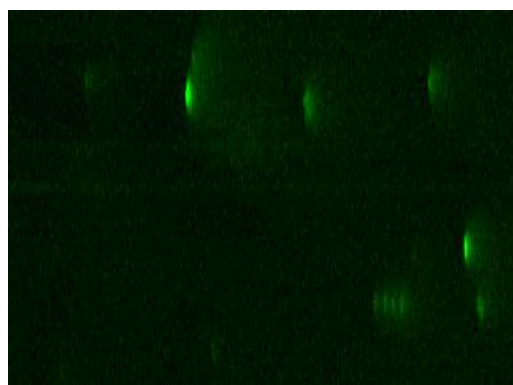


图 2-4 基线荧光强度优化算法

在获取“静息”时刻之后，我们逐行，即针对每个扫描位点，分别求取其所有“静息时刻”上荧光强度的均值，并将其作为该位点的基线荧光强度 F_0 ，并逐行进行归一化计算。示例结果如图 2-5 所示。



(a) 原始图像



(b) 图像归一化效果

图 2-5 荧光图像归一化效果示例

图像荧光强度归一化的意义在于，一方面他降低了数据的复杂度，减轻了数据计算时的负担，加快了程序的运行效率。另一方面，归一化后的荧光强度统一了不同图像间背景荧光信号的差异性，使得多个图像获得的数据间具有可比性。经过我们算法的优化，不仅能实现上述优点，还消除了由于荧光染料分布不均所造成的同一张图片中背景荧光信号的差异，使得整张图片的荧光强度更为统一，同时也在视觉上增强了荧光信号的对比度，令钙火花的有效信号更为突出，降低了目标荧光信号的提取难度。

2) 计算判定阈值的算法优化

为了解决上述由于高频钙火花的发生而导致图像均值过高，进而使得检测阈值过高而对很多有效信号漏检的情况，我们在保留“搜索荧光强度高于阈值的连通区域”的检测思路不变的情况下，优化了检测阈值的计算方法。具体算法流程如下：

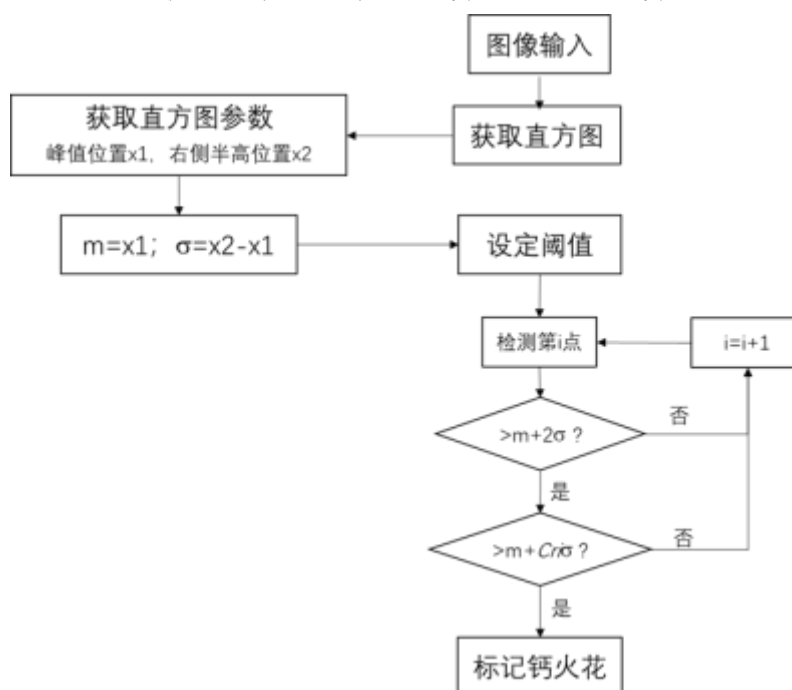


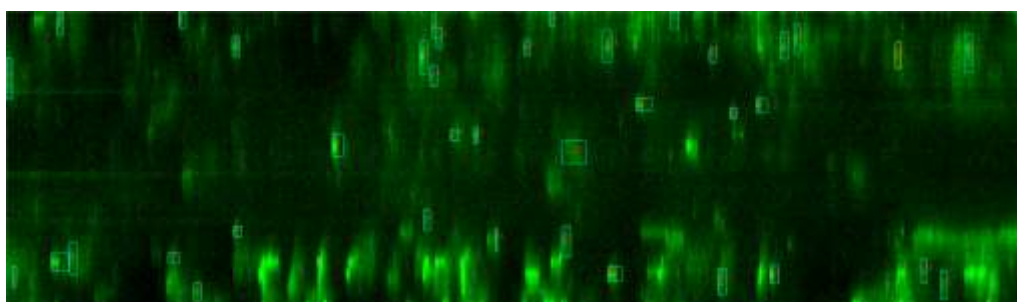
图 2-6 钙火花检测的算法优化流程

阈值检测方法在计算探测阈值时，采用的是均值（ m ）和方差（ σ ）的双参数法。其中，均值是检测阈值的基线，方差代表荧光强度的浮动范围。经过无数科学家的研究工作，人们发现钙火花峰值相对于均值的荧光强度差异与方差拥有相近的倍数关系，这个倍数关系被当做一个固定的经验参数用于钙火花的检测中。目前，常以 $T=m+Cri\sigma$ 作为钙火花的检测阈值，将高于此阈值的区域位置定义为钙火花的事件发生位置。这一经验参数常被设置在 3 附近，不同的研究人员可能会有不同的倾向性。随后再设定一个新的阈值 T_2 ，将原本的阈值略微降低，来作为钙火花范围的判定标准。

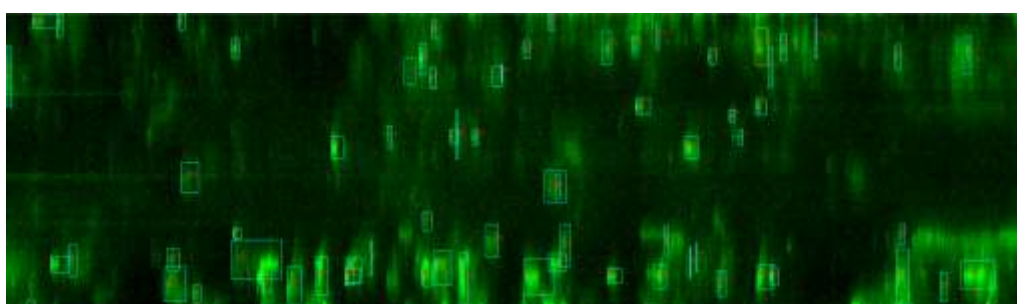
从而在整体上，我们将荧光强度大于 T_2 的连通区域，且区域内存在最大荧光强度大于 T 的区域标记为一个钙火花。在检测过程上，我们先检测小阈值，再对小阈值

检测出来的区域内的最大值是否大于交大阈值，保留最大值大于阈值的标记区域。

在优化的算法中，我们采用分析归一化后的荧光图像上荧光强度的幅度分布直方图来计算检测阈值的方式来规避这一问题。在荧光图像中，占据主要成分的部分是荧光强度较低的底噪荧光信号。而研究者所关心的目标荧光信号则含量较少，且强度越高含量越少。因此，在荧光强度的幅度分布直方图中，峰值所在位置表示的就是底噪荧光信号的均值强度。这一信号成分不会随着钙离子释放事件的发生而产生变化，因此能够很好的避免高频钙火花造成阈值过高的现象。随后用直方图右侧的半高宽来代替方差，也能够很好的表示目标信号与底噪信号的离散程度。



(a) 原始算法检测结果 (n=35)



(b) 改进算法检测结果 (n=72)

图 2-7 改进的钙火花检测算法结果比较

3) 钙火花边缘确定

虽然我们在上一步检测钙火花信号中，通过阈值初步选定了钙火花的范围，但这一范围太过粗略，只能用于标记钙火花位置，而不能用于量化的测定每个钙火花的参数。因此我们需要重新明确钙火花的具体边界，以起始位置边界计算过程为例，流程如图。

首先将已框定范围内的钙火花分别按照时间和位置的方向以均值压缩成单行矩阵，获得时间起始点 t_1 ，结束点 t_2 和空间起始点 x_1 ，空间结束点 x_2 。由于钙火花的荧光强度遵循先升后降的规律，因此从峰值向四周的发散的钙离子荧光强度都应是单调下降的。我们以空间位置方向上的 x_1 到 x_2 的单行矩阵 F_x 为例，具体说明钙火花边界的确认过程。

由于上面提到过的钙火花先升后降的荧光强度规律，矩阵 F_x 的值从第一个到最后一个也应遵循先升后降的规律，因此边界位置上的荧光强度应是临近区域内荧光强

度的最小值。我们先将 $x1$ 处的荧光强度赋值给中间变量 F_{min} ，检测 F_{min} 是否大于前一时刻的荧光强度。若大于，则将前一时刻的荧光强度重新赋值给 F_{min} ，并将钙火花边界向前推进一位。若 F_{min} 不再大于前一时刻荧光强度，则输出当前位置为边界。其他三个边界也是用同样的方法来确定。

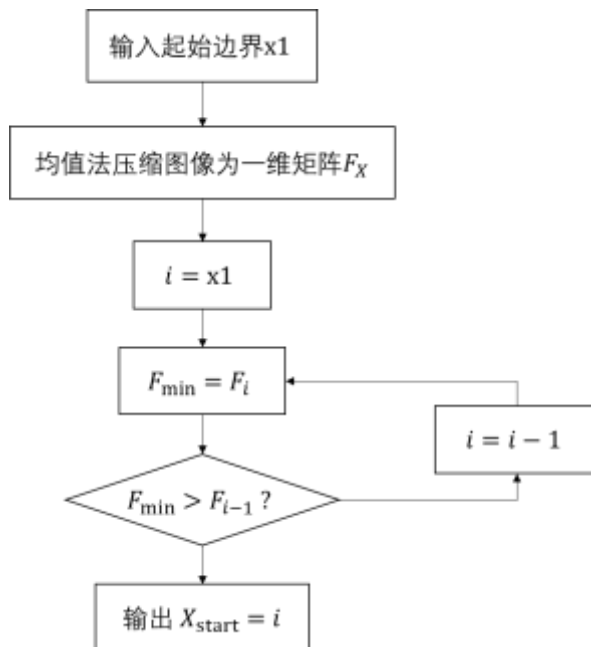


图 2-8 钙火花边界计算流程图

4) 钙火花特征曲线拟合

重新界定了钙火花范围后，分别从 X 轴和 T 轴上对荧光强度进行均值压缩，使其成为一维的时间-幅度曲线和位置-幅度曲线。由于激光共聚焦显微镜极高的分辨率和信号采集率，相应的在信噪比的控制上无可避免的有所妥协，因此噪声的存在使得原始数据无法让研究者获取理想的钙火花特征。因此我们对两个曲线分别进行了拟合，使得拟合函数能够很好的描述出荧光信号在整个时间进程上表现出的特征。

其中，对于时间-幅度曲线，荧光强度的上升时间远远短于下降的时间，这是由于钙离子的释放速率远高于其扩散速率造成的。且由于随着 RyR 通道开放的进程，钙离子的释放速率也逐渐降低，直至 RyR 通道完全关闭释放停止，因此在上升相的荧光强度上升趋势逐渐变缓，其切线斜率由大变小。在下降相的变化速率虽然整体小于上升相位，但其趋势也是逐渐变缓。因此，我们对时间-幅度曲线以如下函数^[40]进行拟和：

$$\frac{\Delta F}{F} = C \quad (t \leq t_s)$$

$$\frac{\Delta F}{F} = A(1 - e^{-k_1(t-t_s)})(t_s < t \leq t_m) \quad (2-2)$$

$$\frac{\Delta F}{F} = A(1 - e^{-k_1(t_m-t_s)})e^{-k_2(t-t_m)} + C \quad (t > t_m)$$

方程中的 C 、 A 、 k_1 、 k_2 、 t_s 、 t_m 这几个参数均用最小二乘法估计，以使方程能很好

的表现出观测到的原数据的性质。其中 C 可以表示静息状态下的基线荧光强度， A 可以表示钙火花幅度， t_s 可以表示钙火花的起始时间而 t_m 可以代表峰值出现时间。其拟合结果如图。从图中可以看到，拟合曲线可以完美的贴合钙火花的尖锐峰值，很好的表现出钙火花荧光曲线的变化趋势，为后续钙火花特征参数的计算打下了很好的基础。

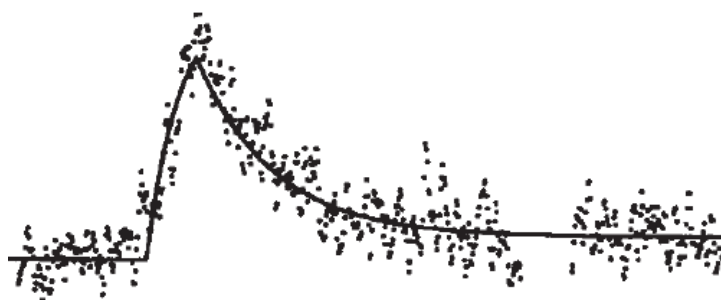


图 2-9 钙火花荧光强度-时间的曲线拟合

2.2.3 钙瞬变的检测与分析

钙瞬变是全细胞统一性的钙释放事件，表现为无数个钙火花在同一时刻共同发生的结果，常由外部施加电刺激产生，在图像上呈现规律性的钙离子信号波动，其频率与施加的电刺激频率相关。

因此为检测钙瞬变信号，我们第一步还是要对图像进行平滑去噪以及荧光强度归一化。这一步与上一节中钙火花的检测相同。

在此程序中，用户可以通过鼠标与软件实现交互。用户通过在图像上拖拽鼠标左键以框选出感兴趣的目标信号区域，随后软件在此区域的基础上，对区域内的钙信号进行测算。具体流程如下：

- (1) 对选中区域沿着时间 t 轴方向，对每个时刻的全部 x 位置荧光强度求均值，从而将图像的二维矩阵压缩为一个一维向量，即选定区域钙瞬变的幅度-时间曲线。
- (2) 对幅度-时间曲线进行拟合。
- (3) 获取幅度-时间曲线上的最大值，即为该区域内钙瞬变的峰值。再通过幅度-时间曲线的拟合曲线计算钙瞬变的峰值上升时间以及半衰时间等有效参数。

2.2.4 钙波的检测与分析

钙波是由许多钙火花逐个传递所产生的群体性钙释放事件，与钙瞬变不同的是，钙波上的所有钙离子释放点不是同时开放的，他们在开放时间上存在间隔，并呈递进关系，且由于钙火花触发临近区域的 RyR 通道开放具有随机性，因此在线扫描观察记录到的荧光图像上形成近乎直线的波状排列。

为检测钙波信号，我们依旧需要先对图像进行基础的平滑去噪及荧光强度归一化，这一步骤与前文相同。

在此程序中，用户通过在图像上拖拽鼠标左键以框选出感兴趣的目标信号区域，随后软件在此区域的基础上，对区域内的钙波进行测算。具体流程如下：

(1) 计算钙波传播速度：检测选中区域中在时间序列上第一个钙离子释放点的所在位置 x_1 以及该点的出现时刻 t_1 ，再检测时间序列上的最后一个钙离子释放点，记其位置为 x_2 ，时刻为 t_2 。则钙波的传播速度为：

$$v = \frac{x_2 - x_1}{t_2 - t_1} \quad (2-4)$$

(2) 波形重构：由于钙波在线扫描荧光图像上的波前近乎直线，因此我们对其波前进行线性拟合，并根据拟合直线将波前上所有钙离子释放点重构到同一时间线上，即将钙波重新整形为钙瞬变的表现形式。

(3) 特征参数计算：同前一小节中一样，使用计算钙瞬变的方式计算整形后钙波的特征参数，包括幅值，上升时间以及半衰时间。

2.3 钙信号自动分析软件设计

2.3.1 软件开发环境的选择

为设计钙信号全自动分析检测系统，考虑到图像上可能存在数目不一的钙火花等钙离子信号，系统需要从图像中提取相应信息进行计算，同时在对钙信号进行提取分析后，能在图像上以可视化的方式呈现并输出计算结果。且为了使用的便捷性，也需要系统本身具有可视化操作组件的能力。因此在结合考虑学习的难易性、开发平台内置数据分析工具的丰富程度以及所支持的数据形式后，本文选择以 IDL 作为本软件的开发平台。

IDL (Interactive Data Language)，是一种集数据分析可视化与图像化应用程序于一身的编程语言。他最早是被用于处理美国航天局拍摄的火星数据而开发的，因此他在图像的处理、提取、分析和显示上具有天然的优势。IDL 本身就是为研究人员所设计的语言，他作为第四代面向矩阵的语言，拥有可视化、交互分析等多重功能的开放性开发环境，是对研究者进行数据的提取、可视化的展示以及分析计算的理想工具^[41]。IDL 在其图像处理模块中集成了丰富多样的图像处理工具，常用的图像旋转、滤波、平滑、直方图均衡化以增强对比度等功能皆可以通过简单的函数实现。另外 IDL 不仅拥有强大的图像处理能力，还有丰富的数据输入输出能力。IDL 对输入数据的格式没有严格要求，无论是文本数据还是图片数据，无论图片的格式还是数据的种类，IDL 均能支持读写，可以完全满足研究者的日常需求。

此外，IDL 的语法相对简单，配合丰富的内置组件，不需要有太大量的学习成本即可满足使用需求；IDL 同样还具有跨平台运行的能力，借助 IDL 虚拟机工具，就可以轻松的将 IDL 程序实现跨平台发布，而不受限于操作系统。鉴于其丰富的功能和优秀的实用性，IDL 目前已被广泛应用于地球科学（包括气象、航海、土壤和地质等）、航空航天、医学影像、图像处理、信号处理等领域。

2.3.2 需求分析

由于本软件主要供科研人员进行钙离子荧光图像数据分析，因此考虑到使用的直观性简便性和操作的易懂程度，在软件设计时应将对图像进行的每一步操作都集合到交互界面上形成一个按钮，让使用者仅通过几次点击就可以实现图像的检测与分析，同时将检测分析操作分步骤进行也有助于研究者在各个步骤处跟进分析结果，及时查漏补缺防止纰漏。

因此，本软件应当实现以下几个需求：

- (1) 软件操作具有很好的直观性，软件界面设计简洁清晰，页面功能布局友好。
- (2) 可以输入多种类型的钙离子荧光信号图像，并展示。
- (3) 可以对输入的图像数据进行基础的图像处理，如调整图像大小以适应窗口；图像去噪，荧光强度归一化。
- (4) 可以检测图像上的目标钙信号，并将结果实时展示在窗口中。
- (5) 可以手动修正检测结果，删除误检区域，添加漏检区域。
- (5) 可以将计算得出的特征参数结果绘制图表展示并输出存储

此外，软件的图形界面还应该遵循软件设计的简洁性、易操作性、常用性和便于维护升级的几个基本原则。

2.3.3 软件架构设计及功能实现

软件的体系结构设计是软件设计的基础，主要用各自行为来描述的各个功能组件与组件之间的相互连接的关系^[38]。Kruchten 认为软件的体系结构有四个角度^[39]，可以从不同方面对系统进行描述。其中，从概念的角度上看，主要描述的是系统的主要构件和他们之间的关系；从模块的角度上看，主要描述的是系统的功能分解与层次结构；从运行的角度则描述系统的动态活动；而从代码的角度看，则描述了各种函数代码在系统中的组织关系。

本软件采用模块的描述角度，在纵向上对本软件的结构层次进行划分，横向上对本软件功能模块进行划分。

纵向上，本软件可按照其所处位置和相互关系分为三个层次，分别是用户层，功能层以及运算层。其中，用户层是各层功能中最直观的一层，主要作用是完成与用户的各项交互动作，在软件中表现为图形用户界面（Graphical User Interface, GUI）。用户在此界面上通过点击相应功能按键进行数据的输入、功能的选择以及参数设置等操作。功能层则是实现 GUI 上各项功能的函数，被用户层的操作直接调用，是用户进行的界面操作动作的响应函数。这些函数内封装包含了各种更加细分功能的函数。运算层则是对功能层函数的二次细分，将界面操作响应函数的具体功能所调用的单个函数，这些函数实现数据的底层运算功能，对数据进行相应处理。

在横向上，可以按照不同阶段的功能划分，将软件分为多个独立且不同的功能模块。不同模块之间不存在上下层级的调用关系，通常按照功能之间相互耦合的关系，受到信号分析处理步骤的顺序约束，完成从原始荧光图像到目标钙信号参数之间的变化。从整体上看，整个系统可以分为四个部分，分别是输入模块、图像处理模块，人机交互

模块以及数据输出模块。

1) 输入模块

输入模块包括了图像输入和参数输入的操作, 实现了对计算机相应工作区域存储的荧光图像的选取, 将荧光图像上的数据以矩阵的形式输入到系统内。

在 IDL 系统中, 我们通过使用 `Read_image` 函数读取荧光图像, 并将图像以二维数组的形式存储在自定义的变量当中, 以供后续调用。

对于输入参数, 我们使用 `Widget_Base` 函数设置了一个独立窗口, 该窗口内继续使用 `Widget_Base` 函数创建了多个参数设置的小组件。在阈值设置组件上, 使用 `Widget_Text` 函数创建文本框, 以供用户输入参数。这里一共需要输入四个参数, 分别是钙火花最小半高全宽 `FWHM`、最小半高全时长 `FDHM`、阈值参数 `Criteria` 以及最小钙火花幅度 `Sparkamplitude`。这些参数中, `Criteria` 的输入值被读取, 以用于计算钙火花阈值, 其余的三个参数在钙火花的检测中只作为最小钙火花的辅助判定。但输入的参数不仅作为信号探测的阈值, 还作为图像处理模块选则的判断条件。我们对 `FWHM` 及 `FDHM` 两个值进行判定, 当 `FWHM` 输入值小于 0 时, 执行钙瞬变的检测程序; 当 `FDHM` 输入值小于 0 时, 执行钙波的分析程序。

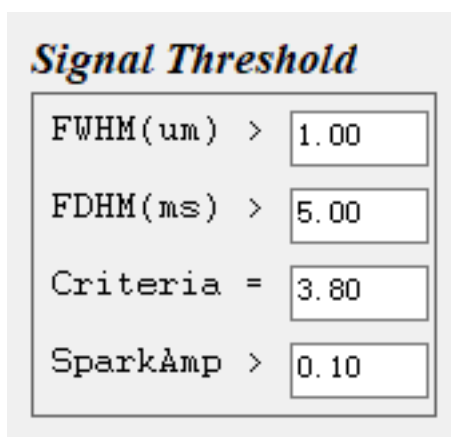


图 2-10 参数输入窗口

2) 图像处理模块

在本模块中对输入的原始荧光图像进行必要的处理操作, 最后得到目标钙信号的相关参数。其中就包括图像的去噪平滑、荧光信号的归一化、钙信号的检测与标记, 以及目标钙信号相关参数的测算。在这一模块中, 我们不仅集成了对钙火花信号的全自动检测分析模块, 还扩展了对钙瞬变和钙波的检测功能, 实现对多种钙信号灵活处理的目标。这也是本钙信号全自动分析软件的核心功能模块。

3) 人机交互模块

这个模块包含用户对整个检测流程前后做出的状态调整操作, 包括在图像处理过程中对感兴趣区域的添加和删除, 对展示窗口展示状态的调整等。

在主界面的图像显示区域, 用户可通过在图像上拖动鼠标左键以实现和软件的交互。

当用户点击鼠标左键不松开时，将在图像上画出一个矩形选框。用 `Widget_control` 函数来获取鼠标点选状态。当鼠标松开后，租后停驻的位置与起始位置时间构成一个矩形，系统将获取起始位置 (x_1, t_1) 以及结束位置 (x_2, t_2) 的位置参数，并在图像的 $I[x_1:x_2, t_1:t_2]$ 的矩形范围内根据当前执行的程序再进行相应的检测与计算。

此外，在主界面的工具栏上，使用 `Widget_Button` 函数创建按钮。用户可以通过点击相应的工具按钮更改其状态值，从而改变图像窗口的显示状态，包括图像的归一化与否、目标信号事件的标注与显示等。

4) 数据输出模块

这一模块的功能是对处理后得到的数据进行输出，包括面向用户的图像输出，也包括面向存储器的数据输出。一方面将提取到的有效数据绘制图表显示在数据输出窗口上，同时在另一方面，将感兴趣的数据以文本的形式存储在计算机上。

在这一模块中，针对钙火花，我们统计了钙火花的几个经典且常用到的特征参数，包括钙火花的峰值荧光强度 ($\Delta F/F_0$)、半高全宽 (full width at half maxima, FWHM)、荧光强度上升到峰值所需要的时间 (t_{Rise})、荧光强度峰值的 1/2 衰减时间 (t_{50})、半高全持续时间 (full duration at half maximum, FDHM)。

其中，峰值荧光强度即为前文中计算得到的归一化后的荧光强度，他与当前钙火花所涉及到的 RyR 通道释放出的钙离子量相关。在细胞内荧光染料名都一定的情况下，钙离子释放的越多，其荧光染料与钙离子的结合产物也就越多，相应的荧光强度也就越高。因为荧光强度与钙离子浓度有单调的对应关系，许多研究者也会通过钙火花的荧光强度来定量计算钙离子的释放量。

而 FWHM 指的是钙火花荧光强度曲线峰值一半处的峰宽度，即通过峰高的中点作平行于峰底的直线，此直线与峰两侧相交两点之间的距离，表示钙火花横向的在平面空间尺度上的直径大小。FWHM 不仅与该钙火花所调动的 RyR 通道的多少有关，还与钙离子在细胞内的传播动力学相关。

除了空间尺度上的描述，还有许多时间尺度上的参数被用于描述钙火花的性质。FDHM 是指在幅度为峰值一半时钙火花的持续时间，即在时间幅度曲线上，通过峰值高度一半的地方做平行于时间轴的直线，该线与峰相交两点间的距离。FDHM 表示的是钙火花在时间尺度上的大小。 t_{Rise} 表示钙火花信号的荧光强度从基线上升到峰值所需要的时间，它反映了这个钙火花的钙离子释放速度以及 RyR 通道的开放时间。此外还有钙离子荧光信号的半衰期 (t_{50})，它反映的是钙信号从峰值衰减到峰值信号强度一半所需要的时间，他主要受到细胞内钙离子扩散速率的影响，也能在一定程度上反映出细胞内钙离子回收、排出等功能的工作效率。这些参数都与钙火花的时间维度相关，均受到钙离子释放时间以及钙离子在细胞内动力学的影响。

在这一模块中，我们通过 `TVSCL` 函数将图像展示在显示屏的窗口上，并用 `write_JPRG` 函数将图片以 jpeg 的图片格式存储在制定的文件夹内。另外，用 `printf` 函数将计算得出的特征参数输入并存储到制定的文本文档中。至此完整的实现结果的输出。

2.4 软件系统性能测试

本软件是基于 Windows 系统设计实现的软件程序，软件运行平台对内存和硬盘没有很高要求，基本的科学研究环境即可满足。

在起始界面中，用户选择想要分析的钙信号类型，以及激光共聚焦显微镜的发射光频率等基础设置参数，并实现选所择图像的输入。

在图像成功输入后就进入软件的信号分析主界面，如图 2-11 所示：

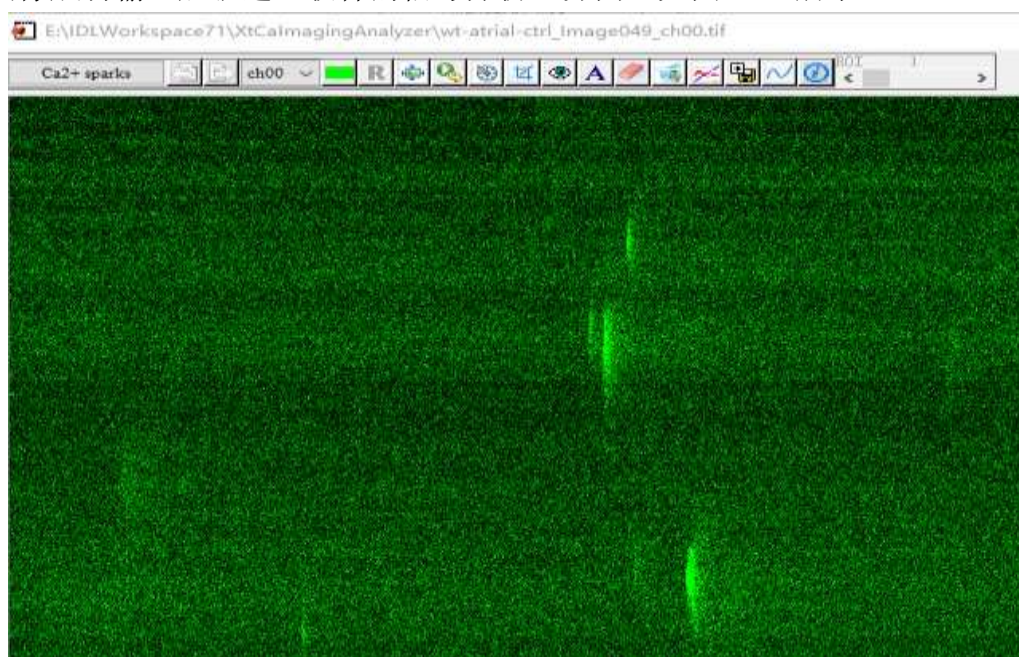


图 2-11 钙火花自动检测软件分析主界面

在这个新的窗口界面中，上排是工具栏，下部为展示当前正在分析的图像。

工具栏中包括了软件中的全部功能按键，包括了状态显示框、功能按键以及选择滚动条。最左侧第一个状态显示框中显示的是当前所分析的钙信号种类，其后第一个按钮是用于在多图像输入时调整图像顺序，切换当前分析图像。下一个按钮为调整荧光信号的颜色，可将信号赋予不同的伪彩，使得图像信息更好的表达。后一个按钮有 N 和 R 两种状态，当前图片显示的状态（归一化与否）。其中 N 代表归一化（normalize），R 代表原始图像（raw）。通过点击这一按钮，可以切换图像的显示状态。在未点击计算按钮时，下部显示的就是最原始的图像。随后是图像的缩放按钮，每张图片在打开后都将自动以适应窗口的大小显示，点击此按钮可将图片恢复原始大小。紧随其后的是运行按键，该按钮集合了本软件对图像处理和信号提取的全部功能，点击该按钮即可实现一键计算。

之后是参数修改按钮。点击此按钮后将出现一个新的窗口，以便使用者调整参数以变更检测水平。在本界面中，若研究者对于检测结果不满意，研究者可以手动输入并调节钙火花的检测参数，使得软件对于钙火花的判别更为灵活精准。这里可以输入的参数包括 FWHM、FDHM、检测参数 criteria（Cri）以及钙火花幅度。这里的 criteria 是作为检测钙火花的重要判断指标，而其他的参数在钙火花检测程序中主要作为检测精确度

的辅助标准，用于限定钙火花的最低大小，以排除检测到过小的噪声信号所造成的干扰。同时其他钙信号测定程序中，FWHM 的输入值被认定是切换钙瞬变检测程序的判定标准，其值小于 0 时执行钙瞬变检测程序；FDHM 的输入值被认定是切换钙波检测程序的判定标准，其值小于 0 时执行钙波检测程序。

其后还有一些其他辅助功能按钮，包括显示/隐藏选定信号框按钮，展示结果图按钮，结果存储按钮等。其中显示/隐藏按钮都有两种状态。同时起到显示当前图像标记的状态和切换状态的作用，切换图像信号标记状态的功能通过单次点击按钮来完成。

点击软件运行按钮后，软件将自动且连续地对图像进行归一化、探测并标记目标信号的步骤，并将归一化后的图像显示在主界面下方的窗口中，替换原始图像；并将检测到的钙信号用方框标记，同样显示在图像上。其处理效果如图 2-12：

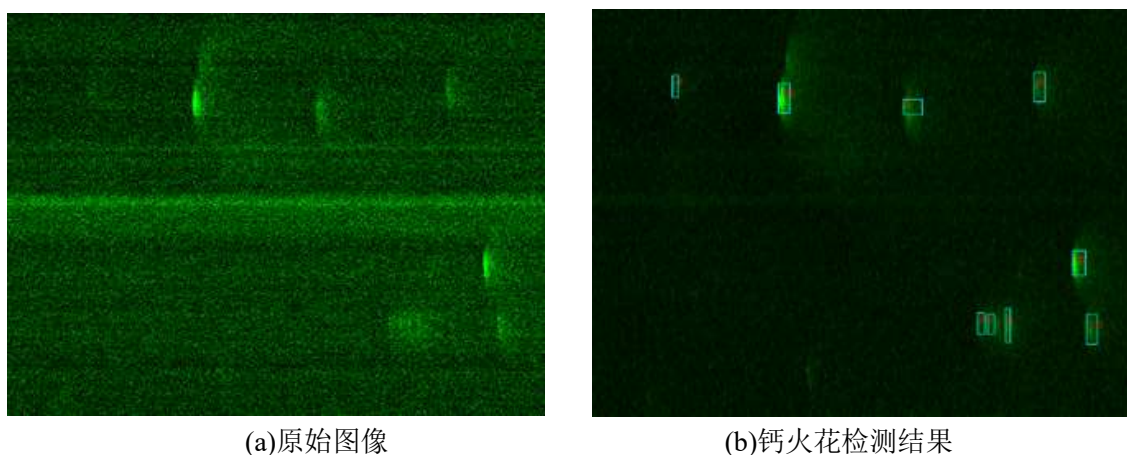


图 2-12 钙火花图像的检测结果

在图中我们可以看到明显的噪声存在，整体图像的荧光强度受荧光染料不均因的影响而呈现出条状的分布规律。经过归一化处理后，噪声信号有了明显的改善，钙火花有效信号从图像中凸显了出来，并用适配于每个独立钙火花的方框对钙火花进行了标记并计数。此时系统已经完成记录和计算全部标记出的钙火花的特征参数信息。使用者在这一步可以通过可视化窗口清晰明了的查看检测结果是否符合预期，以便及时做出调整。

随后点击绘制曲线按钮，即可得到标记为 1 号的钙火花的特征参数和特征曲线，显示在一个新窗口内，如图 2-13。

图中左上角的窗口里显示的为归一化后的荧光图像，右上角是该钙火花的位置-幅度曲线及其拟合曲线；左下角的窗口显示的是该钙火花的荧光强度-时间曲线及其拟合线，右下角的是未经去噪及归一化处理的原始钙火花荧光图像。

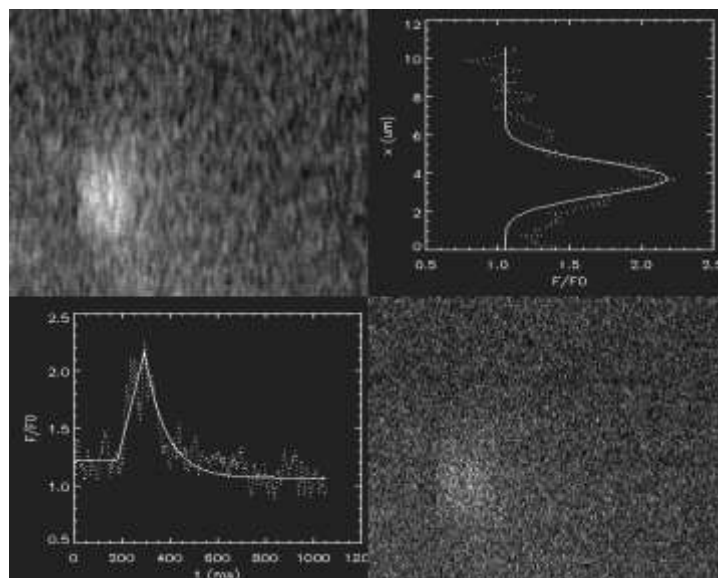


图 2-13 钙火花特征参数及曲线

至此，即完成了钙火花的全部检测流程。点击结果输出按钮即可保存全部钙火花参数及特征曲线。

若软件在执行时检测到输入参数 $\text{FWHM} < 0$ ，则执行钙瞬变检测程序，运行效果如下：

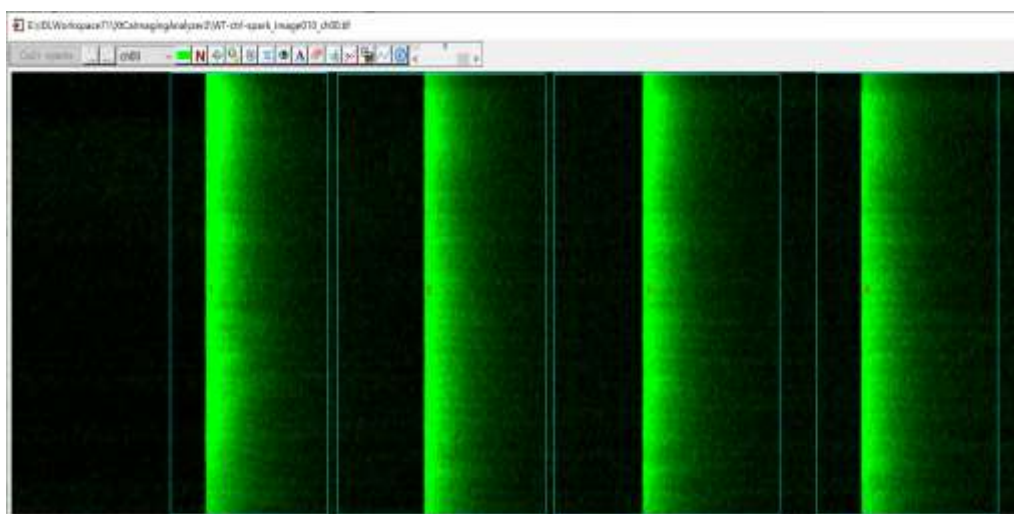


图 2-14 钙瞬变检测界面

对于每一个被框选中的钙瞬变，软件逐一对他们进行检测分析，其检测结果如下：

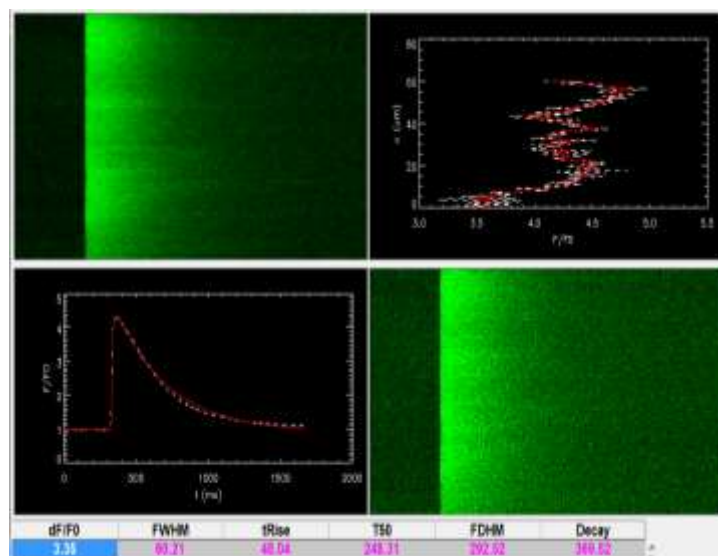


图 2-15 钙瞬变检测结果

图中左上角窗口显示的是当前选定范围内归一化后的钙瞬变图像，右上角窗口是选中区域内钙瞬变的位置-荧光强度曲线。但在钙瞬变中，全部位置的 **RyR** 都同时开放，因此这一曲线中显示出的搏动是由噪声及钙离子扩散产生的，此图像在钙瞬变研究中无意义。左下角显示的是钙瞬变的荧光强度-时间曲线及其拟合曲线，很好的表示出了钙瞬变随时间的幅度变化特征。右下角的窗口显示的是未经归一化的原始图像。

随后与钙火花操作类似的，点击结果输出按钮可将全部钙瞬变相关参数及特征曲线保存至计算机。

若软件在执行时检测到输入参数 $FDHM < 0$ ，则执行钙波检测程序，则运行效果如下：

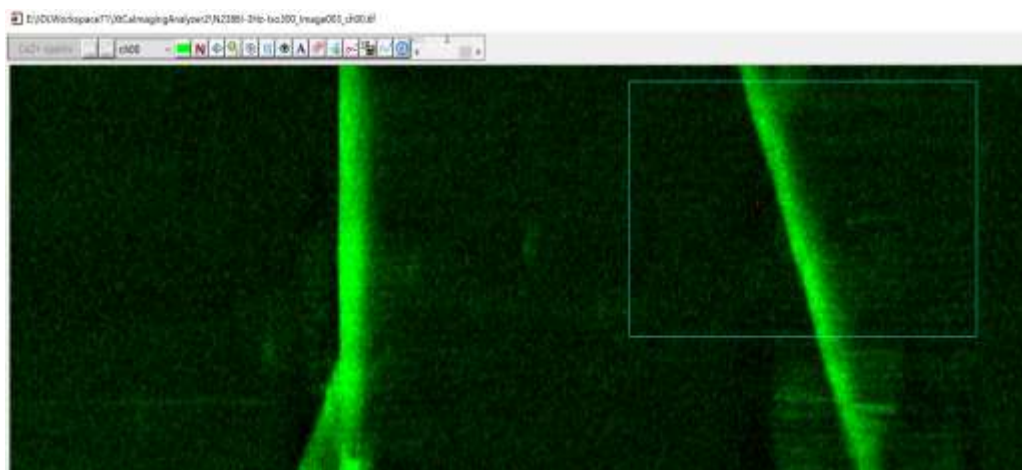


图 2-16 钙波检测界面

使用鼠标框选感兴趣的目标区域后，系统将自动执行钙波检测分析程序，其检测结果如下：

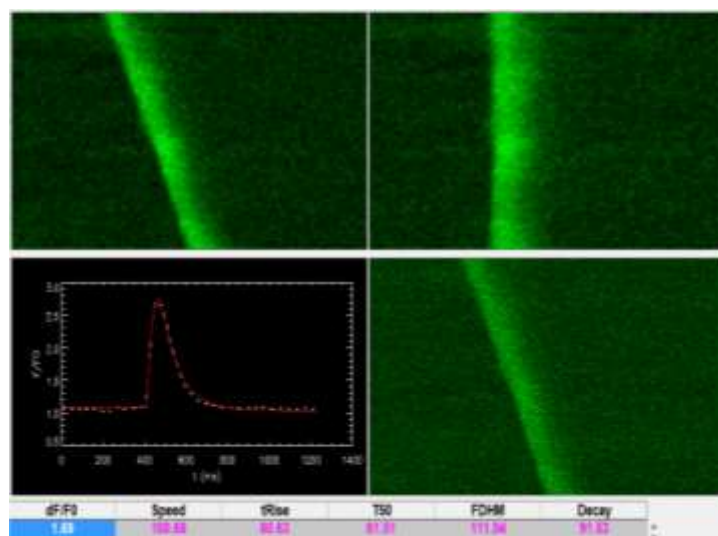


图 2-17 钙波检测结果

图中左上角为归一化后的钙波图像，右上角为使用线性拟合整形后的钙波。左下角的窗口显示的是对整形后钙波模拟钙瞬变的测量方式绘制出的荧光强度-时间曲线及其拟合曲线。右下角则显示的是最原始钙波图像。至此，即完成对钙波的检测。

2.5 本章小结

本章首先分析了现有钙信号检测中存在的问题，确认了钙信号全自动检测软件的开发价值。随后在解决上述问题后，实现了基于 IDL 平台的钙信号全自动检测软件的开发。针对原始荧光图像噪声大，目标信号分辨率低不清晰的问题，采用分段合并、逐行求取均值的方式获取每个扫描位点在图像时间长度上的荧光强度均值作为基线荧光强度。对与钙火花信号的检测，将原始图像的荧光信号进行归一化处理后，获取其荧光强度的幅度分布直方图。从直方图中计算得出该荧光图像的噪声荧光强度基本值及方差，并用以确定钙火花探测的阈值，解决了高频率下以均值和方差为阈值计算的偏差。通过搜索全图，将荧光信号强于阈值的区域标记为钙火花。随后对标记出的每个钙火花单独计算其幅度时间曲线、半高全宽（FWHM），衰减时间（1/2 decay）等标准参数，并在新窗口中展示。在最后的输出模块实现了将全部标记信号的检测结果分别以图像和文本的形式输出至计算机，实现了从原始图像的去噪处理到目标钙信号探测并输出检测结果的全功能。随后介绍了软件对于钙瞬变及钙波检测的扩展功能，分别介绍了他们的检测方法。最后给出了软件交互界面的操作介绍和应用实例。

本软件的优势在于：

（1）本软件分析程序高度集成，且设计了用户友好的图形用户交互界面，使用者只需点击两下即可完成检测分析，还可以通过窗口的形式直观的观察分析进程、图片状态以及修改参数，而不用直接面对繁杂的代码。

（2）本软件对图像归一化和检测阈值的算法上分别进行了优化。计算基线荧光强度时划分区块逐行计算，这样可以避免一些固定脏点和荧光染料分布不均匀产生的噪

声信号对结果造成干扰，使荧光信号相对背景荧光的归一化更为精确；对于钙火花的检测，在计算阈值相关参数均值和方差时，采用对幅度分布直方图提取峰值以代表“均值”，用峰的右侧半高宽来代表“方差”。这种方式更能够准确的表示出噪声的信号强度，较传统计算方法对于高频率钙火花的适应性更强，检测更准确。

（3）扩展了钙瞬变和钙波检测的功能，用户可以通过简单的输入参数来随时调整钙信号的检测模式，使得软件能更灵活的适应钙信号研究的科研需求。

3 肌浆网钙泄漏新检测方法研究

3.1 肌浆网钙泄漏研究背景

3.1.1 钙泄漏与心血管疾病

心血管疾病目前已成为我国致死率最高的疾病，是影响国民健康的头号杀手。其中，慢性心力衰竭（Heart Failure, HF）已被发现是临床上大多数心血管疾病最终阶段常伴有的病理症状。随着研究者们对心力衰竭研究的不断深入，人们逐渐意识到心衰是一个由诸多神经体液激素和心脏机能重构共同组成的生理过程^[41]，这一过程不是一成不变的，而是会随着机能的变化而不断自我发展（self-perpetuating）并不断恶化形成恶性循环。有研究表明，大约有一半的心力衰竭患者都死于心律失常（arrhythmia）^[42]。心律失常的症状多发生于正常人群或者有器质性心脏疾病的患者身上，它的发病率在一定程度上和年龄成正比关系，因此老年人是心律失常的高发人群。有的心律失常可能无症状，或对机体无害甚至不需要治疗，但是另一些心律失常将产生严重的临床症状，严重危害患者的生活质量甚至行动能力，严重时还易于引起猝死性死亡^[43]。

由于钙离子在心肌细胞功能的实现与调控中起到的至关重要的作用，心肌细胞内的钙离子稳态失衡往往成为这些心血管疾病的起源或诱因。而肌浆网作为心肌细胞内最大的钙库，其钙泄漏常常是导致心肌细胞钙离子浓度异常的主要原因。所有在非心肌细胞收缩期肌浆网产生的钙离子释放统称为钙泄漏，因此钙泄漏具有多种表现形态，包括钙火花、钙波和钙瞬变等。

其中，在电刺激下心肌细胞中的 RyR 通道在极短的时间内统一有序的开放所形成的钙离子释放事件被称为钙瞬变（calcium transient）。钙瞬变是无数个钙火花在全细胞水平上的总和，其强度体现了心肌细胞在兴奋收缩偶联中胞浆钙离子的整体变化，他可能影响到动作电位的时程和心肌细胞内兴奋信号的传导，因此其与诸多心血管疾病密切相关。Xin 等人^[44]发现在 FKBP12.6 结合蛋白敲除小鼠的心脏中观察到了心肌肥大的现象，且心肌肥大的开始于钙瞬变的波幅增加显现出很高的相关性。此外，Fadini 等人^[45]也证实了这一观点，即肥大的心肌细胞去极化所产生的钙瞬变，其幅度相较对照组而言明显更高。而在心力衰竭模型下，钙调蛋白的改变影响了细胞内的钙稳态，使得肌浆网的钙释放量变少且更不稳定^[46]，从而也影响了钙瞬变的幅度及时程。而在心律失常的模型中，静息状态下的肌浆网钙离子释放量增加，影响了钙瞬变的幅值，同时也使得肌浆网内存储的钙离子量减少，这也增加了心律失常发生的可能^[47]。

在正常生理状况下，RyR 通道的开放受到细胞间电兴奋信号的统一调控，只有当心肌细胞受到收缩的电兴奋时才会统一开放。在心肌细胞的舒张期，少量的 RyR 通道异常开放，以钙火花的形式发生钙泄漏事件。此时胞浆中多余的钙离子会被肌浆网上的钙回摄通道 SERCA 回收至肌浆网内，以此来将心肌细胞的胞浆钙离子浓度在舒张期

维持在一个较低的水平上。但我们已知, SERCA 对于钙离子的回摄需要有 ATP 的参与, 即会产生能量消耗。因此当肌浆网的钙泄漏增加, 胞浆内的钙离子浓度异常升高过多时, 会显著增大 SERCA 通道的工作压力, 从而消耗过多的 ATP, 使得心肌细胞在收缩时供能不足。这也是导致心力衰竭的病因之一。

除此之外, 我们还知道心肌细胞兴奋收缩偶联中的钙致钙释放过程具有着正反馈的机制, 这就为 RyR 通道受到临近的钙离子释放位点 (Ca^{2+} release unit, CRU) 影响而开放提供了可能^[48]。在一些胞浆钙离子浓度过高或肌浆网内钙离子过饱和的病理情况下, RyR 通道开放几率增加^[49], 并在细胞中相互触发开放就形成了钙波 (calcium wave)^[50]。因为 RyR 被触发而开放并不存在决定性条件, 而是一个随机过程, 且每个钙离子释放位点的每次钙火花事件所释放出的钙离子总量并不恒定, 同时当一个释放位点发生过钙火花事件后, 其进入一段时间的不应期, 而不再受外界条件影响而开放。因此基于以上事实, 已有研究表明钙波的传播具有一定随机性^[49], 其波形也存在多样性^[51]。此外, 多名研究者已发现钙波会引起心肌细胞活动异常, 从而导致心律失常的发生^[52, 53]。

因此, 究肌浆网钙泄漏及其相关离子通道对帮助研究者了解心血管疾病的病理机制及治疗手段有重要的意义。

3.1.2 钙泄漏的传统检测方法

人们对肌浆网钙泄漏的研究经历过多样的发展过程。根据检测对象的不同, 可以将肌浆网钙泄漏的检测方法分为直接法和间接法两类。

1) 间接法

Bassani 与 Bers 等人^[56]通过使用毒胡萝卜素来抑制肌浆网钙离子回收通道 SERCA 回摄 Ca^{2+} , 同时结合咖啡因测量肌浆网钙离子浓度的方式, 第一次检测到了细胞膜穿透情况下单向的兔心肌细胞肌浆网的钙泄漏值。毒胡萝卜素 (Thapsigargin, TG) 是一种非竞争性的 SERCA 钙离子转运抑制剂, 它具有很高的细胞膜渗透性, 能够有效抑制 SERCA 对于钙离子的转运, 使得胞浆内的钙离子浓度上升。但是细胞膜的穿透显然极大降低了细胞的完整性, 会严重影响其生理功能, 因此这样的测量方式难以具有显著的生理意义。

而 Shannon 等人^[57]则是采用无 Ca^{2+} 无 Na^{+} 但包含丁卡因的细胞外液下在完整的心肌细胞上测量不同时间点或条件下的肌浆网钙离子浓度变化情况, 从而得出一条肌浆网钙泄漏-负载曲线。丁卡因 (tetracaine) 是一种肌浆网 RyR 通道阻滞剂。它作为一种小分子酯类化合物, 极易在不破坏细胞的条件下进出细胞膜, 具有起效快且容易洗脱的特点。具体的检测思路是, 由于丁卡因的灌流会导致 RyR 通道的关闭, 故而肌浆网钙泄漏将几乎停滞, 胞浆钙离子浓度降低。因此, 通过计算丁卡因灌流前后胞浆钙离子浓度的变化, 即可得到能够反映出肌浆网钙泄水平的钙离子浓度差。具体的检测方法是^[58]:

(1) 将心肌细胞用荧光指示剂负载, 随后用正常的台氏液 (Normal Tyrode's solution, NT) 对细胞灌流, 使肌浆网拥有一定的钙负载。

(2) 随后将灌流液换为含有 1 mmol/L 丁卡因的无钙无钠的台氏液 (0 Ca/0 Na NT) 灌流 40-60s, 同时实时测量记录胞浆钙离子浓度。丁卡因在这个过程中会抑制 RyR 通道的开放, 而无钙无钠的台氏液会阻断细胞膜上的钠钙离子交换体的作用, 防止胞浆钙离子浓度受到外界因素的影响。

(3) 随后将灌流液再次换成不含丁卡因的无钙无钠的台氏液进行灌流, 以洗脱丁卡因, 使 RyR 通道功能恢复, 钙泄漏再次开始。

(4) 一段时间后, 约在 40-60s 内, 再次测量胞浆钙离子浓度。则在丁卡因灌流前后钙离子浓度的差异即代表了钙泄漏水平。

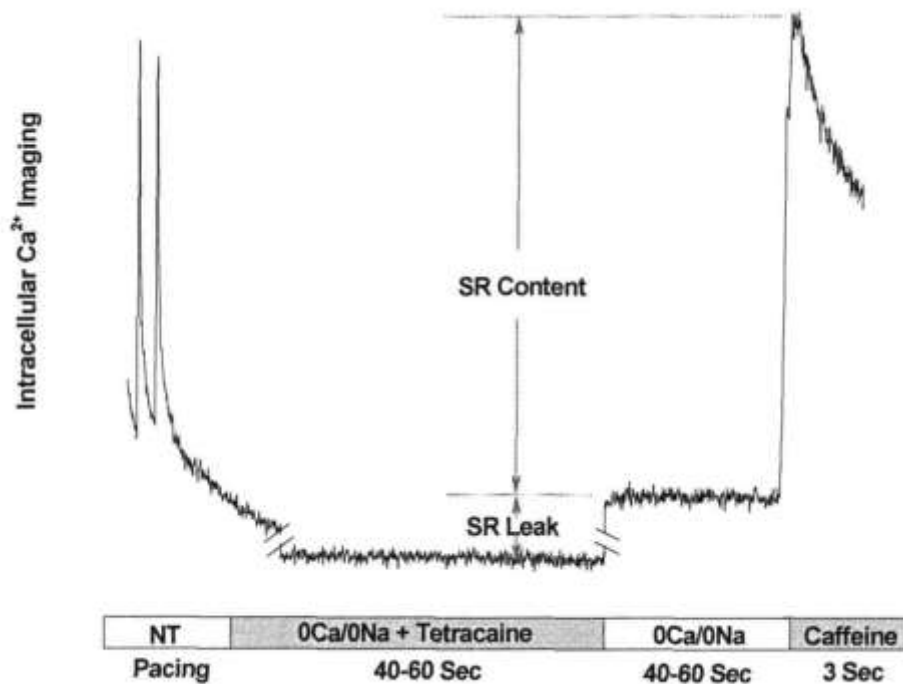


图 3-1 丁卡因测量肌浆网钙泄漏流程

此方法相较于上一种方法而言, 对细胞的损伤更小; 且丁卡因对 RyR 通道的抑制作用是可逆的, 这就意味着可以在同一细胞上进行更多的对比试验, 获取更多有可比性实验数据。

但是, 由于钙泄漏是自发状态下少部分 RyR 通道的开放事件, 因此钙泄漏所释放出的钙离子只在肌浆网钙含量中占据很小的一部分 (约 5%)。而这样钙泄漏和肌浆网钙含量之间的巨大差异也会导致测量的不准确性。此外, 上述过程对钙泄漏的测量都是间接的, 需要单独做细胞实验来专门测量钙泄漏。并且丁卡因的加入抑制了细胞的生理功能, 在非正常生理条件下心肌细胞也将产生无可预知的变化, 因此此时测量的钙泄漏其病理生理价值将受到限制。

2) 直接法

由于肌浆网钙泄漏都是通过 RyR 通道产生的, 因此理论上, 直接叠加全部的钙火花即可描述肌浆网整体钙泄漏情况。

常用的描述钙火花的特征参数包括钙火花的幅度 *Amplitude*、空间尺度上的半高宽 *FWHM*、时间尺度上的峰值上升时间 *riseTime*、半高全时长 *FDHM*，以及钙火花的发生频率 *Frequency*。其中，钙火花的发生频率是一个相对独立的参量，描述的是钙火花的整体事件发生的概率；而其余的参量则描述的均为单个钙火花的形态特征。并且，由于钙火花所表征的钙离子浓度在整个时空内连续变化，因此这些参数之间存在相互影响，并不是完全独立的。

由于我们感兴趣的钙泄漏描述的是全部钙火花所释放出来的钙离子总量，而上述这些钙火花参数各自都只从一个尺度上对单个钙火花的钙离子释放量进行了描述。因此，若要用他们来描述整个时空内钙释放的群体事件，需要对这些参数进行整合，以反映出他们的时空特性。

研究者整合出两个综合了多个参数共同作用的值，并将各个参数之间定义为乘性关系，而各个钙火花之间定义为加性关系。他们分别是考虑了时间尺度的三维全局钙离子释放量以及不考虑时间尺度只考虑峰值所在平面的平面钙离子释放量。我们将全局钙离子释放量具体定义为：

$$\text{SignalMass} = \sum \text{Amplitude} * \text{FWHM} * \text{riseTime} \quad (3-1)$$

将平面钙离子释放量则定义为：

$$\text{ReleaseMass} = \sum \text{Amplitude} * \text{FWHM} \quad (3-2)$$

其中 *Amplitude* 代表各个钙火花的峰值幅度；*FWHM* 为其半高全宽，代表峰的宽度；*riseTime* 代表荧光强度由起始上升至峰值的时间。全局钙离子释放量和平面钙离子释放量均是取图像上所有检测到的钙火花参数乘积之和。

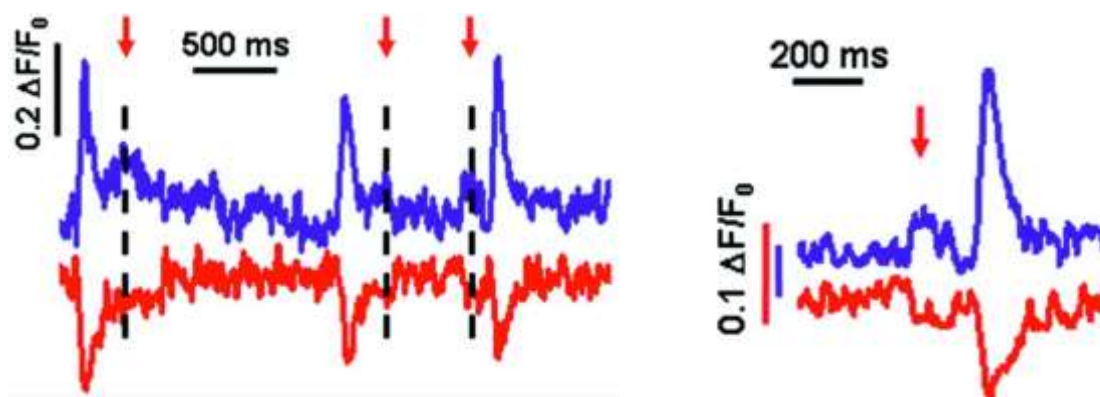
如此，这两个综合参数就能够同时表现出全部钙火花的时空特性。用这种叠加钙火花的方式来研究钙瞬变，不仅仅可以不用向细胞内添加抑制剂而改变细胞的生理活性，获得最接近生理状态的数据；此外他的测量对象钙火花本身就是肌浆网钙泄漏产生的，因此这种方式测出来的钙泄漏结果更加直观。

但这种方法仍旧存在问题，因为钙火花的探测是不准确的。

首先，由于钙火花的探测标准是基于阈值的测定法，而阈值中经验参数的存在就使得钙火花的检测会随研究者的倾向性而产生变化。同时，在高频钙火花发生的情况下，大量钙火花相继发生，相互之间发生重叠，导致无法将它们很好的分离开而导致误检和漏检。同时检测这样非标准型的钙火花也无法准确获取能够准确描述其钙活动的特征参数，这也造成了误差。此外，已有研究者报到过，细胞内还存在比钙火花更小的钙释放事件，被称为钙夸克（*quarky Ca²⁺ release, QCR*）。研究者通过分别用荧光染料 *rhod-2* 标记胞浆钙离子，用荧光染料 *fluo-5N* 标记肌浆网钙离子，并同时记录他们的钙活动，从而发现，在钙火花之余还存在更微小的肌浆网钙释放活动。这样的更小的钙活动可能是由于更少或单个 *RyR* 通道的短暂开放形成的。这种 *RyR* 通道的开放很可能是

由于受到附近钙火花等其他钙活动释放的钙离子的影响，在钙致钙释放的作用机制下打开的，因此这种钙夸克常常可以在钙火花。钙瞬变之后被发现。

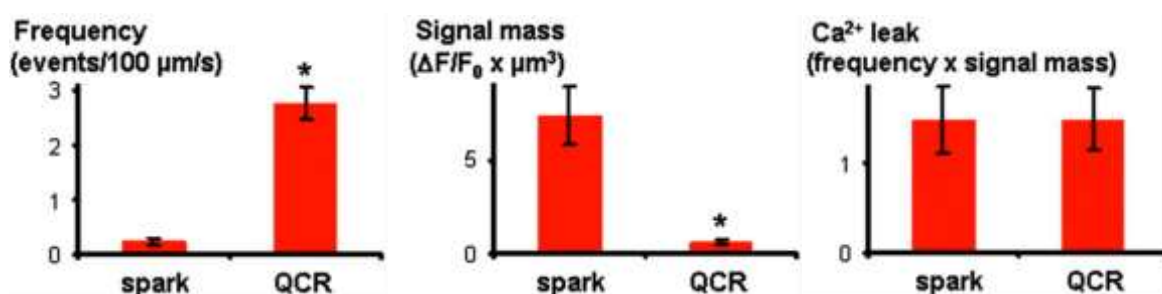
这种类型的钙释放由于幅度太小（钙火花常为 $2\Delta F/F_0$ ，钙夸克只有 $0.1-0.3\Delta F/F_0$ ），用单纯的钙火花检测方法无法很好的将其与噪声信号进行区分。另外，肌浆网和胞浆同时共定位的检测条件限制极高，且肌浆网定向的荧光染料 fluo-5N 只能进入兔子心肌细胞的肌浆网，而无法进入小鼠心肌细胞肌浆网内，因此此研究方法的实现难度很高，无法广泛应用。故而这种微小的肌浆网钙离子释放事件常常被忽略。



(a) 钙火花与钙夸克（箭头指出）幅度-时间曲线 (b) 局部放大的钙火花与钙夸克

图 3-2 钙火花与钙夸克对比

值得注意的是，这种类型的钙离子释放事件虽然幅度极小，但发生的频率极高，研究已经表明其单位时间和单位面积下的钙泄漏总量已经与钙火花相当。因此钙夸克所产生的肌浆网钙泄露也不应被忽视。



(a) 频率对比

(b) 释放量对比

(c) 钙泄漏量对比

图 3-3 钙火花与钙夸克的钙离子释放参数对比

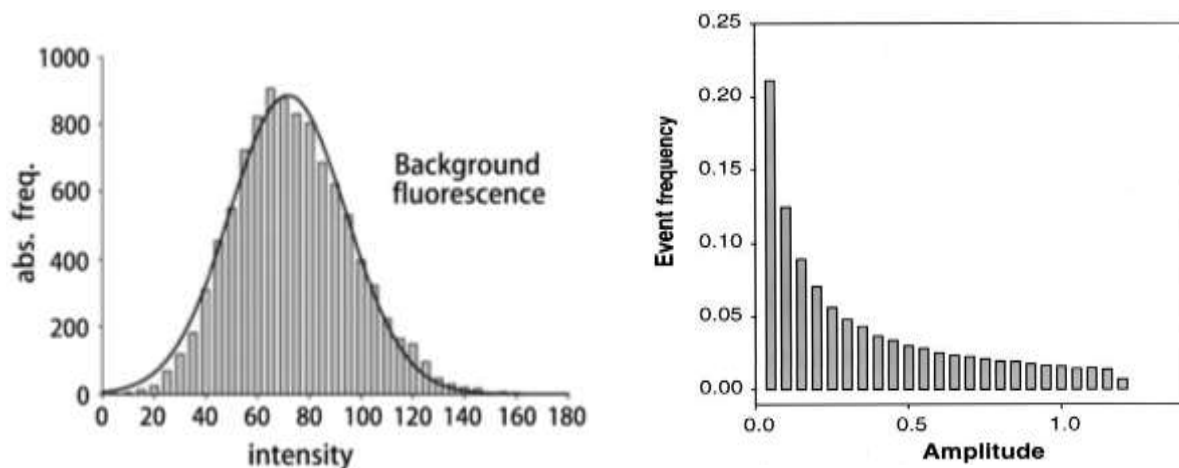
3.2 肌浆网钙泄漏检测新方法

通过叠加检测到的钙火花来估计钙泄漏的方式会由于钙火花检测不可避免的误差以及阈值下钙释放事件的存在而使得对钙泄漏评价的不准确性。因此我们开发了评价肌浆网钙泄漏的新方法。

3.2.1 理论原理

在上一章中计算用于测定钙火花的阈值时，我们使用到了荧光图像的幅度分布直方图。

我们已知激光共聚焦显微镜的固有背景噪声属于高斯白噪，其噪声荧光强度分布近似于泊松分布，可以用高斯函数很好的预测。同时，单纯钙火花的荧光强度分布并不呈现明显的分布规律，只是随着荧光强度的增加而出现频率递减。



(a) 噪声荧光信号分布

(b) 钙火花荧光信号分布

图 3-4 噪声与荧光信号分布规律

我们观察幅度分布直方图所显示出的图像，在其峰值左侧近似高斯分布，但右侧的图像在荧光强度较高的区域有明显的延长。我们认为，此时的荧光图像中只包含有效的钙释放所产生的荧光强度以及硬件所产生的噪声信号两种成分。而整副图像的荧光强度幅度分布直方图正是由这两种信号各自的幅度分布直方图叠加形成的。

因此，我们只需要从整体幅度分布直方图中减去属于噪声信号的部分，即可得到在线扫描图像所表示出的时间范围内，扫描线上肌浆网钙泄漏的总量。

3.2.2 新参量的计算方法

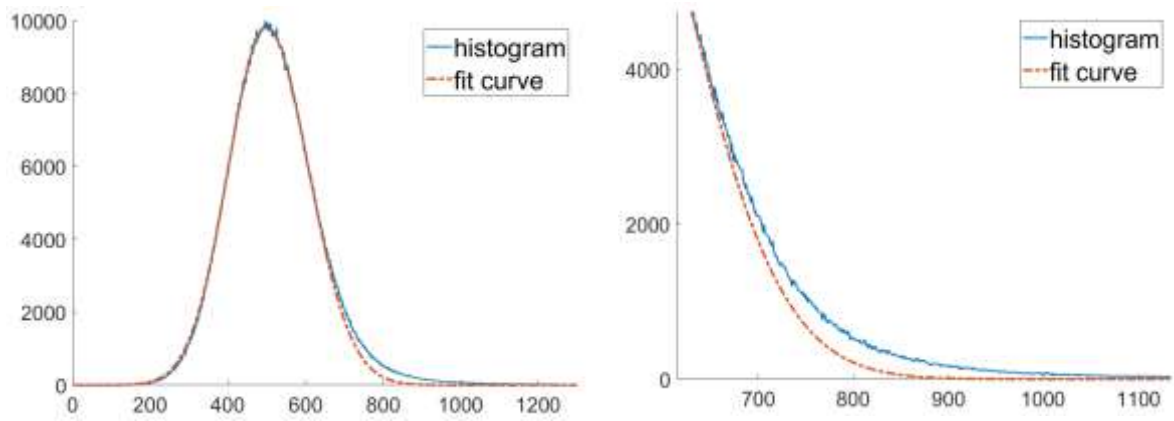
1) 荧光偏差参量

由于有效荧光信号的荧光强度显著高于背景噪声信号，因此在幅度分布直方图中，我们关心的有效信号只出现在荧光强度高、出现频率低的直方图边缘处。且荧光强度越高，在直方图相应区域中有效信号的占比就越高。因此，我们只需将幅度分布直方图右侧曲线中属于噪声的部分去除，就能得到整体的，全部由钙离子释放所产生的荧光信号。

为实现这一目标，需先得到纯噪声信号。为此，我们对幅度分布直方图以其峰值所在位置为中心，将曲线左右两部分分别用参数不同的高斯函数进行拟和：

$$f_{gauss}(x) = \begin{cases} Ae^{\frac{-(x-b)^2}{2c_1^2}}, & x < b \\ Ae^{\frac{-(x-b)^2}{2c_2^2}}, & x \geq b \end{cases} \quad (3-3)$$

式中，A 为直方图峰值；b 为峰值对应位置的横坐标，即中心位置；c1、c2 分别为幅度分布直方图上中心位置左右两侧的半高宽。我们用此拟合曲线来表示噪声信号的分布情况。将拟合曲线与幅度分布直方曲线显示在同一图上，结果如图 3-5 所示：



(a) 幅度分布直方图及拟合曲线

(b) 幅度分布直方图及拟合曲线局部放大图

图 3-5 荧光强度幅度分布直方图拟合结果

可以看到，拟合曲线在左侧拟合情况良好，与原曲线间差距较小；而在右侧荧光强度较高的区域出现了一定的偏差，这也与我们对噪声荧光信号和有效荧光信号之间的关系认知相符合，即幅度分布直方图中小于峰值的部分主要由噪声信号构成，而高于峰值的部分则由噪声信号和有效荧光信号共同构成。

至此，为将噪声荧光信号从整体荧光信号中去除，我们先需分别求出其总荧光强度。根据上述过程得到的幅度分布直方图曲线及其拟合曲线，我们以峰值所在位置为中心，分别对其左右进行面积计算：

$$S = \sum_{x_1}^{x_2} f(x) \quad (3-4)$$

其中 x_1 , x_2 为计算的起止位置。

此时我们可以以峰值所在位置将两条曲线分割成两个部分，定义出四个量：幅度分布直方图中心左侧面积为 S_1 ，右侧为 S_2 ；拟合曲线中心左侧面积为 S_{N1} ，右侧为 S_{N2} 。我们用两个曲线右侧的面积相减，即可得到整张扫描图像上的有效荧光强度之和，也代表了全部钙离子释放量的总量。但是由于每张扫描图像的背景噪声强度不一，因此为了使得这一荧光释放量在不同图像之间具有可比较性，我们需对这一值进行归一化处理去除其量纲，得到：

$$R_{fluo} = \frac{S_2 - S_{N2}}{S_1 + S_2} \quad (3-5)$$

式中 S_1 为幅度分布直方图中心位置左侧面积， S_2 为幅度分布直方图中心位置右侧面积， S_{N2} 为拟合曲线中心位置右侧面积。该比值反应的即为整幅图除背景噪声外单纯钙离子释放所产生的荧光强度相对于整图荧光强度总和，是整个扫描时间段内所有扫描点上释放出的全部钙离子的相对释放量。我们将这个值定义为荧光偏差参量，记做 R_{fluo} 。

这个参量相较于传统的叠加计算全部钙火花来估计整体钙泄漏水平的方法而言，计算更为简单，省略了很多中间步骤即可得到想要的结果。同时，由于钙火花的测算过程中测定阈值内经验参数的存在，且有时存在不少幅度更低更难以被自动检测的钙离子释放事件，有时又存在钙火花相互叠加重叠无法独立探测的情况，钙火花的检测一直存在一些不可避免的误差。因此，用流量偏差参量来描述钙泄漏时，很好的避免了逐个探测钙火花所带来的误差，使得对整体钙泄漏水平的描述更为准确。

但是尽管有如此多的优点，这一参数仍存在可以优化的空间。这样的计算方式所计算的是图像上全部高于基线水平的钙离子相对含量，即将钙离子从释放活动开始直到钙火花结束、钙离子荧光信号强度降至最低的全过程内所有荧光信号相加。但在这个过程中，从峰值出现过后的荧光信号不再是由于钙离子的释放而产生的。此时的钙释放活动已经停止，图像上所显示的荧光信号属于峰值前释放的钙离子的遗留信号，是钙离子在细胞内扩散的结果。因此，严格来说，荧光偏差参量将钙火花荧光强度处于下降阶段，而仍强于背景荧光信号的部分计算在内，会使得我们所求得的“释放量”不是纯粹的释放量。

2) 流量偏差参量

为解决这一问题，这里我们再引入一个流量图的概念。

即对每一个扫描线上的像素点而言，都用原始线扫描荧光图像的每一帧荧光强度减去该位置上前一时刻的图像荧光强度：

$$\Delta y(x, t) = y(x, t) - y(x, t - 1) \quad (3-6)$$

其中， $y(x, t)$ 即为扫描线上 x 位置在 t 时刻的荧光信号强度，而 $y(x, t - 1)$ 为其前一时刻的荧光信号强度， $\Delta y(x, t)$ 表示他们的差值。将原图像上全部点均进行此操作后构成新的流量图， $\Delta y(x, t)$ 即成为流量图上 x 点在 t 时刻的荧光强度。这样的操作即是对原图像进行时间上的差分，效果如图 3-7 所示。

从图中我们可以明显看到，在流量图中，原本荧光强度明亮的钙离子扩散区域的荧光强度已经降低，而钙离子释放阶段的荧光强度依旧显著突出。在这样的流量图中，荧光强度高的区域，每个点此时的荧光强度代表了该位置的扫描点相对于前一时刻更多释放出来的钙离子量，也就是单位时刻的钙离子释放量。而整个时间段内的钙离子释放总量则直接与这些点的荧光强度的总和直接相关。因此这一流量图就很好的解决了钙火花下降期荧光亮度对我们想描述的纯粹钙泄漏事件产生的干扰。

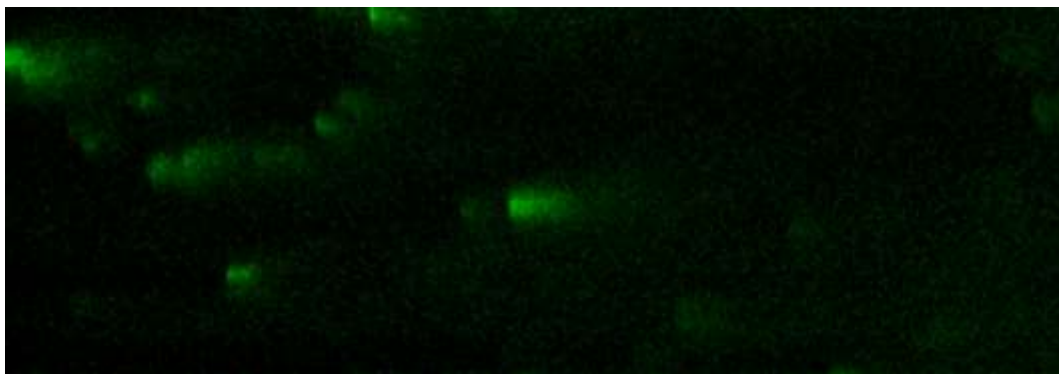


图 3-6 小鼠心房肌细胞线扫描钙火花图

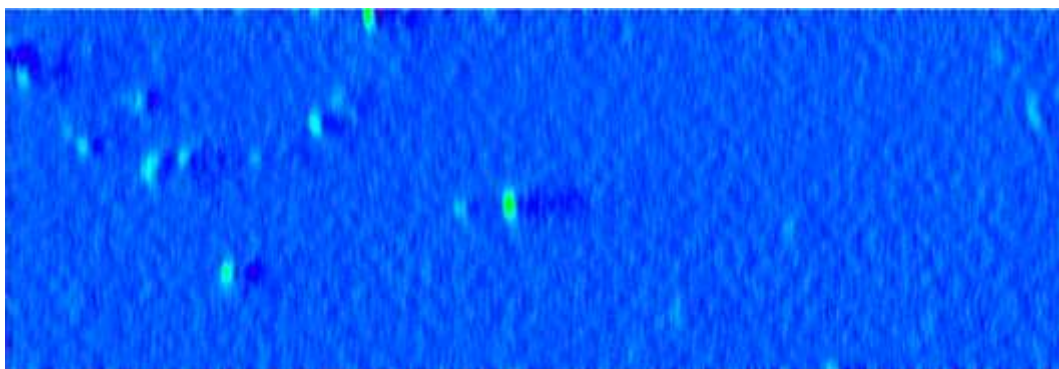


图 3-7 小鼠心房肌细胞线扫描钙火花流量伪彩图

在得到流量图后，我们重复上述计算荧光偏差参量时的步骤，对其幅度分布直方图进行不对称高斯拟合，计拟和前与拟和后曲线的四个区域各自的和为 S'_1 , S'_2 , S'_{N1} , S'_{N2} 。再次计算峰值右侧部分面积拟和前后之差，再用其除以流量图幅度分布直方图的总面积以消除其量纲使其具有可比性：

$$R_{flow} = \frac{S'_2 - S'_{N2}}{S'_1 + S'_2} \quad (3-7)$$

该比值即可用于描述当前图像上纯 Ca^{2+} 释放量的相对大小。我们将这个值记为流量偏差参量 R_{flow} 。

至此，我们便得到了两个全新的描述肌浆网钙泄漏量的参量。

3.2.3 新参量的优势

这两个参量的优势在于：

- (1) 计算步骤简单便捷，可以很快的处理大量图片数据。
- (2) 计算过程对钙泄漏来说避免了检测钙火花的中间过程，在提升了研究简易性的同时，避免了由于钙火花检测不精准带来的误差。
- (3) 新参量中的流量偏差参量能将钙泄漏时产生的荧光信号完整剥离，能更精确直观的描述钙泄漏事件。

3.3 新方法有效性评价

为验证我们开发出的荧光偏差参量和流量偏差参量在评级肌浆网钙泄漏能力上的有效性，我们需将其与已被认可能够描述肌浆网钙泄漏的参量进行相关性分析。由于自发性钙泄漏的表现形式大多数时候为钙火花，因此在这里我们将对钙火花的综合参数与新参量进行相关性研究。

我们在从前的研究中获取的钙火花图像中随机选取了 44 张荧光图像，使用前文中开发的钙信号自动分析软件进行钙火花分析，得出全部钙火花的特征参数值。随后分别计算了每张图像的钙火花的发生频率，以及他们各自的全局钙离子释放量和平面释放量，同时也计算了荧光偏差参量和流量偏差参量，并对这几个参量进行相关性分析。其结果表示在下方。

3.3.1 荧光偏差参量的相关性分析

结果如图 3-8 所示：

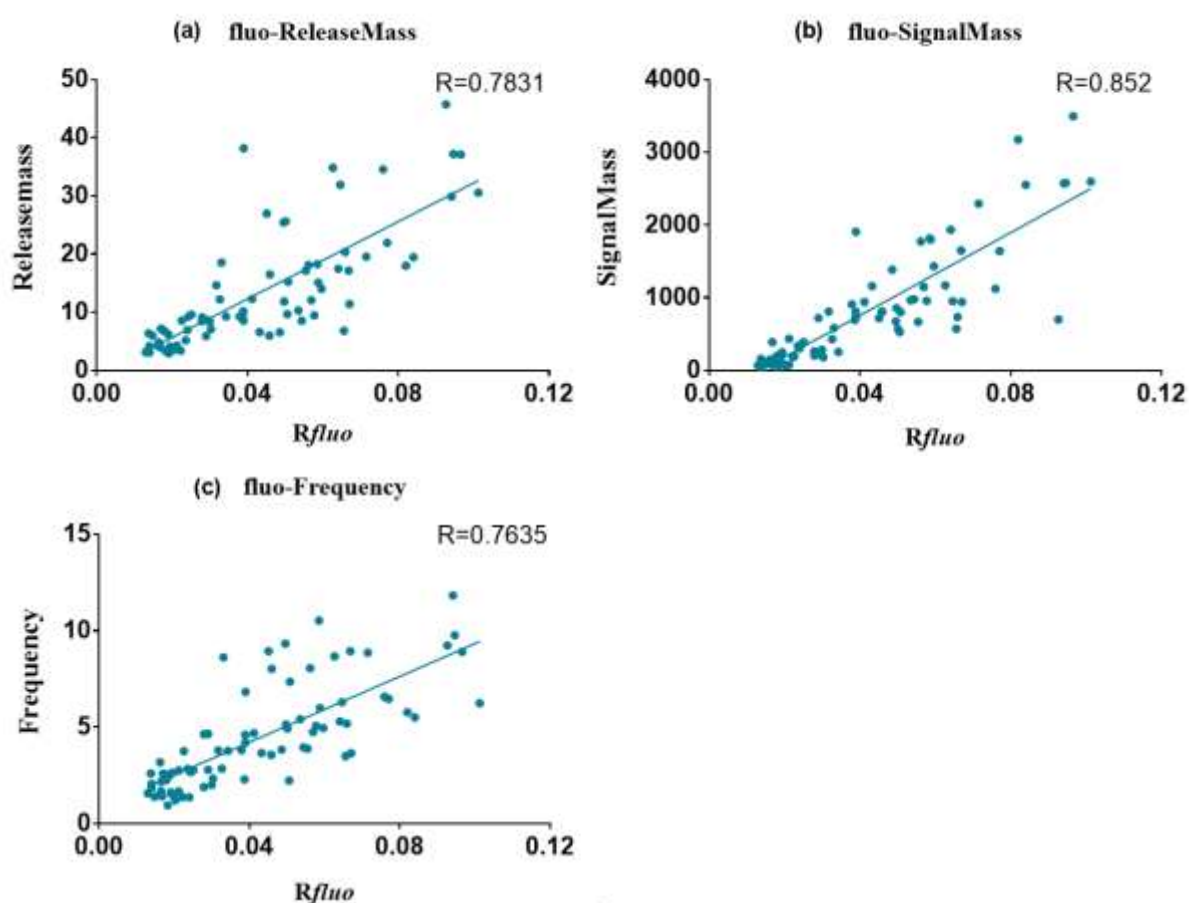


图 3-8 荧光偏差参量相关性分析图。(a) 中显示的是荧光偏差参量与平面钙离子释放量 ReleaseMass 的相关性结果；(b) 中显示的是荧光偏差参量与全局钙离子释放量 SignalMass 的相关性结果；(c) 中显示的是荧光偏差参量与钙火花发生频率的相关性结果。

从图中我们可以看出，荧光偏差参量与钙火花的频率，全局钙离子释放量 Signalmass 和

平面释放量 ReleaseMass 呈现很好的正相关性。其相关系数展示在表 3-1 中：

表 3-1 荧光偏差参量与钙火花参数的相关结果

	相关系数	P 值
R_{fluor} -Frequency	0.764	<0.001
R_{fluor} -Signalmass	0.852	<0.001
R_{fluor} -Releasemass	0.783	<0.001

通过表 3-1 的相关性分析结果我们可以得出，荧光偏差参量与钙火花发生频率及考虑时间参数的全局钙离子释放量 Signalmass 及不考虑时间参数的平面钙离子释放量 ReleaseMass 均有显著的强相关性，且全部呈现正相关的关系。并且由于荧光偏差参量受到钙火花持续时间的影响，因此与考虑时间参数的钙离子释放量 Signalmass 相关性最高，这也符合我们的预期猜想。因此荧光偏差参量可以作为评价心肌细胞肌浆网钙泄漏的有效指标。

3.3.2 流量偏差参量相关性分析结果：

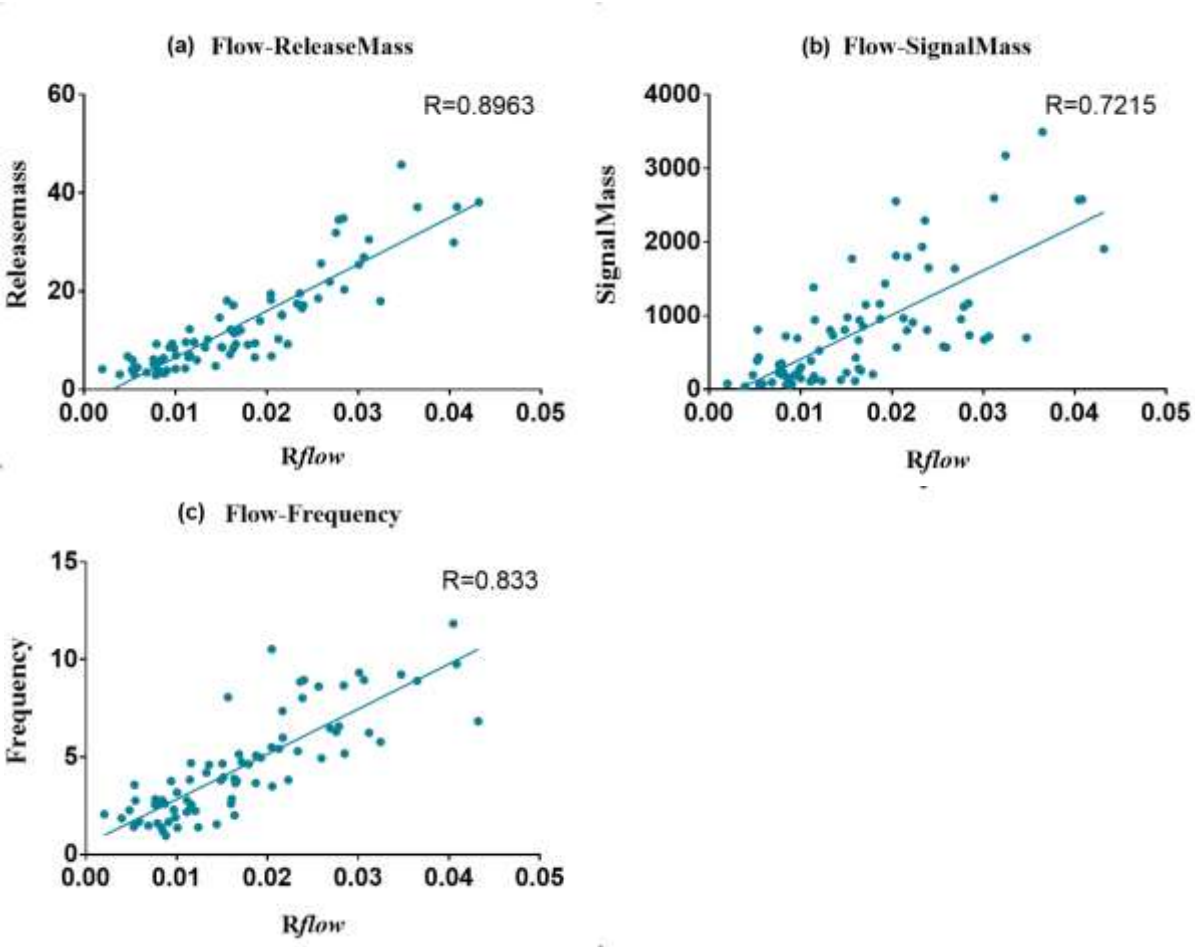


图 3-9 流量偏差参量相关性分析图。a) 流量偏差参量与 ReleaseMass 的相关性结果；(b) 流量偏差参量与 SignalMass 的相关性结果；(c) 流量偏差参量与钙火花发生频率的相关性结果。

从图中我们可以看出，流量偏差参量与钙火花的频率，全局钙离子释放量 **SignalMass** 和平面钙离子释放量 **ReleaseMass** 呈现很好的相关性。其相关系数展示在表 3-2 中：

表 3-2 流量偏差参量与钙火花参数的相关结果

	相关系数	P 值
R_{flow} -Frequency	0.833	<0.001
R_{flow} -Signalmass	0.725	<0.001
R_{flow} -Releasemass	0.896	<0.001

通过表 3-2 的流量偏差参量与钙火花参数的相关结果我们可以得出，流量偏差参量与钙火花发生频率及考虑时间参数的钙离子释放量 **Signalmass** 及不考虑时间参数的平面钙离子释放量 **ReleaseMass** 均有显著的强相关性，且全部呈现正相关的关系。并且由于流量偏差参量是由时间差分图像得出，不受钙火花持续时间的影响，因此与不考虑时间参数的钙离子释放量 **ReleaseMass** 相关性最强，这也符合我们的预期猜想。因此流量偏差参量可以作为评价心肌细胞肌浆网钙泄漏的有效指标。

此分析结果充分证明了新参量在描述肌浆网钙泄漏能力上的有效性。

3.4 本章小结

在本章中，我们首先回顾了肌浆网钙泄漏研究的发展历程，同时指出了现今常用研究方法中基于激光共聚焦显微镜测量钙火花来描述钙泄漏这一方法的优势以及存在的弊端。其问题主要在于描述钙泄漏需要叠加全部钙火花检测结果，计算量大过程复杂；同时由于钙火花形态的多变性，检测误差难以完全避免。又由于某些病理状况下，钙火花不是完全独立发生，相互之间存在叠加与影响，使其完全无法独立探测。为解决这些问题，我们开发出了两个用于描述肌浆网钙泄漏的新参量。该新参量是基于荧光图像中仅包含有效信号和成高斯分布的噪声信号两种信号的认知进行的。我们获取荧光图像的幅度分布直方图，发现其分布规律近似泊松分布。从而想到可以通过对其进行高斯拟合来估测噪声信号。最后用原始信号减去噪声信号，再进行归一化处理，即可得到能够描述肌浆网钙泄露水平的新参量。基于这个计算方法，我们定义了荧光偏差参量 R_{flu0} 。此外我们还进一步对这一参量进行了优化，对原始荧光图像进行差分，用新得到的差分流量图重复上述计算过程，即可剔除由于胞浆钙离子扩散而产生的“非钙泄露”荧光强度。我们将这一参量定义为流量偏差参量 R_{flow} 。随后我们通过计算新参量与钙火花经典参量之间的相关性，证实了两个新参量在描述肌浆网钙泄漏能力上的有效性。

因为本评价方法是跨过钙火花检测，直接计算整体钙离子释放量，因此避免了在钙火花探测过程中可能存在的检测误差，统一了不同研究人员进行检测时可能由于主观因素而带来的结果差异，也避免了叠加大量钙火花所带来的数据处理上的复杂度。适用于类似对病理情况发生的致病原因机制判断这样的定性或定量研究。

4 心房肌细胞钙信号特征研究

4.1 引言

我们已经知道，心脏的泵血功能是以心肌的收缩与舒张功能作为基础而实现的。目前已知的心肌细胞可以分为四类，分别是窦房结细胞（sino-atrial node cell, SNC）、浦肯野纤维细胞，心房肌细胞（atrial cell, AC）和心室肌细胞（ventricular cell, VC）。其中，窦房结是心脏正常生理情况下的起搏点，它具有非常强大的自律性，可以自发的有节律性的产生动作电位进行搏动。随后这一搏动信号通过结间束（internodal bundle, INB）的传导后抵达房室结（atrioventricular node, AVN）和心房肌，最后在通过希氏束和浦肯野纤维的传导使得全部的心室肌细胞几乎在同一时刻被激活，进而引起整个心脏的收缩。虽然心房和心室肌细胞都在整个心脏的工作过程中起到收缩的作用，功能上具有很高的相似性，但他们依旧存在一定的差异，主要体现在细胞形态、细胞内细胞器的分布及含量，离子通道等调控蛋白的表达量等诸多方面。

在心脏的生理功能实现中，左右心室分别与不同动脉相连，左心室连接主动脉，右心室连接肺动脉，在心动周期到来时，左右心室的活动是同步的，他们同时受到心房收缩产生的压力升高影响，并在每搏产生相同的输出量，直接将血液泵出到肺动脉及主动脉，并提供足够的压强使得血液能够流经全身血管。因为心室的收缩与动脉射血直接相关，很次心血管疾病常常会在心室上表现出显著的病理学变化。如，冠状动脉性心脏病会导致心室舒张功能降低、心肌梗死也会出现心室的功能不全，另外高血压所伴有的内分泌因素变化会导致明显的心室肥厚。因此过去人们常常认为心室在心脏的生理功能中起到主要作用，对心脏的研究也主要集中在心室肌细胞当中。

近年来，越来越多的研究发现，在心室出现疾病时，心房也往往伴随发生病变。如，高血压会引起心肌肥大，进而导致心衰的发生，与此同时有研究发现，高血压所导致的心房肥大甚至早于心室肥大的出现，继而导致房颤的发生；另外儿茶酚胺敏感性室性心动过速（catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, CPVT），是一种严重的遗传性心律失常疾病，患病者的心脏结构或休息状态下的心电图都并没有发生任何异常，体育锻炼和肾上腺素能刺激（包括剧烈的情绪波动等）通常会触发心律失常的症状，以往的研究显示 CPVT 患者早期往往伴随有房颤的发生（ref）。研究表明，心房的这些病变与心房肌细胞功能异常导致的钙信号变化也密切相关。

以往针对心房肌细胞钙信号的研究也有很多，但是由于分析工具和手段所限，缺乏一个针对其与心室肌细胞钙信号进行详细比较的典型特征分析。因此，本文在前文中开发的钙信号全自动分析软件和钙泄漏分析方法的基础上，对小鼠心房肌细胞的钙信号进行了详尽的对比研究。

本章主要通过小鼠心肌细胞的体外分离与培养研究了在 CPVT 病理和正常生理状况下心房与心室肌细胞内钙信号的差异，以此来评价心房肌细胞的钙信号特征。

4.2 实验材料与方法

我们选用成年的雄性野生型和 RyR2-R2474S^{+/+}基因突变模型小鼠作为实验对象进行研究。由于 RyR2-R2474S 突变基因为显性遗传，且 RyR2-R2474S 基因突变的纯合子小鼠（RyR2-R2474S^{+/+}）存在胚胎致死现象，因此我们选用杂合子进行实验。RyR2-R2474S^{+/+}基因突变小鼠已被证明是成熟的 CPVT 病理模型小鼠，具有明显的病理学特征。

4.2.1 实验鼠基因型鉴定

分离心肌细胞前，先对模型小鼠进行 Genotyping 实验确定其基因型，其实验过程如下：

1) NaOH 法提取小鼠尾部组织的基因组 DNA

剪取小鼠尾部 4mm 左右的尾部组织，放入无菌的 1.5ml 离心管内。随后加入 300μl 的 50 mmol/L NaOH 溶液进行消化，并使用金属浴在 98℃条件下裂解一小时。随后取出组织液，使其冷却到 15℃，并加入 40μl 的 40mmol/L 的 Tris-HCl (PH=8) 溶液。随后将离心管用 14000 r/min 的速度离心 3min，最后提取上清液，并放置于 4℃保存备用。

2) PCR 基因扩增

由于 RyR2-R2474S^{+/+}基因突变模型小鼠为杂合子，因此需要同时进行野生型（WT）和 RyR2-R2474S 两种 DNA 链的 PCR 扩增，同时检验其 DNA。本实验中，两种 DNA 的 PCR 反应体系均为 15μl。其反应体系如下：

表 3-1 实时荧光定量 PCR 反应体系

Group	Wild Type	RyR2-R2474S
2 × Taq Mix	7.5μl	7.5μl
ddH ₂ O	3μl	3μl
Primer-F 1/3	1μl	1μl
Primer-R 2/4	1μl	1μl
DNA	2.5μl	2.5μl

其中，2 × Taq Mix 包含包含 Taq DNA 聚合酶、dNTP、MgCl₂、PCR buffer、PCR 反应增强剂、稳定剂和一种蓝色示踪染料。Primer1 与 Primer2 分别为 WTDNA 的上下游引物，Primer3 与 Primer4 分别为 RyR^{2474s/+}突变 DNA 的上下游引物。引物均为自主设计，并委托宝日医生物技术（北京）有限公司进行生产合成。其序列为：

Primer 1: CTTGTAGAACAGGTGGCCTT;

Primer 2: TTGTCCCTACTGGCCTTATA;

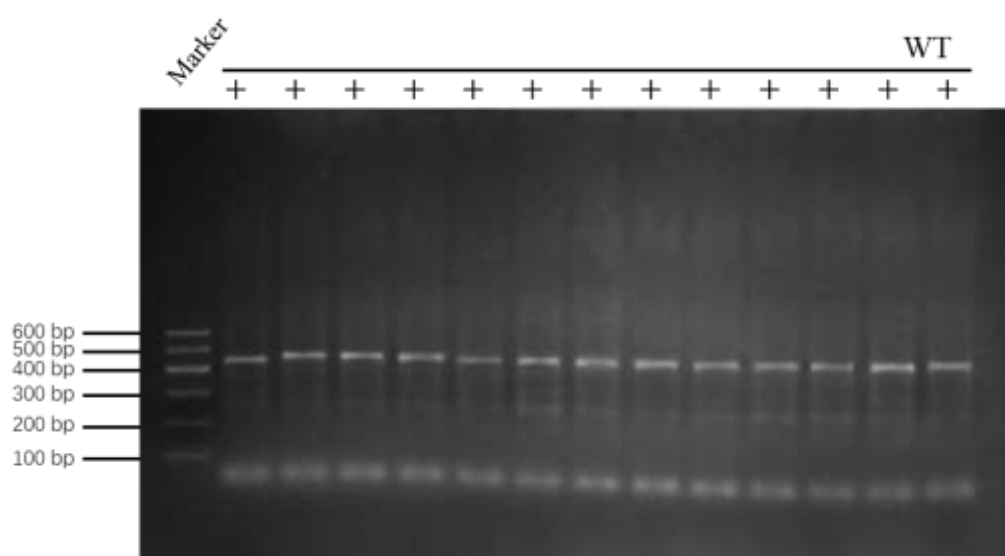
Primer 3: TCTGTAATGGGAAGGTGGG;

Primer 4: GCCGAGTCTAGATATCGATACG。

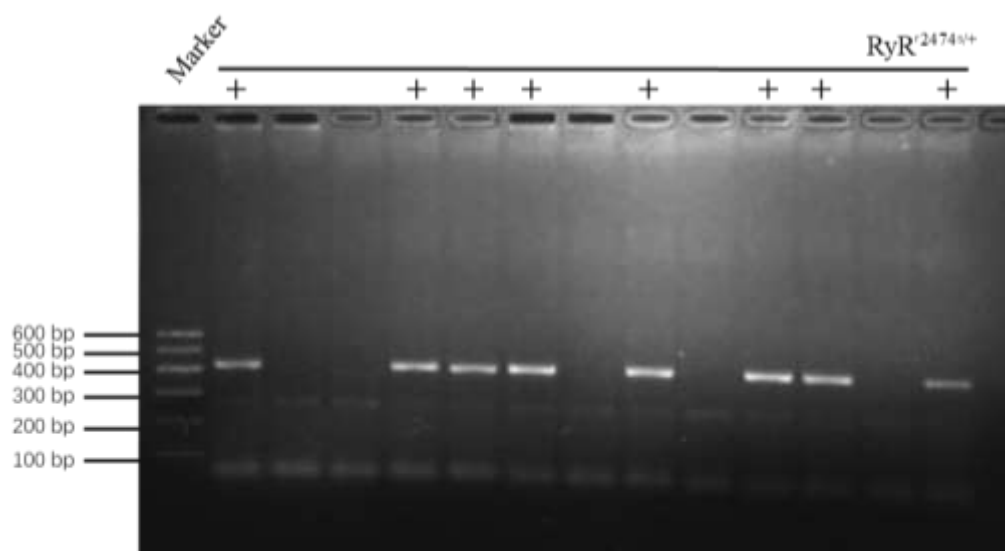
PCR 扩增的反应条件为：94 °C预变性 3 min，94°C变性 30 s，60°C退火 45 s，72°C延伸 1 min，共进行 35 个循环。最后 72°C延伸 5 min，15°C延伸 10 min，待反应结束后取出放置到-20°C保存。

3) 琼脂糖凝胶电泳

本实验使用 0.8%的琼脂糖与 TAE 电泳缓冲液制成凝胶，并向其中加入核酸染料 Gold View。随后将 DNA 加入凝胶孔内，放置在电泳槽中，以 120V 的恒压进行电泳，时间约 30min。电泳结束后取出凝胶板，用凝胶成像分析系统进行拍照分析。实验结果示例如下：



(a) WT DNA 凝胶电泳结果



(b) RyR2-R2474SDNA 凝胶电泳结果

图 4-1 RyR2-R2474S^{+/+}基因突变小鼠 Genotyping 结果图

其中，a 图中显示的为 WT 的 DNA 条带，均呈阳性；b 图中显示的为突变基因型 RyR2-R2474S 的 DNA 条带，其中在 400-500bp 之间显示亮条带的即为阳性。

4.2.2 离体小鼠心肌细胞的制备

本实验采用恒流灌流的 Langendorff 装置分离成年小鼠心肌细胞。相较于以往的恒压灌流方式，恒流灌流更易于借助灌流压力来判断消化的终点。

1) 实验动物与材料

选择健康的成年雄性野生型和 RyR2-R2474S^{+/+} 基因突变型 C57 小鼠，3-6 月龄，30-35g，饲养并繁殖于西安交通大学医学部实验动物中心。所有实验动物和实验动物安乐死的执行均完全符合《实验动物管理和使用指南》的要求，所有实验动物的饲养均符合 SPF 级实验动物饲养要求。

实验试剂包括 BDM (2,3-butanedione monoxime)、BSA (Bovine Serum Albumin)、ITS (Insulin, Transferrin, Selenium)、Laminin、Penicillin 均来自 Sigma 公司，胶原酶 II、MEM (Minimum Essential Medium Eagle) 均来自 GIBCO 公司。

2) 小鼠心肌细胞的分离与培养

实验前预先准备溶液：

A: AFCS 灌流液

B: 35mg 的 II 型胶原酶溶于 2 ml AFCS

C: 1 mg 蛋白酶 XIV 溶解于 200 μ l AFCS

消化液：30 ml A 液+1.5 ml B 液+ 4 μ l 100mmol/L CaCl₂

D: 30 ml A 液+4 μ l 100mmol/L CaCl₂+500mg BSA

E: 10 ml D 液+0.5ml B 液+200 μ l C 液

试验过程如下：

1. 麻醉老鼠，注射肝素钠，等 5min 后待肝素钠循环至全身后，断颈处死，在杀鼠板上使用 75% 的酒精消毒，
2. 用无菌剪刀和镊子将心脏从小鼠上剪下放入装有 AFCS 的培养皿中清洗，并移去多余组织。
3. 将心脏悬挂到 Langendorff 灌流装置上。灌流 AFCS 5min，速度约 4mL/min。
4. 将 AFCS 液换成消化液灌流直至心脏变得肿胀苍白，轻捏表面的时候感到松软。
5. 将左心房和右心房剪下来放在装有 2ml E 液的培养皿里，将心房剪成小片，用玻璃吸管轻轻吹打散开。
6. 随后离心 400-500 rpm 5min，再轻轻用 2ml D 液吹散细胞。
7. 离心 400-500 rpm，5min。用铺板培养基轻轻吹打重悬。移去 laminin 将细胞混合液铺于玻片上。在培养箱中孵育待用。

4.2.3 激光共聚焦显微镜测定细胞内钙信号

在这里我们将使用激光共聚焦显微镜记录小鼠心室肌细胞的钙离子荧光信号。将钙离子荧光指示剂 fluo-4-AM (浓度为 5 μ mol/L) 加入到敷有分离好的心肌细胞培养皿中，避光共同孵育 15min，之后用正常细胞外液 HEPES 缓冲液清洗细胞以去除细胞外多余的荧光染料。其中，钙离子荧光染料上所带的 AM 基团 (acetoxymethylester) 是一种脂质基团，可以帮助荧光染料分子顺利通过细胞膜，在进入细胞后被胞内的相应酶

除去。

将加载了荧光染料的细胞放置到激光共聚焦显微系统的载物台上，选择成长条杆状、横纹清晰、表面平整且没有剧烈自发性收缩活动的细胞进行观测记录。本研究采用 Leica TCS SP8 STED 3X 共聚焦显微镜系统，对细胞以快速线扫描（Line-scanning）的方式进行记录。对此荧光染料使用的激发光为波长 488nm 的氩激光，使用 40 倍，1.3NA（numericalaperture）油浸镜头观察记录细胞，所获得的荧光图像的纵向和水平分辨率分别为 1.0 μm 以及 0.5 μm ，其采样频率为纵 2.5 ms/线。在正式的记录钙火花之前，先用二维面扫描的方式确定细胞的轮廓和防伪，然后调整焦平面以选取荧光分布较为均匀且避开细胞核的细胞层面。随后将系统转变为线扫描方式记录细胞的钙火花情况。所有实验均在室温（25℃）条件下进行。

4.2.4 数据处理

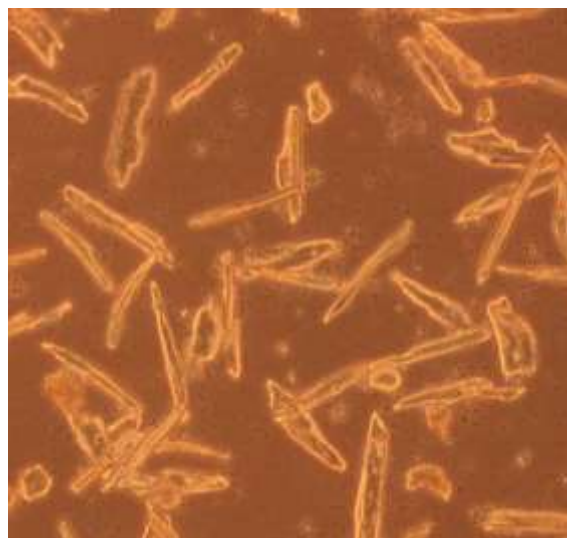
本章中的数据均使用上文中自编的钙信号全自动分析软件进行结果分析。获得的全部试验数据均以均值 \pm 标准误（mean \pm SEM）的形式表示。数据间的比较均采用 SPSS 18.0 统计分析软件进行双侧 t 检验。以 $P<0.05$ 为具有显著性差异， $P<0.01$ 为具有高度显著性差异，以 $P<0.001$ 为具有极高度显著性差异。

4.3 实验结果与讨论

小鼠心肌细胞离体分离培养结果如下：



(a) 心房肌细胞



(b) 心室肌细胞

图 4-2 成年小鼠心肌细胞分离结果

从图 4-2 中，我们可以清晰的观察到心肌细胞的形态。活性良好的心肌细胞成长条杆状，且能观察到清晰的肌纤维纹理，并且无自发性收缩。失去活性的心肌细胞则在视野中团成球状。其中，心房肌细胞与心室肌细胞的形态也存在一定差异。心房肌细胞程细而长的梭形，它的宽度相较于心室肌细胞更窄更细，且两端较尖。而心室肌

细胞则呈现为长柱型，其细胞宽度较心房肌细胞相对更宽，体积更大，截面更接近矩形。

4.3.1 心室及心房肌细胞的钙火花比较研究

在本次实验中，我们分别记录了 WT 和 CPVT 型小鼠心房与心室肌细胞钙火花的激光共聚焦线扫描图像。钙火花的典型图像如图 4-3。其中，我们记录了野生型小鼠心室肌细胞 55 个，在其上共检测到钙火花 386 个；野生型小鼠心房肌细胞 40 个，在其上检测到钙火花共计 1746 个；CPVT 小鼠心室肌细胞 54 个，其上共检测出钙火花 1192 个；CPVT 小鼠心房肌细胞共计 28 个，在其上共检测到钙火花 1356 个。

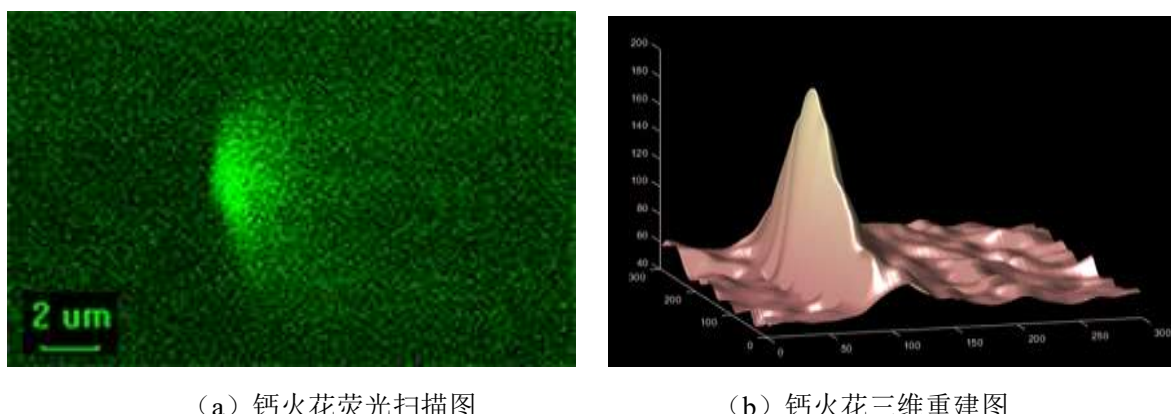


图 4-3 典型钙火花图像

在钙火花的幅度方面，如图 4-4(a)所示，在心室肌细胞中野生型小鼠的钙火花幅度略低于 CPVT 型小鼠的钙火花幅度 (0.71 ± 0.02 vs 0.76 ± 0.011 ，单位 $\Delta F/F_0$ ， $P < 0.05$)。二者之间绝对值虽然相差不大，但仍存在显著性差异。相比较而言，在心房肌细胞中的钙火花幅度相差更大，野生型小鼠的心房肌细胞钙火花幅度 ($\Delta F/F_0$) 显著高于 CPVT 型小鼠的心房肌细胞钙火花幅度 (1.18 ± 0.022 vs 1.04 ± 0.013 ，单位 $\Delta F/F_0$ ， $P < 0.001$)。且两种类型小鼠的心房肌细胞钙火花幅度均显著性大于心室肌细胞的钙火花幅度 ($P < 0.001$)。

从钙火花的横向大小尺度上来看，如图 4-4(b)所示，野生型小鼠和 CPVT 型小鼠的心室肌细胞钙火花宽度大小相近 (2.62 ± 0.051 vs 2.69 ± 0.035 ，单位 μm)，二者不存在显著性差异。但在心房肌细胞中，野生型小鼠的心房肌细胞钙火花宽度显著高于 CPVT 型小鼠的心房肌细胞钙火花宽度 (2.86 ± 0.036 vs 2.41 ± 0.027 ，单位 μm ， $P < 0.001$)。同时，在野生型和 CPVT 型两种小鼠的心房与心室钙火花宽度之间均存在显著性差异 ($P < 0.001$)，其中，野生型小鼠的心房肌细胞钙火花宽度显著高于心室肌细胞的，而 CPVT 型小鼠则正好相反，其心室肌细胞钙火花宽度显著高于心房肌细胞。

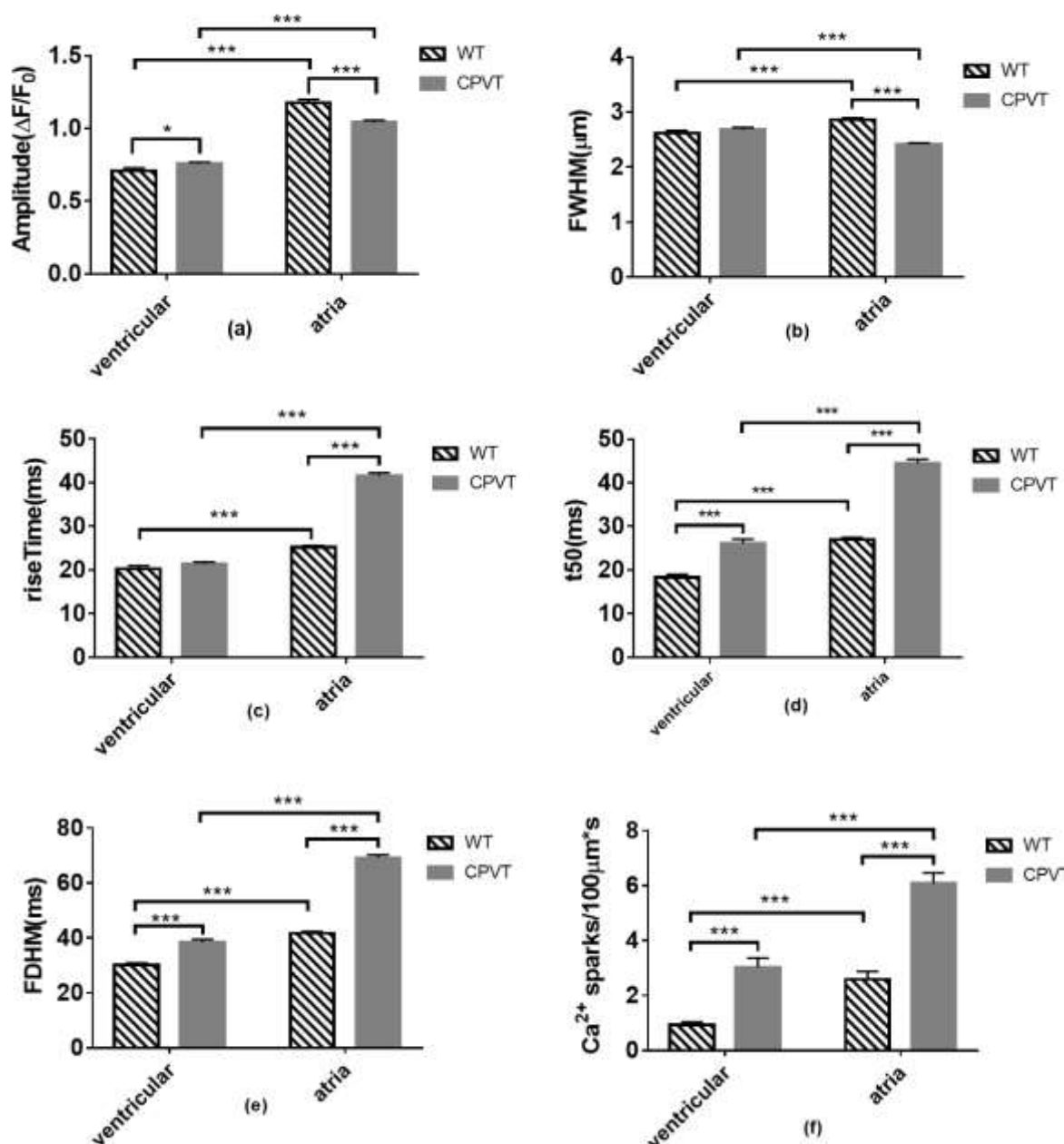


图 4-4 心室与心房肌细胞钙火花在正常与病理情况下的特征参数 (a) 心室与心房肌细胞钙火花幅度比较 (b) 心室与心房肌细胞钙火花半高全宽比较; (c) 心室与心房肌细胞钙火花上升时间比较; (d) 心室与心房肌细胞钙火花半衰时间比较; (e) 心室与心房肌细胞钙火花半高全时长比较 (f) 心室与心房肌细胞钙火花频率比较 (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$)

在时间尺度上, 心房与心室肌细胞的钙火花之间也表现出了显著性差异 ($P < 0.001$)。如图 4-4(c)所示, 从峰值上升时间来看, 野生型小鼠和 CPVT 型小鼠的心室肌细胞钙火花上升到峰值的时间相近 (20.29 ± 0.68 vs 21.37 ± 0.45 , 单位 ms), 其中野生型小鼠的峰值上升时间略低于 CPVT 型小鼠, 但二者之间不存在显著性差异 ($P = 0.185$)。但在心房肌细胞中, 二者存在显著性差异, 野生型小鼠的峰值上升时间显著性低于 CPVT 小鼠的心房钙火花峰值上升时间 (25.18 ± 0.41 vs 41.57 ± 0.68 , 单位 ms, $P < 0.001$)。另外, 两种类型小鼠心室肌细胞的钙火花峰值上升时间均小于心房

肌细胞 ($P<0.001$), 但是野生型小鼠的心室肌与心房肌细胞钙火花峰值上升时间之间的差异明显要小于 CPVT 型小鼠。

在钙火花的衰减时间尺度上, 我们可以从幅度下降到峰值一半的半衰时间 t_{50} 以及幅度从上升相上升到峰值一半到衰减相衰减至峰值一半的整段时间 FDHM, 被认为是钙火花在时间尺度上的大小标准。这两个时间尺度上的参数在野生型和 CPVT 小鼠的心房及心室肌细胞中表现出了相似的关系。其中, 如图 4-4(d)所示, 在心室肌细胞中, 野生型小鼠的 t_{50} 和 FDHM 都显著低于 CPVT 小鼠 ($P<0.001$); 在心房肌细胞中, 野生型小鼠的钙火花半衰时间同样显著低于 CPVT 小鼠 (26.92 ± 0.55 vs 44.47 ± 0.93 , 单位 ms, $P<0.001$)。同时, 两种小鼠的心房肌细胞钙火花半衰时间均显著高于心室肌细胞 ($P<0.001$)。

同样的, 如图 4-4(e)所示, 野生型小鼠的心室肌细胞钙火花半高全时长 FDHM 显著低于心房肌细胞的钙火花 FDHM (30.05 ± 0.87 vs 41.69 ± 0.68 , 单位 ms, $P<0.001$)(), 同时也显著低于 CPVT 小鼠的心室肌细胞钙火花 FDHM (38.50 ± 1.01 ms)。而 CPVT 小鼠的心房肌细胞钙火花 FDHM (69.14 ± 1.07 ms) 值为最大, 与其余三个值都表现出了极高的显著差异性 ($P<0.001$)。

通过对比这些钙火花的统计结果, 我们发现, 野生型小鼠的自发性钙火花发生频率在心房肌细胞中显著高于在心室肌细胞中的发生频率 (2.59 ± 0.29 vs 0.92 ± 0.12 , 单位 Ca^{2+} sparks/ $100\mu\text{m/s}$, $P<0.001$)。对于 CPVT 小鼠也有类似的结论, 即心房肌细胞的钙火花发生频率显著高于心室肌细胞的钙火花发生频率 (6.08 ± 0.38 vs 3.03 ± 0.34 , 单位 Ca^{2+} sparks/ $100\mu\text{m/s}$, $P<0.001$)。此外, CPVT 型小鼠的心肌细胞钙火花发生频率无论是在心房肌细胞还是心室肌细胞中都显著高于野生型小鼠 ($P<0.001$)。

在这一节中, 我们发现心房肌细胞的钙火花特征与心室肌有明显区别。野生型心房肌钙火花频率比心室显著更高, 表明在心房肌细胞中, 基础肌浆网钙泄漏相比于心室更多一些。在 CPVT 模型上, 两者都有提升, 但心房肌保持更高。以往的研究表明, 当钙泄漏达到一定程度时, 会影响钙库的钙含量^[65]。从 CPVT 小鼠心房肌钙火花幅度明显小于 WT 组, 说明其钙库的钙含量受到钙泄漏的影响出现下降, 但在心室上这种影响并不明显。此外, 峰值上升时间与 RyR2 通道整体开放时间相关, 而衰减时间与该通道簇的协调关闭相关。从峰值上升时间还是衰减时间来看, CPVT 突变使得心房肌细胞 RyR2 受到的影响更大, 其开放时间延长, 而释放位点的多个 RyR2 通道关闭时间不一致, 使得细胞功能更易失调。总体来看, 心房肌钙信号受到 CPVT 突变影响比心室肌要更为明显, 这与以往报道的 CPVT 小鼠或病人心房在早期会出现病变相符^[66]。因此我们在这里使用上一节中开发的新参量来验证心房肌细胞中的钙泄漏。

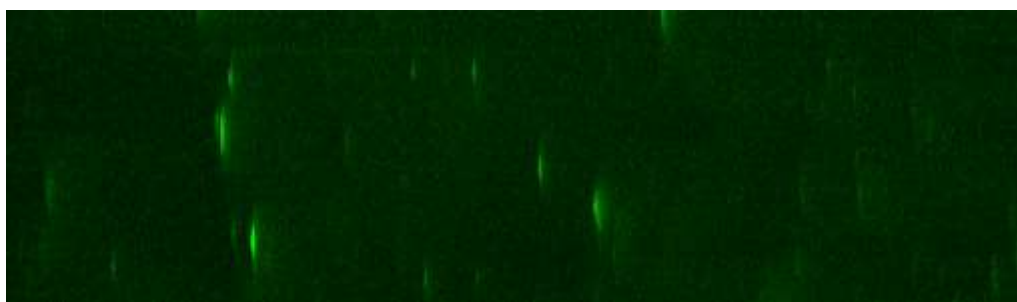


图 4-5 野生型（WT）小鼠心房肌细胞线扫描钙火花

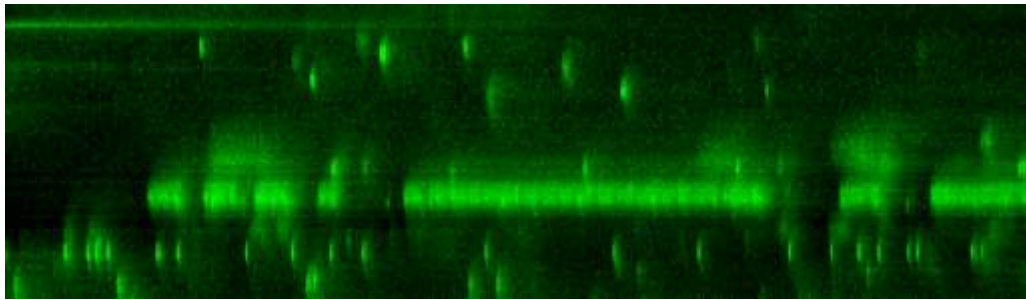


图 4-6 CPVT 小鼠心房钙火花线扫描图

我们使用获取的 CPVT 小鼠和 WT 鼠的心房肌细胞钙火花线扫描荧光图的幅度分布直方图计算流量偏差参量和荧光偏差参量，分别对 WT 型和 CPVT 小鼠进行对比，其结果记录在表 4-3 中，并绘图显示如下：

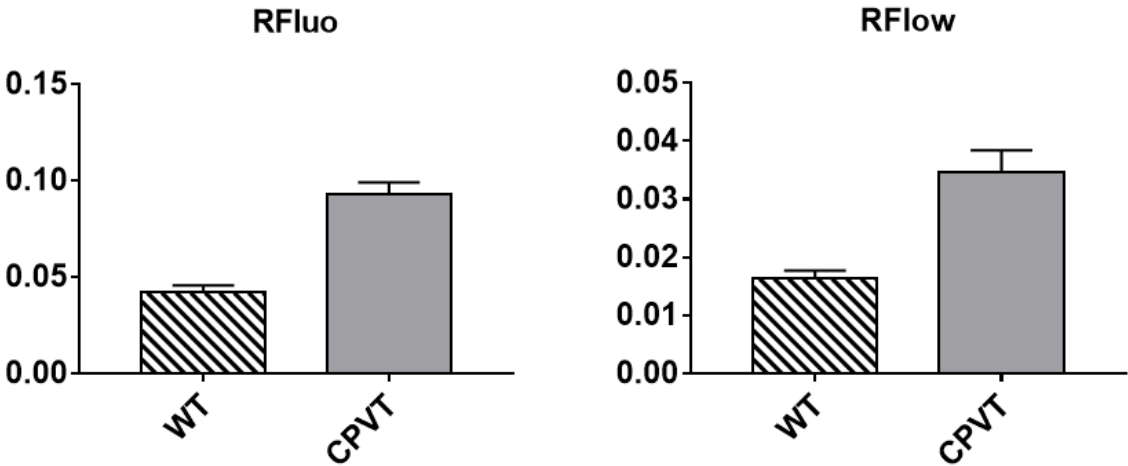


图 4-7 CPVT 小鼠与 WT 野生型小鼠心房肌细胞钙泄漏对比图（a）野生型与 CPVT 型小鼠心房肌细胞 Rfluo 对比；（b）野生型与 CPVT 型小鼠心房肌细胞 Rflow 对比（*** P<0.001）

从数据中我们可以得出，CPVT 小鼠在肌浆网中释放的钙信号的总体体量(Rfluo)和流经 RyR2 的钙电流总和（Rflow）上都比 WT 小鼠增加了 1 倍以上。这一结果能够有效证明，在 CPVT 模型小鼠的心房肌细胞中，肌浆网钙泄漏显著上升。

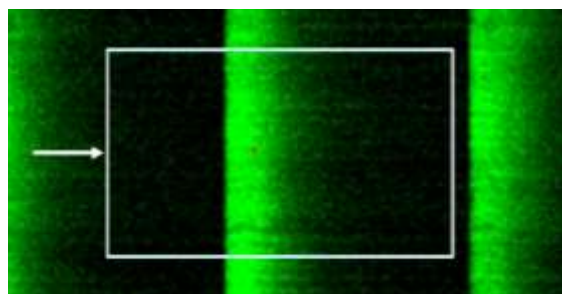
表 4-3 野生型和病理模型小鼠钙泄漏情况（mean±SEM）

	WT	CPVT	P 值
Rfluo	0.042±0.004	0.093±0.006	<0.001
Rflow	0.016±0.001	0.035±0.004	<0.001

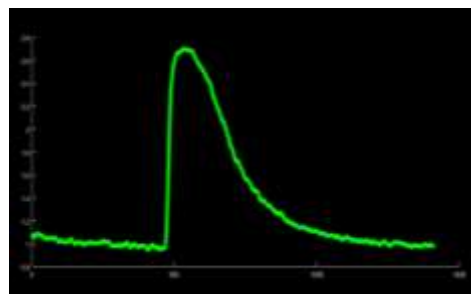
4.3.2 心室及心房肌细胞的钙瞬变比较研究

在本节中，我们分别记录了 WT 和 CPVT 型小鼠心房与心室肌细胞在电压强度 10V，

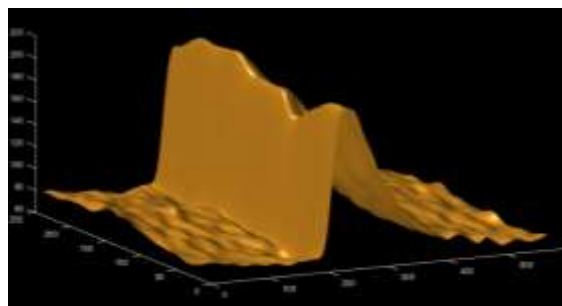
频率为 1Hz 的持续电刺激下产生的规律性钙瞬变的激光共聚焦线扫描图像。本节中，我们共检测野生型小鼠心房肌细胞 83 个，其上共检测到钙瞬变 747 个；检测野生型小鼠心室肌细胞 105 个，其上有效钙瞬变 1090 个；CPVT 小鼠心房肌细胞 132 个，在其上检测到钙瞬变 1391 个；CPVT 小鼠心室肌细胞 72 个，其上检测到的钙瞬变共 706 个。钙瞬变的典型图像如图 4-8。



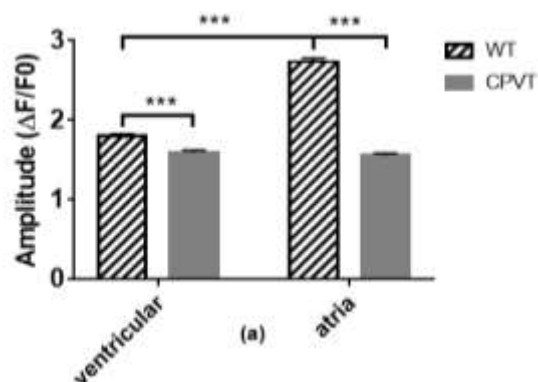
(a) 钙瞬变线扫描下的荧光图像



(b) 选中的钙瞬变荧光强度-时间图像



(c) 选中的钙瞬变三维重建图像



(d) 心室与心房肌细胞钙瞬变幅度比较 (***) $P < 0.001$

图 4-8 典型的钙瞬变图像

通过对比钙瞬变的全部统计结果，如图 4-8 (d) 所示，我们发现，钙瞬变在野生型小鼠心房肌细胞中的幅度显著高于其在心室肌细胞中的幅度 (2.73 ± 0.046 vs 1.80 ± 0.025 , 单位: $\Delta F/F_0$, $P < 0.001$)。但在 CPVT 型小鼠中并没有类似的关系，CPVT 小鼠的心房肌细胞钙瞬变幅度与心室肌细胞中的钙瞬变幅度 (1.55 ± 0.029 vs 1.59 ± 0.028 , 单位: $\Delta F/F_0$) 相当，没有显著性差异。于此同时，无论是在心房肌细胞还是心室肌细胞中，CPVT 型小鼠的钙瞬变幅度都要显著低于野生型小鼠 ($P < 0.001$)，且在心房肌细胞当中其二者的差异更大。

我们知道，钙瞬变是全局性钙离子释放通道全部打开，同时释放钙离子的过程。因此，钙瞬变的幅值常常与肌浆网内的钙离子含量有关。在前面的钙火花研究当中，我们通过观察到的 CPVT 小鼠心房肌细胞钙泄漏升高，来判断 CPVT 小鼠心房肌细胞的肌浆网钙含量可能较低。在钙瞬变研究中，这一结论的也得到证实，即与野生型小鼠相比，CPVT 小鼠的心房肌细胞钙瞬变幅值显著降低，说明其肌浆网钙含量在 RyR2-R2474S 基因突变的作用下而有所降低。

4.3.3 心室及心房肌细胞的钙波比较研究

在本节中，我们分别记录了 WT 和 CPVT 型小鼠心房与心室肌细胞的自发性钙波

的激光共聚焦线扫描图像。我们共检测野生型小鼠心房肌细胞 6 个，其上共检测到钙波 11 个；检测野生型小鼠心室肌细胞 14 个，其上有效钙波 20 个；CPVT 小鼠心房肌细胞 5 个，在其上检测到钙波 11 个；CPVT 小鼠心室肌细胞 11 个，其上检测到的钙波共 17 个。我们观察到的钙波的典型图像如图 4-10。

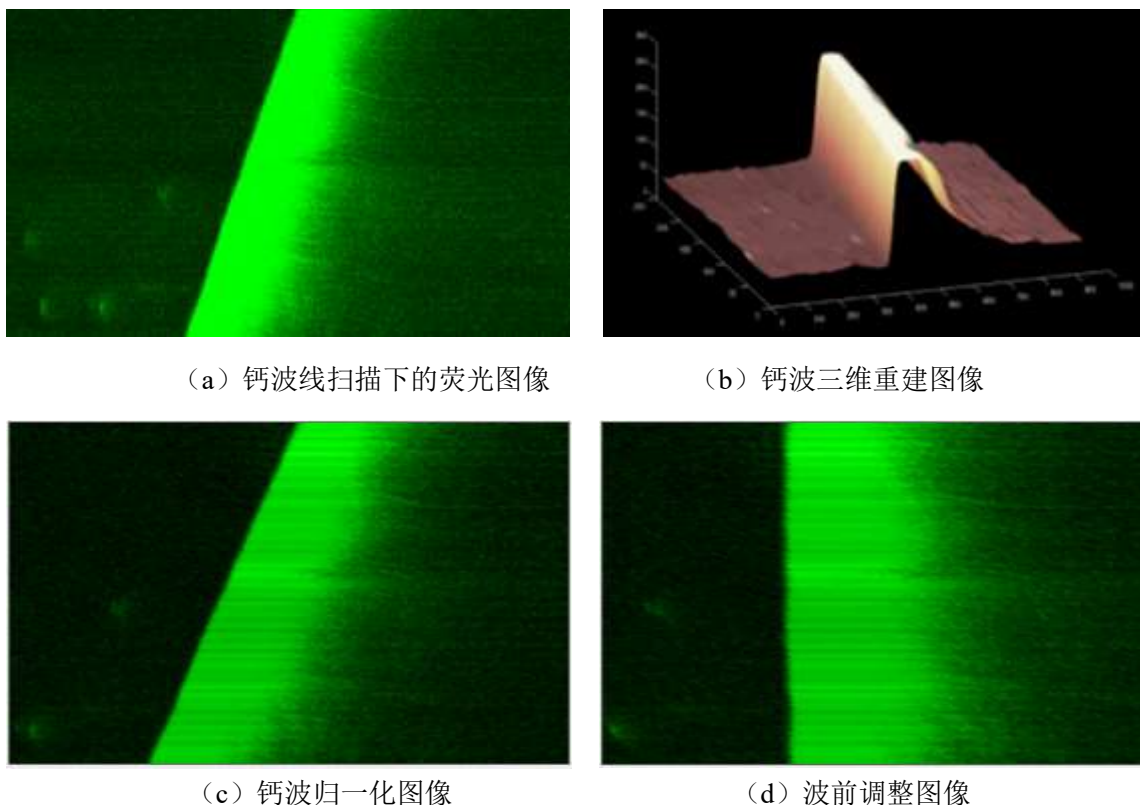


图 4-10 典型的钙波图像

如图 4-11 (a)，从统计结果中可以看到，在钙波的峰值上，钙波在野生型小鼠心房肌细胞中的幅度显著高于其在心室肌细胞中的幅度 (3.55 ± 0.41 vs 2.19 ± 0.28 ，单位： $\Delta F/F_0$ ， $P < 0.05$)。在 CPVT 型小鼠中，我们也可以看到，CPVT 小鼠的心房肌细胞钙波幅度同样略高于心室肌细胞中的钙波幅度，但其差异的显著性没有野生型小鼠那么强 (2.50 ± 0.23 vs 1.86 ± 0.28 ，单位： $\Delta F/F_0$ ， $P = 0.87$)。于此同时，无论是在心房肌细胞还是心室肌细胞中，CPVT 型小鼠的钙瞬变幅度都要稍微低于野生型小鼠，且在心房肌细胞当中其二者的差异更显著 ($P = 0.061$)。

从时间尺度上看，如图 4-11 (b)，钙波的传播速度在四种细胞中均没有显现出明显的差异性。在野生型小鼠中，钙波在心房肌细胞中的传播速度最低，在心室肌细胞中的传播速度略高于心房肌细胞 (94.83 ± 6.45 vs 76.55 ± 9.73 ，单位： $\mu\text{m/s}$)。而在 CPVT 型小鼠中，钙波在心室肌细胞中的传播速度与在心房肌细胞中的传播速度 (100.11 ± 6.38 vs 97.48 ± 12.09 ，单位： $\mu\text{m/s}$) 近乎一致。同时对比野生型和 CPVT 型小鼠，其钙波的传播速度也不具有显著性差异。

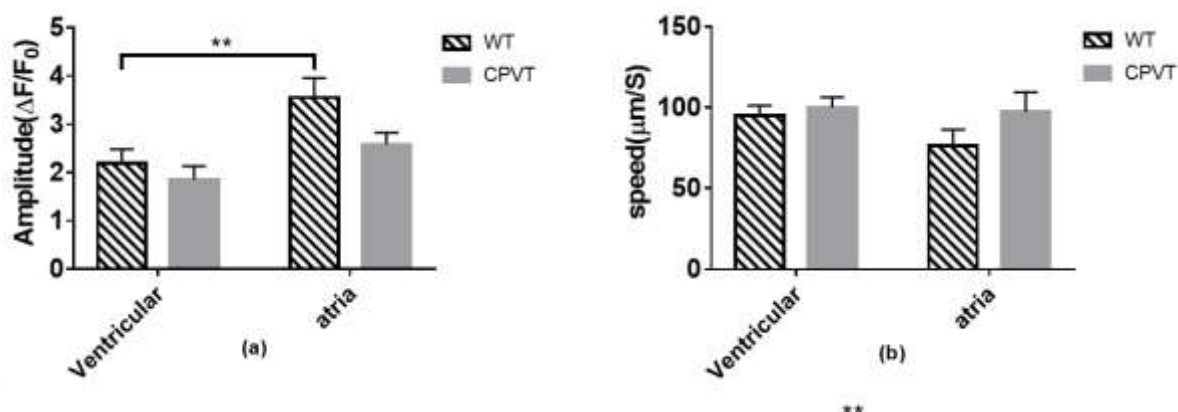


图 4-11 心室与心房肌细胞钙波在正常与病理情况下的特征参数比较 (a) 心室与心房肌细胞钙波幅度比较; (b) 心室与心房肌细胞钙波波速比较 (** $P < 0.01$)

钙波的幅度性质与钙瞬变相类似, 也与钙库含量正相关。CPVT 小鼠心房肌细胞钙波幅度的显著降低与我们在钙瞬变的讨论中获得的肌浆网钙负载量降低相一致。此外, 钙波由于体现的是 RyR 通道之间的相互传递, 因此其传播速度也是重要的生理指标之一。其中传播波速速度与 RyR2 通道的敏感性、胞浆钙浓度、以及钙库含量均成正相关。这里影响钙波传播速度的胞浆钙离子浓度变化是由钙波的幅度, 即钙波发生期间钙离子的释放量决定的, 而胞浆钙离子浓度又会反过来影响 RyR 通道的敏感性。因此, 在胞浆和钙库钙浓度下降的情况下, CPVT 小鼠心房肌细胞的钙波速度不变, 说明其 RyR2 通道的敏感性大大提升。

4.3.4 结果讨论

从上述结果中我们可以明显看到, 心房与心室肌细胞内的钙离子调控存在着显著性差异, 并且 CPVT 致病基因突变的加入会对心房和心室肌细胞产生不同的影响。

首先在钙火花中, 我们可以看到野生型小鼠心房肌细胞相比于心室肌细胞会产生更大、更多的钙火花。其钙火花发生频率更高, 每个钙火花幅值更大, 持续时间也 longer。这一差异在时间及幅度尺度上较为明显, 尤其是在衰减相上。但在空间尺度上, 心房肌细胞与心室肌细胞钙火花的宽度差异则相对较小。从中我们可以推测, 心房肌细胞与心室肌细胞在相比, 在产生钙火花时的钙离子释放速率更高, RyR 通道的开放概率更高, 但并没有同时开放更多的 RyR 通道。通过野生型和 CPVT 小鼠的比较我们可以发现, CPVT 小鼠的心肌细胞钙火花发生频率显著提高。在幅度及空间尺度上, CPVT 突变基因对心室肌细胞的钙火花产生了有限的影响, 而对心房肌细胞钙火花的影响则更为明显。总的来看, CPVT 小鼠相较于野生型会产生更小、更多的钙火花。在时间尺度上看 CPVT 对心房和心室肌细胞的影响更为明显, CPVT 突变基因显著延长了心房肌细胞钙火花的峰值到达时间, 这预示着更持久的 RyR 通道开放; 而 CPVT 小鼠心房肌细胞钙火花在幅度更小情况下拥有更长的半衰时间, 这也预示了心房肌细胞中更低的由 SERCA 主导的钙回收效率。另外, 我们还证实了心房肌细胞在 CPVT 小鼠中钙泄漏的增加, 这是因为其幅度更高频率更强的钙火花导致的。

在钙瞬变中，我们观察到野生型小鼠的心房肌细胞钙瞬变比心室肌细胞的钙瞬变幅度更高，持续时间也 longer。这与我们所知的心房肌细胞的结构有关。T 管的缺失导致兴奋信号不能很快的从细胞膜上传递到整个细胞内部，而靠钙离子在心房细胞内的扩散来传递信号，就造成了钙瞬变上升时间的显著延长。此外由于钙瞬变是受调控的整体性钙离子释放，其幅度反映出了与心肌细胞兴奋收缩偶联相关的钙离子通道活性。已有许多研究表明，钙瞬变信号的变化与心血管疾病密切相关，如心肌肥大的细胞会产生幅度更高的钙瞬变^[68]。在相同条件下钙瞬变幅度与心肌细胞的收缩能力成正比。因此更低的钙瞬变幅度可能会影响心肌细胞的肌肉收缩效果。CPVT 小鼠的心房肌钙瞬变幅度大幅下降，说明其收缩能力受到很大影响，很可能会造成房颤等心律失常疾病的发生。

对于钙波而言，野生型小鼠的心房肌细胞钙波幅度要显著高于心室肌细胞，但钙波的传播速度和每个释放位点出荧光强度上升到峰值的时间并没有显著差异性。由于钙波幅度所导致的胞浆钙离子浓度变化对传播速度同样产生影响，因此我们认为幅度更低但速度一致的 CPVT 小鼠心房肌细胞的 Ry 如通道敏感性大大增加，此时的心肌细胞在受到刺激时更易出现钙波，即也更容易诱发非生理性的细胞收缩。

综合以上结果，我们可以得出结论：虽然 RyR2-R2474S 基因突变模型的主要表型是室性心律失常，但在细胞层面，其对心房肌细胞的 RyR2 功能产生的影响或比在心室肌细胞更为显著。因此，虽然心房的生理功能不如心室那样直接而明显，但心房肌细胞由于结构等因素的差异，并不如心室肌细胞耐病理性冲击的能力强，因此许多心血管疾病可能在心室肌产生病理性症状前就已经对心房肌细胞产生了显著影响。因此在疾病的早期阶段，通过检测心房肌细胞的活动可能比心室肌细胞的相关检测更能作为心脏疾病早期的诊断标志。

4.4 本章小结

在本章中，我们首先介绍了心肌细胞内的钙信号与心血管疾病的关系，以及心室肌细胞和心房肌细胞的差异。其中提到的钙信号包括心肌细胞钙释放的基本单元钙火花、由钙火花受到调控统一发生所形成的钙瞬变以及钙火花之间相互传递所形成的钙波。这三种钙信号都是心肌细胞内钙泄漏的主要发生形式，与心血管疾病的发生均有着密切的关系。随后我们使用野生型(WT)和患有儿茶酚胺敏感性室性心动过速(CPVT)的病理模型小鼠的心室与心房肌细胞分别设计实验，并详细记述了使用实时荧光定量 PCR 技术鉴定小鼠基因型的实验过程，使用 Langendorff 灌流系统分离培养小鼠心肌细胞的方法以及使用激光共聚焦显微成像系统观察并记录细胞内钙信号的方法。

通过实验，我们分别观察并记录了野生型和 CPVT 小鼠心房与心室肌细胞中钙火花、钙瞬变和钙波三种钙信号，并对他们的特征参数进行了统计学分析。其中，对于钙火花，我们统计了其发生频率、幅度、半高全宽(FWHM)、峰值到达时间(t_{Rise})、半高全时长(FDHM)以及半衰时间(t_{50})这几个参数，同时还使用了上一章节中提出

的新方法描述了肌浆网的钙泄漏情况。对于钙瞬变，我们统计了其幅度的差异；对于钙波，除了幅度外我们还专门计算了它的传播速度。最后，我们对上述统计结果进行了分析讨论，从结果中我们发现，RyR2-R2474S 基因突变所导致的 CPVT 会使得心房肌细胞中肌浆网钙泄漏的增大，从而使得钙库的钙含量降低，其原因可能是自发性钙火花幅度和频率的增加，在群体性钙活动的表观上结果则表现为钙瞬变和钙波幅度的降低。进而得出了 RyR 突变导致的 CPVT 对心房肌细胞的影响程度高于心室肌细胞的结论，同时对心房肌细胞与心血管疾病的关系进行了讨论。

5 结论与展望

钙离子是心肌细胞内最重要的第二信使，直接参与并调控着心肌细胞从接收神经电兴奋信号到心肌细胞的兴奋收缩偶联，实现心脏收缩泵血的整个过程。在这个过程中，钙离子进出细胞膜与细胞器膜，与钙离子结合蛋白的链接与解离等过程都受到精密的调控，将细胞内的钙离子稳态维持在一个合理的范围。而心肌细胞内钙稳态的失调会严重影响整个心肌细胞的生理活动。因此，心肌细胞内的钙离子活动一直是科研人员的研究热点。。

5.1 本文成果

为了解决研究过程中钙信号检测精度不稳定、检测较多数据时需耗费大量精力等现实问题，本文首先开发了钙信号全自动检测分析软件。本软件是基于 IDL 平台开发的。IDL 作为一种交互式数据语言，语法简单，且基于矩阵进行运算，自带大量数学工具，能够很好的胜任图像及数据处理的目标需求。在分析了当前检测方法的优缺点后，本文对以钙火花为代表的钙离子特征信号检测方法中的图像背景去噪及归一化步骤进行了优化，将以往对整图去噪的方法变更为分行分段进行计算，再配合图像的均值平滑，很好的实现了去除图像中固定存在的背景噪声，实现了荧光信号的归一化。此外在钙火花的检测阶段，本软件优化了检测阈值的计算方法，使得软件能够更好更灵活的适用于不同状态下的钙火花检测，且都保持较高的检测精确度。另外，我们还在检测钙火花的基础上为软件扩充了钙波和钙瞬变的检测模式，方便使用者在研究过程中快速对检测过程进行切换，以适应多变的研究状况。钙火花、钙瞬变和钙波是常见的钙信号状态，因此对钙火花检测功能的扩充，极大的提高了软件的实用性，使得软件能更好的适配于更多的科研场合。

随后，我们基于现阶段对肌浆网钙泄漏与心血管疾病的研究现状，发开出了计算肌浆网钙泄漏的新方法，其中包括两个参量：荧光偏差参量 R_fluo 和流量偏差参量 R_flow 。该新参量是基于荧光图像的幅度分布直方图计算的，通过对直方图拟和估计噪声水平，再用原始信号减去噪声信号后归一化处理即可得到。因为本参量的计算方法跨过了钙火花检测步骤，直接计算整体钙离子释放量，因此避免了在钙火花探测过程中可能存在的检测误差，统一了不同人进行检测可能由于主观因素而带来的结果差异，也避免了阈值下较低幅度的钙离子释放难以被检测，同时避免了叠加大量钙火花所带来的数据处理上的复杂度。最后我们通过计算新参量与钙火花经典参量之间的相关性，证实了两个新参量在描述肌浆网钙泄漏能力上的有效性。

最后，我们使用此软件对心房与心室肌细胞的钙信号的特征进行了比较和分析。在这一部分中，我们选取了野生型和 CPVT 两种表现型的成年 C57 小鼠，分别取他们的心房与心室肌细胞进行观测，并记录下他们的钙火花、钙瞬变以及钙波三种典型钙

离子信号。文中详细阐述了转基因小鼠的基于实时定量荧光 PCR 技术的基因型鉴定实验方法以及基于 Langendorff 离体灌流的小鼠心肌细胞分离与培养的实验方法。对实验中获取的两种小鼠的两种细胞中三种不同钙信号进行了归类整理, 并按照钙火花、钙瞬变、钙波的顺序对他们各自的特征参数进行了相互比较。在统计结果中我们可以看到, 对于钙火花而言, 心房肌细胞释放出的钙火花相较于心室肌细胞而言频率更高, 且幅度更强, 时间相关参数也有相应的延长。野生型小鼠的心房与心室肌细胞钙火花之间这一关系在基因突变型小鼠中被强化, 心房与心室差异更明显, 这代表了 CPVT 小鼠心房肌细胞钙泄漏的增加。另外在钙瞬变和钙波的特征参数比较中, 我们发现野生型小鼠的心房钙瞬变和钙波的幅度均高于心室, 而在 CPVT 小鼠中这一关系不复存在。因此我们得出结论, 虽然 RyRr2474s/+ 基因突变模型已被认为是儿茶酚胺敏感性室性心动过速的病因之一, 但这一基因突变对心房肌细胞的 RyR2 功能也产生了显著影响, 严重降低了心房肌细胞的肌浆网钙库的钙含量。这预示着心房肌细胞的病理表现可能可以作为心室细胞病理发生的前端信号, 为心血管疾病的早期诊断带来新思路。

5.2 展望

本文中仍存在许多值得优化和改进的地方。

首先, 在该信号全自动检测软件的设计方面, 由于时间等因素的限制, 本软件只设计了三种常见钙信号的检测模式, 而对其他类型钙信号没有涉及。此外, 在用户图形界面的设计和操作流程上也可以继续优化, 以降低操作者的学习成本, 使得各项功能更为直观, 软件更易于使用。因此在未来本软件还存在很大的优化、迭代空间。

其次, 对于新开发的肌浆网钙泄漏研究方法, 本文只介绍了其计算方法及验证其有效性, 并没有将其应用到尚待解决的研究中。为这一新参量开发出新的使用场景也将是本课题的前进方向。

最后, 在对于钙瞬变和钙波的研究中, 本文只涉及到了对其表观特征参数的比较, 而没有涉及这两种钙信号中更微观的结构和更深层次的造成表观现象的原因。我们只分析到 RyR2-R2474S^{+/+} 基因突变对心房肌细胞的钙库钙负载也产生重要影响, 但没有研究 SERCA 等离子通道介导下对钙离子的外排与回收对钙瞬变与钙波的影响。这也是未来还可以继续研究的方向。

致 谢

直到走到了这一步，我才终于有了快要毕业的真实感。一转眼，我就在这个校园里度过了七年的时光。即将离开我的母校和恩师，离开父母和伙伴，即将启程踏上只有一个人前行的路，此刻我内心百感交集。在校的这么一段悠悠岁月里，我在各个方面都成长了很多，这一切都离不开老师和同学们的帮助。

首先我要感谢我的导师谢文俊老师在我三年研究生生涯中给予我全方面的指导与帮助。谢老师在学术科研问题上态度认真严谨，思维细致缜密，但在生活上细心周到，和蔼可亲。谢老师不仅拥有渊博的知识储备，广阔的科研视野，同时还具备极强的执行力，并持续多年始终保持高昂的科研热情。这一切的一切都是我学习的典范，不仅是科研上的明灯，也是人生路上的指向标。我特别要感谢谢老师在我三年的研究生生涯中对我的包容和谅解，在我犯错时的积极鼓励，在我不懂时的悉心指导。老师对科研工作的热忱和对学生的关怀一直深深影响着我，感染着我，让我期待未来也能像老师一样找到一份自己热爱的事业去奋斗。

其次我要感谢在我研究生期间一直给予帮助和指导的老师和同学。感谢张伊老师，老师在科研上表现出的极致的严谨和努力让我明白了做科研应有的状态和一名保持蓬勃热情的科研人员的最好面貌。同时在生活上小张老师又和学生像朋友般相处，关怀着学生，在多个方面给予了帮助和指导。在这三年能遇到老师是我的幸运。同时我也要感谢实验室的戚瑛、李晶晶师姐在我科研上的帮助。感谢师姐们对我的包容和体谅，一次一次不厌其烦的带我做实验，为我的科研生涯提供了亲切的指导与帮助。

另外也要特别感谢教研室的王晓霓、刘彬彬、谢琳师姐在我科研与生活中对我的关怀。她们都比我年长许多，在我遇到很多生活中的选择性难题时，师姐们从她们的角度和人生经验中认真的向我提出了宝贵的意见。教研室的空间作为在校生活中我待的比宿舍还多的地方，我由衷的感谢晓霓师姐和彬彬师姐给我带来的实际上的帮助和情感上的陪伴。

另外我还要特别感谢舍友徐若冰在生活上对我的支持和帮助，在迷茫时对我的鼓励，总能在我在情绪不稳定的时候给予我的温柔和陪伴，这些都是我研究生生涯里闪耀着的光。饼饼有时候就像是软软的床垫让你放心依靠，有时候又像是个小太阳，总能带给你光和热。我的研究生生活因为饼饼的存在变得更加美好。还要感谢舍友郭蕊，这是我们做舍友的第七年，这个一直睡在我对面总和我一样晚睡的姑娘和我们之间那些深夜熨帖的话题是我这漫长的七年中不可忽略的组成成分。还要感谢舍友燕塞塞，赛赛就像是一个什么都知道的万事通小精灵，有什么新通知什么小消息问赛赛一定可以知道。赛赛总是能在意想不到的地方给人惊喜。

我还要感谢我的好朋友姚雨墨。这已经是我们做朋友的第十年了。她是我认识的最温柔最善良又正直的孩子，她做什么都很努力，她永远也都知道自己要的是什么。她一

直是我心里的标杆，是我重要的精神支柱。无数次彻夜的长谈陪我走过了一个人走不尽的迷茫，给了我很大的力量。感谢这些朋友们在我生活上给我的帮助。在他们的关怀下我才走到了今天。希望在未来的所有日子里，我们依旧能为彼此提供肩膀。祝愿她们未来也一切平安顺遂。

最后还要感谢我的父母。他们为我提供了良好的生活条件，让我有机会能尝试自己想尝试的事情，对我做的决定大多数支持，并且尽他们可能的提供帮助。愿父母在未来也能够永远健康。

最后还是要感谢母校，感谢这个承载了我七年欢笑和泪水的地方。感谢清晨第一抹阳光撒进的图书馆，感谢深夜安静的教研室，感谢树叶绿了又黄的梧桐道，感谢食堂总要排队的豆浆和油条。

愿我今后能为世界之光。

参考文献

- [1] 胡盛寿, et al., Summary of the 2018 Report on Cardiovascular Diseases in China[J] 《中国心血管病报告2018》概要.中国循环杂志, 2019. 034(003): p. 209-220.
- [2] 赵志梅, et al., 中国中老年人自评健康与心血管疾病发病风险的关联分析[J].中华预防医学杂志, 2020. 54(02): p. 149-154.
- [3] Bers, D.M., Cardiac excitation-contraction coupling[J]. Nature, 2002. 415(6868): p. 198-205.
- [4] Endoh, M., Cardiac Ca^{2+} signaling and Ca^{2+} sensitizers[J]. Circ J, 2008. 72(12): p. 1915-25.
- [5] Cuello, F., et al., Protein kinase D selectively targets cardiac troponin I and regulates myofilament Ca^{2+} sensitivity in ventricular myocytes[J]. Circulation Research, 2007. 100(6): p. 864-873.
- [6] Fatt, P. and B. Katz, The Electrical Properties of Crustacean Muscle Fibres[J]. Journal of Physiology-London, 1953. 120(1-2): p. 171-&.
- [7] Bean, B.P., Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology[J]. J Gen Physiol, 1985. 86(1): p. 1-30.
- [8] Nilius, B., et al., A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells[J]. Nature, 1985. 316(6027): p. 443-6.
- [9] Hagiwara, S. and S. Nakajima, Differences in Na and Ca Spikes as Examined by Application of Tetrodotoxin Procaine and Manganese Ions[J]. Journal of General Physiology, 1966. 49(4): p. 793-&.
- [10] Vassort, G., K. Talavera, and J.L. Alvarez, Role of T-type Ca^{2+} channels in the heart[J]. Cell Calcium, 2006. 40(2): p. 205-20.
- [11] Perez-Reyes, E., J.H. Lee, and L.L. Cribbs, Molecular characterization of two members of the T-type calcium channel family[J]. Ann N Y Acad Sci, 1999. 868: p. 131-43.
- [12] Dolphin, A.C. and A. Lee, Presynaptic calcium channels: specialized control of synaptic neurotransmitter release[J]. Nat Rev Neurosci, 2020. 21(4): p. 213-229.
- [13] DelPrincipe, F., M. Egger, and E. Niggli, Calcium signalling in cardiac muscle: refractoriness revealed by coherent activation[J]. Nat Cell Biol, 1999. 1(6): p. 323-9.
- [14] Franzini-Armstrong, C., F. Protasi, and V. Ramesh, Shape, size, and distribution of Ca^{2+} release units and couplons in skeletal and cardiac muscles[J]. Biophys J, 1999. 77(3): p. 1528-39.
- [15] Bers, D.M. and E. Perez-Reyes, Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release[J]. Cardiovasc Res, 1999. 42(2): p. 339-60.
- [16] Shen, J.X., et al., Polymorphism of Ca^{2+} sparks evoked from in-focus Ca^{2+} release units in cardiac myocytes[J]. Biophys J, 2004. 86(1 Pt 1): p. 182-90.
- [17] Sarbjit-Singh, S.S., H.R. Matthews, and C.L. Huang, Ryanodine receptor modulation by caffeine challenge modifies Na^{+} current properties in intact murine skeletal muscle fibres[J]. Sci Rep, 2020. 10(1): p. 2199.
- [18] Bennett, J.A., Y.C. Clancy, and J.D. McNeish, Identification and characterization of the murine FK506 binding protein (FKBP) 12.6 gene[J]. Mamm Genome, 1998. 9(12): p. 1069-71.
- [19] Mizuno, K., K. Kurokawa, and S. Ohkuma, Dopamine D1 receptors regulate type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression via both AP-1- and NFATc4-mediated transcriptional processes[J]. J Neurochem, 2012. 122(4): p. 702-13.
- [20] Taylor, C.W., A.A. Genazzani, and S.A. Morris, Expression of inositol trisphosphate receptors[J]. Cell Calcium, 1999. 26(6): p. 237-51.
- [21] Mangla, A., M.T. Guerra, and M.H. Nathanson, Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: A calcium channel for all seasons[J]. Cell Calcium, 2020. 85: p. 102132.

- [22] Ghosh, A. and M.E. Greenberg, Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences[J]. *Science*, 1995. 268(5208): p. 239-47.
- [23] Negretti, N., S.C. O'Neill, and D.A. Eisner, The relative contributions of different intracellular and sarcolemmal systems to relaxation in rat ventricular myocyte[J]. *Cardiovasc Res*, 1993. 27(10): p. 1826-30.
- [24] Anger, M., et al., In situ mRNA Distribution of Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Isoforms during Ontogeny in the Rat[J]. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 1994. 26(4): p. 0-550.
- [25] Lennon, N.J., C. O'Reilly, and K. Ohlendieck, Impaired Ca^{2+} -ATPase oligomerization and increased phospholamban expression in dilated cardiomyopathy[J]. *Int J Mol Med*, 2000. 6(5): p. 533-8.
- [26] Cannell, M.B., Contribution of sodium-calcium exchange to calcium regulation in cardiac muscle[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1991. 639: p. 428-43.
- [27] Rueda, A., D.R. de Alba-Aguayo, and H.H. Valdivia, Ryanodine receptor, calcium leak and arrhythmias[J]. *Arch Cardiol Mex*, 2014. 84(3): p. 191-201.
- [28] Lukyanenko, V., Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves in saponin-permeabilized rat ventricular myocytes[J]. *J Physiol*, 1999. 521.
- [29] Ridgway, E.B. and C.C. Ashley, Calcium transients in single muscle fibers[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967. 29(2): p. 229-34.
- [30] Bonora, M., et al., Subcellular calcium measurements in mammalian cells using jellyfish photoprotein aequorin-based probes[J]. *Nature Protocols*, 2013. 8(11): p. 2105-2118.
- [31] Vay, L., et al., Mitochondrial free $[\text{Ca}^{2+}]$ levels and the permeability transition[J]. *Cell Calcium*, 2009. 45(3): p. 243-250.
- [32] Dinghui, Y., et al., Detection of calcium transients in Drosophila mushroom body neurons with camgaroo reporters[J]. *Journal of Neuroscience*, 2003. 23(1): p. 64-72.
- [33] Fonteriz, R.I., et al., Monitoring mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin[J]. *Cell Calcium*, 2010. 48(1): p. 61-69.
- [34] 漆德瑶 and 庄云龙, 钙离子选择性微电极的研制[J]. *分析化学*, 1985(01): p. 38-41.
- [35] 刘栋, et al., 氟代指示剂在核磁共振检测细胞内钙离子中的应用[J]. *化学工程师*, 2005(1): p. 43-45.
- [36] Tsien, R.Y., T. Pozzan, and T.J. Rink, Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator[J]. *Cell Biol*, 1982. 94(2): p. 325-34.
- [37] 董彦卿, IDL 程序设计: 数据可视化与 ENVI 二次开发[M]. 2012: 高等教育出版社.
- [38] Barbara and Hayes-Roth, An architecture for adaptive intelligent systems[J]. *Artificial Intelligence*, 1995.
- [39] Kruchten and P.B., The 4+1 View Model of architecture[M]. *IEEE Software*, 1995. 12(6): p. 42-50.
- [40] Lacampagne, A., et al., Time course of individual Ca^{2+} sparks in frog skeletal muscle recorded at high time resolution[J]. *Gen Physiol*, 1999. 113(2): p. 187-98.
- [41] Colucci, W.S., Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Failure[J]. *American Journal of Cardiology*, 1997. 80(11-suppl-S1): p. 15-25.
- [42] Brendorp, B., et al., QT Dispersion Has No Prognostic Information for Patients With Advanced Congestive Heart Failure and Reduced Left Ventricular Systolic Function[J]. *Circulation*, 2001. 103(6): p. 831-835.
- [43] Aizawa, Y., Arrhythmias in ischemic heart disease[J]. *Nihon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine*, 2011. 69 Suppl 9: p. 481.
- [44] Xin, H.B., et al., Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy[J]. *Nature*, 2002. 416(6878): p. 334-337.
- [45] Fadini, G.P., et al., Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity of

- diabetic vasculopathy[J]. 20 Jul 2006, 26(9):2140-2146
- [46] Shimizu, M., et al., Endothelial Lipase Gene Polymorphism is Associated With Acute Myocardial Infarction, Independently of High-Density Lipoprotein-Cholesterol Levels[J]. Circulation Journal Official Journal of the Japanese Circulation Society, 2007. 71(6): p. 842-846.
- [47] Shannon and R. T., Elevated Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Leak in Intact Ventricular Myocytes From Rabbits in Heart Failure[J]. Circulation Research, 2003. 93(7): p. 592-594.
- [48] Takamatsu, T. and W.G. Wier, Calcium waves in mammalian heart: quantification of origin, magnitude, waveform, and velocity[J]. FASEB Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1990. 4(5): p. 1519.
- [49] 唐爱辉, 王世强. 心肌细胞钙波随机性研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(8):892-898.
- [50] 陈熹. 心肌细胞内钙波的生物力学研究[D]. 2013..
- [51] Schlotthauer, K. and D.M. Bers, Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Release Causes Myocyte Depolarization : Underlying Mechanism and Threshold for Triggered Action Potentials. Circulation Research[J], 2000. 87(9): p. 774-780.
- [52] Ter Keurs, H.E.D.J. and P.A. Boyden, Calcium and Arrhythmogenesis[J]. Physiological Reviews, 2007. 87(2): p. 457-506.
- [53] Meli, A.C., et al., A novel ryanodine receptor mutation linked to sudden death increases sensitivity to cytosolic calcium[J]. Circ Res, 2011. 109(3): p. 281-90.
- [54] Bezzina, C.R., N. Lahrouchi, and S.G. Priori, Genetics of Sudden Cardiac Death[J]. Circulation Research, 2015. 116(12): p. 1919-1936.
- [55] Coumel, P., et al., Catecholaminergic-induced severe ventricular arrhythmias with Adams-Stokes syndrome in children: Report of four cases[J]. Heart, 1978. 40(Suppl.): p. 28-37.
- [56] Laitinen, P.J., H. Swan, and K. Kontula, Molecular genetics of exercise-induced polymorphic ventricular tachycardia: identification of three novel cardiac ryanodine receptor mutations and two common calsequestrin 2 amino-acid polymorphisms[J]. Eur J Hum Genet, 2003. 11(11): p. 888-91.
- [57] Werf, C.V.D. and A.A.M. Wilde, Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: from bench to bedside[J]. Heart, 2013. 99(7): p. 497-504.
- [58] 赖东武. 钙/钙调素依赖蛋白激酶 II_δ 基因敲除对心脏触发活动的影响及相关机制[D]. 浙江大学, 2010.
- [59] Laitinen, P.J., et al., Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia[J]. Circulation, 2001. 104(4): p. 69-69.
- [60] Priori S G, Napolitano C, Tiso N. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia[J]. Acc Current Journal Review, 2001, 10(4):69-0.
- [61] Bosch, C., et al., A novel variant in RyR2 causes familiar catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia[J]. Forensic Science International, 2017. 270: p. 173-177.
- [62] P érez-Riera, A.R., et al., Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, an update[J]. Annals of Noninvasive Electrocardiology, 2017: p. e12512.
- [63] Venetucci, L., et al., Inherited calcium channelopathies in the pathophysiology of arrhythmias[J]. Nature Reviews Cardiology, 2012.
- [64] Bassani, J.W., R.A. Bassani, and D.M. Bers, Calibration of indo-1 and resting intracellular $[\text{Ca}]_i$ in intact rabbit cardiac myocytes[J]. Biophys J, 1995. 68(4): p. 1453-60.
- [65] Shannon, T.R., et al., A mathematical treatment of integrated Ca dynamics within the ventricular myocyte[J]. Biophysical Journal, 2004. 87(5): p. 3351-3371.
- [66] Shan J, Xie W, Betzenhauser M, et al. Calcium Leak Through Ryanodine Receptors Leads to Atrial Fibrillation in 3 Mouse Models of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia[J]. Circulation Research, 2012, 111(6):708-717.

- [67] Wenjun Xie#, Gaetano Santulli#, Steven R. Reiken, Qi Yuan, Brent W. Osborne, Bi-Xing Chen, and Andrew R. Marks. Mitochondrial oxidative stress promotes atrial fibrillation[J]. Scientific Reports. 2015 Jul 14; 5:11427
- [68] Fadini, G. P . Number and Function of Endothelial Progenitor Cells as a Marker of Severity for Diabetic Vasculopathy[J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2006, 26(9):2140-2146.

攻读学位期间取得的科研成果

- [1] Stretch-induced sarcoplasmic reticulum calcium leak is causatively associated with atrial fibrillation in pressure-overloaded hearts, Yi Zhang, Ying Qi, Jing-Jing Li, Wen-Jin He, Xiao-Hang Gao, Yu Zhang, Xia Sun, Jie Tong, Jianbao Zhang, Xiu-Ling Deng, Xiao-Jun Du, Wenjun Xie. Cardiovascular Research, in Minor Revision (IF=7.014, 中科院医学 I 区, 生物与医学类最具影响力期刊)
- [2] 钙火花全自动分析系统 V1.0, 登记号: 2019SR0735497, 证书号: 软著登字第4156254号
- [3] 一种评价肌浆网钙泄漏的方法, 专利申请号: 201910707026.2

本人声明：所呈交的学位论文系在导师指导下本人独立完成的研究成果。文中依法引用他人的成果，均已做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

1. 交回学校授予的学位证书;

2. 学校可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报;

3. 本人按照学校规定的方式,对因不当取得学位给学校造成的名誉损害,进行公开道歉。

4. 本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

论文作者（签名）： 日期： 年 月 日

本人声明：研究生 所提交的本篇学位论文已经本人审阅，确系在本人指导下由该生独立完成的研究成果。

本人如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果：

1. 学校可在相关媒体上对本人的失察行为进行通报;

2. 本人按照学校规定的方式，对因失察给学校造成的名誉损害，进行公开道歉。

3. 本人接受学校按照有关规定做出的任何处理。

指导教师（签名）： 日期： 年 月 日

我们声明，我们提交的学位论文及相关的职务作品，知识产权归属学校。学校享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。学位论文作者离校后，或学位论文导师因故离校后，发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署各单位仍然为西安交通大学。

论文作者（签名）： _____ 日期： _____ 年 _____ 月 _____ 日

指导教师（签名）：_____ 日期：_____ 年 _____ 月 _____ 日

(本声明的版权归西安交通大学所有, 未经许可, 任何单位及任何个人不得擅自使用)