

基于微纳技术的循环肿瘤细胞免疫检测新方法

李姝亭^{1#}, 焦淑芬^{4#}, 李瑜³, 吴玉娟¹, 翟荣云¹, 王哲¹, 程璟⁵, 张玮莹²,
贲亚琍^{1*}

- 1 江汉大学医学部, 湖北 武汉 430056
- 2 江汉大学生命科学学院, 湖北 武汉 430056
- 3 黄石市中心医院, 湖北 黄石 435002
- 4 武汉市精神卫生中心精神科, 湖北 武汉 430012
- 5 华中科技大学同济医学院附属协和医院, 湖北 武汉 430022

李姝亭, 焦淑芬, 李瑜, 吴玉娟, 翟荣云, 王哲, 程璟, 张玮莹, 贲亚琍. 基于微纳技术的循环肿瘤细胞免疫检测新方法[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3849-3862.

LI Shuting, JIAO Shufen, LI Yu, WU Yujuan, ZHAI Rongyun, WANG Zhe, CHENG Jing, ZHANG Weiyang, BEN Yali. A novel method for detecting circulating tumor cells immunity based on micro-nano technique[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3849-3862.

摘要: 本研究旨在探索一种高灵敏度、高特异性检测循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)的免疫检测新方法, 以尽早地检出结直肠癌, 提高该疾病的检出率。首先制备含有线性微柱结构的微芯片, 通过在其表面孵育氧化石墨烯-链霉亲和素(graphite oxide-streptavidin, GO-SA)及偶联广谱一抗(antibody1, Ab₁), 即上皮特异性黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)单克隆抗体以捕获 CTCs。运用羧基化多壁碳纳米管(carboxylated multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs-COOH)与结直肠癌相关抗体, 即特异性二抗(antibody 2, Ab₂)偶联制备抗体复合物。在捕获 CTCs 的微芯片上孵育该抗体复合物, 构建以 Ab₁-CTCs-Ab₂为主体的超级三明治结构, 通过电化学工作站检测并验证其高灵敏度和高特异性。结果发现, 在免疫传感器的构建中结合应用微纳技术, 极大地提高了 CTCs 的检测灵敏度和特异性。本研究验证了该免疫传感器应用于临床血样检测的可行性, 并通过该免疫传感器对结直肠癌患者外周血中 CTCs 进行检测和计数。结果表明, 基于微纳技术的超级三明治式免疫传感器为 CTCs 的检测提供了新的途径, 对临床工作中的疾病诊断及病情实时监控方面均具有潜在的应用价值。

关键词: 结直肠癌; 免疫传感器; 循环肿瘤细胞; 羧基化多壁碳纳米管; 生物信号放大

资助项目: 国家自然科学基金(11804121); 中央引领地方科技发展专项资金项目(2016ZYD049)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (11804121) and the Central Government Guides the Special Fund Project of Local Scientific and Technological Development (2016ZYD049).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: benyali@jhun.edu.cn

Received: 2022-12-23; Accepted: 2023-06-12

A novel method for detecting circulating tumor cells immunity based on micro-nano technique

LI Shuting^{1#}, JIAO Shufen^{4#}, LI Yu³, WU Yujuan¹, ZHAI Rongyun¹, WANG Zhe¹, CHENG Jing⁵, ZHANG Weiyong², BEN Yali^{1*}

1 School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei, China

2 College of Life Science, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei, China

3 Huangshi Central Hospital, Huangshi 435002, Hubei, China

4 Department of Psychiatry, Wuhan Mental Health Center, Wuhan 430012, Hubei, China

5 Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei, China

Abstract: This study was to develop a new method for detecting circulating tumor cells (CTCs) with high sensitivity and specificity, therefore to detect the colorectal cancer as early as possible for improving the detection rate of the disease. To this end, we prepared some micro-column structure microchips modified with graphite oxide-streptavidin (GO-SA) on the surface of microchips, further coupled with a broad-spectrum primary antibody (antibody1, Ab₁), anti-epithelial cell adhesion molecule (anti-EpCAM) monoclonal antibody to capture CTCs. Besides, carboxylated multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs-COOH) were coupled with colorectal cancer related antibody as specific antibody 2 (Ab₂) to prepare complex. The sandwich structure consisting of Ab₁-CTCs-Ab₂ was constructed by the microchip for capturing CTCs. And the electrochemical workstation was used to detect and verify its high sensitivity and specificity. Results showed that the combination of immunosensor and micro-nano technology has greatly improved the detection sensitivity and specificity of the immunosensor. And we also verified the feasibility of the immunosensor for clinical blood sample detection, and successfully recognized detection and quantization of CTCs in peripheral blood of colorectal cancer patients by this immunosensor. In conclusion, the super sandwich immunosensor based on micro-nano technology provides a new way for the detection of CTCs, which has potential application value in clinical diagnosis and real-time monitoring of disease.

Keywords: colorectal cancer; immunesensor; circulating tumor cells; carboxylated multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs-COOH); biosignal amplification

2021 年国际癌症研究机构发布的最新一期全球癌症负担统计数据指出,结直肠癌的发病率和死亡率分别为各类癌症统计的第 3 和第 2 位^[1]。临床早期就诊病例少、早诊率低以及晚期病例临床诊治不规范是导致结直肠癌病人预后不佳和病人术后生存质量较低的主要原因^[2-3],因此,结直肠癌尽早确诊对患者进行更有效的治疗和降低癌症的死亡率均具有十分重要的意义^[4],“早筛、早诊、早治”是关键!

近年来,科学家们发现循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)的检测对结直肠癌的诊断、转移及预后评估具有重要的作用^[5]。CTCs 即循环肿瘤细胞,作为一种肿瘤衍生细胞,具有原发肿瘤的特异性遗传特征,并在血液中自由循环。但 CTCs 在血液中的含量极其微少,10 亿个血液细胞中仅有 1-100 个 CTCs^[6]。而当前 CTCs 的检测主要基于物理性质^[7](如:大小、密度、电荷等)、免疫磁珠^[8-9]、微流控分离^[10]等技术,

应用于癌症患者血样检测时难以获得满意的检测结果。将生物传感器的信号放大作用和纳米材料的特性结合为 CTCs 的检测提供了新思路。其中,免疫传感器将传感技术与免疫测试相结合,在减少分析时间的同时,提高了测试的灵敏度和准确性,有着更加广泛的应用前景。在过去的 20 年里,纳米技术在靶向药物递送、化妆品、织物、水处理和食品包装等方面的独特性质和应用受到了越来越多的关注。

本研究通过制备含有线性微柱结构的微芯片,有效地增加 CTCs 捕获的表面积,并在微芯片上依次修饰氧化石墨烯-链霉亲和素(graphite oxide-streptavidin, GO-SA)、广谱一抗(antibody1, Ab₁) [即上皮特异性黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)单克隆抗体]及羧基化多壁碳纳米管(carboxylated multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs-COOH)偶联的特异性二抗(antibody2, Ab₂) [即结直肠癌相关抗体(anti-CA199)],由此构建以 Ab₁-CTCs-Ab₂ 为主体的超级三明治结构,探索免疫传感器与微纳技术的结合应用,实现高灵敏度、高特异性检测 CTCs。同时通过回归实验验证该免疫传感器应用于临床血样检测的可行性,运用扫描电镜、倒置荧光显微镜及电化学工作站对免疫传感器在结直肠癌患者血样中捕获的 CTCs 进行表征和计数,为临床工作中对癌症患者的尽早检出及病情预测等提供了参考依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

实验用主要仪器:TI-SR 倒置荧光显微镜,尼康仪器(上海)有限公司;JEM-2100HR 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM),日本电子株式会社;CHI 660E 电化学工作站,上海辰华仪器有限公司;S-3400N 超高分

辨冷场扫描电子显微镜(field emission scanning electron microscope, FE-SEM),株式会社日立制作所;磁力搅拌器,武汉科尔仪器设备有限公司;超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

实验用主要试剂和材料:SU-8 3050 光刻胶, Microchem 公司;SU-8 显影液, Microchem 公司;聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS) RTV 615, Momentive 公司;氧化石墨烯(graphite oxide, GO), Sigma-Aldrich 公司;羧基化多壁碳纳米管(MWCNTs-COOH) (纯度>95%,长度为 10–30 μm,外径<8 nm,内径为 2–5 nm,羧基化程度为 3.9%,质量分数),上海麦克林生化科技股份有限公司;生物素化的人上皮细胞粘附分子抗体(anti-EpCAM),赛默飞世尔科技公司;结直肠癌相关抗体(Anti-CA199),艾博抗(上海)贸易有限公司;抗 CD45 抗体-Cy3 (Anti-CD45-Cy3),武汉三鹰生物技术有限公司;细胞角蛋白抗体-FITC (Anti-CK-FITC),武汉三鹰生物技术有限公司;DNA 染料 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色液,碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞来源

本研究选用的人正常结肠上皮细胞(NCM460)、结直肠癌细胞(HT-29)、乳腺癌细胞(MCF-7)及宫颈癌细胞(HeLa)均来源于中国典型培养物保藏中心。

1.3 患者及正常人临床样本纳入及排除标准

本研究用于实验的血样均来自 2022 年 8 月至 2023 年 3 月就诊的患者。这项研究是按照赫尔辛基宣言规定的指导方针设计和实施的。

1.3.1 癌症患者纳入标准

年龄:18–80 岁;性别:男女不限;病理学明确诊断为结直肠癌患者,且影像学资料齐全。

1.3.2 癌症患者排除标准

基本信息缺失;不能提供病理诊断或影像学

资料者。

1.3.3 正常人纳入标准

年龄：18-80岁；性别：男女不限；近期进行体检，且结果为未患有癌症者。

1.4 含线性微柱结构微芯片的制备

1.4.1 微芯片母模的制备

根据所需沟道的深度选取对应的 SU-8 及匀胶机转速。因本次所需微柱结构的深度为 40 μm ，故选取 SU-8 3025。为获得最大的工艺可靠性，基板应干燥、清洁。将单晶硅片在丙酮、无水乙醇和超纯水中各超声清洗 10 min，用双蒸水重复清洗 3 遍后使用高纯氮气将其吹干(图 1A)。旋涂光刻胶：将处理好的单晶硅片置于匀胶机上，涂布适量 SU-8，静置 1 min。设定匀胶机转速为 2 000 r/min，匀胶 30 s 后再静置 5 min (图 1B)。前烘：为去除光刻胶中的溶剂，将单晶硅片在预设温度的恒温加热台上进行前烘处理(95 $^{\circ}\text{C}$ ，15 min)。同时为优化前烘的次数及条件，完成前烘后，将单晶硅片从加热台上移开并冷却到室温。然后将单晶硅片放回加热台上，如果薄膜“起皱”，则需继续进行热烘，将单晶硅片重复冷却

和加热循环，直到薄膜中不再出现“褶皱”。前烘结束后将单晶硅片放至常温，掩模板正面贴着硅片后置于光刻机内进行紫外曝光(365 nm) (图 1C)。后烘：将完成曝光的单晶硅片置于温度设定为 65 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温加热台加热 1 min，温度升高至 95 $^{\circ}\text{C}$ 再加热 5 min。显影：单晶硅片完成后烘后放至常温，放入显影液中来回晃动 8 min，去除光刻胶，待硅板上沟道清晰无残余光胶用气枪吹干硅板(图 1D)。镜检：显微镜观察光胶沟道平滑且无杂质、无重影即为合格的母模。

1.4.2 含线性微柱结构微芯片的复制

PDMS 单体和交联剂按照质量比 10:1 的比例充分混合后置于真空容器中进行多次脱气处理，待变至透明且无气泡后取出。将母模置于一次性培养皿内，PDMS 聚合物浇筑在母模上，静置 1 min，并用洗耳球轻吹以去除气泡。待表面光滑平整且无气泡后，放置在加热台上(140 $^{\circ}\text{C}$) 加热(图 1E)。PDMS 固化成型后取出，温度降至室温后进行脱膜处理，并切割成 1 cm \times 1 cm 大小的正方形，即得到具有线性微柱结构的微芯片(图 1F)。制备的微芯片需置于阴凉干燥处密封保存。

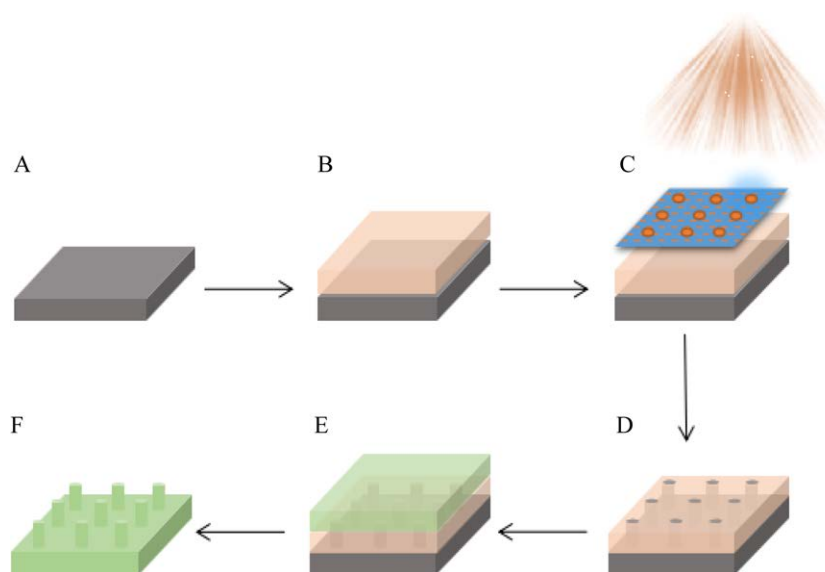


图 1 含线性结构微芯片制备流程图

Figure 1 Flow chart of microchip fabrication with linear structure.

1.5 HRP-MWCNTs-COOH-Ab₂ 复合物的制备

首先配制含 0.4 mmol 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和 0.1 mmol N-羟基丁二酰亚胺(NHS), pH 为 5.2 的 0.1 mol/L 吗啉乙磺酸(MES)溶液。称取 2 mg MWCNTs-COOH 分散于 4 mL 上述溶液中。将混合液在水浴中超声充分分散 1 min 后在室温下使用磁力搅拌器充分搅拌混合。搅拌结束后,取出混合液用磷酸盐缓冲液(PBS)重复清洗离心(5 000 r/min, 10 min)后的混合液沉淀物 5 次,去除过量的 EDC 和 NHS。洗涤结束后,加入 400 ng/mL 结直肠癌相关抗体 Anti-CA199 (即 Ab₂)和 80 μg/mL 辣根过氧化物酶(HRP)各 0.5 mL,置于冰盒中运用超声波细胞破碎仪充分分散 5 min,使 Ab₂ 与 MWCNTs-COOH 更好地结合(图 2)。结束后将混合液置于室温搅拌过夜,进一步促进抗体复合物的结合。同时将 0.05%吐温 20 (Tween 20)溶液与 1%牛血清白蛋白(BSA)以体积比 1:10 的比例混合均匀后在室温下搅拌过夜。将上述 HRP、Ab₂ 与 MWCNTs-COOH 的抗体复合物混合液用 PBS 缓冲液重复清洗离心(15 000 r/min, 10 min)后的混合液沉淀物 5 次,去除过量的 HRP 和 Ab₂。将 Tween 20 与 BSA 的混合液添加到上述抗体复合物沉淀中,并静置于室温下反应 90 min。反应结束后用 PBS 缓冲液重复清洗离心(15 000 r/min, 10 min)后的混合

液沉淀物 5 次,去除多余的抗体和 BSA。此过程中的洗涤步骤对于阻断非特异性结合十分重要,省略任何步骤都将降低灵敏度。洗涤结束后将 HRP-MWCNTs-COOH-Ab₂ 复合物储存在含 3% BSA 的 PBS 缓冲液中置于 4 °C 冰箱备用。

1.6 超级三明治式免疫传感器的构建

1.6.1 微芯片表面的修饰(孵育一抗)

在 200 mL 含 0.05% (质量分数)壳聚糖的无水乙醇中加入 100 mg GO 充分混合,并在水浴中超声分散 30 min。取 1 mL 该 GO 溶液和 1 mL 上述配制的 0.1 mol/L MES 溶液在室温下搅拌混合 120 min,以活化 GO 表面的羧基基团。用 PBS 缓冲液重复清洗离心(3 000 r/min, 5 min)后的混合液沉淀物 5 次。于该沉淀物中加入 1 mL 50 μg/mL 的 SA 溶液并充分混合,然后静置于 4 °C 冰箱中反应 120 min。反应结束后用 PBS 缓冲液重复清洗离心(3 000 r/min, 5 min)后的混合液沉淀物 5 次,去除未结合的 SA。加入 1 mL PBS 缓冲液重悬上述完成洗涤的混合液沉淀物,取 100 μL 该混合液均匀涂布于微芯片表面,静置在室温下孵育 60 min (图 3B、3C)。反应结束后,用 PBS 缓冲液轻柔清洗微芯片表面 3 次,干燥后向微芯片表面滴加 100 μL 1:5 000 稀释的 anti-EpCAM 溶液(Ab₁),并于室温静置孵育 120 min (图 3D)。然后进行清洗、干燥以得到功能化的薄膜,即完成 GO/SA-Ab₁ 的修饰。

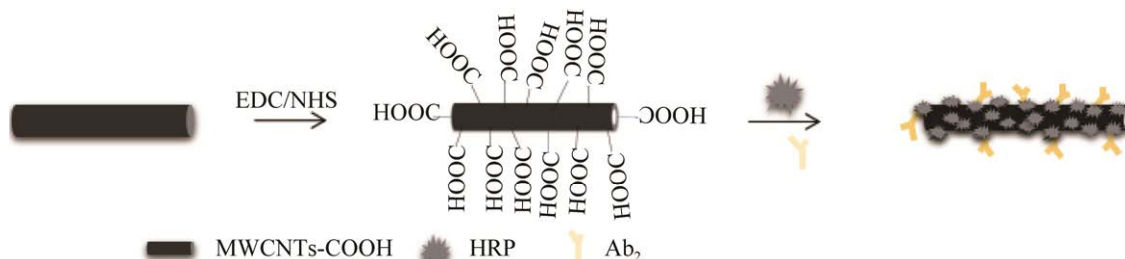


图 2 HRP-MWCNTs-COOH-Ab₂ 复合物的制备示意图

Figure 2 Schematic diagram of preparation of HRP-MWCNTs-COOH-Ab₂ complex.

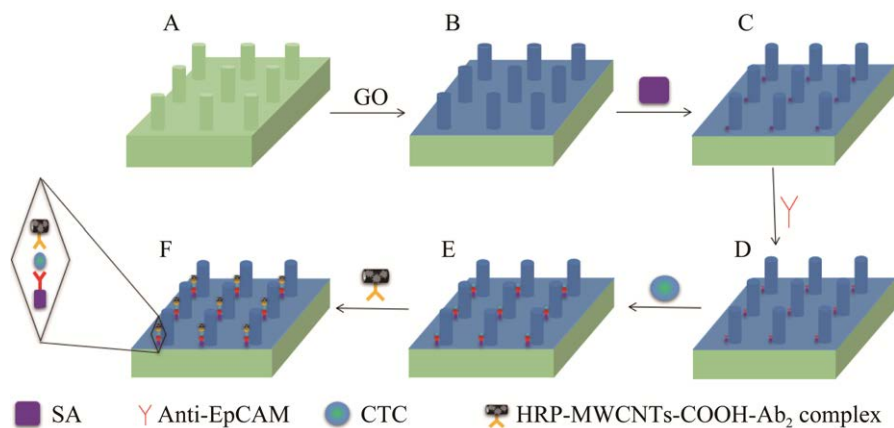


图3 免疫传感器构建流程示意图

Figure 3 Schematic diagram of the immune sensor construction process.

1.6.2 细胞捕获

当细胞生长密度约达细胞培养瓶面积的80%时,滴加1 mL胰蛋白酶消化细胞,运用血球计数板计数后取适量细胞培养基使细胞浓度达到 $10^5/\text{mL}$ 。向已完成GO/SA- Ab_1 修饰的微芯片表面滴加100 μL 细胞悬液,然后置于 37°C 、5% CO_2 的恒温培养箱中孵育50 min(图3E)。取出后用PBS缓冲液轻轻润洗表面3次洗去非特异性吸附的细胞。2.5%戊二醛固定、梯度浓度酒精脱水或染色后,微芯片上捕获的细胞通过扫描电子显微镜及倒置荧光显微镜观察表征。

1.6.3 构建超级三明治式免疫传感器并检测

在完成细胞捕获的微芯片表面加入100 μL HRP-MWCNTs-COOH- Ab_2 复合物溶液后置于细胞培养箱中孵育50 min(图3F),完成超级三明治结构的构建。用PBS缓冲液重复轻柔润洗微芯片3次并干燥,通过电化学工作站进行分析检测。每组实验均制备2个微芯片互为对照,以保证结果的平行性。

电化学检测采用三电极系统:由Ag/AgCl作为参比电极,铂丝电极作为辅助电极和上述已

完成抗体复合物孵育的微芯片作为工作电极组成。通过循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)、方波伏安法(square wave voltammetry, SWV)对所有完成制备的微芯片的电化学性质进行表征,CV在电位范围为 $-0.5-0\text{ V}$,SWV的参数为:初始电位, -0.9 V ;终止电位, 0.6 V ;电位增量, 0.003 V ;振幅, 0.05 V ;频率, 50 Hz 。电化学检测所有检测均是在含有 $25\text{ }\mu\text{mol/L}$ 硫基和 2 mmol/L H_2O_2 的PBS缓冲液中进行。每个免疫传感器样品需重复检测3次。

1.7 临床样本检测

本研究共收集24位结直肠癌患者及10位正常人运用乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝管采集的血液样本。血样置于室温下复温后,将抗凝管上下摇动混匀血样。在完成GO/SA- Ab_1 修饰的微芯片滴加100 μL 血样,同上述步骤1.6.3完成免疫传感器的构建,并通过电化学工作站进行检测。本研究所收集的血液样本来源均为临床检验科吸取部分血样进行血细胞分析后的留存血液,保存于 4°C 冰箱7 d后进行实验操作。

1.8 图像绘制及数据分析

通过图像分析软件 Origin 2022 对电化学工作站所测数据进行分析 and 绘图。

2 结果与分析

2.1 微芯片结构表征

运用 FE-SEM 成像对制备好的 PDMS 材质微芯片表面结构进行表征。结果如图 4 所示, 该微芯片表面微柱结构均匀整齐呈线性排布。经测量, 微柱高度: $40\ \mu\text{m}$, 微柱直径: $50\ \mu\text{m}$, 微柱间间距: $50\ \mu\text{m}$, 符合制备预期。此图也充分说明本研究已成功地完成含有线性微柱结构微芯片的制备。微柱结构有效增加了微芯片细胞捕获的表面积, 为 CTCs 的检测提供必要

条件。

2.2 抗体复合物的表征

完成 HRP 及 Ab_2 修饰的 HRP-MWCNTs-COOH- Ab_2 抗体复合物作为功能化纳米探针, 在三明治结构的构建及检测信号的放大方面均具有决定性的作用。通过 TEM 分别对 MWCNTs-COOH (图 5A) 和 HRP-MWCNTs-COOH- Ab_2 抗体复合物(图 5B)的形貌及分散情况进行表征, B 图中碳纳米管的形貌并没有明显的改变, 但在同样大小的视野里, 数量明显少于未修饰的 MWCNTs-COOH, 由此可见 B 的分散性明显高于 A, 这也说明已经成功地将 HRP 及 Ab_2 与 MWCNTs-COOH 进行偶联, 完成抗体复合物的构建。

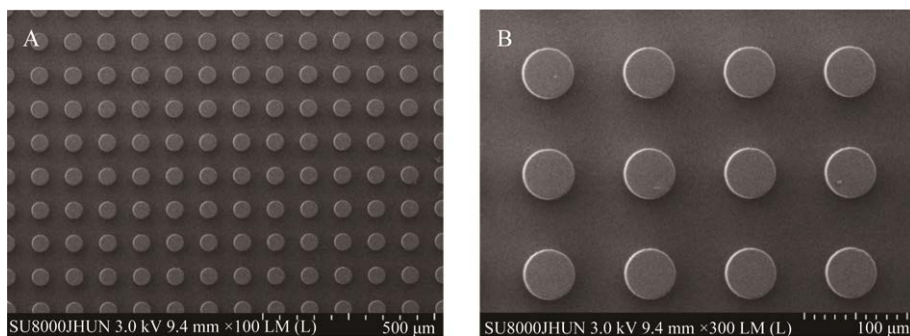


图 4 微芯片不同放大倍数的 SEM 形貌 A: 100 倍. B: 500 倍

Figure 4 SEM images of microchip at different magnification. A: 100 times. B: 500 times.

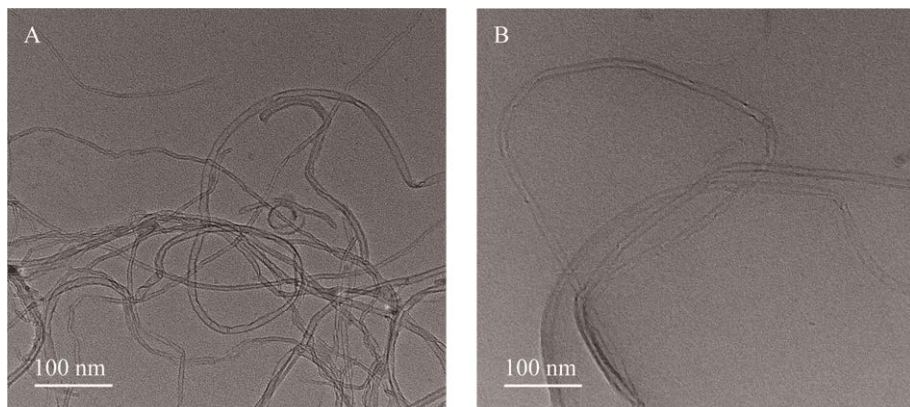


图 5 TEM 表征结果图 A: MWCNTs-COOH. B: HRP-MWCNTs-COOH- Ab_2 复合物

Figure 5 TEM images. A: MWCNTs-COOH. B: HRP-MWCNTs-COOH- Ab_2 complex.

2.3 微芯片捕获循环肿瘤细胞性能表征

2.3.1 微芯片细胞捕获能力表征

运用免疫传感器捕获结直肠癌细胞(HT-29 细胞), 并对完成 CTCs 捕获的微芯片通过 FE-SEM 以不同放大倍数进行观察和表征。结果如图 6 所示, 免疫传感器微柱上及微柱旁均有肿瘤细胞被捕获(图 6A), 放大在微柱侧面观察到捕获的肿瘤细胞(图 6B、6C)且在更大倍数下观察到该细胞在微柱上伸出伪足(图 6C)。可见, 该免疫传感器能够实现 CTCs 的有效捕获。

2.3.2 不同结构微芯片细胞捕获能力表征

为进一步验证含线性结构的微芯片及 GO/SA-Ab₁ 的修饰对于 CTCs 捕获的优势性。通过倒置荧光显微镜对 3 种不同的微芯片捕获 CTCs 后进行表征, 结果如图 7 所示, 修饰有

GO/SA-Ab₁ (图 7A) 的微芯片细胞捕获效率明显比仅修饰 SA-Ab₁ (图 7B) 的含有线性微柱结构微芯片的要高, 约为其 3 倍, 并且约为不含微柱结构的微芯片(图 7C) 捕获效率的 8 倍, 这说明微柱结构及 GO/SA-Ab₁ 的修饰可以显著增加细胞的捕获效率, 这种可能是由 GO 与微芯片三维微柱结构产生的协同效应, 一方面可以提供更多的 SA 及 anti-EpCAM 的结合位点, 另一方面也增加了细胞与微芯片的拓扑相互作用。

2.4 免疫传感器的表征

通过电化学工作站 CV 法对免疫传感器的分步构建进行表征。如图 8 所示, 完成 GO/SA-Ab₁ 修饰的微芯片置入 PBS 缓冲溶液中, 循环伏安曲线没有显示出明显的电流信号(图 8a), 而在加入配制的电解液后, 一对稳定的氧化还原峰分别

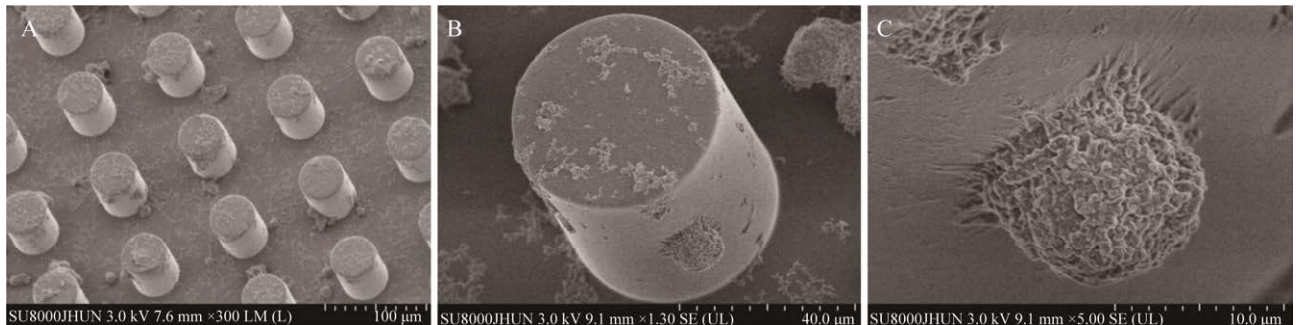


图 6 微芯片捕获 CTCs 的不同放大倍数的 SEM 结果图 A: 500 倍. B: 1 250 倍. C: 5 000 倍

Figure 6 SEM images of CTCs captured by microchip at different magnification. A: 500 times. B: 1 250 times. C: 5 000 times.

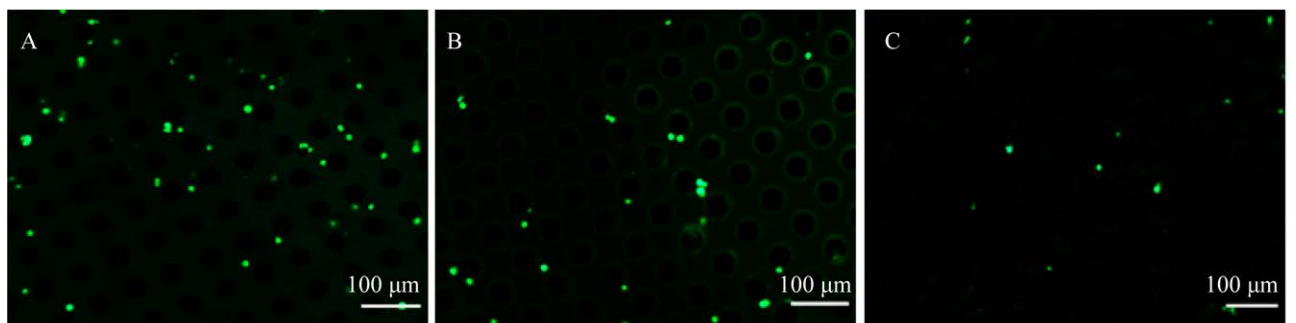


图 7 微芯片捕获 CTCs 的对比荧光图 A: 修饰 GO/SA-Ab₁ 的微芯片. B: 仅修饰 SA-Ab₁ 的微芯片. C: 不含微柱结构的微芯片

Figure 7 Contrast fluorescence images of the CTCs captured by microchips. A: Microchip modified with GO/SA-Ab₁. B: Microchip modified with SA-Ab₁ only. C: Microchip without micro-column structure.

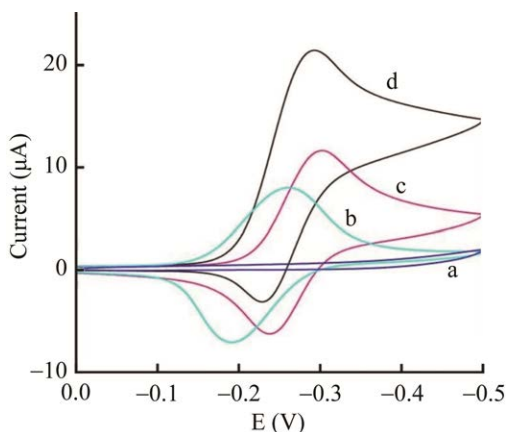


图 8 循环伏安法表征微芯片结果图

Figure 8 Cyclic voltammograms of detecting the microchips.

出现在 -0.187 V 与 -0.258 V (图 8b),这与巯基和 H_2O_2 产生的电化学响应有关。当将 HRP- Ab_2 溶液引入传感器中之后(图 8c),固定的 HRP 与 H_2O_2 产生了还原反应而使还原电流显著地增加。而将 HRP- Ab_2 换为 HRP-MWCNTs-COOH- Ab_2 进行孵育后(图 8d),MWCNTs-COOH 可以增加 HRP 的固定量而使电化学响应电流大幅度地增加。

2.5 免疫传感器的特异性检测

为探究所本研究设计构建的免疫传感器的特异性,分别取 $100\ \mu\text{L}$ NCM460、HT-29、MCF-7、HeLa 细胞及添加培养基(作为对照组)分别构建免疫传感器,并运用电化学工作站进行检测。结果如图 9 所示,HT-29 细胞组响应电流值最大,这说明该免疫传感器用于 HT-29 细胞检测具有较高的特异性,因此在临床应用于结直肠癌检测方面具有巨大的潜力。

2.6 HRP 和 Ab_2 比率对免疫传感器的电化学性能的影响

为确保本研究免疫传感器构建达到最大的检测灵敏度,首先对与 MWCNTs-COOH 偶联的 HRP 和 Ab_2 的比率进行优化。在完成细胞捕获的微芯片上分别添加不同 HRP/ Ab_2 比率(50:1、100:1、200:1、300:1、400:1)与 MWCNTs-COOH 偶联的抗体复合物完成免疫传感器的构建,并进

行电化学检测。结果如图 10 所示,当 HRP/ Ab_2 的比率从 50:1 增加到 200:1 时,响应峰电流呈逐渐上升趋势。这与 MWCNTs-COOH 纳米载体上所负载的 HRP 总量逐步增多有关。而再将 HRP/ Ab_2 的比率从 200:1 增加到 400:1 时,峰电流呈现不增反降的趋势。这是由于过量的 HRP 存在占位效应,反而降低了与 MWCNTs-COOH 及特异性 Ab_2 的有效结合,而使 CTCs 捕获减少。因此,HRP 与 Ab_2 的最佳偶联比率为 200:1,本研究也均运用该最佳偶联比率进行抗体复合物的制备和免疫传感器的构建。

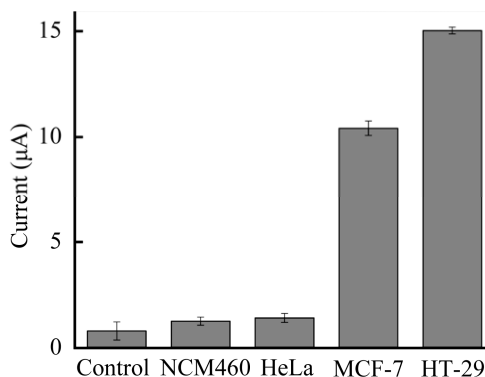


图 9 不同细胞对免疫传感器的电流响应

Figure 9 Current response of different cells to immunosensor.

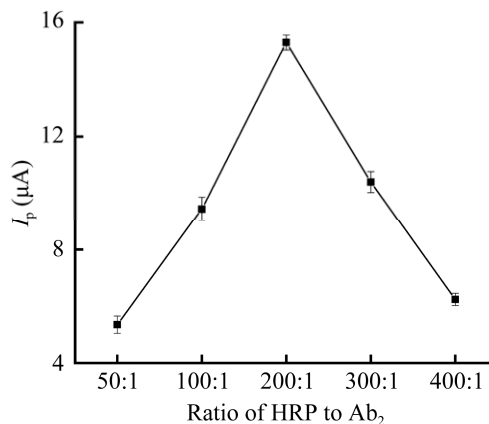


图 10 HRP 与 Ab_2 的偶联比率对生物传感器电化学性能的影响

Figure 10 Effect of the coupling ratio of HRP to Ab_2 on the electrochemical performance of the biosensor.

2.7 孵育时间对免疫传感器电化学性能的影响

肿瘤细胞和抗体复合物的孵育时间也会对免疫传感器电化学性能产生影响,为探究二者的最佳孵育时间,将肿瘤细胞和 HRP-MWCNTs-COOH-Ab₂ 复合物均设计按梯度时间分别进行孵育后通过电化学工作站进行检测。

结果如图 11 黑色曲线所示,随着细胞孵育时间(10–40 min)的增加,峰电流逐渐上升,并在 40 min 达最高点。在 40 min 以后虽不断延长肿瘤细胞孵育时间,但峰电流无明显变化。

而抗体复合物不同孵育时间的检测峰电流(如图 11 红色曲线)在 10–50 min 内逐渐升高,于 50 min 时达到最高,而后随时间继续延长,检测峰电流仍趋于稳定。这是由于随着孵育时间的延长细胞与抗体结合量更多,因此响应峰电流逐渐增大,但当二者结合趋于饱和时,峰电流也就趋于稳定。由此可得,细胞最佳孵育时间为 40 min,抗体复合物最佳孵育时间为 50 min。本研究均采用最佳孵育时间进行肿瘤细胞及抗体复合物的孵育完成免疫传感器的构建。

2.8 免疫传感器性能测试

通过孵育浓度梯度的细胞悬液(HT-29 细胞)构建免疫传感器,并分别检测响应电流,以探究该免疫传感器的检测低限和检测范围。结果如图

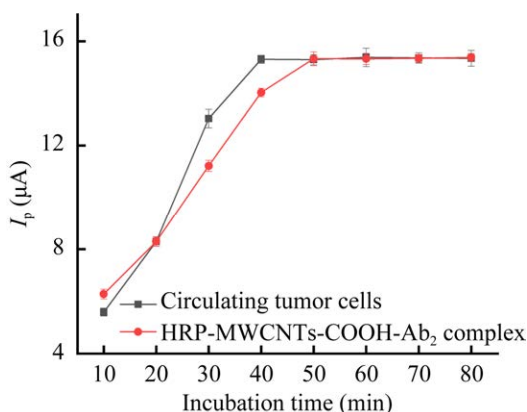


图 11 孵育时间对生物传感器电化学性能的影响
Figure 11 Effect of incubation time on the electrochemical performance of the biosensor.

12 所示:图 12A 为不同浓度细胞的电流响应曲线,随着细胞浓度(10^1 – 10^9 cells/mL)的增加,免疫传感器氧化电流响应逐渐增大。以图 12A 数据建立峰值电流与细胞浓度之间的标准曲线(图 12B)可见峰电流与细胞浓度(10^1 – 10^9 cells/mL)的对数间存在着良好的线性相关关系,拟合度达到 95.67%。由此可得,本研究构建的免疫传感器最低细胞检出限为 10 cells/mL,检测范围为 10^1 – 10^9 cells/mL,这比目前已报道文献中的检出限更低,说明免疫传感器由于 GO 与 MWCNTs-COOH 的双信号放大作用及以 Ab₁-CTCs-Ab₂ 为主体的超级三明治结构而具有较高的灵敏度,为进行临床患者血样的检测提供可能性。

2.9 免疫传感器在临床血样中的分析应用

为探索本研究制备的免疫传感器对于监测生物基质的用途,并验证在临床血样分析检测中的实用性。随机选取 3 份正常人血样,以标准法加入培养状态良好的 HT-29 细胞,使最终细胞浓度分别达 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 cells/mL。并取 100 μL 混合液滴加到完成 GO/SA-Anti-EpCAM 修饰的微芯片上孵育 40 min,操作同实验步骤 1.6 构建免疫传感器,并运用电化学工作站进行检测和结果分析。将所测峰电流数值代入前文已完成的细胞浓度与峰电流标准曲线的回归方程进行计算,得出免疫传感器的检测回收率,了解其在临床血样检测的可行性。由表 1 结果可得,本研究构建的免疫传感器在添加标准化肿瘤细胞的血样中回收率均达 85.11%以上。可见,该免疫传感器用于临床血样检测是可行的。

前文已经证明本研究构建的免疫传感器具有高灵敏度、高特异性,对结直肠癌细胞的筛选也具有优势性。基于上述回收实验已证明免疫传感器用于临床血样检测的可行性,运用患者血样构建的免疫传感器并运用荧光显微镜和高分辨率扫描电镜进行观察。图 13 为捕获 CTCs 免疫

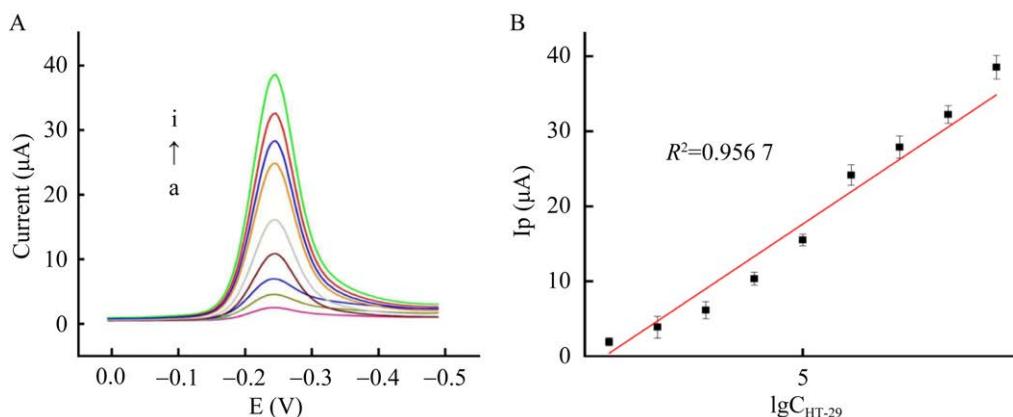


图 12 免疫传感器检测循环肿瘤细胞结果图 A: 电流响应曲线. B: 标准曲线

Figure 12 Current images of detecting circulating tumor cells by immunosenor. A: Current response curve. B: Standard curve.

表 1 免疫传感器在血样中检测 HT-29 细胞

Table 1 Immunosenor detects HT-29 cells in blood samples

No.	Standard cell loading (cells/mL)	Detected cell numbers (cells/mL)	Recovery rate (%)	RSD ($n=3$, %)
1	1.00×10^6	0.85×10^6	85.11	0.25
2	1.00×10^5	0.87×10^5	87.10	1.19
3	1.00×10^4	0.91×10^4	91.20	0.91
4	1.00×10^3	0.93×10^3	93.33	1.15
5	1.00×10^2	0.96×10^2	95.50	0.36

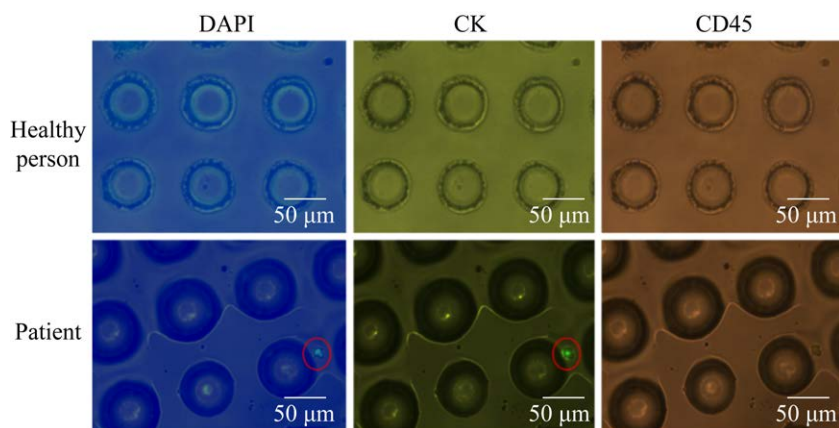


图 13 免疫传感器捕获患者血样中的 CTC 荧光图

Figure 13 Fluorescence images of CTC captured by immunosenor in patient's blood sample.

荧光检测图, 患者血样中捕获的细胞(图 13 红圈标注细胞)表现为 DAPI 阳性、CK 阳性、CD45 阴性, 符合肿瘤细胞的特性。可见, 该免疫传感器能够在患者血样中特异性捕获肿瘤细胞。

图 14 为运用免疫传感器捕获患者血样中肿瘤细胞的 SEM 表征结果图, 微柱旁和微柱上均

有 CTCs 被捕获(图 14 红色箭头标注细胞), 被捕获的肿瘤细胞体积较大, 表面呈不规则隆起。

同时, 将所收集的结肠直肠癌患者血样操作同实验步骤 1.6 构建免疫传感器, 通过 SWV 法检测电流信号。将所测峰电流数值代入回归方程计算得出免疫传感器捕获 CTCs 的值。表 2 中计算结

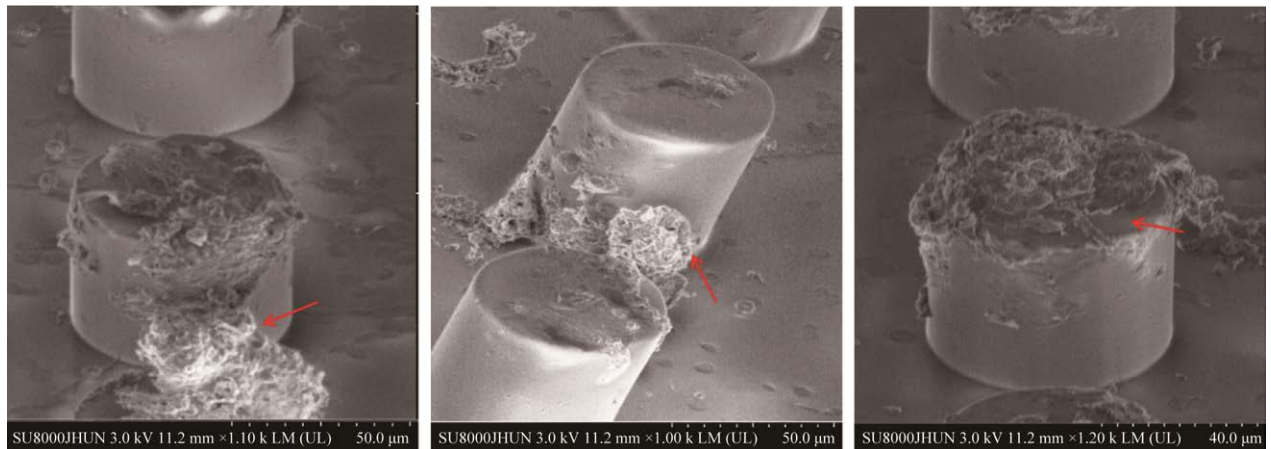


图 14 免疫传感器捕获患者血样中 CTCs 的 SEM 图

Figure 14 SEM images of CTCs captured by immunosensor in patient's blood sample.

表 2 免疫传感器检测患者血样肿瘤细胞数

Table 2 Immunosensor detects tumor cells in patients' blood samples (cells/mL)

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cell numbers	23	30	45	34	12	10	10	13	35	22

果已舍去无法计算及计算细胞数小于 10 cells/mL 的实验组数据。从表 2 中结果可见,本课题基于微纳技术构建的超级三明治式免疫传感器,在 24 例患者血样中成功检出 10 例,CTCs 检出率达 41.7%,具有较高的灵敏度和特异性,有望将来在临床工作中进行结直肠癌的诊断,为临床工作中对结直肠癌患者的尽早检测及治疗效果的追踪等提供有力支持。

3 总结与展望

在临床工作中尽早发现结直肠癌的存在并进行干预,无论在治疗难度、治疗费用和患者 5 年生存率等方面都具有明显的优势。液体活检通过对人体血液进行检测,不仅取样方便、侵袭性低,还可实现实时监测,并具有较好的特异性。CTCs 在形成转移灶之前首先进入循环系统,进行 CTCs 的检测可能比临床影像学表现及临床体征更敏感,更有助于临床尽早采取干预措施。

通过液体活检检出 CTCs,不仅能提示结直肠癌的存在,以便及早开展抗肿瘤和抗转移治疗,还可追踪患者治疗后情况,从而减缓甚至阻止癌症的致命攻击^[11-12]。

近年来,在生物医疗领域中得到了广泛应用。电化学生物传感器和纳米技术为 CTCs 的检测提供了新的思路和方法。电化学生物传感器表面的微观结构可以提供许多可用于有效分离和富集待测物质的电场,通过控制电极电位可进一步提高选择性和该测量方法的灵敏度。生物传感器两个基本检测标准分别为敏感性和特异性,敏感性主要受受体的影响,如抗体、核酸(如适配子)、酶、微生物和受体固定化过程、合适的底物和传感方法,而特异性则受生物识别和传感部分之间可用组合的影响^[13]。电化学传感器具有敏感性高、特异性强、便携性好、使用简单、响应速度快和成本低等优点,在生物医疗领域中得到了广泛的应用。纳米材料易修饰、比表面积大、

生物相容性高,且在电化学方面具有突出优势性。本研究采用基于 PDMS 制备的微芯片,在整个分析过程中能有效减少分析信号的复杂性和分析时间^[14],同时选用具有极强亲水性的 GO,能够在 PDMS 基底上形成稳定的薄膜^[15],更利于与生物材料的结合。通过 GO 与 SA 偶联,极大地增强了细胞和微芯片基底之间的相互作用,增加电荷转移以提高细胞的捕获效率,从而构建具有高灵敏度的生物传感器。MWCNTs 因具有优异的导电性、较大的比表面积、良好的催化活性和化学稳定性等特点被广泛用于电化学检测的研究,对 MWCNTs 进行羧基化处理后明显提高了 MWCNTs 亲水性、导电性和分散性等,同时增加了表面的共价结合效率,为与其他物质的偶联提供了必要条件^[16-17]。本研究选用 MWCNTs-COOH 通过与高 HRP/Ab₂ 比率偶联构建功能化纳米探针,实现信号的大幅放大,大幅增加了免疫传感器的灵敏度。在电化学免疫生物传感器研究中,三明治式生物传感器也因其通过信号放大技术可大幅增加检测灵敏度^[18-19],在纳米生物探针和纳米生物传感器信号放大、多功能复合与靶向识别等方面都展示出其独特的优越性,进一步提高了 CTCs 的富集灵敏度和检测效率。结合临床患者血液样本的检测,真实反映了该方法用于临床的可行性和优越性,这种方法有望用于其他肿瘤标志物的检测且其在疾病诊断与临床分析中具有巨大的潜在应用价值。

由于患者血液中 CTCs 的含量十分稀少,而本研究构建的免疫传感器检测下限仅为 10 cells/mL,因此部分患者血样内的 CTCs 未能灵敏检出。还需不断优化微芯片的结构以增加 CTCs 的捕获量,同时对抗体复合物进行改进和修饰,以提高免疫传感器的检测灵敏度,进一步推进 0-10 cells/mL 检测范围的研究。在此基础上,还需通过 CTCs 的检测优化风险与效益分析,使低风险患者治疗

降级免受不必要的辅助治疗的毒性,以实现临床有效性和在癌症护理中的实用性。高灵敏度 CTCs 检测的出现有可能彻底改变癌症管理结构。在未来的研究中将有必要确定如何将 CTCs 分析实施到临床工作流程中,通过指导临床个性化治疗决策来改善患者的生存质量。

REFERENCES

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] SHARMA KP, DEGROFF A, MAXWELL AE, COLE AM, ESCOFFERY NC, HANNON PA. Evidence-based interventions and colorectal cancer screening rates: the colorectal cancer screening program, 2015-2017[J]. American Journal of Preventive Medicine, 2021, 61(3): 402-409.
- [3] KANTH P, INADOMI JM. Screening and prevention of colorectal cancer[J]. BMJ (Clinical Research Ed), 2021, 374: n1855.
- [4] 苏宇, 孙鑫, 湛浩然, 陈茹, 孙丽, 郝金娟, 田雨, 陈瑞. 全球针对一般风险人群的结直肠癌筛查指南推荐意见的系统综述[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2022, 29(16): 1236-1242.
SU Y, SUN X, ZHAN HR, CHEN R, SUN L, HAO JJ, TIAN Y, CHEN R. Global guidelines of colorectal cancer screening for people at average risk: a systematic review[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2022, 29(16): 1236-1242 (in Chinese).
- [5] JIANG M, JIN SL, HAN JM, LI T, SHI JX, ZHONG Q, LI W, TANG WX, HUANG QQ, ZONG H. Detection and clinical significance of circulating tumor cells in colorectal cancer[J]. Biomarker Research, 2021, 9(1): 1-20.
- [6] ARYA SK, LIM B, RAHMAN ARA. Enrichment, detection and clinical significance of circulating tumor cells[J]. Lab on a Chip, 2013, 13(11): 1995-2027.
- [7] HENDRICKS A, BRANDT B, GEISEN R, DALL K, RÖDER C, SCHAFMAYER C, BECKER T, HINZ S, SEBENS S. Isolation and enumeration of CTC in colorectal cancer patients: introduction of a novel cell

- imaging approach and comparison to cellular and molecular detection techniques[J]. *Cancers*, 2020, 12(9): 2643.
- [8] LI CL, LI R, WU XY, ZUO YF, XIONG GX, HUANG M, SUN YQ, LIAO R, XIAO Y, HU LL, GAO C, YU YY. 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.
- [9] HU L, CHEN XR, CHEN M, FANG JM, NIE JF, DAI HM. Enrichment and detection of circulating tumor cells by immunomagnetic beads and flow cytometry[J]. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(1): 25-34.
- [10] CHEN HM, PENG GS, LI Y, WANG SS, LIN CM. Clinical immunofluorescence comparison analysis of microfluidic chips for highly efficient detection of CTCs with colorectal cancer and other cancers[J]. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2022, 26(8): 1-11.
- [11] YAO YM, ZHU X, LIU WX, JIANG JY, JIANG H. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in gastrointestinal cancer[J]. *Medicine*, 2022, 101(42): e31099.
- [12] SUN SY, YANG CL, HUANG ZC, JIANG W, LIU Y, WU HF, ZHAO JH. Diagnostic value of magnetic resonance versus computed tomography colonography for colorectal cancer[J]. *Medicine*, 2018, 97(22): e10883.
- [13] HOLZINGER M, COSNIER S, LE GOFF A. Synergetic effects of combined nanomaterials for biosensing applications[J]. *Sensors*, 2017, 17(5): 1010.
- [14] RAJ M K, CHAKRABORTY S. PDMS microfluidics: a mini review[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2020, 137(27): 48958.
- [15] IAKUNKOV A, TALYZIN AV. Swelling properties of graphite oxides and graphene oxide multilayered materials[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(41): 21060-21093.
- [16] SASAL A, TYSZCZUK-ROTKO K, WÓJCIAK M, SOWA I, KURYŁO M. Simultaneous analysis of paracetamol and diclofenac using MWCNTs-COOH modified screen-printed carbon electrode and pulsed potential accumulation[J]. *Materials*, 2020, 13(14): 3091.
- [17] ZHANG YT, LI DJ, ZHAO ML, GUO MX, DENG XY, GU HQ, WAN RX. Differences in cytocompatibility between mWents and carboxylic functionalized mWents[J]. *Functional Materials Letters*, 2013, 6(1): 1250053.
- [18] LIU SP, LUO JJ, JIANG XX, LI XQ, YANG MH. Gold nanoparticle-modified black phosphorus nanosheets with improved stability for detection of circulating tumor cells[J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187(7): 1-9.
- [19] ZHANG WZ, CHEN H, YANG MH, LIAO LQ. Electrochemical assay for detection of circulating tumor cells based on LiFePO₄ as electrochemical probe[J]. *Materials Letters*, 2020, 276: 128219.

(本文责编 郝丽芳)