

循环肿瘤细胞捕获材料的研究进展

孙文静^{1,2}, 施振强^{1*}, 卿光焱^{1*}

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; 2. 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122)

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是在肿瘤发展过程中,从肿瘤部位脱落并侵入外周血液中的肿瘤细胞,被认为携带有关肿瘤产生、发展和转移的重要信息,与肿瘤转移密切相关^[1]。它是肿瘤新转移灶形成的前提,被认为是肿瘤组织转移的“种子”,可看作原发灶肿瘤细胞与转移灶肿瘤细胞之间的中间过渡态。CTCs从实体肿瘤病灶脱落后,借助血液循环系统逃逸并锚定,发展成为新的转移灶,极大地增加了肿瘤患者的死亡风险。据报道,90%的肿瘤患者因肿瘤转移而死亡^[2]。从患者血液中分离并分析CTCs,有助于监测肿瘤变化程度,诊断治疗效果和预测转移及复发^[3]。以CTCs为重要生物标志物,设计和开发精准性、特异性CTCs捕获材料^[4],以实现肿瘤发生和发展的实时监测,对肿瘤的早期诊断、术后评估等具有非常深远的临床意义。目前,精准CTCs捕获材料的开发已然成为相关领域的研究热点。本文对CTCs捕获所面临的挑战,以及CTCs捕获材料在近1~2个月内的最新研究进展进行了简要评述。

1 CTCs 捕获材料的种类

现有的CTCs捕获材料,根据其捕获单元的种类不同,主要可分为基于天然抗体或人工抗体的捕获材料两大类。CTCs表面具有上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)、细胞角蛋白(cytokeratin, CK)、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)和前列腺抗原(prostate specific antigen, PSA)等特异性抗原。基于天然抗体的CTCs捕获材料,是将上述特征标志物的抗体修饰到材料表面,基于抗原-抗体的生物亲和原理,

实现对CTCs的特异性捕获。而基于人工抗体的CTCs捕获材料,则是通过模拟抗原-抗体相互作用机理,将能与CTCs表面特征标志物(如唾液酸等)高选择性结合的各种多肽、适配体^[5]、糖类或其他小分子修饰到材料表面,实现CTCs的选择性捕获。两种材料均存在各自的优势和缺陷,基于天然抗体的捕获材料在特异性方面优势显著。但是,基于人工抗体的捕获材料能够针对目前CTCs捕获面临的诸多问题,更加灵活地进行个性化、多元化功能设计,并且在材料稳定性、制备成本等方面也具有一定优势。

2 CTCs 捕获材料面临的挑战

CTCs因在血液中的低丰度、异质性,以及捕获过程造成的细胞损伤等原因,导致对CTCs的精准捕获极具挑战^[6]。如何通过材料设计有针对性地应对上述挑战,是目前CTCs捕获材料的研究重点。

2.1 低丰度

血液中含有大量的血细胞,如白细胞(10^9 个/L)、红细胞(10^{12} 个/L)、血小板(10^{12} 个/L)等。与这些正常血细胞相比,CTCs在血液中的含量非常低^[7]。研究表明:每 $10^5 \sim 10^6$ 个外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中仅有1个CTCs^[8]。这对捕获材料的灵敏度和特异性提出了非常高的要求。另一方面,血浆蛋白质在材料表面的非选择性吸附也会影响材料对CTCs的捕获性能,这就要求CTCs捕获材料必须具备足够的抗污性能。此外,将来若要在血液循环系统中对CTCs的原位实时监测,捕获材料的生物相容性,尤其是血液相容性和细胞相容性,也是不可或缺的

收稿日期:2021-05-28

* 通讯联系人.Tel:(0411)84379050,E-mail:shizhenqiang@dicp.ac.cn(施振强);Tel:(0411)84379050,E-mail:qinggy@dicp.ac.cn(卿光焱)。

基金项目:国家自然科学基金(21922411,21775116,21907094);大连化物所创新基金(DICP-RC201801,DICP I202008);辽宁省兴辽英才计划(XLYC1802109)。

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (Nos. 21922411, 21775116, 21907094); Dalian Institute of Chemical Physics (DICP) Innovation Funding (Nos. DICP-RC201801, DICP I202008); Liaoning Revitalization Talents Program (No. XLYC1802109).

性能要素。

近日,柏林自由大学 Rainer Haag 课题组^[9]设计了一种基于聚甘油和上皮细胞黏附分子抗体(anti-EpCAM)的纳米结构化涂层(见图1)。该涂层表面修饰的 anti-EpCAM 抗体可与 CTCs 表面的 EpCAM 通过生物亲和作用特异性结合,实现 CTCs 精准捕获;同时,该涂层的纳米结构模拟细胞外基质(extracellular matrix, ECM)能增加 CTCs 在材料表面的黏附性,提升捕获效率;更重要的是,涂层上的超支化聚甘油组分增强了材料的抗污染性能,可有效抑制白细胞在材料表面的非选择性黏附,进而提升 CTCs 的捕获纯度。

2.2 异质性

肿瘤细胞的异质性是指同类肿瘤的瘤间,以及同一肿瘤组织的瘤内,存在形态、功能差异的癌细胞亚群^[10]。对 CTCs 而言^[11],其异质性主要体现在细胞表面特征标志物种类及数量的动态变化,这将对材料的 CTCs 捕获效率产生较大影响。

现有基于天然抗体的 CTCs 捕获材料,主要以 CTCs 表面的 EpCAM 为靶标,用相应的抗原实现 CTCs 捕获。但是,肿瘤转移过程中的上皮-间质转

化(epithelial mesenchymal transition, EMT),会使 CTCs 丢失上皮抗原性,EpCAM 表达显著下调^[12,13],从而导致以 EpCAM 为靶标的 CTCs 捕获效率大大降低,甚至造成假阴性的检测结果。针对这一问题,中国科学院大学胡志远课题组^[14]以 CTCs 表面的间质细胞标志物 *N*-钙黏蛋白为靶标,从一珠一化合物(one-bead one-compound, OBOC)肽库中筛选出一种能与 *N*-钙黏蛋白特异性结合的新型肽,并将其修饰到磁性纳米粒子表面,用于间质 CTCs 捕获。此类材料是对 anti-EpCAM 抗体类捕获材料的一个很好补充,有助于克服 CTCs 因 EMT 造成的异质性。

另外,西南大学宋尔群课题组^[15]创新性地利用梯度磁响应性策略,实现了对不同 CTCs 亚群的特异性捕获与分离(见图2)。他们构筑了一系列不同抗体修饰的磁性纳米粒子探针,通过“鸡尾酒”式多抗体联用,实现了对表面携带不同抗原的多种 CTCs 亚群的同时捕获。更有意思的是,通过梯度磁响应分离,该纳米探针可将捕获的 CTCs,从血液样本中按时间顺序依次分离。CTCs 表面抗原的数量,将直接影响与磁性材料结合后 CTCs 的磁响应

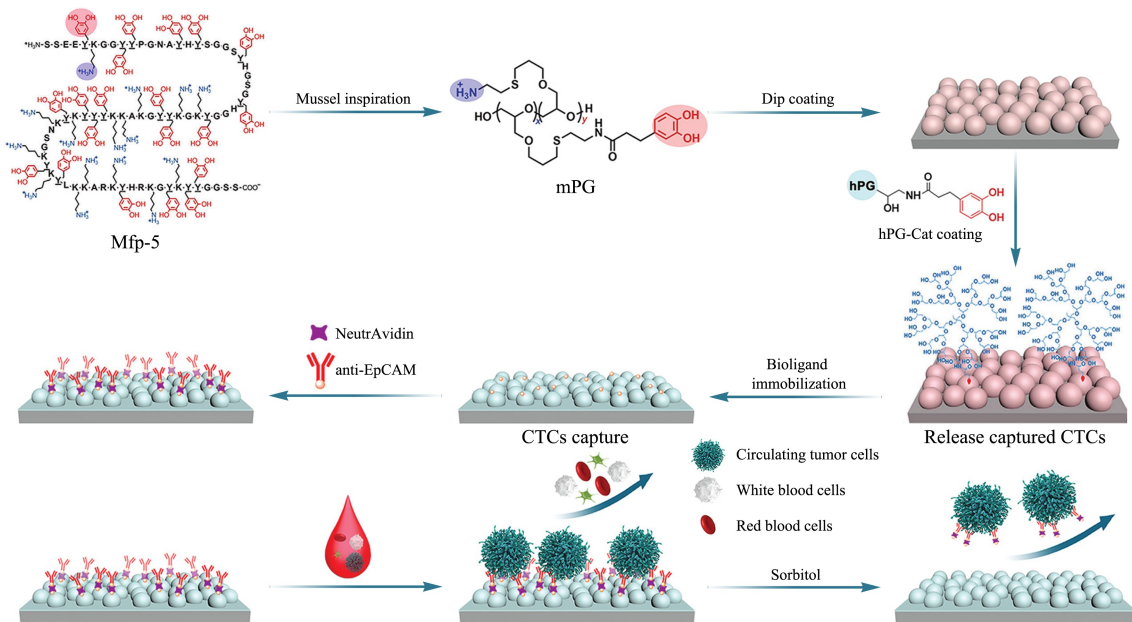


图1 基于聚甘油和 anti-EpCAM 的纳米结构化多价生物涂层用于 CTCs 捕获^[9]

Fig. 1 Captured of circulating tumor cells (CTCs) by the nanostructured multivalent biointerfaces based on hyperbranched polyglycerol (hPG) and epithelial cell adhesion molecule antibody (anti-EpCAM)^[9]
Mfp-5; mussel foot proteins-5; mPG; mussel-inspired linear polyglycerol; hPG-Cat; 5% catecholic hPG.

引用本文:孙文静,施振强,卿光焱.循环肿瘤细胞捕获材料的研究进展.色谱,2021,39(10):1041-1044.

SUN Wenjing, SHI Zhenqiang, QING Guangyan. Advances in materials for circulating tumor cells capture. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(10): 1041-1044.

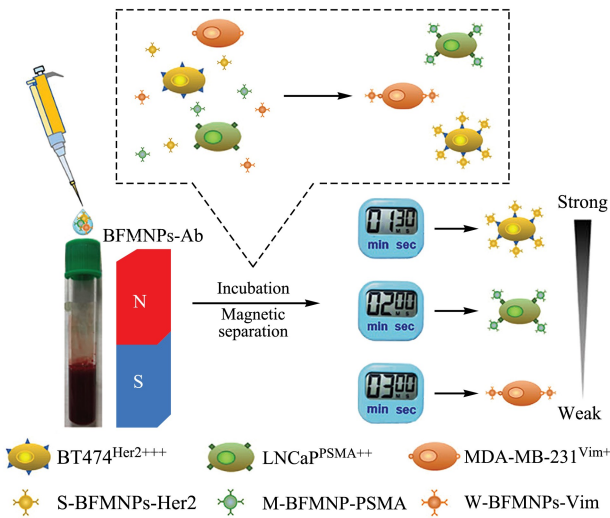


图 2 不同抗体修饰的仿生荧光磁性纳米探针 (BFMNPs-Ab) 联用实现对异质性肿瘤细胞亚群的捕获与磁响应性梯度分离^[15]

Fig. 2 Captured and sequential magnetic separated of heterogeneous tumor cells subpopulations by BFMNPs-Ab nanoprobes with different antibodies^[15]

BFMNPs-Ab: biomimetic fluorescent-magnetic nanoprobes with antibody; BT474^{Her2+}: breast/duct tumor cells; LNCaP^{PSMA+}: prostate carcinoma tumor cells; MDA-MB-231^{Vim+}: breast adenocarcinoma tumor cells; S-BFMNPs-Her2: strong-BFMNPs-Her2; M-BFMNPs-PSMA: middle-BFMNPs-PSMA; W-BFMNPs-Vim: weak-BFMNPs-Vim.

性能, 利用这一特点, 该材料能够很好克服 CTCs 的异质性, 对表面具有不同表达水平的各种标志物的 CTCs 亚群进行特异性捕获和梯度分离。

人工抗体材料方面, 中国科学技术大学裴仁军课题组^[16]开发了一种单宁酸功能化的磁性纳米材料, 利用单宁酸的多酚单元与癌细胞表面糖萼的相互作用, 该材料能够对 HeLa、PC-3、T24 等 7 种癌细胞进行广谱性捕获。当与密度梯度离心联用时, 该材料能从乳腺癌、肾癌、前列腺癌、肺癌等多种癌症的临床血液样本中捕获 CTCs。

2.3 细胞损伤

普遍认为, CTCs 携带肿瘤部位病变细胞的重要信息。捕获过程引起的细胞损伤会导致 CTCs 所携带的核酸、蛋白质、多糖等关键信息流失, 极大地阻碍了对 CTCs 的深度分析。此外, 现有的 CTCs 释放策略^[17-19], 如胰酶降解、竞争解离等, 往往会引起 CTCs 应激反应, 导致细胞信息丢失、活性降低, 从而影响下游细胞培养和分子分析^[20]。因此, 如何实现细胞的无损捕获与释放也是 CTCs 捕获材料的一大难题。

如图 3a 所示, 厦门大学杨朝勇课题组^[21]近日报道了一种刺激响应性配体修饰的微流控芯片

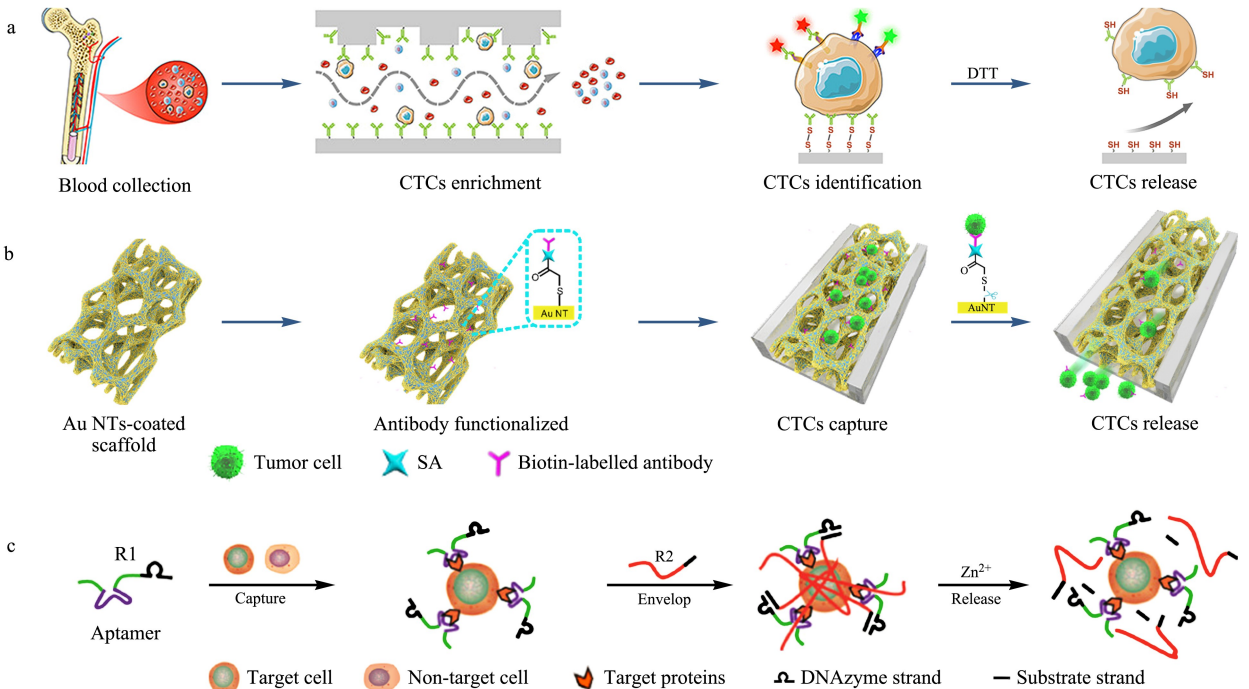


图 3 CTCs 的刺激响应性无损释放

Fig. 3 Stimuli-responsively nondestructive released of CTCs

a. dithiothreitol (DTT)-responsive release based on dynamic disulfide bond^[21]; b. electrochemically responsive release based on Au-S bond^[22]; c. Zn²⁺ responsive release based on DNAzyme hydrogel^[23].

(stimulus-responsive ligand-decorated microfluidic chip, MRD-Chip), 用于外周血中循环骨髓瘤细胞的有效捕获和无损释放。他们通过二硫键将 CD138 抗体修饰到微流控芯片上, 并通过芯片结构优化, 增强了细胞与捕获抗体之间的有效接触, 从而实现了 CTCs 的高效捕获。更重要的是, 基于硫醇与二硫键交换反应, 该材料可以实现对被捕获 CTCs 的精准、无损释放。通过引入二硫苏糖醇 (DTT), 与 CD138 抗体相连的二硫键会被还原而发生断键, 从而将 CD138 抗体以及与其特异性结合的 CTCs 从材料表面精准释放, 并且被释放的 CTCs 的细胞活性保持在 90% 以上。这一动态二硫键的设计, 使材料能在有机小分子还原剂的刺激下, 按需触发 CTCs 的精准、无损释放, 避免了胰酶等传统解离试剂对细胞造成的损伤。

为了进一步避免刺激响应分子对样品造成的二次污染, 武汉大学谢敏课题组^[22]设计了一种具有电响应性 CTCs 释放功能的捕获材料(见图 3b)。他们利用金属置换法在聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 骨架上原位合成金纳米棒 (AuNTs), 并通过 Au-S 键在 AuNTs 表面共价修饰 anti-EpCAM 抗体, 基于抗体与 CTCs 表面抗原的生物亲和作用, 实现对 CTCs 的特异性捕获。同时, 该材料能够通过电化学刺激触发 Au-S 键断裂, 将与 anti-EpCAM 抗体特异性结合的 CTCs 从材料表面释放。这一巧妙设计不仅实现了 CTCs 的无损释放, 而且能在很大程度上提高收集到的 CTCs 纯度。

基于人工抗体的捕获材料在避免细胞损伤方面同样做出了突出贡献。湖南大学贺建军课题组^[23]基于脱氧核酶 (DNAzyme) 水凝胶的溶胶-凝胶-溶胶转化, 实现了对 CTCs 的选择性捕获、原位包封及温和释放(见图 3c)。他们利用滚环扩增技术合成了两条单链 DNA (R1 和 R2), R1 链包含 DNAzyme 序列和能特异性识别 CTCs 表面标志物的适配体序列, R2 链包含 DNAzyme 的互补序列。当 R1 链与 CTCs 结合后, R2 链的加入可以触发溶胶-凝胶转变, 形成 DNAzyme 水凝胶, 实现 CTCs 的原位捕获与分离。此外, 该 DNAzyme 水凝胶能在锌离子 (Zn^{2+}) 刺激下瓦解, 将被捕获的 CTCs 从凝胶中释放。DNAzyme 水凝胶的细胞相容性, 以及温和的释放条件, 使收集到的 CTCs 保持了较高的细胞活性。

3 总结与展望

作为肿瘤诊疗的有效途径之一, CTCs 捕获材

料的开发对肿瘤的早期诊断、术后评估等具有非常深远的临床意义。针对目前 CTCs 捕获所面临的挑战, CTCs 捕获材料的重点发展方向主要有: 1) 提高材料对 CTCs 捕获的选择性、灵敏度和抗干扰性能; 2) 扩大对不同 CTCs 亚群的覆盖度; 3) 减小捕获过程造成的细胞损伤。由此开发的 CTCs 精准捕获材料, 将有助于实现对肿瘤的原位实时监测, 使癌症真正做到“早发现、早诊断、早治疗”。

参考文献:

- [1] Vasilaki D, Bakopoulou A, Tsouknidas A, et al. *Biophys Rev*, 2021, DOI: 10.1007/s12551-021-00811-y
- [2] Ganesh K, Massagué J. *Nat Med*, 2021, 27(1): 34
- [3] Yang M, Zhang X T, Guo L X, et al. *Biomed Res Int*, 2021, 2021(2): 6230826
- [4] Liu L K, Yang K G, Liang Z, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(4): 358
刘路宽, 杨开广, 梁振, 等. *色谱*, 2019, 37(4): 358
- [5] Wu L L, Wang Y D, Xu X, et al. *Chem Rev*, 2021, DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c01140
- [6] Hu X X, Zang X J, Lv Y G. *Oncol Lett*, 2021, 21(5): 422
- [7] Mout L, Dessel L F V, Kraan J, et al. *Eur J Cancer*, 2021, 150: 179
- [8] Rushton A J, Nteliopoulos G, Shaw J A, et al. *Cancers*, 2021, 13(5): 970
- [9] Yu L X, Tang P, Nie C X, et al. *Adv Healthc Mater*, 2021, DOI: 10.1002/adhm.202002202
- [10] Xing X D, Yang F, Huang Q, et al. *Sci Adv*, 2021, 7(5): eabd9738
- [11] Keller L, Pantel K. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(10): 553
- [12] Lisencu L A, Irimie A, Lisencu C. *J Clin Med*, 2021, 10(4): 684
- [13] Vasantharajan S S, Eccles M R, Rodger E J, et al. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875(2): 188514
- [14] Jia F, Wang Y h, Fang Z G, et al. *Anal Chem*, 2021, 93, 5670
- [15] Liao Z Y, Han L, Li Q J, et al. *Adv Funct Mater*, 2021, 31(18): 2009937
- [16] Ding P, Wang Z L, Wu Z, et al. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(3): 3694
- [17] Cheng J, Liu Y, Zhao Y, et al. *Micromachines*, 2020, 11(8): 774
- [18] Chang Z M, Zhang R, Yang C, et al. *Nanoscale*, 2020, 37, 19121
- [19] Han L L, Peng R L, Jiang W N, et al. *J Mat Chem B*, 2020, 33, 7511
- [20] Ye D K, Li M, Zhai T T, et al. *Nat Protoc*, 2020, 15(7): 2163
- [21] Liu Y L, Su R, Song J, et al. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13, 14920
- [22] Cheng S B, Chen M M, Wang Y K, et al. *Anal Chem*, 2021, 93(18), 7102
- [23] Hou M, Yin X, Jiang J H, et al. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(13): 15031