

人胃黏膜上皮细胞介电谱的实验研究

沈 斌, 赵伟红, 杨 阳, 包秀玲, 马 青*

(宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 在 0.01~100 MHz 范围内, 使用交流电阻抗方法测量了人胃上皮 GES-1 细胞悬浮液的介电谱, 通过介电谱的实部和虚部以及复平面图的分析, 观察体积分数对 GES-1 细胞介电谱特性的影响. 结果表明 GES-1 细胞的介电行为具有 3 个特征: (1)频率依赖性, 即随电场频率的增加, 其介电常数增量($\Delta\epsilon=\epsilon-\epsilon_h$)减小, 电导率增量($\Delta\kappa=\kappa-\kappa_L$)增加; (2)体积分数依存性, 即当体积分数增加时, 介电常数最大增量($\Delta\epsilon_{\max}$)、电导率最大增量($\Delta\kappa_{\max}$)和峰值(P_1 、 P_2 、 P_3)随之增加; (3)具有 3 个特征频率(f_1 、 f_2 、 f_3), 分别来源于细胞膜(f_1)、细胞核膜(f_2)和细胞核仁(f_3).

关键词: 人胃黏膜上皮细胞株 GES-1; 细胞体积分数; 介电谱; 介电常数; 电导率

中图分类号: Q64

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2015) 03-0103-05

通过细胞悬浮液介电谱(Dielectric Spectroscopy of Cell Suspension)方法研究细胞介电性能已成为生物医学工程领域关注的热点问题之一^[1]. 近年来, 由于快速、自动化、高精度分析仪器的出现, 促进了细胞介电谱的研究. 到目前为止, 已研究的细胞有: 肝细胞^[2]、软骨细胞^[3]、人白血病 K562 细胞^[4]、前成骨细胞骨髓衍生的 MBA-15 细胞^[5]、中国仓鼠卵巢 CHO 细胞^[6]、犬肾上皮 MDCK 细胞^[7]、血液细胞^[8-9]等. 利用介电谱的无损伤测量和多细胞总合电特性的优点, 有学者开展了应用研究, 如测算细胞体积分数^[10]、对聚合物生物支架进行评价^[2]和判断癌前病变^[11]等. 然而, 对胃上皮细胞的研究, 尚未见报道.

本研究将在 0.01~100 MHz 频率范围, 测量胃上皮细胞介电谱, 并提取其介电谱特征参数, 以期电阻抗成像提供基础的介电频谱数据^[12], 为人们理解电磁场对生物细胞作用效应^[13]提供帮助, 并为胃部疾病的研究提供参考.

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胃黏膜 GES-1 上皮细胞(中科院上海细胞库

提供). 将胃上皮 GES-1 细胞置于含 10%灭活胎牛血清、100 IU·mL⁻¹ 青霉素、100 IU·mL⁻¹ 链霉素的 1640 培养基中培养. 细胞在 5%的 CO₂ 培养箱中(37℃)培养, 经过胰酶消化、吹打、制成细胞悬液, 并配制成不同体积分数的细胞悬液.

1.2 细胞介电谱测量

利用电阻抗技术, 包括安捷伦 4294A 阻抗分析仪、16192A 夹具、42942A 适配器、电脑和测量池. 测量池为圆筒两平行板电极, 电极材料为铂金圆片. 电极规格: 直径 8 mm, 间距 7.2 mm, 容积约 0.4 mL. 经过 25℃ 0.1 mol·L⁻¹ KCl 标准溶液校正, 测量池常数 $C_0=0.0719$ pF、浮游电容 $C_1=1.53$ pF. 在 0.01~100 MHz 频率范围选取 80 个频率点, 采用 C-G 并联模式, 测量每个频率点细胞样本的电容 C 和电导 G , 激励电压 0.2 V. 为减小电极的电感效应, 采用校正如下方法:

数据校正电容

$$C_s = \frac{C(1 + \omega^2 LC) + LG^2}{(1 + \omega^2 LC)^2 + (\omega LG)^2} - C_1.$$

数据校正电导:

$$G_s = \frac{G}{(1 + \omega^2 LC)^2 + (\omega LG)^2}.$$

收稿日期: 2015-03-09.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(51277099); 宁波市自然科学基金(2013A610211).

第一作者: 沈斌(1990-), 男, 浙江嘉兴人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 细胞电生理. E-mail: shenbin@nbu.edu.cn

*通信作者: 马青(1962-), 男, 黑龙江佳木斯人, 教授, 主要研究方向: 细胞电生理. E-mail: maqing@nbu.edu.cn

式中:角频率 $\omega=2\pi f$, f 是交变电场频率, 电极电感 $L=2.78$ nH, 介电常数(ε)和电导率(κ)由 $\varepsilon=C_s/C_0$ 和 $\kappa=(\varepsilon_v/C_0)G_s$ 公式进行换算, $\varepsilon_v=8.854$ pF·m⁻¹, 为真空介电常数. 测量温度为(25±1)℃, 每次测量在 1 min 内完成.

1.3 细胞体积分数测量

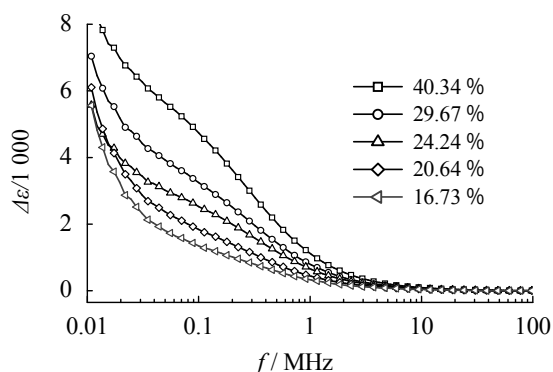
采用离心方法: 细胞充入毛细比容管后离心 12 000 r·min⁻¹ 5 min, 细胞体积分数 $Q_{CVF}=(\lambda/L)\times 100\%$, 这里 L 为全部细胞悬液长度, λ 为离心后细胞长度.

2 结果

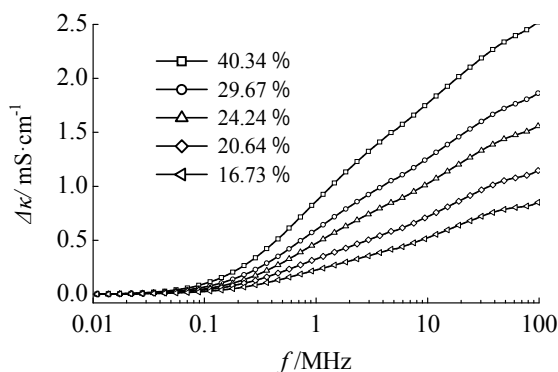
2.1 胃上皮 GES-1 细胞的介电谱

图 1 表示 5 种体积分数的 GES-1 细胞介电谱, 横轴为电场频率 f , 纵轴分别是介电常数增量 ($\Delta\varepsilon=\varepsilon-\varepsilon_h$) 和电导率增量 ($\Delta\kappa=\kappa-\kappa_L$). 各线型分别代表 GES-1 细胞悬浮液体积分数为 40.34%、29.67%、24.24%、20.64% 及 16.73%.

图 1(a)表示介电常数增量 $\Delta\varepsilon$ 与电场频率 f 的关



(a) 介电常数频谱



(b) 电导率频谱

图 1 胃上皮细胞的介电谱

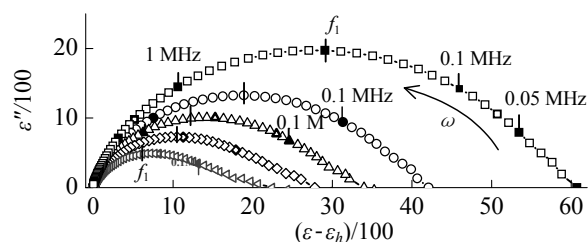
系曲线. 在 $f=0.01\sim 100$ MHz 范围, 当频率增加时, 介电常数增量 ($\Delta\varepsilon=\varepsilon-\varepsilon_h$) 从高数值变成低数值, 在最高频率处等于零. 在频率小于 1 MHz 时, $\Delta\varepsilon$ 随细胞体积分数的增加而增加, 表明在低射频段(0.01~1 MHz)的介电增量 $\Delta\varepsilon$ 能反映细胞体积分数的变化^[8]. 在 $f=1\sim 100$ MHz 范围, $\Delta\varepsilon$ 基本不随细胞体积分数的增加发生变化.

图 1(b)表示电导率增量 ($\Delta\kappa=\kappa-\kappa_L$) 与 f 的关系. 在低频段(0.01~0.1 MHz), $\Delta\kappa$ 基本稳定在零值; 在 $f=0.1\sim 100$ MHz 频段, $\Delta\kappa$ 随着电场频率和细胞体积分数的增加而增加.

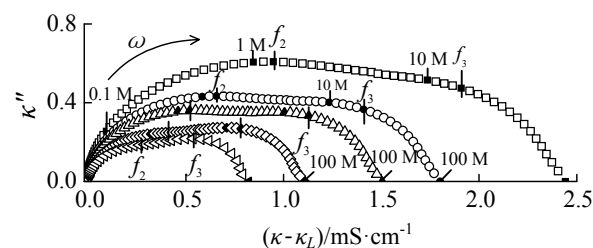
2.2 胃上皮 GES-1 细胞的复平面图

图 2(a)表示 GES-1 细胞介电常数的复平面. 横轴是 $\Delta\varepsilon$, 纵轴是介电损耗因子 $\varepsilon''=(\kappa-\kappa_L)/\omega\varepsilon_v$. 曲线呈现半圆形状, 圆心位于横轴下方, 曲线的左截距为零点, 右截距为介电常数最大增量 ($\Delta\varepsilon_{\max}=\varepsilon_L-\varepsilon_h$), 曲线顶点是第 1 特征频率 f_1 , f_1 是电场作用细胞膜产生的中心频率. 当细胞体积分数增加时, 左截距不变, $\Delta\varepsilon_{\max}$ 逐步增加, 曲线半径和面积增大, 出现以零点为中心, 曲线圆弧向右上扩展. 故细胞体积分数主要影响 ε 复平面图的右截距.

图 2(b)是人胃黏膜上皮细胞电导率 Cole-Cole 图, 横轴是 $\Delta\kappa$, 纵轴是电导率损耗 $\kappa''=(\varepsilon-\varepsilon_h)\omega\varepsilon_v$. 曲线近似 2 个圆弧曲线合成. 在 0.01~3 MHz 范围构成的第 1 个半圆曲线顶点的频率是第 2 特



(a) 介电常数复平面



(b) 电导率复平面

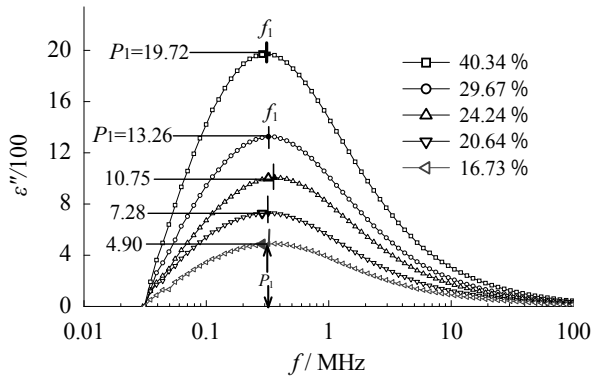
图 2 胃上皮细胞的复平面图

征频率 f_2 , f_2 是电场作用细胞核膜产生的中心频率; 在 3~100 MHz 范围的第 2 个半圆曲线顶点的频率是第 3 特征频率 f_3 , f_3 是电场作用细胞核仁产生的中心频率. 图 2(b)中原点是左截距, 电导率最大增量 ($\Delta\kappa_{\max}=\kappa_h-\kappa_L$) 是右截距. 当细胞体积分数增加, $\Delta\kappa_{\max}$ 渐增, 圆弧曲线面积扩大, 表现为以零点为中心向右上外扩. 故体积分数主要影响 κ 复平面图的右截距.

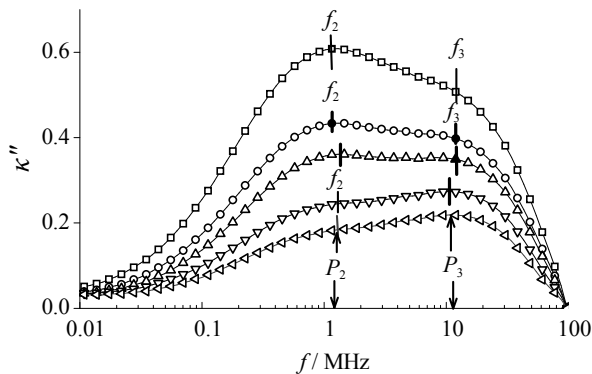
2.3 胃上皮 GES-1 细胞的介电虚部频谱

图 3(a)为 GES-1 细胞的介电损耗因子 ($\varepsilon''=(\kappa-\kappa_L)/\omega\varepsilon_v$) 频谱. 单峰谱线特征, 主峰值 $P_1=\varepsilon''_p(f_1)$, f_1 是主峰对应的第 1 特征频率, 处于 0.3~0.5 MHz 频段, P_1 随细胞体积分数增加而增加.

图 3(b)为 GES-1 细胞的电导率虚部 $\kappa''=(\varepsilon-\varepsilon_h)/\omega\varepsilon_v$ 频谱. 双峰谱线特征, 左侧峰值 $P_2=\kappa''_p(f_2)$, f_2 是对应左侧峰值的第 2 特征频率, 处于 1~2 MHz 频段. 右侧主峰值 $P_3=\kappa''_p(f_3)$, f_3 是对应右侧峰值的第 3 特征频率, 处于 10~20 MHz 频段. P_2 和 P_3 随细胞体积分数增加而增加.



(a) 介电常数虚部频谱



(b) 电导率虚部频谱

图3 胃上皮细胞的虚部频谱

2.4 特征频率与细胞体积分数的关系

图 4 为细胞体积分数 (Q_{CVF}) 与特征频率 (f_1 , f_2 , f_3) 之间的回归分析结果. 从图 4 中的散点图和线性回归直线可知, 3 条回归直线与横轴近似平行, 并且其斜率分别是 0.001、0.002 和 0.001, 数值极低, 说明细胞体积分数对特征频率 (f_1 , f_2 , f_3) 没有影响. 特征频率接近常数, 其数值在均值±标准差范围为: $f_1=(0.373\pm0.053)$ MHz, $f_2=(1.481\pm0.252)$ MHz, $f_3=(12.244\pm2.623)$ MHz. 按 $f_1<f_2<f_3$ 顺序, 两者之间相差近一个数量级, 说明 f_1 , f_2 , f_3 三者来源于细胞不同构造对电场响应的中心频率.

表 1 列出了 5 种细胞体积分数对胃上皮 GES-1 细胞介电谱特性的影响.

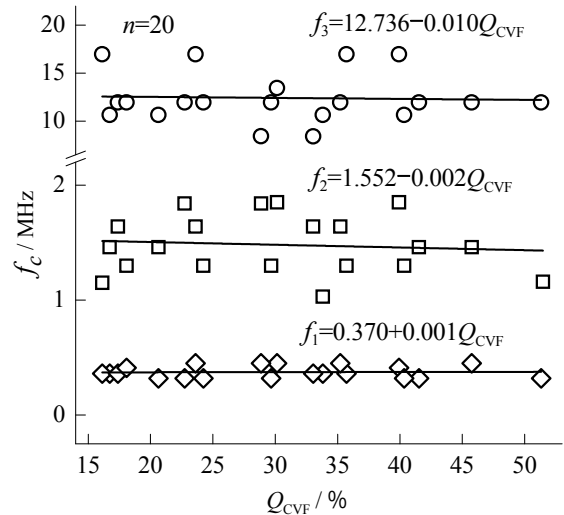


图4 特征频率与细胞体积分数的线性回归分析

3 讨论

人胃黏膜上皮 GES-1 细胞属于非均匀介电系统, 其细胞内部构造的电学特性 (ε , κ) 各异. 当细胞受到外施电场作用时, 细胞膜、细胞核膜对电荷移动具有阻碍作用, 导致电荷在此处积累, 引起细胞极化现象 (Cell polarization)^[13], 细胞极化普遍存在于电磁场对细胞的作用效应, 并且可以借助细胞介电频谱阐明其介电特性.

从图 1 和表 1 可以知道胃黏膜上皮细胞 (GES-1) 具有如下介电特性: (1) 频率依存关系, 即当电场频率增加时, 胃上皮细胞的 $\Delta\varepsilon$ 从大变小, $\Delta\kappa$ 从小变大, 反映细胞增量 ($\Delta\varepsilon$, $\Delta\kappa$) 的频谱特征. (2) 细胞浓度依存关系, 即当细胞体积分数 (Q_{CVF}) 增加时, $\Delta\varepsilon$ 和

表 1 细胞体积分数对胃上皮 GES-1 细胞介电谱特性的影响

指标	参数值				
细胞体积分数 $Q_{CVF}/\%$	40.34	29.67	24.24	20.64	16.73
介电常数低频极限值 ε_L	7 260.01	5 380.13	4 530.98	4 358.79	3 746.39
介电常数高频极限值 ε_h	75.16	74.97	74.69	74.01	73.54
介电常数最大增量 $\Delta\varepsilon_{\max}$	7 184.85	5 305.16	4 456.29	4 284.78	3 672.85
电导率低频限量 $\kappa_L/(\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1})$	8.34	8.51	8.87	8.75	8.84
电导率高频限量 $\kappa_h/(\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1})$	10.79	10.32	10.37	9.86	9.66
电导率最大增量 $\Delta\kappa_{\max}$	2.45	1.81	1.50	1.11	0.82
第 1 特征频率 f_1/MHz	0.32	0.32	0.36	0.32	0.36
第 2 特征频率 f_2/MHz	1.30	1.30	1.30	1.40	1.40
第 3 特征频率 f_3/MHz	13.45	11.96	11.96	10.65	10.65
虚部第 1 峰值 P_1	1 972	1 326	1 075	728	490
虚部第 2 峰值 P_2	0.61	0.43	0.36	0.25	0.19
虚部第 3 峰值 P_3	0.50	0.40	0.35	0.27	0.22

$\Delta\kappa$ 增加.

从图 2 和表 1 可以知道,胃黏膜上皮细胞 (GES-1)对交变电场的频响特性呈现出 3 个中心特征频率:细胞膜的响应是第 1 特征频率,细胞核膜的响应是第 2 特征频率,细胞核仁的响应是第 3 特征频率,并且它们与细胞体积分数无关,说明特征频率(f_1 、 f_2 、 f_3)能够代表胃上皮 GES-1 细胞自身的、固有的和本源的特征参数或指标.利用此特征可以鉴别胃上皮 GES-1 细胞,为进一步鉴别与区分胃癌细胞株(MGC-803、SGC-7901)提供了电生理学基础.

在图 3 的虚部频谱(ε'' 、 κ'')反映外加电场作用在细胞不同界面产生的热量损耗情况.当外加电场频率达到第 1 特征频率(f_1)时,在细胞膜界面处 ε'' 出现最大值 P_1 (图 3(a)).当电场频率达到第 2 特征频率(f_2)和第 3 特征频率(f_3)时,在核膜和核仁的界面处,电导率虚部分别出现 P_2 和 P_3 .进一步验证了 3 个特征频率(f_1 、 f_2 、 f_3)分别来源于细胞膜(f_1)、细胞核膜(f_2)和细胞核仁(f_3).

4 结论

通过对细胞介电谱的分析可以得到人胃上皮 GES-1 细胞的介电特性:介电增量($\Delta\varepsilon$ 、 $\Delta\kappa$)是电场频率的函数; $\Delta\varepsilon$ 随细胞含量的增加而增加;3 个特征频率(f_1 、 f_2 、 f_3)可以作为衡量细胞膜、细胞核

膜和细胞核仁的频域电生理特性指标.

文献参考:

[1] Heileman K, Daoud J, Tabrizian M. Dielectric spectroscopy as a viable biosensing tool for cell and tissue characterization and analysis[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 49:348-359.

[2] Massimi M, Stampella A, Devirgiliis L C, et al. Dielectric characterization of hepatocytes in suspension and embedded into two different polymeric scaffolds[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 102:700-707.

[3] Stacey M W, Sabuncu A C, Beskok A. Dielectric characterization of costal cartilage chondrocytes[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(1):146-152.

[4] Ron A, Fishelson N, Shur I, et al. The effect of irregularity on the dielectric dispersion characteristics of spherical cellular suspension[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009, 74(1):127-135.

[5] Ron A, Shur I, Daniel R, et al. Dielectric screening of early differentiation patterns in mesenchymal stem cells induced by steroid hormones[J]. Bioelectrochemistry, 2010, 78(2):161-172.

[6] Opel C F, Li J, Amanullah A. Quantitative modeling of viable cell density, cell size, intracellular conductivity, and membrane capacitance in batch and fed-batch CHO processes using dielectric spectroscopy[J]. Biotechnol Prog, 2010, 26(4):1187-1199.

[7] Daoud J, Asami K, Rosenberg L, et al. Dielectric

- spectroscopy for non-invasive monitoring of epithelial cell differentiation within three-dimensional scaffolds[J]. *Phys Med Biol*, 2012, 57(16):5097-5112.
- [8] Wolf M, Gulich R, Lunkenheimer P, et al. Broadband dielectric spectroscopy on human blood[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1810(8):727-740.
- [9] 王力, 马青, 陈林, 等. 人血液介电谱 Cole-Cole 数学模型的解析[J]. *中国生物医学工程学报*, 2010, 29(2): 253-258.
- [10] Frezza F, Mangini F, Muzi M, et al. In silico validation procedure for cell volume fraction estimation through dielectric spectroscopy[J]. *J Biol Phys*, 2015, 41(3):223-234.
- [11] Bharati S, Rishi P, Tripathi S K, et al. Changes in the electrical properties at an early stage of mouse liver carcinogenesis[J]. *Bioelectromagnetics*, 2013, 34(6):429-436.
- [12] 刘国强. 医学电磁成像[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 5-140.
- [13] Foster K R, Schwan H P. Handbook of biological effects of electromagnetic fields[M]. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press, 1996:25-102.

Experimental Study: Dielectric Spectra of Human Gastric Epithelial Cells

SHEN Bin, ZHAO Wei-hong, YANG Yang, BAO Xiu-ling, MA Qing^{*}
(Medicine School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Dielectric spectroscopy of human gastric epithelial (GES-1) cell suspensions is measured using the AC impedance method at the frequency ranging from 0.1 MHz to 100 MHz, and the effect of cell volume fraction on dielectric spectral properties of GES-1 cell suspensions is observed with the real and imaginary part of dielectric spectra and the complex plane plots. The results show three characteristics of the dielectric behavior of GES-1 cell: (1)The frequency dependence that is the permittivity increment($\Delta\varepsilon=\varepsilon-\varepsilon_h$) decreases, while the conductivity increment ($\Delta\kappa=\kappa-\kappa_L$) increases along with the increase of frequency in the whole range; (2)The volume fraction dependence with the maximum permittivity increment ($\Delta\kappa_{\max}=\kappa_h-\kappa_L$), the maximum conductivity increment ($\Delta\kappa_{\max}=\kappa_h-\kappa_L$) and spectral peak (P_1, P_2, P_3) increase along with the increase of cellular volume fraction; (3)Three characteristic frequencies of Dielectric relaxation (f_1, f_2, f_3) are identified originating from the cell membrane (f_1), nuclear membrane (f_2) and cell nucleolus (f_3).

Key words: human gastric epithelial cell(GES-1); cell volume fraction; dielectric spectroscopy; permittivity; conductivity

(责任编辑 史小丽)