



基于生物阻抗谱的生物细胞活性 免标记检测方法*

徐恺杰¹⁾ 叶霞^{1)**} 丁力¹⁾ 胡松佩²⁾ 姚佳烽²⁾⁽¹⁾ 江苏理工学院机械工程学院, 常州 213001; ⁽²⁾ 南京航空航天大学机电学院, 南京 210016)

摘要 目的 基于生物阻抗谱 (bioelectrical impedance spectroscopy, BIS) 技术, 提出一种免标记的生物细胞活性实时检测方法。该方法依据不同浓度、生理、病理状态下细胞组织的电学特性差异来判断细胞是否具有活性, 以协助医师在临床手术中快速精准定位患者烫伤组织并实现有效切除。**方法** 使用具有活性的斑马鱼胚胎干细胞来模拟人体烫伤组织, 采用生物阻抗谱技术来鉴别细胞组织的生理状态。**结果** 在不同状态下, 细胞的阻抗幅值变化有显著的差异, 可以从中发现同等浓度下活性细胞的阻抗幅值比死亡细胞平均高出 17.25%, 活性细胞发生弛豫频率的时间也比死亡细胞早 25%。**结论** 实验数据表明, 生物阻抗谱法能有效区分胚胎干细胞的两类生理状态; 从聚类区域中可以看出, BIS 检测法具有明显的细胞活性及浓度区分能力, 理论上能够快速协助医师完成对患者烫伤组织检测。

关键词 细胞活性检测, 生物阻抗谱, 弛豫频率, 电学特性
中图分类号 Q41, Q25

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0561

随着现代生物医学的发展, 当前医疗检测方法已经进入细胞层面^[1]。其中, 细胞活性检测在毒理学研究^[2]、药物筛选^[3]、病理学^[4]、肿瘤放射敏感性^[5-6]等方面应用广泛。在肿瘤细胞的研究中, 为了测试药剂对肿瘤细胞和良性细胞的靶向性和破坏性, 需要时常测定恶性细胞的存活状态及良性细胞的完整度以判断其活性是否下降。在各类细胞培养过程中要随时记录细胞的生长状况, 也需要确定细胞的存活率。研究如何检测细胞活性在生命科学中具有重要的研究意义及应用前景。

目前, 临床上已经有成熟的细胞活性检测方法。台盼蓝染色排除法 (trypan blue dye exclusion, TBDE)^[7] 操作简单, 可以快速有效地对活性细胞和死亡细胞进行定量, 但需要特定溶液间接观察, 且部分凋亡细胞有台盼蓝拒染现象; 流式细胞术 (flow cytometry, FCM)^[8] 具有速度快, 能同时测试多个单位等优点, 但由于细胞在前期需要荧光标记, 会在一定程度上影响细胞活性; MTT 比色分析法^[9] 能有效地避免由于人为操作而造成的实验误差, 极大提高实验结果的准确性和重现性, 但不

适用于悬浮细胞, 且测量前需要进行细胞移植和培养; 李国晓^[10] 利用标量衍射理论研究出了细胞在不同状态下的衍射指纹特征, 并以此实现区分细胞活性的方法。这些技术虽然可以有效地区分细胞活性, 但在实际操作中都会一定程度上影响被测细胞的活性。再者, 这些技术需要依靠经验丰富的操作人员在实验室中使用特定的试剂检测, 所以具有一定的局限性。为了进一步优化细胞活性在医学检测方面的应用, 医学上亟需一种高效、免标记且适用于一般环境下的全新实时检测方法。

生物阻抗谱 (bioelectrical impedance spectroscopy, BIS) 技术是对生物组织注入安全、多频、复阻抗的激励电流, 以此为基础来检测生理参数的技术^[11-12]。此技术是利用多对电极向被测组

* 国家自然科学基金 (12272153, 52005231, 11872026), 科技部国家重点研发计划 (2022YFC2404800), 江苏省研究生实践创新计划 (SJCX22_1482), 常州市科技支撑计划 (社会发展) (CE20215050) 和江苏高校“青蓝工程”项目资助。

** 通讯联系人。

Tel: 13915052185, E-mail: yx_laser@163.com

收稿日期: 2022-12-09, 接受日期: 2023-03-09

胞加以微小幅值的正弦电压或电流, 以扫频的方式从低频到高频来采集生物组织在各个频率分量下的阻抗信息, 再通过提取其中有效响应信号定性分析生物组织内部的电学特性。由于介电测量具有非入侵的原位测量特点, 并且生物体系服从介电增量和生物量之间存在相关性原理, 从而可以获得诸如细胞量的变化、细胞膜的状态等丰富的生理化学信息。姚佳烽等^[13]采用数值仿真的方法对单细胞进行电学特性与其结构之间的关系进行了研究, 根据细胞的生理特征建立了不同种类的细胞电学模型。尹鸿润等^[14]提出一种检测生物组织的成像方法, 将目标区域可视化并精确判别种类。Sande等^[15]分析患者体液管理中的情况, 使用BIS辅助调整血液透析患者的净体重以改善高血压。

近几年的研究表明, BIS在检测烫伤程度方面有了新的进展。如Edwick等^[16]等使用BIS技术来评估烧伤后患者手部的水肿情况, 从医学角度评价了BIS技术作为衡量手烧伤后水肿的可靠性和有效性。其结果显示, BIS检测结果与水置换容量测定法的一致性较高, 是衡量急性手烧伤后水肿的敏感可靠指标。此外, BIS是利用生物组织的电阻抗特性来获取相对应的病理信息, 死亡细胞相较于活性细胞有诸多特性^[17], 会产生与活性细胞不同的响应信号。因此使用BIS技术可以有效地检测生物细胞中的活性和死亡部分, 从中提取出两种细胞的相异电学信息来区分细胞的状态。

局限于当前实验条件和技术手段, 本文拟引入

与人类基因相似度高达87%的斑马鱼胚胎干细胞代替人体烫伤组织, 用以研究人体细胞的介电特性^[18]。并使用便携式无线电阻抗谱检测设备对各类活性细胞悬浮液、死亡细胞悬浮液和混合细胞悬浮液进行扫频检测, 比较各类悬浮液之间的电学特性。

1 实验设备及方法

1.1 实验设备

本文使用了由斑马鱼胚胎干细胞制成的不同浓度的悬浮液作为实验对象并搭建了实验平台(图1a)。实验平台包括1台计算机、1台便携式无线电阻抗谱检测设备(PW-EIS)、1个四电极传感器及1个带有屏蔽装置的自制比色皿。

图1b为自制比色皿结构图。其底部含有两对镀金电极组成的印制电路板为测量传感器, 两两电极之间的间距为 $w_c=3\text{ mm}$, 每个电极的感测面积为 $A=1.8\text{ mm}^2$ 。比色皿长度 $d_c=10\text{ mm}$, 高度 $h_c=20\text{ mm}$, 单次测量可容纳的细胞悬浮液体积 $V=2\text{ ml}$ 。在测试中将传感器放置于含有屏蔽装置的比色皿中进行测量, 可以隔离周围环境的电磁干扰, 有效减少误差, 为降低数据采集过程中的接触阻抗, 本文选用四电极法, 并在实验前, 使用无水乙醇擦拭电极表面, 消除轻度氧化层。传感器的4个镀金电极通过4条屏蔽线连接到PW-EIS上, PW-EIS捕获探头发出的信号后, 将测量数据传输给PC机进行后续的处理。

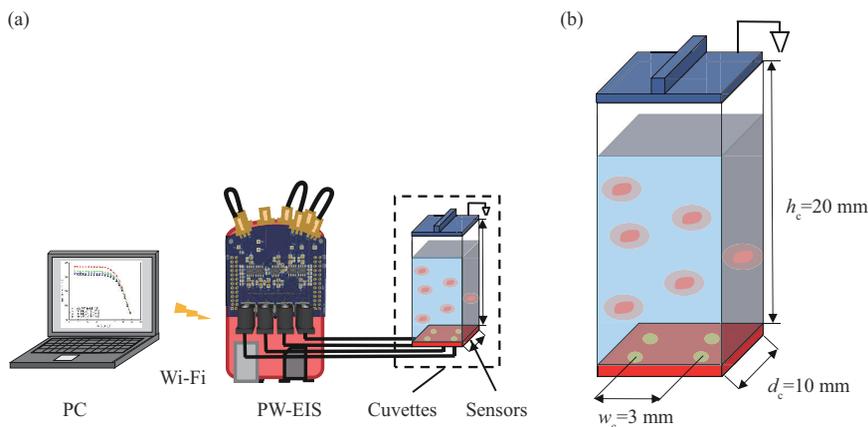


Fig. 1 Bioelectrical impedance spectroscopy instrument

(a) Schematic diagram of experimental equipment; (b) cuvette structure diagram.

图2为激励区域下胚胎干细胞在传感器中的电场和电场线分布。在COMSOL仿真模拟研究表明,最大频率为1 MHz下,电极位于底部时所产生的电场线能流经胚胎干细胞,并且完全穿透,进一步验证了数据采集的有效性和可靠性。

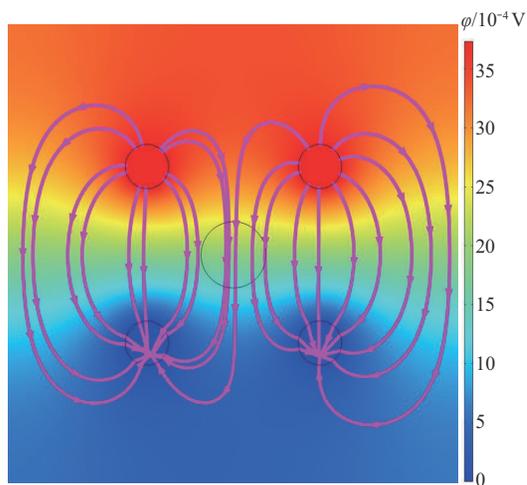


Fig. 2 Electric field and electric field line distribution of embryo tissue at positions of the sensor under excitation areas

1.2 台盼蓝染色筛选

为了在实验前判别所使用的斑马鱼胚胎是否具有活性,本文选用台盼蓝染色排除法来剔除已丧失活性的胚胎。正常活性胚胎细胞具有完整的细胞膜结构,能够排斥台盼蓝,使胚胎不被染色;死亡的胚胎其细胞膜结构被破坏、胞膜不完整、通透性增加,可使台盼蓝渗入将胚胎细胞染成蓝色。因此,借助台盼蓝染色法可以快速地区分活性胚胎细胞和死亡胚胎细胞。如图3所示,使用浓度为0.4%的

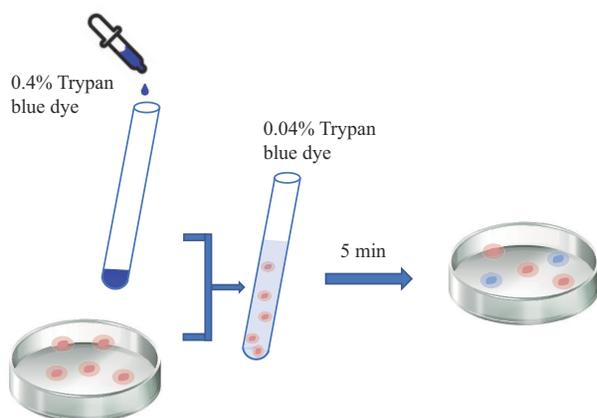


Fig. 3 Trypan blue dye exclusion

台盼蓝染色液与细胞悬浮液以1:9比例混合均匀(最终浓度为0.04%)并静置5 min。完成染色后使用滴管将胚胎取出并放置于盖玻片上使用光学显微镜(PRIMOTECH型)观察。

活性胚胎能够清晰地看到胚胎内的组织(图4)。因为活性胚胎的细胞膜完整,能够排斥台盼蓝染料,使其不进入细胞内,而丧失活性的细胞因细胞膜被破坏,不再完整则可被染成蓝色。经观察发现,所有被染色的胚胎外表都具有乳白色斑点。后续研究表明^[19],胚胎外表呈现透明状为完成受精且具有活性,外表出现白色斑点则为丧失活性或未受精胚胎。下文所使用的均为外表呈现透明且完整的活性胚胎。

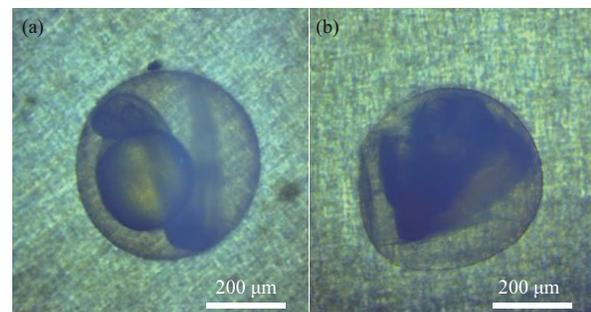


Fig. 4 Embryo images

(a) Active embryo; (b) dead embryo.

1.3 细胞悬浮液制备

为了比较活性胚胎干细胞与死亡胚胎干细胞在交流频率范围内的电学特性,参照文献[20]制备不同体积百分浓度的生物细胞悬浮液,以获得胚胎干细胞在交流频率范围内的阻抗数据。其制备过程如下:选取一批筛选后的活性斑马鱼胚胎干细胞放置于两个含有磷酸缓冲溶液(PBS)的培养皿中。选取其中一个培养皿放置于数显恒温水浴锅(HH-4J)中,经56°C水浴40 min后,可获得已完全灭活的细胞悬浮液。将制备后的细胞悬浮液放置于一旁,静置其至室温后即可用于实验测试。

1.4 实验过程

准备一个自制比色皿,使用滴管将两个培养皿中的胚胎取出,以不同比例放入比色皿中待检测,并往比色皿中加入一定量的生理盐水以保证扫频电流能完全通过所有细胞。为进一步减小电极与被测组织的接触电阻,同时减少电极与细胞组织电解液之间的极化,使用四电极法^[21]测量细胞的阻抗

谱。使用幅值为 $I=1\text{ mA}$, 扫频范围为 $1\sim 10^6\text{ Hz}$ 的交流电对细胞进行激励, 并检测其两端的电位信号。对细胞悬浮液进行扫频, 每次数据采集 3 组。本组实验完成后清洗比色皿, 再更换不同体积百分浓度的细胞悬浮液进行上述操作。对每组 3 次采集的数据取平均值, 再进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 BIS检测结果分析

图 5a, b 给出了在 $1\sim 10^6\text{ Hz}$ 频率范围下, 不同体积百分浓度下的活性胚胎干细胞悬浮液和死亡细胞悬浮液的幅值频谱。可以看出, 对于两类不同体积百分浓度的悬浮液, 其阻抗幅值的变化趋势在整体上都是一致的, 但是在相同的频点上, 其阻抗幅值大小不同。细胞悬浮液的阻抗幅值都是随着频率的增加而降低, 具有活性细胞的悬浮液其阻抗值比

灭活后的阻抗值平均高出 17.25%。从前半段趋于平稳的部分中可以看出活性细胞悬浮液的阻抗幅值相较于灭活细胞悬浮液更具波动性, 这是由于灭活胚胎细胞的细胞外膜在加热过程中受损, 进而丧失高电容性。对于 5%~20% 体积百分浓度的活性胚胎细胞悬浮液, 在 $0\sim 45.25\text{ kHz}$ 的频率范围内阻抗幅值略微下降 1.12%, 总体下降趋势趋于稳定。随着频率的增加, 当频率达到 45.25 kHz 时, 阻抗幅值大幅下降。与活性细胞悬浮液相比, 体积百分浓度为 5%~20% 的灭活细胞悬浮液频率达到 61.08 kHz 后, 才会发生阻抗幅值大幅下降的趋势。图 5c, d 为弛豫频率下细胞悬浮液的浓度-幅值拟合图; 在同一类状态下, 不同体积百分浓度对弛豫频率的产生影响很小, 且不同浓度下的阻抗值有明显的规律, 以此结论拟合函数, 可以判断两类悬浮液弛豫状态下的浓度。

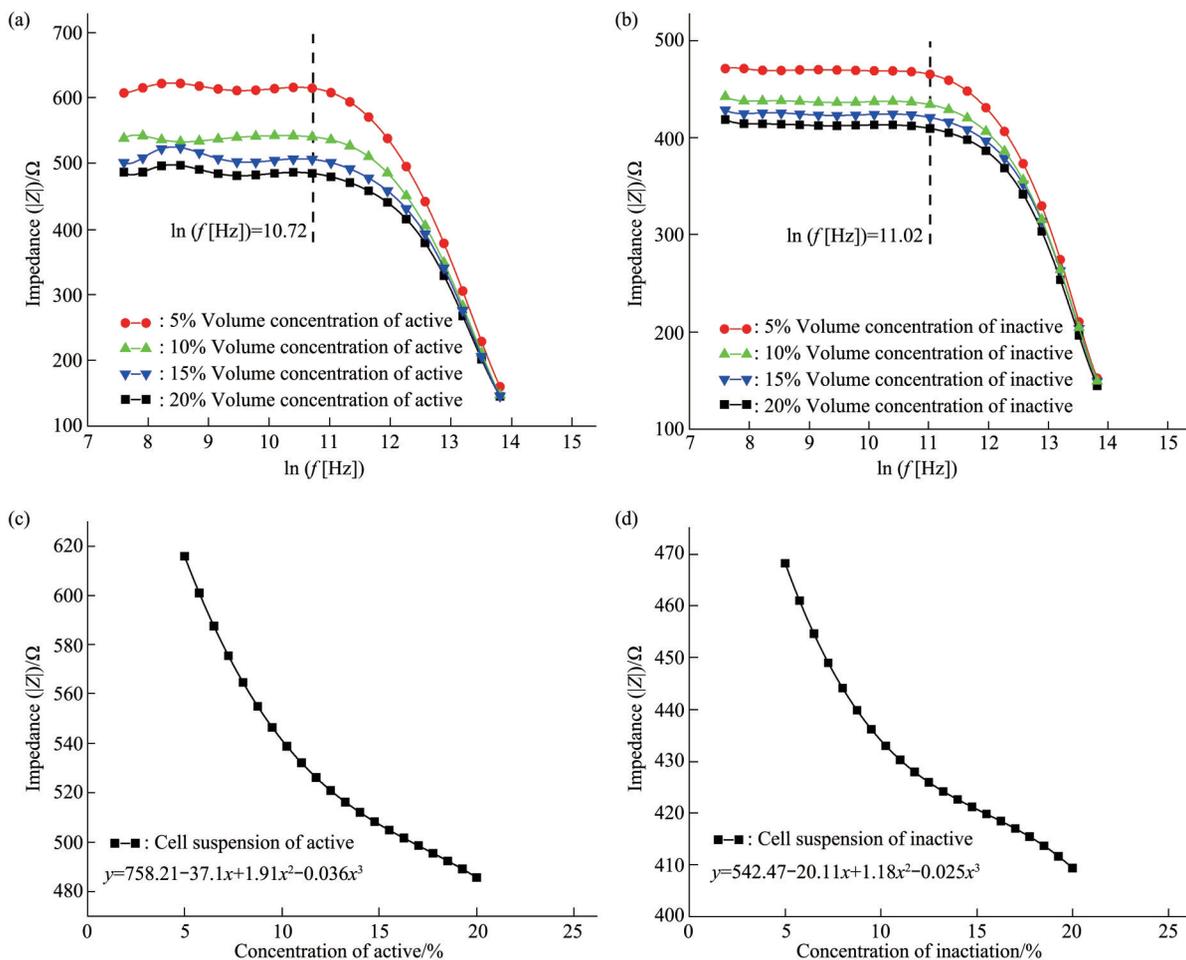


Fig. 5 Amplitude spectroscopy of suspension

随着BIS的深入研究，学者们建立了各种等效模型和电路理论来分析多频电阻抗数据。这些模型都将被测的细胞组织视为含有电阻和电容的电路。在本文中BIS的参数映射将使用科尔模型（Cole Model）其电路的数学方程如下：

$$Y = G + jB = G_{\infty} + \frac{G_0 - G_{\infty}}{1 + (\frac{jf}{f_{yc}})^{\alpha}} = \frac{1}{Z} \quad (1)$$

其中， Y 是全导纳， G 是电导， j 为虚数单位， B 是电纳。 G_0 是零驱动频率下的导纳， G_{∞} 是驱动无限大时的导纳， f_{yc} 是导纳虚部达到最大值时的频率， f_j 是驱动频率， α 是色散参数。

阻抗幅值在低频区受细胞外环境影响，高频区受细胞内结构影响。在低频段时，细胞组织中的阻抗成分中，主导成分为容抗。当施加给细胞悬浮液的外电场频率较低时，由于细胞膜的高电阻性、高容抗性，在低频时导电性差，电流难以穿过细胞，必须绕过细胞并穿过细胞外区域，此时的等效电路可视为开路，所以阻抗幅值较高；另一方面，随着频率的逐渐升高，由于胚胎干细胞膜的电容性质，高频电流能够穿透细胞膜和细胞结构中的其他电子屏障。电流穿过细胞外液，电阻抗和细胞膜容抗缓慢降低，阻抗幅值就会随之缓慢下降。当频率达到一定的幅值时，细胞会逐渐处于导通状态，此时电

流可以完全通过细胞，这时与之对应的阻抗幅值随之快速降低，阻抗幅值的变化也反应了细胞的电容性特点。同时，从图5a, b中可以明显看出，两种细胞悬浮液的浓度越高，在同频率下，其阻抗幅值越低，在0~45.25 kHz时，阻抗幅值小幅减少，直到频率达到45.25 kHz之后，阻抗幅值大幅下降。

细胞是构成生物的基本单元，单个细胞由细胞质和细胞膜及细胞液构成，并分散在组织液中，而细胞膜由低电导率的磷脂双层和蛋白质离子组成，因此细胞膜可以等效为电容。根据Hanai细胞模型可以把胚胎干细胞有效地区分为3个部分：细胞质、细胞膜、细胞壁，这3个部分造成了与频率相关的不同形式的细胞电学特性。图6为细胞悬浮液的等效电路图，对应细胞的生理结构。细胞质和溶液由蛋白质、无机盐和水组成，这些成分都具有抗性。通常将细胞膜的等效电容和细胞质的等效电阻串联起来，再与细胞外液的等效电阻并联起来，最终组合成细胞悬浮液的等效电路图。图中 R_{dl} 和 C_{dl} 分别是双电层的电阻和电容， C_m 是细胞膜的电容， R_{cy} 是细胞质的电阻， R_s 是组织液（细胞外液）的电阻。考虑到实际测量过程中，界面极化对细胞检测结果的影响，引入界面极化电阻和界面极化电容。参照细胞悬浮液的等效电路图，建立了等效电路的阻抗-频率响应函数模型：

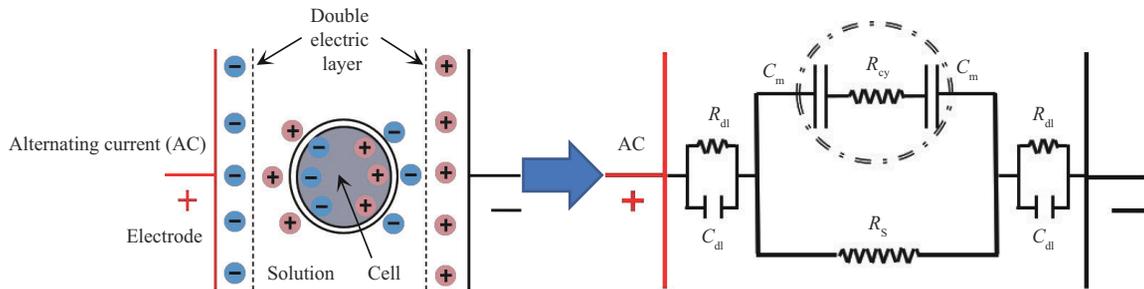


Fig. 6 Equivalent circuit diagram of suspension

$$Z(\omega) = \left(\frac{R_s R_{cy} (R_s + R_{cy}) \omega^2 C_m^2 + 4R_s}{((R_s + R_{cy}) \omega C_m)^2 + 4} + \frac{2R_{dl}}{1 + (\omega R_{dl} C_{dl})^2} \right) - j \left(\frac{2R_s^2 \omega C_m}{((R_s + R_{cy}) \omega C_m)^2 + 4} \right) + \frac{2\omega R_{dl}^2 C_{dl}}{1 + (\omega R_{dl} C_{dl})^2} \quad (2)$$

等效电路中出现的细胞膜电容和双电层电容使

得细胞悬浮液的阻抗下降趋势趋于平缓，而频率达到45 kHz后，抗幅值快速减小，这意味着此时的频率就是细胞悬浮液的弛豫频率，可以用科特模型的弛豫参数模型来表示，其数学公式如下：

$$\varepsilon^* = \varepsilon_h + \sum_n \frac{\Delta \varepsilon_n}{(1 + j\omega \tau_n)^{\beta_n}} + \frac{kK_1}{j\omega \varepsilon_0} \quad (3)$$

$$\Delta \varepsilon_n = \varepsilon_l - \varepsilon_h \quad (4)$$

$$\tau = (2\pi f_n)^{-1} \quad (5)$$

式中, ϵ_h 是介电常数的高频极限值, $\Delta\epsilon_n$ 是介电增量, ϵ_l 是介电常数的低频值, τ_n 是弛豫时间, k_l 是低频电导率, f_n 是特征频率, j 是虚数单位, ω 是外加电场的角频率, β_n 是科特参数, ϵ_0 是真空介电常数。

2.2 细胞悬浮液的特性分析

为了探究和分析在同等体积百分浓度下多种细胞活性程度是否会对悬浮液的弛豫频率和虚部阻抗值产生影响。通过实验获得了4类不同体积百分浓度的混合悬浮液在变频条件下虚部阻抗幅值的变化趋势, 并与同体积百分浓度下的纯活性和纯灭活细胞悬浮液进行对比。

从图7整体来看, 同等体积百分浓度下各个细胞悬浮液的阻抗幅值都是随着频率的增加而上升, 直到某一时刻频率达到了弛豫时间, 阻抗幅值的趋势才发生了转变, 开始下降。这是因为在同等体积百分浓度下, 纯活性悬浮液中细胞完整度高, 细胞

膜具有较高的阻抗特性。其中, 纯活性细胞悬浮液的阻抗幅值整体来看大于另外两种细胞悬浮液。如表1所列, 其弛豫频率发生的时间早于另外两类, 随着浓度的增加, 同类悬浮液之间的阻抗幅值也相继减小, 而混合浓度细胞悬浮液的阻抗幅值在3类中整体来看是最小的。另外, 从表1中可以看出, 相较于混合浓度悬浮液, 纯灭活细胞悬浮液的弛豫频率虽然先产生, 但两者弛豫频率的间隔相差很小只有4.18%~4.73%。图8为斑马鱼胚胎干细胞悬浮液、雄猪生殖细胞悬浮液、酵母菌细胞悬浮液在不同浓度时频率和虚部阻抗幅值的离散度。对于3种细胞悬浮液, 在弛豫频率下可以清楚的区分为两大类聚类区域。聚类分析表明纯活性细胞悬浮液可以与纯灭活和混合悬浮液相区分, 从而鉴别悬浮液中是否具有死亡细胞, 进一步验证BIS技术可以为医学检测细胞活性方面提供有效帮助。

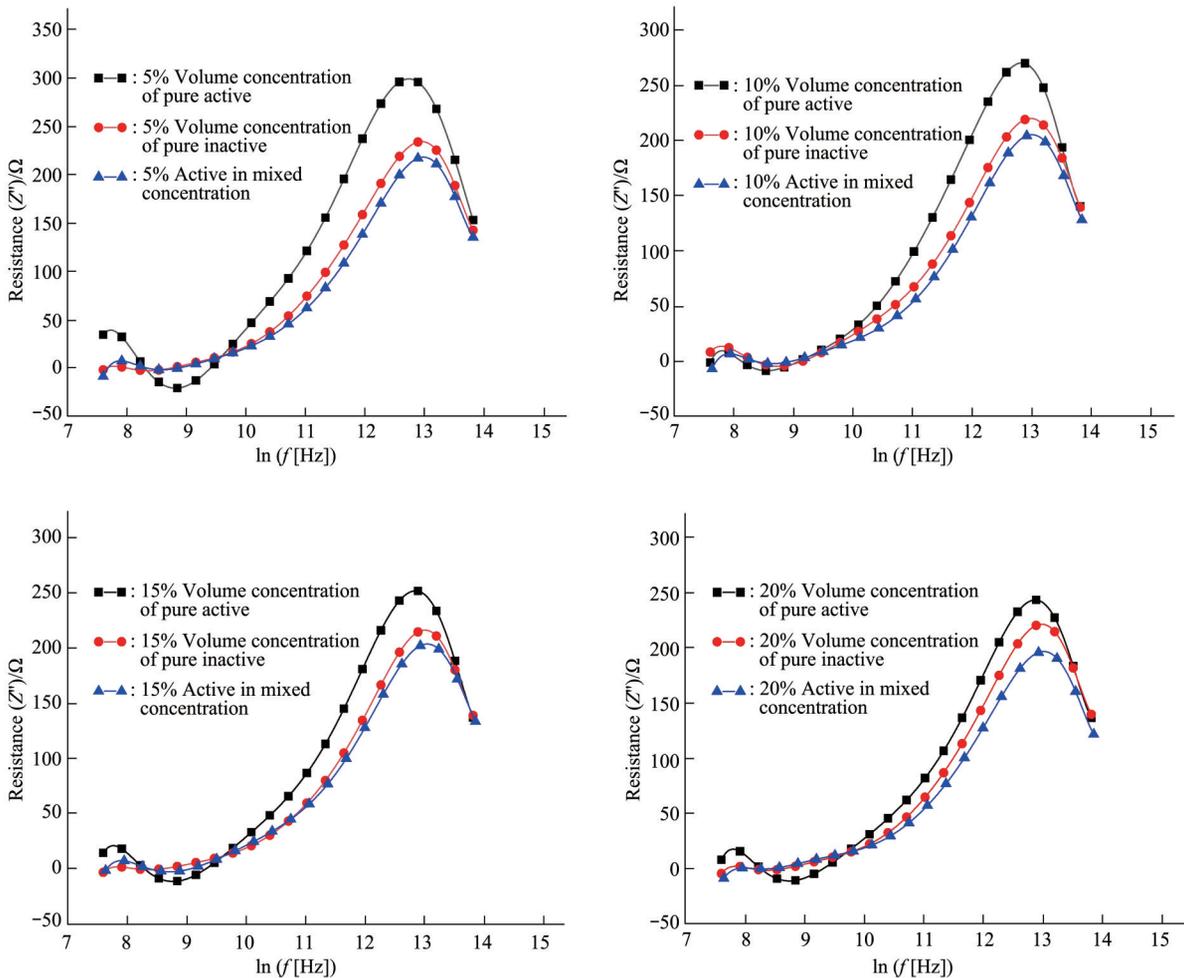


Fig. 7 Electrical impedance imaginary part of cell suspension

Table 1 Relaxation point parameters for three types of cell suspensions

Cell suspension type	Imaginary part of impedance (Z'')/ Ω			Relaxation frequency (f)/Hz		
	Pure active	Pure inactive	Mixed	Pure active	Pure inactive	Mixed
Suspension of 5% concentration	299	234	218	344 551	425 066	443 653
Suspension of 10% concentration	270	219	205	373 248	416 649	435 653
Suspension of 15% concentration	251	215	201	365 857	410 836	431 259
Suspension of 20% concentration	243	211	196	388 481	408 503	428 686

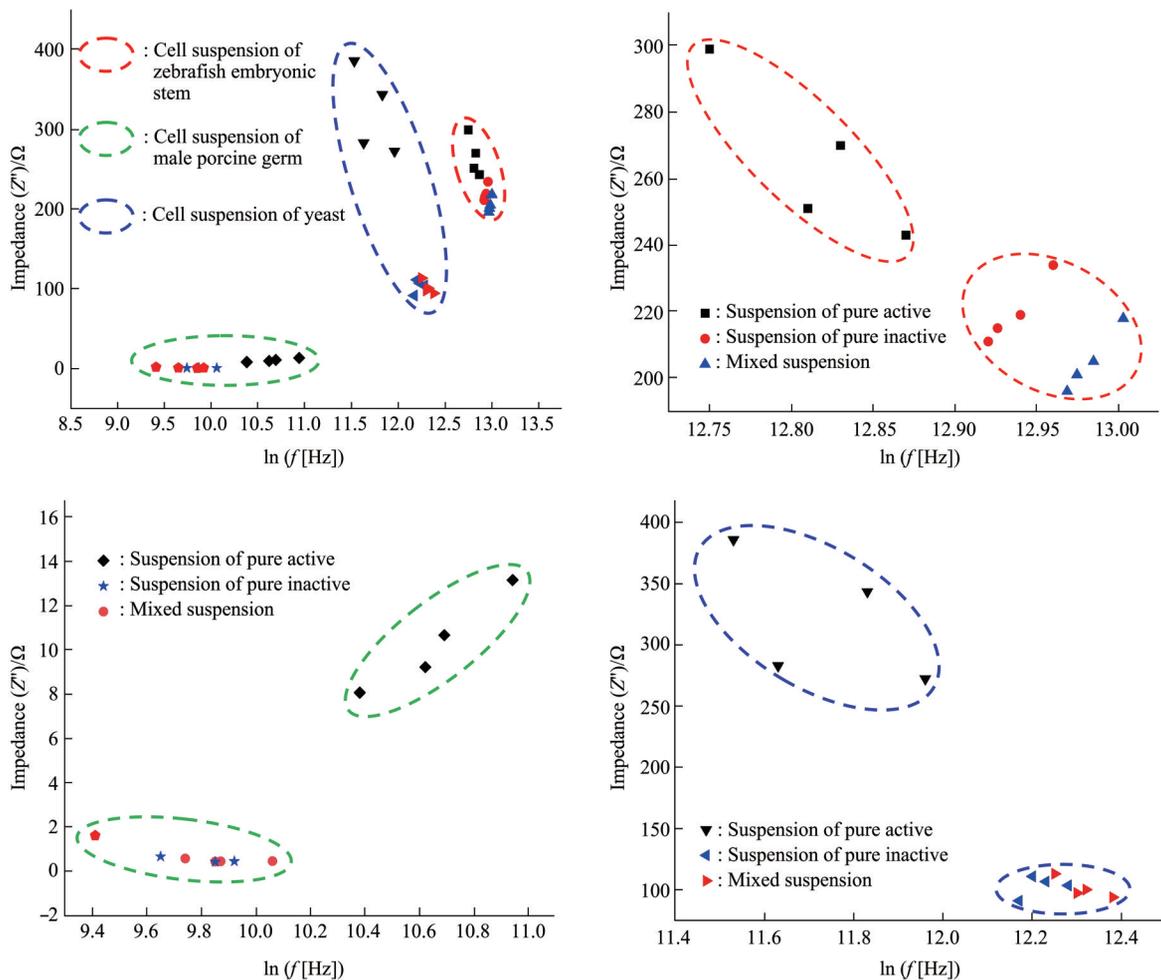


Fig. 8 Dispersion of magnitude versus phase of cell suspension

3 结 论

本文根据台盼蓝染色排除法筛选出的斑马鱼胚胎制成斑马鱼胚胎干细胞悬浮液，采用BIS方法对各类不同浓度、不同活性的干细胞悬浮液进行了电学特性研究，比较发现干细胞悬浮液的阻抗幅值在各类不同状态下有较为明显的差异。在同等浓度下，活性细胞的阻抗幅值大于死亡细胞17.25%，在频率为45.25 kHz时，活性细胞达到了弛豫，且其弛豫时间早于死亡细胞25%。

本文研究方法无需样品预处理，操作简单，可以通过PW-EIS直接进行检测。在研究了各类不同状态的细胞悬浮液，了解了细胞悬浮液在电学特性方面存在的差异后，可以通过弛豫时间、频率和阻抗，采用BIS技术来区分和辨别生物细胞组织的存活状态，并为后续研究生物细胞的准确浓度和活性奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Solary E. Tracking chronic myelomonocytic leukaemia diversity at the single cell level. *EBioMedicine*, 2020, **59**: 102935

- [2] Landovitz R J, Li S, Eron Jr J J, *et al.* Tail-phase safety, tolerability, and pharmacokinetics of long-acting injectable cabotegravir in HIV-uninfected adults: a secondary analysis of the HPTN 077 trial. *Lancet HIV*, 2020, **7**(7): 472-481
- [3] Reiff T, Eckstein H H, Mansmann U, *et al.* Carotid endarterectomy or stenting or best medical treatment alone for moderate-to-severe asymptomatic carotid artery stenosis: 5-year results of a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Neurol*, 2022, **21**(10): 877-888
- [4] Elafros M A, Andersen H, Bennett D L, *et al.* Towards prevention of diabetic peripheral neuropathy: clinical presentation, pathogenesis, and new treatments. *Lancet Neurol*, 2022, **21**(10): 922-936
- [5] 张伟, 梁智辉. Annexin V-FITC/PI 双标记与 Hoechst33342/PI 双标记流式细胞术检测细胞凋亡的比较. *细胞与分子免疫学杂志*, **2014**(11): 1209-1212
Zhang W, Liang Z C. *Chin J Cell Mol Immunol*, **2014**(11): 1209-1212
- [6] Lorentzen C L, Haanen J B, Met Ö, *et al.* Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment. *Lancet Oncol*, 2022, **23**(10): 450-458
- [7] Louis K S, Siegel A C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol*, 2011, **740**: 7-12
- [8] De Latour R P, Szer J, Weitz I C, *et al.* Pegcetacoplan versus eculizumab in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PEGASUS): 48-week follow-up of a randomised, open-label, phase 3, active-comparator, controlled trial. *Lancet Haematol*, 2022, **9**(9): 648-659
- [9] Karagoz K, Mehta G A, Khella C A, *et al.* Integrative proteogenomic analyses of human tumours identifies ADNP as a novel oncogenic mediator of cell cycle progression in high-grade serous ovarian cancer with poor prognosis. *EBioMedicine*, 2019, **50**: 191-202
- [10] 李国晓. 基于无透镜衍射成像的细胞活性检测方法及应用研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020
Li G X. *Research on Cell Viability Evaluation Method and Application Based on Lensfree Diffraction Imaging*[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020
- [11] Jaffrin M Y, Morel H. Body fluid volumes measurements by impedance: a review of bioimpedance spectroscopy (BIS) and bioimpedance analysis (BIA) methods. *Med Eng Phys*, 2008, **30**(10): 1257-1269
- [12] Wabel P, Chamney P, Moissl U, *et al.* Importance of whole-body bioimpedance spectroscopy for the management of fluid balance. *Blood Purif*, 2009, **27**(1): 75-80
- [13] 姚佳烽, 万建芬, 杨璐, 等. 基于生物阻抗谱的细胞电学特性研究. *物理学报*, 2020, **69**(16): 90-97
Yao J F, Wan J F, Yang L, *et al.* *Acta Phys Sinica*, 2020, **69**(16): 90-97
- [14] 尹鸿润, 叶明, 吴阳, 等. 基于生物阻抗谱成像的生物组织检测方法. *物理学报*, 2022, **71**(4): 367-373
Yin H R, Ye M, Wu Y, *et al.* *Acta Phys Sinica*, 2022, **71**(4): 367-373
- [15] van der Sande F M, van de Wal-Visscher E R, Stuard S, *et al.* Using bioimpedance spectroscopy to assess volume status in dialysis patients. *Blood Purif*, 2020, **49**(1-2): 178-184
- [16] Edwick D O, Hince D A, Rawlins J M, *et al.* Bioimpedance spectroscopy is a valid and reliable measure of edema following hand burn injury (part 1—method validation). *J Burn Care Res*, 2020, **41**(4): 780-787
- [17] Zuroff L, Rezk A, Shinoda K, *et al.* Immune aging in multiple sclerosis is characterized by abnormal CD4 T cell activation and increased frequencies of cytotoxic CD4 T cells with advancing age. *EBioMedicine*, 2022, **82**: 104179
- [18] 成林, 钟力生, 张跃, 等. 采用动电方法的生物细胞介电特性研究. *西安交通大学学报*, 2011, **45**(6): 85-90
Cheng L, Zhong L S, Zhang Y, *et al.* *Journal of Xi'an Jiaotong University*, 2011, **45**(6): 85-90
- [19] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 1995, **203**(3): 253-310
- [20] 宋鸿硕, 石爽, 闫玲, 等. 热和紫外线照射对丙型肝炎病毒 JFH-1 株灭活效果的研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, **2009** (5): 438-442
Song H S, Shi X, Yan L, *et al.* *Chin J Microbiol Immunol*, **2009** (5): 438-442
- [21] Bera T K. Bioelectrical impedance methods for noninvasive health monitoring: a review. *J Med Eng*, 2014, **2014**: 1-28

Biological Cell Activity Label-free Assay Based on Bioelectrical Impedance Spectroscopy*

XU Kai-Jie¹⁾, YE Xia^{1)**}, DING Li¹⁾, HU Song-Pei²⁾, YAO Jia-Feng²⁾

¹⁾College of Mechanical Engineering, Jiangsu University of Technology, Changzhou 213001, China;

²⁾College of Mechanical & Electrical Engineering, Nanjing University of Aeronautics & Astronautics, Nanjing 210016, China)

Abstract Objective Based on bioelectrical impedance spectroscopy (BIS), we propose a label-free method for real-time detection of biological cell activity. The method determines whether the cells are active or not based on the differences in electrical properties of the cells at different concentrations, physiological and pathological states. It is used to assist physicians to quickly and precisely locate the scalded tissues in patients and achieve effective excision during clinical surgery. **Methods** Active zebrafish embryonic stem cells were used to simulate human scalded tissues, and bioimpedance spectroscopy was used to identify the physiological state of the cellular tissues. **Results** There were significant differences in the impedance amplitude changes of the cells in different states, from which it could be found that the impedance amplitude of the active cells at the same concentration was on average 17.25% higher than that of the dead cells, and the relaxation frequency of the active cells occurred 25% earlier than that of the dead cells. **Conclusion** The experimental data showed that the bioimpedance spectroscopy method can effectively distinguish two types of physiological states of embryonic cells; according to the clustering region, it can be seen that the BIS assay has obvious ability to distinguish cell activity and concentration, which can quickly assist physicians to complete the detection of scalded tissues of patients theoretically.

Key words cell activity assay, bioelectrical impedance spectroscopy, relaxation frequency, electrical properties

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0561

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (12272153, 52005231, 11872026), National Key R&D Plan of the Ministry of Science and Technology (2022YFC2404800), Jiangsu University Graduate Student Research Innovation Project (SJCX22_1482), Changzhou Science and Technology Support Program (Social Development) Project (CE20215050), and Qing Lan Project of Jiangsu Universities.

** Corresponding author.

Tel: 86-13915052185, E-mail: yx_laser@163.com

Received: December 9, 2022 Accepted: March 9, 2023