

基于荧光方法的循环肿瘤细胞检测研究进展

杨 瑞^{1†}, 李子越^{1†}, 申 艺¹, 郭丽华¹, 周兵帅¹, 李家玮², 刘海鹏^{2*},
董 彪^{1*}

(1. 吉林大学 电子科学与工程学院, 集成光电子学国家重点实验室 吉林 长春 130012;

2. 吉林大学 第一医院, 整形美容与修复重建外科 吉林 长春 130012)

摘要: 循环肿瘤细胞 Circulating tumor cells (CTCs) 是指从恶性肿瘤的原发或转移部位脱落的细胞, 通过血液循环到达全身。体内 CTCs 的存在可以反映肿瘤的发生与发展, 对肿瘤的诊断和预后至关重要。然而, 实现高纯度捕获和捕获后 CTCs 灭活阻断仍然面临许多挑战。目前开发的用于实现选择性分离 CTCs 的方案中, 荧光方法由于具有高灵敏度、高分辨率、操作简便等特点, 在无创检测和快速检测方面具有重要的应用前景。与以往的 CTCs 研究综述相比, 本文详细介绍了 CTCs 从体外捕获到体内捕获再到下游分析的全过程, 并对 CTCs 的完整诊疗过程进行了系统和详细的总结, 为当前的研究提供了新思路, 这对于实现早期循环肿瘤细胞的诊断与治疗具有重要意义。

关键词: 循环肿瘤细胞; 荧光; 捕获; 下游分析; 灭活

中图分类号: 文献标识码: DOI: 10.37188/CJL.20240052

Research progress of circulating tumor cell detection based on fluorescence method

YANG Rui^{1†}, LI Ziyue^{1†}, SHEN Yi¹, GUO Lihua¹, ZHOU Bingshuai¹, LI Jiawei², LIU Haipeng^{2*}, DONG Biao^{1*}

(1. State Key Laboratory of Integrated Optoelectronics, College of Electronic Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130012, China;

2. Department of Plastic and Aesthetic Surgery, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130012, China)

†These authors contributed equally to this work.

* Corresponding Authors, Email: dongb@jlu.edu.cn, Hpliu@jlu.edu.cn

Abstract: Circulating tumor cells (CTCs) are cells that are shed from the primary or metastatic site of a malignant tumor and circulate through the bloodstream to reach the body. Therefore, the presence of CTCs in vivo can reflect the occurrence and development of tumors, which is crucial for the diagnosis and prognosis of tumors. However, there are still many challenges to achieving high purity capture and post-capture CTCs inactivation blocking. Among the schemes developed for selective separation of CTCs, fluorescence method has an important application prospect in non-invasive detection and rapid detection because of its high sensitivity, high resolution and simple operation. Compared with previous CTCs research reviews, this paper describes in detail the whole process of CTCs from in vitro capture to in vivo capture to downstream analysis, and systematically and in detail summarizes the complete diagnosis and treatment process of CTCs, providing new ideas for current research. This is of great significance for the diagnosis and treatment of early circulating tumor cells.

Key words: circulating tumor cells; fluorescence; capture; downstream analysis; inactivate

收稿日期: XXXX-XX-XX; 修订日期: XXXX-XX-XX

基金项目: 本文工作得到了国家自然科学基金项目(52050077, 52272080, 82073475)和吉林省自然科学基金项目(20220402005GH)的资助。

This work received funding from the National Natural Science Foundation of China (52050077, 52272080, 82073475) and the General Program of the Natural Science Foundation of Jilin Province (20220402005GH).

1 引 言

癌症相关疾病是目前全球主要的健康问题。相关数据显示,预计到2040年,癌症新发病例数可能会超过2700万^[1]。导致癌症患者死亡的原因并不是原发灶而是肿瘤的转移^[2]。1869年,澳大利亚学者 Ashworth 率先提出了循环肿瘤细胞的概念^[3]。CTCs 是从原发肿瘤脱落并通过血液扩散到其他器官的癌症细胞,在癌症转移中发挥关键作用,携带大量关于肿瘤发生、发展、转移和耐药性的信息。因此,CTCs 的分离和检测在癌症的早期诊断和预后中起着重要作用^[4]。

然而,CTCs 具有如下几个特性:(1)稀有性:每 10mL 血液中可能仅含有几个到几十个循环肿瘤细胞。(2)非典型性的细胞形态:一般比血液细胞,正常组织细胞体积大;细胞核大,不规则,细胞核质比高;不易发生变形。(3)异质性:细胞表面抗原标志物表达差异、携带不同的分子信息、转移潜力差异。(4)不同形态和类别:CTCs 可以是间质型、上皮型或者上皮间质混合型,既可以是单个细胞也可以成团。这使得实现高纯度和高效率捕获循环肿瘤细胞面临巨大挑战^[5,6]。基于以上特性,人们开发了免疫磁珠、抗体偶联的纳米结构^[7]、聚合酶链反应^[8]、电化学方法^[9]和荧光光谱^[10,11]等 CTCs 检测技术。

近年来,基于荧光光谱法的 CTCs 检测因其具有动态线性范围宽、高灵敏度和选择性等优势受到了国内外广泛关注,具有广阔的应用前景^[12]。荧光,是指一种光致发光的冷发光现象。荧光材料在接收高能量(短波长)光子的能量后,部分能量以热的形式耗散掉,而另外一部分能量,则转换为低能量(长波长)的光子,产生荧光^[13]。与传统检测方法相比,荧光检测不仅可以避免放射性物质处理所带来的危害,还具有高灵敏度、低成本等特点。此外,它还能实现多信号的联合检测和信号跟踪,具有广阔临床应用前景。

利用有机染料进行的 CTCs 荧光检测操作简便、价格低廉、方法多样、对 CTCs 损伤小,但存在荧光寿命短、标记率低、耐光漂白性能差等缺点,因此很难达到较好的检测性能^[14]。随着纳米技术的不断发展,量子点、上转换纳米粒子、金纳米团簇、聚合物点以及荧光碳纳米材料等荧光纳米材料广泛应用于物质的定性和定量检测、分子结构与特异性分析、疾病的检测和诊断等领域。在

CTCs 的检测方面,可以通过改进设计方法控制纳米材料的尺寸、形貌以及荧光性能,实现更高的灵敏度以及多重分析和多模式诊断^[15,16]。本文将对基于荧光光谱法的 CTCs 检测的经典工作和最新研究进展进行综述(见图1),详细阐述 CTCs 的体外捕获、体内捕获以及下游分析过程,对基于 CTCs 的完整诊疗过程进行系统详尽的总结。

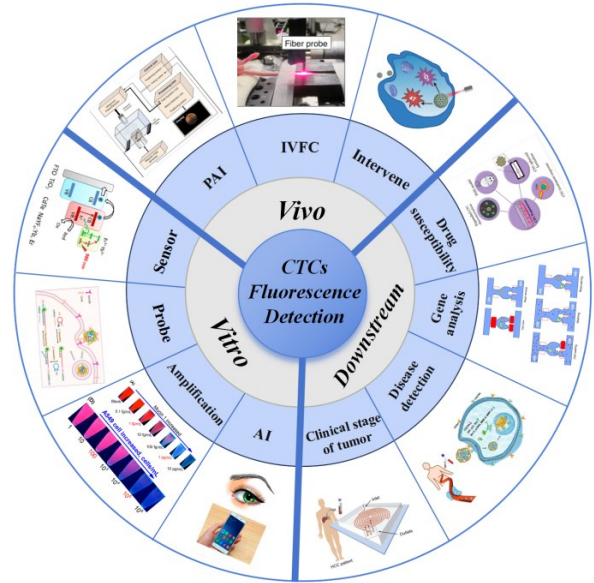


图1 CTCs在体外富集、体内富集和下游分析方面的相关研究示意图^[17-25]。

Fig. 1 Schematic illustration of the recent progress of CTCs on enrichment in vitro, enrichment in vivo, and downstream analysis^[17-25].

2 循环肿瘤细胞的体外富集

针对 CTCs 的体外富集,本文主要从利用荧光探针的 CTCs 检测、利用传感器的 CTCs 检测以及 CTCs 检测的信号放大展开介绍,表1总结了目前最新的 CTCs 检测技术,一方面是要解决目前 CTCs 检测所面临的灵敏度低、捕获效率不理想问题所提出的解决新思路,另一方面,对于目前的人工智能时代,CTCs 检测与智能手机互联是顺应时代发展的必然要求,为此,我们总结了最新的智能化检测方法。

2.1 利用荧光纳米探针的循环肿瘤细胞检测

基于荧光纳米材料实现 CTCs 富集主要通过免疫亲和性实现。利用抗体功能化的磁珠进行免疫磁分离是使用最为广泛的 CTCs 分离技术,目前 CTCs 领域的金标准 CellSearch 系统(第一个通过 FDA 批准用于前列腺癌、乳腺癌和结直肠癌临

表 1 循环肿瘤细胞体外检测
Table1 Detection of circulating tumor cells in vitro

Technology	Method	Ref.
	The fluorescent magnetic double-coding nanospheres were modified with anti-epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) antibody, and the capture efficiency was over 94% after 5min incubation	[28]
	The capture efficiency of MCF-7, HeLa and CCRF-CEM cell mixed artificial samples was 99%, 81% and 0.63%, respectively	[29]
	The double antibody modified magnetic bead surface modified zirconium substrate organic framework to achieve the capture and release of CTCs	[30]
	Biomimetic fluorescence-magnetic nanoprobe modified with different antibodies were designed, and a low detection limit of 1 cell/mL was achieved under external magnetic field	[31]
	Based on the detection strategies of immunomagnetic nanospheres and immunofluorescence nanospheres, the detection of CTC in 1 mL of whole blood was realized after only 20 minutes of incubation, with the capture efficiency of $98.1 \pm 0.8\%$ and the capture purity of 59.5%	[32]
	The microfluidic platform with spectral combination coding enables multiple phenotypic analysis of a single CTCs, in situ separation of heterogeneous CTCs with an efficiency of more than 91.6%, and quantitative analysis of biomarker types and expression levels by composite spectral features	[33]
probe	An ultra-sensitive platform for the detection of CTCs with lanthanide fluorescence nanoprobe, the detection limit is as low as 1 cell/well in a 96-well plate, and the detection rate of blood samples from cancer patients is 93.9%	[34]
	Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and aminopeptidase-N (APN) were used as double targets to design fluorescent nanomaterials. More than 85% CTCs capture efficiency can be achieved, and more than 90% cell viability is guaranteed	[35]
	CuInSe ₂ @ZnS quantum dots are synthesized. With a quantum yield of 21.8 percent of IR-II photoluminescence, it achieves a highly sensitive detection of MCF-7 circulating tumor cells by biobinding to EpCAM antibodies	[37]
	By coupling the polyvalent aptamers Sgc8 and SYL3C to Au nanoparticles and conducting secondary separation by microfluidic chip, the aptamers can efficiently bind to tumor marker proteins PTK7 and EpCAM on the surface of CTCs. Compared with the single aptamer nanoprobe, the binding efficiency of the double aptamer nanoprobe is increased by more than 200%	[38]
	In situ detection of microRNA-21 in living CTCs was achieved by constructing double-targeted nanoprobe	[39]
	By increasing the anchor point of the trapping element with gold nanoparticles and modifying the substrate with two different aptamers, the efficient capture and selective release of various types of CTCs were realized by integrating with different metal ion response DNA enzymes	[40]
	Using folic acid coupled to polydopamine nanoparticles, when the presence of human breast cancer cells is detected, the colorimetric nanoprobe will release thymic phthalein in the alkaline solution, causing a change in the color of the solution, and the colorimetric results can be recorded by software on a smartphone	[44]
	A fluorescent cell sensor that can capture and image CTCs on a smartphone uses the HER2 marker on the surface of SK-BR3 cells as a target, and finally counts the captured CTCs by imaging the smartphone imaging device.	[48]
sensor	A multi-resonant fiber optic aptamer sensor with multiple narrow-band resonances in the near infrared wavelength range for rapid detection of breast cancer CTCs	[52]
	An optoelectronic chemobiosensor consisting of up-conversion nanoparticles (NaYF ₄ : Yb, Er) and a TiO ₂ @CdTe hybrid doped with tin oxyfluoride can detect 400 cells per milliliter of whole blood.	[53]
	A ratio electrochemiluminescence biosensor for detecting MCF-7 was proposed by combining CdTe quantum dots and LED with aptamer.	[54]
	A whole nucleic acid, enzyme-free hairpin assembly assisted amplification strategy can be used for quantitative analysis of mucin-1 in A549 cells, and the catalytic hairpin structure improves its sensitivity.	[59]
	The HCR signal amplification system using near-infrared fluorescent Ag ₂ S nanodots was used to detect CTCs, resulting in the detection of as few as 6 CTCs per milliliter of whole blood	[60]
signal amplification	A dual recognition capture platform combining antibody and aptamer was designed, and double RCA reaction was introduced to realize sensitive detection of CTCs. The fluorescence signal of suitable cells was enhanced by 34 times, and the target cells could be quantitatively detected to 9 cells/200 μ L, with a linear range of 5 orders of magnitude	[61]
	The silver sulfide quantum dots functionalized by multivalent aptamers modified the mixed cell membrane and coated on the surface of magnetic nanoparticles to achieve CTCs capture, and finally achieved a capture efficiency of up to 95%.	[62]
	Nanoassemblies developed through hybridization chain reactions that contain multiple DNA aptamer modified MB and CdTe/cadmium sulfide quantum dots achieve capture purity of about 80%	[66]
	Using microfluidic devices and EPCAM-modified magnetic nanoparticles, CTCs were classified according to protein expression levels, achieving CTCs capture efficiencies of about 90%	[67]

床 CTCs 检测的技术)就是通过这种技术来捕获 CTCs。选取 CTCs 上的相应肿瘤标志物作为靶点,然后在荧光纳米粒子表面修饰相应抗体以提高材料的靶向性,最终利用材料的荧光特性来实现计数、成像等多种功能。然而 CellSearch 系统在纯度、捕获效率、敏感性等方面都存在局限,这为其他细胞捕获技术的发展留出了提升的空间^[26, 27]。

Wen 等采用逐层组装法制备荧光-磁性双编码纳米球,对 CTCs 进行了快速、高效的捕获和灵敏的检测。荧光-磁性双编码纳米球非常稳定且具有很好的分散性,在抗上皮细胞黏附分子(EpCAM)抗体的修饰下,该免疫磁性纳米球成功地捕获了全血中极其罕见的肿瘤细胞,5min 孵育后捕获效率超过 94 %^[28]。Wang 等设计了双抗体(靶向 EpCAM 和 N-钙黏蛋白)修饰的荧光磁性纳米粒子,用于异质 CTCs 的高效分离和鉴定, MCF-7、HeLa 和 CCRF-CEM 细胞混合的人工样品中,双抗体修饰的荧光磁性纳米粒子的捕获效率分别为 99 %、81 % 和 0.63 %^[29]。Hu 等合成了双抗体(anti-EpCAM or anti-N-cadherin)修饰的磁珠表面改性的镉基金属有机框架,实现了 CTCs 的捕获与释放^[30]。Liao 等基于梯度磁分离、荧光成像和仿生膜的原理,设计了不同抗体修饰的仿生荧光-磁性纳米探针,用于 BT474^{Hcr2++}、LNCaP^{PSMA++} 和 MDA-MB-231^{Vim+} 模型肿瘤细胞的梯度磁分离。这些纳米探针结合的细胞亚群在外部磁场下的不同时间点被特异性识别并磁性分离,在几分钟内具有良好的捕获性能,并在血液样品中实现了 1 cell/mL 的低检测限^[31]。

基于免疫磁分离的 CTCs 分离方法在捕获效率和捕获纯度方面取得了许多提升与突破,但传统的预富集然后检测的方法具有检测时间长、过程较为繁琐的限制,近年来,CTC 的直接检测策略得到了广泛的关注。Wu 等开发了一种细胞友好的基于免疫磁性纳米球和免疫荧光纳米球的一步检测策略,仅通过 20 分钟的孵育就实现了 1 mL 全血中 CTC 的检测,捕获效率为 98.1±0.8 %,捕获纯度为 59.5 %,且具有良好的重现性^[32]。在该研究的基础上,该课题组基于多功能纳米球的捕获性能,提出了一种光谱组合编码的微流体平台,实现了单 CTCs 的多重表型分析。由多功能纳米球条形码唯一标记的不同细胞生物标志物具有相

同的磁性标签和不同的光学特征标记,能够以超过 91.6 % 的效率原位分离异质 CTCs,并通过复合光谱特征对生物标志物类型和表达水平进行定量分析^[33]。Guo 等人设计了一个使用镧系元素荧光纳米探针直接检测 CTCs 的超灵敏平台,该探针有效的避免了自发荧光的干扰,检测限低至 96 孔板的 1 个细胞/孔,癌症患者血液样本(n=15)的检出率为 93.9 %^[34]。

考虑到血液中循环肿瘤细胞的数量极其稀少,因此,需要设计出具有高灵敏度的材料来实现 CTCs 的完全捕获,Peng 等选取 CTCs 表面过表达的上皮细胞黏附分子(EpCAM)和氨基肽酶-N(APN)作为双靶点,设计了荧光纳米材料。图 2(a)展示了该材料的结构。该纳米材料能实现精准的双靶向,具有较高的荧光成像分辨率,可实现 85 % 以上的 CTCs 捕获效率,并保证 90 % 以上的细胞活力^[35]。然而,该检测方案的灵敏度往往受到光的散射、吸收以及自发荧光的限制,因此迫切需要开发具有较高组织穿透深度和良好生物特性的近红外发光材料。Chen 等通过控制 Se 和 In 的化学计量比,成功合成了近红外发射峰位于 920-1244 nm 范围内的可调 CuInSe₂@ZnS 量子点。图 2(b)展示了该量子点的 CTCs 捕获与成像原理。该量子点不仅具有 21.8 % 的 NIR-II 光致发光的量子产率,还能通过与 EpCAM 抗体的生物结合,实现对 MCF-7 的循环肿瘤细胞的高灵敏度检测^[36, 37]。为了进一步提高 CTCs 检测灵敏度,Zhang 等采用多价适配体的组合,成功将多价适配体 Sgc8 和 SYL3C 偶联到 Au 纳米粒子上,构建了海胆状的纳米探针。如图 2(c)所示,在此探针捕获 CTCs 后,通过微流控芯片进行二次分选,Sgc8 和 SYL3C 适配体能够高效结合到 CTCs 表面的肿瘤标记物蛋白 PTK7 和 EpCAM 上。与单一适配体纳米探针相比,双适配体纳米探针的结合效率提高了 200 % 以上^[38]。

为了实现释放捕获的 CTCs,为癌症的精准诊断和治疗提供重要信息,Zhang 等设计了双适配体探针。他们利用直径为 13 nm 的金纳米颗粒增加捕获元件的锚点,并用两种不同的适配体修饰底物,分别与不同的金属离子响应 DNA 酶集成,从而实现了多种类型 CTCs 的高效捕获和选择性释放^[40]。由于 CTCs 的分离和鉴定往往会损害其活性和功能,为了降低捕获过程中对 CTCs 细胞的

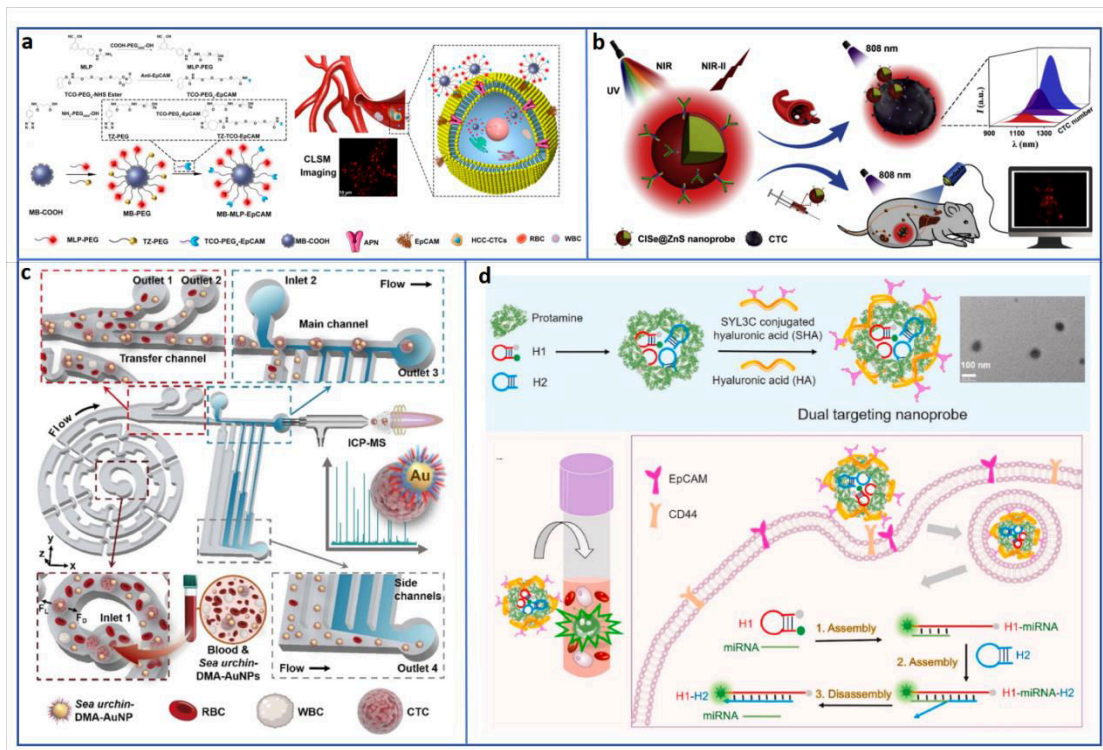


图2 (a)MB-MLP-EpCAM 荧光纳米材料结构示意图以及 CTCs 捕获原理^[35]; (b)CuInSe₂@ZnS 量子点的 CTCs 捕获与成像原理^[37]; (c)荧光纳米探针捕获 CTCs 后在微流控芯片上的二次分选^[38]; (d)纳米探针合成以及 CTCs 内 miRNA 检测原理^[39]。

Fig. 2 (a)Structure diagram of MB-MLP-EpCAM fluorescent nanomaterials and CTCs trapping principle^[35]; (b)CuInSe₂@ZnS CTCs acquisition and imaging principles of quantum dots^[37]; (c)Secondary separation of CTCs on a microfluidic chip after capturing CTCs by a fluorescent nanoprobe^[38]; (d)Nanoprobe synthesis and miRNA detection principle in CTCs^[39]。

损伤以延长 CTCs 细胞的生存时间, Cheng 等构建了一种双靶向纳米探针, 实现了对活 CTCs 的细胞内 microRNA-21 的原位检测^[39]。如图 2(d) 所示, 在这种纳米探针中, 催化发夹组装与硫酸鱼精蛋白复合, 然后用 SYL3C 偶联的透明质酸和透明质酸进行修饰。进入 CTCs 后, 催化发夹系统与细胞内的 microRNA-21 相互作用, 导致强烈的荧光发射。由于发夹和 RNA 的杂交发生在全血中活的 CTCs 中, 该方法可以很容易地消除细胞处理的不利影响, 从而获得反映血液中活的 CTCs 的确切状态的结果。本研究为构建功能性纳米探针提供了一种简便、有效的策略, 可实现单细胞水平的核酸分析, 促进对不同分期癌症的准确、及时的诊断。

2.2 用于检测循环肿瘤细胞的光学细胞传感器

为了进一步提高 CTCs 的检测效率, 荧光检测通常与其他技术相结合。光学细胞传感器能够通过感知广泛的光谱波长识别目标细胞, 并将识别到的信息转化为可测量的输出信号, 用于 CTCs 的计数与成像^[41]。纳米材料可以作为催化剂、载体搭载生物识别元件、信号传感器以及磁性材料产

生磁场以捕获细胞, 因此将纳米材料集成到细胞传感器中可以极大地提高细胞捕获效率和检测的灵敏度^[42, 43]。在本文中, 我们重点讨论光学细胞传感器在 CTCs 检测领域的研究进展, 主要包括比色法、荧光、表面等离子体共振、光电化学以及电化学发光细胞传感器的应用。

比色细胞传感器的原理是功能化纳米材料检测样本中不同浓度的 CTCs 会导致溶液颜色的不同变化, 因此通过肉眼观察溶液颜色即可判断样本中 CTCs 的存在情况。Li 等开发了一种利用叶酸偶联聚多巴胺纳米粒子的制备方法如图 3(a) 所示^[44]。考虑到 Fe²⁺/H₂O₂ 的组合可以有效生成活性氧加速多巴胺的自氧化聚合, 他们提出了一种新的用 Fe²⁺/H₂O₂ 催化制备聚多巴胺纳米粒子的方法。该聚多巴胺纳米粒子具有较高的胸腺酞搭载能力。当检测到人乳腺癌细胞存在时, 比色纳米探针会在碱性溶液中释放出胸腺酞, 导致溶液颜色发生变化。此外, 比色结果可利用智能手机上的 PixelPickere 软件记录, 取决于胸腺酞的数量和癌细胞的浓度。比色细胞传感器不需要外加复杂

的辅助仪器,便携且成本低,并有望集成到智能化设备中,用于家庭日常 CTCs 自我检测。然而,该传感器也存在定量检测的能力差,灵敏度低等缺点。

荧光细胞传感器利用荧光纳米探针识别目标细胞发生的荧光强度变化进行检测。荧光共振能量转移(FRET)是一种简单、高灵敏度的荧光技术,核心为猝灭剂吸收光谱与供体荧光团发射光谱重叠^[45-47]。Tran 等研发了一种可以在智能手机上实现 CTCs 捕获成像的荧光细胞传感器^[48]。如图 3(b)所示,该传感器组件是由磁性氧化铁纳米颗粒、半导体量子点、右旋糖酐、咪唑基团以及四聚体抗体复合物构成,主要利用 SK-BR3 细胞表面的 HER2 标志物作为靶点,并最终通过智能手机成像设备成像实现对捕获的 CTCs 进行计数。然而,荧光细胞传感器也有一些缺点,例如仪器设备复杂和昂贵,此外,由于荧光纳米材料在操作期间可能会失去其强度,导致成像效果并不理想,背景荧光也是一个需要解决的问题。

表面等离子体共振是一种物理光学现象。光在玻璃与金属薄膜界面处发生全内反射时,渗透到金属薄膜内的消逝波会引发金属中的自由电子产生表面等离子体,在入射角或波长为某一适当值的条件下,二者将发生共振。紧靠在金属薄膜表面的介质折射率不同时,共振峰位置(共振角或共振波长)将不同,进而对待测物进行分析^[49-51]。Loyel 等开发了一种在近红外波长范围内具有多个窄带共振的等离子体扩增功能的多谐振光纤适配体传感器,用于快速检测乳腺癌 CTCs^[52],如图 3(c)所示,他们采用相位掩模技术制备光纤并涂上了 50 nm 金层,并利用硫化的 MAMA2 5' 适配体对其表面修饰。该适配体可以与循环肿瘤细胞表面的特定标记物乳腺红蛋白结合而不能结合其他细胞,进而实现对 MDA-MB-231 细胞的特异性检测。与 U 型光纤相比,多芯光纤具有较强的力学特性,对光纤芯间的相互耦合具有极高的灵敏性,可实现智能化远程监测 CTCs。但该传感器背景噪声和仪器分辨率较差,在识别 CTCs 后,还需要考虑到细胞的分离以及如何避免对细胞污染。

光电化学细胞传感器是一种基于光伏转换的新一代细胞传感器,其性能依赖于光伏转换过程的效率,利用电极表面光敏材料薄膜增强光电流输出信号对输入信号激励光的响应。由此可见,

光敏薄膜在将识别到的细胞信号转化为光电流信号中起着至关重要的作用^[55]。与利用可见光作为激励光相比,受近红外激发的上转换纳米材料具有较低光毒性的优点,可以减少对目标信号的辐射损害。Wang 等研发了一种由上转换纳米粒子($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$)和掺杂氟氧化锡的 $\text{TiO}_2@\text{CdTe}$ 杂化物构成的光电化学生物传感器^[53]。如图 3(d)所示,该上转换纳米粒子可以将 980 nm 的近红外光转化为可见光来激发半导体 CdTe 产生光电子和光电流。在电极上修饰与核仁蛋白具有高亲和力的 AS1411 适配体与细胞的结合可以阻断光电流产生,因此,光电流将会随着细胞浓度的增加而降低,并实现在每毫升全血中检测出 400 个细胞。光电化学细胞传感器具有操作简单和成本低等优点。然而,该传感器依赖于有毒的量子点作为光活性材料,对细胞活性伤害较大。

电化学发光细胞传感器是一种将电化学与化学发光相结合的技术,具有操作简单、成本低、响应高且稳定、背景信号低等优点。采用双发光团材料的比值电化学发光生物传感器是一种具有高灵敏度和选择性的新型细胞传感平台。Ding 等利用适配体结合 CdTe 量子点与发光二极管提出了一种用于检测 MCF-7 的比值电化学发光生物传感器^[54],如图 3(e)所示,在电极表面电沉积聚苯胺基导电聚合物水凝胶有效地提高了传感界面的生物相容性和电导性,癌细胞通过另一个 Au-S 键与固定在聚苯胺基导电聚合物水凝胶中的金纳米颗粒相连的适配体捕获到电极表面。如图 3(f)所示,通过两个发射光谱的自校准消除系统中的干扰,这种具有内标的比值电化学发光细胞传感器具有很好的靶向性。

2.3 循环肿瘤细胞检测的信号放大技术

由于 CTCs 在体内含量非常低,1 mL 外周血中大约含有 10^7 个白细胞但 CTCs 仅有 1-100 个,传统的液体活检技术很难实现定量检测,因此出现了许多提高输出信号强度和检测灵敏度的新技术。

链位移信号放大是一种依赖于 DNA 杂交动力学的非酶 DNA 扩增技术,使 DNA 链在多个周期内生成和利用,实现信号扩增^[56-58]。其中,催化发夹组装是比较有代表性的一项技术。Ying 等报道了一种全核酸、无酶催化的发夹组装辅助放大策略^[59]。如图 4(a)所示,适配体双链 DNA 为粘蛋

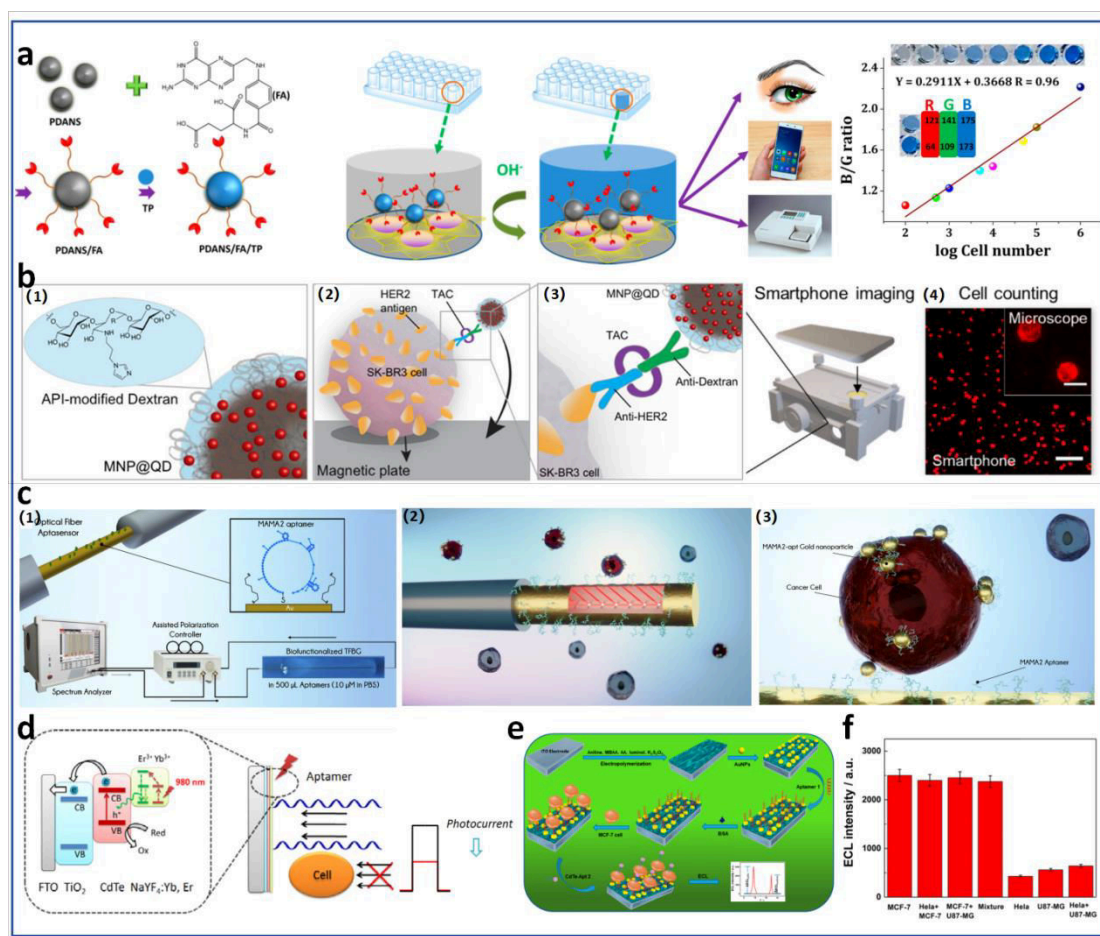


图3 (a)96孔板中荧光纳米探针的合成过程以及与智能手机的集成^[44]; (b)荧光纳米探针的合成与CTCs捕获原理^[48]; (c)实验装置原理以及CTCs捕获过程^[52]; (d)近红外光激发PEC接口和MCF-7细胞检测原理图^[53]; (e)比值ECL细胞传感器工作原理示意图^[54]; (f)传感器靶向性^[54]。

Fig.3 (a) Synthesis process of fluorescent nanoprobes in 96-well plates and integration with smart phones^[44]; (b) Synthesis of fluorescent nanoprobes and CTCs capture principle^[48]; (c) Principle of experimental device and CTCs capture process^[52]; (d) Schematic diagram of PEC interface stimulated by near infrared light and MCF-7 cell detection^[53]; (e) Schematic diagram of the working principle of ratio ECL cell sensor^[54]; (f) Sensor targeting^[54].

白1或A549细胞的识别探针,包含C-Ag⁺-C的发夹结构作为桥梁,用于信号放大的催化发夹结构与辅助DNA自身形成一个稳定的发夹结构,利用CdTe量子点作为纳米级信号报告器。通过P1-DNA与HP-DNA的循环结合和释放,可以放大游离Ag⁺环状释放的整个催化发夹结构过程。量子点的荧光信号可以被释放的游离Ag⁺猝灭,而量子点与Ag⁺结合也会导致溶液的颜色变化作为另一个检测信号。该方法可用于A549细胞中粘蛋白1的定量分析,且催化发夹结构提高了其敏感性。Ding等人构建了一个使用近红外荧光Ag₂S纳米点的HCR信号放大系统来检测CTCs,将Ag₂S量子点与EpCAM适配体利用发夹结构H1与H2进行组装,构建了近红外荧光硫化银纳米探

针,这可以极大地提高血样的成像灵敏度,降低背景信号,EpCAM适配体的存在,提高了探针的靶向性。由于信号放大和结合能力的提高,可以增加CTCs检测的灵敏度,它显示出巨大的临床应用潜力,最终实现了在每毫升全血中可以检测最低至6个CTCs^[60]。链置换不需要酶和其他辅助因子来实现DNA循环。因此,它更经济。此外,由于受到温度、pH值和金属离子等外部条件的干扰较小,因此它相对稳定。链位移信号放大的关键步骤是发夹设计,它必须确保每一个步骤触发的信号泄漏最小。

虽然通过各种核酸扩增策略已经获得了信号扩增,但在液体活检中追求更高的灵敏度仍然是很高的要求。为实现这一目标,出现了许多集成

多重放大方法的技术来实现传感信号的指数倍增。Wu 等人以人乳腺癌细胞(BT474)作为 CTCs 的研究对象,开发了一种利用荧光光谱的高灵敏度 CTCs 检测方法,设计了抗体与适配体结合的双识别捕获平台,引入双 RCA 反应(d-RCA, 包括 RCA1 和 RCA2)来实现 CTCs 的灵敏检测,适配体插入 RCA1(RCA1-p)后,由于多价结合效应,对靶细胞的亲和力显著提高,免疫磁分离消除了复

杂生物环境中共存的非靶细胞,而细胞/DNA 混合物的离心分离消除了多余的探针,从而避免了不必要的干扰。荧光光谱结果显示,BT474 细胞的荧光信号增强了 34 倍,目标细胞可定量检测至 9 个细胞/200 μ L,线性范围为 5 个数量级,表明检测性能显著提高。即使 BT474 细胞在新鲜的全血,没有明显的波动荧光信号,表明新开发的 d-RCA 分析系统适合筛选 CTCs 在复杂的环境中^[61]。

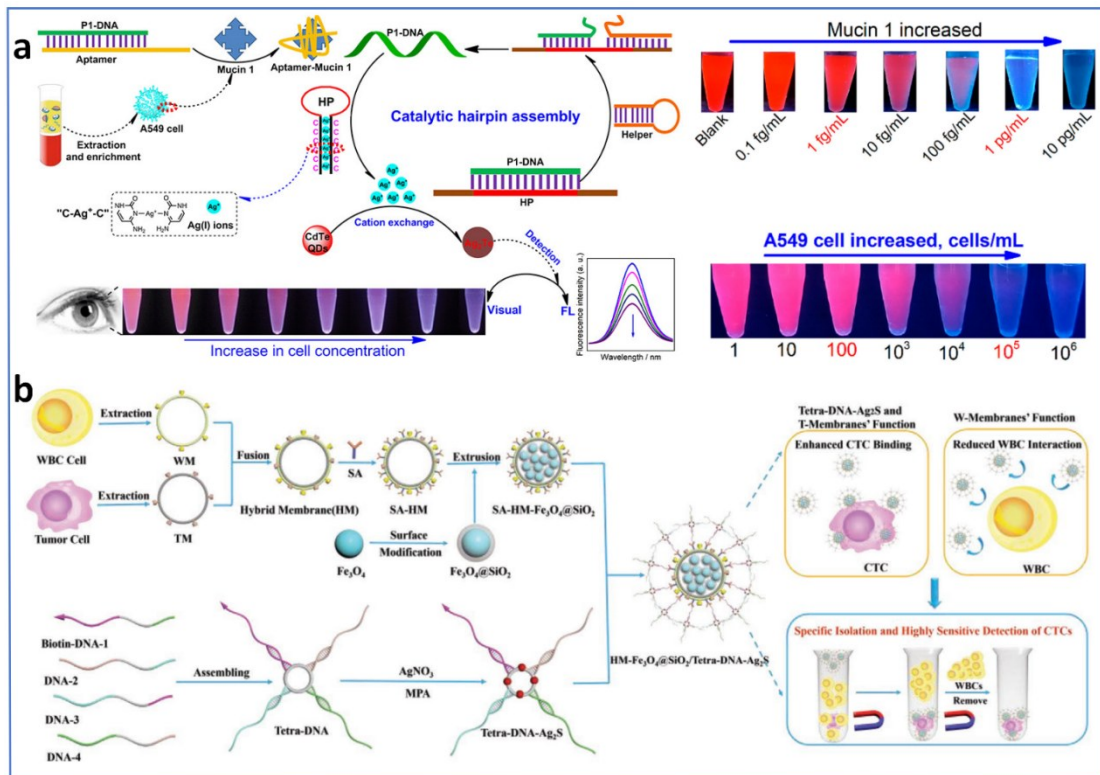


图 4 (a) 全核酸、无酶催化的发夹组装用于 CTCs 捕获原理图^[59]; (b) HM-Fe₃O₄@SiO₂/Tetra-DNA-Ag₂S 的制备过程与 CTCs 捕获原理^[62]。

Fig. 4 (a) Whole nucleic acid, enzyme-free hairpin assembly for CTCs capture schematics^[59]; (b) HM-Fe₃O₄@SiO₂/Tetra-DNA-Ag₂S preparation process and CTCs trapping principle^[62]。

CTCs 检测面临的另一个挑战是血液中大量背景白细胞的干扰。已获美国食品和药物管理局批准用于癌症诊断的 CellSearch 系统,由于受到白细胞干扰,其捕获纯度较低^[20, 63]。为解决此问题,已研发多种检测技术,如常用的免疫磁珠,利用磁珠作为分离介质,MB 表面的特异性抗体充当靶向模块^[64]。然而,从数十亿背景细胞中分离 CTCs 依然极具挑战性^[65]。基于量子点可与核酸信号扩增技术结合,已出现多种改进技术,如 Ma 等通过杂交链反应开发的纳米组件,包含多个 DNA 适配体修饰的 MB 和 CdTe/硫化镉量子点。该组件用于 CTCs 的磁分离和荧光检测,捕获纯度

约为 80 %^[66]。Kelly 等结合使用微流控装置和 EpCAM 修饰的磁性纳米颗粒,依据蛋白表达水平对 CTCs 进行分类,实现约 90 % 的 CTCs 捕获效率^[67]。Xian 等开发了基于多价适配体功能化的硫化银量子点修饰混合细胞膜并包覆到磁性纳米粒子表面以实现 CTCs 捕获,如图 4(b) 所示^[62]。这种荧光纳米材料是利用不同类型细胞膜包覆纳米材料来制备的,一方面继承了白细胞膜的特性可以排斥白细胞,避免背景白细胞的干扰,另一方面,肿瘤细胞膜的加入可以提高材料的靶向性。材料表面由于细胞膜的存在,也有利于适配体和量子点的修饰。这样的设计方法最终实现了高达 95%

的捕获效率。

3 循环肿瘤细胞的体内富集技术

实现血管中 CTCs 的高效捕获是目前国内外的研究热点, 该项技术使得体内检测 CTCs 成为一种可能, 并具有以下优点: (1) 实时监测患者体内 CTCs 的存在状态; (2) 有效避免样品采集、预处理、运输、储存等过程对分析结果的影响; (3) 可从不同的身体部位和不同的体液中捕获 CTCs, 促进更全面、准确地揭示肿瘤的进化过程和机制。

3.1 体内荧光流式细胞术

基于荧光的体内流式细胞术是一种监测体内 CTCs 的新兴工具。它使用光学直接检测 CTCs, 不易产生计数错误, 在连续而不是在离散的时间点测量 CTCs 群, 可以实现在极低的浓度中检测 CTCs^[68]。2018 年, Hu 等报道了一种通过普通共聚焦显微镜直接监测体内 CTCs 简单的光学方法^[21]。2019 年, Ding 等建立了皮下肿瘤和原位肿瘤模型, 采用荧光体内流式细胞术监测肿瘤切除前后小鼠血管 CTCs 数量的变化^[69]。但是在如此低的浓度以及如此低的血液流速下, 基于显微镜的体内流式细胞术可能需要一个相当长的采集时间来检测 CTCs 细胞。

利用漫反射探测大块组织中更大的循环血容量的扩散荧光流式细胞术可以提高体内流式细胞术的敏感性, 实现每分钟采集几百微升的外周血, 在几分钟内实现对整个小鼠外周血容量进行光学采集^[70]。但扩散荧光流式细胞术通常需要使用一个相对复杂的光学设计与多个光源和探测器来定位移动的细胞。此外, 由于激光和探测器必须固定在小鼠的肢体两侧, 并且肢体不能过大, 限制了扩散荧光流式细胞术在大型动物身上的应用^[71]。为此, Mark 等设计了光纤-扩散荧光流式细胞术仪器^[72]。该仪器将两个微加工滤波器直接沉积在光纤尖端, 以去除光纤中产生少量的自身荧光对体内单个细胞的微弱信号的干扰。激发光纤有一个较大带通, 探头尖端也有一个直径为 3 毫米的球形透镜将样品的光耦合到光纤中, 从而避免了噪声干扰并可以实现在大型动物身体上的应用。

3.2 光声成像

光声成像通过光学探测产生的热诱导声波以及短激光脉冲照射细胞本身产生的超声波来实现对目标的检测^[73, 74]。光声成像能将组织吸收的光能转化为热弹性膨胀, 该膨胀产生的超声波可被

换能器检测, 并生成组织内光学吸收的对比图像。利用不同类型和形状的细胞或纳米颗粒对激光的不同波长吸收存在的差异, 可以使用单波长或多波长激光器进行激发, 从而精确确定目标的位置和数量。相比于荧光成像, 光声成像拥有更深的厘米级穿透能力, 能成像周围血管, 检测较大血容量而提供更高的检测灵敏度。

然而, 在临床推广方面, 光声成像面临一些挑战。对不含特定吸收物质的细胞, 必须使用纳米颗粒进行标记。对这些纳米颗粒的生物安全性需进一步研究。同时, 人体组织和血液会对光声成像造成干扰, 难以对更深层的血管进行检测, 并且在癌症发展的早期阶段, 有效的血管系统中很少有 CTCs。磁动力学光声成像旨在通过抑制背景信号来增强光声成像的对比度^[22, 75]。磁动力学光声成像可以识别那些被磁性纳米粒子和光学吸收组件标记的复合粒子。通过结合造影剂与目标组织或细胞, 并利用外部磁场进行磁性操纵, 可以实现目标区域与磁场的相互移动。这种运动调制了光声成像信号, 在空间或时间上, 可以对记录的一系列光声信号进行运动滤波, 从而抑制对磁性不敏感的背景信号^[76, 77]。

3.3 循环肿瘤细胞的治疗阻断

为了有效抑制肿瘤转移, 仅仅进行 CTCs 检测是不够的, 后期的治疗灭活也格外重要, 能够显著提高癌症患者的生存率^[78, 79]。我们课题组致力于循环肿瘤细胞的诊疗一体化研究, 旨在开发癌症转移阻断和个体化精准治疗的新技术。在 2016 年, Xu 等对抗肿瘤药物进行了初步研发, 通过双亲性硅烷包覆的方法修饰了油性上转换纳米粒子, 以实现其在水中的稳定性。此外, 通过利用硅烷修饰的疏水包覆层结构, 载入功能性油性分子 (包括抗癌药物紫杉醇 PTX 和氧气传感材料 PtOEP), 创造了一种具有生物成像、肿瘤治疗和氧气传感等多功能的复合纳米材料^[80]。为了提高抗肿瘤药物的靶向性, Sun 等采用了磁靶向策略, 设计并合成了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ce6}/\text{C6}@\text{silane}$ 。基于两亲性硅烷包覆, 将光敏剂 Ce6、C6 及四氧化三铁磁性纳米粒子集成到内部疏水环境中, 形成了一种旨在通过双模成像和磁靶向技术增强治疗效果的剂型如图 5(a) 所示^[81]。精确的光热治疗是避免对正常细胞和组织造成不必要损害的关键。为了提高肿瘤治疗效果, Sun 等进一步设计了光热疗法和

光动力治疗的联合治疗方案,研发了一种光热疗法的实时温度监测策略如图 5(b)所示,使用 NaYF₄:Yb、Er 上转换纳米粒子结合光敏剂 Ce6 对介孔二氧化硅进行修饰^[82]。

此外,面对目前存在着大多数光敏剂的疏水性、体内转运的安全性和耗氧特性等挑战,Sun 等研发了一种针对增强联合治疗的多功能白蛋白载体,如图 5(c)所示。这一载体同时携带光敏剂 Ce6 和生物还原性前药替拉扎明。白蛋白作为最丰富的血浆蛋白,展现出非常优异的生物相容性和生物降解性。替拉扎明可通过光动力治疗过程中的氧气消耗及肿瘤微环境的乏氧条件被激活,通过在乏氧细胞中分解成自由基,从而损伤 DNA 并产生细胞毒效应。相比于无机纳米粒子,基于白蛋白的复合物显示出更高的生物安全性。值得注意的是,在复合纳米材料中还装载了 C6 荧光染料。Ce6 和 C6 均可被 405 nm 光激发,而经红光辐照后,Ce6 的荧光强度减弱,但 C6 的荧光强度并未显著改变。基于此特性,可以利用 Ce6/C6 的荧光比率监测光动力治疗的进展。该联合治疗策略有效利用了两种治疗分子的互补特性,显著增强了治疗效果,并提供了治疗监控的可能性^[83]。

为了进一步实现循环肿瘤细胞的诊疗一体化,Xu 等设计了一个集成硅纳米线和多功能磁性复合纳米材料(Fe₃O₄@C6/Ce6@silane)的倒置型微流控芯片。抗体修饰的 Fe₃O₄@C6/Ce6@silane 可对 CTCs 进行标记,并将在磁场的作用下导航至上层捕获表面,实现 90% 的捕获纯度。Ce6 的加入还可以实现对捕获 CTCs 实施原位灭活,这对阻断肿瘤扩散具有积极的影响意义^[87]。然而,现有的循环肿瘤细胞检测与分离方法仍然面临许多技术挑战。细胞的表面存在的细胞伪足、细胞外基质等表面结构很容易嵌入纳米结构中,肿瘤细胞表面结构的分形维度通常比正常细胞的要大。为了在微流控芯片中设计具有更优化形貌特征的捕获面以提高循环肿瘤细胞与捕获面之间的接触概率和接触时间,Xu 等设计了一种仿生二氧化钛反蛋白石光子晶体结构,如图 5(d)所示。通过在反蛋白石基底上引入聚多巴胺进一步修饰特殊识别的抗体 anti-EpCAM,其表面形貌能够有效地与细胞表面结构相互作用。在 PBS 环境下 1 mL/h 的流速和 415 nm 的孔径尺寸条件下,捕获效率可达到 92%。这种基于反蛋白石光子晶体结构

的微流控芯片实现了 35% 的荧光信号增强,在 CTCs 的捕获率和实时监测方面展现出显著优势,有望在临床环境中提供可靠且灵敏的检测^[84]。

此外,基于对循环肿瘤细胞进行的实时计数可以有效减少假阴性结果,Lv 等提出了一种用于 CTCs 的分选、计数和原位灭活的新型微流控芯片策略。如图 5(e)所示,通过将稀土掺杂的反蛋白石光子晶体结构材料用作 CTCs 的捕获表面和发光层,设计并合成了 anti-EpCAM-Fe₃O₄@Ce6@Silane 探针,实现 95% 以上的 CTCs 捕获效率。除细胞计数外,如图 5(f)所示,该策略还利用 Ce6 分子的光动力治疗功能,实现了对捕获后的 CTCs 进行原位灭活。这项研究不仅可应用于 CTCs 的检测,也对体内原位清除 CTCs 以阻断肿瘤转移途径进行了体外探索,为临床上降低肿瘤患者的死亡率提供了重要支持^[85]。为了进一步实现 CTCs 的体内捕获以及治疗阻断,Wang 等开发了一种用于 CTCs 体内富集和光热杀伤的微创治疗性静脉导管,导管表面用抗 EpCAM 抗体修饰,内部填充黑磷纳米片,如图 5(g)所示。外周血中的 CTCs 在循环的帮助下不断被导管捕获。捕获的 CTCs 可以用于下游分析或通过黑磷纳米片的近红外光热效应在体内消除。在 5 分钟的处理过程中获得了 2.1% 的捕获效率,在体外闭环循环系统和体内兔模型中,对捕获到的 CTCs 通过近红外光照射实现了 100% 的灭活阻断^[86]。

4 循环肿瘤细胞的下游分析

随着科学技术的不断进步,对 CTCs 的研究已经从简单的计数发展到了细胞水平和基因型分子水平的分析。确保下游分析中提取的遗传物质纯度、CTCs 释放后能保持较高的细胞活力和捕获效率以及捕获 CTCs 的数量,成为了 CTCs 捕获平台新的挑战。CTCs 的特异性鉴定和下游分析最常用的方法包括基于免疫细胞化学/免疫荧光染色的肿瘤特异性抗原检测,以及基于核酸序列鉴定的各种分子分析方法。CTCs 分析有助于确定与治疗相关的特定分子靶点,扩大人们对侵袭、迁移和免疫监视等基本分子途径的认识^[88]。

4.1 疾病检测及预后评价

2018 年,美国 AJCC《肿瘤分期指南》将 CTCs 明确定义为乳腺癌预后评估的工具之一。该指南指出,临床晚期乳腺癌患者外周血中 CTCs \geq 5 个/7.5 mL,临床早期乳腺癌患者外周血中 CTCs \geq 1

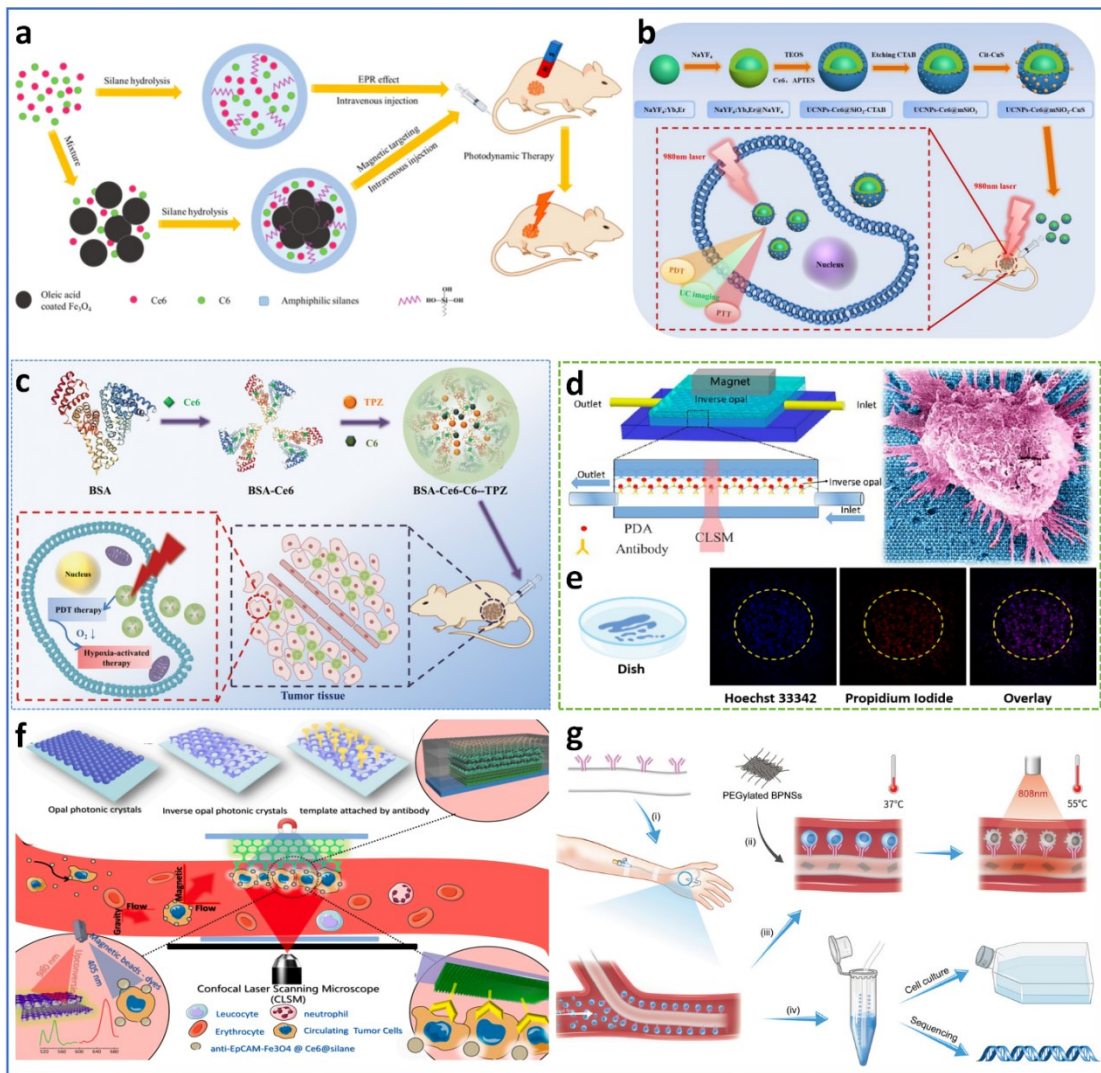


图5 (a)抗肿瘤药物载体合成过程以及磁靶向过程^[81]; (b)上转换纳米复合材料的制备和双模式肿瘤治疗过程^[82]; (c) BSA-Ce6-C6-TPZ的制备及联合治疗^[83]; (d)微流控芯片的IOPC原理图以及细胞在捕获面长出的伪足^[84]; (e) CTCs的原位灭活^[85]; (f)一种用于同时捕获和识别CTCs的微流控装置的示意图^[85];

Fig.5 (a) anti-tumor drug carrier synthesis process and magnetic targeting process^[81]; (b) Preparation of up-conversion nanocomposites and dual-mode tumor therapy processes^[82]; (c) Preparation and combination therapy of BSA-Ce6-C6-TPZ^[83]; (d) The IOPC schematic diagram of the microfluidic chip and the growth of the cell pseudopods at the capture surface^[84]; (e) In situ inactivation of CTCs^[85]; (f) A schematic of a microfluidic device for simultaneously capturing and identifying CTCs^[85]; (g) Schematic of the BPNSs-catheter based therapy^[86].

(g)基于BPNS导管的治疗示意图^[86]

个/7.5 ml,均提示了不良预后^[89],其数量的增加与患者预后的恶化密切相关。相较于传统影像学方法,CTCs计数可以更早期地反映患者的疾病状态和预后,并更准确地预测患者的总体生存期^[90]。越来越多的肿瘤临床研究将CTCs作为追踪患者状态的指标。在肿瘤免疫治疗预测中,CTCs的PD-L1阳性表达与预后不良及免疫治疗效果不佳相关。这些结果与通过组织检测得到的PD-L1表达结果相反,突显了高效CTCs检测在临床发展中

的重要性^[91,92]。

Li等利用了免疫磁性平台 $Fe_3O_4 @ SiO_2 @ PTMAO @ Aptamer$ 检测了结直肠癌患者血液样本中上皮CTCs(E-CTCs)、间质CTCs(M-CTCs)和混合型CTCs(EM-CTCs)的数量如图6(a)所示,并分析了这些CTCs表型与CRC患者临床信息之间的关联。研究对40名处于不同阶段的结直肠癌患者进行了手术前后的CTCs异质性比例分析,结果显示E-CTCs或M-CTCs的数量及比例均显著低

于EM-CTCs。M-CTCs比例的增加与结直肠癌的转移呈正相关,同时也与CRC患者手术及化疗的疗效有关。手术后,M-CTCs比例在所有阶段的患者中均呈下降趋势,但显著差异仅在晚期患者中观察到^[93]。肿瘤异质性是导致治疗耐药性和癌症复发的主要原因。在单细胞水平上及时评估治疗作用的适当性是解决这个问题的关键。如图6(b)所示, Ren等使用多功能化纳米系统实现了CTCs的重编程,并在单细胞水平上对生物标志物进行原位检测。该研究为在单细胞分辨率下深入分析癌细胞对治疗作用的反应提供了一种简单的策略,以便及时方便地评估治疗结果^[94]。

4.2 肿瘤临床分期

肿瘤的大小(T阶段)和淋巴结转移与CTCs的检出率有着密切的联系。综合多因素生存率分析,CTCs的检测率和肿瘤尺寸、淋巴结转移及分子型别一样,均为独立的预后因素。因此,在临床及影像学资料未显示转移性病灶的情况下,CTCs与通过免疫组化或分子诊断技术发现的微小转移与一样,具有预后意义。在M0与M1阶段的判定中,CTCs可以作为一个重要的指标^[95]。中国临床肿瘤协会和中国胸部肿瘤研究协作组的液体活检专家也一致认为,在肺癌的早期检测与复发监控方面,CTCs具有重要的科研应用价值。Wan等开发了一种迷宫式微流控装置,研究了CTCs数量与临床HCC分期的相关性。在这项研究中,选取了42名HCC患者的血液样本,并与5名非HCC健康受试者进行了对照。统计分析显示,HCC分期越晚,CTCs的阳性率越高。此外,55%的患者中检测到循环肿瘤微栓,表明其与晚期HCC分期相关^[23]。CTCs检测可以扩大隐匿性微转移患者的风险分层,为将来选择有风险的患者进行密切监测或通过使用CTC检测技术进行增强的多模式治疗提供了可能。例如Reeh等提出使用CTCs检测进行食管癌的术前患者分期,选择容易肿瘤复发的患者并进行强化治疗,以获得最佳治疗效果^[96]。

4.3 基因分析及辅助靶向治疗

基于组织活检的分子靶向治疗是癌症精准医疗的主要技术手段。虽然可以准确地获得肿瘤遗传信息,但组织活检是一个昂贵、有创且痛苦的过程,且仅限于某些肿瘤部位。通过血液取样或液体活检获取肿瘤细胞,提供了一个有前景的替代

肿瘤组织活检的方案。近年来,由于其低侵袭性、能够反映原发及转移肿瘤特征的完整遗传信息,CTCs基因突变谱分析已成为一种辅助诊断工具,用于描述肿瘤分子异质性并指导治疗的基因型监测。

Cheng等开发了一种用于CTCs捕获和基因表达分析的流体力学单细胞RNA测序(scRNA-seq)技术Hydro-Seq,如图6(c)所示。该技术支持大规模并行分析。使用Hydro-Seq技术,成功对21名乳腺癌患者样本中的666个CTCs进行了单细胞RNA测序,检测到了ER、PR、AR以及HER2的突变,识别了激素和靶向治疗的药物靶点,有助于确定靶向治疗方案。此外,通过跟踪表达癌症干细胞和上皮/间充质转换标记物的单细胞,该研究还为肿瘤转移、治疗选择、细胞异质性分析提供了重要信息^[97]。Kenji等利用密度梯度离心法富集CTCs,研究了100名胃癌患者在胃切除术前的血液样本。免疫组织化学评估显示,外周血中FGFR2阳性CTCs的数量与原发胃癌中的FGFR2表达水平密切相关。FGFR2阳性CTCs患者(≥ 5 个细胞/10 mL血液)的无复发生存率明显低于无FGFR2阳性CTCs患者^[24]。此外,为了在分析CTCs的抗癌耐药基因表达水平时排除白细胞对测试细胞样品的潜在干扰,Chiu等将光诱导介电泳基于力的细胞操作技术集成到微流控系统中,以在传统的CTC分离过程后进一步纯化CTC,从而提高分析灵敏度^[98]。

4.4 体外培养及药敏试验

从患者肿瘤组织中获取的体外培养细胞可用于评估不同治疗方案的效果。通过微创的液体活检从患者外周血中定期取样CTCs支持对临床治疗效果及耐药性发展的实时监控。此外,CTCs源自原发肿瘤,保留了与原发肿瘤癌细胞类似的行为和异质性特征。体外培养CTCs不仅提供了进行进一步鉴定所需的大量细胞,还在新药筛选、疾病特性鉴定、生化机制研究等方面展现出广泛的应用前景。

Guadagni等从黑色素瘤和卵巢癌患者中成功分离并培养出短期稳定的CTCs,测试了这些细胞对多种化疗药物的敏感性。结果表明与基于组织的药物筛查相比,CTC药物筛查的预测价值更好,在卵巢癌患者中的敏感性为100%,特异性为50%,阳性预测值为33%,阴性预测值为100%,准

确性为 60%^[99]。Guadagni 等已经注册了临床试验, 以在更大的患者队列中验证结果。大多数 CTCs 是从外周血中分离出来的, 但 Lianette 等利用基于大小的惯性微流控分离技术, 从 10 名晚期胰腺癌患者血液中成功分离出 CTCs, 并对其进行了体外扩增和功能性表征。在使用吉西他滨和 5-FU 进行测试时, CTCs 细胞系显示出药物敏感性的差异^[25]。Smriti 等报道了一种棉花微流控基底, 该基底不仅能有效分离 CTCs, 还能促进其体外扩增。纳米结构表面的棉花微流控基底有效分离

CTCs, 并作为基质促进了捕获细胞形成的 3D 肿瘤球体。在使用抗癌药物顺铂治疗的情况下, 治疗后的第 2 天和第 3 天, 肿瘤缩小停止, 并随后观察到肿瘤球体的逐渐生长, 暗示了肿瘤对药物的耐药性。这一发现突显了棉花微流控基底在药物发现和化疗疗效评估中的应用潜力^[100]。Liu 等则通过门静脉采血分离出长期稳定的胰腺癌 CTCs, 并证明 CTCs 对常见的化疗药物(如吉西他滨、5-FU 以及奥沙利铂和吉西他滨的组合)具有高度耐药性^[101]。

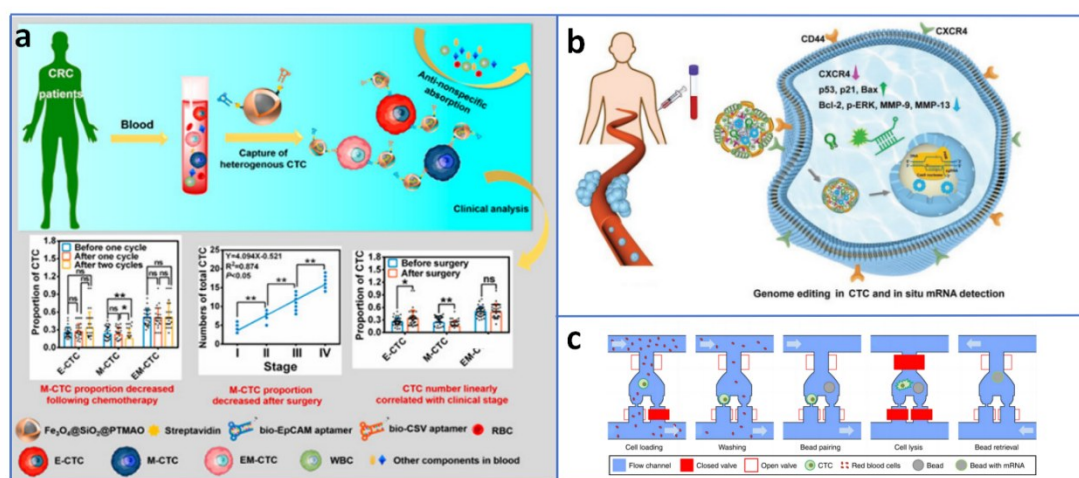


图 6 (a)在免疫磁性和抗非特异性吸附平台上捕获结直肠癌患者的异质循环肿瘤细胞示意图^[93](b)用于重编程 CTCs 的功能性肿瘤靶向纳米系统示意图^[94](c)用于污染稀有样品的高捕获效率 scRNA-seq 平台示意图^[97]

Fig.6(a) Schematic Illustrations of capture of heterogeneous CTCs in Colorectal Cancer Patients on Fe₃O₄@SiO₂@PTMAO@Aptamer platform^[93](b)Schematic diagram showing CXCR4 knockout and in situ probing of mRNA to evaluate therapeutic efficiency in a CTC^[94](c)Schematic Illustrations of Hydro-Seq, a high capture efficiency scRNA-seq platform for contaminated rare samples.^[97]

5 结论与展望

近年来,基于荧光方法的 CTCs 检测技术快速发展,在灵敏度、准确度和可靠性方面取得了新的突破,旨在快速、高效、准确地进行 CTCs 检测与肿瘤早期筛查诊断。鉴于单一检测技术的局限性,当前荧光检测策略通常与其他技术结合使用,以提高准确性。此外,文献中报道了几种用于体内 CTCs 高灵敏度检测的策略。尽管基于荧光的 CTCs 检测技术取得了显著进展,但其仍面临众多

挑战。例如血液中的大量白细胞降低了捕获纯度,这要求开发新方法以避免外周血样本中背景细胞的干扰,从而高效且灵敏地捕获 CTCs。另一挑战是无法实时监测 CTCs 的捕获过程,因为最佳平台依赖于不透明的最大细胞接触捕获层,阻碍了实时监测的可能性。此外,虽然当前的研究关注 CTCs 的治疗阻断,但在体内实现 CTCs 的原位灭活效果并不理想。因此,如何实现高效率与高纯度地捕获及及时灭活 CTCs 仍需要各相关领域的研究人员进一步探索。

参 考 文 献:

- [1] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *cell*, 2011, 144(5): 646-674.
[2] Das P, Sedighi A, Krull U J. Cancer biomarker determination by resonance energy transfer using functional fluorescent

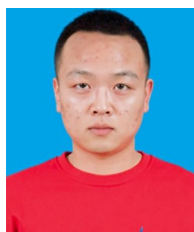
- nanoprobes[J]. *Analytica chimica acta*, 2012. 17(12): 14067-14090.
- [3] Aiello N M, Rhim A D, Stanger B Z. Isolating epithelial and epithelial-to-mesenchymal transition populations from primary tumors by fluorescence-activated cell sorting[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016, 2016(1): 34-37.
- [4] Coumans F A W, Ligthart S T, Uhr J W, *et al.* Challenges in the enumeration and phenoty** of CTC[J]. *Clinical Cancer Research*, 2012, 18(20): 5711-5718.
- [5] Ring A, Nguyen-Sträuli B D, Wicki A, *et al.* Biology, vulnerabilities and clinical applications of circulating tumour cells [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2023, 23(2): 95-111.
- [6] Paterlini-Brechot, Benali P. and N. L. , Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. [J]. *Cancer letters*, 2007. 253(2): 180-204.
- [7] Wang S, Liu K, Liu J, *et al.* Highly efficient capture of circulating tumor cells by using nanostructured silicon substrates with integrated chaotic micromixers[J]. *Angewandte Chemie*, 2011, 123(13): 3140-3144.
- [8] Wang H, Ahn S, Kim S, *et al.* Detection of circulating tumor cell-specific markers in breast cancer patients using the quantitative RT-PCR assay[J]. *International journal of clinical oncology*, 2015, 20: 878-890.
- [9] Chen Q, Hu W, Shang B, *et al.* Ultrasensitive amperometric aptasensor for the epithelial cell adhesion molecule by using target-driven toehold-mediated DNA recycling amplification[J]. *Microchimica Acta*, 2018, 185: 1-8.
- [10] 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[J]. *ACS applied materials & interfaces*, 2017, 9(40): 34706-34714.
- [11] Li J, Liu S, Sun L, *et al.* Amplified visualization of protein-specific glycosylation in zebrafish via proximity-induced hybridization chain reaction[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(48): 16589-16595.
- [12] Zhang R R, Schroeder A B, Grudzinski J J, *et al.* Beyond the margins: real-time detection of cancer using targeted fluorophores[J]. *Nature reviews Clinical oncology*, 2017, 14(6): 347-364.
- [13] Drummen G. P. , Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques—illuminating biological and biomedical research. [J]. *Molecules*, 2012. 17(12): 14067-14090.
- [14] Fei X. and Gu Y. , Progress in modifications and applications of fluorescent dye probe. [J]. *Progress in Natural Science*, 2009. 19(1): 1-7.
- [15] 赵玉慈, 赵雄燕, 王鑫. 稀土上转换纳米发光材料的研究进展[J]. *现代化工*, 2016, 36(7): 21-24.
ZHAO Y C, ZHAO X Y, WANG X, *et al.* Research progress of rare-earth up-conversion luminescent material[J]. *Modern chemical industry*, 2016, 36(7): 21-24. (in Chinese)
- [16] 姜天舒, 张若彤, 董昌梓, 等. 多种形态结构的光学纳米生物传感器及其在肿瘤筛查中的应用[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 148-154.
JANG T S, ZHANG R T, DONG C Z, *et al.* Optical nanobiosensors with multiple morphological structures and their applications in tumor screening[J]. *Chinese Journal of Laser*, 2020, 47(2): 148-154. (in Chinese)
- [17] Wang W, Liu S, Li C, *et al.* Dual-target recognition sandwich assay based on core-shell magnetic mesoporous silica nanoparticles for sensitive detection of breast cancer cells[J]. *Talanta*, 2018, 182: 306-313.
- [18] David C, García de Abajo F J. Surface plasmon dependence on the electron density profile at metal surfaces[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(9): 9558-9566.
- [19] Xiong K, Wei W, Jin Y, *et al.* Biomimetic Immuno-Magnetosomes for High-Performance Enrichment of Circulating Tumor Cells[J]. *Advanced Materials*, 2016, 28(36): 7929-7935.
- [20] A R H, B Z K, A S Y Z, *et al.* Circulating tumor cells: Advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 141(2): 209-221.
- [21] Hu Y, Tang W, Cheng P, *et al.* Monitoring circulating tumor cells in vivo by a confocal microscopy system[J]. *Cytometry Part A*, 2019, 95(6): 657 - 663.
- [22] Huang S W, Gao X, O'Donnell M. Integration of photoacoustic, ultrasound, and magnetomotive system[C]//*Photons Plus Ultrasound: Imaging & Sensing. International Society for Optics and Photonics*, 2010.
- [23] th K J, *et al.* New Labyrinth Microfluidic Device Detects Circulating Tumor Cells Expressing Cancer Stem Cell Marker and Circulating Tumor Microemboli in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 18575.
- [24] Kuroda K, Yashiro M, Miki Y, *et al.* Circulating Tumor Cells with FGFR2 Expression Might Be Useful to Identify Patients Existing FGFR2 Overexpression Tumor[J]. *Cancer Science*, 2020. 111(12): 4500-4509.

- [25] Meng Q , Liu Z , Rangelova E , *et al.* Expansion of Tumor-reactive T Cells From Patients With Pancreatic Cancer[J]. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 2016, 39(2):81-89.
- [26] Wu L. , *et al.* , Fluidic Multivalent Membrane Nanointerface Enables Synergetic Enrichment of Circulating Tumor Cells with High Efficiency and Viability[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(10):4800-4806.
- [27] Dan C , Gui-Lin C , Ting W , *et al.* Combination of multiple nucleic acid aptamers for precision detection of tumors based on optical methods[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2023(10):149.
- [28] Wen C. -Y. , *et al.* Quick-Response Magnetic Nanospheres for Rapid, Efficient Capture and Sensitive Detection of Circulating Tumor Cells[J]. *ACS nano*, 2014. 8(1): 941-949.
- [29] Zhili, Wang, Sun, *et al.* High-Efficiency Isolation and Rapid Identification of Heterogeneous Circulating Tumor Cells (CTCs) Using Dual-Antibody-Modified Fluorescent-Magnetic Nanoparticles. [J]. *ACS applied materials & interfaces*, 2019, 11(43):39586-39593.
- [30] Hu M. , *et al.* , Development of Metal-Organic Framework-Based Dual Antibody Nanoparticles for the Highly Specific Capture and Gradual Release of Circulating Tumor Cells. [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022. 10: 806238.
- [31] Liao Z , Han L , Li Q , *et al.* Gradient Magnetic Separation and Fluorescent Imaging-Based Heterogeneous Circulating Tumor Cell Subpopulations Assay with Biomimetic Multifunctional Nanoprobes [J]. *Advanced Functional Materials*, 2021. 31(18): 2009937.
- [32] Wu L L , Wen C Y , Hu J , *et al.* Nanosphere-based one-step strategy for efficient and nondestructive detection of circulating tumor cells[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 94:219-226.
- [33] Wu L L , Zhang Z L , Tang M , *et al.* Spectrally Combined Encoding for Profiling Heterogeneous Circulating Tumor Cells Using a Multifunctional Nanosphere-Mediated Microfluidic Platform[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020. 59(28): 11240-11244.
- [34] Guo H , Song X , Lei W , *et al.* Direct Detection of Circulating Tumor Cells in Whole Blood Using Time-Resolved Luminescent Lanthanide Nanoprobes. [J]. *Angewandte Chemie*, 2019, 58(35):12195-12199.
- [35] Xia W , Li H , Li Y , *et al.* In Vivo Coinstantaneous Identification of Hepatocellular Carcinoma Circulating Tumor Cells by Dual-Targeting Magnetic-Fluorescent Nanobeads[J]. *Nano Letters*, 2020. 21(1): 634-641.
- [36] 董彪,郭丽华,刘大勇,等. 基于荧光方法的肿瘤标志物检测研究进展[J]. 中国激光, 2022, 49(20):17-38.
DONG B, GUO L H, LIU D Y, *et al.* Progress in tumor biomarker detection based on fluorescence method[J]. *Chinese Journal of Laser*, 2022, 49(20):17-38. (in Chinese)
- [37] Lian W. , *et al.* , Broadband excitable NIR-II luminescent nano-bioprobes based on CuInSe₂ quantum dots for the detection of circulating tumor cells. [J]. *Nano Today*, 2020. 35: 100943.
- [38] Zhang X, Wei X, Men X, *et al.* Dual-multivalent-aptamer-conjugated nanoprobes for superefficient discerning of single circulating tumor cells in a microfluidic chip with inductively coupled plasma mass spectrometry detection [J]. *ACS applied materials & interfaces*, 2021, 13(36): 43668-43675.
- [39] Xu C , He X Y , Ren X H , *et al.* Direct detection of intracellular miRNA in living circulating tumor cells by tumor targeting nanoprobe in peripheral blood[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021. 190: 113401.
- [40] Zhang Q , Wang W , Huang S , *et al.* Capture and selective release of multiple types of circulating tumor cells using smart DNzyme probes[J]. *Chem. Sci*, 2020, 11(7):1948-1956.
- [41] Vajhadin F , Mazloum-Ardakani M , Sanati A , *et al.* Optical cytosensors for the detection of circulating tumour cells[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2022. 10(7): 990-1004.
- [42] Zhang Z , King M R . Nanomaterials for the Capture and Therapeutic Targeting of Circulating Tumor Cells[J]. *Cellular & Molecular Bioengineering*, 2017, 10(1):275-294.
- [43] Hu X , Zang X , Lv Y . Detection of circulating tumor cells: Advances and critical concerns[J]. *Oncology letters*, 2021, 21(5):422.
- [44] Jiao L , Xu Z , Du W , *et al.* Fast Preparation of Polydopamine Nanoparticles Catalyzed by Fe²⁺/H₂O₂ for Visible Sensitive Smartphone-Enabled Cytosensing[J]. *Acs Appl Mater Interfaces*, 2017:28339-28345.
- [45] Ferrer, Jennifer R , Barnaby, *et al.* Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells, and Tissues by Fluorescence[J]. *Chemical Reviews*, 2015. 115(19): 10530-10574.

- [46] Medintz I L , Clapp A R , Mattoussi H , *et al.* Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors [J]. *Nature Materials* , 2003. 2(9): p. 630-638.
- [47] Alibolandi M , Hadizadeh F , Vajhedin F , *et al.* Design and fabrication of an aptasensor for chloramphenicol based on energy transfer of CdTe quantum dots to graphene oxide sheet[J]. *Materials Science & Engineering C* , 2015, 48:611-619.
- [48] Tran M V , Susumu K , Medintz I L , *et al.* Supraparticle Assemblies of Magnetic Nanoparticles and Quantum Dots for Selective Cell Isolation and Counting on a Smartphone-Based Imaging Platform[J]. *Analytical Chemistry* , 2019. 91(18) : 11963-11971.
- [49] Chen H , Hou Y , Ye Z , *et al.* Label-free surface plasmon resonance cytosensor for breast cancer cell detection based on nano-conjugation of monodisperse magnetic nanoparticle and folic acid[J]. *Sensors and Actuators B Chemical* , 2014, 201 : 433-438.
- [50] Shengsong, Jia, Pengfei, *et al.* A cytosensor based on NiO nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance for detection of the breast cancer cell line MCF-7[J]. *Microchimica Acta* , 2016, 183(2) :683-688.
- [51] 李旭光,元秀华. 表面等离子体(SPR)检测电路设计[J]. 中国医学物理学杂志, 2003, 20(4):267-269.
Li X G, YUAN X H. Surface plasma (SPR) detection circuit design[J]. *The Chinese Journal of Medical Physics* , 2003, 20(4) :267-269. (in Chinese)
- [52] LoyezMédéric, Hassan E M , Lobry M , *et al.* Rapid Detection of Circulating Breast Cancer Cells Using a Multiresonant Optical Fiber Aptasensor with Plasmonic Amplification[J]. *ACS Sensors* , 2020, 5(2). 454 – 463
- [53] Wang K , Zhang R , Sun N , *et al.* Near-Infrared Light-Driven Photoelectrochemical Aptasensor Based on the Upconversion Nanoparticles and TiO₂/CdTe Heterostructure for Detection of Cancer Cells[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces* , 2016. 8(39): 25834-25839.
- [54] Ding C , Li Y , Wang L , *et al.* Ratiometric Electrogenated Chemiluminescence Cytosensor Based on Conducting Polymer Hydrogel Loaded with Internal Standard Molecules[J]. *Analytical Chemistry* , 2018. 91(1) :983-989.
- [55] Liu S , He P , Hussain S , *et al.* Conjugated Polymer-Based Photoelectrochemical Cytosensor with Turn-On Enable Signal for Sensitive Cell Detection[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces* , 2018. 10(7) : 6618-6623.
- [56] Hu X. , *et al.* , Nucleic acid and nanomaterial-assisted signal-amplified strategies in fluorescent analysis of circulating tumor cells and small extracellular vesicles. [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 2023. 415(18) :3769-3787.
- [57] Yurke B. , *et al.* , A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. [J]. *Nature* , 2000. 406(6796) : 605-608.
- [58] Miao P. and TangY. , Cascade toehold-mediated strand displacement reaction for ultrasensitive detection of exosomal microRNA. [J]. *CCS Chemistry* , 2021. 3(7) : 2331-2339.
- [59] Chen P , Wang Y , He Y , *et al.* Homogeneous Visual and Fluorescence Detection of Circulating Tumor Cells in Clinical Samples via Selective Recognition Reaction and Enzyme-Free Amplification. [J]. *ACS nano* , 2021. 15(7) : 11634-11643.
- [60] Ding, Caiping, Zhang, *et al.* Near-Infrared Fluorescent Ag₂S Nanodot-Based Signal Amplification for Efficient Detection of Circulating Tumor Cells[J]. *Analytical Chemistry* , 2018. 90 (11) : 6702-6709.
- [61] Sun S , Yang S , Hu X , *et al.* Combination of Immunomagnetic Separation with Aptamer-Mediated Double Rolling Circle Amplification for Highly Sensitive Circulating Tumor Cell Detection[J]. *ACS Sensors* , 2020, 5(12) : 3870-3878.
- [62] Ding C. , *et al.* , Multivalent Aptamer Functionalized Ag₂S Nanodots/Hybrid Cell Membrane-Coated Magnetic Nanobio-probe for the Ultrasensitive Isolation and Detection of Circulating Tumor Cells. [J]. *Advanced Functional Materials* , 2020. 30(16) : 1909781.
- [63] Xiong K , Wei W , Jin Y , *et al.* Biomimetic Immuno-Magnetosomes for High-Performance Enrichment of Circulating Tumor Cells[J]. *Advanced Materials* , 2016, 28(36) :7929-7935.
- [64] Yu M , Stott S , Toner M , *et al.* Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization[J]. *The Journal of Cell Biology* , 2011, 192(3) :373-382.
- [65] Lang R , Qian-Fang M , Qinqin H , *et al.* Platelet – Leukocyte Hybrid Membrane-Coated Immunomagnetic Beads for Highly Efficient and Highly Specific Isolation of Circulating Tumor Cells[J]. *Advanced Functional Materials* , 2018, 28 (34) :1803531. 1-1803531. 9.
- [66] Li Z, Wang G, Shen Y, *et al.* DNA-templated magnetic nanoparticle-quantum dot polymers for ultrasensitive capture and detection of circulating tumor cells[J]. *Advanced Functional Materials* , 2018, 28(14) : 1707152.
- [67] Green B J , Nguyen V , Atenafu E , *et al.* Phenotypic Profiling of Circulating Tumor Cells in Metastatic Prostate Cancer

- Patients Using Nanoparticle-Mediated Ranking[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(15): 9348-9355.
- [68] Lee H , Alt C , Pitsillides C M , *et al.* In vivo imaging flow cytometer[J]. *Optics Express*, 2006, 14(17):7789.
- [69] Pang K , Xie C , Yang Z , *et al.* Monitoring circulating prostate cancer cells by in vivo flow cytometry assesses androgen deprivation therapy on metastasis[J]. *Cytometry Part A*, 2018. 93(5):517-524.
- [70] Shawn, Wagner, Armin, *et al.* Time-of-flight quantitative measurements of blood flow in mouse hindlimbs[J]. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2004. 19(4): 468-474.
- [71] Pestana N , Mortensen L J , Runnels J M , *et al.* Improved diffuse fluorescence flow cytometer prototype for high sensitivity detection of rare circulating cells in vivo[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(7):077002.
- [72] Pera V. , *et al.* , Diffuse fluorescence fiber probe for in vivo detection of circulating cells. [J]. *Journal of biomedical optics*, 2017. 22(3): 037004-037004.
- [73] Li C , Wang L V . Photoacoustic tomography and sensing in biomedicine[J]. *Physics in Medicine & Biology*, 22009. 54(19): p. R59.
- [74] Karabutov A. A , Podymova, *et al.* Time-resolved laser optoacoustic tomography of inhomogeneous media[J]. *APPLIED PHYSICS B LASERS AND OPTICS*, 1996.
- [75] Mehrmohammadi M , Shin T H , Qu M , *et al.* In vivo pulsed magneto-motive ultrasound imaging using high-performance magnetoactive contrast nanoagents[J]. *Nanotechnology*, 2013, 5(22):11179-11186.
- [76] Jin Y , Jia C , Huang S W , *et al.* Multifunctional nanoparticles as coupled contrast agents[J]. *Nature Communications*, 2010, 1(4):41.
- [77] Hu X , Wei C W , Xia J , *et al.* Trapping and Photoacoustic Detection of CTCs at the Single Cell per Milliliter Level with Magneto-Optical Coupled Nanoparticles[J]. *Small*, 2013, 9(12):2045-2045.
- [78] He G , Feng J , Zhang A , *et al.* Multifunctional Branched Nanostraw-Electroporation Platform for Intracellular Regulation and Monitoring of Circulating Tumor Cells[J]. *Nano Letters*, 2019. 19(10): 7201-7209.
- [79] Nedosekin D , Verkhusha V , Melerzanov A , *et al.* In vivo photoswitchable flow cytometry for direct tracking of single circulating tumor cells. [J]. *Chemistry & biology*, 2014, 21(6):792-801.
- [80] Xu S , Zhang X , Xu H , *et al.* Silane modified upconversion nanoparticles with multifunctions: imaging, therapy and hypoxia detection[J]. *Scientific Reports*, 2016. 6(1): 22350.
- [81] Sun X , Dong B , Xu H , *et al.* Amphiphilic Silane Modified Multifunctional Nanoparticles for Magnetically Targeted Photodynamic Therapy[J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(13):11451-11460.
- [82] Sun X , Sun J , Dong B , *et al.* Noninvasive temperature monitoring for dual-modal tumor therapy based on lanthanide-doped up-conversion nanocomposites[J]. *Biomaterials*, 2019. 201: 42-52.
- [83] Sun X , Sun J , Lv J , *et al.* Ce6-C6-TPZ Co-loaded Albumin Nanoparticles for Synergistic Combined PDT-Chemo Therapy of Cancer[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019. 7(38): p. 5797-5807.
- [84] Xu H , Dong B , Xiao Q , *et al.* Three-Dimensional Inverse Opal Photonic Crystal Substrates toward Efficient Capture of Circulating Tumor Cells. [J]. *ACS applied materials & interfaces*, 2017, 9(36):30510-30518.
- [85] Lyu J, Xu H, Dong B, *et al.* Upconversion luminescence based inverted microfluidic chip for in situ CTCs capture, monitor and killing[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 448: 137761.
- [86] Wang D. , *et al.* , In vivo enrichment and elimination of circulating tumor cells by using a black phosphorus and antibody functionalized intravenous catheter. [J]. *Advanced Science*, 2020. 7(17): 2000940.
- [87] Xu H. , *et al.* , High purity microfluidic sorting and in situ inactivation of circulating tumor cells based on multifunctional magnetic composites. [J]. *Biomaterials*, 2017. 138: 69-79.
- [88] Guo L, Liu C, Qi M, *et al.* Recent progress of nanostructure-based enrichment of circulating tumor cells and downstream analysis[J]. *Lab on a Chip*, 2023, 23(6): 1493-1523.
- [89] Dilani L, Valerie A W, Beiko W. *WHO Classification of Tumours, Breast tumours*[J]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2019.
- [90] Khoo B. L. , *et al.* , Liquid biopsy and therapeutic response: Circulating tumor cell cultures for evaluation of anticancer treatment. [J]. *Science advances*, 2016. 2(7): 1600274.
- [91] Cohen S J , Alpaugh R K , Gross S , *et al.* Isolation and Characterization of Circulating Tumor Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer[J]. *Clinical Colorectal Cancer*, 2007, 6(2):125-132.

- [92] Bono J S D , Scher H I , Montgomery R B , *et al.* Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2008, 14(19):6302-9.
- [93] Li C, Li R, Wu X, *et al.* Capture of heterogeneous circulating tumor cells in colorectal cancer patients on an immunomagnetic and anti-nonspecific adsorption platform[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(44): 15240-15249.
- [94] Ren X H, He X Y, Xu C, *et al.* Functional Tumor Targeting Nano-Systems for Reprogramming Circulating Tumor Cells with In Situ Evaluation on Therapeutic Efficiency at the Single-Cell Level[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(21): 2105806.
- [95] 张波. 液体活检在临床病理相关肿瘤诊治中的应用现状及展望[J]. *中华病理学杂志*, 2018, 47(12):897-903.
ZHANG B. Current status and prospect of liquid biopsy in the diagnosis and treatment of clinicopathologically related tumors[J]. *The Chinese Journal of Pathology*, 2018, 47(12):897-903. (in Chinese)
- [96] Reeh M, Effenberger K E , Koenig A M , *et al.* Circulating Tumor Cells as a Biomarker for Preoperative Prognostic Staging in Patients With Esophageal Cancer[J]. *Annals of Surgery*, 2015. 261(6): 1124-1130.
- [97] 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[J]. *Nature communications*, 2019. 10(1): 2163.
- [98] Chiu T K , Chou W P , Huang S B , *et al.* Application of optically-induced-dielectrophoresis in microfluidic system for purification of circulating tumour cells for gene expression analysis- Cancer cell line model[J]. *Scientific Reports*, 2016. 6(1): 32851.
- [99] Guadagni S , Clementi M , Masedu F , *et al.* A Pilot Study of the Predictive Potential of Chemosensitivity and Gene Expression Assays Using Circulating Tumour Cells from Patients with Recurrent Ovarian Cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 21(13): 4813.
- [100] Arora S , D'Souza A , Aland G , *et al.* Antibody mediated cotton-archetypal substrate for enumeration of circulating tumor cells and chemotherapy outcome in 3D tumors[J]. *Lab on a Chip*, 2022, 22(8):1519-1530.
- [101] Xiaoyu L , Changyu L , Junhao L , *et al.* Detection of CTCs in portal vein was associated with intrahepatic metastases and prognosis in patients with advanced pancreatic cancer. [J]. *Journal of Cancer*, 2018, 9(11):2038-2045.



杨瑞 吉林大学 电子科学与工程学院
生物医学工程专业 硕士 研究方向: 纳
米光学材料及生物应用
邮箱: 1414942417@qq.com



董彪 吉林大学 电子科学与工程学院
生物医学工程专业 唐敖庆领军教授
研究方向: 纳米光学材料及生物应用
邮箱: dongb@jlu.edu.cn



李子越 吉林大学 电子科学与工程学院
微电子科学与工程 本科 研究方
向: 微电子技术及生物应用
邮箱: thv0823@163.com



刘海鹏 吉林大学第一医院 整形与美
容外科 副主任医师/副教授 研究方
向: 外科学-整形外科方向
邮箱: Hpliu@jlu.edu.cn