

DOI: 10.19650/j.cnki.cjsi.J2107757

基于苦味受体表达的多组织细胞传感器及其应用*

秦春莲^{1,2,3,4,5}, 袁群琛^{1,2,3,5}, 庄柳静^{1,2,3,4,5}, 李 蓉^{1,2,3,5}, 王 平^{1,2,3,4,5}

(1. 浙江大学生物传感器国家专业实验室, 杭州 310027; 2. 浙江大学生物医学工程教育部重点实验室, 杭州 310027; 3. 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院, 杭州 310027; 4. 浙江大学教育部脑与脑机融合前沿科学中心, 杭州 310027; 5. 浙江大学滨江研究院, 杭州 310053)

摘 要:非口腔组织中的苦味受体(TAS2Rs)可能成为相关疾病治疗的新靶点。该研究将表达有TAS2Rs的细胞作为敏感元件,根据其生理特性与不同的传感器耦合,探究了味觉受体异位表达及其在个性化药物筛选中的应用,构建了针对不同疾病模型的个性化药物筛选平台。首先,基于细胞阻抗传感器以及内源性表达TAS2R38受体的结肠癌细胞,开发了异硫氰酸酯类物质特异性药物筛选平台,求得苯硫脲的EC50为157.6 μM ;其次,结合微电极阵列检测系统,探究了TAS2Rs激动剂地芬尼多(5~160 μM)和水杨苷(0.001~100 μM)对心肌细胞收缩的抑制作用;此外,基于3D呼吸道平滑肌细胞(ASMCs)阵列,结合凝胶成像系统,探究了TAS2Rs激动剂桔皮素(20 μM)对呼吸道平滑肌细胞的舒张作用。

关键词:细胞传感器;苦味受体;结肠癌细胞;心肌细胞;呼吸道平滑肌细胞;个性化药物筛选

中图分类号: TH77 **文献标识码:** A **国家标准学科分类代码:** 416.60.10

Multi-tissue cell sensors based on the expression of bitter taste receptors and their application

Qin Chunlian^{1,2,3,4,5}, Yuan Qunchen^{1,2,3,5}, Zhuang Liuqing^{1,2,3,4,5}, Li Rong^{1,2,3,5}, Wang Ping^{1,2,3,4,5}

(1. Biosensor National Special Laboratory, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Key Laboratory for Biomedical Engineering of Education Ministry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 3. College of Biomedical Engineering & Instrument Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 4. Moe Frontier Science Center for Brain Science and Brain-machine Integration, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 5. Binjiang Institute of Zhejiang University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: The TAS2Rs in extra-oral tissues may become a potential therapeutic target in the treatment of related diseases. In this study, cells expressing of TAS2Rs are used as sensitive elements. According to their physiological characteristics and coupling with different sensors, the heterotopic expression of taste receptors and their application in personalized drug screening are explored. The personalized drug screening platform for different disease models is established. Firstly, based on the electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) and the endogenous T2R38 receptor expressing Caco2 cells, a drug screening platform for isothiocyanates is developed. The EC50 of phenylthiourea is calculated as 157.6 μM . Secondly, combined with the microelectrode array (MEA) detection system, the inhibitory effects of diphenidol (5~160 μM) and salicin (0.001~100 μM) on the contraction of cardiomyocytes are investigated. Furthermore, based on three-dimensional airway smooth muscle cells (ASMCs) array and the gel imaging system, the diastolic effect of tangeretin (20 μM) on airway smooth muscle cells is explored.

Keywords: cell-based biosensor; bitter taste receptors; Caco2 cells; cardiomyocytes; airway smooth muscle cells; personalized drug screening

收稿日期: 2021-04-13 Received Date: 2021-04-13

* 基金项目: 浙江省自然科学基金(LBY21H180001)、国家自然科学基金委政府间国际合作项目(31661143030)资助

0 引言

近年来,苦味受体(bitter taste receptors, TAS2Rs)在非味觉组织中的分布和生理功能研究取得了重大进展。TAS2Rs不仅在口腔中表达,在呼吸道、消化道、心脏、大脑甚至睾丸等组织都有表达^[1-2],其作用也不仅仅局限于感知苦味,研究显示 TAS2Rs 可能成为相关疾病治疗的新靶点。在胃肠道中,TAS2Rs 参与了摄入苦味化合物时的保护性应答,并且被认为是治疗胃肠动力障碍的新的药理靶点^[3-4];在上呼吸道中,气道上皮细胞的活动纤毛表达 TAS2Rs,苦味化合物会增加纤毛的搏动频率,这是气道防御机制的一部分^[5];鼻窦上皮细胞中 TAS2Rs 的激活会刺激一氧化氮生成的增加,进而增加粘膜纤毛清除率并直接杀死细菌^[6];在下呼吸道,TAS2Rs 受体激活诱导气管及支气管平滑肌细胞舒张,显示出 TAS2Rs 治疗哮喘的潜力^[7-8];研究还表明,TAS2Rs 介导了膀胱^[9]、血管^[10]、子宫^[11]等其他器官平滑肌的松弛,有希望作为新的筛选靶点从而发现用于肌肉松弛疗法以治疗疾病的新药物^[12-13];此外,在心脏中表达的 TAS2Rs 可能与心脏中的新陈代谢以及心脏收缩具有生理相关性^[14];在甲状腺中表达的 TAS2Rs 可能是调节甲状腺活动和治疗甲状腺功能减退或甲状腺功能亢进症的新药物靶点^[15];另外,有文献报道几种 TAS2Rs 在大鼠脑干、小脑、皮质和伏隔核中的表达,除了参与有意识的味觉感受外还可能具有其他生理作用^[16]。因此,TAS2Rs 可能成为相关疾病治疗的新靶点。

生物传感器是指配有生物敏感元件的传感器^[17],敏感元件与目标物质结合产生特异性响应,微纳传感器作为二级换能器将响应信号转换为电信号^[18-20]。本文将源于胃肠道、呼吸道、心脏中的细胞系和原代培养细胞作为敏感元件,根据其生理特性不同,与阻抗传感器、电位传感器、凝胶成像系统耦合,构建了不同疾病模型的药物筛选平台,探究了口腔外组织细胞中苦味受体的功能及其应用。

1 理论分析

1.1 基于结肠癌细胞与阻抗传感器的生物电子舌

2005年诺贝尔奖获得者马歇尔教授,发现了幽门螺旋杆菌,并证明了幽门螺旋杆菌是造成大多数胃溃疡和胃炎的原因。幽门螺旋杆菌,是一种消化道细菌,并被世界卫生组织定为一种致癌物质^[21]。研究发现,西兰花、芥蓝、北方圆红萝卜等十字花科植物中含有一种叫做异硫氰酸酯的物质,这种物质对幽门螺旋杆菌的抑制作用非常强^[22],甚至有医生给它“最强天然抗生素”的称号。而结

构特异性苦味受体 TAS2R38 的激动剂大部分为异硫氰酸酯类物质,是具有通式 $R-N-C=S$ 的一类化合物^[23]。

而根据文献报道,Caco2 结肠癌细胞内源性表达 TAS2R38 苦味受体和完整的典型味觉信号通路,可用于研究苦味物质对受体激活的响应。该受体调节口腔和胃肠道中摄取的营养或有毒化合物的苦味感知^[24]。此外,Caco2 细胞表达有紧密连接蛋白、微绒毛以及与小肠上皮细胞类似的酶和转运体,具有自发分化成单层细胞的能力以及良好的贴壁和汇合性能,适合作为细胞阻抗传感器(electric cell-substrate impedance sensing, ECIS)的敏感元件。因此,我们开发了一种生物电子舌,利用 Caco2 细胞和 ECIS 来特异性检测 TAS2R38 激动剂如图 1 所示。一旦受体被激活,细胞内就会发生一系列的级联反应,导致细胞形态改变,如膜褶皱等,这些变化可以通过细胞阻抗传感来检测。由于异硫氰酸盐已显示出抑菌、抗癌的化学特性,因此所构建的生物电子舌对异硫氰酸酯类物质的特异性筛选潜力巨大,可用于幽门螺杆菌感染引起的胃炎、胃溃疡治疗。

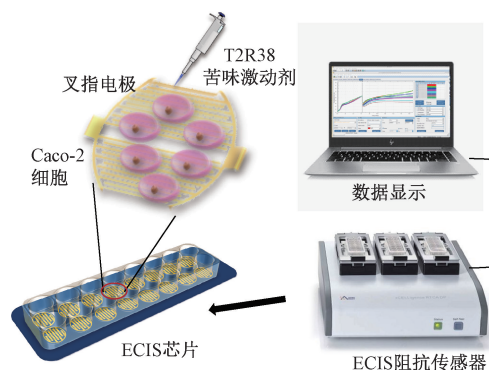


图1 基于Caco2细胞与ECIS传感器构建生物电子舌

Fig. 1 The established bioelectronic tongue based on the Caco2 cells and the ECIS sensor

1.2 基于心肌细胞与微电极阵列的传感器的构建

据文献报道,啮齿类动物的心脏表达有鲜味受体和7种苦味受体(TAS2R108/120/121/126/135/137/143)以及它们的下游信号传导因子(GNAT3, PLC β 2, TRPM5)^[25]。研究发现 TAS2Rs 激动剂在灌注小鼠心脏中产生了重要的负性肌力影响^[26]。苦味激动剂能够激活心肌细胞上的 TAS2Rs,诱导局部 Ca^{2+} 响应,继而激活瞬时受体电位阳离子通道,引起 Na^{+} 内流,使细胞膜去极化。其中, Ca^{2+} 参与心肌细胞的兴奋收缩偶联, Na^{+} 与动作电位的幅值有关。

由于心肌细胞自发产生动作电位时,产生瞬时跨膜电位和离子电流,引起电极电位的变化,采用微电极阵列(microelectrode array, MEA)芯片能检测心肌细胞的生物电活动,具有长期、无损等优势。因此,我们选择利用大

鼠乳鼠原代心肌细胞为敏感元件,并结合 MEA 细胞电位传感器,构建了一种基于心肌细胞的生物电子舌如图 2 所示。心肌细胞在 MEA 芯片表面,形成了用于电位传导的细胞网络。通过 MEA 传感器可采集并记录心肌细胞在施加不同的药物刺激后所产生的电位信号。并且为了提升信号的信噪比,可通过在 MEA 芯片电极表面电镀铂黑,以增加电极比表面积,降低电极阻抗,或者在 MEA 芯片表面涂覆具有良好生物相容性的 Cell-Tak 等细胞和组织粘合剂,通过增强 MEA 芯片与细胞的耦合度来实现^[27]。

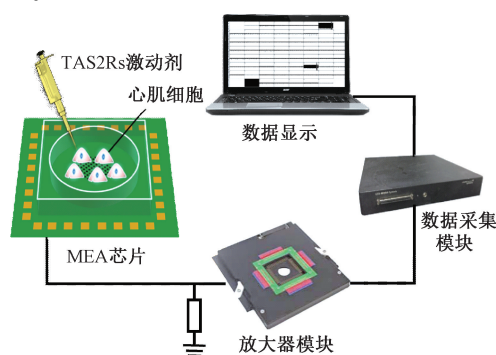


图 2 基于心肌细胞与 MEA 传感器构建生物电子舌

Fig. 2 The established bioelectronic tongue based on cardiomyocytes and microelectrode array

1.3 三维呼吸道平滑肌细胞凝胶阵列成像系统

气道高反应性是哮喘的主要特征之一,被认为是气道过度狭窄的主要因素,导致呼吸困难和呼吸短促。普遍认为气道高反应性是由气道平滑肌细胞(ASMCs)的收缩决定,ASMCs 是主要效力细胞。而研究表明 TAS2Rs 在气道平滑肌细胞(ASMCs)中表达,其中,表达量最高的两种亚型是 TAS2R10 与 TAS2R14 受体,TAS2Rs 激活诱导的局部 Ca^{2+} 响应将激活大电导钙激活钾通道(large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels, BKCa),导致细胞膜超极化,从而介导气道平滑肌细胞舒张,这表明了 TAS2Rs 激动剂治疗哮喘的潜力^[28]。

基于细胞三维立体培养的凝胶收缩、舒张法能有效检测 ASMCs 收缩、舒张反应,平滑肌细胞的收缩、舒张会通过作用于胶原纤维网支架使其发生重排或改构,引起胶原凝胶面积的变化^[29]。因此,我们构建了三维凝胶阵列成像系统,来探究中药中的苦味激动剂对平滑肌的舒张作用,以寻求潜在的抗哮喘苦味中药。加入药物刺激后,用显微镜在不同时刻记录胶原凝胶的形态变化。然后利用 Image J 分析软件计算各时间点的凝胶面积。并且计算细胞收缩效率进行统计学分析。其中,收缩率可以表示为(起始胶原凝胶面积-各时间点胶原凝胶面积)/起始凝胶面积 $\times 100\%$ 。

2 系统与方法

2.1 试剂与仪器

超净工作台,二氧化碳恒温培养箱,恒温水浴锅,离心机,体式显微镜,激光共聚焦显微镜(FV-3000,奥林巴斯),ECIS 阻抗传感器,MEA 微电极阵列。0.25% 胰蛋白酶,MEM (minimum eagle's medium) 培养基,低糖 DMEM (dulbecco's modified eagle medium) 培养基,高糖 DMEM 培养基,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),青-链霉素,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),PBS 缓冲液,Hank's 平衡盐溶液(hanks' balanced salt solution, HBSS),75% 乙醇,95% 乙醇,酒精灯,牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA),钙黄绿素-AM(calcein-AM),碘化丙啉(propidium iodide, PI),Fluo4-AM,Pluronic F-127,T25 培养瓶,96 孔板,2.5 mL 注射器,维纳斯镊子,维纳斯剪。

2.2 原代细胞提取与培养

1) 心肌细胞

本研究所用的心肌细胞来源于大鼠乳鼠,其提取和分离的实验步骤参考了我们之前的工作^[30]。选取新生 SD 大鼠(sprague dawley,购于浙江省医学科学院),酒精消毒后,取心脏心尖部位,并去除心房和血管等组织。转移心肌组织于平衡盐溶液(HBSS)中,剪成约 1 mm^3 碎片,弃上清,用胰蛋白酶(0.07%)/II 型胶原酶(0.05%)混合物酶解组织片段 10~12 次,直至心肌组织块呈现疏松状态。然后向残余心肌组织块中加入含 10% 胎牛血清的高糖培养基,收集细胞悬液。以 800 r/min 的速度离心 5 min 后,重悬细胞,过 $70\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛,收集细胞悬液于 T25 培养瓶中。经 45 min 差速贴壁 2 次后,获得纯化的心肌细胞。将悬液配置成合适的细胞密度,并将心肌细胞以 1.2×10^5 个/ cm^2 的密度接种到 MEA 上,在 37°C 和 5% CO_2 细胞培养箱中培养。心肌细胞在 3~5 天内成熟,可用于电生理信号记录。培养基每 24 小时更换一次。所有方案均符合浙江大学机构动物保护与使用委员会(IACUC)的规定。

2) 呼吸道平滑肌细胞

本研究所用的呼吸道平滑肌细胞来源于 Balb/C 小鼠(购于浙江省医学科学院),5 只 4~5 周龄小鼠麻醉后断颈处死,放入 75% 乙醇中灭菌 2 min,迅速分离气管以及肺组织,置于含 1% 青霉素-链霉素的 HBSS 缓冲液中。去除肺组织、脂肪和残存的结缔组织,将气管用分散酶(Dispase II, 2 mg/mL)浸泡 45 min 后,剥离气管内外膜。然后将气管段剪成 1 mm^3 大小的组织块,加入消化液(5 mL HBSS+ 31 mg I 型胶原酶+ 2 mg 木瓜蛋白酶+

10 mg 牛血清白蛋白+0.7 mg 二硫苏糖醇)消化 25 min,至组织块松软、边缘发毛,然后加入培养液(80% 低糖 DMEM +20% 胎牛血清+1% 青霉素-链霉素)终止消化。吹打分散组织碎片团,使用 70 μm 微孔滤膜过滤,以 1 000 r/min 的速度离心 5 min 后倒掉上清液。加入培养液吹打分散细胞,接种在 T25 培养瓶中,待细胞达到 80% 融合后进行细胞传代以及细胞纯化。向培养瓶中加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶,静置 1~2 min 后,加入 1 mL 培养液终止消化。离心后,加入 1 mL 培养液重悬,1:1 传入一新的培养瓶中。30~60 min 后,小心的吸出上层细胞悬液(此液中含有未贴壁的气管平滑肌细胞),转入另一新的培养瓶中。即可得到较纯的平滑肌细胞,该细胞可传 8 代左右使用。

2.3 ECIS 阻抗传感器系统

细胞阻抗传感器(ECIS)最早由 Giaever 等^[31]提出,用于实时连续、无损检测贴壁细胞的生长增殖、粘附能力、形态等参数^[32],并且为评估受体功能以及药物筛选提供了一种方便、灵敏和定量的方法。

本研究所用的 ECIS 最多可加载 3 个 16 通道的阻抗芯片,其核心结构是叉指电极(interdigital electrode, IDE),阻抗检测的灵敏度与整体尺寸以及单根叉指电极的宽度相关。当芯片表面无细胞贴附时,相邻叉指电极不直接连通,通过培养腔内液体形成回路,主要包括检测腔中培养基的电阻和 Helmholtz 双层界面电容。细胞贴附在传感器表面后,会阻碍离子电流的传播从而增加叉指电极之间的阻抗,在原电路的基础上串联了细胞本身的阻抗(R_{cell})和容抗(C_{cell})之外,还有细胞与电极之间间隙的阻抗(R_{gap})和容抗(C_{gap})。电极表面贴附的细胞越多,电极间的阻抗就越大。同时,细胞与电极贴附状态的改变以及细胞本身形态的变化也会引起阻抗的变化。

细胞指数(cell index, CI)使用阻抗值定量的描述细胞状态,其计算方法如式(1)所示:

$$CI = \frac{Z_{\text{cell}}(f_i)}{Z_{\text{baseline}}(f_i)} - 1 \quad (1)$$

式中: f_i 为阻抗检测的扫描电压频率,Hz; $Z_{\text{cell}}(f_i)$ 和 $Z_{\text{baseline}}(f_i)$ 分别为有无细胞时的频率依赖性电极阻抗, Ω 。

数据采集时,在 ECIS 的交错电极(IDEs)上施加一个振幅为 20 mV,频率为 10 kHz 的正弦电压。数据分析前,根据味觉刺激前的 CI 值进行归一化。

2.4 MEA 传感器系统

微电极阵列(microelectrode array, MEA),是由 Thomas 于 1972 年提出的^[33],用于无损记录体外培养细胞/组织的胞外动作电位、研究外界刺激对细胞离子通道的影响的方法,具有高通量、高灵敏度检测等优势。

MEA 芯片的基本结构包括绝缘层、金属电极层和钝化层,所有电极均采用紫外光刻、金属沉积和剥离工艺制备。芯片上电极点 8×8 阵列排布,电极直径为 30 μm ,电极间距为 200 μm 。当心肌细胞自发产生动作电位时,会产生瞬时跨膜电位和离子电流,通过重建电极-电解质-细胞界面的电荷分布使电极极化,引起电极电位的变化。多电极通道被布线并连接到用于信号放大^[34]、滤波^[35]、数据处理和分析的外部模块。细胞电位信号由电极记录,后经放大器处理,再由数据采集卡传输至 PC 机进行显示和分析。此外,还有一个温度控制模块,帮助控制检测模块的温度。

2.5 凝胶成像系统

本研究中,我们利用 I 型鼠尾胶原蛋白构建了三维呼吸道平滑肌细胞(3D ASMCs)凝胶阵列。在使用 0.25% 胰酶消化 ASMCs 后,将单细胞悬液调整至 $1.2 \times 10^6/\text{mL}$,提前冷却。同时,取 100 μL 10X PBS, 560 μL 鼠尾胶原蛋白 I 型(3.57 mg/mL,溶于 0.02 mol/L 的醋酸)和 13 μL 1 N NaOH 在冰盒中预冷。首先将 100 μL PBS 加入到 13 μL NaOH 中,混合均匀。然后加入 560 μL 的胶原蛋白,立即混合。最后加入 327 μL 的细胞悬液混合,形成 ASMCs-胶原混合物。96 孔板每孔加入 100 μL ASMCs-胶原混合液,最终胶原蛋白浓度为 2 mg/mL,细胞浓度约为 $4 \times 10^5/\text{mL}$ 。96 孔板置于 37℃ 培养箱中孵育 1 h,然后每孔加入 100 μL ASM 培养基,继续在培养箱中培养。培养 24 h 后更换培养基,用注射器针头将胶原凝胶从 96 孔板孔壁上轻轻分离。

3 结果与讨论

3.1 异硫氰酸酯类物质的高特异性筛选

我们首先用已知的 TAS2R38 的配体苯硫脲(phenylthiourea, PTC)^[36],探究了所构建的基于 Caco2 结肠癌细胞和 ECIS 的生物电子舌的灵敏度。阻抗响应峰面积(area under curve, AUC)可以定量的表示 1 μM ~1 mM PTC 刺激下阻抗响应的强度^[37]。如图 3(a)所示,AUC 的响应与 PTC 的刺激浓度呈正相关。采用非线性回归分析方法计算了 PTC 的 EC_{50} 为 157.6 μM 。此外,阻抗响应可以被 TAS2R38 受体拮抗剂丙磺舒以及苦味信号传导通路中 PLC β 2 抑制剂 U73 122 所抑制,如图 3(b)所示,这说明了阻抗传感器的苦味响应确实由 TAS2R38 受体的激活引起。

接下来,我们将该系统应用于异硫氰酸酯类物质的高特异性筛选。目前,已知的 TAS2R38 配体有 21 个,且大多为异硫氰酸盐^[38]。结合化学信息学,利用三维药效团模型对 FooDB 数据库的部分化合物进行评估^[37],筛选

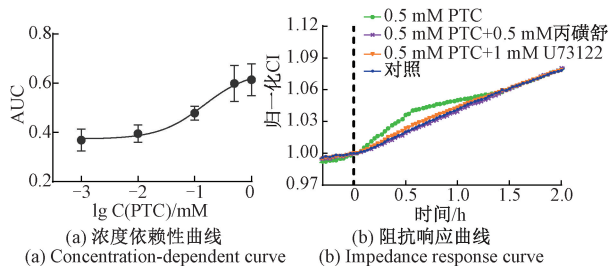


图 3 生物电子舌定量检测 PTC 的结果

Fig. 3 The result of quantitative detection of PTC by the bioelectronic tongue

出芸苔宁、萝卜硫素两种 TAS2R38 激动剂的预测物。首先使用 Fluo 4-AM 钙离子荧光探针进行了钙成像测试,结果表明,芸苔宁(20 μM)、萝卜硫素(20 μM) 均能激活 Caco2 细胞膜上的苦味受体 TAS2R38,引发明显的钙响应,如图 4(a)、(b),图 5(a)、(b) 所示。其次,阻抗实验结果表明,与对照组(20 μM 刺激物+1 mM 丙磺舒)相比,芸苔宁能引发阻抗响应,且在 1~80 μM 浓度范围内具有明显的浓度依赖特性如图 4(c) 所示;萝卜硫素在 1~30 μM 浓度范围内所引发的阻抗响应随浓度升高而增大,但浓度高于 40 μM 时,会引起明显的阻抗值降低,如图 5(c) 所示,这可能与萝卜硫素在较高浓度时具有抗癌作用,对 Caco2 结肠癌细胞具有细胞毒性、降低细胞活力有关^[39]。

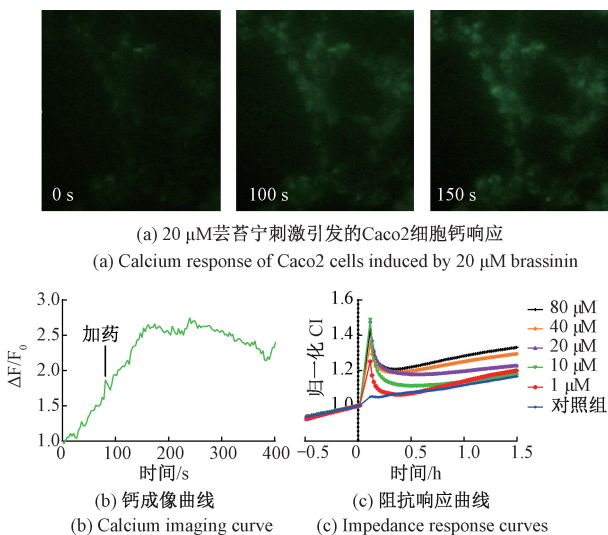


图 4 芸苔宁刺激结果

Fig. 4 Results of the stimulation of brassinin

虽然两种物质引起的阻抗响应曲线在形状上存在差异,但皆能诱导 CI 响应峰,并且可以被丙磺舒明显抑制,表明这两种物质都能有效激活 TAS2R38 受体。因此,我们认为芸苔宁、萝卜硫素是人类苦味受体 TAS2R38 的激动剂,对于抑制幽门螺杆菌具有较大的潜力。这也揭示了胃肠道苦味受体在胃炎、胃溃疡治疗中的潜在应用。

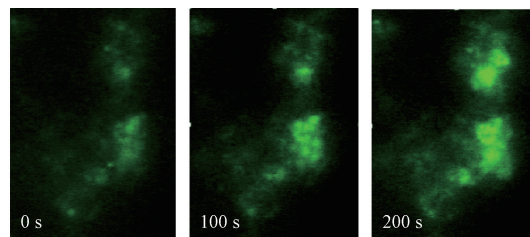
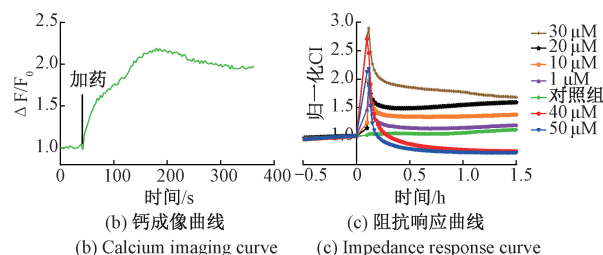
(a) 20 μM 萝卜硫素刺激引发的 Caco2 细胞钙响应(a) Calcium response of Caco2 cells induced by 20 μM sulforaphane

图 5 萝卜硫素刺激结果图

Fig. 5 The stimulation results of sulforaphane

3.2 TAS2Rs 激动剂抑制心肌细胞的收缩

为了验证基于心肌细胞与 MEA 的生物电子舌的特异性,我们选取了 5 种典型的味觉物质,包括酸(盐酸),甜(蔗糖),苦(苯甲地那铵),咸(氯化钠),鲜(谷氨酸钠),以 100 μM 的浓度分别作用于心肌细胞,并检测心肌细胞电兴奋响应。不同的味觉物质作用于心肌细胞后的典型电信号如图 6 所示,可以看到,该生物电子舌只对苦味与鲜味产生响应。苦味物质刺激下,心肌细胞的动作电位发放模式发生了改变,并且幅值明显降低。接下来我们重点探讨对苦味物质的响应。

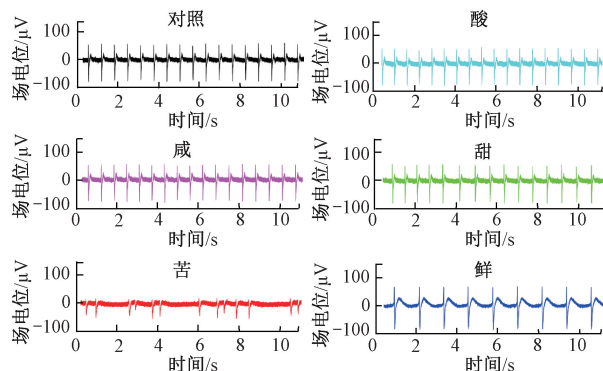
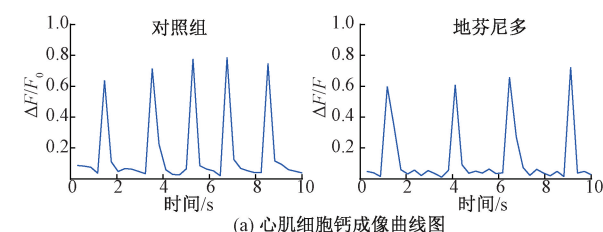


图 6 心肌细胞在 5 种味觉物质刺激下的电位信号

Fig. 6 Potential signal of cardiomyocytes stimulated by five taste substances

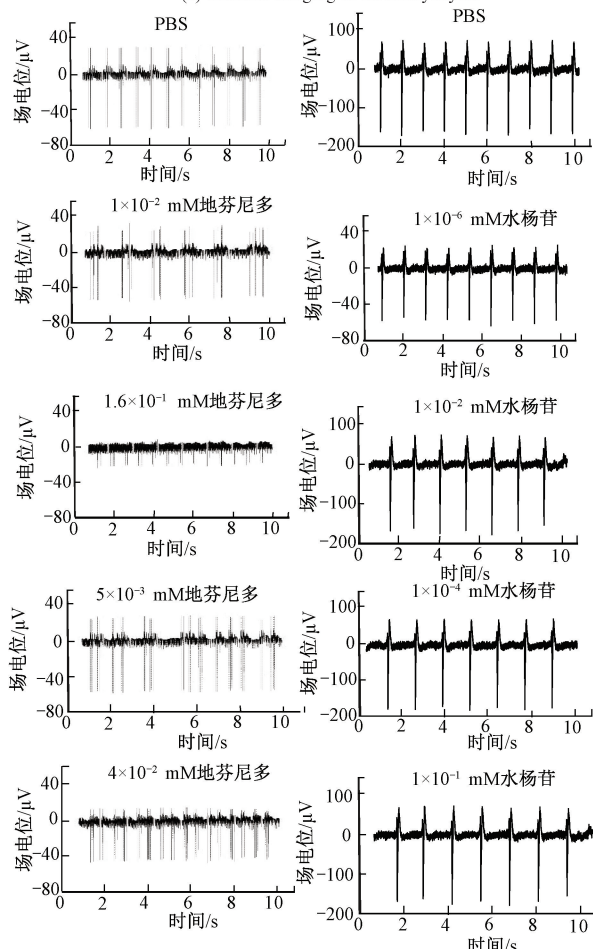
选取了能够激活心肌细胞上苦味受体 TAS2R108、TAS2R137 的苦味物质地芬尼多和激活 TAS2R126 的水杨苷。利用共聚焦显微镜,首先探究了 TAS2Rs 的激活对心肌细胞钙火花释放频率的影响。如图 7(a) 所示,

100 μM 地芬尼多抑制了心肌细胞收缩的频率,这可能是由于 TAS2Rs 激动剂减弱 L 型 Ca^{2+} 通道以及随后释放的 Ca^{2+} 所导致的^[40]。



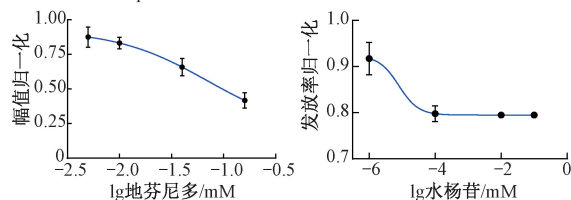
(a) 心肌细胞钙成像曲线图

(a) Calcium imaging of cardiomyocytes



(b) 不同浓度地芬尼多、水杨苷刺激下心肌细胞电位信号

(b) Potential signals of cardiomyocytes stimulated by diphenhydramine and salicin at different concentrations



(c) 电位信号发放幅值与频率统计图

(c) Statistical graph of amplitude and frequency of potential signal

图7 地芬尼多、水杨苷对心肌细胞收缩的影响

Fig. 7 Effect of diphenhydramine and salicin on cardiomyocytes contraction

同时,我们利用 MEA 传感器对不同浓度地芬尼多和水杨苷作用于心肌细胞的响应进行了电生理检测。其胞外电信号如图 7(b) 所示,图 7(c) 为信号发放幅值和频率的统计图,可以看出,地芬尼多作用于心肌细胞后,细胞电位信号呈现簇状发放,并以浓度依赖性方式抑制了心肌细胞收缩的幅度;而水杨苷的作用抑制了心肌细胞收缩的频率。心肌细胞的收缩决定心脏的泵功能,但过快的收缩会导致室性心动过速。而我们的研究表明,TAS2Rs 激动剂可能对心肌细胞的收缩具有抑制作用,这可能有助于开发治疗室性心动过速的药剂工具。

3.3 TAS2Rs 激动剂诱导 3D ASMCs 凝胶舒张

相比于二维细胞培养,三维 ASMCs 培养模型可以使细胞聚集生长,有利于细胞间的紧密连接及其信息交换。本研究中,用于 3D ASMCs 构建的鼠尾胶原蛋白在结构和抗原性上与人体组织 I 型胶原基本一致,ASMCs 凝胶 Live/Dead 染色的结果表明,ASMCs 在鼠尾胶原蛋白中可以较长时间保持活性如图 8 所示,因此我们成功构建了三维 ASMCs 凝胶球阵列。

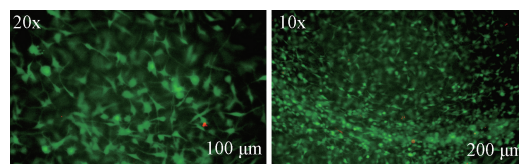
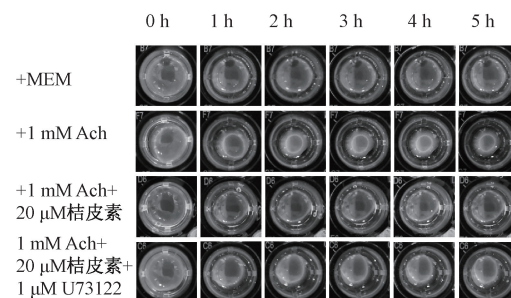


图8 三维 ASMCs 凝胶 Live/Dead 染色

Fig. 8 3D ASMCs gel Live/Dead staining

在研究中,乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 被用作诱导 3D ASMCs 收缩的刺激物,同时加入 TAS2Rs 激动剂桔皮素,然后分别于 0, 1, 2, 3, 4, 5 h 用显微镜记录胶原凝胶在细胞收缩力作用下的形态变化。结果表明,1 mM Ach 刺激下凝胶面积显著降低,然而凝胶收缩在 20 μM 桔皮素作用下得到了有效抑制。对照组在添加桔皮素刺激的同时,添加了 PLC β 信号通路抑制剂 U73122 以阻断 TAS2Rs 受体激活信号通路,ASMCs 收缩则没有被有效抑制,如图 9 所示。



(a) 0~5 h, 3D ASMCs 凝胶面积记录

(a) 3D ASMCs gel area recording at 0~5 h

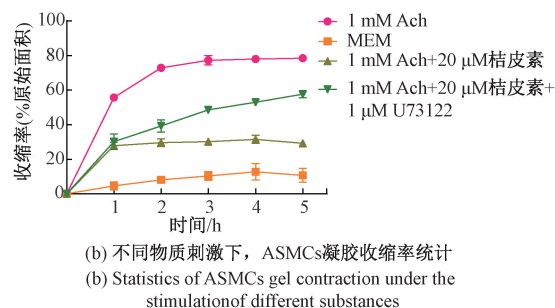


图 9 桔皮素抑制 Ach 诱导的三维 ASMcs 凝胶收缩

Fig. 9 Tangeretin inhibited Ach-induced 3D ASMcs gel contraction

这说明桔皮素具有较强的诱导平滑肌细胞放松的特性,并且是通过苦味受体激活所引起的。同时也验证了所构建的 3D ASMcs 阵列作为抗哮喘药物筛选的可行性。

4 结 论

本文将 3 种表达有苦味受体的细胞与不同的传感检测系统结合,实现了针对不同疾病模型的个性化药物筛选。结果表明,基于胃肠道 Caco2 细胞与 ECIS 阻抗传感器的生物电子舌能够特异性检测异硫氰酸酯类物质,实现了抗幽门螺杆菌药物的筛选,对于胃炎、胃溃疡等胃肠道疾病的治疗具有重要的应用价值。基于乳鼠心肌细胞与 MEA 微电极阵列的生物电子舌,显示 TAS2Rs 激动剂能有效的抑制心肌细胞的收缩,这对于治疗室性心动过速药物的开发提供了新思路。基于呼吸道平滑肌细胞的三维培养阵列,结合凝胶成像系统,以更接近于细胞生长微环境的培养模式,将 TAS2Rs 作为治疗哮喘的药物靶点,实现了抗哮喘药物的有效筛选。因此,在现代药物开发流程中,基于味觉受体的药物筛选有望解决药物靶点单一、受体脱敏等问题,成为发现新药的新途径,本研究所设计的基于苦味受体表达的多组织细胞传感器具有高通量、无创和灵敏等优势。目前,已取得初步的实验结果,但还需要进一步的深入与探讨,如针对更多药物的检测筛选,探究药物作用的具体机制等。本研究对于探索口腔外 TAS2Rs 的功能及其应用提供了一个平台,未来有望应用于大规模的药物筛选与疾病治疗。

参考文献

[1] LUO X, CHEN Z, XUE J, et al. Infection by the parasitic helminth trichinella spiralis activates a Tas2r-mediated signaling pathway in intestinal tuft cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116(12): 5564-5569.

[2] D'URSO O, DRAGO F. Pharmacological significance of

extra-oral taste receptors [J]. European Journal of Pharmacology, 2021, 910: 174480.

- [3] WU S V, ROZENGURT N, YANG M, et al. Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(4): 2392-2397.
- [4] PRANDI S, VOIGT A, MEYERHOF W, et al. Expression profiling of Tas2r genes reveals a complex pattern along the mouse GI tract and the presence of Tas2r131 in a subset of intestinal paneth cells [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2018, 75(1): 49-65.
- [5] CAREY R M, LEE R J, COHEN N A. Taste receptors in upper airway immunity [J]. Advances in oto-rhino-laryngology, 2016, 79: 91-102.
- [6] CAREY R M, LEE R J. Taste receptors in upper airway innate immunity [J]. Nutrients, 2019, 11(9): 2017.
- [7] QIN C, YUAN Q, ZHANG S, et al. Biomimetic in vitro respiratory system using smooth muscle cells on ECIS chips for anti-asthma TCMS screening [J]. Analytica Chimica Acta, 2021, 1162: 338452.
- [8] KIM D, CHO S, CASTAÑO M A, et al. Biased TAS2R bronchodilators inhibit airway smooth muscle growth by downregulating phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 [J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2019, 60(5): 532-540.
- [9] ZHAI K, YANG Z, ZHU X, et al. Activation of bitter taste receptors (tas2rs) relaxes detrusor smooth muscle and suppresses overactive bladder symptoms [J]. Oncotarget, 2016, 7(16): 21156-21167.
- [10] MANSON M L, SÄFHOLM J, AL-AMERI M, et al. Bitter taste receptor agonists mediate relaxation of human and rodent vascular smooth muscle [J]. European Journal of Pharmacology, 2014, 740: 302-311.
- [11] ZHENG K, LU P, DELPAPA E, et al. Bitter taste receptors as targets for tocolytics in preterm labor therapy [J]. The FASEB Journal, 2017, 31(9): 4037-4052.
- [12] LUO M, NI K, JIN Y, et al. Toward the identification of extra-oral TAS2R agonists as drug agents for muscle relaxation therapies via bioinformatics-aided screening of bitter compounds in traditional chinese medicine [J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10:861.

- [13] JERUZAL-WIATECKA J, FENDLER W, PIETRUSZEWSKA W. Clinical role of extraoral bitter taste receptors [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(14): 5156.
- [14] BLOXHAM C J, FOSTER S R, THOMAS W G. A bitter taste in your heart [J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11:431.
- [15] CLARK A A, DOTSON C D, ELSON A E T, et al. TAS2R bitter taste receptors regulate thyroid function [J]. *The FASEB Journal*, 2014, 29 (1): 164-172.
- [16] SINGH N, VRONTAKIS M, PARKINSON F, et al. Functional bitter taste receptors are expressed in brain cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 406(1): 146-151.
- [17] SKLÁDAL P. Smart bioelectronic tongues for food and drinks control [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2020, 127: 115887.
- [18] 孙圣和. 现代传感器发展方向(续) [J]. *电子测量与仪器学报*, 2009, 23(2): 1-9.
SUN SH H. Development trend of modern sensor [J]. *Journal of Electronic Measurement and Instrumentation*, 2009, 23(2): 1-9.
- [19] 邹绍芳,范影乐,王平. 基于微电极阵列的自动环境监测电子舌的设计 [J]. *仪器仪表学报*, 2007(9): 1641-1645.
ZOU SH F, FAN Y L, WANG P. Design of MEA-based electronic tongue for automatic environmental monitoring [J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2007(9): 1641-1645.
- [20] LI H, GU S, ZHANG Q, et al. Recent advances in biofluid detection with micro/nanostructured bioelectronic devices [J]. *Nanoscale*, 2021, 13(6): 3436-3453.
- [21] YE W, HELD M, LAGERGREN J, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric atrophy: Risk of adenocarcinoma and squamous-cell carcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2004, 96(5): 388-396.
- [22] CHOI J, LEE J, CHOI I J, et al. Genetic variation in the TAS2R38 bitter taste receptor and gastric cancer risk in koreans [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 1-8.
- [23] TAHA M A, HALL C A, SHORTESS C J, et al. Treatment protocol for COVID-19 based on T2R phenotype [J]. *Viruses*, 2021, 13(3): 503.
- [24] CHOI J, LEE J, CHOI I J, et al. Genetic variation in the TAS2R38 bitter taste receptor and gastric cancer risk in koreans [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 26904.
- [25] FOSTER S R, PORRELLO E R, PURDUE B, et al. Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64579.
- [26] FOSTER S R, BLANK K, HOE L E S, et al. Bitter taste receptor agonists elicit G-protein-dependent negative inotropy in the murine heart [J]. *The FASEB Journal*, 2014, 28(10): 4497-4508.
- [27] ZHUANG L, WEI X, JIANG N, et al. A biohybrid nose for evaluation of odor masking in the peripheral olfactory system [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 171: 112737.
- [28] DESHPANDE D A, WANG W C H, MCILMOYLE E L, et al. Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction [J]. *Nature Medicine*, 2010, 16 (11): 1299-1304.
- [29] MATSUMOTO H, MOIR L M, OLIVER B G G, et al. Comparison of gel contraction mediated by airway smooth muscle cells from patients with and without asthma [J]. *Thorax*, 2007, 62(10): 848-854.
- [30] 魏鑫伟,高庆,苏凯麒,等. 结合组织工程支架的三维心肌细胞传感器 [J]. *浙江大学学报(工学版)*, 2018, 52(7): 1415-1422.
WEI X W, GAO Q, SU K Q, et al. Three-dimensional cardiomyocyte-based biosensor with tissue engineering scaffold [J]. *Journal of Zhejiang University (Engineering Science)*, 2018, 52(7): 1415-1422.
- [31] GIAEVER I, KEESE C R. Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, 81(12): 3761-3764.
- [32] YU N, ATIENZA J M, BERNARD J, et al. Real-time monitoring of morphological changes in living cells by electronic cell sensor arrays: An approach to study G protein-coupled receptors [J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(1): 35-43.
- [33] THOMAS J C A, SPRINGER P A, LOEB G E, et al. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells [J]. *Experimental cell research*, 1972, 74(1): 61-66.
- [34] 孟丽霞,于林丽,濮钰麒,等. 微小信号放大电路设计 [J]. *仪器仪表学报*, 2006(S1): 1012-1013.
MENG L X, YU L L, PU Y Q, et al. Design of a mplifying circuit for tiny signal [J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2006(S1): 1012-1013.

- [35] 刘春, 谢皓, 肖奕霖, 等. EWT 算法在 ECG 信号滤波中的研究[J]. 电子测量与仪器学报, 2017, 31(11): 1835-1842.
- LIU CH, XIE H, XIAO Y L, et al. Research on empirical wavelet transform algorithm in ECG signal filtering [J]. Journal of Electronic Measurement and Instrumentation, 2017, 31(11): 1835-1842.
- [36] BUFE B, BRESLIN P A S, KUHN C, et al. The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception [J]. Current Biology, 2005, 15(4): 322-327.
- [37] QIN C, QIN Z, ZHAO D, et al. A bioinspired in vitro bioelectronic tongue with human T2R38 receptor for high-specificity detection of N-C=S-containing compounds[J]. Talanta, 2019, 199: 131-139.
- [38] DAGAN-WIENER A, DI PIZIO A, NISSIM I, et al. BitterDB: Taste ligands and receptors database in 2019[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D1179-D1185.
- [39] TRAKA M, GASPER A V, SMITH J A, et al. Transcriptome analysis of human colon Caco-2 cells exposed to sulforaphane[J]. J Nutr, 2005, 135(8): 1865-1872.
- [40] BLOXHAM C J, FOSTER S R, THOMAS W G. A bitter taste in your heart[J]. Frontiers in Physiology, 2020, 11:431.

作者简介



E-mail: 21715013@zju.edu.cn

Qin Chunlian received her B.Sc. degree from Hangzhou Dianzi University in 2017. She is currently a Ph.D. candidate at Zhejiang University. Her main research interests include cell biosensors, bioelectronic tongues and their applications in biomedicine and environmental detection.



E-mail: cnpwang@zju.edu.cn

Wang Ping (Corresponding author) received his B.Sc., M.Sc. and Ph.D. degrees all from Harbin Institute of Technology in 1984, 1987, and 1992, respectively. He was a postdoctoral fellow at Zhejiang University. He is currently a professor in the College of Biomedical Engineering and Instrument Science at Zhejiang University. His main research interests include sensor and detection technology, biochip and bioelectronics, artificial olfaction and gustation.

秦春莲, 2017 年于杭州电子科技大学获得学士学位, 现为浙江大学博士研究生, 主要研究方向为细胞生物传感器、生物电子舌及其在生物医学以及环境检测领域中的应用。

王平(通信作者), 分别在 1984、1987 和 1992 年于哈尔滨工业大学获得学士、硕士和博士学位, 浙江大学博士后。现为浙江大学生物医学工程与仪器科学学院教授, 主要研究方向为传感器与检测仪器、生物芯片与生物电子学、人工嗅觉与人工味觉。