

DOI: 10.13376/j.cbls/2019120

文章编号: 1004-0374(2019)09-0975-10

· 技术与应用 ·

微流控芯片在分选富集循环肿瘤细胞中的应用

吴丽丽, 卢贵红, 张帆, 谢海燕*

(北京理工大学生命学院, 北京 100081)

摘要: 循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs) 是指从原发肿瘤部位脱落, 进入外周血循环的肿瘤细胞, 对其准确检测有利于早期癌症转移的诊断与治疗。然而, 血液中 CTCs 的量极少, 检测前要先对其进行分选富集。在众多的分选富集方法中, 微流控芯片技术成本低、通量高、样品需求量小, 可达到特异、灵敏、高捕获率的效果。该文综述了近年来使用微流控芯片分选富集 CTCs 的方法, 同时, 分析了各种方法的优缺点, 并对未来的发展趋势进行了探讨。

关键词: 循环肿瘤细胞; 微流控芯片; 外周血; 捕获; 富集

中图分类号: O658; R730.43

文献标志码: A

Applications of microfluidics in sorting and enrichment of circulating tumor cells

WU Li-Li, LU Gui-Hong, ZHANG Fan, XIE Hai-Yan*

(School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract: Circulating tumor cells (CTCs) are those cells that shed from the primary tumor site and enter into the peripheral blood. The accurate detection of CTCs is critical for the early diagnosis and treatment of cancer. However, due to the extremely low concentration of CTCs in blood, enrichment has been regarded as an essential pre-treatment step for efficiently detecting CTCs. Among the numerous sorting methods, microfluidics has shown the potential to efficiently isolate and detect rare CTCs. The advantages include low cost, high throughput, and a small amount of sample. In this paper, we review various methods of microfluidics used to separate CTCs, analyze the advantages and disadvantages of each method, and discuss the development trend in the future.

Key words: circulating tumor cells; microfluidics; peripheral blood; capture; enrichment

循环肿瘤细胞 (CTCs) 是指从原发性肿瘤病灶脱落下来, 进入外周血液或淋巴管循环的肿瘤细胞^[1]。进入循环体系的肿瘤细胞一部分被自身免疫系统清除, 未被清除的细胞则通过迁移、黏附等作用相互聚集, 侵袭并转移至其他正常组织, 发展成转移灶^[2]。可见, CTCs 在癌症转移过程中起关键作用。研究表明, 约 90% 癌症患者的死亡源于肿瘤转移, 而 CTCs 在肿瘤早期就已出现, 因此, 早期准确检测 CTCs 至关重要^[3]。然而, 困难在于血液中 CTCs 的数量极少, 1 mL 全血中仅含有 1~10 个 CTCs^[4], 大约是正常血细胞数量的十亿分之一, 因此, 必须在检测前对其进行分选富集, 以消

除血液中非靶细胞的干扰。

只有从复杂的血液样本中准确、完整、快速分离出 CTCs, 才能使下游分析 (计数、细胞免疫染色、基因分析等) 取得良好的效果。这就需要分选方法能够实现 CTCs 的高纯度、高捕获率、高通量和高活性分离^[5]。传统的分选方法包括电旋转^[6]、密度梯度离心^[7-8]、过滤^[9-10]、光导纤维阵列扫描^[11-12]等, 虽然这些方法也可以分离 CTCs, 但存在 CTCs

收稿日期: 2019-04-18; 修回日期: 2019-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(21874011)

*通信作者: E-mail: hyanxie@bit.edu.cn

漏检、背景细胞干扰过强、分选速度慢、样品需求量大、细胞活性受损等问题,不满足上述分选要求。近年来,逐步进入大众视野的微流控芯片技术(microfluidics),可以克服由血液中 CTCs 稀缺引起的分离困难,在 CTCs 的高灵敏度和高效分选中展现出了巨大的应用潜力^[13]。

微流控芯片技术可在微米级通道内操纵非常少量体积的流体。使用该技术分离 CTCs,样品需求量小、成本低、耗时短、通量高、操作简便,可实现高纯度、高效率分选富集。依据 CTCs 和血细胞之间生物学和物理性质的差别,用芯片分选富集 CTCs 的方法可分为两类(图 1):一是生物学方法,它基于 CTCs 和血细胞表面特异性蛋白的表达不同;二是物理方法,主要利用 CTCs 和血细胞之间一些物理性质的差别进行分离,比如细胞大小、密度、介电性和可变形性等。

1 基于生物学性质差异的分选富集

基于生物学性质差异的分选方法指的是选择特异性抗体或核酸适配体以特异性识别并结合靶细胞表面上表达的标志物,从而分选和富集靶细胞。在实际操作中,首先在微流控芯片的内部设计一些特殊的结构,然后在这些结构表面修饰上特异性识别靶细胞的抗体或核酸适配体,再使样品流经通道,此时目的细胞通过表面抗原与芯片内结构上的抗体或核酸适配体的特异性结合作用,被捕获在芯片里,而非靶细胞则随样品一起流出芯片,从而使目的细胞与非目的细胞成功分离^[14]。依据所分选靶细胞的

差别,可将生物学方法分成两种,即以 CTCs 为靶细胞的阳性分选法和以血细胞为靶细胞的阴性分选法。

1.1 阳性分选法

阳性分选法是指以 CTCs 为靶细胞,直接进行捕获。常使用的阳性分选细胞表面标志物是上皮细胞黏附因子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)。EpCAM 是一种跨膜糖蛋白,表达于上皮细胞表面,其在正常细胞中不表达,在几乎所有上皮癌的组织细胞中过表达^[15]。为了获得良好的分选富集效果,有必要使特异性抗体或核酸适配体与 EpCAM 实现最大化结合,也就是说,希望流体中的目的细胞可以与芯片内修饰的抗体或核酸适配体充分接触。起初,抗体或核酸适配体直接被修饰在芯片内的平面通道上,由于流体在微流控芯片内以层流流动,只有靠近通道表面的流体中的细胞才有可能接触抗体或核酸适配体,从而被捕获,这就会导致 CTCs 的分选效率低下^[16]。基于此,许多研究团队开始设计特殊的微结构,如在芯片通道内设计微柱,并将抗体或核酸适配体修饰到微结构表面,结合微柱的高比表面积,增加流体中细胞与抗体或核酸适配体的接触机会,极大地提高了 CTCs 的分选效率。

Nagrath 等^[17]研制了一种“CTC-Chip”芯片,他们在芯片内部设计了很多微柱阵列,并且把 CTCs 的特异性抗 EpCAM 抗体修饰在了微柱的表面。将该芯片应用于对 CTCs 的分选富集,在芯片中的流体速度可以达到 2 mL/h, CTCs 的捕捉率更是高达 99%。这充分说明在芯片内设置微柱这样的

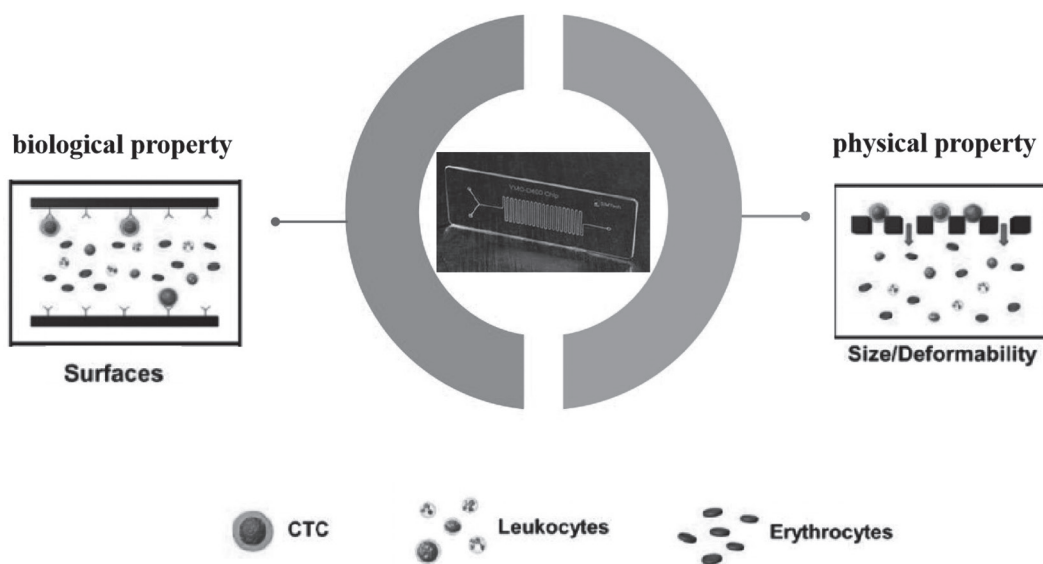
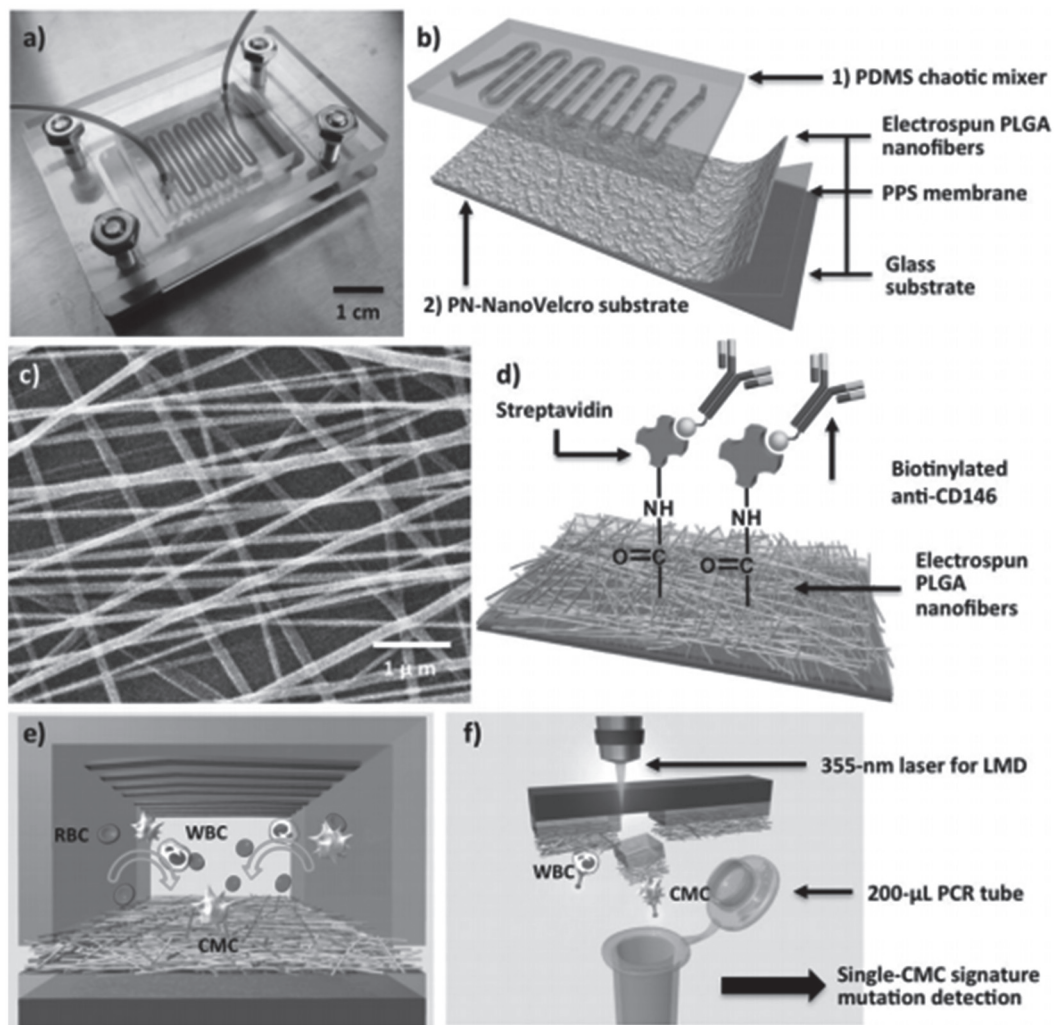


图1 微流控芯片分选富集CTCs的生物学方法和物理方法

微结构, 并将抗体修饰在其表面, 很大程度上增加了抗体与流体中细胞的接触机会, 实现了 CTCs 的高通量、高效分选。随后, Stott 等^[18]又研制了一种“HB-Chip”芯片, 该芯片是“CTC-Chip”的延伸, 芯片底部设计了一种鱼骨结构, 这种结构包括 7.8 万个微柱在内, 每个微柱表面都修饰上了抗 EpCAM 抗体。芯片内的鱼骨结构和平面通道之间产生一个高度差, 使得原来在芯片中层流状态流动的流体呈现涡流流动, 从而大大增加流体内的细胞与芯片内所修饰抗体的接触可能, 进而提高捕获效率, 使更多的 CTCs 得以分离。Tseng 等^[19]研究设计了一系列“NenoVelcro”检测芯片, 第一代 NenoVelcro 检测设备由两个功能部件组成, 即修饰有抗 EpCAM 抗体的硅纳米柱阵列基底 (SiNP) 和嵌于设备顶部的锯齿形高效混合芯片。立体的基底结构可增加细胞

与抗体的接触机会, 覆盖于顶部的无秩序形状的混合芯片可以保证流体以涡流状态通过, 这种设计极大地增加了 CTCs 与硅纳米柱的接触可能性。用该芯片和 FDA 认证的 CellSearch 系统同时对 26 个前列腺癌患者的外周血进行检测并对比计数结果, 发现该检测芯片具有更低的检测限和更高的检测灵敏度^[20]。第二代 NenoVelcro 检测芯片用 PLGA 静电纺丝纳米纤维替代之前的硅纳米柱阵列, 且芯片底部为透明的玻璃载片结构, 使用激光捕获显微镜切割技术可对捕获到的细胞施行单独切割, 实现单细胞操纵, 可分析基因突变或基因表达等分子学特征 (图 2)^[21-22]。第三代 NenoVelcro 检测芯片新增加了热响应功能, 在硅纳米线基底上共价偶联生物素化的温度敏感性聚合物刷 PIPAAm, 然后以链霉亲和素为中间体连接生物素化的抗 EpCAM 抗体; 在



(a)捕获血液中黑色素瘤细胞(CMCs)的芯片实物图; (b)芯片组成示意图; (c) PLGA静电纺丝纳米纤维的扫描电镜图; (d)抗体锚定示意图; (e)芯片捕获机制示意图; (f)单个CTC可用LMD分离, 进行后续基因分析

图2 第二代NenoVelcro检测芯片及其分选原理^[22]

37 °C时,生物素化的 PIPAAm 的生物素基团和疏水区域暴露在表面,实现 CTCs 的捕获,当温度下降到 4 °C时,PIPAAm 的结构主干扩展开来,使得抗 EpCAM 抗体不再暴露在表面,实现 CTCs 的释放^[23]。该温控检测芯片可通过控制温度便利地实现对 CTCs 的捕获和释放,且释放的 CTCs 保持很高的活性。

虽然这方面的研究已经取得了很多成果,但是由于细胞表面高表达 EpCAM 抗原的肿瘤种类有限,基于 EpCAM 的分选富集技术只在少数肿瘤(乳腺癌、前列腺癌、结肠癌)中得到了良好的检测结果^[15]。不同于抗原-抗体的相互作用,核酸适配体的结构及其与抗原的作用形式灵活多样,因此,即使靶细胞抗原未知,核酸适配体也可以捕获 CTCs。Sheng 等^[24]研制了一种微流控芯片,他们在芯片内部设计了 5.9 万个微柱,同时,合成了一种能够与人急性淋巴白血病细胞 (CCRF-CEM) 特异性结合的核酸适配体,并将该核酸适配体修饰在微柱表面,用于对 CTCs 进行特异性捕获。该芯片的分选速度可达 2 nL/s,分选率高达 95%,分选纯度达 81%,且处理 1 mL 癌症患者的全血样本仅需 28 min,最低可检测出 10 个肿瘤细胞,具有很高的检测灵敏度,且捕获到的 CTCs 活性达 93%,便于进行后续分析。Shen 等^[25]在 NenoVelcro 芯片的基础上做了进一步的更新,在硅纳米线阵列上修饰上链霉亲和素,同时,利用 Cell-SELEX 技术筛选出能够特异性结合非小细胞肺癌细胞 (NSCLC) 的核酸适配体,并将核酸适配体生物素化,然后通过生物素和链霉亲和素的特异性结合,将核酸适配体修饰在硅纳米线表面,对血液中的 NSCLC 进行分选富集。实验中分别采取晚期非小细胞肺癌患者和健康人体志愿者的外周血进行检测,结果表明 CTCs 在癌症患者的外周血中被成功检测到 (2~26 个/mL),而在健康志愿者的外周血中未检测到。

尽管上述微流控芯片所设计的结构在分选富集 CTCs 时都取得了很好的效果,但被捕获的 CTCs 不能自动释放,不便于进行下游分析。而将磁性材料引入芯片结构可以很好地解决这一问题。在微流控芯片中使用磁性材料一般有两个优势:其一,相比于微柱,磁珠和微珠有更高的比表面积,用它们来承载抗体或核酸适配体,可以使 CTCs 与磁性材料有更多的接触机会,进而获得更好的捕捉效果;其二,CTCs 的释放也可以通过磁操纵实现。在实际操作中,先把磁性材料作为一种结合载体,在其

表面修饰上特异性抗体或核酸适配体;然后,在已给芯片施加外部磁场的前提下,将其引入微流控芯片,这样,磁性材料就在磁场的作用下固定在了芯片结构中;接着,把流体通入芯片,因 CTCs 能够与磁性材料上修饰的抗体或核酸适配体特异性结合,故 CTCs 会留在芯片中,其他细胞则随流体流出芯片,从而将 CTCs 与非靶细胞分离;在捕获完成后,移除施加的磁场,从芯片中释放出捕获的细胞,并用于后续分析。Tang 等^[26]在微流控芯片内设计了一种交错平行排列的镍微柱阵列结构,在外部磁场的作用下,先将抗 EpCAM 抗体修饰的 Fe₂O₃ 磁性纳米颗粒引入芯片,再使细胞流过芯片,发现 CTCs 可特异性识别抗 EpCAM 抗体而留在通道内,非目标细胞则流出芯片。其捕获率高达 94%,捕获到的细胞可随外加磁场的撤离而释放,且具有很好的活性 (93%),可连续传代。

虽然以上所述单一抗体或单一核酸适配体与微流控芯片技术结合可以实现很好的 CTCs 捕获效果,但由于在肿瘤生长或治疗过程中,CTCs 常会经历上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[27],或产生基因突变^[28],这就导致 CTCs 呈现异质性,此时使用单一的抗体或核酸适配体进行检测,不足以检测出所有的 CTCs,常会存在漏检的问题。近些年来,研究者们将目光转向了使用多种抗体或核酸适配体 (cocktail) 来检测 CTCs。Brinkmann 等^[29]将 CTCs 与抗 EpCAM 抗体和抗 HER2 抗体的混合物共孵育,然后引入一种鱼骨形微流控分选平台,实现了对异质肿瘤细胞的高效率捕获。捕获到的 CTCs 可以在原位进行基因分析,并可实现单细胞分离。

Fang 实验室在 NenoVelcro 芯片上探究了多种核酸适配体混合物对 CTCs 的捕获能力 (图 3)^[30]。在芯片的硅纳米线基底上修饰上链霉亲和素,然后使多种生物素化的核酸适配体与之相连,从而将多种核酸适配体修饰到了芯片内部。使用该芯片对非小细胞肺癌患者的外周血进行检测,实现了对异质性 CTCs 的完整捕获。随后,该团队又将核酸适配体混合物与磁性纳米颗粒结合^[31],在微孔芯片的协助下完成了对异质性非小细胞肺癌细胞的捕获。以 A549 细胞和产生抗药性的 A549 细胞 (A549D) 为靶标,使用 SELEX 技术筛选得到与之特异性结合的核酸适配体 Apt1 和 Apt2,然后将这两种核酸适配体修饰到磁性纳米颗粒表面,使其与临床非小细胞肺癌患者的血液样本共孵育,对血液中的 CTCs

进行高效率捕获, 并且捕捉到的 CTCs 可进行基因分析。

1.2 阴性分选法

阴性分选法指的是, 先特异性捕获血液中除 CTCs 以外的其他细胞, 一般指白细胞, 将白细胞弃除后, 收集剩下的 CTCs。常使用的抗体是抗 CD45 抗体。在实际操作中, 首先将抗 CD45 抗体结合到芯片内的微结构表面, 用裂解液裂解掉血液中的红细胞后, 将血液样本引入到微流控芯片中, 白细胞可与抗 CD45 抗体特异性结合而留在芯片内, CTCs 则流出芯片, 得以收集。相较于阳性分选法, 这种以白细胞为靶细胞的阴性分选法不依赖于 CTCs 表面特异性蛋白的表达水平, 可用于 CTCs 表面弱表达或不表达 EpCAM 的分选富集。Lustberg 等^[32]利用此种方法, 在微流控芯片内结合上修饰有抗 CD45 抗体的磁珠, 在外加磁场的帮助下, 对多种癌症患者的外周血进行了检测, 成功地实现了 CTCs 与血细胞的分离。Toner 实验室研究设计了一

种“CTC-iChip”芯片^[33], 该芯片不依赖于肿瘤细胞表面特异性标志物的表达, 可检测 EpCAM 低表达或不表达的肿瘤细胞, 如三阴性乳腺癌、黑色素瘤等。通过一系列的水力分选、惯性聚焦、磁导入分离步骤, 对前列腺癌患者进行检测, 成功地实现了肿瘤细胞与血细胞的分离(图4)。该芯片还能同时捕获 EpCAM 阳性及 EpCAM 阴性的肿瘤细胞, 并且能够进一步分析细胞的性质。

2 基于物理性质差异的分选富集

基于物理性质差异的分选方法, 指的是依据 CTCs 和血细胞物理性质的不同来设计微流控芯片结构, 实现 CTCs 与血细胞的分离。这些物理性质的差异主要体现在 CTCs 和血细胞的大小、密度、力学性质等的差别以及 CTCs 相对不易变形^[34]的特征。在微流控芯片中依据物理性质的差异对 CTCs 进行分选富集, 不受限于细胞表面标志物的表达, 且芯片结构易于设计、成本低、耗时短、操作简便,

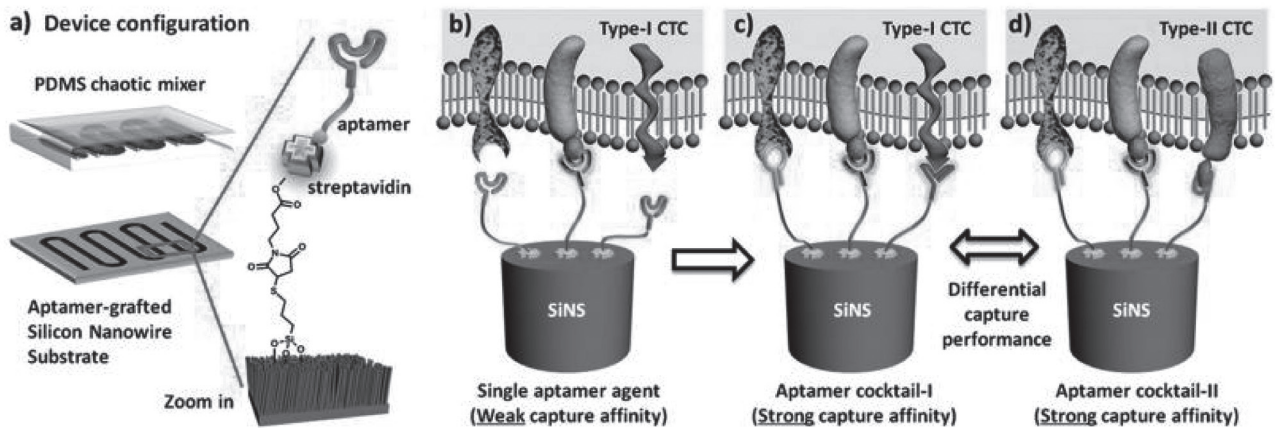


图3 使用NenoVelcro芯片与多种核酸适配体捕获CTCs^[30]

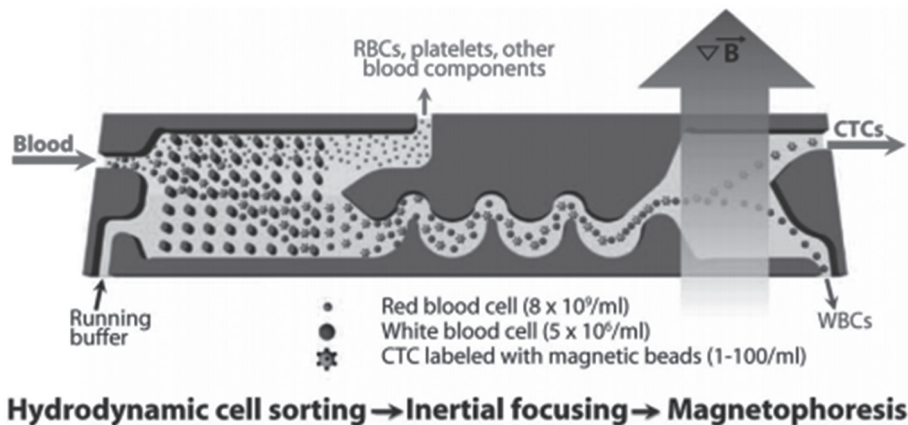


图4 CTC-iChip检测芯片示意图及分选原理^[33]

可以实现高通量分选。

2.1 尺寸和变形性差异

Yang 等^[35]设计了一种“CTC- Δ Chip”楔形芯片,将芯片内的微腔室设计成从样品入口处 60 μm 至出口处 5 μm 连续不同的高度,利用癌细胞与血细胞的尺寸不同,将 CTCs 留于芯片内,血细胞则随流体流出芯片。该设计不依赖于肿瘤细胞表面标志物的表达,在培养基体系中捕捉率高达 (93.7 \pm 3.2)%,在全血体系中捕捉率达 (91.0 \pm 3.0)%,流速达 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。利用该芯片对不同类型肿瘤患者的外周血中的 CTCs 进行检测,在 2 mL 外周血中可检出 2~15 个 CTCs,检测灵敏度高,检出率为 75%。

仅基于尺寸差异设计的 CTCs 捕获芯片常会导致较低的分选纯度,这是因为 CTCs (15~25 μm) 和白细胞尺寸 (5~15 μm) 上有重叠,白细胞可能混在捕获到的 CTCs 中。为此, Ren 等^[36]设计了一种基于尺寸及变形性差异的多排平行微收缩通道和捕获腔室的“CTC-HTECH”芯片。芯片由 6 排微通道组成,每排由 40 个宽高为 8 μm 的收缩通道和宽高为 30 μm 的捕获腔室相间排列组成,当癌症患者的血液流经该芯片时,癌细胞会在经过收缩通道时变形,而在经过捕获腔室时恢复原来的形状,血细胞与流体一起流出芯片,从而捕获 CTCs。将其应用到人工小鼠全血样品体系中捕获前列腺癌细胞,捕获率高达 95% 以上。

确定性侧向位移 (deterministic lateral displacement, DLD) 原理起初主要应用于分离不同尺寸大小的颗粒物^[37],近些年来越来越多的研究团队将其应用于微流控芯片结构以实现 CTCs 的分选富集。在实际操作中, DLD 微柱阵列会存在一个临界分选半径,当流体在 DLD 微柱阵列中流动时,细胞会与 DLD 阵列发生碰撞产生变形,使得细胞自身的有效半径变小。然而, CTCs 本身的有效半径就大,又因 CTCs 相较于血细胞可变形性较差,即便与 DLD 阵列碰撞变形,其有效半径依然有可能大于 DLD 微柱阵列的有效半径,从而发生侧向位移;血细胞具有更好的可变形性,在与 DLD 阵列碰撞后,有效半径明显减小,当其低于分选临界半径时,细胞就不发生侧向位移^[38]。由此,血液中的 CTCs 和血细胞得以分离开来。Liu 等^[39]设计了一种三角形微柱 DLD 阵列芯片,使得该阵列的分选临界半径介于血细胞和 CTCs 的半径之间,该三角形微柱 DLD 阵列与细胞的碰撞接触为点接触,使细胞发生变形。将其用于对癌症患者外周血中的肿瘤细胞进行分选

富集,流速为 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$,捕获率为 95%。

2.2 力学性质差异

流体在微流控芯片中流动时,可看作是一个质点沿着与管道中轴平行的方向做直线运动,这种运动被叫做层流运动。不同流体速度下的层流会产生不同梯度的剪切力。当细胞在芯片通道中流动时,该剪切力梯度会使得细胞与管壁相互作用,这种相互作用力的合力称为惯性迁移力。因为 CTCs 和血细胞具有不同的细胞尺寸,它们在管道中受到的惯性迁移力也不同,这就使得两种细胞在管道中呈现不同的分布位置,进而可将两种细胞分离开来。常用的芯片内通道有三种类型:直管、弯管和螺旋管。Park 等^[40]设计了“MOFF”及“MS-MOFF”直管道微流控芯片,使用该芯片对 CTCs 进行分选,流速可达 100~300 $\mu\text{L}/\text{min}$,并且分选出的肿瘤细胞具有非常高的细胞活性 (89%~91%)。

为了使 CTCs 的分选富集取得更好的效果,许多研究团队设计了弯管道微流控芯片。当流体在弯管道中流动时,流体中的细胞同时受到惯性迁移力和离心力的作用,这种离心力会使得流体呈涡流状态流动,而涡流又对流体中的细胞产生迪恩拽力。利用 CTCs 与血细胞力学性质的差异,设计了一系列涡流芯片^[41-46],在惯性分选方面做了很多的工作,利用这些芯片分选富集 CTCs,实现了高通量高纯度分选。

同样基于惯性分选原理,许多研究团队在弯管道芯片基础上进一步发展螺旋管道芯片。Kuntaegowdanahalli 等^[47]在芯片内设计螺旋管道对不同直径的聚苯乙烯微粒进行了分选,捕获率达 90%,同时,用该芯片分选 CTCs,捕获率为 80%,细胞活性为 90%。Lim 实验室也设计了一系列的螺旋管道芯片(图 5),实现了对 CTCs 的免标记高效率分选富集^[48-49]。

2.3 声波分选

利用声波分选 CTCs 的原理是基于血液中细胞的大小、密度、压缩系数的不同^[50]。该种分选方式不用标记抗体,不用与细胞接触造成大的机械损伤,具有很好的生物相容性。Huang 实验室在声波分选 CTCs 领域做了一系列的研究工作^[51]。该团队设计的第一代声波分选设备基于“倾斜角驻波表面声波 (taSSAW)”,在流体通道两侧各放置一个声波传感器,当两股声波在通道内相遇时结合形成驻波,驻波在特定位置产生压力节点。因声波是倾斜的,细胞以一定角度经过通道,癌细胞和血细胞因大小和

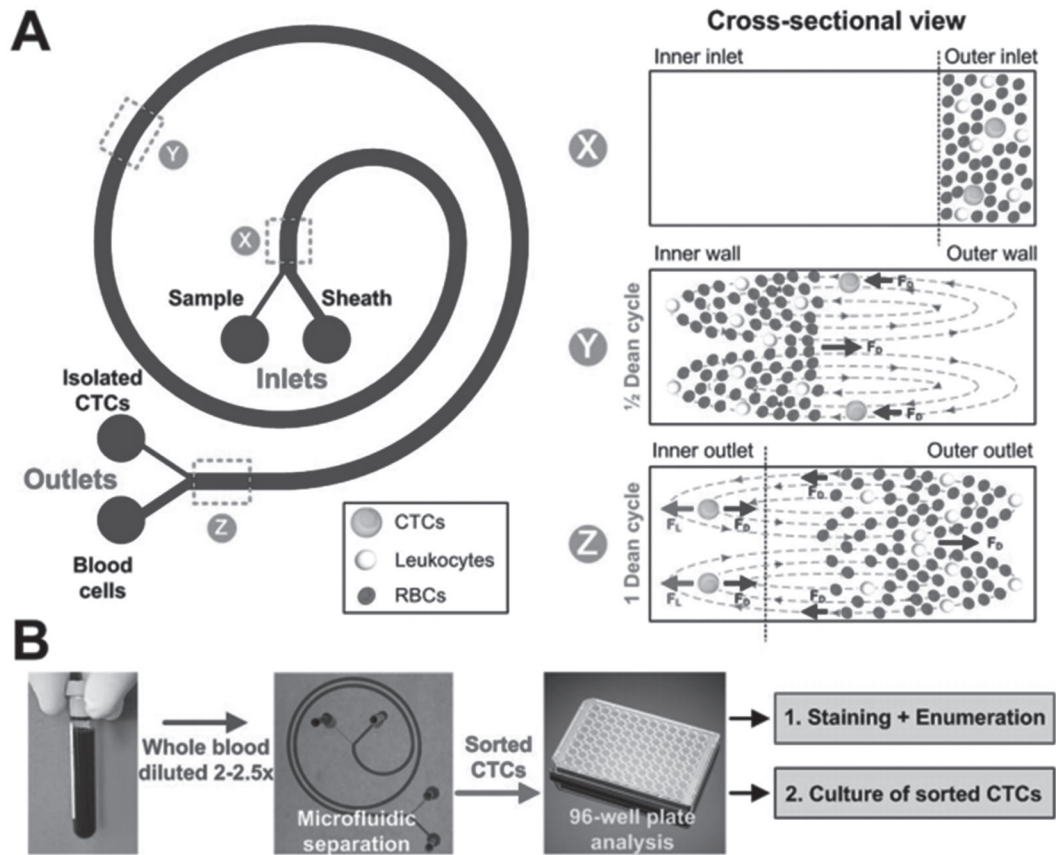


图5 螺旋管道芯片示意图及其分选原理^[48]

压缩系数的不同在经过一系列压力节点时产生不同的走向, 进而实现两者的分离。对最佳分选条件进行优化后, 该设备成功实现了对聚苯乙烯微球的分离, 其中把 10 μm 的微球从 2 μm 微球中分离出来的效率可达 99%, 把 9.9 μm 的微球从 7.3 μm 微球中分离出来的效率可达 97%。随后, 将该声波分选设备应用于人体血液样本中乳腺癌细胞 MCF-7 的分选, 回收率为 71%, 纯度为 84%。第二代声波分选设备解决了第一代通量低、分选速度慢的问题, 6 mL 血的分选时长从原来的 50 多个小时缩短到了 5 小时, 分选速度从 1 μL/min 提高到 1.2 mL/h, 是从前的 20 倍。将癌细胞与白细胞按照血液中比例混合进行分离, 癌细胞的捕获率高于 83%, 纯度为 90% 以上 (图 6)^[52]。将第二代分选设备应用于临床癌症患者血液样本的检测, 取得了很好的分离效果。第三代分选设备在前期工作的基础上进一步提高了通量和捕获效率, 分选速度达 7.5 mL/h, 捕获率达 86% 以上^[53]。

2.4 物理捕获CTC-clusters

在外周血中循环的肿瘤细胞不止以单细胞的形

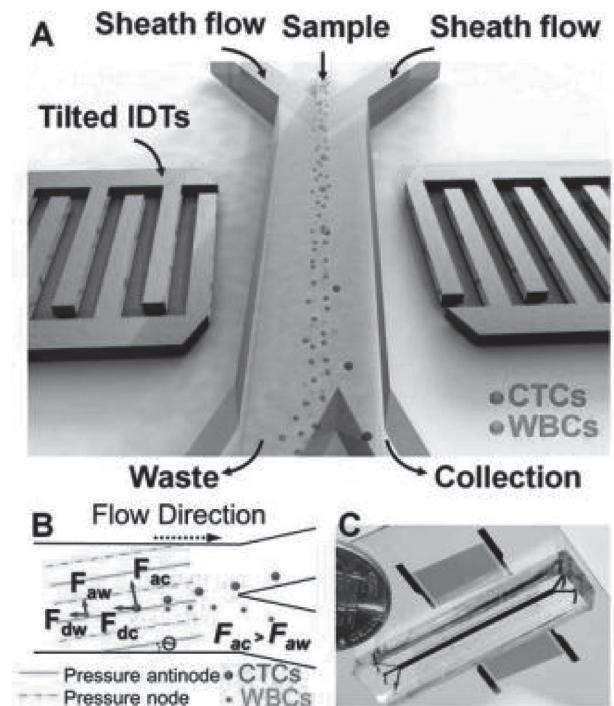


图6 第二代taSSAW声波分选设备示意图及其分选原理^[52]

式存在,有些以单细胞群体 (CTC-clusters) 的形式存在,目前常用的 CTCs 分选富集技术主要是针对单细胞的研究,但有关研究表明,CTC-clusters 更容易引起远端转移,占癌症远处转移病灶的一半。Sarioglu 等^[54]针对该细胞簇进行检测,在 *Nature* 期刊上发表了开创性工作。他们设计制作了一种“Cluster-Chip”,无需对血液预处理,也不依赖于肿瘤细胞表面特异性标志物的表达,可实现对 CTC-clusters 的高效物理捕获。这种方法利用特定的分支诱捕器分离 CTC-clusters,且在较低的剪切力条件下保持了细胞簇的完整性。

3 多种技术结合的分选富集

由于 CTCs 分选的复杂性,同时利用癌细胞和血细胞生物学与物理性质的差异而设计的芯片结构,可得到更好的捕获效果。至今,已经有很多这种多种技术结合的 CTCs 的分选富集报道。

Wu 等^[55]研制了一种“SCT-Chip”微流控芯片,芯片内部设计了一种交错平行有序排列的微柱结构,并且该微柱结构自身的微通道允许血细胞通过而不允许 CTCs 通过,同时在磁珠表面修饰上了抗 EpCAM 抗体,将其应用于对样品中 CTCs 的分选富集,取得了良好的捕获效果。流速可达 3 $\mu\text{L}/\text{min}$,捕捉率高达 98%,且高度有序排列的微柱可指示 CTCs 的位置,减少了分析时间,极大地提高了分析效率。

Ahmed 等^[56]设计了一种“SDI-Chip”芯片,也是一种基于尺寸差异的免疫捕获芯片。芯片内有平行排列且有一定倾斜角度的三角形微柱,在微柱表面修饰上抗 EpCAM 抗体,利用抗原抗体免疫亲和分选及确定性侧向位移原理实现了对样品中癌细胞的捕获,其捕捉率高达 92%,纯度达 82%。随后,该团队又在此芯片的结构基础上,在微柱表面修饰上了结合有特异性靶向 EpCAM 抗原的核酸适配体 SYL3C 的 Au 纳米颗粒,由于一个 Au 纳米颗粒平均连接了约 250 个适配体分子,其在微柱表面形成了一个类似的八爪鱼结构,且 Au 纳米颗粒表面粗糙,比表面积大,联合确定性侧向位移原理,三者协同作用极大地增加了流体中细胞与微柱的接触机会,作者将此芯片命名为“AP-Octopus-Chip”。使用该芯片用于 CTCs 的捕获,捕捉率可达 89.4%,细胞释放率达 80%,释放的细胞活性可达 96%^[57]。

4 结论与展望

利用微流控芯片技术分选富集 CTCs 具有一系

列的优势,如芯片结构易于设计、样品消耗量少、分选时间短、通量高、微型化的芯片体积便于与其他表征手段结合等。其能够在微米尺度范围内对流体进行操控,能很好地应用于分选富集循环肿瘤细胞。本文依据 CTCs 和血细胞之间生物学性质与物理性质的不同,介绍了两种利用微流控芯片分选富集 CTCs 的方法,许多科研团队的研究成果表明这些方法都具有比较好的分选富集效果。基于生物学性质差异的分选富集方法有阳性分选法和阴性分选法,阳性分选法以 CTCs 为目的细胞进行分选,分选效果主要依赖于抗体或核酸适配体与 CTCs 表面特异性标志物的免疫亲和,特异性强、纯度高,但较其他方法成本高、耗时长、通量低,只适用于 CTCs 表面特异性标志物高表达的癌细胞分选,并且由于抗原与抗体或核酸适配体结合时占据反应位点,有可能会影响分选出的细胞的活性降低;阴性分选法多以血液中的白细胞为目的细胞进行分选,可在血样 CTCs 检测时去除白细胞背景干扰。基于物理性质差异的分选富集方法主要是依据 CTCs 和血细胞的细胞尺寸、密度、介电性、变形性、力学性质等物理性质上的差别将其两者分离。该方法不依赖于细胞表面特异性蛋白的表达,且在分选过程中不引入其他试剂,可使分选出的细胞保持很好的活性,直接用于基因测序等下游分析,但因 CTCs 和白细胞的尺寸区间并非完全没有交集,这可能会导致捕捉到的 CTCs 中有白细胞的存在,使得分选纯度较低。可见,单一的生物学方法或物理方法并不能使 CTCs 的分选富集同时具有很好的捕获率和捕获纯度。

在未来的研究工作中,应根据实际情况充分考虑采用哪种方法对 CTCs 进行分选富集,如肿瘤细胞特异性标志物表达水平、分选目的、芯片设计的成本及复杂性等。可将这两类方法结合起来设计芯片,汲取各家优点,可获得更好的捕获效果。同时,由于在肿瘤生长或治疗过程中,CTCs 会经历上皮-间质转化或发生基因突变,这就导致 CTCs 间存在异质性,现有的解决方法主要是通过使用抗体或核酸适配体混合物捕获 CTCs,以防漏检,但这种方法只能将 CTCs 以“团体”形式捕获,不能实现对不同表达水平表面标志物的 CTCs 的梯度检测,即不能依据表面标志物表达水平对单个 CTCs 进行分离。在将来的分选研究中,可通过联合物理学方法,设计特殊结构的芯片,实现对不同梯度蛋白表达水平的 CTCs 分选。

[参 考 文 献]

- [1] Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastasis cascade. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 448-56
- [2] Fidler, Isaiah J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 453-8
- [3] Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 2006, 127: 679-95
- [4] Song YL, Tian T, Shi YZ, et al. Enrichment and single-cell analysis of circulating tumor cells. *Chem Sci*, 2017, 8: 1736-51
- [5] Poudineh M, Sargent EH, Pantel K, et al. Profiling circulating tumour cells and other biomarkers of invasive cancers. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2: 72-84
- [6] Becker FF, Wang XB, Huang Y, et al. Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 860-4
- [7] Muller V, Stahmann N, Riethdod S, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res*, 2005, 16: 331-2
- [8] Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry*, 2010, 49: 150-8
- [9] Vona G, Sabile A, Louha M, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*, 2000, 156: 57-63
- [10] Lee HJ, Oh JH, Oh JM, et al. Efficient isolation and accurate *in situ* analysis of circulating tumor cells using detachable beads and a high-pore-density filter. *Angew Chem Int E Engl*, 2013, 52: 8337-40
- [11] Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN, et al. A rare-cell detector for cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 10501-4
- [12] Hsieh HB, Marrinucci D, Bethel K, et al. High speed detection of circulating tumor cells. *Biosens Bioelectron*, 2006, 21: 1893-9
- [13] Wu CH, Huang YY, Chen P, et al. Versatile immunomagnetic nanocarrier platform for capturing cancer cells. *ACS Nano*, 2013, 7: 8816-23
- [14] 包建民, 王丹丹, 李优鑫. 微流控芯片分选临床样品中循环肿瘤细胞的研究进展. *色谱*, 2017, 35: 129-37
- [15] Went P, Vasei M, Bubendorf L, et al. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target EpCAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer*, 2006, 94: 128-35
- [16] 杜晶辉, 刘旭, 徐小平. 微流控芯片分选富集循环肿瘤细胞的研究进展. *色谱*, 2014, 32: 7-12
- [17] Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 2007, 450: 1235-9
- [18] Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 18392-7
- [19] Wang ST, Liu K, Liu J, et al. Highly efficient capture of circulating tumor cells by using nanostructured silicon substrates with integrated chaotic micromixers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50: 3084-8
- [20] Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the system. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 920-8
- [21] Zhao LB, Lu YT, Li FQ, et al. High-purity prostate circulating tumor cell isolation by a polymer nanofiber-embedded microchip for whole exome sequencing. *Adv Mater*, 2013, 25: 2897-902
- [22] Hou S, Zhao LB, Shen QL, et al. Polymer nanofiber-embedded microchips for detection, isolation, and molecular analysis of single circulating melanoma cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52: 3379-83
- [23] Hou S, Zhao HC, Zhao LB, et al. Capture and stimulated release of circulating tumor cells on polymer-grafted silicon nanostructures. *Adv Mater*, 2013, 25: 1547-51
- [24] Sheng WA, Chen T, Kamath R, et al. Aptamer-enabled efficient isolation of cancer cells from whole blood using a microfluidic device. *Anal Chem*, 2012, 84: 4199-206
- [25] Shen QL, Xu L, Zhao LB, et al. Specific capture and release of circulating tumor cells using aptamer-modified nanosubstrates. *Adv Mater*, 2013, 25: 2368-73
- [26] Tang M, Wen CY, Wu LL, et al. A chip assisted immunomagnetic separation system for the efficient capture and *in situ* identification of circulating tumor cells. *Lab Chip*, 2016, 16: 1214-23
- [27] Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, 2013, 339: 580-4
- [28] Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*, 2005, 2: e73
- [29] Brinkmann F, Hirtz M, Haller A, et al. A versatile microarray platform for capturing rare cells. *Sci Rep*, 2015, 5: 15342-52
- [30] Zhao LB, Tang CH, Xu L, et al. Enhanced and differential capture of circulating tumor cells from lung cancer patients by microfluidic assays using aptamer cocktail. *Small*, 2016, 12: 1072-81
- [31] Dong ZZ, Tang CH, Zhao LB, et al. A microwell-assisted multiaptamer immunomagnetic platform for capture and genetic analysis of circulating tumor cells. *Adv Healthcare Mater*, 2018, 180: 1229-37
- [32] Lustberg M, Jatana KR, Zborowski M, et al. Recent results in cancer research [M]. West Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2012
- [33] Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 179ra47
- [34] Shaw Bagnall J, Byun S, Begum S, et al. Deformability of tumor cells versus blood cells. *Sci Rep*, 2015, 5: 18542-52

- [35] Yang CG, Zhang NG, Wang SY, et al. Wedge-shaped microfluidic chip for circulating tumor cells isolation and its clinical significance in gastric cancer. *J Transl Med*, 2018, 16: 139-50
- [36] Ren X, Foster BM, Ghassemi P, et al. Entrapment of prostate cancer circulating tumor cells with a sequential size-based microfluidic chip. *Anal Chem*, 2018, 90: 7526-34
- [37] Huang LR. Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. *Science*, 2004, 304: 987-90
- [38] Gossett DR, Weaver WM, Mach AJ, et al. Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397: 3249-67
- [39] Liu ZB, Huang F, Du JH, et al. Rapid isolation of cancer cells using microfluidic deterministic lateral displacement structure. *Biomicrofluidics*, 2013, 7: 11801-10
- [40] Park JS, Song SH, Jung HI. Continuous focusing of microparticles using inertial lift force and vorticity via multi-orifice microfluidic channels. *Lab Chip*, 2009, 9: 939-48
- [41] Gossett DR, Dino DC. Particle focusing mechanisms in curving confined flows. *Anal Chem*, 2009, 81: 8459-65
- [42] Mach AJ, Dino DC. Continuous scalable blood filtration device using inertial microfluidics. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 107: 302-11
- [43] Mach AJ, Kim JH, Dino DC. Automated cellular sample preparation using a Centrifuge-on-a-Chip. *Lab Chip*, 2011, 11: 2827-34
- [44] Hur SC, Mach AJ, Dino DC. High-throughput size-based rare cell enrichment using microscale vortices. *Biomicrofluidics*, 2011, 5: 22206-25
- [45] Hur SC, Henderson-Maclennan NK, McCabe ERB, et al. Deformability-based cell classification and enrichment using inertial microfluidics. *Lab Chip*, 2011, 11: 912-20
- [46] Sollier E, Go DE, Che J, et al. Size-selective collection of circulating tumor cells using vortex technology. *Lab Chip*, 2013, 14: 63-77
- [47] Kuntaegowdanahalli SS, Bhagat AA, Kumar G, et al. Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels. *Lab Chip*, 2009, 9: 2973-80
- [48] Hou HW, Warkiani ME, Khoo BL, et al. Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. *Sci Rep*, 2012, 3: 1259-66
- [49] Warkiani ME, Khoo BL, Wu L, et al. Ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells from blood using spiral microfluidics. *Nat Protoc*, 2015, 11: 134-48
- [50] Ding XY, Li P, Lin SC, et al. Surface acoustic wave microfluidics. *Lab Chip*, 2013, 13: 3626-49
- [51] Ding XY, Peng ZL, Lin SC, et al. Cell separation using tilted-angle standing surface acoustic waves. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 12992-7
- [52] Li P, Mao ZM, Peng ZL, et al. Acoustic separation of circulating tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 4970-5
- [53] Wu MX, Huang HP, Zhang R, et al. Circulating tumor cell phenotyping via high-throughput acoustic separation. *Small*, 2018, 14: 1801131
- [54] Sarioglu AF, Aceto N, Kojic N. A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell-clusters. *Nat Methods*, 2015, 12: 685-91
- [55] Wu LL, Tang M, Zhang Z, et al. Chip-assisted single-cell biomarker profiling of heterogeneous circulating tumor cells using multifunctional nanospheres. *Anal Chem*, 2018, 90: 10518-26
- [56] Ahmed MG, Abate MF, Song Y, et al. Isolation, detection, and antigen-based profiling of circulating tumor cells using a size-dictated immunocapture chip. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56: 10681-5
- [57] Song YL, Shi YZ, Huang MJ, et al. Bioinspired engineering of multivalent aptamer-functionalized nanointerface to enhance capture and release of circulating tumor cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58: 2236-40