

细胞传感器的研究进展

许改霞 吴一聪 李蓉 王平* 严伟民 郑筱祥

(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.hz.zj.cn)

摘要 细胞传感器(cell-based sensor)是生物传感器研究中的一个热点, 它利用活细胞作为探测单元, 可以测量被分析物的功能性信息. 细胞传感器敏感性高、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. 近年来, 细胞培养技术、硅微机械加工技术及基因技术的发展, 进一步推动了细胞传感器的研究. 为阐明近年来国际上细胞传感器的最新研究成果和进展, 综合评述了各类细胞传感器的研究方法、应用领域和面临的挑战, 最后, 提出了细胞传感器的发展方向.

关键词 细胞传感器 生物传感器 细胞功能分析

生物传感器是一种把生物体本身或生物物质作为识别元件的测量系统, 用来检测与生理或生化过程相关的参数. 按照识别元件可将生物传感器分为三类: 基于分子(酶、抗原或抗体、受体、核酸、脂质体等)的, 基于细胞的和基于组织切片的. 就敏感元件而言, 前者是固定化的生物体成分, 后者是生物体本身. 基于分子的生物传感器具有高度选择性和敏感性, 只对靶分子有响应. 但正因为这种高度选择性, 可能会使某些具有相同功能的相关分子检测不到. 而将活细胞作为探测单元, 可以检测到许多未知的物质. 近几年, 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, 以活细胞作为敏感元件已成为生物传感器研究领域的一大热点.

细胞传感器能定性定量测量分析未知物质的信息, 即确定某类物质存在与否及浓度大小. 例如, 把具有某一类型受体的细胞当作传感器, 由受体-配体的结合常数可推导出该传感器对某类激动剂的敏感度, 测定该传感器的响应就可以定量测量该激动剂的浓度. 更重要的是, 细胞传感器能够测量功能性信息, 即监测被分析物对活细胞生理功能的影响, 从而能解决一些与功能性信息相关的问题. 例如: 复合药物各成分对生理系统的影响是什么; 被分析物相对于给定的受体是否是抑制剂或激动剂(现代药物筛选和开发的核心问题); 被分析物是否以其他方式来影响细胞的新陈代谢, 如第二信使或酶; 待测物是否对细胞有毒副作用; 环境是否受到污染.

总之, 利用细胞传感器可以连续检测和分析细胞在外界刺激下的生理性能. 从生物学角度来看, 能

够探求细胞的状态、功能和基本生命活动; 从被分析物的角度来看, 能够研究和评价被分析物的功能. 尽管使用活细胞作为主传感器产生很多复杂的问题, 如细胞类型的选择、细胞的培养、细胞活性的保持、细胞与传感器的耦合等; 但该类生物传感器能够完成实时、动态、快速和微量的生物测定, 在生物医学、环境监测和药物开发等领域具有十分广阔的应用前景.

本文按照能够从细胞获得的信息对细胞传感器进行分类, 结合芯片技术在生物领域的运用, 评述了各类细胞传感器的研究方法、应用、进展及面临的挑战, 并展望了该领域的发展方向.

1 各类细胞传感器及其应用

1.1 监测细胞内外环境的细胞传感器

实时活体监测细胞是全面了解细胞生理性能及其机制的重要基础, 这就要求能够定量测量和分析细胞的内外微环境. 测定细胞内自由离子浓度的较好方法是采用离子敏感微电极(ISME), 组合不同的ISME可以并行测量细胞内多种离子, 如 NH_4^+ , Cl^- , Na^+ 和 Mg^{2+} 等. 此外, 荧光成像也是细胞内微环境监测的一种有用的工具^[1], 可测量与细胞信号传递有关的离子浓度、蛋白表达的变化. 荧光探针和共聚焦显微技术(细胞三维“切片”扫描)结合, 使细胞结构和功能的分析可达到前所未有的精确性和清晰度, 能更好地测量细胞内各种离子浓度(游离 Ca^{2+} 和胞内 H^+ 等).

细胞内生理状态的改变会引起细胞外代谢物(如离子、生物大分子等)的相应变化. 因此, 测量细胞代谢

后胞外微环境的相关参数,可以间接监测细胞的生理变化. 20 世纪 90 年代,美国分子器件公司(Molecular Device Corporation)把芯片技术引入生物学领域^[2],开发出了—种细胞微生理计(Microphysiometer):用建立在硅技术基础上的传感器检测细胞酸化的微环境.细胞由于能量代谢产生酸性物质,使外环境酸化,利用光寻址电位传感器(LAPS)^[3]可以测量细胞外微环境的 pH 值变化,定量计算细胞 H⁺排出速率,从而可以分析细胞的代谢率.这种方法对糖酵解和呼吸作用的代谢过程都适用.除了利用 LAPS 测量酸化率,也用 H⁺敏场效应管(ISFET)来测量胞外代谢率^[4].此外,利用氧电极传感器和 CO₂ 传感器可以测量在糖酵解过程中, O₂ 的消耗量和 CO₂ 的生成量^[5,6].

大量的配体-受体结合实验表明,功能受体与激动剂相结合会引起细胞酸化率上升.根据酸化率这一指标,细胞微生理计就可以测量化疗药物对肿瘤细胞的药效^[7],实现高通量的药物评价和筛选^[8].Hafner 等人^[9]还研究了该仪器在 G 蛋白耦合受体、内源性触发受体和配体门控离子通道等亚细胞结构的分析中的特殊应用.

目前,监测细胞外环境的传感器技术虽然获得了快速的发展,但监测到的变化是细胞群的总体效应,如果对单个细胞进行详细的分析,则需要更多的细胞生理信息.此外,由于实验条件和实验目的不同,细胞内、外环境的测试数据缺乏可比性.若能将对内、外环境的两种监测手段结合起来,即在监测细胞外环境的同时,监测细胞内环境相关因子的变化,则将更有助于了解生物物质在跨膜时的运动机理以及药物对细胞的作用机制.目前我们正在进行这项研究工作.

1.2 监测细胞电生理行为的细胞传感器

可兴奋细胞的电生理信号与细胞功能性信息紧密相关.可兴奋细胞,如神经细胞、肌肉细胞和内分泌细胞等,均能产生动作电位响应外界刺激(如光、电、药物等).直接测量细胞膜电位的基本方法是采用膜片钳(patch clamp)技术.但这种方法无法同时测量不同位置的动作电位,不能实现细胞间的耦合测量.而且,细胞内记录和电压敏感染料对细胞是有损的,限制了传统的电生理测量方法的应用.所以,用微细加工技术制作的平面微电极阵列(MEA)或场效应管阵列^[10]应运而生,它能无损、同步地记录多个可兴

奋细胞或组织的动作电位的传播^[11].这类传感器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.

图 1 显示了斯坦福大学集成中心制作的 36 个直径为 10 μm 的平面微电极的阵列^[12].利用标准的薄膜光刻技术刻蚀微电极和引线.图 2 是用这种阵列同步记录的单层鸡胚胎心肌细胞的动作电位^[12].如图 1,在第 36 个电极处生长的细胞给予—定的刺激,阵列中的各电极就会记录兴奋在细胞层中的传播情况,可以看到图 2 中第 36, 29, 25 个电极对应细胞层中的不同位点,所以记录曲线的脉冲尖峰有不同程度的延迟,两点之间距离越大,延迟的时间越长.由实验的数据可估计出,这种速率为 100 mm/s^[13],与细胞内测量相比,这种胞外记录系统有个明显的优势:能直接测量传播速率.Krause 等人^[14]开发了一种基于 8×8 扩展门电极阵列的细胞传感器,也可以用来进行长期的细胞外记录.金属电极直接和栅极场效应管连在一起,实现了细胞外记录系统所需的高输入阻抗.

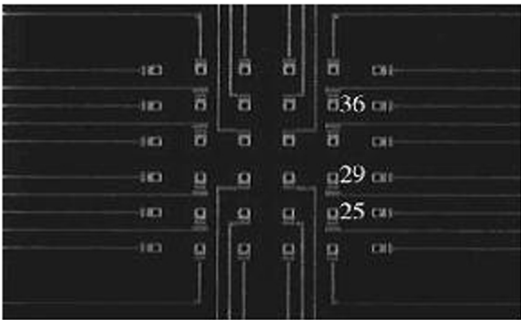


图 1 微电极阵列^[12]

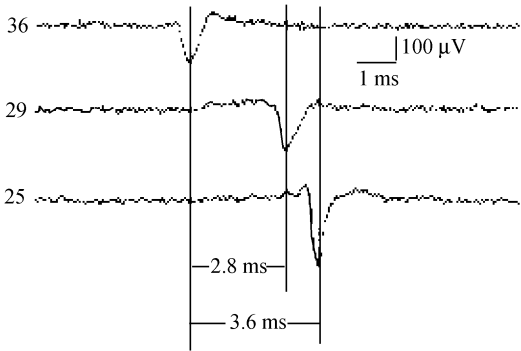


图 2 同步记录的肌电信号^[12]

平面电极阵列也可以用来记录脊椎动物神经元和哺乳动物神经元的细胞外电位,测量神经元对不

同物质的响应^[15]。尽管长时间的细胞外记录会由于神经细胞或切片发生形态的变化(变“瘦”和细胞移动)而发生漂移或模糊,但可以通过信号处理来消除这种漂移^[16],或者,也可以建立神经细胞-硅耦合的等价电路模型来分析信号发生畸变的原因。Vassanelli 等人^[17]所建的模型解释了记录得到的老鼠胚胎神经元细胞外电位幅度偏低的原因,说明神经细胞外电位的差异可能归因于与电极接触到的局部细胞膜的离子电导的差异。大量的神经细胞胞外记录信号在药物筛选中有着极其重要的作用,Morefield 等人^[18]把老鼠胚胎的耳皮质神经元培养在电极阵列上,定量测量不同浓度 AN(一种抑制兴奋的药物)作用下神经元的响应,对该类药物进行评价。

与膜片钳技术相比,这类监测细胞电生理行为的传感器的最大的优点是,可以对细胞间的信号耦联、传导进行长期、实时、无损的测量。膜片钳的发明者之一、德国细胞生物学家 Neher^[19]指出,活细胞与硅器件的结合是可行的。该项技术仍然处于起步阶段,还存在一些问题,例如长期溶液浸泡产生的基底表面腐蚀,细胞附着过程产生的游走、移动,细胞与基底之间间隙难以控制,这些都会导致测量的准确性下降。

目前主要采用的技术途径是,改进基底的表面粗糙度处理技术和表面周期性清洗,以保证细胞的附着和降低器件表面的腐蚀。此外,提高电极阵列的集成度,使一个细胞对应多个电极,可以提高测量的精度和可靠性。

1.3 监测细胞力学行为的细胞传感器

许多效应因子可以改变活细胞的性能或特性,例如,一些细胞对于荷尔蒙刺激会产生移动^[20],某些种类细胞的病毒感染将会引起细胞骨架的变化^[21]。因此,活细胞力学性能的监测,可以提供一种测量效应因子生物活性的方法。这种传感器在商业上有很大的应用潜力,同时也为研究活细胞的力学性能和响应提供了一种新的研究工具。

Antonik 等人^[22]利用微细加工技术蚀刻出长为 200 μm , 宽为 30 μm , 厚为 0.6 μm , 弹性常数为 0.001 ~ 0.5 nm 的悬臂梁(图 3)。通过特殊的生物学处理,把 MDCK 细胞培养在该悬臂梁沉积有 Si_3N_4 的一侧。细胞的机械活动会引起悬臂梁的偏转,将激光束照射在悬臂梁溅射有金薄膜(有良好的反射特性)的一侧,反射光由对位置敏感的光电二极管来接收,可以在

纳米量级检测到这种偏转。MDCK 细胞在不同毒素的刺激下,悬臂梁发生不同程度的偏转。实验结果初步表明,这种集成细胞的悬臂梁可以实时监测活细胞的力学性能。

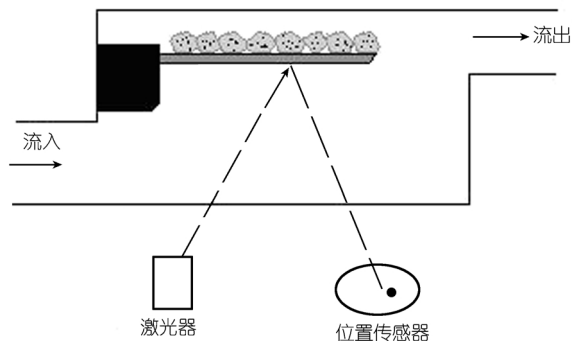


图3 测量细胞力学性能的悬臂梁传感器^[22]

贴壁生长在电极上的细胞形状和运动状态的变化,都会引起贴壁界面阻抗的变化。Giaever 等人^[23]根据这一贴壁界面电特性,设计了能实时、连续、定量跟踪哺乳动物细胞形状变化的细胞传感器。从理论上讲,阻抗技术可以在纳米水平对细胞的运动进行动态测量,比传统测量方法的分辨率要高得多。目前,细胞贴壁生长电极已经被用于监测不可兴奋细胞(包括巨噬细胞、内皮细胞和纤维原细胞)的力学性能,如形态、分布、黏附性和运动性等^[24,25]。

效应因子作用于细胞时,细胞内部会产生一系列新陈代谢的级联反应,从而细胞进行调整使之适应这种变化,这种反应决定了细胞的整体响应。如果需要检测该反应链上任意一个或一组反应,上述检测传感器也可以满足这种要求。因此,这种传感器为细胞生理检测提供了一条新途径。

1.4 监测细胞特殊行为的细胞传感器

有一类独特的细胞传感器,可以用来测量某些细胞的特殊性质,进而研究这些生物体对外界刺激的响应。如基于生物发光的细胞传感器:某些具有发光特性的细菌^[26]或用荧光素酶基因设计的细菌,可能对某些重金属产生敏感,基于这种细菌的生物传感器可以进行环境的监测^[27]。我们目前也在研究将该类细胞传感器用于水污染中重金属离子动态监测。要解决的问题是如何控制影响发射光量的众多因子,如氧浓度, pH, 培养基的组成及细胞的数量等^[28]。而基于细胞色素的细胞传感器,则是诱发色素细胞与酶相关的运动^[29],改变细胞颜色,通过检测颜色变

化来测量神经毒素。

上述细胞传感器的特异性好、检测精度高，但对作为传感器的细胞要求很高，需要选择具有一些独特性质的活细胞，目前已知的这类细胞种类有限，因此限制了这类细胞传感器的应用范围。

2 细胞传感器的发展方向

2.1 并行监测多种参数的细胞传感器

细胞传感器种类很多，原理各异，适用条件不尽相同，但毕竟功能较为单一，只能测量某种或某类参数。因此，实现多参数的并行测量是细胞传感器发展的一大方向。很多研究小组一直致力于这方面的工作，德国 Baumann 等人^[30]开发出一个细胞监视系统(CMS)，这种仪器集成了氧，温度，pH，光纤和固定化酶传感器，前两种传感器用来保持正常细胞的生存环境，后 3 种传感器用来测量细胞外微环境，并采用了 CCD 来监测细胞的形态。

美国斯坦福大学和分子器件公司 1992 年在国际上首次发明的微生理计^[2]，主要通过测量细胞外 H^+ 离子浓度变化，即酸化率指标，间接监测细胞的生理变化，目前微生理计已经获得了广泛的应用。然而在研究受体的激活、配体和受体的相互作用时，仅用酸化率这个指标作为衡量标准是不全面的，还需要同时测量细胞外多种离子的浓度变化。因此我们实验室从 1994 年开始，一直致力于多功能细胞微生理计的

研究，自主设计并实现了基于 MLAPS(多光源电位寻址传感器)的多功能细胞微生理计^[31~33]，如图 4 示，且申报了我们的发明专利¹⁾。

该多功能细胞微生理计的基本原理如下：在 LAPS 表面采用硅微机械加工和 PVC 成膜技术，沉积不同的离子敏感膜，用多个不同频率的调制光分别照射 LAPS 相应的多个敏感膜(如 K^+ ， Ca^{2+} ， H^+ 和 Cl^- 等)，所测量出的光生电流(电压)包含了多种敏感膜的响应，由计算机采用数字补偿和动态频谱分析等信号处理方法，把多种离子响应分离出来，同时计算出多种离子浓度的变化率。该仪器带有一个流体控制系统，由泵和阀门控制培养液以一定的时间间隔流过培养有细胞的微测量腔，以保持细胞的活性。使用这个系统，我们研究了苯妥英钠、苯巴比妥钠和青霉素钠对乳鼠心肌细胞离子通道的影响。实验表明，它可以用来监测正常细胞或病变细胞在各种药物作用下的微环境变化，包括酸性代谢产物和胞外多种离子，估计药物作用对细胞代谢的正负效应(刺激或抑制)，从而进行药物评价和药理探索。

细胞传感器的未来发展方向是把多功能细胞微生理计与超微离子选择电极、激光共聚焦显微镜或纳米光纤相结合，同时研究细胞外微环境和细胞内微环境物质的变化，更深入探讨细胞生理性能及其机制，研究激动剂作用的特异性、受体抑制剂与激动剂的竞争作用、受体介导的信号传导途径等。细胞内外

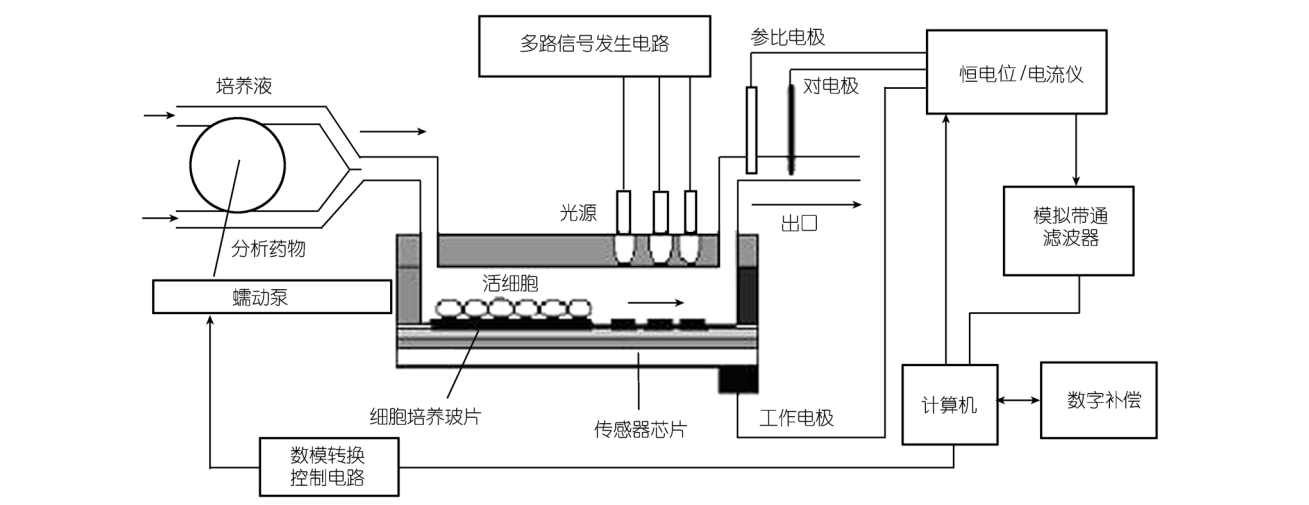


图 4 多功能细胞微生理计的结构图

离子浓度的变化必然涉及离子通道的变化,而离子通道也可看做一种特殊的细胞表面受体,所以这个系统必将在基于细胞表面受体结构的药物设计中发挥重大的作用.根据这些受体,设计调节剂,以调节细胞功能,进行药物评价和筛选.

2.2 基于生物微电子机械系统的细胞传感器

近几年,随着半导体微细加工技术的发展,能在更小尺寸上加工微型元器件,把光元件、微电子和微机械集成在一起,构成性能更稳定的生物微电子机械系统(biological micro electro-mechanical systems, BioMEMS),进一步结合微进样、微分离技术^[34],可以改善细胞传感器的性能和功能:减少所需的样本量,实现进样的自动化,减少所需的细胞数目直至进行单细胞测量,提高灵敏度,提高时间和空间分辨率.采用传统微细加工技术获得的微电极阵列(MEA)已经得到了广泛应用,这种电极的优点是显而易见的^[10,35].若把微泵、微阀和信号的处理电路和微电极阵列(MEA)集成在硅器件上,则从样品的选择、引入、流动和信号的处理、传输、显示都实现了微型化、智能化,这便是典型的基于 BioMEMS 的细胞传感器^[36].Baxter 等人^[37]利用硅微机械技术在硅片上集成了八通道的细胞代谢测量系统,可以实现高通量的药物筛选.

半导体材料有很多特性,尽量地把这些特性和细胞分析相结合,可以研制出更多类型细胞传感器.下面这个例子能给我们一个很好的启示.如 Verhaegen 等人^[38]测量细胞能量代谢过程中释放的微能量,按照标准的集成电路微细加工技术在硅片上加工出了两个绝热的独立的微测量腔(图 5 所示),分别连接在微热量计的冷、热两端.热量计由 666 个铝/ P^+ 多晶硅热电偶组成,热量和温度的敏感度分别为 23 V/W 和 130 mV/K.两个测量腔都加入了 100 μ L 的培养液,

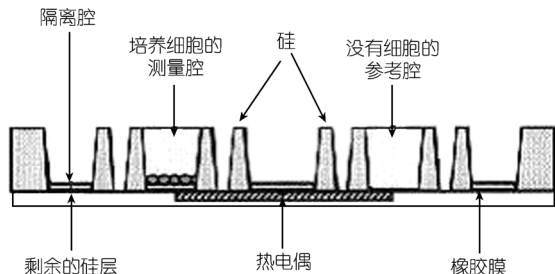


图 5 基于 BioMEMS 能量代谢细胞传感器^[38]

主测量腔培养了约 10^6 个爪蟾(A6)肾细胞,而参考测量腔中没有培养细胞.40 min 后,达到了热平衡.经测量,平均每个细胞基础能量代谢为 330 pW.当降低测量腔渗透压浓度 50%(两个测量腔都再加入 100 μ L 的培养液)来刺激细胞膜转运机制时,单个细胞的能量代谢增加了 40 pW;若加入 1 μ L 浓度为 0.2 U/mL 的催产素后,单个细胞能量代谢增加到 436 pW.

2.3 便携式的细胞传感器

尽管细胞传感器取得了巨大的成功,有不少仪器在商业上的运作是很成功的,但毕竟是在实验室操作.如果要现场测量,如环境监测和病毒检测,就需要一个通用的便携细胞生物平台,以便把传感器从实验室转移到测试现场.Kovacs 等人^[39,40]开发了一个包含细胞运输模块和数据采集模块的系统.细胞运输模块是一个独立的、由电池供电的、集成硅-聚二甲甲基硅甲烷的细胞盒,能保证各种细胞盒模块在运输过程或测量现场中保持在可设定的温度和足够的 CO_2 水平上.该细胞盒包含一个 CMOS 硅片,集成了数字界面、温度控制系统、微电极电生理传感器以及一个模拟信号缓冲区.此外,该细胞盒支持两个容积为 10 μ L 的具有独立流动通道的细胞测量腔.数据采集模块提供了 32 个通道,用来实现动作电位的放大、滤波和实时采集,最后发送到手提计算机.另外,要实现动作电位的长时间记录,需要庞大的存储空间;要实时处理这些信号,需要不断发展新的算法,如短时间序列算法和一些非线性算法^[35,41].

2.4 利用基因设计的细胞传感器

细胞在被分析物的作用下,监测到的新陈代谢、力学性能和电生理性能的改变都是大量生化途径作用的综合效应,这就相当于在测量中引入了“串扰”,因而无法确定被分析物的作用途径,也难以确定真正起作用的细胞响应部位.靠改进从传感器和信号处理方法,难以从根本上解决这个问题.随着分子生物学的发展,可以通过改进主传感器(细胞)的方法来解决.在基因层次上设计细胞,增加它对作用路径的敏感性,或降低它对干扰信号的敏感性,都能大幅度降低“串扰”.在感兴趣的生化途径上对关键单元进行基因编码,一般是插入或抽出细胞的基因组,增强或降低细胞对作用路径的响应.如,去除细胞上某些可疑受体,即把那些我们认为对某一响应起作用的受体击出,使细胞成为击出(kick out, KO)细胞.任何对击出受体起作用的生物试剂都能在正常细胞中

产生响应, 在 KO 细胞中则不能. 将激动剂分别作用于普通细胞和 KO 细胞中, 做对照性实验, 就可以定位真正起作用的受体.

Aravanis 等人^[42]研制了这种利用基因设计的细胞传感器. 首先, 在微电极阵列上培养 3 种老鼠心肌细胞: 正常细胞(WT)、去除了 β_1 -肾上腺素受体的细胞(β_1 -AR KO)和去除 β_2 -肾上腺素受体的细胞(β_2 -AR KO); 然后添加 β_1 -肾上腺素受体激动剂异丙去甲肾上腺素(ISO), 用微电极阵列测量激动剂作用后 3 种细胞膜动作电位(AP)的变化, 输出结果如图 6 所示. 在加入 ISO 后, β_1 -AR KO 细胞的膜外动作电位几乎没有变化, 而 β_2 -AR KO 细胞和正常细胞(WT)都有很强的响应, 从而证实了 ISO 的作用靶位是 β_1 -肾上腺素受体.

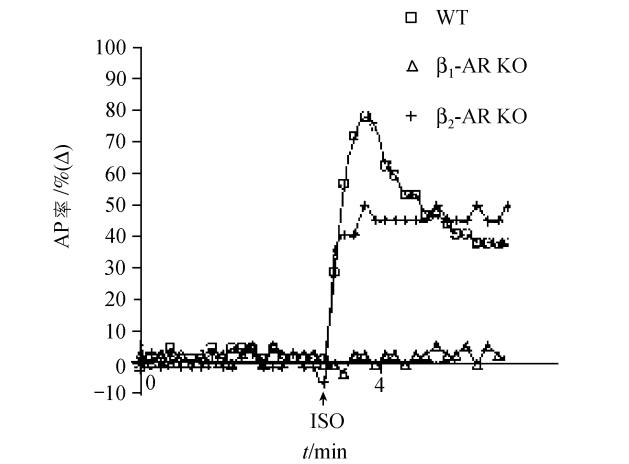


图 6 利用基因设计细胞传感器的输出结果^[42]

这种改变细胞的基因设计, 将“串扰”转换为普通模式的去除噪音的方法, 已经取得了一定的成功. 但是这项新技术还存在一些问题, 如单个受体的缺失可能会对细胞的调节功能产生巨大的影响, 细胞甚至会发生变异, 从而导致功能分析的准确度下降, 甚至产生错误的结论. 尽管如此, 这种基于基因设计的细胞传感器还是为药物筛选提供了一个新方法.

3 结束语

细胞传感器从生理研究到药物筛选都得到了很广泛的应用. 但是, 还有几个主要的因素^[12]限制了细胞传感器的进一步应用, 比如再生性和细胞的选择等. 随机培养的可兴奋细胞尽管寿命长且黏附性

好, 增强了细胞与微电极的耦合, 然而, 缺少在生理化因素的影响, 随机培养的神经元形成一个随机的神经网络, 以致于难以分析. 微电极阵列上的氧化层可能会限制培养在它上面的神经元的神经传导^[43]. 近年来, 细胞模式识别的进展或许能成功引导可兴奋细胞的生长^[44], 提高细胞传感器的可重复性. 显然, 不能使用细胞传感器来研究所有的细胞和所有的生物活性物质, 可兴奋细胞看来比较通用, 但仍需探讨其他类型的细胞. 只有全面了解细胞传感器的适用范围, 才能更好地设计和使用细胞传感器. 细胞传感器要真正进入市场, 还需要解决许多问题. 比如, 微电极阵列中有效的电极数量仍然偏少, 信噪比偏小, 数据分析量大, 对复杂的神经生物响应机理认识不够, 在实验室以外的环境中难以有效地应用^[45].

细胞拥有并表达着一系列潜在的分子识别元件, 如受体、离子通道、酶等, 这些分子都可以作为靶分析物, 当它们对外界刺激敏感时, 就按照固有的活细胞生理机制进行相应的生理功能活动. 所以, 以活细胞作为探测单元的生物传感器可以响应许多具有生物活性的被分析物. 此外, 细胞传感器具备功能性分析的优点, 有助于更深入地探求细胞的生理活动, 它已成为生命科学以及环境科学领域必不可少的工具.

致谢 本工作作为科学技术部重点攻关项目(批准号: 99-929-04-03)、国家“八六三”高技术研究发展计划(批准号: 2001AA635060)及教育部骨干教师资助项目(批准号: 2000-1787).

参 考 文 献

- 1 Dunn K W, Mayor S, Myers J N, et al. Applications of ratio fluorescence microscopy in the study of cell physiology. *FASEB J*, 1994, 8: 573~582
- 2 McConnell H M, Owicki J C, Parce J W, et al. The cytosensor microphysiometer: biological application of silicon technology. *Science*, 1992, 257: 1906~1912
- 3 Ito Y. High-spatial resolution LAPS. *Sensors and Actuators B*, 1998, 52: 107~111
- 4 Mirko L, Werner B, Martin B, et al. Non-invasive measurement of cell membrane associated proton gradients by ion-sensitive field effect transistor arrays for microphysiological and bioelectrical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 2000, 15: 117~124
- 5 Tan H M, Cheong S P, Tan T C. An amperometric benzene sensor using whole cell pseudomonas putida ML2. *Biosensors and Bioelectronics*, 1994, 9: 1~8
- 6 Li N, Endo H, Hayashi H, et al. Development of a trimethylamine gas biosensors system. *Biosensors and Bioelectronics*, 1994, 9: 593~599
- 7 Wolf B, Kraus M, Brischwein M. Biofunctional hybrid structures-cell-silicon hybrids for applications in biomedicine and bioinformatics. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1998, 46: 215~225

- 8 Bousse L. Whole cell biosensor. *Sensors and Actuators B*, 1996, 34: 270~275
- 9 Hafner F. Cytosensor microphysiometer: technology and recent application. *Biosensors and Bioelectronics*, 2000, 15: 149~158
- 10 Ingebradt S, Yeung C K, Krause M, et al. Cardiomyocyte-transistor-hybrids for sensor application. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16: 565~570
- 11 Connolly P, Clark P, Curtis A S G, et al. An extracellular microelectrode array for monitoring electrogenic cells in culture. *Biosensor and Bioelectronics*, 1990, 5: 223~234
- 12 Pancrazio J J, Whelan J P, Borkholder D A, et al. Development and application of cell-based biosensors. *Annal Biomedical Engineering*, 1999, 27: 697~711
- 13 Denyer M C T, Riehle M, Britland S T, et al. Preliminary study on the suitability of a pharmacological bio-assay based on cardiac myocytes cultured over microfabricated microelectrode arrays. *Med Biol Eng Comput*, 1998, 36: 638~644
- 14 Krause M, Ingebrandt S, Richter D, et al. Extended gate electrode arrays for extracellular signal recordings. *Sensors and Actuators B*, 2000, 70: 101~107
- 15 Rhoades B K, Gross G W. Potassium and calcium channel dependence of bursting in cultured neuronal networks. *Brain Res*, 1994, 643: 310~318
- 16 Egert U, Schlosshauer B, Fennrich S, et al. A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays. *Brain Res Protocols*, 1998, 2: 229~242
- 17 Vassanelli S, Fromherz P. Transistor records of excitable neurons from rat brain. *Appl Phys A*, 1998, 66: 459~463
- 18 Morefield S I, Keefer E W, Champman K D, et al. Drug evaluations using neuronal networks cultured on microelectrode arrays. *Biosensors and Bioelectronics*, 2000, 15: 383~396
- 19 Neher E. Molecular biology meets microelectronics. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 114
- 20 VanHaastert P J M. Transduction of the chemotactic cAMP signal across the plasma membrane of dictyostelium cells. *Experientia*, 1995, 51: 1144~1154
- 21 Cudmore S, Cossart P, Griffiths G, et al. Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature*, 1995, 378: 636~638
- 22 Antonik M D, D'Costa N P, Hoh J H. A biosensor based on micromechanical interrogation of living cells. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 1997, March/April: 66~72
- 23 Giaever I, Keese C R. A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature (London)*, 1993, 366: 591~592
- 24 Smith T J, Wang H S, Hogg M G, et al. Prostaglandin E2 elicits a morphological change in cultured orbital fibroblasts from patients with graves ophthalmopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 5094~5098
- 25 Mitra P, Keese C R, Giaever I. Electric measurements can be used to monitor the attachment and spreading of cells in tissue culture. *Biotechniques*, 1991, 11: 504~510
- 26 Lee S, Sode K, Nakanishi K, et al. A novel microbial sensor using luminous bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, 1992, 7: 273~277
- 27 Van der Lelie D, Corbisier P, Baeyens W, et al. The use of biosensors for environmental monitoring. *Res Microbiol*, 1994, 145: 67~74
- 28 Guzzo J, Guzzo A, DuBow M S. Characterization of the effects of aluminum of luciferase biosensors for the detection of ecotoxicity. *Toxicol Lett*, 1992, 64/65: 687~693
- 29 Danosky T R, McFadden P N. Biosensors based on the chromatic activities of living, naturally pigmented cells: digital image processing of the dynamics of fish melanophores. *Biosensor and Bioelectronics*, 1997, 12: 925~936
- 30 Baumann W H, Lehmann M, Schwinde A, et al. Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells. *Sensors and Actuators B*, 1999, 55: 77~89
- 31 Wu Y C, Wang P, Ye X S, et al. A novel microphysiometer based MLAPS for drug screening. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16: 277~286
- 32 Wu Y C, Wang P, Ye X S, et al. Drug evaluations using a novel microphysiometer based on cell-based biosensors. *Sensors and Actuators B*, 2001, 80: 215~221
- 33 吴一聪, 王平, 郑筱祥, 等. 一种新型细胞微生理计的研究. *自然科学进展*, 2002, 12: 54~59
- 34 Vo-Dinh T, Cullum B M, Stokes D L, et al. Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. *Sensors and Actuators B*, 2001, 74: 2~11
- 35 Gholmieh G, Soussou W, Courellis S, et al. A biosensor for detecting changes in cognitive processing based on nonlinear systems analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16: 491~501
- 36 Gray S A, Kusel J K, Shaffer K M, et al. Design and demonstration of an automated cell-based biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16: 535~542
- 37 Baxter G T, Bousse L J, Dawes T D, et al. Microfabrication in silicon microphysiometry. *Clin Chem*, 1994, 40: 1800~1804
- 38 Verhaegen K, Baert K, Simaels J, et al. A high-throughput silicon microphysiometer. *Sensors and Actuators B*, 2000, 82: 186~190
- 39 DeBusschere B D, Kovacs G T A. Portable cell-based biosensor system using integrated CMOS cell-cartridges. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16: 543~556
- 40 Gilchrist K H, Barker V N, Fletcher L E, et al. General purpose, field-portable cell-based biosensor platform. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16: 557~564
- 41 Schwartz I B, Billings L, Pancrazio J J, et al. Method for short time series and analysis of cell-based biosensors data. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16: 503~512
- 42 Aravanis A M, DeBusschere B D, Chruscinski A J, et al. A genetically engineered cell-based biosensor for functional classification of agents. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16: 571~577
- 43 Jimbo Y, Kawana A. Electrical stimulation and recording from cultured neurons using planar electrode array. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1992, 29: 193~204
- 44 Connolly P, Moores G R, Monaghan W, et al. Microelectronic and nanoelectronic interfacing techniques for biological systems. *Sensors and Actuators B*, 1992, 6: 113~121
- 45 Pancrazio J J, Bey J P P, Loloee A, et al. Description and demonstration of a CMOS amplifier-based system with measurement and stimulation capability for bioelectrical signal transduction. *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, 13: 971~979

(2001-11-07 收稿, 2002-05-09 收修改稿)