

实时监测 GHRP对心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 调控的双标记方法研究*

李梅秀 王艳茹 曹济民 田国忠 赵玲辉

摘要 目的 探索实时监测 GHRP对心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 调控的双标记方法,为研究 GHRP对心脏直接保护效应机制提供新方法。方法 用改良的 Langendorff恒流灌注仪系统和酶解法急性分离 SD成年大鼠心肌细胞,在 LSCM下分别以 Ca^{2+} 探针 Rhod - 2/AM和 NO探针 DAF - FM/DA对心肌细胞内 Ca^{2+} 和 NO进行双标记并观察 GHRP即时刺激对两者的调控影响。结果 在 LSCM下心肌细胞内 Ca^{2+} 呈红色荧光,NO呈绿色荧光,两者双标记后呈现黄绿色荧光,GHRP使红色荧光出现瞬时增强后又迟缓地回降,绿色荧光强度没有明显变化,双标记下 GHRP对两者的调控同单标记结果。结论 LSCM下实验中设计的双标记方法能实时监测成年大鼠心肌细胞内 Ca^{2+} 和 NO存在及 GHRP对两者同一时相调控作用,引起 $[Ca^{2+}]_i$ 两个时相的变化,而对 NO信号系统未见明显影响。

关键词 心肌细胞 细胞内游离钙离子浓度 NO 双标记 GHRP LSCM

To Explore the Double - labeling Method of Monitoring the GHRP Regulatory Function on $[Ca^{2+}]_i$ and NO on Real Time in Cardiomyocytes Under LSCM. Li Meixiu, Wang Yannu, Cao Jimin, Tian Guozhong, Zhao Linghui Basic Medical College, Jiamusi University, Heilongjiang 154007, China

Abstract Objective To explore the double - labeling method of monitoring the GHRP regulatory function on $[Ca^{2+}]_i$ and NO in cardiomyocytes of rats on real time under LSCM. **Methods** The reformed constant - flow Langendorff system and enzyme - dissociated was used to isolate cardiomyocytes $[Ca^{2+}]_i$ and NO in the cardiomyocytes of SD rats were double - labeled by their molecular probe Rhod - 2/AM and DAF - FM/DA, respectively to monitor the regulatory function of GHRP on $[Ca^{2+}]_i$ and NO on real time by LSCM. **Results** Ca^{2+} signal showed a red fluorescence and NO showed a green fluorescence while the overlapping of the two signals showed a yellow - green fluorescence by this system, and the similar effect presents in both double - labeled state and the single labeled one: GHRP induced a transient $[Ca^{2+}]_i$ increase then followed by a plateau phase while there was not significant change in NO signal system after GHRP stimulation under the LSCM in the cardiomyocytes of rats. **Conclusions** After having established the double - labeling method we monitored the GHRP regulatory function on $[Ca^{2+}]_i$ and NO on real time in cardiomyocytes of rats under LSCM causing the $[Ca^{2+}]_i$ biphasic increase while no significant change in NO signal system.

Key words Cardiomyocyte; The concentration of intracellular free Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$); Nitric oxide (NO); Double - label; Growth hormone - releasing peptide (GHRP); Laser scanning confocal microscope (LSCM)

GHRP是新的合成的寡肽分子家族,不仅具有促进生长素(growth hormone, GH)作用,尚且通过其广泛分布于中枢和外周特别是心血管系统上的独特结合位点发挥独立于GH之外的重要生物活性^[1,2],越来越多的研究表明,GHRP即将成为新一代最有前途

的对心脏乃至CHF心脏具有明显保护和改善作用的CHF生物学治疗遴选药物之一,然而,其许多作用机制及其发挥生理作用涉及的环节仍然需要我们进一步探索。 Ca^{2+} 及兴奋-收缩偶联对于心脏的收缩做功起着重要作用,在CHF病理进程中也发生相应的改变^[3],GHRP家族的一些成员已经显示了对 Ca^{2+} 直接调控影响;NO是重要的信使分子,与CHF发生发展密切相关,有关这两个方面的研究国内外有过报道^[4,5],但是在CHF发生发展中同时研究两者存在和变化关系及GHRP对两者同一时相调控的研究尚未见报道,本实验设计实时监测大鼠心肌细胞内 Ca^{2+} 和NO和存在关系及GHRP对两者同一时相调控作

基金项目:黑龙江省卫生厅重点科研项目(2005-350)、黑龙江省自然科学基金资助项目D2006-24与YZSCX2007-0077HLJ资助项目

作者单位:154007 黑龙江省佳木斯大学基础医学院(李梅秀、田国忠);北京大学分子医学研究所(王艳茹);中国协和医科大学(曹济民);哈尔滨医科大学(赵玲辉)

通讯作者:赵玲辉,电子信箱:postgraduatedept@126.com; Tel: 0454 - 8618399

用的方法,以期探索 GHRP对心脏直接保护效应机制,研究 CHF发病机制及其 CHF生物学治疗提供新的资料和新的研究方法。

材料与方 法

1. 实验动物:实验动物 Sprague - Dawley (SD), 体重 280 ~ 320g (雌雄不限), 二级, 由中国医学科学院动物研究所提供。

2 主要试剂: (1) 细胞内游离钙指示剂: Rhod - 2/AM (Invitrogen 公司)、Taurine (美国 Sigma 公司)、N - 2 - 羟乙基哌嗪 - N - 2 - 乙烷磺酸 HEPES (德国 Boehringer 公司)、型胶原酶 (Worthington 公司)、胎牛血清 (Gibco BRL 公司)、蛋白酶 (德国 Boehringer 公司)、水合三氯乙醛 (中国 国产) 均为 PEACE 实验室赞助。GHRP - 2 购自杭州中肽生化有限公司 (美国进口分装)。细胞内游离 NO 指示剂 DAF - FM/DA、DAF - FM/DA 稀释液以及台盼蓝购自上海碧云天, 其他常用试剂均为国产分析纯。(2) 无钙台氏液 (mmol/L) 与台氏液 (mmol/L): 溶液随用随配, 并以 1mol/L NaOH 调 pH 值至 7.35 ~ 7.45。分离心肌细胞酶液: A 液: 型胶原酶和牛血清白蛋白 BSA; B 液: A 液中加入蛋白酶 Protease。注: 以上溶液都经过 100% 氧气饱和。(3) 探针负载液配制: NO 探针 DAF - FM/DA 负载液配制: 用 DAF - FM/DA 重悬稀释液配成 5 μ mol/L 浓度的负载液备用。钙离子探针 Rhod - 2/AM 负载液配制: 用 DMSO 将 Rhod - 2/AM 稀释成 1mmol/L 的负载原液, 冻存于 - 20 备用。

3 实验方法: (1) 成年大鼠心肌细胞的急性分离方法: 采用北大分子医学研究所 PEACE 实验室成年大鼠心肌细胞的急性分离方法。(2) 大鼠心肌细胞内 NO 和 Ca^{2+} 单标记并在 LSCM 下分别监测 GHRP 的即时调控作用: 在 LSCM 视野下选择呈棒状、横纹清晰、静息的活力状态良好的心肌细胞进行实验。分离的细胞复钙约 45min 后, 弃去上清后备用。心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 单标记和 GHRP 调控: 加入浓度为 5mmol/L 的 Ca^{2+} 探针 Rhod - 2/AM 负载液, 在室温下孵育 10min, 弃去细胞外残余的 Rhod - 2/AM 负载液, 无钙台氏液洗涤 3 次, 负载完探针的心肌细胞在 Petri dish 培养皿中贴壁, 将心肌细胞置于特定载物台上, 在光镜下选取细胞数多、细胞状态好的视野, 对细胞进行激光扫描测定。Rhod - 2/AM 激发波长 543nm, 发射波长为 560 nm; 在 ZEISS LSM510 下给心肌细胞添加刺激物 CHRP - 2 (10^{-6} mmol/L) 观测并记录心肌细胞内 Ca^{2+} 荧光强度显示的 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化; 心肌细胞内 NO 单标记和 GHRP 调控: 加入浓度为 15mmol/L 的 NO 探针 DAF - FM/DA 负载液, 在室温下孵育 20min, 重复以上步骤, DAF - FM/DA 激发波长 488nm, 发射波长为 515 nm, 给心肌细胞添加刺激物 CHRP - 2 (10^{-6} mmol/L) 观测并记录心肌细胞内 NO 荧光强度显示的 NO 浓度变化。(3) 大鼠心肌细胞内 NO 和 Ca^{2+} 双标记并在 LSCM 下分别监测 GHRP 的即时调控作用: 取备用心肌细胞, 首先加入浓度为 15mmol/L 的 DAF - FM/DA 在室温下孵育 20min, 弃去细胞外残余的 DAF - FM/DA 负载液, 无钙台氏液洗涤 3 次, 再加入浓度为 5mmol/L 的 Rhod - 2/

AM 在室温下孵育 10min, 同样弃去细胞外残余的 Rhod - 2/AM 负载液, 无钙台氏液洗涤 3 次, 在 LSCM 下 Rhod - 2/AM 激发波长 543nm, 发射波长为 560 nm; DAF - FM/DA 激发波长 488nm, 发射波长为 515 nm, 用多轨法, 在两种光间进行快速切换, 每两秒扫描 1 次, 共扫描 25 ~ 35 次并在扫描第 6 次和第 7 次之间计算细胞 XY 平面内平均荧光强度变化, 描记出心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 的浓度曲线图, 给 NO 和 Ca^{2+} 双标记后的心肌细胞 CHRP - 2 (10^{-6} mmol/L) 刺激, 观测并记录心肌细胞 NO 和 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度所显示的各自浓度变化。

4 统计学处理: 所有实验数据用 LSM510 ZEISS 激光共聚焦显微镜计算机软件进行统计学处理。GHRP 刺激前后心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 浓度变化的数据用配对 t 检验 (Pared t test)。P < 0.05 为差异有显著性的标准。

结 果

1. 心肌细胞的急性分离结果见图 1。

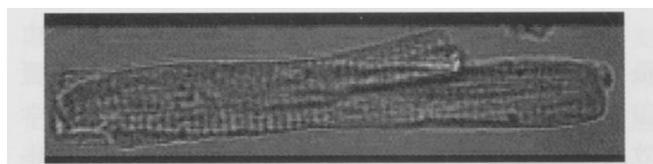


图 1 急性分离的成年 SD 大鼠心肌细胞 ZEISS LSM510 自然光 Plan - Neofluar 40x/L 30 il 成像
分离的正常大鼠单个心肌细胞形态及活性良好,
细胞膜完整, 横纹清晰

2 GHRP 对大鼠心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 单标记下调控监测结果: 分离的单个心肌细胞内 Ca^{2+} 以 Rhod - 2/AM 标记, 用波长为 488 nm 激光激发, 在 ZEISS LSM510 系统下监测可见: 心肌细胞内 Ca^{2+} 呈现红色荧光, 不中断扫描的情况下给心肌细胞添加刺激物 CHRP - 2 (10^{-6} mmol/L) 可使红色荧光呈现两个时相的变化, 荧光强度在 2 ~ 150s 呈现瞬时增强, 随后才慢慢衰减最后恢复至加药前的荧光强度, $[Ca^{2+}]_i$ 曲线在给 GHRP - 2 (10^{-6} mmol/L) 后开始出现瞬时升高的波形, 明显地高于基线水平 (P < 0.05) 然后又迟缓地回降, 呈 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的平台期。分离的单个心肌细胞内 NO 以 DAF - FM/DA 标记, 用波长为 488 nm 激光激发, 在 ZEISS LSM510 下监测可见: 心肌细胞内 NO 呈现绿色荧光, 在不中断扫描的情况下给心肌细胞添加刺激物 GHRP - 2 (10^{-6} mmol/L), NO 的绿色荧光强度及 NO 浓度曲线未见明显改变, 与基线水平持平 (P > 0.05)。

3 GHRP 对大鼠心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 双标记下调控作用观察监测结果: 急性分离的大鼠心肌细胞 Ca^{2+} 和 NO 分别负载探针进行双标记后, 多轨法在

ZEISS LSM 510系统下监测可见:心肌细胞 Ca^{2+} 在波长为 543 nm 激光激发呈现红色荧光,心肌细胞内 NO 在波长为 488 nm 激光激发下为绿色荧光,两者叠加同时成像为黄绿色荧光。给 GHRP - 2 (10^{-6} mmol/L) 刺激后只观察到 Ca^{2+} 红色荧光呈现两个时相的变化,荧光强度在 2 ~ 150s 呈现瞬时增强,随后才慢慢衰减最后恢复至加药前的荧光强度, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 曲线在给 GHRP 后开始出现瞬时升高的波形,明显高于基线水平 ($P < 0.05$),然后又迟缓地回降,呈 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的平台期,两者叠加的黄绿色荧光也呈现瞬时红色荧光增强再回降的结果,而 NO 的绿色荧光未见明显改变,NO 浓度曲线无明显波动,与基线水平持平 ($P > 0.05$)。

讨 论

GHRP 自在 20 世纪 80 年代由 Bowers 等最先由最初合成以来,由于其广泛的外周和中枢生物活性覆盖了许多方面^[1],特别是由于对心脏的直接生物学效应,使得 GHRP 在慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 世纪之交的生物学治疗时代备受各国学者瞩目,因而被列入到了 CHF 治疗的行列中^[3],研究证明 GHRP 首先可以通过促进 GH 的释放,发挥类似 GH 对心脏的调节作用,即 GHRP 对心脏生物学作用的 GH - IGF - 1 信号通路。最让医学工作者寄予厚望的是不断揭示的 GHRP 不依赖 GH,主要是通过存在于心脏的一种特殊受体介导的作用,诸如陈晨、陈孟勤等学者报道的 GHRP 最初的一些对心脏直接作用的研究、发现及 GHRP 对心脏直接作用的预见,也就是 GHRP 直接对心脏的生物学效应。在这一领域曹济民等课题组的研究先后显示 GHRP 对心脏有正性肌力作用、GHRP 保护大鼠、狗和兔心肌缺血、抑制细胞凋亡效应、改善 CHF 大鼠恶病质状态,反映了 GHRP 改善 CHF 心脏功能的细胞生物学基础^[4],为了揭开 GHRP 对心脏直接保护性作用的分子机制,亟需更多研究就 GHRP 对心肌细胞内多种生物活性物质的同一时相调控作用做出解释。

Ca^{2+} 作为重要的第 2 信使参与心肌细胞的细胞内外信息传递、心脏兴奋 - 收缩偶联 (excitation - contraction coupling, EC) 等一系列心肌细胞功能活动,对心肌细胞生命活动和心肌兴奋与心肌收缩性至关重要,心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化会影响、导致一系列的病理生理反应^[3],因此,测定胞内、外游离钙离子浓度及其变化有利于研究多种疾病发病机制,因而成为 CHF 发病机制及其生物学治疗药物开发研究的焦

点^[3,4]。测定心肌细胞钙离子浓度的方法包括测定细胞内、外钙以及线粒体中钙含量, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分子探针也在各种实验需要的促动下不断推出更新换代的荧光指示剂, Rhod - 2 是所有钙荧光指示剂中荧光波长信号最长的,它具有类似于罗丹明的荧光团,其激发与发射最大值在 557nm 和 581nm,可用 LSCM 543nm 的激发光激发,这使得它很容易成为氩激光和氦激光的激发源。高纯度 Rhod - 2 与 Ca^{2+} 结合后 Rhod - 2 的荧光信号的强度可以增大 80 ~ 100 倍。它的信号强度是所有钙荧光探针信号中强度最强的。Rhod - 2/AM 是 Rhod - 2 的乙酸甲酯衍生物,比 Rhod - 2 更容易通过孵育导入细胞中。Rhod - 2 的负载特性: Rhod - 2 和 Ca^{2+} 的解离常数是所有荧光钙离子探针中最高的一个,这就提供了更宽的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度检测范围,可以更敏感地反映心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的精确变化,是以往最常用的第 3 代 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 荧光探针 Fluo - 3/AM 所不能比拟的^[4],从而 Rhod - 2 被认为是激光显微镜中细胞内 Ca^{2+} 监控的推荐探针。毫无疑问, Rhod - 2/AM 也是作为心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 检测的最理想的探针。

NO 参与了机体多种生理和病理过程,已有研究证明 NO 与心血管疾病关系密切^[5],被誉为“明星分子”在已有的研究中已经显示了它在 CHF 发生发展过程中起着既有利又有有害的“双刃剑”的作用^[5]细胞内 NO 的测定探针也在不断更新。DAF - FM/DA 即 3 - Amino, 4 - aminomethyl - 2, 7 - difluorescein, diacetate, 亦称 DAF - FM diacetate 或 4 - Amino, 5 - aminomethyl - 2, 7 - difluorescein, diacetate, 是最新一代用于 NO 定量检测的荧光探针,较以往常用的 NO 荧光检测探针 DAF - 2 diacetate 有多方面的改进。首先, DAF - FM/DA 和 DAF - 2 diacetate 相比,该探针受 pH 值的影响小,在 pH > 5.5 时不受 pH 值的影响。其次, DAF - FM/DA 和 DAF - 2 diacetate 相比,前者产生的荧光更加稳定,不容易淬灭,这样更加便于检测。此外, DAF - FM/DA 和 DAF - 2 diacetate 相比,前者对 NO 的检测灵敏度更高,相同条件下检测灵敏度可以提高接近 2 倍,最低检测浓度可以达到 3nM。DAF - FM/DA 可以穿过细胞膜,进入细胞后可以被细胞内的酯酶催化形成不能穿过细胞膜的 DAF - FM。DAF - FM 本身仅有很弱的荧光,但在和 NO 结合后可以产生强烈荧光,激发波长为 495nm,发射波长为 515nm,适合于实时检测细胞内的 NO 水平。所以, DAF - FM/DA 就以绝对优势成为实时监测心

肌细胞内 NO最佳分子探针。

至今未见有人报道 CHF时心肌细胞内 NO这种重要的信使分子的改变,更有人在急性分离的成年大鼠心肌细胞内建立同时检测 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO共存的双标记方法。有研究曾在培养的大鼠海马神经元细胞内检测了 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO共存,但是他们选择了探针 calcium orange,其解离系数和它与细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 结合后发的荧光与 Rhod - 2/AM比较都没有优势,作者也在文中对此提出了探针需要进一步探索的期望。因此,从波长、解离系数、荧光强度及其抗淬灭特性等综合评价 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO分子探针从而达到使两者的激发波长重叠最少且各自标记效果最佳,确定 Rhod - 2/AM作为 $[Ca^{2+}]_i$ 分子探针与标记 NO的探针 DAF - FM/DA在心肌细胞内建立监测 $[Ca^{2+}]_i$ 与 NO同一时相存在的最理想双标记方法。

实验首先对急性分离的正常成年大鼠心肌细胞内 NO和 $[Ca^{2+}]_i$ 进行了单标记观察,并分别给予 GHRP即时刺激。由于 DAF - FM/DA和 NO结合发出的荧光光谱和 fluorescein非常相似,探针装载的时间也可以根据情况在 15 ~ 60min内适当进行调整,为了使 NO负载 DAF - FM/DA的时间与 $[Ca^{2+}]_i$ 负载 Rhod - 2/AM的时间相差不远,实验中采用了 DAF - FM/DA为 15mmol/L,负载时间设为 20min, Rhod - 2/AM负载时间为 10min。实验结果显示,分离的正常组单个心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 以 Rhod - 2/AM标记, ZEISS LSM510激发波长 543 nm下呈现红色荧光,不中断扫描的情况下给心肌细胞添加刺激物 GHRP - 2 (10^{-6} mmol/L)可使红色荧光呈现两个时相的变化,荧光强度在 2 ~ 150s呈现瞬时增强,随后才慢慢衰减最后恢复至加药前的荧光强度,荧光强度的变化直接反映 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化, $[Ca^{2+}]_i$ 曲线在给 GHRP - 2 (10^{-6} mmol/L)后开始出现瞬时升高的波形,然后又迟缓地回降,呈 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的平台期,单标记结果与曹济民课题组^[4]用 Fluo - 3在 LSCM下单标记的检测到的 GHRP对 $[Ca^{2+}]_i$ 的调控作用一致,使心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 呈现两个时相的变化;心肌细胞内 NO以 DAF - FM/DA标记, ZEISS LSM510激光激发 488 nm下呈现绿色荧光,不中断扫描的情况下给心肌细胞添加刺激物 GHRP - 2 (10^{-6} mmol/L), NO的绿色荧光强度及 NO浓度曲线未见明显改变。

在急性分离的正常成年大鼠心肌细胞内的 NO和 $[Ca^{2+}]_i$ 单标记观测的基础上,重新选取分离的心肌细胞按照程序双标记,采用多轨法在 ZEISS

HAL100 LSM 510系统下心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 在 543 nm激光激发呈现红色荧光,心肌细胞内 NO在 488nm激光激发下为绿色荧光,两者叠加同时成像为黄绿色荧光。给 GHRP - 2 (10^{-6} mmol/L)刺激后只观察到 $[Ca^{2+}]_i$ 红色荧光呈现两个时相的变化,荧光强度呈现瞬时增强,随后才慢慢衰减最后恢复至加药前的荧光强度, $[Ca^{2+}]_i$ 浓度在给 GHRP后开始出现瞬时升高的波形,然后又迟缓地回降,呈 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的平台期,两者叠加的黄绿色荧光也呈现瞬时红色荧光增强再回降的结果,而 NO的绿色荧光未见明显改变,表明在这种双标记下 GHRP同时对心肌细胞内这两种重要的信使分子的调控作用与单标记下监测到的结果一致,两种分子各自负载探针无串染现象,在 LSCM下浓度变化敏感。另外, Rhod - 2/AM作为细胞线粒体内 Ca^{2+} 测定的分子探针,但是负载时间要 20min以上,本实验探针负载时间是 10min,故主要标记的是心肌细胞的 $[Ca^{2+}]_i$,对于 GHRP对心肌细胞线粒体内 Ca^{2+} 的影响还有待于进一步研究探索。

总之,选择 Rhod - 2/AM与 DAF - FM/DA分别作为心肌细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO分子探针, ZEISS LSM 510下可同时观测到 GHRP刺激下两者荧光强度或者心肌细胞内浓度的变化,对比效果明显,表明在对急性分离的正常成年大鼠心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO双标记法监测两者同时存在及其浓度变化方法、监测 GHRP对心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO分子调控影响的方法建立成功,不仅证实了曹济民课题组^[4] GHRP对大鼠心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的动员作用,而且在同一时相监测到 GHRP对急性分离的正常成年大鼠心肌细胞内的 NO信号通路没有明显影响,为进一步探索 CHF发病机制和揭示 GHRP对心脏发挥直接作用机制、开拓分子医学时代 CHF的生物学治疗新药物补充了新资料。

参考文献

- 1 Camanni F, Ghigo E, Arvat E. Growth hormone - releasing peptides and their analogs. *Front Neuroendocrinol*, 1998, 19(1): 47 - 72
- 2 Bodart V, Bouchard J F, McNicoll N, et al. Identification and characterization of a new growth hormone releasing peptide receptor in the heart[J]. *Circ Res*, 1999, 85: 796 - 802
- 3 曹济民. 心力衰竭实验研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2002, 22(1): 16 - 25
- 4 Xu XB, Cao JM, Pang JJ, et al. The positive inotropic and calcium - mobilizing effects of growth hormone - releasing peptides on rat heart [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(11): 5050 - 5057
- 5 田国忠,等. 大鼠心肌氮能神经元及纤维的分布 [J]. *解剖科学进展*, 2004, 10(2): 112 - 115 (收稿: 2007 - 06 - 12)