

# 异质生物网络的同步节律的实验研究\*

贾冰 古华光<sup>†</sup>

(同济大学航空航天与力学学院, 上海 200092)

(2012年6月11日收到; 2012年6月27日收到修改稿)

通过生物学实验研究了两个异质心肌细胞由独立到形成网络过程中的搏动节律随耦合强度的增加的动力学行为的变化。没有耦合时, 两个细胞的搏动节律是独立的, 没有同步的搏动。随着耦合强度的增加, 网络内的两个细胞搏动节律的相位差的绝对值的平均值和最大值急剧降低, 从非相位同步达到了相位同步, 但没有达到完全同步。逐次对比两个细胞的搏动, 非相位同步状态下只有部分搏动是同步的而其他搏动是不同的, 而相位同步状态下所有的搏动都是同步的。随着耦合强度的增加, 非相位同步状态下的同步搏动次数增加, 相位同步状态下的两细胞每次同步搏动的时间间隔降低但不为零。研究结果不仅给出了异质生物网络节律同步的实验例证, 还获得了网络的节律从不同步到同步过程的动力学规律。

**关键词:** 生物网络, 同步, 节律, 异质性

**PACS:** 05.45.Xt, 87.19.Hh, 87.18.Tt, 87.18.Hf

## 1 引言

同步是普遍存在于物理、化学乃至生命系统的自然现象<sup>[1–4]</sup>。生命系统中的同步包括神经放电和心脏搏动节律的同步等现象。当前, 随着复杂网络在神经科学研究中的兴起, 神经元网络的同步行为成为一个研究热点。实际上, 心脏中也存在具有重要生物学和物理学意义的同步化现象。例如, 窦房结节律是心脏的起步节律, 领导心脏的搏动, 是心脏正常工作和生命维持的基础<sup>[5,6]</sup>。而窦房结节律就是结内心肌细胞耦合形成的网络产生的同步化节律, 对其进行研究有重要的基础意义<sup>[7,8]</sup>。最近, 对于心肌细胞网络的同步行为的研究越来越多, 进一步揭示了心脏生理、病理节律的形成机理, 有助于寻求治疗病理性节律的合理措施<sup>[9–21]</sup>。

窦房结和大规模心肌细胞网络的正常的同步节律经常表现为周期1节律, 有时也会是不规则的<sup>[9–17]</sup>, 例如一些病理性节律(如迟后去极化、早后去极化)等<sup>[16,18,20]</sup>。我们以前的研究认为病理性

节律是随机因素在分岔点附近引起的随机同步节律<sup>[16,20]</sup>, 也有研究认为是同步混沌节律<sup>[18]</sup>。而培养心肌单细胞的节律往往是非周期的<sup>[14,16,20]</sup>。此外, 异质心肌细胞网络的数学模型的数值模拟结果提示有正常的周期节律和不规则的混沌的同步化节律<sup>[9–11]</sup>, 以及节律的复杂变化以及分岔等<sup>[12,17]</sup>。目前, 对于心肌细胞网络的同步节律形成机理的认识还相对模糊, 还需要进行进一步研究。

从动物心脏组织中分离出心肌细胞, 在体外进行培养, 是研究心脏同步化节律形成机理的重要生物学模型。培养乳鼠(出生1—2天)心肌细胞最初是孤立的, 但由于细胞还处于生长发育期, 培养2—3天, 细胞会快速生长进而细胞间会通过建立缝隙连接(gap junction)耦合而成为小规模网络; 随着培养时间的增加, 细胞间耦合强度因细胞的生长、发育因素也会持续的增加; 培养6天以上, 往往表现为大规模同步化网络<sup>[14,22–27]</sup>。这些大规模网络同步化节律的研究较多, 但往往关注于网络整体行为的统计, 实际上神经元网络的研究也是如此。而对于小规模网络的研究, 不仅能够研究网络整体行为,

\* 国家自然科学基金(批准号: 11072135, 10772101)和中央高校基本科研业务费基金资助的课题。

† E-mail: guhuaguang@263.net; guhuaguang@tongji.edu.cn

还能研究单元之间的对应关系<sup>[20,28,29]</sup>. 例如, 我们已经在鳌虾口胃神经节幽门网络三神经元网络发现了三相节律, 三个神经元是交互抑制的, 三相节律也就是三个神经元顺序去抑制放电形成的<sup>[28]</sup>. 因此, 小规模网络的研究更有基础意义<sup>[28,29]</sup>. 此外, 小规模网络还具有影响因素简单、易于记录和分析等优点. 但是, 到目前, 关于心肌细胞小规模网络的同步行为的研究尚不多见. 此外, 需要强调的是, 窦房结内或培养心肌细胞网络中的细胞是异质的<sup>[30]</sup>. 实际上, 相比于理论模型研究中往往采用全同振子而言, 现实网络的振子往往是异质的<sup>[28–30]</sup>. 对于异质细胞构成的网络的研究, 无论实验还是数学模型, 因接近现实系统而更有意义.

因此, 本文将对培养 2—3 天、两个异质心肌细胞构成的网络的同步节律随着网络建立、耦合强度增加的变化规律进行研究, 加深对同步节律形成过程的了解. 结果发现, 开始两个心肌细胞是孤立的, 各自搏动; 然后部分搏动已经同步, 部分搏动不同步; 同步搏动次数逐步增加到最后两个细胞的搏动一一对应, 搏动时间间隔较小, 表现为所有的搏动都是同步的. 利用两个细胞搏动节律的相位差可以揭示这是一从非相位同步到相位同步的过程. 只有部分搏动的同步对应于非相位同步, 而所有搏动的同步对应于相位同步. 研究结果不仅从网络层次揭示了从非相位同步到相位同步的过程, 还从细胞搏动对应的层次进一步认识了非相位同步和相位同步的内部特征和机理. 这对于揭示异质细胞网络的同步行为、心肌细胞网络的同步节律的形成都有重要的意义.

## 2 实验模型和同步分析方法

### 2.1 实验模型

采用原代培养的心肌细胞为实验模型. 培养方法简述如下<sup>[14]</sup>: 选用出生 1—2 天的 Sprague Dawley 乳鼠, 取心尖, 消化为独立的心肌细胞. 按  $10^5$  个细胞/ml 的密度接种于放置于培养皿内的培养板上, 孵育于培养液中. 培养皿放在 5%CO<sub>2</sub> 和 37 °C 孵育箱进行培养, 隔天换培养液保证心肌细胞的状态. 在培养 24 h 左右, 心肌细胞附着于培养板上贴壁生长并开始搏动.

心肌细胞可以表现出 3 个层面的节律, 3 个节律是一致的, 在时间历程一一对应的, 研究哪一

节律取决于研究问题和技术特点. 一是膜片钳或多电极技术记录膜电位的节律; 二是利用钙离子成像技术记录细胞内钙离子振荡节律; 三是光学记录细胞搏动节律. 光学记录的优点是可以进行长时间、动态、多次记录.

本研究中利用活细胞图形工作站 (Leica-AF6000, 德国) 配置的高速 CCD(Leica-DFC360 FX, 德国), 在恒温 37 °C 的活细胞培养箱中对心肌细胞自发搏动的光密度变化进行连续记录, 采样频率为 20 Hz. 细胞每次搏动会对应一次光密度变化的脉冲, 该脉冲序列可以忠实反应心肌细胞的搏动序列<sup>[14]</sup>. 重复观察、多次记录, 直到所定位的 2 个细胞建立起稳定的同步搏动节律.

对实验中记录的光密度值随时间的变化序列, 顺序确定搏动脉冲的位置,  $t_n (n = 1, 2, \dots, N)$ , 顺序检出搏动间期 (Inter-beating interval, IBI)  $IBI_n = t_{n+1} - t_n (n = 1, 2, \dots, N - 1)$  获得 IBI 序列, 计算平均 IBI (Mean IBI, MIBI).

### 2.2 同步

本文中我们要研究的同步有两重意思. 一重是两个细胞搏动节律的整体统计上的同步, 以两个细胞搏动节律的相位差来衡量. 这是对同步的宏观统计上的描述. 一般的相位同步的研究都是采用该指标. 另一重是两个细胞的某次搏动的同步, 本文称为搏动的同步. 这是对同步行为的细节上的刻画.

首先, 我们来定义两细胞搏动节律的相位同步. 定义细胞的搏动节律的相位  $\phi(t) = 2\pi \frac{t - t_n}{t_{n+1} - t_n} + 2\pi n, t \leq t \leq t_{n+1} (n = 1, 2, \dots, N - 1)$ . 计算两个细胞的 MIBI, 分别记为 MIBI<sub>1</sub> 和 MIBI<sub>2</sub>,  $MIBI_1/MIBI_2 = 1/r$ . 计算两个细胞的相位, 记为  $\phi_1(t)$  和  $\phi_2(t)$ . 计算两个细胞搏动节律的相位差  $\Delta\phi(t) = \phi_1(t) - r\phi_2(t)$ . 统计  $|\Delta\phi(t)|$  的最大值和平均值, 本文中  $|\Delta\phi(t)|$  的最大值小于  $2\pi$  认为是搏动节律达到了相位同步.  $|\Delta\phi(t)|$  的最大值大于  $2\pi$  则认为没有达到相位同步.

其次, 我们来定义搏动的同步. 在本文中, 若细胞 1 的某次搏动和细胞 2 某次搏动对应的时刻差值小于某一阈值时, 即认为该次搏动是同步的. 若细胞 1 的某次搏动和细胞 2 某次搏动对应的时刻差值大于某一阈值时, 则认为该次搏动是不同的. 本文中该阈值取为 50 ms. 统计同步搏动的次数, 计

算其占总搏动次数的百分比.

1247 s 和 640 s. 五次实验记录的典型的节律如图 2 所示, 黑色表示细胞 1, 灰色表示细胞 2.

### 3 实验结果

#### 3.1 心肌细胞搏动节律的光密度记录

本研究共获得了 6 例两个细胞从孤立到同步的完整记录过程. 其中一例实验中的两个细胞如图 1 所示, 处在图的正中间黑方框内.

需要指出的是, 细胞每搏动一次对应的光密度变化的脉冲可以是正向的, 也可以是负向的, 如图 2 所示. 脉冲为正向还是为负向是取决于细胞和细胞外的区域的明暗对比, 并不影响节律. 该例实验共记录了 5 次, 分别在培养时间的第 24, 27, 31, 45, 54 小时. 记录时间长度分别为 1281 s, 1201 s, 1343 s,

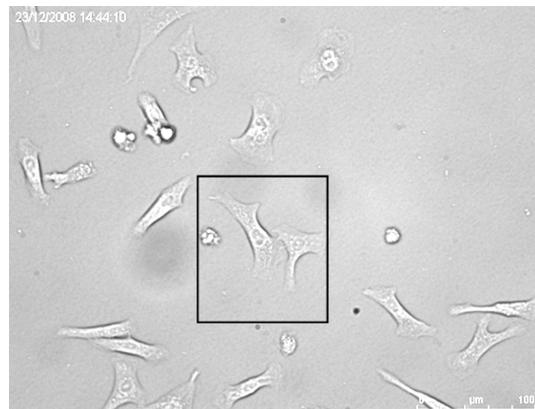


图 1 显微镜下的培养心肌细胞

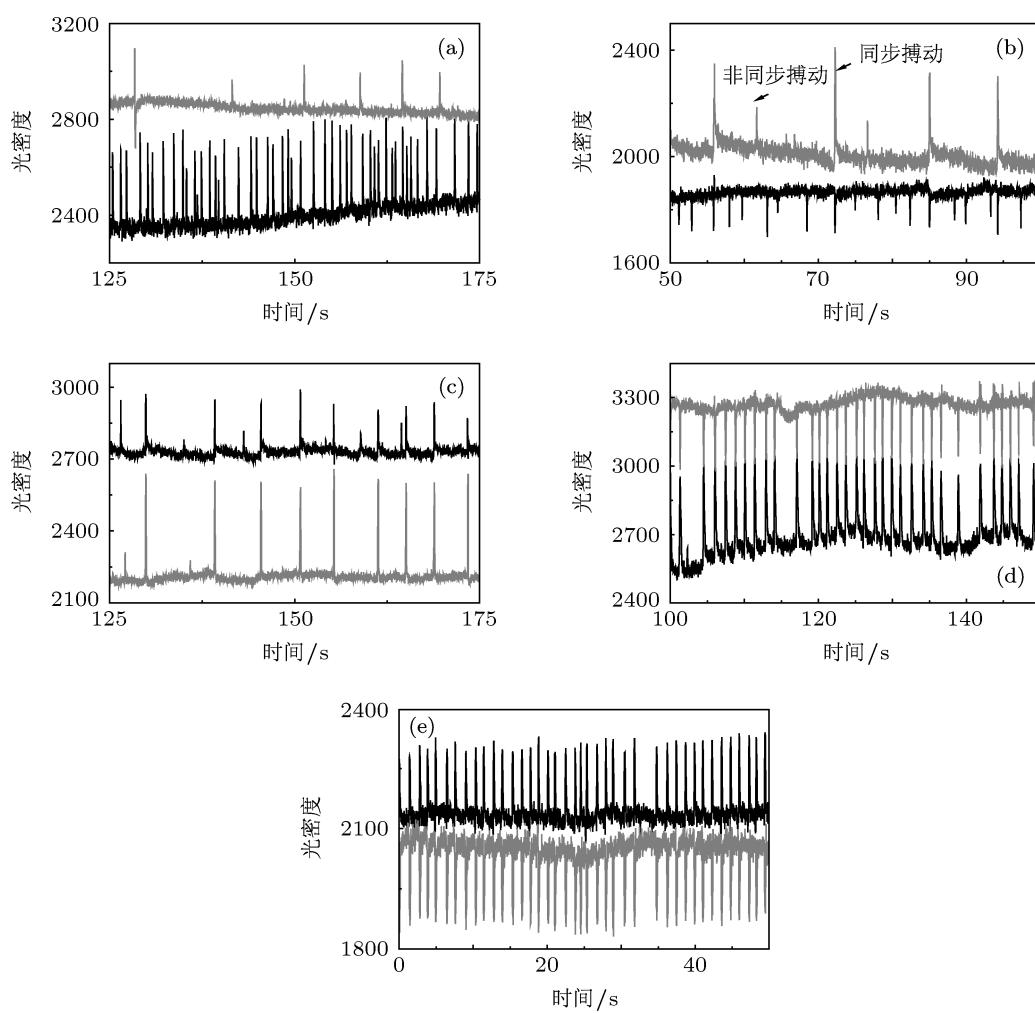


图 2 两个心肌细胞在不同培养时间的搏动轨迹图 (黑色表示细胞 1, 灰色表示细胞 2) (a) 第 24 小时; (b) 第 27 小时; (c) 第 31 小时; (d) 第 45 小时; (e) 第 54 小时

### 3.2 心肌细胞的 IBI

第一次到第五次记录中的细胞 1 的 MIBI 分别是  $0.965 \pm 1.164$  s,  $2.746 \pm 1.386$  s,  $3.750 \pm 1.917$  s,  $1.542 \pm 1.353$  s 和  $1.459 \pm 1.442$  s, 细胞 2 的 MIBI 分别是  $5.838 \pm 3.330$  s,  $5.282 \pm 2.231$  s,  $4.417 \pm 1.620$  s,  $1.542 \pm 1.353$  s 和  $1.459 \pm 1.444$  s, 都是非周期的。五次记录中两个细胞的 MIBI 的差值分别为 4.873, 2.536, 0.667, 0 和 0 s, 呈现出降低的趋势, 如图 3(a) 所示。可以看出, 在第四和第五次记录中, 两个细胞的平均 IBI 是相等的, 提示可能已经达到同步。

### 3.3 心肌细胞的同步搏动次数

第一次记录中细胞 1 和 2 的搏动次数分别为 1328 和 219 次, 两个细胞的同步搏动次数为 0, 搏动是独立的、不同步的。第二次记录中细胞 1 和 2 的搏动次数分别为 438 和 225 次, 不同步次数分别为 303 和 90 次, 同步搏动次数为 135

次。同步搏动和不同步搏动如图 2(b) 中箭头所示。同步搏动次数占细胞 1 和 2 的总搏动次数的 30.82% 和 60.00%。第三次记录中细胞 1 和 2 的搏动次数分别是 359 和 305 次, 不同步搏动次数分别为 89 和 35 次, 同步搏动次数为 270 次。同步搏动次数分别占细胞 1 和 2 的总搏动次数的 77.21% 和 88.53%。第四次记录中细胞 1 和 2 的搏动次数相同, 为 809 次, 全部搏动都是同步的。第五次记录中两个心肌细胞的搏动次数相同, 为 434 次, 全部搏动都是同步的。可以看出, 从第一次到第四次记录, 同步搏动次数的百分比从 0% 逐步增加到 100%, 第五次保持在 100%, 如图 3(b) 所示, 方块为细胞 1 而圆点代表细胞 2。

对于第四次和第五次记录, 细胞 1 和 2 每次搏动的时间间隔差值的绝对值的平均值分别为  $0.027 \pm 0.019$  s 和  $0.013 \pm 0.015$  s, 说明第五次较第四次的时间差值更小, 更为同步。但是第四次和第五次记录中两细胞对应搏动的时间还是有间隔, 说明还没有达到完全同步。

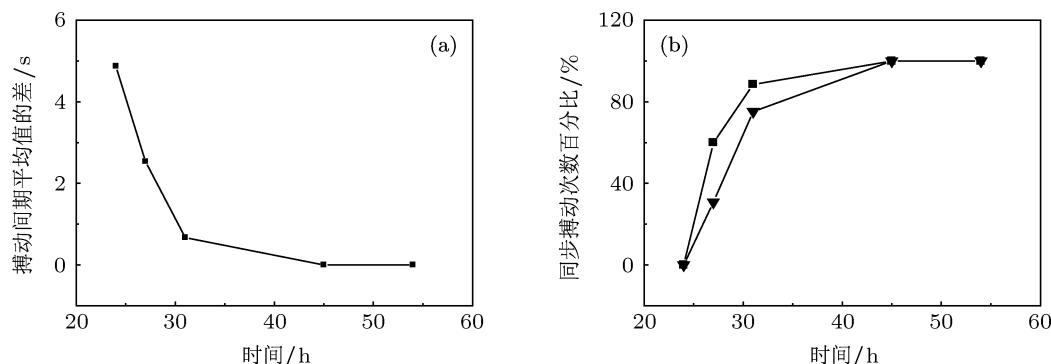


图 3 (a) 两细胞平均搏动间期的差值随培养时间的变化; (b) 两细胞同步搏动次数的百分比随细胞培养时间的变化 (方块为细胞 1, 圆点为细胞 2)

### 3.4 心肌细胞搏动节律的相位差

第一次到第五次记录的两细胞的搏动节律的相位差分别如图 4 所示。其绝对值的最大值分别为 713.74, 217.70, 79.97, 2.09 和 1.09, 呈现出降低的趋势, 如图 5 所示 (方块)。第一次到第三次记录中搏动节律呈现出非相位同步, 而第四次、第五次记录中已经达到了相位同步。五次记录的相位差的绝对值的平均值为 339.86, 88.39, 26.23, 0.14 和 0.10, 也呈现出降低的趋势, 如图 5 所示 (三角)。第四次和第五次记录中相位差虽然很小, 但是不为 0, 也说明还没有达到完全同步。

### 4 结论与讨论

在当前, 网络的同步动力学的理论研究较多, 实验研究相对较少; 对同质振子构成的网络研究较多, 对异质振子构成的网络的研究较少; 大规模网络较多, 小规模网络较少。本文从动力学角度通过实验研究了异质两心肌细胞网络的同步化节律的形成过程。不仅从宏观统计量相位差的角度刻画了同步的过程, 从非相位同步到相位同步, 也从两个细胞的搏动的对应关系进一步刻画了同步节律的形成过程和细节, 先有部分搏动的同步再到全部搏动的同步。该结果比单纯的宏观的相位同步进入到

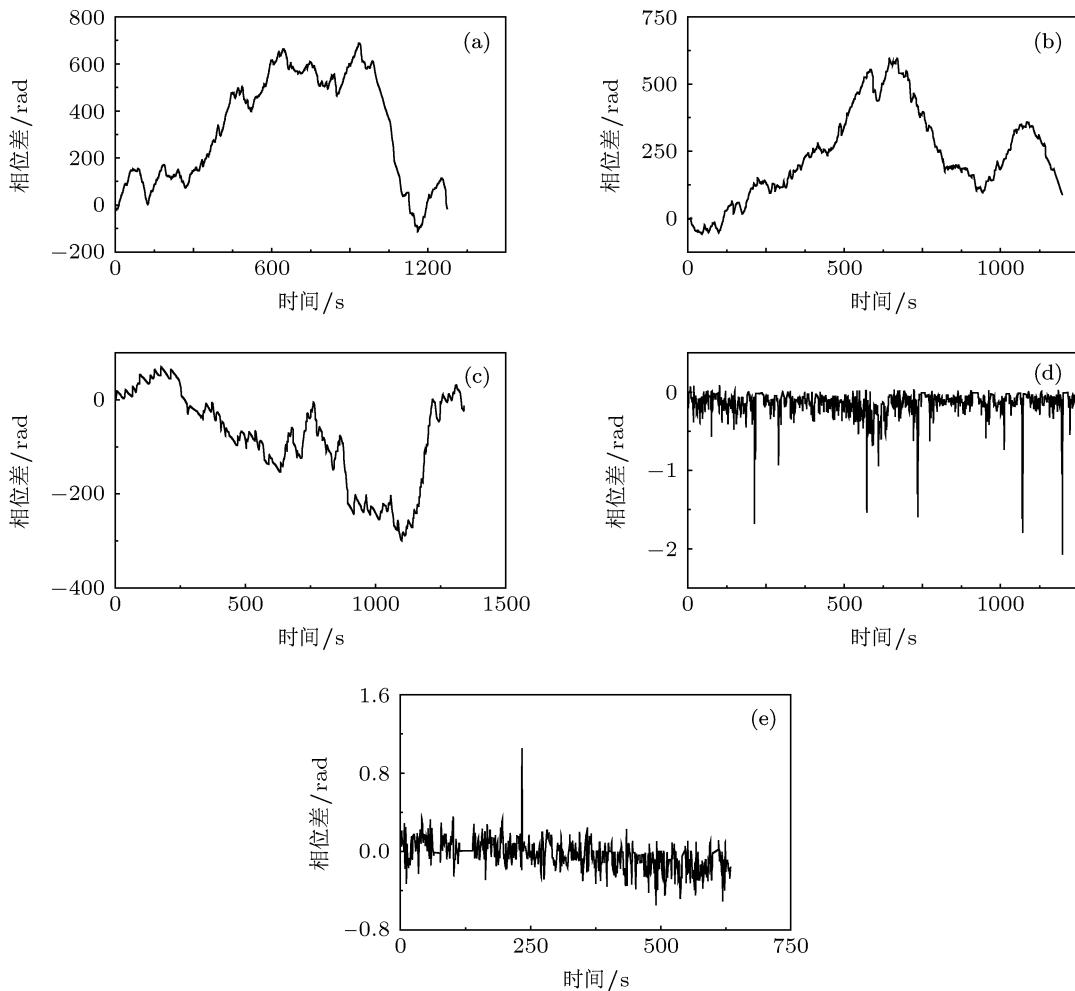


图4 五次记录的两细胞搏动节律的相位差 (a) 第一次; (b) 第二次; (c) 第三次; (d) 第四次; (e) 第五次

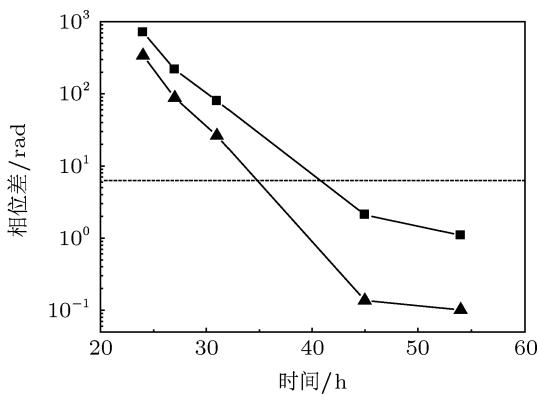


图5 两个细胞搏动节律相位差的绝对值随培养时间的变化(方块, 最大值; 三角, 平均值)

了节律内部, 部分搏动同步到所有搏动同步. 但由于是异质振子, 两个振子达不到完全同步, 相位差

虽小但大于0, 搏动对应时间间隔差值虽小但不为0. 这就给出了培养2—3天的小规模心肌细胞网络的同步节律的形成和变化的动力学特征, 对于全面认识心肌细胞网络同步节律<sup>[9-27]</sup>是一个重要的补充. 该结果也是异质生物网络节律同步的一个重要例证.

本研究中从每次搏动产生时间对应的角度研究了两个心肌细胞的同步节律. 以前关于小规模神经元网络的实验研究中, 有两个交互抑制神经元网络的反同步, 三个交互抑制神经元网络的顺序去抑制活动形成的三个神经元轮流放电的三相节律<sup>[28,29]</sup>. 这都从细胞间的活动的时间对应关系上刻画了同步的特征. 这些细节的特征也可能是理解网络、特别是异质网络同步的重要的环节, 尚需要进一步的理论研究.

- [1] Gray C M, König P, Engel A K, Singer W 1989 *Nature* **338** 334
- [2] Steinmetz P N, Roy A, Fitzgerald P J 2000 *Nature* **404** 187
- [3] Boccaletti S, Kurths J, Osipov G, Valladares D L, Zhou C S 2002 *Phys. Rep.* **366** 2
- [4] Pikovsky A, Rosenblum M, Kurths J 2001 *Synchronization: A Universal Concept in Nonlinear Science* (Cambridge: Cambridge University Press) p1
- [5] Boyett M R, Honjo H, Kodama I 2000 *Cardiovasc. Res.* **47** 658
- [6] Li C 2001 *Sino-Auricular Node* (Beijing: Beijing Medical University Press) p1 (in Chinese) [李澈 2001 窦房结 (北京: 北京医科大学出版社) 第1页]
- [7] Verheijck E E, Wilders R, Joyner R W, Golod D A, Kumar R, Jongsma H J, Bouman L N, van Ginneken A C 1998 *J. Gen. Physiol.* **111** 95
- [8] Kanakov O I, Osipov G V, Chan C K, Kurths J 2007 *Chaos* **17** 015111
- [9] Cai D, Lai Y C, Winslow R L 1993 *Phys. Rev. Lett.* **71** 2501
- [10] Cai D, Winslow R L, Noble D 1994 *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **41** 217
- [11] Winslow R L, Cai D, Varghese A, Lai Y C 1995 *Chaos Solitons Fractals* **5** 491
- [12] Soen Y, Cohen N, Lipson D, Braun E 1999 *Phys. Rev. Lett.* **82** 3556
- [13] Yamauchi Y, Harada A, Kawahara K 2002 *Biol. Cybern.* **86** 147
- [14] Liu H J, Liu Z Q, Gu H G, Yang M H, Li L, Ren W 2006 *Acta Bio. Phys. Sin.* **22** 441 (in Chinese) [刘红菊, 刘志强, 古华光, 杨明浩, 李莉, 任维 2006 生物物理学报 **22** 441]
- [15] Lerma C, Krogh-Madsen T, Guevara M R, Glass L 2007 *J. Stat. Phys.* **128** 347
- [16] Zhang N, Zhang H M, Liu Z Q, Ding X L, Yang M H, Gu H G, Ren W 2009 *Chin. Phys. Lett.* **26** 110501
- [17] Kim M Y, Aguilar M, Hodge A, Vigmond E, Shrier A, Glass L 2009 *Phys. Rev. Lett.* **103** 058101
- [18] Sato D, Xie L H, Sovari A A, Tran D X, Morita N, Xie F, Karagueuzian H, Garfinkel A, Weiss J N, Qu Z 2009 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** 2983
- [19] Petrov V S, Osipov G V, Kurths J 2010 *Phys. Rev. E* **82** 026208
- [20] Yuan L, Liu Z Q, Zhang H M, Yang M H, Wei C L, Ding X L, Gu H G, Ren W 2011 *Chin. Phys. B* **20** 020508
- [21] Oyamada M, Kimura H, Oyamada Y, Miyamoto A, Ohshika H, Mori M 1994 *Exp. Cell. Res.* **212** 351
- [22] Jongsma H J, Masson-Pevet M, Tsjernina L 1987 *Basic Res. Cardiol.* **82** 454
- [23] Kimura H, Oyamada Y, Ohshika H, Mori M, Oyamada M 1995 *Exp. Cell. Res.* **220** 348
- [24] Cohen N, Soen Y, Braun E 1998 *Physica A* **249** 600
- [25] Yamauchi Y, Harada A, Kawahara K 2002 *Biol. Cybern.* **86** 147
- [26] Hachiro T, Kawahara K, Sato R, Yamauchi Y, Matsuyama D 2007 *Bio. Systems* **90** 707
- [27] Nakayama Y, Kawahara K, Yoneyama M, Hachiro T 2005 *Biol. Rhythm Res.* **36** 317
- [28] Dong S, Gu H G, Yuan L 2011 *Acta Bio. Phys. Sin.* **27** 627 (in Chinese) [董珊, 古华光, 袁岚 2011 生物物理学报 **27** 627]
- [29] Elson R C, Selverston A I, Huerta R, Rulkov N F, Rabinovich M I, Abarbanel H D I 1998 *Phys. Rev. Lett.* **81** 5692
- [30] Norwood C R, Castaneda A R, Norwood W I 1980 *J. Mol. Cell. Cardiol.* **12** 201

# Experimental research on synchronous rhythms of biological network composed of heterogeneous cells\*

Jia Bing Gu Hua-Guang<sup>†</sup>

(School of Aerospace Engineering and Applied Mechanics, Tongji University, Shanghai 200092, China)

(Received 11 June 2012; revised manuscript received 27 June 2012)

## Abstract

The evolution of the dynamic behaviors of beating rhythms from independent states to the formation of network is studied in biological experiment on two heterogeneous cells. The beating rhythms are independent and not synchronous when there is no coupling between two cells. With the enhancement of the coupling strength, the mean and maximum of absolute value of the phase difference drastically decrease in the beating rhythms of the two cells, from non-phase synchronization to phase synchronization, eventually not to full synchronization. Some of beatings become synchronous while others not synchronous for non-synchronization states while all beatings are synchronous for the phase synchronization state. With the increase of coupling strength, the times of synchronized beatings increases for the non-phase synchronization state, and time interval between the corresponding synchronous beatings of the two cells decreases to a low but non-zero value for the phase synchronization state. The results not only provide experimental demonstration of rhythm synchronization in a biological network, but also give changing regularity in the forming process of synchronous rhythm in the heterogeneous network.

**Keywords:** biological network, synchronization, rhythm, heterogeneity

**PACS:** 05.45.Xt, 87.19.Hh, 87.18.Tt, 87.18.Hf

\* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 11072135, 10772101), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China.

† E-mail: guhuaguang@263.net; guhuaguang@tongji.edu.cn