



## 评述

## 心肌细胞兴奋-收缩偶联芯片检测技术的研究进展

周洁<sup>①</sup>, 肖丽丹<sup>②</sup>, 吴成雄<sup>①</sup>, 胡宁<sup>①</sup>, 王华<sup>①</sup>, 王平<sup>①\*</sup><sup>①</sup> 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院, 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, 杭州 310027;<sup>②</sup> 香港理工大学医疗科技及资讯学系, 香港 999077

\* 联系人, E-mail: cnpwang@zju.edu.cn

收稿日期: 2012-03-03; 接受日期: 2012-04-22

国家自然科学基金(批准号: 81027003)和浙江省科技厅国际合作项目(批准号: 2010C14006)资助

doi: 10.1360/052012-122

**摘要** 兴奋-收缩偶联是指肌细胞的电激动经过转导引起肌细胞收缩等一系列级联反应和信息传递过程。心肌细胞作为肌细胞的一种, 它的兴奋-收缩偶联是心脏正常生理功能的基础。电兴奋和机械收缩作为 ECC 两个标志性的生理过程, 其作用呈双向性, 任何一阶段的异常都会导致心肌细胞 ECC 障碍, 深入探讨和研究两者的相互作用为 ECC 异常导致的心律失常等心脏疾病的预防和治疗提供了新思路, 寻求更为简便和有效的检测心肌细胞电兴奋和机械收缩的方法已成为研究者的一个热门研究课题。细胞芯片作为一种无损的实时传感检测手段, 在生命科学、环境监测和药物开发等领域有着广泛的应用。本文首先概述了心肌细胞的 ECC 机制, 接着针对国际上心肌细胞电兴奋和收缩检测领域最新研究成果, 分析了多种芯片检测方法应用于心肌细胞 ECC 检测的可行性以及面临的问题, 并介绍了一种实验室自主研发的多尺度电极阵列芯片。该芯片在不同电极位点分别记录细胞的电兴奋和机械收缩, 可对 ECC 进行系统的分析, 最后结合该芯片对芯片技术的应用前景进行了展望。

**关键词**兴奋-收缩偶联  
心肌细胞  
芯片技术  
电兴奋  
机械收缩  
多尺度电极阵列

心脏的基本功能和基本的活动形式有两种: 电活动和机械活动。正常心肌电活动和机械收缩的偶联间期约 50 ms, 即动作电位开始约 50 ms 后心肌发生机械性收缩, 并在动作电位复极到一半时出现收缩的峰值, 而复极完毕时开始舒张。这种心脏的电激动经过转导引起心肌收缩、心肌收缩频率及强度变化的现象称为心肌兴奋-收缩偶联(excitation-contraction coupling, ECC)。ECC 是心脏生理学和心脏病学中的一个基本概念, 它对深刻理解心脏的生理功能和病理学改变有着重要的意义<sup>[1]</sup>。ECC 障碍会导致心脏功能紊乱而引发一系列心脏疾病, 如心律失常<sup>[2]</sup>、心肌

缺血<sup>[3]</sup>、心肌梗大<sup>[4]</sup>、高血压等, 深入探讨和研究 ECC 机制可为顽固性心脏疾病的预防和治疗提供新思路。随着离体细胞培养技术的日益成熟, 心肌细胞作为心脏的基本组成单元, 成为研究心血管生理和药理学的重要工具之一。近年来, 很多科学家致力于开发检测心肌细胞 ECC 的技术和手段, 以解释心力衰竭等心脏疾病的产生机理、研究病态心肌细胞在分子水平上的改变以及探索药物对心肌细胞 ECC 的作用。电兴奋和机械收缩作为 ECC 的两个标志性的生理过程, 两者的作用呈双向性, 任何一阶段的异常都会导致心肌细胞 ECC 障碍, 现有的 ECC 检测主要是采用

电兴奋检测和收缩检测相结合的方式.

细胞芯片是生物芯片研究中的一个热点, 活细胞作为探测单元培养在微器件上, 可以通过实时记录细胞参数监测细胞的生理活动. 细胞芯片敏感性好、选择性好、响应迅速, 在生命科学、环境监测和药物开发等领域有着广泛的应用. 心肌细胞芯片作为一种无损的实时检测技术手段, 将在心肌细胞 ECC 检测中发挥重要作用.

本文基于心肌细胞概述了肌细胞的 ECC 机制, 评述了芯片技术在心肌细胞 ECC 检测上的应用进展, 并结合实验室自主设计的 ECC 检测芯片对芯片技术在细胞 ECC 机制研究的应用前景进行了展望.

## 1 心肌细胞 ECC 机制的概述

生物体中, 心脏作为最重要的器官之一, 是推动血液循环的主要动力. 心脏主要是由心肌细胞组成, 而 ECC 是心脏功能在细胞水平上的基础.

心肌细胞在受到相邻细胞传递的电刺激后, 细胞膜首先产生动作电位并通过兴奋收缩偶联机制引起肌丝滑动而使整个细胞发生机械收缩. 心肌细胞的动作电位分为 4 个阶段: 0 期为快速去极化, 1 期为快速复极初期, 2 期为平台期, 3 期为快速复极末期,

其中 0 期为去极化过程, 后 3 期为复极化过程. 这些电位的变化是由于离子通道的开、闭所引发的离子内流或外流造成的. 在动作电位产生过程中, 去极化激活钙离子通道打开产生内向的钙离子流, 是动作电位平台期主要的离子流之一. 内向的  $\text{Ca}^{2+}$  作用于肌质网末池上的兰尼碱(ryanodine)受体, 触发肌质网膜通道呈爆发性开放, 通道以钙火花的形式释放  $\text{Ca}^{2+}$ , 使胞浆内游离的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度骤然上升, 并和肌钙蛋白(troponin)C 结合引起心肌收缩. 胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度逐渐降低,  $\text{Ca}^{2+}$  与肌钙蛋白分离, 心肌细胞进入舒张期. 胞内多余的自由  $\text{Ca}^{2+}$  通过 SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase、肌膜  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交换、肌膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 或线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  单向转运 4 种途径排出细胞外<sup>[5]</sup>. 图 1 给出了心肌细胞兴奋-收缩耦合机制的示意图以及动作电位、机械收缩、细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度之间的关系.

## 2 芯片技术在细胞电生理检测中的应用

心肌细胞动作电位异常可导致心肌细胞的 ECC 障碍<sup>[6]</sup>. 因此, 电兴奋作为心肌细胞 ECC 的基础, 细胞电生理的检测是心脏病理生理学和药理学研究中重要的实验手段和技术之一<sup>[7,8]</sup>. 电生理记录方法包括胞内记录和胞外记录.

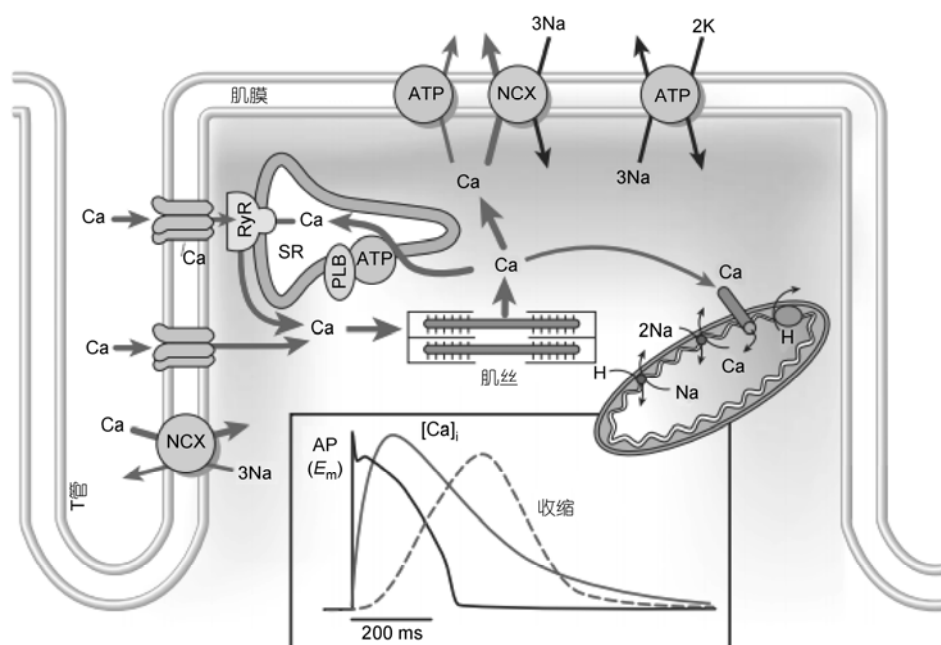


图 1 心肌细胞 ECC 机制及动作电位、机械收缩、细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度之间的关系<sup>[5]</sup>

## 2.1 胞内记录

传统膜片钳技术是利用玻璃微电极与细胞膜形成 G 欧级高阻抗封接, 在电压或电流钳制的方式下测量细胞膜上的离子通道电流或动作电位的低噪声测量技术<sup>[9]</sup>. 膜片钳为心肌细胞膜上不同离子通道动力学如电压依赖性、化学门控特性等研究提供准确、快速的手段, 基于此可通过改变钳制电压和去/超极化水平或借助特定的药物达到选择性地激活某种通道电流而抑制其他的电流成分的目的, 从而对单通道离子电流进行测量. 不同离子通道动力学也为解释心肌细胞动作电位产生机制提供了理论基础. 此外该技术可用于临床相关领域, 如研究抗心律失常药物对心肌细胞离子通道的作用机制; 考察从不同心衰模型中分离出来的心肌细胞的离子通道、跨膜电位特性. 膜片钳技术由于信息含量大、分辨率高, 已经成为目前细胞电生理研究的“金标准”.

膜片钳虽然能对细胞的离子通道电流或电位进行精确地检测, 但由于实验程序复杂, 对操作者要求非常高, 而且整个过程需要显微镜做辅助, 很难做到多通道同步测量, 从而无法实现高通量的药物筛选.

19 世纪 90 年代, 研究者意识到膜片钳技术的瓶颈后, 开始研制平面膜片钳芯片. 用带有微米级孔洞的平面基底代替玻璃微电极吸管, 将细胞悬液倾倒在孔洞上, 施加负压或者静电场, 引导细胞与孔洞相接触并形成高阻抗封接<sup>[10]</sup>. 这种方法操作快捷简便, 平面阵列化的结构实现了对多个细胞的高通量同时记录. 它已被应用于离子通道动力学、药物筛选等研究领域. 例如平面膜片钳系统 IonWorks™ HT 通过施加去极化脉冲对 (human ether-à-go-go-related gene, hERG) 钾离子通道电流进行记录, 研究一些会引起心律失常的药物对 hERG 钾离子通道的抑制作用 (<http://www.moleculardevice.com>). 使用膜片钳芯片得到的结果和传统的膜片钳技术得到的结果很接近, 但是采用经典膜片钳技术需要至少 160 h 才能获取这些数据, 而采用 IonWorks™ HT 只需 30 min, 从而大大提高了效率.

## 2.2 胞外记录

胞外场电位记录是另一种心肌细胞电生理检测的方法. 虽然记录到的胞外信号的精确度比膜片钳记录到的膜电位的低, 但它可实现长时、无损、高通

量的检测, 且检测过程中不需要在细胞和电极之间形成高阻抗封接, 与膜片钳芯片相比对操作人员的要求较低. 当前用于检测胞外场电位的传感器芯片主要有微电极阵列芯片、场效应管阵列芯片、光寻址电位传感器.

微电极阵列 (microelectrode arrays, MEA) 是用微加工工艺将 Au, Ir 或 Pt 等金属沉积在玻璃或硅基底上, 形成大小与细胞尺寸相当的电极阵列的一类芯片. 由于其制作简单、生物相容性佳、可用传统显微镜观察等优点, 目前在细胞传感器研究领域得到了广泛应用. 在心肌细胞研究中, MEA 可用于检测细胞间动作电位的传导特性<sup>[11]</sup>、药物或病变引起的细胞胞外场电位形态变化以表征其对离子通道的特异性作用<sup>[12]</sup>. Meyer 等人<sup>[13]</sup>设计了一种 96 孔的 MEA 芯片用以心脏安全药理学研究, 每个孔底分布着一对 MEA 电极 (图 2A). 他们利用该芯片检测了 E-4031、索他洛尔、维拉帕米、奎尼丁等药物造成的心肌细胞 QT 间期延长并得到了它们的剂量-响应曲线 (图 2B), 同时结合检测到的信号分析了奎尼丁的作用机理. 该芯片最多可实现每天 6000 个数据点的工作量, 每个数据点的花销小于 0.20 美元, 由此可见 MEA 阵列在高通量药物筛选领域有着巨大的应用前景.

1991 年, Fromherz 等人<sup>[14]</sup>用场效应晶体管 (field effect transistor, FET) 作为敏感元件, 代替早期的金属电极, 用硅作为基底材料并结合标准集成电路微加工技术, 开发出 FET 细胞芯片. 细胞培养在 FET 的栅极上后, 当细胞的膜电位发生变化时, 这个微小的电压会通过细胞和绝缘层间的电解液耦合到栅极电压 ( $V_{GS}$ ) 上, 从而调制 FET 的漏源电流 ( $I_D$ ), 利用这个特性就能检测出膜上的动作电位. 由于 FET 自身的结构, 它对于小信号的检出有很好的放大作用, 因此在细胞网络研究和药物筛选<sup>[15]</sup>中得到广泛的应用. 然而, FET 制作工艺较复杂, 而且电解液容易对器件造成腐蚀, 使传感器基线漂移.

MEA 和 FET 的最大缺点是记录位点的有限性, 而光寻址传感器 (light addressable potentiometric sensor, LAPS) 采用光束扫描寻址方式可对硅片上任意点的光电流响应进行测量, 通过改变光源的相关参数可以实现不同的测量目的. 将光点直径调整到与所测细胞直径大小类似便可测得耦合在 LAPS 表面的单细胞的动作电位<sup>[16]</sup>, 用不同频率的调制光源对 LAPS

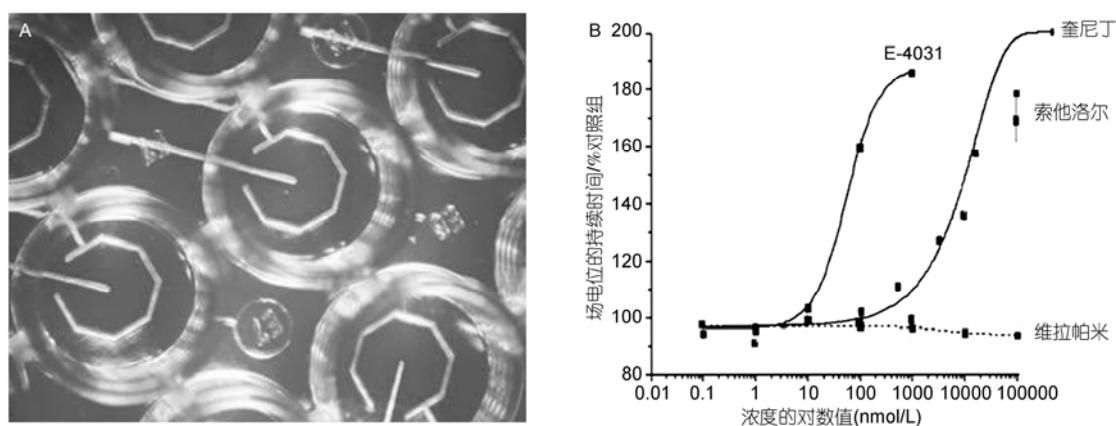


图2 96孔MEA芯片在心脏药物筛选中的应用

A: 96孔板腔底的放大图, 每个腔底部都加工有一个直径为  $100\ \mu\text{m}$  的工作电极和一个六边形的对电极; B: E-4031、索他洛尔、维拉帕米、奎尼丁的剂量-场电位持续时间响应曲线<sup>[13]</sup>

传感器表面的多个位点进行照射, 对光电流的幅值进行傅里叶分析, 就可以同时得到每个照射位点上细胞的动作电位。

### 3 芯片技术在细胞收缩检测中的应用

有节律的收缩是心肌细胞的基本特征, 也是全身血液循环系统的源动力。它和心肌细胞的基本构成如微管、肌质网、肌动蛋白紧密相关, 是心脏功能是否病变的一个重要反映。另外, 药物也会导致心肌细胞收缩功能的改变。近年来, 研究心脏病变或药物引起的心肌细胞收缩功能的改变已成为心脏学领域的一个热点课题<sup>[17-19]</sup>。

心肌细胞收缩时, 细胞沿其长轴缩短, 细胞收缩的程度可用细胞长轴一端或两端边缘的位移表示。当前主要采用光学方法和微机械<sup>[20]</sup>方法对心肌细胞收缩功能进行研究。

基于光衍射效应的光学技术较早应用于心肌细胞动态力学特性的研究, 它通过计算心肌细胞的长度表征其收缩舒张过程<sup>[21]</sup>, 其检测结果可靠, 但受到较多外界因素的干扰。另一种光学检测方法是动缘检测方法, 对被测心肌细胞进行高速采样并成像于计算机, 基于心肌细胞边缘与周围背景的对比度差异跟踪细胞两端边缘的移位, 从而测定细胞收缩力<sup>[22,23]</sup>。

由心肌细胞的ECC机制我们可以得出整个ECC都是由钙离子介导, 胞浆内的钙瞬变直接引起心肌细胞收缩。一般说来, 钙瞬变与心肌细胞的收缩成正

相关关系, 因此可以通过检测钙瞬变间接表征细胞的收缩。激光共聚焦显微镜钙成像技术是基于荧光检测原理的常见的检测胞内钙瞬变的方法<sup>[24]</sup>。细胞中的  $\text{Ca}^{2+}$  先与荧光染料进行特异性结合, 共聚焦显微镜发出的光对合适细胞层面进行扫描, 结合的荧光物质被激发, 发射的荧光经滤光片传送至光电倍增系统转换为电信号, 转换后的数字信号被计算机记录, 便可得到胞内的钙瞬变过程, 以此表征细胞的收缩。与其他研究钙瞬变的方法相比, 激光共聚焦显微镜线扫描成像技术具有较好的时间分辨率和空间分辨率。

传统的光学方法记录到的结果直观、可靠, 然而它们只能检测单细胞的收缩特性, 对细胞的质量和细胞分离技术要求很高。在实验过程中需要对心肌细胞进行灌流, 并施加电场刺激后才能检测到细胞的收缩。因而操作复杂, 无法用于多通道并行检测, 在药物应用上有局限性。

随着微机械加工技术的发展, 出现了各种微尺度芯片用于检测细胞的机械特性。检测之前不需要分离出单个心肌细胞, 只需将准备好的细胞悬液置于芯片上, 放在培养箱环境中培养。在培养2~3天后, 芯片上的心肌细胞通过伪足形成相互连接, 长成透明紧密的细胞层, 并发生同步有节律的搏动。由于动物体内的组织本身就是由形态相似、功能相同的一群细胞组合而成的, 因此检测细胞群的收缩力能更真实地反映体内的生理活动。微悬臂梁具有超灵敏的力学特性, 能探测到极微小的位移变化。Todorova 等人<sup>[25]</sup>

采用硅微悬臂梁阵列检测新生大鼠心肌细胞的收缩特性. 当生长在微悬臂梁上的心肌细胞产生机械收缩时, 打在悬臂梁上的激光的反射路径发生偏向. 通过分析激光的路径, 对悬臂梁挠度和承压的关系进行建模, 便可得到细胞收缩力的大小. Zhao 等人<sup>[26]</sup>提出了一种垂直 PDMS 微柱阵列, 与水平微悬臂梁相比, 它提供了两个方向的自由度. 细胞收缩牵引着微柱位置发生偏移, 微柱的图像通过显微镜被 CCD 记录, 对图像进行处理可得到其偏移图谱, 再通过计算将偏移图谱转换成细胞收缩力的矢量图谱(图 3). 然而微柱的柱形结构可能会对细胞膜或细胞功能造成未知的伤害<sup>[27]</sup>.

心肌细胞的搏动也可以通过电化学阻抗的方法进行检测<sup>[28]</sup>. 细胞阻抗传感器(electric cell-substrate impedance sensor, ECIS)是一种将阻抗测量技术运用到平面电极监测细胞形态变化的微尺度传感器芯片. 当贴附在芯片表面的心肌细胞发生有节律的搏动时, 细胞的形态发生改变, 检测到的电极阻抗会显示出有规律的变化, 从而反映细胞的搏动特性. ECIS 芯片加工工艺成熟、实验操作简单、生物相容性佳, 既能用于实时分析不同心肌细胞的搏动特性, 也能实现高通量的心脏药物筛选. 然而由于系统的数据采样率较低, 信号容易产生失真, 且细胞生长或衰亡引起的阻抗的变化与搏动信号混在同一信号中, 需要进一步分离后才能对细胞搏动进行分析.

#### 4 基于多尺度电极阵列芯片的细胞 ECC 检测

虽然在电生理和心肌机械收缩检测方面都已存在了较多的检测方式, 但上文介绍的用于细胞电生理和收缩检测的芯片是基于不同加工流程加工出来的, 而且两者检测原理不同, 因此很难将其集成在同一系统中, 两者一体同步检测仍未在真正意义上实现. 当前主要采用传统检测方法相结合的方式如全细胞膜片钳-激光扫描共聚焦显微镜联机技术<sup>[22,29]</sup>研究心脏发生病变后心肌细胞 ECC 的改变如阿霉素诱导或心肌梗塞引发的大鼠慢性心力衰竭后心肌细胞钙调控异常<sup>[2,29]</sup>, 药物(钠/钙交换(NCX)抑制剂<sup>[22]</sup>、氧化苦参碱<sup>[29]</sup>等)对心肌细胞 ECC 的特异性作用. 虽然此复合平台能精确地对信号进行定量的分析, 但设备庞大, 操作困难, 对细胞有损伤, 难以应用于高通量的药物筛选.

为此, 本课题组开发了一种新型多尺度电极阵列(multi-scale electrode array, MSEA)芯片. 通过将 MEA 上的电极加工成不同尺寸, 可实现心肌细胞电兴奋和机械收缩的同步检测, 从而对 ECC 进行系统地分析, 相比传统的检测方法具有无损、长时、便捷和高通量的优势.

图 4 是对芯片检测原理等效电路的分析. 当金属电极和电解液接触时, 在电极和溶液界面形成电性

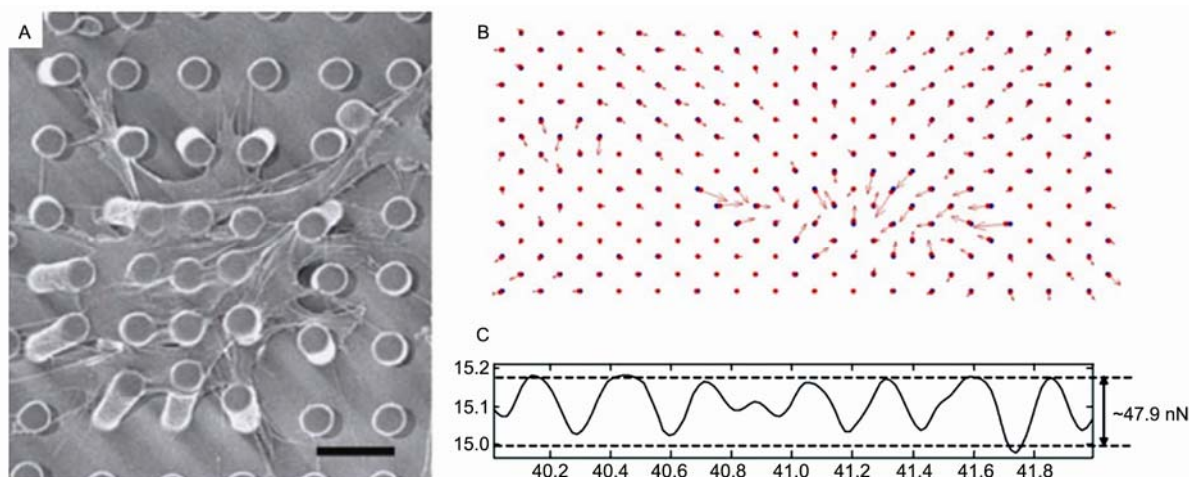


图 3 垂直 PDMS 微柱阵列用于检测心肌细胞的机械收缩

A: 细胞生长在微柱表面的扫描电子显微图像; B: 微柱的偏移图谱(红色点表示细胞收缩时微柱的位置, 蓝色点表示对照组微柱的位置, 红色箭头表示偏移矢量); C: 细胞收缩曲线<sup>[26]</sup>

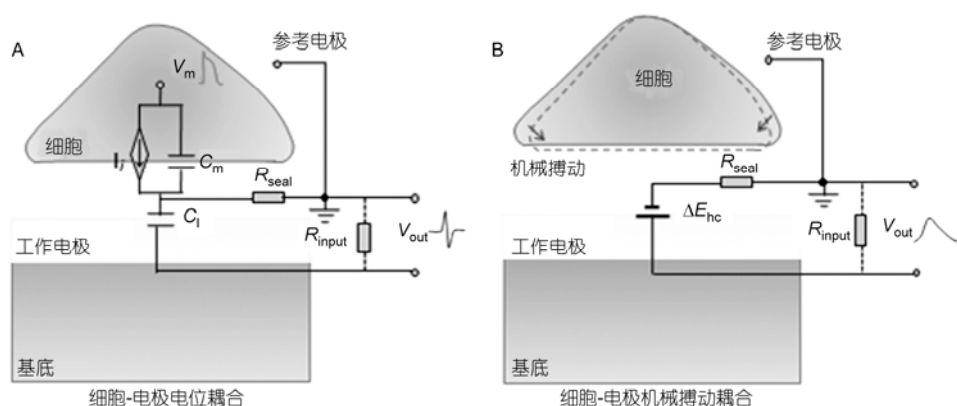


图4 胞外场电位检测的电路模型和机械搏动检测的电路模型

A: 细胞-电极电位耦合模型; B: 细胞-电极机械搏动耦合模型.  $R_{seal}$ : 封接阻抗;  $R_{input}$ : 前置放大器输入阻抗;  $\Delta E_{hc}$ : 半电池电势变化;  $C_i$ : 界面电容;  $V_{out}$ : 输出电压

相反的双层电荷, 类似一个电容器, 称为双电层. 胞外场电位和机械搏动的检测都是基于双电层电荷排布变化引起的电极电势的改变. 不同的是, 在胞外场电位检测中, 细胞的自发动作电位和离子通道电流为信号源, 它引起了细胞胞外附近的电场变化和电流密度变化, 改变了双电层电荷排布, 使电极极化产生了电势; 而在细胞机械搏动检测中, 细胞的机械搏动为信号源, 它扰动了双电层的电荷排布, 引起了电极中自由电子的移动, 从而产生电势.

由于检测原理有差别, 各参数对信号的影响也不同. 在胞外场电位检测中, 电极面积的大小和信号幅度成反关系, 即: 电极面积越大, 电极和细胞培养液的接触几率越高, 产生的漏电流更大, 封接阻抗 ( $R_{seal}$ ) 则越小, 从而削弱了电极检测分路的电流分量. 而在细胞机械搏动检测中, 双电层电荷扰动引起的半电池电势变化 ( $\Delta E_{hc}$ ) 为等效电路的电源,  $R_{seal}$  和  $R_{input}$  为分压关系, 由于  $R_{seal}$  远远小于  $R_{input}$ , 因而面积增大引起的  $R_{seal}$  减小对检测影响较小, 但电极面积变化会引起  $\Delta E_{hc}$  的不同, 电极面积越大,  $\Delta E_{hc}$  越大.

根据以上分析, MSEA 应至少包含两类电极: 直径几十微米 (10~100  $\mu m$  的性能较佳) 的微电极用于细胞胞外场电位的检测, 而几百微米至几毫米直径的电极用于细胞搏动的检测. 虽然场电位和机械搏动是在 2 个电极位点上检测到的, 但由于培养在同个芯片上的心肌细胞具有同步兴奋-收缩的特性, 因此 MSEA 实现了细胞兴奋和收缩的同步检测. 图 5A 为设计的 MSEA 芯片版图. 所设计的电极根据电极面

积大小的不同分为两类, I 类电极的尺寸类同于普通微电极, 包括 3 种面积的电极, 为 2500, 4900 和 14400  $\mu m^2$ , 电极设计成方形, 因此等效的边长分别为 50, 70 和 120  $\mu m$ ; II 类电极面积为 125000  $\mu m^2$ , 等效边长约为 350  $\mu m$ . 在芯片布局中, I 类电极以普通的矩形阵列排布, 为避免电极之间的电场干扰, 间距大于 250  $\mu m$ . 两个 II 类电极呈三角形设计, 由于面积较大, 引起电场干扰的区域比较广, 和 I 类电极阵列分开, 排布于芯片的两边. 设计后, 芯片的总面积为 6 mm×8 mm. 封装后的 MSEA 器件如图 5B 所示.

两类电极检测到的典型信号如图 6A 所示. I 类电极检测到的信号同普通微电极检测的信号相似, 为细胞电兴奋引起的胞外场电位. II 类电极检测到的信号, 在微弱上升峰和下降峰后有一幅度较大, 时程较长的隆起波峰, 将之命名为“驼峰”(hump). 通过时程分析和对细胞-电极耦合系统进行建模仿真后得出驼峰是心肌细胞的机械搏动引起的. 驼峰的幅度和电极的面积成正相关, 也和搏动的力度大小成正比.

长春碱是一种常见的抗癌药, 它抑制微管蛋白聚合的特性能增强心肌细胞的收缩力<sup>[30]</sup>. 当含长春碱的培养液作用于心肌细胞上 5~10 min 后, 大面积电极记录到的驼峰的强度和频率均明显增加 (图 6B), 进一步验证了驼峰是由细胞的机械搏动引起的.

LAPS 也可以同时检测到心肌细胞的胞外电位和搏动. 当心肌细胞生长在 LAPS 芯片上时, 根据硅器件同细胞耦合模型关系的研究, 可以判定记录到的

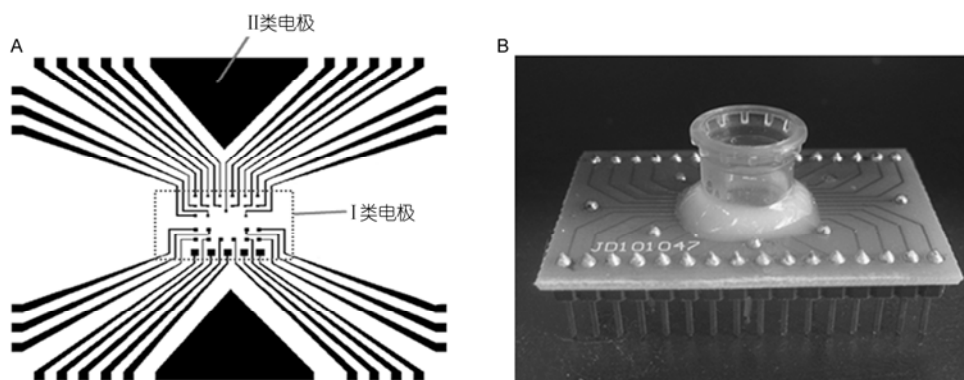


图 5 MSEA 芯片布局图及封装图

A: 芯片布局图; B: 封装后的 MSEA 器件

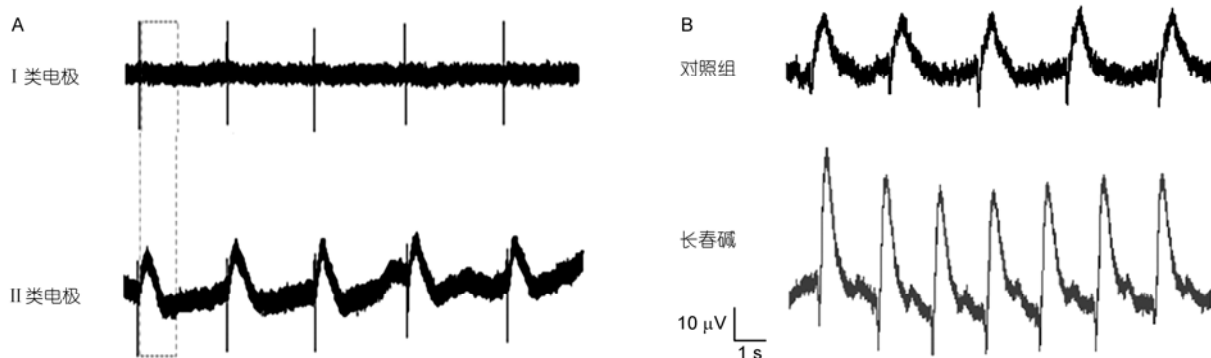


图 6 不同电极检测到的信号的对比以及药物对心肌细胞搏动的特异性作用

A: 两类电极检测到的信号比较; B: 长春碱作用前后 MSEA 芯片中 II 类电极检测到心肌细胞信号的变化

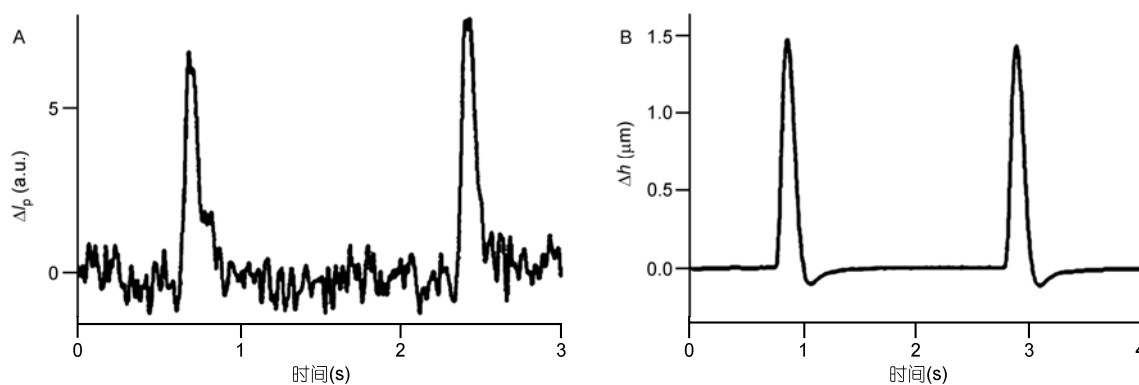


图 7 LAPS 系统与 AFM 记录到的信号的对比

A: LAPS 系统所记录到的心肌细胞的信号; B: AFM 检测到的搏动心肌细胞的高度信号

心肌细胞信号部分来自通过电解液耦合到 LAPS 器件表面的胞外电位, 另一部分来自细胞搏动时形态的改变对光源的调制<sup>[31,32]</sup>, 伴随着细胞收缩和舒张

的交替进行, 在细胞胞外电位发生改变的同时, 细胞会起到一个类似透镜的作用, 对光源进行汇聚和发散. 它们的综合效应引起光生电流发生相应的变化,

并通过工作电极记录. 但 LAPS 芯片上的任一位点测到的都是两种变化混叠在一起产生的信号, 而且当出于定位目的采用正面光照模式时, LAPS 测到的信号主要是由于搏动导致的细胞形态周期性改变引起的, 因此会严重干扰胞外电位的测量, 此外心肌细胞的动作电位和机械搏动在时程上的交错也会增加信号处理的难度. 图 6 为 LAPS 系统所记录到的心肌细胞的信号和 AFM 检测到的搏动心肌细胞的高度信号<sup>[32]</sup>, 两种信号的形态和时程相似, 可以看出 LAPS 测得的心肌细胞信号是由机械搏动主导的.

对比 MSEA 和 LAPS 芯片, MSEA 芯片能更加清晰地表征心肌细胞兴奋-收缩偶联, 可被应用于心脏病理的离体模拟治疗研究, 如研究不同心血管疾病引起的细胞动作电位和收缩性的改变; 研究心衰心肌细胞 ECC 钙调控异常. 首先钙离子通道电流强度的变化引起 I 类电极记录的胞外场电位形态的改变, 其次 II 类电极记录的心肌细胞收缩力的改变可以反映细胞钙瞬变的变化, 同时还可以探讨药物对心衰心肌细胞 ECC 钙调控的影响, 以期获得其对心脏保护作用的机制. 该芯片还能对引起 ECC 功能失常的药物进行高通量的评估和筛选, 如多孔板的每个孔底部都加工上多尺度电极, 以检测不同药物或药物在不同浓度下对细胞 ECC 功能的影响, 由此建立强有力的药物筛选平台.

## 5 结语

兴奋-收缩偶联是心脏电活动和机械活动这两种

基本活动方式形成的偶联, 是心脏功能的基础. 心肌细胞作为心脏的基本组成单元, 对其 ECC 的研究有助于加深对心脏生理功能和病理学改变的理解. 心肌细胞电生理和机械收缩芯片检测技术的快速发展为深入探讨心肌细胞 ECC 机制建立了坚实的基础. 目前用于细胞 ECC 检测的传统检测方法也有一定的局限性, 如检测仪器庞大且昂贵、操作过程复杂、需要给予电位刺激才能检测到细胞的兴奋和收缩、检测方法对细胞有损伤, 导致其无法在药物筛选上得到广泛的使用. 为此本课题组提出了一种新型多尺度阵列芯片, 该芯片克服了传统检测方法的缺点, 可同时检测心肌细胞的电兴奋和机械收缩. 基于对信号参数的特征提取, 并对传感器进一步深入研究可以实现对心肌细胞 ECC 的病理生理学研究以及心血管药物的快速筛选、分析和评价, 在心肌细胞 ECC 研究领域有着广泛的应用前景. 该芯片还可用于其他类型肌细胞 ECC 的检测.

此外, 由上文的分析可以得出: 细胞芯片未来的发展方向之一是研发用于细胞生理检测的多功能细胞芯片<sup>[33]</sup>, 可实现细胞多个生理参数的检测, 除了在加工工艺方面寻求突破, 还可以在已有的传感器上探索新的应用方向, 例如 MSEA 芯片通过在 MEA 上设计不同尺寸的电极, 实现了心肌细胞电兴奋和机械收缩的同步检测. 未来细胞芯片的研究也将结合纳米技术以及微流控技术<sup>[34]</sup>, 深入到分子研究领域, 如检测心衰心肌细胞 ECC 钙调控基因和蛋白的表达, 这些都将扩展细胞芯片在未来生物医学和环境监测等领域的应用.

## 参考文献

- 1 郭继鸿. 心脏的兴奋收缩偶联与心电图. 临床心电学杂志, 2007, 16: 325-332
- 2 Cooper P J, Soeller C, Cannell M B. Excitation-contraction coupling in human heart failure examined by action potential clamp in rat cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol, 2010, 49: 911-917
- 3 Bito V, Heinzel F R, Claus P, et al. Alterations in excitation-contraction coupling in chronically ischemic or hibernating myocardium, Exp Clin Cardiol, 2005, 10: 142-145
- 4 Chen-Izu Y, Chen L, Bányász T, et al. Hypertension-induced remodeling of cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes occurs prior to hypertrophy development. Amer J Physiol-Heart Circ Phy, 2007, 293: 3301-3310
- 5 Bers D M. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature, 2002, 405: 198-205
- 6 Cooper P J, Soeller C, Cannell M B. Excitation-contraction coupling in human heart failure examined by action potential clamp in rat cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol, 2010, 49: 911-917
- 7 Stummann T C, Beilmann M, Duker G, et al. Report and recommendations of the workshop of the European centre for the validation of alternative methods for drug-induced cardiotoxicity. Cardiovasc toxicol, 2009, 9: 107-125
- 8 Yeung C K, Sommerhage F, Wrobel G, et al. To establish a pharmacological experimental platform for the study of cardiac hypoxia using

- the microelectrode array. *J pharmacol toxicol method*, 2009, 59: 146–152
- 9 Wang P, Liu Q. *Cell-based biosensors: Principles and applications*. London: Artech House Publishers, 2010
- 10 陈培华, 张威, 周俊, 等. 膜片钳芯片技术及其在细胞电生理分析中的研究进展. *自然科学通报*, 2007, 17: 1601–1608
- 11 Natarajan A, Stancescu M, Dhir V. Patterned cardiomyocytes on microelectrode arrays as a functional, high information content drug screening platform. *Biomaterials*, 2011, 32: 4267–4274
- 12 Natarajan A, Molnar P, Sieverdes K, et al. Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity. *Toxicol Vitro*, 2006, 20: 375–381
- 13 Meyer T, Leisgen C, Gonser B, et al. QT-Screen: high-throughput cardiac safety pharmacology by extracellular electrophysiology on primary cardiac myocytes. *Assay Drug Dev Technol*, 2004, 2: 507–514
- 14 Fromherz P, Offenhausser A, Votter T, et al. A neuron-silicon junction: a retzius cell of the leech on an insulated-gate field effect transistor. *Science*, 1991, 252: 1290–1293
- 15 Poghosian A, Ingebrandt S, Offenhausser A, et al. Field-effect devices for detecting cellular signals. *Semin Cell Dev Biol*, 2009, 20: 41–48
- 16 Yu H, Cai H, Zhang W, et al. A novel design of multifunctional integrated cell-based biosensors for simultaneously detecting cell acidification and extracellular potential. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24: 1462–1466
- 17 李吉和.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶在高血压诱发大鼠心肌细胞收缩性改变中的作用. 博士学位论文. 石家庄: 河北医科大学, 2007. 1–8
- 18 俞世强. 甲状腺素对大鼠单个心肌细胞收缩功能及钙瞬变的影响. 硕士学位论文. 西安: 第四军医大学, 2008. 3–5
- 19 张博. 胰岛素促进离体缺血再灌注心脏和心肌细胞收缩-舒张功能恢复. 硕士学位论文. 西安: 第四军医大学, 2003. 2–5
- 20 Addae-mensah K A, Wikswo J P. Measurement techniques for cellular biomechanics *in vitro*. *Exp Biol Med* 2008, 233: 792–809
- 21 Virgen-Ortiz A, Apolinar-Irribé A, Ríos-Martínez M E, et al. Analysis of rat papillary muscle transverse deformation by laser diffraction. *Gen physiol biophys*, 2010, 299: 129
- 22 蒋彬. 豚鼠心室肌细胞兴奋收缩偶联钙转运调控机制的研究. 博士学位论文. 兰州: 兰州大学, 2005. 1–5
- 23 石晓路. 哇巴因对大鼠心肌细胞钙瞬变及收缩力的作用. 硕士学位论文. 石家庄: 河北医科大学, 2010. 1–4
- 24 Buvinić S, Almaraz G, Bustamante M, et al. ATP released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 2009, 284: 34490
- 25 Todorova M, Stücklin P, Bertsch A, et al. Contraction measurement of cardiomyocytes grown on silicon cantilevers. The 4th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, 2007 June, 10–14, Lyon. Lyon: Transducers, 2007. 13–14
- 26 Zhao Y, Zhang X. Contraction Force Measurements in Cardiac Myocytes Using PDMS Pillar Arrays. *Proceeding of the 18th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*. 2005. 834–837
- 27 Wilson K, Das M, et al. Measurement of contractile stress generated by cultured rat muscle on silicon cantilevers for toxin detection and muscle performance enhancement. *PLoS ONE*, 2010, 5: e11042
- 28 Wang X, Abassi Y, Xi B, et al. 2009. Label-free monitoring of excitation-contraction coupling and excitable cells using impedance based systems with millisecond time resolution. *International Patent*, WO 2009/137440 A1, 2009-11-12
- 29 胡淑婷. 慢性心衰大鼠心肌细胞钙调控异常及药物干预的研究. 博士学位论文. 上海: 第二军医大学, 2011. 1–5
- 30 Jordan M A, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 253–265
- 31 刘清君, 蔡华, 徐莹, 等. 心肌搏动细胞传感器及其在药物分析中的应用. *浙江大学学报(工学版)*, 2007, 41: 742–745
- 32 George M, Domke J, Radmacher M, et al. Can the light-addressable potentiometric sensor (LAPS) detect extracellular potentials of cardiac myocytes? *IEEE Trans on Biomed Eng*, 2000, 47: 1106–1113
- 33 Xiao L, Hu Z, Zhang W, et al. Evaluation of doxorubicin toxicity on cardiomyocytes using a dual functional extracellular biochip. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26: 1493–1499
- 34 El-Ali J, Sorger P K, Jensen K F. Cells on chips. *Nature*, 2006, 442: 403–411

## Progress Regarding Chip Technologies in Detection of the Excitation-contraction Coupling of Cardiomyocytes

ZHOU Jie<sup>1</sup>, XIAO LiDan<sup>2</sup>, WU ChengXiong<sup>1</sup>, HU Ning<sup>1</sup>, WANG Hua<sup>1</sup> & WANG Ping<sup>1</sup>

*1 Biosensor National Special Laboratory, Key Laboratory of Biomedical Engineering of Education Ministry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;*

*2 Department of Health Technology and Informatics, the Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong 999077, China*

Excitation-contraction coupling (ECC) denotes a series of cascades or signal transmissions caused by processes in which the excitation of myocytes stimulates the contraction through transduction, and it forms the basis of cardiac function at the cellular level. As two iconic physiological processes in ECC, the interaction of the excitation and contraction is bidirectional, which makes the abnormal of either one induce the defective ECC of cardiomyocytes. Studies on the interaction of the excitation and contraction provide new clues on the prevention and treatment of ECC abnormal-induced heart disease. Seeking for more convenient and effective methods in detecting the excitation and contraction of cardiomyocytes has been a hot topic among researchers. Cell chips, which serve as a noninvasion and real-time sensing technology, have been widely used in many fields, such as life science, environment monitoring and drug development. This paper first summarizes the ECC mechanism of cardiomyocytes, then describes the newest progress in monitoring either excitation or contraction. The feasibilities and defects of those chip detection methods are analyzed. We also introduce a chip with multi-scale electrode array carried out in our lab, which provides an *in vitro* platform to synchronously monitor excitation and contraction of cultured cardiomyocytes in different electrodes. It allows us to systematically analyze ECC. Finally, the prospect of chip technology is discussed.

**excitation-contraction coupling, cardiomyocytes, chip technology, excitation, mechanical contraction, multi-scale electrode array**

doi: 10.1360/052012-122