



许恒毅 副研究员,工学博士,硕士生导师,江西省海外引进人才。中国免疫学学会会员、中华预防医学会微生态学分会微生态制品专业学组成员、中国毒理学会纳米毒理专业委员会会员。主要从事循环肿瘤细胞(CTCs)的高效磁分离方法研究,尤其是基于磁性纳米粒子在外周血中的高效分离CTCs的方法学研究,以及新型纳米材料的生殖毒性研究。主持国家自然科学基金和教育部高等学校博士学科点基金等省部级研究项目5项,参与973、863、国家自然科学基金等国家及省部级项目20余项。发表学术论文近百篇,参编著作3部,申报专利50余项,并担任十余种相关领域SCI期刊的审稿专家。

## 磁性氧化铁纳米粒子的表面修饰及其在CTCs分离中应用的研究进展\*

黄小林 综述 许恒毅 审校

**摘要** 磁性氧化铁纳米粒子(magnetic iron oxide nanoparticles, MIONs)已被广泛应用于靶向药物转运、磁共振成像(MRI)、癌细胞分离和富集及肿瘤靶向治疗等生物医学领域。随着MIONs在生物医学领域应用的不断深入,对MIONs在更低的毒性、更稳定的胶体分散性、更好的生物相容性及更高的磁响应性等方面的性能也提出了更具体的要求。因此,除了材料合成本身需不断改进外,选择合适的修饰材料对MIONs进行表面改性和修饰是至关重要的。本文对MIONs表面修饰的方法和表面修饰的材料及其作用进行了综述,并着重阐述了MIONs在循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)分离中应用的研究进展。

**关键词** 磁性氧化铁纳米粒子 表面修饰 循环肿瘤细胞 分离

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20131123

### Recent advances in surface modification of magnetic iron oxide nanoparticles and their applications for CTCs separation

Xiaolin HUANG, Hengyi XU

Correspondence to: Hengyi Xu; E-mail: kidyxu@163.com

State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China.

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81201691 and 31271863), the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20123601120005) and Scientific Research Funds from Jiangxi Provincial Department of Education (No. GJJ13093).

**Abstract** Magnetic iron oxide nanoparticles (MIONs) have been widely used in biomedical fields, including targeted drug delivery, magnetic resonance imaging, separation and enrichment of cancer cells, and tumor-targeted therapy. However, MIONs are increasingly necessary to ensure reduced toxicity, more stable colloidal dispersion, better biocompatibility, and higher magnetic responsiveness. Thus, apart from the continuous improvement of material synthesis, specific surface modification of MIONs is essential to choose appropriate materials. This paper reviews the available methods and materials and their function in MION surface modification as well as their applications for the separation of circulating tumor cells.

**Keywords:** magnetic iron oxide nanoparticles, surface modification, circulating tumor cells, separation

作者单位:南昌大学食品科学与技术国家重点实验室(南昌市330047)

\*本文课题受国家自然科学基金资助项目(编号:81201691、31271863),高等学校博士学科点专项科研基金项目(编号:20123601120005)和江西省教育厅科学技术研究项目(编号:GJJ13093)资助

通信作者:许恒毅 kidyxu@163.com

随着纳米科学与技术的发展,纳米粒子在不同研究领域已被广泛应用。MIONs 因具有高矫顽力、高磁敏性、非免疫原性、低毒性、较好的生物相容性等优势,受到越来越多研究者的青睐<sup>[1-2]</sup>。由于 MIONs 在药物转运<sup>[3]</sup>、磁成像<sup>[4-5]</sup>、组织修复<sup>[6]</sup>、糖尿病治疗<sup>[7]</sup>、癌症治疗<sup>[8-9]</sup>及 CTCs 分离检测<sup>[10-13]</sup>等生物学领域具有潜在应用前景,引起了各相关领域研究者的关注。一般方法合成的 MIONs 水溶性和生物相容性较差、易团聚且在血液循环中存在时间较短,往往无法直接满足生物医学应用的要求<sup>[14]</sup>。因此, MIONs 表面常需进行修饰和改性,以获得更好的性能并引入合适的反应功能基团(如羧基、羟基等)。在此基础上,引入多种生物相关分子(抗体、靶向剂、药物分子及荧光素等),实现 MIONs 的功能化。本文对 MIONs 的表面修饰及其在 CTCs 分离中的应用进行综述。

## 1 MIONs 的表面修饰

MIONs 粒径一般在 1~100 nm,绝大部分原子位于粒子的表面。疏水表面及比表面积较大因而具有特殊的表面性质:1) NPs (nanoparticles) 处于高能状态,且表面吉布斯自由能较大,可自发地团聚、氧化或表面吸附,以降低能量;2) NPs 表面存在许多活性中心,具有较高的化学活性;3) NPs 表面台阶和粗糙度增加,表面出现非化学平衡、非整数配位的化学价。通常可对 MIONs 进行表面修饰及改性,达到生物医学应用的要求。

### 1.1 MIONs 表面修饰的方法

MIONs 的表面修饰方法主要有原位反应法(制备中修饰)和合成后表面改性法(制备后修饰)<sup>[15-16]</sup>。原位反应法是指在纳米粒子制备过程中直接加入表面修饰剂共同反应,而合成后表面改性法是先制备出纳米粒子,然后将其分散于表面修饰剂中进行包覆反应。

### 1.2 MIONs 表面修饰剂的种类及作用

用于 MIONs 表面修饰的材料有很多,主要包括聚合物、非聚合物和无机分子<sup>[15-16]</sup>。使用聚合物修饰可以提高 MIONs 生物相容性和胶体稳定性,并引入反应基团,常见的聚合物有聚乙二醇和聚乙烯醇等。使用非聚合物修饰 MIONs 可提高胶体分散性,常见为有机小分子和表面活性剂分子等。使用无机分子修饰可提高 MIONs 在液体中的稳定性和抗氧化能力,且有利于生物配体的偶联,常见的无机修饰分子有二氧化硅、金、金属氧化物和硫化物等。

## 2 MIONs 在 CTCs 分离中的应用

CTCs 是一类主要存在于癌症患者外周血循环中的

肿瘤源性上皮细胞,可能与肿瘤的转移和复发有关<sup>[17]</sup>。外周血中 CTCs 的出现往往早于临床上可见实体瘤<sup>[18]</sup>。因此 CTCs 的精准诊断对于肿瘤的早期发现、肿瘤患者化疗药物的快速评估、个体化治疗(临床筛药、耐药性的检测)、肿瘤复发的监测以及肿瘤新药物的开发等具有重要的指导意义,同时可为癌症的有效防治提供理论参考。但是,早期肿瘤患者外周血中 CTCs 的数量十分稀少,在人体正常血液中,每数亿个(4.0~5.5)×10<sup>9</sup>/mL 红细胞中仅含(0~50)个 CTCs,加上血液的性质特殊(如粘稠、组分复杂等),导致 CTCs 完全“隐蔽”在外周血的复杂背景中,常规的手段还无法对其进行直接检测<sup>[19-20]</sup>。目前 CTCs 的分离方法主要是基于细胞形态或细胞表面抗原/受体分子,已商业化的免疫磁分离法应用最为广泛。

### 2.1 CellSearch™ 系统

CellSearch™ 系统由美国 Veridex 公司研发,是目前唯一通过美国 FDA 认证的半自动 CTCs 检测系统。该系统采用的免疫磁珠是含单个纳米铁磁核,且包被了抗上皮细胞黏附因子(EpCAM)特异性抗体的纳米磁颗粒,可特异性结合血液中所有表达 EpCAM 的 CTCs,并在外加强力磁场下将 CTCs 从血液样本中分离出来。临床应用 CellSearch™ 系统时,只需采集 7.5 mL 的血液样本。Riethdorf 等<sup>[21]</sup>利用 CellSearch™ 检测系统对 92 个转移性乳腺癌患者外周血样本(7.5 mL)中的 CTCs 进行分离检测,结果发现 63 个样本中至少含有 1 个 CTCs,而另外的 29 个样本中未检测到 CTCs。在含 CTCs 的 63 个样本中,34 个样本 CTCs 的数量在 5 个以上(CTCs cut-off 值 ≥5 CTCs 时与预后相关),13 个样本 CTCs 数量在 50 个以上(最多为 1 491 CTCs)。

### 2.2 激活细胞分选系统

激活细胞分选系统(magnetic activated cell sorting system, MACS®)是由德国 Miltenyi 公司研发的利用 MACS 微珠捕获细胞的专用产品,该产品因操作简便、快速(2.5~30 min)、高纯度(90%~99%)、高回收率等优点已被广泛应用于 CTCs 的分离。MACS 微珠由氧化铁组成且表面修饰了多聚糖。Königsberg 等<sup>[22]</sup>使用 MACS® 正向选择性分离转移性乳腺癌患者外周血中 EpCAM 阳性 CTCs,证明 EpCAM 阳性细胞(MCF-7 及 ZR-75-1)的回收率明显高于 EpCAM 阴性细胞(Hs587T)。26 个临床确诊为转移性乳腺癌患者外周血样本中,发现含 CTCs 的概率为 42.3%。同时该研究将 MACS® 与另外一种不依赖于 EpCAM 密度离心分离法 OncoQuick® plus 进行对比分析,结果发现在分离 EpCAM 阳性细胞时前者的回收率明显高于

后者,相反在分离EpCAM阴性细胞时后者的回收率高于前者。

### 2.3 AdnaTest™系统

AdnaTest™是由德国AdnaGen AG公司开发用来分离和检测血液中CTCs的系统。AdnaTest™系统使用磁性微球来分离患者外周血样本中表达有相关抗原的CTCs,基于RT-PCR技术检测表达有相关特异性基因的肿瘤细胞。该磁性微球表面修饰了抗上皮抗原的抗体(抗EpCAM抗体)和抗肿瘤相关抗原的抗体(抗MUC1抗体)。相对CellSearch™系统(需7.5 mL血液样本),临床应用AdnaTest™系统时,只需采集5 mL血液样本。Andreopoulou等<sup>[23]</sup>同时使用AdnaTest™与美国Veridex公司研发的CellSearch™对55个转移性乳腺癌患者的外周血样本进行检测,结果发现CellSearch™的CTCs阳性率为47%(CTCs cutoff值 $\geq 2$  CTCs)和36%(CTCs cutoff值 $\geq 5$  CTCs);而AdnaTest™的CTCs阳性率为53%。上述两种检测系统的阳性一致率为73%(CTCs cutoff值 $\geq 2$  CTCs)和69%(CTCs cutoff值 $\geq 5$  CTCs)。

### 2.4 Dynal Magnetic Beads®材料

Dynal Magnetic Beads®是由美国Invitrogen公司生产,用于细胞分离的免疫磁分离类产品,已取得美国环保局和美国分析化学家协会(AOAC)的认证。Dynal Magnetic Beads®由 $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>和Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性材料合成,是一种超顺磁、单分散性多聚微球,其表面修饰有一层用于吸附和结合生物活性分子的多聚材料。Dynal Magnetic Beads®用于细胞分离主要有以下优点:1)全部过程可在试管内完成,不需要磁柱及离心操作;2)可根据实验需要选择不同的分离方法;3)获取的目标物质纯度及产量较高;4)对后续分析无抑制作用而不需洗脱。Talasaz等<sup>[24]</sup>将1 000 CEpCs(circulating epithelial cells)加标于9 mL PBS溶液中,通过Dynal Magnetic Beads®选择性捕获1 h后使用分离器分离,CEpCs的分离效率达50%。该研究对52个外周血样本(9 mL)又进行分离,发现在健康者的样本中并未分离到CEpCs,而47个转移性乳腺癌患者外周血样本均检测到CEpCs,其数量为(12 $\pm$ 23)个。

### 2.5 EasySep®技术

EasySep®是由加拿大StemCell公司开发的一种新型而高效的免疫磁珠细胞分选技术。EasySep®的理论基础为靶细胞表面特异性的抗原抗体反应,其实现靶细胞高纯度分离则基于StemCell公司四聚体复合物(TAC)技术。需要富集的靶细胞通过TAC与磁微粒相结合后在EasySep®专用磁极提供的磁场中即可与非靶细胞相分离。EasySep®所用的磁微粒极

小,不会影响靶细胞的后续分析,因此不需要去除,具有简单快捷(25 min)、获得细胞纯度高(达99%)、回收率高、对细胞无影响等优点。Fusi等<sup>[25]</sup>应用EasySep®分离了68个肿瘤患者外周血样本(10 mL)中的CTCs,结果显示72%(49/68)的样本至少分离到1个CTCs。

### 2.6 基于磁性纳米粒子的其他分离方法

随着新型纳米材料和表面修饰材料的不断出现,越来越多基于纳米粒子的磁分离方法被建立并用于CTCs的分离。如Xu等<sup>[11]</sup>利用热分解法在有机溶剂十八烯中,以氧化铁粉为前体、油酸为配体,成功制备了表面修饰有双亲聚合物的MIONs。该MIONs直径为30 nm,具有良好的生物相容性且可利用其表面的羧基来偶联癌细胞相关抗体。该研究将MIONs表面的羧基与抗HER-2抗体上的氨基偶联并用于外周血中癌细胞的分离,可以分离出平均73.6%的SK-BR-3细胞(最大为84%)。

## 3 结语与展望

20世纪70年代以来,MIONs已受到国内外学者的普遍关注,有关其制备、表面修饰或改性及应用的研究论文层出不穷。MIONs作为一种磁性强、制备相对简单、且生物相容性较好的磁性纳米材料,已被广泛应用于各种生物医学领域。在CTCs的分离和肿瘤的治疗方面,MIONs起着至关重要的作用,具有极大的发展空间和应用前景。为此,除了MIONs自身合成需不断改进外,MIONs的表面修饰或改性的完善也是未来研究的重点。相信随着高分子材料学、磁学、医学、生物工程学的进一步发展,MIONs相关的基础研究和应用研究必将也加速发展,从而为临床上CTCs的分离检测和肿瘤的早期诊断及治疗提供新的契机。

### 参考文献

- 1 Wu W, He Q, Jiang C. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2008, 3(11):397-415.
- 2 Tong L, Zhao M, Zhu S, et al. Synthesis and application of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in targeted therapy and imaging of cancer[J]. *Front Med*, 2011, 5(4):379-387.
- 3 Chertok B, Moffat BA, David AE, et al. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(4):487-496.
- 4 Jain TK, Richey J, Strand M, et al. Magnetic nanoparticles with dual functional properties: drug delivery and magnetic resonance imaging[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(29):4012-4021.
- 5 Hu LJ, Guan WX. Advance in ultra small super paramagnetic iron oxide particles in target MRI contrast agents[J]. *Chin J Clin Oncol*, 2013, 40(7):423-426.[胡立江,管文贤.超小超顺磁性氧化铁粒子的靶向磁共振显影剂研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40(7):423-426.]



- 6 Raju HB, Goldberg JL. Nanotechnology for ocular therapeutics and tissue repair[J]. *Expert Rev Ophthalmol*, 2008, 3(4):431-436.
- 7 Chen B, Wu W, Wang X. Magnetic iron oxide nanoparticles for tumor-targeted therapy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011, 11(2):184-189.
- 8 Xu Y, Karmakar A, Heberlein WE, et al. Multifunctional magnetic nanoparticles for synergistic enhancement of cancer treatment by combinatorial radio frequency thermolysis and drug delivery[J]. *Adv Healthc Mater*, 2012, 1(4):493-501.
- 9 Sadhukha T, Wiedmann TS, Panyam J. Inhalable magnetic nanoparticles for targeted hyperthermia in lung cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(21):5163-5171.
- 10 Galanzha EI, Shashkov EV, Kelly T, et al. In vivo magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells[J]. *Nat Nanotechnol*, 2009, 4(12):855-860.
- 11 Xu H, Aguilar ZP, Yang L, et al. Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(36):9758-9765.
- 12 Hossain M, Luo Y, Sun Z, et al. X-ray enabled detection and eradication of circulating tumor cells with nanoparticles[J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 38(1):348-354.
- 13 Chen P, Li L. Advances in detection of circulating tumor Cells in non small cell lung cancer[J]. *Chin J Clin Oncol*, 2013, 40(14):862-865. [陈鹏,李雷.非小细胞肺癌循环肿瘤细胞检测进展[J].中国肿瘤临床,2013,40(14):862-865.]
- 14 Gupta AK, Curtis AS. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2004, 15(4):493-496.
- 15 Mahmoudi M, Simchi A, Imani M. Recent advances in surface engineering of superpara- magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications[J]. *J Iran Chem Soc*, 2010, 7(Suppl):S1-S27.
- 16 Mahmoudi M, Sant S, Wang B, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(1-2):24-46.
- 17 Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, et al. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers[J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(3):130-139.
- 18 Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, et al. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(12):4080-4085.
- 19 Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology[J]. *Nature*, 2007, 450(7173):1235-1239.
- 20 Hosokawa M, Hayata T, Fukuda Y, et al. Size-selective microcavity array for rapid and efficient detection of circulating tumor cells [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(15):6629-6635.
- 21 Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(3):920-928.
- 22 Königsberg R, Obermayr E, Bises G, et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients[J]. *Acta Oncol*, 2011, 50(5):700-710.
- 23 Andreopoulou E, Yang LY, Rangel KM, et al. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest Breast Cancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ system[J]. *Int. J Cancer*, 2012, 130(7):1590-1597.
- 24 Talasaz AH, Powell AA, Huber DE, et al. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(10):3970-3975.
- 25 Fusi A, Liu Z, Kümmerlen V, et al. Expression of chemokine receptors on circulating tumor cells in patients with solid tumors[J]. *J Transl Med*, 2012, 10:52.

(2013-07-15 收稿)

(2013-11-07 修回)

(本文编辑:张侃)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 参考文献的科学性审查

参考文献在科技期刊中具有标志功能、查验功能、检索功能、评价功能、保护功能。

按参考文献著录规定,凡是引用前人或他人的观点、数据和材料等,都要在文中对它们的出处予以标明,并在文末列出参考文献表。采用顺序编码制,按照引文先后顺序,用阿拉伯数字连续编号。在正文引出处加方括号标注在句尾右上角,或标注在引文作者的右上角。参考文献仅限作者亲自阅读过的主要文献,本期刊要求近3年的文献占50%以上。为提高参考文献著录质量,除了严格遵守参考文献著录规定外,还要避免“结论错误”文献的引用,这就要求作者加强对参考文献的科学性审查,作者须仔细核对所引参考文献以保证各项内容准确无误,真正起到参考文献的功能。