

生理学实验 第二单元



蛙坐骨神经干复合动作电位的记录 与神经干不应期的测定



中山大学 项辉



实验目的

- 学习神经干标本的制备
- 学习用生理信号计算机采集系统检测神经干双相动作电位并进行不应期和传导速度的测量分析

相关知识

静息电位

刺激与反应

神经干的复合动作
电位

刺激与伪迹



实验原理

刺激与反应

刺激的强度

刺激的持续时间

刺激强度-时间变化率

刺激是指能引起细胞兴奋的内外环境理化因素的改变。若要使细胞对刺激发生反应，如产生动作电位，刺激必须达到一定的量，即**有效刺激**。

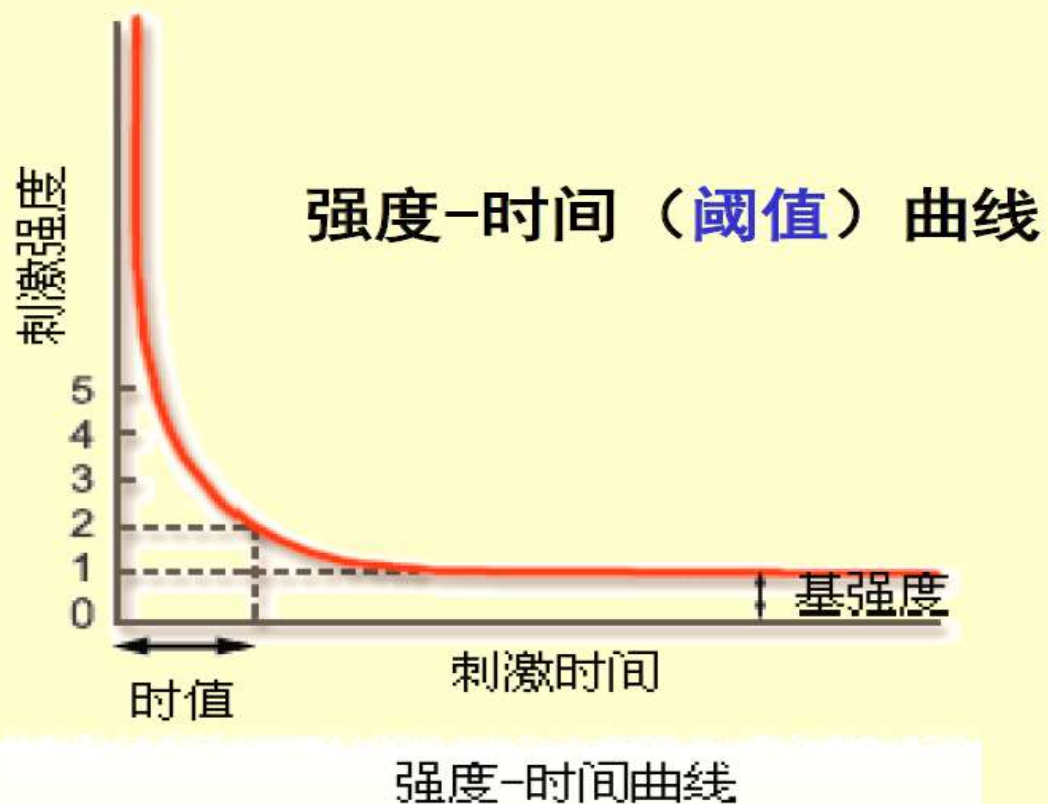
阈值（或者阈强度）：刺激持续时间和刺激强度-时间变化率固定时，引起细胞兴奋的最小刺激强度。

- ◆ 阈刺激：强度等于阈值的刺激
- ◆ 阈下刺激：强度小于阈值的刺激
- ◆ 阈上刺激：强度大于阈值的刺激



实验原理

- 刺激强度、刺激时间、刺激强度-时间的变化率，量化后必须都达到某一临界值，才能成为有效的刺激而引起细胞活动，产生兴奋。



- 引起兴奋的刺激要有一定的强度，并维持一定时间；当其它条件不变时，在一定范围内，产生兴奋的阈强度与刺激的时间成反比。

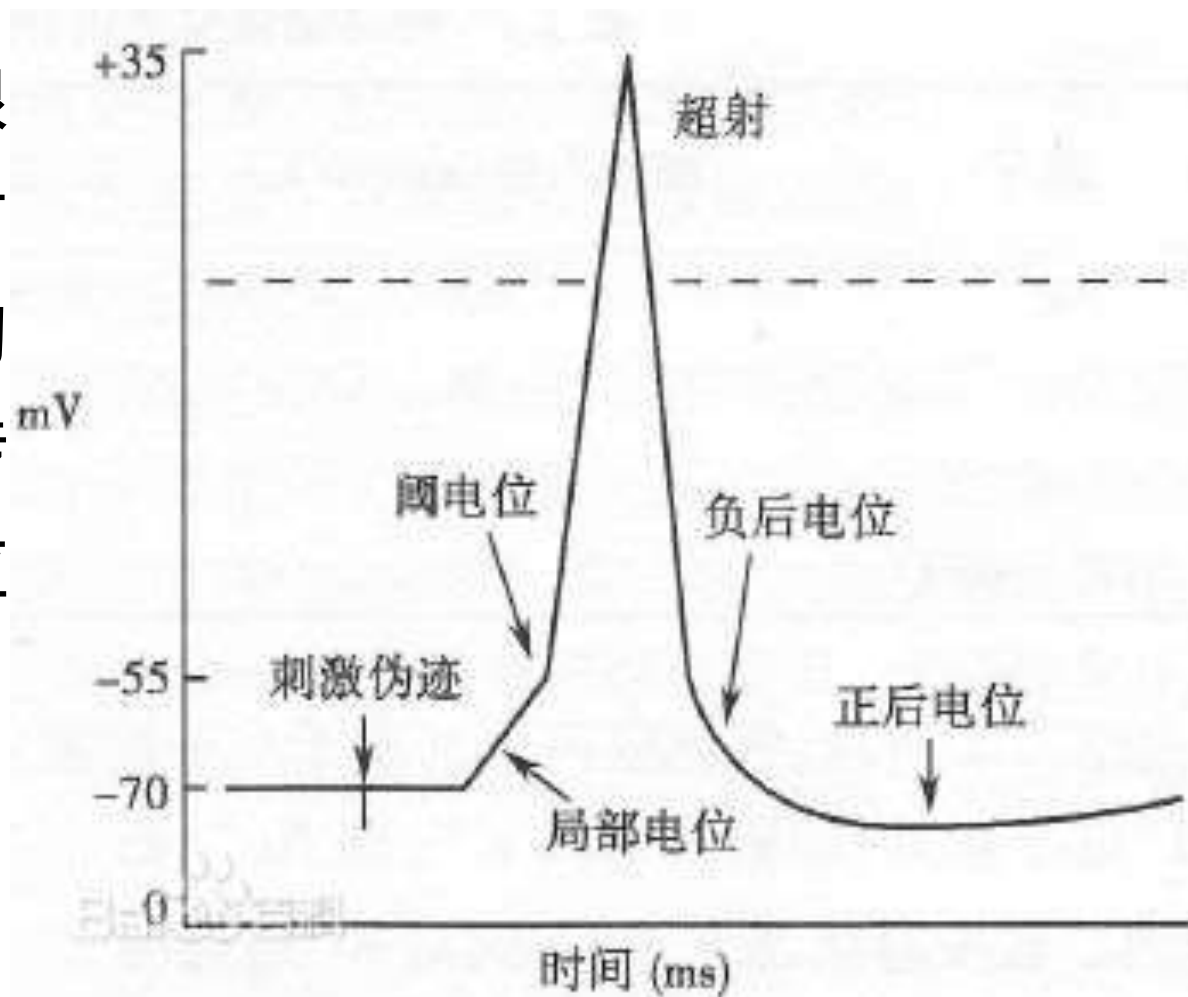


实验原理

可兴奋细胞（神经、肌肉以及部分腺体中的分泌细胞等）受到**有效刺激**时在静息电位的基础上产生的可扩布的膜电位波动。动作电位是实现神经传导和肌肉收缩的生理基础。动作电位包含锋电位和后电位。



静息电位、动作电位

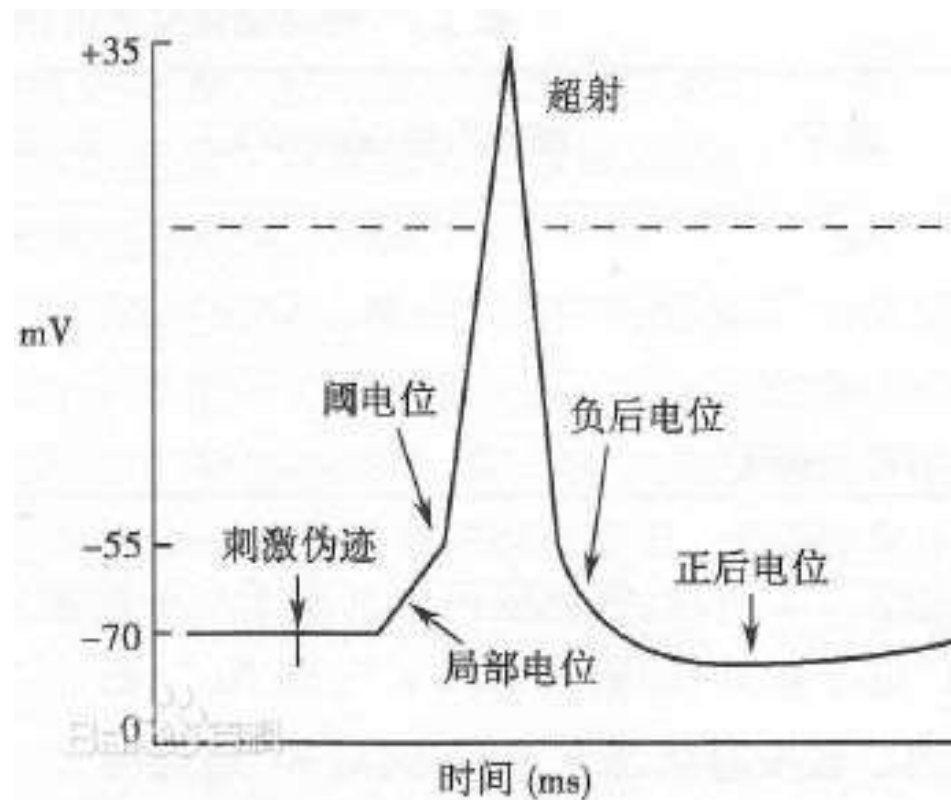


实验原理

兴奋的不应期

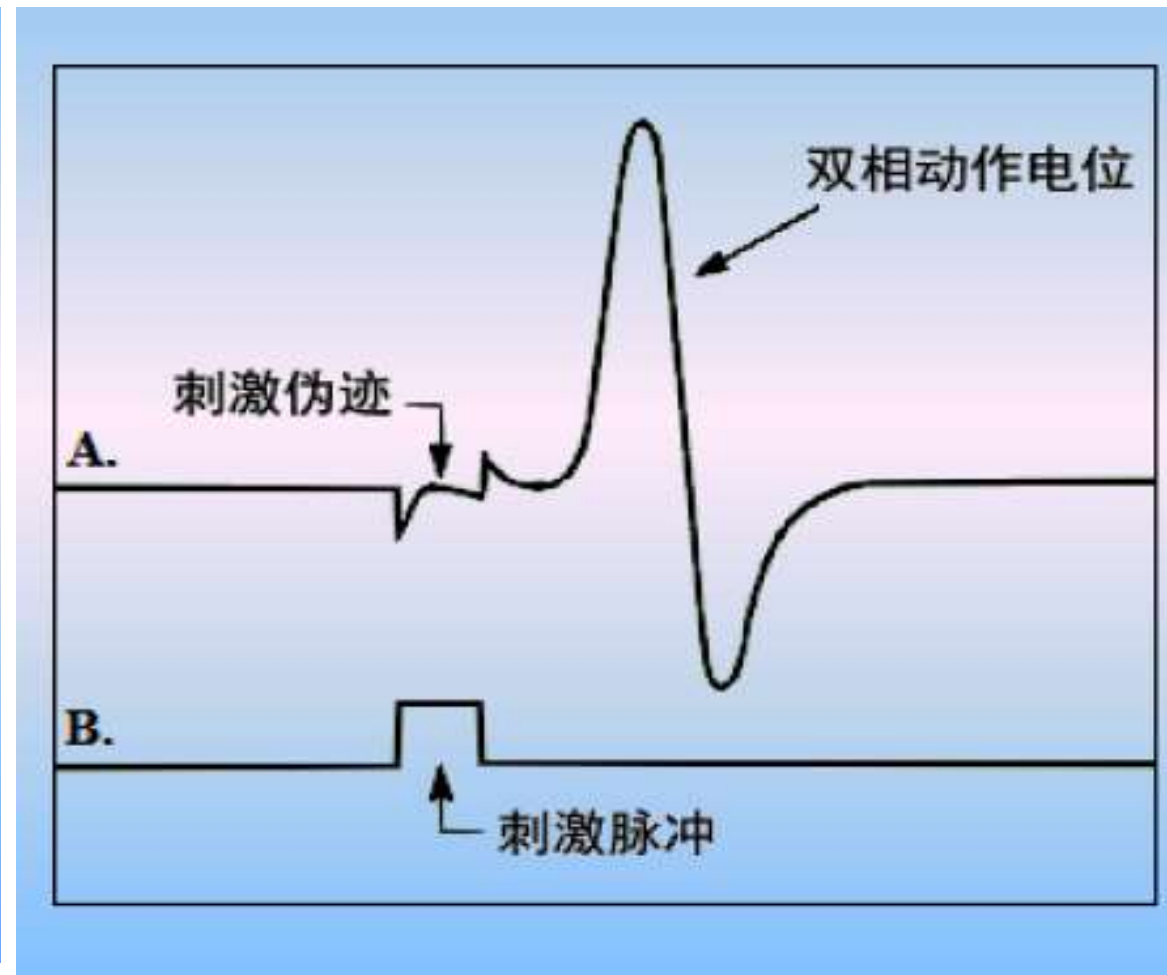
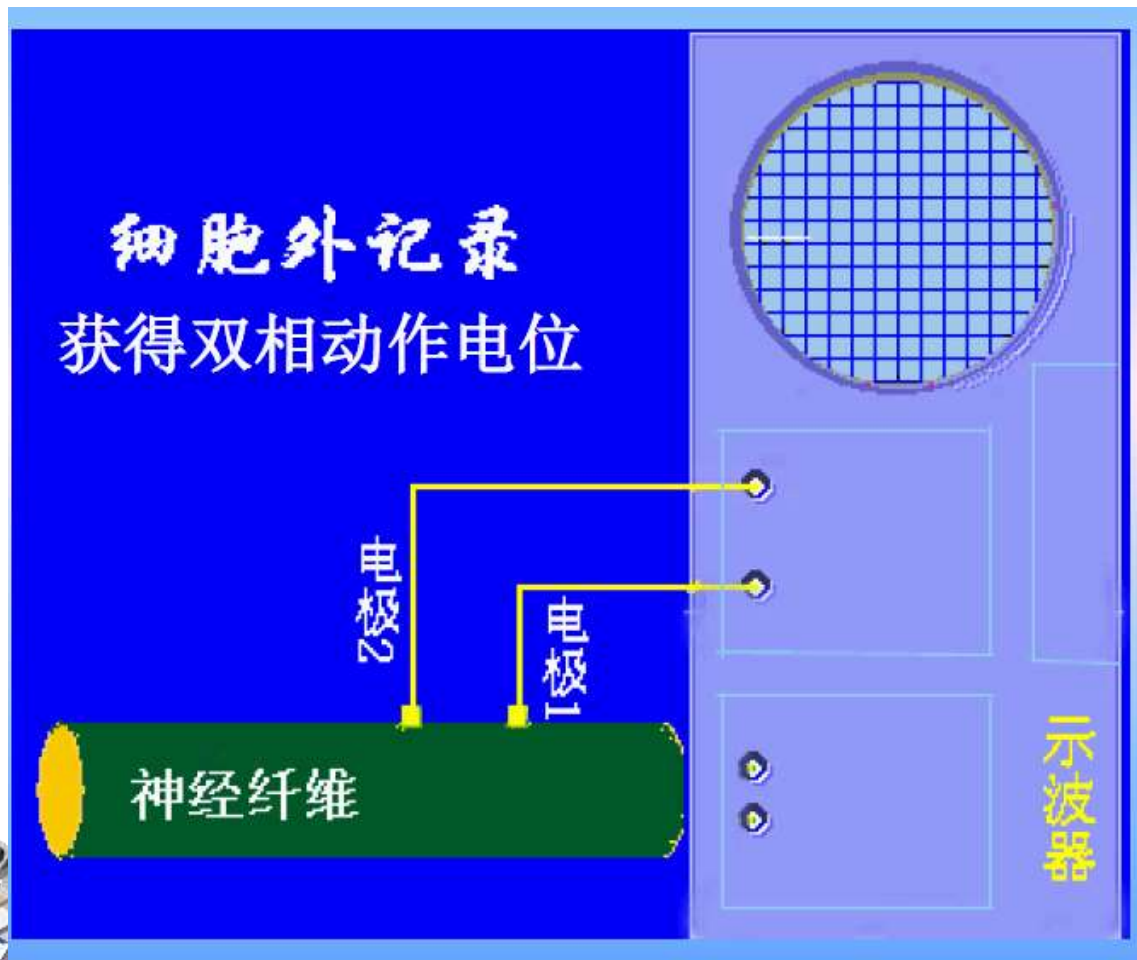
- **绝对不应期**：绝大部分钠离子通道处于失活状态，任何新的刺激都不能引起新的兴奋（峰电位上升支及下降支的大部分时间）。

- **相对不应期**：绝对不应期之后，一些失活的钠离子通道开始恢复，此时只有较正常更强的刺激才能引起新的兴奋（峰电位下降支的后期和超极化期）。因钾通道仍处在开放状态，钾外流可对抗钠内流引起的去极化，所以要求刺激强度必须比阈刺激更强才能使膜电位去极化达到阈电位水平，从而诱发动作电位，此时膜的兴奋性较正常时低。



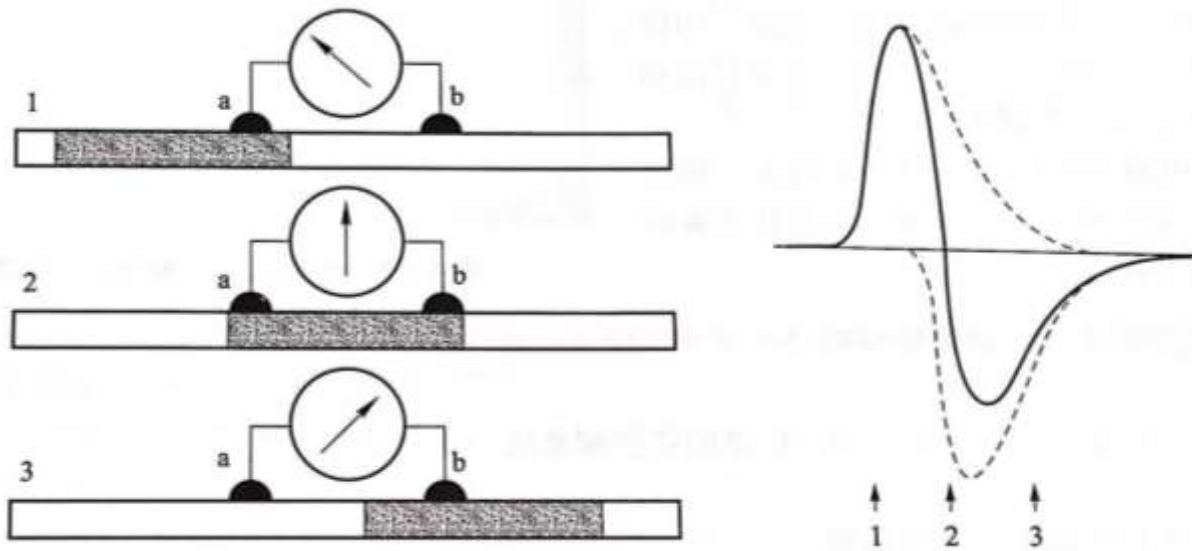
实验原理

细胞外双电极引导记录动作电位



实验原理

神经干双向动作电位



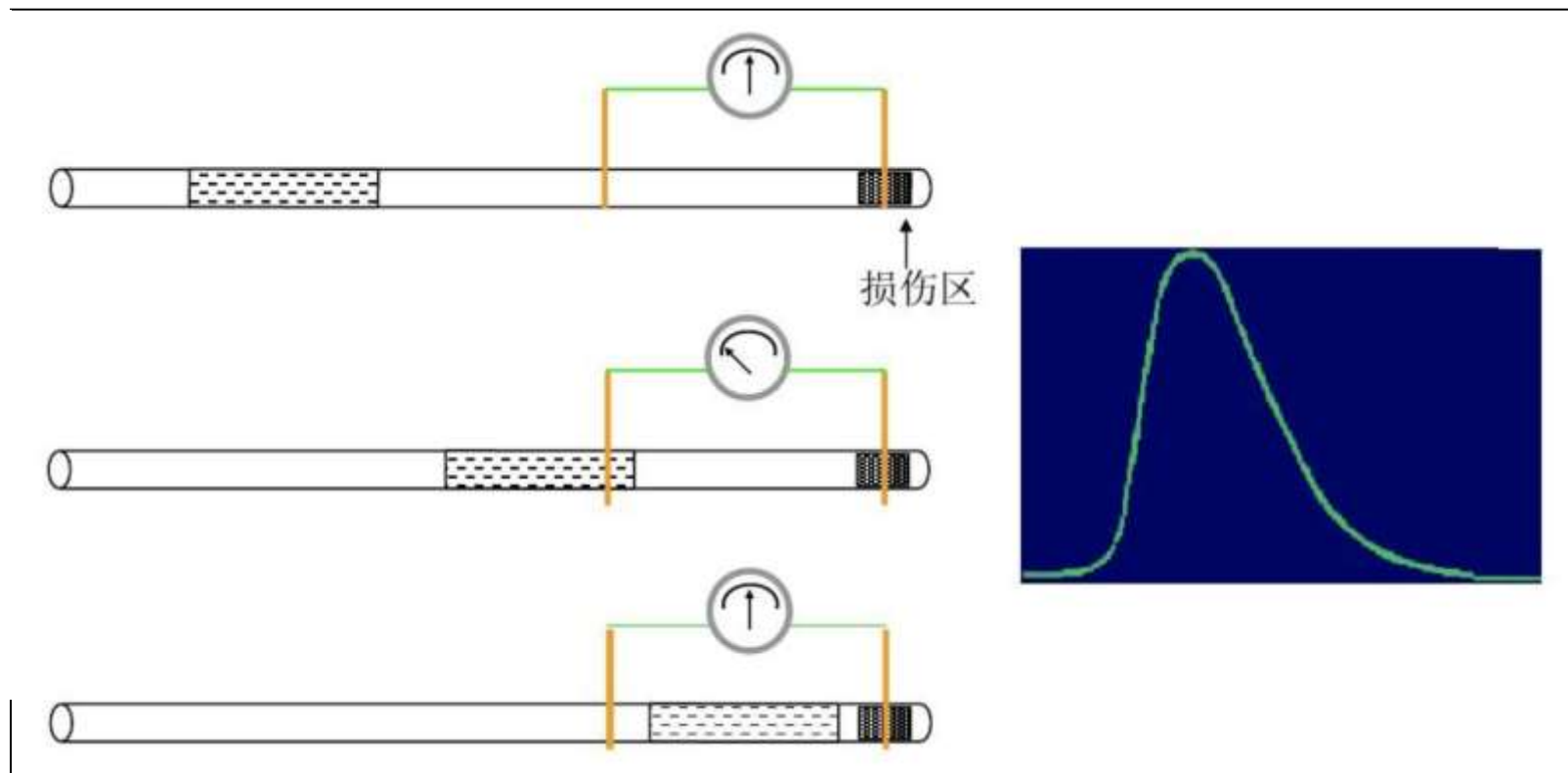
- 负电位变化的动作电位传导到a电极时，a、b之间出现电位差，a负b正，可记录到上相波。
- 当动作电位传至两电极之间时，a、b又处于等电位状态。
- 动作电位进一步传导当到达b电极时，a、b之间又出现电位差，a正b负，可记录到下相波。

实验原理

- 如将细胞外的两个引导电极之间的神经麻醉或者损伤，动作电位只会发生一个方向的电位偏转

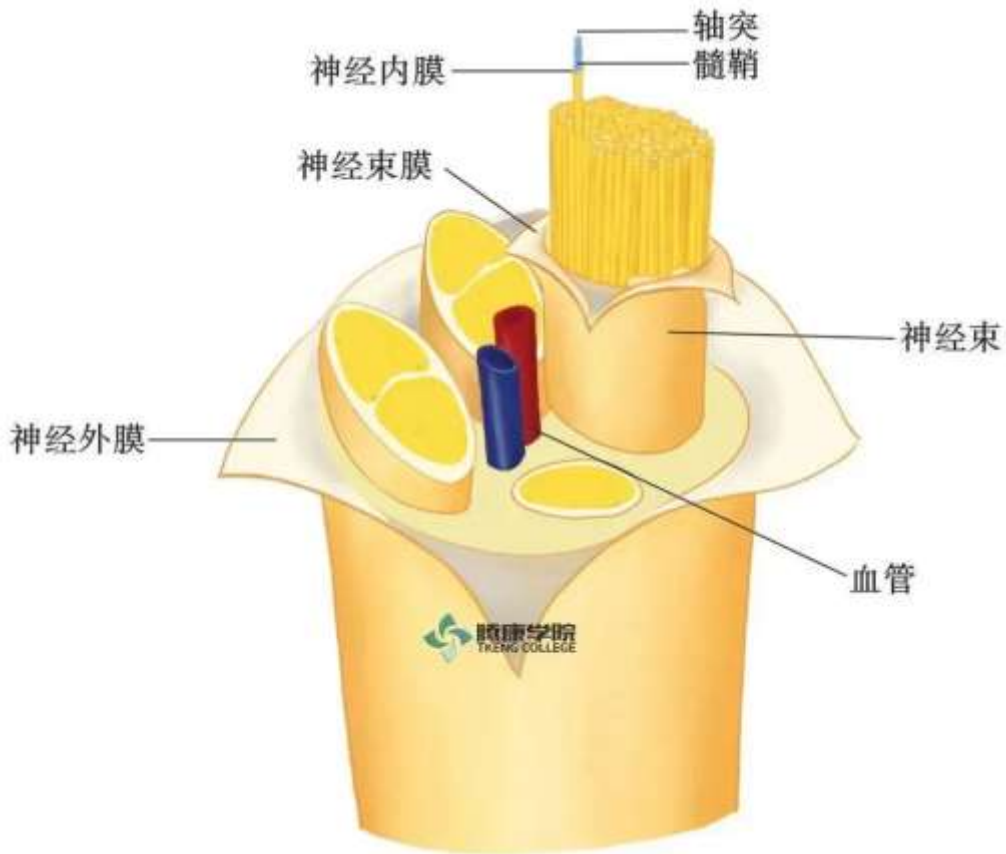


单相动作电位



实验原理

神经干的复合动作电位



- **神经干是由许多神经纤维组成神经组织。**当刺激强度达到少数纤维的阈值时，可出现较小的复合动作电位。
- 随着刺激的加强，参与兴奋的纤维数目增加，复合动作电位的幅度也随之而增大。
- 当刺激强度加大到可引起全部纤维都兴奋时，其复合动作电位幅度即达到最大值。

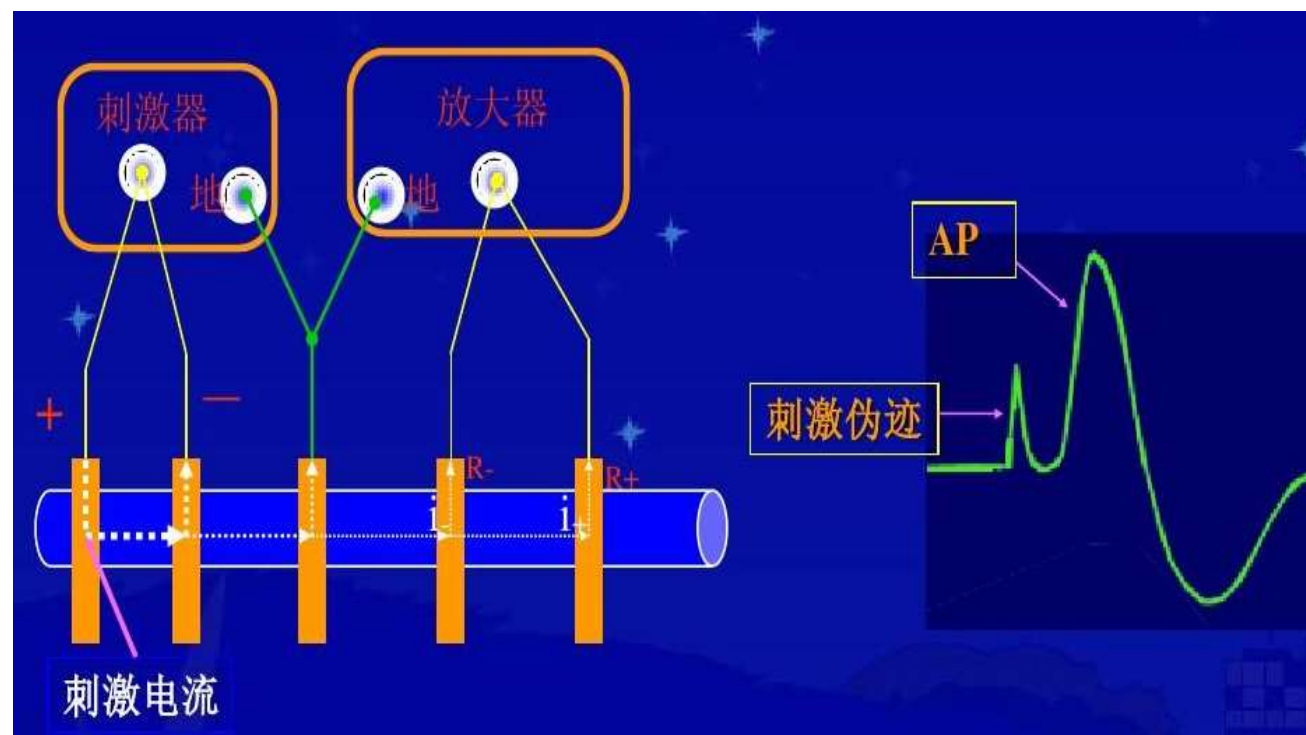
神经干复合动作电位的幅度

在一定范围内随刺激强度的增加而增大

实验原理

刺激伪迹是刺激电流通过组织器官或机体内外的电解质溶液，扩散至引导电极而形成的电位差信号。它在动作电位之前出现，而且会随着刺激强度的增加而增大。

刺激的伪迹



若刺激伪迹过大，会影响动作电位的观察
较理想的伪迹应小而清晰，不影响动作电位的观察



实验原理

减小伪迹的方法

- 增大刺激电极和引导电极之间距离
- 刺激电极和引导电极之间增加连接专用地线
- 尽量减少刺激强度（标本活性相关）和波宽

神经标本活性较好或刺激强度较小，
均能减小刺激伪迹



实验动物与标本

实验动物

牛蛙



实验动物与标本

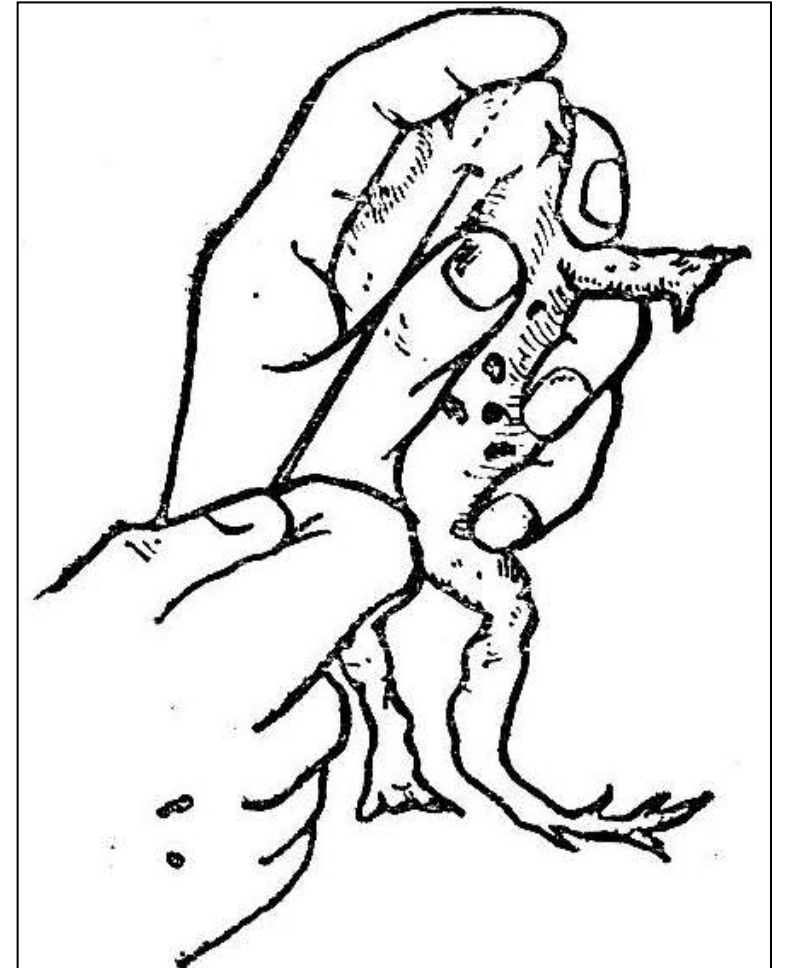
使用合适的工具与器械



实验方法

1. 牛蛙毁脑

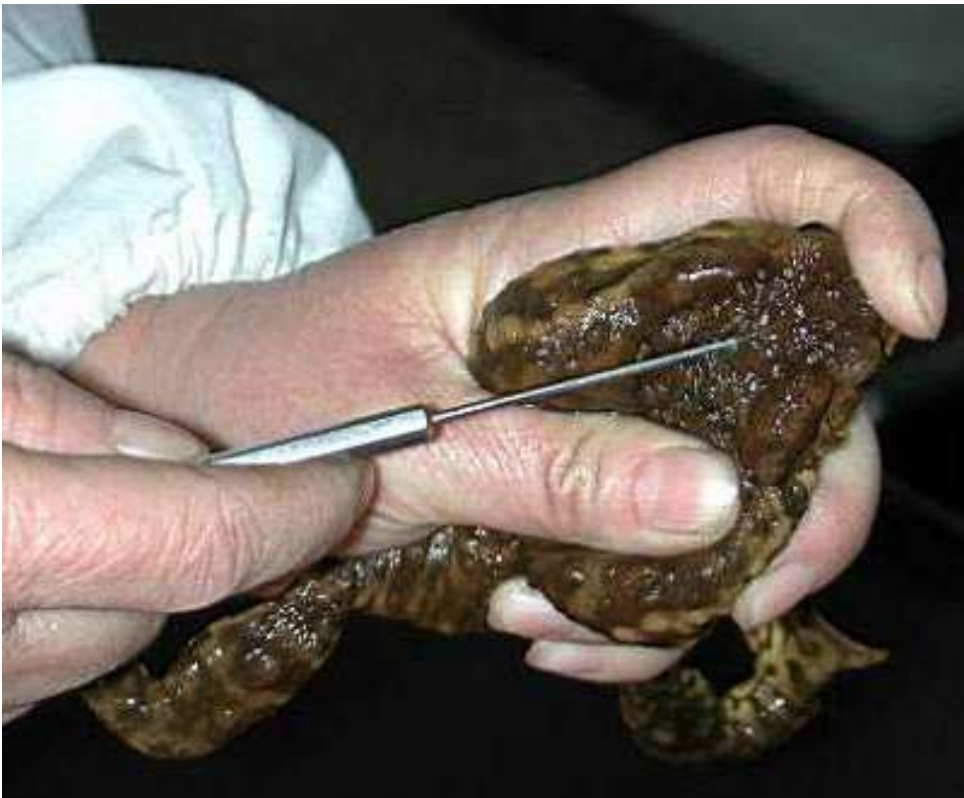
- 用食指将其头部压向下方，使其头部与躯干约 40° 角，可清楚地看到头颅与脊柱交接处的枕骨大孔；
- 将探针在枕骨大孔处垂直插入，先是左右摆动探针以横断脑和脊髓的联系；
- 再将探针向前方插入颅腔，旋转并摆动探针以捣毁蟾蜍的脑组织。



实验方法

2. 牛蛙毁髓

- 捣毁脑组织后，将探针尖部轻轻提起（不必从枕骨大孔完全拔出），将探针转向后方并插入脊椎管内。



- 探针刺入椎管，蛙腿**后蹬挺直**。
- 随即四肢松软，对痛刺激不再有任何反应时，表明蛙的神经中枢已被完全刺毁。



实验方法

3. 环切去皮

- 捣毁神经中枢后，将青蛙腹位放在蛙板（蜡盘）上。在两前肢的下方将皮肤做**环周切开**。



实验方法

- 用带齿镊或手撕去前肢以下的全部皮肤。



实验方法

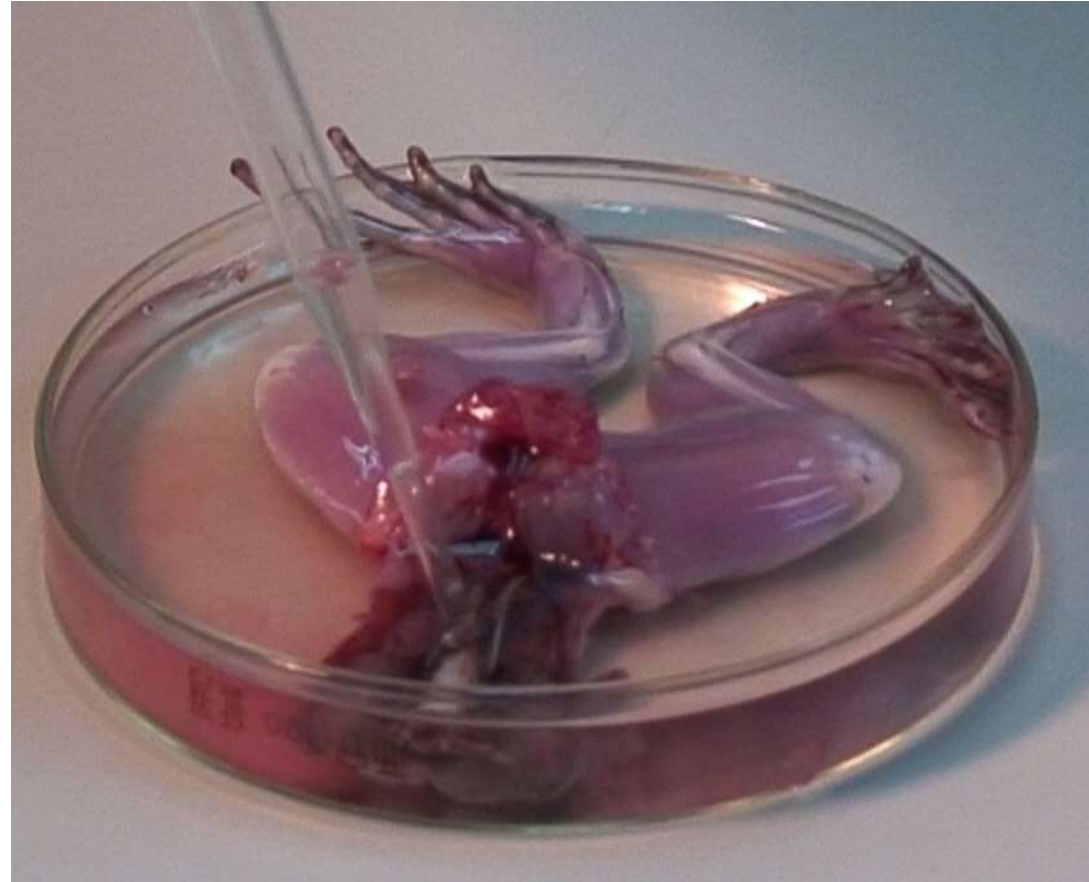
4. 剪断蛙体

- 将蛙体腹位放置于洗净的蛙板上，剪开腹壁，将内脏向头端方向拉扯。



实验方法

- 在尾杆骨上方2~3节脊椎处，拦腰剪断脊柱，弃掉蛙体上半段，将标本置于盛有任氏液的培养皿中，用吸管吸取任氏液冲洗神经。



实验方法

- 用大剪刀沿正中线将脊柱分为两半，并从耻骨联合中央剪开两侧大腿，使之完全分离。



实验方法

蛙的盆腔及腹后壁

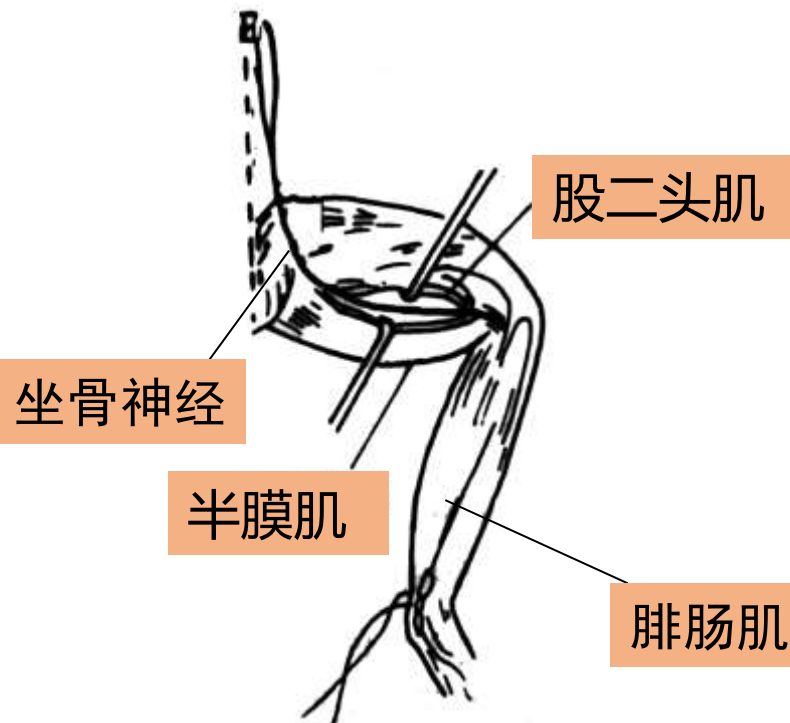


坐骨神经

腰骶神经丛

5. 神经分离

坐骨神经标本示意图



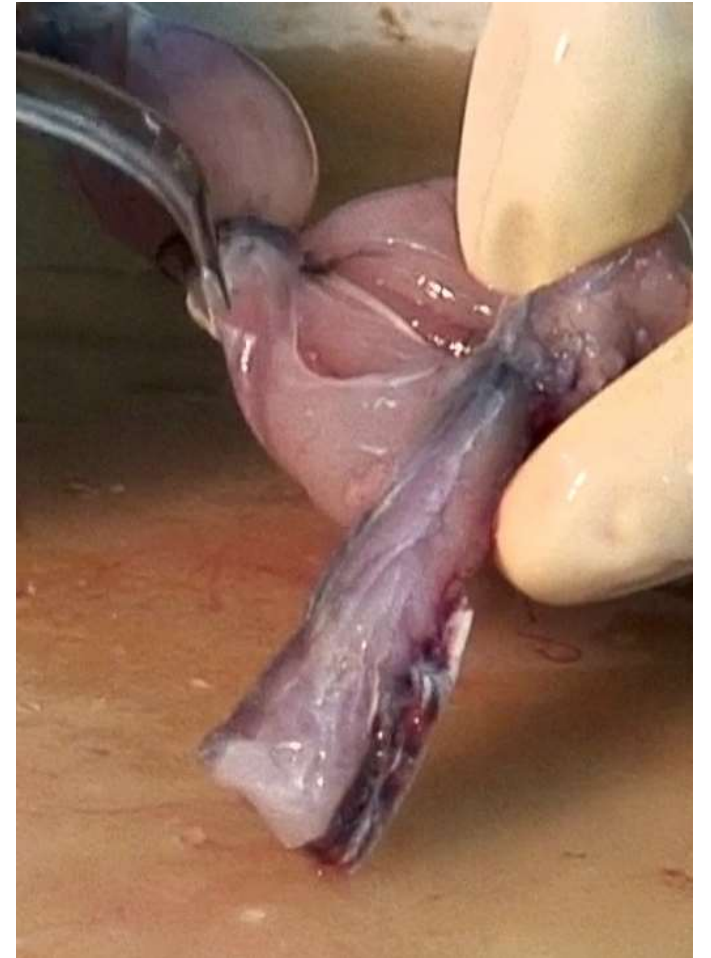
坐骨神经

股二头肌

半膜肌

腓肠肌

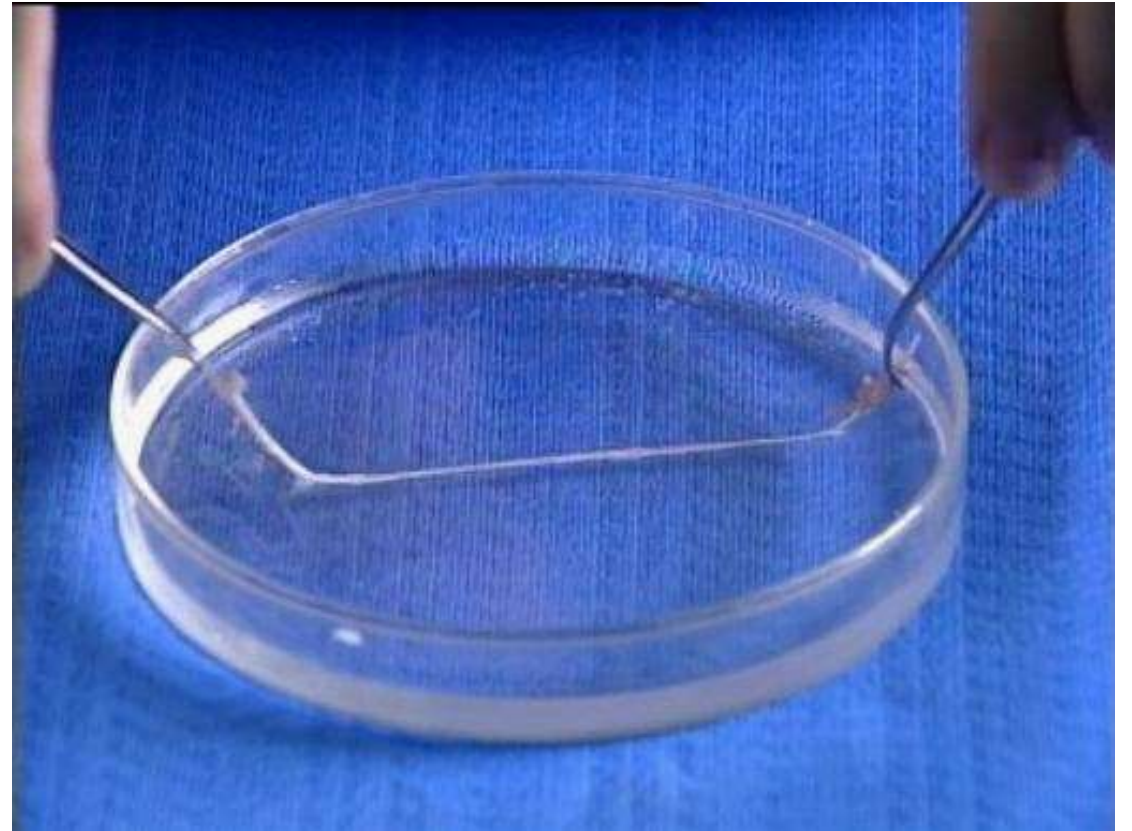
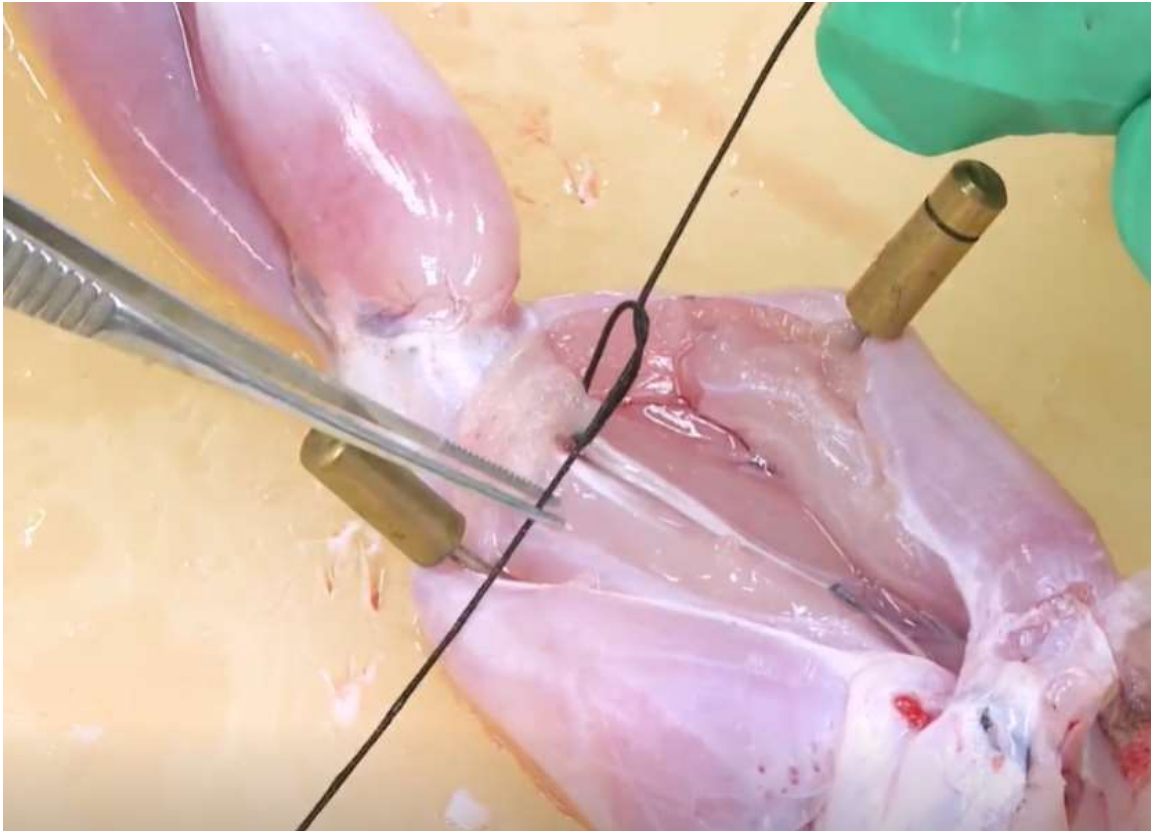
- 标本背侧向上放置，循坐骨神经沟（股二头肌及半膜肌之肌间沟）找出坐骨神经的大腿部分。



- 顺着神经走向剪去沿途的小分支，将神经从半膜肌和股二头肌的肌缝中分离出来



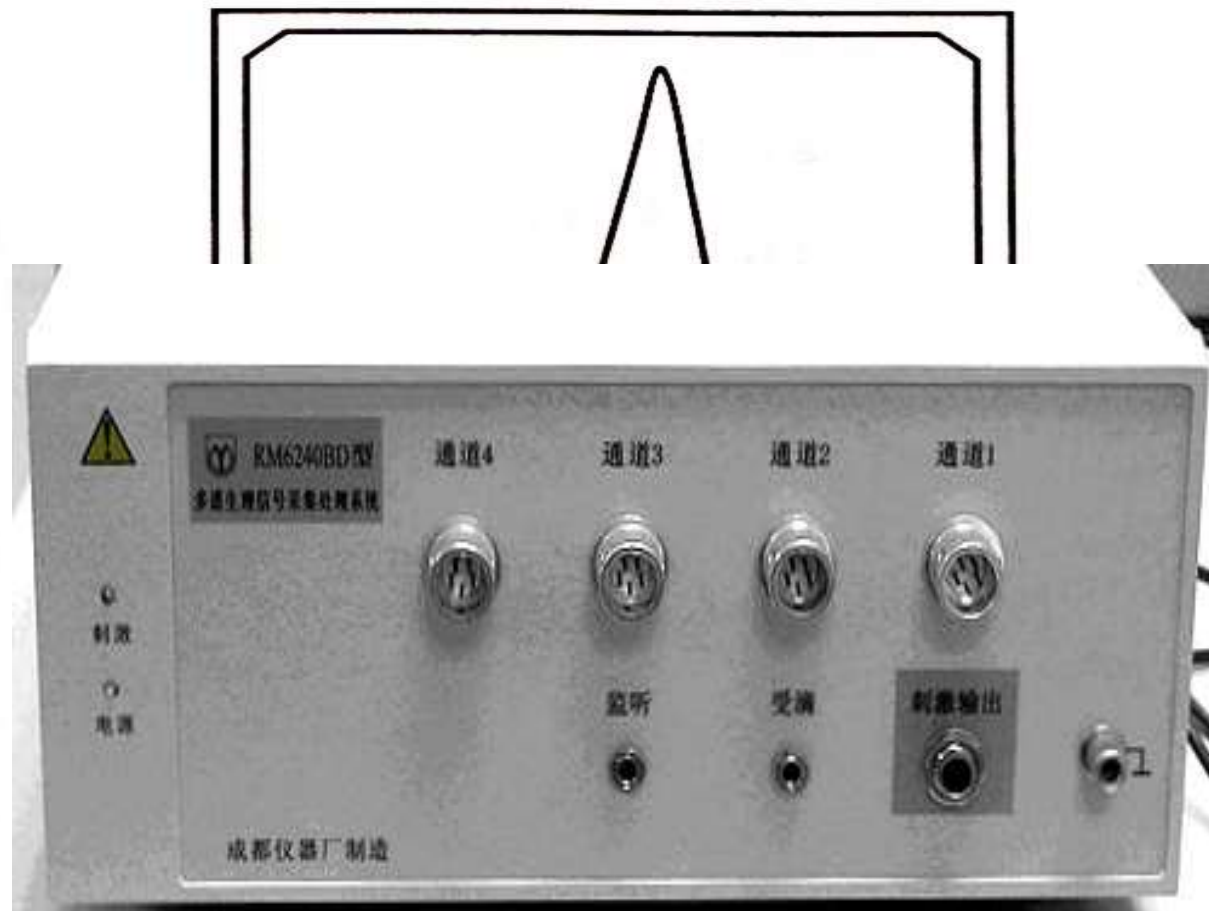
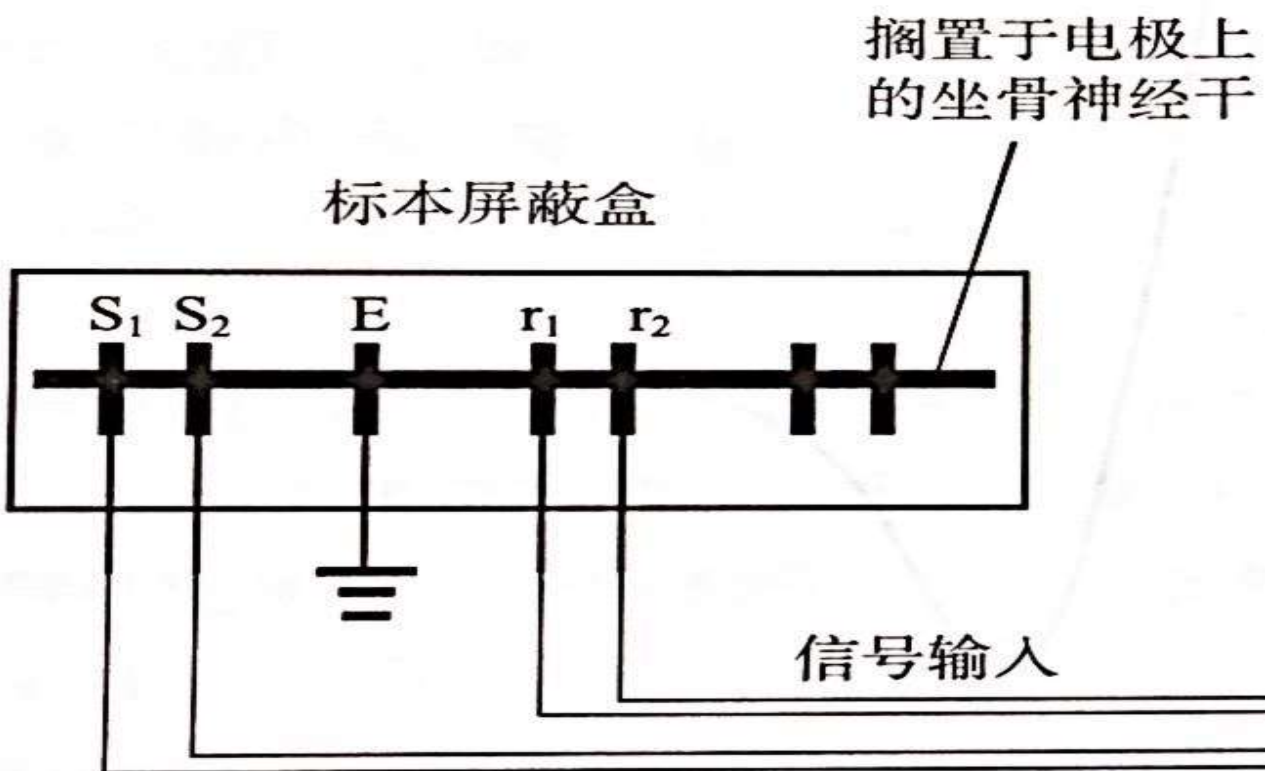
- 用湿润的线结扎神经两端，夹住结扎线的线头，将制备好的神经标本放在干净的任氏液中待用。



标本制备注意事项

1. 毁脑和脊髓后，先去除皮肤。下肢标本放培养皿中，用少量的任氏液冲液一下即可。
2. 分离神经时，一定要把周围的结缔组织剥离干净。在剥制标本时，**不能用金属器械触碰神经干**；结扎线要先用任氏液润湿。
3. 在标本制备过程中，勿损伤或用力牵拉神经，应经常用Ringer液润湿神经干。

实验装置与连接



刺激输出

S₁、S₂: 刺激电极, S₁ 接刺激器输出正端 (红线), S₂ 接刺激器输出负端 (黑线); E: 接地电极, 与屏蔽盒的外壳相连, 接放大器地线端, 即生物电输入电缆地线端 (黑线); r₁、r₂: 引导电极, r₁ 接放大器负输入端, 即生物电输入电缆负端 (绿线或黄线), r₂ 接放大器正输入端, 即生物电输入电缆正端 (红线)

刺激参数 设置范围

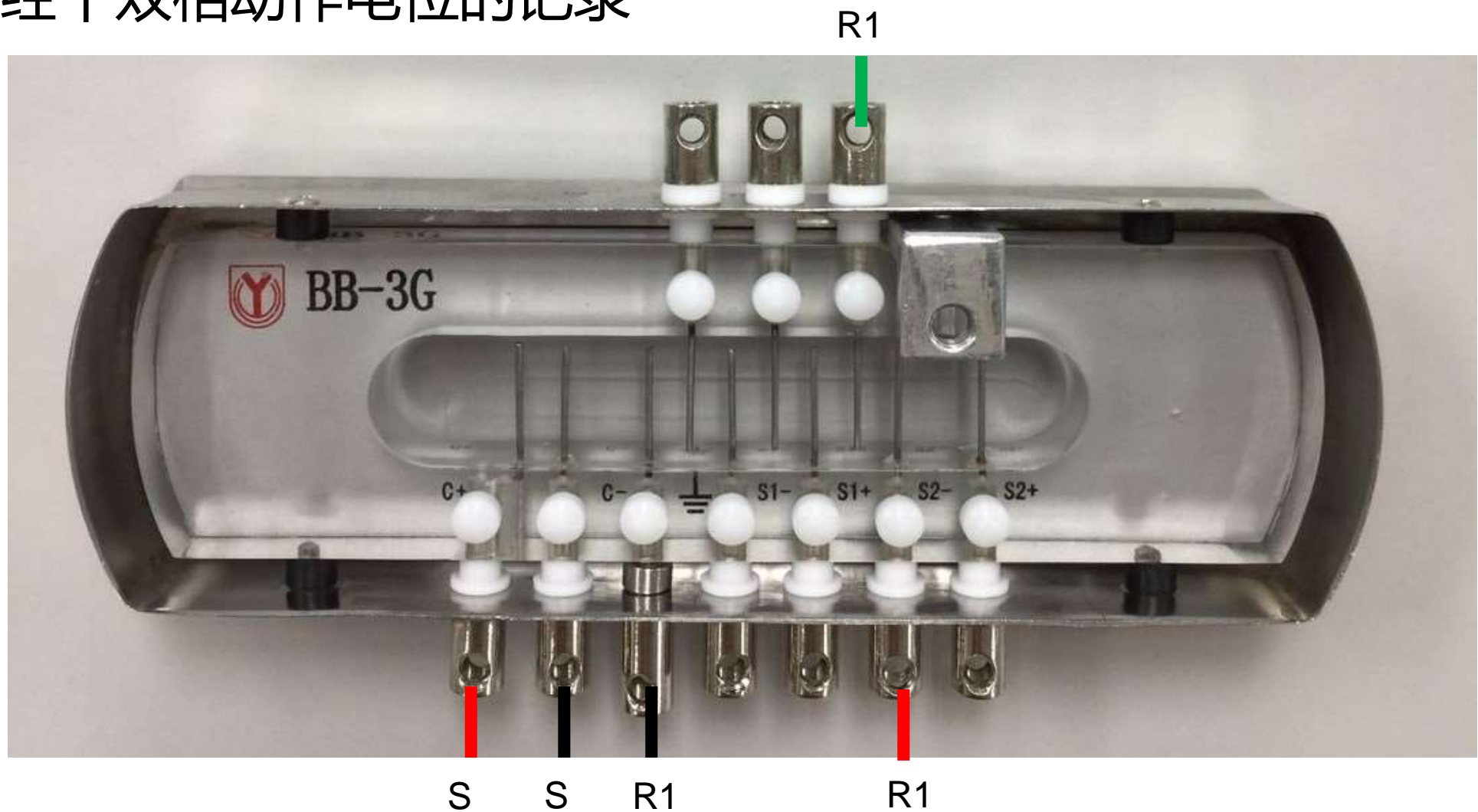
实验名称	刺激参数							
	刺激方式	延时	波宽	强度	波间隔	备注		
大脑皮层诱发电位	单刺激	10ms	0.2ms	7.5V		用叠平均功能		
蛙心期前收缩一代偿间歇	单刺激	0.0ms	10ms	4V				
神经干兴奋传导速度的测定	单刺激	5.0ms	0.2ms	1V				
神经干兴奋不应期的测定	双刺激	2.0ms	0.2ms	1V	20ms (起始值)			
神经干动作电位(蟾蜍)	单刺激	5ms	0.2ms	1V				
肌肉神经刺激强度与反应	自动单刺激	高 级 (选项)						
		强 度 递 增						
		延时	波宽	强度	频率	脉冲数	强度增量	组间延时
		20ms	1ms	0.1V	1Hz	1(串)	0.02V	2s
肌肉神经刺激频率与反应	自动单刺激	频 率 递 增 (常规实验)						
		延时	波宽	强度	频率	脉冲数	频率增量	组间延时
		20ms	1ms	2V	1Hz	1(串)	2Hz	4s

实验装置与连接



实验观察与记录

1. 神经干双相动作电位的记录



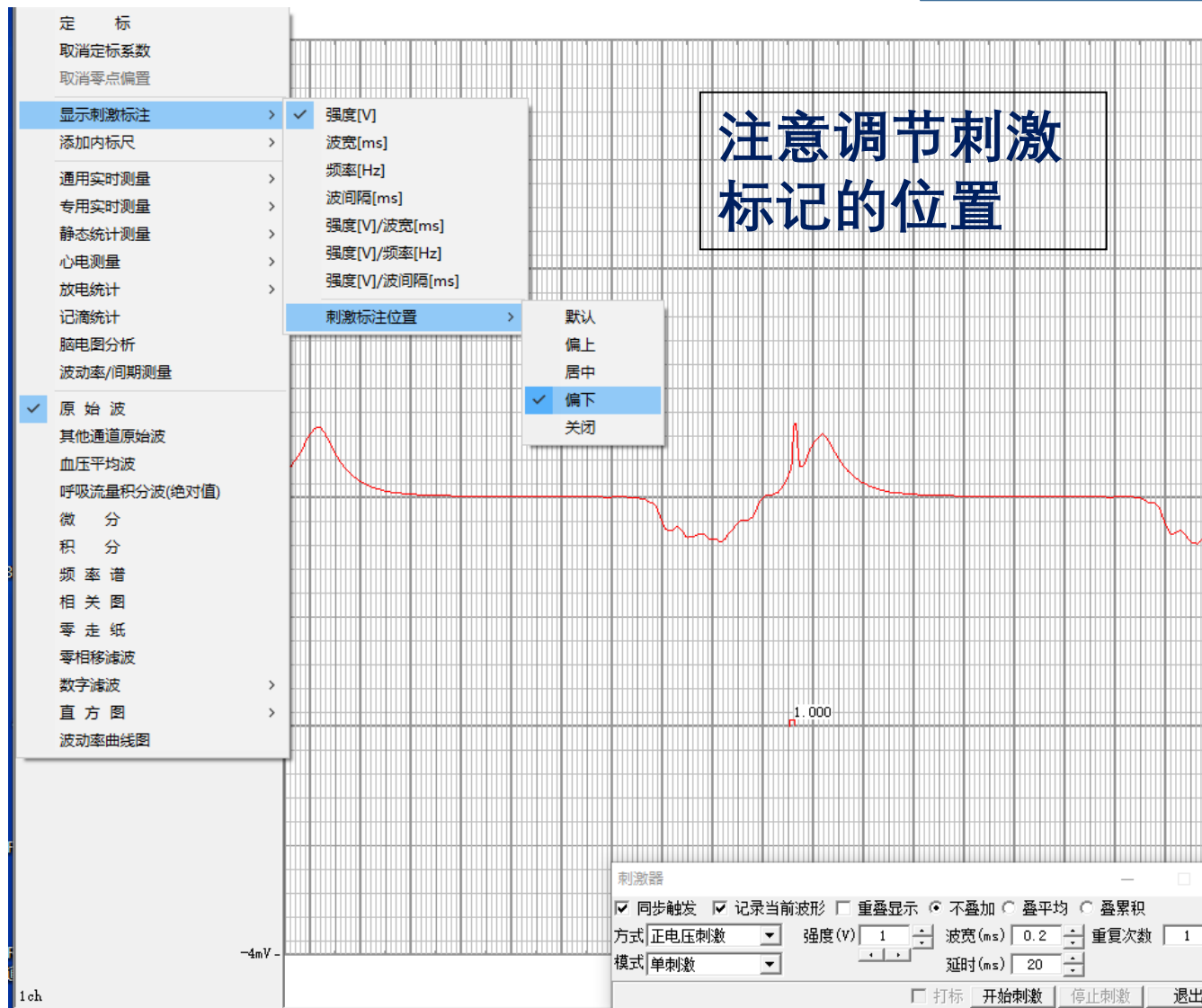
实验观察与记录

实验选择模块



实验观察与记录

实验参数设置



扫描速度: 1 ms/div

灵敏度: 2 mV

时间常数: 0.001 s (~159Hz)

滤波: 1 KHz

50 Hz陷波: 开

打开刺激器, 勾选同步触发

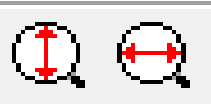
刺激模式: 单刺激

刺激波宽: 0.1 ms

延时 2ms, 同步触发

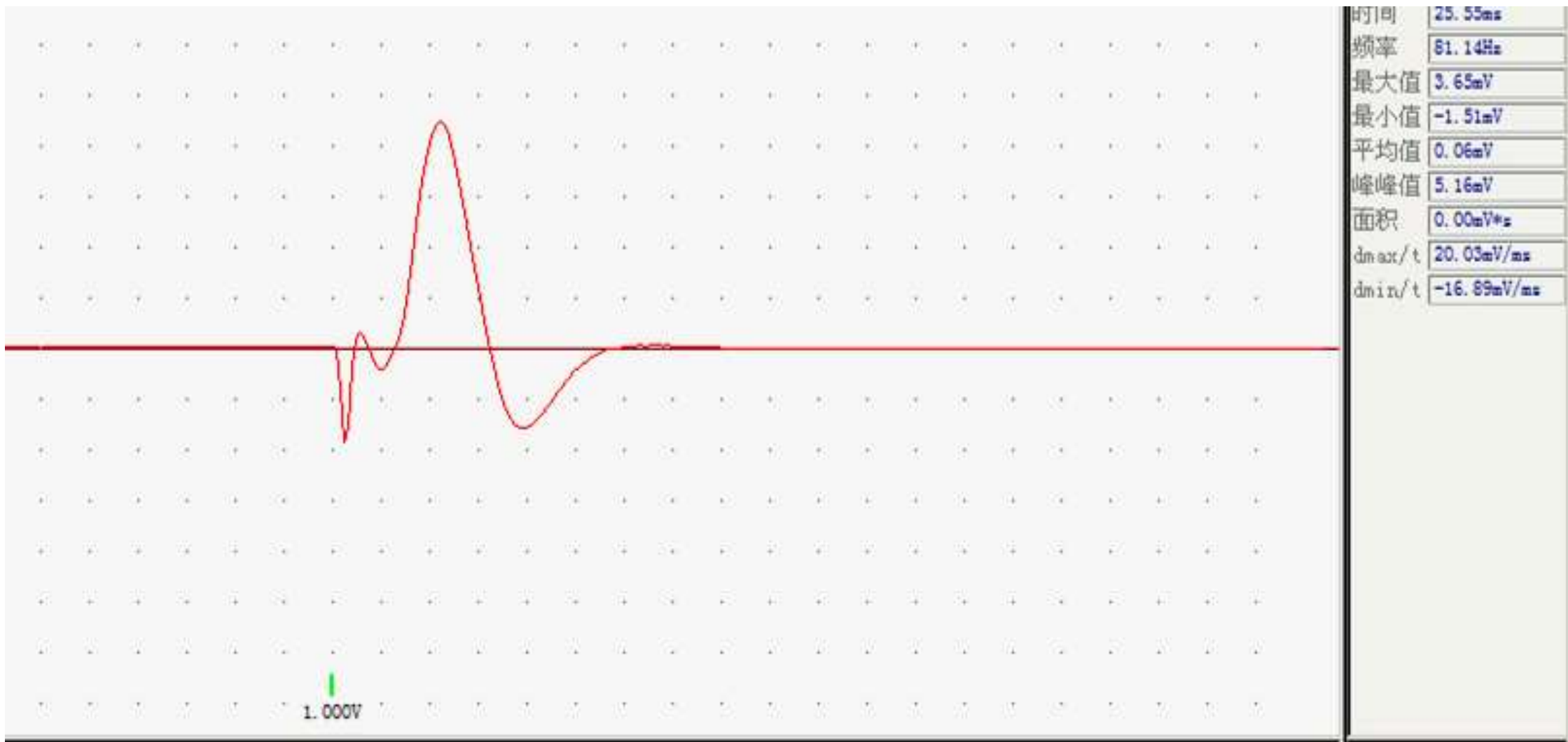
实验观察与记录

实验步骤

1. 刺激强度设置为0.1V, 0.2V, 0.3V……, 点击开始刺激, 找出产生动作电位的大致刺激强度范围。
2. 在以上参数的基础上, 将扫描速度改为500 ms/div, 打开刺激器, 取消同步触发, 改刺激模式为**强度递增刺激**, 强度设置为不产生动作电位的最大刺激强度, 增量设置为0.01v, 波间隔设置为2s。点击示波按钮, 开始示波。波形稳定后, 点击记录按钮, 记录动作电位从无到有, 直至所有神经都兴奋的一段波形。
3. 选择工具栏中的缩放按钮  , 调整步骤2中的波形, 观察伪迹及动作电位的信号, 记录典型的动作电位图。并根据步骤2中的波形图找出阈刺激以及导致所有神经纤维都兴奋的最小刺激强度。

实验观察与记录

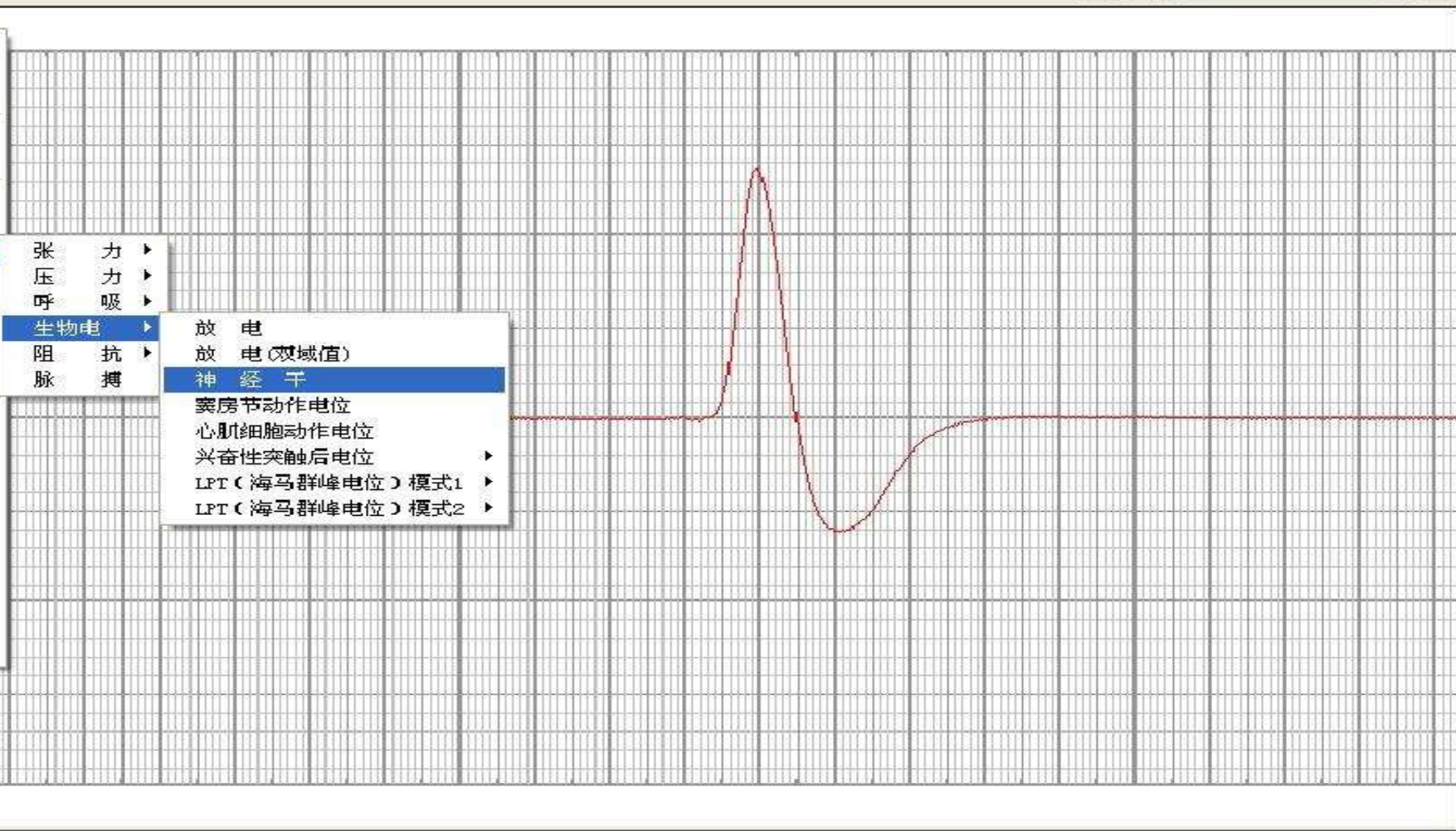
神经干双相动作电位结果示例





子文件: 1 名称: 神经干动作电位 日期: 2002-03-27

- 选择
 - 定 标
 - 取消定标系数
 - 取消零点偏置
 - 显示刺激标注
 - 添加内标尺
 - 通用实时测量
 - 专用实时测量
 - 静态统计测量
 - 张 力
 - 压 力
 - 呼 吸
 - 生物电
 - 放 电
 - 放 电(双阈值)
 - 神 经 干
 - 窦房节动作电位
 - 心肌细胞动作电位
 - 兴奋性突触后电位
 - LPT(海马群峰电位)模式1
 - LPT(海马群峰电位)模式2
 - 阻 抗
 - 脉 搏
 - 心电图测量
 - 放电统计
 - 记滴统计
 - 脑电图分析
 - 波动率/间期测量
- 原始波
- 其他通道原始波
- 微 分
- 积 分
- 频 率 谱
- 相 关 图
- 零 走 纸
- 零相移滤波
- 数字滤波
- 直 方 图



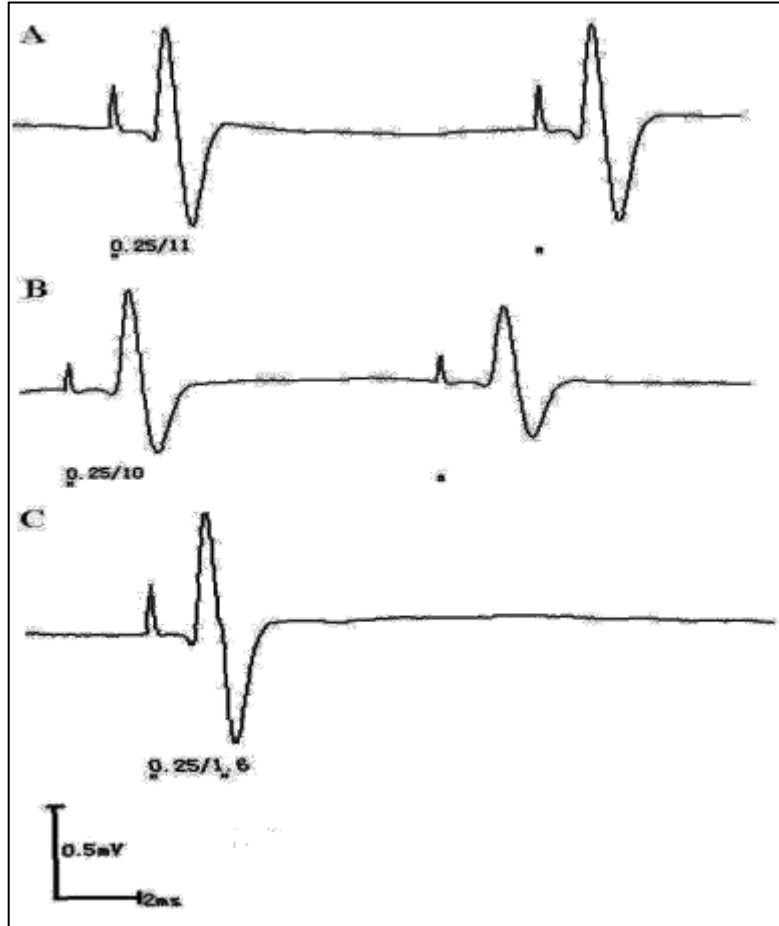
40kHz
生物电
0.50ms/div
2mV
0.001s
1kHz
导联关

1ch -4mV - 0.01秒 << >> 同步扫描 数字

- 双脉冲刺激：
 - 第一个刺激先作用于组织，作为条件刺激；
 - 第二个刺激为测试刺激，用来测试不应期；
- 在本实验中，通过调整刺激间隔的时间来检测不应期。当测试刺激落入条件刺激所引起的不应期中，测试刺激引起的兴奋将发生改变。

实验观察与记录

神经干不应期的测定结果示范



A. 两个刺激间隔较大，产生两个独立的动作电位；

B. 测试刺激落入前一个动作电位的相对不应期，产生一个不完整的动作电位；

C. 测试刺激落入前一个动作电位的绝对不应期。

自动测量

模块：实验-肌肉神经-**神经干兴奋不应期的自动测定**

默认：双刺激的波间隔（20 ms - 0.3 ms）

- ①摸索引发全部神经兴奋的最小刺激强度。然后在此强度下进行不应期的测定。
- ②刺激器中选择同步触发，调节刺激标注位置，显示时间
- ③点自动键开始刺激，系统自动存盘。用PgUp和PgDn翻页，查找适当的波形截图，注意记录临界点的时间以计算绝对不应期和相对不应期的时间点。

手动测量

①模块：实验-肌肉神经-**神经干兴奋不应期测定**

②在刺激器中选择“双刺激模式”

③选择同步触发模式。

④手动输入波间隔，点击刺激键。

选择

4mV -

2mV -

0mV -

-2mV -

-4mV -

1 ch

- 肌肉神经
 - 刺激强度对骨骼肌收缩的影响
 - 刺激频率对骨骼肌收缩的影响
 - 刺激强度与反应的关系
 - 刺激频率与反应的关系
 - 神经干动作电位**
 - 神经干兴奋传导速度的测定
 - 神经干兴奋不应期的测定 ←
 - 神经干兴奋不应期的自动测定 ←
 - 肌肉兴奋—收缩时相关系
 - 神经干动作电位、肌电、肌肉收缩
- 循环
- 呼吸
- 消化
- 感觉器官
- 中枢神经
- 泌尿
- 减压神经放电、血压、心电同步实验
- 药理学专用实验
- 病理生理专用实验
- 创建实验菜单项目
- 保存自定义实验项目...
- 打开自定义实验项目...
- 最近实验参数
- 实验信息...
- 量纲转换
- 标记组...

生物电

1.00ms/div

2mV

0.001s

1kHz

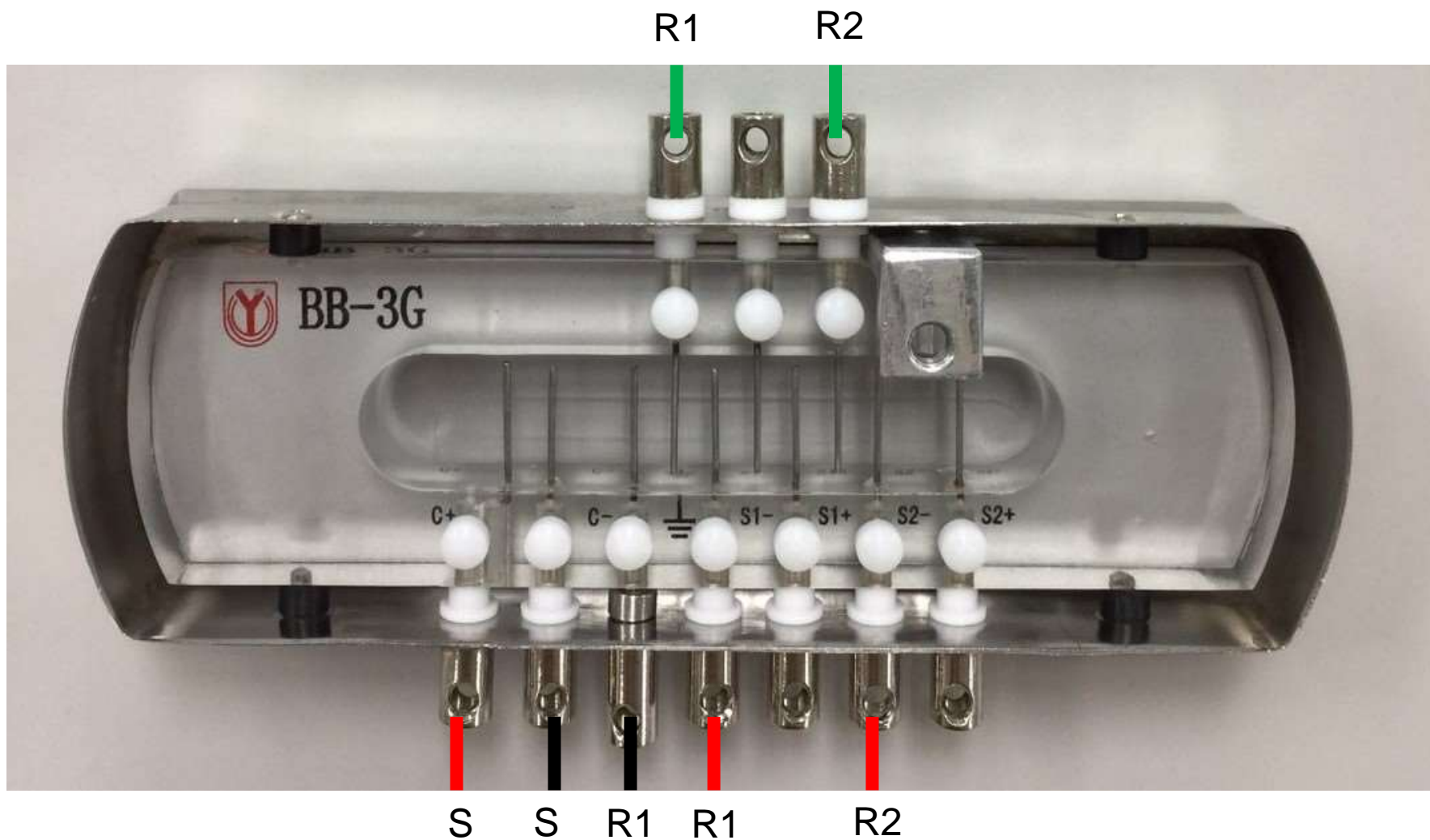
导联关

同步扫描

数字

3. 传导速度的测定

设备连接方式



实验模块选择及参数调节

➤模块：实验-肌肉神经-神经干兴奋传导速度的测定

- 1) 摸索引发全部神经兴奋的最小刺激强度。然后在此强度下进行传导速度的测定。
- 2) 调整参数(刺激波宽0.1 ms)，记录通道1和通道2的动作电位。
- 3) 选择工具-显示所有通道-通道1和通道2合并，并显示于通道1
- 4) 区域测量检测两个波峰之间的时间差。
- 5) 根据传播距离和时间差计算传导速率。



名称: 神经干动作

选择

4mV

2mV

0mV

-2mV

-4mV

1 ch

- 肌肉神经
 - 刺激强度对骨骼肌收缩的影响
 - 刺激频率对骨骼肌收缩的影响
 - 刺激强度与反应的关系
 - 刺激频率与反应的关系
 - 神经干动作电位**
 - 神经干兴奋传导速度的测定
 - 神经干兴奋不应期的测定
 - 神经干兴奋不应期的自动测定
 - 肌肉兴奋--收缩时相关关系
 - 神经干动作电位、肌电、肌肉收缩
- 循环
- 呼吸
- 消化
- 感觉器官
- 中枢神经
- 泌尿
- 减压神经放电、血压、心电同步实验
- 药理学专用实验
- 病理生理专用实验
- 创建实验菜单项目
- 保存自定义实验项目...
- 打开自定义实验项目...
- 最近实验参数
- 实验信息...
- 量纲转换
- 标记组...

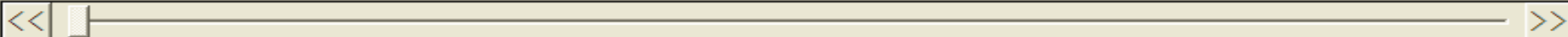
- 刺激强度对骨骼肌收缩的影响
- 刺激频率对骨骼肌收缩的影响
- 刺激强度与反应的关系
- 刺激频率与反应的关系
- 神经干动作电位**
 - 神经干兴奋传导速度的测定
 - 神经干兴奋不应期的测定
 - 神经干兴奋不应期的自动测定
- 肌肉兴奋--收缩时相关关系
- 神经干动作电位、肌电、肌肉收缩



+ -

40kHz

- 生物电
- 1.00ms/div
- 2mV
- 0.001s
- 1kHz
- 导联关



同步扫描

四、实验报告内容

1. 每人剥制一条神经标本。
2. 记录**阈刺激的强度**，以及神经干全部神经纤维兴奋的**最小刺激强度**。可以是不同刺激强度的动作电位变化图
3. 采用**最小刺激强度**刺激神经干，记录典型的神经干复合动作电位（注意调节适当的参数使伪迹与动作电位尽量分离）。
4. 神经兴奋不应期的测定。
实验结果一共3个图（双刺激下的两个独立的动作电位，处于相对不应期两个动作电位，处于绝对不应期内的两个动作电位）
请计算出绝对不应期，相对不应期的时间段。
5. 神经干的传导速度（选做）。

动手吧!

