

纳米生物无机界面的构筑与循环肿瘤细胞分离

朱润冬

上海七宝德怀特高级中学 上海 201101

摘要: 纳米材料的出现使无机化学、材料科学和生物学相互融合, 产生了许多新的研究领域, 如纳米生物-无机界面材料、无机药物材料和无机金属蛋白的研究和应用等。无机材料, 如零维纳米粒子、一维纳米线、二维纳米带等。具有光学、电学、热学、催化和其它性能, 这些性能是大块材料由于其增大的比表面积而不具有的。它们用于构建纳米生物无机界面, 广泛应用于功能材料制备、细胞行为研究、生物检测和缺失、疾病诊断和治疗等领域。比如利用微纳结构增加表面粗糙度, 可以制备具有特殊润湿性的功能表面: 模拟生物矿化机制。可以制备具有高机械性能的纳米复合材料。此外, 通过制备各种微纳结构, 可用于研究细胞粘附、分化等行为, 探索细胞外基质对细胞生命活动的影响。利用纳米结构增加比表面积可以提高生物分子检测的灵敏度。最近。无机纳米结构在癌症诊断方面也显示出巨大的优势和应用前景, 如循环肿瘤细胞的分离和检测。

关键词: 无机材料; 纳米结构; 生物界面; 循环肿瘤细胞 (CTCs); 癌症诊断

Construction of nanobiotic inorganic interface and isolation of circulating tumor cells

Rundong Zhu

Shanghai Qibao Dwight High School, Shanghai 201101

Abstract: The appearance of nanomaterials makes inorganic chemistry, materials science and biology integrate with each other, and gives rise to many new research fields, such as the research and application of nanobiotic-inorganic interface materials, inorganic pharmaceutical materials and inorganic metalloproteins. Inorganic materials, such as zero nanometer particles, one nanometer wire, two dimensional nanoribbons, etc. Having optical, electrical, thermal, catalytic, and other properties that bulk materials do not possess due to their increased surface area. They are widely used in the preparation of functional materials, cell behavior studies, biological detection and deletion, disease diagnosis and treatment, and so on. For example, by using micro-nano structures to increase surface roughness, functional surfaces with special wettability can be prepared: the mechanism of biomineralization can be simulated. Nanocomposites with high mechanical properties can be prepared. In addition, various micro and nano structures can be used to study cell adhesion, differentiation and other behaviors, and explore the effect of extracellular matrix on cell life activities. The sensitivity of biomolecular detection can be improved by using nanostructures to increase the specific surface area. Recently. Inorganic nanostructures have also shown great advantages and promising applications in cancer diagnosis, such as the isolation and detection of circulating tumor cells.

Keywords: Inorganic materials; Nanostructure; Biological interface; Circulating tumor cells (CTCs); A cancer diagnosis

纳米无机界面的研究是无机化学新的前沿领域之一。纳米结构无机材料在仿生界面、细胞界面、生物检测界面等领域发挥着越来越重要的作用。近年来, 无机纳米结构被尝试用于分离微量循环肿瘤细胞的基础研究。展示了非常诱人的应用前景。痕量CTCs的高效分离对于癌症的早期发现、术后监测和生物学研究具有重要意义。

一、纳米结构用于高效分离CTCs

可以通过在基底表面制备纳米结构来捕获和分离血液中的CTCs, 以设计细胞界面并修饰相应的特异性识别分子。目前, 抗epcam1(上皮细胞粘附分子)是最常用的特异性识别分子。EpCAM(上皮细胞粘附分子)是上皮肿瘤细胞过度表达的表面分子, 但不在正常细胞表面。

用于制备纳米结构表面的常用材料主要是无机材料,如硅、二氧化钛等。还有一些有机聚合物材料。下面将根据衬底表面上的不同纳米结构详细描述该分离方法。

1. 纳米线阵列的表面

为了更好地模拟细胞表面的纳米伪足,研究人员制备了无机硅纳米线阵列,并用于细胞捕获和分离界面的设计。硅纳米线因其优异的光电性能在太阳能电池、光伏器件等领域得到了广泛的研究和应用。硅纳米线的制备方法主要有两种:自下而上的bottom-up制备方法如化学气相沉积法;自上而下的top-down制备方法,例如蚀刻法。通过选择不同的晶面,可以通过刻蚀制备不同取向的纳米线。例如,使用经典的氢氟酸/硝酸银湿法化学蚀刻方法,可以在(100)晶面上制备垂直取向的纳米线,而在(110)晶面上可以制备倾斜取向的纳米线。由于其良好的可设计性,近年来,硅纳米线逐渐被应用于纳米生物-无机界面的制备。我们采用氢氟酸/硝酸银湿法化学蚀刻方法在(100)硅片表面制备了垂直三维硅纳米线阵列结构。抗体抗。通过进一步的化学修饰,EpCAM附着在硅纳米线阵列的表面。随后的细胞捕获实验证明,该表面对特定的乳腺癌细胞系MCF7具有高的捕获效率(45%-65%)。与光滑硅表面相比,俘获效率提高了40%左右。相应细胞环境的SEM表征表明,细胞在光滑的基底上是圆形的,而在纳米线阵列的表面,表面伪足与基底纳米结构紧密相互作用。这一结果首次证明了纳米结构对细胞捕获和分离的增强作用,为探索和制备高效的CTCs分离器件提供了新思路。之后,通过将硅纳米线阵列表面与简单的微流体通道结合,我们制备了用于分离CTC的微流体装置。微流体通道上部的鱼骨结构用于增强流体对流并增加细胞与基质之间的接触频率,从而进一步提高MCF7的捕获效率(约95%)。同时,我们对患者的血液样本进行了实验,并将其与商业细胞搜索系统进行了比较。结果表明,基于硅纳米线阵列的微流控装置在检测率和CTC数方面比细胞搜索系统更灵敏和准确。这为制备商用高效CTCs分离装置提供了新的选择。细胞表面结构和基底纳米结构之间增强的三维拓扑相互作用是纳米结构提高细胞捕获和分离效率的主要原因。结果表明,细胞与纳米结构微球表面的相互作用力远高于细胞与相应光滑微球表面的作用力。这也证明了细胞表面结构和基底结构之间存在密切的相互作用。纳米结构对细胞捕获的三维拓扑增强效应。已经开发了许多基于表面纳米结构的CTC分离方法。采用热化学气相沉积法制备了无机硅纳米线阵列的表面。制备的硅线的顶壁和侧

壁均匀覆盖有无机金纳米颗粒。通过修饰金簇表面上的抗体,该表面对靶肿瘤细胞具有约88%的捕获效率。与光滑的金表面和简单的硅线表面相比,捕获效率相应提高。细胞形态的表征还反映了从细胞表面突出的微绒毛与金簇-硅纳米线复合结构相互作用。同时分离目标细胞后,用近红外光照射它们。金簇的光热效应可以杀死肿瘤细胞。这样,通过将纳米结构的增强捕获效应与金簇的光热效应相结合,可以在有效捕获的同时实现原位CTCs光热处理,这为CTCs分离装置的多功能性提供了一种思路。此外以聚苯乙烯胶体晶体为模板,通过金属沉积、深度反应离子刻蚀等步骤制备了透明无机石英纳米线阵列。在用特异性抗体进行表面修饰后,捕获相应的靶肿瘤细胞。与光滑玻璃表面相比,纳米线阵列表面的细胞捕获效率提高了约60%。同时,表面可用作激光扫描细胞计数器,实现大面积原位自动定量表征和检测CTC以及单细胞尺度细胞形态和荧光强度分析。

2. 纳米团簇表面

将聚乙二醇修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子附着在硅烷化玻璃表面,然后对转铁蛋白进行修饰。形成由特定识别分子修饰的三维纳米结构表面。该表面可用于捕获表达转铁蛋白受体的靶细胞,例如结肠癌细胞(HCT116)。通过引入 Fe_3O_4 纳米颗粒,表面具有粗糙的结构。与转铁蛋白修饰的光滑玻璃表面相比,细胞的捕获效率提高了2倍以上。同时,该表面具有高特异性,能够高效识别靶细胞,并且具有低的非特异性细胞粘附(Caco-2)。通过荧光染色和显微镜下观察细胞形态,发现在转铁蛋白修饰的光滑玻璃表面上,细胞呈圆形,而在三维纳米结构表面,细胞相对散开,伸出表面伪足。这反映了细胞与基底纳米结构之间的三维拓扑相互作用,增强了细胞与基底之间的相互作用,提高了目标细胞的捕获和分离效率。此外,还可以通过聚噻吩纳米簇在导电玻璃上的电沉积和抗体修饰来捕获和分离相应的上皮肿瘤细胞。研究人员系统地研究了不同粗糙度的纳米团簇表面上靶细胞MCF7的捕获效率。发现随着粗糙度的增加,细胞捕获效率在较高的粗糙度下达到最大,这反映了基底表面结构对细胞捕获和分离的影响。

3. 纳米纤维膜表面

受细胞外基质框架的启发,研究人员制备了水平排列的纳米纤维膜表面。这种结构表面与垂直排列的硅纳米线阵列表面有很大不同,可以更好地模拟细胞外基质的结构。通过静电纺丝钛酸四丁酯和聚乙烯吡咯烷酮前驱体溶液,然后高温煅烧得到无机二氧化钛纳米纤维膜

表面。通过化学修饰获得的抗体修饰的基底用于CTC的捕获和分离。通过调节静电纺丝的条件,可以改变纳米纤维的排列密度,从而系统地研究基底结构对细胞捕获的影响。结果表明,这种无机TiO₂纳米纤维膜表面具有较高的细胞捕获效率,与光滑的硅表面相比,可提高约18倍。相应的病人血样实验也取得了良好的效果。细胞的形态学表征表明,细胞在光滑的基底上基本呈球形,表面结构较少。而在TiO₂纳米纤维膜表面,细胞的铺展程度增加,更多的丝状伪足突出与平行于表面的纳米纤维相互作用,反映了细胞与细胞外基质骨架的作用方式。这种结构虽然不同于硅线体系,但也充分证明了基底表面纳米结构对细胞捕获的三维拓扑增强效应。

4. 其他表面

使用多聚赖氨酸将无机埃洛石(水合高岭土,一种含铝硅酸盐的矿物)纳米管粘附到微管的内壁。然后在纳米管表面修饰P选择性蛋白,利用选择性蛋白调节细胞粘附的原理,分离相应的淋巴细胞和上皮肿瘤细胞。纳米管的引入增加了表面的粗糙度,与微管光滑的内壁相比,细胞分离效率相应提高。最近,研究发现。由于癌细胞对纳米结构的强粘附性,CTC可以在没有特定识别分子的情况下被有效地捕获和分离。通过反应离子蚀刻。通过改变蚀刻条件,可以在无机玻璃表面获得一系列不同粗糙度的纳米结构表面。通过使用该表面进行细胞捕获,发现随着粗糙度的增加。捕获的细胞数量不断增加。而且无论是否修饰特定抗体,对应的细胞捕获效率基本相同。本研究为捕获和分离CTCs提供了一种简单有效的方法。它只能利用细胞粘附特性的差异,将对纳米结构粘附性强的肿瘤细胞与粘附性弱的血细胞分开,而不考虑细胞大小和表面蛋白表达。然而,相关实际患者血液样本的分离需要进一步验证。

二、纳米材料用于分离循环肿瘤细胞

1. 纳米线阵列

制备硅纳米线有两种方法:自下而上和自上而下。氢氟酸和硝酸银湿法蚀刻是最常用的方法。在该方法中,将硅片浸入HF和NO₃的混合溶液中,在其表面沉积不连续的Ag颗粒膜,并逐渐向下蚀刻以形成纳米线阵列。在将抗EpCAM抗体移植到硅纳米线表面后,选择人乳腺癌细胞(MCF-7)作为捕获实验的靶细胞。综合优化细胞捕获条件后,MCF-7细胞在硅纳米线阵列表面的捕获率为45-65%,比光滑硅表面提高了10倍。扫描电子显微镜(SEM)显示,靶细胞在硅纳米线阵列表面具有完全扩展的伪足,以获得充分的接触和有效的粘附。而在平

坦的Si表面上捕获的靶细胞呈球形构象,几乎没有伪足,因此捕获效率要低得多。这一结果首次证明了纳米结构可以用于有效地分离和捕获循环肿瘤细胞。

2. 纳米纤维

纳米阵列是垂直取向的纳米材料,而纳米纤维是水平拉伸的纳米材料。与用于制备纳米柱和纳米线的湿法刻蚀和化学沉积方法不同,纳米纤维通常通过静电纺丝来制备。一些研究人员在硅片表面沉积了直径为100nm-300nm的TiO₂纳米纤维。纳米基底经过化学修饰和抗体修饰后,可用于大肠癌细胞(HCT116)和胃癌细胞(BCG823)的高效分离和捕获。结果发现,在最佳捕获条件下(60分钟静电纺丝时间,60分钟细胞捕获时间),纳米纤维膜的细胞捕获率比平坦Si表面高18倍。研究人员将纳米纤维应用于相应癌症患者的血液样本中,也得到了很好的捕获结果:在3名结直肠癌患者的2个样本中捕获了2个CTC,在7名胃癌患者的样本中捕获了3-19个CTC。

3. 纳米粗糙表面

聚(3,4-乙烯二氧基)噻吩(PEDOTs)是一种结构简单、稳定性好、生物相容性好的导电聚合物。研究人员通过羧基功能单体(EDOT-COOH)的电化学聚合在电板上沉积EDOT-COOH,制成纳米结构导电聚合物。羧基团可用于生物结合,抗EpCAM修饰的底物可用于癌细胞的分离。实验结果表明,PEDOT-COOH纳米点的俘获率比光滑的PEDOT-COOH膜高4倍,这与在3D硅纳米线阵列上观察到的纳米放大效应相似。这是捕集剂-受体结合和纳米结构匹配的协同效应的结果。

4. 仿生层级结构

自然界中一些独特的拓扑结构表现出优越的性能。不需要复杂昂贵的微机械加工设备,利用具有精密结构的天然生物为模板,就可以制备相应结构的仿生材料。有研究者以表面具有微纳米分级结构的玫瑰花瓣为模板,以聚二甲硅氧烷(PDMS)为复制材料,制备了直径和深度约为20-30μm,纳米尺度宽度约为500-600nm的微孔或凸起结构。抗体修饰后,仿生分级结构用于高效分离和捕获胰腺癌(PaTu8988t)和人乳腺癌(MCF-7)细胞。细胞捕获后,生物相容性还原剂谷胱甘肽(GSH)可用于裂解二硫键,将细胞从基质中释放出来。

三、研究展望

无机纳米材料,如零维纳米颗粒、一维纳米线和纳米纤维,已逐渐应用于纳米生物-无机界面的构建以及CTC的捕获和分离。许多研究结果表明,利用基底表面

纳米结构的三维拓扑增强效应捕获细胞,可以显著提高细胞的分离效率。除了分离CTC外,纳米结构表面还用于分离淋巴细胞等其他细胞,为实现新型高效微量细胞分离装置提供了新的研究思路。尽管已经制备了许多不同的纳米结构并实现了有效的细胞捕获,但表面结构的设计规律需要进一步的系统研究。生物体中的许多细胞识别过程涉及纳米结构的协同作用,例如淋巴细胞对癌细胞的识别。如何模拟和利用这一识别规则来实现纳米结构表面的合理设计是一个重要而富有挑战性的课题。无机纳米结构种类繁多,可设计性强,可在平面和曲面上制备。这将为本研究提供一个广阔的研究平台。从患者血液中分离出CTC后,需要进一步检测、分析、活细胞研究和细胞治疗。因此,CTCs分离和检测平台需要实现原位细胞捕获分离和检测识别,以及后续细胞释放收集。所以实现细胞分离界面的透明性、可观察性、可逆性、可释放性和多响应性是制备先进CTCs分离设备中需要解决的重要问题。无机纳米材料在这方面也显示出相

应的应用优势。无机纳米结构界面已用于响应性功能界面设计、血液相容性研究IV.细胞释放等。这为我们制备功能性CTCs分离界面提供了基础。

总之,CTCs的检测可以为早期癌症诊断、肿瘤预后和个体化治疗提供重要的参考信息。因此,开发一种高效分离和纯化CTCs的系统变得越来越重要。然而,由于血液中CTCs的含量稀少且种类繁多,因此CTCs的分离和鉴定面临着一定的挑战。尽管利用纳米结构基底分离纯化CTCs的研究仍处于初级阶段,但不同类型的纳米结构基底已经被制备出来,并且成功地提高了CTCs的分离纯化效率。相信未来通过不断的研究,该实验室的发现可以成功应用于肿瘤的临床诊断和治疗。

参考文献:

[1]刘涛.浅谈纳米生物无机界面的构筑与循环肿瘤细胞分离.2021.

[2]刘晓丽,关于纳米生物无机界面的构筑与循环肿瘤细胞分离.2021.