基于磁性花粉状纳米硅球的循环肿瘤细胞高效捕获

靳荣荣, 高明霞*, 张祥民

复旦大学化学系, 上海 200433

*通讯作者, E-mail: mxgao@fudan.edu.cn

收稿日期: 2021-06-15; 接受日期: 2021-08-03; 网络版发表日期: 2021-10-20

国家自然科学基金(编号: 21974023, 21475027)和国家重点研发计划(编号: 2016YFA0501401, 2016YFA0501402, 2017YFA0505003)资助项目

摘要 本文设计合成了一种适配体修饰的磁性花粉状纳米硅球用于循环肿瘤细胞(CTCs)的高效捕获。此纳米硅球表面特有的“硅毛刺”结构不仅可为后续适配体的修饰提供更多的结合位点, 而且可以与细胞表面的微绒毛及伪足相互作用, 促进细胞的铺展和伪足的延伸, 可进一步提高CTCs的捕获效率。实验结果表明, 此纳米硅球的捕获效率高达85%, 且捕获后细胞的存活率接近100%。将此纳米材料用于模拟实际样中CTCs的检测分析, 其捕获效率为53%~83%, 研究结果表明, 即使在体系复杂的样品中, 该纳米材料仍具有良好的捕获性能, 为CTCs的分离纯化提供了新的方法与技术。

关键词 磁性花粉状纳米硅球, 循环肿瘤细胞, 高效捕获

1 引言

肿瘤的转移是其致死率高的主要原因, 据报道, 90%左右的癌症患者都死于肿瘤的侵袭和转移^[1,2]。肿瘤侵袭和转移是指肿瘤细胞从肿瘤原发病灶脱落下来, 进入循环系统尤其是血液循环系统中, 随着血液循环转移到身体其他部位进一步增殖发展为转移病灶的过程, 而存在于循环系统中的这类肿瘤细胞被称为循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)^[3,4]。循环肿瘤细胞的含量及其组学信息对肿瘤的早期诊断、治疗监测及预后评估甚至是肿瘤发生发展的新机理都具有重要的研究价值^[5,6]。然而, 全血中CTCs的数量极低(每毫升几个到几百个不等)^[7,8], 这给CTCs的检测分析带

来了极大的挑战。

近几十年来, 多种新技术和新方法被开发并广泛应用于循环肿瘤细胞的检测分析中。根据其分选机制的不同, 这些方法可以分为基于物理性质的分选和基于生物亲和性质的分选两大类^[9]。基于物理性质的分选主要是利用CTCs和正常血细胞间尺寸大小、变形性、黏附性等物理性质的差异实现^[10~12]。这类方法虽然捕获效率高但由于肿瘤细胞和正常细胞的物理性质在范围上有部分重叠, 导致捕获后的CTCs纯度较低。基于生物亲和性质的分选是指在捕获基底上修饰相应的抗体、适配体或叶酸、硼酸等有机小分子, 特异性地与肿瘤细胞相互作用, 进而实现肿瘤细胞的捕获^[13~16]。相比于基于物理性质分选的方法, 这类方法

引用格式: Jin R, Gao M, Zhang X. Magnetic pollen-like silica nanoparticles for efficient capture of circulating tumor cells. *Sci Sin Chim*, 2022, 52: 515–522, doi: 10.1360/SSC-2021-0145

特异性强, 捕获后CTCs的纯度高, 被广泛应用于临床治疗中。该方法常用的捕获基底主要包括免疫磁珠^[17,18]、网状水凝胶基底^[19]、三维阵列材料^[20]等。免疫磁珠合成简单且检测速度快, 通过简单地与肿瘤细胞共孵育就可以实现较高的捕获效率, 捕获后的细胞仍具有良好的生物活性。本课题组曾设计合成适配体功能化的磁珠^[21]、抗体修饰的亲水磁珠^[22]和硼酸功能化的三维阵列^[23]用于循环肿瘤细胞的高效捕获。

随着对自然界的探索和研究的深入, 人们发现一些天然的生物结构不仅易于修饰而且具有良好的功能特异性。在过去的几十年里, 各种不同结构的仿生材料被开发出来并广泛应用于细胞捕获, 如蜂窝复合材料^[24]、花粉状阵列结构^[25]、细胞印迹水凝胶^[26]等。据报道, 仿生材料特殊的拓扑结构可以与细胞表面的微绒毛及细胞伪足相互作用, 促进细胞在捕获基底上的铺展, 进一步提高了细胞的捕获效率^[27,28]。除此之外, 这些拓扑结构材料具有超亲水性, 能有效降低非特异性捕获, 有效提高捕获后细胞的纯度, 减少CTCs下游分析的干扰因素^[29-31]。

本文结合免疫磁珠和仿生拓扑结构材料的优点, 设计合成了一种适配体修饰的磁性花粉状纳米硅球用于循环肿瘤细胞的高效捕获。此花粉状纳米粒子具有仿生材料的超亲水性, 可以降低捕获基底的非特异性, 其对正常细胞(人输尿管上皮细胞)的非特异吸附仅为2.5%。此外还具有良好的磁响应性能, 能快速地从捕获体系中分离出来。其表面特有的花粉状结构不仅为后续适配体的修饰提供了更多的结合位点, 而且可以与细胞表面的微绒毛及伪足相互作用, 促进了细胞的铺展和伪足的延伸, 通过物理与生物亲和双重作用的协同进一步提高捕获效率, 其捕获效率可达85%。吖啶橙(AO)/碘化丙啶(PI)双染色后的荧光图像表明, 捕获后细胞具有良好的生物活性, 存活率接近100%。将此纳米硅球用于模拟实际样品中CTCs的检测分析, 结果表明, 即使在体系复杂的样品中, 该纳米材料仍具有良好的捕获性能, 对肿瘤的早期诊断具有一定的指导意义。

2 实验部分

2.1 原料与试剂

六水合三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、乙酸钠、乙醇、

乙二醇均为分析纯, 购自上海化工公司。间苯二酚、甲醛水溶液(37 wt%)、正硅酸四乙酯(TEOS)、异丙醇、氨水均为分析纯, 由国药化学试剂有限公司提供。3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)购自Sigma-Aldrich公司; 盐酸阿霉素由上海阿拉丁生化科技有限公司提供。Hoechst 33258染液、Dulbecco's Modified Eagle培养液(DMEM)、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶和磷酸盐缓冲液(PBS)均购自索莱宝科技有限公司(上海)。F-12K基础培养液由赛默飞世尔科技(中国)有限公司提供。核仁素特异性适配体(5'-NH₂-C₁₂-AS1411适配体)由上海生工生物技术有限公司合成。

2.2 实验方法

2.2.1 磁性花粉状纳米硅球的合成

首先采用文献报道的水热法合成粒径为250~280 nm的磁珠^[32], 将0.005 mol $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和0.044 mol NaAc溶解于75 mL乙二醇中, 室温磁力搅拌至溶液澄清透明, 然后将上述混合溶液转移到内衬为聚四氟乙烯的不锈钢高压釜中, 200℃反应16 h, 冷却至室温。将所得磁珠用去离子水和无水乙醇交替清洗3次, 50℃真空干燥, 备用。

称取50 mg磁珠, 溶于80 mL乙醇和水的混合溶液中($v/v=7:1$), 超声分散20 min, 并用氨水调节溶液pH至9.5。向上述溶液中加入0.6 mL正硅酸四乙酯(TEOS), 35℃反应8 min, 继续向混合溶液中依次加入0.4 g间苯二酚和0.56 mL甲醛水溶液(37 wt%), 35℃反应2 h, 6500 r min^{-1} 离心6 min。将所得产物用无水乙醇和去离子水交替清洗3次, 50℃真空干燥后置于马弗炉中550℃煅烧5 h, 得到磁性花粉状纳米硅球(magnetic pollen-like silica nanoparticles, Mag@plSP)。

2.2.2 磁性花粉状纳米硅球的功能化

Mag@plSP纳米粒子的功能化分为两步。首先将Mag@plSP纳米粒子表面氨基功能化, 取60 mg Mag@plSP溶于100 mL异丙醇溶液中, 超声分散20 min。在超声下逐滴加入1 mL APTES, 30℃反应过夜, 得到Mag@plSP-NH₂, 用无水乙醇和去离子水分别清洗3次, 50℃真空干燥, 备用。

接下来称量1 mg Mag@plSP-NH₂分散于0.75 mL的磷酸盐缓冲溶液中(PBS, 10 mM, pH 7.4), 再向其中加入0.25 mL戊二醛溶液(2.5 wt%, 过量), 超声分散

10 min, 30℃反应6 h, 用PBS洗涤3次, 除去未反应的戊二醛, 得到氨基活化后的Mag@plSP-NH₂纳米粒子. 将上述纳米粒子重溶于2 mL的去离子水中, 加入100 mL 5-NH₂-C₁₂-AS1411 (20 mM, 溶于Tris-EDTA缓冲液中), 室温反应过夜, 得到适配体修饰的磁性花粉状纳米硅球(简称为Mag@plSP@aptamer).

2.2.3 表面光滑的磁性纳米硅球的合成

称取50 mg磁珠, 溶于80 mL乙醇和水的混合溶液(v/v=7:1), 超声分散20 min, 并用氨水调节溶液pH至9.5. 再加入0.6 mL正硅酸四乙酯(TEOS), 35℃反应2 h, 得到表面光滑的磁性硅纳米粒子(magnetic smooth silica particles, Mag@smSP), 用无水乙醇和去离子水分别清洗3次, 50℃真空干燥, 备用.

2.2.4 磁性纳米粒子的表征

Mag@plSP纳米粒子的形貌和结构特征通过日本株式会社2011透射电子显微镜进行表征. 使用Nicolet红外光谱仪, 采用KBr压片法, 对Mag@plSP材料表面的基团进行检测分析. Mag@plSP和Mag@plSP@aptamer表面的Zeta电势通过Malvern Nano Z Zetasizer进行表征. Mag@plSP和Mag@plSP@aptamer纳米粒子的亲水性用接触角测量仪(JC2000D1, 上海忠臣数字技术设备有限公司)表征.

2.2.5 细胞培养

人乳腺癌细胞(MCF-7)、宫颈癌细胞(HeLa)、肾癌细胞(ACHN)、人脐静脉细胞融合细胞(EA.hy926)的培养液为45 mL DMEM培养液、5 mL FBS以及0.5 mL抗生素的混合溶液, 在二氧化碳浓度为5%的37℃恒温培养箱中培养, 每两天更换一次培养液. 人输尿管上皮永生化细胞(Sv-Huc-1)的培养液为45 mL F-12K基础培养液、5 mL FBS以及0.5 mL抗生素的混合溶液, 在二氧化碳浓度为5%的37℃恒温培养箱中培养, 一天更换一次培养液.

2.2.6 细胞的捕获

选取处于对数生长期的细胞, 用胰酶-EDTA消化液酶解并配制成浓度为 10^5 mL⁻¹的细胞悬浮液. 向1 mL的细胞悬浮液中加入150 μg Mag@plSP@aptamer纳米粒子, 置于37℃恒温培养箱中孵育40 min, 孵

育完成后用磁力架将磁珠从孵育体系中分离, 并用PBS浸洗3次, 除去未被捕获的细胞, 并将上清液保留用于后续捕获效率的计算.

$$\text{捕获效率}(\%) = (1 - N_1/N_0) \times 100\%$$

N_1 为PBS浸洗后上清液中未被捕获的细胞, N_0 为细胞总数, 这里为 10^5 .

2.2.7 细胞存活率考察

为了研究捕获基底的生物相容性及捕获后细胞的活性变化, 本文采用MTT法和AO/PI双染色法两种方法考察了细胞的活性, 具体操作如下.

MTT法: 首先, 将MCF-7细胞以 10^4 /孔的浓度接种于96孔板中, 培养24 h后, 与不同修饰的纳米粒子(20~200 μg mL⁻¹)共同孵育24 h. 然后用PBS浸洗细胞3次, 除去相应的纳米粒子并向每孔分别加入20 μL MTT的PBS溶液(0.5 mg mL⁻¹), 37℃反应4 h, 吸除多余的MTT, 向每孔分别加入100 μL DMSO溶液. 室温在摇床中反应10 min, 待生成的甲臍溶解完全后, 用Multiskan FC酶标仪检测每孔的吸光度, 计算细胞存活率.

AO/PI双染色法: 首先分别配制浓度为1 mg mL⁻¹的AO和PI的储存液并用PBS稀释至10 μg mL⁻¹, 然后混合等体积的AO和PI溶液. 将捕获后的细胞加入AO/PI混合液中, 37℃恒温培养箱中避光孵育20 min. 孵育完全后, 除去多余的染液, 并用PBS浸洗细胞三次, 将染色后的细胞置于荧光显微镜下, 观察细胞活性.

2.2.8 模拟实际样中循环肿瘤细胞的捕获

为了进一步评价Mag@plSP@aptamer纳米粒子的临床实用性能, 将Mag@plSP@aptamer纳米粒子用于模拟实际样中循环肿瘤细胞的捕获. 健康人的全血样本由复旦大学中山医院提供, 收集于EDTA抗凝管中, 24 h内使用(所有的实验均经过复旦大学道德委员会的同意并按照标准步骤进行操作). 首先用红细胞裂解液裂解全血样本中的红细胞, 具体步骤如下: 向全血中加入三倍体积的红细胞裂解液, 混匀后在冰上放置15 min, 期间用混悬仪轻轻涡旋2次, 待红细胞裂解后用4℃离心机450g离心10 min, 弃去上清液, 再次加入两倍体积的红细胞裂解液重悬细胞, 用4℃离心机450g离心10 min, 弃去上清液, 得到除红细胞外的全血细胞, 用1 mL DMEM培养液重悬细胞. 向去除红细胞后的全

血细胞悬液中加入经Hoechst 33258预染色的MCF-7细胞($10\sim 200\text{ cell mL}^{-1}$), 得到模拟实际样. 将1 mL模拟实际样与 $150\text{ }\mu\text{g Mag@plSP@aptamer}$ 共孵育40 min, 孵育完全后用磁铁收集捕获后的细胞, 在荧光显微镜下计数, 计算捕获效率.

3 结果与讨论

3.1 Mag@plSP@aptamer纳米粒子的合成及表征

Mag@plSP@aptamer纳米粒子的合成过程如图1所示, 首先利用水热法合成了 $250\sim 280\text{ nm}$ 的磁球, 然后在磁球表面合成了一层硅和间苯二酚-甲醛树脂(resorcinol-formaldehyde resin, RF)穿插生长的外壳, 再经过煅烧, 除去外壳中的RF部分后, 得到磁性花粉状纳米硅球, 然后利用戊二醛交联法在粒子表面进一步修饰了适配体. 从Mag@plSP@aptamer的透射电子显微镜图(图2a)可以看出, 磁核的粒径为 260 nm 左右, 在磁核的外边包覆了一层 40 nm 厚的硅壳, 硅壳表面粗糙形似花粉, 这种特殊的花粉状结构可以增强纳米粒子与细胞表面的物理作用, 进而提高捕获效率. 利用 N_2 吸附-脱附曲线研究了材料的表面性质(图S1, 网络版补充材料), 其比表面积为 $129.15\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$, 大的比表面积为后续适配体的修饰提供了更多的结合位点, 可进一步增强捕获基底与细胞间的生物亲和作用, 有助于肿瘤细胞的高效捕获. 通过接触角的测量评估Mag@plSP和Mag@plSP@aptamer纳米粒子的亲水性, 如图2b所示, Mag@plSP的接触角为 14.01° , 表明Mag@plSP纳米粒子具有良好的亲水性. 当修饰适配体后, Mag@plSP@aptamer的接触角降低, 仅为 9.64° (图2c), 适配体的修饰在一定程度上增加了纳米粒子的亲水性, 这有助于降低材料的非特异性捕获. Mag@plSP纳米粒子经每步修饰后的Zeta电势如图S2所示, 与APTES反应后, Mag@plSP- NH_2 纳米粒子表面带正电荷, 表明Mag@plSP被氨基功能化, 而修饰适配体后, 由于适配体带负电荷, 纳米粒子表面的Zeta电势由正值变为了负值. 用傅里叶红外光谱仪分析了Mag@plSP@aptamer纳米粒子的官能团结构, 如图S3所示, 563 cm^{-1} 处的吸收峰归属于Fe-O键的振动, 1044 cm^{-1} 处的吸收峰是由于硅醇基的振动, 1650 cm^{-1} 处的吸收峰归属于-NH的弯曲, 而 1210 cm^{-1} 处-P=O振动峰的出现, 进一步证明了适配体的成功修饰.

图1 Mag@plSP@aptamer纳米粒子的合成流程图(网络版彩图)

Figure 1 The fabrication of Mag@plSP@aptamer nanoparticles (color online).

图2 (a) Mag@plSP@aptamer的TEM图像. 纳米粒子(b) Mag@plSP和(c) Mag@plSP@aptamer的接触角(网络版彩图)

Figure 2 The TEM image of Mag@plSP@aptamer (a). The contact angle of Mag@plSP (b) and Mag@plSP@aptamer (c) (color online).

3.2 细胞捕获条件优化

为了实现高效的细胞捕获, 我们以MCF-7细胞为例, 考察了孵育时间和捕获基底对细胞捕获效率的影响. 1 mL 细胞悬浮液(10^5 cell mL^{-1})与 $150\text{ }\mu\text{g}$ 不同修饰的磁性纳米粒子(表面光滑的Mag@smSP纳米粒子、Mag@plSP花粉状纳米粒子以及经适配体修饰后的Mag@plSP@aptamer花粉状纳米粒子)共孵育 $10\sim 50\text{ min}$. 结果如图3所示, 随着孵育时间的增加, Mag@smSP、Mag@plSP和Mag@plSP@aptamer三种捕获基底对细胞的捕获效率均不断提高, 且在 40 min 时达到最大值, 相应的捕获效率分别为 $25.40\%\pm 2.88\%$ 、 $35.78\%\pm 2.35\%$ 和 $84.53\%\pm 1.79\%$. Mag@plSP对肿瘤细胞的捕获效率明显高于Mag@smSP, 其表面特殊的花粉状拓扑结构与细胞表面微绒毛及伪足相适应, 促进了细胞伪足的延伸, 增强了基底与细胞间的物理相互作用, 提高了捕获效率. 进一步修饰适配体后, Mag@plSP@aptamer的细胞捕获效率高达 $84.53\%\pm 1.79\%$, 纳米粒子表面的适配体可以与肿瘤细胞表面过表达的核仁素蛋白特异性结合, 通过物理、化学双重作用实现肿瘤细胞的高效捕获. 为了进一步考察表面光滑的纳米粒子与花粉状纳米粒子之间的区别, 本文还研究了适配体修饰的光滑磁性硅球的捕获性能, 结果如图S4所示, 与MCF-7细胞共孵育 40 min 后,

图3 不同孵育时间和捕获基底的细胞捕获效率($n=5$) (网络版彩图)

Figure 3 The capture efficiency of cells with different incubation time and substrate ($n=5$) (color online).

Mag@smSP@aptamer的捕获效率为 $47.45\% \pm 2.51\%$ 。一方面, Mag@smSP@aptamer纳米粒子表面光滑, 与肿瘤细胞间的物理作用较弱。此外, 其适配体的修饰位点较少, 与肿瘤细胞间的亲和作用也相对较低, 因此其捕获效率明显低于Mag@pISP@aptamer纳米粒子。综上所述, 最终选用Mag@pISP@aptamer为捕获基底, 孵育时间为40 min进行后续实验。

3.3 磁性纳米粒子的生物相容性研究

捕获基底具有良好的生物相容性是细胞能够存活的重要保证。本文以MCF-7细胞为研究对象, 利用MTT法考察了Mag@pISP和Mag@pISP@aptamer两种纳米粒子的生物相容性, 结果如图4所示。与不同浓度的Mag@pISP纳米粒子共孵育24 h后, MCF-7细胞仍表现出良好的细胞活性。即使在材料浓度高达 $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时, 细胞存活率也大于90%, 说明Mag@pISP纳米粒子具有良好的生物相容性。与Mag@pISP@aptamer共孵育后的细胞存活率略高于Mag@pISP, 这是由于适配体的修饰增加了纳米粒子的亲水性, 进一步提高了其生物相容性。

3.4 适配体修饰的磁性纳米粒子的非特异性捕获研究

捕获后的循环肿瘤细胞的纯度对后续的生物信息学研究具有重要的影响。为此, 本文以正常细胞系

图4 不同浓度的Mag@pISP或Mag@pISP@aptamer纳米粒子与肿瘤细胞(MCF-7)共孵育24 h后的细胞存活率($n=5$) (网络版彩图)

Figure 4 The cell viability of tumor cells (MCF-7) incubated with different concentrations of Mag@pISP or Mag@pISP@aptamer nanoparticles for 24 h ($n=5$) (color online).

EA.hy926为研究对象, 考察了不同形状纳米粒子捕获性能的非特异性, 结果如图S5所示。与EA.hy926细胞共孵育40 min后, Mag@pISP@aptamer纳米粒子的非特异性捕获仅为 $8.5\% \pm 2.0\%$, 而Mag@smSP@aptamer纳米粒子的非特异性捕获高达 $26.8\% \pm 2.47\%$ 。此外, 本文还进一步研究了大分子掩蔽剂BSA和小分子掩蔽剂甘氨酸(Gly)对Mag@pISP@aptamer纳米粒子非特异性捕获性能的影响, 首先将Mag@pISP@aptamer与2 wt%的BSA溶液或0.1 mM甘氨酸(Gly)溶液共孵育1 h, 然后再将其分别用于正常细胞系EA.hy926细胞的捕获, 与未经掩蔽过程相比, 经BSA或甘氨酸掩蔽后, Mag@pISP@aptamer纳米粒子对EA.hy926细胞的捕获效率分别为 $8.75\% \pm 2.8\%$ 和 $6.11\% \pm 1.5\%$ (图S5), 与未经掩蔽的非特异性捕获效率($8.5\% \pm 2.0\%$)接近。实验结果表明, 无论是否使用掩蔽剂, Mag@pISP@aptamer纳米粒子对正常细胞捕获能力均小于10%, 材料的超亲水性和适配体的修饰是其非特异性捕获效率低的主要原因。

3.5 Mag@pISP@aptamer纳米粒子对不同类细胞的捕获研究

为了进一步研究Mag@pISP@aptamer纳米粒子对肿瘤细胞捕获的选择性, 我们考察了Mag@pISP@aptamer对三种膜表面核仁素蛋白过表达的肿瘤细胞

(HeLa, ACHN和MCF-7)和两种膜表面核仁素蛋白表达量极低的正常细胞(EA.hy926, Sv-Huc-1)的捕获能力, 结果如图5所示. 其对于肿瘤细胞的捕获效率都大于60%, 其中对MCF-7细胞的捕获效率最高, 达到了84.53%, 对HeLa细胞的捕获效率为70%. Mag@plSP@aptamer纳米粒子对ACHN细胞的捕获效率较低, 为64.32%, 我们推测可能是由于ACHN细胞表面靶蛋白的表达量相对较低造成的. 然而, Mag@plSP@aptamer对正常细胞的捕获效率都明显低于肿瘤细胞, 捕获效率均小于10%, 尤其是对Sv-Huc-1细胞的捕获效率仅为 $2.5\% \pm 1.3\%$. 结果表明, 此适配体修饰的磁性花粉状纳米硅球具有良好的选择性, 可对核仁素蛋白过表达的肿瘤细胞进行特异性的捕获, 且具有较高的捕获效率.

3.6 捕获后细胞的活性

捕获后的循环肿瘤细胞具有良好的细胞活性和增殖能力是进行后续生物组学研究的重要条件. 本文利用AO/PI双染色法研究了捕获后细胞的活性, 结果如图6所示. 从荧光显微图中可以看出, 细胞均被AO染色呈现绿色荧光, 看不到被PI染色而呈红色荧光的细胞, 细胞存活率接近100%. 这是由于捕获基底具有良好的生物相容性, 而且捕获条件比较温和降低了对细胞的损伤, 从而保持了高的细胞活力.

图5 Mag@plSP@aptamer纳米粒子对不同细胞的捕获效率($n=5$) (网络版彩图)

Figure 5 The capture efficiencies of Mag@plSP@aptamer nanoparticles for different cells ($n=5$) (color online).

3.7 模拟实际样中循环肿瘤细胞的捕获

为了研究Mag@plSP@aptamer磁性花粉状纳米硅球在临床应用的潜能, 本文将Mag@plSP@aptamer用于模拟实际样中循环肿瘤细胞的捕获. 将 $150 \mu\text{g}$ Mag@plSP@aptamer纳米粒子与1 mL的含有不同数量肿瘤细胞的模拟实际样共孵育40 min, 其捕获效率如

图6 AO/PI染色后细胞的荧光图(比例尺: 100 μm) (网络版彩图)

Figure 6 The fluorescent microscope image of cells after AO/PI staining (scale bar: 100 μm) (color online).

图7 模拟实际样中CTCs的捕获效率($n=5$) (网络版彩图)

Figure 7 Capture efficiency of circulating tumor cells in mimic cancer patients' whole blood ($n=5$) (color online).

图7所示. Mag@pISP@aptamer纳米粒子对模拟实际样中肿瘤细胞的捕获效率在53%~83%之间, 在肿瘤细胞浓度为 10 cell mL^{-1} 时, 捕获效率仍可达83%. 实验结果表明, Mag@pISP@aptamer纳米材料具有良好的抗干扰能力, 即使在复杂的体系中仍具有高的捕获性能, 表现出极大的临床应用潜能.

4 结论

本文通过溶胶-凝胶法合成了具有花粉结构的磁

性纳米硅球, 此纳米粒子不仅具有合成简单、分析速度快的优点, 还具有高的细胞亲和性, 在修饰适配体后能够通过物理、生物亲和双重作用的协同实现循环肿瘤细胞的高效捕获, 其捕获效率高达85%, 且捕获后的细胞具有良好的细胞活性. 此外, 捕获基底对于正常细胞捕获的捕获效率均低于10%, 有助于提高捕获后循环肿瘤细胞的纯度. 模拟实际样的检测结果表明该纳米粒子即使在复杂的体系中也能表现出良好的捕获性能, 具有极大的临床应用潜能, 对肿瘤的早期诊断和预后评估具有重要的意义.

补充材料

本文的补充材料见网络版chemcn.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

参考文献

- Chaffer CL, Weinberg RA. *Science*, 2011, 331: 1559–1564
- Hanahan D, Weinberg RA. *Cell*, 2011, 144: 646–674
- Zhang N, Deng Y, Tai Q, Cheng B, Zhao L, Shen Q, He R, Hong L, Liu W, Guo S, Liu K, Tseng HR, Xiong B, Zhao XZ. *Adv Mater*, 2012, 24: 2755
- Nonaka T, Wong DTW. *J Dent Res*, 2018, 97: 701–708
- Ortiz V, Yu M. *Trends Cell Biol*, 2018, 28: 764–775
- Sun Y, Haglund TA, Rogers AJ, Ghanim AF, Sethu P. *Anal Chim Acta*, 2018, 1012: 10–29
- Wang S, Liu K, Liu J, Yu ZTF, Xu X, Zhao L, Lee T, Lee EK, Reiss J, Lee YK, Chung LWK, Huang J, Rettig M, Seligson D, Duraiswamy KN, Shen CKF, Tseng HR. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 3084–3088
- Cheng B, He Z, Zhao L, Fang Y, Chen Y, He R, Chen F, Song H, Deng Y, Zhao X, Xiong B. *Int J Nanomed*, 2014, 9: 2569
- Alix-Panabières C, Pantel K. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 623–631
- Ahmed MG, Abate MF, Song Y, Zhu Z, Yan F, Xu Y, Wang X, Li Q, Yang C. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 10681–10685
- Abdulla A, Liu W, Gholamipour-Shirazi A, Sun J, Ding X. *Anal Chem*, 2018, 90: 4397–4405
- Hao SJ, Wan Y, Xia YQ, Zou X, Zheng SY. *Adv Drug Deliver Rev*, 2018, 125: 3–20
- Zhang P, Gao M, Zhang X. *Talanta*, 2016, 153: 366–371
- Wang S, Zhang C, Wang G, Cheng B, Wang Y, Chen F, Chen Y, Feng M, Xiong B. *Theranostics*, 2016, 6: 1877–1886
- Luan C, Wang H, Han Q, Ma X, Zhang D, Xu Y, Chen B, Li M, Zhao Y. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 21206–21212
- Liu H, Li Y, Sun K, Fan J, Zhang P, Meng J, Wang S, Jiang L. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 7603–7609
- Lu NN, Xie M, Wang J, Lv SW, Yi JS, Dong WG, Huang WH. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 8817–8826
- Shi W, Wang S, Maarouf A, Uhl CG, He R, Yunus D, Liu Y. *Lab Chip*, 2017, 17: 3291–3299
- Wang L, Liu H, Zhang F, Li G, Wang S. *Small*, 2016, 12: 4697–4701
- Xu H, Dong B, Xiao Q, Sun X, Zhang X, Lyu J, Yang Y, Xu L, Bai X, Zhang S, Song H. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 30510–30518
- Sun C, Zhang R, Gao M, Zhang X. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 8883–8892
- Zhang P, Zhang Y, Gao M, Zhang X. *Talanta*, 2016, 161: 925–931
- Jin R, Wang J, Gao M, Zhang X. *Anal Chem*, 2020, 92: 3403–3408
- Chen S, Lu Q. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9: 2001006–2001015
- Wang W, Yang G, Cui H, Meng J, Wang S, Jiang L. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6: 1700003–1700008
- Liu L, Yang K, Gao H, Li X, Chen Y, Zhang L, Peng X, Zhang Y. *Anal Chem*, 2019, 91: 2591–2594

- 27 Dou X, Li P, Jiang S, Bayat H, Schönherr H. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 8508–8518
- 28 Zhang P, Chen L, Xu T, Liu H, Liu X, Meng J, Yang G, Jiang L, Wang S. *Adv Mater*, 2013, 25: 3566–3570
- 29 Liu H, Liu X, Meng J, Zhang P, Yang G, Su B, Sun K, Chen L, Han D, Wang S, Jiang L. *Adv Mater*, 2013, 25: 922–927
- 30 Shen MY, Chen JF, Luo CH, Lee S, Li CH, Yang YL, Tsai YH, Ho BC, Bao LR, Lee TJ, Jan YJ, Zhu YZ, Cheng S, Feng FY, Chen P, Hou S, Agopian V, Hsiao YS, Tseng HR, Posadas EM, Yu HH. *Adv Healthcare Mater*, 2018, 7: 1700701
- 31 Song Y, Shi Y, Huang M, Wang W, Wang Y, Cheng J, Lei Z, Zhu Z, Yang C. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 2236–2240
- 32 Wang Y, Wang J, Gao M, Zhang X. *J Mater Chem B*, 2015, 3: 8711–8716

Magnetic pollen-like silica nanoparticles for efficient capture of circulating tumor cells

Rongrong Jin, Mingxia Gao^{*}, Xiangmin Zhang

Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China

^{*}Corresponding author (email: mxgao@fudan.edu.cn)

Abstract: Aptamer-modified magnetic pollen-like silica nanoparticles were synthesized and used as a substrate for the efficient capture of circulating tumor cells. Silica spikes on the surface of nanoparticles can not only provide more binding sites for the modification of aptamer, but also interact with the microvillus and pseudopods on the cell surface, thus improving the capture efficiency of circulating tumor cells (CTCs). The capture efficiency was up to 85%, and the cell viability was nearly 100%. The mimic clinical sample array showed that this strategy achieved a good capture performance even in the complex system and showed a good potential in the clinical applications.

Keywords: magnetic pollen-like silica nanoparticles, circulating tumor cells, efficient capture

doi: [10.1360/SSC-2021-0145](https://doi.org/10.1360/SSC-2021-0145)