

磁性纳米材料在循环肿瘤细胞检测中的研究进展

程世博 谢 敏*

(生物医学分析化学教育部重点实验室, 武汉 430072; 武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072)

摘要: 近年来, 磁性纳米材料由于其独特的物理和化学性质在生物医学领域得到广泛的应用。本文介绍磁性纳米材料在细胞分离中的应用情况, 重点介绍其在循环肿瘤细胞分离检测中的研究进展。

关键词: 磁性纳米材料; 循环肿瘤细胞; 分离; 检测

中图分类号: G64; O65; R73

Progress in Detection of Circulating Tumor Cells by Magnetic Nanomaterials

CHENG Shi-Bo XIE Min*

(Key Laboratory of Analytical Chemistry for Biology and Medicine (Ministry of Education), Wuhan 430072, P. R. China;
College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, P. R. China)

Abstract: Recently, magnetic nanomaterials are widely applied in biomedical area owing to their unique physical and chemical properties. Herein, we introduce the progress of application of magnetic nanomaterials in cell separation, especially, in detection of circulating tumor cells from human whole blood.

Key Words: Magnetic nanomaterials; Circulating tumor cells; Separation; Detection

目前, 癌症是仅次于心血管疾病的人类第二大杀手, 癌症死亡率的90%与肿瘤转移相关。肿瘤转移过程中, 癌细胞从原发肿瘤脱落, 进入血液或淋巴循环系统, 成为循环肿瘤细胞(CTCs), 其中一些具有高度转移潜能的肿瘤细胞在循环系统中存活下来, 并进一步发展为远端器官转移肿瘤。CTCs作为原发灶和转移灶之间的链接以及肿瘤生物学和转移的窗口, 不仅是研究肿瘤转移复发过程和机制的一个重要切入点, 而且可作为具有肿瘤(包括转移灶)代表性的“液体活检”(liquid biopsy)样品, 是指导个体化肿瘤诊疗的绝佳标本^[1,2]。研究证明, CTCs的检测对于肿瘤患者早期诊断、术后复发与转移监测、抗肿瘤药物敏感性评估以及选择个体化的治疗策略具有非常重要的意义^[3–6]。

CTCs的分离主要是针对细胞的密度、尺寸、表面分子等生物物理特性进行, 包括密度梯度离心法^[7]、基于尺寸的过滤法^[8–11]以及基于表面特异性分子的免疫分离法等^[12–17]。2004年, 美国食品和药品管理局(FDA)批准了利用纳米免疫磁珠实现CTCs富集的CellSearch检测平台^[18–20]。该系统对CTCs的检测具有良好的再现性, 已在临床应用。随着纳米科技的发展, 以纳米颗粒^[21–26]、纳米线或纳米纤维^[27–32]、纳米材料和结构^[33–39]为基础的CTCs捕获平台, 可有效增大细胞与捕获靶点的接触几率, 减少纳米颗粒吸附对细胞活力和分析检测的影响, 从而提高细胞的捕获效率和检测准确性, 有助于实现

*通讯作者, Email: mxie@whu.edu.cn

基金资助: 国家自然科学基金(81071227, 21575110)

CTC 富集检测的一体化。王树涛研究员^[27,30,38,40-43]的一系列研究工作表明, 纳米结构与细胞表面结构存在三维拓扑相互作用, 对细胞捕获及分离具有增强效应, 为探索制备高效的 CTCs 分离器件提供了新思路。

微流控技术可以实现对流体精确操纵, 适合用于 CTCs 的分离和捕获^[44-48]。2007 年, Toner 教授课题组^[49]制备出用于 CTCs 分离的微流控芯片“CTC-chip”, 成功用于癌症患者外周血中 CTCs 的特异性检测。此后, 该课题组又研制了含有 PDMS(聚二甲基硅氧烷)鱼骨结构的第二代芯片^[50], 以及用于分离循环肿瘤细胞簇的“Cluster-Chip”^[51], 进一步提高了 CTCs 的分离效果, 推动了微流控芯片技术在 CTCs 分离中的应用。通过优化微流控芯片结构设计, 改变芯片中细胞的运动模式, 提高细胞与基底的接触频率, 结合纳米材料与细胞的三维拓扑相互作用, 制备 NanoVelcro 芯片^[29-32,52,53], 可实现少量血液样品中 CTCs 的快速、高效捕获。

以微流控芯片和纳米技术为基础的 CTCs 检测技术有望满足临床诊断中样品量少、检测通量高、实时快速的检测需求, 在生物医学研究领域具有广阔的应用前景。但是, 基于免疫磁分离的 CellSearch 系统仍然是 FDA 批准的唯一指定 CTCs 检测平台, 可见磁性纳米材料在 CTCs 分离检测中具有重要地位。本文简要介绍磁性纳米材料制备和表面修饰的方法, 重点讨论磁性纳米材料在 CTCs 检测中的应用进展, 探讨磁性纳米材料在 CTCs 检测中的发展方向。

1 磁性纳米材料的制备和表面修饰

1.1 磁性纳米材料的制备

磁性纳米材料是一类能够被外加磁场操控的纳米材料的统称, 通常由具有铁磁性的铁、钴、镍及其相应的化合物组成, 其中, 以铁或铁化合物组成的磁性纳米材料应用较多。磁性纳米粒子应用广泛, 研究较早, 制备方法也较为多样, 除常见的物理和化学方法外, 还可使用生物法从生物体内提取磁性纳米材料。物理法是指借助物理手段, 获得磁性纳米材料的方法, 主要包括高能球磨法、溅射法、蒸发冷凝法等。物理方法制备磁性纳米材料对仪器设备要求较高, 但可进行批量制备。生物法可依托众多生物体内自身存在的磁性纳米材料, 借助分离手段, 提取生物相容性好的磁性纳米材料, 但是此法受产率和产量的限制, 难以做到大规模生产。相比物理法和生物法, 化学合成在磁性纳米材料的合成、组装、表面修饰和功能集成等方面展现出较大的优势, 可制备出不同性能的磁性纳米材料。

磁性纳米粒子的化学制备方法种类繁多, 包括沉淀法、化学气相沉积、微乳液、油相高温分解等。其中油相高温分解法, 利用有机溶剂的高沸点性, 使前体在高温下分解并结晶成核、生长, 通过控制原料浓度、反应时间以及投入的晶核大小可以方便控制粒子粒径、形状、晶型, 得到单分散、粒径小且均一、饱和磁化强度高的超顺磁性纳米颗粒。磁性纳米材料的超顺磁性是指, 没有外加磁场的情况下, 磁性纳米颗粒不会表现出磁性, 若施加外加磁场, 则会被磁化, 就像顺磁性一样, 而且磁化率远远大于顺磁体的磁化率。因此, 合成和使用超顺磁性纳米材料一直是当前的研究热点。磁性纳米材料的粒径必须小到一定尺寸才能具备超顺磁性, 但是粒径越小, 比表面积越大, 表面能越高, 纳米材料越不稳定。因此, 有效利用超顺磁性纳米颗粒, 需对其进行表面修饰或包覆处理, 提高其稳定性的同时, 还可与其他纳米材料进行功能集成, 制备多功能磁性纳米材料。

1.2 磁性纳米材料的表面修饰

超顺磁性纳米材料可以经 SiO₂ 等无机材料包覆, 得到具有良好化学惰性、胶体稳定性和生物相容性的磁性纳米颗粒; 此外, 通过表面聚合或表面吸附等方式在超顺磁性纳米材料表面修饰具有不同结构或功能的高分子材料, 可以得到诸如温敏磁性纳米颗粒等具有特殊性能的磁性纳米材料。随着纳米技术的发展, 将超顺磁性纳米材料与其他功能性纳米材料进行复合或组装, 在解决磁性纳米颗粒稳定性的同时, 可制备新型的功能性磁性纳米材料。Nie 等^[54]将磁性纳米材料和量子点包埋进 SiO₂ 微球的

内部, 制备了荧光磁性纳米材料。武汉大学庞代文教授课题组^[55]采用层层自组装的方式将量子点和磁性纳米材料组装于纳米载体表面, 通过控制量子点和磁性纳米材料的组装种类或层数制备具有不同荧光性能和不同磁响应性能的可寻址荧光-磁性双编码纳米材料, 满足高通量分析应用的需要。此外, 将磁性纳米材料与金或石墨烯等材料复合, 制备多种复合型磁性纳米材料, 可以满足生物医学分析检测的应用。

经无机材料或高分子包覆的磁性纳米材料以及与功能材料复合的多功能磁性纳米材料表面富含 $-COOH$ 或 $-NH_2$ 等功能基团和大量的表面电荷, 易与各种生物分子偶联, 实现生物功能化。偶联功能性生物分子可采用直接法和间接法两种方式。直接法即将生物分子通过共价键直接偶联于磁性纳米材料表面, 制备具有生物靶向的磁性纳米材料; 间接法通常是利用链霉亲和素和生物素之间的相互作用, 将链霉亲和素修饰的磁性纳米材料与生物素化的生物分子进行连接, 从而制备生物分子衍生化的磁性纳米材料。由于1个链霉亲和素分子可以和4个生物素分子偶联, 因此通过间接方式制备的生物功能性磁性纳米材料往往较直接偶联法表面偶联更多的生物分子, 可提高生物分子在磁性纳米材料表面的固载效率, 便于进行后续应用。

2 磁性纳米材料在细胞分离中的应用

磁性纳米材料由于其磁性的特点, 使其在生物医学的众多领域都有着广泛的应用, 其中在磁共振成像^[56-58]、磁热治疗^[59]、磁生物分离^[60]、靶向载药^[61]和模拟酶催化^[62]应用等方面的研究较为广泛和充分。细胞分离是磁性纳米粒子在磁生物分离领域应用最早的实例。20世纪70年代后期, Molday等^[63]首创将磁性载体技术用于细胞分离。他们先用荧光染料标记磁性复合微球, 进一步在其表面偶联抗体或外源凝集素, 用于血红细胞和B淋巴细胞的磁场分离。与传统的细胞分离技术相比(如流式细胞分离技术, FACS), 磁免疫细胞分离技术不需要复杂的装置, 在外加磁场或普通磁铁作用下即可实现靶细胞的分离, 分离过程简单, 易于操作。近年来, 随着磁性纳米材料的制备及表面修饰技术的发展, 磁性纳米材料在磁免疫细胞分离领域的应用取得了长足的进步。目前, 磁性纳米材料已经可以用于血样中CTCs的分离和检测。下文将结合磁性纳米材料的性能介绍磁性纳米材料在CTCs分离和检测中的应用进展。

2.1 磁性纳米材料用于CTCs的分选

磁性纳米材料用于细胞分选源于20世纪70年代, 经过几十年的发展, 美国FDA于2004年批准基于免疫磁分离的CellSearch系统用于转移性乳腺癌的预后评估、无进展生存期和总生存期的预测, 并分别于2007年和2008年批准其用于转移性结直肠癌及前列腺癌的辅助性诊疗。CellSearch系统利用修饰了包被抗上皮细胞黏附因子(EpCAM)抗体的磁性纳米颗粒, 通过抗原抗体反应识别血液中所有表达EpCAM的细胞, 利用磁场的磁力将结合了纳米颗粒的细胞与血样中其他细胞分离, 进一步通过荧光染料标记的一抗(抗CD45抗体、抗细胞角蛋白(CK)8, 18/19抗体)结合细胞核DAPI荧光染色试剂共同鉴别CTCs。经免疫磁分离及荧光染色后, 细胞尺寸大于 $5\mu m$, 且DAPI+/CK+/CD45-则被鉴定为CTCs, 而白细胞则是DAPI+/CK-/CD45+。虽然, 基于免疫磁分离的CTCs分离(CellSearch)系统已经成功商品化并用于临床测试, 但是该系统每次分析需要7.5 mL血样, 且CTCs分离效率较低, 因此发展新型的磁性纳米材料用于快速、高效地分离CTCs成为当前的研究热点。

众所周知, 细胞表面存在着几十到几百纳米的表面结构, 如丝状伪足、片状伪足、微绒毛等。2009年, Desai教授小组^[64]的研究表明, 细胞与纳米结构微球表面的作用力远高于细胞与平滑微球表面的作用力, 显示了细胞表面结构与纳米材料之间密切的相互作用。因此制备具有纳米结构的磁性材料, 利用其表面的拓扑特征增强材料与细胞间的三维拓扑相互作用, 可提高细胞分离效率。基于此, Huang等^[65]制备了具有巨噬细胞形貌的磁性纳米材料。他们将巨噬细胞与磁性纳米颗粒孵育, 利用巨

噬细胞的吞噬性能将纳米颗粒胞吞于细胞内部。随后,以胞吞了磁性纳米粒子的巨噬细胞为模板,在细胞表面进行硅化处理并高温煅烧,制备了具有细胞形貌的仿生磁性材料。在仿生磁性材料表面修饰抗体后,可获得具有拓扑结构、磁响应性、细胞靶向的多功能生物捕获探针用于癌细胞的识别和捕获。

为了提高CTCs的分离效率,除了构建具有拓扑结构的磁性材料用于增强与细胞的相互作用外,提高磁性纳米材料的磁响应性,避免由于磁球磁响应较慢造成细胞分离过程的损失是当前磁性纳米材料研究的另一个重要课题。Wen等^[66]以纳米级聚苯乙烯/丙烯酰胺共聚球为载体,通过层层自组装的方式在纳米球表面组装多层磁性纳米 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$,通过控制纳米 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 的组装层数调节磁性纳米材料的磁响应性。结果显示,在纳米微球表面组装5层 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 后,磁性纳米材料的粒径为380 nm,饱和磁化强度为 $34.9 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$,可在1 min内被磁力架全部分离,说明其具有粒径小、饱和磁化强度高和磁响应速度快的特点。上述磁性材料进一步通过硅烷化修饰用以增强材料稳定性,并修饰anti-EpCAM抗体后,可构建快速响应并能保持长时间稳定的磁性纳米探针,用于CTCs的快速分离和检测。CTCs分选实验表明,该探针与血液样品孵育5 min即可实现靶细胞94%以上的捕获效率,且分离后的细胞约90%保持良好活力。该磁性材料优异的磁学性能、化学稳定性和细胞分离特性,使其有望进行商品化生产,进入临床应用。

除了受磁性纳米材料本身的影响,纳米材料表面修饰的生物靶分子也会影响磁性纳米探针的性能。目前,磁性纳米材料表面一般修饰抗EpCAM的抗体用于CTCs的特异性识别,除此之外,功能性多肽修饰^[67]的磁性纳米材料亦可用于血液中少量癌细胞的检测。近期,Fierer等^[68]发现SpyLigase可催化蛋白连接,实现不可逆的蛋白质-蛋白质相互作用,从而将具有识别功能的抗体或类抗体(affibody,具有细胞识别功能的类似抗体的蛋白)进行聚合形成蛋白多聚物。磁球与细胞的接触面有限,因此在磁球表面连接尽可能多的抗体用于细胞识别,则可以大大提高细胞捕获效率。将上述经SpyLigase处理后形成的多聚类抗体与磁球偶联,可有效提高磁球表面生物靶分子的固定量,实现对细胞表面抗原表达量少的靶细胞的高效识别和捕获。因此,从新型磁性纳米材料制备及有效固定生物分子两个角度出发,探讨性能优异的磁性纳米生物探针的制备方法可以为CTCs分选研究提供新的契机。

2.2 磁性纳米复合材料用于CTCs的分选

磁性纳米材料可以与其他功能性纳米材料复合制备复合型磁性纳米材料,用于CTCs的分选研究。近期,我们课题组^[69]利用超声自组装的方法将量子点和磁性纳米颗粒包埋进两亲性羧甲基壳聚糖的内部,制备了超顺磁性的荧光-磁性纳米材料。该法具有制备简单的优势,所得产物荧光强度高、磁响应速度快、生物相容性好,在其表面偶联表皮生长因子(EGF)后,成功用于血液中表达表皮生长因子受体的少量癌细胞的特异性识别、捕获及荧光成像。Shi等^[70]在磁性纳米颗粒表面通过共价偶联碳纳米点制备了具有双光子荧光及磁学性能的碳纳米点-磁性纳米复合材料。该材料表面偶联抗Glypican-3(肝癌特异性表达抗原)的抗体后,可以特异性识别和检测掺杂于15 mL血样中的10个癌细胞,捕获效率达91%。由于该探针具有磁可操控性的同时,具有双光子荧光性能,因此,从血样中分离的少量癌细胞可以直接进行双光子荧光成像,实现了分离和检测同步进行,为CTCs的快速高灵敏分析奠定基础。Wu等^[71]通过高温热分解方法制备核/壳型 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 磁性纳米颗粒,粒径为 $(6.2 \pm 0.8) \text{ nm}$,具有磁响应性的同时由于金壳层的包覆还可进行暗场反射成像。该材料粒径较小,在其表面偶联不同的抗体后可以用于细胞表面及细胞内抗原的特异性标记。实验表明, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 纳米颗粒分别标记抗EpCAM抗体、抗HER2抗体、抗EGFR抗体及抗CK抗体后可制备多种纳米生物探针,用于结肠癌、乳腺癌及皮肤癌细胞的特异性识别和暗场反射成像。肿瘤细胞具有异质性,联合使用不同抗体修饰的两种 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 纳米探针相比于使用一种纳米生物探针,可以大大提高癌细胞的捕获效率,如:抗HER2抗体修饰的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 纳米探针对SK-BR-3细胞的捕获效率是 $(69 \pm 7)\%$,而联合使用抗HER2抗体修饰的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 及抗EpCAM抗体修饰的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 后对SK-BR-3细胞的捕获效率为

(93 ± 10)%, 说明使用多种抗体针对细胞表面多种肿瘤标志物可以提高细胞的捕获效率。

此外, Wang等^[72]制备了具有上转换荧光性能的磁性纳米材料, 在其表面偶联抗EpCAM的抗体后用于血液中少量癌细胞的分离。由于该材料具有上转换荧光性能, 可以摒除传统荧光成像中系统自发荧光的影响, 因此经磁分离的细胞可以直接进行上转换荧光成像, 实现癌症病人样品中CTCs的捕获和上转换荧光分析。Yang等^[73]制备了磁性氧化石墨烯, 可用于磁分离和电化学检测, 在其表面偶联抗PSMA抗体后, 实现血液中PSMA蛋白及PSMA阳性表达的PCa前列腺癌细胞的分离和电化学检测。该工作利用磁性氧化石墨烯实现了肿瘤标志物和肿瘤细胞的分离和检测。以上研究表明, 发展新型的磁功能性纳米材料, 利用磁分离的同时, 发挥材料的光学或电学性能, 可以实现CTCs的高灵敏检测。

2.3 磁性纳米材料与物理分离结合用于CTCs的分选

癌细胞与血液中白细胞、红细胞或血小板等血液成分, 在尺寸、密度、变形性及黏附性等物理特性方面均存在明显的差异, 因此, 研究者可以利用上述差异将血液中CTCs与其他血液成分进行分离, 如: 基于密度的离心分离法^[7]以及基于尺寸大小的尺寸排阻分离法^[8,9]等。上述基于CTCs物理性质的分离方法操作简单, 对细胞损伤小且利于后续检测。但是由于CTCs尺寸与部分血细胞尺寸有交叉, 如果物理参数选择不当会使CTCs产率偏低或者与白细胞共存, 特异性较差。将基于物理性质的分离方式与免疫磁分离相结合, 同时发挥物理分离与免疫分离两种分离方式的优势, 可提高CTCs的分离效率和纯度。

Chung等^[74]将抗EpCAM抗体修饰的3.28 μm磁性微球与掺杂了少量MCF-7细胞的血液样品孵育。随后将血样注入固定有半环形磁铁的特制注射式过滤器, 采用免疫磁分离除去大量的血细胞, 分离纯化出MCF-7细胞。随后, 再经过直径13 mm、孔径为5 μm的滤膜过滤, 进一步去除MCF-7细胞里存在的少量其他血细胞, 从而达到分离纯化血液中少量癌细胞的目的。实验结果显示, 该方法可以对0.5 mL血液中掺杂的10个MCF-7细胞达到70%的分离纯化效率。Zhang等^[75]使用了与Chung等类似的分离方式, 所不同的是他们将3 μm的磁性微球与含有癌细胞的血液孵育后, 采取了先尺寸分离再免疫磁分离的方式。血液样品与磁球孵育后, 首先经过直径3.5 mm、孔径8 μm的滤膜过滤, 之后再经过免疫磁分离, 得到磁球标记的癌细胞。实验表明, 磁球与癌细胞结合后可以有效避免过滤时细胞的变形性; 同时磁球增大细胞的尺寸, 进而可以选择较大孔径的滤膜, 从而去除绝大多数白细胞, 降低白细胞在滤膜上的残留; 最后, 滤膜上的细胞还可经进一步磁分离, 去除尺寸分离时残留的少量白细胞, 大大提高了癌细胞的分离纯度。该法对每毫升血液掺杂有50–200个癌细胞的分离效率达90%以上, 对掺杂5–10个癌细胞的分离效率可达80%。值得一提的是, 由于该法使用了尺寸分离和免疫磁分离两种分离模式, 大大提高了癌细胞的分离纯度, 回收的癌细胞纯度达98%以上。上述研究表明, 将免疫磁分离技术与基于物理特性的分离方法相结合, 可以对CTCs的分离效率和分离纯度有明显的提升, 为CTCs相关研究奠定了基础。

2.4 磁性纳米材料与微流控芯片结合用于CTCs的分选

微流控芯片是利用微机械、微电子技术制备的含有小尺度(从微米到纳米)通道、腔、阀、泵等微结构的流体器件。微流控芯片通过不同结构设计, 调节芯片的流体特性, 结合生物工程及纳米技术, 在CTCs检测方面展现出良好的应用前景。一系列研究表明, 微流控芯片用于CTCs分析时, 所需样品量小, 无须对血液样品进行前处理, 且流动的流体环境可有效除去血液中的其他细胞, 对CTCs的分离纯度较高, 可用于血液中CTCs的高通量、快速检测。但是, 基于微流控芯片装置捕获的CTCs往往固定于芯片内, 很难进行回收利用; 因此, 将微流控芯片与磁性纳米材料相结合, 利用微流控芯片的流体性能以及磁性纳米材料的可操控性, 构建微流控磁免疫分离平台, 获得活力好、纯度高的CTCs, 方便进行后续分析和检测。

基于微流控芯片的磁免疫分离体系一般以芯片为载体, 将表面连接抗体的磁性纳米颗粒与含靶细

胞的血样混合后通入芯片中,通过芯片集成的磁场及芯片的流体作用实现CTCs的磁分离及洗涤等步骤^[76-80]。基于上述原理, Kim等^[76]构建了基于微流控芯片的CTCs免疫磁分离平台。他们在微流控芯片底部电镀镍铁金属线阵列,在外加磁场诱导下,镍铁导线阵列会产生磁场梯度。当anti-EpCAM修饰的磁性纳米颗粒与含SK-BR-3细胞的血样混合并通入芯片中,被磁球识别的SK-BR-3细胞会在诱导磁场及流体的作用下,发生侧向磁泳。最终,SK-BR-3细胞通过侧向磁泳移动至固定区域,从而实现高效、高纯度的CTCs分离。实验结果显示,在流体流速为每小时5 mL时,该装置对血液中掺杂的少量癌细胞能实现90%的分离效率和97%的分离纯度。值得一提的是,该装置分离的CTCs保持了较好的活力,方便用于基因分析等后续检测。

Toner及其合作者在微流控芯片用于CTCs分离和检测方面做出了大量开创性的工作。他们制备了“CTC-chip”^[49]和鱼骨芯片^[50]等,将其成功用于血液中少量癌细胞的检测。近期,为了得到活力好的CTCs,他们将微流控芯片与磁免疫分离相结合,制备了“CTC-iChip”^[81]用于CTCs的捕获。该芯片主要包括两部分:第一部分主要是基于CTCs与血液成分在尺寸及变形性等物理特性上的差异,利用流体的确定性侧向位移(deterministic lateral displacement)作用除去血液中红细胞、血小板及多余磁珠;第二部分,在惯性聚焦(inertial focusing)流体力的作用下结合磁泳技术将磁球标记的CTCs和白细胞分离。该装置可使用正选和负选两种方式分离CTCs,不同之处在于所用磁球表面标记抗体的种类:若采用anti-EpCAM抗体修饰的磁珠,磁珠与CTCs结合,通过该装置可得到磁球标记的CTCs,即为正选;若采用anti-CD45或anti-CD66b抗体标记的磁珠与血液孵育,白细胞被磁球标记后通过惯性聚焦和磁泳除去,从而得到未被标记的CTCs,即为负选。该“CTC-iChip”的负选模式适用于EpCAM表达较弱或不表达的CTCs分离,且对CTCs活性基本无影响,分离后的CTCs可进行培养、增殖及后续基因分析,有望用于基于CTCs的个性化肿瘤诊断和治疗。

Kelley及其合作者^[82]将微流控芯片与磁免疫分离结合用于血液中CTCs的异质性分析。他们设计了具有V型结构域的微流控芯片用于CTCs的捕获,并运用了类似圣诞树的结构在同一芯片的不同区域实现不同流速控制,将结合有不同数目磁球的CTCs固定在不同的V型结构域中,用于癌细胞亚类分析。实验过程中,当含有靶细胞的血样与磁性纳米材料孵育后,通入到含有磁场和V型结构的微流控芯片中,细胞在不同流速下受到流体的牵引力会有不同,流速越大,细胞所受牵引力越大;与此同时,细胞与磁球结合后在磁场作用下会受磁吸引力影响,当细胞所受磁吸引力大于或与流体的牵引力相当时,细胞则被固定在V型区域,细胞表面抗原表达量多则被固定在高流速区域,细胞表面抗原表达量低则被固定在低流速区,实现癌细胞的分类。通过该装置,他们成功实现了EpCAM表达量不同的3种癌细胞,即Vcap(前列腺癌细胞)、SK-BR-3(乳腺癌细胞)、MDA-MB-231(乳腺癌细胞)的分类分析,并将该方法用于癌症病人血样中的CTCs分型检测。近期,该课题组设计了具有双重分离性能的微流控芯片,结合两种修饰不同适配体(anti-EpCAM或anti-HER2)的磁珠,可以同时SK-BR-3及MDA-MB-361两种乳腺癌细胞表面EpCAM及HER2表达量的高低进行定性和定量检测^[83]。以上研究表明,微流控芯片与磁免疫分离相结合,不仅可以用于CTCs的无损分离,还可用于CTCs异质性分析和检验,在未来CTCs的研究中将发挥重要作用。

2.5 可分解磁性纳米材料用于CTCs的捕获和释放

发展有效的技术手段,满足CTCs高效捕获的同时,实现CTCs无损伤释放,获取具有高生物活力的CTCs,是当前的研究热点。目前,基于核酸适配体^[29]、温敏材料^[28,53]的智能化传感界面已成功实现CTCs可逆捕获和释放;此外,光^[9,32]和电信号^[84]诱导下的CTCs释放研究也取得了一定进展。免疫磁分离作为CTCs捕获的重要手段,在捕获CTCs的同时,将CTCs与磁球有效解离,方便CTCs的后续分析和培养,是目前亟待解决的重要问题。

为了实现上述目的, Huang等^[65]以二硫键为桥在磁球表面修饰了链霉亲和素并固定了生物素化的

抗EpCAM抗体，用于识别和捕获MCF-7细胞。该磁球特异性识别MCF-7细胞后，加入二硫苏糖醇(DTT)用于破坏二硫键，切断磁球与抗EpCAM抗体的连接，使得磁球与细胞解离，成功实现了MCF-7细胞的捕获和释放。该类磁性纳米材料与生物靶分子的连接是可逆的，我们称其为可分解磁性纳米材料。

近期，我们课题组在可分解磁性纳米材料的制备及用于CTCs的捕获和释放方面也开展了一系列工作，我们成功制备了化学^[85]、生物^[16]及光敏感^[86]3类可分解磁性纳米探针用于CTCs的捕获和释放。我们利用了钙离子交联形成的海藻酸钠壳层可以被EDTA破坏和瓦解的原理，在荧光磁性纳米材料表面形成了海藻酸钠壳层，并将海藻酸钠-链霉亲和素偶联物组装机于荧光磁性纳米材料表面，用于进一步连接生物素化的抗EpCAM抗体分子。随后，利用EDTA对钙离子的螯合作用，实现对海藻酸钠壳层的破坏，从而达到释放抗体分子的目的，可以用于SK-BR-3细胞的特异性捕获和有效释放。

此外，我们采用化学偶联的方法制备了Steptag多肽衍生化的二抗，通过Steptag与Streptactin工程化蛋白的特异性识别作用将其固定在修饰有Streptactin的磁性纳米材料表面，进一步结合可识别CTCs的一抗之后，用于CTCs的捕获。由于biotin可以竞争性结合Streptactin与Steptag相互作用的位点，加入biotin后，多肽修饰的二抗连同一抗会从磁性材料表面竞争性解离，从而实现CTCs的可逆释放。我们将该方法用于17例癌症病人血液中CTCs的捕获，分别检出2–215个CTCs，并成功得到释放后癌症病人的CTCs。

最近，我们又以光敏分子7-氨基香豆素为桥在磁球表面固定抗EpCAM抗体，用于CTCs的捕获。7-氨基香豆素可在365 nm或800 nm的光照射下释放与之化学键连的分子，用其做桥连接磁球和抗EpCAM抗体可以在光照条件下实现CTCs与磁球的有效分离。我们也成功将该探针用于13例肿瘤患者血液中CTCs的捕获和光控释放。

可分解磁性纳米材料具有磁可操控性以及刺激响应性，修饰上特定的生物分子后，可以用于CTCs的捕获；同时，在特定的信号刺激下，磁球和CTCs有效解离，方便对CTCs的后续分析和培养等生物学应用。但是，目前可分解磁性纳米材料的种类还比较少，应用效果也有待进一步提高。

3 总结与展望

近年来，随着纳米技术的发展，磁性纳米材料的合成和制备工艺取得了巨大进步，具有光学、电学及刺激响应性等功能的复合磁性纳米材料的制备和合成工艺亦有显著提高。上述材料在CTCs捕获、检测、释放等方面都发挥了重要作用。与此同时，将免疫磁分离与微流控平台相结合，同时发挥免疫磁分离的磁操控特性以及微流控芯片的流体操控特性，实现CTCs的无损捕获，获得活力好、纯度高的CTCs，方便对其进行后续分析、培养以及耐药性实验，从而实现肿瘤的个性化诊疗，是当前CTCs的研究热点。因此，制备性能优异的磁性纳米材料，并与微流控平台相结合，发展满足临床需求的CTCs分离方法是当前磁性纳米材料用于CTCs分选的重点，也是未来的发展方向。

参 考 文 献

- [1] Lianidou, E. S.; Markou, A.; Strati, A. *Cancer Metastasis Rev.* **2012**, *31* (3), 663.
- [2] Budd, G. T. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (5), 1307.
- [3] Balic, M.; Williams, A.; Lin, H.; Datar, R.; Cote, R. J. *Annu. Rev. Med.* **2013**, *64*, 31.
- [4] Steeg, P. S. *Nat. Med.* **2006**, *12* (8), 895.
- [5] Alix-Panabières, C.; Pantel, K. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14* (9), 623.
- [6] Ozkumur, E.; Shah, A. M.; Ciciliano, J. C.; Emmink, B. L.; Miyamoto, D. T.; Brachtel, E.; Yu, M.; Chen, P. I.; Morgan, B.; Trautwein, J.; Kimura, A.; Sengupta, S.; Stott, S. L.; Karabacak, N. M.; Barber, T. A.; Walsh, J. R.; Smith, K.; Spuhler, P. S.; Sullivan, J. P.; Lee, R. J.;

- Ting, D. T.; Luo, X.; Shaw, A. T.; Bardia, A.; Sequist, L. V.; Louis, D. N.; Maheswaran, S.; Kapur, R.; Haber, D. A.; Toner, M. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5* (179), 179ra47.
- [7] Park, J. M.; Lee, J. Y.; Lee, J. G.; Jeong, H.; Oh, J. M.; Kim, Y. J.; Park, D.; Kim, M. S.; Lee, H. J.; Oh, J. H.; Lee, S. S.; Lee, W. Y.; Huh, N. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (17), 7400.
- [8] Hosokawa, M.; Hayata, T.; Fukuda, Y.; Arakaki, A.; Yoshino, T.; Tanaka, T.; Matsunaga, T. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (15), 6629.
- [9] Lee, H. J.; Oh, J. H.; Oh, J. M.; Park, J. M.; Lee, J. G.; Kim, M. S.; Kim, Y. J.; Kang, H. J.; Jeong, J.; Kim, S. I.; Lee, S. S.; Choi, J. W.; Huh, N. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2013**, *52* (32), 8337.
- [10] Qin, X.; Park, S.; Duffy, S. P.; Matthews, K.; Ang, R. R.; Todenhöfer, T.; Abdi, H.; Azad, A.; Bazov, J.; Chi, K. N.; Black, P. C.; Ma, H. *Lab Chip* **2015**, *15* (10), 2278.
- [11] Hosokawa, M.; Yoshikawa, T.; Negishi, R.; Yoshino, T.; Koh, Y.; Kenmotsu, H.; Naito, T.; Takahashi, T.; Yamamoto, N.; Kikuhara, Y.; Kanbara, H.; Tanaka, T.; Yamaguchi, K.; Matsunaga, T. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (12), 5692.
- [12] Launier, C.; Gaskill, M.; Czaplewski, G.; Myung, J. H.; Hong, S.; Eddington, D. T. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (9), 4022.
- [13] Myung, J. H.; Gajjar, K. A.; Chen, J.; Molokie, R. E.; Hong, S. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (12), 6088.
- [14] Miyamoto, D. T.; Lee, R. J.; Stott, S. L.; Ting, D. T.; Wittner, B. S.; Ulman, M.; Smas, M. E.; Lord, J. B.; Brannigan, B. W.; Trautwein, J.; Bander, N. H.; Wu, C. L.; Sequist, L. V.; Smith, M. R.; Ramaswamy, S.; Toner, M.; Maheswaran, S.; Haber, D. A. *Cancer Discov.* **2012**, *2* (11), 995.
- [15] Myung, J. H.; Launier, C. A.; Eddington, D. T.; Hong, S. *Langmuir* **2010**, *26* (11), 8589.
- [16] Lu, N. N.; Xie, M.; Wang, J.; Lv, S. W.; Yi, J. S.; Dong, W. G.; Huang, W. H. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (16), 8817.
- [17] Fizazi, K.; Morat, L.; Chauveinc, L.; Prapotnich, D.; de Crevoisier, R.; Escudier, B.; Cathelineau, X.; Rozet, F.; Vallancien, G.; Sabatier, L.; Soria, J. C. *Ann. Oncol.* **2007**, *18* (3), 518.
- [18] Huang, X.; Gao, P.; Song, Y.; Sun, J.; Chen, X.; Zhao, J.; Xu, H.; Wang, Z. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 202.
- [19] Riethdorf, S.; Fritsche, H.; Müller, V.; Rau, T.; Schindlbeck, C.; Rack, B.; Janni, W.; Coith, C.; Beck, K.; Jänicke, F.; Jackson, S.; Gornet, T.; Cristofanilli, M.; Pantel, K. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (3), 920.
- [20] Flaig, T. W.; Wilson, S.; Bokhoven, A. V.; Varela-Garcia, M.; Wolfé, P.; Maroni, P.; Genova, E. E.; Morales, D.; Lucia, M. S. *Oncology* **2011**, *78* (4), 863.
- [21] Sekine, J.; Luo, S. C.; Wang, S.; Zhu, B.; Tseng, H. R.; Yu, H. H. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (41), 4788.
- [22] He, R.; Zhao, L.; Liu, Y.; Zhang, N.; Cheng, B.; He, Z.; Cai, B.; Li, S.; Liu, W.; Guo, S.; Chen, Y.; Xiong, B.; Zhao, X. Z. *Biomed. Microdevices* **2013**, *15* (4), 617.
- [23] Sheng, W.; Chen, T.; Tan, W.; Fan, Z. H. *ACS Nano* **2013**, *7* (8), 7067.
- [24] Reátegui, E.; Aceto, N.; Lim, E. J.; Sullivan, J. P.; Jensen, A. E.; Zeinali, M.; Martel, J. M.; Aranyosi, A. J.; Li, W.; Castleberry, S.; Bardia, A.; Sequist, L. V.; Haber, D. A.; Maheswaran, S.; Hammond, P. T.; Toner, M.; Stott, S. L. *Adv. Mater.* **2015**, *27* (9), 1593.
- [25] Sha, M. Y.; Xu, H.; Natan, M. J.; Cromer, R. J. *Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (51), 17214.
- [26] Lee, H. J.; Cho, H. Y.; Oh, J. H.; Namkoong, K.; Lee, J. G.; Park, J. M.; Lee, S. S.; Huh, N.; Choi, J. W. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *47* (2), 508.
- [27] Wang, S.; Wang, H.; Jiao, J.; Chen, K. J.; Owens, G. E.; Kamei, K. I.; Sun, J.; Sherman, D. J.; Behrenbruch, C. P.; Wu, H.; Tseng, H. R. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2009**, *48* (47), 8970.
- [28] Hou, S.; Zhao, H.; Zhao, L.; Shen, Q.; Wei, K. S.; Suh, D. Y.; Nakao, A.; Garcia, M. A.; Song, M.; Lee, T.; Xiong, B.; Luo, S. C.; Tseng, H. R.; Yu, H. H. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (11), 1547.
- [29] Shen, Q.; Xu, L.; Zhao, L.; Wu, D.; Fan, Y.; Zhou, Y.; Ouyang, W. H.; Xu, X.; Zhang, Z.; Song, M.; Lee, T.; Garcia, M. A.; Xiong, B.; Hou, S.; Tseng, H. R.; Fang, X. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (16), 2368.
- [30] Wang, S.; Liu, K.; Liu, J.; Yu, Z. T. F.; Xu, X.; Zhao, L.; Lee, T.; Lee, E. K.; Reiss, J.; Lee, Y. K.; Chung, L. W. K.; Huang, J.; Rettig, M.; Seligson, D.; Duraiswamy, K. N.; Shen, C. K. F.; Tseng, H. R. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2011**, *50* (13), 3084.
- [31] Zhao, L.; Lu, Y. T.; Li, F.; Wu, K.; Hou, S.; Yu, J.; Shen, Q.; Wu, D.; Song, M.; Ouyang, W. H.; Luo, Z.; Lee, T.; Fang, X.; Shao, C.; Xu, X.; Garcia, M. A.; Chung, L. W. K.; Rettig, M.; Tseng, H. R.; Posadas, E. M. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (21), 2897.
- [32] Hou, S.; Zhao, L.; Shen, Q.; Yu, J.; Ng, C.; Kong, X.; Wu, D.; Song, M.; Shi, X.; Xu, X.; Ouyang, W. H.; He, R.; Zhao, X. Z.; Lee, T.; Brunicardi, F. C.; Garcia, M. A.; Ribas, A.; Lo, R. S.; Tseng, H. R. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2013**, *52* (12), 3379.
- [33] Ivanov, I.; Stojcic, J.; Stanimirovic, A.; Sargent, E.; Nam, R. K.; Kelley, S. O. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (1), 398.
- [34] Yoon, H. J.; Kim, T. H.; Zhang, Z.; Azizi, E.; Pham, T. M.; Paoletti, C.; Lin, J.; Ramnath, N.; Wicha, M. S.; Hayes, D. F.; Simeone, D. M.; Nagrath, S. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8* (10), 735.

- [35] Wan, Y.; Winter, M.; Delalat, B.; Hardingham, J. E.; Grover, P. K.; Wrin, J.; Voelcker, N. H.; Price, T. J.; Thierry, B. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (23), 20828.
- [36] Wang, H.; Yue, G.; Dong, C.; Wu, F.; Wei, J.; Yang, Y.; Zou, Z.; Wang, L.; Qian, X.; Zhang, T.; Liu, B. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (6), 4550.
- [37] Chen, W.; Weng, S.; Zhang, F.; Allen, S.; Li, X.; Bao, L.; Lam, R. H. W.; Macoska, J. A.; Merajver, S. D.; Fu, J. *ACS Nano* **2013**, *7* (1), 566.
- [38] Meng, J.; Zhang, P.; Zhang, F.; Liu, H.; Fan, J.; Liu, X.; Yang, G.; Jiang, L.; Wang, S. *ACS Nano* **2015**, *9* (9), 9284.
- [39] Park, G. S.; Kwon, H.; Kwak, D. W.; Park, S. Y.; Kim, M.; Lee, J. H.; Han, H.; Heo, S.; Li, X. S.; Lee, J. H.; Kim, Y. H.; Lee, J. G.; Yang, W.; Cho, H. Y.; Kim, S. K.; Kim, K. *Nano Lett.* **2012**, *12* (3), 1638.
- [40] Zhang, P.; Chen, L.; Xu, T.; Liu, H.; Liu, X.; Meng, J.; Yang, G.; Jiang, L.; Wang, S. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (26), 3566.
- [41] Liu, H.; Li, Y.; Sun, K.; Fan, J.; Zhang, P.; Meng, J.; Wang, S.; Jiang, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (20), 7603.
- [42] Li, Y.; Lu, Q.; Liu, H.; Wang, J.; Zhang, P.; Liang, H.; Jiang, L.; Wang, S. *Adv. Mater.* **2015**, *27* (43), 6848.
- [43] 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* (6), 922.
- [44] Shields IV, C. W.; Reyes, C. D.; López, G. P. *Lab Chip* **2015**, *15* (5), 1230.
- [45] Alix-Panabières, C.; Pantel, K. *Lab Chip* **2014**, *14* (1), 57.
- [46] Arya, S. K.; Lim, B.; Rahman, A. R. A. *Lab Chip* **2013**, *13* (11), 1995.
- [47] Hyun, K. A.; Jung, H. I. *Lab Chip* **2014**, *14* (1), 45.
- [48] King, J. D.; Casavant, B. P.; Lang, J. M. *Lab Chip* **2014**, *14* (1), 24.
- [49] Nagrath, S.; Sequist, L. V.; Maheswaran, S.; Bell, D. W.; Irimia, D.; Ulkus, L.; Smith, M. R.; Kwak, E. L.; Digumarthy, S.; Muzikansky, A.; Ryan, P.; Bails, U. J.; Tompkins, R. G.; Haber, D. A.; Toner, M. *Nature* **2007**, *450* (7173), 1235.
- [50] Stott, S. L.; Hsu, C. H.; Tsukrov, D. I.; Yu, M.; Miyamoto, D. T.; Waltman, B. A.; Rothenberg, S. M.; Shah, A. M.; Smas, M. E.; Korir, G. K.; Floyd, F. P.; Gilman, A. J.; Lord, J. B.; Winokur, D.; Springer, S.; Irimia, D.; Nagrath, S.; Sequist, L. V.; Lee, R. J.; Isselbacher, K. J.; Maheswaran, S.; Haber, D. A.; Toner, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (43), 18392.
- [51] Sarioglu, A. F.; Aceto, N.; Kojic, N.; Donaldson, M. C.; Zeinali, M.; Hamza, B.; Engstrom, A.; Zhu, H.; Sundaresan, T. K.; Miyamoto, D. T.; Luo, X.; Bardia, A.; Wittner, B. S.; Ramaswamy, S.; Shioda, T.; Ting, D. T.; Stott, S. L.; Kapur, R.; Maheswaran, S.; Haber, D. A.; Toner, M. *Nat. Methods* **2015**, *12* (7), 685.
- [52] Lin, M.; Chen, J. F.; Lu, Y. T.; Zhang, Y.; Song, J.; Hou, S.; Ke, Z.; Tseng, H. R. *Accounts Chem. Res.* **2014**, *47* (10), 2941.
- [53] Ke, Z.; Lin, M.; Chen, J. F.; Choi, J. S.; Zhang, Y.; Fong, A.; Liang, A. J.; Chen, S. F.; Li, Q.; Fang, W.; Zhang, P.; Garcia, M. A.; Lee, T.; Song, M.; Lin, H. A.; Zhao, H.; Luo, S. C.; Hou, S.; Yu, H. H.; Tseng, H. R. *ACS Nano* **2015**, *9* (1), 62.
- [54] Sathe, T. R.; Agrawal, A.; Nie, S. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (16), 5627.
- [55] Xie, M.; Hu, J.; Wen, C. Y.; Zhang, Z. L.; Xie, H. Y.; Pang, D. W. *Nanotechnology* **2012**, *23* (3), 035602.
- [56] Ghazani, A. A.; Pectasides, M.; Sharma, A.; Castroa, C. M.; Mino-Kenudson, M.; Leea, H.; Shephardb, J. A. O.; Weissleder, R. *Nanomedicine* **2014**, *10* (3), 661.
- [57] Ghazani, A. A.; McDermott, S.; Pectasides, M.; Sebas, M.; Mino-Kenudson, M.; Lee, H.; Weissleder R.; Castro, C. M. *Nanomedicine* **2013**, *9* (7) 1009.
- [58] Castro, C. M.; Ghazani, A. A.; Chung, J.; Shao, H.; Issadore, D.; Yoon, T. J.; Weissleder, R.; Lee, H. *Lab Chip* **2014**, *14* (1), 14.
- [59] Huang, P.; Li, Z.; Lin, J.; Yang, D.; Gao, G.; Xu, C.; Bao, L.; Zhang, C.; Wang, K.; Song, H.; Hu, H.; Cui, D. *Biomaterials* **2011**, *32* (13), 3447.
- [60] Zhao, Z.; Yang, Y.; Zeng, Y.; He, M. *Lab Chip*, **2016**, *16* (3), 489.
- [61] Li, J.; Qu, Y.; Ren, J.; Yuan, W.; Shi, D. *Nanotechnology* **2012**, *23* (50), 505706.
- [62] Pino, F.; Ivandini, T. A.; Nakata, K.; Fujishima, A.; Merkoçi, A.; Einaga, Y. *Anal. Sci.* **2015**, *31* (10), 1061.
- [63] Molday, R. S.; Yen, S. P. S.; Rembaum, A. *Nature* **1977**, *268* (4), 437.
- [64] Fischer, K. E.; Alemán, B. J.; Tao, S. L.; Daniels, R. H.; Li, E. M.; Bünger, M. D.; Nagaraj, G.; Singh, P.; Zettl, A.; Desai, T. A. *Nano Lett.* **2009**, *9* (2), 716.
- [65] Huang, C.; Yang, G.; Ha, Q.; Meng, J.; Wang, S. *Adv. Mater.* **2015**, *27* (2), 310.
- [66] Wen, C. Y.; Wu, L. L.; Zhang, Z. L.; Liu, Y. L.; Wei, S. Z.; Hu, J.; Tang, M.; Sun, E. Z.; Gong, Y. P.; Yu, J.; Pang, D. W. *ACS Nano* **2014**, *8* (1), 941.
- [67] Bai, L.; Du, Y.; Peng, J.; Liu, Y.; Wang, Y.; Yang Y.; Wang, C. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (26), 4080.
- [68] Fierer, J. O.; Veggiani, G.; Howarth, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (13), E1176.

- [69] Guo, S.; Chen, Y. Q.; Lu, N. N.; Wang, X. Y.; Xie, M.; Sui, W. P. *Nanotechnology* **2014**, 25 (50), 505603.
- [70] Shi, Y.; Pramanik, A.; Tchounwou, C.; Pedraza, F.; Crouch, R. A.; Chavva, S. R.; Vangara, A.; Sinha, S. S.; Jones, S.; Sardar, D.; Hawker, C.; Ray, P. C. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7 (20), 10935.
- [71] Wu, C. H.; Huang, Y. Y.; Chen, P.; Hoshino, K.; Liu, H.; Frenkel, E. P.; Zhang, J. X. J.; Sokolov, K. V. *ACS Nano* **2013**, 7 (10), 8816.
- [72] Wang, C.; Ye, M.; Cheng, L.; Li, R.; Zhu, W.; Shi, Z.; Fan, C.; He, J.; Liu, J.; Liu, Z. *Biomaterials* **2015**, 54, 55.
- [73] Yang, H. W.; Lin, C. W.; Hua, M. Y.; Liao, S. S.; Chen, Y. T.; Chen, H. C.; Weng, W. H.; Chuang, C. K.; Pang, S. T.; Ma, C. C. M. *Adv. Mater.* **2014**, 26 (22), 3662.
- [74] Chung, Y. K.; Reboud, J.; Lee, K. C.; Lim, H. M.; Lim, P. Y.; Wang, K. Y.; Tang, K. C.; Ji, H.; Chen, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26 (5), 2520.
- [75] Zhang, H.; Wang, Y.; Li, Q.; Zhang, F.; Tang, B. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (53), 7024.
- [76] Kim, S.; Han, S. I.; Park, M. J.; Jeon, C. W.; Joo, Y. D.; Choi, I. H.; Han, K. H. *Anal. Chem.* **2013**, 85 (5), 2779.
- [77] Chang, C. L.; Huang, W.; Jalal, S. I.; Chan, B. D.; Mahmood, A.; Shahda, S.; O'Neil, B. H.; Mateid, D. E.; Savran, C. A. *Lab Chip* **2015**, 15 (7), 1677.
- [78] Earhart, C. M.; Hughes, C. E.; Gaster, R. S.; Ooi, C. C.; Wilson, R. J.; Zhou, L. Y.; Humke, E. W.; Xu, L.; Wong, D. J.; Willingham, S. B.; Schwartz, E. J.; Weissman, I. L.; Jeffrey, S. S.; Neal, J. W.; Rohatgi, R.; Wakeleebe, H. A.; Wang, S. X. *Lab Chip* **2014**, 14 (1), 78.
- [79] Hoshino, K.; Huang, Y. Y.; Lane, N.; Huebschman, M.; Uhr, J. W.; Frenkel, E. P.; Zhang, X. *Lab Chip* **2011**, 11 (20), 3449.
- [80] Kang, J. H.; Krause, S.; Tobin, H.; Mammoto, A.; Kanapathipillai, M.; Ingber, D. E. *Lab Chip* **2012**, 12 (2), 2175.
- [81] Karabacak, N. M.; Spuhler, P. S.; Fachin, F.; Lim, E. J.; Pai, V.; Ozkumur, E.; Martel, J. M.; Kojic, N.; Smith, K.; Chen, P. i.; Yang, J.; Hwang, H.; Morgan, B.; Trautwein, J.; Barber, T. A.; Stott, S. L.; Maheswaran, S.; Kapur, R.; Haber, D. A.; Toner, M. *Nat. Protoc.* **2014**, 9 (3), 694.
- [82] Mohamadi, R. M.; Besant, J. D.; Mephram, A.; Green, B.; Mahmoudian, L.; Gibbs, T.; Ivanov, I.; Malvea, A.; Stojcic, J.; Allan, A. L.; Lowes, L. E.; Sargent, E. H.; Nam, R. K.; Kelley, S. O. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2015**, 54 (1), 139.
- [83] Labib, M.; Green, B.; Mohamadi, R. M.; Mephram, A.; Ahmed, S. U.; Mahmoudian, L.; Chang, I. H.; Sargent, E. H.; Kelley, S. O. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138 (8), 2476.
- [84] Jeon, S. H.; Moon, J. M.; Lee, E. S.; Kim, Y. H.; Cho, Y. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2014**, 53 (18), 4597.
- [85] Xie, M.; Lu, N. N.; Cheng, S. B.; Wang, X. Y.; Wang, M.; Guo, S.; Wen, C. Y.; Hu, J.; Pang, D. W.; Huang, W. H. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (9), 4618.
- [86] Lv, S. W.; Wang, J.; Xie, M.; Lu, N. N.; Li, Z.; Yan, X. W.; Cai, S. L.; Zhang, P. A.; Dong, W. G.; Huang, W. H. *Chem. Sci.* **2015**, 6 (11), 6432.