



华夏英才基金学术文库

关兵才 张海林 李之望 主编

细胞电生理学基本 原理与膜片钳技术

Basic Principles of Cellular Electrophysiology
and Patch Clamp Techniques



科学出版社

陈武平 潘海强 李士强 主编

细胞电生理学基本 原理与膜片钳技术

Basic Principles of Cellular Electrophysiology
and Patch Clamp Techniques



华夏英才基金学术文库

细胞电生理学基本原理与膜片钳技术

Basic Principles of Cellular Electrophysiology and Patch Clamp Techniques

关兵才 张海林 李之望 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书内容包括:细胞膜的电学效应及其等效电路的分析,膜片钳实验系统工作原理、伪迹信号的消除和各种误差的补偿,电极的制备与溶液的配制,降低噪声和排除干扰的方法,膜片钳实验操作步骤与注意事项,膜片钳技术的扩展性应用,细胞电生理实验标本的制备,各种离子通道的生物物理及电生理学特性,细胞电生理学常见问题解答等,其中穿插与电生理学相关的电学基础知识、细胞电生理实践经验的介绍以及对某些理论问题较为深入的探讨。

本书适合于细胞电生理实验研究人员,尤其是日益增多的膜片钳使用者,并可以向医学和生物学领域的教师及研究生介绍不易理解的细胞电生理学基本原理与膜片钳技术。

图书在版编目(CIP)数据

细胞电生理学基本原理与膜片钳技术/关兵才,张海林,李之望主编. —北京:科学出版社,2013

(华夏英才基金学术文库)

ISBN 978-7-03-035845-5

I. ①细… II. ①关… ②张… ③李… III. ①细胞-电生理学
IV. ①Q424

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 251253 号

责任编辑:莫结胜 岳漫宇 贺窑青 / 责任校对:林青梅

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:陈 敬

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

装 订 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013 年 1 月第一次印刷 印张:24 1/4 插页:4

字数:553 000

定价:88.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

人体和动物体的各种功能活动几乎都直接或间接地与生物电现象有关,而各种生物电现象的基础是细胞水平的电活动。因此,细胞电生理学是整个机能科学的重要基础,细胞电生理学技术也成为医学和生物医学研究中重要而独特的实验手段。20 世纪四五十年代,Alan Hodgkin、Andrew Huxley、Kenneth Cole、Howard Curtis、Bernard Katz 等一批杰出的科学家利用自己设计制作或改进的电子仪器及枪乌贼巨轴突等有利的标本,结合他们高超的艺术性思维技巧所做的系列工作,为细胞电生理学奠定了坚实的基础。1976 年德国马-普生物物理化学研究所的科学家 Erwin Neher 和 Bert Sakmann 首创了膜片钳技术,可以记录到单个离子通道的电活动。该技术到 80 年代初完善成熟,逐渐成为生物学和医学领域常规的实验研究手段。这一技术的出现从思维角度上虽未必能超越 Hodgkin 等前贤,但极大地推进了人们对离子通道以及其他膜蛋白功能的研究和认识深度,使电生理学这一古老的学科呈现出空前的生机。

早在 20 世纪 60 年代初,我国生理学界冯德培、张香桐、刘育民等前辈在上海举办了影响深远的电生理训练班,数十名学员来自全国各地,他们成为我国电生理学的第一批“种子”。其后,我国的电生理学研究也曾红火一时,但就细胞内记录等细胞水平的电生理学技术而言,由于其难度较大,能长期传承、应用的单位并不多。膜片钳这一细胞电生理新技术在我国起步于 20 世纪 80 年代末,经过十余年的徘徊之后,逐渐呈现出遍地开花之势,购置膜片钳实验系统的单位越来越多。但就我们了解的情况来看,这些先进的电生理仪器并未很好地发挥作用,有的甚至长期处于闲置状态,主要原因是细胞电生理学技术涉及较多的电学和电化学知识,专业性比较强,对使用者的知识结构和动手操作能力要求均较高。而我国的电生理实验研究人员多数具有医学类或生物学类专业背景,因此普遍感到在理解膜片钳技术上有困难,真正掌握并能较好地应用此技术的人还比较少。

同时,我国出版的有关细胞电生理学和膜片钳技术方面的参考书非常匮乏,一些译著也不太适合我国的国情,同行们普遍希望能有针对性对我国读者撰写的此类专著问世。鉴于这种现状,我们原打算把个人对电生理学技术的认识及实践经验整理一下,写本小册子供大家参考。后来了解到,读者除了需要理解掌握细胞电生理学技术(主要是膜片钳技术)及其原理外,还很希望了解各种离子通道的电生理学特性,因此我们决定扩大写作范围。但这仅凭个人的学识和经验是不够的,因此我们邀请了部分电生理学专家和从事一线研究工作的青年教师加盟,各尽其长,编写了本书。本书的作者绝大多数有海外学习或工作的经历,对国内外电生理工作的现状比较了解。细胞电生理学原理与技术涵盖面很广,我们不求面面俱到,而是根据我国细胞电生理实验研究人员(尤其是日益增多的膜片钳使用者)的实际需要,对内容有所取舍,力求写出自己的特色。一方面,我们尽量将细胞电生理学理论和膜片钳技术的基础知识讲清楚,这是“道”的问题,明白了“道”,便可以在工作中自我发挥,即形之于“术”。另一方面,我们也尽量将自己积累的实践经验介绍给读者,使



大家在工作中少走一些弯路。另外,对某些与实验分析相关的理论问题也做了一定深度的探讨。本书力争能够体现出原创性、科学性、易读性和实用性。考虑到多数读者的数理基础较薄弱,本书尽量以简明直观、通俗而不失严谨的方式,把较复杂的细胞电生理学知识讲得清楚些;但是,为了保证内容的科学性,并使读者更好地理解某些理论问题,在必要的时候也使用了一些物理含义比较明确的公式,而且有些公式的推导也是难以避免的。

本书绪论、细胞膜电学效应基本原理、膜片钳技术及问题解答等章由河北医科大学关兵才同志主编,钠通道、钙通道、钾通道和氯通道等章由河北医科大学张海林同志主编,细胞电生理实验标本的制备及记录中的加药方式、配体门控离子通道等章由华中科技大学李之望同志主编。最后由关兵才同志统一修改定稿。在当今市场经济冲击下形成的浮躁、功利化社会氛围中,主持编写这样一部学术著作,可谓艰辛备至,其中甘苦,如鱼饮水,冷暖自知。我们尽最大努力引导作者力戒浮躁心理,并严格把关,经常为核实一个小问题查阅大量资料。所幸的是,在组稿、写作过程中,得到了同行们的大力支持。美国俄勒冈健康科学大学的蒋志根教授应邀担任本书的主审,蒋教授是我国生理学界前辈徐丰彦先生的早期弟子,在电生理学和物理学等方面均有很深的素养,他在百忙之中审阅了大量书稿,并加盟写作;我国膜片钳实验系统研制主持人、华中科技大学的瞿安连教授给予了热情的指导,并在身体欠佳的情况下仔细审阅了部分稿件;参加审稿的还有赵强、张丽男、马春蕾和王玉红同志;我国第一台膜片钳放大器(PC-I型)研制者周专教授、PC-II型膜片钳放大器研制者曹忠升教授和PC-II_B型膜片钳放大器研制者张川博士也给予了无私的支持。承蒙河北医科大学张永健教授、许彦芳教授以及河北医科大学统战部和河北省统战部的鼓励和推荐,本书荣获中央统战部华夏英才出版基金资助。我们在此谨一并表示衷心的感谢。

一个优秀的电生理学工作者,应该在生物学或基础医学、电学、电化学方面都有比较深厚的底蕴,并具有丰富的实践经验。虽然我们也在朝这一方向努力,但客观地讲,每位作者的学识水平和经验积累都是有限的,再兼写作时间比较紧张,不妥和疏漏之处在所难免,诚望读者批评、指正。

主 编

2012年4月于滹沱河畔

目 录

前言

第一章 绪论	1
第一节 细胞电生理学及其技术概述	1
第二节 细胞电生理学发展简史	3
第三节 怎样学习掌握细胞电生理学及其技术	9
一、调整改善电生理学工作者的知识结构	9
二、理论与实践相互促进	10
主要参考文献	11
第二章 细胞膜电学效应基本原理	13
第一节 离子通道与跨膜离子浓度梯度共同构成“微电池”	13
一、离子通道与其可通透的离子构成以离子的平衡电位为电动势的浓差电池	13
二、离子平衡电位的计算——Nernst 公式	14
三、体液中主要离子的平衡电位	15
四、离子通道的电导及用一段含源电路的欧姆定律描述离子通道	16
五、离子电流的反转电位(零电流电位)初说	18
第二节 细胞膜及细胞内液、细胞外液的电容效应	20
第三节 离子泵的双重电学效应	22
一、离子泵的活动既是通道电源效应的前提,本身又可直接产生电源效应	22
二、钠-钾泵电流的平衡电位	23
第四节 其他膜转运蛋白的电学效应	24
一、细胞膜上的其他转运蛋白	24
二、例解:钠-钙交换体及其平衡电位	24
第五节 细胞膜的电路模型及其初步分析	25
第六节 细胞膜对离子的通透性与 Goldman-Hodgkin-Katz 方程	27
一、离子的扩散与在电场中的运动;扩散系数与离子淌度及其影响因素	27
二、膜对离子的通透性与电导	28
三、GHK 电流方程和电压方程	30
主要参考文献	32
第三章 膜片钳技术基本理论与方法	34
第一节 膜片钳技术概述	34
一、“膜片钳”的基本含义	34
二、膜片钳记录的基本构型	35
第二节 膜电位钳制条件下检测膜电流的意义简析	37

一、为何在细胞电生理研究中常需要钳制膜电位?	37
二、膜电位钳制在稳恒水平时的通道电流简析	39
三、当膜电位从一个钳制水平阶跃到另一水平时的通道电流简析	39
四、再说反转电位	40
第三节 膜片钳技术基本原理	40
一、膜电位钳制和电流检测的实现	40
二、电流钳制与膜电位的监测	46
第四节 偏移电位的补偿	48
一、什么是偏移电位	48
二、为什么要补偿偏移电位	49
三、怎样补偿偏移电位及其变化(主要是液接电位的变化)	49
四、液接电位的测量	51
五、不同记录构型下的偏移电位补偿	51
六、局部灌流产生的界面电位和改变溶液 Cl^- 浓度引起的电极电位改变的补偿	52
七、结语	53
第五节 电压钳模式下的电容补偿和串联电阻补偿	53
一、电容补偿	53
二、串联电阻的补偿	57
第六节 漏电流的含义及其减除的意义和方法	60
一、漏电流的含义	60
二、膜片钳中的漏电流减除	60
第七节 膜片钳实验中信号的基本处理——滤波与采样	66
一、滤波	66
二、采样	70
第八节 细胞浴液和电极内液的配制及保存	73
一、细胞浴液	73
二、电极内液	75
第九节 膜片钳实验用电极的制备和安装	77
一、 Ag/AgCl 电极丝和玻璃微电极的制备	77
二、接地电极和记录电极的安装	79
第十节 膜片钳实验基本操作步骤、细节说明及注意事项	81
一、全细胞式膜片钳基本操作步骤、细节说明及注意事项	81
二、单通道记录基本操作说明	85
三、其他注意事项	87
第十一节 噪声与干扰及其排除方法	87
一、膜片钳记录系统本身的噪声	88
二、干扰及其排除方法	93
第十二节 穿孔全细胞膜片钳技术	96

一、概述	97
二、常用穿孔剂的作用特点和使用方法	98
三、穿孔全细胞膜片钳技术的优缺点	100
主要参考文献	101
第四章 膜片钳技术的扩展性应用	104
第一节 离体脑片膜片钳记录技术	104
一、离体脑片的制备及培养	104
二、脑片膜片钳记录的实验装置	106
三、离体脑片膜片钳记录的基本操作步骤	107
四、离体脑片膜片钳记录的应用	109
五、脑片膜片钳记录技术的几点说明	110
第二节 应用膜片钳技术检测细胞的分泌活动	111
一、全细胞记录构型的等效电路	112
二、膜电容检测的时域法	113
三、膜电容检测的频域法	115
四、膜电容检测示例	119
五、膜电容检测技术相关问题的讨论	120
第三节 穿孔囊泡外面朝外式单通道记录	121
第四节 高阻封接宏膜片钳记录	122
第五节 松膜片钳技术	123
一、概述	123
二、松膜片钳技术的实施方案	124
第六节 巨裁膜片钳技术	126
主要参考文献	127
第五章 自动膜片钳技术	129
一、自动膜片钳技术原理	129
二、传统膜片钳技术与自动膜片钳技术比较	132
三、自动膜片钳技术的应用	133
四、结语与展望	134
【附】 自动膜片钳仪器简介	134
主要参考文献	138
第六章 细胞电生理实验标本的制备及记录中的加药方式	139
第一节 细胞电生理实验标本的制备	139
一、急性或新鲜分离细胞标本	139
二、培养细胞标本	139
三、表达细胞	140
四、脑片标本	141
五、微动脉段标本	141



六、溶液的配制	142
第二节 细胞电生理实验中的加药方式	143
一、细胞外给药	143
二、细胞内给药	145
主要参考文献	146
第七章 钠通道	147
第一节 电压门控性钠通道概述	147
一、电压门控性钠通道的分子结构	147
二、电压门控性钠通道的命名和分类	150
三、电压门控性钠通道的基因	152
四、电压门控性钠通道的功能	154
第二节 电压门控性钠通道的离子通透性和门控机制	155
一、电压门控性钠通道的通透性	155
二、电压门控性钠通道的门控机制	160
第三节 电压门控性钠通道的生物物理学特征	169
一、电压门控性钠通道的电流-电压关系曲线	169
二、电压门控性钠通道的激活与失活特征	170
第四节 常用钠通道调节剂及作用机制	174
一、钠通道工具药	175
二、局部麻醉药	179
三、抗癫痫药	180
四、I类抗心律失常药	181
主要参考文献	182
第八章 钙通道	184
第一节 概述	184
第二节 电压门控性钙通道的结构及生物物理学特性	185
第三节 电压门控性钙通道的离子通透性和门控机制	188
一、电压门控性钙通道的选择性和通透性	188
二、电压门控性钙通道的门控机制	190
第四节 各类电压门控性钙通道的特征、分布和功能	193
一、L型钙通道	193
二、T型钙通道	196
三、P/Q型钙通道	199
四、N型钙通道	200
五、R型钙通道	200
第五节 电压门控性钙通道的药理特性	202
一、激动剂	202
二、阻滞剂	203

三、药物作用机制	204
第六节 其他类型钙通道	206
一、受体操纵性钙通道	206
二、钙库调控性钙通道	206
三、IP ₃ 受体	207
四、ryanodine 受体	208
主要参考文献	209
第九章 钾通道	211
第一节 电压门控性钾通道概述	211
第二节 钾通道的结构及功能特性	214
一、钾通道对钾离子的选择性	214
二、钾通道的门控结构	216
三、电压门控性钾通道的电压敏感性	216
四、电压门控性钾通道的失活	216
第三节 不同种类电压门控性钾通道的电生理记录方法	217
一、A 型钾通道	217
二、延迟外向整流钾通道	220
三、介导 M 电流的电压门控性钾通道	223
四、超速激活的延迟整流钾通道	224
第四节 电压门控性钾通道的生理功能及病理意义	225
第五节 电压门控性钾通道的药理特性	227
第六节 其他类型钾通道	233
一、钙激活的钾通道	233
二、内向整流性钾通道	235
三、双孔区钾通道	236
四、内向整流性钾通道、双孔区钾通道与电压门控性钾通道亚基的基本结构比较	237
主要参考文献	237
第十章 氯通道	239
第一节 钙激活的氯通道	239
一、CACC 通道的分子基础	240
二、CACC 通道拓扑结构	241
三、CACC 通道的生理作用	241
四、CACC 通道的生物物理学特性	242
五、CACC 通道离子通透及门控机制	243
六、常用 CACC 通道调节剂及作用机制	245
第二节 电压依赖性氯通道	245
一、ClC 通道家族简介	245
二、ClC 通道的拓扑及三维结构	246

四、CIC通道的生物物理学特性

247

酸 (linoleic acid)、四乙胺 (tetra-

六、常用CIC通道的调节剂

250

CIC₁抑制剂、反膜、钙CIC₁抑制剂: SC182

三、CFTR通道的生理功能

251

CFTR通道的生理功能

252

一、细胞内低钙时的氯通道调节

252

二、细胞内低钙时的氯通道调节

253

第二章 气通道研究及临床应用

254

气通道研究及临床应用

254

一、气通道研究及临床应用

255

气通道研究及临床应用

256

气通道研究及临床应用

256

气通道研究及临床应用

256

气通道研究及临床应用

256

气通道研究及临床应用

256

气通道研究及临床应用

256

气通道研究及临床应用

256

气通道研究及临床应用

256

气通道研究及临床应用

256

二、尼古丁型 AChR 的激活与阻断

262

尼古丁型 AChR 的激活与阻断

262

一、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

264

二、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

264

三、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

四、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

五、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

六、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

七、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

八、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

九、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

十、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

十一、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

十二、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

十三、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

十四、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

十五、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

十六、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

十七、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

十八、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

十九、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

二十、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

二十一、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

二十二、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

二十三、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

二十四、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

二十五、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

二十六、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

二十七、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

二十八、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

二十九、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

三十、尼古丁型 AChR 受体激活与阻断

265

续表

通道	分布	表型	激动剂 (开放剂、增强剂)	阻断剂
K _v 3.4 (KCNC4)	CNS(脑干和海马颗粒细胞)和骨骼肌细胞	A型钾电流		门控抑制剂: 硫喷妥(thiopental) 孔道阻断剂: 海洋海葵毒素 BDS-I(sea anemone toxin BDS-I)、十六碳-1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷(C ₁₆ -1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane)、四乙胺(tetraethylammonium)、1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷(1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane)
K _v 4.1 (KCND1)	CNS、心脏、肝脏、肾脏、甲状腺和胰腺	A型钾电流		孔道阻断剂: heteroscodra maculata (HmTx1)、4-氨基吡啶(4-aminopyridine)、四乙胺(tetraethylammonium)
K _v 4.2 (KCND2)	CNS(小脑、海马、丘脑、前脑和背根神经元)及啮齿动物的心脏	A型钾电流		门控抑制剂: UO126 孔道阻断剂: phrixotoxin 1、phrixotoxin 2、异足蛛毒素-2(heteropodatoxin - 2)、sBmTX 3、花生四烯酸(arachidonic acid)、奎尼丁(quinidine)、4-氨基吡啶(4-aminopyridine)
K _v 4.3 (KCND3)	CNS(皮层和小脑)、心房和心室肌细胞(I _{to})及平滑肌细胞	A型钾电流		门控抑制剂: 瑞鲁唑(riluzole) 孔道阻断剂: phrixotoxin 1、phrixotoxin 2、尼古丁(nicotine)、西布曲明(sibutramine)、布比卡因(bupivacaine)、4-氨基吡啶(4-aminopyridine)
K _v 7.1 (KCNQ1)	心肌、耳蜗、骨骼肌、肝脏、肾上皮、肺脏和胃肠道	慢型延迟整流钾电流	磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)、甲芬那酸(mefenamic acid)、尼氟酸(niflumic acid)、R-L3、吡啶硫酮锌(zinc pyridithione)	孔道阻断剂: XE991、IKs124、HMR-1556、L735824、阿齐利特(azimilide)、色满醇 293B(chromanol 293B)

十八、Nagata 平衡电位、Goldman-Hodgkin-Katz 平衡电位和 Deussen 平衡电位有什么 CNS(海马、皮质、丘 瑞替加宾(retigabine)、 区别?	330
十九、什么是漏电流?	337
二十、什么目的控制电压?	337
(KCND2) 飞结)交感神经节和 (KCND2) 飞结)交感神经节和	
二十一、BAPTA、BAPTA-AM 和 Fura-2 的作用有什么区别?	339
二十二、膜片钳实验系统有哪些主要组成部分? 孔道阻断剂:XE991、平昔地尔 阻塞系统神经二和 DM4001250 阻胺类 外毛细胞以及血管 纹(zinc purithione) 磷 (ceprilan)、利诺呢呢(linopirid-	
二十五、使用 Axon 膜片钳实验系统时 左哪田沿要维持电位为什?	342
二十六、膜片钳实验系统有哪些主要组成部分? BMS204250 阻胺类 K 7.5 BMS204250 阻胺类 BMS204250 阻胺类	
二十七、用 Axon 膜片钳实验系统在封接过程中,某一个或数个被监测的电学参数值为	
二十八、用 Axon 膜片钳实验系统在封接过程中或破膜后监测电学参数时,调节测试重	
二十八、用 Axon 膜片钳实验系统在封接过程中或破膜后监测电学参数时,调节测试重 新速率为何会引起电学参数值的变化?	344
二十九、平衡电位、反转电位和零电流电位是一回事吗?	345
三十、为什么电极刚进入溶液后,膜片钳放大器总是出现饱和现象?	345
三十一、如何排除 50Hz 的正弦波工频干扰?	345
三十二、可兴奋细胞膜的阈电位的电学实质是什么?	346
三十三、什么是空间钳位误差? 如何避免之?	346
三十四、用 Axon 公司的膜片钳实验系统,如何同时进行电压刺激下的电流反应记录和 电流的连续性背景记录?	347
三十五、对于药物引起的电流和电压激活的电流,使用斜坡电压刺激做 I-V 曲线分别 有什么要求?	347
三十六、膜片钳实验中,能否根据电压钳模式下的膜输入电阻和加药引起的电流幅度, 推测电流钳模式下同样的加药刺激引起的膜电位变化幅度?	348
三十七、膜片钳记录数据中的电流和电压基本参考方向(正方向)是怎样约定的?	348
三十八、细胞膜在非钳压状态下,如果出现内向电流或外向电流,膜电位会如何改变 (去极化还是超极化)?	349
主要参考文献	349
附录 细胞电生理学与膜片钳技术专业术语英中文对照表	352
作者简介	373
彩版	

第一章 绪 论

细胞电生理学是一门理论与技术高度融合的学科,其理论性和实践性都比较强。此学科集电学、电化学和生物医学于一体,故细胞电生理学工作者需要对这几个方面都有一定深度的了解,才能对此学科真正略窥门径,而不至于在工作中犯自己难以察觉的错误。

以膜片钳技术为发展高潮的细胞电生理学技术,在生命科学研究中,尤其是在离子通道、离子泵、离子转运体等生电性膜蛋白的功能及其相关的信使物质的研究中,一直发挥、且将继续发挥其他实验方法无法替代的作用。

第一节 细胞电生理学及其技术概述

电生理学(electrophysiology)是研究生物体内的电现象的一门学科。细胞电生理学(cellular electrophysiology)则是研究细胞尤其是细胞膜的电现象的学科。由于细胞电现象是机体诸多生理活动的前提或功能表现,因此电生理学是生理学中最重要、最基本的内容之一。由于生物电是生物体内的物理现象,所以电生理学又隶属于生物物理学的范畴,是生物学和物理学的交叉学科。

动物体内和植物体内均存在生物电现象,很多微生物亦然,但时至今日电生理学研究主要还是集中在动物体标本,尤其是动物的可兴奋组织或细胞。细胞电生理学研究则主要集中在细胞膜中具有电学性质的结构上,包括各种离子通道、离子泵及其他膜转运蛋白体、脂质双层本身,以及与它们相关联的受体、膜内和胞内信号转导系统等。由于技术问题,目前对细胞器的膜电现象了解较少,这方面有望成为未来的发展方向之一。

电生理学是一门技术性非常强的学科,其技术本身即电生理学技术(electrophysiological techniques)便是该学科的重要组成部分,它是利用电子仪器结合电化学装置研究生物电现象的方法体系。记录生物电信号,需要用电极将电信号引导至放大器的输入端,经过放大器的放大和(或)阻抗变换及各种补偿调节等处理,将信号从放大器的输出端输出至记录系统(如示波器、笔录仪、微型计算机采样系统等)进行记录。

我们先从不同的角度对电生理学技术进行基本分类。引导生物电信号,一般需要两个电极,这两个电极有时互为参比电极,但在多数情况下,其中一个作为参比电极[reference electrode,即接地电极(grounding electrode)],另一个作为探测电极[exploratory electrode,亦有人习惯称之为记录电极(recording electrode)]。参比电极通常置于标本的细胞外液中,并与记录系统各点电位的公共参照点(即电路的“地”)相连接,因此在电生理学中习惯上将细胞外液作为零电位点(严格地讲这是在补偿了界面电位基础上的一种简化方法)。探测电极则根据实验目的放置于特定的部位,其放置部位不同,记得的信号

及形成的记录模式不同。若将探测电极放置于细胞外,称为**细胞外记录**(extracellular recording),可以用来记录探测电极尖端与参比电极之间的电位差(如场电位记录)或流过探测电极的电流(如细胞贴附式膜片钳)。若将探测电极尖端穿刺至细胞内,记录细胞膜两侧的电位差(如尖锐电极胞内电位记录)或跨膜电流(如双电极电压钳,此方法通常需要两根插入胞内的电极,见本节下述),则称为**细胞内记录**(intracellular recording)。

另外,根据人为控制的电学参数不同,可以将电生理技术分为**电压钳**(voltage clamp)和**电流钳**(current clamp)。电压钳即在人为控制细胞膜两侧的电位差(膜电位)的条件下测定通过细胞膜的电流,电流钳则是人为控制经电极向细胞膜注射的电流而观察膜电位的变化。

各种电生理技术均可按照上面的两种基本技术归类。下面对几种传统的电生理技术做一概念性简介,以便读者对电生理学技术有个轮廓性了解。

传统的电生理教学性实验,如神经干动作电位的引导、减压神经放电、膈神经放电、大脑皮层诱发电位的记录等,以及一些临床电生理学检查,如心电图、脑电图、肌电图、耳蜗电图的描记等,均属于细胞外记录,记录的是两个引导电极间的电位差,或探测电极尖端相对于参比电极的电位值,体现的是多细胞电变化造成的**场电位**(field potential)的综合效应。因电极中几乎没有电流通过,属于电流钳中的**零位钳流**(zero-current clamp)。

神经元单位放电(neuronal unit discharge)记录,即将探测电极(可用玻璃微电极或金属电极)置于单个神经细胞的外表面,记录该细胞兴奋活动过程中细胞外表面某一点与参比电极之间的电位差。因为参比电极也与细胞外液相连,两电极之间的短路效应较强,此电位差很小(一般几十到几百微伏)。可分析的指标有放电频率、幅度及诱发放电的潜伏期,以分析放电频率最为重要。神经元单位放电记录,是单个细胞的细胞外记录,也为零位钳流。

传统的双电极电压钳(two-electrode voltage clamp)技术,是针对体积较大的细胞,将两根电极(分别俗称电压电极和电流电极)刺入细胞内,电压电极用于引导记录膜电位,并将其与想要的电位水平即命令电位在负反馈放大器输入端相比较,只要二者有微小的差异,便由负反馈放大器的输出端通过电流电极给细胞注射电流,以保证膜电位基本等于命令电位,从而实现对膜电位的控制。电流电极和胞外的接地电极构成电流回路,电流较大时为了避免在溶液产生的压降对钳压的影响,常将接地电极分成控制细胞外电位的电极和测定电流的电极,后者用于记录钳制膜电位需要注射的电流。若细胞膜的通道状态发生改变(开放或关闭),则钳制膜电位需要注射的电流也会发生变化,此变化实际上相当于通道电流的变化,并反映了细胞膜电导的变化。如其名曰,此技术为电压钳技术,也属于细胞内记录。

细胞内尖锐电极记录(intracellular sharp electrode recording),即用尖端非常细($<0.5\mu\text{m}$)的玻璃微电极作为探测电极刺入细胞内,记录细胞膜内侧和置于细胞外液(如标本灌流液)中的参比电极的电位差(即膜电位)。我们通常狭义上说的细胞内记录(intracellular recording in its narrow sense)即指此方法。记录时通过电极的电流一般为零,也可以通过电极对细胞施以可调节的方波电流刺激,或注射持续电流改变基础膜电位,故此方法属于电流钳。当通过电极的电流为零时即为零位钳流。

现在盛行的膜片钳(patch clamp)技术,电学参数的钳制和记录采用同一个玻璃微电极完成,因其尖端开口通常较粗,所以也被称为玻璃微细管。将玻璃微细管吸附于细胞表面,形成吉欧级($>10^9 \Omega$)高阻封接(gigaseal),若记录玻璃微细管口下面的一小片细胞膜中的通道(一个或几个)的活动,为细胞贴附式(on-cell /cell attached)膜片钳记录。以此为基础,还可形成全细胞式(whole-cell)、内面朝外式(inside-out)、外面朝外式(outside-out)三种记录构型(详见第三章“膜片钳技术基本理论与方法”)。因为玻璃微细管尖端处于细胞外,所以膜片钳技术属于细胞外记录。这也是德国 HEKA 公司将其生产的膜片钳放大器系列称为 EPC(extracellular patch clamp)的原因。膜片钳实验工作模式既可设为电压钳,也可设为电流钳。

需要说明的是,在多数电生理实验中把细胞外液与记录系统电路的“地”相连作为零电位点,其他点与细胞外液之间的电压(电位差)便是该点的电位值,因此在细胞电生理学资料中,电位(potential)和电压(voltage)两个概念一般混用。膜电位(membrane potential)、跨膜电位[transmembrane potential, 或称跨膜电压(transmembrane voltage)]均指细胞膜内侧和膜外侧电位之差,按胞外电位为零参考点的习惯规定,也就是细胞内的电位值,这几个概念较为笼统,既可指存在人为因素(如钳压电路)作用时的情况,也可指无人因素作用时的情况;而静息电位(resting potential, RP)则指无人干预且细胞处于静息状态时的膜电位。

第二节 细胞电生理学发展简史

细胞电生理学及其技术的发展,是人们对生物电的研究向微观方向发展的结果,故谈及细胞电生理学的发展史,无法与早期的生物电研究历史割裂开来。然而,系统、完整地讲述生物电研究史并非易事,在此只对其中较有启发意义的事件和对理解细胞电生理学有帮助的事件及相关背景做一简介。

人们最早对生物电现象的观察至少可以追溯到公元前 300 多年。古希腊的哲学家亚里士多德(Aristotle, 公元前 384~前 322 年)观察到电鳐(torpedo)可以对水中的动物施以震击致其麻痹,古希腊罗马人也曾用黑电鳐的震击治疗头痛、关节痛、瘫痪、麻痹等,但直到 18 世纪电学的一些基本规律被发现后,人们才逐渐认识到电鳐、电鲇(electric catfish)、电鳗(eel)等电鱼的放电性质。其中值得一提的是,John Walsh 于 1775 年成功地观察到电鳗能使锡片的狭缝产生火花,这在当时被视为确认电现象的“铁证”之一。

众所周知,电生理教学实验中常用的标本之一是蛙神经肌肉标本(nerve-muscle preparation)。此标本的雏形可追溯到 17 世纪 60 年代。当时荷兰的显微镜师和生物学家 Jan Swammerdam 分离出“蛙股部一块最大的肌肉及其相连的神经”,用剪刀或其他器械“激惹”(irritate)神经,会引起肌肉收缩。他还曾将银线的一头做成小环套住神经使之固定,再将银线与接触着肌肉的铜线相触及,发现肌肉也会发生收缩。可惜他生不逢时,与神经肌肉标本中信号传播本质的研究失之交臂。

18 世纪后期,意大利医生和解剖学家 Luigi Galvani 用摩擦生电器、方形容电器、莱顿瓶等装置,刺激蛙的连有脊柱节段的股部神经和后肢肌肉组成的标本,观察到很微弱的刺