

生理学蟾蜍肌梭放电实验的改良探索与实践

赵雪红, 周茜, 丁露, 刘倩蓉, 范晓航, 李微

湖北文理学院基础医学院, 湖北 襄阳

收稿日期: 2022年5月27日; 录用日期: 2022年6月23日; 发布日期: 2022年6月30日

摘要

为了提高实验课堂教学效率, 结合自身科研技术优势, 对现有教材中常规的蟾蜍肌梭放电活动的实验操作技术进行了一系列改进和优化, 采用原位记录模式, 通过改变膝关节的角度来牵拉肌肉, 增加了实验结果的稳定性; 将科研成果融入实验项目, 观察琥珀胆碱、谷氨酸等药物因素对肌梭放电活动的影响, 丰富了实验教学内容, 使科研和教学有机融合, 提高了学生的学习兴趣。

关键词

生理学实验, 肌梭放电, 蟾蜍, 电生理

Exploration and Practice of the Improvement of Toad Muscle Spindle Afferent Discharge Experiment in Physiology

Xuehong Zhao, Xi Zhou, Lu Ding, Qianrong Liu, Xiaohang Fan, Wei Li

Medical College, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang Hubei

Received: May 27th, 2022; accepted: Jun. 23rd, 2022; published: Jun. 30th, 2022

Abstract

In order to improve the efficiency of experimental teaching, a series of improvements and optimizes the conventional experimental operation techniques of toad muscle spindle afferent discharge activities in existing textbooks. The *in-situ* recording mode is adopted to pull the muscles by changing the angle of knee joint, which increases the stability of experimental results. Integrate scientific research achievements into experiment items, the influence of drug factors such as suc-

cynlcholine and glutamate on muscle spindle afferent discharge activities was introduced to the experimental teaching content. The integration of scientific research and teaching improves students' learning interest.

Keywords

Physiological Experiment, Muscle Spindle Afferent Discharge, Toad, Electrophysiology

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

蟾蜍肌梭放电活动的实验观察是生理学的常规实验项目，也是研究机械敏感性牵张感受器及其机制的最基本技术[1] [2]。但在多年的教学实践中，我们不难发现，该实验的成功率低，教学效果并不理想。主要表现为：1) 标本活性差部分标本经锌铜弓测试有明显收缩，但在神经上观察不到放电活动；2) 部分实验记录到的信号弱且不稳定，持续时间短。出现上述实验失败的主要原因是实验操作及电生理技术不当。

本课题组十余年来致力于肌梭与肌萎缩的相关研究，熟练掌握肌梭的分离技术、成功建立了稳定的大鼠单一肌梭放电活动记录技术，在肌梭的电生理技术方面积累了丰富的经验[3] [4] [5]。我们利用本研究组的优势，对现有教材中常规的蟾蜍肌梭放电记录方法进行了一系列的摸索和总结，将部分科研成果融入课堂实验教学内容，将科研与教学有机融合，取得了良好的效果，现报道如下。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

体重 200 g 左右的中华大蟾蜍(购自湖北医药学院实验动物中心)，雌雄不拘。

2.2. 仪器设备和实验试剂

用于生理学实验教学的 BL-420N 生物信号采集系统(成都泰盟软件有限公司)、神经引导电极(成都泰盟软件有限公司)。

任氏液(mmol/L): NaCl 111.2, KCl 1.9, CaCl₂ 1.0, NaHCO₃ 2.38, 葡萄糖 11.1, 室温(25℃), pH = 7.4; 所有试剂购自于上海国药集团有限公司。

2.3. 蟾蜍坐骨神经 - 缝匠肌标本制备

2.3.1. 捣毁蟾蜍的脑和脊髓，减掉躯干上部及内脏，去掉皮肤

注意不要损伤缝匠肌表面的肌膜。

2.3.2. 分离坐骨神经至缝匠肌分支

将去皮的腰背部下肢标本放入盛有任氏液的培养皿中进行神经分离：小心分离用缝匠肌内侧与股薄肌之间的筋膜，暴露、游离半腱肌，剪断半腱肌耻骨端肌腱，轻轻提起半腱肌，即可看到坐骨神经在半腱肌肌腹中部发出的分支与缝匠肌神经交汇；沿半腱肌神经走行向主干方向游离神经，切断其他肌肉的神经支配，直至脊柱两侧坐骨神经主干发出处，剪下一小段脊柱。

2.3.3. 游离缝匠肌

1) 常规的离体标本记录[1] [2]

小心分离缝匠肌与周围其他肌肉之间的筋膜，分离缝匠肌耻骨联合端，分离膝关节处的肌腱、系线，剪断肌腱，游离缝匠肌。

2) 原位记录肌梭放电

小心分离缝匠肌与周围其他肌肉之间的筋膜，缝匠肌保留在原位，通过改变膝关节的角度改变缝匠肌的长度，牵拉肌梭。

2.4. 实验内容

将标本置于神经肌肉标本盒内，将神经置于钩状引导电极上，肌梭放电活动经导线输入生物信号采集与处理系统。系统设置：信号选择→一通道→神经放电(采样频率 20 kHz，低通滤波 20 kHz，高通滤波 15 Hz)。观察不同状态下肌梭放电的变化：

- 1) 静息状态肌梭的自发放电
- 2) 肌肉长度对肌梭放电活动的影响
- 3) 50 mg/L/琥珀胆碱肌梭放电活动的影响
- 4) 1 mmol/L 的谷氨酸对肌梭放电活动的影响

2.5. 数据分析

将不同条件下记录到的肌梭放电频率进行对比，分析不同药物及其他因素对肌梭放电活动的影响。

3. 结果及教学效果

3.1. 标本分离技术的改进优化

3.1.1. 标本制备过程在全程在任氏液中进行

常规的标本制备在蛙板上进行，由于缝匠肌位置浅表，滴加的任氏液很容易挥发流失，学生的操作时间较长，导致标本的活性较弱。因此，我们将标本制备全程在任氏液中进行将分离出的标本几乎 100% 保持活性。

3.1.2. 先游离神经，后游离肌肉

常规操作中，先游离肌肉，后分离神经[1] [2]。在神经分离过程中，由于神经反复受刺激引起肌肉持续收缩，进而导致肌肉无负荷状态下的初始长度过短，肌梭放电活动减少甚至缺失。如图 1 所示，经本研究改进后，分离出的缝匠肌长度接近于在体长度，肌梭的自发放电频率为 5~13 Hz，较常规的自发放电(0.5~2 Hz)明显增加($p < 0.05$) [6]。

3.1.3. 坐骨神经发出端保留少量脊柱

避免二次剪断损伤神经，避免神经的弹性回缩，使分离出的缝匠肌神经约 1 cm。

3.1.4. 记录方式

缝匠肌保留在原位进行电生理活动记录，肌梭的自发放电频率较高，波幅规律平稳。通过改变膝关节的角度改变肌肉的长度，牵拉肌梭。

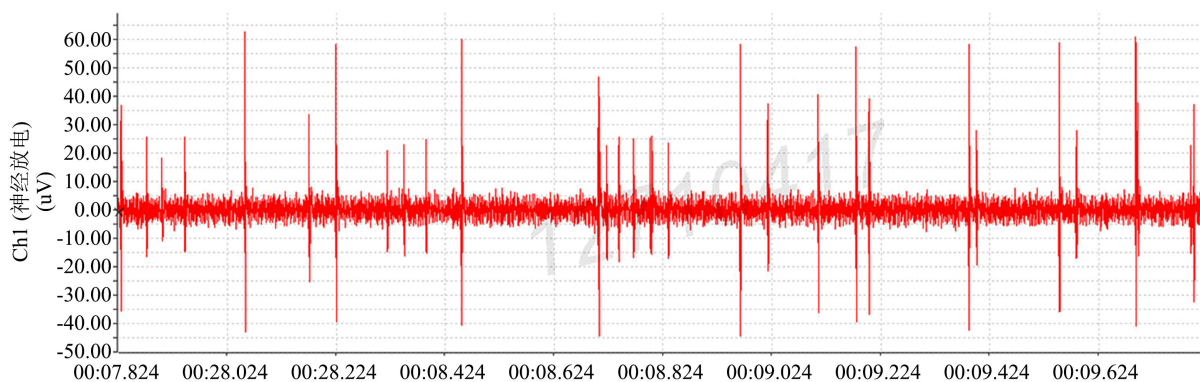
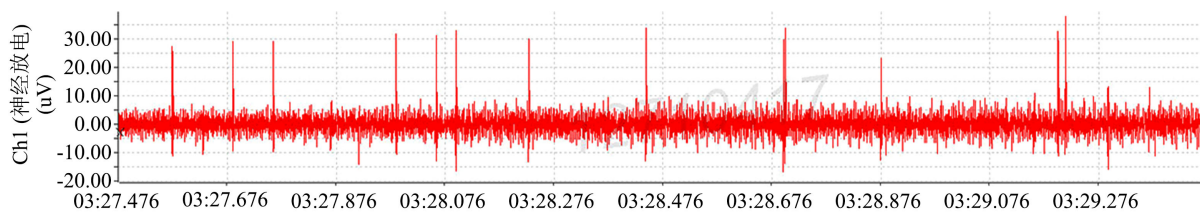
3.2. 记录电极的位置对肌梭放电的影响

实验中发现，当记录电极的位置接近肌肉时，肌梭放电的波幅较低，出现许多小波幅的电信号与基

线混杂一起, 很难分辨; 当记录电极位置逐渐远离肌肉, 电信号逐渐增强; 当电极放置于靠近半腱肌的神经分叉时(图 1(b)), 肌梭的放电活动信号最强; 继续向中枢端靠近信号又逐渐减弱, 到主干时几乎很难记录到较强的信号。因此, 在所有的实验过程中, 选定信号最强的位置进行后续实验。



(a) A toad Sartorius-sciatic nerve sample (a-Sartorius, b-Semitendinosus)



(b) Muscle spindle afferents (upper in the # indicated region and lower in the arrow indicated region)

Figure 1. A toad Sartorius-sciatic nerve sample and its muscle spindle afferent discharge

图 1. 蟾蜍缝匠肌 - 坐骨神经标本及肌梭放电

3.3. 原位记录

蟾蜍的脑和脊髓捣毁后, 膝关节屈曲角度约为 45° , 减小屈曲度时缝匠肌处于松弛位, 外展时缝匠肌

被拉长。将记录电极置于信噪比最强的位置，通过改变膝关节的角度来改变缝匠肌的长度，记录肌肉长度变化对肌梭放电活动的影响。

如图 2 所示，原位记录时肌梭的放电活动比较规律，放电频率较高，平均约 10.2 ± 3.1 Hz；增加膝关节的角度，肌梭的放电活动明显增加，肌梭活动的电信号记录稳定。

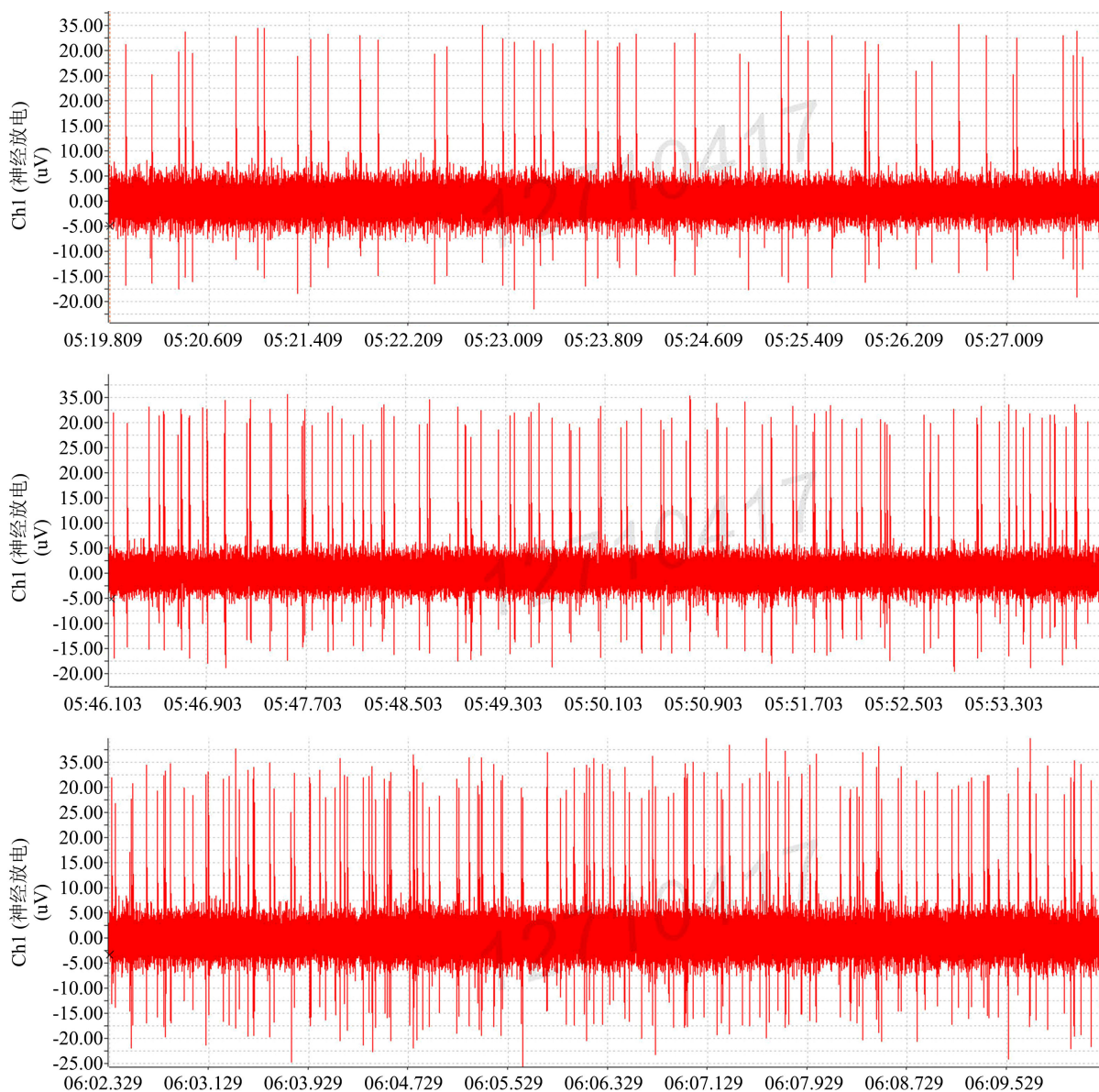


Figure 2. The effect of knee joint's on muscle spindle afferent discharge ($45^{\circ} \rightarrow 90^{\circ} \rightarrow 120^{\circ}$)

图 2. 膝关节角度对肌梭放电活动的影响($45^{\circ} \rightarrow 90^{\circ} \rightarrow 120^{\circ}$)

4. 讨论分析

确保所制备的标本保持活性，是肌梭放电活动实验成功的前提。与哺乳类不同，两栖类肌梭与所在骨骼肌的长度相同，肌梭的两端以裸露的梭内肌纤维直接和肌腱连接。缝匠肌的肌梭分布近于肌肉表面，甚至有的肌梭就位于肌膜下。由于缝匠肌位置表浅，耻骨联合端肌腱不明显，在分离中肌梭易破坏受损。

另外, 缝匠肌本身是快挛缩肌, 肌梭的量较少, 而且在标本制备中神经、肌肉等易受刺激引发肌肉颤动, 引起疲劳性损伤, 影响肌梭的电活动[7]。因此, 在标本制备中应尽量避免对神经和肌肉的牵拉、触碰刺激。学生初次操作, 分离需要时间较长, 容易使标本干燥失去营养, 这是导致标本活性降低的重要原因。本研究中分离神经和肌肉均在任氏液中进行, 避免了此因素对实验结果的影响, 分离出的坐骨神经-缝匠肌标本 90%以上能记录到放电活动。

大量的研究发现, 两栖类肌梭放电活动中普遍存在阈下去极化电位, 称其为“abortive spikes”[8][9]。“abortive spikes”是由感觉神经末梢产生, 以电紧张的方式向中枢扩布。因此, 越接近感觉神经末梢处“abortive spikes”越密集, 而当肌梭与记录电极之间的距离大于 7 mm 时“abortive spikes”消失[8][9]。本科教学实验所用的生理信号采集系统, 普遍分辨率偏低、抗干扰能力弱, 这种“abortive spikes”往往与基线混杂在一起, 干扰正常的放电信号。因此记录电极放置的位置对信号的强弱非常关键。在我们的研究中发现, 当记录电极远离肌肉时, 基线干扰逐渐减小, 肌梭放电的信号幅度增加; 当记录电极放置在距离肌肉约 1 cm 左右的神经分叉处时记录的信号最强, 这也与以往的研究结果一致。

由于在国内没有市售的牵拉仪, 实验室所用的张力换能器的灵敏度和精密度都不够, 很难精确的观察肌肉的长度、张力与肌梭的变化关系。在常规的实验中, 往往通过给胫骨端肌腱侧添加砝码来牵拉肌肉, 观察不同张力条件下肌梭的放电变化。但是, 由于缝匠肌神经特殊的位置——靠近胫骨侧 1/3, 因此牵拉肌腱会干扰神经电活动的记录。我们采用改变关节角度的方法改变肌肉的长度, 操作简单易行, 对肌梭放电活动的记录没有影响; 而且更接近于生理状态, 更有助于学生对肌梭放电活动的生理意义的理解。连续 3 年使用此改进的实验方案, 肌梭放电实验的课堂教学成功率达 85%, 而且能够稳定记录 30 min 以上, 完全满足生理学实验教学。

考虑到缝匠肌的解剖及生理因素对肌梭实验的影响, 我们也尝试寻找新的骨骼肌来进行肌梭放电的观察。蟾蜍的半腱肌和髂胫肌均为慢肌, 肌梭的含量丰富, 两端有明显的肌腱, 肌肉的分离技术简单。用上述改进的方法, 我们在半腱肌/髂胫肌-坐骨神经标本上均记录到稳定的肌梭放电, 表明本研究技术的改进普遍适合肌梭放电的活动记录。

5. 小结

利用研究组在肌梭研究技术方面的优势, 我们对标本的分离和电生理技术进行了改进和优化, 提高了实验成功率; 在体标本替代了离体标本使得标本活性得以较好维持。实验教学过程中, 连续 3 年使用此改进的实验方案, 实验成功率为 85%, 较高的实验成功率保证了教学的顺利进行; 并将部分科研成果融入教学内容; 结合此项实验技术方法, 我们研发了虚拟仿真实验教学软件, 已被评为湖北省虚拟仿真实验一流课程。

基金项目

国家自然科学基金项目(31300981); 湖北省虚拟仿真实验教学一流课程(鄂教高函[2021] 3 号); 湖北文理学院教研教改项目(JY2019047, JY2019049)。

参考文献

- [1] 胡浩. 机能实验学[M]. 第 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2021: 60-61.
- [2] 胡还忠, 牟阳灵. 医学机能实验教程[M]. 第 4 版. 北京: 科学出版社, 2018: 73-74.
- [3] 余蕾, 赵雪红, 樊小力, 等. 大鼠比目鱼肌梭内肌细胞钙超载模型的建立[J]. 生物学杂志, 2018, 35(5): 65-68.
- [4] 赵雪红, 樊小力, 刘广斌. 大鼠比目鱼肌梭内肌纤维的分离方法[J]. 生理学报, 2013, 65(4): 461-465.

-
- [5] 余蕾, 赵雪红, 樊小力, 等. 胞内游离钙离子浓度增加抑制大鼠离体比目鱼肌肌梭传入放电(英文) [J]. 航天医学与医学工程, 2019, 32(5): 386-392.
- [6] 李焰, 李建国, 杨彩虹, 等. BL-420 生物机能实验系统在肌梭放电实验中的应用[J]. 山西医科大学学报, 2012, 43(2): 150-153.
- [7] Timmer, L.T., Hoogaars, W. and Jaspers, R.T. (2018) The Role of IGF-1 Signaling in Skeletal Muscle Atrophy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1088**, 109-137. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1435-3_6
- [8] Ito, F. (1969) Abortive Spikes of the Frog Muscle Spindle. *The Japanese Journal of Physiology*, **19**, 373-391. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.19.373>
- [9] Querfurth, H. (2006) Action-Potential Initiation and Maintained Activity of the Isolated Frog Muscle Spindle. *European Journal of Neuroscience*, **24**, 1147-1156. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04983.x>