

生理学 方法与技术

周衍椒 赵铁千 王雨若 主编



生理学方法与技术

第二集

周衍椒 赵軼千 王雨若 主编

科学出版社

1984

内 容 简 介

本书为《生理学方法与技术》的第二集。本集以循环、消化、呼吸为重点,收集了血液学与内分泌学方面有关的一些方法。

本书的宗旨是专以介绍当前我国生理科学领域内所采用的实验研究方法与技术。由于生理科学学科范围比较宽广,所使用的方法与技术更是多式多样,而且总是随着生产技术的发展在不断的完善与更新,因此本书以汇编的方式分册出版发行,以便于能及时收集各方面所用的新方法、新技术提供给读者,促进学科发展。

本书可供从事基础医学、临床医学、动物生理学、教育学、心理学、体育卫生、畜牧兽医等方面的教师、医师、科学研究人员参考。

生 理 学 方 法 与 技 术

第 二 集

周衍椒 赵轶千 王雨若 主编

责任编辑 吴爱珍

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1984年11月第一版 开本:787×1092 1/32

1984年11月第一次印刷 印张:11 3/8

印数:0001—5,100 字数:258,000

统一书号:13031·2732

本社书号:37·7·13—10

定 价: 1.80 元

编 辑 组

(按各单位名称及编者姓氏笔划为序)

山西医学院 赵荣瑞(循环系统)

上海中医学院 曾兆麟(感官)

上海第一医学院 陈子彬(呼吸系统)

上海第二医学院 边毓土(电子技术及肌肉神经)

徐有秋(循环系统)

中国医学科学院基础医学研究所 郑永芳(中枢神经系统)

中国医科大学 姚承禹(代谢、体温)

中国科学院上海生理研究所 梁之安(感官)

安徽医学院 徐光尧(消化系统)

武汉医学院 杨焜(循环系统)

赵轶千(副组长)

河南医学院 王雨若(副组长)

贵阳医学院 吴熙春(电子技术及肌肉神经)

湖南医学院 周衍椒(组长)

唐恢玲(血液)

暨南大学医学院 王子栋(电子技术与肌肉神经)

遵义医学院 孙云寿(中枢神经系统)

林茂璋(泌尿系统)

梅懋华(消化系统)

前 言

《生理学方法与技术》是为了适应当前建设现代化的社会主义强国的需要而编写的。实现四个现代化要求迅速出成果，出人才，所有生物科学与医学工作者面临着不断提高教学质量、广泛开展科学研究工作的任务；需要用生理学的方法与技术，来解决他们在科学研究中遇到的一些问题。可是十余年来我国生理科学受到严重损失，科学队伍的建设也受到极大的破坏，使我国生理学在许多领域内与国际先进水平的差距增大了，远远不能适应形势的需要。摆在我们生理科学工作者面前的任务之一，就是编一本关于生理学方法与技术的参考书，供年轻的生理学工作者和临床工作者使用，这对于解决他们在科学研究和教学中遇到的部分问题，能有所帮助。因此，本书在选题方面多着重于基本的、现代的和实用的方法和技术，然而对于已经在临床和生理教学中广泛、常规使用的，国内已有较多的其他材料可查阅的方法与技术就不列入。

本书在写法上着重于实验方法和技术的描述，注意经验与体会的介绍，力求阅读之后就能应用，但为有助于正确地选择方法与技术，也斟酌情况说明其理论基础。在编辑出版方面，采取分册陆续出书的办法，这样也能及时反映国内生理科学的发展，另外也便于读者选购所需资料。

本书在编辑过程中得到各校党委和科学出版社的领导与支持及不少单位的专家、教师的赞助与扶植，积极为本书撰稿，才使本书能早日与读者见面。但是我们业务水平有限，对国内各单位的研究情况了解不够，以致在本书的选题及编

• v •

辑方面必然存在缺点和问题，请读者批评指正或提出建议。

编 者

1980年11月

目 录

前言.....	v
用浮置式细胞内电极 (floating microelectrode) 记录心肌 细胞电位.....李少如等	1
吸引式电极记录家兔在体心脏单相动作电位.....赵荣瑞等	24
在体心脏心肌收缩性能的评定指标和测取方法...李云霞	34
希氏束电图.....徐有秋等	67
无创性多导描记左心室功能测定.....赵荣瑞等	85
正交心电图.....徐有秋等	96
M型超声心动图.....刘望彭、吴博威	109
施他林 (Starling) 氏心肺制备.....吴熙春	128
哺乳动物离体心脏灌流及其心电图.....曾敬添等	137
利用蟾蜍离体心脏观察影响心输出量的各种因素.....杨宗洗、乔丽荫	148
利用蟾蜍离体心脏观察心肌收缩性能的改变...杨宗洗	157
测定造血干细胞的几种主要方法.....王绮如	164
膈神经和肋间神经冲动引导.....陈子彬	188
呼吸运动的描记方法.....陈子彬	194
去脑垂体手术.....马蒲生等	229
肾上腺皮质机能实验.....倪江等	234
胰岛素放射免疫测定法.....于吉人	243
胃肠道运动的记录方法.....徐光尧、许冠荪	252
食道瘘管的制备.....卢光启	269

胃液的收集·····	卢光启	275
胃泌素的放射免疫测定法·····	郭燕世	299
慢性实验性溃疡模型的制备·····	董秀云	307
胆道括约肌运动机能的研究方法·····	裴德恺	312
胆囊收缩的长期测量法·····	梅懋华等	322
离体豚鼠胆囊平滑肌收缩活动的描记·····	冯镇源等	328
狗的慢性胰瘘制备法·····	梅懋华等	340

用浮置式细胞内电极 (floating microelectrode) 记录心肌细胞电位

李少如 李之望 曾敬添 王世端

(武汉医学院生理教研室)

一、概 述

自从 Woodbury 等^[1] (1951) 和 Weidman (1951)^[2] 应用 Ling G. (凌宁) 和 Gerard^[3] (1949) 创制的玻璃微电极插入单个心肌细胞内记录心肌细胞的跨膜电位之后, 1956 年 Woodbury 和 Brady^[4] 将玻璃微电极尖端部分切下并将其悬浮于细金属丝上, 则微电极尖端部分可以上下自由浮动, 并可使电极尖端插入在体跳动心脏的单个心肌细胞内以记录其跨膜电位变化, 这样可使心脏跳动的机械运动所造成的伪迹减至最低。使用这种方法记录离体心脏各部分组织的跨膜电位变化, 可以减少对被检测组织所需的牵张, 因此记录效果也较为满意。

近年来, 我们对不同动物的在体和离体心肌标本用浮置式玻璃微电极进行了单个细胞跨膜电位变化的记录, 认为此法对在体跳动着的心脏作细胞内跨膜电位的记录是目前较好的记录方法。对离体心脏各部分组织的灌流标本进行细胞内跨膜电位的记录, 此法也很适用。对标本小至直径 0.56 毫米^[16], 长度 5 毫米的猫右心乳头肌, 细胞小至窦房结的起搏细胞都可以用此法满意地进行细胞内跨膜电位的记录。其他组织如离体骨骼肌、神经细胞或纤维乃至内脏器官的平滑肌同

样也可使用此法进行细胞内跨膜电位记录。

二、仪器设备及器材

(一) 记录电极

1. 浮置式玻璃微电极的拉制、充灌、测定及制作 浮置式玻璃微电极的拉制、充灌及电阻测定与单管玻璃微电极相同^[5]。第一集已述及此处不再重复^[6]。一般对电阻在 50 兆欧以上和 5 兆欧以下的电极应予删除，剩下的电极在使用前再作测定，一般用 10—30 兆欧的电极为好，窠房结起搏细胞则选用 20—40 兆欧者为宜。

2. 微电极的制作(附 Ag-AgCl 乏极化电极的制作)

浮置式玻璃微电极的 Ag-AgCl 乏极化电极的制作：将长

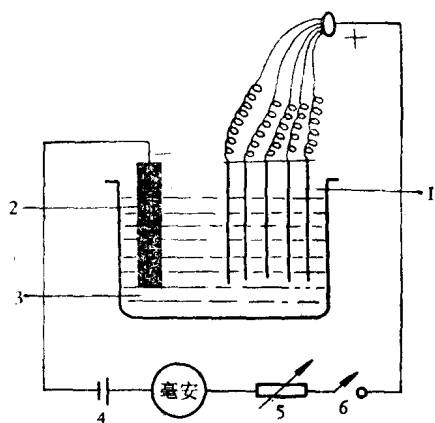


图 1 镀氯化银时的电极装置。

1. 直径 100 微米的银丝；2. 干电池碳芯；
3. 1% NaCl 液；4. 2 伏直流电；5. 5 千欧
可调限流电位器；6. 开关。

2—3 厘米直径 100 微米的银丝焊接于 4—15 厘米长，25—50 微米直径的银丝上，后者与直径 0.5 毫米长，3—6 厘米的粗银丝焊接。由于直径 100 微米的银丝与微电极中的 KCl 液直接接触，因此只将该部分镀上 AgCl 即可。

(1) 在 NaCl 溶液中镀 AgCl (图 1)：

将需镀的银丝用砂纸擦去表层并用蒸馏水洗净，浸入 0.9% 的 NaCl 溶液中(本实验仅将 100 微米直径的银丝没入 2 厘米，其

他部分则悬于溶液上),一次可镀 5—10 根电极,通过整流器取得 2—6 伏的直流电压,将负极与石墨棒相连并置于 0.9% 的 NaCl 溶液中(石墨棒可用干电池的碳棒或铅笔的石墨芯代替),而正极则通过 1—4 千欧电阻与电极的粗银丝相连,于是就有 1—4 毫安的直流电通过电极,电流强度可通过改变电路中的限流可变电阻调节,一般每平方厘米银丝面积用的电流为 5—10 毫安,上述 10 根电极的表面积为 0.3 厘米²,故镀 AgCl 的电流强度为 2—4 毫安即可。镀 AgCl 的时间为 2 小时左右,镀好的电极应储存于暗处,因光照可引起 AgCl 分解。

(2) 在 0.1 当量的 HCl 中镀 AgCl: 方法同上,仅将 0.1 当量的 HCl 取代 NaCl 溶液即可。

将经电子管繁用表初测合格的一根玻璃微电极取出,在距最尖端 2 厘米左右处折断,保留其尖端部分,在此操作过程中慎勿碰伤其最尖端。折断的方法有三种: (1)直接折断; (2)在将要折断处以砂轮切一痕迹以便准确折断; (3)用小止血钳咬断其尾端,并仔细渐向尖端部分伸延,直至达到管径突然变细为止。然后将 Ag-AgCl 电极从尾端插入并向前推进直至再推不动为止,此时慢慢松开左手上的微电极尖端使其垂直悬浮在 Ag-AgCl 电极上(保持垂直悬浮对微电极插入细胞内,并在细胞内维持的时间较长十分重要)。随即用细玻棒尖端蘸少许石蜡油沿 Ag-AgCl 电极流下,使微电极的尾端封闭以防水分蒸发。

将制作好的玻璃微电极安置在三向推进器的电极安置处,使其粗银丝与连接到 78-7 型源跟随器或微电极放大器(FW-2 型电容中和源跟随器)的输入端。让玻璃微电极尖端垂直悬浮在被插入的心肌之上 2 厘米左右处,以便随后插入心肌细胞(图 2,3)。

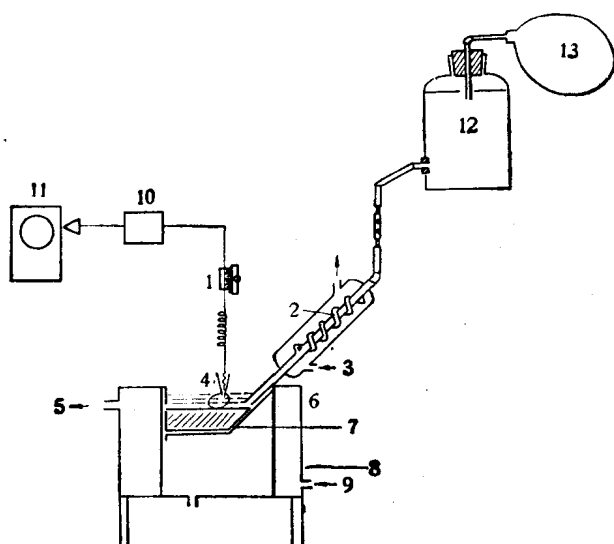


图2 哺乳动物小片离体组织灌流装置示意图。

1.微推进器；2.温热水出口；3.温热水进口；4.微电极；5.温热水出口；6.组织片；7.石蜡或硅橡胶垫；8.保温盒；9.温热水进口；10.微电极放大器；11.示波器；12.氧充分饱和的洛克氏液；13. 100O_2 或 $95\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$ 。

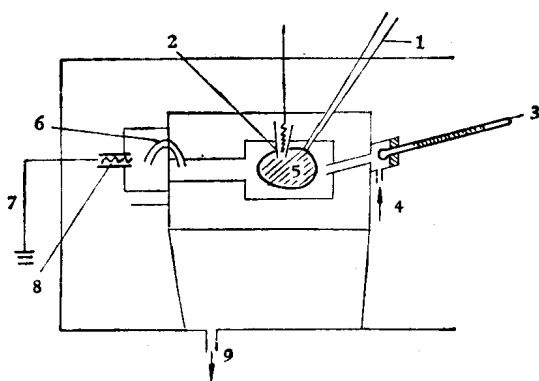


图3 哺乳动物小片离体组织灌流装置浴槽示意图。

1.刺激电极；2.记录微电极；3.温度计；4.灌流液入口；5.组织片；6.任氏液-琼脂块桥；7. Ag-AgCl 参考电极；8. KCl -琼脂块桥；9.灌流液出口。

(二) 记录装置

1. 微电极放大器 源跟随器(附制作法)及微电极放大器。由于微电极本身的电阻很高,在输入示波器之前,必须先通过微电极放大器才能使微电极拾取的讯号显示在示波器上。我们实验中采用了两种微电极放大器,一种是武医生理 78-7 型源跟随器,另一种是科学院上海生理研究所 FW-2 型电容中和源跟随器,两者均可满足心肌细胞电活动不失真的记录的要求。兹将 78-7 型源跟随器介绍如下(图 4):

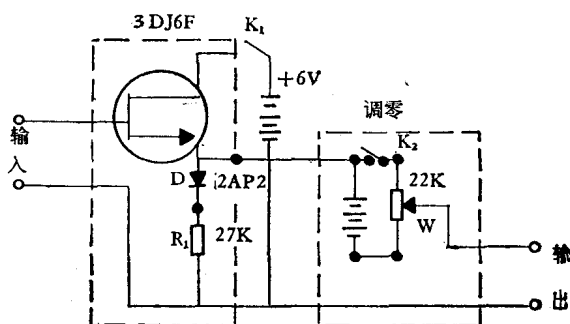


图 4 78-7 型源跟随器电路原理图。

我们部分实验采用本教研室装置的源跟随器,其主要技术规范:(1) 输入直流电阻: $\geq 1 \times 10^9$ 欧;(2) 放大倍数: 85% (当微电极电阻在 20 兆欧左右时);(3) 输入电容 $< 4\text{P}$;(4) 栅流 $< 5 \times 10^{-11}$ 安;(5) 噪声 < 100 微伏。其电路原理如图 4。

对元件要求: 3DJ₆F 应选择栅流小于 5×10^{-11} 安; 噪声 < 100 微安以及输入直流电阻 $> 1 \times 10^8$ 者。

结构及安装工艺注意事项: 为尽量减少输入电容, 输入引线必须尽量缩短。本仪器输入线不超过 15 厘米, 因此应安

装在微电极推进器上,体积应尽可能缩小,故将探头与调零部分分开安装。探头体积为 $5 \times 6 \times 2.5$ 厘米,内装 F 电池一只,其控制部分仅包括一个电源开关和输入单线及输出屏蔽线各一根。调零装置体积为 $6 \times 10 \times 3$ 厘米,内装下电池一个。其控制部分包括电源开关 1 个,调零电位器和输入插座各一只以及两对输出插头,分别与照像示波器和监视示波器连接。其输入线采用屏蔽线。

(1) 探头部分: 先用 2 毫米厚 20×10 毫米的有机玻璃板,按线路图打眼并钉上铜空心铆钉。

(2) 将制好的线路板, 3DJ6F, 2AP2 及 1/16W27K 电阻,分别放入乙醚中泡 1 分钟,然后用干棉球将上述部件元件擦净,凉干后方进行安装,在安装好(包括接好引出线及电源线)并经检查无误后,然后用 95% 的酒精将线路板的焊接部位洗净,最后用乙醚清洗干净。

(3) 制作适当大小的金属盒将线路板屏蔽。电池应置于金属盒外,输入线与地线应分开引出,其长度不得超过 15 厘米。FW-2 型微电极放大器,性能稳定,无交流干扰对记录各种生物电变化都适用。

2. 记录用双线阴极射线示波器 SBR-1 型示波器。本型示波器灵敏度高,有直流放大系统其时间座标及电压座标都有标定,能配合国产示波器照像机(如 Js-715, 华南师范学院机械厂制造)。如将 SBR-1 改装成长余辉可换以 13SJ23D 双枪长余辉示波管即可作监视用。

3. 电子刺激器及刺激隔离器 我们采用 YSD-4 药理学实验多用仪的刺激器。用我室技术员装置的晶体管射频(RF)刺激隔离器^[7]。

4. 离体组织灌流装置 (图 2, 3)

(1) 灌流液: 哺乳动物常用 Tyrode 液或 Locke 液对

离体组织进行灌流。一般用 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体使溶液氧分压达到 600 毫米汞柱为宜。最近曾有人采用几种修改的 Tyrode 液及 Locke 液供纯氧而不加 CO₂，这样使供氧问题简化^[8-11]。

①修改的 Tyrode 液成分(毫克分子)NaCl 143, KCl 5.6, CaCl₂ 2.16, MgCl₂ 0.25, 葡萄糖 11。上述溶液用三羟甲基氨基甲烷 (Tris-hydroxymethyl-aminomethane 5 毫克分子) 缓冲, 后者可防止心肌缺 O₂ 并有抗心律失常的作用^[8]。

②另一种修改的 Tyrode 液 (毫克分子) NaCl 147, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.5, 葡萄糖 5.5, NaH₂PO₄ 1.2, Na₂HPO₄ 4.8 (pH 7.4)。

③修改的 Locke 液 (克/升)^[11] NaCl 9.2, KCl 0.42, CaCl₂ 0.23, NaHCO₃ 0.15, 葡萄糖 1.0。

我们实验中采用修改的洛克氏液 (Locke), 在充氧前后测得 pH 为 7.3—7.4^[11]。

(2) 灌流速度: 通常不少作者^[17]采用微量液体泵作定量灌流。我们用 Murphy 滴注法使灌流速度维持均匀, 一般每分钟 3—8 毫升, 可视实验需要调整, 但在同一实验过程中灌流速度维持不变。

(3) 灌流液充氧法: 按图 2 装置, 先将储液瓶充满灌流液, 将装满纯 O₂ 的球胆与瓶相通, 松开流出端的何氏夹使瓶中液体流出 300 毫升左右, 该容积立即被球胆内的纯氧所取代。夹紧何氏夹; 将储液瓶用力震摇 10 分钟, 使灌流液被 O₂ 充分饱和。这种充氧法可使灌流液氧饱和度高, 并且方便易行。

(4) 温度和 pH: 视实验情况, 可通过超级恒温浴槽加温通过冷凝管中的灌流液及浴槽外套维持在 32 ± 0.5°C, 34 ± 0.5°C 或 37 ± 0.5°C。pH 一般维持在 7.3—7.4。

(5) 固定标本时应注意之事项：固定灌流标本时，不要使组织过度牵张；灌流液应刚好覆盖被灌流组织，如覆盖太深则浮置电极易漂动而不能垂直向下插入细胞内；如覆盖太浅以致被灌流组织暴露在液面外，则组织营养、供氧和干燥等因素可改变细胞跨膜电位。由于组织固定在石蜡或硅橡胶垫底的有机玻璃盒内，水在石蜡上表面张力很大，使液面时降时落，妨碍记录电极的稳定，故用一长条滤纸使灌流液流经组织后立即引向流出处，则覆盖组织的液面可保持稳定。灌流液的流速及流向组织的方向应保持恒定，对记录的稳定较好。

洛克氏液-琼脂块桥的制备：为了使接地的 Ag-AgCl 粗丝所连接的高浓度 (3M) KCl 块桥不弥散到心肌组织灌流槽内，应采用洛克氏液-琼脂块桥作为过渡。制备法为在热的洛克氏液中加入 1—2% 的琼脂。在琼脂完全溶化后装入内径 2 毫米左右的橡皮管(如自行车胎打气的小橡皮管)内与倒 U 形玻璃管内，待琼脂凝固后保存在洛克氏液中。

高浓度 (3M) KCl 块桥的制备：为了使电极系统对称，使接触电位互相抵消，在参考电极一端也用 KCl 块桥作过渡。制备法为在热的 KCl 液中加入 1—2% 琼脂。当琼脂完全溶化后吸入尖端直径 1 毫米，内径 5 毫米的玻璃管内，将参考 Ag-AgCl 电极插入其中，待琼脂凝固后保存在 3M KCl 溶液中。

三、哺乳类及两栖类窦房结(静脉窦) 起搏细胞及心房肌细胞跨膜电位的记录

(一) 哺乳类^[12-18,20]

1. 标本制备 实验用健康家兔，雄雌两性，体重 1.5—2 公斤为宜；豚鼠用 300—500 克者。猛击头部致死，迅速开胸

将心肺全部取出，随即置于 10℃ 以下的洛克氏液中，此时心跳迅速减慢。剪开心包膜认清主动脉、肺动脉、右心房和上腔静脉，并将肺、气管、食道等组织剪去，然后将探针插入上腔静脉直达右心室作为右心室定位之标志。沿三尖瓣入口处自右至左切开房室前壁连接处，然后在靠近主动脉根部沿房中隔与右心房游离缘的交界处向上腔静脉方向伸延，剪开右心房但保留 3 毫米左右紧靠右心房的一段上腔静脉，以便探针能继续保持在腔静脉内以利于定位。将右心房前壁向右掀开即可看到冠状窦入口（因可看到少量静脉血由该处流出），然后将整个右心房摘下置于盛氧饱和的洛克氏液的培养皿中，认清下腔静脉入口并洗去血液。将此标本移至由石蜡或硅胶垫底的有机玻璃肌槽中，先用不锈钢针固定上下腔静脉入口，然后左右各用 2 根不锈钢针使心内膜朝上将心房肌固定，随即大部分心房肌切除，只保留上下腔静脉附近的少量心

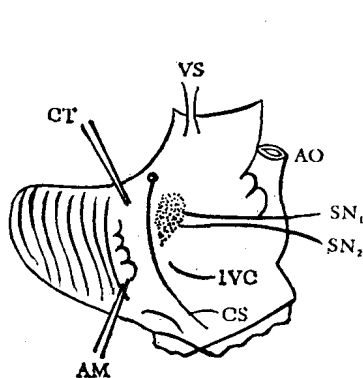


图 5 家兔心房标本示意图。（依 Spear, J. F. 等, 1979）SVC: 上腔静脉；AO: 主动脉；IVC: 下腔静脉；CS: 冠状窦出口；TV: 三尖瓣；VS: 迷走神经刺激电极；CT: 终脊。

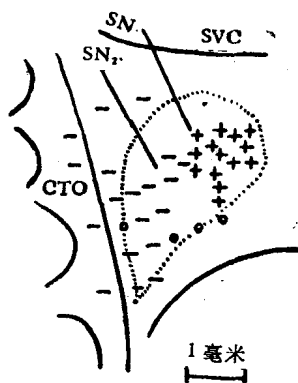


图 6 家兔窦房结起搏细胞所分布的区域。（依 Spear, J. F. 等, 1979）SN₁: 主起步点；SN₂: 辅助起搏区；CT: 终脊；SVC: 上腔静脉。