

应用电声脉冲法的细胞膜电特性研究

张跃, 钟力生, 成林, 程湘东, 朱华

(西安交通大学电力设备电气绝缘国家重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 首次将电声脉冲法(PEA)应用于研究脉冲电场下生物细胞的电特性, 试样采用一种类似“三文治”的结构, 可以看作是一种复合介质. 利用 PEA 装置测量多层复合介质试样的一个关键问题在于声波会在界面处发生透射和反射, 给测量带来很大的误差. 通过对试样模型和声波传播过程的分析, 求解出了界面处的声波传输方程. 根据传输方程推导出波形修正公式, 并编写了波形恢复程序, 取得了较理想的结果. 文中波形处理方法同样适用于其他复合介质的测量, 对于同类问题分析具有一定的参考价值.

关键词: 电声脉冲法; 细胞膜; 复合介质; 波形恢复

中图分类号: TM930. 12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2011)06-0081-04

Study of Cell Membrane Charging Properties with Pulsed Electro-Acoustic Method

ZHANG Yue, ZHONG Lisheng, CHENG Lin, CHENG Xiangdong, ZHU hua

(Stake Key Laboratory of Electrical Insulation & Power Equipment, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: The pulsed electro-acoustic (PEA) method is firstly used to measure the charging properties of biological cells under a pulsed electric field by means of a sandwich-like model, which can be treated as composite dielectrics. For measuring space charge in the composite dielectrics with PEA method the reflection and absorption of acoustic wave at the interfaces often bring forth a great error. By analyzing and modeling the transmission of acoustic wave in samples, the transmission equations of sound wave at the interface are solved. According to the transmission equations, the modifier formulas are derived and the experimental waveform recovery program is established. The waveform recovery method is also appropriate for the other measurements of composite dielectrics.

Keywords: pulsed electro-acoustic method; cell membrane; composite dielectrics; waveform recovery

目前, 电磁生物学研究的一个关键问题是关于生物组织、细胞与外电磁场(尤其是脉冲电场)交互作用过程的物理本质^[1], 而这一过程主要与细胞的膜电特性有关. 细胞的外周膜与细胞内的膜系统统称为细胞膜, 是由脂类、蛋白质及糖等组成的超分子体系^[2], 电学上主要表现为电容性, 同时又对进出细胞的物质具有很强的选择透过性. 细胞与外界发生

信息、物质和能量交换的过程都与细胞膜特性密切相关. 由于细胞膜对离子的通透存在选择性, 造成细胞内外离子浓度分布不均, 形成膜内外离子电荷聚集. 当细胞悬浮液置于脉冲电场下时, 根据电介质物理相关理论, 对应不同频率下的细胞将产生不同机理的极化现象^[3], 即膜外离子迁移形成新的正负电荷中心, 产成宏观电偶极距^[4]. 如果能够动态地测量

收稿日期: 2010-11-03. 作者简介: 张跃(1982—), 男, 博士生; 钟力生(联系人), 男, 教授, 博士生导师. 基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目(2011CB503701).

网络出版时间: 2011-03-04

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1069.T.20110304.1724.000.html>

到膜外离子电荷的变化情况,就有可能为揭示细胞与外电场交互过程的物理本质提供依据。

目前,常用的生理学测量方法很难实现动态观测无介入条件脉冲电场作用下细胞膜外电荷的变化情况。例如,生理学常用的膜片钳技术,需要在细胞膜内外插入电极,测量电极的引入必然破坏原有的电场分布;离子荧光标定技术虽然可以直观地得到离子分布的信息,但需添加染色剂,且实验成本较高,操作过程复杂,主要依赖显微镜观测手段,对于动态过程的捕捉受技术限制。电声脉冲测量装置的信号源为陡脉冲发生器,测量过程中细胞始终置于脉冲电场作用下,细胞处于无介入的电磁环境中,得到的声信号不会受到电磁场的干扰,经压电传感器变换后最终得到电信号,与显微镜观测相比,动态过程的捕捉电信号分析显然更具备优势。而且,采用电声脉冲法实验难度和费用比荧光标定法大大降低,且不存在使用染色剂的负面影响,更有利于测量装置的集成和小型化。因此,应用电声脉冲法可以在无损伤条件下测得脉冲电场下细胞膜外电荷的动态变化情况,为电生理学研究提供一种全新的测量手段。

1 测量方法

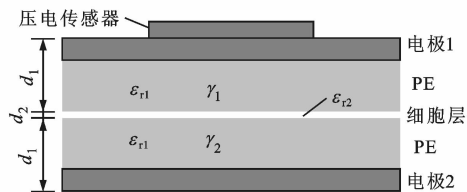
电声脉冲法(PEA)最早于20世纪80年代由日本武藏工业大学的Takada教授提出^[5],其基本原理可以简述如下:电介质材料中存在的空间电荷在外施脉冲电场作用下会受力,产生位移,形成超声波,通过压电传感器将包含有空间电荷信息的声信号转化为电信号,并进行放大和波形处理,就可以得到电介质材料中空间电荷的分布及密度等信息。目前,该项技术主要用于测量固体薄膜材料和电缆绝缘层中空间电荷分布的研究^[6-9]。

2 试样模型的建立

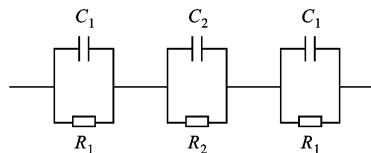
2.1 等效电路模型

由于细胞悬液试样中富含离子,其电学特性与通常PEA测量固体薄膜试样相差甚远,所以试样的放置方式就显得尤为重要。PEA测量时,试样一般置于两只电极间并压紧,以保证电极面和试样面紧密接触。本文采用多层试样结构将细胞悬液置于两层固体薄膜之间,形成类似“三文治”型的3层复合试样,其结构如图1a所示。

首先对这种复合试样结构中细胞层的电场强度进行估算。分析这种多层介质结构中的电场分布常



(a)复合试样结构



(b)等效电路

图1 试样结构及等效电路

采用并联电阻-电容等效电路,上述的3层试样可以用图1b所示电路来等效,电路中各项参数表述为

$$C_1 = \frac{\epsilon_0 \epsilon_{r1} S}{d_1}; R_1 = \frac{d_1}{\gamma_1 S}; C_2 = \frac{\epsilon_0 \epsilon_{r2} S}{d_2}; R_2 = \frac{d_2}{\gamma_2 S} \quad (1)$$

式中: ϵ_0 为真空中介电常数; ϵ_{r1} 和 ϵ_{r2} 分别为固体薄膜层和细胞悬液层的相对介电常数; d_1 和 d_2 分别为固体薄膜层和细胞悬液层的厚度; γ_1 和 γ_2 分别为固体薄膜层和细胞悬液层的电导率; S 为电极面与试样面的接触面积。实验中,采用的是聚乙烯薄膜材料,厚度为180 μm ,相对介电常数为2.2,细胞悬液层厚度约为10 μm ,相对介电常数约为78。

2.2 试样内电场分布

由于薄膜层的电导率远小于细胞悬液层的电导率,所以施加到细胞层的主要是脉冲电场。利用PEA装置测量需要在试样上施加几千到十几千伏特的偏置电压和脉宽为5 ns的脉冲信号,则脉冲电场作用下的细胞悬液层内的电场强度可表示为

$$E_{\text{pulse}} = \frac{\epsilon_{r1}}{\epsilon_{r1} d_2 + 2\epsilon_{r2} d_1} U_{\text{pulse}} \quad (2)$$

PEA测量施加的脉冲电压信号幅值 U_{pulse} 为1 kV,可以算出细胞悬液层的电场强度约为81.4 kV/m。根据报道细胞结构的完整性在电场强度1 000 kV/m以下是不会遭到破坏的^[9]。

3 测量及波形分析

3.1 试样制备

生物细胞悬液的制备过程大致包括以下几个步骤:首先从活体小白鼠的尾部取血,由于血量很少,需要使用RPMI-1640培养液稀释过后再经过多次

离心分离,最终得到较为纯净的血细胞悬液。固体薄膜层选用两片 $180\text{ }\mu\text{m}$ 厚的低密度聚乙烯(LDPE)薄膜,选择 LDPE 薄膜是因为关于这种材料的 PEA 测量较为成熟,有较多的可参考文献和数据。

3.2 测量装置

电声脉冲测量装置结构如图 2 所示,金属铝电极与细胞层之间为 LDPE 薄膜层,传感器材料为聚偏氟乙烯(PVDF)薄膜,紧贴传感器最左端的为声波吸收层,一般采用聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)材料。直流高压源 U_0 可提供最高 20 kV 的偏置电压,与直流高压源串联为防止击穿的限流电阻 R 取值一般为数兆欧姆,脉冲源 U_{pulse} 提供幅值为 1 kV 、脉宽为 5 ns 的脉冲,与其串联的电容 C 起到耦合脉冲信号和隔离直流的作用,取值为 100 pF 。

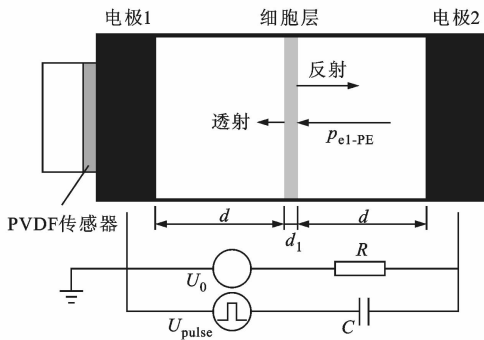


图2 电声脉冲测量装置框图

3.3 测量波形分析及处理

3.3.1 波形失真的因素 相比传统测量的单层均匀固体薄膜材料试样,这种由固体-液体-固体材料所构成的复合结构试样,在数据处理上需要做更多的考虑,主要包括以下3个方面。

(1)因器件非线性失真所引起的过冲问题。所谓过冲问题,是由于PEA测量装置中的传感器和放大器等并非绝对理想的器件,其自身频率特性的影响而引起非线性相位失真,表现在测量波形上会在电极电荷附近出现一个异极性峰,通常称之为过冲现象。过冲现象是PEA测量中普遍存在的问题,目前对过冲问题的处理已经有了比较成熟的解决方法。

(2)声波信号在介质中传播的衰减问题。声波在非理想媒质中传播时,出现声波随着距离而逐渐衰减的物理现象,产生了将声能转变为热能的耗散过程,这被称为介质中的声衰减。声波传输过程中,声压衰减表示如下

$$P = P_0 e^{-\alpha x} \quad (3)$$

式中: P 和 P_0 为声波在介质中传播距离 x 后的声

强和起始声强; α 为衰减因子,通过实验可以测得声波在细胞悬液层中传播的衰减因子约为 $0.0023\text{ }\mu\text{m}^{-1}$,在 LDPE 层中衰减因子约为 $0.0013\text{ }\mu\text{m}^{-1}$ 。

(3)声波在接触面的反射和透射问题。对于多层介质试样,由于相邻两层试样的声阻抗不一致,因而声波在传播过程中在界面处产生反射和透射现象,如果不对实验测量波形进行处理,就无法得到较为真实的电荷分布^[10-13]。假设声波从介质层 i 向介质层 j 传播,介质层 i 和介质层 j 的声阻抗分别为 Z_i 和 Z_j ,界面处的反射和透射现象一般用产生系数 G_{ij} 、反射系数 R_{ij} 和透射系数 T_{ij} 来描述

$$G_{ij} = \frac{Z_j}{Z_i + Z_j}; T_{ij} = \frac{2Z_j}{Z_i + Z_j}; R_{ij} = \frac{Z_i - Z_j}{Z_i + Z_j} \quad (4)$$

3.3.2 声传播过程分析 如图2所示,首先分析电极1和LDPE接触面产生的声压为 $P_{\text{el-PE}}$ 的声波传播情况。声波产生后会向电极1和电极2两个方向传播,只有向电极2方向传播的声波才能被传感器所采集。设介质层 i 的衰减因子为 α_i ,根据声波传播的相关系数,可以得到声波到达PE层与细胞层界面处的声压为

$$P_{\text{PE-C}} = G_{\text{el-PE}} P_{\text{el-PE}} e^{-\alpha_{\text{PE}} d_1} \quad (5)$$

经过细胞层后声波的声压变为

$$P_{\text{C-PE}} = G_{\text{el-PE}} P_{\text{el-PE}} e^{-\alpha_{\text{PE}} d_1} T_{\text{PE-C}} e^{-\alpha_{\text{C}} d_2} T_{\text{C-PE}} \quad (6)$$

虽然界面处的反射波会在传播中发生二次反射,但考虑到声波的衰减使得其幅值相对很小,对于二次反射波的情况不做考虑。这样,最终到达传感器的电极1和LDPE接触面产生声波的声压可表示为

$$P_{\text{S1}} = G_{\text{el-PE}} P_{\text{el-PE}} e^{-\alpha_{\text{PE}} d_1} T_{\text{PE-C}} e^{-\alpha_{\text{C}} d_2} T_{\text{C-PE}} e^{-\alpha_{\text{PE}} d_1} T_{\text{PE-e2}} T_{\text{e2-S}} \quad (7)$$

其中下标C代表细胞层,PE代表LDPE层,S代表传感器,e1和e2分别代表电极1和电极2。

对于由电极2和LDPE接触面产生的声压为 $P_{\text{e2-PE}}$ 的声波,向电极2传播的部分直接被传感器所采集,设这部分的声压为 P'_{S2} ,而向电极1方向传播的部分会在LDPE层与细胞层的接触面处发生反射后被传感器所采集,设这部分分量的声压为 P''_{S2} ,分别可以表示如下

$$P'_{\text{S2}} = G_{\text{PE-e2}} P_{\text{e2-PE}} T_{\text{e2-S}} \\ P''_{\text{S2}} = G_{\text{e2-PE}} P_{\text{e2-PE}} e^{-\alpha_{\text{PE}} d_1} R_{\text{PE-C}} e^{-\alpha_{\text{PE}} d_1} T_{\text{PE-e2}} T_{\text{e2-S}} \quad (8)$$

同理,按照图2由右向左得到LDPE层与细胞层的两个接触面产生声压分别为 $P_{\text{C-PE}}$ 和 $P_{\text{PE-C}}$ 的声波,到

达传感器处声压可表示如下

$$P'_{C-PE} = P_{C-PE} G_{C-PE} e^{-a_{PE}d_1} T_{PE-e2} T_{e2-S} P'_{PE-C} = P_{PE-C} G_{PE-C} e^{-a_C d_2} T_{C-PE} e^{-a_{PE}d_1} T_{PE-e2} T_{e2-S} \quad (9)$$

经过以上3个方面的分析,就可以开始对测量波形进行一定程度的恢复,从而得到更为真实反映电荷分布情况的波形.采用已有的成熟软件对过冲问题进行处理,而对于声波衰减和接触面的反射、透射等问题,则是将采集到的原始数据利用 Matlab 软件自行设计程序进行处理.在进行波形恢复重建的过程中,首先假设到达传感器的声波信号经过压电传感器和放大器后转换为电压信号,该电压信号与声波信号之间为线性关系,比例系数设为 K .如图2所示,电极2与LDPE的接触面产生声波的电压信号可以表述如下

$$U_{e2} = KP'_{e2-PE} = KG_{PE-e2} P_{e2-PE} T_{e2-S} \quad (10)$$

选取 U_{e2} 波形作为波形恢复过程的参考,以 U_{e2} 波形为基准进行推算其他接触面产生的声波.因为电极2与LDPE的接触面是最靠近传感器的一个界面,而电极2与传感器接触面是所有声波都必须通过的界面.在理想状态下,声波传播过程中不存在衰减和除电极2与传感器接触面外的其他界面处的透射、反射的问题,以 U_{e2} 作为参考,电极1与LDPE接触面处产生的声波的电压为

$$U_{e1-PE} = KG_{e1-PE} T_{e2-S} P_{e1-PE} \quad (11)$$

对比式(9)、式(11),可以得到电极1与LDPE的接触面处波形的修正方程

$$U_{e1-PE} = \frac{1}{e^{-a_{PE}d_1} T_{PE-C} e^{-a_C d_2} T_{C-PE}} \frac{1}{e^{-a_{PE}d_1} T_{PE-e2}} KP_{S1} \quad (12)$$

从上面的分析可知,电极2与LDPE接触面产生的声波有一部分经反射后被传感器所采集,即声压为 P'_{S2} 的部分.由于与LDPE相比,中间细胞悬液层非常薄,可以认为 P'_{S2} 与 P_{S1} 同时到达传感器端,即产生了两个声波的叠加.根据式(10),可以得到声压为 P'_{S2} 的声波产生的电压的修正方程

$$U''_{e1-PE} = \frac{G_{e2-PE} e^{-2a_{PE}d_1} R_{PE-C}}{G_{PE-e2}} T_{PE-e2} U_{e2} \quad (13)$$

同理对比式(11),可以得到细胞与LDPE接触面处电压的修正方程

$$U_{PE-C} = \frac{G_{PE-e2}}{G_{PE-C} e^{-a_C d_2} T_{C-PE}} \frac{1}{e^{-a_{PE}d_1} T_{PE-e2}} U'_{PE-C}$$

$$U_{C-PE} = \frac{G_{PE-e2}}{G_{C-PE} e^{-a_{PE}d_1} T_{PE-e2}} U'_{C-PE} \quad (14)$$

3.3.3 波形处理 根据上述修正方程,利用 Matlab 软件编写了处理程序,得到原始波形与恢复后

的波形对比,如图3所示.从图中可以明显看到,两处电极峰的过冲得到明显修正,由于衰减等因素影响的正电极峰的高度也得到了补偿.

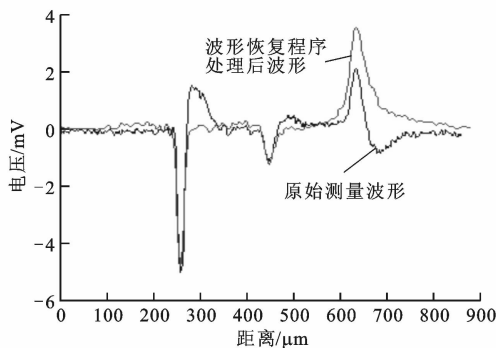


图3 原始波形与恢复后的波形对比图

4 结论

(1)本文首先利用电介质物理学中的并联电路模型,对3层复合试样内部电场分布进行了估算,以保证在外加高压偏置的情况下不会对细胞造成损伤.分析解决了PEA测量多层复合试样中存在的问题,利用已有软件对测量波形中的过冲进行了修正,利用实验手段测量得到声波在各介质层中的衰减因子.

(2)根据复合试样中声波的产生和传播过程,利用声阻抗相关参数对每个介质层的接触面进行了分析,得到描述声波在该界面处产生透射和反射现象的数学方程.

(3)根据分析结果得到对实验波形的恢复方程,并对实验波形进行了修正,取得了比较好的效果.这种对多层试样的处理方法不但适用于本实验模型,对普遍存在的多层介质模型都具有适用性.

当然要想真正得到有关细胞膜电的准确信息,仅靠PEA测量是不够的,还需要辅助一定的生物学诊断方法,这将是进一步研究的内容.

参考文献:

- [1] GAILEY P C, EASTERLY C E. Cell membrane potentials induced during exposure to EMP fields [J]. *Electro- and Magnetobiology*, 1994, 13(2):159-165.
 - [2] 郑国辑. 细胞生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000:2-3.
 - [3] 崔湘屏, 王淑秋, 马青. 人红细胞对 10 kHz~100 MHz 电磁场的介电响应探讨 [J]. *黑龙江医药科学*, 2004, 27(4):12-14.
- CUI Xiangping, WANG Shuqiu, MA Qing. Dielectric

- response of human erythrocytes in the frequency range of 10 kHz-100 MHz [J]. Heilongjiang Medicine and Pharmacy, 2004, 27(4): 12-14.
- [4] 徐传骧,刘辅宜,钟力生,等. 工程电介质物理与介电现象 [M]. 西安: 西安交通大学出版社, 2007: 137-138.
- [5] TAKADA T, SAKAI T. Measurement of electric fields at a dielectric/electrode interface using an acoustic transducer technique [J]. IEEE Trans Electrical Insul, 1983, 18(6): 619-628.
- [6] LI Ying, YASUDA M, TAKADA T. Pulsed electroacoustic method for measurement of charge accumulation in solid dielectrics [J]. IEEE Trans Electrical Insul, 1994, 1(2): 188-195.
- [7] MAENO T, FUTAMI T, KUSHIBE H. Measurement of spatial charge distribution in thick dielectrics using the pulsed electroacoustic method [J]. IEEE Trans Electrical Insul, 1988, 23(3): 433-439.
- [8] MAENO T, FUKUNAGA K. High-resolution PEA charge distribution measurement system [J]. IEEE Trans Electrical Insul, 1996, 3(6): 754-757.
- [9] BEEBE S J, FOX P M, REC L J, et al. Nanosecond pulsed electric field (ns PEF) effects on cells and tissues; apoptosis introduction and tumor growth inhibition [J]. IEEE Trans Plasma Sci, 2002, 30: 286-292.
- [10] FU M, CHEN G, DAVIES A E. Space charge measurements in cables using the PEA method; signal data processing considerations [C]//IEEE 7th International Conference on Solid Dielectrics. Piscataway, NJ, USA: IEEE, 2001: 219-222.
- [11] BODEGA R, MORSHUIS P H F. Space charge measurements on multi-dielectrics by means of pulsed electroacoustic method [J]. IEEE Trans Electrical Insul, 2006, 13(2): 272-281.
- [12] ZHU Yongchang, TU Demin, TAKADA T. Mathematical analysis and interpretation of pulsed electroacoustic system [C]//Proceedings of the 6th International Conference on Properties and Applications of Dielectric Materials. Xi'an, China: Xi'an Jiaotong University, 2000: 63-66.
- [13] WADAMORI M, FUKUMA M. Proposal of numerical analysis model of acoustic wave propagation and generation on PEA method [C]//Proceedings of the 7th International Conference on Properties and Applications of Dielectric Materials. Nagoya, Japan: [n. s.], 2003: 863-866.

(编辑 杜秀杰)