

DOI:10.3969/j.issn.1001-4551.2014.09.002

贴壁细胞电阻抗谱等效电路模型的建立与分析*

焦 泉¹, 胥善治¹, 杨生胜², 秦晓刚², 王 鹏^{1*}

(1. 清华大学 精密仪器系, 北京 100084; 2. 兰州空间技术物理研究所
真空低温技术与物理重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要:为了在生物电特性与生化特性之间建立明确的映射关系,采用微加工技术于硅玻璃基底上研制出了叉指结构金电极阵列,组装出了能实时、连续获得细胞电阻抗谱的测量装置。将子宫颈癌细胞接种于测量装置中,细胞在电极上进行正常贴附生长,使用Parstat4000连接测量装置获得了不同时刻频率范围为1 Hz~1 MHz的细胞电阻抗谱数据;在已有细胞电阻抗谱等效电路模型基础上,根据实际测量阻抗谱数据,结合细胞生理过程电特性,提出了修正细胞阻抗模型。研究结果表明,该修正模型用于拟合阻抗数据的方差比原模型小,同时修正模型包含参数按变化趋势分作两组,分别反映细胞贴附生长过程中溶液特性的变化和细胞本身的变化,最终建立了细胞阻抗数据与细胞生理变化之间的定性关系。

关键词:叉指电极;细胞电阻抗谱;等效电路模型

中图分类号:TH7;Q26

文献标志码:A

文章编号:1001-4551(2014)09-1107-05

Establishment and analysis of the equivalent circuit model of the electrical impedance of adherent cells

JIAO Quan¹, XU Shan-zhi¹, YANG Sheng-sheng², QIN Xiao-gang², WANG Peng¹

(1. Department of Precision Instruments, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Lab of Vacuum Low Temperature Technology and Physics, Lanzhou Institute of Physics, Lanzhou 730000, China)

Abstract: In order to establish a clear relationship between the biological electrical characteristics and biochemical characteristics, an interdigitated gold electrode was designed and manufactured on a silica glass substrate by using micro-processing technology. Based on this substrate, a cell electrical measurement device that can measure continuous impedance spectroscopy in real-time was then fabricated. Cervical cancer cell was planted and then growing on the measurement cell. Impedance spectroscopy of the cell was then measured with Parstat4000, with frequency varying from 1 Hz to 1 MHz. Based on existed equivalent circuit model, a corrected model of interdigital electrodes was proposed. The result indicates that the variance of the corrected model is smaller than the original model. The parameters of corrected model can be divided into two sets which reflect the change of character of the solution and the cells while the cells were growing. Finally, a qualitative relationship between the impedance data and cell physiological change was build.

Key words: interdigitated electrodes; electric cell-substrate impedance; equivalent circuit model

0 引 言

细胞贴附是细胞生长、迁移、细胞间连接形成、代

谢、分裂、分化和凋亡等组织或肿瘤形成过程的初始步骤。基于生物方法的检测,如采用标记,都是基于终点的检测,并且会对细胞产生一定影响。细胞电生理研

收稿日期:2014-03-10

基金项目:国家重大科学信息仪器设备开发专项项目(20111847594)

作者简介:焦 泉(1990-),女,江西吉安人,主要从事细胞电阻抗谱方面的研究。E-mail:pomelobjiao@sina.cn

通信联系人:王 鹏,男,副教授,硕士生导师。E-mail:peng@mail.tsinghua.edu.cn

究采用电学方法研究细胞的生理状态的改变,其中很重要的一种方法是细胞电阻抗传感,它在药物筛选和临床诊断方面有很大作用。

细胞电阻抗传感检测 (electric cell-substrate impedance sensing, ECIS) 最早是由 Giaever 和 Keese 两个人^[1]在 1984 年提出,细胞在金电极上贴附生长会改变电极溶液的整体阻抗,他们使用细胞电阻抗来监测细胞在金电极上的繁殖和形态变化,这种方法的特点是实时、非侵入式和无标记性。Giaever 和 Keese 所使用的测量电极形式是一个小面积 ($3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$) 的工作电极与一个大面积 (2 cm^2) 的参比电极,测量 4 kHz 频率下阻抗随时间的变化,并建立相应的分析模型^[2-3]。采用小面积测量电极进行检测,由于电极面积很小,细胞不容易分布均匀,且每次测量位置不同会对结果产生很大影响,导致实验的重复性较差。而后在 1997 年 Ehert^[4]首次全面报道了叉指电极 (IDE) 检测细胞行为的研究,相比于小面积的单点电极,叉指电极的覆盖面积大,实验重复性好,多用于细胞毒理的研究。在细胞阻抗的研究中,大多使用单频点下的阻抗随时间的变化来反应细胞的生长变化,其中就涉及到频率点的选取问题,频率点的选取,最开始 Giaever 对于频率点的选择原因没有做出说明,不同频率点的选择对于结果会有影响,其后的研究中,所采用频率点选择方法通常是先测量一个宽频率 (通常 1 Hz ~ 1 MHz) 下的无细胞溶液电阻抗谱与有细胞溶液电阻抗谱,选取细胞有无状态下阻抗幅值差值最大所在的频率点,测量该频率点下细胞阻抗值随时间的变化来评定细胞生长状态^[5]。这种方法简化了测量过程,对于药物检测也有实际的作用。

在本研究开展的工作中,笔者所采用的电极形式是叉指电极,实验所测量数据是细胞溶液的电阻抗谱,由此建立细胞溶液的等效电路模型,分析模型参数随时间的变化情况,给出细胞贴附生长生理变化与等效模型参数变化之间的对应关系,相对于单频点的测量,本研究所使用的方法能够给出关于细胞贴附生长更加全面的生理信息。

1 理论分析

使用电极测量细胞阻抗,首先分析无细胞存在时电极与溶液之间的阻抗。按照电化学理论的解释,溶液电化学反应包含两个过程,一个是离子从溶液扩散在电极界面,这是传质过程;然后离子在电极上发生反应,这是活化过程。整个电化学反应模型可以用经典 Randles 电路表示,等效电路模型如图 1 所示。

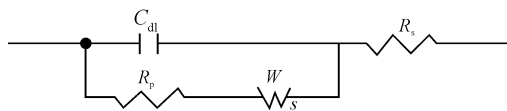


图 1 Randles 等效电路模型

C_{dl} —电极溶液界面电容,取决于界面附近的所有物质,包括可溶解的分子、离子等等; R_s —溶液的电阻,和溶液本身导电特性相关; R_p —极化电阻,反映活化过程的特征; W —Warburg 阻抗,反应传质过程的特征

R_p 和 W 一起成为法拉第阻抗,包含的是电化学反应过程的阻抗。该电路中, R_s 和 C_{dl} 近似于是理想的电路元件,而 R_p 和 W 阻抗并非理想的元件,它们与测试频率之间还有一定的关系。

上述基础等效电路分析的是典型的电化学反应过程,该过程中电极与溶液会发生氧化还原反应,而在生物实验中,由于使用的金电极是惰性电极,电极上基本上不发生氧化还原反应,即法拉第阻抗很大。

McAdams^[6]等人的研究表明,等效电路可以简化为如图 2 所示的等效电路模型。

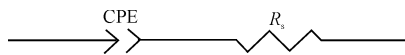


图 2 简化后电极溶液界面等效电路模型

根据图 2 的等效模型可知,即电极溶液界面的阻抗等效为一个常相角元件 CPE,它的阻抗表达式为:

$$Z_{CPE} = \frac{K}{(j\omega)^\beta}$$

式中: K —与溶液特性相关的参数,包括溶液浓度、溶液体积等因素; β —与电极属性相关的参数,包括电极的材料、电极表面粗糙度等。

生物细胞由细胞膜包裹细胞液组成,细胞液含有离子,导电性较好,而细胞膜是磷脂双分子结构,磷脂双分子层导电性很差,上面分布着各种类型的通道,水分子与离子只能通过相应的特殊通道进出细胞,这导致细胞膜的导电性很差。而由于水化作用的存在会使得细胞膜表面形成双电层,整体细胞带有一定量的静电荷,最终使得细胞整体容抗很大、电导很小^[7]。文献^[7]表明细胞整体电容率达到 $0.5 \mu\text{F}/\text{cm} \sim 1.3 \mu\text{F}/\text{cm}$,电导率达到 $10^2 \Omega \cdot \text{cm}^2 \sim 10^5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 。宫颈癌 Hela 细胞具有贴壁特性,它在培养液中需先贴附到培养器皿的底部器壁上,而后才能进行正常生长繁殖。细胞接入培养皿初始时分,细胞悬浮于溶液中,整体呈球状,然后开始贴附过程,细胞与容器底部发生物理接触,整体舒展,贴附完成后,细胞整体呈梭形附着在容器底部,此时细胞膜与电极之间的间距达到 $10 \text{ nm} \sim 20 \text{ nm}$ 。按照此前的研究结果,细胞对电极

的贴附会改变电极流出电流的通路,Giaever 和 Keese 建立了一个基于电流流向分布的数学解析模型,该模型参数能够实时表征细胞生长状态的变化。

其后,Wengener 利用等效电路对实验数据进行了分析^[8],Cho 将 CPE 模型用于表征细胞膜阻抗^[9],胡朝颖等^[10]提出的等效分析电路如图 3 所示。对比经典 Randles 等效电路模型,图 3(a)所示模型增加了细胞电极间隙的阻抗以及细胞本身的阻抗;图 3(b)所示模型将间隙阻抗与细胞阻抗统一简化成为一个整体,用于表征由于细胞存在对模型整体带来的影响。

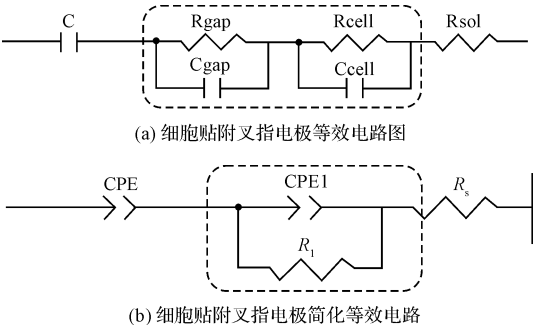


图 3 细胞贴附前后等效电路图

综合上述分析,得到的细胞贴附等效电路模型如图 4 所示。

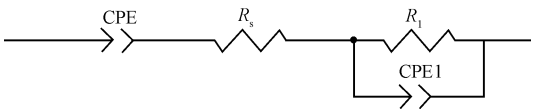


图 4 细胞贴附叉指电极等效电路

2 材料与方法

2.1 细胞阻抗测量装置的研制

细胞阻抗测量装置主要感应部分是叉指金电极,电极的外观结构图如图 5 所示。其中,电极整体外观如图 5(a)所示。图 5(a)中,一块电极上面有 4 个感应电极,组成四通道传感器。单通道电极的形状和主要结构参数如图5(b)所示。主要的参数有两个,分别是叉指电极的宽度 D 和电极间距 W ,实验所用的电极芯片参数为: $D = 20\ \mu\text{m}$, $W = 100\ \mu\text{m}$ 。电极采用微电子加工技术获

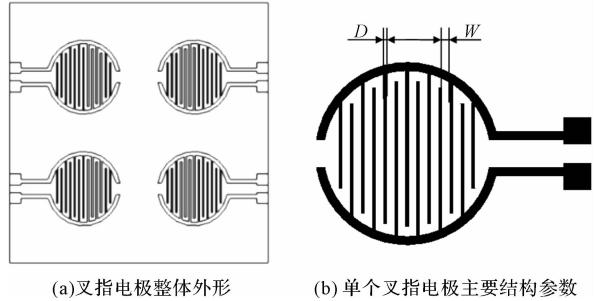


图 5 叉指电极外观结构

得,在硅玻璃基底上加工出 $20\ \mu\text{m}$ 厚度的钛和 $200\ \mu\text{m}$ 厚度的金,钛的存在是为了增大金和硅玻璃之间的附着。

为了实时培养细胞和施加电信号,需要增加培养结构和电路连接结构,制备完整的细胞培养腔。细胞培养整体结构构成如图 6 所示。

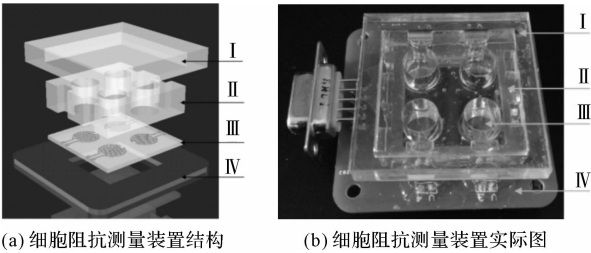


图 6 细胞培养整体结构

I—保护罩;II—细胞样品腔;III—叉指电极芯片;IV—PCB 电路板

2.2 细胞阻抗谱测试系统

细胞阻抗谱测试系统构成图如图 7 所示。细胞测量装置整体置于培养箱中,来对细胞进行实时地培养和测量。传感器芯片通过杜邦线与电化学工作站 (Parstat 4000) 相连,在计算机界面上对 Parstat 4000 进行控制,使得 Parstat 4000 施加幅值为 $20\ \text{mV}$,频率为 $1\ \text{Hz} \sim 1\ \text{MHz}$ 的交流电压给测量装置,响应信号被 Parstat 4000 采集后,经过处理,最后得到阻抗谱数据。

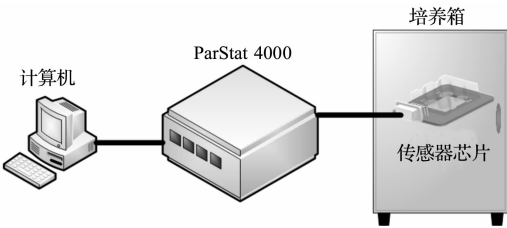


图 7 细胞阻抗谱测试系统

2.2 Hel a 细胞培养与测量

实验所采用的的细胞是 Hel a 细胞,将 Hel a 细胞接种于含有 10% 的胎牛血清的 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium) 溶液中。整体测量装置置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,连续培养 10 h,每隔一小时测量一次阻抗谱。在放入培养箱 1 h 时与 10 h 时这两个时刻对细胞进行显微拍照。

3 结果与讨论

3.1 细胞生长状态

本研究选取 Hel a 细胞为实验材料。因 Hel a 细胞对表面要求不高,无需做表面处理即可良好贴附生长,

接种细胞 1 h 时与接种 10 h 时显微镜下观察到的细胞形态如图 8 所示。由图可知,接入细胞 1 h 时,细胞多悬浮在电极表面,呈圆形颗粒状;而在接入细胞 10 h 时,细胞已经在电极表面贴附,并且伸展开呈单层生长状态,细胞呈梭形状态。从细胞分布来看,电极区域与非电极区域并无明显分布差异。

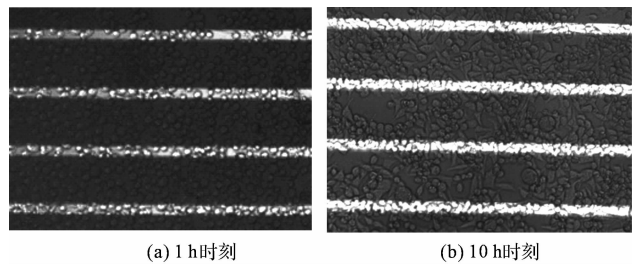


图 8 Hela 细胞加入芯片后显微镜下观察到的细胞形态

3.2 模型参数分析

本研究测量 0 h ~ 10 h 的阻抗谱。每隔 1 h 测量一次,总共得到 11 组数据。笔者使用图 4 所示等效电路对第一组数据进行非线性最小二乘拟合,在高频区段,实际测量相角出现负值,而图 4 等效电路不会出现该种状况。

考虑实验系统线路会带入感抗因素,故对模型进行修正,增加分布电感 L 。修正后的电路模型如图 9 所示。

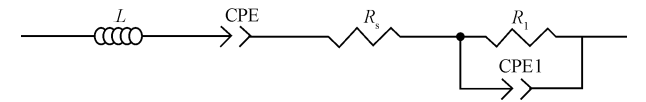


图 9 修正后的细胞溶液阻抗谱等效电路图

针对修正前后的等效电路模型,本研究对 0 h 时的阻抗谱数据进行拟合,两次拟合结果的比较情况如表 1 所示。对比结果可知,修正模型的拟合结果标准差远小于原模型,拟合效果更优,即选用修正模型能够更好地拟合实验数据。

表 1 初始模型与修正模型拟合结果参数对比

电路模型	图 4 模型	修正模型
L		6.06×10^{-7}
R_s/Ω	32.62	31.84
K	7.30×10^{-7}	7.30×10^{-7}
β	0.95	0.95
R_1/Ω	44	48
K_1	8.60×10^{-7}	1.80×10^{-6}
β_1	0.91	0.84
拟合标准差	0.249 6	0.076 9

本文引用格式:

焦 泉,胥善治,杨生胜,等. 贴壁细胞电阻抗谱等效电路模型的建立与分析[J]. 机电工程,2014,31(9):1107-1110,1121.

JIAO Quan, XV Shan-zhi, YANG Sheng-sheng, et al. Establishment and analysis of the equivalent circuit model of the electrical impedance of adherent cells [J]. Journal of Mechanical & Electrical Engineering, 2014,31(9):1107-1110,1121.

本研究使用修正模型对测量的 11 组数据进行拟合,得到不同时刻的 7 个模型参数,以 10 h 时的参数为标准参数,将 0 h ~ 10 h 的模型参数与之相除,得到标准化的模型参数,绘制标准化模型参数与时间的关系,如图 10 所示。

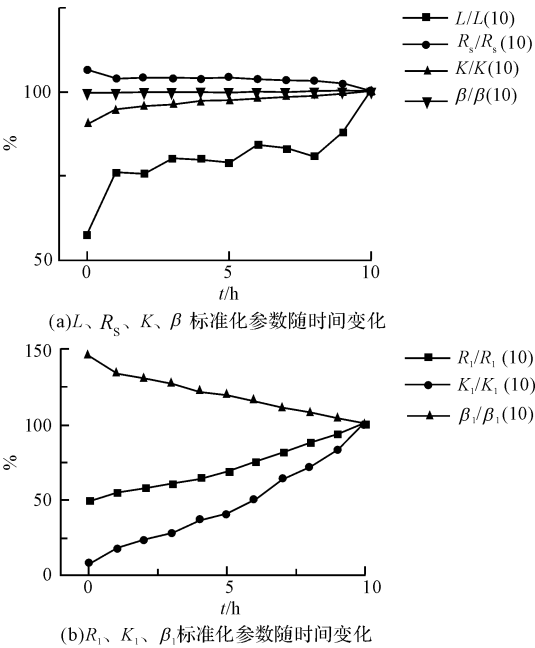


图 10 阻抗谱等效电路模型标准化参数的变化

整体上将参数分为两组:第一组参数反映电极和溶液的固有性质,包含 L 、 R_s 、 K 、 β ;第二组参数反映细胞带来的影响,包含 R_1 、 K_1 和 β_1 。

第一组参数中,参数变化分成两种。参数 L 开始变化很大,可能是由于培养温度变化引起,其后 7 h 保持平稳,最后 2 h 上升可能是线路抖动产生。另外 3 个参数 R_s 、 K 、 β 全过程变化不超过 5%,这 3 个参数反映的是溶液电极固有性质,在实验过程中,电极本身没有变化,细胞生长消耗了培养液中的营养物质,而细胞内外离子浓度保持平衡,培养液的电特性不变,所以这几个参数变化不大。

第二组参数 R_1 、 K_1 、 β_1 变化明显。如图 10 所示,3 个参数随时间是一个线性变化过程,因此可以用 3 个参数的变化来反应细胞的生长贴附状况。因细胞本身相当于一个容性元件,溶液相当于阻性元件,故 R_1 反应的是细胞与电极之间溶液的变化,电流流向与电极表面平行,由于贴附,导致间隙溶液的横截面减小,电

(下转第 1121 页)

研究给出了闪蒸塔顶端振动能量减少率与 TMD 最大相对位移的等值线图,可以通过协调二者的关系来解决空间有限的难题。

参考文献 (References) :

[1] 王肇民. 高耸结构振动控制[M]. 上海:同济大学出版社, 1997.

[2] 冯甦,金江. 高耸钢塔结构的脉动风荷载模拟及结构风振响应分析[J]. 南通大学学报(自然科学版),2007,6(1):67-71.

[3] 朱晓辉. MR 阻尼器用于电视塔结构风振控制的研究[D]. 湖北:武汉理工大学土木工程与建筑学院,2004.

[4] 呼学军,葛建平. 某高耸结构 TMD 风振控制研究[J]. 山西建筑,2007,33(32):81-82.

[5] 何建宇,赵文波,王建. 浮顶罐密封不严的原因分析

[J]. 硅谷时代,2009(11):4.

[6] 罗仁. 多高层建筑钢结构抗侧力体系综述[J]. 钢结构, 2001,16(3):47-50.

[7] 金林,应祖光,罗银森. 斜拉索的不稳定振动及控制[J]. 噪声与振动控制,2004,24(5):5-7.

[8] 秦丽,闫维明,呼学军,等. 河南艺术中心标志塔 TMD 地震控制[J]. 北京工业大学学报,2009,35(6):761-768.

[9] 向敢,翁泽宇,王辉,等. 基础柔性对深筏隔振系统振动特性的影响[J]. 轻工机械,2013,31(5):30-33.

[10] DAVENPORT A G. The spectrum of horizontal gustiness near the ground in high winds[J]. **Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society**,1961,87(372):194-211.

[11] 白泉,朱浮声,康玉梅. 风速时程数值模拟研究[J]. 辽宁科技学院学报,2006,8(1):1-3.

[编辑:张豪]

本文引用格式:

胡朋,何立东,郝伟,等. 高耸闪蒸塔调谐质量阻尼减振技术的数值分析[J]. 机电工程,2014,31(9):1117-1121.

HU Peng, HE Li-dong, HAO Wei, et al. Numerical simulation on vibration reduction of high-rise flashing column implemented with the tuned mass damper [J]. *Journal of Mechanical & Electrical Engineering*, 2014,31(9):1117-1121.

《机电工程》杂志: <http://www.meem.com.cn>

(上接第 1110 页)

阻增大。细胞贴附过程,细胞本身形状变扁,类比于平板电容,电容值与面积成正比,与电极间距成反比,由于细胞变扁,细胞附着在电极上的膜与未附着的膜之间距离变小,而面积变大,最终 K_1 值增大, β_1 减小。

4 结束语

本研究组装出了能实时、连续获得细胞电阻抗谱的测量装置。

实际 HeLa 细胞实验结果表明,细胞阻抗测量装置能够对细胞贴附进行实时监测,为细胞电生理如细胞活性检测盒药物筛选等提供了一种无损、快速的方案。同时,针对实验中获得的阻抗谱数据,笔者使用等效电路对其分析,提出修正等效电路模型,用于分析细胞贴附过程生理改变。相较于单频点阻抗变化,该方法提供了更全面的细胞生理信息。

参考文献 (References) :

[1] GIAEVER I, KEESE C R. Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,1984,81(12):3761-3764.

[2] GIAEVER I, KEESE C R. Micromotion of mammalian cells measured electrically[J]. **Proceedings of the National A-**

cademy of Sciences,1991,88(17):7896-7900.

[3] GIAEVER I, KEESE C R. A morphological biosensor for mammalian cells[J]. **Nature**,1993,366(6455):591-592.

[4] EHRET R, BAUMANN W, BRISCHWEIN M. Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures[J]. **Biosensors and Bioelectronics**,1997,12(1):29-41.

[5] WANG L, WANG H, WANG L. Analysis of the sensitivity and frequency characteristics of coplanar electrical cell - substrate impedance sensors[J]. **Biosensors and Bioelectronics**,2008,24(1):14-21.

[6] MCADAMS E T, LACKERMEIER A, MCLAUGHLIN J A. The linear and non-linear electrical properties of the electrode-electrolyte interface[J]. **Biosensors and Bioelectronics**,1995,10(1):67-74.

[7] PETHIG R. Dielectric and electronic properties of biological materials[M]. John Willey & Sons, New York,1979.

[8] WEGENER J, SIEBER M, GALLA H J. Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces[J]. **Journal of biochemical and biophysical methods**,1996,32(3):151-170.

[9] CHO S, THIELECKE H. Electrical characterization of human mesenchymal stem cell growth on microelectrode[J]. **Microelectronic Engineering**,2008,85(5):1272-1274.

[10] QINGJUN LIU, PING WANG. Cell-based biosensors: principles and applications[M]. Artech House,2009.

[编辑:罗向阳]