

大穿透深度折射率传感器对活细胞药物敏感性的研究

刘璐^{**}, 吴晓静², 孙伽略¹, 张慧琴¹, 杨勇^{1*}

¹南开大学现代光学研究所, 天津 300350;

²天津市人民医院, 天津 300121

摘要 针对现有表面等离子激元折射率传感器纵向探测深度小、探测范围无法覆盖整个细胞厚度的问题, 提出一种大探测深度、高灵敏度的活细胞折射率实时测量方法, 并利用该方法开展了药物敏感性的实验研究。基于偏振选择吸收效应, 设计并搭建了全内反射条件下的石墨烯折射率传感系统, 进行了不同质量分数氯化钠溶液折射率的测量, 结果表明系统具有 9.5×10^6 mV/RIU 的灵敏度和 5.5×10^{-7} RIU 的分辨率; 利用该系统开展了活细胞药物敏感性的实验研究, 分别研究了顺铂和紫杉醇作用于 Ramos 细胞和 Jeko-1 细胞时生物演化过程中细胞折射率的实时变化规律, 验证了折射率变化与其药性机理作用的一致性。

关键词 生物光学; 折射率传感; 石墨烯; 活细胞; 药物敏感性

中图分类号 O436

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201838.1104001

Study on Large Penetration Depth Refractive Index Sensor to Drug Susceptibility of Living Cells

Liu Lu^{1**}, Wu Xiaojing², Sun Jialüe¹, Zhang Huiqin¹, Yang Yong^{1*}

¹Institute of Modern Optics, Nankai University, Tianjin 300350, China;

²Tianjin Union Medical Center, Tianjin 300121, China

Abstract Aiming at the problem that the existing surface plasmon refractive index sensor has a small vertical detection depth and the detection range cannot cover the entire thickness of cells, we propose a real-time measurement method of the living cell refractive index for its advantages: large detection depth and high sensitivity. And this method is used to carry out the experimental research on drug susceptibility. Based on the polarization-selective absorption effect, we design and build a graphene-based refractive index sensing system under the condition of total internal reflection. The refractive index with various mass fraction of sodium chloride solution is measured. The results indicate that the sensitivity and resolution of the system is 9.5×10^6 mV/RIU and 5.5×10^{-7} RIU, respectively. The experimental study on the drug susceptibility of living cells is carried out by the system. The real-time changes of cell refractive index during the biological evolution of cisplatin and paclitaxel in Ramos cells and Jeko-1 cells are studied, and the consistency of refractive index changes with its pharmacological mechanism is verified.

Key words biotechnology; refractive index sensing; graphene; living cells; drug susceptibility

OCIS codes 170.1530; 040.1880; 160.4236

1 引 言

生物传感技术能将人体各种生理信息转化成工程上可测定的量, 在毒品检测、医疗诊断、食品安全和环境监测等方面有着广阔的应用前景^[1-5]。折射率(RI)作为一项重要的物理参数, 可以反映物质内部成分的变化。近年来, 高灵敏度的折射率传感技术已发展成为一种在分子水平上实现快速分析物质

中分子相互作用的方法^[6]。表面等离子体共振 (SPR) 技术^[7-11]作为一种高灵敏度地测量折射率的方法, 被广泛应用于生物传感器领域, 其折射率分辨率最高可以达到 10^{-8} RIU^[11]。然而, 表面等离子体波(SP)是一种近场电子谐振波, 仅作用于距金属膜 100~200 nm 的范围内, 这使得其在许多测量应用中表现出穿透深度小的缺点。例如, 在体外活细胞折射率的实时检测中, 贴壁细胞的厚度为 2~

收稿日期: 2018-05-03; 修回日期: 2018-07-05; 录用日期: 2018-07-12

基金项目: 国家自然科学基金(11474171)、天津市卫生和计划生育委员会科技基金(2015KY30)

* E-mail: yangyong@nankai.edu.cn; ** E-mail: 13383023626@163.com

3 μm , SPR 技术仅能在金属膜附近很小的范围内检测细胞的折射率,无法给出整体细胞折射率的信息。此外,在研究活细胞对药物敏感性的过程中,由于给药方式的限制,往往是细胞上层表面(远离金属膜表面)先与药物作用,待药物扩散到金属膜附近的探测区域时,才能检测到折射率的变化,因而,导致测量不具有时效性。

石墨烯是一种二维材料,具有许多优异的光学性质。基于偏振选择吸收效应的石墨烯折射率传感技术已经成为一种高灵敏度的折射率测量方法,其穿透深度大的优点使其在癌症诊断、气体探测和细胞免疫等领域表现出了巨大的应用价值。2012年, Bao 等^[12]率先报道了石墨烯对 TE 和 TM 电磁波具有选择偏振吸收特性。Xing 等^[13]首次基于偏振选择吸收效应实现了折射率的高灵敏度测量;Sun 和 Xing 等^[14-15]将基于该效应的石墨烯折射率传感技术应用于细胞折射率的测量,实现了癌变细胞的筛选。近年来,石墨烯折射率传感技术还被应用于气体参数检测^[16]、蛋白质检测^[17]和抗原抗体检测^[18]等方面。

不同于 SPR 技术,石墨烯折射率传感技术是利用石墨烯表面的倏逝波与样品的相互作用来实现折

射率的测量的。研究表明,在全内反射条件下,可探测的倏逝波穿透深度可以达到 2~3 μm ^[19],可以完全覆盖一个细胞的厚度。为此,本文提出基于石墨烯折射率传感的活细胞折射率实时测量方法,设计了一种在全内反射条件下的生物折射率传感器,即:采用厚度为 10 层的石墨烯,在全内反射条件下构成石墨烯折射率传感器。通过对不同质量分数氯化钠溶液的折射率进行标定,得到了传感器的灵敏度和分辨率分别为 9.5×10^6 mV/RIU 和 5.5×10^{-7} RIU。实验分别对注射顺铂药物和紫杉醇药物的人淋巴瘤细胞 Ramos 细胞和 Jeko-1 细胞进行了长时间的折射率测量,结果显示:顺铂药物和紫杉醇药物均可对细胞的生长过程起到抑制作用,实验结果与药物的药性机理具有很好的一致性。

2 石墨烯折射率传感原理

在全内反射条件下,光从光密介质射入光疏介质中,会在界面处形成倏逝波。为了探讨石墨烯的偏振选择吸收特性,采用一种三明治结构将石墨烯夹在介质 1(折射率 n_1)和介质 2(折射率 n_2)中间,如图 1(a)所示。石墨烯具有复杂的光学常数,其复折射率 n 为 $3.6+1.3i$ 。单层石墨烯的厚度为 0.34 nm。

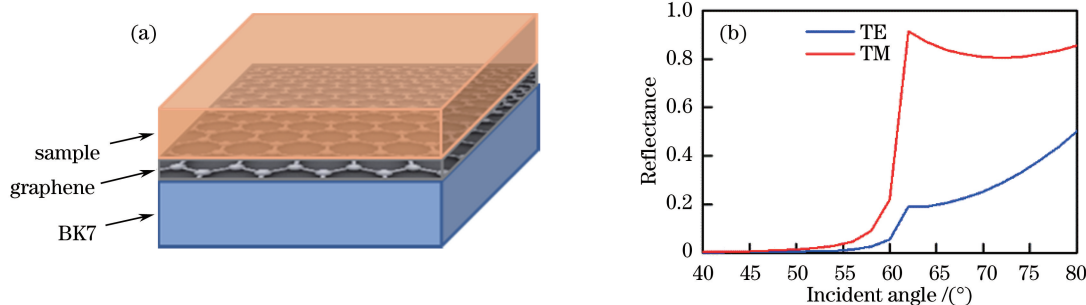


图 1 石墨烯偏振选择吸收特性仿真结果。(a)样品-石墨烯-BK7 基底三层结构示意图;
(b) TE 和 TM 偏振波反射率曲线

Fig. 1 Simulation result of polarization-selective absorption property of graphene.

(a) Sample-graphene-BK7 three-layer structure; (b) reflectivity index curves of TE and TM polarized waves

根据菲涅耳公式及多层膜耦合理论,对石墨烯在全内反射条件下的反射率进行模拟。图 1(a)中的三明治结构的整体反射率为

$$R = \left| \frac{r_{1g} + r_{g2} \exp(2i\beta)}{1 + r_{1g} r_{g2} \exp(2i\beta)} \right|^2, \quad (1)$$

其中

$$\beta = \frac{2\pi}{\lambda} n d \cos \theta_{1g}, \quad (2)$$

式中: r_{1g} 为介质 1 与石墨烯交界面处的反射系数; r_{g2} 为介质 2 与石墨烯交界面处的反射系数; β 为层

与层之间的相位传递因子; λ 为入射光波长; d 为 10 层石墨烯的厚度; θ_{1g} 为光从介质 1 入射到石墨烯的折射角。

对于 TE 偏振的电磁波,反射系数分别为

$$r_{1g} = \frac{n_1 \cos \theta - n \cos \theta_{1g}}{n_1 \cos \theta + n \cos \theta_{1g}}, \quad (3)$$

$$r_{g2} = \frac{n \cos \theta_{1g} - n_2 \cos \theta_{g2}}{n \cos \theta_{1g} + n_2 \cos \theta_{g2}}, \quad (4)$$

式中: θ_{g2} 为光从石墨烯入射到介质 2 的折射角。

对于 TM 偏振的电磁波,反射系数分别为

$$r_{1g} = \frac{n \cos \theta - n_1 \cos \theta_{1g}}{n \cos \theta + n_1 \cos \theta_{1g}}, \quad (5)$$

$$r_{g2} = \frac{n_2 \cos \theta_{1g} - n \cos \theta_{g2}}{n_2 \cos \theta_{1g} + n \cos \theta_{g2}}. \quad (6)$$

在模拟中,介质 1 为 BK7 玻璃($n_1=1.517$),介质 2 为水($n_2=1.333$),石墨烯采用化学气相沉积法制备(共 10 层),入射光波长为 532 nm。TE 和 TM 偏振波反射率曲线如图 1(b)所示,可见:当入射角大于临界角(61.2°)后,石墨烯对 TE 波的吸收强于 TM 波,展现出了石墨烯的偏振选择吸收特性。

3 实验方法及材料

3.1 石墨烯折射率传感系统

在全内反射条件下,测量石墨烯折射率的实验装置如图 2 所示。实验选用输出波长为 532 nm 的激光器作为光源,入射光功率为 20 mW。激光经偏振片后变为线偏振光,再通过四分之一波片后变成圆偏振光(偏振片和四分之一波片快轴的夹角为 45°)。入射光以全内反射临界角 61.2° 射入棱镜(棱镜表面由下而上依次是石墨烯和待测样品),反射光

入射到偏振分光棱镜后被分成 TE 和 TM 两种不同的偏振态,由平衡探测器同时进行监测,将光信号转化为电压差分信号。多功能数据采集控制卡在计算机的控制下采集电压信号。

3.2 微流控芯片的加工

微流控芯片是一种容积小,可供液体在其中流动的沟槽,它的主要作用是储存培养细胞的液体。为了实现对照测量,采用双样品池进行实验。其中的一个样品池用于盛放细胞和培养液,另一个样品池只盛放培养液。此外,由于细胞在生长过程会进行新陈代谢,营养液的成分每时每刻都会发生变化,因此需要保证两个样品池可进行营养液的物质交换,但不进行细胞的流通。为达到这一目的,在两个样品池之间流通的地方插入一张半透膜,该膜对细胞和营养液具有选择透过性。芯片两侧是边长均为 10 mm 的正方形样品池,样品池的高度为 15 mm。芯片中间是长为 8 mm、宽为 5 mm 的流通区域,其高度为 12 mm。微流控芯片的几何参数如图 3(a)所示。基于上述要求,应用软件建模制作微流控芯片模板,如图 3(b)所示,采用增材制造工艺制作模板。

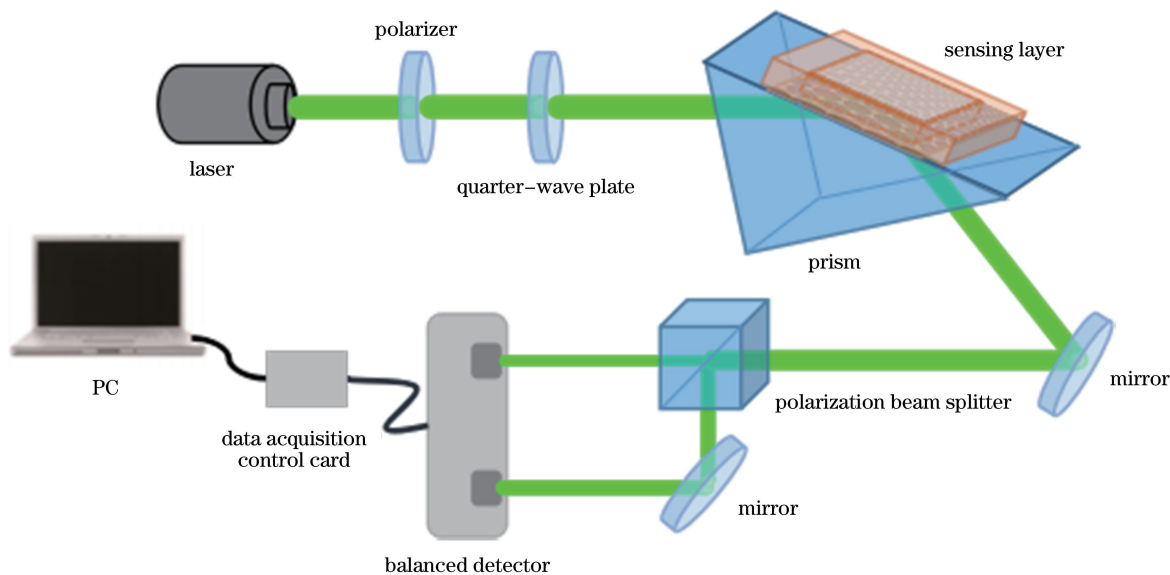


图 2 石墨烯折射率传感系统示意图

Fig. 2 Schematic of graphene-based refractive index sensing system

微流控芯片模板制作完成后,还需要在其四周环绕一层聚二甲基硅氧烷(PDMS)形成凹槽,以便于盛放营养液。制作过程中需要将液态 PDMS 与凝固剂以质量比为 10:1 的比例混合,即将 60 g 的 PDMS 与 6 g 的凝固剂混合,待两者充分混合后,将混合物缓慢

倒在芯片模板四周,且低于模板高度。待混合物完全凝固后就获得 PDMS 微流控芯片。在微流控芯片模板的流通区域插入半透膜。最后,采用表面氧等离子体处理的方法,对微流控芯片和石墨烯波片进行粘连,粘连后的效果如图 3(c)所示。

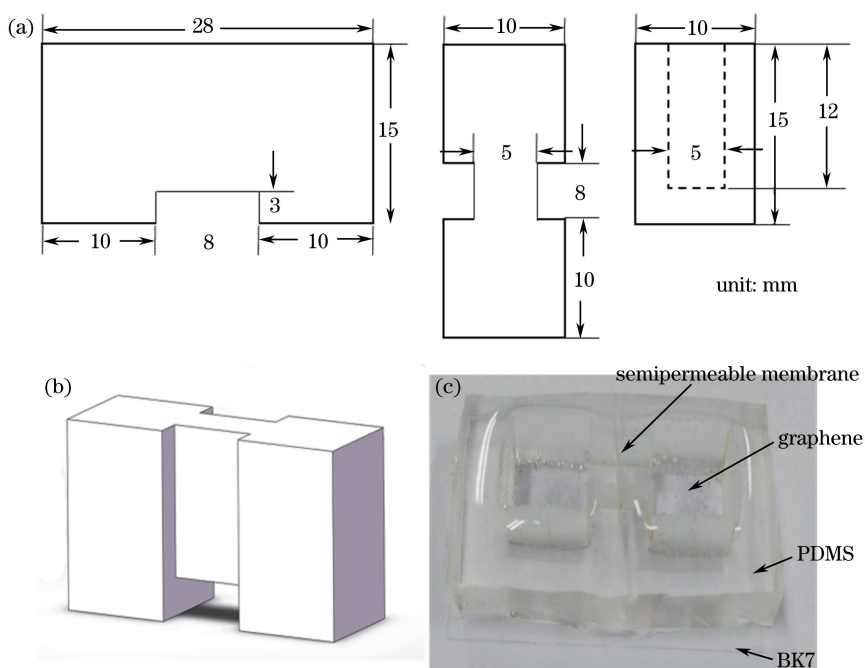


图 3 微流控芯片结构示意图。(a) 芯片模板三视图；(b) 芯片模板图；(c) 芯片成品图
Fig. 3 Structural schematics of microfluidic chip. (a) Three views of chip template;
(b) template of chip; (c) finished product of chip

3.3 实验材料

在实验室配制了质量分数分别为 0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1% 的氯化钠溶液。选用的两种细胞分别为 Ramos 细胞和 Jeko-1 细胞，均购自美国模式培养物集存库(ATCC)，两种药物分别为顺铂(用药量为 3 μL ，质量浓度为 1 mg/mL)和紫杉醇(用药量为 10 μL ，质量浓度为 1 mg/mL)。Ramos 细胞的密度为 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ，培养基为 RPMI-1640，其中加入质量分数为 10% 的热灭活胎牛血清；Jeko-1 细胞的密度为 $4 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ，培养基为 RPMI-1640，其中加入质量分数为 20% 的胎牛血清。培养基和牛血清均购自

Gibco 公司。细胞在温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为 5% 的培养箱中培养生长。

4 实验研究与分析

4.1 折射率检测实验

在进行细胞折射率测量之前，首先对实验系统的折射率灵敏度进行检测。在实验中，先后测量水和不同质量分数的氯化钠溶液的折射率。氯化钠溶液的折射率与质量分数的关系为

$$n_{\text{NaCl}} = n_{\text{water}} + 0.00185c, \quad (7)$$

式中： c 为氯化钠溶液的质量分数。得到的实时电压 U 如图 4(a) 所示。

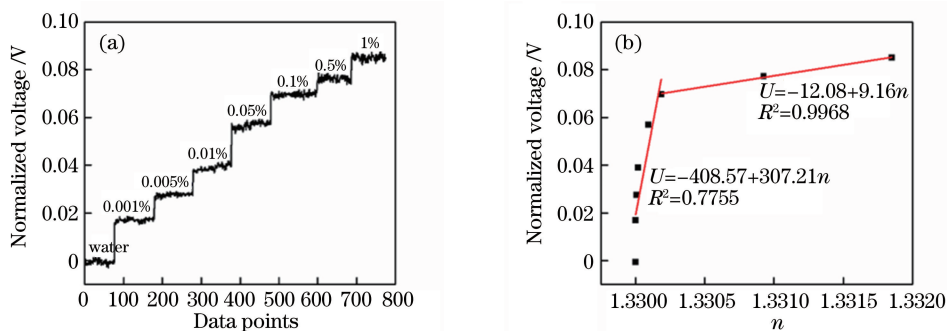


图 4 (a) 不同质量分数氯化钠溶液的折射率实时测量结果；(b) 不同质量分数氯化钠溶液的电压与折射率的关系
Fig. 4 (a) Real time measurement results of refractive index of sodium chloride solution with different mass fractions;
(b) relationship between voltage and refractive index of sodium chloride solution with different mass fractions

在微小的氯化钠折射率变化范围内,测量电压与折射率的关系如图 4(b)所示。由图 4 可见:随着氯化钠溶液折射率增大,通过平衡探测器测量得到的电压差分值逐渐增大;质量分数为 0.001%的氯化钠溶液与水的折射率差异可以被明显区分,电压信号差值为 0.0176 V。

灵敏度和分辨率的计算公式分别为

$$S(n) = \frac{\Delta U}{\Delta n}, \quad (8)$$

$$R = \frac{3\sigma}{S(n)}, \quad (9)$$

式中: $S(n)$ 为灵敏度; R 为分辨率; σ 为标准差; Δn

为氯化钠溶液与水的折射率之差; ΔU 为 Δn 对应的电压差值。石墨烯折射率传感系统的标准差为 1.74 mV,从而可以计算出基于石墨烯的折射率传感器的灵敏度和分辨率分别为 9.5×10^6 mV/RIU 和 5.5×10^{-7} RIU。

4.2 生物细胞的演化过程

实验分别测量顺铂药物和紫杉醇药物对 Ramos 细胞和 Jeko-1 细胞生长过程中折射率变化的影响。细胞给药之前,分别测量了有细胞区域和无细胞区域的折射率;细胞给药之后,每经过 40 min,对两个区域测量一次,记录给药后细胞折射率的变化。实验结果如图 5 所示。

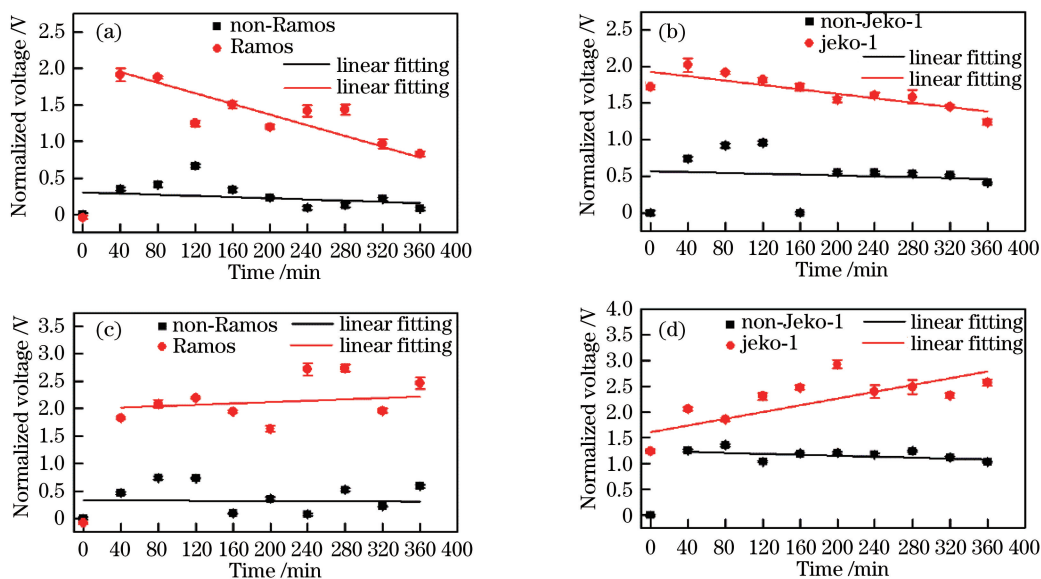


图 5 细胞生长过程中折射率的测量结果。(a) Ramos 细胞加入顺铂药物;

(b) Jeko-1 细胞加入顺铂药物;(c) Ramos 细胞加入紫杉醇药物;(d) Jeko-1 细胞加入紫杉醇药物

Fig. 5 Measurement results of refractive index in growth process of cells. (a) Ramos cells with cisplatin;

(b) Jeko-1 cells with cisplatin; (c) Ramos cells with paclitaxel; (d) Jeko-1 cells with paclitaxel

顺铂药物可抑制 DNA 的复制过程,并损伤其细胞膜上结构,导致细胞凋亡^[20-21]。紫杉醇药物可促进细胞微管蛋白的聚合和微管束的形成,并可抑制其解聚^[22-23]。在微流槽中加入顺铂药物或紫杉醇药物后,药物会对细胞的生长过程造成影响,从而引起传感区域细胞折射率的变化^[24],表现为石墨烯折射率传感器电压的变化。

由图 5(a)、(b)可见:两种细胞加入顺铂药物后,输出电压逐渐下降,折射率变小;Ramos 细胞的电压下降了 1.08 V,可推算出细胞折射率的变化为 1.14×10^{-4} RIU;Jeko-1 细胞的电压下降了 0.78 V,推算出其折射率的变化为 8.2×10^{-5} RIU。由图 5(c)、(d)可见:两种细胞加入紫杉醇药物后,输出电压逐渐上升,折射率变大;Ramos 细胞的电压

上升了 0.64 V,可推算出其折射率的变化为 6.7×10^{-5} RIU;Jeko-1 细胞的电压上升了 0.51 V,可推算出其折射率的变化为 5.4×10^{-5} RIU。通过计算可以发现,两种药物对细胞生长过程中折射率的影响与其药性机理作用一致,且折射率的变化都在微小的范围内。因此,石墨烯折射率传感器可对细胞进行高灵敏度的免标记测量。

5 结 论

本课题组提出了一种基于石墨烯折射率传感的活细胞折射率实时测量方法,利用其具有的大探测深度的优势,可以实现活细胞折射率的实时测量。实验结果表明:所提出的石墨烯折射率传感系统具有 9.5×10^6 mV/RIU 和 5.5×10^{-7} RIU 的灵敏度

和分辨率;两种药物均具有抑制细胞生长的作用,说明所提出的石墨烯折射率传感系统对研究抗肿瘤药物在抑制癌细胞生长和治疗肿瘤方面具有潜在的应用价值。此外,石墨烯折射率传感系统将整个细胞作为研究对象,并具有生物无毒性、免标记、大穿透深度、高灵敏度等优点,因此可成为一种具有普适性的活细胞检测手段,不仅可以用于细胞药物敏感性的检测,还可以用于诸如细胞结构与功能、细胞增殖、分化、代谢、运动、衰老、凋亡等生命过程的其他研究。

参 考 文 献

- [1] Sun Y R, Shi T L, Liu J J, *et al.* Terahertz label-free bio-sensing with EIT-like metamaterials [J]. *Acta Optica Sinica*, 2016, 36(3): 0328001.
孙雅茹, 史同璐, 刘建军, 等. 太赫兹超材料类 EIT 谐振无标记生物传感[J]. *光学学报*, 2016, 36(3): 0328001.
- [2] Kumawat N, Pal P, Varma M. Diffractive optical analysis for refractive index sensing using transparent phase gratings [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16687.
- [3] Sreekanth K V, Alapan Y, ElKabbash M, *et al.* Extreme sensitivity biosensing platform based on hyperbolic metamaterials [J]. *Nature Materials*, 2016, 15(6): 621-627.
- [4] Xu S C, Zhan J, Man B Y, *et al.* Real-time reliable determination of binding kinetics of DNA hybridization using a multi-channel graphene biosensor [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14902.
- [5] Wang H, Zhou W C, Li K W, *et al.* Label-free biosensing characteristics of micro/nano-fiber coupler [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(3): 0306005.
汪海, 周文超, 李凯伟, 等. 微纳光纤耦合器无标生物传感特性[J]. *光学学报*, 2017, 37(3): 0306005.
- [6] Liu P Y, Chin L K, Ser W, *et al.* Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis past, present and future[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(4): 634-644.
- [7] Guo T. Review on plasmonic optical fiber grating biosensors[J]. *Acta Optica Sinica*, 2018, 38(3): 0328006.
郭团. 等离子体共振光纤光栅生物传感器综述[J]. *光学学报*, 2018, 38(3): 0328006.
- [8] Brule T, Granger G, Bukar N, *et al.* A field-deployed surface plasmon resonance (SPR) sensor for RDX quantification in environmental waters [J]. *Analyst*, 2017, 142(12): 2161-2168.
- [9] Zeng S W, Baillargeat D, Ho H P, *et al.* Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(10): 3426-3452.
- [10] Wong C L, Olivo M. Surface plasmon resonance imaging sensors: a review [J]. *Plasmonics*, 2014, 9(4): 809-824.
- [11] Slavik R, Homola J. Ultrahigh resolution long range surface plasmon-based sensor [J]. *Sensors and Actuators B*, 2007, 123(1): 10-12.
- [12] Bao Q L, Loh K P. Graphene photonics, plasmonics, and broadband optoelectronic devices [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(5): 3677-3694.
- [13] Xing F, Liu Z B, Deng Z C, *et al.* Sensitive real-time monitoring of refractive indexes using a novel graphene-based optical sensor [J]. *Scientific Report*, 2012, 2: 908.
- [14] Sun L X, Zhang Y Q, Wang Y J, *et al.* Refractive index mapping of single cells with a graphene-based optical sensor [J]. *Sensors and Actuators B*, 2017, 242: 41-46.
- [15] Xing F, Meng G X, Zhang Q, *et al.* Ultrasensitive flow sensing of a single cell using graphene-based optical sensors [J]. *Nano Letters*, 2014, 14(6): 3563-3569.
- [16] Xing F, Zhang S, Yang Y, *et al.* Chemically modified graphene films for high-performance optical NO₂ sensors [J]. *Analyst*, 2016, 141(15): 4725-4732.
- [17] Jiang W S, Xin W, Xun S, *et al.* Reduced graphene oxide-based optical sensor for detecting specific protein [J]. *Sensors and Actuators B*, 2017, 249: 142-148.
- [18] Jiang W S, Xin W, Chen S N, *et al.* Microshell arrays enhanced sensitivity in detection of specific antibody for reduced graphene oxide optical sensor [J]. *Sensors*, 2017, 17: 221.
- [19] Yang Y, Sun J L, Liu L, *et al.* Research of detection depth for graphene-based optical sensor [J]. *Optics Communications*, 2018, 411: 143-147.
- [20] Reedijk J, Lohman P H M. Cisplatin: synthesis, antitumour activity and mechanism of action [J]. *Pharmaceutisch Weekblad*, 1985, 7(5): 173-180.
- [21] Raghavan R, Cheriyaundath S, Madassery J. Dimethyl sulfoxide inactivates the anticancer effect of cisplatin against human myelogenous leukemia cell lines in *in vitro* assays [J]. *Indian Journal of Pharmacology*, 2015, 47(3): 322-324.
- [22] Safinya C R, Chung P J, Song C, *et al.* The effect of multivalent cations and Tau on paclitaxel-stabilized

- microtubule assembly, disassembly, and structure [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2016, 232: 9-16.
- [23] Yeung T K, Germond C, Chen X M, *et al.* The mode of action of taxol: apoptosis at low concentration and necrosis at high concentration [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 263(2): 398-404.
- [24] Altieri D C. Validating survivin as a cancer therapeutic target [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3(1): 46-54.