



循环肿瘤细胞捕获与检测的纳米分析技术进展*

陈璐 高学云** 高靓**

(北京工业大学化学与生物系, 北京 100124)

摘要 随着纳米科学技术的发展, 结构可控、表面多功能化、生物相容性良好的纳米材料在生物医药领域的各个方面都具有广泛的应用. 作为一种重要的血液生物学标志物, 循环肿瘤细胞 (CTC) 是肿瘤转移的“种子”, 活力较强的肿瘤细胞随着血液的流动可穿出血管在远端聚集形成微小的癌栓, 对 CTC 的检测可用于癌症的早期诊断和转移的评估. 新型纳米材料以及纳米表征测量技术的应用对 CTC 分析技术的进步产生了巨大的影响. 近年来, 基于纳米材料和微流控技术对 CTC 的捕获和检测已成为液体活检的研究热点, 这一技术也被逐步推广到临床应用中. 本文对纳米材料与纳米技术在 CTC 的捕获和检测中所发挥的作用进行了综述, 并展望了该领域生物分析的应用前景.

关键词 纳米材料, 循环肿瘤细胞 (CTC), 捕获, 检测, 微流控技术

中图分类号 O65, R73, Q599

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0342

人们普遍认为原发肿瘤向远端扩散是癌症死亡的主要原因, 90% 的癌症相关死亡是由转移引起的^[1-3]. 1869 年澳大利亚籍医生 Ashworth 首次在癌症死亡患者血液中发现并提出循环肿瘤细胞 (CTC) 的概念^[4]. CTC 是来源于原发肿瘤或转移肿瘤, 获得脱离基底膜的能力并通过组织基质进入血管的肿瘤细胞. 自从在癌症患者外周血中发现 CTC 以来, CTC 已被公认为肿瘤转移和诊断的生物学标志物^[5]. 近十年来, CTC 已成为癌症肿瘤标志物的研究热点. CTC 检测对癌症的早期诊断具有重要的临床研究及应用价值^[6]. 但是, CTC 在血液中含量极其稀少, 血液中 10^9 个血细胞中混杂着极少数量的 CTC, 很多研究表明平均每毫升血液中只有 1~10 个 CTC, 并且其以不同的形态进入外周血中, 具有很高的异质性, 因此给 CTC 的捕获和检测带来了极大的挑战^[7-11].

纳米材料具有体积小、易修饰、比表面积大等优点, 近些年又以其突出的磁性^[12]、光学^[13]和电学^[14]性质被广泛用于细胞生物学领域. 同时纳米材料独特的物理化学性质使其可以极大地增强细胞和基质之间的相互作用, 很大程度上提高了细胞的捕获灵敏度和检测效率. 纳米技术的发展对 CTC 的捕获和检测提供了更多的方法. 目前, CTC 的捕获

过程通常是基于其物理性质 (如大小、密度和电荷等)^[15-19]、免疫磁珠^[20-21]、微流控分离^[22-26]等技术. 分析过程通常是对 CTC 的表型进行分析, 包括上皮型、混合型和间质型. 本文就 CTC 的捕获与检测中所涉及的纳米材料与纳米技术进行简要综述.

1 功能化纳米材料对 CTC 的捕获

纳米材料是指结构尺寸在 1~100 nm 的材料, 当材料具有纳米尺寸时, 其物理化学性能就会发生与尺寸密切相关的变化. 纳米材料因其独特的光学性能、力学性能、电磁学性能等近年来在 CTC 捕获和检测分析中发挥了重大作用. 各种各样的新型纳米材料被用来对 CTC 进行捕获, 例如纳米颗粒^[27-30]、纳米线^[31-32]和纳米纤维^[33-34]等. 功能化纳米材料被生物识别基团修饰, 可增加纳米材料与 CTC 的接触面积以提高捕获效率. 根据纳米材料被

* 国家自然科学基金面上项目 (31771082) 和北京市教育委员会 2020 年度计划科技重点项目 (KZ202010005005) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-88236727

高靓. E-mail: gaoliang@bjut.edu.cn

高学云. E-mail: gaoxy@ihcp.ac.cn

收稿日期: 2020-09-25, 接受日期: 2020-11-23

修饰生物分子的类别不同,可分为抗体、DNA与多肽偶联的纳米材料。

1.1 抗体偶联的纳米材料

体液免疫的基础是抗原与抗体分子的结合,这种结合可以是游离形式,也可以在细胞表面结合。目前较为成熟的CTC捕获技术是基于抗原抗体的结合,即将抗体连接在纳米材料上,以生物偶联的形式对CTC表面抗原进行识别。该方法特异性强、捕获纯度高,在CTC捕获方面的研究最为广泛。通常利用纳米材料与单一抗体或者双抗偶联对CTC进行捕获。

1.1.1 单抗偶联的纳米材料

大多数实体瘤来源于上皮细胞,因此上皮细胞黏附分子(EpCAM)是捕获CTC最常见的抗原。EpCAM是应用最广泛的上皮型生物学标志物,其位于CTC表面,并在上皮肿瘤细胞表面高度表达^[35]。研究人员可以利用CTC结合抗体的方式,使其与其他血细胞分离开,提高捕获纯度。CellSearch是目前唯一经过美国食品和药物管理局(FDA)认定的CTC捕获技术,它是在磁珠上包被EpCAM抗体对CTC进行识别捕获,再通过磁场将磁珠与未捕获的细胞分离。受这一技术启发,研究人员开发了新型纳米材料,基于免疫亲合法对CTC进行捕获。Yin等^[36]利用功能化的荧光聚苯乙烯(PS)微球包被EpCAM抗体,使其可以选择性地与CTC结合,但血液中白细胞较多,对实验干扰较大,增加了细胞捕获难度。为了降低白细胞的干扰,Chang等^[37]制备了磁性金纳米颗粒,并在其表面涂覆白细胞膜,再与EpCAM抗体偶联,这种仿生免疫磁性金纳米颗粒对CTC具有较高的特异性识别能力,但与白细胞的相互作用减弱,从而提高了捕获效率。

由于每个CTC表面表达的蛋白质水平不同,导致每个细胞对纳米材料的结合能力不同,表达水平较低的CTC就难以被分离。为了更好地满足对CTC细胞检测与研究的需求,提高CTC的捕获效率成为科研工作者有待解决的一个关键问题。研究者采用抗体扩增策略和构建纳米结构衬底的方式试图有效解决这个难题。

Nie等^[38]基于链霉亲和素-生物素介导的两步结合策略,对CTC进行了高效捕捉(图1)。研究表明,这种扩增的方式可以增加与每个CTC结合磁性纳米颗粒的数量。即使细胞表面蛋白质表达量低也可以进行捕获,极大地提高了捕获效率。因此

抗体扩增的方式可以将蛋白质表达水平放大,最大程度地结合抗体,极大地降低了漏检率。

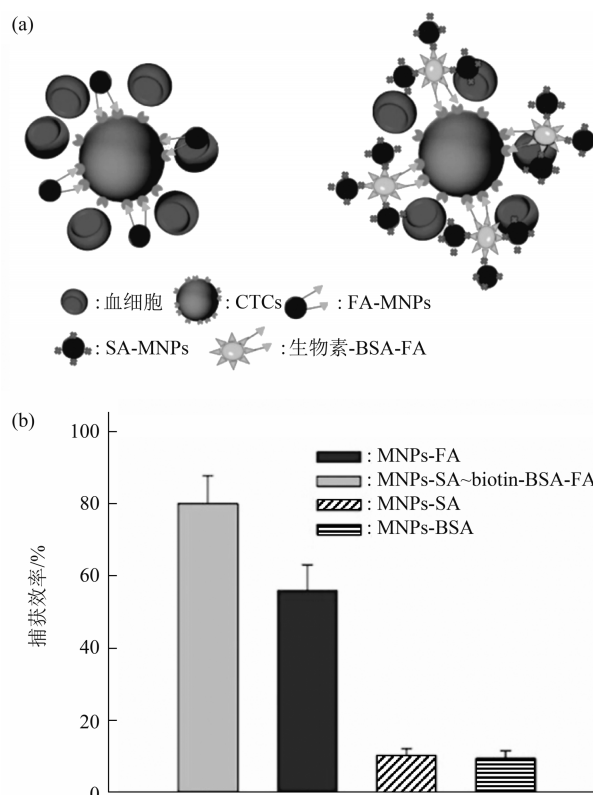


Fig. 1 The amplification method increases the efficiency of nanoparticle for CTC capture^[38]

图1 扩增方式增加了纳米颗粒捕获CTC的效率^[38]

(a) 扩增方式捕获CTC示意图。(b) 捕获效率图。CTC: 循环肿瘤细胞; FA: 叶酸; MNP: 磁性纳米颗粒; SA: 链霉亲和素; BSA: 牛血清白蛋白; Biotin: 生物素。

纳米结构衬底可以增加靶细胞表面与衬底之间的相互作用,从而获得较高的捕获效率。许多研究人员已经从事了增加衬底粗糙度的研究^[39-42]。Guo等^[43]通过改变基底的形状来增加与靶细胞的接触,利用低温水热法,将生长在透明玻璃基板上的氧化锌纳米线(ZnO NW)转化为花朵状的磷酸锌基纳米衬底(HZnPNS),再将EpCAM抗体偶联在其表面,可以有效捕获稀有癌细胞,氧化锌纳米材料由线状转化为花朵状,有效地为抗体提供了更多的附着位点(图2a)。Li等^[44]通过改变基底的粗糙度来增加与靶细胞的接触,利用涂有可溶性二氧化锰(MnO₂)纳米颗粒的二氧化钛(TiO₂)纳米阵列制备一个细胞捕获平台(图2b)。该方法制备的MnO₂/TiO₂/FTO纳米衬底,与FTO衬底相比增加了粗糙度,提供更多的抗体修饰位点用于与靶细胞

接触, 且结合性强, 可显著提高捕获和释放效率, 其最佳捕获效率高达 92.9%. 除此之外, Yin 等^[45] 制备了一种 3D 纳米结构石墨烯平台 (图 2c), 该平台通过集成生长在 3D 石墨烯上的氧化锌 (ZnO) 纳米阵列, 以及用于识别肿瘤细胞的 EpCAM 抗体

对肿瘤细胞进行捕获. ZnO 纳米棒具有良好的生物相容性, 易于被抗体进行改性, 同时高密度的 ZnO 纳米棒增加了三维空间内与细胞基质的接触频率, 提高了捕获率.

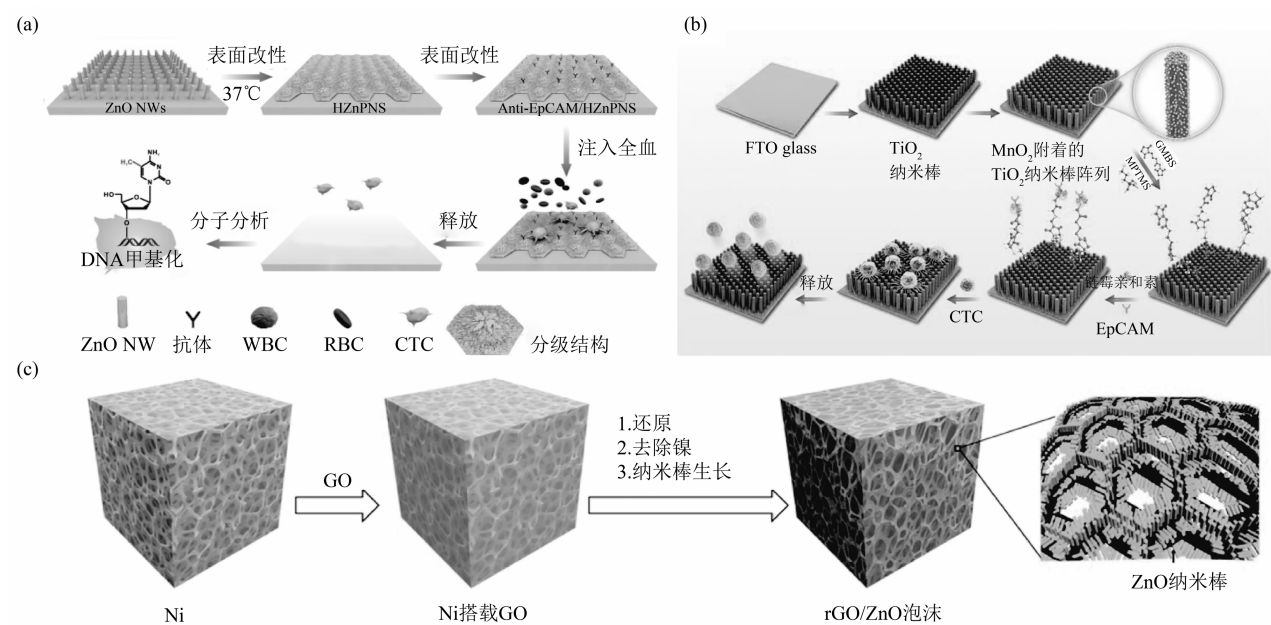


Fig. 2 CTC captured by nanostructured substrate
图2 纳米结构衬底对CTC捕获

(a) 花朵状HZnPNs^[43]. (b) MnO₂/TiO₂/FTO纳米衬底^[44]. (c) 3D石墨烯^[45]. ZnO NW: 氧化锌纳米线; HZnPNs: 花朵状的磷酸锌基纳米衬底; Anti-EpCAM: EpCAM抗体; WBC: 白细胞; RBC: 红细胞; CTC: 循环肿瘤细胞; FTO glass: 氟掺杂氧化锡玻璃; GMBS: N-马来酰亚胺基丁酰氧基琥珀酰亚胺酯; MPTMS: 3-巯丙基三甲氧基硅烷; EpCAM: 上皮细胞黏附分子; CTC: 循环肿瘤细胞; GO: 氧化石墨烯; rGO: 还原氧化石墨烯.

1.1.2 双抗偶联的纳米材料

目前CTC分离主要依赖于EpCAM抗体, 肿瘤细胞在转移过程中发生了上皮-间质转化过程 (EMT). 在EMT过程中, EpCAM的表达丢失或下调可能会显著降低捕获CTC的能力. 有研究表明, 间质型CTC中EpCAM表达极低或无表达, 而间质细胞比上皮细胞更有侵袭性, 并且和转移倾向的疾病进展相关^[46-47]. 因此, 为了防止间质型CTC漏检, 需要利用不同表型的抗体同时对CTC进行捕获.

磁性纳米颗粒具有成像分析灵敏度高、生物相容性良好和毒性低等优点, 近年来在磁共振成像 (MRI)^[48-49]、靶向药物输送^[50-52]、医学检测^[53]等方面被广泛研究. 抗体改性磁性纳米粒子分离方法操作简单, 捕获效率高, 是目前应用最广泛的CTC分离方法^[54]. Wang等^[55]研究了一种利用荧

光磁性纳米颗粒 (F-MNPs) 从患者血液样本中高效分离和鉴定异质性CTC的方法 (图3a). 在F-MNPs上构建以EpCAM和N钙黏连蛋白 (N-cadherin) 为靶点的双抗体界面. EpCAM是典型的上皮型标志物, N-cadherin是间质型重要标志物, 该探针可捕获全血样本中的上皮型CTC和间质型CTC. 同时F-MNPs在癌症患者血样的CTC分离和鉴定中也得到了验证. 表皮生长因子受体 (EGFR) 是一种重要的细胞表面受体, 它在细胞增殖、分化和存活过程中发挥重要作用^[56], 在头颈癌、结肠癌和淋巴瘤中过表达^[57]. Ma等^[58]采用逐层组合法合成了多功能化、响应外磁场强的免疫纳米磁球, 其表面用CD45抗体和EpCAM & EGFR抗体分别修饰, 可对血液中的CTC进行富集 (图3b). EpCAM & EGFR抗体的混合物能够比单一抗体更有效地捕获肿瘤细胞, 同时避免发生EMT过程中

CTC的损失.两种磁珠联合使用,使富集效率达到90%. 目前已有商业设备结合免疫磁珠靶向肿瘤细胞,再利用外部磁场富集CTC,实现CTC的高纯度捕获,为CTC深入研究提供了一定的基础.但是,由于引入外来磁珠可能会影响细胞的存活和进一步的细胞分析,因此需要寻找新的纳米材料来进行改善.

Liu等^[59]采用静电纺丝法制备了均匀的聚乳酸-乙醇酸(PLGA)纳米纤维作为衬底,搭载

EpCAM和N-cadherin的双抗体纳米界面,为细胞捕获提供平台(图3c).实验表明,该平台可对血液样本的上皮型CTC和间质型CTC进行捕获.并且双抗体修饰的纳米纤维比单抗体修饰的纳米纤维具有更高效的捕获能力,通过临床实验发现,在双抗体修饰的PLGA底物上,在低至10 cells/ml的血液样本中可以检测到CTC.该方法也推动了纳米技术在临床应用的发展.

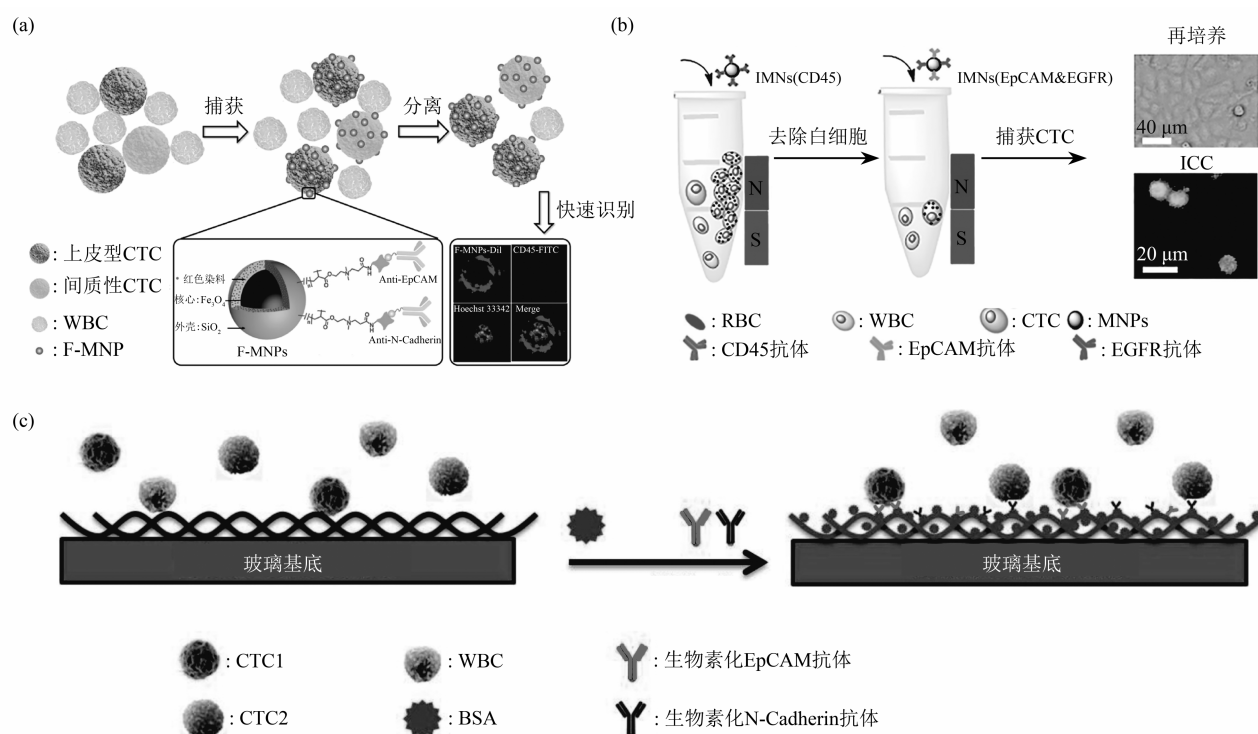


Fig. 3 CTC captured by double antibody nanomaterials

图3 双抗体纳米材料对CTC的捕获

(a) 荧光磁性纳米颗粒捕获示意图^[55]. (b) 免疫纳米磁球捕获示意图^[58]. (c) 纳米纤维捕获示意图^[59]. CTC: 循环肿瘤细胞; WBC: 白细胞; F-MNP: 荧光磁性纳米颗粒; Anti-EpCAM: EpCAM抗体; Anti-N-Cadherin: N钙黏连蛋白抗体; IMN: 免疫磁性纳米球; EpCAM: 上皮细胞黏附分子; EGFR: 表皮生长因子受体; ICC: 细胞免疫荧光; RBC: 红细胞; WBC: 白细胞; MNP: 磁性纳米颗粒; BSA: 牛血清白蛋白; N-Cadherin: N钙黏连蛋白.

1.2 DNA偶联的纳米材料

虽然抗体功能化极大地提高了CTC的捕获效率, CellSearch方法也得到了FDA的批准,但是由于抗体体积大且不稳定,导致其使用受到限制.较大的抗体也会干扰靶标结合能力和免疫应答,对癌细胞检测的敏感性也会下降^[60]. 适配体是一种与靶细胞高度亲和的单链寡核苷酸,是一种人工抗体.与天然抗体相比,适配体的筛选是以整个细胞为靶点,不考虑细胞的表面特征,从而在一定程度上避免了天然抗体的假阴性.与抗体相比, DNA适

配体除了具有亲和力和特异性外,还具有可构建性、高稳定性、低位阻和低毒性等特性^[61].为了准确、快速地捕获CTC,基于适配体的生物传感器受到广泛的关注.

适配体功能化的纳米粒子,如磁性粒子、金纳米粒子和纳米TiO₂等,已被证明在CTC捕获方面具有很大优势. DNA适配体可靶向不同的表面蛋白质,最常用的是针对EpCAM的适配体探针, Song等^[62]筛选出一种发夹结构的DNA适配体对EpCAM进行捕获.除此之外还有一些针对特异性

蛋白质的适配体也可对 CTC 进行识别, Yin 等^[63] 利用能够识别附膜蛋白 (MUC1) 的适配体对 CTC 进行捕获, Zheng 等^[64] 筛选优化了一条适配体 (ZY5C) 序列, 该序列对 EMT 后 CTC 上过表达的细胞表面波形蛋白 (CSV) 具有较高的结合亲和力与特异性.

Chen 等^[65] 受章鱼形态的启发, 模仿章鱼的特征, 制备了一种“纳米章鱼”材料 (图4), 用于在全血中分离癌细胞. 该材料是由磁性微粒 (MP)

作为章鱼头和固定在 MP 表面单链 DNA 序列作为触须组成, 每个触须包含 500 个重复的 DNA 序列, 通过这些 DNA 适配体序列特异性地结合细胞膜上的目标蛋白质. 研究表明, 触须 DNA 与细胞受体的多价结合使其具有超高的灵敏度和特异性. 通过纳米技术制成的“纳米章鱼”装置有效和选择性地从全血中分离目标细胞, 为下游分子分析提供了保障.

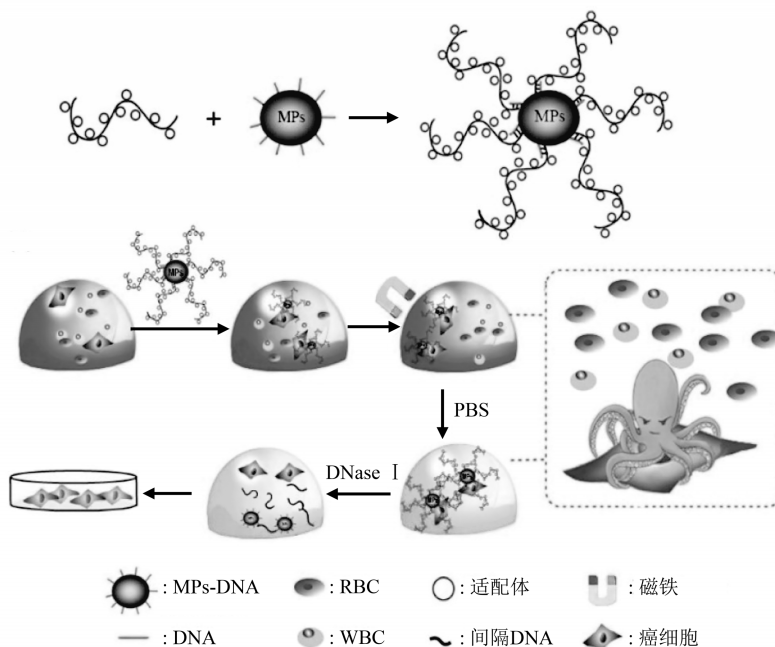


Fig. 4 Schematic diagram of CTC captured by “nanoOctopus” structure^[65]

图4 “纳米章鱼”结构对CTC捕获示意图^[65]

MP: 磁性微粒; PBS: 磷酸缓冲溶液; DNase I: 脱氧核糖核酸酶 I; RBC: 红细胞; WBC: 白细胞.

金纳米粒子是研究较早的一种纳米材料, DNA 诱导金纳米粒子组装结构使其具有良好的靶向性, 从而更好地对细胞进行识别. Miao 等^[66] 将金纳米粒子与多足 DNA 结合设计了单细胞生物传感器, 通过 DNA 适配体序列可以特异性地与 CTC 跨膜受体蛋白相互作用, 促进细胞表面 AuNPs 的富集, 从而提高 CTC 捕获效率.

为了提高富集效率, 满足对 CTC 的进一步研究, 可以通过增加材料的比表面积来增加适配体探针的数量, 从而对 CTC 实现高效捕获. Sun 等^[67] 采用水热合成法制备了一种均匀的多尺度 TiO₂ 纳米棒阵列, 为细胞提供一个相互作用的平台. 同时引入牛血清白蛋白 (BSA) 抑制非特异性细胞黏附, TiO₂ 纳米棒阵列作为 DNA 适配体提供了较大的

附着位点, 使其捕获率可达 85%~95%. 除了阵列式外, 纳米结构衬底也可增加适配体的附着. 电纺丝纳米纤维具有比表面积大、生物相容性好、可模拟细胞外基质、易于制备和表面改性等优点, 在肿瘤细胞捕获领域得到了广泛的应用. Liu 等^[68] 制备了 TiO₂ 电纺丝纳米纤维基底, 结合适配体对细胞进行捕获, 捕获效率可达 75%. Zhao 等^[69] 用叶酸受体靶向的多功能树枝状醋酸纤维素 (CA) 纳米纤维捕获 CTC. 实验表明, 双分子层的自组装和树枝状分子修饰不会明显改变纤维的形态, 并且具有较高的捕获能力. 随后, 同组 Xiao 等^[70] 对该技术进行改进, 构建了 DNA 适配体功能化的磁性短纳米纤维, 用于有效捕获和释放 CTC. 通过共混静电纺丝工艺将其封装在纳米纤维中, 进行 DNA 适配体的

表面偶联. 实验发现, 经过不同时间的孵育, 最佳捕获率为 87%. 这种纳米纤维较大的比表面积为适配体固定化提供了大量的位点, 有效提高了细胞捕获率. 同时该方法可利用磁场将捕获的 CTC 释放, 进行下游分析.

新型纳米材料与 DNA 适配体结合不仅可以提高捕获效率, 同时也可用于后续研究. Cheng 等^[71] 利用高通量平台对单细胞 CTC 转录组进行研究并对 CTC 异质性进行分析. Fan 等^[72] 利用适配体偶联磁性金纳米颗粒, 用于肿瘤细胞的靶向诊断、分离和光热治疗. Chen 等^[73] 构建了基于 DNA 纳米器件的局部药物传递系统, 通过光疗和化疗的协同配合有效地检测和摧毁 CTC. 纳米材料结合 DNA 适配体探针在 CTC 捕获、检测与下游分析方面做出了重大贡献.

1.3 多肽偶联的纳米材料

近些年多肽已被应用于肿瘤靶向^[74-77]、癌症治疗^[78-81]和基因载体^[82]等技术. 多肽因其对靶点亲和性高、稳定性强、相对容易制备等优点而受到广泛关注^[83]. 多肽可以特异性对 CTC 进行识别, 目前利用多肽捕获 CTC 的技术主要是利用纳米磁珠进行, 纳米磁珠在磁场作用下可以将 CTC 分离, 同时纳米磁珠为多肽提供较大的比表面积, 有利于多肽的附着, 因此多肽靶向性的研发将有助于 CTC 检测和分离过程.

Bai 等^[84] 设计了能特异性识别 CTC 表面 EpCAM 蛋白的多肽, 通过生物素亲和素相互作用附着在功能化氧化铁磁性纳米颗粒上 (图 5). 实验证明在磁场作用下, 肽功能化磁性纳米颗粒可以成功地从人类血液中分离 CTC, 并且捕获效率达到 90% 以上, 此外捕获的细胞仍保持活力可进行下游分析. 类似地, Wang 等^[85] 有效地筛选出与 EpCAM 相关的多肽序列, 该肽在体内和体外对 EpCAM 阳性细胞均显示出较高的亲和性和良好的特异性. Wang 等^[86] 设计了多功能磁性纳米颗粒, 用靶向肽 SP94 和抗癌药物阿霉素对 Fe_3O_4 进行修饰, 用于 CTC 的识别、分离和原位治疗.

除了纳米磁球外, 纳米纤维衬底也为细胞捕获提供较大的比表面积, 不仅抗体可以偶联在衬底表面, 多肽也可通过戊二醛有效偶联到衬底表面. TiO_2 纳米纤维衬底可以作为 CTC 捕获和计数的一种重要方法. Chen 等^[87] 利用一个小分子肽, 天冬酰胺-甘氨酸-精氨酸 (NGR), 作为捕获探针, 选择性富集和分离 CTC. 该方法采用电纺丝和煅烧的

方法制备多尺度 TiO_2 纳米纤维衬底, 为靶细胞捕获提供了类似于细胞外基质的平台. TiO_2 纳米纤维附着在 55 nm 厚的玻璃片上, 形成细胞捕获的三维界面. 进一步实验表明以 PC-3 癌细胞为模型, 检出限可低至 10 cells/ml.

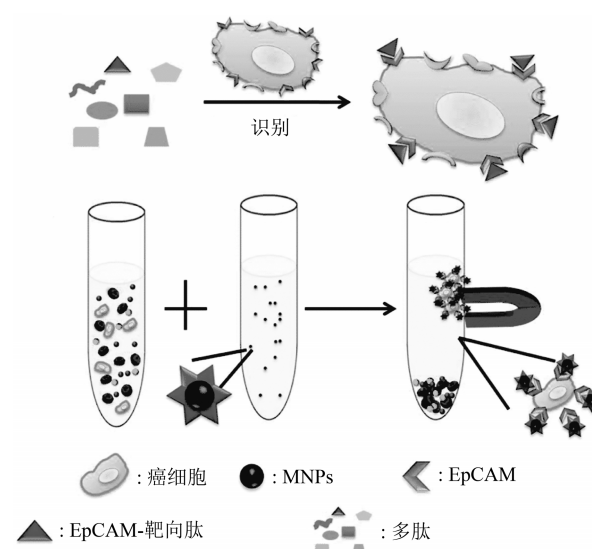


Fig. 5 Schematic diagram of CTC captured by magnetic nanoparticles coupled with EpCAM-targeting peptide^[84]

图5 偶联EpCAM靶向肽的磁性纳米颗粒对CTC捕获示意图^[84]

MNP: 磁性纳米颗粒; EpCAM: 上皮细胞黏附分子.

多肽更容易穿透或接近受体, 免疫原性更低, 药代动力学性能更好^[84], 在这些方面多肽比抗体具有更明显的优势. 以多肽为基础的 CTC 分离方法可以提高分析的稳定性和重复性. 但是由于多肽序列的筛选过程复杂, 为了确保多肽能够精准识别 CTC, 需要对多肽的特异性进行反复验证, 实验工作量较大. 目前能够应用于 CTC 捕获的多肽较少, 这方面研究还有待开发.

2 功能化纳米材料与微流控对CTC捕获

微流控技术最早出现于 20 世纪 80 年代初, 随后应用于喷墨打印头、微推进、微流控芯片等方向. 微流控芯片可以在小尺度 (通常是毫米以下) 对流体行为进行精确控制. 近年来, 微流控芯片也被开发用于体外 CTC 检测, 利用 CTC 和血细胞之间的生物学差异, 微流控平台可以从数百万个血细胞中精确分离到 CTC. 例如抗体功能化的鱼骨形芯片^[88]、介电泳芯片^[89]、横向磁力芯片^[90]等. 随着纳米技术的发展, 一些新型纳米材料也可以集成到

芯片中, 使细胞的分离和处理更加便捷高效. 纳米材料修饰的微流控芯片是通过改变基底的结构和功能来提高其与细胞的接触频率从而提高捕获效率, 这种方法延长了基底与细胞的接触时间, 使抗体能更充分地识别细胞表面蛋白质. 而功能化纳米材料与微流控芯片结合的方式是将捕获分两步走, 充分发挥两者各自的优势, 利用纳米材料对 CTC 进行捕获, 再利用微流控技术进行筛选, 确保捕获 CTC 的准确性.

2.1 纳米材料修饰微流控芯片

高精度的研究已经进入到更小尺寸的流体芯片中, 这些芯片通常由金属、聚合物和玻璃制成^[91]. 而磁性纳米颗粒、金纳米球、TiO₂纳米纤维等已被报道可高效捕获 CTC, 将此类纳米材料修饰到微流控芯片中, 不仅可以极大地提高捕获效率, 还能够快速便捷地对 CTC 进行计数检测. 微流控芯片的修饰从无到有的飞跃也快速推动着 CTC 临床产业的发展, 为早日实现临床检测奠定了良好的基础.

最传统的微流控器件制备主要是利用聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 和其他热塑性材料^[92]. PDMS 是一种广泛应用于微流控器件和纳米结构平台的高分子材料, 具有成本低、易加工、透明度高、弹性好等优点. 最早 Stott 等^[88] 制备了一种人字骨形芯片 (图 6a) 用于对 CTC 捕获, 该芯片是由附着在 PDMS 上的 13 个玻片组成, 上面刻有人字骨形图案, 通过骨形回沟产生一个涡旋增强其与抗体的接触来提高捕获效率. 随着纳米技术的发展, 一些功能化的纳米材料修饰到芯片上, 使捕获效率再次得到提升. He 等^[93] 制备了多功能化纳米管电穿孔微流控芯片, 在纳米管的外壁上有大量的纳米分支, 可与特异性抗体结合对 CTC 进行有效捕获, 但是该捕获方式限制较大, 只能对细胞进行静态捕获, 因此捕获效率提升较低. 氧化石墨烯 (GO) 是一种很有前途的纳米材料, 它具有很高的生物相容性, 而且易于对抗体改性. Yu 等^[94] 报道了一种由 GO 修饰的磁性镍纳米柱 (NiMPs) 装置 (图 6b), 通过磁可控方式捕获和释放癌细胞. GO 纳米突起增加了癌细胞和微柱表面之间的拓扑作用, 同时抗体改性 GO 在 NiMPs 上的高密度填充增加了抗体的局部浓度, 上述两方面协同配合提高了对癌细胞的有效捕获. 在此基础上, Yoon 等^[95] 对石墨烯材料进行改进, 在基板上使用功能化 GO 纳米片对 CTC 进行捕获. 硅基板有 58 957 个花形金制图案,

行列内各图案之间的距离为 150 μm , PDMS 层形成高度为 50 μm 、总容积为 45 μl 的微流控腔, GO 纳米薄片被吸附到图案金表面, 利用抗体相互作用对 CTC 进行捕获 (图 6c). 石墨烯纳米材料修饰微流控基底的方法有效提高了 CTC 与抗体的接触频率, 实现对微流体精准控制的同时增加捕获效率.

通常影响微流控芯片捕获效率的主要是两个基本参数: 流速和剪切力. 流速影响细胞与微柱接触的时间, 剪切力影响细胞对微柱的附着力, 只有当流速与剪切力适中时才能确保细胞的捕获效率^[96]. 基于以上特点, Wang 等^[97] 搭建了一个新的 CTC 捕获平台, 该平台由两个功能组件组成, 一是抗体包被的硅纳米柱 (SiNP) 基板, 二是带有蛇形通道的 PDMS 芯片 (图 6d). SiNP 经化学蚀刻法镶嵌在蛇形图案上, PDMS 芯片具有 88 μm 长的循环通道, 可以精准控制流速和剪切力, 当含有 CTC 的血液样本流过该设备时, 混合器可以诱导血液的垂流, 导致细胞与 SiNP 衬底之间的接触频率增加, 从而提高捕获效率. 该方法巧妙地利用蛇形通道控制流速和剪切力, 使细胞最大程度地与抗体接触. 纳米材料修饰微流控芯片的方法为细胞捕获开创了新平台, 为细胞下游分析奠定了基础.

除此之外, 目前也有报道利用静电纺丝技术生产的纳米纤维也可用作 CTC 捕获衬底. 电纺丝纳米纤维易于制备, 具有较大的比表面积和高孔隙率, 在物理化学性质上与细胞外基质及其相似, 因此通过对微流控芯片进行修饰, 使捕获效率得到了明显提升. Xu 等^[98] 利用透明质酸功能化的 PLGA 纳米纤维对微流控芯片进行修饰, 实验发现在恒定的介质灌注条件下, 捕获的 HeLa 细胞可以在微芯片纳米纤维膜上连续生长数天, 但不影响细胞的生存能力. 这是首次在芯片装置中使用功能化电纺丝纳米纤维进行癌细胞捕获和培养的试验. 随后该小组的 Wang 等^[99] 又将透明质酸功能化的壳聚糖纳米纤维嵌入到微流控芯片中, 该装置可用于 CTC 的高特异性捕获和非破坏性释放. 结果表明, 经过连续的表面改性后, 形成的纳米纤维仍然保持光滑的纤维形态, 具有良好的血液相容性, 以 1.0 $\mu\text{l}/\text{h}$ 的流速捕获癌细胞, 效率可达 91%. 纳米纤维修饰的微流控芯片不仅能提高捕获效率, 还可对细胞进行分型. Zhu 等^[100] 开发了一种适配体修饰的 PEG-PLGA-nanofiber (PPN) 微流控系统, 该系统可快速、准确地识别 CTC 的罕见亚型, 基于适配体的

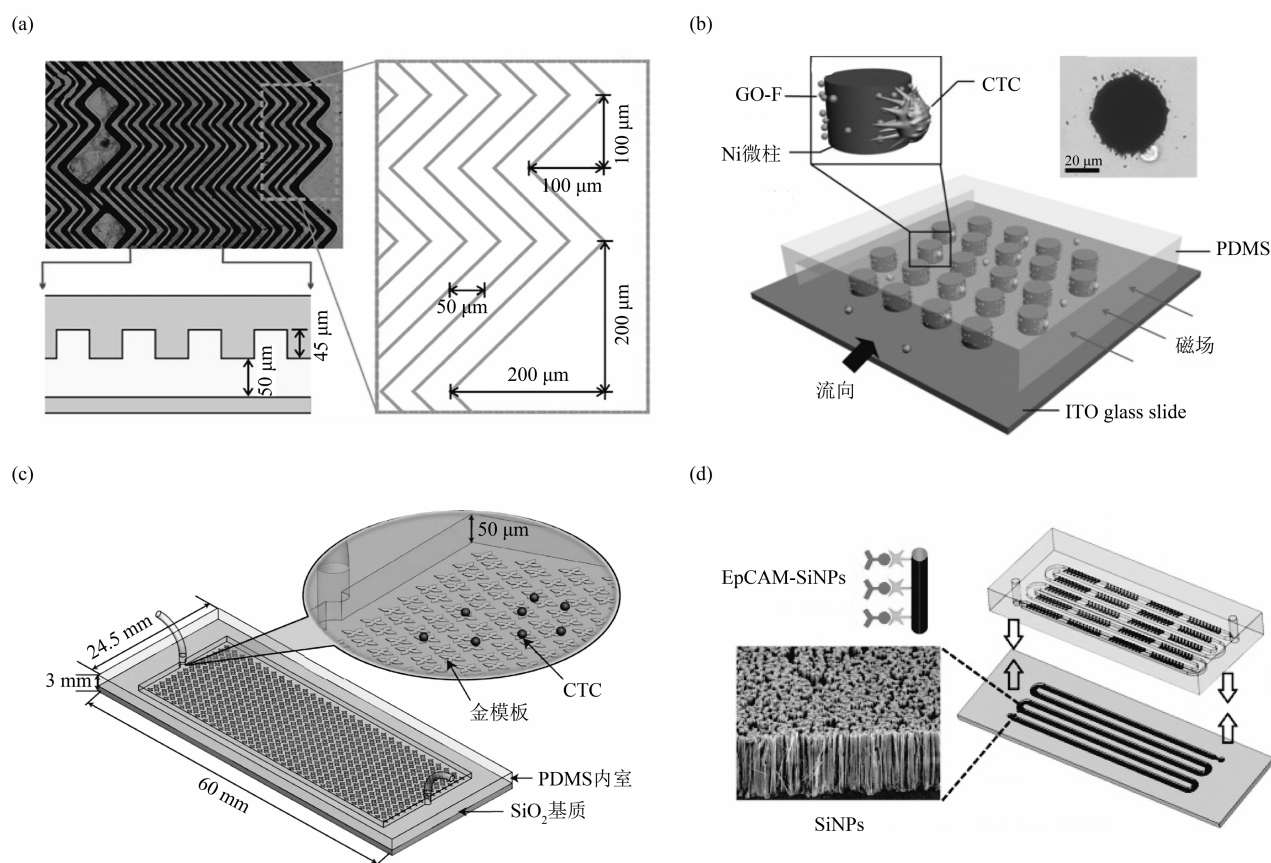


Fig. 6 CTC captured by different nanostructured chips

图6 不同纳米结构芯片对CTC捕获

(a) 人字骨性芯^[88]. (b) GO修饰的磁性镍纳米柱^[94]. (c) 刻有金图案的氧化石墨烯薄片^[95]. (d) 蛇形硅纳米柱^[97]. GO-F: 氧化石墨烯-四氧化三铁纳米粒子; CTC: 循环肿瘤细胞; PDMS: 聚二甲基硅氧烷; ITO glass slide: 氧化锡玻璃片; EpCAM: 上皮细胞黏附分子; SiNP: 硅纳米柱.

PPN微流控系统已应用于肺癌患者的血样中且表现出良好的细胞捕获效率和较高的细胞存活率. 综上所述, 经过纳米材料修饰的微流控芯片展示出较高的捕获效率.

2.2 功能化纳米材料与微流控芯片结合

利用微流控技术分离和纯化CTC具有样本量小、成本低、检测灵敏度高、吞吐量高等优点^[101]. 纳米材料因其高表面积、大体积比并且与生物分子尺寸相似等性能, 极大地提高了生物分子检测的灵敏度. 目前已有大量文章对纳米材料、微流控技术捕获CTC有所研究, 将纳米材料与微流控技术结合对CTC进行双重捕获, 能显著提高捕获效率. 目前研究较多的是磁性纳米材料与微流控技术结合, 利用纳米磁珠的磁性与微流控芯片中磁场的相互作用对CTC进行捕获, 减少因纳米磁珠特异性不足导致的假阳性, 提高检测准确度.

Park等^[90]设计了一种基于横向磁泳力的新型

CTC分离装置(图7a), 该装置利用纳米磁珠靶向癌细胞进入微流控芯片, 芯片底部是将60 μm厚、100 μm宽的Ni-Co软磁线阵列镶嵌在玻璃基板底部, 用来产生横向磁泳力, 增强对靶细胞的磁力. 在磁泳力作用下与纳米磁球结合的细胞运动轨迹会发生改变, 从而进行捕获. 实验证明只需要10 min就可以处理400 ml的人体血液. 该方法操作简单, 使其成为可大规模生产的临床工具, 用于癌症诊断、预后和个性化医疗. Han等^[102]在横向磁泳力芯片上又增加了一个细胞阻抗仪, 使用石墨烯纳米板(GNPs)作为与细胞表面结合的高导电性材料, 通过GNPs修饰CTC造成的相位差, 对富集的CTC进行鉴别, 使捕获精准度再次提高.

除了磁泳力芯片外, 漏斗收缩阵列式芯片也可高效地对CTC进行捕获. 基于生物力学性质的细胞分离, 如大小和变形能力, 比基于亲和捕获的分离方法有一些关键的优势, 前者可避免使用细胞表面

标记, 以及分离活细胞时对细胞的机械压力. 基于过滤方法的微流控装置使样品通过一系列的微尺度收缩, 利用尺寸和变形能力不同对细胞进行分离. Mcfaul 等^[103]报道过一种二维排列的微流体棘轮, 根据细胞的大小和变形性进行排序和分离, 但是该平台需要对微小部件定期清除以避免阻塞. 为了克服该缺点, 随后 Lin 等^[104]利用棘轮机制创建了一个自动微流控平台, 该平台能够根据细胞的大小和可变形性从背景白细胞中分离和提取罕见的癌细胞. 在此基础上 Wu 等^[105]又进行了创新, 将纳米

磁球与漏斗阵列式芯片结合 (图 7b), 通过 CdSe/ZnS 量子点 (QDs) 和 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 磁性粒子制成不同光致发光的双编码纳米球, 分别用两种不同的抗体标记, 通过磁性富集后进入微流控通道, 通道进口为 $20\text{ }\mu\text{m}$, 出口为 $8\text{ }\mu\text{m}$, 由于肿瘤细胞体积较大, 再加上表面有纳米磁球吸附, 因此被截留在通道内. 然而白细胞和未结合的纳米磁球被过滤出去, 从而对 CTC 进行高纯度捕获, 捕获后的细胞可进行后续分析.

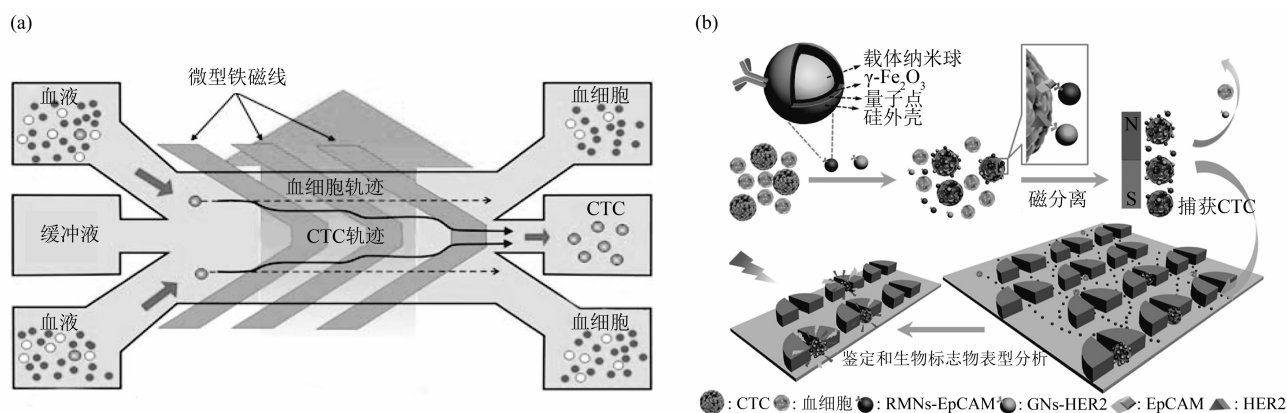


Fig. 7 Schematic diagram of CTC captured by the combination of functionalized nanomaterials and microfluidic chips

图7 功能化纳米材料与微流控芯片结合对CTC的捕获示意图

(a) 磁性纳米材料与横向磁力芯片对CTC捕获^[90]. (b) 磁性纳米材料与漏斗阵列式芯片对CTC捕获^[105]. CTC: 循环肿瘤细胞; RMN: 红色荧光磁性纳米粒子; EpCAM: 上皮细胞黏附分子; GN: 绿色荧光磁性纳米粒子; HER2: 人表皮生长因子受体2.

3 基于功能化纳米材料的CTC检测

除了有效的富集外, CTC的检测同样重要. 人全血是一种由红细胞、白细胞、血小板等成分组成的复杂液体. 其中红细胞容易干扰CTC的识别, 同时大量白细胞也很大程度上增加了捕获难度, 因此有必要进一步对捕获的癌细胞进行检测和分析. 目前, 对CTC检测应用较为广泛的方法是通过免疫细胞化学鉴定, 但该方法需要对细胞进行固定和渗透, 这可能会破坏细胞活力和细胞功能, 也可能导致CTC丢失. 新材料的研发成为CTC检测的重中之重, 纳米材料优良的电学、光学等特性成为CTC检测的首选材料.

3.1 基于纳米材料的电化学分析

电化学免疫传感器以其简单、低成本的特点广泛应用于实验室和临床分析领域. 电化学免疫传感器是将固定化识别分子偶联在电极表面, 选择性附着分析物, 通过表面的电压或电流变化来感知这种

附着^[106]. 电化学生物传感器通常由两个或三个电极组成: 工作电极、参比电极和对电极. 多数情况下是将生物识别元件如抗体、适配体等固定在电极表面, 对癌细胞进行识别捕获, 通过相互作用产生的电信号对分析物进行鉴别或定量. 这些电化学免疫传感器将会成为CTC检测的一种很好的替代方法, 能极大地促进CTC检测的发展. 表1列举了几种不同纳米材料电化学传感器的检出限和线性范围.

电化学发光分析法 (ECL) 具有灵敏度高、仪器设备简单、操作方便等特点, 已广泛地应用于化学、生物、医学、环境分析等领域. 金属团簇、量子点、石墨烯、金属氧化物等用作信号载体、催化剂或发光体在ECL传感器中起放大信号的作用^[107]. Liu 等^[108]利用金碳点纳米合金 (Au@CDs) 来增强ECL信号 (图8), 利用适配体对细胞进行捕捉, 通过对电流的响应信号对CTC进行定量. 金纳米粒子比表面积大, 具有良好的导

电性和催化活性. 碳点是一种新型碳纳米材料, 具有发光效率高、毒性低、稳定性好等优点. 与单个碳点相比, Au@CDs 的 ECL 强度增大了 12 倍, 二者结合极大地提高了检测灵敏度. 另外, Feng 等^[109] 利用金纳米颗粒修饰的氮化碳纳米薄片 (AuNPs@CNNS) 二维纳米材料优良的电化学性能对 CTC 表面多糖进行检测. 该方法原理是利用 AuNPs@CNNS 为阴极, 金纳米颗粒作为阳极探针, 构建了 ECL 传感器. 由于 CTC 的空间位阻效应, 阴极 ECL 信号明显降低. 同时阳极探针识别

CTC 表面多糖后, 阳极 ECL 信号增加, 通过测量阳极和阴极 ECL 信号的强度比值, 可以灵敏地检测 CTC. 实验结果显示: 阳极 ECL 信号与阴极 ECL 信号之比与 CTC 浓度呈线性响应, 检测范围广, 实现了对细胞浓度的高灵敏测定, 以及对细胞表面多糖表达的准确分析. 与单信号法相比, 这种双电位比 ECL 方法在分析应用中更有优势, 特别是在对细胞等复杂生物样品的分析中. 该方法可以减小因环境变化引起的误差, 提供更准确的测量结果.

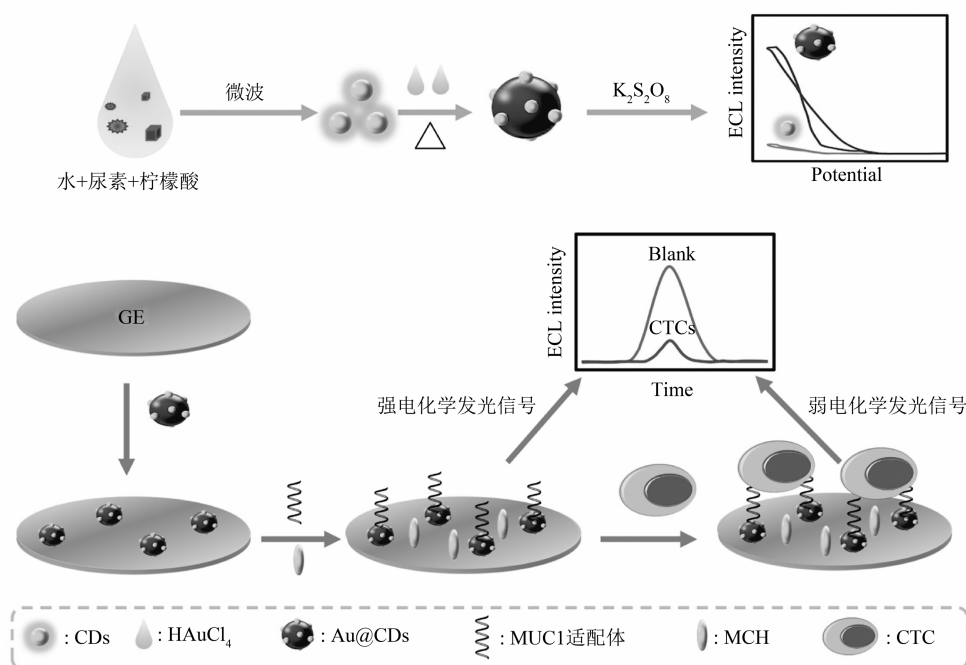


Fig. 8 Schematic diagram of the detection of CTC by AuNPs@CNNS^[107]

图8 金碳点纳米合金对CTC的检测示意图^[107]

GE: 金电极; CD: 碳点; HAuCl₄: 氯金酸; MUC1: 附膜蛋白; MCH: 巯基己醇; CTC: 循环肿瘤细胞.

为了提高电化学的检测灵敏度, Yang 等^[110] 通过对电极固定环状 DNA 复合物进行滚动环扩增, 再用抗体和辣根过氧化物酶偶联金纳米颗粒 (anti-EpCAM/HRP-AuNP) 作为信号探针. 当癌细胞被捕获时, 触发酶催化反应, 产生放大的电流响应, 用于 CTC 的灵敏检测. Miao 等^[66] 将金纳米粒子与多足 DNA 结合设计了单细胞生物传感器, 当多足 DNA 在电极上行走时导致电流降低. 实验结果显示, 随着 CTC 数目增多, 多足 DNA 位点被 CTC 占据, 导致能够行走的多足 DNA 减少, 峰电流下降. Qu 等^[111] 将两种不同的适配体同时偶联到玻碳电极表面. 实验结果证明, 与单适配体修饰策略相比, 双适配体修饰方法的灵敏度有所提高.

此外, 三明治式生物传感器通过信号放大技术也可增加检测灵敏度. Liu 等^[112] 成功制备了一种基于抗体修饰的磁珠和黑磷结合金纳米颗粒适配体 (BP@AuNPs@适配体) 的超灵敏三明治式生物传感器 (图 9a). BP@AuNPs@适配体, 用作电化学信号探针, BP 和磷氧化物均能与钼酸盐反应形成氧化钼磷酸并产生电化学电流, 导致双信号放大, 从而提高电化学检测灵敏度. 该小组 Zhang 等^[113] 也制备了类似的三明治式生物传感器. 与 Liu 不同的是, 他们采用金纳米颗粒修饰的磷酸铁锂 (LiFePO₄/Au) 作为电化学标签, 通过 LiFePO₄ 与钼酸盐反应生成氧化钼磷酸产生电信号. 利用 LiFePO₄ 作为信号探针 (图 9b), 不仅可以拓展锂

离子电池材料的应用, 还可以拓展生物传感领域的应用. Shen 等^[114] 用 EpCAM 修饰的磁纳米球对 CTC 进行捕捉后再将 MUC1 适配体连到细胞表面形成三明治式结构, 利用滚环扩增技术对 DNA 产生的电信号进行放大. Zhou 等^[115] 利用酪胺信号放大技术 (TSA) 制备了三明治式生物传感器 (图 9c). 该方法的原理是采用铂纳米粒子@辣根过氧化物酶@适配体 (Pt NPs@HRP@CP) 复合材料作为催化探针, 酪胺功能化配位聚合物 (ICPs@Tyr) 作为电活性信号标签, ICPs@Tyr 可在 Pt NPs@HRP@CP 的催化作用下逐层沉积在靶细胞膜上, 通过三明治反应在电极上形成生物偶联物, 在 CTC 存在的情况下, 组合的 Pt NPs@HRP 催化 H₂O₂ 还原, 产生大量 O₂, 从而使 ICPs 的还原峰值

电流明显增大. 根据电流变化, 可用微分脉冲伏安法 (DPV) 对 CTC 数量进行检测. 这种三明治式生物传感器极大地提高了分析灵敏度和检测效率.

Table 1 Detection limits and linear ranges of electrochemical sensors with different nanomaterials
表1 不同纳米材料电化学传感器的检出限和线性范围

材料	细胞	检出限 个/ml	检测范围/ cell
AuNPs ^[66]	CCRF-CEM	1	5~5×10 ³
Au@CDs ^[108]	MCF-7	34	10 ² ~10 ⁴
AuNPs@CNNS ^[109]	MCF-7	20	10 ² ~10 ⁶
HRP-AuNP ^[110]	MCF-7	25	10 ² ~5×10 ⁴
BP@AuNPs ^[112]	MCF-7	2	10 ² ~10 ³
LiFePO ₄ /Au ^[113]	MCF-7	1	3~10 ⁴
Pt NPs@HRP@CP ^[115]	HeLa	2	2~2×10 ⁴

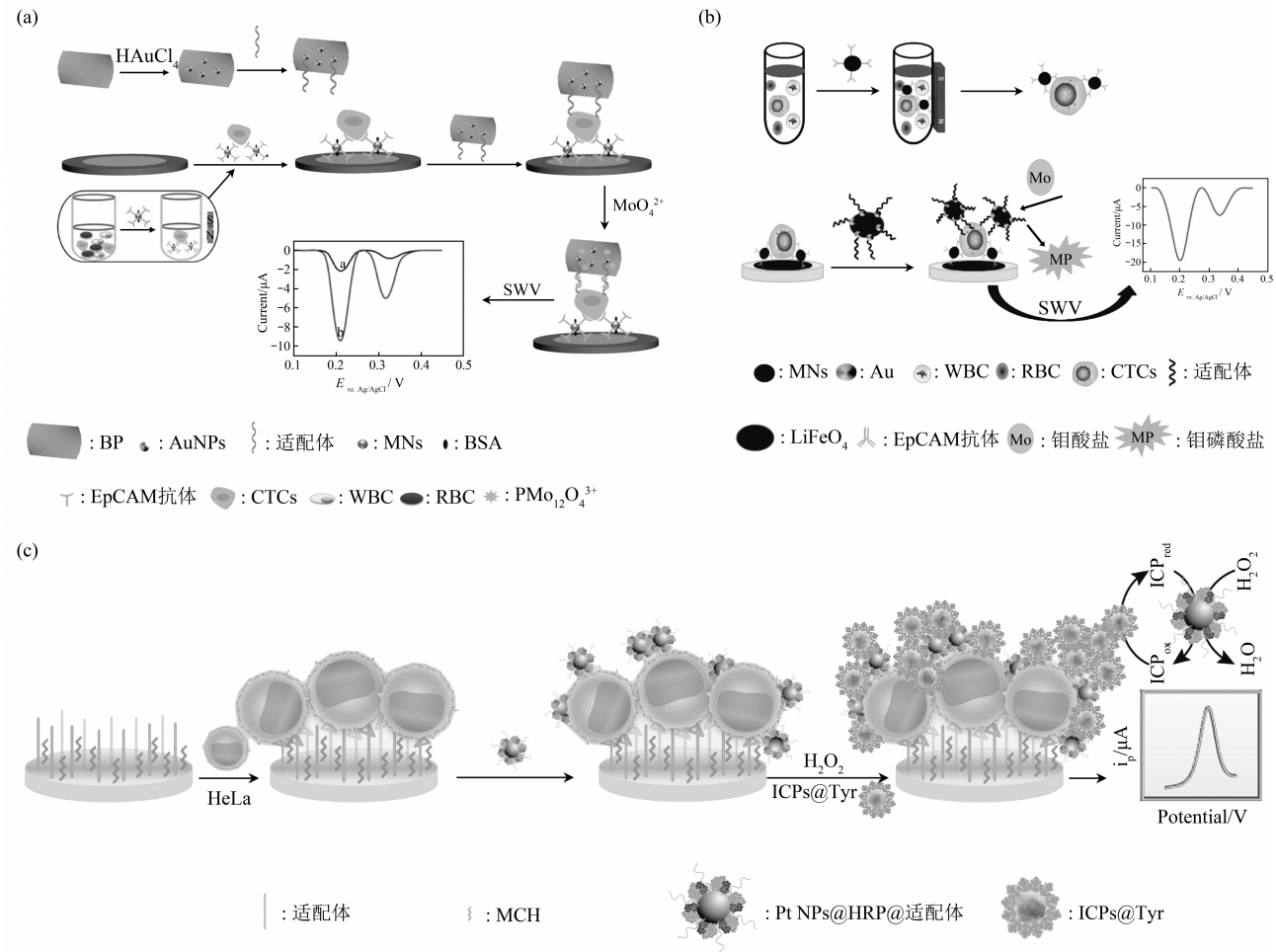


Fig. 9 Schematic diagram of the sandwich biosensor for CTC detection
图9 三明治式生物传感器对CTC的检测示意图

(a) BP@AuNPs@适配体^[112]. (b) LiFePO₄/Au^[113]. (c) Pt NPs@HRP@适配体^[115]. HAuCl₄: 氯金酸; SWV: 方波伏安法; BP: 黑磷; AuNP: 金纳米颗粒; MN: 磁性纳米粒子; BSA: 牛血清白蛋白; EpCAM: 上皮细胞黏附分子; CTC: 循环肿瘤细胞; WBC: 白细胞; RBC: 红细胞; ICP: 酪胺功能化配位聚合物; ICPred: 酪胺功能化配位聚合物还原态; ICPox: 酪胺功能化配位聚合物氧化态; MCH: 巯基己醇; Pt NPs: 铂纳米粒子; HRP: 辣根过氧化物酶; ICPs@Tyr: 酪胺功能化配位聚合物.

3.2 基于纳米材料的光学分析

光学分析作为一种灵敏度高、重复性好、快速高效的分析方法,在生物分析技术中得到广泛的应用.光学生物传感器是目前研究较为广泛、发展较快的传感器之一,可用光学材料与生物识别元件如抗原、抗体、核酸、酶、受体等的相互作用进行光学检测^[116].最早利用光学技术对CTC进行检测是利用化学发光法,Bi等^[117]、Cao等^[118]通过鲁米诺与 H_2O_2 反应,利用化学发光对CTC进行检测,但是该方法对体系环境要求高、选择性差,因此需要引入新的材料进行改进.

3.2.1 纳米材料的发光特性

常见的具有发光性能的纳米材料通常有纳米颗粒、金属团簇、量子点、上转换发光纳米粒子等.Sobral-Filho等^[119]利用金纳米壳具有较大散射截面的优点,可直接在暗场显微镜下进行观察,从而实现

光特性及良好的光猝灭性,使其在传感器设计中受到极大的关注.Viraka等^[120]开发了一种适配体修饰的多孔氧化石墨烯膜,用于多色荧光成像识别不同类型的CTC.Yu等^[121]制备了石墨化氮碳量子点(g-CNQDs)与金纳米团簇(AuNCs)的比率荧光探针,对CTC进行检测(图10).g-CNQDs与AuNCs荧光强度比值变化还可作为CTC的定量指标.近红外探针具有更好的光穿透能力的特性,Ding等^[122]利用适配体修饰的 Ag_2S 纳米点,通过杂交链反应成功制备了近红外荧光 Ag_2S 纳米探针.该探针较窄的带宽和良好的生物相容性,极大地提高成像灵敏度,降低血液样本的背景信号.上转换发光纳米粒子是一种能将近红外激发光转化为可见光和紫外光的发光型粒子,具有较高的光化学稳定性与较大斯托克斯位移等优点^[123].Fang等^[124]使用适配体结合的上转换发光纳米粒子作为探针来识别肿瘤细胞,通过荧光成像对细胞进行鉴定.

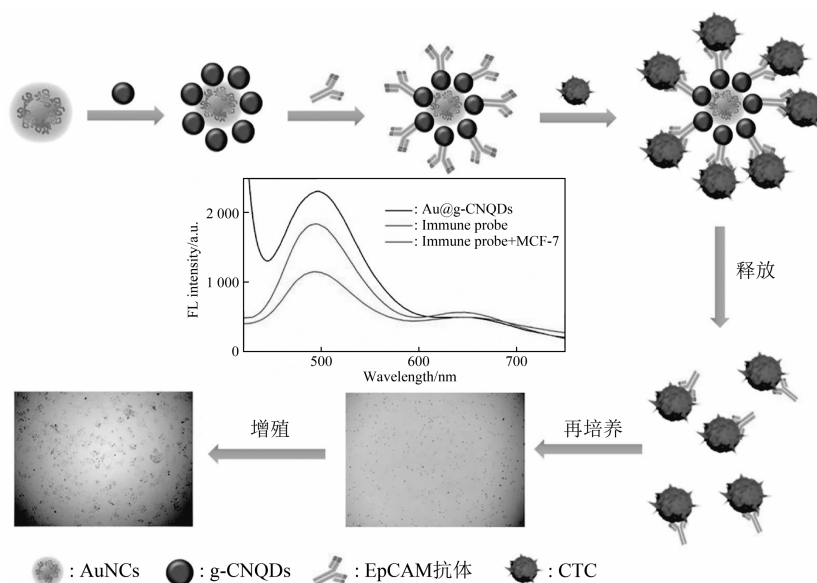


图10 Schematic diagram of ratiometric fluorescence probe for CTC detection^[121]

图10 比率荧光探针检测CTC示意图^[121]

g-CNQDs: 石墨化氮碳量子点; Immune probe: 免疫探针; AuNCs: 金纳米团簇; EpCAM: 上皮细胞黏附分子; CTC: 循环肿瘤细胞.

3.2.2 纳米材料的光动力及光热特性

复杂基体的自荧光和散射是CTC识别的主要干扰因素.近红外光(NIR)发射材料对组织有很高的穿透深度,对细胞的光损伤较小^[125-126].Xu等^[127]制备了一种NIR驱动的荧光纳米材料,该纳米材料中的铂纳米颗粒分布在壳内,在近红外照射下,由于铂纳米颗粒的不对称分布产生局部热泳力推动纳米材料运动,它可以直接在全血中高精度、

安全的捕获和检测CTC.Wang等^[128]制备了基于NIR的生物平台可以对CTC进行捕获和释放,该平台表面用二硫化钼纳米粒子(MoS_2 NFs)和凝胶修饰,由于 MoS_2 NFs具有良好的光热效应,在808 nm近红外光照射下, MoS_2 NFs可以将近红外光转化为热,将CTC释放.

3.2.3 纳米材料的光学力特性

光学力体现了光与物质的相互作用.光学力技

术近年来在细胞分离方面有很大进展, Hu等^[129]利用声学和光学力结合技术对白细胞亚型进行了分离. 由于肿瘤细胞和白细胞的光学常数相似, 因此对于CTC的分离仍然具有挑战. Hu等^[130]巧妙地将靶向分子结合技术与光学力分离技术相结合, 实现了对CTC的精确、无创分离. 细胞的折射率和体积是决定光学力的关键因素, 由于红细胞具有较大的折射率^[131], 通过将多个同源红细胞与肿瘤细胞结合, 增加肿瘤细胞的光学常数, 利用红外激光的光力可以准确地将CTC与其他细胞区分开来. 与磁珠相比, 红细胞来自同一供体, 创新性地避免了外来物质的引入. 此外, 红细胞易于获得, 且易于从肿瘤细胞中清除, 是一种理想的生物友好型临床应用材料.

3.2.4 纳米材料的表面增强拉曼光谱特性

表面增强拉曼光谱(SERS)是一种先进的振动光谱技术, 由于其灵敏度高、生物相容性好、稳定性强等优点, 已成为常用的检测和光学分析方法^[132]. 与其他光谱技术相比, SERS可以得到清晰的指纹样光谱模式, 减少复杂血样中细胞和蛋白质的干扰, 为CTC的检测和识别提供强有力的光谱技术.

SERS技术利用贵金属纳米粒子的独特性, 极大地放大单分子的光谱信号, 它已经发展成为一种超灵敏的、通用的分析技术, 可以用于分子水平上的表征^[133].

Wang^[132]等制备了EGFR肽为靶向配体的SERS金纳米颗粒, 通过SERS光谱直接检测血液中的CTC. 在785 nm激光照射下, 用SERS光谱记录靶向纳米颗粒的数量. 随后, Sha等^[134]研发了SERS标签, 由一个或多个具有SERS活性的金属纳米颗粒, 再嵌入一个保护性的二氧化硅涂层中, 利用SERS技术对全血中癌细胞进行检测. Nima等^[135]制备了一种基于SERS的四色镀银金纳米棒对CTC进行多重靶向和多色识别(图11a), 每种颜色的纳米棒上分别结合不同乳腺癌细胞表面的生物学标志物, 在拉曼共聚焦显微镜下观察同一个细胞的四色标记, 通过记录SERS峰对CTC进行检测. 与传统的金纳米棒相比, 该双金属纳米棒的SERS信号提高了两个数量级, 并能够克服样品自荧光, 具有良好的特异性.

通常, 纳米颗粒的不对称形状可以诱导新的表面等离子体共振(LSPR), 在较宽范围内出现在拉曼光谱中, SERS主要是电磁增强的结果, 纳米粒

子的不对称形状可以增强电磁强度. 因此, 形状是提高贵金属纳米粒子LSPR和SERS信号的一个非常重要的因素. Wu等^[136]采用两步法制备了粒径相似、修饰相似、形状不同的金纳米球、金纳米棒、金纳米星3种纳米颗粒用于CTC检测(图11b), 该检测方法不需要对血液中的CTC进行富集, 直接检测极大提高检测效率. 由于SERS信号强度会随着金纳米颗粒不对称性的增加而增加, 实验结果显示金纳米星的灵敏性最好, 可达到1 cell/ml检测限.

然而, 具有SERS活性的纳米星在溶液中的稳定性不是很高. 如果常温贮藏时间长, 几天就会形成沉淀. 为了解决这个问题, 该课题组Ruan等^[137]制备了三角银纳米粒子(AgNPR)和超顺磁性氧化铁纳米粒子(图11c), Wu等^[138]制备了球形金纳米粒子, 3种纳米粒子表面均被还原牛血清白蛋白(rBSA)包被, rBSA不仅可以提高纳米粒子的稳定性, 还可降低对SERS强度的影响, 使其可以高效地捕获、富集、检测和释放CTC.

综上, 基于纳米材料SERS性能检测的优点主要有: a. 检测过程简单, 不需要富集步骤; b. 可同时处理多个样本, 缩短检测时间; c. 检测成本较低; d. 敏感性和特异性高. 但是该检测技术的局限性也很明显: a. 检测过程不容易实现自动化; b. 较难分离CTC, 不利于进行后续的表型鉴定和分子分析.

4 总结与展望

CTC的精准捕获、准确的定量分析和明确的分型分析可为肿瘤患者的早期诊断、预后和有效治疗提供重要依据. 近年来, 纳米技术被广泛应用于CTC的捕获和检测中. 磁性纳米材料研究较早, 但是由于磁场作用导致细胞机械强度较大, 对后续分析造成一定的影响. 随后纳米柱、纳米纤维、纳米衬底等结构相继被开发, 这些结构为细胞捕获提供了较大的比表面积, 极大地提高了捕获效率, 同时可以释放完整细胞进行下游分析. 在特异性捕获方面, CTC的研究最早是基于EpCAM抗体识别. 但随着研究深入, 研究人员发现细胞发生EMT转化过程, 间质型细胞低表达EpCAM导致细胞漏检. 因此, 通过在纳米材料表面连接靶向除EpCAM之外的其他CTC标志物的生物识别分子, 如抗体、多肽、DNA适配体等, 利用其对血液中的CTC进行识别. 随后通过纳米材料的光学、磁学、电学等

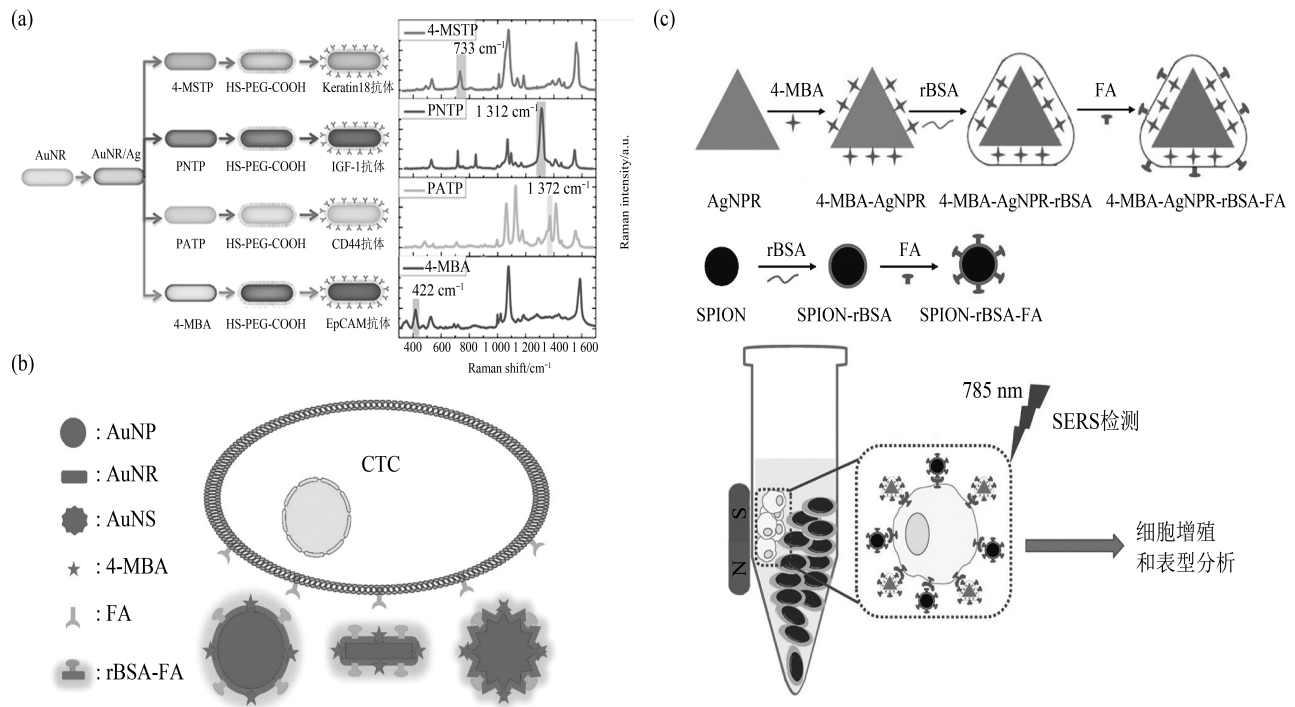


Fig. 11 Schematic diagram of SERS nanomaterials for CTC detection

图11 SERS纳米材料对CTC检测示意图

(a) 四色镀银金纳米棒对CTC检测^[135]. (b) 金纳米球、金纳米棒、金纳米星对CTC检测^[136]. (c) 三角银纳米粒子对CTC检测^[137]. AuNR: 金纳米棒; AuNR/Ag: 镀银金纳米棒; 4-MSTP: 对甲硫基苯硫酚; HS-PEG-COOH: 巯基-聚乙二醇-羧基; keratin18: 角蛋白18; PNTp: 对硝基硫酚; IGF-1: 胰岛素样生长因子1; PATP: 对氨基苯硫酚; 4-MBA: 4-巯基苯甲酸; EpCAM: 上皮细胞黏附分子; AuNP: 金纳米颗粒; AuNS: 金纳米星; FA: 叶酸; rBSA: 还原性牛血清白蛋白; CTC: 循环肿瘤细胞; AgNPR: 三角银纳米粒子; SPION: 超顺磁性氧化铁纳米粒子.

特性对捕获的 CTC 进行检测, 将极大提高 CTC 的捕获与分析效率. 此外, 将微流控技术与纳米材料结合, 可极大提高 CTC 的富集效率. 微流控可对微量液体进行精确控制, 减少血液用量, 为临床癌症监测提供了极大的便利. 未来有望从血液检测到单细胞分析, 纳米材料可做到一站式解决, 为 CTC 检测技术的临床应用奠定良好的材料基础. 除了纳米技术外, 一些新的检测方法也在应运而生, 如偏振光检测法^[139], 有望可无损伤、无标记、快速的检测 CTC. 综上所述, 建立简单、快速、稳定、低成本、高性能的分析技术仍然是 CTC 捕获与检测分析的研究趋势.

参考文献

- [1] Park E S, Jin C, Guo Q, *et al.* Continuous flow deformability-based separation of circulating tumor cells using microfluidic ratchets. *Small*, 2016, **12**(14): 1909-1919
- [2] Ferreira M M, Ramani V C, Jeffrey S S. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*, 2016, **10**(3): 374-394
- [3] Lambert A W, Pattabiraman D R, Weinberg R A. Emerging biological principles of metastasis. *Cell*, 2017, **168**(4): 670-691
- [4] Ashworth T R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J*, 1869, **14**: 146-149
- [5] Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*, 2014, **14**(9): 623-631
- [6] Jin C, Mcfaul S M, Duffy S P, *et al.* Technologies for label-free separation of circulating tumor cells: from historical foundations to recent developments. *Lab Chip*, 2014, **14**(1): 32-44
- [7] Navin N, Kendall J, Troge J, *et al.* Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*, 2011, **472**(7341): 90-94
- [8] Shin S H, Bode A M, Dong Z. Addressing the challenges of applying precision oncology. *NPJ Precis Oncol*, 2017, **1**(1): 28
- [9] Rossi E, Fabbri F. CTCs 2020: great expectations or unreasonable dreams. *Cells*, 2019, **8**(9):989
- [10] Shishido S N, Carlsson A, Nieva J, *et al.* Circulating tumor cells as a response monitor in stage IV non-small cell lung cancer. *J Transl Med*, 2019, **17**(1): 294
- [11] Renier C, Pao E, Che J, *et al.* Label-free isolation of prostate circulating tumor cells using vortex microfluidic technology. *NPJ Precis Oncol*, 2017, **1**(1): 15
- [12] Po J W, Roohullah A, Lynch D, *et al.* Improved ovarian cancer EMT-CTC isolation by immunomagnetic targeting of epithelial EpCAM and mesenchymal N-cadherin. *J Circ Biomark*, 2018,

- 7:1849454418782617
- [13] Marks H L, Pishko M V, Jackson G W, *et al.* Rational design of a bisphenol a aptamer selective surface-enhanced raman scattering nanoprobe. *Analytical Chemistry*, 2014, **86**(23): 11614-11619
 - [14] Wu S, Gu L, Qin J, *et al.* Rapid label-free isolation of circulating tumor cells from patients' peripheral blood using electrically charged Fe₃O₄ nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(4): 4193-4203
 - [15] Panchapakesan B, Caprara R, Velasco V, *et al.* Micro- and nanotechnology approaches for capturing circulating tumor cells. *Cancer Nanotechnol*, 2010, **1**(1-6): 3-11
 - [16] Kim T H, Lim M, Park J, *et al.* FAST: Size-selective, clog-free isolation of rare cancer cells from whole blood at a liquid-liquid interface. *Anal Chem*, 2017, **89**(2): 1155-1162
 - [17] Hofman V J, Ilie M I, Bonnetaud C, *et al.* Cytopathologic detection of circulating tumor cells using the isolation by size of epithelial tumor cell method: promises and pitfalls. *Am J Clin Pathol*, 2011, **135**(1): 146-156
 - [18] Tan S J, Lakshmi R L, Chen P, *et al.* Versatile label free biochip for the detection of circulating tumor cells from peripheral blood in cancer patients. *Biosens Bioelectron*, 2010, **26**(4): 1701-1705
 - [19] Sun N, Li X, Wang Z, *et al.* High-purity capture of CTCs based on micro-beads enhanced isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) method. *Biosens Bioelectron*, 2018, **102**: 157-163
 - [20] Chiang C S, Kao Y C, Webster T J, *et al.* Circulating tumor-cell-targeting Au-nanocage-mediated bimodal phototherapeutic properties enriched by magnetic nanocores. *J Mater Chem B*, 2020, **8**(25): 5460-5471
 - [21] Lu N N, Xie M, Wang J, *et al.* Biotin-triggered decomposable immunomagnetic beads for capture and release of circulating tumor cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, **7**(16): 8817-8826
 - [22] Edd J F, Mishra A, Dubash T D, *et al.* Microfluidic concentration and separation of circulating tumor cell clusters from large blood volumes. *Lab Chip*, 2020, **20**(3): 558-567
 - [23] Green B J, Nguyen V, Atenafu E, *et al.* Phenotypic profiling of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer patients using nanoparticle-mediated ranking. *Anal Chem*, 2019, **91**(15): 9348-9355
 - [24] Loeian M S, Mehdi Aghaei S, Farhadi F, *et al.* Liquid biopsy using the nanotube-CTC-chip: capture of invasive CTCs with high purity using preferential adherence in breast cancer patients. *Lab Chip*, 2019, **19**(11): 1899-1915
 - [25] Pei H, Li L, Wang Y, *et al.* Single-cell phenotypic profiling of CTCs in whole blood using an integrated microfluidic device. *Anal Chem*, 2019, **91**(17): 11078-11084
 - [26] Chen J, Liu C Y, Wang X, *et al.* 3D printed microfluidic devices for circulating tumor cells (CTCs) isolation. *Biosens Bioelectron*, 2020, **150**: 111900
 - [27] Poudineh M, Aldridge P M, Ahmed S, *et al.* Tracking the dynamics of circulating tumour cell phenotypes using nanoparticle-mediated magnetic ranking. *Nat Nanotechnol*, 2017, **12**(3): 274-281.
 - [28] Sun N, Wang J, Ji L, *et al.* A cellular compatible chitosan nanoparticle surface for isolation and *in situ* culture of rare number CTCs. *Small*, 2015, **11**(40): 5444-5451
 - [29] Sheng W A, Chen T, Tan W H, *et al.* Multivalent DNA nanospheres for enhanced capture of cancer cells in microfluidic devices. *ACS Nano*, 2013, **7**(8): 7067-7076
 - [30] Xiao L, He Z-B, Cai B, *et al.* Effective capture and release of circulating tumor cells using core-shell Fe₃O₄@MnO₂ nanoparticles. *Chemical Physics Letters*, 2017, **668**: 35-41
 - [31] 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
 - [32] Zhai T T, Ye D, Zhang Q W, *et al.* Highly efficient capture and electrochemical release of circulating tumor cells by using aptamers modified gold nanowire arrays. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, **9**(40): 34706-34714
 - [33] Wang Z, Sun N, Liu M, *et al.* Multifunctional nanofibers for specific purification and release of CTCs. *ACS Sens*, 2017, **2**(4): 547-552
 - [34] Zhao Y, Fan Z, Shen M, *et al.* Capturing hepatocellular carcinoma cells using lactobionic acid-functionalized electrospun polyvinyl alcohol/polyethyleneimine nanofibers. *RSC Advances*, 2015, **5**(86): 70439-70447
 - [35] Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, **15**(2): 261-273
 - [36] Yin J, Deng J, Wang L, *et al.* Detection of circulating tumor cells by fluorescence microspheres-mediated amplification. *Anal Chem*, 2020, **92**(10): 6968-6976
 - [37] Chang Z M, Zhou H, Yang C, *et al.* Biomimetic immunomagnetic gold hybrid nanoparticles coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for the detection of circulating tumor cells. *J Mater Chem B*, 2020, **8**(23): 5019-5025
 - [38] Nie L, Li F, Huang X, *et al.* Folic acid targeting for efficient isolation and detection of ovarian cancer CTCs from human whole blood based on two-step binding strategy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**(16): 14055-14062
 - [39] Ding P, Wang Z, Wu Z, *et al.* Natural biointerface based on cancer cell membranes for specific capture and release of circulating tumor cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(18): 20263-20270
 - [40] 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
 - [41] Wan Y, Winter M, Delalat B, *et al.* Nanostructured polystyrene well plates allow unbiased high-throughput characterization of circulating tumor cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, **6**(23): 20828-20836
 - [42] Dou X, Li P, Jiang S, *et al.* Bioinspired hierarchically structured surfaces for efficient capture and release of circulating tumor cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, **9**(10): 8508-8518
 - [43] Guo S, Xu J, Xie M, *et al.* Degradable zinc-phosphate-based hierarchical nanosubstrates for capture and release of circulating tumor cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, **8**(25): 15917-15925
 - [44] Li R, Chen F F, Liu H Q, *et al.* Efficient capture and high activity release of circulating tumor cells by using TiO₂ nanorod arrays coated with soluble MnO₂ nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**(19): 16327-16334
 - [45] Yin S, Wu Y-L, Hu B, *et al.* Three-dimensional graphene

- composite macroscopic structures for capture of cancer cells. *Advanced Materials Interfaces*, 2014, **1**(1): 1300043
- [46] Zhao R, Cai Z, Li S, *et al.* Expression and clinical relevance of epithelial and mesenchymal markers in circulating tumor cells from colorectal cancer. *Oncotarget*, 2017, **8**(6): 9293-9302
- [47] Yu M, Bardia A, Wittner B S, *et al.* Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, 2013, **339**(6119): 580-584
- [48] Cheng C A, Chen W, Zhang L, *et al.* Magnetic resonance imaging of high-intensity focused ultrasound-stimulated drug release from a self-reporting core@shell nanoparticle platform. *Chem Commun*, 2020, **56**(71): 10297-10300
- [49] Shin T H, Choi Y, Kim S, *et al.* Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging. *Chem Soc Rev*, 2015, **44**(14): 4501-4516
- [50] Sun C, Lee J S, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, **60**(11): 1252-1265
- [51] Ulbrich K, Hola K, Subr V, *et al.* Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies. *Chem Rev*, 2016, **116**(9): 5338-5431
- [52] Estelrich J, Escribano E, Queralto J, *et al.* Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. *Int J Mol Sci*, 2015, **16**(4): 8070-8101
- [53] Lori A N, Mark A, Nu A P, *et al.* T2 Magnetic resonance enables nanoparticle-mediated rapid detection of candidemia in whole blood. *Science Translational Medicine*, 2013, **5**(182): 182ra54
- [54] Bamrungsap S, Chen T, Shukoor M I, *et al.* Pattern recognition of cancer cells using aptamer-conjugated magnetic nanoparticles. *ACS Nano*, 2012, **6**(5): 3974-3981
- [55] Wang Z, Sun N, Liu H, *et al.* High-efficiency isolation and rapid identification of heterogeneous circulating tumor cells (CTCs) using dual-antibody-modified fluorescent-magnetic nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(43): 39586-39593
- [56] Yewale C, Baradia D, Vhora I, *et al.* Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials*, 2013, **34**(34): 8690-8707
- [57] Ciardiello F, Tortora G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. *Eur J Cancer*, 2003, **39**(10): 1348-1354
- [58] Ma X Y, Wu L L, Chen L, *et al.* Enhanced and high-purity enrichment of circulating tumor cells based on immunomagnetic nanospheres. *ACS Applied Nano Materials*, 2018, **1**(8): 4019-4027
- [59] Liu H, Wang Z, Chen C, *et al.* Dual-antibody modified PLGA nanofibers for specific capture of epithelial and mesenchymal CTCs. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, **181**: 143-148
- [60] Shigdar S, Lin J, Yu Y, *et al.* RNA aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule. *Cancer Sci*, 2011, **102**(5): 991-998
- [61] Krishnan Y, Seeman N C. Introduction: nucleic acid nanotechnology. *Chem Rev*, 2019, **119**(10): 6271-6272
- [62] Song Y, Zhu Z, An Y, *et al.* Selection of DNA aptamers against epithelial cell adhesion molecule for cancer cell imaging and circulating tumor cell capture. *Anal Chem*, 2013, **85**(8): 4141-4149
- [63] Yin X, Chen B, He M, *et al.* A multifunctional platform for the capture, release, and enumeration of circulating tumor cells based on aptamer binding, nicking endonuclease-assisted amplification, and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Anal Chem*, 2020, **92**(15): 10308-10315
- [64] Zheng Y, Zhang J, Huang M, *et al.* Selection of aptamers against vimentin for isolation and release of circulating tumor cells undergoing epithelial mesenchymal transition. *Anal Chem*, 2020, **92**(7): 5178-5184
- [65] Chen Y, Tyagi D, Lyu M, *et al.* Regenerative nanooctopus based on multivalent-aptamer-functionalized magnetic microparticles for effective cell capture in whole blood. *Anal Chem*, 2019, **91**(6): 4017-4022
- [66] Miao P, Tang Y. Gold nanoparticles-based multipedal DNA walker for ratiometric detection of circulating tumor cell. *Anal Chem*, 2019, **91**(23): 15187-15192
- [67] Sun N, Li X, Wang Z, *et al.* A multiscale TiO₂ nanorod array for ultrasensitive capture of circulating tumor cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, **8**(20): 12638-12643
- [68] Liu H, Sun N, Ding P, *et al.* Fabrication of aptamer modified TiO₂ nanofibers for specific capture of circulating tumor cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, **191**: 110985
- [69] Zhao Y, Zhu X, Liu H, *et al.* Dendrimer-functionalized electrospun cellulose acetate nanofibers for targeted cancer cell capture applications. *J Mater Chem B*, 2014, **2**(42): 7384-7393
- [70] Xiao Y, Lin L, Shen M, *et al.* Design of DNA aptamer-functionalized magnetic short nanofibers for efficient capture and release of circulating tumor cells. *Bioconjug Chem*, 2020, **31**(1): 130-138
- [71] Cheng Y H, Chen Y C, Lin E, *et al.* Hydro-Seq enables contamination-free high-throughput single-cell RNA-sequencing for circulating tumor cells. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 2163
- [72] Fan Z, Shelton M, Singh A K, *et al.* Multifunctional plasmonic shell-magnetic core nanoparticles for targeted diagnostics, isolation, and photothermal destruction of tumor cells. *ACS Nano*, 2012, **6**(2): 1065-1073
- [73] Chen N, Qin S, Yang X, *et al.* "Sense-and-treat" DNA nanodevice for synergetic destruction of circulating tumor cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, **8**(40): 26552-26558
- [74] Gao L, Liu M Q, Ma G F, *et al.* Peptide-conjugated gold nanoprobe: intrinsic nanozyme-linked immunosorbant assay of integrin expression level on cell membrane. *ACS Nano*, 2015, **9**(11): 10979-10990
- [75] Zhai J, Wang Y, Xu C, *et al.* Facile approach to observe and quantify the alpha(Iib)beta3 integrin on a single-cell. *Anal Chem*, 2015, **87**(5): 2546-2549
- [76] Zhang X, Liu R, Yuan Q, *et al.* The precise diagnosis of cancer invasion/metastasis via 2D laser ablation mass mapping of metalloproteinase in primary cancer tissue. *ACS Nano*, 2018, **12**(11): 11139-11151
- [77] Zhang X, Yuan Q, Gao X. Assessment of the MT1-MMP expression level of different cell lines by the naked eye. *Sci China Life Sci*, 2018, **61**(4): 492-500
- [78] Liu R, Wang Y, Yuan Q, *et al.* The Au clusters induce tumor cell apoptosis via specifically targeting thioredoxin reductase 1

- (TrxR1) and suppressing its activity. *Chem Commun*, 2014, **50**(73): 10687-10690
- [79] Li Q, Yuan Q, Zhao M, *et al.* Au nanoclusters suppress chronic lymphocytic leukaemia cells by inhibiting thioredoxin reductase 1 to induce intracellular oxidative stress and apoptosis. *Science Bulletin*, 2017, **62**(8): 537-545
- [80] Liu M, Gao L, Zhao L, *et al.* Peptide-Au clusters induced tumor cells apoptosis *via* targeting glutathione peroxidase-1: the molecular dynamics assisted experimental studies. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 131
- [81] Cong Y, Ji L, Gao Y J, *et al.* Microenvironment-induced *in situ* self-assembly of polymer-peptide conjugates that attack solid tumors deeply. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, **58**(14): 4632-4637
- [82] Lee S K, Siefert A, Beloor J, *et al.* Cell-specific siRNA delivery by peptides and antibodies. *Methods Enzymol*, 2012, **502**: 91-122
- [83] Zhai J, Zhao L, Zheng L, *et al.* Peptide-Au cluster probe: precisely detecting epidermal growth factor receptor of three tumor cell lines at a single-cell level. *ACS Omega*, 2017, **2**(1): 276-282
- [84] Bai L, Du Y, Peng J, *et al.* Peptide-based isolation of circulating tumor cells by magnetic nanoparticles. *J Mater Chem B*, 2014, **2**(26): 4080-4088
- [85] Wang W, Wang Z, Bu X, *et al.* Discovering of tumor-targeting peptides using Bi-functional microarray. *Adv Healthc Mater*, 2015, **4**(18): 2802-2808
- [86] Wang Y, Jia H Z, Han K, *et al.* Theranostic magnetic nanoparticles for efficient capture and *in situ* chemotherapy of circulating tumor cells. *J Mater Chem B*, 2013, **1**(27): 3344-3352
- [87] Chen C, Wu Z, Ding P, *et al.* Peptide NGR modified TiO₂ nanofiber substrate for circulating tumor cells capture. *Advanced Fiber Materials*, 2020, **2**(4): 186-193
- [88] 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
- [89] Chiu T-K, Chao A C, Chou W-P, *et al.* Optically-induced-dielectrophoresis (ODEP) -based cell manipulation in a microfluidic system for high-purity isolation of integral circulating tumor cell (CTC) clusters based on their size characteristics. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, **258**: 1161-1173
- [90] Park J W, Lee N-R, Cho S M, *et al.* Microdevice for separation of circulating tumor cells using embedded magnetophoresis with V-shaped Ni-Co nanowires and immuno-nanomagnetic beads. *ETRI Journal*, 2015, **37**(2): 233-240
- [91] Opoku DVY, Assanhou A G, Sooro M A, *et al.* Functional diagnostic and therapeutic nanoconstructs for efficient probing of circulating tumor cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**(17): 14231-14247
- [92] Au A K, Lee W, Folch A. Mail-order microfluidics: evaluation of stereolithography for the production of microfluidic devices. *Lab Chip*, 2014, **14**(7): 1294-1301
- [93] He G, Feng J, Zhang A, *et al.* Multifunctional branched nanostraw-electroporation platform for intracellular regulation and monitoring of circulating tumor cells. *Nano Lett*, 2019, **19**(10): 7201-7209
- [94] Yu X, He R, Li S, *et al.* Magneto-controllable capture and release of cancer cells by using a micropillar device decorated with graphite oxide-coated magnetic nanoparticles. *Small*, 2013, **9**(22): 3895-3901
- [95] Yoon H J, Kim T H, Zhang Z, *et al.* Sensitive capture of circulating tumour cells by functionalized graphene oxide nanosheets. *Nat Nanotechnol*, 2013, **8**(10): 735-741
- [96] Nagrath S, Sequist L V, Maheswaran S, *et al.* Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 2007, **450**(7173): 1235-1239
- [97] 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 Int Ed Engl*, 2011, **50**(13): 3084-3088
- [98] Xu G, Tan Y, Xu T, *et al.* Hyaluronic acid-functionalized electrospun PLGA nanofibers embedded in a microfluidic chip for cancer cell capture and culture. *Biomater Sci*, 2017, **5**(4): 752-761
- [99] Wang M, Xiao Y, Lin L, *et al.* A microfluidic chip integrated with hyaluronic acid-functionalized electrospun chitosan nanofibers for specific capture and nondestructive release of CD44-overexpressing circulating tumor cells. *Bioconjug Chem*, 2018, **29**(4): 1081-1090
- [100] Zhu Y, Zou C, Zhang J, *et al.* Dynamically monitoring the clonal evolution of lung cancer based on the molecular characterization of circulating tumor cells using aptamer cocktail-modified nanosubstrates. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(5): 5671-5679
- [101] Cetin D, Okan M, Bat E, *et al.* A comparative study on EpCAM antibody immobilization on gold surfaces and microfluidic channels for the detection of circulating tumor cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, **188**: 110808
- [102] Han S I, Han K H. Electrical detection method for circulating tumor cells using graphene nanoplates. *Analytical Chemistry*, 2015, **87**(20): 10585-10592
- [103] Mcfaul S M, Lin B K, Ma H. Cell separation based on size and deformability using microfluidic funnel ratchets. *Lab Chip*, 2012, **12**(13): 2369-2376
- [104] Lin B K, Mcfaul S M, Jin C, *et al.* Highly selective biomechanical separation of cancer cells from leukocytes using microfluidic ratchets and hydrodynamic concentrator. *Biomicrofluidics*, 2013, **7**(3): 34114
- [105] Wu L L, Tang M, Zhang Z L, *et al.* Chip-assisted single-cell biomarker profiling of heterogeneous circulating tumor cells using multifunctional nanospheres. *Anal Chem*, 2018, **90**(17): 10518-10526
- [106] Ravalli A, Voccia D, Palchetti I, *et al.* Electrochemical, electrochemiluminescence, and photoelectrochemical aptamer-based nanostructured sensors for biomarker analysis. *Biosensors (Basel)*, 2016, **6**(3): 39
- [107] Sun J, Sun H, Liang Z. Nanomaterials in electrochemiluminescence sensors. *Chem Electro Chem*, 2017, **4**(7): 1651-1662
- [108] Liu P, Wang L, Zhao K, *et al.* High luminous efficiency Au@CDs for sensitive and label-free electrochemiluminescent detection of circulating tumor cells in serum. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, **316**: 128131
- [109] Feng Y, Sun F, Chen L, *et al.* Ratiometric electrochemiluminescence detection of circulating tumor cells and

- cell-surface glycans. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2016, **781**: 48-55
- [110] Yang J, Li X, Jiang B, *et al.* *In situ*-generated multivalent aptamer network for efficient capture and sensitive electrochemical detection of circulating tumor cells in whole blood. Anal Chem, 2020, **92**(11): 7893-7899
- [111] Qu L, Xu J, Tan X, *et al.* Dual-aptamer modification generates a unique interface for highly sensitive and specific electrochemical detection of tumor cells. ACS Appl Mater Interfaces, 2014, **6**(10): 7309-7315
- [112] Liu S, Luo J, Jiang X, *et al.* Gold nanoparticle-modified black phosphorus nanosheets with improved stability for detection of circulating tumor cells. Mikrochim Acta, 2020, **187**(7): 397
- [113] Zhang W, Chen H, Yang M, *et al.* Electrochemical assay for detection of circulating tumor cells based on LiFePO₄ as electrochemical probe. Materials Letters, 2020, **276**: 128219
- [114] Shen C, Liu S, Li X, *et al.* Electrochemical detection of circulating tumor cells based on DNA generated electrochemical current and rolling circle amplification. Anal Chem, 2019, **91**(18): 11614-11619
- [115] Zhou X, Li Y, Wu H, *et al.* A amperometric immunosensor for sensitive detection of circulating tumor cells using a tyramide signal amplification-based signal enhancement system. Biosens Bioelectron, 2019, **130**: 88-94
- [116] Du Y, Dong S. Nucleic acid biosensors: recent advances and perspectives. Anal Chem, 2017, **89**(1): 189-215
- [117] Bi S, Hao S, Li L, *et al.* Bio-bar-code dendrimer-like DNA as signal amplifier for cancerous cells assay using ruthenium nanoparticle-based ultrasensitive chemiluminescence detection. Chem Commun (Camb), 2010, **46**(33): 6093-6095
- [118] Cao H X, Liu P F, Wang L, *et al.* Nonenzymatic chemiluminescence detection of circulating tumor cells in blood based on Au@luminol nanoparticles, hybridization chain reaction and magnetic isolation. Sensors and Actuators B: Chemical, 2020, **318**: 128287
- [119] Sobral-Filho R G, Devorkin L, Macpherson S, *et al.* *Ex vivo* detection of circulating tumor cells from whole blood by direct nanoparticle visualization. ACS Nano, 2018, **12**(2): 1902-1909
- [120] Viraka Nellore B P, Kanchanapally R, Pramanik A, *et al.* Aptamer-conjugated graphene oxide membranes for highly efficient capture and accurate identification of multiple types of circulating tumor cells. Bioconjug Chem, 2015, **26**(2): 235-242
- [121] Yu Y, Yang Y, Ding J, *et al.* Design of a biocompatible and ratiometric fluorescent probe for the capture, detection, release, and reculture of rare number CTCs. Anal Chem, 2018, **90**(22): 13290-13298
- [122] Ding C, Zhang C, Yin X, *et al.* Near-infrared fluorescent Ag₂S nanodot-based signal amplification for efficient detection of circulating tumor cells. Anal Chem, 2018, **90**(11): 6702-6709
- [123] Wilhelm S. Perspectives for upconverting nanoparticles. ACS Nano, 2017, **11**(11): 10644-10653
- [124] Fang S, Wang C, Xiang J, *et al.* Aptamer-conjugated upconversion nanoprobes assisted by magnetic separation for effective isolation and sensitive detection of circulating tumor cells. Nano Research, 2014, **7**(9): 1327-1336
- [125] Xuan M, Mestre R, Gao C, *et al.* Noncontinuous super-diffusive dynamics of a light-activated nanobottle motor. Angew Chem Int Ed Engl, 2018, **57**(23): 6838-6842
- [126] Li W, Chen Z, Zhou L, *et al.* Noninvasive and reversible cell adhesion and detachment via single-wavelength near-infrared laser mediated photoisomerization. J Am Chem Soc, 2015, **137**(25): 8199-8205
- [127] Xu P, Yu Y, Li T, *et al.* Near-infrared-driven fluorescent nanomotors for detection of circulating tumor cells in whole blood. Analytica Chimica Acta, 2020, **1129**: 60-68
- [128] Wang X, Wang X, Cheng S, *et al.* Near-infrared light-switched MoS₂ nanoflakes@gelatin bioplatform for capture, detection, and nondestructive release of circulating tumor cells. Anal Chem, 2020, **92**(4): 3111-3117
- [129] Hu X J, Liu H L, Jin Y X, *et al.* Precise label-free leukocyte subpopulation separation using hybrid acoustic-optical chip. Lab Chip, 2018, **18**(22): 3405-3412
- [130] Hu X, Zhu D, Chen M, *et al.* Precise and non-invasive circulating tumor cell isolation based on optical force using homologous erythrocyte binding. Lab Chip, 2019, **19**(15): 2549-2556
- [131] Liu P Y, Chin L K, Ser W, *et al.* Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future. Lab Chip, 2016, **16**(4): 634-644
- [132] Wang X, Qian X, Beitler J J, *et al.* Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles. Cancer Res, 2011, **71**(5): 1526-1532
- [133] Li J F, Zhang Y J, Ding S Y, *et al.* Core-shell nanoparticle-enhanced raman spectroscopy. Chem Rev, 2017, **117**(7): 5002-5069
- [134] Sha M Y, Xu H X, Natan M J, *et al.* Surface-enhanced raman scattering tags for rapid and homogeneous detection of circulating tumor cells in the presence of human whole blood. JACS, 2008, **130**(51): 17214-17215
- [135] Nima Z A, Mahmood M, Xu Y, *et al.* Circulating tumor cell identification by functionalized silver-gold nanorods with multicolor, super-enhanced SERS and photothermal resonances. Sci Rep, 2014, **4**: 4752
- [136] Wu X, Xia Y, Huang Y, *et al.* Improved SERS-active nanoparticles with various shapes for CTC detection without enrichment process with supersensitivity and high specificity. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, **8**(31): 19928-19938
- [137] Ruan H, Wu X, Yang C, *et al.* A supersensitive CTC analysis system based on triangular silver nanoprisms and SPION with function of capture, enrichment, detection, and release. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2018, **4**(3): 1073-1082
- [138] Wu X, Luo L, Yang S, *et al.* Improved SERS nanoparticles for direct detection of circulating tumor cells in the blood. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, **7**(18): 9965-9971
- [139] 孙翔宇, 王勇, 廖然, 等. 利用偏振光散射方法检测癌细胞. 生物化学与生物物理进展, 2019, **46**(12): 1196-1201
- Sun X Y, Wang Y, Niao R, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2019, **46**(12): 1196-1201

Advances in Analytic Nanotechniques for The Capture and Detection of Circulating Tumor Cells*

CHEN Lu, GAO Xue-Yun**, GAO Liang**

(Department of Chemistry and Biology, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract With the development of nanotechnology, nanomaterials with controllable structure, multifunctional surface and good biocompatibility have been widely used in various aspects of biomedicine. As an important blood biomarker, circulating tumor cells (CTC) are the "seeds" of tumor metastasis. With the flow of blood, tumor cells with strong vitality can pass through blood vessels and gather at the distal end to form tiny tumor thrombi. Therefore, the detection of CTC can be used for early diagnosis of cancer and assessment of metastasis. The application of new nanomaterials and nanomaterial characterization measurement technology has a great impact on the progress of CTC analysis technology. In recent years, the capture and detection of CTC based on nanomaterials and microfluidic technology has become a research hotspot in liquid biopsy, and this technology has been gradually extended to clinical applications. This article reviews the role of nanomaterials and nanotechnology in the capture and detection of CTC, and looks forward to the application prospects of bioanalysis in this field.

Key words nanomaterial, circulating tumor cells (CTC), capture, detection, microfluidic technology

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0342

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31771082) and Beijing Municipal Education Commission (KZ202010005005).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-88236727

GAO Liang. E-mail: gaoliang@bjut.edu.cn

GAO Xue-Yun. E-mail: gaoxy@ihep.ac.cn

Received: September 25, 2020 Accepted: November 23, 2020