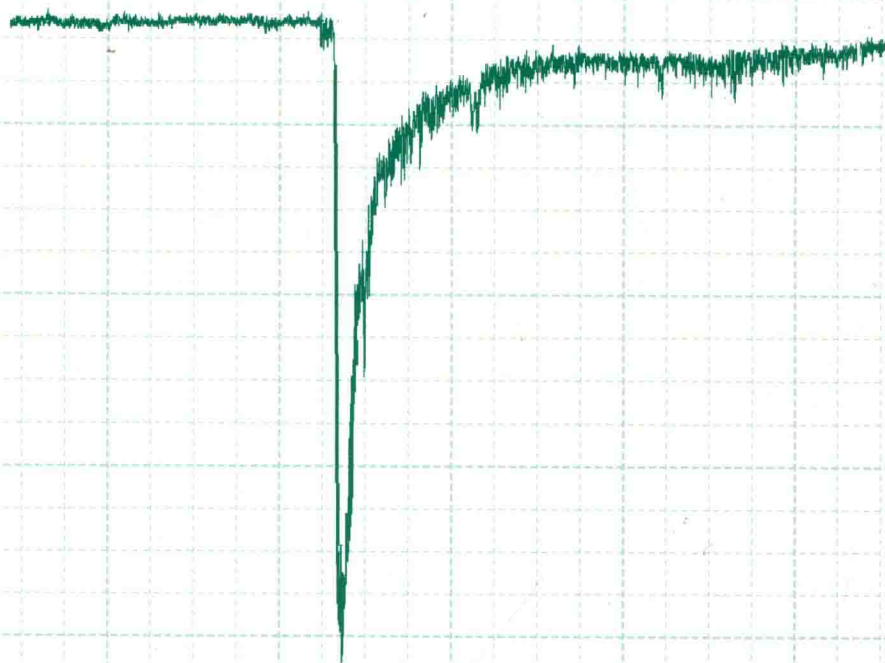


膜片钳技术 在医学中的应用

蔡浩然 编著



北京大学医学出版社

膜片钳技术在医学中的应用

蔡浩然 编著

北京大学医学出版社

MOPIANQIAN JISHU ZAI YIXUE ZHONG DE YINGYONG

图书在版编目 (CIP) 数据

膜片钳技术在医学中的应用 / 蔡浩然编著. —北京: 北京大学医学出版社, 2016.1

ISBN 978-7-5659-1143-9

I. ①膜… II. ①蔡… III. ①质膜—生物技术… IV. ①Q241

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 和 139781 号

膜片钳技术在医学中的应用

编 著: 蔡浩然

出版发行: 北京大学医学出版社

地 址: (100191) 北京市海淀区学院路38号 北京大学医学部院内

电 话: 发行部 010-82802230; 图书邮购 010-82802495

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E-mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京瑞达方舟印务有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 马联华 责任校对: 金彤文 责任印制: 李 啸

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 25 字数: 650千字

版 次: 2016年1月第1版 2016年1月第1次印刷

书 号: ISBN 978-7-5659-1143-9

定 价: 96.00 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

本书由

北京大学医学科学出版基金
资助出版

作者简介

蔡浩然，北京大学第一医院教授，博士生导师，国际神经行为学会会员，中国生物物理学会会员，中华医学会会员，中国神经生理学学会会员，《中国斜视与小儿眼科》杂志编委，《国际眼科学杂志》常务编委。1956年考入北京大学生物系生理学专业，1963年毕业；同年分配到中国科学院心理研究所任实习研究员。1973年调到中国科学院生物物理研究所，先后任实习研究员、助理研究员和副研究员。1981—1983年，受德国洪博基金资助，在联邦德国进修，并在 Kassel 大学获博士学位。1986年调到清华大学生物系任副教授。1987—1988年，应日本科技振兴会（JSPS）邀请，在日本东京大学讲学和从事合作研究。1989年，调到北京大学（原北京医科大学）第一医院，先后任副教授、教授、博士生导师。1991—1992年，在澳大利亚国立大学，以及1996—1997年，在美国布法罗纽约州立大学，讲学和从事合作研究。1992年起享受国务院政府特殊津贴。几十年来，一直从事视觉生理和生物物理的研究与教学工作；主讲神经生理学、临床视觉电生理学等；从事视觉电生理与视觉信息加工，目标与背景的相互作用，以及视觉诱发电位和儿童视觉发育等方面的研究。近十几年来又建立了脑片膜片钳实验室，深入研究视觉发育敏感期视系突触受体分子机制和其他有关的离子通道病的发病机制。在国际国内刊物上发表过80多篇论文。著有《视觉分子生理学基础》，译著有《视觉生理与仿生学》《声和听觉》等书。

在生理学和生物物理学领域,电生理技术一直是极受重视的。从科学发展历史来看,电生理技术对于探讨和阐明各种客观生理规律和发病机制起到了重要作用,它与其他自然科学一样,也是从粗浅到深入逐渐发展起来的。自意大利学者 L. Galvani (1737—1798 年)发现生物组织的电活动以来,有关生物电现象及其本质问题的研究便一直延续至今。18 世纪七八十年代,生理科学中的电生理学领域得到了快速发展;随后,研究的目标则从整体和器官水平,逐渐深入到单细胞水平——进行细胞外与细胞内电信号的记录。至今,在电生理学领域,离子单通道记录已成为常规的方法,因为生物电导变化是由各种离子通道的开放与关闭而导致的观点几乎已被人们普遍接受。Katz 和 Miledi (1972 年)最初提出了各种离子通道介导的跨生物膜离子流是最令人信服的早期证据,尔后,他们的观点被膜片钳方法直接证实。20 世纪八九十年代, Sakmann 和 Neher (1991 年诺贝尔奖获得者)发展了膜片钳 (patch clamp) 技术,使人们能对各种类型的细胞的各种各样的离子通道进行广泛的探索和研究。膜片钳技术使人们有可能在低于毫秒的时间分辨率下,测量跨越细胞膜的单个离子通道的极其微弱的电流。离子通道首先是根据对透过它们的离子进行选择性的分类,因此,机体的各种细胞存在可使 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 和 H^+ 等离子选择性透过的离子通道。离子通道的明显生物物理特性包括:单个通道的电导 (也就是每秒能有多少个离子通过通道,这个数值是 10^6 或更多),以及透过各种不同离子的能力和次序等。根据通过离子的体积,可判断通道的大小;以及根据开放的持久性,可判断通道是否有“整流作用”以及是内向或外向整流等。这些因素如何影响这种离子单个通道的电导?通道的门控机制 (通道是如何开放或关闭的)赋予选择性通道的特异类型。例如,膜电位从它的正常静息水平去极化,可激活电压依赖性通道,这些离子通道属于电压门控离子通道。而其他一些通道则可能由激动剂、细胞质的钙或细胞内的其他信使使激活,这些就是配体门控离子通道。自 20 世纪八九十年代以来,这一领域更得到了飞速发展。现在,人们不仅对单个较大的细胞能直接开展从胞内记录较大细胞的电信号,而且也可以用微小的单细胞 (直径为 $10\text{ }\mu\text{m}$ 左右)或从细胞上“撕”下的一小片细胞膜 (即所谓的“膜片”, patch) 作为研究对象,对镶嵌在膜上的各种活的、跨膜蛋白质大分子 (离子通道) 的生理功能进行深入的研究,即直接深入研究活细胞膜上蛋白质分子 (离子通道) 的各种生理功能,使以往仅仅从理论上推断的一些生命活动规律 (如跨膜离子交换等) 能直接可用实验加以证实。

离子通道是一类能通过特定离子、贯穿细胞膜的亲水性蛋白质孔道,它们可使带电的离子进行跨膜转运,是神经、肌肉、腺体等多种组织细胞膜上的基本兴奋单元,能产生和传导电信号,具有重要的生理功能。离子通道种类繁多,目前已经发现有上百种通道存在于生物体的各类细胞中。无论是动物还是植物,也无论是单细胞生物还是多细胞生物,都拥有各种各样的离子通道。离子通道不仅直接与细胞的兴奋性相关,还影响和调制递质释放、腺体分泌、肌肉收缩、细胞分裂、生殖、学习、记忆,对调节细胞体积和内环境稳定

等起着重要作用。通过对离子通道的研究,已经初步形成了一套理论体系和相应的实验技术,该学科涉及生命科学的诸多方面,并且与分子生物学、细胞生物学、分子遗传学、生理学、病理学和药理学等学科密切联系,属于交叉学科。

尤其重要的是,在以往的临床实践中,电生理技术只能用于进行一些无创伤的临床检测(如 EEG、ECG 和 VEP 等)。自膜片钳技术问世以来,结合基因工程、分子生物学技术,在临床诊断、治疗、药效检测等方面,临床医学各个领域的离子通道病研究大量应用了该技术,取得的成果也像雨后春笋一样。应用膜片钳技术所发表的论文不仅在国际神经科学的学术年会上占绝大多数,而且这类论文在各种主要的生物医学科学的学术刊物上的比重也占绝对优势。由此可见,膜片钳技术已成为当今世界上电生理学领域中最先进的电生理技术。

膜片钳技术最初主要是以分离的单细胞作为研究对象而发展起来的,后来逐渐过渡到用所谓的“盲法”脑片膜片钳,以及近年来利用“水镜头”和近红外差分干涉成像技术(NR-DIC)。后者的发展使人们逐渐能在可视条件下对活的组织片甚至活的整体动物进行体内(in vivo)膜片钳记录,这样既可避免因应用分离细胞改变了细胞周围生存环境带来的影响,同时还可以保持所记录的细胞与周围细胞的正常生理突触(synapse)连接,因而可以深入研究神经元之间的突触神经递质及突触受体的生理功能,大大扩展了应用膜片钳技术的研究领域。相关学者结合分子生物学和基因工程等方面的新技术,陆续发现了更多的各种各样的离子通道,并且把这些通道的缺失或功能异常与相关的疾病联系起来加以研究,由此创造出了一个医学名词,即离子通道病(channelopathy),用来表示一类与离子通道有联系,并且与日俱增的疾病。例如,在 K_v7 离子通道亚家族的 5 个成员中,就有 4 个与离子通道病有关。所谓离子通道病是由于离子通道功能的丧失而引起的遗传性疾病。在国际上,临床医学各科早已广泛应用膜片钳技术对与离子通道相关的各种离子通道病加以研究。近年来,我们在北京大学第一医院呼吸内科、心内科、中西医结合科、麻醉科、儿科、小儿眼科和抗感染科等学科都有多个科研课题应用膜片钳技术,开展了相应的发病机制和疗效等方面的研究,然而这仅仅是起步,一些不成熟的结果在本书中也有所反映,希望能够起到抛砖引玉的作用。

本书前半部分主要介绍膜片钳技术原理和仪器原理,以及具体操作和注意事项等。各章节都是深入浅出地加以介绍,尽量使读者在掌握基本原理的基础上,迅速学会仪器的使用,并根据各自研究的课题正确设计相应的实验、成功地开展实验、掌握实验数据的采集和分析方法。本书后半部分主要论述当今应用膜片钳技术研究可兴奋细胞膜上众多膜离子通道特性的最新进展,介绍膜离子通道研究在临床发病机制和药理方面的应用。例如,药物作用在某些离子通道(受体)上导致细胞的特定的离子通道的特性改变,通过对后者的研究可以达到检测药效和毒理作用的目的。至于与临床医学的结合,我们不仅介绍了儿童视觉发育与弱视产生的分子病理、生理生物学机制,也介绍一些离子通道的基因突变与一些常见的老龄化相关的慢性疾病,例如,疼痛、帕金森病、阿尔茨海默病、心律失常、睡眠呼吸暂停综合征、糖尿病、局灶节段性肾小球硬化症(FSGS)等一类肾病、肿瘤和免疫功能障碍等发病机制有关的各种离子通道,以及应用相应受体的激动剂或抑制剂进行疾病治疗的一些新思路和可行性的新进展,这为临床各科医生提供了许多重要的信息,因此,本书也是临床各级医生深造的重要参考书。本书还介绍了用膜片钳技术研究一些因神经元和(或)心肌细胞膜兴奋性的交替变化而产生的起搏、振荡、细胞的谐振和信号传递。另外,介绍了以心肌起搏器为例,

应用遗传工程与膜片钳技术,创造所谓的生物起搏器以代替目前的电子起搏器等方面的新思路,以及这些成果对形成生物体自发节律(如脑电波和心电图)的理论基础产生的影响。总之,本书不仅深入浅出地介绍了膜片钳技术的原理和实验操作,也讨论了一些临床主要的离子通道病发病机制和治疗策略,因此,本书是一本理论性和实用性都很强的当代顶尖电生理学书籍。本书各章节分别列出了相应的主要参考文献。

本书作者自 20 世纪 60 年代开始从事大脑电活动的基础研究,随后从事视觉电生理以及临床视觉电生理研究工作。20 世纪 80 年代,在洪堡基金资助下在德国主要用微电极胞外记录技术开展两栖动物视顶盖神经元视觉功能的研究,先后在国际和国内杂志上发表了 80 多篇重要论文。从 1996 年在美国布法罗纽约州立大学(SUNY, Buffalo)访问从事合作研究起,至今已开展了十多年的膜片钳方面研究工作;在这一研究领域,先后指导了 20 多位本院及外院各科(如心内科、呼吸内科、中西医结合科、麻醉科、眼科、肾内科、抗感染科、小儿眼科和儿科等临床科室)博(硕)士研究生,指导他(她)们研究各自的课题,利用该技术开展与多种临床疾病相关的各种离子通道方面的研究工作。他(她)们不仅圆满地完成了各自的博(硕)士论文,还在中外顶级学术期刊上发表了 20 多篇论文。从事过膜片钳技术研究的毕业生,许多已被聘用到美国哈佛、杜克、南加州等大学从事这方面的博士后工作,近年来都以第一作者的身份在国外顶级学术期刊上发表了多篇文章。本院仍有数名博士研究生在应用膜片钳技术从事各科相关课题的研究工作,因而积累了大量实验数据及国际上最新的数百篇相关的参考文献资料,所涉及的生物医学领域非常广泛,本书将对这些内容加以全面的总结,并尽可能上升到当今前沿的理论高度,这些都为撰写本书奠定了良好的基础。

由于作者所在的实验室十多年来一直不间断地在运用膜片钳技术进行相关的工作,无论是细胞培养、急性分离的单细胞膜片钳记录,还是各种活组织(脑和心肌)片制作,以及应用盲法或 DIC 水镜头法开展活脑片研究,我们积累了大量的实践经验。本书在这些方面进行了深入的总结和细致的介绍,具有良好的实用性,可使从事相关研究的读者更好地掌握相关技术。

本书主要读者为从事生物医学、药学方面的科研工作者,高等学校教师,各级临床医生,博(硕)士研究生,相关专业的高年级本科生,以及在神经科学、药学、生理学、生物物理学和临床医学各学科的科研领域及教学中的专业工作者。作为专业参考书籍,本书也可作为大学本科高年级和研究生院电生理学的专业课教材。

本书第六章至第九章的初稿主要由近几年来和本人一起从事膜片钳工作的李琳助理研究员执笔编写,她在协助指导学生开展实验等方面做了大量的工作,在此谨致衷心感谢。本书后半部分是十多年来由作者及其指导下的十余名科研型博(硕)士研究生(包括温晓红、王红、李少敏、刘燕、朱丹、李婍、李康、徐雪峰、陈一帆、张荣媛和姜丽娜等)精心收集的北京大学第一医院膜片钳实验室的第一手资料,他(她)们收集了与其学位论文或研究课题有关的国内外相关文献资料,先后在膜片钳实验室开展实验,积累和整理了原始实验数据,在此向他(她)们的辛勤劳动致谢。

本书具有膜片钳技术与临床医学研究相结合的特色,叙述力求平妥准确,不仅科学性较强,而且资料新颖有趣,文字生动流畅。每章都配有一些相应的插图,图文并茂,以供读者了解相关内容。对于需要解释的主要术语、化学试剂和专业名词等,则统一以原文注

释提供参考，帮助读者理解，也使文章内容更畅达易懂。尽管本书的确是一本可读性高和实用性强的电生理学读物，但本书作者的观点难免有某些偏颇之处，还请读者多多指正。本书得以出版，还要感谢北京大学医学科学出版基金的支持和资助，作者衷心感谢北京大学医学出版社。

	第一章 生物电信号和电生理学技术 1		
第一节	细胞膜的结构和功能.....1		
第二节	细胞膜的静态电学特性.....5		
第三节	人体的生物电信号和电生理学的发展.....8		
第四节	突触的结构和功能.....11		
第五节	突触的分类.....12		
第六节	突触后电位(流) 与微突触后电位(流).....14		
第七节	神经胶质细胞及其功能.....20		
	第二章 膜片钳实验标本的制备 ... 23		
第一节	电极内、外液的成分和配制...23		
第二节	电极(记录电极和参考电极) 和电极夹持器.....24		
第三节	振动切片机的使用.....28		
第四节	健康、成活标本的制备(孵育、切片和灌流等)方法.....30		
第五节	大鼠心室肌细胞的急性分离.....32		
第六节	主动脉平滑肌细胞的培养.....34		
第七节	平滑肌细胞总RNA的提取以及RT-PCR.....35		
	第三章 数据采集与分析的基本原理 44		
第一节	分析水平.....44		
第二节	数据的采集和预分析.....45		
第三节	单通道电流的数据分析.....49		
		第四节	宏电流分析.....54
		第四章 电信号的采集与记录方案的设置 60	
		第一节	Clampex数据采集软件的窗口.....60
		第二节	数据采集.....66
		第三节	I-V关系的分析.....70
		第五章 膜片钳记录的操作过程 .. 79	
		第一节	千兆欧姆封接.....79
		第二节	形成封接的过程.....81
		第三节	几种记录模式.....82
		第四节	电流钳与电压钳.....87
		第五节	全细胞记录.....88
		第六节	穿孔膜片钳记录.....92
		第七节	分离单细胞和脑片膜片钳.....94
		第六章 生命有机体的离子通道 103	
		第一节	离子通道的发展和进化.....103
		第二节	离子通道的命名.....104
		第三节	离子通道的家族.....105
		第四节	离子通道的电流-电压关系(I-V).....105
		第五节	离子选择性.....107
		第六节	离子通道的多样性.....108
		第七节	离子通道的阻断剂.....109
		第八节	离子通道的结构.....110

 第七章 钙离子通道.....111	第七节 嘌呤能受体161
第一节 钙离子通道存在于所有的 可兴奋细胞111	 第十章 尖峰电位爆发(簇)、谐 振和双稳态与阈下振荡...164
第二节 Ca^{2+} 可以调节肌肉收缩、 细胞分泌和门控特性113	第一节 神经元的尖峰电位和两种 反应模式164
第三节 Ca^{2+} 赋予细胞的电压依赖性...116	第二节 尖峰电位爆发(簇)168
第四节 多通道类型:二氢吡啶 敏感的离子通道118	第三节 神经元的谐振特性和 频率选择173
第五节 神经元有多种HAV钙离子 通道亚型119	第四节 谐振和选择性通信177
第六节 钙离子通道的分类119	第五节 平台电位、双稳态和簇振荡...181
第七节 电压依赖性钙离子通道的 分子结构120	第六节 神经元的阈下振荡183
第八节 钙离子通道的功能特性121	 第十一章 视觉发育过程中突触 连接的可塑性与弱视的 发病机制.....187
 第八章 钾离子通道和 钠离子通道128	第一节 视觉发育过程中的敏感期...187
第一节 钙激活钾离子通道129	第二节 敏感期突触修饰的机制190
第二节 内向整流钾离子通道134	第三节 视皮层功能变化的细胞和 分子生理学机制193
第三节 双孔钾离子通道137	 第十二章 长时程增强效应 与抗老年痴呆症.....209
第四节 电压门控钠离子通道140	第一节 海马结构与学习记忆的 功能209
第五节 非电压门控钠离子通道(上 皮的钠离子通道, ENaC) ..150	第二节 β 淀粉样蛋白在Alzheimer病 中的神经毒性213
 第九章 配体门控离子通道.....153	第三节 中药淫羊藿苷逆转 β 淀粉样 蛋白效应221
第一节 配体门控受体结构153	第四节 淫羊藿苷和 $\text{A}\beta_{25-35}$ 对钙离子 通道和海马神经元突触传递 的影响223
第二节 激动剂通过多种途径作用于 ACh受体.....154	 第十三章 痛觉与离子通道.....231
第三节 终板电流的衰减反映通道 门控动力学的特性155	第一节 疼痛的分子机制231
第四节 配体门控受体的去敏作用...157	
第五节 尼古丁乙酰胆碱受体介导的 非选择性阳离子电流157	
第六节 毒覃碱乙酰胆碱受体介导的 M-电流($I_{\text{K(M)}}$)159	

第二节 离子通道在疼痛过程中的作用	243
-------------------------	-----

第十四章 G-蛋白偶联受体与帕金森病..... 249

第一节 受GPCR调制的离子通道	249
第二节 肾上腺素受体	256
第三节 多巴胺和多巴胺受体	258
第四节 多巴胺受体与帕金森病	260

第十五章 离子通道与心脏节律... 271

第一节 离子通道与心脏动作电位 ...	271
第二节 HCN通道的起搏器电流与心脏节律的维持	272
第三节 KCNE辅助亚单元与K _v 通道的相互作用	274
第四节 K _v 7.1 (KCNQ1) 电压依赖性钾离子通道家族	276
第五节 与ether-a-go-go基因相关的电压门控钾离子通道	277
第六节 HERG 钾离子通道和心律失常	279
第七节 人工生物窦房结起搏器	283

第十六章 离子通道与呼吸系统的生理功能和疾病..... 286

第一节 离子通道与呼吸节律活动 ...	286
第二节 双孔钾离子通道	290
第三节 TASK-1和呼吸调控	292
第四节 阻塞性和中枢性睡眠呼吸暂停	297
第五节 中脑舌下运动神经元的TASK1离子通道的电信号	299

第十七章 K_{ATP}通道及其相关的主要疾病..... 309

第一节 K _{ATP} 通道, 使细胞的代谢与细胞的兴奋性相关联	309
第二节 胰腺内分泌细胞的离子通道及其在糖尿病中的作用	314
第三节 婴幼儿先天性胰岛素功能亢进	319
第四节 新生儿持久性糖尿病	321

第十八章 瞬态受体电位阳离子通道家族与肾病... 328

第一节 多种复合阳离子通道TRP家族	328
第二节 肾小球的结构及肾小球硬化症的发病机制	332
第三节 培养的单个足细胞中的TRPC6	341

第十九章 肿瘤、细胞增殖和凋亡与离子通道..... 347

第一节 离子通道与癌症	347
第二节 凋亡涉及的离子通道	352

第二十章 免疫和活细胞的离子通道..... 359

第一节 离子通道调节免疫反应的作用	359
第二节 淋巴细胞离子通道的分子鉴定和结构与功能分析	363
第三节 生命活动中的离子通道及其展望	373

彩图 377

第一章

生物电信号和电生理学技术

关于生物电产生机制的学说，目前流行的主要是在 Bernstein (1902 年) 的膜学说 (membrane theory) 基础上的离子学说 (ionic theory)。因此，我们在介绍生物电之前，首先要简单回顾一下细胞膜的结构和功能，然后再介绍跨膜的生物电信号是如何产生的。

第一节 细胞膜的结构和功能

当前医学研究的特点之一是分子生物学已广泛地渗透到医学科学的各个领域，而且随着科学技术的迅猛发展，目前有可能将分子生物学与电生理学紧密地结合起来，膜片钳技术就是这种结合的一个范例。由于膜片钳技术研究的主要对象是细胞膜，因此，在这里首先简单介绍一下细胞膜的结构和功能。

一切可兴奋的细胞（包括神经细胞和心肌细胞等）的细胞膜都是由类脂双分子膜上镶嵌的一些跨膜蛋白质分子所构成，此外还有一些糖类等物质。各类物质分子，尤其蛋白质和类脂的分子，在膜中的排列形式对细胞膜的功能起决定性的作用。有关细胞膜的分子排列，过去提出过很多学说，目前看来，液态镶嵌模型能比较满意地说明各种生理现象。图 1-1 就是这种细胞膜的镶嵌模式图。

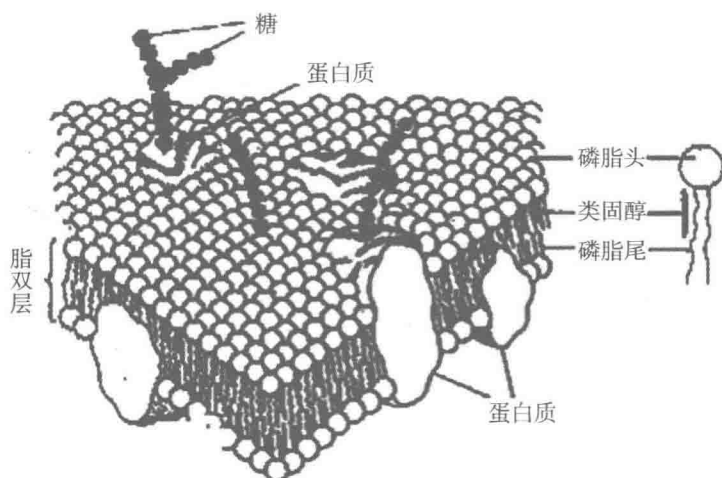


图 1-1 细胞膜的模式图

我们在此要特别强调,膜最主要的成分是双层分子,这些类脂双层分子是膜的基本架构。膜中的类脂主要是磷脂。每一个磷脂都由一个头部和两个尾部组成。头部是可溶于水的亲水端,而尾部则是不溶于水的疏水部分。膜的类脂结构是以两层分子尾尾相接,而两个亲水的头部则形成膜的内侧和外侧。这样就排列成了类脂双分子层。蛋白质分子则镶嵌在由类脂双分子层构成的骨架内。

类脂双分子层是不能让无机离子透过的,而跨膜蛋白质分子在一定条件下可有选择性地让某些无机离子透过,这样就造成了膜内、外各种无机离子的浓度、电荷以及渗透压等不完全相同。下面分别介绍这些参数在细胞膜内、外的差别及其相关特性。

一、细胞膜内外离子浓度的差别与浓差电位

早在1902年,Bernstein就根据当时所发现的一些生物电现象提出了膜学说。这一学说认为,生物组织在没有受到刺激或不兴奋时,本身就有生物电存在,这是由于膜内、外的钾离子(K^+)浓度不同,膜内浓度比膜外浓度高,所以在膜内、外两侧就形成了电位差,膜外的电位比膜内的电位更正,这就是膜电位。

由于在不同生理状态下,透过膜的各种离子的数量各不相同,因而呈现出不同的膜电位。离子透过细胞膜的运动由两种不同的机制所支配。一种机制是扩散作用,即通过单位面积膜的离子数量,这又取决于膜对某种离子的通透性和这种离子的电化学梯度;另一种机制则是离子逆电化学梯度而移动,这是一个耗能的过程,如所谓的“钠钾泵”就是这种机制。在此先介绍前一种机制,这里以氯离子(Cl^-)为例加以说明。

由于细胞膜只能有选择性地透过某些无机正、负离子,这就造成了一些主要的离子(如 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 等)在细胞内外的浓度不完全相同。一般来说,在静息状态下,细胞膜外的 Na^+ 和 Ca^{2+} 浓度比膜内的高,而膜内的 K^+ 浓度则比膜外的高。另外,某些带负电荷的较大的有机分子是不可以透过膜的,这又造成了 Cl^- 浓度在膜内外有差别,使得膜外的 Cl^- 浓度也比膜内的高。在静息状态下,离子既可以从膜外流向膜内,也可以从膜内流向膜外。当 Cl^- 从膜外流向膜内时,带正电荷的正离子则从细胞外液向带负电荷的细胞内逆电化学梯度而流动;相反,另外还会有一些 Cl^- 从膜内向膜外顺电化学梯度流动。当膜内、外 Cl^- 浓度相等时,向内流的离子量远远少于向外流的离子量,这就是由膜内、外离子浓度决定的浓度差电位。如果把细胞膜内、外 Cl^- 浓度调整到正好等于计算得出的数值,则进出细胞膜的数目相等,而达到了稳定的动态平衡状态,此时,膜内、外的电位差就是该离子的平衡电位。在此电位下,人们观察不到 Cl^- 向内或向外流动所引起的电流。如果偏离了这一电位, Cl^- 就不是由细胞外向细胞内(叫“内向电流”)流动,而是由细胞内向细胞外流动(叫“外向电流”)。也就是说,高于或低于这一电位,该离子都要流动,因而相应地产生负内向电流或正外向电流,即在平衡电位的上下电位,电流的方向发生了反转,所以又把平衡电位称为“反转电位”。不同离子在膜内外的浓度各不相同,因此,各种不同的离子也具有其独特的平衡电位。利用膜片钳技术不断地改变膜电位,可以测定在不同电压下相应的电流值,当电流反应为“0”时,则为该状态下的平衡电位。进而可以通过该反转电位值推导出携带该电流的是哪几种离子,从而推断出这种电流是哪几种离子的电流。各种正、负离子电流反转电位的总和,便构成了当电流为“0”时的静息电位。 K^+ 电流的反转平衡电位为 -70 mV ,而 Cl^- 电流的平衡电位为 -90 mV 。有关各种主要离子电流的平衡电位值,以后在相关章节还要进行详细的介绍。

然而,在此还需要指出的是,当细胞处在静息状态时,从细胞膜内、外两侧是测不出电流流动的,也就是说,处于静态的细胞其膜电流为零。但此时还是有 $-60 \sim -70 \text{ mV}$ 的静息电位,因为此时膜外的 Na^+ 和 Cl^- 的浓度要比膜内的高得多,而膜内的 K^+ 浓度又远高于膜外的,这些离子肯定要顺着浓度差从浓度高处向浓度低处流动。实际上,活细胞一直维持着这种因膜内外离子浓度差而形成的静态电位。前面曾提到,能维持这种状态,是由于细胞内还存在着另一种机制,这种机制能使离子逆浓度梯度或电化学梯度流动,使离子从浓度低处流向浓度高处。 Na^+-K^+ 泵就是这种机制主要作用之一,它是由一个内向的 K^+ 泵和外向的 Na^+ 泵耦合组成的,这样便产生了按离子浓度梯度而扩散的逆向流动。总之,顺离子浓度梯度的扩散作用与 Na^+-K^+ 泵的作用相同但方向相反。 Na^+-K^+ 泵的作用是使 Na^+ 从浓度低的膜内泵出到浓度高的膜外,与此同时,又要将 K^+ 从浓度低的膜外泵回到浓度高的膜内,这是一个需要消耗能量(如 ATP)的过程。因此,维持细胞的静息电位,是靠一个主动的 Na^+-K^+ 泵作用和一个被动的离子扩散运动过程相互作用形成的动态平衡。

关于细胞膜内、外离子浓度差,哺乳动物细胞与两栖动物细胞又有所不同,因此,这两类动物的静息电位也有所不同。下面是根据膜内、外离子浓度差,用电化学中的公式来计算的细胞膜电位。

假设膜内溶液浓度为 C_i ,膜对 K^+ 和 Cl^- 是可通透的,而对 P^- (如蛋白质、多肽等)是不可透的。由于膜两边在电化学上是中和的,因而进入膜内的 K^+ 和 Cl^- 同样多。假设进入的 K^+ 和 Cl^- 的浓度为 x 后达到动态平衡,此后进出膜外的 KCl 速度一样大,按质量定律,则得:

$$[\text{K}^+]_i[\text{Cl}^-]_i = [\text{K}^+]_o[\text{Cl}^-]_o$$

这种平衡称为多南 (Donnan) 平衡。由该方程可见, x 值小于 $C_o - x$, 而 $(C_o - x)$ 又小于 $(C_i + x)$ 。也就是说,当膜内有不可渗透的负离子 (P^-) 时,膜内可渗透的正离子 (K^+) 的浓度 $(C_i + x)$ 大于膜外的浓度 $(C_o - x)$; 而膜内的可渗透的负离子 (Cl^-) 的浓度 (x) 则小于膜外的浓度 $(C_o - x)$ 。已知膜内 Cl^- 的浓度可用 $[\text{Cl}^-]_i$ 表示,膜外 Cl^- 的可用 $[\text{Cl}^-]_o$ 表示,并假设膜内、外 Cl^- 都相对同一电极(参考电极),则膜内 Cl^- 的浓差电位 E 为:

$$E_i = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[\text{Cl}^-]_i}{C}$$

而膜外 Cl^- 的电位 E 为:

$$E_o = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[\text{Cl}^-]_o}{C}$$

式中 Z 是该元素的原子价, R 为气体常数, T 为绝对温度, F 为法拉第常数, C 为离子浓度。就 Cl^- 而言,由上述两式可得出膜内相对膜外的浓差电位 E 为:

$$\begin{aligned} E &= E_i - E_o = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[\text{Cl}^-]_i}{C} - \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[\text{Cl}^-]_o}{C} \\ &= \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[\text{Cl}^-]_i}{[\text{Cl}^-]_o} = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[\text{K}^+]_o}{[\text{K}^+]_i} \end{aligned}$$

因 K^+ 和 Cl^- 的 Z 都是 1 价, 故在室温 (如 $25^\circ C$) 下, 膜内相对于膜外的浓差电位为:

$$E = 59 \log \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_o} = 59 \log \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}$$

上述公式表明: 膜电位的大小取决于膜两侧同种离子浓度的比值。如膜内 K^+ 的浓度为 1 mol , 膜外为 10^{-3} mol , 则代入上述公式可得:

$$E = 59 \log 10^{-3} = -177 \text{ mV}$$

当膜电位达到一定值时, 就可使离子流动达到动态平衡。细胞处在静息状态下, 膜内 K^+ 浓度比膜外高 100 倍。细胞的静息电位, 膜内相对于膜外为 -60 mV 左右。总之, 离子学说对静息电位的解释基本上是正确的, 但实际测得的值总要比根据理论计算出的值小, 而且 K^+ 的浓度的对数与膜电位之间的线性关系也只有在一定范围内才适用, 膜片钳方法测得的结果也是如此 (见第十六章)。根据理论计算时, 都假定离体标本的通透性处于稳定状态, 但事实上即使标本处在完全接近生理环境的条件下, 其通透性也不可能处于稳定状态。此时, 膜对 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 的通透性都不能完全忽视。因此, Hodgkin 和 Katz (1949 年) 利用 Goldman (1943 年) 提出的定场学说推导出如下公式:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_o}{P_K[K]_o + P_{Na}[Na]_o + P_{Cl}[Cl]_i}$$

式中: P_K 、 P_{Na} 、 P_{Cl} 分别指 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 的通透性常数。在静息状态下, 细胞膜的通透性常数分别为: $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0.04 : 0.45$, 根据这个公式计算出的结果与实际测得的值基本接近。

二、细胞膜的半透性与内外渗透压

细胞膜是一层极薄 (约 10 nm) 的半透膜, 氧气和营养物质都要通过这层膜才能进入细胞内, 细胞内的产物也得通过这层膜排出。有关由半透膜隔开的电解质溶液, 除了具有前面介绍的重要的电化学特性外, 渗透压也是一个很重要的物理属性。当把一个细胞放在不同浓度的蔗糖溶液中时, 由于细胞膜是可以让水分子自由进出的, 因此, 如果蔗糖溶液的浓度高, 则水分子从细胞内流出到细胞外, 细胞逐渐皱缩; 反之, 如果蔗糖溶液的浓度很低, 则水分子将逐渐进入细胞内, 使细胞体积变大, 以致最后整个细胞破裂。因此, 就水分子而言, 它是由浓度高的地方往浓度低的地方流, 可见渗透压只是扩散的一种特殊情况。将细胞置于某种溶液中, 如果该溶液的渗透压大于细胞本身的渗透压, 则把这种溶液称为高渗溶液, 反之称为低渗溶液。如果两者的渗透压相等, 则称为等渗溶液。在膜片钳实验进行过程中, 调好溶液的渗透压是需要特别注意的, 一定要把玻璃微电极内液、细胞或脑片孵育液以及灌流液等的渗透压调至与被记录细胞内的渗透压相等。同时, 还要注意, 不同种类动物的同类细胞的渗透压之间差别也很大。如果所用溶液的渗透压与细胞的正常渗透压不同, 则不可能维持活细胞的健康状态, 因而也无法进行下一步的膜片钳实验。

有关渗透压的来源, 早年范特 - 荷普提出了一个学说, 该学说认为, 在非常稀释的电解质溶液中, 溶质分子与气体分子相似, 可以认为渗透压是由溶质分子碰撞半透膜的结果。故

渗透压 P 可以用蒙德雷也夫 - 克拉比尤公式表示:

$$P = \frac{m}{\mu V} RT$$

式中 m 是溶质的质量, μ 是它的分子量, V 是溶液的体积, R 是气体常数。由于我们又知道:

$$C = \frac{m}{\mu V}$$

公式中, C 是溶液的浓度, 以每千克水中含多少克溶质表示, 因此, 上式则可改写为: $P = CRT$, 由该公式可知: ①在一定温度下, 已知溶质的渗透压 P 与其浓度成正比; ②如果浓度一定, 则已知溶质的渗透压 P 与溶液的绝对温度 T 成正比。以上两点都得到了实验的证实。但对电解质的渗透压, 情况则有所不同。有人测定过 20°C 时 0.2 mol 的 NaCl 溶液, 发现它的渗透压是在相同温度下蔗糖溶液的 1.8 倍, 这一结果与范氏公式有很大出入, 原因是: NaCl 是电解质, 它在水中解离成正、负离子, 由于离子数目增多了, 所以渗透压也增大了。假设 1 克分子 NaCl 中有 a 克分子解离为 Na^+ 和 Cl^- , 则未解离的 NaCl 为 $(1 - a)$, 那么在电解质溶液中, 分子和离子总数为 $(1 - a) + 2a$ 克分子。因此, 电解质中起着气体分子作用的质点数目是同浓度非电解质的 $(1 + a)$ 倍, 这个倍数叫等渗系数或范氏系数 (i), 即 $i = 1 + a$, 于是范氏公式则为:

$$P = iCRT。$$

在膜片钳实验切片过程中, 有时要用到分子不能解离的蔗糖溶液, 但在更多情况下, 要用到的是由多种电解质组成的生理盐水。对于某一特定动物的脑片或细胞, 要求所用各种溶液的成分都是相同的。这里需要特别注意的是, 已知配成任氏液的多种电解质成分及其质量 (各有多少毫克), 此时不能简单地用此溶液的毫克分子数除以 2 作为蔗糖的毫克分子数, 因为并不是所有的电解质都能解离成两个质点 (离子), 所以应该用此溶液的毫克分子数除以范氏系数 “ i ” 来计算蔗糖的毫克分子数。不同种类的动物的同种组织的渗透压差别很大, 如两栖动物的脑细胞的渗透压就比大鼠的脑细胞的渗透压低很多。测量渗透压的方法很多, 其中以直接法最为简便, 根据液柱上升的高度即可直接读出该溶液的渗透压。较大医院的检验科即可协助进行快速渗透压的测定。

第二节 细胞膜的静态电学特性

一、膜电阻和膜电导

在本章上一节中, 我们已简单介绍过细胞膜都是由类脂双分子和一些跨膜蛋白质分子构成的; 在此, 我们要特别强调, 膜的最主要的成分是其双层分子结构, 这些类脂双层分子是膜的基本架构, 膜中的类脂主要是磷脂; 类脂双分子膜是无机离子不能透过的, 也就是说, 它对要透过的带电离子有很大的阻力。因此, 细胞膜虽然很薄, 但具有很大的电阻。