

循环肿瘤细胞富集和检测的纳米技术*

白林灵 杨延莲** 王琛**

(国家纳米科学中心, 北京 100190)

摘要 循环肿瘤细胞(CTC)是肿瘤转移过程中在血液循环系统中存活的肿瘤细胞, 该细胞的生成被认为是肿瘤发生转移的必要前提. CTC的存在与否及数量多少是肿瘤预后判断、疗效监控和肿瘤转移评估的一个重要检测指标. 近年来, 纳米材料、纳米结构表面以及可操控微量液体的微流控技术广泛应用于 CTC 的富集和检测, 本文对 CTC 富集、检测纳米技术的最新进展进行综述, 希望能够为肿瘤的诊断和治疗提供帮助.

关键词 循环肿瘤细胞(CTC), 纳米材料, 纳米结构, 微流控技术, 富集, 检测

学科分类号 O647

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00288

恶性肿瘤是我国死亡率最高的重大疾病之一, 90%以上肿瘤患者的死亡都是由于肿瘤转移所致. 侵袭与转移是恶性肿瘤最显著的特征之一, 肿瘤细胞自发或因诊疗操作从原发肿瘤脱落, 发生上皮-间质转化(EMT), 从而具有流动特性, 进入外周血中, 就形成了循环肿瘤细胞(CTC)^[1]. CTC 是肿瘤转移过程中在血液循环系统中存活的肿瘤细胞, 它的生成被认为是肿瘤发生转移的必要前提^[2]. CTC 的检测有助于研究肿瘤转移机制、指导肿瘤治疗、判断治疗效果、为推断预后提供可靠参考, 是国内外肿瘤治疗关注的焦点. 然而 CTC 在血液中浓度极低, 出现概率约为 1 个 CTC/10⁹ 个血细胞, 所以 CTC 研究的关键在于能否在复杂环境中高效、迅速、准确地富集和检测 CTC^[3].

纳米科技是指在纳米尺度(从单个原子、分子到亚微米尺度之间)上研究物质的特性和相互作用, 以及由纳米结构集成的功能系统^[4]. 随着纳米科学与技术的发展, 人们获得了结构可控的、表面功能化的纳米材料和纳米结构, 同时在微流控技术及纳米器件方面实现了对微量液体的精确操纵以及微弱信号的精确测量, 从而在减少血样量的同时, 大大提高了 CTC 的富集率和检测灵敏度. 靶向 CTC 表面标志物的特异性识别分子修饰的纳米材料结合微流控技术的 CTC 检测平台研究受到了科学家的广泛关注, 并取得了令人瞩目的成果. 2013 年,

《自然》(*Nature*)杂志将 CTC 纳米检测列为最具创新性和转化潜力的肿瘤诊断新方法^[5]. 新纳米材料、纳米器件以及纳米表征测量技术的应用对 CTC 检测技术的进步已经并即将产生巨大的影响, 下面就纳米材料、纳米结构表面、微流控技术、纳米检测技术等几个方面, 对 CTC 富集和检测纳米技术的最新进展进行简要介绍.

1 纳米材料在 CTC 富集中的应用

大多数实体瘤都是上皮来源的, 因而 CTC 细胞表面的上皮细胞黏附分子(EpCAM)是最为常用的 CTC 表面抗原, 广泛用于各种纳米材料、纳米结构的表面修饰以实现 CTC 的富集. 随着纳米技术的发展, 人们可获得结构可控、表面功能化的不同种纳米材料, 纳米材料所表现出的小尺寸效应、高比表面积等诸多不同于一般材料的特性, 使血液中极少量的 CTC 的捕获成为可能. 纳米材料与纳米结构与 CTC 的高接触几率, 也可以大大提高 CTC 的富集效率, 被广泛用于 CTC 的富集和检测.

* 国家自然科学基金(21273051, 91127043)和国家重大科学研究计划(2011CB932800, 2009CB930100)资助项目.

** 通讯联系人.

王琛. Tel: 010-82545561, E-mail: wangch@nanctr.cn

杨延莲. Tel: 010-82545559, E-mail: yangyl@nanocr.cn

收稿日期: 2013-06-20, 接受日期: 2013-07-04

1.1 基于磁性纳米材料的 CTC 富集

目前, 富集技术主要包括免疫磁珠富集、基于血液中各种细胞特征密度的密度梯度离心法、基于细胞尺寸的膜过滤法、双向电泳等, 其中免疫磁珠技术由于方法简单、快捷、富集效率较高, 是临床的首选方法. 然而, 由于技术的限制, 早期的磁珠只能达到微米级, 与纳米磁珠相比, 微米磁珠因其比表面积低、尺寸大、稳定性差、易聚沉等原因, 导致细胞分离效率低, 并且分离出的细胞很难将磁珠洗脱而保持细胞活性, 使得进一步的分析也很困难. 近年来, 纳米技术的发展使磁珠大小达到了纳米级 (10~100 nm)^[6-9], 增大的比表面积增加了与待测细胞的接触几率, 更好地分散性降低了对细胞造成的机械性压力, 大大提高了 CTC 的富集率.

Xu 等^[8]制备了 EpCAM 抗体修饰的聚合物包被的铁磁性纳米颗粒(30 nm), 并对 1 ml 血液里的极少量乳腺癌细胞进行了富集, 其最大捕获效率高达 84%. 为了提高磁性材料的富集率, 人们探索不同组成的磁性材料(如纳米铁^[7]、碳包被的纳米铁^[9])的富集效率, 并同时试图增强磁性响应速度和分散性, 以提高 CTC 的捕获速率和被捕获细胞的活性.

目前, 用于临床的 CellSearch 是唯一通过美国 FDA 和我国 SFDA 批准的 CTC 检测设备, 该检测平台就是基于纳米免疫磁珠的 CTC 富集技术, 能够对 7.5 ml 血液样品进行分析检测, 具有良好的再现性, 已被用于转移性乳腺癌、肺癌、结直肠癌和前列腺癌的临床 CTC 检测, 用来预测无进展生存期和总生存期.

1.2 基于非磁性纳米材料的 CTC 富集

1.2.1 基于纳米材料修饰表面的 CTC 富集.

尽管免疫磁珠富集技术在临床上得到了广泛应用, 但是该技术中捕获了 CTC 的纳米磁珠在磁场富集过程中易发生聚集, 在这样的机械压力下, 细胞形态及活性会受到影响. 另一方面, 被捕获的 CTC 表面结合了磁珠, 不利于 CTC 的进一步分析检测. 因此, 一些非磁性纳米材料在 CTC 富集中的应用受到了研究者的广泛关注. 将抗体功能化的不同形状的纳米材料(纳米颗粒^[10]、纳米线^[11]等)固定在基底上用于 CTC 富集, 既提高了细胞与捕获靶点的接触几率, 又方便将 CTC 细胞从表面洗脱, 减少纳米颗粒吸附对于细胞活力和分析检测的影响, 从而提高了细胞的富集率和检测准确性, 并且可以实现 CTC 富集检测的一体化.

我国科学家王树涛等与日本科学家 Yu 合作^[10], 恒压条件下, 通过电化学方法在氧化锡锡包被的玻璃表面成功制得大小尺寸分布均一的聚 3, 4- 亚乙二氧基噻吩导电聚合物纳米点, 然后对纳米点表面修饰 EpCAM 抗体, 从而对 CTC 进行富集(图 1).

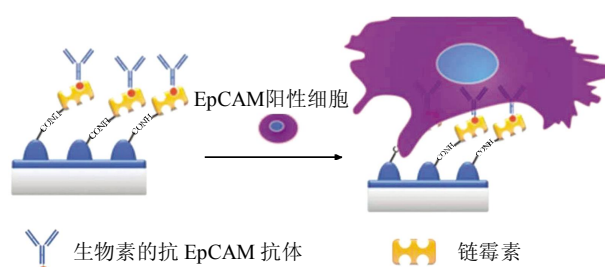


Fig. 1 Bioconjugating antibody onto PEDOT-COOH nanodots for CTC capture^[10]

图 1 抗体修饰的 PEDOT-COOH 纳米点沉积在膜上用于 CTC 的富集^[10]

与光滑的导电聚合物薄膜相比, 这种具有低宽高比的纳米点薄膜增加了捕获靶点, 富集率提高了 4~5 倍. 该纳米导电聚合物具有合成方法简单、易功能化、与细胞机械性能相匹配等优点, 在 CTC 检测中有良好的应用前景.

武汉大学 Zhang 等^[11]利用功能化二氧化钛纳米电纺丝包被基底, 实现血液中 CTC 的分离富集(图 2). 除了功能化识别抗体, 基底沉积的电纺丝水平排列, 其拓扑结构与细胞外基质的相互作用在提高 CTC 捕获率方面也起到了很大的作用. 研究表明: 细胞表面的纳米结构组件(微绒毛和丝状伪足)与细胞外基质相互作用, 将影响细胞的黏附、

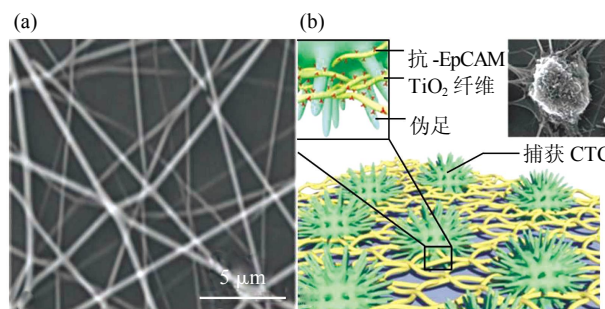


Fig. 2 TiO₂ nanofiber conjugated with antibody for CTC capture^[11]

图 2 抗体修饰的 TiO₂ 纳米纤维用于 CTC 的捕获^[11]

(a)硅基底上制备 TiO₂ 纳米纤维用于 CTC 捕获. (b)纳米结构对 CTC 的捕获原理.

活性、迁移及分化等功能. 因而通过纳米技术模仿细胞外基质结构构建一些纳米表面, 调控细胞黏附性, 可以实现对 CTC 的捕获. 二氧化钛纳米电纺丝在基底上的铺设方向和密度容易控制, 对基底没有特殊要求, 使此 CTC 捕获平台的构建成为可能.

无论是磁性的或是非磁性的纳米免疫富集方法, 均是利用纳米材料的大比表面, 增大待测细胞与靶点的接触几率, 纳米材料的这一特点恰好解决了血液中 CTC 检测量极少的问题.

1.2.2 基于纳米结构表面的 CTC 富集.

免疫分离方法主要基于细胞表面特异性表达的蛋白, 然而, 这些蛋白的表达在肿瘤细胞转移过程中会发生变化, 从而造成 CTC 检测结果假阴性. 研究发现, 肿瘤细胞和正常细胞在粗糙表面上具有不同的黏附特性, 因此科学家们开始探索利用纳米

粗糙表面(如功能化的纳米线^[12-13]、纳米柱^[14-17])分离血液中的 CTC.

Chen 等^[18]用离子刻蚀的方法得到不同粗糙度(1、50、100、150 nm)的玻璃表面, 进一步实验结果表明, 随着粗糙度的增加, 肿瘤细胞在其表面的黏附增多, 而正常细胞则不受影响(图 3). 通过血细胞与肿瘤细胞在纳米粗糙表面的不同黏附特性实现 CTC 的分离富集. Wan 等^[19]为了提高纳米材料对肿瘤细胞的黏附, 又在基底表面上修饰了多水高岭石纳米管和 E-选择素分子(E-selectin)功能化的阿霉素脂质体, 从而大大提高了 CTC 的选择性.

也有课题组将聚二甲基硅氧烷(PDMS)制成有纳米纹理结构的表面^[20], 一改常用的光滑 PDMS 表面, 从细胞物理结构性能的角度出发实现了 CTC 富集效率的提高.

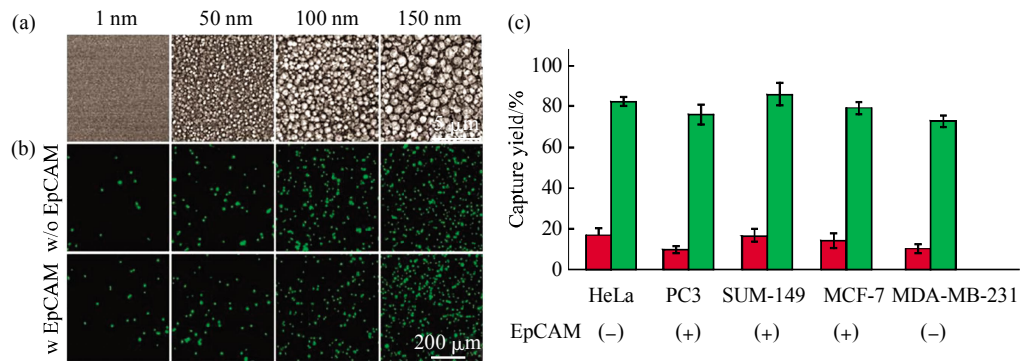


Fig. 3 Nanotopological sensing for capture of cancer cells^[18]

图 3 基于纳米拓扑结构的肿瘤细胞捕获^[18]

(a) 玻璃表面具有不同均方根(RMS)粗糙度的纳米结构的扫描电镜图. (b) 抗体修饰(下)和未修饰(上)的纳米结构表面对肿瘤细胞(细胞核进行吖啶染料 DAPI 的预染)的捕获效果荧光图. (c) 不同肿瘤细胞的捕获率与表面粗糙度的关系. ■: 平滑(1 nm); ■: 粗糙(150 nm).

这种基于纳米结构物理性能的 CTC 富集技术不依赖于抗原-抗体相互作用, 虽然富集效率有所降低, 但是避免了因细胞表面特异性抗原丢失所导致的假阴性结果. 如果将基于纳米结构的高效富集表面与免疫分离技术相结合, 必将大大提高 CTC 的富集效率. 美国耶鲁大学癌症研究中心的 Lee 等^[21]利用掩膜刻蚀技术, 在透明石英基底上构建了石英纳米线阵列, 并在表面进行了 EpCAM 抗体功能化, 这种纳米拓扑结构平台能够高效、快速地富集非小细胞肺癌 A549 细胞. 美国加州大学洛杉矶分校的 Wang 等^[16]和 Hou 等^[17]在硅纳米阵列上修饰抗体功能化的热响应性聚合物 N-异丙基丙烯酰胺,

从而实现捕获的 CTC 细胞的温度可控释放(图 4).

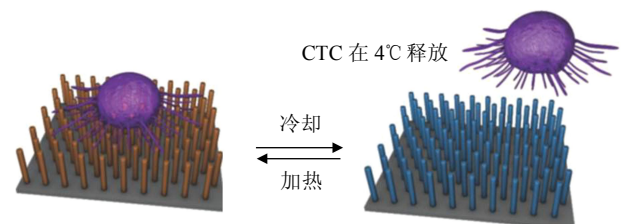


Fig. 4 Conceptual illustration of a new-generation nanomaterial-based platform for CTC capture and releasing controlled by temperature^[17]

图 4 新一代基于纳米材料的 NanoVelcro 实现 CTC 捕获的同时可以进行温控释放^[17]

1.3 纳米材料与微流控技术相结合用于 CTC 富集

随着半导体微加工技术的发展, 微流控芯片已经受到科学家们的广泛关注. 微流控技术是一种针对极少量($10^{-9} \sim 10^{-18}$ L)流体进行操控的系统科学技术. 微流控芯片是微流控技术实现的主要平台和技术装置, 其主要特征是容纳流体的有效结构(通道、反应室和其他某些功能部件)至少在一个维度上为微米级尺度. 对肿瘤病人血液中极少量的 CTC 检测时, 样本量有限的问题成为 CTC 检测的一个重要瓶颈. 然而基于纳米材料构建微流控芯片或将纳米材料与微流控通道相结合的技术能够很好地克服这一难题.

Stott 等^[21]最先将微流控芯片用于 CTC 的检测, 如图 5 所示, 他们构建了一种肿瘤细胞表面特异性识别抗体功能化的鱼骨形(HB)芯片, 血液流过一个可视通道, 通道内鱼骨形沟回能够引起血液的一个轻微斡旋, 从而增强了其与抗体修饰表面的接触. 与 FDA 批准目前用于临床的 CellSearch 检测相比, 该技术不用对血液样品进行预处理, 具有更好的灵敏度. 值得一提的是, 这种方法获得的 CTC 仍能够保持活性, 用于进一步的分析. 为了进一步提高微流控芯片的 CTC 捕获率和灵敏性, 研究者们对纳米材料与微流控技术相结合用于 CTC 的富集做

了很多研究, 例如下面谈到的利用纳米材料与微流控技术结合进行 CTC 富集的工作.

1.3.1 磁性纳米材料与微流控结合用于 CTC 富集.

基于磁性免疫富集技术的 CellSearch 的成功证明了磁珠捕获方法的优势. 但是, 该系统也还存在检测成本高、样品用量多、样品检测时间长、检测过程封闭等诸多不足. 微流控芯片的样品量少、流速可控及构件透明性等特点, 为进一步改进 CellSearch 的 CTC 检测技术提供了技术支持^[22-23].

Hoshino 课题组^[22-23]将基于 PDMS 的微流通道固定于玻璃表面, 在玻璃一侧放有磁铁, 对 CTC 进行富集. 透明玻璃可以实现 CTC 检测过程的可视化; 免疫磁性纳米颗粒捕获的 CTC 会在一个梯度场强的作用下, 分散在一定面积的玻璃表面, 避免了聚集; 对于分散在玻璃表面的 CTC 还可以直接进行进一步分析. 实验结果表明, 与 CellSearch 相比, 微流通道内的磁场梯度使得即使在一个较高的流速下, 仍能达到较高的捕获率. 在此系统中, 磁珠用量也减少 25%.

1.3.2 非磁性纳米材料与微流控结合用于 CTC 富集.

Toner 课题组在微流控芯片用于 CTC 富集方面的工作, 给纳米科学家一个很好的提示, 将纳米材料与微流控芯片相结合, 可以进一步提高细胞与捕获靶点的接触, 从而在解决临床检测中血样量多的同时, 解决单一使用微流控芯片时富集灵敏度较低等问题.

Hou 等^[13]构建 CTC 表面特异性识别抗体包被的硅纳米柱阵列和能使血液样品混合的在微流通道相组合的 CTC Nanovelcro 检测芯片, 通过控制微流通道长度, 流体流速等因素提高了 CTC 的捕获灵敏度. 为了近一步提高捕获效率并实现捕获 CTC 的可控释放, 我国科学家方晓红, 侯爽, 熊斌等与 Hou 等合作开发了第二代 Nanovelcro 芯片^[13], 用纳米线替代原有的硅纳米柱, 改变拓扑结构, 增加了细胞表面识别探针与细胞的接触; 用核酸适配体(apptamer)探针替代抗体对 CTC 进行捕获, 核酸适配体在酶的作用下可轻松与靶细胞解离, 从而实现捕获 CTC 的可控释放.

随后, Hou 等^[13]又开发了有机聚合物纳米线包埋的 PN-Nanovelcro 透明基底, 替代以前的硅基底, 从而使 CTC 捕获过程可视化, 并且该基底可以实现单细胞的显微切割, 为进一步的单细胞基因组学分析打下了基础.

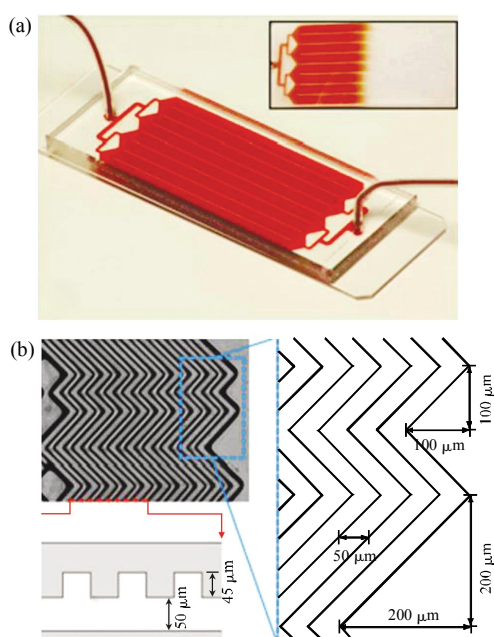


Fig. 5 The CTC capture technology based on Herriherringbone(HB)-chip and microfluidic system^[21]

图 5 鱼骨型芯片结合微流控技术用于 CTC 富集^[21]

(a) HB 芯片由具有进口和出口的微流阵列通道构成. (b) HB 芯片的非对称周期性鱼骨微结构示意图.

Hou 等还创办了名为 CytoLumina Technologies 的公司以实现以上研究工作的商业化. 这一系列结合了纳米结构和微流控技术的 CTC 检测装置(图 6)无不说明纳米技术在 CTC 富集中的重要作用, 这部分工作也被 2013 年的《自然》(*Nature*)杂志作为亮点工作进行报道^[9]. 结合了纳米技术的微流控技术为 CTC 捕获打开了新的大门.

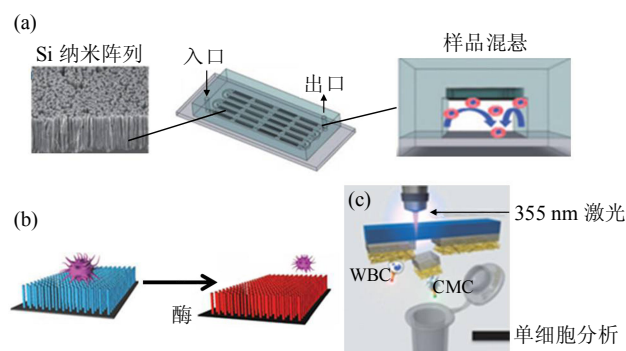


Fig. 6 Characters of different generations nanovelcro chip for capturing CTC

图 6 不同代 CTC 捕获 nanovelcro 芯片的结构特点

(a)第一代: 抗体功能化的硅纳米柱芯片和上面覆盖了微流混合装置用于 CTC 捕获^[9]. (b)第二代: 能够替代抗体靶向 CTC 且酶处理后可释放捕获的 CTCs 的 aptamer 修饰基底^[9]. (c)第三代: 可用于单个循环肿瘤细胞分离的透明基底, 从而对分离出的极少量 CTC 进行分析^[9].

2 纳米技术在 CTC 检测中的应用

对富集出的极少量 CTC 进一步分析鉴定是 CTC 检测中的另一个重要环节, 目前的方法主要有免疫学检测、实时定量 PCR 检测、酶联免疫斑点印迹等方法. 由于富集到的 CTC 数量极少并有可能已经失去活性, 这些普通的生物学检测方法很难对其进行及时准确的计数和分析. 然而, 所有的纳米材料都具有三个共同的结构特点: a. 纳米尺度的结构单元或特征维度尺寸在纳米数量级(1~100 nm); b. 有大量的界面或自由表面; c. 各纳米单元之间存在着或强或弱的相互作用. 由于这种结构上的特殊性, 纳米材料具有一些独特的效应, 包括小尺寸效应、量子尺寸效应、界面效应以及宏观量子隧道效应, 使纳米材料在性能上与具有相同组成的传统概念上的微米材料有非常显著的差异, 表现出许多优异的性能和全新的功能, 这些特殊的光学、电学、声学性质为 CTC 检测提供了新的途径.

2.1 基于纳米材料光学性能的 CTC 检测

量子点又名半导体纳米微晶粒, 是一种直径在 1~100 nm 之间, 能够接受激发光产生荧光的半导体纳米颗粒. 其诸多特性, 如发光光谱依赖尺寸变化的可控性、光稳定性、宽激发谱窄发射谱、荧光寿命长、生物相容性好等, 使其克服了现有普通有机荧光染料在生物样品荧光成像中的不足. 目前, 有课题组^[24-29]基于量子点独特的发光性能, 将其用于纳米磁珠 CTC 富集的辅助检测. Zhang 等^[24]合成了粒径分布为 2.8~7.3 nm 两种不同发光波长的 CdTe 量子点, 并在其表面偶联肺癌细胞特异性识别抗体, 对免疫磁珠富集后的肺癌细胞进行了双色鉴定. Efstathopoulos^[25]则将 ZnS 和聚合物修饰的 15~20 nm 尺寸范围的 CdSe 量子点直接偶联在免疫磁性纳米磁珠上, 从而实现了 CTC 富集、鉴定的一体化, 提高了 CTC 检测速度和效率.

与量子点相比, 金属铈纳米颗粒灵敏、特异、简单的 X 射线荧光光谱在生物标志物检测中有着良好的应用前景. Hossain 等^[26]用肿瘤特异性识别抗体修饰 70~95 nm 铈纳米颗粒, 对免疫磁性富集的 CTC 进行了检测.

一维纳米材料有巨大的比表面积、很高的表面活性, 其对周围环境敏感响应使其在光生物传感方面有着良好的应用前景^[27-28], 纳米线在光生物传感器中有着良好的应用前景. Sioss 等^[27]制备出纳米线阵列光生物传感器件, 并将 50 nm 金纳米颗粒修饰于纳米线表面通过增加质量来提高传感器的响应灵敏度.

反射干扰检测(RIFS)是一种在薄膜表面或纳米拓扑结构表面上, 发生入射光和反射光相互干扰的光谱检测方法. 澳大利亚科学家 Kumeria 等^[28]用电化学方法制备的多孔阳极氧化铝(AAO)用于 CTC 无标记反射干扰光谱测量. 在阳极氧化铝膜上下产生的光反射导致产生 Fabry-Perot 特征干涉条纹, 而结合了细胞的多孔膜结构折射率和膜厚度引起 Fabry-Perot 特征干涉条纹信号偏移. 这种高有序三维纳米孔结构材料的机械、化学和热稳定性及易功能化等特点使其在反射干扰检测中有很强的检测信号(图 7).

2.2 基于纳米材料光声性质的 CTC 检测

在体的荧光检测技术, 一方面受到体内组织光猝灭、光漂白、强的光散射和背景自发荧光等因素的限制, 另一方面, 该技术血样需求量大, 耗时长, 因而开发一种无荧光物标记的快速准确体内成

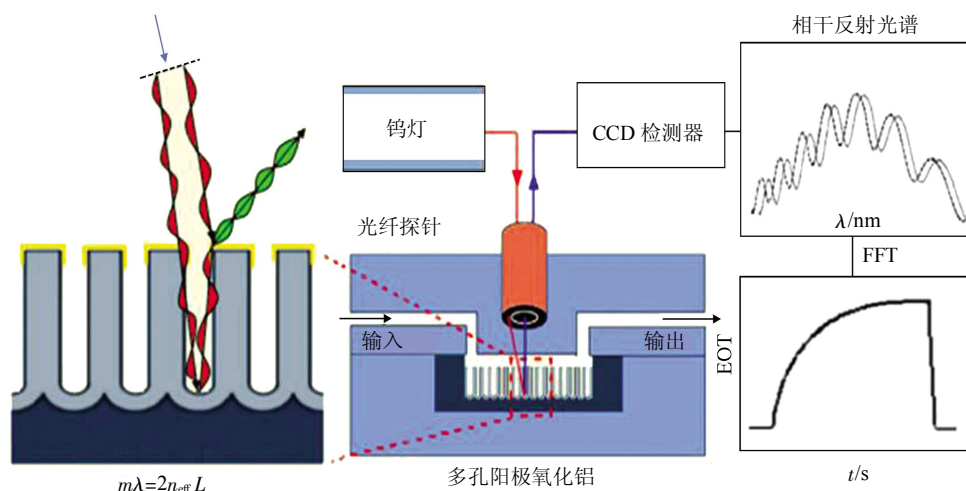


Fig. 7 Schematic of the RIFS microchip detection system: comprising an AAO nanopore as sensing platform integrated into a microfluidic chip, fiber optic probe connected to a light source and CCD detector^[28]

图 7 CTC 反射干涉检测微芯片检测系统组成及原理示意图: 多孔阳极氧化铝, 光纤探针, CCD 检测器^[28]

像检测技术十分必要。光声成像是近年来发展起来的一种无损医学成像方法, 它结合了纯光学成像的高对比度特性和纯超声成像的高穿透深度特性, 可以提供高分辨率和高对比度的组织成像。该技术工作原理: 当纳秒量级的脉冲激光照射生物组织时, 组织内的吸收体吸收激光能量, 局部的温度发生瞬时改变, 导致体积膨胀, 产生光声信号。

纳米颗粒的强光吸收和光稳定性使其常被用来作为体内光声成像的对比剂。金纳米颗粒可以有效增强组织内的特异性吸收, 并通过控制纳米颗粒尺寸得到所需的光吸收波长。研究表明, 与传统的光吸收对比剂相比, 纳米金对光的吸收要强 10^5 倍左右, 极大地增强了组织的光学吸收, 从而有效地改善了光声图像质量。目前金纳米颗粒已被应用于 CTC 的体内光声检测。

为了克服光声检测技术对快速流动的 CTC 捕获信号响应慢的问题, Galanzha 等^[29]和 Kim 等^[30]利用具有强磁性的磁性纳米颗粒和具有光强吸收性的金包覆碳纳米管两种纳米材料, 金包覆碳纳米管在 639、900 nm 处强的光吸收会给出 $10 \mu\text{s}$ 的时间延迟检测信号, 从而实现体内 CTC 的实时快速多色光声检测。基于这两种纳米材料的 CTC 检测平台将磁性富集技术和灵敏性、特异性强的光声诊断技术有效结合, 与体外检测技术相比, 该技术能够从大量血液中检测 CTC, 故其检测灵敏度最大能提高 10^3 倍(图 8)。

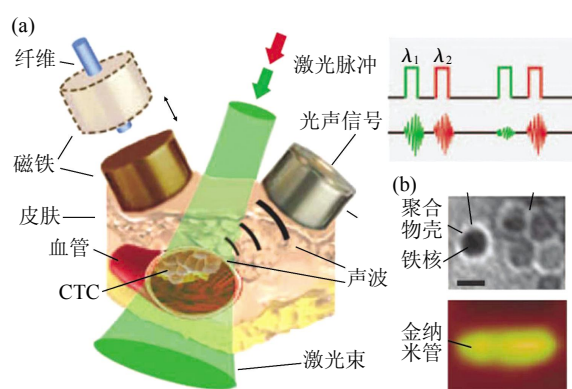


Fig. 8 *In vivo* magnetic enrichment using two-colour photoacoustic detection of CTCs^[29]

图 8 体内磁性富集和双色光声 CTC 检测示意图^[29]

(a) 体内光声检测示意图。(b) 磁性纳米颗粒的透射电镜图(上)和金纳米管的原子力显微镜图像(下)。

2.3 基于纳米材料电化学性能的 CTC 检测

基于显像的单细胞分析非常耗时, 并且荧光标记和检测仪的高昂价格导致测试成本较高。另外, 荧光染料标记的细胞会影响细胞的分子组学检测, 并且由于自身荧光的问题, 该系统在灵敏度、特异性方面也有待提高。相比较而言, 基于金纳米粒子在析氢反应中电催化性能的电化学检测就能够克服这些缺点。

西班牙科学家 Maltez-da Costa 等^[31]发展了一种 20 nm 金纳米粒子电化学检测 Caco2 肿瘤细胞的方

法. 这种方法的原理是通过抗体功能化的磁性纳米材料对样品中的 CTC 进行富集, 而后根据结合的纳米金颗粒数目不同所导致的电催化析氢反应中电流的不同来间接反映捕获的 CTC 数量. 实验结果显示, 在最优的测量条件下, 测得的电流值与细胞数在 $1 \times 10^3 \sim 3.5 \times 10^4$ 范围内成线性相关. 金纳米粒子具有的还原性能、强的电催化活性、特殊的光及电化学生活性, 使其适合作为肿瘤细胞的标记探针. 与传统的基于酶和染料标记的分析方法相比, 在免疫分析中使用纳米颗粒作为标记试剂能够提高检测的灵敏度, 并且该方法简单、低耗、更易操作.

3 结论与展望

血液中 CTC 的准确检测将为监测临床肿瘤转移过程提供重要依据, 因而开发高灵敏、高特异性的 CTC 检测技术的研究非常重要. 如上文所述, 纳米技术可提高检测灵敏度和特异性, 在 CTC 检测体系中广泛应用. 尤其是最近发展起来的具有纳米拓扑结构的材料和表面与微流控技术相结合, 可大大提高 CTC 的富集效率, 降低检测所需的血样量. 国家纳米科学中心 Sun 等^[32]发展了双螺旋微流控通道, 利用尺寸依赖的水动力可以对外周血中的肿瘤细胞实现无标记分离和富集. 另一方面, 纳米材料所特有的光学、电学、电化学生性能为少量 CTC 的检测也提供了新的途径. 特别是, 金纳米颗粒特殊的光学和电化学生性能已用于蛋白质及食品安全的快速检测, 其在 CTC 细胞的检测中展示出良好的应用前景.

然而由于抗体的成本高、稳定性差, 大部分基于抗体-抗原免疫识别的纳米检测技术成本居高不下. 因此发展基于新的 CTC 捕获探针(如多肽探针或者核酸适配体探针)和特异性释放探针的 CTC 富集和检测纳米技术意义重大, 不仅可以对目前已有的临床检测方法进行升级, 降低检测成本, 而且可以利用纳米集成技术进行高内涵的检测, 为个体化治疗提供科学基础和技术支撑. 比如中国科学院化学研究所 Shen 及合作者基于指数富集的配体系统进化(SELEX)技术, 筛选了特异性识别非小细胞肺癌细胞的单链 DNA 适配体探针, 结合纳米技术用于 CTC 的富集检测. 我们课题组也设计和筛选了特异性识别 CTC 细胞表面 EpCAM 蛋白的多肽探针, 该探针与靶蛋白的亲合力与抗体相当, 将多肽探针修饰在磁纳米颗粒的表面, 在模拟血液中的

CTC 富集效率与抗体一致. 总之, 结合微流控技术, 发展基于新的 CTC 捕获探针的纳米检测方法是 CTC 检测的发展方向, 这也将推动临床肿瘤转移的诊断、治疗和预后的发展.

参 考 文 献

- [1] Gaorav P G, Joan M. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 2006, **127**(17): 679-695
- [2] Patricia S S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*, 2006, **12** (8): 895-904
- [3] Paterlini-Brechot P, Benali N L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett*, 2007, **253**(2): 180-204
- [4] Lei J P, Ju H G. Signal amplification using functional nanomaterials for biosensing. *Chem Soc Rev*, 2012, **41**(6): 2122-2134
- [5] Marx V. Tracking metastasis and tricking cancer. *Nature*, 2013, **494**(7): 131-136
- [6] Li F R, Li Q, Zhou H X, *et al.* Detection of circulating tumor cells in breast cancer with a refined immunomagnetic nanoparticle enriched assay and nested-RT-PCR. *Nanomedicine*, 2013, **9** (7): 1106-1113
- [7] Li Q, Qi H, Zhou H X, *et al.* Detection of micrometastases in peripheral blood of non-small cell lung cancer with a refined immunomagnetic nanoparticle enrichment assay. *Int J Nanomedicine*, 2011, **6**: 2175-2181
- [8] Xu H, Aguilar Z P, Yang L, *et al.* Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood. *Biomaterials*, 2011, **32**(36): 9758-9765
- [9] Chung Y K, Reboud J, Lee K C, *et al.* An electrical biosensor for the detection of circulating tumor cells. *Biosens Bioelectron*, 2011, **26**(5): 2520-2526
- [10] Sekine J, Luo S C, Wang S, *et al.* Functionalized conducting polymer nanodots for enhanced cell capturing: the synergistic effect of capture agents and nanostructures. *Adv Mater*, 2011, **23** (41): 4788-4792
- [11] Zhang N, Deng Y, Tai Q, *et al.* Electrospun TiO₂ nanofiber-based cell capture assay for detecting circulating tumor cells from colorectal and gastric cancer patients. *Adv Mater*, 2012, **24** (20): 2756-2760
- [12] Lee S K, Kim G S, Wu Y, *et al.* Nanowire substrate-based laser scanning cytometry for quantitation of circulating tumor cells. *Nano Lett*, 2012, **12**(6): 2697-2704
- [13] Hou S, Zhao L, Shen Q, *et al.* Polymer nanofiber-embedded microchips for detection, isolation, and molecular analysis of single circulating melanoma cells. *Angew Chem Int Ed*, 2013, **52** (12): 3379-3383
- [14] Wang S, Liu K, Liu J, *et al.* Highly efficient capture of circulating tumor cells by using nanostructured silicon substrates with integrated chaotic micromixers. *Angew Chem*, 2011, **50**(13): 3084-3088
- [15] Shen Q, Xu L, Zhao L, *et al.* Specific capture and release of circulating tumor cells using aptamer-modified nanosubstrates. *Adv Mater*, 2013, **25**(16): 2368-2373

- [16] Wang S, Wang H, Jiao J, *et al.* Three-dimensional nanostructured substrates toward efficient capture of circulating tumor cells. *Angew Chem Int Ed*, 2009, **48**(47): 8970–8973
- [17] Hou S, Zhao H, Zhao L, *et al.* Capture and stimulated release of circulating tumor cells on polymer-grafted silicon nanostructures. *Adv Mater*, 2013, **25**(11): 1547–1551
- [18] Chen W Q, Weng S N, Zhang F, *et al.* Nanoroughened surfaces for efficient capture of circulating tumor cells without using capture antibodies. *ACS Nano*, 2013, **7** (1): 566–575
- [19] Wan Y, Mahmood M A, Li N, *et al.* Nanotextured substrates with immobilized aptamers for cancer cell isolation and cytology. *Cancer*, 2012, **118** (4): 1145–1154
- [20] Mitchell M J, Castellanos C, King M R. Nanostructured surfaces to target and kill circulating tumor cells while repelling leukocytes. *J Nanomater*, 2012: 1–10
- [21] Stott S L, Hsu C H, Tsukrov D I, *et al.* Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(43): 18392–18397
- [22] Huang Y Y, Hoshino K, Chen P, *et al.* Immunomagnetic nanoscreening of circulating tumor cells with a motion controlled microfluidic system. *Biomed Microdevices*, 2012, **15**(4): 673–681
- [23] Hoshino K, Huang Y Y, Lane N, *et al.* Microchip-based immunomagnetic detection of circulating tumor cells. *Lab Chip*, 2011, **11**(20): 3449–3457
- [24] Wang Y, Zhang Y, Du Z, *et al.* Detection of micrometastases in lung cancer with magnetic nanoparticles and quantum dots. *Int J Nanomedicine*, 2012, **7**(4): 2315–2324
- [25] Gazouli M, Lyberopoulou A, Pericleous P, *et al.* Development of a quantum-dot-labelled magnetic immunoassay method for circulating colorectal cancer cell detection. *World J Gastroenterol*, 2012, **18**(32): 4419–4426
- [26] Hossain M, Luo Y, Sun Z, *et al.* X-ray enabled detection and eradication of circulating tumor cells with nanoparticles. *Biosens Bioelectron*, 2012, **38**(1): 348–354
- [27] Sioss J A, Bhiladvala R B, Pan W, *et al.* Nanoresonator chip-based RNA sensor strategy for detection of circulating tumor cells: response using PCA3 as a prostate cancer marker. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2012, **8**(6): 1017–1025
- [28] Kumeria T, Kurkuri M D, Diener K R, *et al.* Label-free reflectometric interference microchip biosensor based on nanoporous alumina for detection of circulating tumour cells. *Biosens Bioelectron*, 2012, **35** (1): 167–173
- [29] Galanzha E I, Shashkov E V, Kelly T, *et al.* *In vivo* magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells. *Nat Nanotechnol*, 2009, **4** (12): 855–860
- [30] Kim J W, Galanzha E I, Zaharoff D A, *et al.* Nanotheranostics of circulating tumor cells, infections and other pathological features *in vivo*. *Mol Pharm*, 2013, **10** (3): 813–830
- [31] Maltez-da Costa M, de la Escosura-Muñiz A, Nogués C, *et al.* Simple monitoring of cancer cells using nanoparticles. *Nano Lett*, 2012, **12**(8): 4164–4171
- [32] Sun J, Li M, Liu C. Double spiral microchannel for label-free tumor cell separation and enrichment. *Lab Chip*, 2012, **12**(20): 3952–3960

Nanotechnology of Circulating Tumor Cell Enrichment and Detection*

BAI Lin-Ling, YANG Yan-Lian**, WANG Chen**

(National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China)

Abstract Circulating tumor cells (CTC) in the blood is the tumor cells surviving in the process of tumor metastasis, which is considered to be the prerequisite to the metastasis tumor. The presence and the number of CTC is important to evaluate the tumor prognosis, monitor and evaluate the curative effect of tumor metastasis. In recent years, nanomaterials, nanostructured surface combined with microfluidic technology is widely used in CTC enrichment and detection. Now we review the latest nanotechnology progress on the enrichment and detection of CTC, hoping to provide help for the diagnosis and treatment of tumor.

Key words circulating tumor cells(CTC), nanomaterials, nanostructure, microfluidic technology, enrichment, detection

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00288

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(21273051, 91127043) and Basic Research Program of China (2011CB932800, 2009CB930100).

**Corresponding author.

WANG Chen. Tel: 86-10-82545561, E-mail: wangch@nanoctr.cn

YANG Yan-Lian. Tel: 86-10-82545559, E-mail: yangyl@nanoctr.cn

Received: June 20, 2013 Accepted: July 4, 2013