

实验1：坐骨神经—腓肠肌标本的制备

实验2：骨骼肌单收缩的分析

骨骼肌收缩的总和与强直收缩

实验3：神经干复合动作电位的观察与记录

神经冲动传导速度的测定

神经干不应期的测定

I 基本实验原理

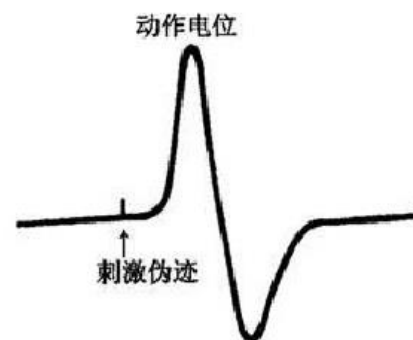
- ▶ 蛙类：一些基本生命活动和生理功能与恒温动物相似，而其**离体组织器官**所需的生活条件比较简单，并且易于控制和掌握，在生理实验中常用蛙类离体组织器官作为实验标本进行**神经生理、肌肉生理、心脏生理、微循环、水肿、肾功能不全**等实验。
- ▶ 蛙类坐骨神经-腓肠肌标本是研究**神经冲动**和**肌肉收缩机能**等实验最常用的实验材料。
- ▶ 制备此标本是动物生理实验的一项基本但又非常重要的操作技术。

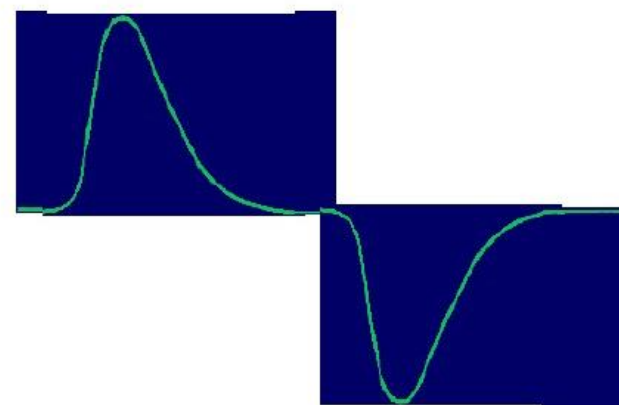
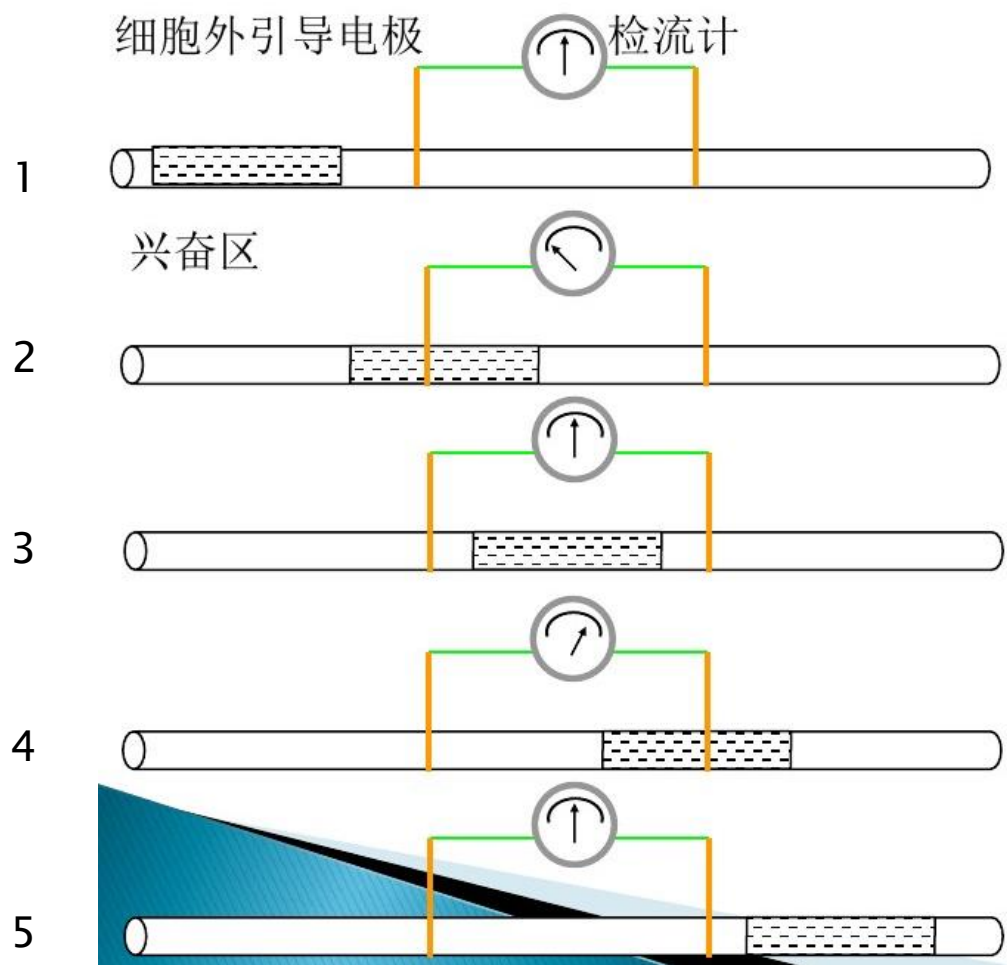
- ▶ 蛙类**坐骨神经**起源于脊椎腰骶部，主要支配腰部以下的肌肉收缩。在腓窝处分为胫神经和腓神经。
- ▶ **腓肠肌**为蛙类小腿部位最突出的肌肉，接受坐骨神经兴奋产生的刺激会产生收缩。



坐骨神经—腓肠肌标本

- 神经兴奋的标志是产生动作电位，每条神经纤维动作电位的产生都遵守“**全或无**”的方式。
- 神经干是由许多兴奋性不同的神经纤维组成的。因此，神经干动作电位记录到的是多个**兴奋阈值、传导速度和振幅**各不相同的动作电位的总和，为一个**复合动作电位**，不存在严格的阈强度，也不表现为“全或无”的特征。
- 在一定范围内神经干动作电位的幅度随刺激强度的增加而增大。





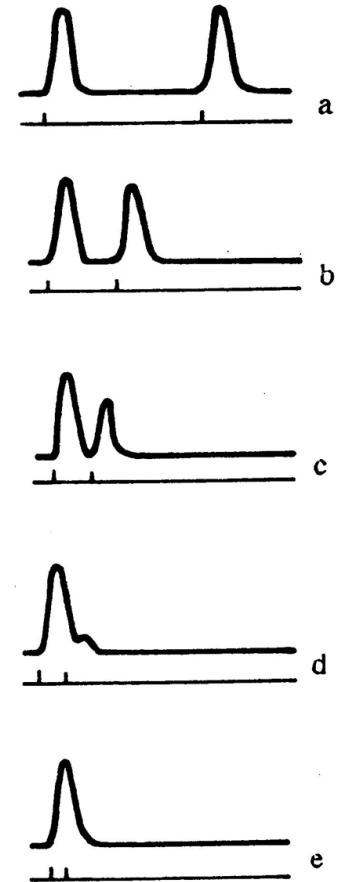
双相动作电位

(记录动作电位在神经细胞膜表面的传导)

- 神经纤维在一次兴奋过程中，其兴奋性可发生周期性变化，包括绝对不应期、相对不应期、超常期和低常期。
- 先给神经施加一个条件性刺激，引起神经兴奋，然后在前一兴奋过程的不同时相内给神经一个检验性刺激，检查神经对检验性刺激所作出的反应，来判断神经组织兴奋性的变化。

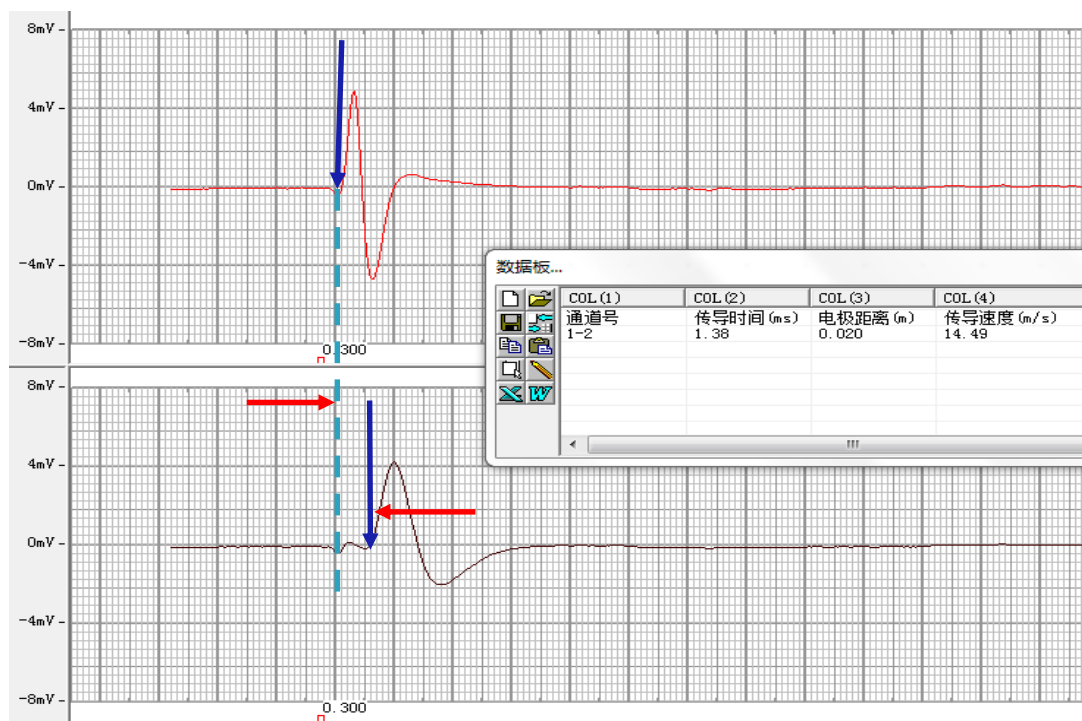
- ▶ 实验中所给条件性刺激和检验性刺激为两个**参数完全相同**的阈上刺激，在不同时间间隔内检查检验性刺激所引起的动作电位幅度的变化，来反映部分神经纤维兴奋性的变化规律：

- **相对不应期**：检验性刺激引起的动作电位幅度开始减小时两刺激间的时间间隔。
- **绝对不应期**：检验性刺激引起的动作电位刚好消失（且增加刺激强度也不能使之产生）时两刺激间的时间间隔。



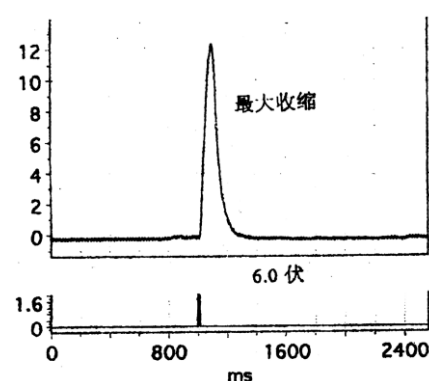
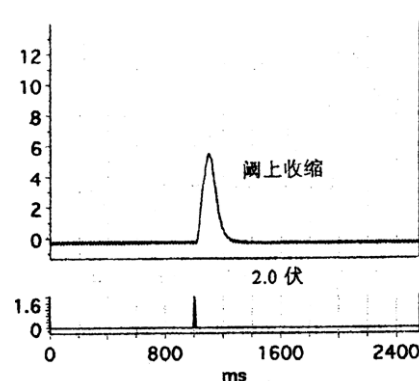
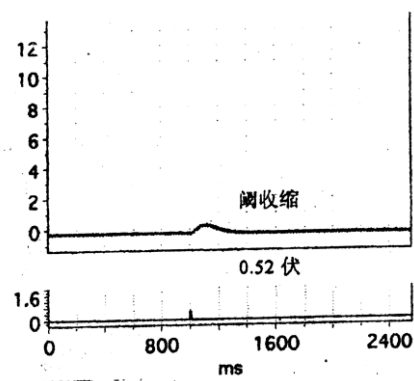
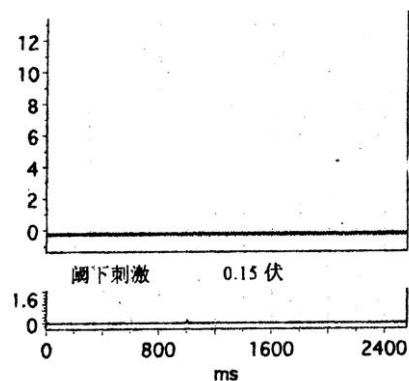
神经干兴奋性的
周期性变化

- 动作电位在神经纤维上的传导有一定的速度。不同类型的神经纤维其传导速度各不相同，主要取决于神经纤维的**直径、有无髓鞘、环境温度**等因素，蛙类坐骨神经干的传导速度约为**35 ~ 40 m/s**。

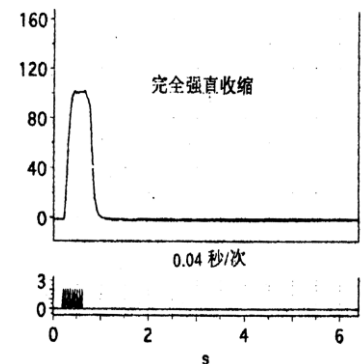
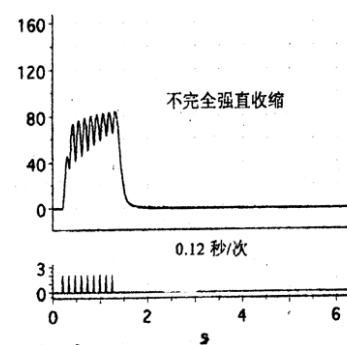
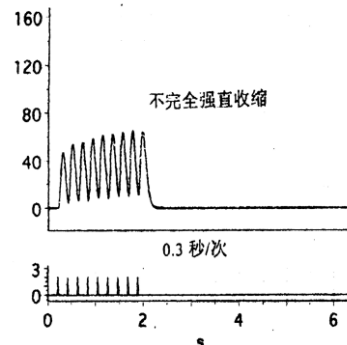
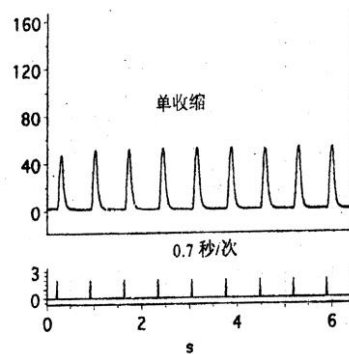


神经冲动传导速度

- ▶ 当肌肉受到一个阈上强度的刺激时，爆发一次**动作电位**，迅速发生一次收缩反应，叫**单收缩**。单收缩曲线分为**潜伏期**、**收缩期**、**舒张期**三个时期。
- ▶ 在一定范围内，刺激的强度和频率会影响到肌肉收缩的幅度和各单收缩曲线之间的关系。
- ▶ 在一定范围内，肌肉收缩的幅度随刺激强度的增加而增大。



- ▶ 当肌肉相继受到**两个以上同等强度**的阈上刺激时，因刺激频率不同，后一次收缩会落在前一次收缩的不同时相内，从而形成不同形式的收缩曲线：
- ▶ 几个**分离的单收缩**：刺激频率低于单收缩频率，各收缩时间间隔大于单收缩时间。
- ▶ **收缩的总和（强直收缩）**：刺激频率高于单收缩频率，各收缩之间的时间间隔小于单收缩时间。
 - **不完全强直收缩**：后一次刺激所引起的收缩发生在前一次收缩的舒张期内，肌肉收缩曲线呈锯齿状；
 - **完全强直收缩**：后一次刺激所引起的收缩发生在前一次收缩的收缩期内，各收缩不能分开，肌肉维持持续的收缩状态。



II 实验目的

- ▶ 学习破坏牛蛙脑和脊髓的方法（或安死术）
- ▶ 掌握制备牛蛙坐骨神经—腓肠肌标本的实验技术
- ▶ 掌握离体神经干动作电位的细胞外记录法及其基本波形的判断和测量
- ▶ 掌握坐骨神经干兴奋性的特点
- ▶ 了解肌肉收缩过程的时相变化
- ▶ 通过对支配肌肉收缩的神经进行刺激，观察刺激强度和频率对骨骼肌收缩形式的影响

III 实验对象与器材

- 牛蛙：学名 *Lithobates catesbeiana* ，属于两栖纲，无尾目，蛙科。
- 蛙类手术器械（探针、金冠剪、手术剪、手术镊、眼科剪、**玻璃分针**、蛙钉、纱布、医用缝合线），蜡盘，小烧杯，塑料滴管，锌铜弓，任氏液
- RM6240E型多道生理信号采集处理系统（人体机能实验系统），**屏蔽盒**，**张力换能器**，刺激线，大头针，双凹夹



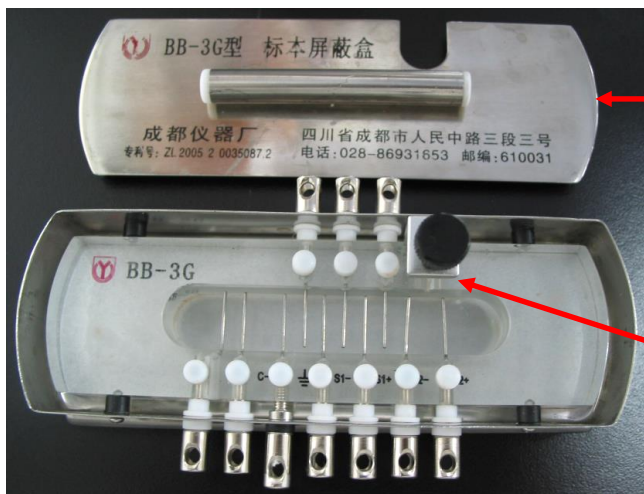
屏蔽盒



张力换能器



玻璃分针



屏蔽盒盖

胫腓骨固定器
(肌槽)

刺激输入
↑
接地
信号输出



胫腓骨固定器
(肌槽)

屏蔽盒结构

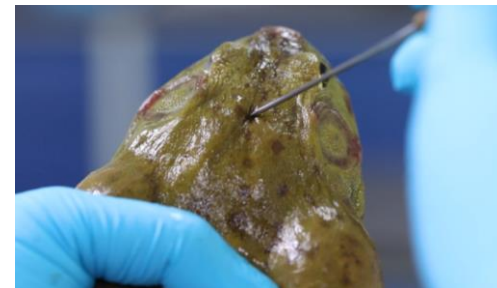
几种常用生理盐溶液中固体成分的含量（g）

溶 液 成 分	任氏溶液 (Ringer)	乐氏溶液 (Locke)	台氏溶液 (Tyrode)	生理盐水	
				两栖类	哺乳类
氯化钠 (NaCl)	6.5	9.0	8.0	6.5	9.0
氯化钾 (KCl)	0.14	0.42	0.2	—	—
氯化钙 (CaCl ₂ 无水)	0.12	0.24	0.2	—	—
碳酸氢钠 ((NaHCO ₃))	0.20	0.1~0.3	1.0	—	—
磷酸二氢钠 (NaH ₂ PO ₄)	0.01	—	0.05	—	—
氯化镁 (MgCl ₂)	—	—	0.10	—	—
葡萄糖	2.0	1.0~2.5	1.0	—	—
加蒸馏水至毫升数	1000	1000	1000	1000	1000
pH	7.0~7.2	7.5	8.0		

IV 实验过程

实验1：坐骨神经-腓肠肌标本的制备

1. 双毁髓法处死牛蛙：



- ▶ 左手握牛蛙，用食指下压头部前端使头前俯。
- ▶ 右手持探针由头背侧前端沿正中中线向脊柱端触划，当触到位于两个鼓膜之间凹陷处即枕骨大孔处时，将探针垂直插入，左右摇动，切断脑和脊髓的联系，然后将探针向前刺入颅腔内，将探针左右摇动、旋转，**捣毁脑组织**。制成脊蛙。
- ▶ 将探针退回枕骨大孔，沿与脊椎骨平行的方向向后刺入脊椎，不断捻动探针，使之刺入整个椎管内，彻底**捣毁脊髓**。

1. 牛蛙安死术

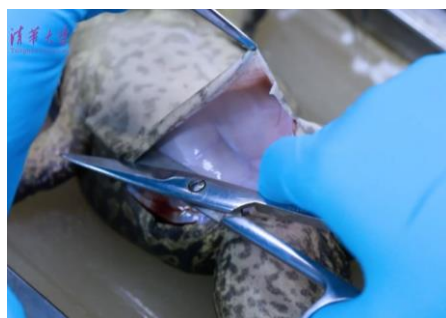
- ▶ 用右手拇指和食指夹住牛蛙，将牛蛙从容器中取出，放于盛有10g/L MS-222的麻醉剂中浸泡15~20 min，动物即可死亡。
- ▶ 动物死亡的标志是：形体对称、肌肉松弛、四肢瘫软、呼吸消失，整个身体包括头部均浮于麻醉剂中。



2. 下肢标本的制备：

(1) 剪去躯干上部及内脏

- ▶ 从耻骨联合开始向腹腔左右两侧剪开皮肤和肌肉直至两前肢后侧。
- ▶ 轻轻提起耻骨联合处的内脏，小心剪开，可看到位于腰骶段的坐骨神经丛。
- ▶ 轻轻提起牛蛙后肢，使其头与内脏自然下垂，在脊柱胸段用金冠剪（粗剪刀）剪断脊柱，并剪断两侧的的皮肤和肌肉。将头、前肢、内脏及腹部软组织全部剪除，放于动物尸体污物盘，只保留下端脊柱和后肢。在腹侧脊柱两旁可看到腰骶神经丛。注意切勿触及或损伤坐骨神经。

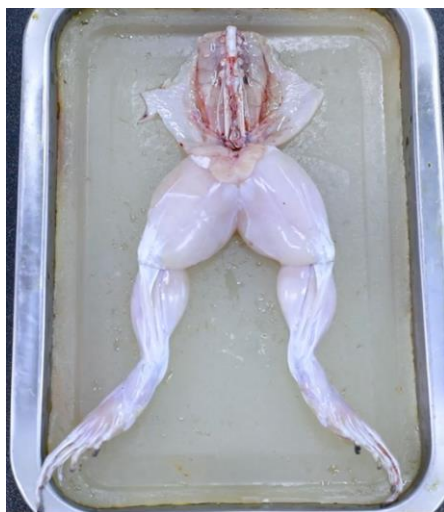


(2) 剥后肢皮肤

- ▶ 用一只手拇指和食指第一指节夹住脊柱断端，另一只手捏住断端皮肤边缘，剥掉全部后肢皮肤。将手和手术器械洗净。

(3) 分离两腿

- 用金冠剪沿耻骨联合正中央剪开两侧大腿，剪去尾骨杆（骶骨），沿脊椎中线将脊柱剪开，使两腿完全分离（切勿伤及神经），将两腿浸于任氏液中。



3. 坐骨神经和腓肠肌的分离

(1) 游离坐骨神经

- 取一后肢，腹面向上（背位）固定于蜡盘上，沿脊柱侧用玻璃分针轻轻勾起坐骨神经，逐一剪去神经分支至股端。用金冠剪剪断脊柱，只保留一小段椎骨片与坐骨神经相连。也可在坐骨神经的脊椎骨穿出部位附近结扎后紧贴脊椎骨剪断。
- 将标本改为背面向上（腹位）固定，用镊子提起梨状肌，剪断，沿坐骨神经沟（半膜肌和股二头肌的肌间缝）分离坐骨神经。用镊子夹住与神经相连的脊椎骨，提起神经，用眼科剪将神经分支及结缔组织膜顺序剪断，将神经一直游离到腘窝处。



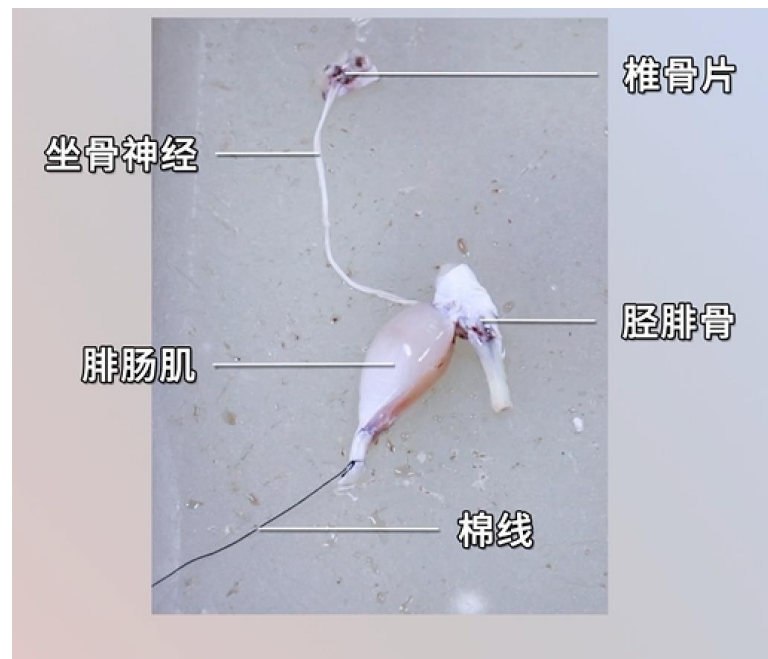
(2) 游离腓肠肌

- ▶ 分离腓肠肌的跟腱，用线结扎，自结扎线外、跟腱的附着点剪断，提起跟腱，将腓肠肌分离至膝关节处。
- ▶ 用金冠剪将胫腓骨于膝关节以下约1.5 cm处剪断，弃去下段及足部，自膝关节处剪掉股骨和大腿部位所有肌肉，将胫腓骨上的肌肉刮干净。

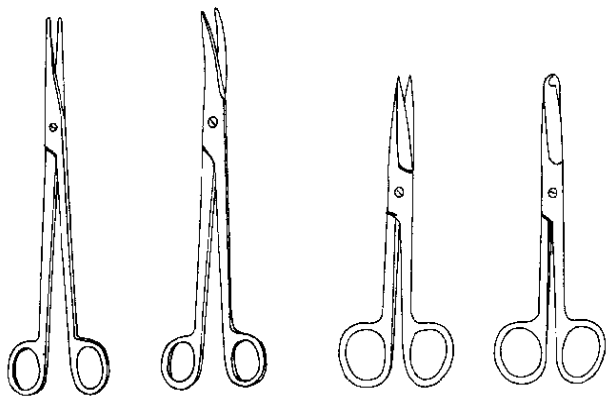


4. 标本兴奋性检验

○ 锌铜弓

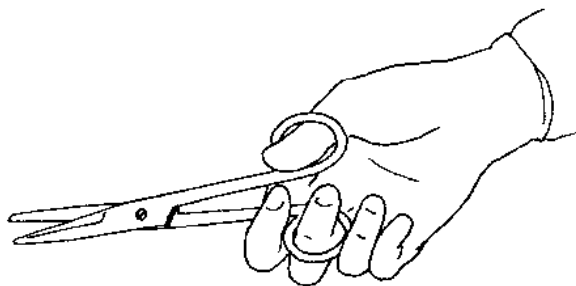
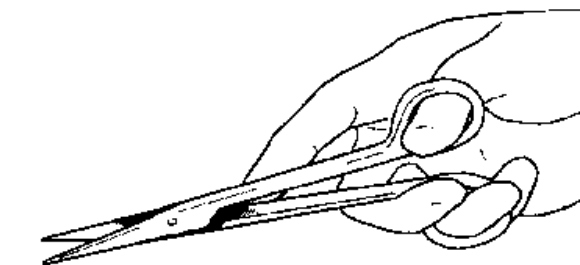


坐骨神经—腓肠肌标本

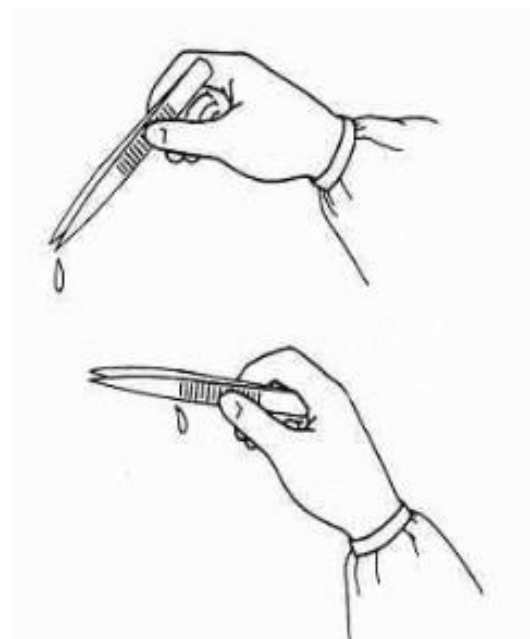


组织剪

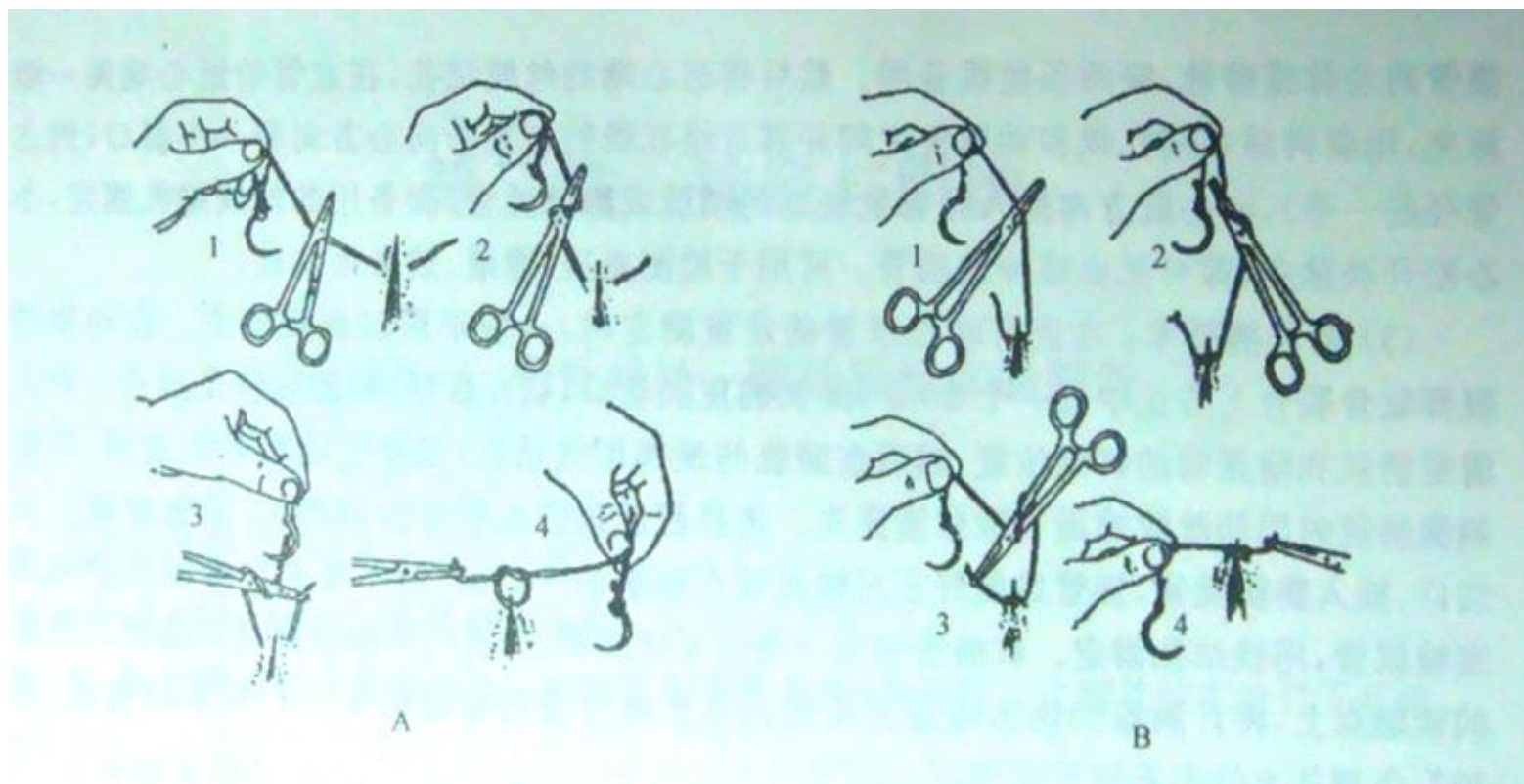
线剪



手术剪的使用



手术镊的使用



持钳打结法

方结又称平结，由两个方向相反的单结组成。

▶ **持钳打结法：**

- **第一个单结：**左手拉住结扎线的左侧长线一端，将持针钳头从上往下横置于长线上，按顺时针方向旋转持针钳，将长线从钳尖处在持针钳上绕一周，张开持针钳，夹住短线，拉向左侧，长线端拉向右侧，收紧；
- **第二个单结：**拉线的手不变，将持针钳从下往上横置于右侧长线一端，按逆时针方向旋转持针钳，将长线从钳尖处在持针钳上绕一周，张开持针钳，夹住短线，拉向右侧，长线段拉向左侧，收紧。

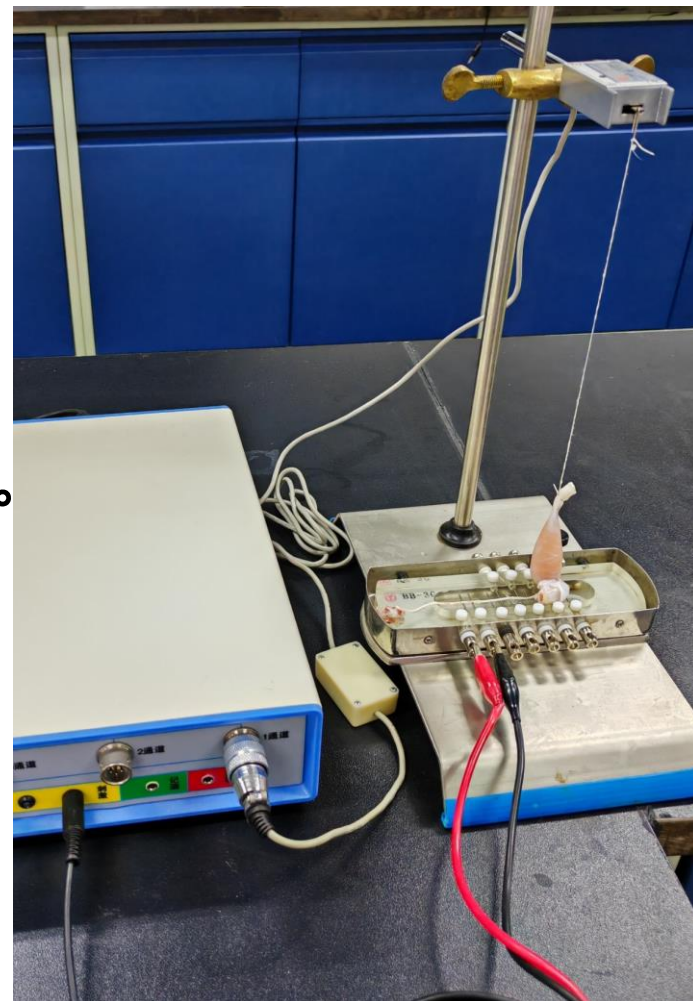
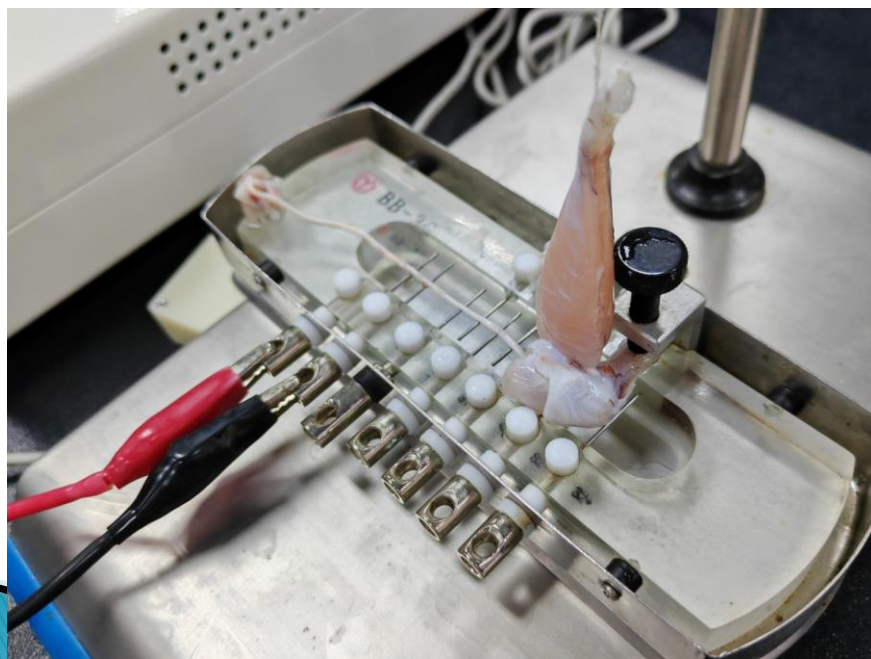
▶ **注意：**在打第二个结时要保持第一个结不松动。

实验2：骨骼肌单收缩的分析

骨骼肌收缩的总和与强直收缩

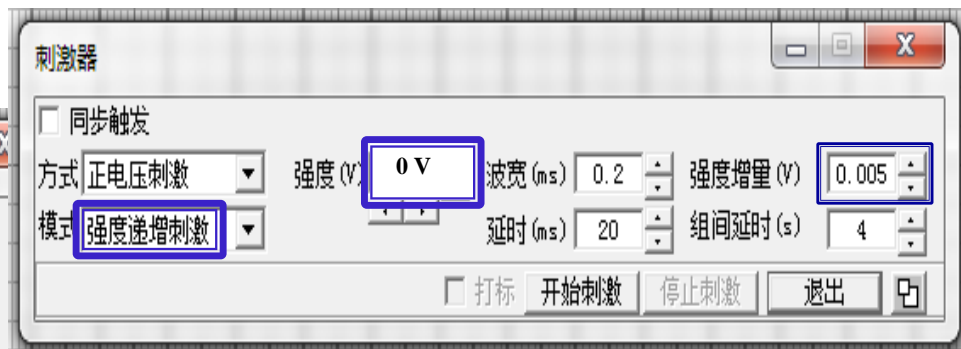
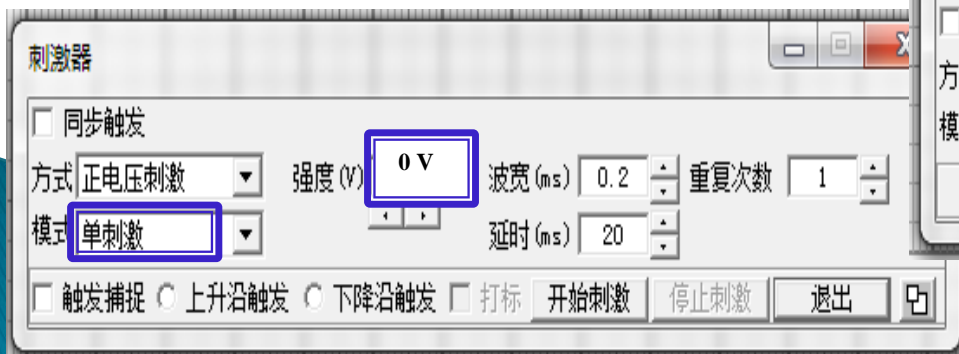
1. 标本与仪器的连接：

- ▶ 将标本胫腓骨固定在屏蔽盒内的肌槽上，结扎跟腱的线通过大头针与张力换能器相连，神经置于屏蔽盒内**刺激电极**上，用任氏液保持标本湿润。
- ▶ **刺激线**接记录系统的刺激输出，**张力换能器信号输出端**接记录系统的1通道。



2. 刺激强度与肌肉收缩的关系：

- ▶ 打开记录系统主机、计算机，将桌面上的“RM6240E2.6”软件打开，并从“实验”中找到“**肌肉神经实验-刺激强度对骨骼肌收缩的影响**”。
- ▶ 在刺激器窗口中选择刺激为**单刺激**，点击开始示波、开始记录，**从零开始**逐渐增加刺激强度(V)，找出引起肌肉收缩的最小刺激强度（阈强度），增大刺激强度，观察刺激强度与收缩曲线高度（收缩幅度）的关系。
- ▶ 继续增大刺激强度，当肌肉收缩曲线的幅度不再随刺激强度增大而增高时，记下最大刺激强度。
- ▶ 保存曲线。



3. 刺激频率与肌肉收缩的关系：

- ▶ 选择“**刺激频率对骨骼肌收缩的影响**”实验，将刺激模式改为**连续单刺激**，在阈刺激强度和最大刺激强度之间选择一个合适的强度固定不变（略大于阈刺激强度即可），将刺激频率**从1 Hz开始逐渐增大**（**一般不要超过50 Hz**），观察记录收缩形式的变化，分别记录可使肌肉出现分离单收缩、不完全强直收缩、完全强直收缩时的刺激频率及相应曲线。
- ▶ **保存曲线。**



生理记录系统常见问题及处理方法：

- ▶ 安装不成功：
 - windows系统：更换安装路径，重新安装；
 - MAC系统：不兼容，可借用其他同学或公共实验室电脑安装，或在本实验室完成数据处理。
- ▶ 实时记录时，界面中看不到描记的曲线：
 - 曲线量程超出界面设置的纵坐标显示范围，鼠标移至左侧空白区，长按左键上下移动。
- ▶ 曲线幅度或描记速度不合适：
 - 调节相应通道右侧“控制参数区”第二（速度）或第三项（幅度）参数。
- ▶ 找不到刺激条件的强度或频率标记：
 - 在界面左侧点击“选择”下拉菜单中“显示刺激标注”中相应的参数。
- ▶ 忘记保存就开始了另一个记录程序：
 - 如果在记录曲线时按下了“记录（●）”键，并且没有关闭软件窗口，之前记录的文件都在“子文件”中。

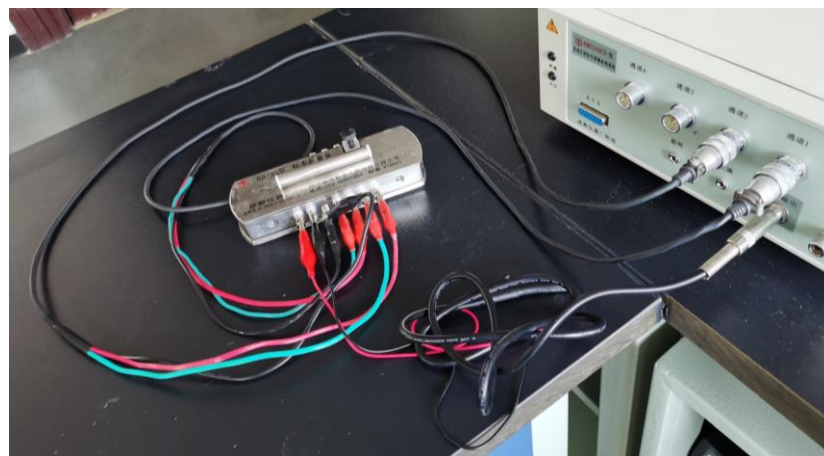
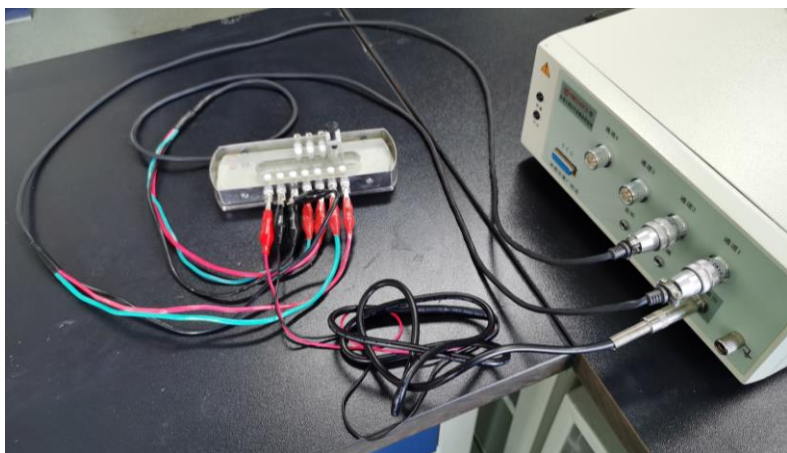
实验3：神经干复合动作电位的观察与记录
神经冲动传导速度的测定
神经干不应期的测定

1. 制备坐骨神经标本：

- 若神经长度足以搭过屏蔽盒中所有电极，则将神经从腠窝处结扎，于结扎线远端剪断即可。
- 若神经长度不够，将坐骨神经在腠窝处的两条分支（胫神经和腓神经）剪去任一分支，**继续分离留下的另一分支**，直至脚跟端。用线结扎，在结扎线的远端剪断神经，保留一小段线头（约1 cm）。
- 将完全游离的坐骨神经干置于盛有任氏液的小烧杯（或平皿）中备用。同法分离另一侧坐骨神经干备用。

2. 标本放置与电极连接:

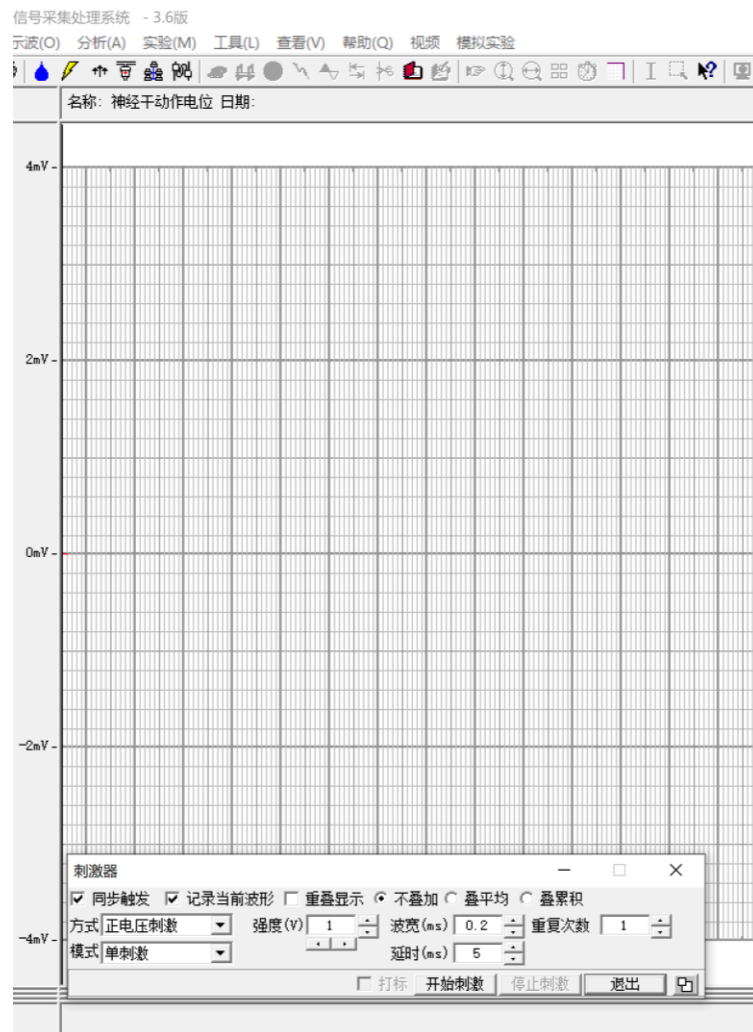
- ▶ 将神经干标本置于标本屏蔽盒内，使神经干与刺激电极、接地电极、引导电极均接触良好。**盖好屏蔽盒盖。**刺激电极与记录系统的刺激输出相连，引导1接1通道，引导2接2通道。



标本放置与仪器连接

3. 测量双相动作电位：

- ▶ 打开系统软件，选择**神经干动作电位**实验→自动弹出刺激器→调节刺激为**单刺激**→调节刺激强度→开始刺激→记录波形，辨别**刺激伪迹**和**动作电位**，保存曲线。

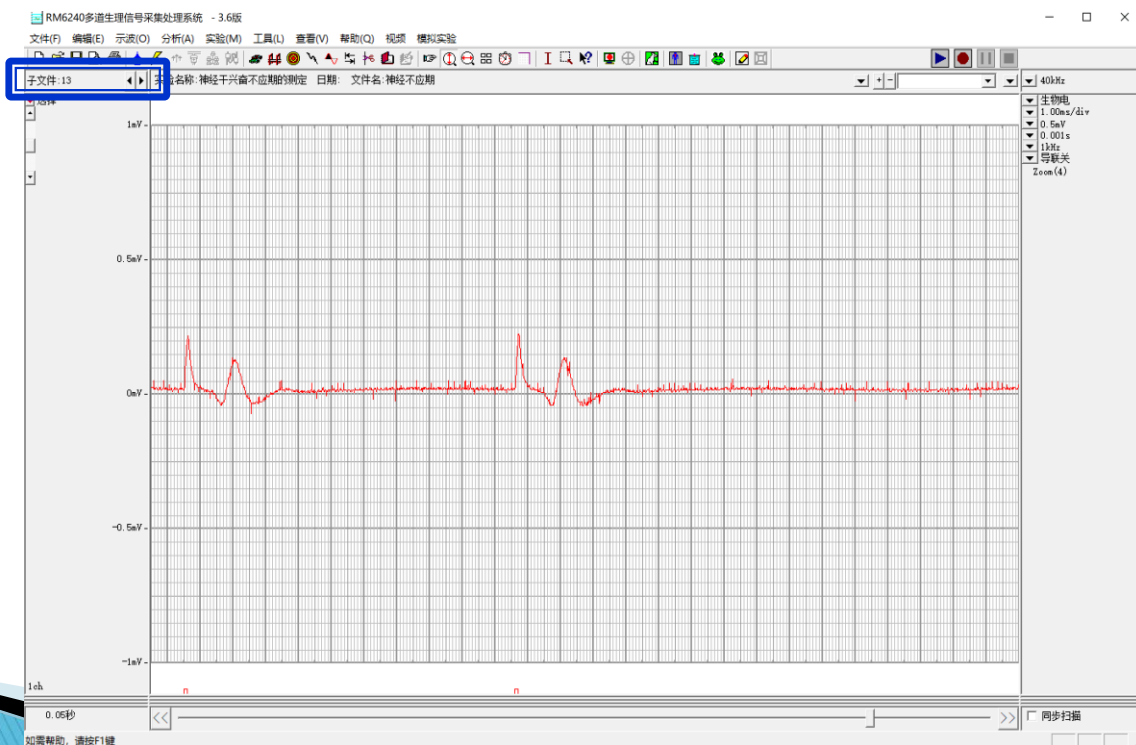


4. 测定传导速度：

- ▶ 选择**神经冲动传导速度**实验→开始刺激→记录上一个动作电位起始部位与下一个动作电位起始部位之间的时间间隔（T）（单位：秒），保存曲线。
- ▶ 测量引导电极1，2之间的坐骨神经干的长度，用“S”表示（单位：米）。
- ▶ 根据公式 $V=S/T$ 计算神经冲动的传导速度（其中V表示传导速度）。

5. 不应期的测定:

- ▶ 选择**不应期自动测定**实验→开始刺激→ page up / page down （或子文件左右键）看相关波形→保存曲线。
- ▶ 计算坐骨神经兴奋的相对不应期和绝对不应期。



选作实验内容

▶ 不同引导方向的动作电位观察与记录：

- 调换引导电极（“+”、“-”极）的位置，观察动作电位波形有无变化，改变标本放置位置后，波形有无变化。保存曲线。


▶ 单相动作电位观察与记录：

- 用镊子将两引导电极（+，-）之间的神经夹伤或剪断，观察动作电位变化。

V 本实验需掌握的实验技术

- 常用手术器械的正确使用
- 牛蛙坐骨神经分离技术
- 持钳打结法
- 生物信号采集处理系统及其软件的使用

VI 关键技术

- ▶ 坐骨神经的剥离技术
 - ▶ 标本与仪器的连接
 - ▶ 刺激强度与频率的选择
 - ▶ 曲线的记录与保存
- 

VII 注意事项

- ▶ 在制备标本时，避免过度牵拉神经，不可用手或金属器械触碰神经干。
- ▶ 避免动物皮肤分泌物（体液、血液等）污染神经和肌肉，也不要用水冲洗，以免影响组织机能。神经周围的结缔组织要剥离干净。
- ▶ 腓肠肌与换能器的连接松紧适当，连线要垂直。
- ▶ 神经干要伸直，与各电极良好接触，防止弯曲、折叠和粘附。
- ▶ 用刚能使神经干产生最大动作电位的刺激强度刺激神经。以免强度过大，对标本产生难恢复的损伤。
- ▶ 位于刺激电极和记录电极外侧端的神经干及棉线要尽量短，不可与盒底接触，更不要缠绕在电极上。
- ▶ 每改变一次刺激频率后，应休息0.5~1 min，每次刺激不要超过3~4 s，以免标本疲劳。
- ▶ 实验过程中应常用任氏液润湿标本，以免影响神经和肌肉活性。
- ▶ 实验要迅速，以免时间过长影响标本活性（兴奋性）。

VIII 思考与探索

- ▶ 制备坐骨神经腓肠肌标本前为什么要完整破坏神经中枢？
- ▶ 设计实验观察不同强度的连续刺激对强直收缩形式的影响。
- ▶ 试设计实验测试腓肠肌的不应期，并与神经干不应期进行比较。
- ▶ 设计实验，观察刺激腓肠肌与刺激支配腓肠肌的神经其不应期有何不同。
- ▶ 设计实验，观察其他神经干或神经纤维的传导速度。
- ▶ 设计实验，观察普鲁卡因对不同神经干传导速度的影响。
- ▶ 坐骨神经-腓肠肌标本还能用来做哪些研究？