

味觉传导机理及味觉芯片技术研究进展

李燕 刘清君 徐莹 蔡华 秦利锋 王丽江 王平*

(浙江大学生物传感器国家专业实验室, 生物医学工程教育部重点实验室, 生物医学工程与仪器科学学院, 杭州 310027)

* 联系人, E-mail: cnpwang@mail.bme.zju.edu.cn

摘要 在人类的敏感器官方面, 味觉的研究明显落后于视觉、听觉、触觉和嗅觉. 针对酸、甜、苦、咸、鲜等多种不同味觉, 人类及动物的味觉细胞内存在有多种不同的传导感受机制, 但由于缺乏在细胞和分子水平上进行有效的研究手段, 有关味觉的研究仍在探索中. 近年来, 随着分子生物学和电生理研究的不断深入, 味觉细胞的传导编码机制研究取得了很大的进展. 结合我们实验室多年来在人工嗅觉与人工味觉和细胞传感器方面的研究基础, 对近年来国际上有关味觉的传导机理和细胞芯片技术的最新发展进行了综合评述. 在此基础上, 结合我们当前的研究工作, 重点介绍了细胞芯片这一生物学与微电子技术交叉领域研究的最新成果, 对味觉细胞芯片及其应用前景进行了论述, 提出了仿生味觉芯片和味觉细胞芯片的研究方向, 并在细胞和分子水平上对味觉的研究进行了初步探讨.

关键词 味觉 味觉传导 细胞芯片 味觉芯片

味觉是重要的生理感觉, 一般分为酸、甜、苦、咸和鲜 5 种基本味觉. 通常, 我们所说的各种味道均由这 5 种基本味觉组合而成. 某种味觉物质(即味质)溶解于唾液、作用于味觉细胞上的感受器后, 经过细胞内信号转导、神经传递把味觉信号分级传送到大脑, 进行整合分析, 产生味觉. 通常所说的辣味是红辣椒内的辣椒素作用于口腔黏膜上皮的感觉神经元而非味觉受体细胞引起的疼痛感, 所以辣并不是一种基本味觉. 研究表明, 辣椒素激活了口腔内感觉神经元上的疼痛受体(一种离子通道), 引起可由物质 P、神经激肽 A 和降血钙素基因相关的缩氨酸调节的疼痛感以及口腔温度升高.

味觉是味质和味觉受体细胞顶端微纤毛上的受体和离子通道相互作用产生的. 其中, 一些味觉传导过程把化学信息转变成分子第二信使(如磷酸环苷酸 cNMPs 和三磷酸肌醇 IP₃)使味觉细胞去极化和 Ca²⁺ 释放, 另一些将味质本身作为细胞信号(如 Na⁺, K⁺, H⁺)使味觉细胞产生动作电位. 味质本身的结构和化学多样性决定了味觉传导具有多种机制, 从而决定了与视觉、嗅觉单一的刺激传导机制(光子或者挥发性小分子)具有显著的区别.

由于以前的研究方法和手段有限, 味觉研究一直落后于视觉、听觉、触觉和嗅觉的研究. 近年来, 随着运用微电极记录到动物单一味细胞上的味觉受体电位和膜片钳对单通道离子电流的记录, 结合细胞生物学、分子生物学方法及微电子芯片技术的运用,

味觉研究取得了较大的进展. 细胞芯片是生物芯片研究中的一个热点, 它利用活细胞作为探测单元, 直接将细胞培养在硅微器件上, 可以监测细胞新陈代谢、电生理信息等. 细胞芯片敏感性高、选择性好、响应迅速, 在生物医学、环境监测和药物开发中有广泛的应用. 随着半导体微细加工技术的发展, 分析技术的微型化为细胞微环境分析提供了强有力的手段. 味觉细胞芯片作为一种无损的实时传感技术手段, 将在味觉传导机理的研究等方面发挥重要的作用.

本文基于味觉细胞详细叙述了 5 种基本味觉响应机制, 评述了细胞芯片这一生物学与微电子技术交叉领域热点在神经网络研究中的应用, 对味觉细胞芯片在研究味觉传导机制方面的应用前景进行了展望.

1 味觉的生物学基础

味觉感受器是味蕾(taste bud). 在哺乳动物中, 味蕾主要分布于舌上皮、口腔和咽部黏膜的表面. 味蕾由味觉受体细胞(taste receptor cells)、支持细胞和基底细胞组成, 每个味蕾包括 50~100 个味觉细胞, 形状类似洋葱(图 1). 味觉受体细胞是直接和味质接触感受特定味道, 并与神经纤维突触连接传导味觉信号的功能性味觉细胞. 它属于形态细长的双极细胞, 顶端有味纤毛, 集合形成味孔与外界味质直接接触发生相互作用. 味觉受体细胞可以分为 3 种类型: 暗细胞、亮细胞和中间细胞. 它们均具有突触连接的

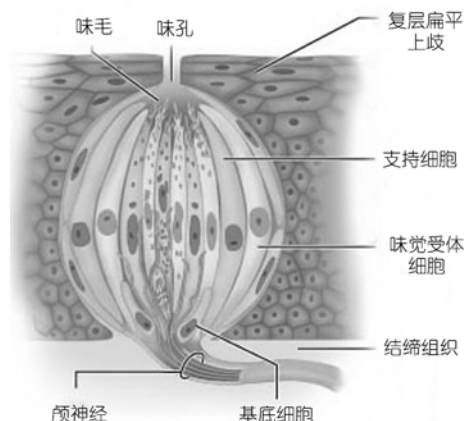


图1 味蕾的示意图

特异性, 分别约占细胞总数的 50%, 25%和 15%. 味觉传入神经的终末端穿过味蕾的基底部并与味觉受体细胞形成突触连接. 基底细胞位于味蕾的基底部, 并由它们再分化产生各种味觉受体细胞. 味觉细胞由舌咽神经、面神经的鼓索神经侧支和迷走神经支配. 味觉信号沿这些神经传导至延髓孤束核后到达脑桥的味觉区, 再经过丘脑味觉中继核投射到中央后回最下部的味觉中枢进行味觉感知.

2 味觉受体细胞对味觉物质的响应机制

通常NaCl能引起典型的咸味; H^+ 是引起酸味的关键因素, 有机酸的味道也与它们带负电的酸根有关; 甜味的引起与葡萄糖的主体结构有关; 奎宁和一些有毒植物的生物碱的结构能引起典型的苦味; 味精能够引起鲜味. 这5种基本味觉信号传导机制并不一样, 咸和酸的刺激要通过特殊化学门控通道, 甜味涉及受体、G-蛋白和第二信使系统, 苦味和鲜味则由于物质结构不同可能存在多种传导机制. 和嗅觉编码类似, 味觉中枢可能通过专用神经通路上的神经信号来“认知”这5种基本味觉.

2.1 咸味传导机制

目前, 关于钠盐的传导机制可以肯定的是上皮型钠通道(ENaCs)^[1]通过 Na^+ 内流激活味觉细胞从而识别钠盐. 味觉细胞上的ENaCs电导很小(~ 5 pS), 可以被亚摩尔级的阿米洛利抑制. ENaC通常包含3个亚基: α , β , γ . α -ENaC产生阿米洛利敏感的 Na^+ 电流, 而 β -ENaC和 γ -ENaC的联合作用可使这些电流提高100多倍.

Na^+ 也有可能通过细胞间隙渗透导致基底外侧膜胞外 Na^+ 浓度升高, 再通过基底外侧膜上阿米洛利敏

感 Na^+ 通道或者非选择性阳离子通道进入味觉细胞, 使细胞去极化. Miyamoto等人^[2]发现, 阿米洛利虽然可以抑制味觉细胞对NaCl的响应, 但高浓度的阿米洛利并不能把这种响应完全抑制, 说明味觉细胞对于盐的响应分为阿米洛利敏感和不敏感两部分. 研究表明, NaCl在小鼠味觉细胞内引起的响应包括3个组分: 阿米洛利敏感电导、 Cd^{2+} 敏感的非选择性阳离子电导和NPPB敏感的 Cl^- 电导(详见酸味传导)^[2]. 在不同的细胞内这3种组分的作用程度各不相同. 小鼠味觉细胞对NaCl响应主要依赖位于顶端受体膜上的前两种组分.

2.2 酸味传导机制

酸味感知和 H^+ 浓度直接相关. 酸在味觉细胞内可以阻断、通透或者激活离子通道、改变传递物质的功能, 并且改变胞内pH值. 当酸导致胞外pH变化, 胞内pH也会相应改变, 且呈线性关系^[3]. 2001年, 研究人员总结了不同动物的味觉受体细胞中酸味的传导机制^[4], 泥源属味觉受体细胞的顶端膜存在大量电压门控 K^+ 通道, 可被氢离子阻断. 其他种属味觉受体细胞的酸感知可能是通过顶端膜上可通透 Na^+ 和 Ca^{2+} 的质子门控离子通道(proton-gated channel)作用的.

和钠盐传导类似, ENaC家族的离子通道在酸味传导中也有重要作用. 20世纪90年代初, 研究发现, H^+ 通过ENaCs使得仓鼠味觉细胞去极化^[5]. 1999年, Benos等人^[6]发现与味觉细胞酸味感知有关的ENaCs有3个亚族: 脑型 Na^+ 通道-1(BNaC1), 脑型 Na^+ 通道-2(BNaC2)和脊底酸味感知离子通道(DRASIC), 它们都是可以被 H^+ 激活的阳离子通道, 并且对于阿米洛利敏感. 酸味质激活这些通道导致了味觉细胞去极化.

阿米洛利敏感的酸味传导机制只存在于仓鼠, 对于小鼠、大鼠和灵长类都不适用, 酸刺激会引发小鼠味觉细胞的基底外侧膜上 Cl^- 电导^[2]. 因此, 不同的生物物种的味觉细胞对酸响应机制也不尽相同, 具体还需要进一步的研究.

2.3 苦味传导机制

2000年, 研究人员克隆出苦味受体T2Rs/TRB^[7,8], 这类受体存在于味觉受体细胞, 可以被苦味物如苦精激活. T2Rs/TRB属于G蛋白偶联受体(GPCRs)超家族, 是由一条多肽链形成的7个跨膜螺

旋结构,有相应的3个胞内环和3个胞外环^[9]. T2Rs/TRB可以结合不同结构的苦味物质,具有明显的多态性.

苦味传导中最主要的就是味蛋白(gustducin)调节通路. 味蛋白是一种味觉特异性G-蛋白,专门表达于舌味蕾细胞而不表达于其他细胞,与参与视觉信号转导的转导蛋白相似. 如图2(e)所示, T2Rs/TRB也即味蛋白偶联受体. 味蛋白由 α , β , γ 共3个亚基组成,在苦味和甜味传导中有重要作用,敲除 α -gustducin(味蛋白的 α 亚单位)的小鼠会明显减少对苦味和甜味的响应. 图2(e)即味蛋白调节的苦味响应的2条通路:

() 苦味物质刺激苦味T2Rs/TRB受体,激活 α -gustducin以及磷酸二脂酶(PDE),从而降低胞内第二信使cNMP的浓度, cNMP通过一定途径影响味觉细胞膜上的离子通道活性,使得细胞去极化. () α -gustducin- $G\beta_3$ - $G\gamma_{13}$ 三聚体被味质激活后, β 和 γ 亚

基从T2Rs/TRB释放出来激活磷脂酶C($PLC\beta_2$)产生三磷酸肌醇(IP_3),从而引起胞内贮存的 Ca^{2+} 释放、神经递质释放.

除此之外,研究发现还有其他的蛋白参与了苦味的信号传导,同一种苦味物质可能有多种复杂关联的传导途径. 其他一些苦味物如奎宁和 Mg^{2+} ,通过抑制顶端 K^+ 通道(图2(e))产生动作电位. 而且,同一苦味物质作用于不同生物物种也会有不同的传导途径.

2.4 甜味传导机制

甜味在味觉细胞内通过2种途径传导(图2(d)):蔗糖与特定的GPCR结合后,激活腺苷酸环化酶(AC)产生的cAMP导致胞内cAMP浓度升高,进一步激活蛋白激酶A(PKA)磷酸化,然后抑制基底外侧的 K^+ 通道,引起胞外 Ca^{2+} 内流. 人造甜味剂与另外一种

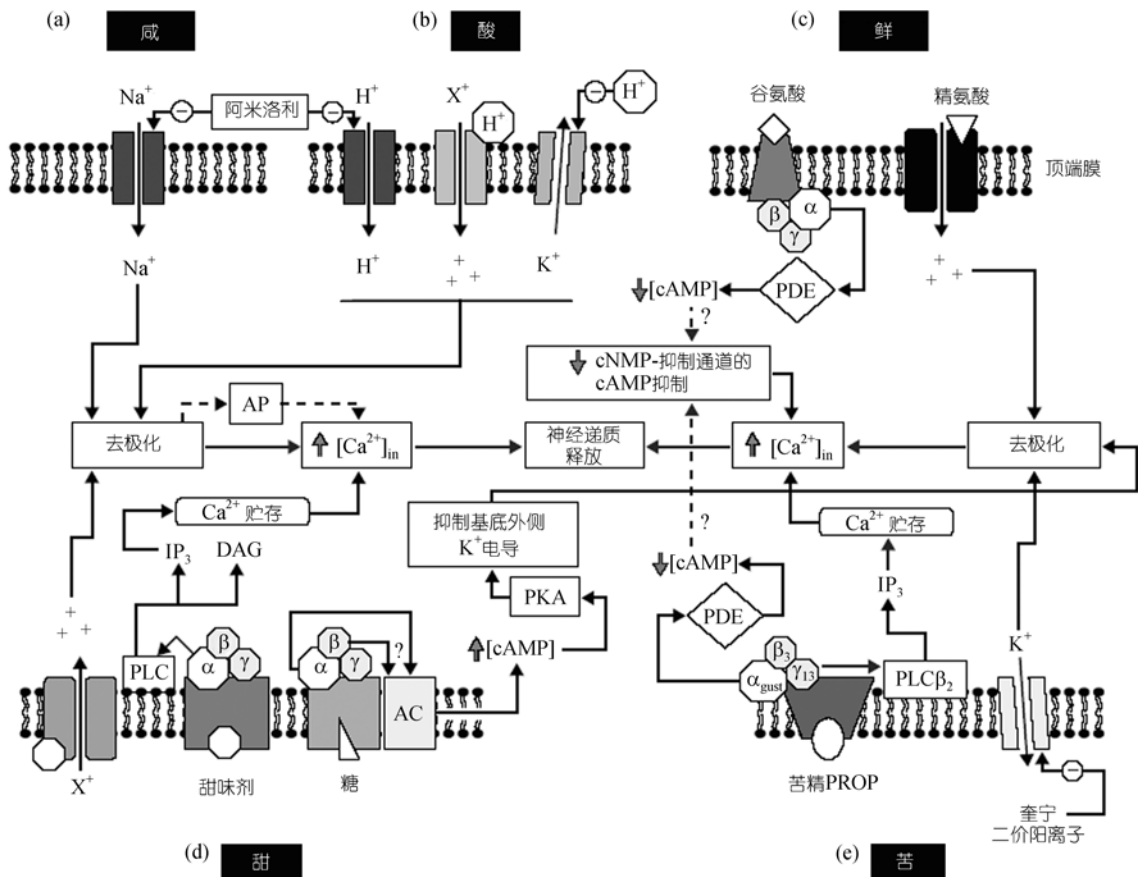


图2 5种味觉物质在脊椎动物味觉受体细胞内的传导机制^[1]

所有味觉通路最终都引起胞内 Ca^{2+} 浓度升高,神经递质释放. (a) Na^+ 通过阿米洛利敏感的ENaC使细胞去极化; (b) 酸(H^+),也通过ENaC激活 H^+ -依赖的阳离子(X^+)通道,抑制顶端 K^+ 通道; (c) 详见鲜味传导机制; (d) 详见甜味传导机制; (e) 详见苦味传导机制

GPCR结合, 激活 $\text{PLC}\beta_2$ 产生 IP_3 , 引起胞内 IP_3 增加, 导致胞内细胞膜上 IP_3 -门控 Ca^{2+} 通道开放, 胞内贮存的 Ca^{2+} 释放. 天然糖类通过 Ca^{2+} 内流引发动作电位, 人造甜味剂则通过释放胞内贮存的 Ca^{2+} 来产生动作电位. 甜味也可能与味蛋白有关(见苦味传导机制), 还需要进一步研究.

2.5 鲜味传导机制

鲜味来自L型谷氨酸及其盐, 味精的主要成分就是谷氨酸钠(MSG). 在味觉细胞内, L型谷氨酸有2种作用机制: 离子型(iGluR)和代谢型谷氨酸受体(mGluR)^[10]. 膜片钳记录到2种谷氨酸响应: 大鼠味觉细胞通过iGluR发生去极化, 而通过mGluR激活产生超极化^[11]. iGluR代表突触型受体或者自动受体, 即可以被某些物质选择性激活的离子通道, 某些氨基酸如精氨酸, 就是激活离子型谷氨酸受体(图2(c)), 导致味觉细胞去极化的; 而mGluR是具有7跨膜区的GPCR, 最早发现于大脑.

代谢型谷氨酸受体的一个独特亚型mGluR4, 具有鲜味受体的所有特性^[12]. mGluR4在味觉细胞中特异性表达, 而且可以结合毫摩尔级的谷氨酸, 和引起鲜味的浓度阈值一致. 研究者利用细胞转染及原位杂交技术得到味组织中的mGluR4与脑组织中mGluR4在结构和功能上有明显不同, 从另一个角度证实了味型mGluR4是针对鲜味觉的味觉受体^[13]. mGluR4的配体L-AP4和L-MSG与单核苷酸协同作用可以引起鲜味觉的信号转导; 利用谷氨酸刺激味蕾可引起细胞内cAMP的下降并改变膜的转导速率. 如图2(c)所示, L型谷氨酸激活了mGluR4, 接着激活了PDE降低了cAMP水平. cAMP减少可能会打开cNMP抑制的通道导致胞内 Ca^{2+} 释放. 目前mGluR4引起味觉细胞中cAMP的降低的效果还不清楚, 需要mGluR4受体敲除小鼠来做进一步研究.

2.6 味觉编码模式

味质刺激味觉受体细胞产生相应的动作电位, 然后释放神经递质到相应的味觉神经纤维, 这些神经纤维再把得到的味觉信息传导到大脑, 由大脑作出相应的判断, 这个过程称为味觉编码. 30年来, 味觉编码形成2种对立的模型^[14]: () 跨纤维模式, 即外周的单个味觉细胞识别出很多味道, 并且对于多种味道有响应; () 分类模式, 即味觉细胞选择性的对于特定味质响应, 如某些细胞识别甜味物质而另

一些识别苦味物质. 2004年, Kristin^[15]利用受体研究味觉编码, 发现在糖类、氨基酸和苦味物的识别中, 特定受体在某类味觉细胞中表达并参与识别这些味道. 甜味传导由T1R家族的G-蛋白偶联受体T1R2和T1R3联合调节, 鲜味传导由T1R1和T1R3联合调节, 而苦味主要由T2R家族约30个G-蛋白偶联受体介导. 最后认为相应于不同味道特定受体在味觉细胞中选择性的表达, 5种基本味觉由舌上5种细胞沿分类线传入大脑.

分子生物学最新发现味觉细胞内表达2种信号传导的组分: 磷脂酶 $\text{C}\beta_2$ ($\text{PLC}\beta_2$)和TRPM5离子通道. TRPM5与T1Rs或者T2Rs受体共存, 味觉受体通过PLC可以激活TRPM5, 它们对于苦味、甜味和鲜味识别很重要. TRPM5或者 $\text{PLC}\beta_2$ 基因敲除的小鼠表现出甜味、苦味和鲜味的味觉缺失^[16], 但不影响其酸味和咸味的感觉, 说明虽然甜味、苦味和鲜味的感觉依赖于不同的受体, 但具有相同的信号编码途径.

3 细胞芯片技术在味觉传导机理研究中的应用

3.1 胞内记录和膜片钳记录

味觉受体细胞的胞内记录有近30年的历史^[17], 标准的胞内记录是用一个记录电极直接刺入细胞, 记录膜电位的直流信号. 1956年首先成功得到了单个味觉细胞的胞内记录, 测得细胞的静息电位, $-30\sim-50$ mV. 后来通过注入超极化电流到细胞, 记录到了与动作电位密切相关的电压依赖性 Na^+ 和 Ca^{2+} 电流. 随后Roper^[18]用一个微电极刺入泥小狗味觉细胞, 注入去极化电流记录到第1个味觉细胞动作电位.

检测动作电位可进一步分析味蕾中的信息. 但味觉细胞只有几个微米, 包埋在坚韧的舌上皮内, 标准的胞内记录并不适合. 需要采用高阻抗的电极、较细尖端以使对细胞损伤降到最小. 膜片钳技术的出现使其成为可能. 膜片钳技术以微弱电流信号测量为基础, 利用玻璃微电极与细胞膜封接, 可进行胞内记录, 而且相比微电极、电压钳对细胞损伤较小. 损伤小, 细胞就有更高的输入阻抗, 阻抗越高越能记录到很小的电流. 因此膜片钳可以测量多种膜通道电流, 其值可小到pA(10^{-12})量级.

目前, 味觉研究很多建立在膜片钳技术的基础上, 从味觉受体细胞的单个离子通道和受体入手来

分析膜上分布的通道、胞内第二信使系统以及酸、甜、咸、苦、鲜5种味质在味觉细胞内的传导机制、再从味觉受体细胞沿各级神经传导的过程等。除了前文所述对于基本味质响应传导的研究成果,膜片钳记录还发现柠檬酸离子能够大幅度增强动物对于甜味、咸味和酸味的喜好^[19]、低浓度辣椒素通过抑制味觉受体细胞上的 K^+ 通道使人产生愉悦味觉^[20]等等。

3.2 细胞芯片技术及味觉细胞芯片研究

虽然膜片钳相比早期的电压钳对细胞的损伤小了很多,但仍然对细胞有一定的刺伤。近几年,仿生味觉传感器(taste sensor)采用多通道高分子膜电极来辨别不同的味道,已经取得了显著的成果^[21,22]。这种传感器用类脂膜作为味觉物质换能器,能够以类似人的味觉感受方式检测出特定味质。通过模式识别味觉传感器可以很好地区分咖啡、绿茶等饮料,用于茶叶、酒类品质鉴定。但这些都是定性分析,目前还没有商业化的成品应用于食品工业,味觉传感器的定量研究还在发展中。同时,国际上基于光寻址电位传感器(LAPS)、场效应管(FET)、微电极阵列(MEA)的细胞芯片已用于培养电兴奋性细胞,并应用于动作电位监测、药效评估等。这些细胞芯片可以测量胞外电信号,对于细胞没有较大损伤。而且相对膜片钳技术,芯片技术可以同时测量不同位置的动作电位,实现细胞间的耦合测量,无损、同步地记录多个可兴奋细胞或组织的动作电位的传播。细胞芯片不仅可以研究神经元的电生理现象,也能研究细胞间的通讯,因此,可用于研究味觉电生理、传导机理。

美国Austin大学模拟动物舌的味觉辨别功能,利用对离子敏感的聚合物微球作为仿生味蕾,采用光化学原理来检测被测溶液离子成分^[23]。这种仿生味觉芯片能对溶液中多种被分析物进行并行、实时、

快速检测,并且可对检测结果进行量化。该芯片固定在一微机械加工平台上,采用蓝色发光二极管照射微球,位于微机械平台下的CCD用来采集荧光信号变化数据。在硅晶片表面用微机械加工工艺刻槽,将一种直径为50~100 μm 的合成敏感球固定在槽中,如图3所示。调制光通过敏感球和底部后投射到CCD探测器上,由CCD探测器和计算机分析光信号的变化。该芯片可以初步测定pH, Ca^{2+} , Ce^{3+} 和蔗糖的响应,识别不同的pH(3, 5, 7, 9, 11)下0.1 mol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液, 0.1 mol/L $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,以及0.1 mol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和0.1 mol/L $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 混合溶液。

我们较早开始了人工嗅觉、人工味觉和味觉芯片技术的研究^[22,24]。而且首先发展了LAPS结合LB膜技术的集成味觉芯片,并实现了味觉图像的检测。

LAPS(light addressable potentiometric sensors)的基本原理是基于半导体的内光电效应,即当半导体层受到一定波长的光照射时,半导体层吸收光子,发生禁带到导带的跃迁,产生出电子空穴对。若固定光强并采用强度调制的光照射LAPS器件,就可以在外电路中测量到电流。由于敏感膜与被测物的响应电压对耗尽层的影响,外电流大小的变化就反映了敏感膜的响应。若光源在LAPS器件上做连续扫描,记录下每一个位置光信号的大小,就可形成用于味觉溶液的图像,相当于在扫描区域内集成有上千个传感器,构成大容量传感器阵列。LAPS的这种特性可用来制作味觉图像传感器,通过在LAPS上沉积不同的敏感膜便可实现对不同离子成分的测量,实验中采用LB膜(单分子复合技术)实现了5种味觉物质的敏感膜的制备(图4)^[25]。

此外,我们在Austin大学研究的基础上,进一步发展硅微加工技术研制了微结构味觉芯片和信号识

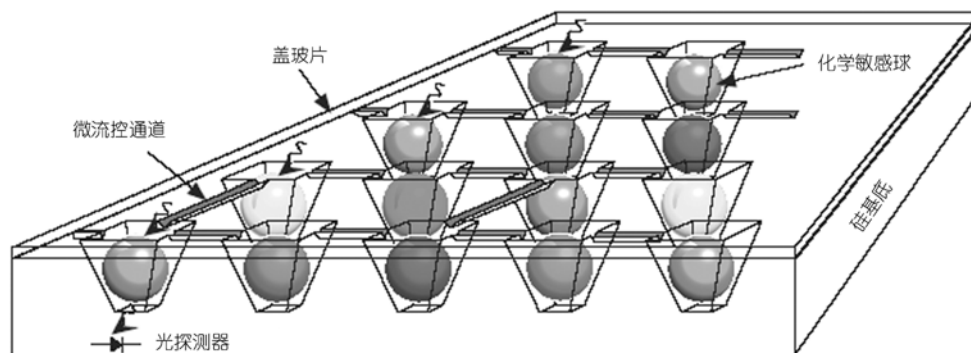


图3 仿生味觉芯片结构示意图

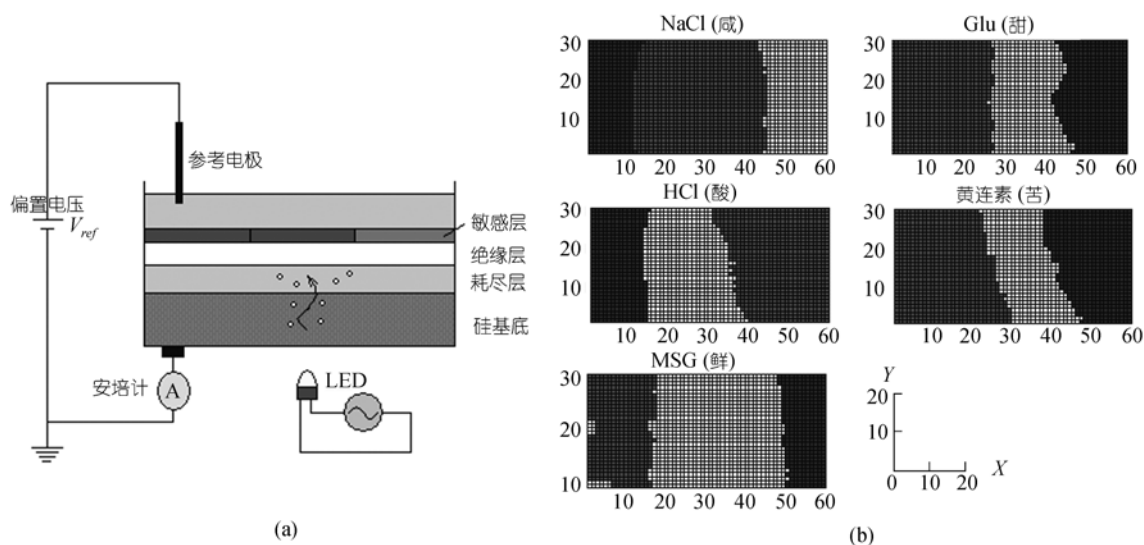


图4 基于LAPS和LB膜技术的味觉芯片

(a) 结构示意图; (b) 对5种基本味觉物质的检测结果

别技术, 实现了多种离子的自动识别. 该芯片经过深刻蚀的硅片和2层石英玻璃键合而成, 反应腔由微沟道和微井组成, 吸附了敏感物质的硅胶微球作为仿生味蕾放置在微井中. 由于硅胶是透明半透明的固体小球, 表面的羟基使得它能够很好的吸附极性的

染料物质. 图5(a)为测试系统框图. 待测溶液泵入反应腔体中, 与吸附在微球表面的敏感物质发生反应, 使得微球的颜色发生变化, 微球的图像通过显微镜被CCD记录, 提取微球上特定区域的RGB值作为味觉传感器的输出值^[26]. 如图5(b)为微球阵列在291

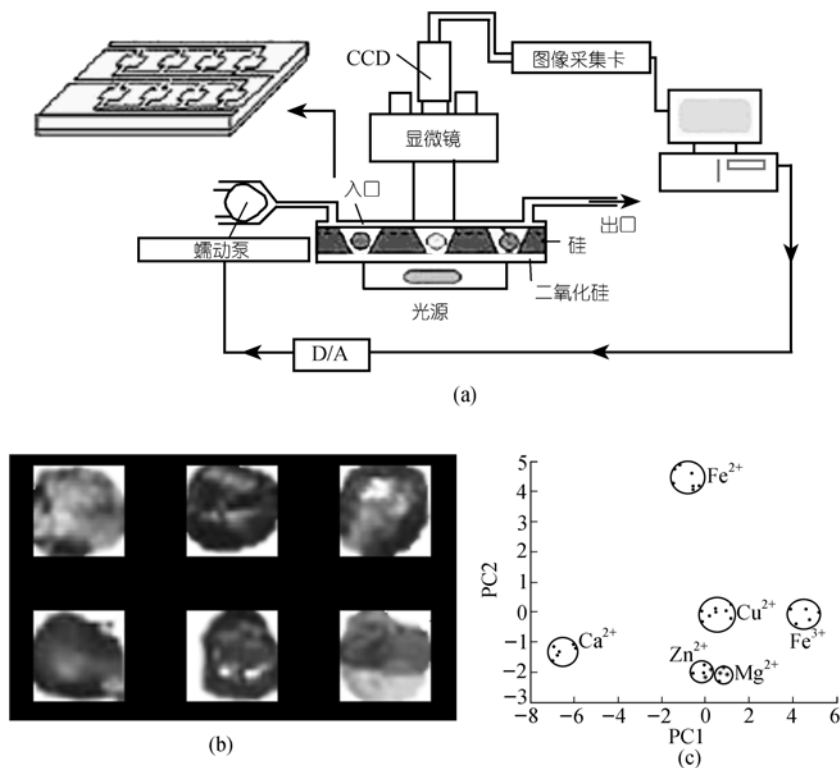


图5 仿生味觉芯片

(a) 检测系统框图; (b) 微球阵列在 Zn^{2+} 溶液中的响应图像; (c) 6种金属离子的PCA自动分类识别结果

$\mu\text{g/L}$ Zn^{2+} 溶液中的响应图像, 从左到右小球吸附的染料分别为苯酚红、茜素络合指示剂、5 碳荧光素(第 1 行), 茜素红、甲基紫 6B、甲基百里酚蓝(第 2 行). 我们不仅分析了多种 pH 溶液, 还测试了 40 个金属溶液样本, 其中包括 6 种金属离子: Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} 和 4 个离子混合样本, 溶液浓度最低可达 $2.02 \mu\text{g/L}$. 采用人工神经网络(ANN)、偏最小二乘法(PLS)和主元分析法(PCA)对得到的数据进行处理, 实现了溶液成分的定性和定量测量. 图 5(c)即 PCA 分析得到的结果, 成功的识别了这 6 种金属离子溶液.

目前, 国际上开展细胞芯片技术的研究呈现上升的势头, 并在神经网络方面取得很大的进展. 德国 Fromherz^[27] 在 FET 上培养了蜗牛神经网络并记录到了神经兴奋性和 2 个突触连接的神经元的动作电位传导过程. 采用类似的技术, 在 FET 上也可以培养味觉细胞网络, 进行味觉响应过程的动作电位记录、神经兴奋传导及电位分布, 有助于解开味觉细胞网络信息传导的本质.

MEA 是在硅或者玻璃基底上采用标准硅工艺, 采用 lift-off 技术制作微电极, 相对于 FET 工艺简单. 电极可选用金、钽或铂, 直径在几个微米到几十微米之间. 近来又有研究人员使用 ITO(锡钨氧化物, 透明)作为微电极, 便于细胞培养与显微观察. 因此, 目前更多地应用 MEA 研究神经网络. Ecken 等人^[28] 开

了一种基于 8×8 扩展门电极阵列的 MEA, 探测心肌细胞层的信号传播和用于心脏药物筛选. 大量的神经细胞胞外记录信号在药物筛选中有着及其重要的作用, Keefe 等人^[29] 在 64 ITO 电极($\phi = 8 \mu\text{m}$)阵列上培养了小鼠脊髓神经网络, 测量引起痉挛的药物 TMPP 对神经元的响应(图 6), 得到 TMPP 作用于神经元使得其动作电位频率、幅度均增大, 说明此药物对神经递质 GABA 的去抑制性导致癫痫. FET 和 MEA 另一个重要应用是记录神经组织切片的活动^[30]. 组织切片的多点测量也可用于药物或者毒性物质的筛选, 研究神经元的整体兴奋性.

基于 LAPS 芯片技术也能够用于研究心肌细胞、嗅觉和味觉神经细胞网络的动作电位. 相对于 FET 和 MEA 的定点测量, LAPS 可以移动寻址, 能对基底上随机培养的味觉细胞群跟踪定位, 从而使我们能检测味觉细胞群的传导响应. 我们实验室在前几年研究细胞微生理计以及细胞传感器的基础上尝试了基于 LAPS 的味觉细胞芯片. 同时, 我们也开展了基于 FET 和 MEA 的味觉细胞芯片的研究^[31](图 7). 图 7 是我们目前在芯片上培养的味蕾组织、味觉细胞网络和基于 FET 的细胞芯片. 图 8 是用于味觉细胞芯片测量的系统框图. 在该系统中, 我们已经研究了在单个细胞、味觉细胞网络的信号传导过程, 希望得出在不同味道刺激下的味觉细胞的响应和味觉细胞网络的

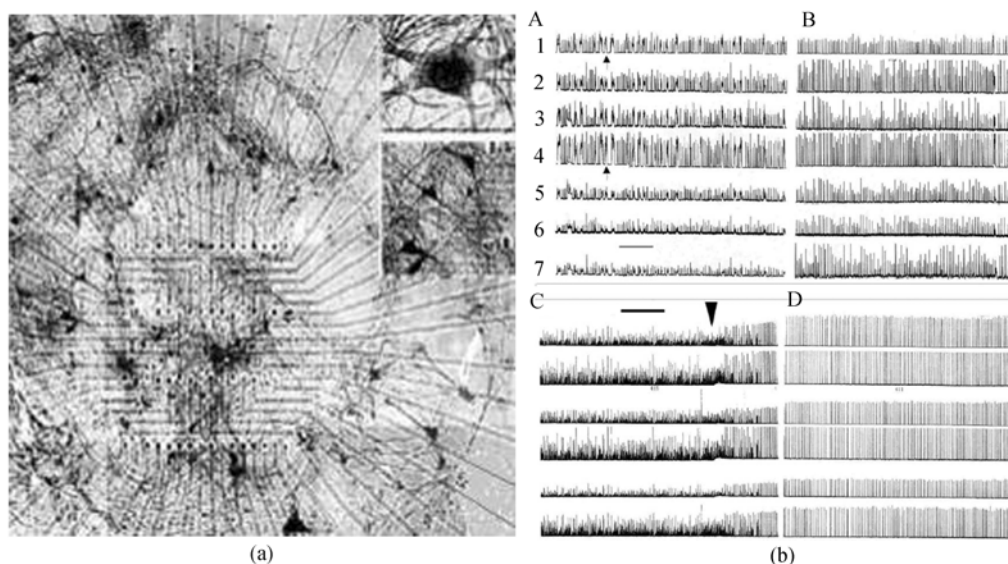


图 6 MEA 用于药物筛选

(a) 64 ITO 电极阵列上培养的小鼠胚胎脊髓神经网络(右上框内是神经元放大图); (b) TMPP 作用前后神经网络的放电模式变化;

A, 神经网络原始活动性; B, 加 $2 \mu\text{M}$ TMPP; C 和 D, 加 $100 \mu\text{M}$ TMPP 前后 20 min

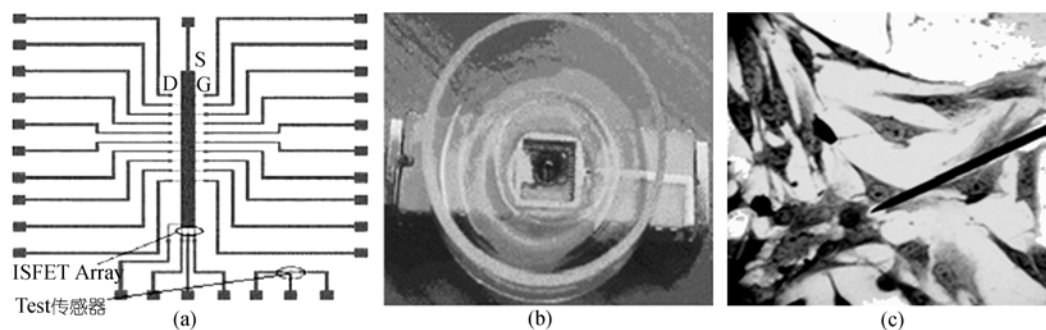


图7 基于FET的味觉细胞芯片

(a) 细胞芯片FET测量单元; (b) 封装好的细胞芯片; (c) 味觉细胞网络

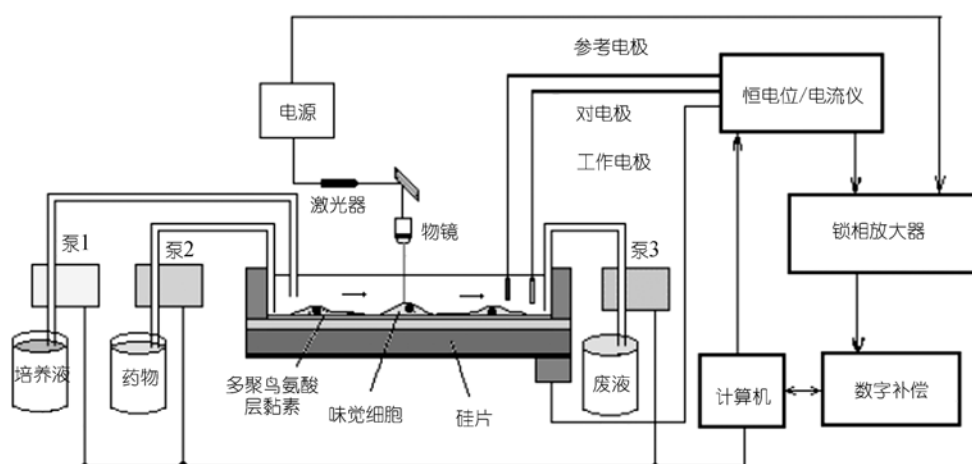


图8 味觉细胞芯片测量的系统框图

传导过程,从而揭示出味觉的响应机理^[32]。

4 结束语

味觉细胞芯片的一个关键技术是味蕾细胞的纯化。目前常用的方法是分离出单个的味蕾细胞,使用直径为500甚至100 μm ^[33]的玻璃毛细管把含味蕾的乳头吸出,再用一些水解蛋白来分解乳头,直至获得分离的单个的味细胞。另一个关键技术是随机培养的味觉细胞形成一个随机的神经网络,不易进行定点的电极测量。近来采用在MEA基底表面光刻^[34]、涂布多聚赖氨酸或者用PDMS制作三维的微流控系统^[35]等微图形技术引导神经元定向生长,提高电极附近的神经元密度,可以使得培养的神经网络的响应增强。同时也要考虑后继放大电路设计优化以提高信噪比、改进基底表面粗糙度和表面周期性清洗以保证电极的可重复使用性进行长期测量等。

近来的分子克隆已经发现很多味觉传导相关的离子通道和受体,结合分子生物学、生物化学和电生

理学描述这些分子在味觉受体细胞中的功能,为研究味觉传导机理提供了新的手段。该领域的未来发展方向将集中研究味觉信息是如何在中枢神经系统进行。此外,味觉细胞具有神经细胞的特性,细胞膜能够去极化,并释放神经递质,通过突触把信号传导至传入神经纤维,因而可以用细胞芯片技术研究味觉细胞对于不同味觉物质的响应、味觉受体细胞与神经纤维间的兴奋传导。目前,国际上的细胞芯片技术发展迅速,在细胞芯片上可以培养神经细胞网络以及组织切片,进行无损、同步的多点测量,这也为不久的将来研究味觉在中枢的传导提供了一种极具潜力的研究手段。

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:30270387)、国家教育部博士点基金(批准号:20010335007)和国家航天科技支撑基金(批准号:2002HTZJDX04)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Gilbertson T A, Damak S, Margolskee R F. The molecular physi-

- ology of taste transduction. *Curr Opin Neurobiol*, 2000, 10: 519~527[DOI]
- 2 Miyamoto T, Fujiyama R, Okada Y, et al. Acid and salt responses in mouse taste cells. *Prog Neurobiol*, 2000, 62: 135~157[DOI]
- 3 Lyall V, Feldman G M, Heck G L, et al. Effects of extracellular pH, P_{CO_2} and HCO_3^- on intracellular pH in isolated rat taste buds. *Am J Physiol*, 1997, 273: C1008~1019
- 4 DeSimone J A, Lyall V, Heck G L, et al. Acid detection by taste receptor cells. *Respir Physiol*, 2001, 129: 231~245[DOI]
- 5 Gilbertson T A, Avenet P, Kinnamon S C, et al. Proton currents through amiloride-sensitive Na channels in hamster taste cells: Role in acid transduction. *J Gen Physiol*, 1992, 100: 803~824[DOI]
- 6 Benos D J, Stanton B A. Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels. *J Physiol*, 1999, 520: 631~644[DOI]
- 7 Adler E, Hoon M A, Mueller K L, et al. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*, 2000, 10: 693~702[DOI]
- 8 Matsunami H, Montmayeur J P, Buck L B. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*, 2000, 404: 601~604[DOI]
- 9 叶萍. 苦味受体及其传导机制的研究进展. 国外医学口腔医学分册, 2003, 30(6): 453~454
- 10 Chaudhari N, Yang H, Lamp C, et al. The taste of monosodium glutamate: Membrane receptors in taste buds. *J Neurosci*, 1996, 16: 3817~3826
- 11 Lin W, Kinnamon S C. Physiological evidence for ionotropic and metabotropic glutamate receptors in rat taste cells. *J Neurophysiol*, 1999, 82: 2061~2069
- 12 Chaudhari N, Landin A M, Roper S D. A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nat Neurosci*, 2000, 3: 113~119
- 13 杨慧, 徐群渊, Roper S, 等. 脑型和味型代谢型谷氨酸受体的不同功能. 解剖学报, 2002, 33(1): 1~5
- 14 Smith D V, John S J, Boughter J D. Neuronal cell types and taste quality coding. *Physiol Behav*, 2000, 69: 77~85[DOI]
- 15 Kristin S. The sweet and the bitter of mammalian taste. *Curr Opin Neurobiol*, 2004, 14: 423~427[DOI]
- 16 Zhang Y, Hoon M A, Chandrashekar J, et al. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: Different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, 2003, 112: 293~301[DOI]
- 17 Scott H. Coding in taste receptor cells: The early years of intracellular recordings. *Physiol Behav*, 2000, 69: 17~27[DOI]
- 18 Roper S. Regenerative impulses in taste cells. *Science*, 1983, 220: 1311~1312
- 19 Gilbertson D M, Monroe W T, Milliet J R, et al. Citrate ions enhance behavioral and cellular responses to taste stimuli. *Physiol Behav*, 1997, 62(3): 491~500[DOI]
- 20 Park K, Brown P D, Kim Y B, et al. Capsaicin modulates K^+ currents from dissociated rat taste receptor cells. *Brain Research*, 2003, 962: 135~143[DOI]
- 21 Men H, Liu D L, Zhou S F, et al. Electronic tongue for environmental detection. The 10th International Meeting on Chemical Sensors, Tsukuba, Japan, 2004. 478~479
- 22 王平. 人工嗅觉与人工味觉. 北京: 科学出版社, 2000. 45~99
- 23 Savoy S, Lavigne J J, Yoo J S, et al. Solution-based analysis of multiple analytes by a sensor array: toward the development of an "electronic tongue". SPIE Conference on Chemical Microsensors and Applications, Boston, MA, 1998. Vol. 3539
- 24 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: 1126~1132
- 25 He H Q, Li R, Wang P, et al. The integrated taste image sensor based on LB film. International Conference on Sensor Technology (ISTC 2001) (in Chinese), Wuhan, 2001. 406~409
- 26 He H Q, Ye X S, Li R, et al. A novel electronic tongue combined integrated microsensors with pattern recognition. *Measur Sci Technol*, 2003, 14(7): 1040~1046[DOI]
- 27 Fromherz P. Semiconductor chips with ion channels nerve cells and brain. *Physica E*, 2003, 16: 24~34
- 28 Ecken H, Ingebrandt S, Krause M, et al. 64-Channel extended gate electrode arrays for extracellular signal recording. *Electrochimica Acta*, 2003, 48: 3355~3362[DOI]
- 29 Keefer E W, Gramowski A, Stenger D A, et al. Characterization of acute neurotoxic effects of trimethylolpropane phosphate via neuronal network biosensors. *Biosens Bioelectron*, 2001, 16: 513~525[DOI]
- 30 Bergen A V, Papanikolaou T, Schuker A, et al. Long-term stimulation of mouse hippocampal slice culture on microelectrode array. *Brain Res Protocols*, 2003, 11: 123~133[DOI]
- 31 Wang P, Xu G X, Qin L F, et al. Cell-based biosensors and its application in biomedicine. *Sensors Actuators B*, 2005, 108: 576~584[DOI]
- 32 Xu G X, Ye X S, Qin L F, et al. Cell-based biosensors based on light-addressable potentiometric sensors for single cell monitoring. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20(9): 1757~1763[DOI]
- 33 Kishi M, Emori Y, Tsukamoto Y, et al. Primary culture of rat taste bud cells that retain molecular markers for taste buds and permit functional expression of foreign genes. *Neuroscience*, 2001, 106(1): 217~225[DOI]
- 34 Chang J C, Brewer G J, Wheeler B C. Modulation of neural network activity by patterning. *Biosens Bioelectron*, 2001, 16: 527~533[DOI]
- 35 Griscom L, Degenaar P, LePioufle B, et al. Techniques for patterning and guidance of primary culture neurons on micro-electrode arrays. *Sensors Actuators B*, 2002, 83: 15~21[DOI]

(2005-03-21 收稿, 2005-06-27 收修改稿)