

可兴奋膜研究中的模型和系统辨识

蔡体导

(中国科学院上海生理研究所)

在线性系统的研究工作中通常可从系统的输入、输出之间的关系中求得动态特性。如图 1a 所示, 当系统输入为 $x(t)$ 时其输出为 $y(t)$, 那末可用

$$\begin{aligned} & a_n y^{(n)}(t) + a_{n-1} y^{(n-1)}(t) + \dots \\ & + a_1 y'(t) + a_0 y(t) \\ & = b_m x^{(m)}(t) + b_{m-1} x^{(m-1)}(t) + \dots \\ & + b_1 x'(t) + b_0 x(t) \end{aligned} \quad (1)$$

这样一个微分方程来表示该系统的动态特性。

常用的脉冲反应函数、阶跃反应函数、传递函数、幅频一相频特性和实频一虚频特性等等实质上都是从输入、输出的关系中求得的系统动态特性。只要系统是线性的, 那末, 经过简单数学运算都可以从其中一个函数推导出另一个函数^[1]。

刺激与反应

从输入输出关系中求得系统动态特性的方法在可兴奋膜的特性研究中早有广泛应用 (图 1b), 只是这里常常使用刺激与反应这样的名词而已! 可兴奋膜, 顾名思义, 就是受到一个脉冲刺激就会引起一个兴奋反应的细胞膜。由此可见, 动作电位实际上就是它的“脉冲反应函数”。在可兴奋膜电生理研究中很早就使用了电压箝方法^[2]。它用负反馈的电子线路将膜电位箝制在实验所希望的一定值上 (即输入), 同时测量膜电流的变化 (即输出), 从电位与电流之比求出膜电导变化。在大多数情况下, 控制电位的变化都采用阶跃方波形式, 所以在这个意义上, 膜电导随时间的变化就是可兴奋膜的

- 1, 677—686, 1983.
- [8] 孙晋武 郭兴华: «微生物学通报», 11, 177—181, 1984.
- [9] 黄胜和 马金鉴: «酶在临床上的应用», 241—272页, 1984年, 天津科学技术出版社, 天津.
- [10] Maugh, T. H.: *Science*, **223**, 474—476, 1984.
- [11] Mozhaev, V. V., and Martinek, K.: *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 50—59, 1984.
- [12] Maugh, T. H.: *Science*, **223**, 475, 1984.
- [13] [美] G. G. 吉尔鲍特 (缪辉南、陈石根译): «酶法分析手册», 418 页, 1983 年, 上海科学技术出版社, 上海.
- [14] Lee, V.: *Biotechnology*, **2**, 549—551, 1984.
- [15] 毕家正: «世界科学 (World Science)», **4**, 25—26, 1984.
- [16] 吉鑫松: «生命的化学» **4**, 9—10, 1984.
- [17] 袁中一等: «固相酶与亲和层析», 1 页, 1975 年科学出版社, 北京.
- [18] [日] 千畑一郎 (胡宝华 吴雄江译): «固定化酶», 1 页, 1981 年, 河北人民出版社, 石家庄.
- [19] Breslow, R. P. *Science*, **218**, 532—537, 1982.
- [20] Wetzel, R., and Göddel, D. V.: *The Peptides* (Edited by E. Gross and J. Meienhofer), 1983, Vol. 5, PP. 1—64, Academic Press, New York.
- [21] Davies, K. E.: *Genetic Engineering* (Edited by Robert Williamson), 1982, Vol. 3, PP. 143—173, Academic Press, London.
- [22] Wilkinson, A. J. et al.: *Nature*, **307**, 187—188, 1984.
- [23] Maugh, T. H.: *Science*, **223**, 269—274, 1984.
- [24] Hammes, G. G.: *Enzyme Catalysis and Regulation*, 1982, PP. 14—37, Academic Press, New York.
- [25] Pabo, C.: *Nature*, **301**, 200, 1983.
- [26] Drexler, K. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 5275—5278, 1981.
- [27] Dean, D. C. et al.: *Nature*, **305**, 551—554, 1983.
- [28] Casadaban, M. J., and Chou, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 535—539, 1984.
- [29] Abelson, P. H.: *Science*, **219**, 611—613, 1983.
- [30] Wilson, T., and Klausner, A.: *Biotechnology*, **6**, 511—519, 1984.

[本文于 1985 年 4 月 1 日收到]

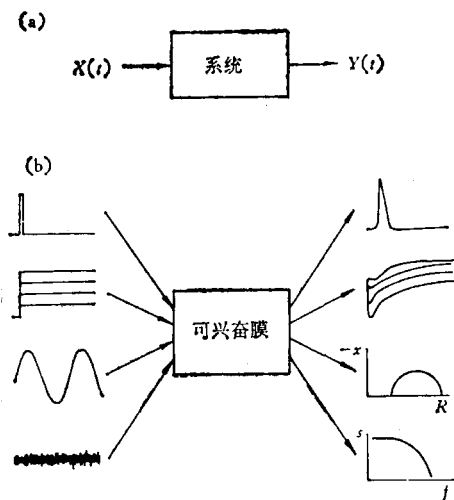


图 1

- a) 一个输入为 $x(t)$ 、输出为 $y(t)$ 的系统；
b) 在可兴奋膜特性研究中将脉冲、方波、正弦波与白色噪声作输入分别得到脉冲反应函数、阶跃反应函数、幅相频率特性与传递函数。

“阶跃反应函数”。自从 K. C. Cole 等人用不同频率的正弦波作输入测量可兴奋膜阻抗随频率而变化的特性以来，阻抗轨迹图和导纳轨迹图，也就是幅相频率特性已成为这个研究领域常用工具之一^[3,4]。由于计算机迅速发展用白色噪声或准随机信号作输入，通过计算机输入、输出信号的互谱密度函数求得系统动态特性的方法也在可兴奋膜的离子运动与动力学研究中得到应用，并取得了一些有趣的结果^[5,6]。也可以说，在这里测量的是系统传递函数。

由此可见，在可兴奋膜特性研究中采用脉冲、方波、正弦波与白色噪声等作为系统输入，从输入、输出信号关系分别得到系统的脉冲反应函数、阶跃反应函数、幅相频率特性与传递函数。不过，可兴奋膜也象其他生物系统一样，并非是简单的线性系统。因而，线性系统中适用的各种转换，常常不能简单地在这里套用，给研究这系统的工作带来了不少新的难题。

Hodgkin-Huxley 分析法与小信号测量

大家知道，Hodgkin 等人用电压钳方法分析了可兴奋膜的特性^[7]。他们将可兴奋膜看成

是一个膜电容与三个膜电导并联的模型（图 2a）。三个膜电导分别为钠电导，钾电导与漏电导。施加一个阶跃电压方波，那末流经可兴奋膜的总电流密度

$$\begin{aligned} I_M &= I_C + I_{Na} + I_K + I_L \\ &= C \frac{dv}{dt} + \bar{g}_{Na} m^3 h (V - V_{Na}) \\ &\quad + \bar{g}_K n^4 (V - V_K) + \bar{g}_L (V - V_L) \end{aligned} \quad (2)$$

这里， C 是单位面积的膜电容， $\bar{g}_{Na}$ 、 $\bar{g}_K$ 、 $\bar{g}_L$ 分别为钠、钾和漏电导的最大值， V_{Na} 、 V_K 、 V_L 、 V 分别为钠平衡电位，钾平衡电位、漏电位与膜电位，是相对于静息电位的变化部分。其中 m 、 h 、 n 都是取值于 0 与 1 之间，可用下列一阶速率方程来描写：

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(1 - m) - \beta_m m \quad (3)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(1 - h) - \beta_h h \quad (4)$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1 - n) - \beta_n n \quad (5)$$

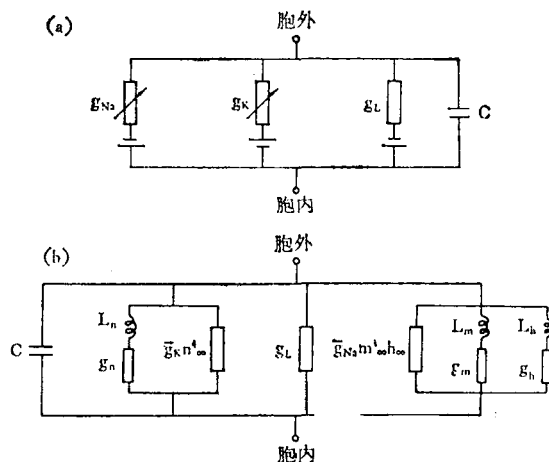


图 2

- a) 可兴奋膜的 Hodgkin-Huxley 模型；
b) 线性化了的 Hodgkin-Huxley 方程的电路模型，
其中 $L_m = \tau_m / \bar{g}_m$ ， $L_h = \tau_h / \bar{g}_h$ ， $L_n = \tau_n / \bar{g}_n$ 。

α 、 β 是速率参数，在固定温度与钙浓度条件下仅是膜电位 V 的函数。当纤维内电压向正变化时 α_m 、 β_h 、 α_n 增大， β_m 、 α_h 、 β_n 减少。

方程(2)–(5)是一个非线性方程组，其中

各种参数只是膜电位的函数。Hodgkin、Huxley 在电容电导并联的线性系统中加入一个电导随膜电位与时间而变化的非线性因素，从而简化了对可兴奋膜这样一个非线性系统特性的描述。将电压箝制实验测得的各种参数代入上述方程可以很好地解释可兴奋膜的很多特性，赋以适当的初始条件并与纤维的电缆方程相结合在计算机上求解，可以模拟可兴奋膜的兴奋与传导等多种机能^[8,9]。

只要输入信号足够小，即所谓在线性范围内变化，一个非线性系统将可近似地等同于一个线性系统。将方程(2)一(5)线性化^[10]并略加整理得膜导纳(图 2b)

$$Y(p) = C_p + g_{\infty} + \frac{g_m}{1 + p\tau_m} + \frac{g_h}{1 + p\tau_h} + \frac{g_n}{1 + p\tau_n} \quad (6)$$

其中

$$\left. \begin{aligned} g_{\infty} &= \bar{g}_K n_{\infty}^4 + \bar{g}_{Na} m_{\infty}^3 h_{\infty} + g_L \\ g_m &= 3\bar{g}_{Na} m_{\infty}^2 h_{\infty} \tau_m (V - V_{Na}) \cdot [\alpha'_m - m_{\infty}(\alpha'_m + \beta'_m)] \\ g_h &= \bar{g}_{Na} m_{\infty}^3 \tau_h (V - V_{Na}) \cdot [\alpha'_h - h_{\infty}(\alpha'_h + \beta'_h)] \\ g_n &= 4\bar{g}_K n_{\infty}^3 \tau_n (V - V_K) \cdot [\alpha'_n - n_{\infty}(\alpha'_n + \beta'_n)] \\ \tau_m &= (\alpha_m + \beta_m)^{-1}; \\ \tau_h &= (\alpha_h + \beta_h)^{-1}; \\ \tau_n &= (\alpha_n + \beta_n)^{-1} \\ m_{\infty} &= \alpha_m \tau_m; \quad h_{\infty} = \alpha_h \tau_h; \\ n_{\infty} &= \alpha_n \tau_n \end{aligned} \right\} \quad (7)$$

α' 、 β' 分别为 α 、 β 对 V 的一阶导数， $P = j\omega$ ，即 $\sqrt{-1}$ 乘以圆频率。也就是说，可以将原先 Hodgkin-Huxley 方程中钠、钾电导与 m 、 n 的多次方关系降为一次，成线性关系。由方程(6)一(7)推算结果可以很好地阐明在低于阈值强度的电流作用下乌贼大纤维膜电位的振荡现象。

有人用四种方法对乌贼大纤维钾电导进行了小信号分析^[11]，对其线性与动力学阶数进行了估计：1)钾电流起始时的形状是指数形还是 S 形；2)小的超极化与去极化方波所引起的钾

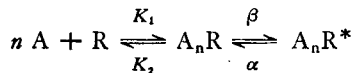
电流是否对称；3)宽频带的导纳测量，比较实验测得的膜导纳的幅频相频曲线与线性化了的 Hodgkin-Huxley 方程计算所得理论曲线是否一致；4)谐波分析，测量输入、输出信号中谐波成份的变化以及输出信号中基频与高次谐波成份之比例。结果表明，在电压箝制条件下，只要控制信号小于 $1\text{mV}(\gamma_{\text{rms}})$ K^+ 电导的反应将是线性的。这时， K^+ 电导的动力学可以象线性化了的 Hodgkin-Huxley 方程中那样用一阶速率方程来描述。最简单的解释是这里的线性反应可归因于一阶门机制 (first-order gating mechanism)，而常用的几十毫伏电压箝制信号产生了非线性现象。似乎 Hodgkin-Huxley 分析法与小信号测试是相辅相成的，都是对可兴奋膜这样一个非线性系统特性研究的有力方法。而对生物膜研究工作者来说更有兴趣的将是输入信号怎样使一个系统逐步由线性变为非线性的，具体的物理机理是什么，这样的变化与生物膜的功能和结构又有什么关系？

灰箱问题与“拆箱”过程

对于通常的系统动态特性研究来讲，常常是希望建立一个象(1)式那样的微分方程，并确定其各阶系数或者求得系统的脉冲反应函数、阶跃反应函数、传递函数、幅频—相频特性和实频—虚频特性中的任一个函数。研究工作者不必关心系统的具体物理结构。这是一个经常所讲的暗箱问题。然而，在可兴奋膜特性研究工作中人们希望从表示输入、输出信号之间的数学关系，进一步深入到更具体的生物膜的结构与功能中去。所以，这里是一个灰箱问题。从这个意义上讲，这个逐步深入的研究过程是一个逐步“拆箱”的过程。大家知道，有很多数学方程可以描述电压箝制实验中控制电压方波与膜电流变化历程的相互关系，Hodgkin-Huxley 方程仅仅是其中的一个。不同之处就在于它不仅给出了一组数学关系式，而且相应地提出了一个可兴奋膜上离子运动的物理模型，从其他实验方法所得结果来看，这个物理模型也是合理的。

最新工作又从这个粗略的钠、钾离子流模型逐步深入到可兴奋膜上离子单通道的研究。生物膜噪声^[12]为这种研究提供了可能。利用系统正常运行时的噪声作随机信号,计算输入、输出信号的谱密度函数,求得系统传递函数的方法是经常使用。这个方法已用于可兴奋膜离子通道的研究,譬如从乙酰胆碱(Ach)引起的膜噪声测得 Lorentz 形式的谱密度函数。最简单的假设这是一步模型: $A + R \xrightleftharpoons[K_2]{K_1} AR^*$; 这里,

A 是 Ach, R 是乙酰胆碱受体通道, AR^* 是与 Ach 结合并处于道通状态的乙酰胆碱受体通道。然而, 1) 有的激动剂即使在很大浓度下仍不能引出最大反应和 2) 箭毒与受体结合的部位虽和 Ach 的相同, 却不能引起通道道通的实验提示似乎应是两步模型: $A + R \xrightleftharpoons[K_2]{K_1} AR \xrightleftharpoons[\alpha]{\beta} AR^*$; 第一步是接合过程, 第二步是构形变化。不过, 若是这样, 任何偏离返回到平衡状态的过程应有两个时间常数^[13]。可是实验中仅测到一个时间常数 τ 。所以, 必须假定其中一个过程是快速的, 而另一个是速率限制的(rate-limiting)。有人看到, 在不可逆的 Ach 脂酶抑制剂作用下, 高浓度的 Carbachol 使 $1/\tau$ 趋近常数^[14]。看来和所有已研究过的酶系统一样, 构形变化是速率限制的。另外, 在终板上实验表明: 反应与 $[A]^n$ 成正比, n 在 1.5 到 2.9 之间。所以乙酰胆碱受体离子通道的动力学模型应是^[15]:



也就是说, n 个 Ach 分子(一般认为 $n=2-4$) 与一个受体相结合, 经过构形变化, 与 Ach 接合的受体通道可能处于道通或者关闭两种状态(图 3)。

假定 I 是流过离子单通道的电流、 N 为受体通道总数。 P 为其道通概率, 那末, 平均膜电流 $\bar{I} = NP_i$, 其方差 $\sigma_i^2 = Nip(1-p)$, 由此模型计算得到的膜电流噪声的理论功率谱 $S_i(f)$

$$= \frac{2\sigma_i^2\tau}{1 + (2\pi f\tau)^2},$$

与实验测得一样, 是 Lorentz

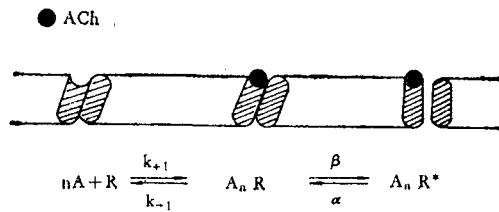


图 3 乙酰胆碱受体离子通道由关闭到道通的二步模型形式。当 $P \ll 1$, 离子单通道电导

$$g = \frac{\sigma_i^2}{\bar{I}(V_c - V_r)} = \frac{S_i(0)}{2\bar{I}\tau(V_c - V_r)},$$

其中 V_c 为电压箝制下的膜电位, V_r 为 Ach 受体通道的逆转电位; 而通道平均道通时间 $\tau = \frac{1}{2\pi f_c}$, 这里 f_c 为功率谱的特征频率。所以, 从实验测得的功率谱用计算机拟合可以得到离子通道的特征值 γ 与 τ (同样方法用到钠、钾离子通道研究, 也得到相应的 γ 与 τ 值)。

由此可见, 在可兴奋膜特性研究工作中系统辨识不仅给出了一个物理意义不十分明确的系统传递函数, 而且, 要进一步与具体物理模型相结合, 为逐步了解系统的具体结构及其如何工作的机理提供信息。这是可兴奋膜系统辨识的主要目的。当然这个辨识过程还远没有完成, 不过我们深信将有更多的生物学工作者掌握与使用系统辨识这样一个十分有用的研究手段, 为更深入地研究可兴奋膜的特性作出贡献。

参 考 文 献

- [1] 潘裕煊:《生产过程自动化中的数学模型》, 科学出版社, 1977。
- [2] 蔡体导:《生理科学进展》, 2, 160—163, 1985。
- [3] Cole, K. S.: *Membranes, ions and impulses*, Univ. Calif., Press Berkeley, Calif., 1968.
- [4] Schanne, O. F. et al.: *Impedance measurements in biological cells*, A Wiley-Interscience Publication, 1978.
- [5] Fishjan, H. M.: et al.: In 'The biophysical approach to excitable systems' (Ed. by Adelman, W. J. et al.), 65, 1981.
- [6] Moore, L. E. et al.: *J. Memb. Biol.* 73, 217, 1983.
- [7] Hodgkin, A. L. et al.: *J. Physiol.*, 117, 500, 1952
- [8] Noble, D.: *Physiol. Rev.*, 46, 1, 1966.
- [9] 蔡体导:《生理学报》, 30, 187, 1978。
- [10] Mauro, A. et al.: *J. Gen. Physiol.*, 55, 497 1970.

(下转第 28 页)

Hartin^[8] 的观点, 应将整个细胞周期分为“A态”和“B态”两个不同部分。“A态”包括了G₁期的大部分, 在这一部分, 细胞可以随机停顿, 一旦有机遇即可过渡到“B态”而“B态”包括 $T_s + T_{G_2} + T_M$ 以及 T_{G_1} 的剩余部分, 其不同于A态之点是B态一旦起始即不可避免地、完成周期的运转。这说明一个细胞群体周期的变化主要是由 T_{G_1} 的易变性决定的; 正因为 T_{G_1} 的改变, 影响了 T_c 的长短。

我们的实验结果是 T_c 和 T_{G_1} 延长, 这一方面可能因培养条件和细胞本身某些程度的变化, 另一方面可能因实验中培养液的不断更新, 细胞经多次震荡和低温条件影响, 这些因素都可能影响细胞动力学的进程, 累及由“A态”向“B态”运转的速度。

2. 在理想条件下, 利用液闪法或标记有丝分裂指数法 (PLM) 可以从曲线上直接计算出周期各时相的持续时间。但实际上, 在一个细胞群体中, 细胞分布是非均一的, 由此用液闪计数或 PLM 得出的曲线不是典型的双峰值图形, 因此必须进行曲线的拟合。

曲线拟合法有很多种; Stell 将其归为八大类^[9]。而应用较多也较成功的是 Barrett-Steel-Hans 法和高桥-Mendelsohn 方法。前一类方法是将周期分为三个时相, 可是, 当第二个峰值不足 50% 时, 应用就受到限制。后一类方法采取一定补救措施后, 能解决这个困难, 但计算量较大。我们采用高桥等人的方法, 从以上两组曲线拟合所得数据看, 结果比较一致, 这是此法的优点。因此, 影响参数的与其说是个别的点, 不如说是第一个峰下的面积, 因为面积的稳定性, 所以最后的结果也比较稳定。

为了验证方法的可靠性, 我们曾用 PLM 方法测定 CHO-K1 细胞的周期。结果所得周期的参数与液闪法相似 ($T_c = 26$ 小时, $T_{G_1} = 12.7$ 小时, $T_s = 8.2$ 小时, $T_{G_2} = 3.9$ 小时, $T_M = 1.2$ 小时)。从而进一步肯定了此法的可靠性。

3. 尽管液闪法如同 PLM 法一样存在上述的一些问题, 但液闪法仍不失为一种简单、快速和准确的方法。用液闪法在实验结束后一小时内即可得出有关参数, 而 PLM 法则需数星期。

4. 用有丝分裂选择法收集的有丝分裂期细胞, 其分裂指数在 90% 以上, 但为了获得更为精确的结果, 对脉冲标记后不同时间内收集的细胞的放射性, 进行有丝分裂指数修正是有意义的。

参 考 文 献

- [1] Howard, A. et al.: *Heredity*, Suppl. 6, 261, 1953.
- [2] Quastler, H. et al.: *Exp. Cell Res.*, 17, 420, 1959.
- [3] Takahashi, M. et al.: *Cell tissue kinetic*, 4, 505, 1971.
- [4] Mendelsohn, M. L. et al.: *The Cell Cycle and Cancer* (ed by R. Baserga), Chap III, Dekker, New York, 1971.
- [5] Barranco, S. C. et al.: *Cell tissue kinetic*, 10, 335, 1977.
- [6] Prescott, D. M.: *Reproduction of Eukaryotic cell*, Chap IV, Academic press, 1976.
- [7] Pardee, A. R.: *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 71, 1286, 1974.
- [8] Smith, J. A. et al.: *The cell cycle* (Society for Experimental Biology Series 10, Edited by P. C. L. John), 38, 1981.
- [9] Steel, G. G.: *Growth Kinetics of tumours*, Clarendon Press, Oxford, 1977.

[本文于 1984 年 8 月 13 日]

(上接第 10 页)

- [11] Moore, L. E. et al.: *J. Memb. Biol.*, 54, 157, 1980.
- [12] 蔡体导: 生物化学与生物物理进展, 4, 9, 1984.
- [13] Colquhoun, D. et al.: *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 199, 231, 1977.
- [14] Sakmann, B. et al.: In *'Advances in pharmacology*

and therapeutics V. 1. Receptors' (Ed. J. Jacob), Pergamon Press, Oxford and New York, 81, 1978.

- [15] Anderson, C. R. et al.: *J. Physiol.*, 235, 655, 1973.

[本文于 1984 年 12 月 5 日收到]