

人结肠上皮细胞电阻率谱的数学模型分析

杨 阳, 包秀玲, 杨淑娟, 于冬雁, 廖 聪, 马 青*

(宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用交流电阻抗方法测量了不同浓度人结肠细胞电阻率的实部和虚部. 通过 Cole-Cole 数学模型的数值计算, 对人结肠细胞复电阻率频谱和 Nyquist 图进行曲线拟合, 提取了人结肠细胞的 Cole-Cole 模型参数, 探讨细胞体积分数对人结肠细胞电学性能的影响. 结果表明: 细胞体积分数对人结肠细胞的电阻率频谱和 Nyquist 图皆有影响, 与体积分数呈线性关系的参数为电阻率实部低频值($\text{Re}\rho_L$)、电阻率实部高频值($\text{Re}\rho_H$)、电阻率增量($\Delta\rho = \rho_L - \rho_H$)和电阻率虚部峰值($\text{Im}\rho_p$)等; 特征频率(f_c)与细胞体积分数无关, f_c 来源于细胞膜的界面极化效应, 是人结肠细胞对交流电场响应的标志性参数.

关键词: 人结肠上皮细胞; 电阻率谱; 数学模型

中图分类号: R333.3; Q2.33; Q64 **文献标志码:** A

文章编号: 1001-5132 (2016) 02-0112-04

细胞电阻抗是在不同频率下施予细胞悬浮液的交流电场(压), 测其电流主要依据欧姆定律获得电阻抗谱. 其作为一种有效的分析工具, 已经广泛地应用到多种生物细胞的电学性质研究当中^[1], 这些细胞包括肝癌 SMMC-7721 细胞^[2]、肺鳞癌 SK-MES-1 细胞^[3]、宫颈癌 HeLa 细胞^[4]、乳腺癌细胞^[5-6]以及卵巢癌 SKOV3 细胞^[7]等. 并且, 电阻抗技术在变性黄斑的定量研究^[8]、免疫球蛋白研究^[9]和皮肤损伤检测^[10]等方面也得到了应用.

人结肠上皮 NCM460 细胞易于培养, 转染效率高, 常用于结肠癌研究的对照细胞, 以往对人结肠细胞研究主要在 Wnt-5b 蛋白表达^[11]、增殖与凋亡^[12]、浸润与转移^[13]以及膜蛋白离子通道^[14]等研究, 其电阻率谱研究鲜有报道. 本文采取细胞体外培养和交流电阻率技术, 测量人结肠细胞电阻率谱, 观察细胞体积分数对人结肠细胞电特性影响, 为进一步研究结肠癌细胞电生理变化奠定基础.

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人结肠上皮细胞株 NCM460 购自 INCELL 公

司. 体外培养采用 PPMI-1640 (GIBCO 公司)培养基, 其含 10%小牛血清(Hyclone 公司), 1% 100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和链霉素(GIBCO 公司). 细胞培养环境为 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 体积浓度 5%, 湿度 100%. 细胞经培养传代后, 在无菌条件下, 经胰酶消化, 收集至 15 mL 离心管, 25 $^{\circ}\text{C}$, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 得到高浓度富集细胞悬液.

1.2 测量池^[15]

测量池由透明的有机玻璃圆管两侧嵌入两平行铂片制成, 电极圆盘直径 $d = 3\text{ mm}$, 电极间距 $L = 9.4\text{ mm}$, 容积约 66 μL . 测量温度(25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$.

1.3 电阻率测量

电阻率谱测量由计算机控制的精密电阻抗分析仪(Agilent 4294A)完成. 在 40 Hz~110 MHz 频率范围内选取 201 个点, 每个频率点设定自动循环扫描测量 3 次. 每个细胞样本的测量在 1 min 内完成. 交流激励信号源电压 100 mV, 测量幅值 $|\rho|$ 和相位角 θ , 复电阻率 $\rho^* = |\rho|e^{-j\theta} = \text{Re}\rho - j\text{Im}\rho$, 复电阻率实部 $\text{Re}\rho^* = |\rho|\cos\theta$, 复电阻率虚部 $\text{Im}\rho^* = |\rho|\sin\theta$, 角频率 $\omega = 2\pi f$, 虚部单位 $j = (-1)^{1/2}$, f 为激励信号频率.

收稿日期: 2015-11-04.

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

基金项目: 国家自然科学基金(51277099); 宁波市科技惠民项目(2015C5009).

第一作者: 杨阳(1990-), 男, 山东临沂人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 细胞介电泳的理论模型. E-mail: yangy0124nbu@163.com

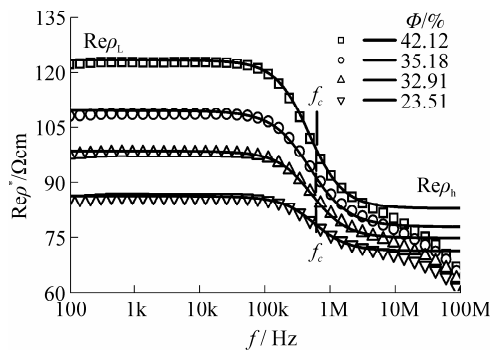
*通信作者: 马青(1962-), 男, 黑龙江佳木斯人, 教授, 主要研究方向: 细胞电生理. E-mail: maqing@nbu.edu.cn

1.4 Cole-Cole 方程

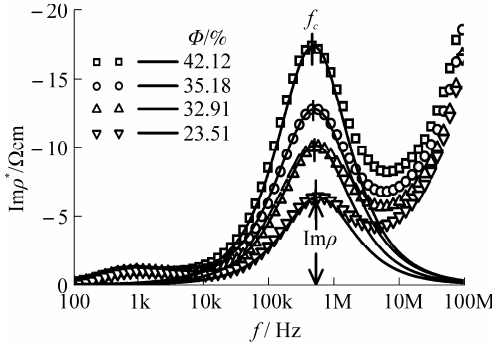
为确定人结肠细胞的电阻率特性, 采用 Cole-Cole 模型^[15]对实验数据进行拟合分析, 方程如下:

$$\rho^* = \rho_h + \frac{\Delta\rho}{1 + (jf/f_c)^\beta}, \quad (1)$$

式中, ρ_h 为电阻率高频值, 是电阻率增量; f_c 为特征频率, 散射角 $0 < \beta < 1$. 非线性数值计算参见文献[16]. 采用(1)式对人结肠细胞电阻率频谱(图1)和 Nyquist 图(图2)进行数值计算得到表1的拟合参数.



(a) 电阻率实部频谱



(b) 电阻率虚部频谱

图1 人结肠细胞电阻率频谱

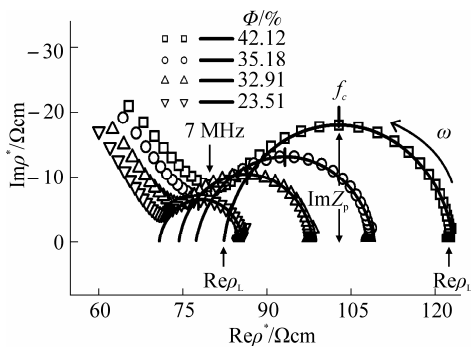


图2 人结肠细胞电阻率 Nyquist 图

1.5 拟合曲线的残差分析

利用非线性最小二乘法对实验数据与拟合曲

表1 人结肠细胞的电阻率谱 Cole-Cole 拟合参数

$\Phi/\%$	$\rho_h/\Omega\text{cm}$	$\Delta\rho/\Omega\text{cm}$	f_c/MHz	β
42.12	82.5	41	0.48	0.92
35.18	77.5	32	0.50	0.88
32.91	74.5	24	0.52	0.92
23.51	71.0	15	0.52	0.92

线进行残差分析, 确定最小残差:

$$R(x) = \frac{1}{n} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (D - D_{\text{cal}})^2}{D_{\text{max}} - D_{\text{min}}}} \times 100\%, \quad (2)$$

$x = \text{Re}\rho^*, \text{Im}\rho^*,$

式中, D 和 D_{cal} 为实测数值和由(1)式计算所得的理论数值, D_{max} 和 D_{min} 为实测值的最大值和最小值.

2 结果与讨论

2.1 人结肠上皮细胞电阻率谱及其拟合曲线

图1(a)是人结肠细胞电阻率实部($\text{Re}\rho^*$)与频率的关系曲线. 结果显示, 随着频率增加, 电阻率由电阻率低频值($\text{Re}\rho_L$)逐渐减小至电阻率高频值($\text{Re}\rho_h$), 表现出较大的弛豫过程. 原因在 $f < 100$ kHz 较低频率电场作用细胞时, 诱导出细胞极化, 即细胞膜电容呈开路, 电阻率较大, 电流在低电阻率细胞外区域流动; 随电场频率增加, 细胞的极化状况逐步减小; 当 $f > 10$ MHz 较高频率电场作用细胞时, 细胞极化状况极低, 细胞膜呈现短路, 电阻抗($Z_C = 1/j\omega C$)较小, 电流极易流过细胞内, 故表现出低频高电阻率、高频低电阻率的弛豫过程^[2]. 另外, 随着细胞体积分数(Φ)的增大, 电阻率幅值(ρ_L, ρ_h)增大, 电阻率增量($\Delta\rho = \rho_L - \rho_h$)也增加, 并呈现正相关. 其原因是随着细胞体积分数的增加, 细胞数量也增加, 细胞膜的极化强度和密度随之增加, 因此, $\rho_L, \rho_h, \Delta\rho$ 皆增加. 据此特点, 无标记细胞增殖检测技术得到了应用^[17].

图1(b)所示为人结肠细胞的电阻率虚部($\text{Im}\rho^*$)与频率(f)的关系曲线. 结果显示, 随频率增加, 电阻率虚部表现出不同特征, 即在 $f = 100$ Hz~10 kHz 范围, $\text{Im}\rho^*$ 接近零; 在 $f = 10$ kHz~10 MHz 范围, $\text{Im}\rho^*$ 出现明显的山峰型弛豫, 其峰值频率是中心特征频率 f_c , 峰顶点到横坐标的落差是电阻率虚部峰值($\text{Im}\rho_p$); 在 $f = 10$ ~100 MHz 范围, $\text{Im}\rho^*$ 值上扬. 细胞属于非均匀电介质, 电场致细胞极化, 产生电位移, 虚部跟不上电场频率的变化,

产生电位移与电场强度之间的位相差. 当交流电场作用细胞膜时, $\text{Im}\rho^*$ 出现峰值 $\text{Im}\rho_p$, 表明细胞膜对交流电场的响应特性, 称为特征频率(Characteristic Frequency). 在不考虑负号的情况下, $\text{Im}\rho_p$ 值随细胞体积分数增加而增大.

2.2 人结肠细胞电阻率复平面图及其拟合曲线

图 2 为不同体积分数结肠细胞的 Nyquist 图, 又称复电阻率平面图. 此图呈现由低频到中频的半圆弧轨迹和高频的翘尾现象. 复电阻率(ρ^*)由实部($\text{Re}\rho^*$)和虚部($\text{Im}\rho^*$)组成, 实部系电阻, 虚部系容抗. 在 10 kHz~7 MHz 范围内, 细胞膜极化效应引起电容性变化的 β 散射, 即 Maxwell-Wagner 效应^[18], 在图中表现成半圆弧特征, 故采用单项 Cole-Cole 公式对实验数据进行拟合分析. 右截距是电阻率低频值($\text{Re}\rho_L$), 左截距是电阻率高频值($\text{Re}\rho_h$), 圆弧顶点到横轴距离是电阻率虚部峰值($\text{Im}\rho_p$), 圆弧峰值对应频率称为中心特征频率 f_c . f_c 与细胞体积分数的方程: $f_c = -0.2 - 0.0031\Phi$. 其斜率极低(0.0031), 直线方程与横坐标轴近乎平行, 说明特征频率与细胞体积分数无关. 随着细胞体积分数的增加, 圆弧曲线整体右移并扩展, 其半径和面积增大, $\text{Re}\rho_L$ 和 $\text{Im}\rho_p$ 皆增加. 从表 2 可知, 100 Hz~100 MHz 频段的拟合残差明显大于 100 Hz~10 MHz 的残差值, 表明曲线拟合误差主要来源于 10~100 MHz 的高频段.

表 2 人结肠细胞电阻率谱的拟合残差

$\Phi/\%$	100 Hz~10 MHz		
	$R(\text{Re}\rho^*)/\%$	$R(\text{Im}\rho^*)/\%$	$R(\text{sum})/\%$
42.12	0.11	0.58	0.69
35.18	0.13	0.49	0.63
32.91	0.11	0.52	0.63
23.51	0.11	0.45	0.56
$\Phi/\%$	100 Hz~100 MHz		
	$R(\text{Re}\rho^*)/\%$	$R(\text{Im}\rho^*)/\%$	$R(\text{sum})/\%$
42.12	0.49	1.74	2.23
35.18	0.45	1.67	2.12
32.91	0.52	1.66	2.18
23.51	0.61	1.60	2.21

2.3 细胞体积分数对人结肠细胞特征参数的影响

图 3 为人结肠细胞的电阻率谱拟合参数(f_c 、 $\Delta\rho$ 、 $\text{Re}\rho_h$ 、 $\text{Re}\rho_L$ 、 $\text{Im}\rho_p$)与细胞体积分数间的

散点情况. 在不考虑负号的情况下, 4 个指标($\Delta\rho$ 、 $\text{Re}\rho_h$ 、 $\text{Re}\rho_L$ 、 $\text{Im}\rho_p$)随 Φ 增加而增大. 其线性回归方程分别为: $\Delta\rho = -16.9 + 1.36\Phi$, $\text{Re}\rho_h = 51.61 + 0.76\Phi$, $\text{Re}\rho_L = 34.73 + 2.12\Phi$, $\text{Im}\rho_p = 7.71 - 0.6\Phi$. 其原因在于细胞膜由脂质双分子层构成, 本身离子透过性很低, 可视为非导电壳. 由于细胞膜对低频电流具有阻碍作用, 细胞量的增多相当于增大了细胞系的电阻, 所以 $\Delta\rho$ 、 $\text{Re}\rho_h$ 和 $\text{Re}\rho_L$ 增大; 另外, 在 100 kHz~10 MHz 的射频段, 因细胞膜极化引起的 β 散射是由于极化强度跟不上电场变化而产生的相位差, 当电场频率等于特征频率时, 细胞的电阻率虚部达到了瞬间的饱和值形成 $\text{Im}\rho_p$ (图 2), 而 $\text{Im}\rho_p$ 可被视为细胞在交变电场中的“损失”成分, 通常以热能方式体现出来. 当细胞量增多时, 这种“损失”增大.

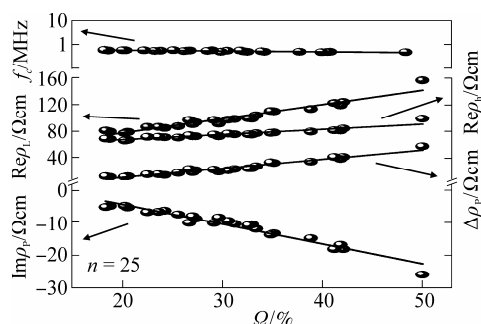


图 3 细胞特征参数与体积分数之间的关系

3 结论

利用 Cole-Cole 数学模型对人结肠细胞电阻率谱的分析可以得到其电生理学特性. Cole-Cole 数学模型可以表征人结肠细胞电阻率谱; Cole-Cole 模型参数($\Delta\rho$ 、 $\text{Re}\rho_h$ 、 $\text{Re}\rho_L$ 、 $\text{Im}\rho_p$)随细胞数量(体积分数)的增加而增加; 特征频率(f_c)可作为鉴别细胞的频域电生理指标. 正常的人结肠细胞通常作为结肠癌的对照细胞来使用, 表征人结肠细胞的电学特性为进一步探讨结肠癌细胞电生理变化提供帮助, 具有重要的学术价值和理论意义.

参考文献:

- [1] MANSOR M A, AHMAD M R. Single cell electrical characterization techniques[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(6): 12686-12712.
- [2] 方云, 汤治元, 张倩, 等. 人肝癌细胞电阻抗特性的实验研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2014, 31:1070-1074.

- [3] 张倩, 方云, 董长征, 等. 人肺鳞癌细胞电阻抗谱测量实验研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2015, 34:114-118.
- [4] CAVIGLIA C, ZÓR K, CANEPA S, et al. Interdependence of initial cell density, drug concentration and exposure time revealed by real-time impedance spectroscopic cytotoxicity[J]. Analyst, 2015, 140(10):3623-3629.
- [5] QIAO G F, WANG W, DUAN W, et al. Bioimpedance analysis for the characterization of breast cancer cells[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2012, 59(8): 2321-2329.
- [6] SILVA J G, CÁRDENAS R A, QUIRÓZ A R, et al. Impedance spectroscopy assisted by magnetic nanoparticles as a potential biosensor principle for breast cancer cells[J]. Physiol Meas, 2014, 35(6):931-941.
- [7] VENKATANARAYANAN A, KEYES T E, FORSTER R J. Label-free impedance detection of cancer cells[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(4):2216-2222.
- [8] GAMAL W, BOROOAH S, SMITH S, et al. Real-time quantitative monitoring of hiPSC-based model of macular degeneration on electric cell-substrate impedance sensing microelectrodes[J]. Biosens Bioelectron, 2015, 71:445-455.
- [9] OHNO R, OHNUKI H, WANG H, et al. Electrochemical impedance spectroscopy biosensor with interdigitated electrode for detection of human immunoglobulin A[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 40(1):422-427.
- [10] WHITE E A, ORAZEM M E, BUNGE A L. Characterization of damaged skin by impedance spectroscopy: Mechanical damage[J]. Pharm Res, 2013, 30(8):2036-49.
- [11] 刘伟, 周兵, 张红, 等. Wnt-5b 在结肠癌中的表达及对结肠癌细胞的影响[J]. 生命科学研究, 2013, 17(5):427-430; 446.
- [12] 张青松. MTA 对人结肠和结肠癌 RKO 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(5):468-469.
- [13] YANG B, TAN Z, SONG Y. Study on the molecular regulatory mechanism of MicroRNA-195 in the invasion and metastasis of colorectal carcinoma[J]. Int J Clin Exp Med. 2015, 8(3):3793-3800.
- [14] SOBRADILLO D, HERNÁNDEZ M M, UBIERNA D, et al. A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STIM2) contributes to Ca^{2+} remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2014, 289(42):28765-28782.
- [15] 沈斌, 赵伟红, 杨阳, 等. 人胃粘膜上皮细胞介电谱的研究[J]. 宁波大学学报(理工版), 2015, 28(3):103-107.
- [16] 宫宇, 马青, 陈林, 等. 尾吊大鼠血液细胞电阻抗谱的 Cole-Cole 模型分析[J]. 航天医学与医学工程, 2012, 25(4):243-246.
- [17] 赵灵芝, 张成孝. 交流阻抗法在细胞分析中的应用的研究进展[J]. 化学通报, 2015, 78(1):23-28.
- [18] FOSTER K R, SCHWAN H P. Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical Review[J]. Crit Rev Biomed Eng, 1989, 17(1):25-104.

Analysis: Mathematical Model of Resistivity Spectra of Human Colonic Epithelial Cells

YANG Yang, BAO Xiu-ling, YANG Shu-juan, YU Dong-yan, LIAO Cong, MA Qing*
(The Medicine School, Ningbo University, Ningbo 351211, China)

Abstract: The real and imaginary parts of the resistivity of human colonic epithelial cells in different concentrations are measured using the AC electrical impedance. The Cole-Cole mathematical model parameters of colonic epithelial cells are extracted by curve fitting in the complex resistivity spectra and the Nyquist diagram. Also discussed is the effect of cell volume fraction on the electrical properties of colonic epithelial cells. The results show that the cell volume fraction has an effect on the resistivity spectra and Nyquist diagram of the human colon cells, and the parameters of the linear relationship with the volume fraction possess the low frequency and high frequency components of the resistivity ($\text{Re}\rho_L, \text{Re}\rho_h$), the increment of resistivity ($\Delta\rho = \rho_L - \rho_h$) and the peak value of the imaginary part of the resistivity ($\text{Im}\rho_p$). Also found is that the characteristic frequency (f_c) is not related to the cell volume fraction, which originates from the interface polarization of the cell membrane, and is a marker of the colonic epithelial cells, which represents a sign of the response to the AC electric field.

Key words: human colonic epithelial cells; resistivity spectroscopy; mathematical model

(责任编辑 章践立)