

扫描介电成像技术及其在生物体系的应用*

赵孔双¹⁾

(厦门大学化学系, 固体表面物理化学国家重点实验室, 厦门 361005)

摘要 通过实例介绍了近一二年新开发的一种扫描探针显微技术——扫描介电显微镜 (SDM) 的基本原理、测量系统的构造和特点, 并扼要地展望了它在生物体系及医学上的应用潜力。

关键词 扫描介电显微镜, 介电谱, 界面极化, 生物细胞

近年来, 以扫描隧道显微镜 (STM) 为代表的显微成像技术已得到迅速发展, 并成为生物体系的重要研究手段之一^[1,2]。然而, 作为样品表面扫描的探针检测并不只限于隧道电流, 其样品和探针间的相互作用可以是范德华力、静电相互作用、电容及磁力等。这样, 改变探针又可派生出来更多的所谓扫描探针显微镜 (SPM), 事实上已有相当数量陆续登场并在生物体系的研究中扮演着越来越重要的角色。如扫描电容显微镜 (SCM), 它给出空气中的非导电和导电的物体在固定超高频下的形貌和电容^[3], 还有扫描离子电导显微镜 (SICM), 它提供了直流电场下的电解质覆盖的非导电表面的离子电流图象和形貌^[4]。

频率域介电谱研究法以其独特的非破坏诊断之优点对研究细胞体系具有很大潜力, 其中悬浊液法的介电技术已经广泛地被用于研究细胞膜电容, 胞原生质的电导率和介电常数^[5~7], 但该方法只能从细胞悬浊液的介电数据中求出细胞群体的平均电性质, 尽管对蛙和鱼蛋细胞等特殊大的单一细胞的介电测量是可能的^[8,9], 但也难以给予其表面的详细特征。1994年由Asami开发并命名为扫描介电显微镜 (scanning dielectric microscope, SDM) 的介电成像技术给这一领域带来了生机, 尤其是1996年首次对活细胞的表面成像处理, 对生物、生理以及医学专家们应是个鼓舞和刺激。SDM与SCM和SICM不同, 它可在较宽的频率范围, 给出溶液环境的胶体、囊泡以及细胞颗粒的局部介电常数和电导率 (或电容和电

导) 图像。本文将以实例阐述这种新技术的原理以及测量特点, 并介绍SDM对生物细胞体系的应用及其发展前景。

1 原 理

该技术的理论基础是Maxwell-Wagner的界面极化介电理论, 和被Hanai和Asami等发展的分散体系介电解析方法^[10,11]。这些非均匀体系如人工膜、生物膜体系和包括生物细胞在内的胶体悬浊液以及如胶团、囊泡等分子集合体系。在外交流电场作用下, 各类体系显示出特异的介电常数和电导率的频率依存性, 即介电弛豫。这种介电行为与纯物质所观测到的极性分子偶极极化不同, 是由于离子趋向并积存在不同物质的相界面, 即界面极化引起的。处于探针电极和对电极之间的由溶液或微粒/溶液构成的单相 (图1a) 或多相 (二和三相) (图1b、c) 均一的或非均匀的体系, 其介电性质可以用各组成相的相参数表示的等价电路说明。因为相界面的种类数决定其介电弛豫的个数^[10,12], 故溶液、颗粒/溶液和被覆壳颗粒/溶液的一、二和三相体系的介电模式可以图1d、e、f表示, 通过解析各介电谱可获得有关体系构造以及各组成相的介电信息^[13]。因弛豫强度和弛豫频率很强烈地依存于体系的构造和组成相的电性质, 故通过用适当的探测频率进行扫描能够区别和了解体系的不同结构。

* 福建省自然科学基金资助。

¹⁾ 现在华南师范大学化学系 (广州 510631)。

收稿日期: 1996-07-09, 修回日期: 1996-10-15

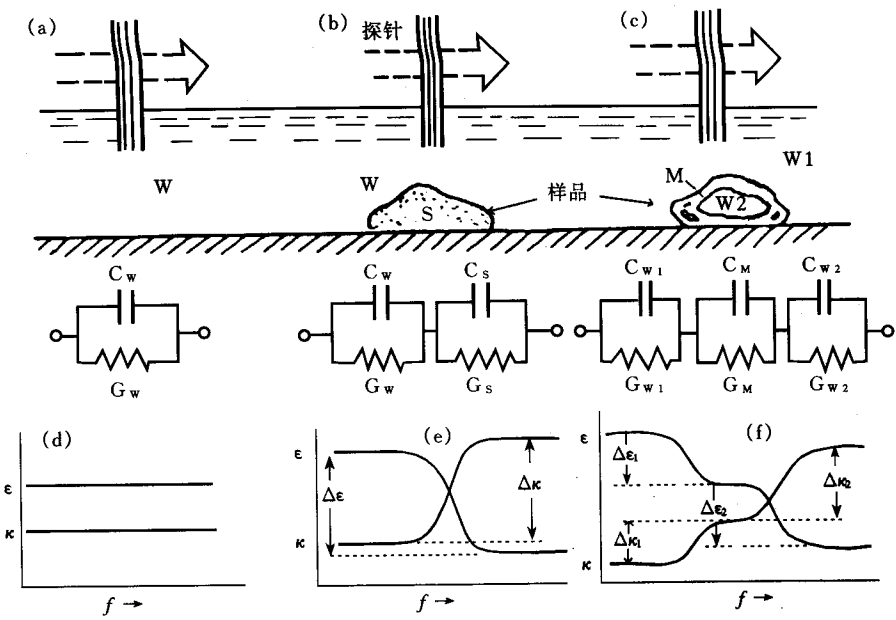


图1 探针在溶液相 (a) 和溶液与被测物体构成的多相系 (b)、(c) 上扫描以及产生的介电弛豫模式的示意图 (d)、(e) 和 (f)

2 测量系统及特征

图2给出了SDM装置的略图. 与其他扫描探针显微技术, 特别是SICM或SCM类似, 由探针电极、扫描控制微调装置、检测、图象处理以及数据输出等主要部分组成(图2a). 因颗粒的局部电容和电导十分小, 尽可能地减少误差是真实反映表面电性质的关键. 而通常介电测量时的两端子法常有如图2c所示的电力线外漏的边缘现象而影响测量精度和分辨率, 为消除边缘现象并精确测量到极小区域内, 该法采用含有内部测量电极(被保护)和外部保护电极的同轴型电极作为探针, 和对电极构成三端子电极系统^[14](图2b). 样品被置于x、y、z三维移动的储液槽底部的对电极上, 通过微调器调整z的高度, 使探针电极靠近样品. 用不同范围的阻抗分析仪联接微机进行介电测量. 扫描以三种模式: 固定频率的扫描、用扫描频率的线扫描和固定区域的频率扫描, 从不同角度描绘被测样品的电容和电导的介电图像. 其分辨率可用公式:

$\sqrt{(s+R)/|d\lg F(s)/ds|}$ 表示 (其中R是探针端的曲率半径、s是探针和样品间的距离、F(s)是控制所用信号的强度).

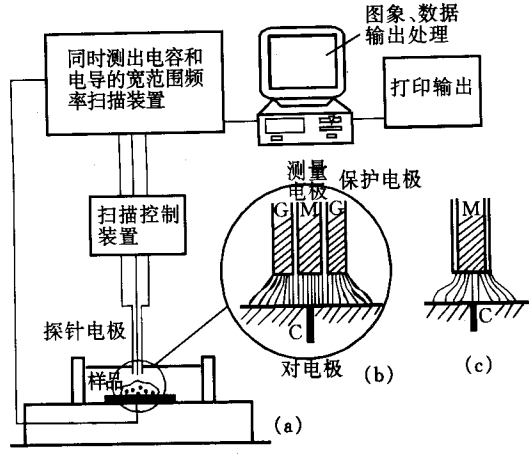


图2 测量系统示意图

(a) 为SDM装置, (b)、(c) 分别表示三、二端子的电极系统.

3 有效性的验证实例

以下给出表示SDM的分辨率和有效性的

3 个例子^[15].

3.1 蒸馏水中头发的介电成像

图 3 为一根直径为 74 μm 的头发在 1 MHz 频率的扫描结果. 介电成像和灰度尺度 (图 3a 和 b) 明显地反映了被测物的形貌和介电特征: 电容和电导的低谷处表示头发的存在, 与水相比显然有着较小的介电常数和电导率. 其灰度表示约为 80 μm 的宽度与头发直径相仿.

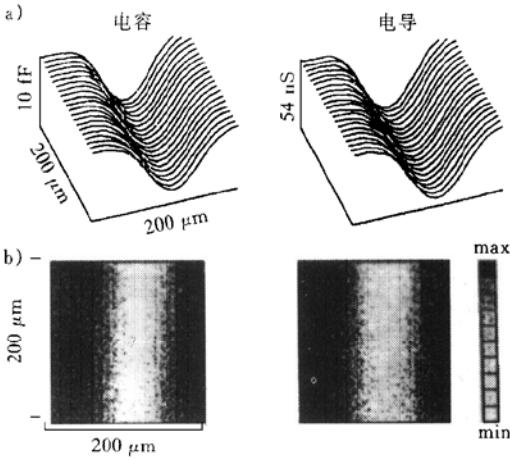


图 3 头发丝在水中的电容和电导的 (a) “显微成像”和 (b) 灰度尺度^[15]

3.2 部分涂有低导电性物质的钨丝

一根直径为 100 μm 、部分涂有低导电性环氧树脂的钨丝, 置于蒸馏水中的 SDM 的显微成像如图 4 所示. 它给出了沿钨丝的纵轴向

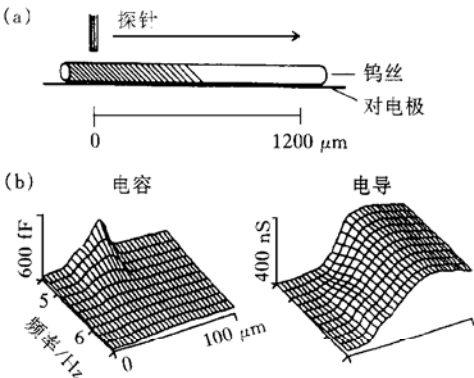


图 4 部分涂有环氧树脂的钨丝的扫描结果^[15]
(a) 斜线部分是涂层, 其厚度自左端逐渐变薄, (b) 电容及电导的频率依存性图貌.

的电导和电容的频率依存性. 未涂树脂的部分, 即金属部分无电容和电导的频率依存性, 而涂层部分显示了显著的介电弛豫. 在频率为 10 kHz 附近电容最大, 随涂层的厚度变薄而减小; 涂层部分的电导几乎为零. 这种介电弛豫可用图 1 所示意的机理模型解释为: 由于金属的强导电性, 在介电回路模型中可忽略其贡献, 这时, 扫过金属时也相当于只有溶液介质一相, 故没有介电弛豫现象 (图 1a 和 d); 而当扫过涂有绝缘性物质时, 相当于存在两相, 故显示出一个介电弛豫 (图 1b 和 e).

3.3 微胶囊/溶液体系

以聚苯己烯为材料、用二次乳化的界面聚合法制成直径为 600 μm 、壳厚约为 1~ 5 μm 的微胶囊作为生物细胞的模型, 测量其局部的介电性质. 由于胶囊内、外相水溶液的离子浓度不同, 被测体系相当图 1c 所示的三相非均匀体系, 其介电谱应有两个弛豫. 探针在胶囊上方的扫描成像如图 5 所示, 它的介电特性依

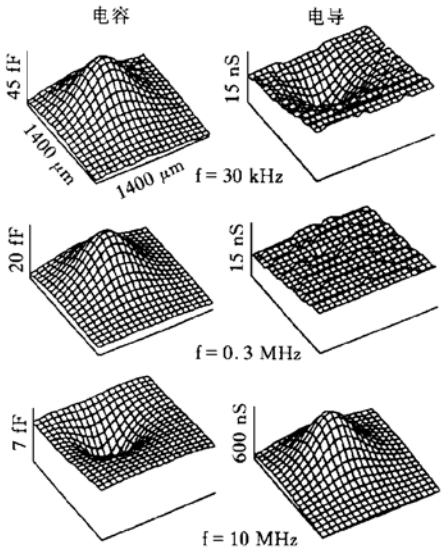


图 5 微胶囊/蒸馏水体系分别在频率为 30 KHz, 0.3 MHz 和 10 KHz 的介电扫描图象^[15]

存于所加的交流频率. 在 30 kHz 时, 呈现高的电容和低的电导, 与低电容和高电导表示的溶液相对比它反映了胶囊的存在, 最大值是胶

囊的顶部. 另一方面, 随着频率的增加, 电容减小而电导相对增加. 当探针电极扫描了整个胶囊时, 介电成像出现两次峰值, 它说明由胶囊内、外溶液相与其内、外壁形成的两种相界面的界面极化而引起介电弛豫.

尽管胶囊的壳厚度远远大于实际的细胞膜, 但结果预示一个可区别细胞种类的相当有价值的应用前景, 如内部空的人体红血球细胞、内部含有液胞的酵母细胞以及具有细胞核的淋巴球细胞等. 在广域的频率范围进行扫描, 根据不同频率段的各异的介电吸收来判断细胞的类型和构造; 又如细胞表面局部的变质会失去对离子的阻碍作用, 这样离子便不能停留在细胞的表面而产生界面极化, 其介电图象将观察到介电常数的减小.

4 活生物细胞的介电成像

Akami 首次应用 SDM 于生物体系是研究活的犬肾 MDCK (Mardin-Darby canine kidney) 细胞^[16]. 这些细胞被置于不锈纲箔上, 在培养液 0.3 mol/L 甘露糖醇介质中培养 1 d 后, 基板上形成细胞单层, 使用有效直径为 20~ 30 μm 探针电极在表面部分覆盖有细胞的箔上扫描. 细胞的局部介电常数和电导率可根据探针和对电极间的距离、探针电极的有效面积从测量的电容和电导计算得到^[15].

图 6 是 30 kHz 频率下, 对 80 $\mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$ 面积样品测量的电容和电导成像的灰度表示. 高电容区域 (相应于图 6a 中的黑色区域) 正好是低电导区域 (相应于图 6b 的白色区域), 它表示细胞的存在, 因为 MDCK 细胞单层有着特殊高的电容 (1.6~ 1.8 uF/cm^2) 和低的电导 (约 1 mS/cm^2)^[17]. 图 7 表示从中取出的一个细胞的扫描结果, 它是电容和电导被转换成不依赖于电极形貌的介电常数和电导率的图像. 在 30 kHz, 该细胞的介电常数显得凸出, 由于边缘场效应其周边略大于实际的细胞. 随着频率增加, 介电常数减小, 相反电导率变得高于介质的电导率. 这种弛豫现象可归于界面极化, 并可用建立在电路模型上的介电

理论预料和计算. 假定该细胞是由一个导电性的核 (相应胞原生质) 和外覆很薄的非导电壳层 (对应着原生质膜) 构成, 理论上细胞在低频域的介电常数和电导率依存于原生质膜的电参数, 而高频观察到的是细胞内侧近乎短路的部分. 因此, 通过改变频率可对细胞进行介电解剖. 这种方法可通过与细胞的光学微观图像的比较来证实. 为此, 一种与旋转的光学显微镜联用的新型 SDM (具有透明电极) 正在开发中.

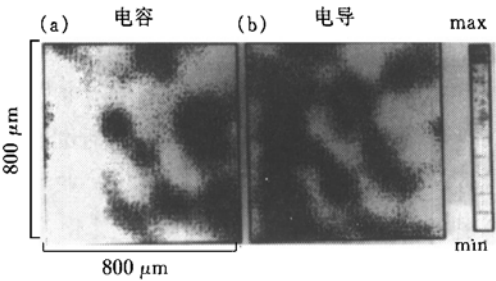


图 6 探针频率为 30 KHz 下的 MDCK 细胞的局部电容和电导显微成像的灰度尺度表示^[16]

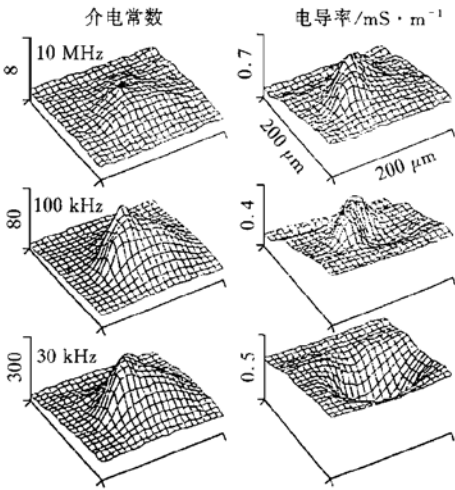


图 7 不同频率下对一个 MDCK 细胞的介电扫描图象^[16]

5 评价与发展前景

本文介绍的 SDM 的分辨率虽还只是几十微米, 但因分辨率是探针有效面积、探针定位

的精度和阻抗分析仪的灵敏度的函数, 其改良可通过用微细石板制备精细探针电极、提高电压变换器的敏感度和使用更高精度的频率扫描介电分析仪来完成. 处于开发阶段的 SDM 由于以下两个原因只限于应用在低离子浓度的溶液介质中: 一是高导电性的介质, 三端子测量法效果下降; 二是产生于电极和电解质界面的双电层引起的电极极化, 将引起低频段的测量误差. 由实例可见, 在千赫兹频率以下的较低频率段, 可较精确扫描数毫摩尔浓度的电解质溶液体系.

生物细胞由于其钝态的电性质, 大都有明显的介电响应^[5], SDM 这种新的介电图像化技术, 提供了在水溶液环境中研究活细胞的各种性质, 了解诸如细胞生长、分化、收缩等多种细胞过程, 监测细胞生存率的变化变化的新方法. 它有助于判别如细胞及脂质集合体的融合、重组所形成的多样构造; 观察胶团以及超细颗粒的表面局部带电特征^[18]. 用 SDM 检测蛋白质、核酸等生物大分子在电极表面吸附后功能变化^[19], 进行生物高分子在细胞表面与其相互作用的微环境研究等^[20], 这些对生物物理学家不能不说是一个刺激, 而具体体系的研究对 SDM 的改进亦是个挑战. 作为一种新技术的雏形, 从其具有的潜力、应用对象的环境选择以及可获得的信息来看, 已显示了超于 SCM 和 SICM 的应用前景.

另外, 在溶液介质存在的情况下, 这种不受样品表面形状以及内部构造的限制, 不破坏样品的内部诊断法, 无疑会在食品、医药以及细胞工程学等应用领域发挥其独特的作用. 因为病变的细胞与正常细胞有着截然不同的介电性质, 所以可以使用大探针和宽范围的 SDM 扫描生物组织和器官进行肿瘤检查, 这种对生物体的介电诊断, 在医学研究及临床上是个很有前途的技术. 随着 SDM 的不断改进和应用、并最终达到如 STM 那样仪器化和普及化时, 必将会为生物细胞体系的研究以及医学等方面的应用带来革命性的进步.

参 考 文 献

- 1 Foster J S, Frommer J E. Imaging of liquid crystals using a tunnelling microscope. *Nature*, 1988, **333**: 542~ 545
- 2 Arakawa H, Umemura K, Ikai A. Protein images obtained by STM, ATM and TEM. *Nature*, 1992, **358**: 171~ 173
- 3 Williams C C, Hough W P, Rishon S A. Scanning capacitance microscopy on a 25 nm scale. *Appl Phys Lett*, 1985, **55**: 203~ 205
- 4 Hansma P K, Drake B, Marti O. The scanning ion conductance microscope. *Science*, 1989, **243**: 641~ 643
- 5 Schwan H P. *Advances in biological and medical physics*. New York: Academic Press, 1957, **5**: 147~ 209
- 6 Hanai T. *Electrical properties of emulsion in Emulsion Science*. London, New York: Academic Press, 1968. 353~ 478
- 7 Takashima S. *Electrical properties of biopolymers and membranes*. Bristol and Philadelphia: Adam Hilger, 1989. **7**: 194~ 223
- 8 Cole K S, Guttman R M. Electric impedance of the frog egg. *J Gen Physiol*. 1942. **25**: 765~ 775
- 9 Asami K, Irimajiri A, Hanai T. Development of medaka eggs as monitored by their dielectric behavior. *Bull Inst Chem Res Kyoto Univ*, 1987, **64**: 339~ 343
- 10 Hanai T, Zhang H, Asaka K *et al*. The number of interfaces and the associated dielectric relaxations in heterogeneous systems. *Ferroelectrics*, 1988, **86**: 191~ 203
- 11 Asami K, Irimajiri A. Dielectric analysis of mitochondria isolated from rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 1984, **778**: 570 ~ 578
- 12 Zhao K, Hanai T. Dielectric relaxation of heterogeneous systems with planar structure: Influence of the number and the electric conductivity of constituent phases on the relaxation pattern. *Electrochemistry*, 1995, **3**: 311~ 326
- 13 Hanai T. Some characteristics of heterogeneous structure in membrane systems as viewed from dielectric behavior. *Maku (Membrane)*, 1989, **14**: 101~ 117
- 14 Asami K, Zhao K. Dielectric measurement of a single submillimeter size microcapsule. *Colloid Polymer Sci*, 1994, **272**: 64~ 71
- 15 Asami K. The scanning dielectric microscope. *Meas Sci Technol*, 1994, **5**: 589~ 592
- 16 Asami K. Dielectric imaging of biological cells. *Colloid and Polymer Sci*, 1996, **273**: 1905~ 1907
- 17 Asami K, Irimajiri A, Hanai T. Dielectric properties of epithelial monolayer cultured on planar permeable support. *Bull Inst Chem Res Kyoto Univ*, 1990, **68**: 219~ 223
- 18 Nakamura K, Partch R E, Matijevic E. Preparation of polymer colloids by chemical reactions in aerosols. *J Colloid Interface Science*, 1984, **99**: 118~ 127
- 19 Drake B, Prater C B, Weisenhorn A L. Imaging crystal, polymers and processes in water with the atomic force

microscope. Science, 1989, **243**: 1586~ 1589

20 Kurihara K, Yoshii K, Kashiwayanagi M. Transduction mechanisms in chemoreception. Comp Biochem Physiol, 1986, **85A**: 1~ 22

Scanning Dielectric Imaging Technology and Its Application in Biological System. ZHAO Kongshuang (*State Key Laboratory for Physical Chemistry of Solid Surface, Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, China*).

Abstract A new technology developed recently,

termed scanning dielectric microscopy (SDM), to image the dielectric properties of colloidal particles and biological cells in an aqueous environment was introduced through practical examples, and the characteristics of its principle and measurement system were described. The application potentiality of SDM in biological system and medicine was reviewed briefly.

Key words scanning dielectric microscope, dielectric spectroscopy, interfacial polarization, biological cell

NMDA 受体通道的结构与功能

王 文¹⁾ 徐天乐²⁾

(第四军医大学梁 璐脑研究中心, 西安 710032)

摘要 近来用分子克隆方法对 N-甲基-门冬氨酸受体 (NMDA 受体) 通道的分子结构进行了广泛的研究. 这些研究清楚地显示了 NMDA 受体通道的分子多样性, 为 NMDA 受体通道的在体功能多样性提供了基础. 已获得的克隆为研究这些受体通道分布和生理作用提供了有价值的工具.

关键词 NMDA 受体通道, 钙离子, 可塑性, 神经元死亡

谷氨酸受体 (glutamate receptor, GluR) 通道在快速兴奋性突触传递中起重要作用. 根据其药理学特性, GluR 通道可分成三个主要亚型, 即 AMPA、Kainate (KA) 和 N-甲基-门冬氨酸受体 (NMDA 受体) 通道. 由于 NMDA 和 AP5 等高选择性 NMDA 受体配基的发展, 该受体通道成为三者中研究得最清楚的亚型. NMDA 受体通道具有一种独特的门控方式, 既受配基门控, 又受电压门控. 其电压依赖性是由离子通道内部的 Mg^{2+} 阻滞作用决定的. NMDA 受体通道不像大多数非 NMDA 受体通道, 它对 Ca^{2+} 高度通透. 与非 NMDA 受体通道介导的兴奋性突触后电位 (excitatory post synaptic potential, EPSP) 相比, NMDA 受体通道介导的 EPSP 的时程比较慢. 除此之外, NMDA 受体通道的功能受多种细胞内和

细胞外机制的调节. 越来越多的证据表明, 神经系统的一些最重要功能如突触的可塑性与 NMDA 受体通道的活动密切相关. 而且 NMDA 受体通道的过度激活可导致一系列病理状态引起的神经学损伤.

1 分子多样性和命名

1.1 命名

对 NMDA 受体的分子结构研究最重要的发现之一是阐明了 NMDA 受体通道的多样性. 迄今鉴定的哺乳动物 GluR 通道亚单位根据其氨基酸序列的同源性可以分成六个亚家族. Hollmann 等^[1]用表达克隆方法确认了第一种,

¹⁾1993 年级军医系学员.
²⁾通讯联系人.
收稿日期: 1996-07-09, 修回日期: 1996-12-18