



细胞传感器与芯片的研究进展

韦晓兰¹⁾ 莫志宏^{1,2)*}

(¹⁾重庆大学生物医学工程学院, 重庆 400044; ²⁾重庆大学化学化工学院, 重庆 400044)

摘要 细胞传感器 (cell-based biosensor) 与芯片 (cell-based biochip) 已成为后基因时代生物科学研究的重要工具, 它们利用生活细胞作为研究对象或敏感元件, 与传感器和芯片技术相结合, 通过生物信号与物理、电化学等其他信号的转换, 实现实时、快速、微量地检测细胞的功能信息和待测物的性质. 在细胞生物学研究、环境监测和药物开发等领域有广泛的应用. 综述近三年来细胞传感器与芯片技术的研究进展及应用, 并提出展望.

关键词 细胞传感器, 细胞芯片, 细胞功能信息

学科分类号 Q819

细胞是组成生命结构和功能的基本单位, 是接近有机体原位的最小结构, 有机体的生理功能和一切生命现象都是以细胞为基础表达的. 随着人类基因组计划 (human genome project, HGP) 的完成, 分子水平上的基因和蛋白质研究已不能满足人类对生命科学的原位探索, 而细胞水平研究的核心优势在于实现原位检测, 即在不破坏细胞形态结构的状况下, 用生化的和物理的技术对细胞的生活状态做定性定量分析, 研究其动态变化, 了解细胞代谢过程中各种状态的变化, 对细胞、细胞的组分和细胞外的产物, 在其原位和活的情况下进行定量化学分析, 因此细胞水平的研究必将成为后基因时代生命科学的核心内容.

近年来, 细胞传感器 (cell-based biosensor) 与芯片 (cell-based biochip) 的研究日益成为细胞研究领域的热点和前沿, 它们利用活细胞作为研究对象或敏感元件, 使之与电极或其他信号元件组合, 定性定量地检测细胞的基本功能信息和被分析物的性质. 如细胞传感器可以监测单个活细胞的生理功能, 从而解决与功能性信息相关的问题. 细胞传感器还可以确定被分析物的存在与否及浓度大小, 如细胞的呼吸代谢产生电子, 这些电子直接在阳极上放电, 也可通过电子传递媒介间接在电极上放电, 产生可被测量的电信号, 电流的大小与被测物的浓度呈线性关系, 因此, 可以通过测量电信号实现检测待测物的目的. 细胞芯片则可以检测细胞内部基因和蛋白质表达的变化, 如在芯片上通过培养吸收了已知 cDNA 的细胞, 利用生物芯片探针杂

交检测原理, 便可检测激动剂或抑制剂对细胞内部基因表达的影响^[1].

总之, 在生物医学、环境监测和药物开发等领域, 细胞传感器与芯片均能实时、持续和快速地进行分析检测, 具有十分广阔的应用前景. 本文综述了近三年细胞传感器与芯片的研究方法、应用领域和最新进展, 并做出展望.

1 细胞传感器及其应用

细胞传感器技术是在 20 世纪 80 年代出现的. 目前, 浙江大学生物传感器实验室已详细报道了根据所获取的细胞信息类别而分类的几种细胞传感器, 如监测细胞内外环境的细胞传感器, 监测细胞电生理行为的细胞传感器, 监测细胞力学行为的细胞传感器等^[2]. 这里我们根据细胞传感器的用途, 介绍几种其他类型的细胞传感器.

1.1 应用于单细胞功能信息检测的细胞传感器

实时活体监测细胞是全面了解细胞生理性能及其机制的重要基础. 这类细胞传感器可以实时检测单个细胞的生长、发育和凋亡的功能信息. 加利福尼亚大学 Yong 等^[3]设计了一个由两层透明的多晶硅电极和一层氮化硅薄膜组成的细胞传感器. 顶部和底部的硅电极含 KOH 蚀刻腔, 中层为 1 μm 厚的 Si_3N_4 层, 共三层, 形成两个液腔, 细胞便生活在这两个液腔中. 两个腔通过 Si_3N_4 层上唯一的

* 通讯联系人.

Tel: 023-65106963, E-mail: zhihmo@cqu.edu.cn

收稿日期: 2004-02-23, 接受日期: 2004-04-29

直径 $2 \sim 10 \mu\text{m}$ 的孔相连, 形成电子流路, 在细胞培养液流动时, 由于两腔内压力不同, 会有单个细胞塞住微孔, 单个细胞的功能信息得以检测。

由于细胞的新陈代谢会引起细胞的生活状态发生变化, 整合多种专项传感器, 便可检测细胞的基本功能信息。如采用不同的离子敏感微电极 (ISME), 和荧光成像等工具结合, 可精确和清晰地测量细胞内环境中的 H^+ 、 NH_4^+ 、 Cl^- 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 等各种离子浓度的变化^[4]。细胞的新陈代谢还会引起细胞外代谢物如离子、生物大分子等的相应变化, 如细胞由于能量代谢产生的酸性物质使细胞外环境酸化, 利用细胞传感器可以和 H^+ 敏场效应管 (ISFET) 等结合测定细胞外微环境的 pH 值变化, 定量计算细胞 H^+ 排出速率, 即酸化率, 从而可以分析细胞的代谢率^[5]。此外, 细胞传感器还可以和氧电极传感器及 CO_2 传感器结合测量在糖酵解过程中 O_2 的消耗量和 CO_2 的生成量^[6]。

此类细胞传感器是对细胞进行体外的培养和记录, 其检测是无损性和长期性的, 如美国海军研究工作实验室^[7]利用细胞传感器对鸡胚胎的心肌细胞进行了长期功能测试, 并逐步实现便携化和商业化。但是细胞活性维持、环境干扰等技术障碍仍待解决。

1.2 应用于环境监测的细胞传感器

细胞对外界环境的变化会产生响应, 细胞传感器可将细胞状态的变化转化成声、光、色等可测的物理信号, 定性定量地进行环境监测^[8]。如许改霞等^[2]报道的监测细胞特殊行为——基于生物发光和细胞色素的细胞传感器, 德国研制的表面光波细胞传感器^[9]等。

捷克的 Masaryk 大学最近设计了一种监测环境质量的细胞传感器, 利用检测细胞生长过程中 Jun 蛋白表达量的变化, 定量检测环境中重金属 Zn^{2+} 的浓度^[10]。重金属可以调节细胞内一定基因的表达, 如调节为金属硫蛋白启动子编码的基因等, 且基因的表达水平与金属的浓度呈线性关系, 因此可以根据细胞中基因表达水平的变化来定量重金属离子的浓度, 达到环境监测的目的。锌在细胞的生长发育过程中起着重要的调节作用, 它是金属酶和蛋白质的组成元素, 还可以有效影响 DNA 的性质, 但浓度大于正常值的 Zn^{2+} 会毒死细胞, 该实验用对真核细胞低毒性的银电极做工作电极, 在传感器上用 DMEM 培养基培养鸡的成单核细胞, 它的 Jun 蛋白便以 Zn^{2+} 浓度依赖的方式表达, 改变细胞外

环境中 Zn^{2+} 浓度, 用免疫印迹的方法检测到 Jun 蛋白表达水平的变化, 从而计算 Zn^{2+} 的浓度^[10]。

与测量重金属浓度的常用方法 (如原子吸收光谱和等离子体质谱等) 相比, 细胞传感器技术检测准确度高, 检测极限可达 250 nmol/L , 检测快速, 还可以通过这种方法筛选出基因表达的最优化条件。日本环境省也将开发利用人肺细胞监测环境的细胞传感器。但此项技术在实验室以外的环境中难以有效地应用, 仍是该研究的困难。

1.3 应用于药物筛选的细胞传感器

大多数细胞具有黏附性, 贴壁生长在电极上的细胞形状和运动状态的变化, 都会引起贴壁界面阻抗的变化。Giaever 等^[11]根据这一特性, 设计了能实时、连续、定量跟踪哺乳动物细胞变化的细胞传感器 ECIS (electric cell-substrate interaction impedance sensor)——细胞与电极基底之间的阻抗传感器^[12]。这个系统可以检测细胞的运动、延展、凋亡等变化的量化信息, 更重要的是可以定量检测细胞对药物的响应。系统的核心部分是一个沉在培养皿底部的金电极, 因此电极就浸在组织培养液中, 大多数哺乳动物细胞在培养过程中沉降并在电极上附着延展时, 电极的阻抗会发生变化, 阻抗的改变揭示了关于细胞变化的重要动力学信息。这个系统可以在纳米水平上定量地检测细胞的微运动^[13]。

牛津大学医学部应用金电极测量活细胞阻抗或电位变化的细胞传感器进行抗癌药物的筛选^[14], 筛选出阿霉素 (Adriamycin)、卡铂 (Cisplatin) 等对卵巢癌和乳腺癌等细胞有响应的药物, 以及紫杉萜 (Taxotere) 等无效的药物, 这些结果已经证实与扫描电镜和 MTT 比色分析法的测试结果一致。最近, 加利福尼亚大学 Yong 等^[3]还对利用阻抗的变化反映细胞膜完整性的细胞传感器芯片进行了研究, 用不同浓度的 Triton X-100 试剂检测人类前列腺癌细胞系的细胞膜完整性损坏情况, 通过细胞传感器检测整个实验的动力学过程, 细胞膜的生理完整性是细胞死亡的一个重要指标, 因此, 此类细胞传感器结合比色度和荧光染色可以跟踪检测细胞的发育情况, 也为细胞凋亡的基础研究提供了有力的工具。又如美国马里兰大学研制的细胞培养分析系统 CCA (cell culture analog)^[15], 就是利用细胞传感器与药物动力模型 PBPK 结合对动物进行体外研究, 为临床诊疗中的药效评估提供了代用品。日本研究机构研制细胞传感器, 与扫描电镜结合进行抗癌药物的筛选^[16], 瑞士 Hug 等^[17]研究的与光波导

质谱技术 OWLS (optical waveguide lightmode spectroscopy) 结合的细胞传感器, 应用于药物筛选的研究, 均取得了明显效果。

在过去的研究中, 评估药品的药理和毒理需要对整个动物体进行测试, 实验十分昂贵和繁琐。细胞传感器的出现大大改善了这种状况, 仅仅利用一定量体外培养的生活细胞, 在传感器上生物状态变化的检测便可实现快速、高通量的药物筛选。细胞传感器进行的药效测试在药物筛选和临床诊断方面发挥了巨大的作用, 不仅可以通过生活细胞的响应确定药物对细胞的效用, 而且可以确定对药物反映的细胞特异性。

2 细胞芯片及其应用

细胞芯片的概念最早出现在日本东京大学 Dr. Washizu 领导的研究项目中, 20 世纪 90 年代也出现了相关报道。我们将根据制作原理介绍几种细胞芯片。

2.1 多参数细胞芯片

此类细胞芯片是将大量的细胞固定和排列在一个小的空间 (图 1), 再利用在样品间构建隔膜, 在硅芯片平面蚀刻孔或生成沟槽为每个细胞提供分

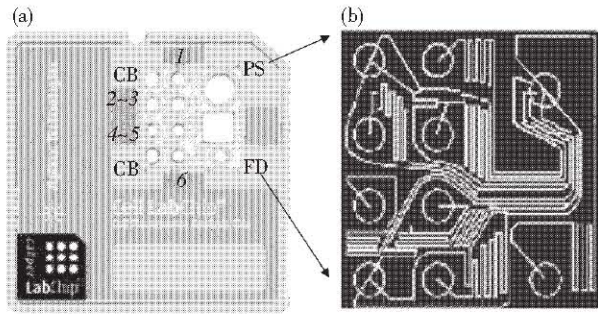


Fig. 1 Cell fluorescence LabChip used in the Agilent 2100 Bioanalyzer^[18]

图 1 荧光 6 通道细胞芯片图^[18]

CB: 细胞缓冲液池; PS: 初级溶解池; FD: 集中染色池;
1~6: 检测通道。

离空间, 分别固定, 整合多种目标传感器检测细胞的基本功能信息^[19]。为保护支持材料平面的悬浮细胞不被溶解, 以防扩散, 用聚合体等黏性材料对表面进行特殊处理后, 用点样器进行点样。此类细胞芯片可以同时检测 500 个或 2000 个细胞进行点样, 可以检测多个参数的细胞功能信息。德国 Fromherz 做的神经元半导体芯片^[20], 在细胞芯片上装有多

种传感器, 检测细胞 ΔpH 、 ΔO_2 、酸化率和呼吸率等多个代谢参数, 并测量了细胞的生长、代谢过程中不同时段的动力学特性和代谢的基本功能信息。实验还检测了几种化学治疗药物对几种癌细胞系的代谢影响, 结果对 LS1747 癌细胞, 细胞松弛素 B 明显造成细胞耗氧量增加, 细胞外环境酸化率降低; 对乳腺癌细胞, 氯乙醛 (chloroacetaldehyde) 则降低细胞呼吸率; 对鼠癌细胞 S180, 其酸化率和呼吸率均被阿霉素抑制。实验显示, 细胞芯片是测量细胞代谢和生理功能信息的快速高敏感方式。另外, 日本 Matsubara 等^[21]开发的嗜碱性粒细胞芯片, 美国研制的与膜片钳和安培计技术结合的细胞芯片^[22]等, 也属于此类细胞芯片。

此类细胞芯片还可用于细胞类型的快速筛选, 也用于单细胞 PCR 和原位杂交的标准化, 还可以对数以千计的细胞的基因表达进行同时检测, 且所需样品量少、检测量大、快速, 每个样品约少于 4 min, 在疾病诊断和癌症或基因疾病的药效评估上有广泛用途。

2.2 电穿孔细胞芯片

美国加利福尼亚大学的科研小组找到了一种利用电穿孔 (electroporation) 细胞芯片控制人体细胞活动的方法。电穿孔细胞芯片, 又叫仿生芯片^[23], 是由健康的人体细胞与一个电子集成电路芯片经特殊方法结合起来的微型装置, 它的原理是当细胞面临一定的电压时, 细胞膜微孔就会张开, 具有渗透性。罗宾斯基小组将染料、药物、DNA、RNA、蛋白质、肽和氨基酸等精确地导入靶细胞, 可以在不影响周围细胞的情况下, 对目标基因或细胞进行基因导入、蛋白质提取等研究。通过计算机控制微型装置中的芯片, 即可达到控制该健康细胞活动的目的。

电穿孔细胞芯片可以进行原本比较难以把握的基因治疗, 实现了基因治疗的高精确度和高效率, 并为细胞和亚细胞结构的研究提供了重要的实验工具^[23]。另外, 研究者还将根据病人的个体基因特点设计个性化的细胞芯片, 进行疾病治疗。

2.3 微流体细胞芯片

微流体细胞芯片是在细胞芯片上构建一个流路体系, 准确控制细胞的传输与定位以及稀释细胞外电解液浓度, 形成浓度梯度, 实现细胞响应的监测。

Chan 等^[24]开发了与双通道荧光检测技术结合的微流体细胞芯片, Farinas 等^[25]研制了检测细胞膜电位变化图谱的微流体细胞芯片, 在这些装置

中, 一个“坝”状流路结构将细胞集合起来, 细胞在“坝”中所受液体剪切力最小, 通过电解液在微流体通道中的稀释和流动, 调整细胞的数量和定位至理想状况, 对初级细胞进行细胞凋亡分析和蛋白质表达检测. Yang 等^[26]报道的微流体细胞芯片, 则利用对 Ca^{2+} 吸收呈 ATP 依赖型的 HL-60 细胞作为模型, 在细胞芯片上通过微流体系统检测了细胞内产生大量 Ca^{2+} 信号的 ATP 阈值, 显示了在细胞芯片上操纵细胞进行药物浓度梯度响应和治疗的前景. 这类芯片还有与免疫电泳技术结合的检测细胞激素分泌情况的微流体芯片^[27]以及应用于药物筛选的微流体芯片^[28]等.

与传统的流式细胞术 FCM (flow cytometer) 相比, 微流体芯片实现了细胞的快速、高通量检测, 它们具有高敏感性, 细胞和试剂消耗量小, 数据准确等优点.

2.4 检测基因表达变化的细胞芯片

这一类细胞芯片, 是用活的细胞通过 cDNA 固定在芯片上, 使细胞吸收了 cDNA, 在点上生长并表达编码的蛋白质^[1]. 目前, Chichen 等^[18]利用细胞芯片进行了细胞内部蛋白质表达的检测. 一个芯片可以同时检测 6~8 个样品, 他们选取与细胞表面抗体结合的 6 种抗原与细胞内的抗体进行原位杂交, 其中脐血 (umbilical cord blood, UCB) 来源的单核细胞经过药物成分 F3 的处理, 发现识别人类 NK 细胞的 CD56 + 抗体明显增加, 浓度从 1.1% 增至 3.2%, 说明 F3 定量地影响 NK 细胞的活动, 结果与传统的流式细胞技术的测试结果比较, 基本一致.

3 展 望

目前, 细胞传感器与芯片从生理研究到药物筛选都得到了很广泛的应用, 但是还存在许多复杂问题, 如细胞类型的选择、细胞的培养、细胞活性的保持、细胞与传感器和芯片的耦合等, 并且在微型化和便携式等方面还有待改进.

总之, 细胞拥有并表达着一系列潜在的分子识别元件, 如受体、离子通道、酶等, 这些分子都可以作为靶分析物, 当它们对外界刺激敏感时, 就按照固有的活细胞生理机制进行相应的生理功能活动. 所以, 以活细胞作为探测单元和敏感元件的细胞传感器与芯片技术可以响应许多具有生物活性的被分析物, 此外, 它们还具备功能性分析的优点, 有助于更深入地探求细胞的生理活动, 已成为生命

科学和环境科学以及医疗科学领域必不可少的工具.

同时, 人类基因组测序已经完成, 下一步是要对所有基因的功能和应用进行研究, 细胞传感器与芯片技术可以在基因水平上进行细胞融合、细胞分型, 以及制造单细胞电穿孔芯片, 从而进行同步、大量的基因检测, 以实现基因治疗的目的. 因此, 细胞传感器与芯片必将在后基因组时代的科学研究中发挥巨大的作用.

参 考 文 献

- 1 Steve N B, Randy Z W, David M S. Applications of transfected cell microarrays in high-throughput drug discovery. *DDT*, 2002, **7**: 113 ~ 118
- 2 许改霞, 吴一聪, 李 蓉, 等. 细胞传感器的研究进展. *科学通报*, 2002, **47** (15): 1126 ~ 1132
Xu G X, Wu Y C, *et al.* *Sci Bull*, 2002, **47** (15): 1126 ~ 1132
- 3 Yong H, Naveep S S, James B, *et al.* Instantaneous, quantitative single-cell viability assessment by electrical evaluation of cell membrane integrity with microfabricated devices. *Sensors and Actuators A*, 2003, **105** (1): 31 ~ 39
- 4 Mirko L, Werner B, Martin B, *et al.* Non-invasive measurement of cell membrane associated proton gradients by ion-sensitive field effect transistor arrays for microphysiological and bioelectrical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 2000, **15** (1): 117 ~ 124
- 5 Lorenzelli L, Margesin B, Martinoia S, *et al.* Bioelectrochemical signal monitoring of *in vitro* cultured cells by means of an automated microsystem based on solid state sensor-array. *Biosens Bioelectron*, 2003, **18** (5~6): 621 ~ 626
- 6 Otto A M, Brischwein M, Grothe H, *et al.* Multiparametric sensor chips for chemosensitivity testing of sensitive and resistant tumor cells. *Recent Results Cancer Res*, 2003, **161** (1): 39 ~ 47
- 7 Gray S A, Kusel J K, Shaffer K M, *et al.* Design and demonstration of an automated cell-based biosensor. *Biosens Bioelectron*, 2001, **16** (7~8): 535 ~ 542
- 8 Rishpon J. Electrochemical biosensors for environmental monitoring. *Rev Environ Health*, 2002, **17** (3): 219 ~ 247
- 9 Lange K, Bender F, Voigt A, *et al.* A surface acoustic wave biosensor concept with low flow cell volumes for label-free detection. *Anal Chem*, 2003, **75** (20): 5561 ~ 5566
- 10 Rene K, Libuse T, Sabina S, *et al.* Silver electrode as a sensor for determination of zinc in cell cultivation medium. *Analytical Biochemistry*, 2002, **301**: 8 ~ 13
- 11 Keese C R, Giaever I, Bhawe K, *et al.* Real-time impedance assay to follow the invasive activities of metastatic cells in culture. *Biotechniques*, 2002, **33** (4): 842 ~ 850
- 12 Luong J H, Habibi-Rezaei M, Meghrouh J, *et al.* Monitoring motility, spreading, and mortality of adherent insect cells using an impedance sensor. *Anal Chem*, 2001, **73** (8): 1844 ~ 1848
- 13 Woolley D E, Tetlow L C, Adlam D J, *et al.* Electrochemical monitoring of cell behaviour *in vitro*: a new technology. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **77** (7): 725 ~ 733
- 14 Woolley D E, Tetlow L C, Adlam D J, *et al.* Electrochemical Monitoring of Anticancer Compounds on the Human Ovarian Carcinoma Cell Line A2780 and Its Adriamycin and Cisplatin-Resistant Variants. *Experimental Cell Research*, 2002, **273**: 65 ~ 72

- 15 Sin A, Chin K C, Jamil M F, *et al.* The design and fabrication of three-chamber microscale cell culture analog devices with integrated dissolved oxygen sensors. *Biotechnol Prog*, 2004, **20** (1): 338 ~ 345
- 16 Torisawa Y S, Kaya T, Takii Y, *et al.* Scanning electrochemical microscopy-based drug sensitivity test for a cell culture integrated in silicon microstructures. *Anal Chem*, 2003, **75** (9): 2154 ~ 2158
- 17 Hug T S, Prenosil J E, Morbidelli M. Optical waveguide lightmode spectroscopy as a new method to study adhesion of anchorage-dependent cells as an indicator of metabolic state. *Biosens Bioelectron*, 2001, **16** (9 ~ 12): 865 ~ 874
- 18 Chichen M C, Chen J L, Chang W T, *et al.* Cell phenotype analysis using a cell fluid-based microchip with high sensitivity and accurate quantitation. *Journal of Chromatography B*, 2003, **795** (1): 1 ~ 8
- 19 Lee D S, Lee J. Bio-cell chip. Korea, WO 03068982, 2003-08-21
- 20 Alexander K R, Naweed I S, Peter F. Neuron-semiconductor chip with chemical synapse between identified neurons. *Physical Review Letters*, 2004, **92** (3): 038102
- 21 Matsubara Y, Murakami Y, Kobayashi M, *et al.* Application of on-chip cell cultures for the detection of allergic response. *Biosens Bioelectron*, 2004, **19** (7): 741 ~ 747
- 22 Chen P, Xu B, Tokranova N, *et al.* Amperometric detection of quantal catecholamine secretion from individual cells on micromachined silicon chips. *Anal Chem*, 2003, **75** (3): 518 ~ 524
- 23 Olofsson J, Nolkranz K, Ryttsen F, *et al.* Single-cell electroporation. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14** (1): 29 ~ 34
- 24 Chan S D, Luedke G, Valer M, *et al.* Cytometric analysis of protein expression and apoptosis in human primary cells with a novel microfluidic chip-based system. *Cytometry*, 2003, **55A** (2): 119 ~ 125
- 25 Farinas J, Chow A W, Wada H G. A microfluidic device for measuring cellular membrane potential. *Anal Biochem*, 2001, **295** (2): 138 ~ 142
- 26 Yang M, Li C W, Yang J. Cell docking and on-chip monitoring of cellular reactions with a controlled concentration gradient on a microfluidic device. *Anal Chem*, 2002, **74** (16): 3991 ~ 4001
- 27 Roper M G, Shackman J G, Dahlgren G M, *et al.* Microfluidic chip for continuous monitoring of hormone secretion from live cells using an electrophoresis-based immunoassay. *Anal Chem*, 2003, **75** (18): 4711 ~ 4717
- 28 Weigl B H, Bardell R L, Cabrera C R. Lab-on-a-chip for drug development. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, **55** (3): 349 ~ 377

The Progress of Bio-cell Sensor and Cell Chip

WEI Xiao-Lan¹⁾, MO Zhi-Hong^{1,2)} *

⁽¹⁾ *Biology Engineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China;*

⁽²⁾ *Chemistry & Chemical Engineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China)*

Abstract Bio-cell sensor and bio-cell chip techniques have been important tools in post-gene era. They can detect functional information of cells as well as nature of matters detected. Living cells would be detected as a unit or sensitive element by exchanging between biological signals and physical and electrochemical signals. The detection using these tools is raptive, in real-time, quantitative and qualitative. Bio-cell sensor and bio-cell chip techniques have been applied in fields of the cellular biology, the monitoring of environment and the developments of drugs. The developments of methods, applications in three years and the trends are reviewed.

Key words bio-cell sensor, bio-cell chip, cell functional information

* Corresponding author. Tel: 86-23-65106963, E-mail: zhihmo@cqu.edu.cn

Received: February 23, 2004 Accepted: April 29, 2004