

DOI:10.3969/j.issn.1005-202X.2016.12.009

专题:数字诊疗装备研发

太赫兹光谱技术挑战检测循环肿瘤细胞难题

颜识涵¹,姚春艳²

1.中国科学院重庆绿色智能技术研究院,重庆 400714;2.第三军医大学,重庆 400038

【摘要】检测血液中循环肿瘤细胞(CTCs)对与其相关疾病的诊治具有重要意义。简单介绍目前CTCs判定方法以及太赫兹光谱技术在生物学中的应用,提出太赫兹光谱技术运用在CTCs检测方面的潜在优势。改进与优化现有太赫兹细胞检测技术,以CTCs为模式样本,筛选不同组织学分类肿瘤细胞在种类、结构和丰度上存在显著差异的细胞成分(如脂质、蛋白和糖类生物大分子及其复合体),并通过这些细胞差异分子所表征的细胞水平太赫兹振动光谱指纹来实现对不同组织学分类肿瘤细胞的直接检测。所获得的肿瘤细胞太赫兹振动光谱指纹是CTCs检测的新指标,有望从新的视角为临床CTCs检测提供革命性的技术手段。

【关键词】循环肿瘤细胞;太赫兹;光谱诊断;指纹光谱

【中图分类号】R-33

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2016)12-1225-04

Challenge of the detection of circulating tumor cells with terahertz spectroscopy technique

YAN Shihan¹, YAO Chunyan²

1. Chongqing Institute of Green Intelligent Technology, Chinese Academy of Sciences, Chongqing 400714, China; 2. Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: The detection of circulating tumor cells (CTCs) in the blood is significant for the diagnosis and treatment of related diseases. The current developments of CTCs determination methods, and the application of terahertz (THz) spectroscopy technique in biomedical applications are briefly introduced. The potential application of THz spectroscopy technique in CTCs detection is proposed. To detect CTCs from different tissues would be realized by analyzing the different THz vibration spectra of the cells caused by different cell components (such as lipid, protein, carbohydrate and other biological macromolecules, and their complex) which are significantly different in the type, structure and abundance of tumor cells in different histological classifications. The obtained THz fingerprint spectrum of CTCs which is a new index of CTCs detection is expected to provide some revolutionary techniques for clinical CTCs detection.

Keywords: circulating tumor cells; terahertz; spectrum diagnosis; fingerprint spectrum

前言

影响肿瘤治疗效果的关键因素是如何能够在早期恰当的时机发现肿瘤的存在。恶性肿瘤发生于人体的组织、器官,从瘤体上脱落的肿瘤细胞进入外周血循环成为循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cells,

CTCs),这种细胞是实时监控肿瘤动态发展的重要标志物。这些细胞的特点是血液中含量极低,约占全部血细胞的百万分之一,更早、更快、更准确的判定是治疗癌症的关键^[1]。“国家重点研发计划”特别关注了此类项目的开展,第三军医大学联合中国科学院重庆绿色智能技术研究院合作开展《基于太赫兹技术的靶向CTCs搜索系统的构建研究》,希望能够通过快速发展的太赫兹光谱技术检测CTCs,服务于国民健康事业。

1 CTCs检测方法概述

目前已经发明众多方法判断CTCs,常用的

【收稿日期】2016-10-22

【基金项目】国家重点研发计划(2016YFC0101300)

【作者简介】颜识涵,博士,助理研究员,研究方向:太赫兹生物医学检测, E-mail: yanshihan@cigit.ac.cn

【通信作者】姚春艳,博士,副教授/副主任医师,研究方向:医学检验, E-mail: yaochunyan@tmmu.edu.cn

CTCs分离技术包括:(1)磁性细胞分选技术,但该技术分离效率低且分离出的肿瘤细胞只有与磁珠解离后才能恢复活性进行进一步检测^[2];(2)膜滤过法,该方法敏感性高并可维持细胞完整形态,分离后的细胞可用于细胞染色、免疫标记等进一步研究,另外还具有检测循环肿瘤微栓子的独特优势^[3];(3)密度梯度离心法,分离后可以进一步进行细胞染色、免疫标记等进一步的相关分析,局限性在于敏感性较低且依赖于肿瘤细胞的特性、离心时间、温度等因素^[4];(4)免疫细胞化学技术,该方法简便,可直接进行形态学分析,但敏感性较低而且一些分化差的肿瘤细胞不能表达目标抗原,这都在一定程度上限制了其应用^[5];(5)反转录—聚合酶链反应检测法,是通过检测组织或肿瘤特异性 mRNA(通常不表达于正常外周血细胞)的表达或某些基因改变后 DNA 水平的异常,如果在外周血中检测到肿瘤特异性 mRNA 可以间接提示 CTCs 的存在,假阳性结果、无法进行形态学观察、无法对外周血肿瘤细胞进行定量检测是影响其应用的重要原因^[6];(6)流式细胞分析法,该技术利用肿瘤细胞单抗结合荧光物质使肿瘤细胞染色,然后用流式细胞仪进行分析,其局限性在于敏感性较低^[7];(7)激光扫描细胞计量技术,是一种高通量细胞分析仪,同时具有流式细胞仪和图像细胞仪的功能,可通过连续扫描荧光显微镜图像自动分析产生数据^[8]。

随着 CTCs 相关理论研究的进展和实验技术的进步,出现了同时具备 CTCs 富集和分析功能的细胞搜索系统^[9]。细胞搜索系统是目前唯一通过 FDA 认证的 CTCs 检测方法,已经过数千例肿瘤患者的临床验证。该方法首先通过纳米磁流体颗粒富集 CTCs,随后利用白细胞特异抗体 CD45 标记进行阴性选择和上皮特异抗体染色进行阳性选择,经细胞核染料 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色后利用荧光显微技术随后分离出肿瘤上皮细胞,最后用半自动荧光显微镜检查法检测并重建图像提供分析。尽管如此,但该方法的阳性率很低,808 例肿瘤转移患者中只有 41.7% 为阳性结果(>5 CTCs/7.5 mL 标本)。遗憾的是,现有的所有 CTCs 检测方法都无法判定检测到的细胞是存活还是凋亡的,而只有功能细胞才能够促成转移灶的形成。因此,有必要寻求能够有效解决上述技术瓶颈的跨学科 CTCs 检测技术与方法,即对细胞数量和形态分析于一体的有效检测方法,以实现 CTCs 的实时、有效检测。

2 太赫兹光谱技术在生物医学领域的运用

太赫兹辐射的能级与生物分子低频运动如分子的振动、转动以及分子骨架扭动的能量有很大的交界,太赫兹技术可通过“指纹谱”识别生物分子表征,太赫兹光子能量覆盖了生物大分子空间构象的能级范围^[10]。太赫兹光谱表征的是分子内、分子间的弱相互作用,主要包括氢键、范德华力以及非键作用(如亲疏水性等)^[11]。用该频段电磁波探测生物大分子,可以直接获得其他电磁波段无法获得的代表生物大分子功能的空间构象等重要信息,这是因为太赫兹波光谱成像技术能够直接获取具有反应物质结构与性质的分子指纹信息,太赫兹波能直接“看到”DNA、蛋白质等生物大分子。由于太赫兹波光子能量远小于 X 射线能量,一般只有几毫电子伏特,不会对生物大分子、生物细胞和组织等产生有害电离,完美契合了 CTCs 活检的要求。太赫兹辐射对生物体内含量最多的物质—水特别敏感,而肿瘤组织和正常组织新陈代谢存在的差异恰好能够被太赫兹波灵敏探测,为发展我国独立自主的新型太赫兹检测技术提供了理论依据。而且,在太赫兹技术更为成熟的美国、日本等国家,研究人员已经通过该技术检测出皮肤癌、乳腺癌、结肠癌和胃癌等多种癌细胞^[12-13]。这一事实也提醒着我们抢占“太赫兹频谱资源”,提供临床 CTCs 检测革命性的技术手段,形成系列自主创新成果已迫在眉睫。

3 太赫兹光谱技术检测 CTCs

2016 年国家重点研发计划的支持正是雪中送炭,立项“基于太赫兹技术的靶向 CTCs 搜索系统的构建研究”,以 CTCs 为模式对象,筛选不同组织学分类肿瘤细胞在种类、结构和丰度上存在显著差异的细胞成分(如脂质、蛋白和糖类等生物大分子及其复合体),并通过这些细胞差异分子所表征的细胞水平太赫兹振动光谱指纹实现对不同组织学分类肿瘤细胞的直接检测。并结合先进的微流控、荧光光谱等技术形成分离与鉴定全流程,波谱信息与图像信息相结合的新型诊断技术,所获得的肿瘤细胞太赫兹振动光谱指纹将成为 CTCs 检测的新指标。具体来讲,基于太赫兹技术的 CTCs 搜索系统的构建主要采用如下解决手段鉴定 CTCs:(1)采用微流控技术制备,用于高效分离 CTCs,同时在进样系统中添加采用自组装技术制备的纳米金颗粒狭槽纳米天线或其他具有类似功能的微纳结构器件,以获得信号放大效

果;(2)采用高效的太赫兹源与检测器优化探测灵敏度;(3)结合传统的光谱学手段,构建多通道成像系统,获得波图合一的信息。如果这一设想被实现,将扩大了太赫兹研究领域的运用前景,同时也为CTCs的鉴定提供了一种新思路。

设想的太赫兹靶向CTCs搜索系统集成微流控、光学检测、太赫兹检测和电子控制等部件。微流控帮助样本液中的细胞约束在液流系统产生的鞘液流中心部位,逐个流过后续检测窗口,使得待测细胞恰好处于光学系统及太赫兹系统的焦点上,方便后续光学系统和太赫兹系统的检测。随后,利用光学系统和太赫兹系统获得波图合一的细胞图像。在获得海量数据的前提下,太赫兹靶向CTCs搜索系统还可以对每个细胞进行多量化参数分析,这些参数包括细胞整体荧光信号强度及太赫兹特征光谱信息,还能对包括细胞形态、细胞组成成分差异性及亚细胞信号分布的分析。太赫兹靶向CTCs搜索系统集成细胞光学检测、荧光显微成像与太赫兹光谱检测功能于一身,既能提供待检测血液样本中所有细胞的统计数据,又可以获得其中单个细胞,如白细胞或者CTCs的图像信息。通过获得的细胞形态学、细胞结构和细胞分类等综合信息帮助CTCs检测。太赫兹技术的运用有望从新的视角为临床CTCs检测提供革命性的技术手段。将来对CTCs的检测就像安排血液中的细胞过安检,发现“可疑份子”,将其“绳之以法”。从此,癌症诊治将不再是困扰人类的噩梦。

4 结 语

太赫兹波被誉为电磁波谱最后的处女地,相比传统光源具有很多独特的性质,对于物质结构的探索具有重要意义,是一种具有独特优越性的重要新技术,更是发展新型诊断设备的科学技术基础。提出的结合太赫兹振动光谱和显微成像技术实现CTCs搜索的新方法,利用了CTCs细胞独特的物理和化学性质,通过获得独特的太赫兹特征光谱指纹鉴别CTCs,是一种无需细胞培养、无需试剂、实时快速、直接定性和定量检测CTCs细胞的新技术与新方法。太赫兹-检验医学是一门综合了医学、生物学、物理学、光学、生物医学工程学、计算机学、信息和材料等多学科的综合交叉前沿学科,已成为当下一个非常重要的交叉前沿领域,蕴含着原创性重大机理和方法并亟待突破,具有重大的科学意义。太赫兹科学技

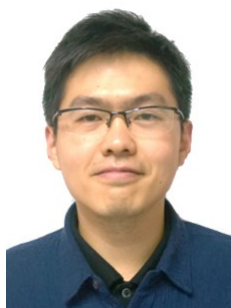
术也将是后摩尔时代信息技术发展的重要支撑。未来,太赫兹光谱技术将在更加宽广的领域造福人类!

最后,非常感谢“国家重点研发计划”对项目《基于太赫兹技术的靶向CTCs搜索系统的构建研究》(2016YFC0101300)的支持。

【参考文献】

- [1] CRISTOFANILLI M, BUDD G T, ELLIS M J, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. *New Engl J Med*, 2004, 351(8): 781-791.
- [2] ZHANG T, ARMSTRONG A J. Clinical utility of circulating tumor cells in advanced prostate cancer[J]. *Curr Oncol Rep*, 2015, 18(1): 1-8.
- [3] DHAR M, WONG J, KARIMI A, et al. High efficiency vortex trapping of circulating tumor cells[J]. *Biomicrofluidics*, 2015, 9(6): 64116.
- [4] ASADIAN-BIRJAND M, BIGLIONE C, BERGUEIRO J, et al. Transferrin decorated thermoresponsive nanogels as magnetic trap devices for circulating tumor cells[J]. *Macromol Rapid Commun*, 2016, 37(5): 439-445.
- [5] WARKIANI M E, KHOO B L, WU L, et al. Ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells from blood using spiral microfluidics[J]. *Nat Protoc*, 2015, 11(1): 134-148.
- [6] GORGES T M, PENKALLA N, SCHALK T, et al. Enumeration and molecular characterization of tumor cells in lung cancer patients using a novel *in vivo* device for capturing circulating tumor cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 19(12): 113-120.
- [7] HIYAMA E, ALI A, AMER S, et al. Direct lipid-metabolomics of single floating cells for analysis of circulating tumor cells by live single-cell mass spectrometry[J]. *Anal Sci*, 2015, 31(12): 1215-1217.
- [8] DICKEY D D, GIANGRANDE P H. Oligonucleotide aptamers: a next-generation technology for the capture and detection of circulating tumor cells[J]. *Methods*, 2015, 97: 94-103.
- [9] SALVIANTI F, PAZZAGLI M, PINZANI P. Single circulating tumor cell sequencing as an advanced tool in cancer management[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, 16(1): 51-63.
- [10] CHEN T, LI Z, MO W. Identification of biomolecules by terahertz spectroscopy and fuzzy pattern recognition[J]. *Spectrochim Acta A*, 2013, 106(4): 48-53.
- [11] GLOBUS T, DOROFEEVA T, SIZOV I, et al. Sub-THz vibrational spectroscopy of bacterial cells and molecular components[J]. *Am J Biomed Eng*, 2012, 2(4): 143-154.
- [12] JOSEPH C S, YAROSLAVSKY A N, NEEL V A, et al. Continuous wave terahertz transmission imaging of nonmelanoma skin cancers[J]. *Lasers Surg Med*, 2011, 43(6): 457-462.
- [13] BRUN M A, FORMANEK F, YASUDA A, et al. Terahertz imaging applied to cancer diagnosis[J]. *Phys Med Biol*, 2010, 55(16): 4615-4623.

(编辑:陈丽霞)



颜识涵 助理研究员。2009年毕业于东北师范大学城市与环境科学学院生态学专业,获理学学士学位。同年,保送进入武汉大学生命科学院遗传学专业硕博连读,从事植物分子细胞遗传学和表观遗传学研究工作。2014年7月加入中国科学院重庆绿色智能技术研究院,开始从事太赫兹生物医学检测方面工作。发表SCI论文18篇,其中第一作者4篇。同第三军医大学西南医院合作申请并获得国家重点研发计划“基于太赫兹技术的靶向CTCs搜索系统的构建研究”的资助;另同重庆市纤维检验局合作开展项目“用于皮革快速鉴定的太赫兹光谱技术研发”。



姚春艳 副教授/副主任医师。一直从事生物传感器和分子生物学领域的相关研究工作,利用滚环扩增、适配子、量子点等技术构建了细菌、蛋白质、核酸、凝血等分子与细胞水平的生物传感器检测技术平台,具有生物检测方面坚实的理论基础和丰富的实验经验。先后承担国家863重大项目子课题、国家自然科学基金、中国工程物理与生物医学交叉重点项目等多项课题,先后获得国家科技进步二等奖、中华预防医学会科技进步一等奖、军队科技进步一等奖等多项科研成果,以第一作者及通讯作者在Molecular Cell、Biosensors and Bioelectronics等高水平国际刊物上发表SCI论著十余篇,其中分子成像的相关研究成果发表在Cell子刊上,影响因子约15.0。