

离子选择性微电极及其在生物医学中的应用

马 逸 龙

(同济医科大学环境医学研究所, 武汉 430030)

提 要

离子选择性微电极技术及其在生物医学中的应用研究是当前多学科协同攻关的热门课题。本文择要介绍了离子选择性微电极的发展简史。研究现况与发展趋势。并概述了离子选择性微电极在神经生理与电生理研究中所显示出的独特功能。

关键词 离子选择性, 微电极, 电位法, 微环境测定

离子选择性微电极是一种能测定细胞等生物微环境内单一离子活度的信息传感器。其定量测定的基本原理是: 被测定的离子活度的对数值与由离子选择性微电极和参比电极构成的电池电动势值之间存在线性关系, 即符合 Nernstian 方程:

$$E = E^0 \pm \frac{RT}{nF} \ln a_i$$

因此, 离子选择性微电极测定是一种电位型测定方法。与其他细胞内离子组分的测定方法(如光度法)相比, 具有如下特点: (1) 点位测定: 光度法(如细胞染色)测得的是整个细胞内被测离子的平均浓度, 离子选择性微电极则可测出 1pL (皮升) 局部胞液内的离子活度^[1]。(2) 动态连续或瞬时测定: 离子选择性微电极可记录细胞内外某一离子活度的动态、连续或瞬时变化过程。(3) 可进行生物微环境内离子活度的在体检测。所有这些特点是其他细胞内的分析方法所不具备的。因此, 离子选择性微电极技术是细胞乃至分子水平的近代基础医学研究中脱颖而出的独特研究方法, 已日益引起国内外生物医学界和电化学界等的广泛兴趣。

一、离子选择性微电极的研究进展

1. 离子选择性微电极的发展简史

50 年代中期, 把内充 3mol/L KCl 溶液的玻璃微电极(标准微电极)引入了细胞膜电位的测量, 这为电压箝位技术(可将细胞膜电位固定在所需值上)及近年来发展的膜片钳(patch clamp)技术(可记录单个离子通道电流)提供了重要的技术基础。但所有这些技术, 只能通过细胞膜电位或电流的变化来间接反映细胞内外离子组分的相对变化, 不能直接测定其离子浓度或活度。60 年代, Hinke 首先制成了 pH、pK、pNa 玻璃微电极, 为离子选择性微电极研究提供了雏型。70 年代初, J. L. Walker 首次用液态离子交换剂膜溶液作敏感材料, 制成了可测定 K⁺ 和 Cl⁻ 的液态离子交换剂玻璃微电极。从此, 离子选择性微电极进入了实用阶段, 但微电极的选择性仍较差。70 年代末以来, Simon 等设计合成了一系列中性载体大环化合物作敏感材料, 制成了中性载体离子选择性微电极^[2], 选择性得到了明显的改善, 使离子选择性微电极的研究与应用取得了新进展。

2. 离子选择性微电极的技术改进

Walker 最早发明的液态离子交换剂微电极是单管微电极, 如图 1a 所示。为扣除叠加在单管微电极上的细胞膜电位, 需用另一支 KCl 标准微电极分别测得细胞膜电位的统计值, 然后再予以扣除。为此, Vyskočil 等将标

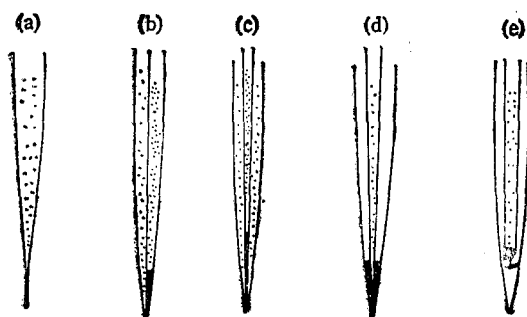


图1 液膜型离子选择性微电极的类型

- (a) 单管微电极; (b) 双管微电极;
(c) 同心双管微电极; (d) 同轴微电极;
(e) 侧孔微电极

准微电极与离子选择性微电极合并,制成了双管微电极(图1b),实现了细胞膜电位与离子活度电位的同时测出。后来,有人设计并研制了可同时测定两种以上离子活度的多管微电极^[3],因制作较难,至今应用较少。H. Yamaguchi 等将 ETH1001 中性载体 Ca^{2+} 微电极插入参比(标准)微电极管内,制成以参比电极为外管、 Ca^{2+} 微电极为内管的同心型双管微电极(图1c)^[4]。R. C. Thomas 则将参比微电极插入 H^+ 交换剂 pH 微电极内组成另一构型的同心型双管微电极^[5]。为有效缩短离子敏感膜溶液的长度、减小电极阻抗, Ujec 等用另一支内充微电极内充液的微电极管插入离子交换剂内,控制敏感膜液柱的长度,制成同轴型微电极(图1d)的阻抗下降了10倍。为使微电极插入肌纤维时不造成机械损伤, Vyskočil 等设计了一种侧孔型微电极(图1e)。

3. 离子选择性微电极的研究现况与发展方向

由于新的中性载体的不断诞生,以其作为敏感膜的 H^+ , Na^+ , K^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , Cl^- 选择性微电极相继获得成功^[2]。

Ammann 等最近合成的新载体 (ETH 1907) 制成的 pH 微电极^[6],其测定的 pH 范围为 2—10,性能优于以 3-正十二烷基胺作 H^+ 载体的现行 pH 微电极^[7]。以缬氨霉素作载体的 K^+ 选择性微电极是目前选择性最佳的离子选择性微电极^[8],但 Rb^+ 、 $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ 仍干扰测

定。 Na^+ 选择性微电极的选择性迄今仍较差,相对较好的载体是 Simon 等合成的 ETH 157 开链酰胺型载体^[9],但 K^+ , Ca^{2+} , Li^+ 等对测定有不同程度的干扰。基于开链酰胺 ETH1001 型载体的 Ca^{2+} 微电极是应用较多的微电极,检测限在 10^{-7}mol/L 左右。Ammann 等研制的 ETH 129 作载体的 Ca^{2+} 微电极,其检测限达 10^{-9}mol/L 以下^[10]。 Mg^{2+} 选择性微电极的选择性不好一直是其应用的障碍。Simon 等研制的 Mg^{2+} 选择性微电极,其选择性有较大的改进^[11]。现行的 HCO_3^- , Cl^- 微电极的干扰仍较大。可见,选择性仍然是中性载体离子选择性微电极存在的共性问题。

就种类而言,目前离子选择性微电极尚局限于上述无机离子的微电极。很少见到能测定生物微环境内有机离子或分子类物质的微电极。Jaramillo 等研究了以六硝基二苯胺与乙酰胆碱络合物作电活性物质的乙酰胆碱微电极及以六硝基二苯胺胆碱盐作活性物质的胆碱选择性微电极^[12]。研究开发有机离子微电极将是微电极研究的重要方向之一。

研究可用于生物微环境内中性分子或生化物质(如氨基酸、蛋白质)的分子选择性微电极是国际上正在竞相探索的热门课题。作者已研究成功可用于测定生物微环境内氨与二氧化碳的气敏微电极,已获得专利^[13]。有关研究报告均已发表^[14,15]。这两种气敏微电极是以中性载体 pH 微电极为内敏感电极的空气隙式气敏微电极。由于其结构简单、制作较易、性能较佳,使气敏微电极进入了研究实用阶段。还可用这两种气敏微电极作基体微电极,开发可测定氨基酸等生化物质的酶微电极。作者研究过测定尿素用的尿酶微电极^[14]。正在研究测定细胞内氨基酸的微电极。

S. Levy 等已将计算机应用于离子选择性微电极研究,实现了微电极校正的计算机程序控制^[16]。

二、离子选择性微电极的生物医学应用

在研究细胞的特性时,检测细胞内外的离

子活度是极为重要的。在可兴奋组织中,尤其是神经和肌肉中,无论信息的脉冲传递还是细胞膜电位的产生,均与细胞内外的离子活度及细胞膜中离子转移过程相关。离子通过可兴奋细胞膜的运动是脉冲启动、传导和神经细胞突触传递的基础。70年代以前,可兴奋细胞膜离子通透性的瞬变及由此引起的其它变化等信息,大部分由电压箝位技术、放射同位素法及光度法获得,这些方法只能获得细胞内外各种离子的总浓度,不可能测定如癫痫发作时特定脑区中真实的离子浓度,也不能以足够的准确度测定心脏起搏细胞邻近 Ca^{2+} 的积累,甚至无法知道由血脑屏障等阻塞产生的脑中细胞外静态 K^+ 水平的信息。离子选择性微电极使这类研究成为了现实。

1. 离子选择性微电极在中枢神经系统研究中的应用

(1) 脑组织细胞外测定 有人用 K^+ 微电极进行研究并证明脑不同部位中细胞外 K^+ 浓度调节的重要性。有的研究将 Cl^- , Na^+ , Ca^{2+} 选择性微电极用于脑细胞外的测定。典型的应用之一,是用 K^+ 微电极跟踪测定神经扩布性抑制、缺氧去极化和癫痫发作等情况下,猫躯体感觉皮质、兔及鼠大脑皮质等脑细胞外 K^+ 活度的贮存和积累现象。还有用 Ca^{2+} 微电极测得猫癫痫发作时,其躯体感觉皮质中 Ca^{2+} 活度大为下降。从而认为癫痫的形成与 Ca^{2+} 的活度变化有关。应用之二是,用 K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Na^+ 选择性微电极测定小脑中离子的活度。有人用 K^+ , Ca^{2+} 微电极对鼠和猫的小脑进行实验,证明氨基吡啶能诱发 K^+ 的增加,同时伴随大量 Ca^{2+} 活度的减小。也有人用 K^+ , Cl^- 微电极测定了鲇鱼小脑中扩布性抑制时的离子活度变化,发现大量 Cl^- 与 Na^+ 活度锐减,伴随 K^+ 活度的增加。另一应用实例是外侧膝状核和中脑网状结构中的离子活度测定。 K^+ 微电极已用于测定猫的外侧膝状核中细胞外 K^+ 活度的变化。刺激中脑网状结构、视觉皮质、视交叉或光刺激视网膜后,由于神经元活动的增加,可测得细胞外间隙中 K^+ 的瞬时增加,基于这些结

果提出了视神经纤维束 K^+ 去极化作用的见解。

(2) 脊髓细胞外的测定 K^+ 选择性微电极已广泛地应用于哺乳类及两栖动物脊髓中 K^+ 的瞬变检测。研究表明 K^+ 瞬变的生理作用与初级传入纤维的去极化密切相关,是形成突触前抑制的基础。 K^+ 瞬变对调整脉冲的传递有重要影响。初级传入纤维去极化可能由两种因素引起,即由传入纤维上的突出活动引起以及突触间隙中 K^+ 的贮存引起。

(3) 在感觉器官——内耳和视网膜中的测定 已用 K^+ , Na^+ , Cl^- 选择性微电极测定了各种感觉器官中离子活度的瞬变。多数是在内耳中进行的^[17],证明在缺氧时,内淋巴的 Na^+ 浓度增加,内耳蜗电位的正电成分是由 K^+ 的传递形成的,从而证明内耳蜗的负电位主要是由内淋巴与外淋巴之间的 K^+ 浓度梯度产生的。L. J. Frishman 等用 K^+ 微电极研究了猫内视觉视网膜(proximal retina)内光诱发 K^+ 活度的变化^[18], R. Hanitzsch 等通过对离体视网膜进行连续光照,对 K^+ 的积累效应作了研究^[19],从而得出视网膜 K^+ 积累的机理。L. L. Odett 则用 K^+ 微电极法研究了视网膜内钾积累的动力学模型^[20]。有的学者还研究了视网膜内各种离子的调控过程与机制。

(4) 单个神经元的测定 已有多种离子选择性微电极用于软体动物如蜗牛神经元的 pH 及 K^+ , Na^+ , Li^+ , Cl^- 的活度测定,并获得许多重要的结果。

2. 离子选择性微电极在骨骼肌和心肌研究中的应用

(1) 骨骼肌 这不仅意味研究方法的重要突破,而且能使细胞内外对肌肉功能影响极大的若干离子进行直接测定与评价。很多研究者分别测定过蟹大肌纤维细胞内的 H^+ , Na^+ , K^+ 的活度变化,青蛙缝匠肌、鼠比目鱼肌纤维细胞内 K^+ , Cl^- 的活度变化。有的学者研究了兔、猫等腓肠肌细胞外 K^+ 的变化,证明等长强直收缩造成 K^+ 贮存,贮存愈多,收缩持续的时间愈长。还有人测定了肌活动时 K^+ 释放进入静脉血液中的变化过程。所有这些研究得出的

生理学结果是: ① K^+ 在肌内的局部贮存是影响活动后充血的主要因素。② 细胞外 K^+ 的贮存可以成为非本体感受随意感觉神经末梢去极化和激发的原因。③ K^+ 贮存除了影响组织间血管平滑肌和神经的生理作用外, 还可影响横纹肌细胞本身。④ 肌工作时造成肌的 K^+ 活度降低。

(2) 心肌 虽然对心肌膜的各种电化性质测定较早, 但迄今一些最重要的数据仍是由离子选择性微电极获得的。测定结果大多与骨骼肌中测得的相类似, 也获得了一些新的结果。

细胞内测定: Miura 与 Rosen 用 K^+ 微电极测定了乌巴因对跨膜电位的作用及其与狗心浦肯野氏纤维细胞内 K^+ 活度的关系, 发现静息膜电位降低时, 细胞内 K^+ 活度下降。Deitmer 等曾应用 Na^+ 微电极测定了各种二价阳离子浓度升高时引起的羊浦肯野氏纤维细胞内 Na^+ 的活度变化。由此得出的结果是: 细胞外 Ca^{2+} 的浓度较高造成 Na^+ 活度降低。这是因为改变了 Na^+ 的被动流入量以及 Na^+ 被外部 Ca^{2+} 交换的缘故。

细胞外离子浓度测定: 用离子选择性微电极测定蛙心肌条在受刺激时 K^+ 的贮存情况。结果是: K^+ 贮存的程度不仅取决于刺激的频率, 还决定于电极穿刺的深度。有人研究过长箝位脉冲期间 (1~8s), 细胞外 K^+ 的活度变化。pH 降低可提高细胞外 K^+ 活度, 降低细胞内 K^+ 活度, 并导致膜电位下降和动作电位突增。此结果可以认为是 K^+ 泵部分抑制或可逆抑制产生的。

由上可见, 离子选择性微电极已经在神经生理和电生理研究中表现出独特的功能与效用。但由于目前离子选择性微电极的种类还有限。已有的电极尚存在选择性不足、干扰较多、电极阻抗较高、响应时间较长、漂移较大、寿命较短等缺点。目前, 其应用尚受到一定限制。随着新的、选择性较好的载体的设计与合成、新技术的引进、微电极制作方法的改进, 可以预计微

电极的性能定会获得进一步的改善。从发展看, 对生物活性物质(如酶)或生化物质(如氨基酸等)有选择性的微电极的出现, 将使微电极技术在生理、生化、药理、病理、毒理等研究领域获得更为广泛的应用。

本文承蒙本校电生理室王阿敬教授审阅, 诚此致谢。

参 考 文 献

- 1 Ammann D, Simon W. *ISM symposium, ion-selective microelectrodes and excitable tissue*. Toronto: Univ of Toronto, 1986: 17
- 2 Ammann D. *Ion-selective microelectrodes*. Berlin: Springer-Verlag, 1986: 9—40
- 3 Fujimoto M, Honda M. *Jap J Phys*, 1980; 30: 359
- 4 Yamaguchi H. *Can J Physiol Pharmacol*, 1986; 64: 1006
- 5 Thomas C R. *Can J Physiol Pharmacol*, 1986; 65: 1001
- 6 Chao P, Ammann D, Oesch U et al. *Pflügers Arch*, 1988; 411: 216
- 7 Ammann D, Lanter F, Steiner R A et al. *Anal Chem*, 1981; 53: 2267
- 8 Ammann D. *Ion-selective microelectrodes*. Berlin: Springer-Verlag, 1986: 240
- 9 Ammann D, Anker P. *Neurosci Lett*, 1985; 57: 257
- 10 Ammann D, Bühler T, Schefer U et al. *Pflügers Arch*, 1987; 409: 223
- 11 Hu Z M, Bühler T, Müller M et al. *Anal Chem*, 1989; 61: 574
- 12 Jaramillo A, Lopez S, Justice J B et al. *Anal Chim Acta*, 1983; 146: 149
- 13 马逸龙, 中国专利88-2-06367, 1989
- 14 Ma Yilong, Cleemann L. *Anal Biochem*, 1988; 174: 666
- 15 Ma Yilong, *Anal Biochem*, 1990; 186: 74
- 16 Levy S. *ISM symposium, ion-selective microelectrodes and excitable tissue*, Toronto: Univ of Toronto, 1986: 39
- 17 Bosher S K. *The application of ion-selective microelectrodes*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981: 129—143
- 18 Frishman L J, Steinberg R H. *ISM symposium, ion-selective microelectrodes and excitable tissue*, Toronto: Univ of Toronto, 1986: 43
- 19 Hanitzsch R, Matting U. *ISM symposium, ion-selective microelectrodes and excitable tissue*, Toronto: Univ of Toronto, 1986: 45
- 20 Odett L L. *ISM symposium, ion-selective microelectrodes and excitable tissue*, Toronto: Univ of Toronto, 1986: 46

[本文于1990年4月23日收到, 8月1日修回]