



doi: 10.12452/j.fxcxb.26043007

苯硼酸功能化纳米鱼骨芯片实现肿瘤外泌体高特异性分离分析

田瑞婷^{1,2}, 康倩^{1,2}, 张鹏^{1,2*}, 杨朝勇^{1,2,3*}

(1. 上海大学 生命科学学院, 上海 200444; 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院 分子医学研究所, 上海 200120; 3. 厦门大学 化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 胰腺癌的早期精准诊断是提升患者生存率的核心突破口。基于外泌体的液体活检虽展现出巨大潜力并受到广泛关注, 但现有血液胰腺癌外泌体分离方法仍面临两大瓶颈: 层流微流控芯片内反应效率低下, 且缺乏高特异性的肿瘤外泌体蛋白靶标, 导致分离特异性和效率严重受限。针对上述挑战, 该研究构建了一种苯硼酸功能化的三维纳米鱼骨微流控芯片, 利用肿瘤外泌体表面异常高表达的糖基化顺式二醇结构与苯硼酸之间的共价结合, 实现对肿瘤外泌体的广谱、高亲和力识别; 同时, 有序堆积的纳米鱼骨阵列可诱导产生微涡流, 突破层流边界层, 显著增强外泌体与芯片界面的碰撞与结合效率。结果显示, 该芯片对 PANC-1、SW1990 和 PACA-2 三种胰腺癌细胞外泌体的捕获效率均达约 85%, 而正常胰腺细胞 hTERT-HPNE 外泌体结合极弱, 经肽 N-糖苷酶 F (PNGase F) 切除 N-糖链的肿瘤外泌体则几乎完全丧失被捕获的能力, 确证了芯片的特异性捕获依赖于糖基识别。在此基础上, 芯片进一步集成原位酶促荧光信号放大, 成功实现了对同一样品中前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、癌胚抗原 (CEA)、黏蛋白-1 (MUC-1)、核仁素 (NCL)、蛋白酪氨酸激酶-7 (PTK7) 和上皮细胞黏附分子 (EpCAM) 六种胰腺癌相关膜蛋白标志物的同步分子分型。六种标志物在肿瘤外泌体中均呈显著高表达, 且不同细胞系展现出特征性的表达图谱, 表明该芯片具备区分肿瘤与正常来源外泌体以及识别胰腺癌分子亚型的能力。该研究将糖基化学识别、高效流体传质与多靶标分子分型一体化集成, 为胰腺癌早期液体活检提供了一种不依赖抗体分离、高特异性、多维信息输出的新技术平台, 在胰腺癌临床精准诊断与分子分型中展现出重要的应用前景。

关键词: 微流控芯片; 外泌体; 液体活检; 疾病标志物; 胰腺癌诊断

中图分类号: O657; TB383 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)09-1924-09

Phenylboronic Acid-Functionalized Nano-Herringbone Chip for Highly Specific Separation and Molecular Analysis of Tumor Exosomes

TIAN Rui-ting^{1,2}, KANG Qian^{1,2}, ZHANG Peng^{1,2*}, YANG Chao-yong^{1,2,3*}

(1. School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. Institute of Molecular Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200120, China; 3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Early and accurate diagnosis of pancreatic cancer represents a pivotal breakthrough for improving patient survival. Although exosome-based liquid biopsy has demonstrated immense promise and attracted widespread attention, existing methods for isolating pancreatic cancer exosomes from blood still face two major bottlenecks: low reaction efficiency within laminar-flow microchips and the lack of tumor-specific exosomal protein markers, which severely compromise both separation specificity and efficiency. To tackle these limitations, this study developed a phenylboronic acid-functionalized three-dimensional nano-herringbone microfluidic chip. By exploiting the covalent binding between phenylboronic acid and the aberrantly overexpressed glycosylated cis-diol structures on tumor

收稿日期: 2026-04-30; 修回日期: 2026-05-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (22374097)

* 通讯作者: 张鹏, 博士, 研究员, 研究方向: 微流控外泌体分离分析, E-mail: pengzhang016@sjtu.edu.cn
杨朝勇, 博士, 教授, 研究方向: 微流控技术在生物医学中的应用, E-mail: cyyang@xmu.edu.cn

网络首发日期: 2026-05-28

exosome surfaces, the chip achieves broad-spectrum, high-affinity recognition of tumor-derived exosomes. Simultaneously, the periodically ordered nano-herringbone array induces microvortices that disrupt the laminar diffusion boundary layer, substantially enhancing the collision and binding efficiency between exosomes and the chip interface. The results demonstrated that the chip achieved a capture efficiency of approximately 85% for exosomes derived from three pancreatic cancer cell lines, PANC-1, SW1990, and PACA-2. In stark contrast, exosomes from normal pancreatic hTERT-HPNE cells exhibited minimal binding, and tumor exosomes subjected to PNGase F-mediated N-glycan cleavage lost nearly all ability to be captured, definitively confirming that the chip's specific capture is dependent on glycan recognition. Building upon this capability, the chip further integrates in situ enzymatic fluorescence signal amplification, successfully enabling simultaneous molecular profiling of six pancreatic cancer-associated membrane protein markers prostate-specific membrane antigen (PSMA), carcinoembryonic antigen (CEA), mucin 1 (MUC-1), nucleolin (NCL), protein tyrosine kinase 7 (PTK7), and epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) within a single sample. All six markers were significantly overexpressed in tumor-derived exosomes, and distinct cell lines displayed characteristic expression signatures, demonstrating the chip's capacity to distinguish tumor-derived from normal exosomes and to identify pancreatic cancer molecular subtypes. By integrating glycan-based chemical recognition, efficient fluidic mass transport, and multiplexed molecular profiling into a unified platform, this study provides a novel, antibody-independent separation, highly specific, and multi-dimensional information-enriched technology for early pancreatic cancer liquid biopsy, exhibiting significant application prospects in the clinical accurate diagnosis and molecular subtyping of pancreatic cancer.

Key words: microfluidic chip; exosome; liquid biopsy; biomarker; pancreatic cancer

胰腺癌发病隐匿、进展迅速,素有“癌王”之称,5年生存率极低^[1]。传统的影像学检查与血清蛋白标志物,如糖类抗原19-9(CA 19-9)在检测灵敏度和诊断特异性方面仍然存在局限,导致胰腺癌早期精准诊断困难,严重影响胰腺癌的治疗效果^[2]。以血液标志物检测为代表的液体活检,在肿瘤的早期诊断和治疗监测中展现出诸多优势,受到广泛关注^[3]。外泌体(Exosomes)作为液体活检的新兴靶标,已在疾病液体活检中展现出重大的科研价值和临床潜力^[4-5]。外泌体是一类由细胞主动分泌至体液的纳米级膜囊泡(30~150 nm),其数量相对丰富,脂质双层膜结构赋予其良好的稳定性,能够保护内部运载的核酸及蛋白质等功能分子不被降解^[6]。尤为关键的是,外泌体携带着母细胞的分子指纹,其表面蛋白、核酸及糖基化特征与肿瘤的发生、转移及免疫逃逸密切相关,能够在宏观病灶形成之前反映病理变化^[7-8]。因此,从复杂体液中高纯度、高效率地分离出胰腺癌来源的外泌体,是实现其下游分子解析和临床诊断的前提。

生物体液组分复杂,存在诸多类似外泌体的膜结构纳米颗粒的干扰^[9];外泌体因其生成母细胞的来源不同,分子分型也差异巨大^[10]。从生物体液中高特异性、高效率地分离富集靶标外泌体,对基于外泌体的液体活检研究具有重要意义。传统的超速离心法虽是应用最广的“金标准”,但存在耗时长、依赖昂贵大型设备、纯度有限且易破坏外泌体完整性等缺陷。尺寸排阻与聚合物沉淀法虽操作简单、分离通量高,但外泌体纯度稍显不足。近年来,微流控芯片以其集成化、低样品消耗和高检测性能等优势,成为外泌体分离的前沿平台^[11-12]。基于免疫亲和的分离策略,通过在芯片界面固定CD63、EpCAM等特异性抗体,显著提升了外泌体分离的特异性和纯度。然而,抗体的高成本、批次差异及苛刻的储存条件限制了其临床转化潜力。更重要的是,目前尚缺乏特异性外泌体膜蛋白靶标,以实现疾病外泌体亚群的精准识别与分离。

糖基化异常表达与肿瘤恶性演进密切相关,为肿瘤外泌体靶向分离提供了生物学基础。蛋白质的糖基化高表达是恶性肿瘤公认的标志之一^[13]。在肿瘤发生发展过程中,糖基转移酶和糖苷酶的表达及活性发生显著改变,导致细胞表面糖蛋白和糖脂出现截短的O-聚糖(如Tn和sialyl-Tn抗原)、高度分支化的N-聚糖以及唾液酸化与岩藻糖化水平升高等异常结构^[14]。这些异常糖基化不仅直接参与肿瘤细胞的增殖、侵袭和上皮-间质转化,还通过重塑免疫微环境协助肿瘤实现免疫逃逸。肿瘤来源的外泌体膜表面继承了亲代细胞的异常糖基化特征,其聚糖丰度与结构异质性显著高于正常细胞来源的外泌体,

为区分肿瘤外泌体与正常外泌体提供了独特的“糖基指纹”^[15]。然而,目前通用的凝集素糖基检测探针,往往只能识别一种或少数几种糖型,难以全面覆盖因糖基化高度异质性而呈现的多样化外泌体亚群。因此,直接靶向外泌体表面异常高表达的顺式二醇基团,而非某一种特定蛋白抗原,能够突破传统免疫亲和法的局限,实现更广谱、更高效的肿瘤外泌体富集。

针对上述挑战,本研究构建了一种苯硼酸功能化的纳米鱼骨芯片,用于胰腺癌外泌体的高特异性分离与标志物液体活检。二氧化硅微球自组装形成的三维多孔纳米鱼骨结构,能够有效诱导微涡流,打破界面流体边界层,大幅增强外泌体与芯片界面的碰撞反应概率;纳米鱼骨结构表面修饰了苯硼酸(PBA),可在生理pH条件下与糖类分子上的顺式二醇基团高效形成稳定的硼酸酯键,实现糖基高表达的肿瘤特异性外泌体的选择性分离与富集。研究表明,该芯片对PANC-1、SW1990、PACA-2等多种胰腺癌细胞系来源的外泌体均实现约85%的高捕获效率。作为对比,经肽N-糖苷酶F(PNGase F)切除N-糖链的阴性对照外泌体及正常胰腺导管上皮细胞hTERT-HPNE来源的外泌体均显示极低的非特异性吸附,证实了该芯片对肿瘤异常糖基化外泌体的识别特异性。芯片分离得到的肿瘤外泌体,通过荧光标记与信号放大检测,实现对前列腺特异性膜抗原(PSMA)、癌胚抗原(CEA)、黏蛋白-1(MUC-1)、核仁素(NCL)、蛋白酪氨酸激酶-7(PTK7)和上皮细胞黏附分子(EpCAM)的分子分型检测。相比于正常胰腺细胞来源的阴性外泌体,胰腺癌外泌体在上述六种标志物上显著高表达,展现了其在胰腺癌体外诊断中的应用潜力。

1 实验部分

1.1 苯硼酸功能化纳米鱼骨芯片制备

1.1.1 芯片模板制备 采用标准软光刻技术制备鱼骨结构微流控芯片模板。将SU-8负性光刻胶旋涂于洁净硅片上(转速及时间根据目标厚度20 μm设定),经前烘、紫外曝光(光掩模预先设计有鱼骨状微槽图案)、后烘及显影处理,在硅片表面形成高精度阳模结构。随后,将聚二甲基硅氧烷(PDMS)预聚体与PDMS固化剂按10:1质量比充分混合、真空脱气,倾注于SU-8阳模表面,于80℃烘箱中固化2 h。固化后的PDMS层经切割、打孔后,从阳模上小心揭下,得到带有鱼骨微通道的PDMS盖片。该盖片经氧等离子体单面处理后,与洁净玻片可逆连接,形成密封微流控通道。

1.1.2 硅球自组装鱼骨结构 将单分散二氧化硅纳米微球(粒径约1 μm)分散于水中,配制成质量分数为3%的悬浊液。将该悬浊液注入上述PDMS芯片与鱼骨通道连通的进样槽中,利用毛细力与溶剂蒸发诱导的限域自组装效应,在通道内自发形成三维高度有序的纳米鱼骨堆积结构。自组装完成后,将芯片置于80℃烘箱中干燥1 h,以增强硅球间及硅球与基底间的物理连接。最后揭开自组装芯片,使纳米鱼骨结构与通道芯片键合,组合成纳米鱼骨分析芯片。

1.1.3 芯片界面修饰苯硼酸 将新鲜制备的纳米鱼骨芯片浸入含5% 3-巯丙基三甲氧基硅烷(MPTMS)的无水乙醇溶液中,室温静置反应12 h,使二氧化硅微球表面通过硅烷化反应共价引入—SH基团,作为后续链转移聚合的链转移剂。反应结束后,用70%的乙醇水溶液冲洗芯片三次,去除未结合的MPTMS。随后进行硼酸基团的修饰。将0.3 g 3-丙烯酰胺基苯硼酸(3-AAPBA)溶解于15 mL DMF中,加入3 mg偶氮二异丁腈(AIBN)作为自由基引发剂,充分溶解后经氮气鼓泡除氧30 min,配制成脱氧预聚液。将巯基功能化的芯片浸入该预聚液中,在氮气保护下于80℃反应4 h,完成polyAAPBA聚合物在纳米鱼骨表面的接枝生长。反应结束后,以大量去离子水充分冲洗芯片通道,去除未反应单体和均聚物副产物,氮气流干燥后于4℃保存备用。

1.2 苯硼酸功能化纳米鱼骨芯片表征

采用扫描电子显微镜(SEM)观察纳米鱼骨芯片的截面与表面形貌。样品经喷金处理后,在不同放大倍数下拍摄,以评估二氧化硅微球的堆积有序性、鱼骨结构完整性与三维多孔特征。利用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)验证苯硼酸的功能化修饰:分别收集4-羧基苯硼酸及最终苯硼酸修饰硅球的红外光谱,追踪Si—O、—NH₂弯曲振动峰及苯硼酸B—O和苯环C=C特征峰的变化,确认各步化学修饰成功。芯片的宏观光学特性通过数码相机拍照记录,展示自组装结构在自然光下的布拉格光散射色彩。

1.3 细胞培养与外泌体收集

人胰腺癌细胞系 PANC-1、SW1990、PACA-2 及正常人胰腺导管上皮细胞 hTERT-HPNE 均购自中国科学院细胞库。细胞培养于含 10% 已去除外泌体的胎牛血清 (Exosome-depleted FBS) 的 DMEM 或 RPMI-1640 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中常规传代。待细胞生长至约 80% 融合度时, 收集细胞培养上清液。采用差速超速离心法分离外泌体, 具体流程为: 4 °C 下 300×g 离心 10 min 去除细胞; 2 000×g 离心 20 min 去除死细胞和较大碎片; 10 000×g 离心 30 min 去除大囊泡和细胞器; 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后, 于 4 °C 下 100 000×g 超速离心 70 min, 沉淀即为外泌体粗提物。以磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬洗涤后, 再次重复 100 000×g 离心一次, 以去除余量杂蛋白。最终得到的外泌体用 PBS 混匀分装, -80 °C 冻存备用。

1.4 外泌体表征

1.4.1 SEM 表征 外泌体样品 SEM 分析前需先进行固定和干燥处理。取纯化外泌体悬液 10 μL (约 1×10⁹ particles/mL) 滴加于洁净硅片上, 湿盒中室温吸附固定 30 min。PBS 轻柔冲洗后, 以 4% 戊二醛溶液 4 °C 固定 1 h。PBS 漂洗 3 次, 依次以 30%、50%、70%、80%、90%、95% 及无水乙醇 (两次) 梯度脱水, 每步 10 min。样品经临界点干燥 (液态 CO₂) 后, 以离子溅射仪喷涂金-钼合金 (20 mA, 60 s), 于扫描电子显微镜下 5~10 kV 加速电压观察。

1.4.2 纳米颗粒跟踪分析 (NTA) 表征 采用 NTA 技术测量外泌体的布朗运动, 报告其水合粒径分布、平均粒径及颗粒浓度。每次测量前以标准纳米颗粒校准, 样品用 PBS 稀释至合适浓度使视野内颗粒数在最佳检测区间。

1.4.3 蛋白质免疫印迹法 (Western Blot) 表征 取纯化外泌体悬液, 加入等体积含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min, 期间每 5 min 涡旋振荡 15 s 以充分裂解外泌体膜结构。裂解后于 4 °C、12 000×g 离心 15 min, 取上清液进行 BCA 蛋白定量。取等量蛋白 (约 20 μg), 加入含二硫苏糖醇 (DTT) 的还原型上样缓冲液, 于 95 °C 加热变性 5 min。蛋白样品经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后, 湿转法 (300 mA 恒流, 60 min) 转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。膜用 5% 脱脂牛奶或牛血清白蛋白 (BSA) 室温封闭 1 h, 分别加入兔抗人 CD81 一抗 (1:1000 稀释, 识别四跨膜蛋白阳性标志物) 和兔抗人 Calnexin 一抗 (1:1000 稀释, 识别内质网蛋白阴性标志物), 4 °C 孵育过夜。用 Tris-HCl 缓冲液洗膜 3 次 (每次 10 min), 以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:5000 稀释) 室温孵育 1 h。TBST 再次洗膜 3 次, 滴加增强化学发光底物, 用化学发光凝胶成像系统采集信号图像。

1.5 胰腺癌外泌体芯片分离

芯片使用前, 用含 5% BSA 的 PBS 以 5 μL/min 封闭芯片通道 30 min, 以减少非特异性吸附。胰腺癌细胞外泌体用 PBS 缓冲液 (pH 7.8) 稀释至 1×10⁹ particles/mL, 并用荧光染料 DiO 标记染色。染色后的胰腺癌外泌体以 0.5 μL/min 注入苯硼酸功能化纳米鱼骨芯片, 并在室温下匀速通过并反应 1 h。为对比特异性, 平行设置以下对照组: 以相同条件注入 (i) 正常胰腺 hTERT-HPNE 细胞外泌体; (ii) 提前用 PNGase F 酶切除 N-糖链的 SW1990 外泌体。捕获结束后, 用含 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液温和冲洗通道以去除弱吸附与非特异性结合的外泌体。对 DiO 标记样品, 直接在荧光显微镜下观察并拍摄芯片通道内的荧光图像。捕获效率定义为 (洗脱液中未结合外泌体数量/初始注入外泌体总数)×100%。

1.6 胰腺癌外泌体标志物检测

在芯片捕获外泌体后, 直接对其运载的蛋白标志物进行原位荧光定量检测。六种膜蛋白标志物 (PSMA、CEA、MUC-1、NCL、PTK7 和 EpCAM) 的一抗, 用含 1% BSA 的 PBS 稀释至 20 μg/mL。以 0.5 μL/min 注入纳米鱼骨芯片内, 室温下持续标记 1 h。洗去多余的抗体, 通入 20 ng/mL 的亲素-半乳糖苷酶 (SβG) 反应 5 min。洗去多余 SβG, 通道内充满荧光底物荧光素二 (β-D-吡喃半乳糖苷) (FDG), 避光反应 0.5 h, 再在荧光显微镜下测定通道内荧光信号强度。荧光显微镜的成像参数在所有的的外泌体荧光检测中保持一致, 曝光时间为 500 ms, 相机增益值固定为 1, 物镜倍数为 20× 倍。

2 结果与讨论

2.1 苯硼酸功能化纳米鱼骨芯片设计原理

在微流控芯片上实现外泌体的高效特异性捕获, 面临两个核心挑战: 一是如何克服微尺度层流效应带来的传质限制, 使纳米级囊泡能够充分接触芯片识别界面; 二是如何在缺乏通用型肿瘤外泌体蛋白靶标的情况下, 实现广谱而特异的肿瘤外泌体识别。针对这两大瓶颈, 本芯片采用“化学识别+物理增强”的双重设计理念, 设计并制备了一种苯硼酸功能化的三维纳米鱼骨微流控芯片, 其工作原理及胰腺癌诊断应用流程如图 1 所示。

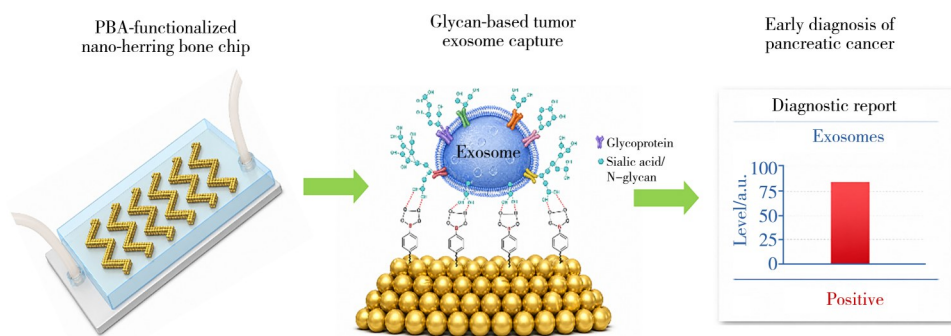


图 1 苯硼酸功能化纳米鱼骨芯片用于肿瘤外泌体特异性分离分析及胰腺癌早期诊断示意图

Fig. 1 Schematic illustration of the phenylboronic acid-functionalized nano-herringbone chip for tumor exosome-specific separation and molecular analysis, and early diagnosis of pancreatic cancer

在化学识别层面, 我们摒弃了传统抗体-抗原的单靶点识别模式, 转而利用苯硼酸基团与顺式二醇之间的可逆共价化学。肿瘤外泌体表面因异常糖基化而普遍高表达唾液酸、截短 O-聚糖等富含顺式二醇结构的聚糖分子, 这些结构在正常细胞来源外泌体上丰度极低。前研究表明^[16-17], 苯硼酸基团在生理 pH 条件下 (PBS 缓冲液, pH 7.8) 可与之快速形成环状硼酸酯键, 将外泌体“锚定”于芯片表面; 而在 pH 降低或游离葡萄糖竞争条件下, 该键合又能迅速解离, 实现捕获与释放的可逆切换。这种不依赖单一蛋白抗原的糖基靶向策略, 从根本上克服了肿瘤外泌体高度异质性带来的识别盲区, 可一次性广谱富集来自不同胰腺癌细胞克隆的外泌体亚群。

在物理增强层面, 纳米鱼骨的三维有序结构是突破传质瓶颈的关键。常规平面微流控芯片在低雷诺数层流条件下, 固液界面处会形成稳定的流体边界层, 纳米级外泌体因扩散系数极小, 极难穿越该边界层与芯片表面接触。参照课题组前期研究成果^[18-20], 我们在芯片通道内通过单分散二氧化硅微球紧密堆积自组装形成周期性有序排列的三维纳米鱼骨结构。前期流体研究结果表明^[18]: 当流体流经这些隆起的鱼骨微结构时, 流线被迫沿鱼骨方向交叉混匀, 并产生垂直于主流动方向的各向异性微涡流。这些微涡流如同无数微型“搅拌子”, 持续将流体本体中的外泌体输送到芯片近壁区域, 不断更新固液界面浓度, 显著增大了外泌体表面糖基与苯硼酸配基的碰撞频率。同时, 纳米微球之间的间隙使鱼骨呈现三维多孔结构, 不仅能有效消除界面粘滞流层, 降低外泌体界面反应阻力, 而且提供了极高的比表面积和多重结合位点, 使得单个外泌体可通过表面多个聚糖分子与芯片形成多价协同结合, 极大增强了整体结合亲和力与捕获稳定性。

这种“化学-物理”协同设计赋予本芯片如下独特性能优势: 第一, 高捕获效率, 在三个数量级以上浓度范围内对多种胰腺癌外泌体均能实现约 85% 的捕获率; 第二, 高特异性, 能准确区分肿瘤与正常细胞外泌体表面糖基化水平的细微差异; 第三, 普适性, 不受单一蛋白标志物表达水平限制, 可拓展应用于不同分子亚型的胰腺癌乃至其他上皮来源肿瘤; 第四, 温和无损, 捕获与释放条件接近生理环境, 释放后的外泌体仍保持完整膜结构和生物活性, 有利于后续功能研究与多组学分析。

2.2 苯硼酸功能化纳米鱼骨芯片表征

根据之前的研究, 苯硼酸功能化纳米鱼骨芯片采用芯片介导纳米颗粒自组装来制备^[18]。图 2A 展示了芯片实物照片, 在自然光照射下, 自组装纳米鱼骨结构呈现出绚丽的虹彩颜色, 这是典型的布拉格 (Bragg) 光散射现象, 直观证明了二氧化硅微球形成了大范围高度有序的周期性排列。SEM 表征进一步

揭示了鱼骨结构的微观细节: 从图2B的立体总体图可见, 二氧化硅微球紧密堆积, 形成了轮廓清晰、周期规整的三维鱼骨状阵列, 其隆起高度均匀, 约为20 μm ; 高倍SEM图像(图2C)显示, 微球粒径均一、呈面心立方密堆积, 球体间留存有大量纳米级间隙孔道。依据面心立方密堆积模型进行了理论计算, 粒径1 μm 硅球之间的理论间隙约为207 nm, 与SEM图上观测的距离一致。这一孔隙间距表明外泌体(30~150 nm)能自由出入多孔结构中, 实现在纳米鱼骨结构上的高捕获效率。傅里叶变换红外光谱(FT-IR, 图2D)为苯硼酸的成功界面修饰提供了坚实证据。苯硼酸功能化后的硅球在约1 340 cm^{-1} 处出现了归属于B—O键伸缩振动的特征吸收峰, 同时芳香环骨架C=C振动峰明显增强, 表明含苯硼酸的有机基团已通过共价键稳定锚定在二氧化硅表面。上述结果表明, 已经成功制备界面苯硼酸功能化的纳米鱼骨芯片。

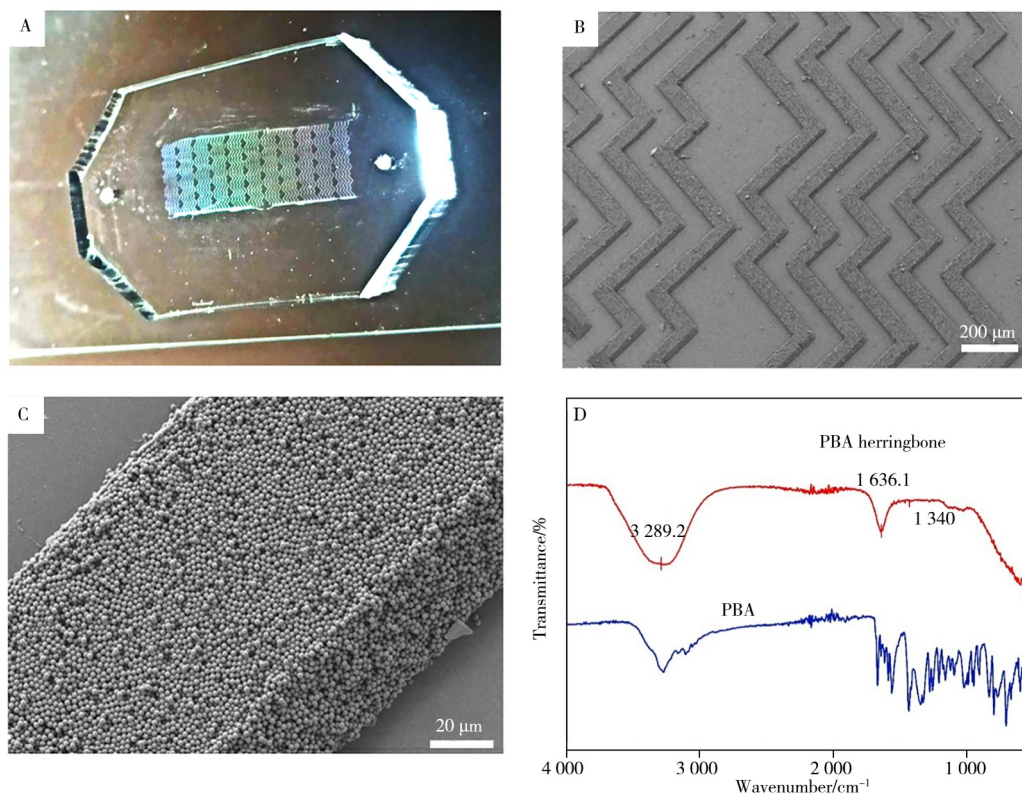


图2 苯硼酸功能化纳米鱼骨芯片

Fig. 2 Phenylboronic acid-functionalized nano-herringbone chip

A: photograph of the chip, with the self-assembled herringbone structure exhibiting the Bragg light scattering effect(芯片实物, 自组装鱼骨结构呈现布拉格光散射效应); B: three-dimensional nano-herringbone structure(三维纳米鱼骨结构); C: highly ordered arrangement of silica microspheres within the nano-herringbone structure(纳米鱼骨结构中二氧化硅微球呈现高度有序状态); D: infrared characterization of the phenylboronic acid-functionalized nano-herringbone chip, showing the characteristic peaks unique to phenylboronic acid(苯硼酸功能化纳米鱼骨芯片红外表征, 展现苯硼酸独有的特征峰)

2.3 胰腺癌外泌体表征

为验证芯片捕获性能, 我们首先培养了三种人胰腺癌细胞系PANC-1、SW1990和PACA-2, 利用超速离心法从其培养上清中分离出外泌体并进行多种表征。SEM图像(图3A)清晰显示, 分离获得的囊泡呈典型的“茶杯状”或碟状凹陷形貌, 具有清晰的膜边界, 这是外泌体在负染干燥过程中的特征形态。对外泌体的蛋白质进行Western Blot分析, 三种外泌体均高表达CD81, 但对非外泌体标志物Calnexin则表达很低, 表明收集到的外泌体纯度较高(图3B)。纳米颗粒跟踪分析(NTA)测定了三株细胞外泌体的粒径分布。PANC-1外泌体平均粒径为147.3 nm(图3C), PACA-2外泌体平均粒径为143.4 nm(图3D), SW1990外泌体平均粒径为123.7 nm(图3E), 三者粒径主要分布在30~150 nm的外泌体典型尺寸范围内, 且粒径分布较窄, 说明分离得到的外泌体纯度较高、囊泡结构完整。SW1990外泌体的平均粒径略小于其他两株, 这可能与其来源的细胞特性及其外泌体生物发生途径的细微差异有关, 但这不影响其作为肿瘤外泌体模型的代表性。

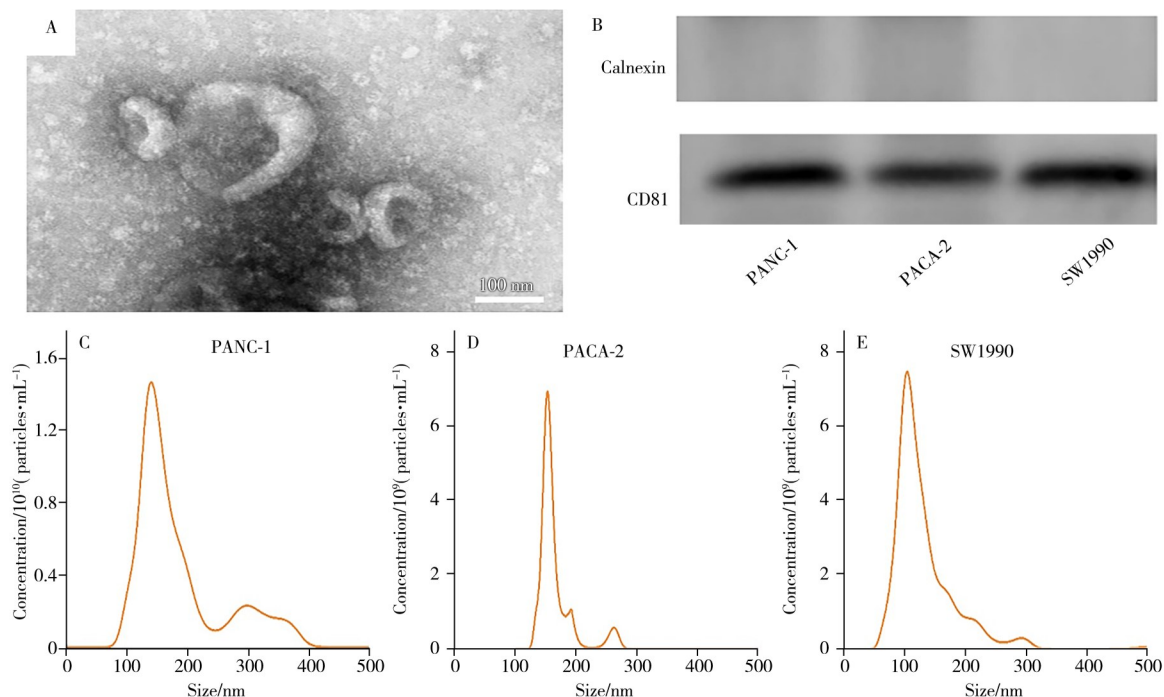


图3 胰腺癌外泌体表征

Fig. 3 Characterization of pancreatic cancer exosomes

A: SEM image of exosomes, displaying the typical cup-shaped morphology(外泌体SEM图, 呈现典型的茶杯状结构); B: western blot characterization of CD81 and Calnexin in exosomes derived from three pancreatic cancer cell lines(PANC-1, PACA-2, SW1990)(三种胰腺癌细胞PACA-2、PANC-1、SW1990外泌体的CD81和Calnexin Western Blot表征图); C: exosomes derived from pancreatic cancer PANC-1 cell line, with a mean particle size of 147.3 nm(胰腺癌PANC-1细胞系外泌体, 平均粒径为147.3 nm); D: exosomes derived from pancreatic cancer PACA-2 cell line, with a mean particle size of 143.4 nm(胰腺癌PACA-2细胞系外泌体, 平均粒径为143.4 nm); E: exosomes derived from pancreatic cancer SW1990 cell line, with a mean particle size of 123.7 nm(胰腺癌SW1990细胞系外泌体, 平均粒径为123.7 nm)

2.4 胰腺癌外泌体高效芯片捕获

为了验证苯硼酸功能化纳米鱼骨芯片对肿瘤外泌体的特异性捕获性能, 通过胰腺癌外泌体荧光成像和效率测算进行评估。如图4A所示, 以DiO荧光染料预标记的SW1990胰腺癌外泌体进样后, 芯片鱼骨通道内观察到强烈且分布均匀的荧光信号, 荧光强度沿鱼骨图案呈清晰的轮廓分布, 表明大量肿瘤外泌体被高效结合在苯硼酸修饰的纳米鱼骨结构界面。这一结合是糖-硼酸化学介导的选择性富集: 在捕获缓冲液(pH 7.8)中, 外泌体膜表面糖蛋白糖链末端或唾液酸上的顺式二醇基团与芯片表面的苯硼酸基团定量形成环状硼酸酯键, 从而“锚定”靶标囊泡。作为对照, 当注入等量的正常胰腺导管上皮细胞hTERT-HPNE来源外泌体时, 芯片通道内仅观察到极其微弱的背景荧光(图4B), 与肿瘤外泌体形成鲜明反差。正常细胞外泌体虽然同样存在表面糖基化, 但其聚糖总体丰度尤其是异常“截短糖链”和唾液酸化水平远低于恶性转化的肿瘤细胞外泌体, 这一糖基指纹的差异被苯硼酸芯片巧妙捕捉并准确地转化为肉眼可辨的信号差异。更为直接的化学证据来自图4C所示的酶切对照组: 用PNGase F酶预先切除SW1990外泌体表面的N-连接糖链后, 其芯片捕获信号急剧衰减至接近空白水平, 完全丧失了被芯片识别和捕获的能力。该结果从化学修饰的正反验证角度确证, 芯片的特异性捕获完全依赖于苯硼酸-顺式二醇糖基的特异性亲和作用, 而非物理嵌顿或非特异性蛋白吸附。

图4D定量统计了三种胰腺癌细胞外泌体的捕获效率, 均达到约85%的高水平, 且三种细胞间无显著差异, 反映了该糖基靶向策略能够广谱覆盖来自不同患者或不同克隆的胰腺癌外泌体亚群, 具有良好的普适性。该优异的捕获效率归因于两个层面: 化学层面, 单个外泌体表面的大量聚糖分子提供了多价键合位点, 导致整体亲和力的协同增强; 物理层面, 三维纳米鱼骨结构不断产生的微涡流将外泌体从主流“推送”至芯片表面, 克服了传统平面芯片的传质限制, 极大增加了分子碰撞频率, 使芯片捕获快速高效。

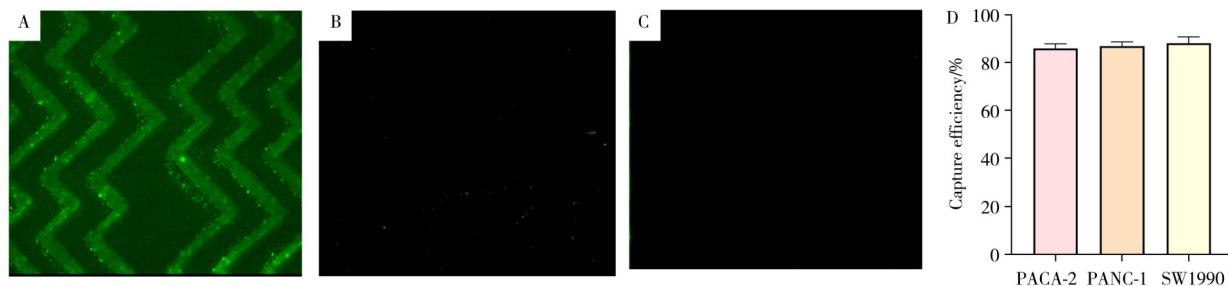


图4 胰腺癌外泌体高效芯片捕获

Fig. 4 Highly efficient on-chip capture of pancreatic cancer exosomes

A: fluorescence image of DiO-stained exosomes derived from pancreatic cancer SW1990 cells captured on the chip (DiO 染色的胰腺癌SW1990 细胞外泌体芯片捕获荧光成像图); B: fluorescence image of exosomes derived from normal pancreatic hTERT-HPNE cells captured on the chip (正常胰腺hTERT-HPNE 细胞外泌体芯片捕获荧光成像图); C: fluorescence image of PNGase F-treated exosomes derived from pancreatic cancer SW1990 cells captured on the chip (PNGase F酶切处理的胰腺癌SW1990 细胞外泌体芯片捕获荧光成像图); D: capture efficiencies of exosomes derived from three pancreatic cancer cell lines: PACA-2, PANC-1, and SW1990 (PACA-2、PANC-1、SW1990 三种胰腺癌 细胞外泌体的芯片捕获效率)

2.5 胰腺癌外泌体分子分型检测

在芯片上对肿瘤外泌体进行高效特异性捕获后,对其运载的肿瘤标志物分子进行定量检测和分子分型,对实现基于外泌体的胰腺癌早期精准诊断具有更高价值。为此,本实验构建了芯片荧光酶信号放大检测方法。通过进行原位免疫荧光标记和酶催化荧光信号放大,同步检测了六种已在文献中被报道与胰腺癌进展和诊断相关的膜蛋白标志物:PSMA、CEA、MUC-1、NCL、PTK7和EpCAM,并以正常hTERT-HPNE 外泌体进行平行对比。结果如图5所示。

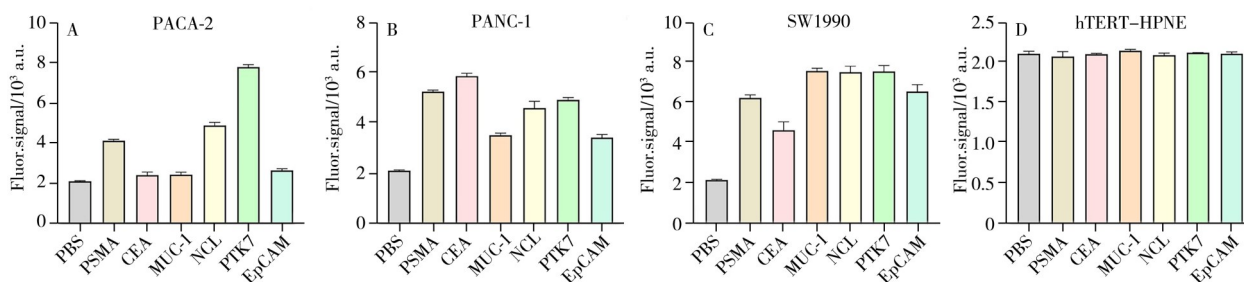


图5 胰腺癌外泌体分子分型:在芯片上对胰腺癌细胞PACA-2(A)、PANC-1(B)、SW1990(C)和正常胰腺细胞hTERT-HPNE(D)外泌体的六种膜蛋白标志物(PSMA、CEA、MUC-1、NCL、PTK7、EpCAM)的荧光定量检测信号图谱(均值 $\pm$ SD, $n=3$)

Fig. 5 On-chip molecular profiling of pancreatic cancer exosomes: fluorescence quantitative detection (mean value $\pm$ SD, $n=3$) and profiling of six membrane protein markers (PSMA, CEA, MUC-1, NCL, PTK7, and EpCAM) on exosomes derived from pancreatic cancer cell lines PACA-2(A), PANC-1(B), SW1990(C), and normal pancreatic cell line hTERT-HPNE(D)

谱图显示出清晰的规律性:三种胰腺癌细胞系(PACA-2, PANC-1, SW1990)的外泌体在六种标志物上均检测到明显高于正常对照的荧光信号,表明这些蛋白在肿瘤外泌体膜上显著富集。其中,MUC-1和CEA的信号在三种癌细胞中普遍较高,这与胰腺癌临床血清学诊断中常用的蛋白标志物趋势吻合,证实了芯片上检测结果的准确性。EpCAM作为经典的循环肿瘤细胞及外泌体上皮来源标志物,同样显示肿瘤组远高于正常组,进一步验证了芯片捕获群体的上皮源性肿瘤特征。值得关注的是,NCL和PTK7这两种相对新兴的肿瘤标志物在胰腺癌外泌体上也有突出的高表达,提示其可能为胰腺癌联合诊断提供额外维度的信息,弥补单一标志物灵敏度和特异性不足的缺陷。三种细胞系的标志物信号图谱呈现出各自略有差异的表达模式,例如PACA-2的PTK7相对更高,SW1990的PSMA最为突出,反映了不同胰腺癌细胞株固有的分子亚型差异。此结果表明,我们构建的芯片兼有“分离”与“分子分型”的能力,能够一次性从微量样品中获取多维分子信息,有望在临床上实现胰腺癌的早期精准诊断。

3 结论

本研究成功开发了一种苯硼酸功能化自组装纳米鱼骨微流控芯片,并将其用于胰腺癌外泌体的高特异性分离与多标志物分子分型。基于苯硼酸与肿瘤外泌体表面过表达顺式二醇基团的共价识别,并

依靠纳米鱼骨微涡流效应实现高效传质结合,该芯片展现出约85%的捕获效率。作为对照, PNGase F去糖链处理及正常细胞对照充分验证了其出色的糖基特异性,几乎无非特异性吸附。胰腺癌外泌体捕获后可直接在芯片上进行PSMA、CEA、MUC-1、NCL、PTK7和EpCAM六种膜蛋白标志物的同步荧光光谱检测,揭示了不同胰腺癌细胞株的蛋白表达特征谱。该方法成功规避了传统外泌体分离对抗体的高度依赖以及由此带来的成本高、特异性不足、肿瘤异质性兼容性差等问题,为胰腺癌的早期精准液体活检提供了简便、灵敏、多维信息输出的新技术平台。

参考文献:

- [1] Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B J, Kamiyama M, Hruban R H, Eshleman J R, Nowak M A, Velculescu V E, Kinzler K W, Vogelstein B, Iacobuzio-Donahue C A. *Nature*, **2010**, 467(7319): 1114–1117.
- [2] Tinteln J, Xu Y, Lesker T R, Schönlein M, Konczalla L, Giannou A D, Pelczar P, Kyllies D, Puelles V G, Bielecka A A, Peschka M, Cortesi F, Riecken K, Jung M, Amend L, Bröring T S, Trajkovic-Arsic M, Siveke J T, Renné T, Zhang D M, Boeck S, Strowig T, Uzunoglu F G, Güngör C, Stein A, Izbicki J R, Bokemeyer C, Sinn M, Kimmelman A C, Huber S, Gagliani N. *Nature*, **2023**, 615(7950): 168–174.
- [3] Mattox A K, Bettgowda C, Zhou S B, Papadopoulos N, Kinzler K W, Vogelstein B. *Sci. Transl. Med.*, **2019**, 11(507): eaay1984.
- [4] Xu R, Rai A, Chen M S, Suwakulsiri W, Greening D W, Simpson R J. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, 15(10): 617–638.
- [5] Hoshino A, Kim H S, Bojmar L, Gyan K E, Cioffi M, Hernandez J, Zambirinis C P, Rodrigues G, Molina H, Heissel S, Mark M T, Steiner L, Benito-Martin A, Lucotti S, Di Giannatale A, Offer K, Nakajima M, Williams C, Nogués L, Pelissier Vatter F A, Hashimoto A, Davies A E, Freitas D, Kenific C M, Ararso Y, Buehring W, Lauritzen P, Ogitali Y, Sugiura K, Takahashi N, Alečković M, Bailey K A, Jolissant J S, Wang H J, Harris A, Schaeffer L M, García-Santos G, Posner Z, Balachandran V P, Khakoo Y, Raju G P, Scherz A, Sagi I, Scherz-Shouval R, Yarden Y, Oren M, Malladi M, Petriccione M, De Braganca K C, Donzelli M, Fischer C, Vitolano S, Wright G P, Ganshaw L, Marrano M, Ahmed A, DeStefano J, Danzer E, Roehrl M H A, Lacayo N J, Vincent T C, Weiser M R, Brady M S, Meyers P A, Wexler L H, Ambati S R, Chou A J, Slotkin E K, Modak S, Roberts S S, Basu E M, Diolaiti D, Krantz B A, Cardoso F, Simpson A L, Berger M, Rudin C M, Simeone D M, Jain M, Ghajar C M, Batra S K, Stanger B Z, Bui J, Brown K A, Rajasekhar V K, Healey J H, de Sousa M, Kramer K, Sheth S, Baisch J, Pascual V, Heaton T E, La Quaglia M P, Pisapia D J, Schwartz R, Zhang H Y, Liu Y, Shukla A, Blavier L, DeClerck Y A, LaBarge M, Bissell M J, Caffrey T C, Grandgenett P M, Hollingsworth M A, Bromberg J, Costa-Silva B, Peinado H, Kang Y B, Garcia B A, O'Reilly E M, Kelsen D, Trippett T M, Jones D R, Matei I R, Jarnagin W R, Lyden D. *Cell*, **2020**, 182(4): 1044–1061.e18.
- [6] Kalluri R, LeBleu V S. *Science*, **2020**, 367(6478): eaau6977.
- [7] Zhou L Z, Wang C L, Zhang X Y, Song Y L, Qing G Y. *J. Instrum. Anal.* (周凌竹, 王存利, 张晓雨, 宋艳玲, 卿光焱. 分析测试学报), **2026**, 45(5): 922–929.
- [8] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2018**, 19(4): 213–228.
- [9] Hu Y Y, Di H N, Lai H Y, Li Y R, Chen C, Tian Y, Yan X M. *J. Instrum. Anal.* (胡芸芸, 底浩楠, 赖辉燕, 李雨柔, 陈晨, 田野, 颜晓梅, 分析测试学报), **2022**, 41(9): 1345–1354.
- [10] Tkach M, Théry C. *Cell*, **2016**, 164(6): 1226–1232.
- [11] Huang G, Lin G G, Zhu Y, Duan W, Jin D Y. *Lab a Chip*, **2020**, 20(14): 2423–2437.
- [12] Wang S, Khan A, Huang R R, Ye S Y, Di K L, Xiong T, Li Z Y. *Biosens. Bioelectron.*, **2020**, 154: 112056.
- [13] Sharma S, Jiao X F, Yang J, Kwan K Y, Kiledjian M. *Nat. Cell Biol.*, **2025**, 27(6): 983–991.
- [14] Ren T J, Zhang Y Z, Tong Y X, Zhang Q, Wang T H, Wang Y, Yang C G, Xu Z R. *Nat. Commun.*, **2025**, 16(1): 3391.
- [15] Zhang G H, Huang X D, Gong Y L, Ding Y, Wang H, Zhang H M, Wu L L, Su R, Yang C Y, Zhu Z. *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, 146(42): 29053–29063.
- [16] Wang S Y, Yang T, Wang J H, 2021 China Academic Conference on Tumor Biomarkers & The 15th Youth Scientists Forum on Tumor Biomarkers (王思怡, 杨婷, 王建华. 2021年中国肿瘤标志物学术大会暨第十五届肿瘤标志物青年科学家论坛), 2021, 线上会议.
- [17] Dong J W, Xia L, Li G K. *Chin. J. Anal. Chem.* (董建伟, 夏凌, 李攻科. 分析化学), **2018**, 46(12): 1851–1862.
- [18] Zhang P, Zhou X, He M, Shang Y Q, Tetlow A L, Godwin A K, Zeng Y. *Nat. Biomed. Eng.*, **2019**, 3(6): 438–451.
- [19] Zhang P, Wu X Q, Gardashova G, Yang Y, Zhang Y H, Xu L, Zeng Y. *Sci. Transl. Med.*, **2020**, 12(547): eaaz2878.
- [20] Niu Q, Gao J F, Zhao K F, Chen X F, Lin X L, Huang C, An Y, Xiao X Y, Wu Q Y, Cui L, Zhang P, Wu L L, Yang C Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2022**, 119(44): e2213236119.

(责任编辑: 胡雪玉, 龙秀芬)