

[Article]

www.whxb.pku.edu.cn

钛/活细胞界面原位 EIS 研究

胡仁 林理文 张帆 林昌健*

(厦门大学化学化工学院化学系, 固体表面物理化学国家重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要 设计了原位电解池用于生物材料/活细胞界面电化学交流阻抗谱(EIS)的测量, 原位观测了钛/MG63 细胞界面 EIS 行为及其随时间的变化. 原位电解池中引入 Ag/AgCl 作为参比电极, 解决了 EIS 测量过程中高频部分信号失真的问题. 钛/MG63 细胞界面 EIS 研究初步结果表明: 活细胞在钛电极表面附着, 可改变界面双电层结构和电极的表面状态, 进而影响界面的电化学性质. 实验发现, 由于钛电极表面氧化层的阻抗信号处于中低频段, 而细胞膜层自身的电化学阻抗响应位于高频范围, 由此, 可分别分析不同的电极过程, 解析其相互关系, 研究活细胞在生物材料表面的作用机理.

关键词: 钛/细胞界面, 原位 EIS, Ag/AgCl 参比电极

中图分类号: O646

In situ EIS Study on Titanium/Living Cells Interface

HU, Ren LIN, Li-Wen ZHANG, Fan LIN, Chang-Jan*

(State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surfaces, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, P. R. China)

Abstract Using a home-made in situ electrochemical cell of electrochemical impedance spectroscopy(EIS), the impedance behaviors of the titanium/MG63 cells interface were measured to elucidate the interfacial structure and to monitor the interactions of biomaterials and living cells in a physiological condition. The in situ electrochemical cell was designed to detect the dynamic EIS behavior of living cells growing on a titanium surface. A three-well design of electrochemical cell was used to decrease system error and a home-made Ag/AgCl electrode was introduced as a reference electrode to eliminate the distortion phenomena in high frequency range. The EIS spectra and its time dependency of titanium/MG63 cells interface showed that the polarization resistance was increased with the decreasing of CPE constant (Y_0) and a new time constant in high frequency range was detected. It suggested that the adhesion and growth activities of the living cells on the biomaterial surface may influence the surface status and the structure of the double layer at the interface, and thus alter its electrochemical characteristics.

Keywords: Titanium/cells interface, in situ EIS, Ag/AgCl reference electrode

生命体系中存在大量电现象, 生命体系的阻抗行为可反映其生命活动的某些特性, 因而生命体系的原位阻抗响应测量可成为探索生命运动过程的一个重要手段. 如基于细胞阻抗测量以探测细胞生物学过程而发展起来的细胞阻抗传感技术(ECIS)^[1-4]已

受到广泛关注. 该技术^[5-8]通常是在单频率(如 4 kHz 等)激励信号下检测金膜芯片电极表面细胞的阻抗性质, 可定量地获得细胞粘附、伸展及运动等生长过程的信息及其对环境刺激的响应, 从而探测细胞的生命运动规律等. ECIS 技术具有原位、定量、高通量

Received: March 13, 2006; Revised: May 29, 2006. * Correspondent, E-mail: cjlin@xmu.edu.cn; Fax: 0592-2189354.

国家自然科学基金(20273055), 教育部博士点基金(20020384012)及国家 863 计划(2003AA302230)资助项目

©Editorial office of Acta Physico-Chimica Sinica

等优点,但单频率测量相对于宽频率范围测量得到的信息少,而且采用金膜芯片使得基底材料的可变性差,不利于对其它生物材料体系的研究. Wegener 等人^[9-10]在较宽频率范围内测量了细胞在金膜电极表面生长的阻抗谱,提出连续细胞单层的电性质可用一个电阻电容并联电路加以模拟,并测得牛大动脉内皮细胞单层的电阻为 $3.6 \pm 0.6 \cdot \text{cm}^2$, 电容为 $0.6 \pm 0.1 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$. Hanawa 等人^[11-12]报导了用于材料表面细胞电化学交流阻抗谱(EIS)测量的装置. 他们以工业纯钛为研究材料,采用 L929 成纤维细胞,提出将材料表面由吸附的生物分子及生长的细胞组成的生物膜层,用一个电阻电容并联等效电路来模拟,其拟合的电阻值约为 $10^2 \sim 10^4 \cdot \text{cm}^2$, 而且认为细胞对该生物膜层的阻值没有大的影响,这与 Wegener 的结果相比存在偏差. Huang^[13]以钛及钛合金为研究材料,原位测量了材料表面生长的 U-2OS 成骨样细胞的 EIS, 所测量的阻抗谱图表现为一个表观时间常数. 他认为电极表面氧化层的电阻电容性质与细胞生长膜层的电阻电容性质叠加在一起,难以对细胞生长膜层的结构进行深入讨论. 由上可知,虽然 EIS 测量可提供生物材料表面与活细胞相互作用机理的相关信息,并引起了诸多研究者的关注,但国际上材料表面细胞生长及相互作用的 EIS 研究刚刚起步,尚有较多不确定实验因素导致实验数据的偏差,对 EIS 测量结果的分析还存在相当的难度.

本文试图通过建立稳定的 EIS 测量装置,探索生物材料/活细胞界面 EIS 测量方法,并检测钛电极表面细胞生长的 EIS 行为,初步研究活细胞在生物材料表面的生长过程、细胞对生物材料的生物响应及生物材料与生物环境相互作用机理.

1 实验部分

1.1 原位 EIS 测量电解池的设计

用于研究材料/活细胞界面 EIS 的原位电解池必须满足以下条件: (1) 便于消毒灭菌; (2) 保证活细胞的正常生长; (3) 尽量少的外界干扰. 由此,原位电解池采用三孔设计,如图 1 所示. 三个样品处于同一个测量电解池中,可认为测量过程中的溶液状态是一致的,其信号差别是由界面性质决定,由此可以减小系统误差. 将样品旋进相应位置后,用硅胶封住边缘部分,由此达到密封效果. 对电极与参比电极固定于池盖上,对电极呈环形,三个样品使用各自的参比电极. 电解池体材料为聚四氟乙烯. 原位电解池的整

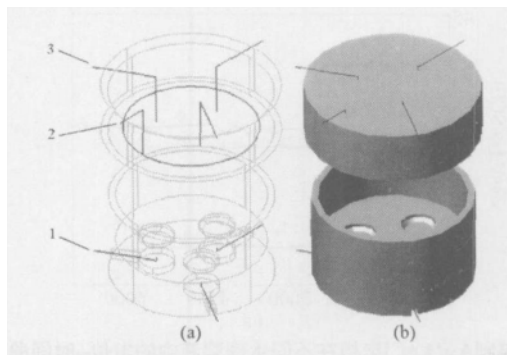


图 1 EIS 原位电解池示意图

Fig.1 Schematic illustration of the in situ EIS electrochemical cell

(a) scenograph, (b) stereogram; 1) working electrode (Ti),
2) counter electrode (Pt), 3) reference electrode (Ag/AgCl)

体设计形似细胞培养皿,便于操作. 实验中,工作电极为 $6 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ 的工业纯钛片,对电极为铂丝,参比电极采用 Ag/AgCl 电极.

1.2 体外细胞培养

实验采用 MG63 人成骨肉瘤细胞(引自中国典型培养物保藏中心, CCTCC). 细胞培养采用 RPMI 1640 培养基(含 15% 胎牛血清,青霉素 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 链霉素 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 在二氧化碳培养箱(5% CO_2 , 37 °C, 饱和湿度)中培养. 正常换液、传代.

1.3 EIS 测量

原位电解池经灭菌后,将细胞悬液以一定密度种植于钛样品表面,空白样品加入等量无细胞培养液,于培养箱中静置 1 h,待细胞贴壁后,再加入适量培养基,置于培养箱中培养,进行 EIS 测量. EIS 测量采用荷兰 ECO CHEMIE 公司生产的 AUTOLAB (PGSTAT30) 电化学工作站,配有 FRA2 模块. 实验控制和数据拟合均采用配套 FRA 软件. 实验采用控电位模式,电位振幅为 5 mV, 单正弦波测量.

2 结果和讨论

2.1 EIS 原位电解池参比电极的选择

采用三电极体系的阻抗测量可获得比 ECIS 技术更丰富的研究信息,本实验生物材料/细胞电化学测量系统均采用三电极体系. 而原位电解池设计的一大问题是参比电极的选择,传统饱和甘汞电极(SCE)不便于消毒, SCE 的另一个缺点在于:参比电极本身的阻抗可能导致高频部分的失真,表现为 Bode 相角图中出现一个翘起的尾巴. 由此,本工作采用 Ag/AgCl 电极作为参比电极.

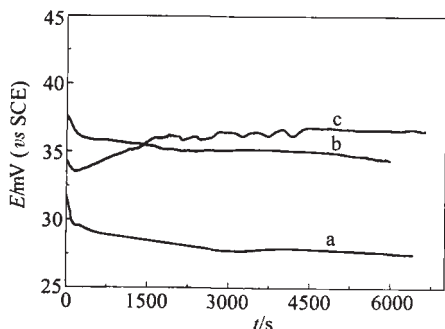


图2 自制Ag/AgCl电极在不同生理溶液中的电位-时间曲线

Fig.2 The potential vs time curves of home-made Ag/AgCl electrode in different solutions

- a) in 0.9% NaCl, b) in RPMI 1640 medium,
c) in RPMI 1640 medium (+10% fetal bovine serum)

图2为自制Ag/AgCl电极在生理盐水以及培养基溶液中的电位-时间曲线.由图可知Ag/AgCl电极在生理盐水以及RPMI 1640培养基溶液中的电位是较稳定的,而在另加有10%牛血清的培养基溶液中的电位有一定起伏,估计是牛血清中的蛋白在Ag/AgCl电极表面吸附所致.考虑其电位波动值不大(1~2 mV),培养基溶液浓度基本不变,本实验采用镀有氯化银的银丝直接插入培养基中做为电位参比.实验发现,经过湿热处理的Ag/AgCl电极具有高的稳定性.Ag/AgCl电极的优点在于其操作简便、易于消毒,而且由于Ag/AgCl电极直接插入培养基溶液的阻抗很小,将不会影响高频测量,可避免SCE参比的高频失真问题.

2.2 钛/活细胞膜层界面EIS谱

将细胞以 5×10^4 cells·cm⁻²密度种植于钛表面,在CO₂培养箱中培养两天后,测量纯钛样品表面细胞的EIS.测量频率范围为10⁴~10⁻² Hz,作为比较,空白样为同样的材料,表面无种植细胞.结果示于图3.图中测量数据用点表示,应用AUTOLAB电化学工作站控制软件FRA进行数据处理,用R_s(R_pQ)模拟电路对数据进行拟合,拟合数据用线表示.拟合的元件数值及其拟合误差见表1.

模拟电路中R_s元件为溶液电阻.由表可知,表面种植细胞的样品的R_s值高于表面无细胞生长的样品.由于生物大分子的吸附以及细胞在材料表面的附着生长,形成一个微米级厚度的生物膜层,这一膜层与培养基基质之间没有明显的界面,它是疏松的,其间渗透着培养基溶液,而生物膜层通常是不良导体,材料表面生物膜层的存在必然导致溶液相电阻的增加,从而可以解释表面有细胞生长的样品的R_s值明显增高.模拟电路中R_pQ呈并联结构,其中

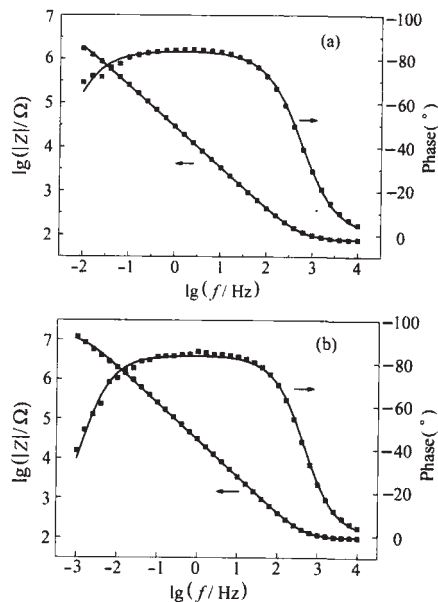


图3 钛电极表面的EIS谱

Fig.3 EIS spectra of Ti surfaces

- a) without cells, b) with living cells;
dot: experimental data, line: simulated data

R_p为界面电化学反应电阻,Q为常相位角元件.可以看出,当电极表面形成生物膜层时,界面电化学反应电阻显著增大,说明表面形成生物膜层对界面电化学反应过程有一定的抑制作用.等效元件Q含有两个参数:Y₀和n,Y₀表示表面双层电容,但由于表面存在弥散效应,使得它并不是一个完全的电容.可以看出,当电极表面形成生物膜层时,界面电容值有所降低,这是由于表面生物膜层的形成,引起的介电常数的变化直接导致界面电容值的变化.这一实验结果与文献结果^[13]是一致的.

2.3 钛/活细胞膜层界面EIS随培养时间的变化

将细胞以 5×10^3 cells·cm⁻²密度种植于材料表面,每24 h对样品进行一次EIS测量,测量频率范围为10⁵~10¹ Hz,连续测量三天,观测材料表面细胞膜层EIS随时间的变化.空白样表面无种植细胞.所得谱图见图4.图中所示曲线(0~3 d)分别为接种细

表1 拟合元件值

Table 1 Simulated data for fit parameters

Sample	R _s (Ω·m ²)	R _p (M·m ²)	Q	
			Y ₀ (μΩ ⁻¹ ·cm ² ·s ⁻¹)	n
Ti without cells	39.8±0.3	1.99±0.14	5.35±0.08	0.936±0.001
Ti with living cells	50.5±1.1	7.10±0.38	4.91±0.18	0.929±0.003

R_s: solution resistance, R_p: polarization resistance, Q: constant phase element (CPE), Y₀: CPE constant, n: CPE exponent

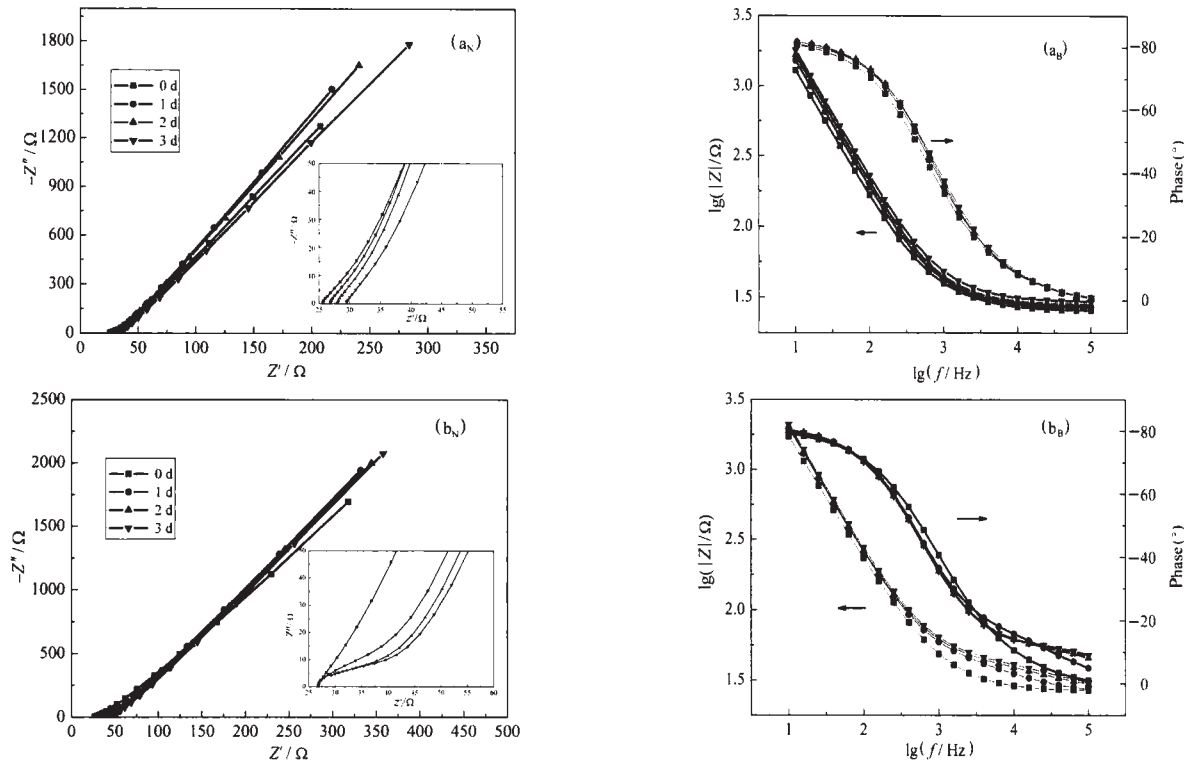


图 4 钛电极表面 EIS 谱随时间的变化

Fig.4 Time dependence of EIS spectra of Ti surfaces

a) without cells, b) with living cells; N: Nyquist diagram, B: Bode diagram

胞当天以及细胞培养过程不同时间所测的EIS谱图。

从空白样的 EIS(图 4a)可知, Bode 相角图的高频部分没有出现翘起的尾巴, Ag/AgCl 参比电极有效避免了 SCE 高频失真问题。当电极在空白培养基溶液中浸泡, 表面没有细胞生长时, 测得的 EIS 谱图随时间无明显改变, 表明电极表面状态基本保持不变。进一步比较不同时间的 EIS 曲线, 可以看到, 在实验范围内阻抗值随培养时间延长有少量增大, 这一现象与空白的钛样品表面氧化膜的成长过程以及生物大分子的吸附过程有关。图 4b 为钛电极表面生长细胞的 EIS 谱图, 从 Bode 图可见, 培养一天后 EIS 谱图高频段出现新的时间常数, 说明界面存在新的电化学反应过程, 而且这一响应随着时间的增长而出现规律性变化, 即阻抗值随着时间的延长而呈明显增长趋势。第三天更换新鲜培养基后测量得到的 EIS 谱图形状与未更换时所测谱图无异, 但阻抗值有所变化, 这主要是由于培养基溶液的变化以及更换培养基操作过程对测量系统有细微的扰动。

取 EIS 谱中 3981 Hz (~4 kHz) 的阻抗数据进行分析。假设此时的阻抗完全反映生物吸附层的性质, 阻抗实部为生物膜层电阻, 阻抗虚部为生物膜层容抗。以接种细胞当天的阻抗值为 1 进行归一化处理,

得到图 5。由图可知, 经归一化处理后, 表面种植细胞的样品的电阻值呈增加趋势, 电容值呈减小趋势, 而且其变化幅度明显大于对照的空白样品。这一变化趋势与 ECIS 的实验规律是相同的, 由此可以推断所测得的阻抗变化信息主要来自于在电极表面的细胞膜层。而且发现, 细胞与材料相互作用引起的阻抗变化主要表现在高频段, 这是细胞自身的电化学反应行为的一个特征, 而通常金属表面氧化膜及电

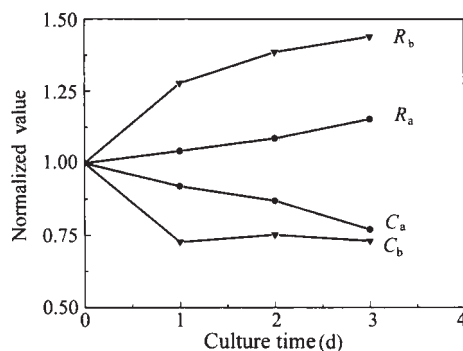


图 5 $f=3981\text{ Hz}$ 时钛电极表面阻抗标准化元件值随培养时间的变化

Fig.5 Dependence of normalized value at $f=3981\text{ Hz}$ on culture time for different Ti surfaces
a) without cells, b) with living cells. R and C are resistance and capacitance respectively.

表2 开路电位-培养时间变化

Table 2 Dependence of OCP (V, vs Ag/AgCl in cell culture medium) on culture time

Sample	Culture time (d)			
	0	1	2	3
Ti without cells	-0.352	-0.278	-0.162	-0.142
Ti with living cells	-0.367	-0.318	-0.290	-0.258

化学反应的阻抗信息是处于低频范围,因此可以分别加以检测和分析.在高频区独立的细胞膜层阻抗信息可以直接反映细胞膜层自身的附着、生长、增殖状态等,结合低频段氧化膜层的阻抗信息(如图3),可以由全频率的阻抗谱研究材料与细胞间的相互作用机理,这方面的研究工作有待进一步深入.

在测量 EIS 的同时,检测了钛电极样品开路电位的变化,其变化规律如表 2 所示.由于装置采用紫外灭菌,紫外光可能引起钛电极表面电子能级分布的变化,导致样品开路电位负移.对于空白样品,由于电极表面状态有回复到平衡的趋势,开路电位由 -0.352 V 随时间正移,3 天后达到 -0.142 V;而对于表面生长细胞的样品,这一电位回复过程明显比较缓慢,3 天后达到开路电位 -0.258 V.在 Hanawa 等^[11]的实验结果中,发现同样条件下,有细胞生长的样品的开路电位偏负.在本实验中,表面无细胞生长的对照样品与表面有细胞生长的实验样品同处于一个培养池,由此可以消除可溶性细胞代谢物的影响.对照二者的实验结果的差异,可认为这是由于细胞在电极材料表面的附着,进而诱导产生的细胞外基质蛋白、粘多糖、粘附蛋白等在电极表面的吸附和成膜,并改变界面双电层的结构和电极的表面状态,从而引起电极开路电位变化行为的差异.

根据以上结果,基本可用文献中提出 $R(RC)(RC)$ 等效电路^[9-13]对生物材料/细胞界面的交流阻抗行为进行模拟.而实际测量表明,模拟电路中的电容元件用恒相位角元件代替更为合理,即 $R_s(R_pQ_d)(R_{cell}Q_{cell})$,如图 6 所示.

图 6 中, R_s 为溶液电阻, R_p 和 Q_d 为金属电极表面的极化电阻和双电层电容, R_{cell} 和 Q_{cell} 为细胞膜层的电阻电容性质.对于钛/MG63 细胞界面体系,基底材料的阻抗信号主要分布在中低频区,细胞的生长可引起基底材料阻抗行为的变化;细胞膜层的阻抗信号主要分布在高频区,并具有与其它电极过程不同的时间常数.通过对金属/细胞表面阻抗谱的测量,可获得有关细胞在材料表面的吸附、生长、增

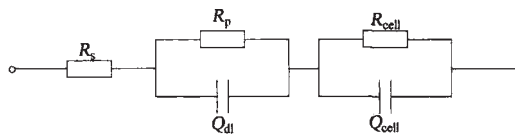


图6 钛/细胞界面等效电路示意图

Fig.6 Equivalent circuit for the titanium/cell interface

殖过程及其与材料表面的相互作用的信息,用来评价生物材料表面的生物性能.

3 结论

自行设计了用于测量钛/细胞体系 EIS 原位电化学池,并采用 Ag/AgCl 作为原位测量 EIS 的参比电极,避免了 SCE 参比电极高频失真问题.通过对钛/细胞界面的 EIS 测量,观测到表面有活细胞生长的电极表面 EIS 变化的动态行为.可认为细胞在电极材料表面附着,进而产生细胞外基质蛋白、粘多糖、粘附蛋白等在电极表面的吸附、成膜,可改变界面双电层结构和电极的表面状态. EIS 测量表明,材料表面钝化膜阻抗信号通常处于中低频段,而细胞膜层自身的电化学阻抗信号处于高频段,从而有利于分别对细胞膜层和生物材料的阻抗信号进行分析,深入了解生物材料/活细胞的相互作用机理.

References

- Giaever, I.; Keese, C. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 7896
- Tiruppathi, C.; Malik, A. B.; Del Vecchio, P. J.; Keese, C. R.; Giaever, I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 7919
- Giaever, I.; Keese, C. R. Nature, 1993, 366: 591
- Wegener, J.; Keese, C. R.; Giaever, I. Exp. Cell Res., 2000, 259: 158
- Xiao, C.; Lachance, B.; Sunahara, G.; Luong, J. H. T. Anal. Chem., 2002, 74: 1333
- Luong, J. H. T.; Habibi-Rezaei, M.; Meghrou, J.; Xiao, C.; Male, K. B.; Kamen, A. Anal. Chem., 2001, 73: 1844
- Xiao, C.; Lachance, B.; Sunahara, G.; Luong, J. H. T. Anal. Chem., 2002, 74: 5748
- Xiao, C.; Luong, J. H. T. Biotechnol. Prog., 2003, 19: 1000
- Wegener, J.; Sieber, M.; Galla, H. J. J. Biochem. Biophys. Methods, 1996, 32: 151
- Wegener, J.; Zink, S.; Rösen, P.; Galla, H. J. Pflügers Arch., 1999, 437: 925
- Hiroto, S.; Noda, K.; Hanawa, T. Electrochim. Acta, 2002, 48: 387
- Hiroto, S.; Noda, K.; Hanawa, T. Corrosion Sci., 2002, 44: 955
- Huang, H. H. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, 314: 787