

光学活体流式细胞仪在肿瘤转移研究中的应用(特邀)

张富丽¹, 田华琴², 李宏良², 魏勋斌^{1,3,4,5,6*}¹上海交通大学生物医学工程学院 Med-X 研究院, 上海 200030;²佛山市中医院肿瘤中心, 广东 佛山 528199;³北京大学肿瘤医院肿瘤发生与转化研究教育部重点实验室, 北京 100142;⁴北京大学医学部医学技术研究院, 北京 100191;⁵北京大学生物医学工程系, 北京 100081;⁶北京大学国际癌症研究院, 北京 100191

摘要 癌症是人类生命的一大威胁,而肿瘤的侵袭和转移是癌症患者死亡的主要原因之一。在这一复杂过程中,循环肿瘤细胞(CTC)等血液循环中的粒子起到十分关键的作用,所以监测血液循环中的 CTC 和其他肿瘤相关的粒子可以促进肿瘤转移的研究。光学活体流式细胞仪(IVFC)是一种基于激光的新技术,可在体内无创监测循环细胞,包括 CTC 等肿瘤相关的颗粒。这一强大的工具已被广泛应用于癌症相关的多个领域,尤其是肿瘤转移研究。因此,总结分析 IVFC 在肿瘤转移研究中的应用具有重要意义。本文介绍 IVFC 的检测原理,总结基于荧光发光、光声效应、计算机视觉等光学技术的荧光活体流式细胞仪、光声活体流式细胞仪、图像活体流式细胞仪等 IVFC 分类,对 IVFC 应用于肝癌、前列腺癌、乳腺癌、黑色素瘤等肿瘤转移的相关研究进行综述,并总结和展望 IVFC 对肿瘤转移研究的应用。

关键词 活体流式细胞仪; 肿瘤转移; 循环肿瘤细胞; 无创监测; 光学成像

中图分类号 R318.51

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP232407

Applications of Optical *in Vivo* Flow Cytometry in Tumor Metastasis Research (Invited)

Zhang Fuli¹, Tian Huaqin², Li Hongliang², Wei Xunbin^{1,3,4,5,6*}¹Med-X Research Institute and School of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China;²Cancer Center, Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Foshan 528199, Guangdong, China;³Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Beijing Cancer Hospital, Beijing 100142, China;⁴Institute of Medical Technology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China;⁵Biomedical Engineering Department, Peking University, Beijing 100081, China;⁶International Cancer Institute, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract Cancer poses a significant threat to human health, with tumor invasion and metastasis being the leading causes of mortality. Circulating tumor cells (CTCs) and other circulating entities are pivotal in the metastasis process. Consequently, tracking these cells and particles is critical for understanding metastasis. Optical *in vivo* flow cytometry (IVFC), an innovative laser-based technique, facilitates non-invasive tracking of CTCs and tumor-associated particles, proving invaluable in cancer researches, especially in metastasis studies. This study focuses on the applications of IVFC in tumor metastasis research. We discuss the detection principles of IVFC, highlighting various optical techniques such as fluorescence emission, photoacoustic effects, and computer vision. The categorization of IVFC technologies, including fluorescence *in vivo* flow cytometry, photoacoustic flow cytometry, and *in vivo* imaging flow cytometry, is detailed. We review its application in research on different cancers such as liver, prostate, breast cancer, and melanoma. The paper

收稿日期: 2023-11-01; 修回日期: 2023-12-02; 录用日期: 2023-12-06; 网络首发日期: 2023-12-12

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFF0502900)、国家自然科学基金(62027824)、广东省中医药局科研项目(20213018)、广东省佛山市中医院高水平医院登峰计划

通信作者: *xwei@bjmu.edu.cn

concludes with future prospects for IVFC in studying tumor metastasis.

Key words *in vivo* flow cytometry; tumor metastasis; circulating tumor cells; non-invasive monitoring; optical imaging

1 引言

癌症是一种非常复杂的常见致命疾病,已被广泛认为是对全球人类发展的威胁^[1]。2020年的全球最新癌症负担数据显示,全球新发癌症病例约1930万例,癌症死亡病例约1000万例^[2]。美国癌症协会预计2023年美国将新增1958310例癌症病例和609820例癌症死亡病例,乳腺癌、前列腺癌和子宫体癌的发病率还会持续上升^[3]。在中国,癌症已经成为人们生命健康的首要威胁,是导致死亡的主要原因^[4]。2020年,中国共有457万例新发癌症病例,死亡病例300万例,分别占全球新确诊病例的24%和全球癌症相关死亡人数的30%,远远超过了其他国家^[5]。造成癌症病人死亡的主要原因是肿瘤转移^[6]。肿瘤转移是一种源于大量随机事件的复杂生物过程,而且在不同类型的癌症中,其转移过程可能存在显著的差异。因此,对肿瘤转移进行预测、治疗和研究将有助于降低癌症的死亡率。在转移过程中,循环肿瘤细胞(CTC)是从原发肿瘤和转移沉积物中脱落后进入血液循环的细胞,是癌症诊断、分期和预后的重要生物标志物^[7]。通过对CTC进行分析,可以更深入地研究肿瘤细胞侵入血液循环到形成临床上可检测的转移灶这一过程中的各个环节。

由于CTC在血液中数量很少,一般情况下血细胞的数量是CTC数量的10亿倍^[8],因此CTC在血液中是一种十分难以检测的细胞群。传统的检测方法,如传统的流式细胞仪^[9],通常需要从病人或实验动物身上抽取外周血,无法进行长时间的实时监测,且这些方法的后续处理步骤也可能会消除血液中罕见的癌细胞,从而影响测量精度。活体检测方法如激光散斑成像^[10]、光学相干断层成像^[11]和光声显微成像^[12]可以活体分析血流情况,但是多用于观察血管形貌和血流参数,对于血流中CTC的监测通量和灵敏度有限。光学活体流式细胞仪(IVFC)是一种基于激光的用于在体量化循环细胞的新兴技术。对比传统流式细胞仪,IVFC将血流作为鞘流,并结合共聚焦方法,利用荧光发光、光声效应等原理检测血流中通过激光光斑的循环细胞^[13]。大量研究表明,IVFC可以实现实时、无创地检测血液循环中的红细胞^[14]、白细胞^[14]、白血病细胞^[15]、间充质干细胞^[16]、T细胞^[17]、CTC^[18]、纳米颗粒^[19]、细菌^[20]等粒子。因此,利用IVFC监测血液循环中的CTC和其他肿瘤相关粒子可以对肿瘤转移进行进一步研究。本文对IVFC的原理和分类进行介绍,针对IVFC在肿瘤转移研究中的应用进行综述,并展望其发展前景。

2 IVFC检测原理

IVFC利用激光监测血液循环中的循环细胞。最初的IVFC主要基于荧光技术,荧光标记的细胞流过特定波长激光调制后,激光光斑会产生特定波长的发射荧光,且随着细胞的流动,发射荧光强度会形成一个信号峰,分析探测器接收到的特定波长的发射荧光信号峰数量,可以计算流过激光光斑的细胞数量,从而实现细胞计数。在系统搭建上,与传统流式细胞仪类似,IVFC将毛细血管或浅表血管视为流体系统,利用探测器收集血管中移动目标的信号,并通过计算机软件进行分析。如图1所示,IVFC利用绿色发光二极管(LED)提供宽场照明,利用电荷耦合器件(CCD)收集透射光以定位待测血管,LED照明光波长取决于血红蛋白的特殊吸收(约520 nm)。利用柱面透镜和物镜将激光聚焦成狭缝状并横跨到待测血管上,当目标细胞穿过聚焦平面时会激发荧光。利用物镜收集前向散射光,并用光电倍增管(PMT)进行检测。PMT前面的机械狭缝(MS2)与激光光路中的狭缝(MS1)共焦,从而利用共聚焦原理消除离焦荧光。在检测过程中,目标细胞的信号会在自发荧光背景中凸显出一个峰的形状。利用分析软件计算信号峰的数量,就可以对待测细胞进行计数。在利用IVFC进行肿瘤转移的研究中,通常使用荧光标记的方法鉴别肿瘤细胞,利用荧光染料或探针肿瘤细胞进行标记,从而实现活体监测。除此之外,有些特定的肿瘤细胞(如黑色素瘤细胞)会产生和健康细胞不同的光声效应,可以利用光声活体流式细胞仪进行无标记监测。由于利用荧光标记或光学特性进行肿瘤细胞监测,IVFC对于循环肿瘤细胞的检测具有很高的特异性,其检测精度主要受荧光标记技术的影响。除此之外,

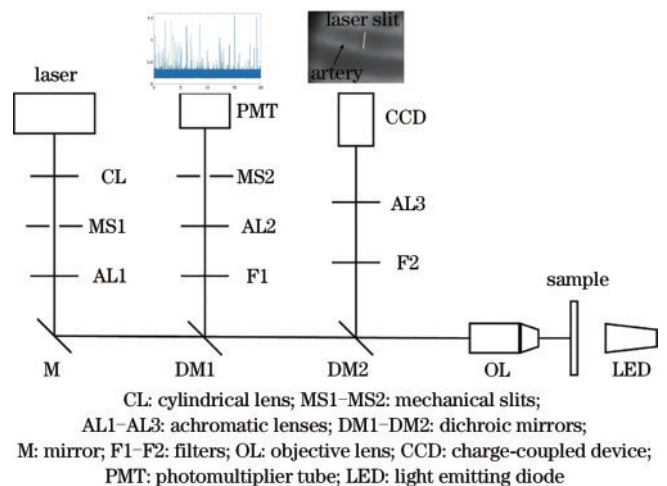


图1 光学活体流式细胞监测系统示意图
Fig. 1 Schematic of *in vivo* flow cytometry setup

IVFC 检测血液中的细胞没有成像过程,数据处理只需要在一维方向进行,因此具有较高的检测效率。IVFC 还具有较高的灵敏度,通过 IVFC 对原位和皮下瘤模型

中转染了 GFP 的 CTC 进行监测,实验结果表明,IVFC 的灵敏度比传统体外流式细胞仪的全血分析灵敏度高出 1.8 倍^[18]。IVFC 的发展见表 1。

表 1 IVFC 的发展
Table 1 The development of IVFC

Year	Technique	Target	Label	Principle
2004	<i>In vivo</i> flow cytometry ^[13-14]	Leukemia (MLL), prostate cancer (LNCaP), red blood cells, white blood cells	DiD, Cy-Chrome-CD45	Fluorescent
2006	Photoacoustic flow cytometry ^[21]	Human squamous carcinoma (SQ20B)	GN	Photoacoustic effect
2012	Diffuse fluorescence flow cytometry ^[22]	Multiple myeloma cells	DiD	Diffuse fluorescent
2013	Computer vision <i>in vivo</i> flow cytometry ^[23]	Multiple myeloma cells	DiD	Computer vision
2015	Near infrared <i>in vivo</i> flow cytometry ^[24]	Bone marrow cells, mesenchymal stem cells	DiO, IR-780	Fluorescent
2018	<i>In vivo</i> imaging flow cytometry ^[25]	Dendritic cells, breast cancer (4T1)	GFP, DiD	Computer vision

3 IVFC 分类

3.1 荧光活体流式细胞仪

IVFC 发展之初主要基于荧光技术检测细胞,因此也被称为荧光 IVFC。2004 年,Novak 等^[14]首次报道了基于共聚焦和荧光标记方法的 IVFC。第一台荧光 IVFC 只有一个通道,仅能检测 DiD 和 Cy5 等红色荧光。由于单色 IVFC 无法满足同时监测多种细胞的要求,Boutrus 等^[26]提出了一种双色 IVFC,该装置利用 473 nm 和 633 nm 激光同时激发和检测两种不同颜色的荧光,可以应用于更大范围的荧光探针。2015 年,Suo 等^[24]将 IVFC 扩展到穿透力更强的近红外范围,利用波长为 785 nm 的激光激发七甲氧基氰基染料 IR-780 来实现活体监测。此研究表明,IVFC 能够检测从可见光到近红外光范围的荧光团,可以拥有传统流式细胞仪的全部通道。除此之外,Zettergren 等^[22]对体内相对较大血管的漫射荧光进行检测,提出了弥散荧光流式细胞仪(DFFC)。DFFC 使用激光照射小鼠肢体,并通过光纤阵列耦合到以光子计数模式运行的高灵敏度光电倍增管阵列来检测细胞发出的微弱荧光信号,从而提高了 IVFC 的检测通量。

3.2 光声活体流式细胞仪

由于荧光 IVFC 需要利用荧光标记方法进行检测,会受到荧光团光漂白和细胞毒性等问题的影响,无法在临床上进行进一步的研究。2006 年,Zharov 等^[21]提出了结合 IVFC 和光声效应原理的光声 IVFC (PAFC)。PAFC 与 IVFC 同样将血流视为自然鞘流并将激光聚焦跨过血管。与荧光 IVFC 不同的是,PAFC 使用高能量的脉冲激光和超声波传感器进行检测,带有色素的细胞穿过激光时会吸收激光能量,从而

产生热量,随后发出超声波。由于使用近红外激光并检测声波信号,因此 PAFC 原理上比荧光 IVFC 具有更深的检测能力。Zharov 等^[21]还提出了光声和荧光 IVFC 混合系统,通过集成方法提高检测的多功能性。PAFC 可以对黑色素瘤 CTC 进行监测,已被证明是一种很有前途的无标记检测方法,具有临床转化的潜力。相比荧光活体流式细胞仪,光声活体流式细胞仪可以对有明显光吸收的细胞进行无标记监测,且可以检测更深层的组织。

3.3 图像活体流式细胞仪

为了提升成像通量,Markovic 等^[23, 27]结合计算机视觉算法提出了计算机视觉 IVFC (CV-IVFC),实现对小鼠耳部多条大血管中荧光标记的循环细胞进行活体检测、计数和跟踪。CV-IVFC 使用 660 nm 激光和高灵敏度电子多重电荷耦合器件(EMCCD)相机从相对较大的成像区域(535 mm²)获取荧光图像序列,之后利用图像分析算法在具有大量自发荧光和噪声的图像序列中识别和跟踪罕见细胞。研究结果表明,该方法能在外周血浓度为 20 mL⁻¹的情况下实现单细胞的检测灵敏度。除此之外,Zeng 等^[25]将荧光 IVFC 与多波段滤光片和彩色 CCD 相结合开发了图像 IVFC,实现了双通道识别 CTC 和树突状细胞。图像活体流式细胞仪可以同时检测多根血管,且能够可视化细胞运动速度和轨迹。

4 IVFC 在各类肿瘤转移研究中的应用

4.1 肝癌

肝癌是一个重要的全球健康问题,全球发病率排名第 5,死亡率排名第 4。2020 年,肝癌新发病例超过 100 万例,估计有 76.9 万人死亡^[2]。肝癌在东亚地区

的发病率最高,而在北美、北欧和非洲地区的发病率往往较低。肝癌具有转移或扩散至身体其他部位的能力,尤其是邻近的淋巴结和远处的器官,其最常见的转移部位包括肺部、骨骼、肾上腺和淋巴结,转移性肝癌患者的生存率几乎为 0,因此需要进一步对肝癌转移进行研究,从而开发新型治疗方法,降低肝癌死亡率。

IVFC 可以监测肝癌转移相关的循环细胞。Li 等^[28-29]使用改进计数算法的 IVFC 检测了两种人类肝癌细胞系(高转移性 HCCLM3 细胞和低转移性 HepG2 细胞)的清除动力学,发现 60% 以上的 HCCLM3 细胞在 1 h 内从外周血中清除,而对于 HepG2 细胞,这个数值小于 40%,说明 CTC 的清除可能是肝癌形成远处转移能力的重要决定因素。在血液中 CTC 除了单个存在,还可能形成团块,它们具有更大的转移潜力。Suo 等^[30]通过分析 IVFC 信号峰模式区分出单个 CTC 和 CTC 团块,发现原位肝癌模型转移过程中 CTC 团块比例显著增大。骨髓间充质干细胞(MSC)可以迁移至肿瘤转移灶^[31],为了研究其归巢情况,Xie 等^[16]利用 IVFC 监测了 MSC 在血液中的清除动力学,发现 MSC 在健康小鼠、皮下肝癌模型、原位肝癌模型和肺转移模型中具有不同的清除动力学,表明它们积极归巢于肿瘤环境,从而增强肿瘤的转移能力。

IVFC 与原位瘤模型结合还可以研究不同治疗方法对肝癌转移的影响。Fan 等^[18,32]利用 IVFC 研究了转染 GFP 的原位肝癌模型,比较了肝切除对晚期肝癌血行转移的作用。研究表明,肝切除后 CTC 数量和早期转移灶数量显著减少,切除术明显限制了血行转移和远处转移。除了肝切除,对于无法手术或远处转移的肝癌,通常使用药物治疗。索拉非尼(Sorafenib)是一种能够抑制肿瘤细胞生长的多激酶抑制剂,自 2007 年起被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗原发性肾癌和晚期原发性肝癌。为了研究这种药物对肝癌转移的影响,Yan 等^[33]利用 IVFC 在上述肝癌模型中监测 CTC,发现索拉非尼治疗显著降低了 CTC 数量和转移率。

4.2 前列腺癌

据统计,前列腺癌是全球男性中发病率第二高的癌症,也是导致癌症死亡的第五大原因,2020 年全球有近 140 万例新发病例和 37.5 万死亡病例,中国前列腺癌的发病率一直在上升^[2]。前列腺癌具有较强的转移能力,能够扩散至身体的其他部位,特别是骨骼、淋巴结和远处的器官。深入研究前列腺癌转移的相关问题对于开发新型治疗方法、控制疾病进展、缓解相关症状、延长患者生存期以及降低死亡率具有重要意义。

IVFC 可以用来监测前列腺癌相关细胞在血液中的循环动力学变化,从而进一步对前列腺癌转移进行研究。Irene 等^[13]利用 IVFC 监测血液中注射了 LNCaP 细胞和 MLL 细胞的雄性 SCID 小鼠和哥本哈根大鼠,发现大多数细胞都从小鼠和大鼠的血液循环

中被清除,其中转移性较强的 MLL 细胞比 LNCaP 细胞清除得更快。Li 等^[29]使用改进计数算法的 IVFC 同样检测了具有不同转移潜能的癌细胞的消耗动力学,发现侵袭性更强的 PC-3 细胞从血液循环中清除的速度比 LNCaP 细胞更快。两项实验都观察到 CTC 的数量在最初被清除之后会增加的现象,这可能是由细胞注射后被肺部捕获又逃逸产生的。利用 IVFC 对具有不同转移潜能的前列腺癌细胞系在小鼠和大鼠体内的循环动力学的研究说明了细胞系和宿主环境会影响前列腺癌细胞的循环动力学。除了不同转移潜能的细胞系,不同肿瘤模型也会影响 CTC 数量。Pang 等^[34]利用 IVFC 对 PC-3 细胞系建立的皮下和原位前列腺肿瘤模型进行检测,发现原位瘤模型 CTC 数量高于皮下瘤模型。分析表明,原位瘤模型中 CTC 数量是由爆发性生长造成的,而皮下瘤模型中 CTC 数量随着肿瘤尺寸的增大逐渐增加。CTC 数量变化和肿瘤转移涉及一系列复杂的生物学过程,可能受许多因素影响。为了研究巨噬细胞对肿瘤转移的影响,Guo 等^[35]利用 IVFC 监测了注射 PC-3 细胞的裸鼠,发现巨噬细胞缺乏组的 CTC 数量与对照组相比下降较慢,说明巨噬细胞的缺失有利于前列腺癌细胞在循环中存留。研究还表明,巨噬细胞能够捕获、吞噬和消化 PC-3 细胞,因此吞噬作用可能是造成 CTC 消耗动力学变化的原因。除此之外,昼夜节律也会影响 CTC 数量。Zhu 等^[36]利用 IVFC 对前列腺小鼠模型中的 CTC 进行无创监测,结果表明,CTC 在癌症进展过程中表现出随机突变,在早期阶段爆发活动的概率高于晚期阶段。24 小时的纵向监测结果显示,CTC 数量每天都有显著振荡,在夜晚(啮齿动物的活跃期)开始时达到峰值,这表明 CTC 的释放可能受昼夜节律的调节。为了研究 CTC 数量与肿瘤转移的相关性,Zhao 等^[37]参考 IVFC 的工作原理,使用共聚焦显微镜系统,通过对血管进行连续快速线性扫描来检测前列腺癌皮下瘤模型小鼠体内血管中流动的 CTC。该研究使用异丁基甲基黄嘌呤(IBMx)调整血流以增加 CTC 数量。结果表明,IBMx 组小鼠监测到的 CTC 数量增多,但转移率更低,说明转移与 CTC 数量并无直接关系,可能主要由具有更多干性和存活能力的 CTC 团块决定。Suo 等^[30]通过分析 IVFC 信号峰模式区分单个 CTC 和 CTC 团块,发现前列腺癌皮下瘤小鼠模型转移过程中 CTC 团块比例显著增加,说明转移风险随着肿瘤的发展逐渐增加。

目前有多种方法可以对前列腺癌进行治疗,IVFC 可以研究不同治疗方法对于转移的影响。雄激素剥夺治疗(ADT)是用于前列腺癌的关键治疗方法,主要通过降低男性体内的雄激素水平来抑制前列腺癌细胞的生长。Pang 等^[34]利用 IVFC 结合超声波成像技术对 PC-3 细胞系建立的前列腺肿瘤模型进行检测,结果表明,ADT 治疗通过抑制肿瘤增殖和肿瘤血管生成来减

少原位瘤模型的 CTC 数量,限制肿瘤生长,并抑制远端转移。射频消融术(RFA)是一种微创介入的治疗方式,已应用于前列腺癌治疗。Zhu 等^[38]利用 IVFC 监测了 RFA 对于前列腺癌原位模型小鼠的影响,结果表明 CTC 在 RFA 过程中急剧增加,且治疗后 RFA 组比切除组观察到更多的肺转移灶,这说明与切除术相比,RFA 会导致肿瘤细胞立即扩散并向远处转移,从而降低生存率。除了常规治疗前列腺癌的方法,光动力疗法、光热疗法、基因疗法等^[39-40]新兴的治疗模式也被提出并得到证实。为了提高这些新兴方法的抗癌效率,具有高光热效应的新型药剂,如金纳米颗粒^[41],也成了研究热点。这些新兴治疗方法和药剂虽然具有良好的应用前景,但是对肿瘤转移的影响还有待研究。Pang 等^[42]利用 IVFC 动态监测了不同浓度纳米颗粒治疗的肿瘤小鼠,结果表明,金纳米颗粒诱导血管内皮壁出现剂量依赖性间隙,从而加速了 CTC 的形成,高剂量的纳米颗粒显著促进前列腺癌的转移,而使用生物相容性材料进行封装则能减轻纳米颗粒对癌症转移的促进作用。

4.3 乳腺癌

目前,乳腺癌已成为女性最常被诊断的癌症,也是全球最常被诊断的癌症之一,据估计 2020 年有 230 万新发病例,南美、非洲和亚洲转型国家的乳腺癌发病率在迅速上升^[2]。乳腺癌可以转移扩散到身体的其他部位,尤其是骨骼、肝脏、肺部、淋巴结和大脑。对乳腺癌转移进行研究将有助于开发新的治疗方法和治疗药剂,延长病人生存期,降低死亡率。

利用 IVFC 监测血液中的循环细胞,可以对乳腺癌肿瘤转移进行初步的预测或评估。Hwu 等^[43]利用双色 IVFC 检测了表达 GFP 的循环人源乳腺癌细胞数量和具有强自荧光的循环造血细胞群的变化,研究发现在植入后 7 天检测到的 CTC 数量与红色自发荧光细胞(650~690 nm)的数量相结合,可预测 8 周后肿瘤的形成和转移。Nolan 等^[44]利用双通道 IVFC 检测 Annexin-V 和 GFP 标记的 MDA-MB-231 细胞来区分体内凋亡的 CTC,通过分析凋亡与存活 CTC 的比例,可以直接在血液循环中评估肿瘤的转移潜力。

由于 IVFC 可以用来监测血液循环中的粒子,所以利用 IVFC 可以对相关颗粒的清除动力学等在血液中的行为进行研究。Wei 等^[45]利用图像 IVFC 观察了乳腺癌 CTC 和树突状细胞(DC)的相互作用,同时分析了它们的移动速度,发现与单个 CTC 或 DC 相比,CTC-DC 簇的移动速度更慢。Nolan 等^[46]利用双光束时差光声荧光 IVFC 测量 CTC 和包括外泌体、纳米颗粒和微颗粒等粒子的肿瘤相关颗粒(CTP),发现癌症早期阶段 CTP 的浓度高于 CTC。Aceto 等^[47]在对 CTC 团块和乳腺癌转移之间的关系进行研究时,利用 IVFC 分析了 CTC 团块的清除动力学,发现 CTC 团块的循环半衰期比单个 CTC 短。这些结果为乳腺癌转

移相关分析提供了新的见解。

IVFC 还可以用来研究不同治疗方法对乳腺癌转移的影响,监测新型治疗方法或治疗药剂对转移的作用。Juratli 等^[48]利用 IVFC 对 MDA-MB-231 细胞系皮下瘤模型进行检测,发现加压、活检和激光治疗会使 CTC 数量大幅增加,而肿瘤切除则能够显著减少 CTC 数量。Weng 等^[49]利用 IVFC 检测光动力疗法(PDT)对乳腺癌转移的影响,结果表明,与切除相比,PDT 治疗后 CTC 数量较低,原发肿瘤复发时间推迟,肺和肝转移减弱。乳积方是一种已有十余年临床应用历史的治疗乳腺癌的传统中药配方^[50],Zhang 等^[51]利用 IVFC 检测乳腺癌原位模型研究乳积方治疗对乳腺癌转移的作用。结果表明,乳积方可以减少 CTC 数量,抑制乳腺癌远端转移。近些年,靶向药物治疗越来越受到关注,双色 IVFC 可以通过分析双阳信号检测材料对 CTC 的靶向作用。Zhang 等^[52]利用双色 IVFC 检测了 CFSE 标记的 MDA-MB-231 细胞与 BODIPY 标记的 P-选择素靶向肽修饰的氧化还原反应型紫杉醇载药胶束(PSN-PEG-SS-PTX4)之间的相互作用,结果表明,PSN-PEG-SS-PTX4 胶束能捕获血液循环中的 CTC,且能有效抑制乳腺癌的肺转移,并降低远处肝转移的发生率。Xia 等^[53]利用双色 IVFC 检测了 CFSE 标记的 4T1 细胞和 DiD 标记的人参皂苷 Rg3 脂质体(Rg3-Lp),通过分析双阳信号证明了 Rg3-Lp 对 CTC 的靶向作用,Rg3 与 CTC 一起进入肺部后抑制了转移灶的形成,展现出较好的转移抑制能力。

4.4 黑色素瘤

黑色素瘤是一种皮肤癌,由黑色素细胞发展而来,是最具侵略性的皮肤癌之一,全球黑色素瘤的发病率正在上升,尤其是在人群皮肤白皙且紫外线辐射强烈的国家^[2]。相比之下,亚洲人群的黑色素瘤发病率普遍较低,但仍有一定风险。黑色素瘤如果不及早发现和治疗,可能会转移到身体的其他部位,因此对黑色素瘤转移的研究也至关重要。

光声 IVFC 能灵敏地检测色素细胞,所以可以无创地监测血液中的黑色素瘤细胞。Juratli 等^[48]利用光声荧光 IVFC 对 GFP 标记的小鼠黑色素瘤(B16F10)细胞进行检测,研究了加压、活检和切除对外周血中 CTC 数量的影响。研究表明,加压和活检会增加 CTC 数量,而肿瘤完全切除可以显著减少 CTC 数量。Galanzha 等^[54]利用二极管激光双色光声 IVFC 成功实现在体内无创、无标记地检测和消除循环转移性黑色素瘤细胞。Nedosekin 等^[55]利用基于近红外高脉冲率激光器的光声 IVFC 对循环中的人类黑色素瘤细胞进行活体超快速检测。He 等^[56]开发了一种结合纳秒脉冲黑色素瘤特异性激光治疗机制的双波长光声成像 IVFC,成功实现对小鼠动脉和静脉中单个循环黑色素瘤细胞的体内无标记检测,同时可以以热封闭方式当场杀死黑色素瘤细胞,有望促进转移瘤的早期治疗。

5 总结与展望

IVFC 是一项利用光学手段在体实时监测血液中循环细胞的新兴技术,自提出以来结合光声成像、计算机视觉等原理已发展出多条技术路线。与传统的体外检测方法相比,IVFC 作为体内光学技术,具有更高的时间分辨率和非侵入等优势。由于 IVFC 可以用于活体监测肿瘤转移的生物标志物——CTC,因此 IVFC 结合超声波成像、小动物活体成像等技术可以对肿瘤转移进行研究。本文回顾了 IVFC 的不同种类和 IVFC 应用于不同癌症类型的研究,表明了其在肿瘤转移研究中的无限潜力。

IVFC 虽然已经拥有了广泛的应用,但是其发展还是面临着巨大的挑战。作为光学技术,IVFC 会受到光散射的影响,因此只能检测浅表血管。目前的研究中,光声 IVFC 可以达到更深的监测深度,但是灵敏度也会降低,所以更大的检测深度是 IVFC 未来发展的挑战之一。在临床应用中,可以对浅表血管或眼睛进行监测,或者借助内窥技术解决这一问题。IVFC 也同样受到光学分辨率限制的影响,无法直接监测粒径在纳米尺寸的纳米颗粒和外泌体。虽然现有研究表明可以通过分析 IVFC 信号基线高度和信号峰来判断纳米尺寸粒子的浓度变化和团聚情况^[19],但是这种方法有最低检测浓度限制,应用场景有限。因此,提高检测分辨率也是 IVFC 未来的发展方向之一。除此之外,IVFC 检测通常需要对待测粒子进行荧光标记,这限制了该技术的临床应用。光声 IVFC 虽然可以无标记检测,但是受限于检测原理,只能对黑色素瘤细胞进行研究。虽然如此,最近的一项研究证明了 2-N-(7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-氨基)-2-脱氧葡萄糖(2-NBDG)可通过静脉注射活体标记 CTC^[57],这说明了随着荧光探针和标记方法的发展,IVFC 有望进行更深入的临床应用,例如肿瘤早期检测、治疗效果监测、疾病进展预测等。由于 IVFC 可以实时监测循环肿瘤细胞的动态变化,若能在肿瘤发展初期对 CTC 进行监测,就可以更早地预测肿瘤转移的形成,而在治疗过后监测 CTC 同样可以对治疗效果进行判断,从而为患者接下来的治疗提供辅助信息。

参 考 文 献

- [1] Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: a systematic analysis for the global burden of disease study [J]. *JAMA Oncology*, 2019, 5(12): 1749-1768.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209-249.

- [3] Siegel R L, Miller K D, Wagle N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2023, 73(1): 17-48.
- [4] Feng R M, Zong Y N, Cao S M, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. *Cancer Communications*, 2019, 39(1): 1-12.
- [5] Cao W, Chen H D, Yu Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. *Chinese Medical Journal*, 2021, 134: 783-791.
- [6] Gupta G P, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework[J]. *Cell*, 2006, 127(4): 679-695.
- [7] Pantel K, Speicher M R. The biology of circulating tumor cells[J]. *Oncogene*, 2016, 35(10): 1216-1224.
- [8] Paterlini-Brechot P, Benali N L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions[J]. *Cancer Letters*, 2007, 253(2): 180-204.
- [9] Takao M, Takeda K. Enumeration, characterization, and collection of intact circulating tumor cells by cross contamination-free flow cytometry[J]. *Cytometry Part A*, 2011, 79(2): 107-117.
- [10] 韩广, 丰昊, 陈思琪, 等. 基于扩散相干散斑成像技术的局部脑血流量检测方法[J]. *光学学报*, 2023, 43(7): 0717002.
Han G, Feng H, Chen S Q, et al. Detection method of regional cerebral blood flow based on interferometric diffusing speckle contrast imaging technology[J]. *Acta Optica Sinica*, 2023, 43(7): 0717002.
- [11] 张子艺, 俞晨阳, 乔依琳, 等. 显微集成术中光学相干断层血流造影术[J]. *中国激光*, 2022, 49(15): 1507301.
Zhang Z Y, Yu C Y, Qiao Y L, et al. Intraoperative optical coherence tomography angiography with micro integration[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(15): 1507301.
- [12] 孙彤, 黄国家, 张振辉. 基于高分辨光声显微成像的肝癌微血管特征分析[J]. *中国激光*, 2023, 50(15): 1507105.
Sun T, Huang G J, Zhang Z H. Characteristics analysis of micro-vessels liver cancer based on high resolution photoacoustic microscopy[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2023, 50(15): 1507105.
- [13] Irene G, Nicolas S, John N, et al. *In vivo* flow cytometry: a new method for enumerating circulating cancer cells[J]. *Cancer Research*, 2004, 64(15): 5044-5047.
- [14] Novak J, Georgakoudi I, Wei X, et al. *In vivo* flow cytometer for real-time detection and quantification of circulating cells[J]. *Optics Letters*, 2004, 29(1): 77-79.
- [15] Sipkins D A, Wei X B, Wu J W, et al. *In vivo* imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment[J]. *Nature*, 2005, 435(7044): 969-973.
- [16] Xie C Y, Yang Z R, Suo Y Z, et al. Systemically infused mesenchymal stem cells show different homing profiles in healthy and tumor mouse models[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2017, 6(4): 1120-1131.

- [17] Fan Z G, Spencer J A, Lu Y, et al. *In vivo* tracking of “color-coded” effector, natural and induced regulatory T cells in the allograft response[J]. *Nature Medicine*, 2010, 16(6): 718-722.
- [18] Fan Z C, Yan J, Liu G D, et al. Real-time monitoring of rare circulating hepatocellular carcinoma cells in an orthotopic model by *in vivo* flow cytometry assesses resection on metastasis[J]. *Cancer Research*, 2012, 72(10): 2683-2691.
- [19] Wei D, Pang K, Song Q X, et al. Noninvasive monitoring of nanoparticle clearance and aggregation in blood circulation by *in vivo* flow cytometry[J]. *Journal of Controlled Release*, 2018, 278: 66-73.
- [20] Zimmermann J. Trash your agar plates! Blood stream bacteria are now quantified by *in vivo* flow cytometry[J]. *Cytometry Part A*, 2020, 97(9): 869-871.
- [21] Zharov V P, Galanzha E I, Shashkov E V, et al. *In vivo* photoacoustic flow cytometry for monitoring of circulating single cancer cells and contrast agents[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(24): 3623-3625.
- [22] Zettergren E, Vickers D, Runnels J, et al. Instrument for fluorescence sensing of circulating cells with diffuse light in mice *in vivo*[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(3): 037001.
- [23] Markovic S, Li B L, Pera V, et al. A computer vision approach to rare cell *in vivo* fluorescence flow cytometry [J]. *Cytometry Part A*, 2013, 83(12): 1113-1123.
- [24] Suo Y Z, Liu T, Xie C Y, et al. Near infrared *in vivo* flow cytometry for tracking fluorescent circulating cells [J]. *Cytometry Part A*, 2015, 87(9): 878-884.
- [25] Zeng X J, Wei D, Wei X B. Background modeling method to identify interactions between circulating tumor cells and dendritic cells[C]//2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), July 18-21, 2018, Honolulu, HI, USA. New York: IEEE Press, 2018: 806-809.
- [26] Boutrus S, Greiner C A, Hwu D, et al. Portable two-color *in vivo* flow cytometer for real-time detection of fluorescently-labeled circulating cells[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, 12(2): 020507.
- [27] Markovic S, Li S Y, Niedre M. Performance of computer vision *in vivo* flow cytometry with low fluorescence contrast[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(3): 035005.
- [28] Li Y, Fan Z C, Guo J, et al. Circulation times of hepatocellular carcinoma cells by *in vivo* flow cytometry [J]. *Chinese Optics Letters*, 2010, 8(10): 953-956.
- [29] Li Y, Guo J, Wang C F, et al. Circulation times of prostate cancer and hepatocellular carcinoma cells by *in vivo* flow cytometry[J]. *Cytometry Part A*, 2011, 79A(10): 848-854.
- [30] Suo Y Z, Xie C Y, Zhu X, et al. Proportion of circulating tumor cell clusters increases during cancer metastasis[J]. *Cytometry Part A*, 2017, 91(3): 250-253.
- [31] Spaeth E L, Dembinski J L, Sasser A K, et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression[J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e4992.
- [32] Wei D, Fan Z C, Wang X D, et al. *In vivo* flow cytometry visualizes the effects of tumor resection on metastasis by real-time monitoring of rare circulating cancer cells[J]. *Proceedings of SPIE*, 2013, 8582: 85820F.
- [33] Yan J, Fan Z C, Wu X F, et al. Circulating tumor cells are correlated with disease progression and treatment response in an orthotopic hepatocellular carcinoma model [J]. *Cytometry Part A*, 2015, 87(11): 1020-1028.
- [34] Pang K, Xie C Y, Yang Z R, et al. Monitoring circulating prostate cancer cells by *in vivo* flow cytometry assesses androgen deprivation therapy on metastasis[J]. *Cytometry Part A*, 2018, 93(5): 517-524.
- [35] Guo J, Fan Z C, Gu Z Q, et al. Studying the role of macrophages in circulating prostate cancer cells by *in vivo* flow cytometry[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2012, 5(4): 1250027.
- [36] Zhu X, Suo Y Z, Fu Y T, et al. *In vivo* flow cytometry reveals a circadian rhythm of circulating tumor cells[J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10: 110.
- [37] Zhao X H, Qi Z, Gao Z, et al. High counting of circulating tumor cells in blood is not directly related to metastasis[J]. *Cytometry Part A*, 2023, 103(1): 82-87.
- [38] Zhu X, Wei C, Zhang Y, et al. Monitoring radiofrequency therapy-induced tumor cell dissemination by *in vivo* flow cytometry[J]. *Cytometry Part A*, 2021, 99(6): 593-600.
- [39] Agostinis P, Berg K, Cengel K A, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, 61(4): 250-281.
- [40] Liu Y J, Bhattarai P, Dai Z F, et al. Photothermal therapy and photoacoustic imaging via nanotheranostics in fighting cancer[J]. *Chemical Society Reviews*, 2019, 48(7): 2053-2108.
- [41] Cheng X J, Sun R, Yin L, et al. Light-triggered assembly of gold nanoparticles for photothermal therapy and photoacoustic imaging of tumors *in vivo*[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(6): 1604894.
- [42] Pang W, Ding S H, Lin L Y, et al. Noninvasive and real-time monitoring of Au nanoparticle promoted cancer metastasis using *in vivo* flow cytometry[J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 12(4): 1846-1857.
- [43] Hwu D, Boutrus S, Greiner C A, et al. Assessment of the role of circulating breast cancer cells in tumor formation and metastatic potential using *in vivo* flow cytometry[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(4): 040501.
- [44] Nolan J, Nedosekin D A, Galanzha E I, et al. Detection of apoptotic circulating tumor cells using *in vivo* fluorescence flow cytometry[J]. *Cytometry Part A*, 2019, 95(6): 664-671.
- [45] Wei D, Zeng X J, Yang Z R, et al. Visualizing interactions of circulating tumor cell and dendritic cell in the blood circulation using *in vivo* imaging flow cytometry [J]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2019, 66(9): 2521-2526.

- [46] Nolan J, Sarimollaoglu M, Nedosekin D A, et al. *In vivo* flow cytometry of circulating tumor-associated exosomes[J]. *Analytical Cellular Pathology*, 2016, 2016: 1628057.
- [47] Aceto N, Bardia A, Miyamoto D T, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis[J]. *Cell*, 2014, 158(5): 1110-1122.
- [48] Juratli M, Sarimollaoglu M, Siegel E, et al. Real-time monitoring of circulating tumor cell release during tumor manipulation using *in vivo* photoacoustic and fluorescent flow cytometry[J]. *Head and Neck*, 2014, 36(8): 1207-1215.
- [49] Weng X F, Wei D, Yang Z R, et al. Photodynamic therapy reduces metastasis of breast cancer by minimizing circulating tumor cells[J]. *Biomedical Optics Express*, 2021, 12(7): 3878-3886.
- [50] 田华琴, 王艳杰, 王斌, 等. 乳积方对女性乳腺癌术后患者生存状况的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(10): 1336-1340.
- Tian H Q, Wang Y J, Wang B, et al. Effect of ruji recipe on the post-surgical survival of female breast cancer patients[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2013, 33(10): 1336-1340.
- [51] Zhang F L, Li H L, Lin X, et al. *In vivo* flow cytometry reveals an anti-metastatic effect of Rujifang in triple-negative breast cancer[J]. *Cytometry Part A*, 2023, 103(9): 723-731.
- [52] Zhang Y J, Zhu X, Chen X L, et al. Activated platelets-targeting micelles with controlled drug release for effective treatment of primary and metastatic triple negative breast cancer[J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29(13): 1806620.
- [53] Xia J X, Ma S J, Zhu X, et al. Versatile ginsenoside Rg3 liposomes inhibit tumor metastasis by capturing circulating tumor cells and destroying metastatic niches [J]. *Science Advances*, 2022, 8(6): eabj1262.
- [54] Galanzha E I, Shashkov E V, Spring P M, et al. *In vivo*, noninvasive, label-free detection and eradication of circulating metastatic melanoma cells using two-color photoacoustic flow cytometry with a diode laser[J]. *Cancer Research*, 2009, 69(20): 7926-7934.
- [55] Nedosekin D A, Sarimollaoglu M, Ye J H, et al. *In vivo* ultra-fast photoacoustic flow cytometry of circulating human melanoma cells using near-infrared high-pulse rate lasers[J]. *Cytometry Part A*, 2011, 79A(10): 825-833.
- [56] He Y, Wang L D, Shi J H, et al. *In vivo* label-free photoacoustic flow cytography and on-the-spot laser killing of single circulating melanoma cells[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 39616.
- [57] Weng X F, Wei D, Zhu X, et al. Real-time monitoring of single circulating tumor cells with a fluorescently labeled deoxy-glucose by *in vivo* flow cytometry[J]. *Cytometry Part A*, 2021, 99(6): 586-592.