扫描电化学显微镜在生物医学领域的应用研究进展

李亚北^{1,2}, 叶朝阳^{2,3}, 刘禹霖^{2,3}, 赵宇翔^{2,3}, 翟阳^{2,3,4}, 朱彤^{2,3,5}, 徐峰^{2,3}, 李菲^{2,3*}

1. 西安交通大学化学学院, 西安 710049

2. 西安交通大学仿生工程与生物力学研究所(BEBC), 西安 710049

3. 西安交通大学生命科学与技术学院, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安 710049

4. 陕西省肿瘤医院肿瘤内科, 西安 710061

5. 西电集团医院心内科, 西安 710077

*通讯作者, E-mail: feili@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-10-22; 接受日期: 2020-11-17; 网络版发表日期: 2020-12-10

国家自然科学基金(编号: 21775117)、陕西自然科学基金基础研究计划(编号: 2020JC-06)和中央高校基本科研业务费(编号: PY3A081, xjh012019044)资助项目。

摘要 研究病变细胞和组织的异常表现可为理解重大疾病发生发展的病理机理和新型药物筛选提供重要参考。扫描电化学显微镜(Scanning electrochemical microscopy, SECM)是一种基于电化学原理的扫描探针显微镜, 通过记录探针在样品表面扫描时的电流或电位等信息, 对活细胞的形态和多种化学信息进行原位、实时、精准表征。近10年来, SECM在重大疾病相关的细胞、细胞球和微组织层次的应用研究得到快速发展。本文从与疾病相关的SECM研究角度入手, 分别从单细胞、细胞球和微组织层次小结SECM近10年来在生物医学领域的应用研究进展。首先介绍SECM的仪器组成、探针种类和工作模式, 其次分别介绍SECM在神经细胞、心肌细胞和肿瘤细胞的应用进展, 之后介绍SECM近期在细胞球和微组织的最新应用, 最后提出并展望SECM技术在生物医学领域进一步应用所面临的挑战和发展方向。

关键词 扫描电化学显微镜, 神经细胞, 心肌细胞, 肿瘤细胞, 细胞球, 微组织

1 引言

神经系统疾病、心血管疾病和癌症是目前影响全球公众健康的三大主要疾病, 每年的新发病率和死亡率呈逐年上升趋势^[1~3]。疾病病变部位的细胞和组织的形貌、细胞膜表面蛋白表达和化学微环境等均与正常细胞相比有明显差异, 研究病变细胞或组织的异常表

现可为理解疾病发生发展的病理机理和药物开发提供重要参考。目前有关疾病的研究主要包括在体(*in vivo*)和离体(*in vitro*)两个方面, 体外培养疾病模型, 从单细胞和微组织层次原位、实时、动态、精准研究与疾病相关的细胞行为和生化信息等可更好地理解细胞间的异质性以及细胞与细胞间的相互联系, 揭示疾病的发生发展机制和筛选潜在的药物。但传统的细胞表征技

引用格式: Li Y, Ye Z, Liu Y, Zhao Y, Zhai Y, Zhu T, Xu F, Li F. Research advances of scanning electrochemical microscopy in biomedical field. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 337–358, doi: 10.1360/SSC-2020-0205

术如光学显微镜(如相差显微镜、荧光显微镜)、电子显微镜(如扫描电子显微镜、透射电子显微镜)和膜片钳技术等存在非原位、非实时、有损样品或不可逆表征等问题, 另外研究细胞发生化学信息传递功能时所分泌的物质组成、含量及作用机制可为理解疾病的发生、发展及防治提供细胞化学信息的重要参考, 对细胞和微组织的研究技术提出了新的需求。

近些年, 随着电子技术、微纳制造技术和生物技术等的快速发展, 多种单细胞分析技术被用于体外研究单细胞和微组织。扫描电化学显微镜(Scanning electrochemical microscopy, SECM)是一种基于电化学原理的扫描探针显微镜, 使用超微电极(ultramicroelectrode, UME)作为探针, 通过记录探针在样品表面扫描时的氧化还原电流或电位等信息, 可在生理条件下(如细胞培养液中)对活细胞的形态和多种生化和生理参数进行原位、实时表征。SECM无需对样本进行固定、染色等预处理, 可实现对活细胞非接触地扫描和检测, 并且微/纳米尺度的超微电极作为SECM探针使其具备微/纳米的空间分辨率和高的时间分辨率, 可实现对细胞表面微结构、细胞内/外化学物质和界面快速反应过程等研究, 成为传统细胞表征技术的有力补充。自1990年SECM第一次被用于表征植物细胞的呼吸作用以来^[4], 历经30年的发展, 基于其原位无损的扫描特征和精准电化学信息的采集功能, SECM已被广泛用于各种细胞的形貌和各类化学信息的研究中^[5], 如表征细胞的形貌^[6]、活性^[7]、氧化状态^[8,9]和细胞膜表面蛋白等^[8-10]。例如, Matsue课题组应用SECM检测了人宫颈癌HeLa细胞^[11]、人乳腺癌细胞MCF-7细胞^[12]和小鼠胚状体中^[13]的碱性磷酸酶等, Mauzeroll课题组^[14]应用SECM量化了人宫颈癌HeLa细胞多药耐药蛋白MRP1的活性, 建立了细胞耐药性活动的量化指标。此外, SECM还被用于研究环境刺激产生的细胞响应行为(如活性氧的释放), 如Ding课题组^[15]利用SECM对膀胱癌T24细胞外的ROS浓度分布进行了电化学成像, 实现了对细胞释放H₂O₂和细胞形态变化动态过程的可视化表征。

近10年, 伴随着重大疾病机理、组织工程和药物筛选等研究对体外模型和单细胞原位表征技术的需求, SECM在细胞方面的应用研究也从传统的细胞形貌表征、化学物质检测拓展到对细胞氧化状态、细胞膜蛋白表达表征等方面。并且, 基于各种纳米电极和微

流控技术的发展以及与其他细胞表征技术(如荧光显微镜)的联用, SECM在细胞生物学领域的研究对象也从细胞外拓展到细胞内^[16], 从细胞电化学信息的捕捉到细胞内物质荧光的同时成像^[8], 并从单细胞拓展到细胞球^[12]和微组织^[17]领域。在此背景下, 本文按照神经系统疾病、心血管疾病和癌症三类疾病分类, 分别从单细胞到细胞球和微组织层次小结SECM在近10年来在生物医学方面的应用研究进展(图1)。首先介绍了SECM的仪器组成、探针种类和工作模式, 其次按细胞种类分别介绍了SECM在神经细胞、心肌细胞和肿瘤细胞的应用研究进展, 之后介绍了SECM在细胞球和微组织的最新应用以及SECM与其他技术联用的最新进展, 最后提出并展望了SECM在生物医学领域进一步应用所面临的挑战和发展的方向。希望通过本文的介绍为从事生物医学领域研究的科研人员介绍SECM的新方法, 为从事疾病病理和药物筛选等研究的科研人员提供可原位、实时、动态表征细胞和细胞球/微组织等化学信息的SECM新技术, 为从事SECM研究的科研人员介绍SECM在生物医学领域的最新应用。

2 SECM的组成和原理

2.1 SECM的组成

如图2, 传统的SECM系统主要包括电化学测试系统、三维定位系统和计算机操作系统三部分^[18,19]。其中, 电化学测试系统包括三电极测试系统(工作电极(SECM探针)、参比电极、对电极)、电化学池和双恒电位仪。探针为微米或纳米电极, 用于记录溶液中探针表面电化学反应的法拉第电流或电位, 双恒电位仪用于控制和采集探针电极上的电流、电位等信息; 三维定位系统包括步进电机和压电控制系统, 分别用于从大量程和微/纳米尺度精准控制探针与待测样品基底间的相对位置以及对样本进行扫描。

为满足SECM在生物领域(如细胞表征)的应用研究需求, 根据实验需要, SECM的主体系统还需搭配一些细胞表征组件(图2)。例如, 为记录探针与细胞位置和观察细胞形貌, SECM系统中需加入倒置光学显微镜; 为对细胞进行电化学表征的同时对细胞进行荧光成像, SECM系统中可配置倒置荧光显微镜或荧光成像系统^[20]; 为实现对活细胞样本的长时间观测, SECM

图 1 SECM在单细胞、细胞球和微组织领域的应用研究示意图^[15,52,64,84] (网络版彩图)

Figure 1 Schematic diagram of applications of SECM in studies of single cell, cell spheroid and microtissue ^[15,52,64,84] (color online).

图 2 用于细胞研究的SECM系统装置示意图 (网络版彩图)

Figure 2 Schematic diagram of the SECM system for cell studies (color online).

系统与活细胞工作站结合用以控制细胞生长环境的温度、湿度和气氛等条件^[21]; 为实现细胞局部给药并记录细胞对药物响应的电化学信号, SECM系统可配置微管注射系统和微操作手^[22]; 为避免SECM表征中细胞形貌对其化学检测信号的干扰, 可使用剪切力(shear

force)模块控制SECM探针对细胞样品表面的距离, 实现对细胞样本表面的“恒距离”扫描^[23]. 另外, 在使用纳米电极作SECM探针对细胞表面进行亚微米和纳米尺度的高分辨电化学成像时, SECM系统需配防震台和电磁干扰屏蔽装置, 用以屏蔽机械震动和电磁等对探针电流的干扰. 为进一步拓展SECM在生物医学领域的应用范围, SECM还可与其他表征技术联合使用, 如SECM-AFM(原子力显微镜)^[24]、SECM-SICM(扫描离子电导显微镜)^[25]、SECM-NSOM(近场扫描光学显微镜)^[23]等, 实现对细胞化学信息、力学信息、光学等信息的同时表征.

2.2 探针

SECM的电化学实验在包括工作电极(SECM探针)、辅助电极和参比电极的三电极体系下进行. 所有尺度上均呈现稳态循环伏安行为, 它的电化学理论建立在多维扩散基础之上, 具有常规电极无法比拟的电化学特性, 如欧姆降小、快速的表面传质过程和响应时间等. 在细胞的应用研究中, SECM常使用直径1~25 μm 的微米电极或<100 nm的纳米电极作为其探针, 材质包括贵金属电极、碳电极和玻璃管电极, 按照检测对象的数目又可分为单通道微电极和多通道微电极^[26]. 下面按照以上分类介绍几种SECM在细胞表征

中的常用电极。

2.2.1 微米电极

由于细胞大小(通常5~30 μm)和电极表面物质的扩散距离, SECM常使用直径1~25 μm 的圆盘电极作为其探针, 以实现对小空间中细胞消耗或释放电活性物质的检测需求, 电极材料包括贵金属、碳纤维和玻璃毛细管三种。另外, 针对单目标物和多目标物的不同检测需求, 可选择单通道微电极或多通道微电极作SECM探针。在SECM的细胞实验中, 根据细胞尺寸和检测物质的不同选择不同尺寸和材料的微电极做SECM探针。

(1) 单通道微电极

SECM探针主要分为固体微电极(包括贵金属电极和碳微电极)和玻璃管微电极两类。针对单一检测目标物, 主要使用单通道微电极。下面介绍在SECM细胞研究中常用的铂微电极、碳纤维微电极和玻璃管微电极的三种微电极。

1) 铂微电极: 在SECM的细胞研究中, 直径1~25 μm 的铂圆盘微电极最为常用。其主要采用熔焊法和胶粘法两种方法制备: 将铂丝(直径1~25 μm)置于拉制的玻璃管锥形尖端, 电阻丝加热的同时抽真空使玻璃熔融并将铂丝密封在玻璃管尖端, 之后将铂丝后端与导线相连, 含铂丝的玻璃管前端打磨剖光即得铂微电极^[27]。另外, 近些年等离子轰击法和刻蚀涂层法等也被用于铂微电极的制备中。由于铂具有贵金属惰性, 铂微电极具有表面易处理且不易吸附污染、结果重现性好、稳定性高等优点, 并且关于铂圆盘微电极的理论研究也较成熟。另外, 鉴于铂对氧气还原和 H_2O_2 氧化反应具有催化作用, 铂微电极常被直接用于检测细胞周围的溶解氧^[21,28]和外排或消耗的活性氧物质(如 H_2O_2)等^[15,20](图3(a)), 并且可进一步通过对铂微电极表面修饰(如用酶或纳米材料)拓宽铂微电极检测物质的种类、提高其检测灵敏度。例如, 通过在铂微电极上修饰葡萄糖氧化酶或乳酸氧化酶可提高其对细胞代谢活性(如葡萄糖摄取量)的检测特异性和抗干扰能力^[29,30], 在铂微电极上修饰纳米材料(如石墨烯、碳纳米管)可进一步提高其对细胞代谢产物(如 H_2O_2)的检测灵敏度^[31,32]。

2) 碳纤维微电极: 在细胞的表征应用中, 直径5~12 μm 的碳纤维微电极也常被用作SECM探针。其制

备方法与铂微电极制备方法类似, 采用密封法制备: 将单根碳纤维置于拉制的玻璃管锥形尖端内, 高温密封玻璃管前端并在碳纤维后端连接外电路导线, 即得碳纤维微电极。相比于铂微电极, 碳纤维微电极在阳极区具有更宽的电势检测范围, 有利于检测水溶液体系中高过电位的物质及其快速的电化学反应过程, 如对脑组织中神经递质(如色胺和血清素)及其传递过程的检测^[33]。另外, 使用碳纤维微电极也可检测神经细胞突触间的神经递质的传递^[34,35]。对于非电活性生物分子(如乙酰胆碱), 可使用酶修饰的碳纤维微电极对其进行检测^[36]。但碳纤维微电极具有高的双电层电容, 因此其检测中的背景电流较高, 使得记录的电流信号的信噪比较低, 可通过对碳纤维微电极进行纳米材料等(如碳纳米管)的修饰提高其检出限^[37]。

3) 玻璃管微电极: 玻璃管微电极是生物体系电化学检测(如微区、活体、现场实时检测)和SECM的常用探针, 将玻璃管微电极与适当的配体组成可得到离子选择性超微电极, 如 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 等离子选择性电极和活体pH电极等^[38]。常用的玻璃管微电极由玻璃管、电解质溶液和金属丝三部分组成, 其制备先将玻璃毛细管通过热熔拉制法或激光拉管机拉制, 之后注入电解质溶液(或液体离子交换剂), 最后插入参比电极(如 Ag/AgCl 电极)的三步法完成。使用玻璃管微电极做SECM探针研究细胞时, 在微电极上施加一定电位诱导电活性物质从细胞培养液转移到探针电解质溶液中, 通过记录微电极电流和电位等变化实现对电活性物质的定量检测。除了检测传统电子转移的氧化还原反应, 玻璃管微电极还可实现对非氧化还原活性物质(如离子)的检测。并且相比于固体微电极, 玻璃管微电极具有制备工艺简单、电极尺寸易控等特点, 常用于定量分析细胞的离子、神经元释放的电化学活性和非电化学活性的神经递质等^[33]。如Shen课题组^[39]拉制了直径为750~860 nm的亚微米玻璃管电极(图3(b)), 玻璃管内灌注1-二氯乙烷电解质溶液, 利用电势驱动离子穿过液/液界面时的电流变化成功定量分析了单个神经元乙酰胆碱释放的动态速率, 研究了脑组织中神经元的交流模式。

(2) 双通道微电极

为满足细胞多参数同时表征的需要, 可使用多通道微电极作为SECM探针。按照形状分类, 双通道微电极主要包括“0型”和环状双通道电极两种。其中最常用

图 3 用于细胞研究的SECM探针(超微电极)示例。(a) 直径25 μm的铂圆盘微电极^[53];(b) 玻璃管微电极^[39];(c) 碳/玻璃微管双通道电极^[40];(d) 金/玻璃微管微圆环双通道电极^[25];(e) 直径114 nm的铂纳米电极^[51];(f) 玻璃管纳米电极^[52] (网络版彩图)

Figure 3 Examples of SECM probes (*i.e.*, ultramicroelectrodes) used for cell studies. (a) 25 μm-in-diameter Pt disc microelectrode ^[53]; (b) micropipette electrode ^[39]; (c) glass micropipette/carbon dual microelectrode ^[40]; (d) Au/micropipette microring dual microelectrode ^[25]; (e) 114 nm-in-diameter Pt nanoelectrode ^[51]; (f) nanopipette electrode ^[52] (color online).

的是适用于SECM与扫描离子电导显微镜(SICM)联用的“0型”双通道微电极。其中一个通道是基于SICM原理的玻璃管微电极,通过电势诱导离子迁移形成离子电流记录离子电导的变化,从而反馈控制探针相对于细胞的位置并实现对细胞形貌的表征,另一通道多为碳纤维或贵金属微电极,用作SECM探针检测氧化还原反应过程。根据电极材料的不同,“0型”双通道微电极主要包括碳/玻璃管双通道微电极和铂/玻璃管双通道微电极两种。其中碳/玻璃管双通道微电极的制备使用激光拉管机拉制Theta玻璃管成尖端为锥形的“0”微管,控制碳源(如丁烷气体)气流进入其中一个管路,并通过加热方式使碳源气体裂解并在玻璃壁沉积碳层,经过导线连接和封装完成电极的制备。例如,Unwin课题组^[40]使用气相沉积法制备了总直径为150 nm的碳/玻璃管双通道微电极(图3(c)),通过玻璃微管通道实现分子传输、碳微电极通道用于电化学检测,实现了在

亚细胞水平对玉米根毛细胞摄取 $\text{Ru}(\text{NH}_6)\text{Cl}_3$ 分子速率的成像。铂/玻璃管双通道微电极可通过在碳/玻璃管双通道微电极基础上对其中的碳微电极表面应用电化学沉积法进一步沉积铂层制备。例如,Matsue课题组^[41]制备了直径为1.25 μm的铂/玻璃管双通道微电极作SECM探针,实现了对表皮鳞癌细胞(A431)样品表皮生长因子受体(EGFR)蛋白表达的高选择性和高灵敏检测。

环状双通道微电极主要包括铂、金和碳圆环电极,其制备可通过激光拉管机将单通道玻璃管拉制为锥形尖端的玻璃微管,使用喷镀、溅射或气相沉积等方法在玻璃管外层镀上导电层(如铂、金或碳)和绝缘层,再将导线与导电层连接,封装即得环状双通道微电极^[42-46](图3(d))。环状双通道微电极常单独用作SECM实验或SECM与SICM联用的实验,实现对细胞化学信息和细胞形貌的同时表征^[47]。

2.2.2 纳米电极

为进一步提高SECM检测的时空分辨率,并在尽量对细胞损伤小的情况下实现对细胞内物质的原位电化学检测,研究者们制备了不同种类的纳米电极用作SECM探针,包括固体纳米电极和玻璃管纳米电极^[48-50]。固体纳米电极主要包括贵金属纳米电极(如Pt)和碳纳米电极两种。其中,铂纳米电极的制备通过将微米Pt丝(如直径10~25 μm)置于玻璃管内中间位置,使用激光拉管机加热并从两端对玻璃管施加拉力,使玻璃管和Pt丝熔融的同时在拉力下Pt丝形成纳米尺寸的锥形尖端即得铂纳米电极;碳纳米电极的制备方法同样使用激光拉管机将玻璃管拉制成锥形尖端尺寸为纳米尺寸的玻璃管,然后用化学气相沉积法在尖端内部沉积碳层得到碳纳米电极。例如, Mirkin课题组^[16,51]分别制备了直径为144 nm的铂纳米电极(图3(e))和直径为80 nm的碳纳米电极,实现了对人上皮胸腺上皮细胞(MCF-10A)表面结构的高分辨电化学成像和细胞内的ROS/RNS物质的定量检测。

玻璃管纳米电极与玻璃管微电极的制备方法类似,唯一区别是通过激光拉管机将玻璃毛细管拉制成尖端为纳米尺寸的玻璃管。由于玻璃管纳米电极尺寸约为细胞尺寸的1/1000~1/100,可几乎无损地插入细胞膜内,可在亚细胞尺度上实现对细胞内氧化还原物质和离子等的原位、实时检测。例如, Chen课题组^[52]制备了直径15 nm的玻璃管纳米电极用于检测神经元突触位置的乙酰胆碱浓度和释放的动力学(图3(f))。

注意在使用纳米电极做SECM探针时,由于纳米电极易受静电作用和物理震动的影响而破坏,并且在细胞检测中易被溶液物质或细胞物质的污染,因此其使用时需要包括防震系统和电磁屏蔽系统等更严格的SECM实验环境。另外,实验中因为需要将纳米电极保持在距离待测样本表面纳米尺度的距离范围内才能实现检测,因此需要高精度和高稳定性的定位系统辅助SECM实验。

2.3 工作原理

SECM在生物体系研究应用时,通过SECM探针记录细胞表面溶液中的氧化/还原介质的法拉第电流/电位等信息可得到细胞/溶液界面间的氧化还原反应过程信息,分析可得到细胞的形貌、活性和界面反应动

力学等信息。相比于使用常规“大”电极(毫米尺寸)作为工作电极的电化学方法,SECM使用具有球形扩散场快速传质过程的微/纳米电极作探针,可实现稳态条件下对细胞界面快速氧化还原反应过程的检测,并通过将实验得到的探针渐进曲线与多物理场耦合分析软件建立的界面反应模型拟合,得到细胞界面反应动力学常数等信息,进一步分析可得到细胞界面反应的机理等。下面以SECM细胞应用研究为例,介绍SECM常用的三种工作模式:正负反馈模式(图4(a~c))、产生/收集模式(图4(d, e))和氧化还原竞争模式(图4(f))。

2.3.1 正负反馈模式

以溶液中开始存在还原物质R为例介绍SECM的反馈工作模式。基本原理如图4,当SECM探针和待测样本同时浸没在含有还原介质R的电解质溶液中,当探针上施加R的氧化电位,R在探针表面发生氧化反应生成O,产生法拉第电流(i_T)。当待测样本与探针表面的距离(d)大于10倍的探针电极半径(a)时(图4(a)),探针上记录的是R在主体溶液中氧化反应的稳态扩散电流 $i_{T,\infty}$,其值可用公式(1)表示^[54]。

$$i_{T,\infty} = 4nFDCa \quad (1)$$

其中 n 是R氧化反应的转移电子数, F 是法拉第常数, D 是R在溶液中的扩散系数, C 是R在溶液中的起始浓度, a 为探针电极的半径。探针电流值(i_T)受电极表面的氧化还原反应、待测样品性质(如导体、半导体、绝缘体)和化学活性以及探针/待测样本间的距离等影响。当探针向导电基底渐进时,探针表面由R氧化生成的O被基底可重新氧化为R,增加R向探针的传质过程使 i_T 上升,该过程称为“正反馈”模式(图4(b));当探针向绝缘基底渐进时,本体溶液中R向探针的传质过程被基底阻碍,使 i_T 下降,该过程称为“负反馈”模式(图4(c))。

SECM的细胞实验中,正反馈模式常被用于研究细胞的氧化还原活性。例如,向待测细胞电解液中加入可透过细胞膜的氧化还原介质(如二茂铁甲醇(FcCH_2OH)),并在探针上施加 FcCH_2OH 的氧化电位, FcCH_2OH 会在SECM探针表面氧化成其氧化态 $[\text{FcCH}_2\text{OH}]^+$ 。当探针向细胞表面渐进时,探针表面生成的 $[\text{FcCH}_2\text{OH}]^+$ 扩散至细胞表面时被细胞产生的还原性分子(如谷胱甘肽(glutathione , GSH))重新还原为 FcCH_2OH ,

图 4 SECM用于细胞研究的三种主要工作模式的示意图和细胞表征应用原理示意图: (a) 探针在远离基底的本体溶液中(稳态时); (b) 正反馈模式; (c) 负反馈模式; (d) 探针产生/基底收集模式; (e) 基底产生/探针收集模式; (f) 氧化还原竞争模式; (g) 反馈模式用于细胞GSH状态的检测; (h) 反馈模式用于细胞形貌的表征; (i) 基底产生/探针收集模式用于细胞外排ROS检测(网络版彩图)

Figure 4 Schematic diagram of the three SECM operational modes and the principles for characterizations of cells. (a) The probe is in the bulk solution and far away from the substrate (steady-state behavior); (b) positive feedback mode; (c) negative feedback mode; (d) probe generation/substrate collection mode; (e) substrate generation/probe collection mode; (f) redox competition mode; (g) feedback mode for detection of cell GSH status; (h) feedback mode for characterization of cell morphology; (i) substrate production/probe collection mode for detection of ROS efflux of cells (color online).

使探针电流 i_T 上升, 形成“正反馈”^[55](图4(g)). 通过对探针电流 i_T 的数值分析可得到细胞GSH的外排通量. SECM的负反馈模式多被用于细胞形貌的表征. 例如在溶液中加入不透过细胞膜且不与细胞外排物质发生反应的氧化还原介质(如三氯化六氨合钌($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$)), 当探针施加 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 的还原电位并向细胞表面渐进时, 本体溶液中的 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 向探针方向的传质被细胞表面阻碍, i_T 下降. 鉴于 i_T 随探针-细胞间距离 d 而变化, 通过记录细胞上方的不同位置 i_T 可得到细胞形貌的信息^[8](图4(h)).

2.3.2 产生/收集模式

SECM的产生/收集模式分为基底产生/探针收集(Substrate generation/tip collection, SG/TC)和探针产生/基底收集(Tip generation/substrate collection, TG/SC)两

种模式. SECM细胞实验中, 常用的产生收集模式为SG/TC模式. 其工作原理如图4(e), 基底(细胞)产生的氧化/还原物质R扩散至探针表面被探针施加的电位氧化/还原后, 该物质发生还原/氧化反应生成O, 通过探针电流可得到R的浓度分布或R从基底传输的化学通量.

SECM的细胞研究中, 使用 SG/TC模式可检测受环境刺激影响(如加入药物)后细胞释放的活性氧物种(ROS)和其呼吸活性(细胞周围 O_2 的浓度分布)变化, 并实现对细胞膜表面蛋白活性的表征等. 如图4(i), 在细胞培养液中加入刺激物(如在膀胱癌T24细胞培养液中加入异铂), 细胞的ROS($\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{HOO}^{\cdot}$ 、 $\text{OH}^{\cdot}$ 、 OH^- 和 H_2O_2 等)外排通量会发生变化, O_2 和 H_2O_2 在细胞培养环境中化学性质相对稳定, 而 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 等化学性质不稳定, 产生即会转化为 O_2 . 因此, 在SECM探针施加 O_2 和

H_2O_2 的还原电位并向细胞渐进, 探针上的电流因 O_2 和 H_2O_2 外排通量的不同发生变化. 因此, 通过记录探针上的电流可定量分析 O_2 和 H_2O_2 的浓度变化, 又因 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{HOO}^{\cdot}$ 、 $\text{OH}^{\cdot}$ 、 OH^- 等化学性质不稳定的ROS产生即转化为 O_2 , 进而可分析刺激物对细胞ROS释放的影响^[15].

2.3.3 氧化还原竞争模式

SECM的氧化还原竞争模式(Redox competition mode, RC)最早由Schuhmann课题组^[56]提出. 其工作原理如图4(f): 假设溶液中同一氧化/还原物质O在施加一定氧化/还原电位的基底和探针表面均发生还原/氧化反应生成R, 在基底反应活性位点附近溶液中的O浓度因基底反应被消耗, 因此当探针经过基底反应活性位点时, 探针电流由于O浓度的下降而减弱, 因此命名为“氧化还原竞争模式”.

SECM的细胞研究中, 氧化还原竞争模式可用于检测细胞周围溶解氧的浓度, 并进一步分析得到细胞的呼吸活性. 例如, 当给SECM探针施加氧气的还原电位, 当探针接近细胞时探针记录的氧气还原电流发生下降, 根据下降程度可判断细胞消耗周围溶解氧的速率, 分析得到细胞的呼吸活性强弱. 例如, Bertotti课题组^[28]使用SECM的RC模式对人胸腺癌细胞(HS578T)的氧气消耗的分布进行了成像, 并计算出细胞周围氧气的消耗速率; Komatsu课题组^[21]使用SECM的RC模式研究了地高辛对心肌细胞呼吸活性的影响等.

3 SECM在细胞表征的应用研究

SECM可在细胞培养液中通过检测细胞周围的电活性物质实现对细胞形貌和化学信息等的非接触、实时、动态和精准表征. 自1990年SECM用于植物细胞呼吸作用研究的第一篇工作起^[4], 经过30年的发展, SECM已被用于各种细胞的表征研究中. 特别在过去10年间, SECM在细胞表征的应用已从统的细胞形貌到细胞内外蛋白表达和细胞氧化还原状态等的研究中. 针对神经系统疾病、心血管疾病和癌症研究中对细胞和微组织形貌、化学信息等原位、实时、精准表征的需求, 接下来以细胞种类分类, 介绍近10年SECM分别在神经细胞、心肌细胞和肿瘤细胞表征中的应用研究实例.

3.1 神经细胞

神经细胞是神经系统中联系整个机体, 发挥记忆、思维、行为意识等生理学功能的细胞. 研究神经细胞发挥信息传递功能时所分泌的物质, 特别在非常狭窄的神经突触间隙中监测神经递质信使的种类和量子化释放水平, 对理解神经网络的传递和神经紊乱的调节机制具有重要意义. SECM可实时监测神经细胞释放的神经递质的组成、含量及其发挥作用的机制, 可为理解神经系统疾病的发生、发展及疾病防治提供神经单细胞化学信息的重要参考. 下面主要介绍SECM在表征神经细胞及突触囊泡中的应用研究.

3.1.1 神经细胞呼吸、形貌和神经递质含量的表征

检测神经细胞的呼吸活性、信息传递与形貌变化有助于研究神经网络的耦合调节机制. 与其他表征技术(如免疫荧光、流式细胞术)相比, SECM具有原位、实时且高时空分辨的技术优势, 可原位表征神经细胞的拓扑结构和状态. 但以往由于探针电极尺寸、待测物化学性质不稳定等问题, SECM对神经细胞的前期研究具有局限性. 近10年发展了不同的SECM检测模式, 拓宽了SECM在神经细胞研究中的应用领域. 例如, 2013年Schuhmann课题组^[57]将SECM的氧化还原竞争模式与剪切力等高模式相结合, 通过施加并接收剪切力信号, 实现了对探针位置的精确控制, 并使用电势脉冲法通过施加脉冲电势记录了探针上的反应电流, 实现了对PC12细胞呼吸活性分布的电化学成像, 该工作中剪切力模式的使用可避免细胞形貌对其化学信息检测的干扰. 鉴于同时监测神经细胞释放的神经递质传递过程和细胞拓扑结构变化有助于理解神经的调节机制, Matsue课题组^[58]开发了具备同时监测神经细胞功能和形貌变化的SECM电化学成像方法, 利用电压切换模式(voltage-switching mode), 通过切换探针施加电位将法拉第电流从受阻的扩散反馈电流信号转变为电化学反应电流信号, 同时检测了PC12细胞释放的神经递质并得到了细胞的高分辨形貌图像(图5(a)). 另外, Matsue课题组^[25]又以直径0.55 μm 的铂(或金)/玻璃管微圆环双通道电极为SECM-SICM联合探针, 利用跳跃模式(hopping mode)实现了对交感神经细胞(SCG)的高分辨成像, 成功表征了细胞间紧密连接区域的双排绒毛结构. 针对SECM对多种信号检测时存在的多

次扫描、耗时较长和高充电电流造成的信噪比降低的问题, He课题组^[59]近期开发了一种可编程的SECM (programmable-SECM)操作模式, 同时利用三种不同电对(FcCH_2OH 、 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 和 O_2)对PC12细胞的形貌和细胞生物活性进行了成像和表征(图5(b)), 在一次成像过程中可同时获得细胞高度、膜通透性和呼吸活性等多个参数的图像, 他们开发的可编程的SECM将来可用于神经细胞复杂生命活动的监测研究。

3.1.2 神经细胞突触囊泡释放神经递质的表征

突触囊泡释放神经递质的胞吐过程是神经细胞间主要的信息传递方式, 研究囊泡胞吐过程不仅有助于探索神经细胞功能和意识的活动规律, 并且对神经性退行性疾病的研究与防治有重要意义。2014年以来SECM被用于监测各种神经递质释放浓度的动态变化过程^[60], 如通过将SECM纳米电极探针深入到单个神

经细胞的突触间隙内, 通过对探针施加不同电位可监测突触释放的极少量的多巴胺、血清素、肾上腺素、去甲肾上腺素等神经递质^[61]。例如, Huang课题组^[60]应用碳纤维纳米电极作为SECM探针, 通过毛细管泵入高浓度的 K^+ 离子浓度引起神经元膜电位的变化, 实时监测了单个神经元突触发生的囊泡胞吐现象, 量化了单个突触内的神经递质释放量, 证实了突触的活性释放区大多集中在突触后靶区, 解释了神经元通讯的路径。另外, 考虑到囊泡释放的神经递质还包括一些非电活性物质, 为拓宽SECM对非电活性神经递质物质的检测应用, 2018年Shen课题组^[52]应用SECM在稳态电势下记录了包括血清素、 γ -氨基丁酸、多巴胺以及谷氨酸等多种神经递质的电流-时间曲线, 研究了突触释放动力学和浓度, 并首次对突触内释放的非氧化还原活性的神经递质(如乙酰胆碱)进行了检测, 成功测量了单个突触释放泡囊的数量及非电活性的化学物

图 5 SECM在神经细胞的应用研究实例。(a) 应用SECM表征PC12细胞的形貌图和神经递质的总含量^[58]; (b) 可编程-SECM表征细胞原理示意图和对PC12细胞高度、膜通透性和呼吸作用三个参数的连续表征图像^[59]; (c) 应用纳米电极检测单突触神经递质的释放过程示意图和结果图^[52] (网络版彩图)

Figure 5 Application examples of SECM in neuron studies. (a) Application of SECM to characterize the morphology of PC12 cells and their total contents of neurotransmitters ^[58]; (b) Principle diagram of using programmable-SECM to characterize cells and the three SECM images of PC12 cells, which correspond to cell height, membrane permeability and cell respiration ^[59]; (c) Schematic diagram of using nanoelectrode to detect the process of single-synaptic released neurotransmitter and the detection results ^[52] (color online).

质, 揭示了海兔神经元突触释放的乙酰胆碱的浓度和动力学信息, 证明了突触乙酰胆碱的释放频率与去甲肾上腺素释放频率的一致性(图5(c)). 同年, 该课题组^[39]又报道了应用SECM对神经细胞通讯的关键信息(包括神经递质的细胞外浓度、细胞通透性、 Ca^{2+} 对体细胞释放依赖性、囊泡密度、释放分子数量和释放动力学等)的原位表征, 对理解细胞胞吐作用机制提供了重要参考. 此外, 鉴于突触间隙中还存在一些非囊泡释放的神经递质(如ROS、一氧化氮(NO)等), 了解这些神经递质的信息传递作用是理解神经元氧化应激的信号传导的关键因素之一, Chen课题组^[62]使用基于纳米管中自由基引发的丙烯酸聚合反应产生电阻的方法, 对单个神经元突触中 H_2O_2 进行了电化学检测, 证明 H_2O_2 的分布具有与其他神经递质不同的分布模式, 对了解神经元的氧化应激在细胞信号转导和体内平衡提供了重要参考, 也为在亚细胞水平上对神经元细胞内的分子检测提供了SECM新手段.

以上基于SECM方法对神经递质的电化学研究实现了神经单细胞变化的实时分析, 特别通过对神经递质量子化电流的测量揭示了胞吐作用及其调控机制, 更深入诠释了化学突触及其与行为与神经系统疾病的关系, 为进一步理解神经传递和大脑通讯、感知系统调节提供了重要的单细胞原位表征数据.

3.2 心肌细胞

作为心脏主要功能细胞的心肌细胞在心脏发育、功能和重塑过程中起关键作用. 心肌细胞作为心脏搏动的执行细胞具有收缩/舒张特性, 其兴奋-收缩偶联过程可通过测量其动作电位进行监测, 搏动分析对于心脏疾病用药筛选具有指导意义. 另外, 心肌细胞因其搏动特性比其他类型细胞消耗更多氧气, 量化心肌细胞耗氧量对分析心脏能量代谢至关重要^[63]. 通常使用免疫荧光染色法监测心肌细胞的搏动行为和耗氧量, 由于光损伤和光漂白效应使荧光信号不稳定, 不适合长期监测. 基于SECM探针可通过测量与细胞形貌直接相关的电流或通过测量氧气的还原电流得到细胞周围氧气含量的原理, 近年SECM被用于监测心肌细胞的收缩/舒张和氧气消耗等动态过程^[21].

3.2.1 心肌细胞搏动和耗氧量的表征

2014年, Komatsu课题组^[21]首次应用SECM通过测

量细胞附近的氧气还原电流表征了心肌细胞的耗氧量, 并通过恒高度模式将记录的 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 氧化电流转换为细胞形貌与时间的关系图, 表征了心肌细胞的搏动. 并进一步研究了温度和地毛地黄素对心肌细胞功能的影响, 对比了心肌细胞和心肌成纤维细胞附近的氧气浓度, 证实了添加毛地黄素后心肌细胞的收缩幅度增加、心率和耗氧量降低. 该工作表明SECM可用于表征心肌细胞的收缩和耗氧量(图6(a)). 之后, 他们进一步将局部给药与SECM结合: 在SECM基础平台上搭建了恒温、恒湿和恒定 CO_2 浓度的细胞培养舱, 并在舱内组装了局部药物输送系统, 利用该系统将心肌细胞的搏动检测与给药同时进行, 通过SECM探针的电流信号控制了药物阿司咪唑的给药量, 再通过SECM实验发现心肌细胞的搏动随刺激时间的增加而改变, 通过对比实验组与对照组平均波形的实验结果证实了心肌细胞收缩持续时间在给药前后无变化, 但舒张时间比给药前增加了5倍(图6(b))^[22], 该方法未来可用于研究心脏药物对心肌细胞的药理特性等. 另外, Matsue课题组^[25]使用铂/玻璃管微圆环双通道电极为SECM-SICM联用探针, 实现了在亚微米尺度对心肌细胞呼吸活性的电化学高分辨成像.

3.2.2 心肌细胞的GSH释放量和NADH氧化酶性的表征活

细胞内的氧化还原稳态依靠活性氧(ROS)与抗氧化剂的相互作用来调节, ROS过度累计或抗氧化系统功能下降可导致氧化还原失衡. 心肌细胞内氧化还原稳态对心肌组织维持正常功能至关重要, 了解细胞微环境对心肌细胞氧化还原状态的影响是研究心肌细胞功能障碍病理学的关键. 谷胱甘肽(GSH)是细胞内氧化还原代谢循环中含量最丰富的反应物, 是细胞氧化还原状态的重要指示物. 研究单个心肌细胞释放的GSH动力学, 可避免相邻细胞(如心肌成纤维细胞)在心肌细胞氧化还原状态检测中的干扰. 近期, Li课题组^[64]以二茂铁甲酸(FcCOOH)为氧化还原电对, 应用SECM对不同硬度基质上培养的心肌细胞表面释放的GSH与 FcCOOH 的氧化还原反应的表现速率常数(k_f)进行了原位表征, 得到了不同硬度基底上心肌细胞的氧化还原状态参数(图6(c)). 结果显示生长在越硬基底上的心肌细胞的 k_f 值越高, 表明心肌细胞较高的GSH释放速率, 证明基质硬度对心肌细胞氧化还原状态的

图 6 SECM在心肌细胞的研究应用实例. (a) 应用SECM表征心肌细胞的搏动情况和耗氧量^[21]; (b) SECM系统与局部给药和细胞培养舱结合检测心肌细胞的搏动情况和耗氧量^[22]; 应用SECM (c) 研究不同硬度基质上心肌细胞的GSH外排通量^[64], (d) 健康和病理性hmMSCs细胞内的氧化还原状态^[66,67] (网络版彩图)

Figure 6 Application examples of SECM in studies of cardiomyocytes. (a) Application of SECM to characterize the pulsation and oxygen consumption of cardiomyocytes [21]; (b) Application of SECM combined with micropipette injection system and cell culture chamber to detect the pulsation and oxygen consumption of cardiomyocytes [22]; Applications of SECM to investigate (c) the efflux of GSH released from cardiomyocytes cultured on the substrates with different stiffness [64] and (d) the redox state of healthy and pathological hmMSCs cells [66,67] (color online).

直接影响, 揭示了基质硬度对心肌细胞氧化还原状态影响的规律. 该工作首次将SECM用于细胞力学微环境的研究中, 为探究细胞力学微环境对细胞氧化还原状态的影响提供了单细胞研究的SECM新手段. 另外, 细胞产生的ROS与胞内还原型烟酰胺二核苷酸(NADH)的水平直接相关, 心肌细胞中NADH氧化酶活性的增加导致氧化应激增加, 会损害心肌组织的能量稳态, 在心脏功能障碍病理生理学过程中起重要作用^[65]. 许多因素(如细胞内酶浓度、胞生长条件和扩散

过程)会影响酶在体内的催化效率和细胞对外部刺激的反应, 需要在细胞生长条件下高灵敏地监测细胞内的氧化还原过程. 基于SECM适用于细胞周围扩散层的化学梯度成像和研究细胞内的氧化还原活性的特性, Jurate等^[66,67]以甲萘醌为氧化还原介质, 应用SECM对健康和病理性人心肌源性间充质干细胞(hmMSCs)摄取的甲萘醌和释放的甲萘二酚的表观米凯利常数(K_M)进行了原位表征, 研究了hmMSCs内氧化还原状态的变化. 结果表明健康的hmMSCs比病理细胞具有

更高的氧化还原电位, 并且通过三维培养可改善hmMSCs细胞内的氧化还原状态(图6(d)). 该工作证明SECM可监测健康和病理hmMSCs氧化还原能力的变化, 并探究了不同细胞生长条件对细胞氧化还原能力的影响.

3.3 肿瘤细胞

肿瘤细胞自身具有复杂性及彼此之间的巨大差异, 研究细胞群体会掩盖细胞的异质性, 需在单细胞层面了解肿瘤细胞特征及彼此之间的信息传递. 因此, 发展单细胞分析技术对癌症早期病理学诊断、药物筛选和细胞生理学研究具有重要意义. SECM可原位、实时、高分辨率地对肿瘤细胞的形貌及多种生化信息进行电化学表征, 包括肿瘤细胞的形貌、细胞蛋白表达、多药耐药蛋白活性、细胞膜通透性和电化学活性小分子等. 下面从肿瘤细胞检测的5个应用领域分别介绍近10年来SECM在肿瘤细胞表征方面的应用.

3.3.1 肿瘤细胞形貌的表征

肿瘤细胞的形状、体积、细胞膜表面特征等均有别于正常细胞, 因此对其形貌的准确表征可为临床肿瘤诊断提供参考. SECM可通过检测细胞培养液中的电活性物质或细胞消耗氧气的氧化/还原电流值实现对活细胞形貌的原位、无损表征. 早在2006年, Bard课题组^[68]就使用 FcCH_2OH 和溶解氧为氧化还原介质, 对宫颈癌HeLa细胞进行了原位电化学成像. 近些年, 随着肿瘤细胞研究内容的拓展, 肿瘤细胞在药物作用下的形貌变化成为SECM肿瘤细胞形貌表征的主要应用之一. 如Ding课题组等^[15]以溶解氧为氧化还原介质, 通过SECM探针表征了膀胱癌T24细胞周围的氧气还原电流值, 间接得到了T24细胞在不同时间的形貌变化, 并发现未经顺铂处理的T24细胞在2小时内细胞形貌未发生明显改变, 而经顺铂处理后的T24细胞形貌因凋亡发生明显变化, 且在凋亡过程中释放了更多的ROS物质. 另外, 暴露在多糖、蛋白质等生物活性分子中的细胞形貌可根据自身生理状态及与其附着的表面建立的相互作用而改变, 因此对肿瘤细胞形貌的实时表征有助于了解其与细胞微环境之间的相互作用. Komatsu课题组^[6]等将微量移液管(micropipettes)与SECM结合, 用微量移液管向细胞培养液中添加凋亡诱

导剂(如蛋白激酶抑制剂星形孢菌素), 以 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 为氧化还原电对, 利用反馈模式表征了不同凋亡诱导剂浓度下肝癌细胞HepG2的形貌变化, 发现了细胞在凋亡诱导剂下的收缩行为; Rapino和Albonetti课题组^[69]利用有机分子束外延技术将并五苯、六噻吩和二甲酰亚胺沉积在硅基底上, 构成了二维单分子层的有机分子基底, 并在这些有机分子基底上培养了乳腺上皮细胞MCF10A, 以 FcCOOH 为氧化还原介质, 应用SECM表征了不同基底上MCF10A细胞的形貌. 如图7(a), 他们进一步通过分析单细胞形态定义了细胞表面与不同有机分子层的相互作用, 量化了不同微环境中细胞高度、表面接触面积、半峰宽和细胞表面倾角的变化, 为阐释细胞与基质之间的相互作用机制提供了参考.

另外, 作为肿瘤侵袭转移关键步骤之一的细胞迁移是一个复杂的多步骤过程, 受到细胞结构、功能和基质多因素的影响. 目前以荧光为基础的检测技术需将细胞长时间暴露在高强度光源下, 可能会影响细胞的功能和行为, 另外相差显微镜技术在监测单细胞迁移中分辨率较低且无法实现细胞定位. SECM可克服光学表征技术的以上缺点, 通过测量细胞周围探针的氧化/还原电流的变化跟踪和量化细胞的迁移过程. 如Koley课题组^[70]以10 μm 直径的碳纤维电极为SECM探针, 以 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 为氧化还原电对, 利用SECM对单个头颈部癌细胞SCC25定位后, 通过记录细胞周围 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的氧化电流得到了细胞超过4小时的SECM图像, 由此分析得到了细胞迁移过程中的形貌和迁移距离等信息. 他们的SECM结果显示同一细胞系内的细胞具有异质性的迁移模式, 迁移速度约为 $8 \pm 3 \mu\text{m/h}$, 而血清饥饿的同系同步细胞却以 $9 \pm 3 \mu\text{m/h}$ 的速度呈现非异质细胞的迁移模式, 该研究为原位追踪单个肿瘤细胞的迁移行为提供了SECM表征工具.

3.3.2 肿瘤细胞膜蛋白表达的表征

通常肿瘤细胞的细胞膜过表达某些膜蛋白以实现其特殊功能, 如与侵袭、迁移密切相关的细胞黏附分子家族的CD44蛋白, 与生长、增殖、分化相关的表皮生长因子受体家族(human epidermal growth factor receptor, HER)等, 这些过表达的膜蛋白可作为肿瘤检测的标志物. 目前检测恶性肿瘤的方法多为组织切片的免疫组化方法, 通过光学手段检测肿瘤细胞膜蛋白

图 7 SECM在肿瘤细胞研究中的应用实例。(a) 不同单分子层上培养的MCF10A细胞的SECM图像^[69]；(b) SECM用于检测细胞表面SEAP表达的原理示意图和微孔阵列中HeLa细胞的荧光和SEAP表达的SECM图像^[71]；(c) SECM研究GSH外排的原理示意图和HeLa细胞GSH外排的 SECM图像^[8]；(d) SECM检测膜渗透性的原理示意图及不同浓度CdCl₂加入后T24细胞的光学显微照片和FcMeOH扩散的SECM图像^[76]；(e) SECM检测T24细胞释放H₂O₂的原理示意图和不同时间T24细胞外H₂O₂电流的SECM图像^[15]；(f) 应用镀铂碳纳米电极作SECM探针，检测乳腺癌细胞(MDA-MB-231、MDA-MB-468、MCF-10A)内ROS/RNS(H₂O₂、ONOO⁻、NO和NO₂⁻)的伏安图^[16] (网络版彩图)

Figure 7 Application examples of SECM in tumor cell studies. (a) SECM images of MCF10A cells cultured on different monolayers ^[69]; (b) The principle of SECM to detect SEAP expression on the cell membrane and the fluorescence and SECM images of SEAP expression in the microwell arrays ^[71]; (c) The principle of SECM to study GSH efflux and the SECM image of GSH efflux of HeLa cells ^[8]; (d) The principle of SECM to detect released H₂O₂ and the SECM images of H₂O₂ of T24 cells for different times ^[76]; (e) The principle of SECM to detect cell membrane permeability and optical microscopic images and SECM images of FcCH₂OH diffusion of T24 cells after adding different concentrations of CdCl₂ ^[15]; (f) Application of Pt-modified carbon nanoelectrode as SECM probes to detect RNS/ROS species (H₂O₂, ONOO⁻, NO, NO₂⁻) inside breast cancer cells (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-10A) and their voltammograms ^[16] (color online).

表达, 受实验条件限制可能产生伪影, 并且病理诊断中对活细胞荧光标记可能会导致毒副作用从而引发不确定的检测结果. SECM仅依赖与生物标志物有关的氧化还原活性物质的电化学信号, 可无损、高空间分辨和高灵敏度地表征肿瘤细胞表面膜蛋白的表达含量. 例如, Matsue课题组^[71]将宫颈癌HeLa细胞接种在固定有分泌性碱性磷酸酶(secreted alkaline phosphatase, SEAP)抗体的微阵列, 细胞分泌的SEAP被锚定在微阵列基底的抗体上, SEAP将磷酸对氨基苯酚(*p*-amino-phenylphosphate, PAPP)催化脱去磷酸基团产生对氨基苯酚(*p*-aminophenol, PAP), PAP在+0.3 V下可被SECM探针氧化, 因此通过SECM检测PAP的氧化电流值可实现在单细胞水平上对SEAP表达的检测, 并排除了内源性ALP酶活性对SEAP酶活性检测的影响(图7(b)). 之后, 基于SECM以PAPP/PAP为电对的检测细胞ALP酶表达的原理, 该课题组^[41]又将ALP酶标记在人皮肤鳞癌A431细胞的表皮生长因子受体(EGFR)蛋白上, 以铂/玻璃管微电极为SECM探针实现了对A431细胞膜表面EGFR蛋白表达的高分辨成像.

另外, 特定膜蛋白在不同肿瘤甚至同一肿瘤的不同区域或不同分期的表达具有差异性, 利用SECM可在单细胞水平定量这些膜蛋白标志物的表达, 对临床诊断和预后评价具有参考价值. 例如, Higson课题组^[10]将膀胱癌细胞RT112沉积在氨基化的玻璃基质表面上, 先将其孵育在抗CD44的一抗中, 随后孵育在生物素化的二抗中, 最后用生物素-链霉素相互作用将辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)固定在二抗上. 在测量体系中添加1 mM的对苯二酚和1 mM的H₂O₂后, HRP利用H₂O₂将对苯二酚氧化生成苯醌, 苯醌在-0.4 V下被SECM探针电极尖端还原产生电流, 通过检测还原电流值实现了对细胞膜表面CD44蛋白表达的定量表征. 该研究为肿瘤细胞的鉴定提供了高空间分辨率的原位表征SECM新手段, 可为诊断临床患者癌细胞种类作参考.

3.3.3 肿瘤细胞多药耐药蛋白的表征

长期化疗可能导致肿瘤细胞产生多药耐药性(multidrug resistance, MDR), 增加了肿瘤治疗的难度. 某些腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)结合超家族转运蛋白的过表达导致的药物外排增加是诱发MDR的重要因素之一. 其中, 多药耐药相关蛋白1(mul-

tidrug resistance-associated protein, MRP1)通过谷胱甘肽与化疗药物形成共轭复合物一起转运排到细胞外, 可介导对阿霉素、依托泊苷和长春新碱等多种化疗药物的耐药性. 尽管流式细胞仪和免疫组化染色可对MRP1的表达进行分析, 但难以阐明药物作用下这种外排泵的实时活性. SECM可原位、实时地对MRP1转运GSH——药物共轭体的动力学过程进行表征, 可被于表征肿瘤单细胞的MRP1和耐药性. 例如, 2011年Mauzeroll课题组^[14]应用SECM发现了人宫颈癌HeLa细胞内GSH与FcCH₂OH之间的定量关系(图7(c)): 在FcCH₂OH通过细胞膜进入细胞内后, 细胞内的GSH通过MRP1被转运到细胞外并将探针表面氧化得到的[FcCH₂OH]⁺还原, 探针电化学信号增加, 证实GSH外排的电化学信号与细胞耐药性的联系, 建立了细胞耐药性活动的量化指标. 2013年, 他们进一步利用SECM对共培养于微孔阵列的正常和耐药的宫颈癌HeLa细胞的GSH外排进行了实时电化学成像, SECM结果显示在正常HeLa和耐药HeLa细胞之间的MRP1活性不同, 后者的MRP1活性更强, 建立了应用SECM对肿瘤细胞耐药性进行电化学区分的新方法^[8]. 2015年, 他们又应用SECM表征了在绿茶儿茶素作用下HeLa细胞的GSH外排动力学过程, 结果表明短时间暴露于表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCg)导致细胞的代谢活性降低, 增强对GSH的外排, 而长时间暴露于EGCg的HeLa细胞出现了不可逆的死亡^[72]. 之后, Bard课题组^[9]也利用SECM表征了在甲萘醌刺激下HeLa细胞的甲萘醌-谷胱甘肽共轭物的外排动力学过程, 在MRP1单克隆抗体或选择性抑制剂作用下甲萘醌刺激HeLa细胞的GSH外排异质率参数比单纯的甲萘醌刺激组明显降低, 确定了甲萘醌是MRP1的底物, 建立了利用SECM鉴定MRP1底物的方法. 这些例子证明可利用SECM建立在不干扰细胞环境或代谢情况下单细胞水平上表征与MRP1相关耐药性的原位无损方法, 实现了对细胞表面MRP1蛋白活性的定量表征. 因此, SECM可成为表征肿瘤单细胞多药耐药性的工具.

除了研究肿瘤细胞MRP1与蛋白活性间的关系外, Mauzeroll课题组^[73]还应用SECM对转运蛋白表达与功能活性之间的关系进行了研究. 他们利用蛋白免疫印迹法和流式细胞仪检测了正常和耐药HeLa细胞之间MRP1蛋白表达的差异, 同时利用SECM分别以FcCH₂OH

和 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 为氧化还原介质, 在 FcCH_2OH 电对得到的GSH外排的SECM图像基础上扣除了以 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^- \text{Cl}_3$ 为电对得到的细胞形貌图像, 表征了这两种细胞系MRP1蛋白的实时活性, 结果表明HeLa细胞上的MRP1活性与表达并不直接相关. 之后, 他们将HeLa细胞接种在氧等离子体处理的不同面积斑点的环烯烃聚合体树脂-Zeonor 1060R基底上, 利用SECM表征了不同大小斑点上细胞MRP1外排GSH的实时活性, 发现当基底面积小于细胞下表面面积时, GSH外排增加, MRP1活性增加, 并且高浓度的阿霉素使正常和耐药的HeLa细胞MRP1药物外排的活性增强. 他们的研究证实联合使用SECM的蛋白活性鉴定手段与流式细胞术的蛋白表达鉴定手段可有助于明确MRP1在不同类型癌症中的预后情况.

3.3.4 肿瘤细胞的膜通透性的表征

细胞膜是防止细胞外物质进入细胞的第一道屏障. 损伤后的细胞膜磷脂双分子层结构发生改变, 离子通道开放甚至形成大量微孔, 导致细胞膜功能变化甚至丧失. 对于肿瘤细胞来说, 细胞膜上糖蛋白和糖脂结构发生改变, 细胞膜通透性异常, 包膜间黏着力降低, 接触抑制降低或消失, 会导致肿瘤细胞不受控制的增殖、侵袭和转移. 因此, 针对细胞膜通透性的研究有助于揭示肿瘤细胞的病理和生理学机制, 但现有方法无法实现对细胞膜通透性的实时定量表征. SECM可通过探针探测细胞膜表面可透过膜的电化学物质(如 FcCH_2OH)的氧化/还原电流的实时变化, 表征和监测细胞膜通透性的动态变化过程, 实现非侵入式地对细胞膜通透性的定量表征. 例如, Ding课题组^[74]以 FcCH_2OH 为氧化还原电对, 应用SECM对膀胱癌T24细胞在正常和药物添加前后的膜通透性变化进行了研究, 发现正常条件下膀胱癌T24细胞对 FcCH_2OH 具有恒定的膜通透性(对 FcCH_2OH 的渗透系数约为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ m/s}$), 当 Cd^{2+} 添加到T24细胞培养液中后T24细胞膜的通透性增加(渗透系数约为 $3.5 \times 10^{-4} \text{ m/s}$), 可允许更多的 FcCH_2OH 扩散至SECM探针尖端使探针测得的 FcCH_2OH 的氧化电流增加, 表明高浓度的 Cd^{2+} 增加了细胞对 FcCH_2OH 的膜通透性, 促进了细胞膜内与细胞膜外之间物质的扩散, 引起细胞体积的缩小等形态变化, 导致细胞死亡. 另外, 他们又利用深度扫描模式(depth scan mode)的SECM成像, 生成了 x - z 或 y - z 平面

的二维电流图, 基于一个深度扫描图像包含数百个探针渐进曲线的原理, 从深度扫描图像垂直截面中提取得到的渐进曲线结合多物理场耦合分析软件(COMSOL Multiphysics)进行了理论数值模拟, 得到了T24细胞表面不同位置细胞膜对 FcCH_2OH 的渗透系数, 发现T24细胞表面不同位置对 FcCH_2OH 渗透系数的一致性^[75]. 并通过改变加入 Cd^{2+} 的浓度发现: 当 Cd^{2+} 浓度小于 $10 \mu\text{M}$ 时, 由于细胞自身的抗氧化应激作用, 细胞膜对 FcCH_2OH 的渗透系数为 $75 \mu\text{m/s}$, 与未处理的T24细胞一致; 当 Cd^{2+} 浓度在 $10 \sim 100 \mu\text{M}$ 范围时, 由于细胞膜的脂质过氧化, ROS水平增加使细胞膜平均渗透系数下降到 $25 \mu\text{m/s}$; 当 Cd^{2+} 浓度急剧增加至 $100 \mu\text{M}$ 以上时, 细胞膜渗透系数增加, 推测可能与高水平的ROS和过度的膜损伤导致的细胞膜完整性丧失有关^[76](图7(d)). 另外, 向T24细胞外环境添加顺铂和 Cr^{6+} 溶液后也观察到一致的现象^[77~79].

3.3.5 肿瘤细胞的活性氧簇和溶解氧的表征

除了以上对肿瘤细胞膜蛋白和膜通透性的表征外, SECM还被用于对电化学活性分子(如活性氧簇和氧气)在肿瘤细胞表面的分布进行电化学成像, 用以揭示细胞的状态和研究肿瘤细胞的生理机制. 例如, 肿瘤细胞的ROS水平高于正常细胞, ROS的改变可反映细胞的功能及稳态变化. SECM利用肿瘤细胞本身释放的ROS作为氧化还原介质, 可无标记地监测单个肿瘤细胞的生理活性. 如图7(e), Ding课题组等^[15]利用SECM对膀胱癌T24细胞在不同时间的细胞外的ROS浓度分布进行了电化学成像, 并通过记录探针的渐进曲线实现了对T24细胞空间 H_2O_2 及细胞形态的可视化表征, 结果发现未加入顺铂药物的T24细胞周围的 H_2O_2 浓度分布稳定, 有一个长周期的交替, 经顺铂处理后顺铂诱导的T24细胞凋亡导致细胞外排大量 H_2O_2 , 显著加速了ROS的演化周期, 证实了细胞凋亡可显著加速细胞的新陈代谢过程. Bertotti课题组^[28]利用SECM对乳腺癌HS578T细胞的呼吸活性进行了研究, 使用Pt微电极作为SECM探针记录了单个HS578T细胞上方的氧气浓度, 得到了单细胞的氧气分布图, 获得了具有高空间分辨率的细胞氧消耗速率信息, 在单细胞水平上揭示了线粒体耗氧特性和空间异质性, 使单细胞内不同区域的呼吸活性可视化成为可能. 除了检测细胞外排的活性氧物质含量, 细胞内的ROS/RNS物质

含量更能反映细胞所处的氧化还原状态. 为在尽量对细胞损伤小的情况下实现对细胞内ROS/RNS物质的原位检测, 2017年Mirkin课题组^[16]制作了尖端直径约为20 nm的镀铂碳纳米电极作为SECM探针, 穿透了三种乳腺癌细胞(MDA-MB-231、MDA-MB-468和MCF-10A), 实现了细胞内四种ROS/RNS物质(H_2O_2 、 ONOO^- 、NO和 NO_2^-)局部浓度和通量的检测. 实验结果表明, 细胞内ROS/RNS的产生与细胞转移活性之间存在相关性: 在转移性癌细胞(MDA-MB-231和MDA-MB-468)中, 大量RNS物质爆发性产生, 但在非转移性细胞MCF-10A中, ROS/RNS浓度低且无法测量(图7(e)). 以上这些示例表明SECM不仅可用于检测细胞外的ROS及氧气含量, 还可对细胞内的RNS/ROS物质进行检测, 为从单细胞水平研究肿瘤细胞内外的氧化还原状态及呼吸活性提供了精准的原位表征方法.

4 SECM在细胞球和微组织表征方面的应用

越来越多的证据表明与传统的二维细胞培养方式相比, 三维细胞球或微组织更接近于体内环境(如可增加细胞间通讯、模拟病理过程等), 可最大限度还原在体组织的结构与功能, 因此体外构建三维细胞球或微组织模型对组织工程和疾病研究具有重要意义^[80]. 传统用于三维细胞球和微组织的光学表征方法(如荧光显微镜)需要对组织样本固定、染色, 而细胞球和微组织的厚度较厚, 常引起荧光染料扩散不均匀, 导致结果出现偏差^[81], 难以实现对细胞球和微组织的准确、原位、无损表征. 近年来, 基于SECM可同时、原位、无损获得样本形貌和化学信息的特点, 其在生物医学领域的研究对象也从传统的单细胞拓展到三维细胞球和微组织方面. 下面主要介绍近几年SECM在三维细胞球和微组织的耗氧量、呼吸活性和膜蛋白表达等方面的表征应用.

4.1 细胞球和微组织的耗氧量表征

氧气消耗是活体组织最基础的生化行为, 在组织新陈代谢中起关键作用. 耗氧量的异常变化与疾病相关, 因此监测细胞球和微组织的耗氧量可提供有关其生存能力和代谢活性的基本信息. 由于氧气是水溶液中存在的天然电对, 根据SECM探针上测得的氧气还原电流可实现对溶解氧浓度分布的直接表征, 故

SECM可连续、无创监测活体细胞球和微组织的耗氧情况. 例如, 2014年Hisada课题组^[82]制备了直径范围在32.8~166.6 μm 的不同尺寸的大鼠原代肝细胞球, 利用SECM监测了不同直径细胞球的消耗氧气水平, 评估了它们呼吸活性间的差异. 结果显示, 直径70 μm 的细胞球耗氧量最大, 随着球体直径的增加耗氧量逐渐减低, 并进一步通过对肝功能相关蛋白、多药耐药相关基因(如厌氧呼吸有关的乳酸脱氢酶A的基因表达)等生物学指标的检测, 推断出直径70 μm 以上的细胞球合并有厌氧呼吸甚至细胞坏死的情况, 并不是活性最佳的球体尺寸. 该结果表明可利用SECM对细胞球耗氧量的监测筛选出体外实验效果最佳的细胞球直径, 并通过与基因表征等生化检测方法结合实现对肝细胞体外药物毒性的筛选. 同年, Gac课题组^[83]应用SECM的恒高度模式, 在培养有子宫癌HeLa细胞球的PDMS微阵列平台上方的不同距离处对细胞球的氧气还原电流进行了检测, 评估了HeLa细胞球的呼吸活性. 结果发现随着探针与细胞球之间距离的缩短, 细胞球表面的氧气还原电流逐渐下降(图8(a)). 另外, 为了证明细胞球周围的还原电流下降由组织的耗氧引起, 而非细胞球存在导致的扩散受阻引起, 他们进一步对药物处理后的死亡细胞球进行了检测. 发现死亡的细胞球周围并无耗氧量随距离变化的情况, 该结果与常规的死活荧光染色结果一致, 证实了细胞球的活性氧消耗而导致的氧气梯度的存在. 该研究表明SECM可通过检测局部的化学梯度获得常规光学显微镜技术无法得到的细胞球生物学过程的相关信息. 以上这些基于SECM评价细胞球耗氧量的方法不仅可实现对细胞球非侵入式地检测, 还可持续监测它们的药物反应过程, 为研究细胞球活性与生理、病理状态之间的相关性提供重要的原位表征数据.

SECM不仅可监测细胞球的耗氧量变化, 还由于其非侵入性和高空间分辨率, 可用于量化细胞的呼吸水平, 进而用于评估微组织在移植或治疗过程中的存活能力, 进一步扩展SECM在移植组织和器官领域中的应用. 例如, Parthasarathy课题组^[17]应用SECM分别对含和不含半乳糖修饰的聚乙烯醇明胶水凝胶支架上培养的肝癌HepG2微组织进行了表征. 首先通过SECM探针记录的HepG2微组织周围 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的氧化电流得到了水凝胶支架上HepG2微组织形貌的SECM图像, 接着以氧气为氧化还原介质得到了微组

图 8 SECM在细胞球和微组织表征方面的应用示例. (a) SECM对HeLa细胞球耗氧量的检测^[83]; (b) SECM对乳腺癌MCF-7细胞球的形貌及ALP活性的检测^[84]; (c) SECM对黑色素瘤皮肤组织上TyR分布的检测^[85] (网络版彩图)

Figure 8 Application examples of SECM in characterizations of cell spheroids and microtissues. (a) Monitoring the oxygen consumption of HeLa microtissues by SECM ^[83]; (b) Characterizations of surface topography and ALP activity of breast cancer MCF-7 cell spheroid by SECM ^[84]; (c) Mapping the tyrosinase (TyR) distribution of skin biopsies from melanoma patients by SECM ^[85] (color online).

组织形貌和呼吸活性的SECM图像, 由二者的电流差值分析得到了肝癌HepG2微组织呼吸活性的定量信息. 该研究表明细胞在半乳糖修饰的水凝胶支架上比无半乳糖修饰的支架具有更好的增殖能力和代谢活性, 证实使用半乳糖修饰的支架可能有利于肝组织的再生. 他们还进一步将SECM结果与肝细胞培养测定法、白蛋白测定法相比较, 结果表明SECM方法对微组织呼吸活性的检测灵敏度更高, 由此证明SECM可作为检测三维组织工程支架上微组织的细胞呼吸活性的灵敏工具.

4.2 肿瘤细胞球和微组织表面的蛋白表征

肿瘤组织来源于正常组织, 但其细胞形态、组织结构等均与正常组织存在差异(异型性), 异型性的程

度决定了肿瘤的侵袭性, 因此鉴别肿瘤组织和正常组织对肿瘤研究具有十分重要的意义. 2019年, Zhang课题组^[84]将SECM与微流控芯片技术相结合, 首先应用微流控技术制备了尺寸统一的乳腺癌MCF-7细胞球和成纤维细胞球芯片, 之后用SECM对MCF-7细胞球和成纤维细胞球进行了鉴别(图8(b)): 基于肿瘤细胞膜上碱性磷酸酶(ALP)表达的特异性, 利用磷酸对氨基苯酚(PAPP)可被肿瘤细胞膜上的ALP催化生成对氨基苯酚(PAP), 在SECM探针Pt微电极上施加了PAP的氧化电压将其氧化成对醌亚胺, 通过检测对醌亚胺的氧化电流实现了对肿瘤细胞球的鉴别. 另外, 为在不干扰底物形态的情况下利用ALP将肿瘤球体与基质分开, 他们又以 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 为氧化还原介质对微流控芯片及其细胞球进行了形貌表征, 分析了PAP和 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$

两种电对的SECM表征结果, 得到了肿瘤细胞球ALP活性的定量信息(图8(b)). 并进一步对ALP高表达的肿瘤细胞球进行了基因表达谱的分析, 得到了MCF-7肿瘤细胞球基因表达的变化, 为肿瘤分化、致病机制的研究提供了参考。

黑色素瘤是最致命的皮肤恶性肿瘤之一。黑色素瘤的早期阶段(0, I和II期)可治愈, 但转移性黑色素瘤(III和IV期)的生存率急剧下降。由于黑色素瘤和无害的皮肤痣具有相似的外观, 对早期黑色素瘤的识别成为临床诊断难点。传统基于免疫组化与病理分析结合的活检组织特定生物标志物(如辣根过氧化物酶(HRP)、荧光标记分子)的光学检测方法存在黑色素与显色剂颜色类似而不易分辨的问题, 而电化学方法仅依赖于电化学检测与生物标志物存在有关的氧化还原活性物质, 因此可克服光学方法的局限性。酪氨酸酶(TyR)是一种可控制黑色素的含铜酶, 可作为黑色素瘤预后诊断的高选择性指标, 电化学方法检测皮肤组织TyR的表达可更准确地对黑色素瘤阶段进行识别。基于此, Girault课题组^[85]应用SECM与软的刷状探针微电极相结合, 在温和接触模式和恒定高度模式下, 采用HRP标记的抗TYR免疫分析法对皮肤组织的表面进行了扫描。通过催化四甲基联苯胺(TMB)氧化形成的氧化产物(TMBox)在微电极表面还原, 通过检测TMBox的还原电流得到了正常皮肤、黑色素瘤II期(非转移性)和III期(转移性)皮肤微组织上TyR分布的电流图。SECM的结果证实II期皮肤微组织样品上的TyR表达水平最高, 正常皮肤微组织上的TyR水平较低, III期组织上TyR的表达水平最低(图8(c)). 该SECM方法得到的TyR分布极性与文献报道的相符, 为未来诊断和了解不同黑色素瘤阶段TyR水平的空间分布提供了SECM表征新方法。

5 总结与展望

体外培养疾病模型, 从单细胞、细胞球和微组织层次对与重大疾病相关的细胞行为和生化信息等研究可更好地理解细胞间的异质性以及细胞与细胞间的相互联系, 揭示疾病的发生发展机制和药物筛选。作为一种可在生理条件下对活细胞、细胞球和微组织的形态和多种生化/生理参数原位、实时、精准表征的扫描探针显微镜技术, SECM被广泛用于各种疾病相关的

细胞、细胞球和微组织的原位、实时、动态表征中^[90,91]。特别是近10年, SECM在生物医学领域的应用研究得到快速发展, 从单细胞到细胞球和微组织, 研究对象也从细胞的形貌和活性到拓展到细胞迁移、氧化还原状态、细胞内/外ROS浓度、膜表面特异蛋白等, 成为传统细胞分析手段的有力补充。本文以与神经系统疾病、心血管疾病和癌症三大疾病相关的细胞分类, 综述了近10年来SECM在生物医学领域的研究进展。包括SECM的仪器基本构成、常用探针和工作模式, 列举了SECM用于不同细胞样品(神经细胞、肿瘤细胞、心肌细胞)、细胞球和微组织的多参数表征研究, 包括细胞形貌、细胞氧化还原状态、细胞内/外ROS浓度、细胞膜通透性和细胞膜表面特异性蛋白酶的分布和活性以及细胞球和微组织的呼吸活性和表面蛋白等(表1)。

未来为进一步拓宽SECM在生物医学领域的应用, 发展可对细胞、细胞球和微组织的多目标物实时、原位、动态、精准表征是SECM的主要发展方向, 具体可在以下几方面进一步发展: (1)研发多功能、多通道的SECM探针: 为实现SECM对细胞多参数、高通量的同时检测功能(如对细胞形貌和活性、细胞释放不同化学物质的同时表征)和对细胞内物质的高时空分辨检测, 可制备多通道(如双通道、四通道等)的微/纳米电极作SECM探针, 提高电极在生物体系检测中的稳定性和抗干扰能力, 同时建立适合纳米电极和限域效应的电极界面反应的新电化学理论和模型; (2)快速扫描功能的开发: 目前商用SECM仪器的扫描速度还不能完全满足细胞快速变化和对细胞释放物质的快速、灵敏检测, 未来可通过硬件设计和软件开发自主搭建具有高扫描功能的SECM仪器用以捕捉细胞的快速变化过程等, 例如结合基于优化算法的数字图像处理技术^[92]和智能软件实现SECM的快速扫描和智能扫描功能; (3)生物样本多参数的同时表征功能: 为实现包括化学信息在内的细胞、细胞球和微组织的多功能、多行为、多目标物的检测, 更系统地研究细胞形态、生化与生理指标之间的相互联系, 更好地解释细胞复杂的生物学过程, 可将SECM与其他表征仪器(如荧光显微镜、拉曼光谱、质谱等)进一步联用, 利用多个仪器从多方面表征细胞的功能和行为, 为生物医学领域中的复杂体系问题的研究提供细胞整体的实验数据参考。

表 1 SECM在单细胞、细胞球和微组织方面的应用研究(2010~2020年)

Table 1 Summary of SECM applications in studies of single cell, cell spheroid and microtissues (from 2010 to 2020)

研究对象	细胞、细胞球和微组织种类	探针种类	表征参数	参考文献
神经细胞	PC12	铂微电极(直径10 μm)	形貌 呼吸活性	[57,59]
		碳电极(直径150 nm)	形貌 NO 多巴胺	[58]
	SCG	铂/玻璃管微圆环双通道微电极 (内径0.33 μm , 外径0.55 μm)	形貌	[25]
	神经元	玻璃管微电极(直径 30 nm、860 nm)	乙酰胆碱	[39,52]
心肌细胞	心室壁细胞	铂微电极(直径10 μm)	搏动 O_2 GSH	[21,22]
		铂/玻璃管微圆环双通道微电极 (内径0.33 μm , 外径0.55 μm)	形貌 呼吸活性	[25]
	心肌间充质干细胞	铂微电极(直径10 μm)	氧化还原状态	[66,67]
肿瘤细胞	HeLa	铂微电极(直径10 μm , 20 μm , 25 μm , 50 μm)	MRP1泵的表达 NAD(P)H醌氧化还原酶活性 碱性磷酸酶活性	[8,9,14,71,72,84,86,87]
	WM-115	碳纤维微电极(直径7 μm)	MRP1泵的表达	[73]
		铂微电极(直径25 μm)	细胞膜通透性	[88]
	A431	铂/玻璃微管电极(直径1.25 μm)	碱性磷酸酶活性	[41]
	T24	铂微电极(直径5 μm 、10 μm)	细胞膜通透性 O_2 H_2O_2	[15,74~79,89]
			H_2O_2 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ONOO^- $\text{NO}^\bullet$ NO_2^-	
	MCF-10A	碳纳米电极(直径80 nm)		[16]
	RT112	铂微电极(直径10 μm)	跨膜蛋白CD44表达	[10]
	PC3	铂微电极(直径10 μm)	H_2O_2	[20]
	HS578T	铂微电极(直径1 μm 、10 μm)	O_2	[28]
	HepG2	铂微电极(直径10 μm)	形貌	[6]
	SCC25	石墨糊微电极(直径10 μm)	迁移	[70]
细胞球 微组织	HeLa微组织	铂微电极(直径10 μm)	O_2	[83]
	肝细胞球	铂微电极(直径10 μm)	O_2	[82]
	MCF-7细胞微球	铂微电极(直径25 μm)	碱性磷酸酶活性	[84]
	HepG2微组织	铂微电极(直径10 μm)	O_2	[17]
	黑色素瘤微组织	Tyr修饰的铂微电极(直径 10 μm)	TyR	[85]

参考文献

- Şahin B, İlğün G. *Health Soc Care Community*, 2020, doi:10.1111/hsc.13156
- Hassanpour SH, Dehghani M. *J Cancer Res Practice*, 2017, 4: 127–129

- 3 Deuschl G, Beghi E, Fazekas F, Varga T, Christoforidi KA, Sipido E, Bassetti CL, Vos T, Feigin VL. *Lancet Public Health*, 2020, 5: e551–e567
- 4 Lee C, Kwak J, Bard AJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 1740–1743
- 5 Shao YH. *Chin J Analyt Chem*, 1999, 27: 3–5 (in Chinese) [邵元华. 分析化学, 1999, 27: 3–5]
- 6 Hirano Y, Kowata K, Kodama M, Komatsu Y. *Bioelectrochemistry*, 2013, 92: 1–5
- 7 Noyhouzer T, L'Homme C, Beaulieu I, Mazurkiewicz S, Kuss S, Kraatz HB, Canesi S, Mauzeroll J. *Langmuir*, 2016, 32: 4169–4178
- 8 Kuss S, Polcaro D, Geissler M, Brassard D, Mauzeroll J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 9249–9254
- 9 Koley D, Bard AJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 11522–11527
- 10 Roberts WS, Davis F, Holmes JL, Collyer SD, Larcombe LD, Morgan SL, Higson SPJ. *Biosens Bioelectron*, 2013, 41: 282–288
- 11 Chang CY, Takahashi Y, Murata T, Shiku H, Chang HC, Matsue T. *Lab Chip*, 2009, 9: 1185–1192
- 12 Arai T, Nishijo T, Matsumae Y, Zhou Y, Ino K, Shiku H, Matsue T. *Anal Chem*, 2013, 85: 9647–9654
- 13 Obregon R, Horiguchi Y, Arai T, Abe S, Zhou Y, Takahashi R, Hisada A, Ino K, Shiku H, Matsue T. *Talanta*, 2012, 94: 30–35
- 14 Kuss S, Cornut R, Beaulieu I, Mezour MA, Annabi B, Mauzeroll J. *Bioelectrochemistry*, 2011, 82: 29–37
- 15 Zhang MMN, Long YT, Ding Z. *J InOrg Biochem*, 2012, 108: 115–122
- 16 Li Y, Hu K, Yu Y, Rotenberg SA, Amatore C, Mirkin MV. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 13055–13062
- 17 Vasanthan KS, Sethuraman S, Parthasarathy M. *Anal Chim Acta*, 2015, 890: 83–90
- 18 Kwak J, Bard AJ. *Anal Chem*, 1989, 61: 1221–1227
- 19 Bard AJ, Fan FRF, Pierce DT, Unwin PR, Wipf DO, Zhou F. *Science*, 1991, 254: 68–74
- 20 Salamifar SE, Lai RY. *Anal Chem*, 2013, 85: 9417–9421
- 21 Hirano Y, Kodama M, Shibuya M, Maki Y, Komatsu Y. *Anal Biochem*, 2014, 447: 39–42
- 22 Okumura S, Hirano Y, Maki Y, Komatsu Y. *Analyst*, 2018, 143: 4083–4089
- 23 Lee Y, Ding Z, Bard AJ. *Anal Chem*, 2002, 74: 3634–3643
- 24 Kranz C, Kueng A, Lugstein A, Bertagnolli E, Mizaikoff B. *Ultramicroscopy*, 2004, 100: 127–134
- 25 Takahashi Y, Shevchuk AI, Novak P, Murakami Y, Shiku H, Korchev YE, Matsue T. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 10118–10126
- 26 Chai X, Zhou X, Zhu A, Zhang L, Qin Y, Shi G, Tian Y. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 8129–8133
- 27 Su B. *Handbook of Analytical Chemistry. Part 4 Electroanalytical Chemistry*. Beijing: Chemical Industry Press, 2016 (in Chinese) [苏彬. 分析化学手册. 第四分册. 电化学分析. 北京: 化学工业出版社, 2016]
- 28 Santos CS, Kowaltowski AJ, Bertotti M. *Sci Rep*, 2017, 7: 11428
- 29 Soldà A, Valenti G, Marcaccio M, Giorgio M, Pelicci PG, Paolucci F, Rapino S. *ACS Sens*, 2017, 2: 1310–1318
- 30 Li Y, Ning X, Ma Q, Qin D, Lu X. *TrAC Trends Anal Chem*, 2016, 80: 242–254
- 31 Liu Y, Liu X, Guo Z, Hu Z, Xue Z, Lu X. *Biosens Bioelectron*, 2017, 87: 101–107
- 32 Ren QQ, Wu J, Zhang WC, Wang C, Qin X, Liu GC, Li ZX, Yu Y. *Sens Actuat B-Chem*, 2017, 245: 615–621
- 33 Shen M, Colombo ML. *Anal Methods*, 2015, 7: 7095–7105
- 34 Li YT, Zhang SH, Wang XY, Zhang XW, Oleinick AI, Svir I, Amatore C, Huang WH. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 9313–9318
- 35 Polcaro D, Dauphin-Ducharme P, Mauzeroll J. *Chem Rev*, 2016, 116: 13234–13278
- 36 Lugo-Morales LZ, Loziuk PL, Corder AK, Toups JV, Roberts JG, McCaffrey KA, Sombers LA. *Anal Chem*, 2013, 85: 8780–8786
- 37 Du F, Huang W, Shi Y, Wang Z, Cheng J. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24: 415–421
- 38 Chen Y, Su B, Shao YH. *Chem J Chin U*, 2003, 24: 1834–1837 (in Chinese) [陈勇, 苏彬, 邵元华. 高等学校化学学报, 2003, 24: 1834–1837]
- 39 Welle TM, Alanis K, Colombo ML, Sweedler JV, Shen M. *Chem Sci*, 2018, 9: 4937–4941
- 40 Page A, Kang M, Armitstead A, Perry D, Unwin PR. *Anal Chem*, 2017, 89: 3021–3028
- 41 Şen M, Takahashi Y, Matsumae Y, Horiguchi Y, Kumatani A, Ino K, Shiku H, Matsue T. *Anal Chem*, 2015, 87: 3484–3489
- 42 Phillips CG, Stone HA. *J Electroanal Chem*, 1995, 396: 277–283
- 43 Wang CL, Creasy KE, Shaw BR. *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem*, 1991, 300: 365–375
- 44 Lin Y, Wang K, Xu Y, Li L, Luo J, Wang C. *Biosens Bioelectron*, 2016, 78: 274–280
- 45 Pan R, Xu M, Burgess JD, Jiang D, Chen HY. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 4087–4092
- 46 Pan R, Xu M, Jiang D, Burgess JD, Chen HY. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 11436–11440
- 47 Lee Y, Amemiya S, Bard AJ. *Anal Chem*, 2001, 73: 2261–2267

- 48 Zoski CG. *Curr Opin Electrochem*, 2017, 1: 46–52
- 49 Takahashi Y, Kumatani A, Shiku H, Matsue T. *Anal Chem*, 2017, 89: 342–357
- 50 Ino K, Şen M, Shiku H, Matsue T. *Analyst*, 2017, 142: 4343–4354
- 51 Sun P, Laforge FO, Abeyweera TP, Rotenberg SA, Carpino J, Mirkin MV. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 443–448
- 52 Shen M, Qu Z, DesLaurier J, Welle TM, Sweedler JV, Chen R. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 7764–7768
- 53 Ding Z, Quinn BM, Bard AJ. *J Phys Chem B*, 2001, 105: 6367–6374
- 54 Bard AJ, Fan FRF, Kwak J, Lev O. *Anal Chem*, 1989, 61: 132–138
- 55 Rapino S, Marcu R, Bigi A, Soldà A, Marcaccio M, Paolucci F, Pelicci PG, Giorgio M. *Electrochim Acta*, 2015, 179: 65–73
- 56 Eckhard K, Chen X, Turcu F, Schuhmann W. *Phys Chem Chem Phys*, 2006, 8: 5359–5365
- 57 Nebel M, Grütze S, Diab N, Schulte A, Schuhmann W. *Faraday Discuss*, 2013, 164: 19–32
- 58 Takahashi Y, Shevchuk AI, Novak P, Babakinejad B, Macpherson J, Unwin PR, Shiku H, Gorelik J, Klenerman D, Korchev YE, Matsue T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 11540–11545
- 59 Ning X, Wu T, Xiong Q, Zhang F, He PG. *Anal Chem*, 2020, 92: 12111–12115
- 60 Li YT, Zhang SH, Wang L, Xiao RR, Liu W, Zhang XW, Zhou Z, Amatore C, Huang WH. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 12456–12460
- 61 Shin M, Wang Y, Borgus JR, Venton BJ. *Annu Rev Anal Chem*, 2019, 12: 297–321
- 62 Xu M, Pan R, Zhu Y, Jiang D, Chen HY. *Anal Chem*, 2018, 90: 10117–10121
- 63 Tan XL, Wang MH, Dong YF, Shao YH. *Chin J Appl Chem*, 2018, 35: 1107–1112 (in Chinese) [覃晓丽, 王茗涵, 董逸帆, 邵元华. 应用化学, 2018, 35: 1107–1112]
- 64 Li Y, Lang J, Ye Z, Wang M, Yang Y, Guo X, Zhuang J, Zhang J, Xu F, Li F. *Anal Chem*, 2020, 92: 4771–4779
- 65 Zheng XT, Li CM. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 2061–2071
- 66 Petroniene J, Morkvenaite-Vilkonciene I, Miksiunas R, Bironaite D, Ramanaviciene A, Mikoliunaite L, Kisielute A, Rucinskas K, Janauskas V, Plikusiene I, Labeit S, Ramanavicius A. *Electroanalysis*, 2020, 32: 1337–1345
- 67 Petroniene J, Morkvenaite-Vilkonciene I, Miksiunas R, Bironaite D, Ramanaviciene A, Rucinskas K, Janauskas V, Ramanavicius A. *Electrochim Acta*, 2020, 360: 136956
- 68 Bard AJ, Li X, Zhan W. *Biosens Bioelectron*, 2006, 22: 461–472
- 69 Bartolini L, Malferrari M, Lugli F, Zerbetto F, Paolucci F, Pelicci PG, Albonetti C, Rapino S. *ChemElectroChem*, 2018, 5: 2975–2981
- 70 Ummadi JG, Joshi VS, Gupta PR, Indra AK, Koley D. *Anal Methods*, 2015, 7: 8826–8831
- 71 Şen M, Ino K, Shiku H, Matsue T. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 2163–2167
- 72 Kuss S, Trinh D, Mauzeroll J. *Anal Chem*, 2015, 87: 8102–8106
- 73 Polcaro D, Hernández-Castro JA, Li K, Geissler M, Mauzeroll J. *Anal Chem*, 2017, 89: 8988–8994
- 74 Li MSM, Filice FP, Ding Z. *J Inorg Biochem*, 2014, 136: 177–183
- 75 Filice FP, Li MSM, Henderson JD, Ding Z. *Anal Chim Acta*, 2016, 908: 85–94
- 76 Henderson JD, Filice FP, Li MSM, Ding Z. *J Inorg Biochem*, 2016, 158: 92–98
- 77 Henderson JD, Filice FP, Li MSM, Ding Z. *ChemElectroChem*, 2017, 4: 856–863
- 78 Filice FP, Li MSM, Wong JM, Ding Z. *J Inorg Biochem*, 2018, 182: 222–229
- 79 Zhang MN, Ding Z, Long YT. *Analyst*, 2015, 140: 6054–6060
- 80 Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 839–845
- 81 Lei KF, Lin BY, Tsang NM. *RSC Adv*, 2017, 7: 13939–13946
- 82 Takahashi R, Zhou Y, Horiguchi Y, Shiku H, Sonoda H, Itabashi N, Yamamoto J, Saito T, Matsue T, Hisada A. *J Biosci Bioeng*, 2014, 117: 113–121
- 83 Sridhar A, de Boer HL, van den Berg A, Le Gac S. *PLoS ONE*, 2014, 9: e93618
- 84 Zhao L, Shi M, Liu Y, Zheng X, Xiu J, Liu Y, Tian L, Wang H, Zhang M, Zhang X. *Anal Chem*, 2019, 91: 4307–4311
- 85 Lin TE, Bondarenko A, Lesch A, Pick H, Cortés-Salazar F, Girault HH. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 3813–3816
- 86 Kuss S, Trinh D, Danis L, Mauzeroll J. *Anal Chem*, 2015, 87: 8096–8101
- 87 Matsumae Y, Takahashi Y, Ino K, Shiku H, Matsue T. *Anal Chim Acta*, 2014, 842: 20–26
- 88 Bondarenko A, Lin TE, Stupar P, Lesch A, Cortés-Salazar F, Girault HH, Pick H. *Anal Chem*, 2016, 88: 11436–11443

- 89 Filice FP, Li MSM, Ding Z. *Adv Theor Simul*, 2018, 2: 1800124
- 90 Bard AJ, Mirkin MV. *Scanning Electrochemical Microscopy. Second Edition*. New York: Taylor & Francis Group, 2012
- 91 Amemiya S, Guo J, Xiong H, Gross DA. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386: 458–471
- 92 Wang W, Liu ZB, Bao Y, Guan YR, Niu L, Zhang GY. *Chin J Analyt Chem*, 2018, 46: 342–347 (in Chinese) [王伟, 刘振邦, 包宇, 关怡然, 牛利, 张国玉. 分析化学, 2018, 46: 342–347]

Research advances of scanning electrochemical microscopy in biomedical field

Yabei Li^{1,2}, Zhaoyang Ye^{2,3}, Yulin Liu^{2,3}, Yuxiang Zhao^{2,3}, Yang Zhai^{2,3,4}, Tong Zhu^{2,3,5}, Feng Xu^{2,3}, Fei Li^{2,3*}

¹ School of Chemistry, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

² Bioinspired Engineering and Biomechanics Center (BEBEC), Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

³ The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

⁴ Department of Oncology, Tumor Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710061, China

⁵ Department of Cardiology, Xidian Group Hospital, Xi'an 710077, China

*Corresponding author (email: feili@mail.xjtu.edu.cn)

Abstract: Investigation of the abnormal behavior of pathological cells and tissues can provide important references for understanding the pathological mechanism of critical diseases and screening new drugs. Scanning electrochemical microscopy (SECM), an electrochemical principle-based scanning probe microscope, can record the currents or potentials when the probe scans above the sample surface and performs the characterizations of morphology and obtains various chemical informations of living cells in an *in-situ*, real-time and local way. The applications of SECM in the studies of critical diseases-related cells, cell spheroids and microtissues have been rapidly developed in the past 10 years. From the perspective of disease-related SECM researches, this review summarizes the research progress of SECM in the biomedical field from 2010 to 2020 from the levels of single cell to cell spheroid and microtissue. Firstly, the instrument composition, probe types and working modes of SECM are introduced. Secondly, the application progress of SECM in neurons, cardiomyocytes and tumor cells is introduced. Thirdly, we introduce the latest applications of SECM in cell spheroids and microtissues. Finally, we propose and prospect the challenges and development directions of the future applications of SECM in the biomedical field.

Keywords: Scanning electrochemical microscopy (SECM), neuron, cardiac cell, cancer cell, cell spheroid, microtissue

doi: [10.1360/SSC-2020-0205](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0205)