

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.01.0023

论著

乳腺癌转移演进的关键分子 ALDH2 体外可视化研究

牛琛, 付丽

(天津医科大学肿瘤医院乳腺病理科, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060)

摘要 目的: 分析乙醛脱氢酶 2 (ALDH2) 靶向脂质体纳米探针 ALDH2-Cy7@LP-FA 在细胞水平的成像能力和靶向性能。方法: 研究制备荧光探针 ALDH2-Cy7@LP-FA, 通过粒径分析、紫外吸收和荧光发射光谱对其进行表征。利用 Western 印迹和免疫组化检测 ALDH2 在乳腺癌组织和细胞系的表达情况。以 ALDH2 高表达的乳腺癌细胞 BT474、MDA-MB-231 作为实验组, ALDH2 低表达的 MCF-10A 作为对照组, 通过流式细胞术及共聚焦荧光显微镜, 观察探针的亚细胞器共定位及成像效果。采用 CCK8 法分析探针的细胞毒性和生物相容性, 为体内成像提供实验依据。结果: 脂质体探针 ALDH2-Cy7@LP-FA 粒径均一分布[(155±2) nm], 脂质体的包载使得标记抗体的紫外吸收和荧光发射分别发生了 4 nm 和 5 nm 的蓝移, 脂质体的包载实现了抗体纳米化。ALDH2 蛋白在 BT474 细胞系中表达最高, 在 MCF-10A 表达最低($t=29.123, P<0.001$)。体外摄取及成像效果显示, ALDH2-Cy7@LP-FA 可特异性靶向线粒体中的 ALDH2, 对 BT474 细胞的结合亲和力高于 231 细胞, 对 MCF-10A 的结合最低, 具有选择性结合 ALDH2 高表达癌细胞的能力(BT474: $t=9.976, P<0.01$; MDA-MB-231: $t=12.026, P<0.05$)。CCK8 实验结果表明探针毒性极低, 具有良好的生物相容性。结论: ALDH2 在高转移乳腺癌细胞和组织中高表达, 是识别转移细胞的关键分子, 通过 ALDH2-Cy7@LP-FA 靶向 ALDH2 分子成像, 可实现精准定位肿瘤边界。

关键词 乳腺癌; 乙醛脱氢酶 2; 近红外荧光成像; 可视化

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)01-0023-06

In vitro visualization of ALDH2, a key molecule in the evolution of breast cancer metastasis

NIU Chen, FU Li

(Department of Breast Cancer Pathology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Medical Research Center for Tumors, Tianjin 300060, China)

Abstract Objective: To analyze the imaging ability and targeting performance of acetaldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2)-targeted liposomal nanoprobe ALDH2-Cy7@LP-FA in the cellular level. **Methods:** The fluorescent probe ALDH2-Cy7@LP-FA was prepared and characterized by particle size analysis, UV absorption and fluorescence emission spectroscopy. Western blotting and immunohistochemistry were used to detect the expression of ALDH2 in different breast cancer tissues and cell lines. Breast cancer cells BT474 and MDA-MB-231 with high ALDH2 expression were used as the experimental group, and MCF-10A with low ALDH2 expression was used as the control group and the subcellular organelle co-localization and imaging effect of the probes were observed by flow cytometry and confocal fluorescence microscopy. The cytotoxicity and biocompatibility of the probes were analyzed by CCK8 method to provide experimental basis for *in vivo* imaging. **Results:** The particle size of the liposomal probe ALDH2-Cy7@LP-FA was uniformly distributed [(155±2) nm], and the liposome encapsulation resulted in a blue shift of 4 nm and 5 nm in the UV absorption and fluorescence emission of the labeled antibody, respectively, and the liposome encapsulation realized the nanosizing of the antibody. The protein expression of ALDH2 was the highest in BT474 cell line, and the expression in MCF-10A was extremely low ($t=29.123, P<0.001$). *In vitro* uptake and imaging showed that ALDH2-Cy7@LP-FA could specifically target ALDH2 in mitochondria, with higher binding affinity to BT474 cells than to 231 cells, and the lowest binding to MCF-10A, with the ability to selectively bind to ALDH2 high-expressing cancer cells (BT474: $t=9.976, P<0.01$; MDA-MB-231: $t=12.026, P<0.05$). The results of CCK8 experiments demonstrated that the probe had extremely low toxicity and good biocompatibility. **Conclusion:** ALDH2 is highly expressed in highly metastatic breast cancer cells and tissues, and is a key molecule for identifying metastatic cells. Molecular imaging by targeting ALDH2 with ALDH2-Cy7@LP-FA can achieve precise localization of tumor boundaries.

Key words breast cancer; acetaldehyde dehydrogenase 2; NIR-fluorescence imaging; visualization

乳腺癌的发病率已经上升为全球恶性肿瘤的第一位, 肿瘤的复发和转移是患者死亡的主要原因

因^[1-3]。如何能术前精准标记出具有播散和转移潜能的肿瘤细胞, 是解决肿瘤复发和转移的关键^[4-5]。目

基金项目 国家自然科学基金资助项目(82173344)

作者简介 牛琛(1997-), 女, 硕士, 研究方向: 病理学与病理生理学; 通信作者: 付丽, E-mail: fulijyb@hotmail.com。

前,组织病理学是诊断肿瘤的金标准,但是其有创、滞后、取材有限导致不能观察到肿瘤的全貌^[6-7]。如果能够通过分子影像技术准确预判肿瘤范围及转移潜能,不但可以指导精准取材,也可以实时指导手术,避免病灶残留,对患者的诊断、治疗以及预后极为重要。近红外光学成像因其灵敏度高、背景荧光干扰小、组织光损伤较低、无辐射、成本低等优点,在肿瘤诊断、光学手术导航和实时可视化评价疗效等方面做出了显著贡献^[8-10]。

乙醛脱氢酶 2(ALDH2)属于醛脱氢酶家族^[11],在维持肿瘤细胞干性和介导微管抑制剂抗性中起关键作用^[12-14]。前期研究表明,ALDH2 在浸润性微乳头状癌(IMPC)这种高转移的乳腺癌组织中高表达,其表达水平与肿瘤细胞的播散、迁移和转移能力成正比,是患者死亡的独立风险因素^[15]。因此,ALDH2 是识别具有播散和转移潜能肿瘤细胞的重要分子。设计并合成一种脂质体纳米探针 ALDH2-Cy7@LP-FA,评估其在肿瘤细胞中的表达水平,实现在体、无创、精准、高效诊断具有高侵袭和转移特性的乳腺癌,可为精准诊疗方案的制定及患者的预后预测提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器 人乳腺癌细胞系 BT474、MDA-MB-231、T47D、MCF-7 和人正常乳腺细胞 MCF-10A 均购自 Procell 公司;ALDH2 抗体和 GAPDH 抗体购于美国 Abcam 公司;DMEM 培养基、胎牛血清和青霉素-链霉素双抗购于美国 Gibco 公司;Cy7 购自北京范博生化;超干二甲基亚砜(DMSO)、三乙胺(TEA)购自北京百灵威科技有限公司;乙醚购自国药集团化学试剂有限公司;无水甲醇(CH₃OH)购自天津天力化学试剂有限公司;(2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺(DOTAP)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二硬脂基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[叶酸(聚乙二醇)](DSPE-PEG2k-folate)、胆固醇(Chol)购自 Avanti Polar Lipids 生物公司。

紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司,TU-1900)、荧光光谱仪(爱丁堡仪器公司,FLS1000)、磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司,DF-101S)、混匀仪(上海仙象仪器有限公司,ELE-MS100)、纳米粒径电位分析仪(Malvern,ZEN3690)、台式高速离心机(eppendorf,5810R)、脂质体薄膜挤出器(加拿大 ATS 工业系统有限公司,LEPEX)。

1.2 方法

1.2.1 探针合成及制备 参照文献方法^[16-17],先将

叶酸-NHS 和 DSPE-PEG2000-NH₂ 溶解于 PBS 中,TEA 为催化剂,室温搅拌 12 h。用透析袋对反应液透析 3 次,去除未反应的叶酸,真空冷冻干燥得到 Folate-PEG2000。然后,采用薄膜水化法合成脂质体纳米颗粒,将二棕榈酰磷脂胆碱(DPPC)、胆固醇和 Folate-PEG2000 混合溶于甲醇/氯仿(9/1,v/v)混合液中,减压去除有机溶剂,形成脂质干膜。分别将含有 ALDH2-Cy7 与 ALDH2-Cy5 的 PBS 溶液加入脂质干膜中,50℃水化 1 h,得到多层脂质体,再用脂质体挤出器(聚碳酸酯膜 100 nm)挤出多层脂质体 10 次后,得到纳米脂质体,最后用透析袋透析 3 次,去除未包封的 ALDH2-荧光基团原料,得到脂质体纳米探针 ALDH2-Cy7@LP-FA。

1.2.2 细胞培养 人乳腺癌细胞系 BT474、MDA-MB-231、T47D、MCF-7 和人正常乳腺细胞 MCF-10A 在补充有 10%胎牛血清的 DMEM 中培养,37℃下在 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.3 免疫组化染色 采用免疫组织化学染色方法分析 ALDH2 在肿瘤组织和癌旁组织中的表达情况。4%的多去甲醛(PFA)固定肿瘤组织,连续切取 5 μm 厚度的组织切片进行免疫组化染色。染色步骤和评分标准详见前期实验步骤^[15]。

1.2.4 蛋白质印迹 采用蛋白质印迹法分析 ALDH2 在乳腺癌细胞 BT474、T47D、MDA-MB-231、SKBR3、MCF-7 和人正常乳腺细胞 MCF-10A 中的表达水平。使用苯基甲磺酰氟(PMSF)(#8553,CST)的细胞裂解缓冲液(#9803,CST)裂解乳腺癌细胞。SDS-PAGE 凝胶(10%)分离蛋白质,转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉封闭。将 PVDF 膜与 ALDH2(ab133306,Abcam,1:1 000)一抗在 4℃下孵育过夜。与 HRP 耦联的抗兔 IgG(7074 s, CST,1:5 000)在室温下孵育 1 h,使用 ECL 检测试剂盒(P90719,Immobilon)分析蛋白质表达。

1.2.5 流式细胞实验 将 BT474 细胞以 2×10⁴ 密度平铺到 12 孔板,并设置空白对照组。待细胞贴壁后,去除旧培养基,在空白对照组中加入新鲜培养基,实验组中加入对应的探针,孵育不同时间(0、2、4、6 h)后,再次去除旧培养基,PBS 清洗 3 次,500 μL 胰酶消化 2 min,然后加入 500 μL 培养基终止消化。将细胞 1 000 r/min 离心 3 min,去除上清,然后 200 μL PBS 重悬。吹打均匀,流式细胞仪对细胞进行荧光定量。MDA-MB-231 和 MCF-10A 细胞组处理方法类似。

1.2.6 激光共聚焦成像实验 以 BT474、MDA-MB-231 细胞作为实验组,MCF-10A 细胞作为对照组。

将 BT474 细胞以 20 000 个/皿的密度平铺到共聚焦小皿(35 mm × 10 mm)上,5% CO₂,37℃培养箱中孵育过夜。待细胞贴壁生长后,去除旧培养基,加入含有 ALDH2-Cy7@LP-FA(5 μmol/L)的培养基孵育 4 h。随后去除培养基,PBS 清洗 3 次,加入含有 Mito Tracker Green FM(50 nmol/L)的培养基孵育 20 min 以进行线粒体染色,然后 PBS 清洗 3 次,使用 500 μL Hoechst 33 342 溶液孵育 10 min 进行细胞核染色,最后 PBS 清洗 3 次,将各共聚焦小皿分别置于激光共聚焦显微镜下观察拍摄。MDA-MB-231 和 MCF-10A 细胞组处理方法类似。

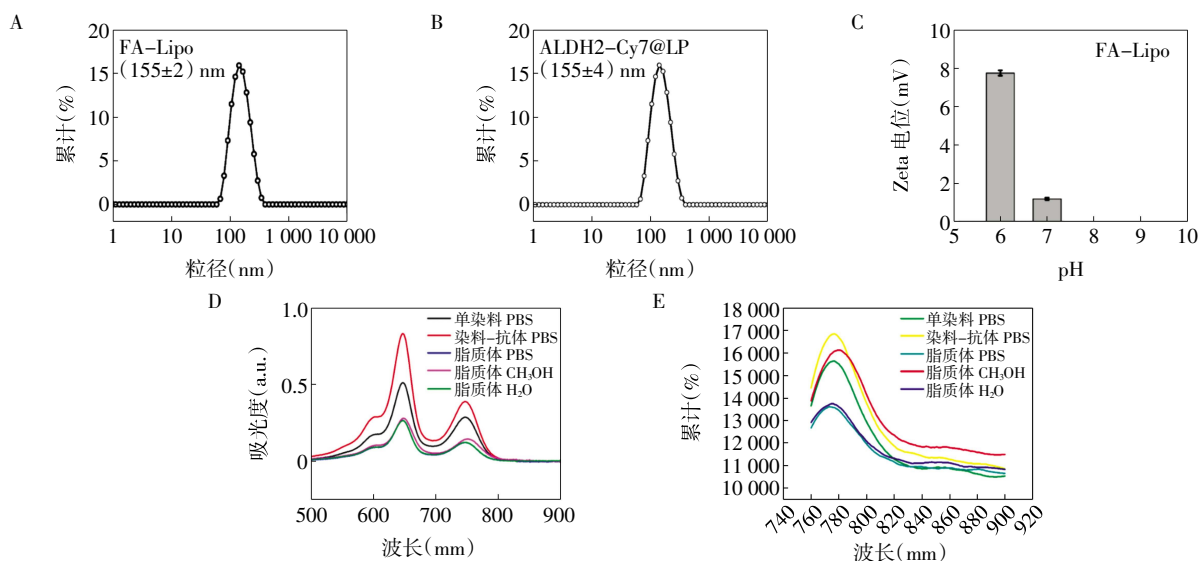
1.2.7 细胞毒性实验 采用 CCK8 法检测纳米脂质体探针的细胞毒性。将传代培养至对数期的乳腺癌细胞 BT474、MDA-MB-231 消化、离心、吹匀,以每孔 5×10^3 密度平铺至 96 孔板,在 37℃培养箱孵育。随后去除旧培养基,对照组加入新鲜培养基,实验组加入用培养基配置的不同浓度的探针(浓度分别为 0、5、10、15、20、30 μg/mL),然后分别以 100 μL/孔加入 96 孔板,在恒温培养箱中培养 48 h。孵育结束后,加入 10 μL/孔的 CCK8 溶液,将培养板放入培养箱中孵育 4 h,之后使用酶标仪检测每孔的吸

光度值(OD),波长设置为 450 nm,对肿瘤细胞的存活率进行计算,检测探针对肿瘤细胞毒性的影响。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 6.0 统计软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示,蛋白质印迹及其他实验差异分析,采用独立样本的 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异统计学意义。

2 结果

2.1 探针的表征 制备得到粒径均一分布的叶酸靶向脂质体 FA-Lipo,其粒径大小为(155±2) nm(图 1A)。在不同 pH 值条件下均为电中性(zeta 电势<10 mV)(图 1B)。由于需要递送的 ALDH2 抗体的等电点为 7.49,在中性条件下也为电中性。因此通过超声法制备含有 ALDH2-Cy7 的脂质体 ALDH2-Cy7@LP。粒径分析表明其粒径与原脂质体 FA-Lipo 相当,为(155±4) nm(图 1C)。进一步对 ALDH2-Cy7@LP 的紫外吸收光谱和荧光发射光谱进行表征,结果表明,脂质体的包载使得标记抗体的紫外吸收和荧光发射分别发生了 4 nm 和 5 nm 的蓝移。光谱性质表明(图 1D),Cy7 对 ALDH2 的抗体标记成功,脂质体的包载实现了抗体纳米化,同时对标记抗体的光谱性质影响很小(图 1E)。



注:A:叶酸脂质体 FA-Lipo 的粒径分布;B:包载 ALDH2-Cy7 的脂质体 ALDH2-Cy7@LP-FA 的粒径分布;C:FA-Lipo 在不同 pH 值条件下的电势;D:ALDH2-Cy7@LP-FA 荧光发射图;E:ALDH2-Cy7@LP-FA 紫外吸收图

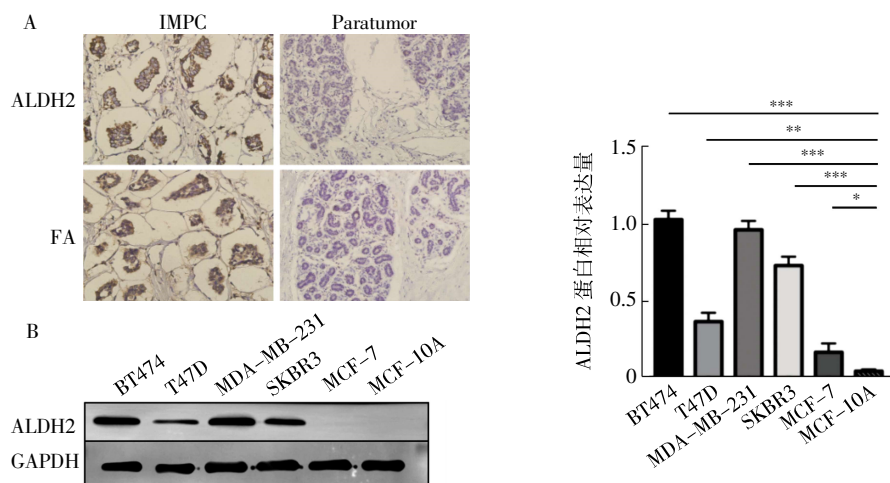
图 1 ALDH2-Cy7@LP-FA 的表征结果

Fig.1 Characterization results of ALDH2-Cy7@LP-FA

2.2 ALDH2 蛋白在不同乳腺癌细胞系中的表达 免疫组化对比 IMPC 组织与癌旁组织中 ALDH2 的蛋白表达差异,发现 ALDH2 在 IMPC 组织中显著高表达(图 2A)。通过蛋白质印迹实验检测 ALDH2 蛋白在 6 种乳腺细胞中的表达水平,发现 ALDH2 在人正常乳腺细胞 MCF-10A 极低表达,在乳腺癌细胞 BT474 和 MDA-MB-231 中高表达,在 T47D、

SKBR3、MCF-7 细胞中较低表达(图 2B,BT474: $t = 29.123, P < 0.001$; T47D: $t = 9.512, P < 0.01$; MDA-MB-231: $t = 27.162, P < 0.001$; SKBR3: $t = 21.279, P < 0.001$; MCF-7: $t = 3.628, P < 0.05$)。

2.3 探针的体外摄取及成像结果 采用流式细胞术分析探针在肿瘤细胞中的摄取情况,将探针与 BT474 和 MDA-MB-231 细胞共孵育,发现结合率



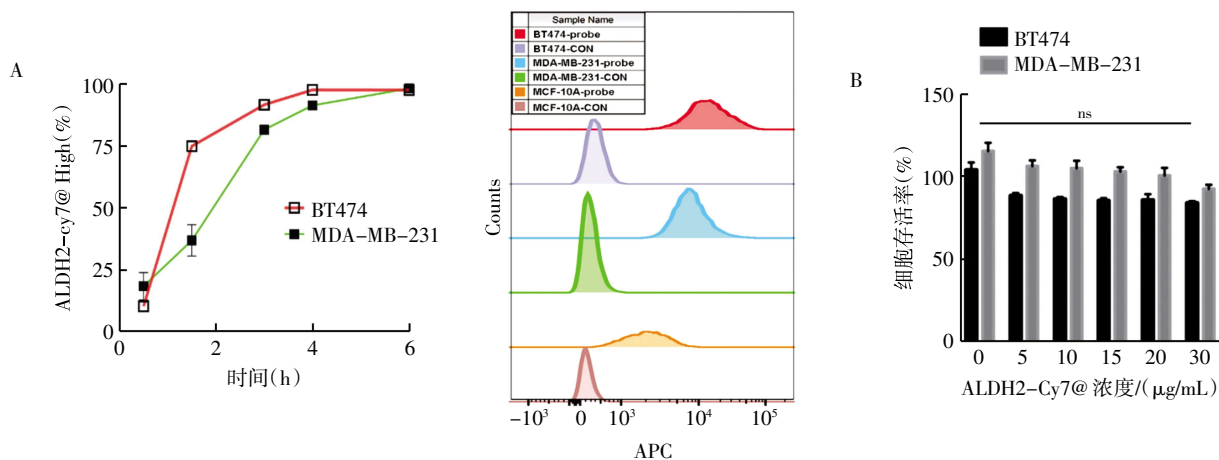
注:A:免疫组化分析 ALDH2 和叶酸在 IMPC 和癌旁中的表达($\times 400$);B:Western 印迹分析 ALDH2 在不同人乳腺癌细胞系和正常乳腺细胞中的表达; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; IMPC:浸润性微乳头状癌

图2 ALDH2 在乳腺癌组织和细胞的表达水平

Fig.2 ALDH2 expression levels in breast cancer tissues and cells

随时间逐渐增高,在 4 h 后达到饱和(图 3A)。流式细胞术检测 MCF-10A、MDA-MB-231 和 BT474 细胞的 ALDH2-Cy7@LP-FA 探针结合率,与 MCF-10A 细胞相比,在高表达 ALDH2 的 BT474 细胞中的结合率最高,MDA-MB-231 细胞次之(BT474: $t = 9.976$,

$P < 0.01$; MDA-MB-231: $t = 12.026$, $P < 0.05$)。CCK8 结果显示,ALDH2-Cy7@LP-FA 探针在浓度高达 30 $\mu\text{g/mL}$ 时,BT474 和 MDA-MB-231 的细胞存活率仍在 80%以上,与对照组相比无统计学差异,并未发现明显的细胞毒性(图 3B)。



注:A:ALDH2-Cy7@LP-FA 的流式细胞实验;B:ALDH2-Cy7@LP-FA 细胞存活率

图3 ALDH2-Cy7@LP-FA 对细胞的摄取及毒性

Fig.3 Cellular uptake and toxicity of ALDH2-Cy7@LP-FA

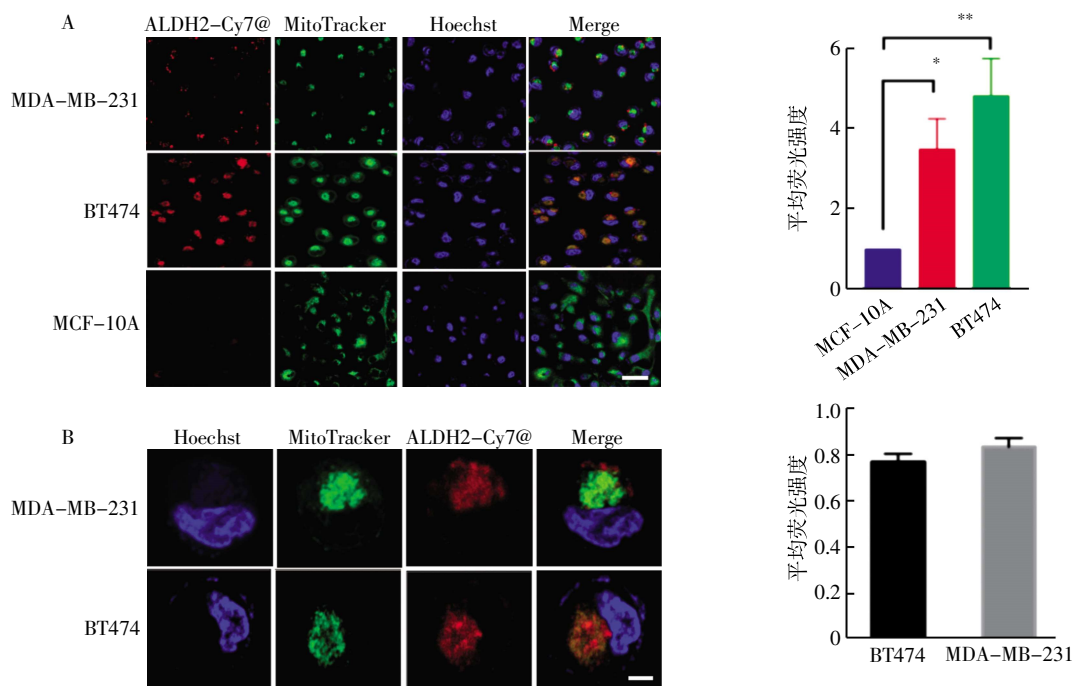
共聚焦显微镜结果显示,ALDH2-Cy7@LP-FA 探针荧光与 Mito Tracker 线粒体发光高度重叠,提示主要定位在胞浆线粒体。探针 BT474 中呈强荧光着色,在 MCF-10A 中呈极弱荧光着色,与蛋白质印迹结果一致(图 4A)。共定位实验表明,探针与线粒体染料 Mito Tracker 高度重合,在 BT474、MDA-MB-231 中的 Pearson 相关系数分别高达 0.88 和 0.78,成功释放和定位在线粒体(图 4B)。

3 讨论

2020 年全球确诊了 230 万例乳腺癌新病例(占所有肿瘤的 11.7%),其已超过肺癌,成为全球最常

见的肿瘤,是女性肿瘤死亡的主要原因。乳腺癌的局部复发或远处转移是临床致死的主要原因,寻找肿瘤特异性靶向分子,利用分子影像学技术实现在体、精准标记播散及转移细胞是提高患者生存率的关键。

在过去的几十年里,医学成像技术飞速发展,在临床肿瘤学中发挥着核心作用。分子成像不仅可以可视化肿瘤在体内的位置,而且能够可视化影响肿瘤行为或治疗反应的特定分子的表达以及生物过程(如凋亡、血管生成和转移)^[6]。其中,近红外荧光分子影像技术具有高灵敏度、高分辨率、无辐射、



注:A:ALDH2-Cy7@LP-FA 成像(比例尺:25 μm),* $P<0.05$,** $P<0.01$;B:ALDH2-Cy7@LP-FA 共定位成像(比例尺:2 μm)

图 4 ALDH2-Cy7@LP-FA 的成像效果

Fig.4 Imaging effect of ALDH2-Cy7@LP-FA

低成本等优点,能够在多水平对关键分子靶标进行体内成像,在术前提供肿瘤的精准定位信息,并适用于手术导航,实现对肿瘤的实时监测和精准切除^[19-20]。菁染料是近红外荧光染料中最常用的一类荧光染料,其摩尔吸光系数在荧光染料中是最高的,其中 Cy7 的吸收在近红外区背景非常低,是荧光强度最高、最稳定的长波长染料^[21-22],特别适合代替放射性元素用于活体小动物体内成像^[23-24]。

课题组前期对 IMPC 肿瘤细胞团全基因组测序,发现 IMPC 组织中具有高转移潜能的肿瘤转移种子细胞,并鉴定出了肿瘤转移种子细胞演进的 3 个关键分子:ALDH2、免疫球蛋白超家族 9 号成员 (immunoglobulin superfamily member 9, IGSF9) 和 PR 结构域家族 16 号成员 (PR-domain containing 16, PRDM16)。其中,ALDH2 在 IMPC 组织中高表达,提示 ALDH2 是促进 IMPC 高侵袭和转移的种子基因。因此,设计 ALDH2 靶向荧光探针标记体内高转移潜能的肿瘤细胞,可实现在体肿瘤细胞的定位,并可评估肿瘤细胞的转移潜能。

ALDH2 属于醛脱氢酶家族,位于线粒体。早期研究表明其主要功能是将乙醛代谢成无毒的乙酸,参与乙醇氧化代谢过程^[25]。近年来,多研究表明 ALDH2 在肿瘤发生、发展过程中发挥重要作用,ALDH2 失活或活性降低使乙醛在体内蓄积,过量的乙醛与谷胱甘肽结合抑制抗氧化防御系统,增加体内

的活性氧簇(ROS),促进氧化应激反应,从而导致肿瘤的侵袭与转移^[26]。多项研究表明,ALDH2 在多种不同类型的肿瘤中表达增加,且与不良预后显著相关。Chen 等^[12]研究表明,ALDH2 高表达可增强肝癌细胞的增殖和侵袭能力。Ramakrishnan 等^[27]研究发现,在浸润性膀胱癌中 ALDH2 高表达的亚群具有侵袭性表型。Aboulouard 等^[28]通过对子宫内膜癌和其前哨淋巴结的临床样本进行空间蛋白组学测序分析,发现了高表达分子 ALDH2 更多在子宫内膜癌的 II 级和 III 级中表达,故被认为是肿瘤转移的关键分子之一。

ALDH2 不仅在 IMPC 这种高转移的乳腺癌中高表达,还与肿瘤细胞的转移能力成正比。ALDH2 在乳腺正常组织中低表达,在乳腺癌中高表达,其蛋白表达水平与肿瘤细胞的淋巴结转移呈正相关,与患者的极差预后呈负相关,是患者死亡风险的独立预后因素。以上研究结果均显示 ALDH2 是识别具有转移潜能肿瘤细胞的重要候选分子,使 ALDH2 体内成像,评估其在肿瘤细胞中的表达水平,可实现精准高效的病理诊断。另外,ALDH2 体内成像可为术中精准、彻底地切除肿瘤提供依据。

本研究依据前期研究鉴定出肿瘤转移的关键分子 ALDH2,对脂质体纳米表面修饰 Folate 并包载 ALDH2 抗体,构建高灵敏、高特异性的线粒体靶向荧光分子探针,并借助近红外分子影像技术,识别

具有高侵袭转移潜能的肿瘤干细胞。同时选取人源乳腺癌细胞系具有高侵袭/转移能力强的MDA-MB-231(三阴型)和BT474(Luminal B型)与探针共孵育,评估探针的体外靶向结合能力。结果显示,ALDH2-Cy7@LP-FA可特异性靶向线粒体中的ALDH2,选择性结合ALDH2高表达癌细胞,共定位分析显示该探针在线粒体中特异性积累,其线粒体定位能力优异。且探针对细胞的毒性极低,具有良好的生物相容性。未来将进一步完善在体内实验的验证。希望可以精准显像具有转移潜能的肿瘤细胞和癌灶边界,实现检测ALDH2过表达的早期乳腺癌,对肿瘤和转移灶进行精准全切除。此外,ALDH2同样在子宫内膜癌、肺癌、肝癌等中参与肿瘤细胞的增殖、转移过程,被认为是肿瘤转移的关键分子之一。因此,基于ALDH2合成的靶向分子探针可能在多种肿瘤中具有广泛的应用价值。

参考文献:

- FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview[J]. *Int J Cancer*, 2021, 149(4):778-789.
- CORREIA A L, GUIMARAES J C, AUF DER MAUR P, et al. Hepatic stellate cells suppress NK cell-sustained breast cancer dormancy[J]. *Nature*, 2021, 594(7864): 566-571.
- SHOR R E, DAI J, LEE S Y, et al. The PI3K/mTOR inhibitor Gedatolisib eliminates dormant breast cancer cells in organotypic culture, but fails to prevent metastasis in preclinical settings [J]. *Mol Oncol*, 2022, 16(1): 130-147.
- NAUME B, SYNNESTVEDT M, FALK R S, et al. Clinical outcome with correlation to disseminated tumor cell (DTC) status after DTC-guided secondary adjuvant treatment with docetaxel in early breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(34): 3848-3857.
- HUGHES R, CHEN X, COWLEY N, et al. Osteoblast-derived paracrine and juxtacrine signals protect disseminated breast cancer cells from stress [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(6):1366.
- MUTHUSWAMY S K. Self-organization in cancer: implications for histopathology, cancer cell biology, and metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(4): 443-436.
- WANG S, LI J, HUA J, et al. Molecular imaging of prostate cancer targeting cd46 using immunoPET[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(5): 1305-1315.
- HU Z, CHEN W H, TIAN J, et al. NIRF nanoprobe for cancer molecular imaging: approaching clinic[J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26(5): 469-482.
- HU Z, FANG C, LI B, et al. First-in-human liver-tumour surgery guided by multispectral fluorescence imaging in the visible and near-infrared- I /II windows[J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(3): 259-271.
- ZHANG R R, SCHROEDER A B, GRUDZINSKI J J, et al. Beyond the margins: real-time detection of cancer using targeted fluorophores[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(6): 347-364.
- VAN DAM G M, THEMELIS G, CRANE L M, et al. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results[J]. *Nat Med*, 2011, 17(10): 1315-1319.
- CHEN M H, WENG J J, CHENG C T, et al. ALDH1A3, the major aldehyde dehydrogenase isoform in human cholangiocarcinoma cells, affects prognosis and gemcitabine resistance in cholangiocarcinoma patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(16): 4225-4235.
- MOREB J S, UCAR D, HAN S, et al. The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance [J]. *Chem Biol Interact*, 2012, 195(1): 52-60.
- KALLIFATIDIS G, SMITH D K, MOREA D S, et al. β -Arrestins regulate stem cell-like phenotype and response to chemotherapy in bladder cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(4): 801-811.
- CHEN L, WU M, JI C, et al. Silencing transcription factor FOXM1 represses proliferation, migration, and invasion while inducing apoptosis of liver cancer stem cells by regulating the expression of ALDH2[J]. *Iubmb Life*, 2020, 72(2): 285-295.
- TANG L, FAN T M, BORST L B, et al. Synthesis and biological response of size-specific, monodisperse drug-silica nanoconjugates [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(5):3954-3966.
- TANG L, GABRIELSON N P, UCKUN F M, et al. Size-dependent tumor penetration and *in vivo* efficacy of monodisperse drug-silica nanoconjugates[J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(3): 883-892.
- SHI Q, SHAO K, JIA H, et al. Genomic alterations and evolution of cell clusters in metastatic invasive micropapillary carcinoma of the breast[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 111-112.
- DELLA-LONGA S, ARCOVITO A. Structural and functional insights on folate receptor alpha (FRA) by homology modeling, ligand docking and molecular dynamics[J]. *J Mol Graph Model*, 2013, 44: 197-207.
- SALAZAR M D, RATNAM M. The folate receptor: what does it promise in tissue-targeted therapeutics?[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(1): 141-152.
- FENG L, CHEN W, MA X, et al. Near-infrared heptamethinecyanines (Cy7): from structure, property to application[J]. *Org Biomol Chem*, 2020, 18(46):9385-9397.
- MENG X, LI W, SUN Z, et al. Tumor-targeted small molecule for dual-modal imaging-guided photo therapy upon near-infrared excitation[J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5:9405-9411.
- ZHANG Y, BI J, XIA S, et al. A near-infrared fluorescent probe based on a FRET rhodamine donor linked to a cyanine acceptor for sensitive detection of intracellular pH alternations[J]. *Molecules*, 2018, 23:2679-2680.
- ALACHOUZ G, SCHULTE A M, MONDAL A, et al. Computational design, synthesis, and photochemistry of cy7-ppg, an efficient nir-activated photolabile protecting group for therapeutic applications[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61(27):1308-1310.
- KIMURA M, YOKOYAMA A, HIGUCHI S. Aldehyde dehydrogenase-2 as a therapeutic target[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(11): 955-966.
- GARAVCOECHEA J I, CROSSAN G P, LANGEVIN F, et al. Alcohol and endogenous aldehydes damage chromosomes and mutate stem cells[J]. *Nature*, 2018, 553(7687): 171-177.
- RAMAKRISHNAN S, GRANGER V, RAK M, et al. Inhibition of EZH2 induces NK cell-mediated differentiation and death in muscle-invasive bladder cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(10): 2100-2114.
- ABOULOUD S, WISZDORSKI M, DUHAMEL M, et al. In-depth proteomics analysis of sentinel lymph nodes from individuals with endometrial cancer[J]. *Cell Rep Med*, 2021, 2(6):100-108.

(2023-07-23 收稿)