

微流控芯片技术在循环肿瘤细胞分离中的研究进展*

吕晓庆¹⁾ 李雷^{2)**} 陈红梅³⁾ 陈鹏^{4)**} 刘静²⁾

¹⁾ 天津医科大学基础医学研究中心转化肿瘤学实验室, 天津 300070;

²⁾ 中国科学院理化技术研究所低温工程学重点实验室, 低温生物医学工程学北京市重点实验室, 北京 100190;

³⁾ 中国科学院半导体研究所集成光电子学国家重点联合实验室, 北京 100083;

⁴⁾ 天津医科大学附属肿瘤医院, 天津市肺癌诊治中心, 天津 300060)

摘要 循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是指从原发肿瘤或转移灶脱落、发生上皮-间质转化进入患者外周血血液循环的恶性肿瘤细胞。CTCs 在肿瘤研究和临床诊断上的作用逐渐得到认可, 外周血中 CTCs 存在与否以及数量多少不但可以用于肿瘤的早期诊断, 还可以用于评估肿瘤预后、监测肿瘤的转移和复发。微流控芯片作为一个高通量、小型化的细胞实验平台, 已被应用于 CTCs 的分选当中。本文综述了用于 CTCs 捕获的微流控芯片系统的最新研究进展, 着重介绍各类芯片的捕获原理、芯片结构和捕获效率, 最后对微流控芯片技术在 CTCs 分选中的应用前景进行了展望。

关键词 微流控芯片, 循环肿瘤细胞, 肿瘤转移, 细胞分选

学科分类号 Q81, R73

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0309

恶性肿瘤已成为我国死亡率最高的重大疾病之一, 90%以上的肿瘤病人死于肿瘤的转移和复发。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是从实体瘤或转移灶脱落, 发生上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进入外周血血液循环的恶性肿瘤细胞, 被认为是肿瘤发生转移的必要前提^[1-2]。微环境改变的条件下, CTCs 又发生间质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)而在远端器官中停留, 生成新的肿瘤, 从而导致肿瘤转移^[3]。CTCs 检测在新的肿瘤生物标志物的发现、肿瘤预后判断及个体化治疗方面存在很大的应用潜力, 是国内外肿瘤研究的热点之一。然而, CTCs 在血液中的数量非常少, 10^9 个血细胞中仅含有 1~10 个 CTCs^[4], 因此, CTCs 研究的关键在于从含有大量血细胞的复杂血液样本中准确、高效地将其分选出来^[5], 满足高捕获率、高纯度和高通量的要求, 进而成为能够满足科研和临床需求的工具。a. 高捕获率, 即可以将样品中的 CTCs 尽可能多地分离出来; b. 高纯度,

即希望分离出来的细胞只含有 CTCs, 其他细胞的含量很少或没有, 收集到的 CTCs 可以进行表型和基因型分析; c. 高通量, 即能短时间内处理大量样品。

目前, 唯一通过美国食品和药品监督管理局(FDA)认证的 CTCs 分离和计数系统是 CellSearch, 它是一个依赖于免疫磁珠原理的半自动化工作系统。该系统通过连接了抗上皮细胞黏附分子抗体(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)的磁珠和 CTCs 表面标志物 EpCAM 特异性结合, 达到捕获 CTCs 的目的。CTCs 的识别使用经典的免疫染色法。该系统分选 CTCs 效率为 80%^[6]。尽管

* 中国科学院重点部署项目(KJZD-EW-TZ-L03-6), 天津市自然科学基金项目(13JCYBJC23600), 国家自然科学基金面上项目(61078074)和中国博士后科学基金(2014M550794)资助。

** 通讯联系人。

李雷: Tel: 010-82543766, E-mail: lileilei@mail.ipc.ac.cn

陈鹏: Tel: 022-23340123, E-mail: chenpengdoc@sina.com

收稿日期: 2015-02-02, 接受日期: 2015-03-05

CellSearch 已通过 FDA 批准, 但该系统还存在一些缺点, 比如暂未实现全自动分选、假阳性比率高^[7]、富集后的 CTCs 没有生物活性等, 更重要的是, CellSearch 捕获到的 CTCs 仅仅是 EpCAM 阳性的类型, 而许多恶性程度很高的 CTCs 并不表达 EpCAM, 从而无法被检测出来。

微流控芯片是一个集样品制备、反应、分离、检测等功能于一体的小型分析实验平台, 它通过微加工技术, 在硅、玻璃、聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 等材料上, 根据实际需求, 制作出各种结构的、尺寸在微米量级的管道进行实验。将原来需要在一个综合实验室内完成的工作简化到一个微小的芯片上, 不仅减少了耗材和试剂的消耗、大大降低了成本, 而且提高了检测的灵敏度和分析速度, 具有自动和高效的优点。

随着微流控芯片技术在细胞生物学中的应用不断扩展, 微流控芯片具有的可集成样品预处理和分析为一体的优势, 在 DNA 测序^[8-9]、蛋白质检测^[10-11]、细胞操控和胞内成分分析^[12-13]等研究领域

显示出巨大的应用潜力。由于微流控芯片管道尺寸在微米量级和细胞尺寸匹配, 非常适合应用于细胞分选, 近些年来, 有越来越多的研究者将该技术应用在 CTCs 的分选上。

微流控芯片分选和富集 CTCs 的原理主要分为 4 类: a. 利用抗原抗体亲和性进行分选; b. 利用细胞物理特征的不同进行分选, 比如细胞大小、变形性以及不同大小的细胞在流场中的力学特性; c. 利用免疫磁珠具有磁性兼连接抗体的作用进行分选; d. 利用不同细胞的电学性能差异进行分选等。本文依据不同的 CTCs 分选原理, 总结了近年来利用微流控芯片分离、富集 CTCs 的研究现状和最新进展。

1 亲和性分选法

利用亲和性反应 (affinity reaction) 原理进行细胞分选是微流控芯片上最经典、最常用的方法之一 (图 1a), 具体步骤是在芯片内部的微通道或微结构上修饰能够与目的细胞表面抗原结合的特异性抗体

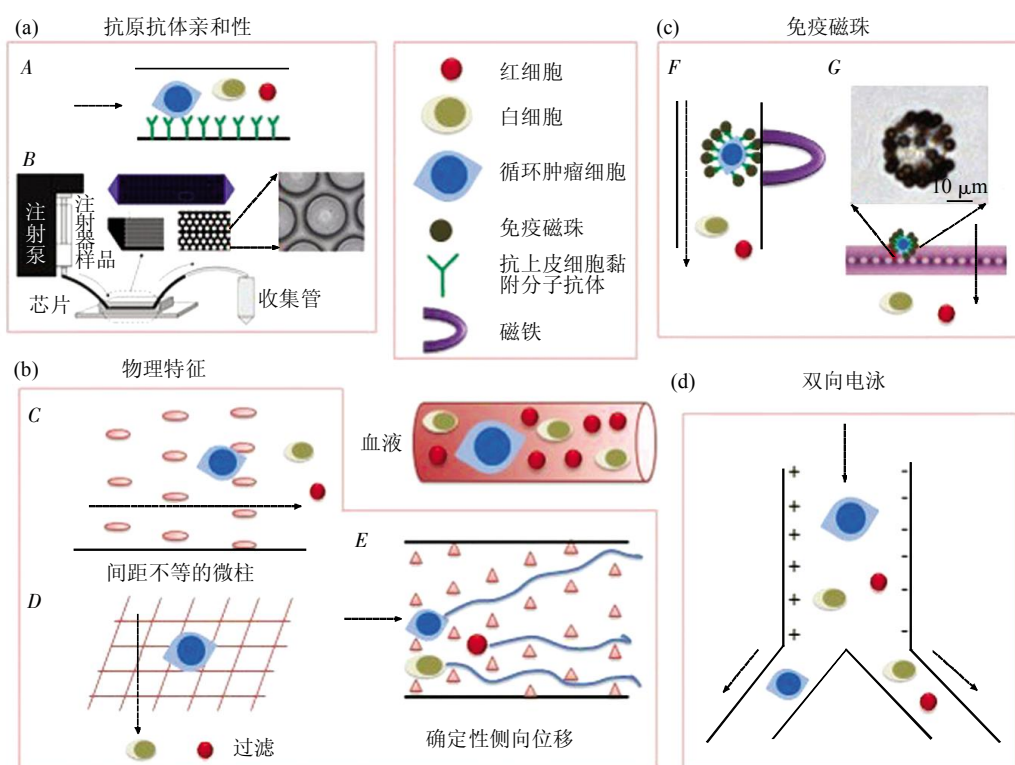


Fig. 1 The schematic of various CTCs capturing microfluidic chips

图 1 微流控芯片捕获 CTCs 各类芯片结构示意图

(a) 亲和性分选法 (A: 亲和性分选芯片原理示意图; B: 亲和性分选芯片系统装置及芯片内部微柱显微照片). (b) 物理特征分选法 (C: 大小 - 变形性分选微柱捕获示意图; D: 大小 - 变形性分选微孔捕获示意图; E: 确定性侧向位移芯片示意图). (c) 免疫磁珠分选法 (F: 免疫磁珠捕获原理示意图; G: 磁珠和大小 - 变形性方法结合捕获示意图, 细胞与磁珠结合后, 尺寸增加, 更有利于细胞被捕获). (d) 双向电泳分选法示意图。

或适配体, 比如上皮细胞黏附分子, 当样品流经微通道时, 目的细胞表面抗原与微通道或微结构上的特异性抗体或适配体结合, 细胞被固定在芯片内, 其他细胞随缓冲液流出芯片; 再用合适的方法, 比如更换缓冲液, 洗脱并收集目的细胞进行下游分析.

He 等^[14]设计了一种由 TiO₂ 纳米颗粒制备的具有生物相容性纳米薄膜, 在玻璃基底中旋涂这种纳米薄膜, 再在薄膜上修饰 EpCAM 抗体, 样品通过芯片时, CTCs 结合在纳米薄膜上而留在芯片中. 该研究将人结肠癌细胞 HCT116 混入健康人血液作为待测样品, 成功分离出 HCT116 细胞, 其效率约为 80%. 这种由纳米颗粒组成的纳米薄膜可以增加抗体和细胞表面抗原之间的接触机率. 通过加大流体剪切力可将约 50% 的被捕获细胞洗脱下来, 洗脱下来的细胞具有生物活性, 可进行体外培养.

Sheng 等^[15]制作了几何增强混合 (geometrically enhanced mixing) 芯片, 简称 “GEM chip”, 芯片大小与载玻片相同, 芯片中有很多鱼脊形或 V 形结构, 8 个并联管道用以加大通量. 这种芯片通过内部的鱼脊形或 V 形结构形成涡流, 从而提高细

胞与抗体之间的接触机率, 有利于目的细胞与芯片结构内修饰的抗体结合, 从而高效捕获 CTCs. 该研究将人胰腺癌细胞混入健康人血液作为待测样品进行实验, 捕获效率高达 90%, 同样, 被捕获的肿瘤细胞可以被洗脱并继续培养进行后续实验.

Launier 等^[16]设计了一种内部连接 EpCAM 和 E 选择素 (E-selectin) 的双抗体芯片, E 选择素用于加大肿瘤细胞在所受流体剪切力作用下的捕获效率, 与其结合的白细胞可以用一种螯合钙的缓冲液洗脱下来, 肿瘤细胞则留在芯片内. 文中还用只修饰 EpCAM 抗体的芯片作为对比, 证明这种方法的捕获效率是只修饰 EpCAM 抗体的芯片捕获效率的 1.9 倍.

Nagrath 等^[17]设计了具有微柱阵列结构 CTCs 捕获芯片, 实验了不同癌细胞系 EpCAM 表达水平, 对于人非小细胞肺癌细胞系 NCI-H165 的 PBS 悬液捕获效率高达 99%, 对于 116 例肿瘤转移患者 (包括前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌和结肠癌) 血液, 有 115 例捕获到了数量不等的 CTCs. 其他利用亲和性原理捕获 CTCs 的微流控芯片整理列于表 1.

Table 1 Summary of affinity method to capture CTCs
表 1 亲和性分选法捕获 CTCs 文献总结

捕获单元	抗体类型	样品	捕获效率 /%	参考文献
TiO ₂ 纳米颗粒制备的纳米薄膜	Anti-EpCAM	HCT116 细胞混于血液	80	[14]
鱼脊形或 V 形结构	Anti-EpCAM	L3.6pl 细胞混于血液	90	[15]
直线型微管道	Anti-EpCAM	MCF-7 细胞 PBS 悬液	95	[16]
微柱阵列	Anti-EpCAM	NCI-H165 细胞 PBS 悬液, 癌症病人血液	99	[17]
PDMS 鱼骨形结构	Anti-EpCAM	PC-3 细胞混于血液 15 例转移性前列腺癌病人血液	91.8	[18]
曲线 PMMA 微管道	Anti-EpCAM	MCF-7 细胞混于血液中	97	[19]
金纳米孔 PMMA 微管道	Anti-EpCAM	PANC-1 细胞混于血液	-	[20]
纳米多孔聚碳酸酯膜	Anti-EpCAM	PC-3 细胞混于白细胞	70	[21]
硅纳米柱子	Anti-EpCAM	MCF-7、PC-3、T-26 细胞混于血液 26 例前列腺癌病人血液	95	[22]

-: 文章中未提.

亲和性分选法有特异性高的优点, 能有效分选形状、大小相似的不同种类细胞. 目前大部分研究者采用 EpCAM 作为 CTCs 的表面特异性抗原^[14-22], 但是在不同的肿瘤亚型中, EpCAM 的表达各不相同, 例如乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231 的 EpCAM 表达水平不同^[23], 并且当肿瘤细胞通过上

皮间质转化 (EMT) 作用传播时, EpCAM 和角蛋白 (CKs) 的表达下调, 波形蛋白 (vimentin) 和 N- 钙黏素 (N-cardherin) 表达上调^[24]. 依赖 EpCAM 的 CTCs 分选芯片会丢失不表达或低表达 EpCAM 的 CTCs, 然而这些 CTCs 具有更大的浸润性和侵入性^[25]. 因此, 缺乏公认的表面标志物限制了亲和性分选在

CTCs 分选中的应用. 另外, 亲和性分选法要在通量和效率之间权衡, 流速越大, CTCs 和抗体反应的时间越少, 这会导致分选效率降低. 亲和性分选法与大小变形性分选法相结合, 或使用多抗体修饰的芯片分选 CTCs 也许是个不错的解决办法, 但不同种类抗体的反应缓冲液以及反应条件各不相同, 实验成本也会随之增加. 因此, 增加芯片内部结构与细胞接触的面积和机率, 在芯片内部修饰多种抗体捕获不同蛋白质表达的 CTCs, 是利用亲和性分选法原理分离 CTCs 的微流控芯片发展的主要方向. 另外这种方法非常适合分选已知表面抗原的目的细胞, 比如血液中的某些免疫细胞等.

2 物理特征分选

微流控芯片进行 CTCs 分选, 常根据 CTCs 与血细胞物理特性(如变形性、大小、流体力学特性等)的差异, 通过在芯片中设置不同的微结构单元将其从血液中分离出来, 常用的微结构包括微孔、微过滤网和微柱等.

2.1 基于细胞大小和变形性差异

大多数上皮来源的 CTCs 直径从 14~26 μm 不等, 而白细胞直径从 8~20 μm 不等^[26]. 通过在芯片内部设计不同的小于 CTCs 直径的微孔、微过滤网、微柱等结构(图 1b(C、D)), 当含有 CTCs 的样品流经芯片时, CTCs 由于直径大而被卡在结构内, 血细胞则随缓冲液一起流出, 较大的白细胞被结构捕获时, 由于 CTCs 比白细胞变形性小, 加大缓冲液流速时, 白细胞被冲走, CTCs 则留在芯片内, 从而达到分离目的.

Abnova 公司的 ClearCell® CX System^[27]就是基于此原理分离 CTCs 的代表, 该系统还可以动态监测 CTCs 的捕获过程. 芯片主要结构由圆柱形微柱构成, 每个捕获单元由三个圆柱排列组成一个“爪形”结构. 捕获后的 CTCs 可以进行染色鉴别和计数, 亦可被重新收集继续培养进行后续实验, 如研究 CTCs 的分子生物学特征、建立动物模型、临床个体病例研究等.

Lim 等^[28]设计了一种微筛芯片, 该芯片由硅片加工而成, 其捕获单元为包含 10^5 个小孔的微阵列, 蠕动泵将血液样品从芯片上方泵入进行捕获. 该系统捕获掺在健康人血液中的 MCF-7 和 HepG2 细胞的效率在 80% 以上. 该作者又用 8 例癌症病人血液样品进一步验证了该系统的可靠性, 成功从病人血液中分离出 CTCs, 整个处理过程仅需 1.5 h.

Hosokawa 等^[29]则用微腔阵列(microcavity array, MCA)系统捕获 CTCs, 该系统的核心结构由 100×100 个 8~9 μm 直径的圆孔阵列组成, 芯片下面连接蠕动泵. 实验中, NCI-H358 细胞混在血液中, 蠕动泵将样品从蓄液池吸入芯片, 血细胞通过圆孔随缓冲液流出, 肿瘤细胞则由于负压作用被固定在圆孔上从而被成功分离. 该系统可将混在 1 ml 血液中的 10 个肿瘤细胞在 15 min 内完全捕获, 并且保持细胞活性. 染色鉴别结果证明其分选效率高 97%, 大大高于同一实验样本采用 CellSearch 系统的分选效率. Jin 等^[30]设计了一种不同间距的“棘齿”型微柱阵列捕获芯片, 间距依次从 18 μm 到 2 μm 递减, 进入芯片的样品呈振荡流, 与垂直方向的液流耦合, 通过调整压力和流速, 肿瘤细胞和血细胞在芯片内实现分离, 人膀胱癌细胞掺在健康人血液中的样品分离效率在 70% 以上. Lv 等^[31]设计了一种间距渐变式捕获芯片, 该芯片结构分为过滤和捕获两个部分. 过滤部分的作用是滤掉血液中的杂质, 最大限度减少芯片堵塞; 捕获部分则设计了不同间距微柱, 间距从 12 μm 到 4 μm 递减, 血细胞可通过微柱, 而肿瘤细胞则被捕获, 肿瘤细胞混入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)悬液样品的捕获效率高达 90% 以上. 其他基于细胞大小和变形性差异原理捕获循环肿瘤细胞的微流控芯片整理列于表 2.

基于细胞大小和变形性差异分选法捕获 CTCs 的优势在于: a. 操作过程简单, 样品只需用缓冲液稀释, 不需要进行染色标记, 检测时直接将稀释后的全血通入芯片, 在出口处收集细胞即可; b. 捕获效率高; c. 能够实现高通量分选; d. 成本远远低于 CellSearch; e. 无需依赖表面标志物, 分选出的 CTCs 可以用多种抗体进行标志物鉴别. 该方法存在的问题是仅仅基于细胞尺寸和变形性不同而进行过滤式分选, 由于 CTCs 尺寸和白细胞有重叠部分, CTCs 有可能会通过滤网或微柱的间隔, 然而这些 CTCs 由于经历了 EMT 作用而具有间质细胞特性, 更容易发生转移, 恶性程度更高^[32]; 而且在较大的机械力作用下, CTCs 随着缓冲液流过微柱或者滤网时容易破裂^[33]. 这些因素会对分离纯度和细胞活性造成一定影响, 这类芯片在设计内部捕获单元时应避免使用带棱角的微柱, 比如三角形、长方形、正方形等, 而改用圆形、椭圆形等微柱, 减少对细胞的损伤.

Table 2 Summary of size-deformability based method to capture CTCs

表 2 基于细胞大小和变形性差异捕获 CTCs 文献总结

捕获单元	管道特征	捕获间距	样品	捕获效率 /%	参考文献
微过滤器	硅材料微孔	10 μm	MCF-7、HepG2 细胞混于血液、癌症病人血液	80	[28]
	微腔阵列	8~9 μm	The A549, HCC827, NCI-H358, NCI-H441, PC-14, DMS79, NCI-H69 和 NCI-H82 细胞混于血液, 肺癌病人血液	97	[29]
	parylene-C 微柱薄膜	5~7 μm	PC3、DU145 细胞混于血液	约 90	[34]
	双层 Parylene 微孔薄膜	8 μm	LNCaP、MCF-7 细胞混于血液	86.5 $\pm$ 5.3	[35]
	Parylene 微孔薄膜	8 μm	RT4、T24、J82、HT-1080、LNCaP、MCF-7、MDA-MB-231、SK-BR-3 细胞混于血液, 转移癌症病人血液	> 90	[36]
间距不同的微柱	“棘齿”型微柱阵列	2~18 μm	UM-UC13 细胞混于血液	70	[30]
	PDMS 微柱	4~12 μm	THP-1 细胞 PBS 悬液	90	[31]
	PDMS 微柱	5~20 μm	SK-N-MC、SK-N-AS、SK-N-SH、SHSY5Y、BE(2)-M17、MDA231、SW620、HEK293 细胞混于血液	-	[37]
	PDMS 微柱	8~16 μm	MCF-7 细胞混于血液, 转移癌症病人血液	95	[38]
	PDMS 微柱	4~41 μm	THP-1 细胞混于血液	-	[39]

-: 文章中未提。

2.2 基于细胞力学性质差异

2.2.1 基于惯性力

近年来, 有研究者利用惯性力与微流控芯片结合的惯性微流技术(inertial focusing)进行 CTCs 分选, 该方法的分离原理简述如下: 当流体在直线型微通道内呈层流流动时, 悬浮在其中的细胞会受到梯度剪切升力(shear-gradient lift force)和管壁效应升力(wall effect lift force)的作用, 在二者的共同作用下, 大小不同的细胞产生不同的流动特性, 再结合不同的芯片内部结构设计, 便可达到捕获 CTCs 的目的。

Sollier 等^[40]设计了一种具有 8 联排并联管道、每条管道有 8 个储液囊的高通量分选芯片。样品流经芯片管道时, 细胞受到管壁效应升力和梯度剪切升力共同作用, 一旦细胞流经储液囊, 管壁效应升力就会减弱, 直径较大的肿瘤细胞受较大的梯度剪切升力远离管道中心分界线进入储液囊, 直径较小的血细胞留在主流体中。该系统分离人乳腺癌细胞 MCF-7 和肺癌细胞 A549 掺入健康人血液样品的效率可达 85%, 作者还用该系统成功地从癌症病人的血液样本中分离出 CTCs。

2.2.2 确定性侧向位移

基于确定性侧向位移法(deterministic lateral

displacement, DLD)设计的微流控芯片原理是芯片内具有相对于流体流动方向呈一定角度的微柱阵列, 尺寸不同的颗粒在流动过程中具有不同的运动轨迹, 尺寸大的颗粒会发生侧向位移向一侧汇聚, 尺寸小的颗粒会按原轨迹运动, 在芯片上设计相应的两个出口, 即可收集到相应的细胞(图 1b(E))。Morton 等^[41]和 Davis 等^[42]的研究证明此方法适用于直径从 30 nm~100 μm 范围内的颗粒分离; Louterback 等^[43]第一次证明使用此方法可以在数分钟内分离 CTCs。芯片整体尺寸为 2.5 mm 宽、25 mm 长, 微结构中三角柱边长 58 μm 、间距 42 μm , 排列与液流方向呈 1/20 弧度角。和圆形柱相比, 三角柱更有利于防止堵塞。液体流过具有一定排列角度的微柱时, 直径较大的肿瘤细胞会向芯片侧壁富集, 随液体流出, 通过收集侧壁出口处的液体, 即可得到肿瘤细胞。该系统分离混有人乳腺癌细胞 MCF-7 的 PBS 悬液样品效率在 85%以上。将 MDA-MB-231 细胞掺入健康人血液进行实验, 捕获后的细胞可保持活性, 可用于继续培养和实验分析。除以上提到的几种典型的分离方法之外, 其他基于细胞力学性质差异捕获 CTCs 的微流控芯片整理于表 3。

Table 3 Summary of hydrodynamic force based method to capture CTCs

表 3 基于细胞力学性质差异捕获 CTCs 文献总结

捕获单元	流体特征	样品	捕获效率 /%	参考文献
DLD 阵列	水平流体	MCF-7 细胞 PBS 悬液, MDA-MB-231 细胞混于血液	85	[43]
螺旋管道	涡旋	MCF-7、T24 细胞混于血液	—	[44]
螺旋芯片	涡旋	MCF-7、T24、MDA-MB-231 细胞混于血液	> 80	[45]
自动离心芯片	离心	MCF-7、HCC827 细胞混于血液	> 90	[46]
多级多孔(MS-MOFF)分离芯片	多级分流(MS-MOFF)	MCF-7 细胞混于血液	98.9	[47]
DLD 阵列	水平流体	MCF7、MDA-MB-231、A549、HEPG2、KYSE150 细胞混于血液	99	[49]
DLD 阵列	水平流体	SP2/O 细胞混于血液	88	[49]
螺旋管道	涡旋	HeLa 细胞混于血液	90	[50]
螺旋管道	涡旋	MCF7、MDA-MB-231、T24、SK-BR-3 细胞混于血液	80	[51]
螺旋管道	涡旋	MCF7、HeLa 细胞混于血液	96.7	[52]

—: 文章中未提。

基于细胞力学性质差异分选同基于细胞大小和变形性差异分选一样, 装置简单、无需复杂的实验设备、成本低, 可以作为一个单元与其他微流控分选系统相结合, 通过优化细胞分选结构实现更高的分选效率. 样品无需标记, 不影响 CTCs 分子特性和表面标志物; 细胞在微流环境中损伤小, 分选后细胞的存活率更高, 可继续培养和做后续分析. 然而, 由于血液的复杂性, 细胞间的相互作用不容易控制, 当处理细胞浓度较高的样品时, 分选效率降低. 另外, 该方法单纯基于细胞的物理特性实现, 而人体血液是高度复杂的血浆、红白细胞、血小板、蛋白质混合物, 且血液黏度是水的 3 倍以上^[53], 因此芯片有时容易发生堵塞现象, 影响分选效率, 分选出的 CTCs 可能存在假阳性结果. 综上所述, 在使用流体动力学分选时, 减少细胞间相互作用的样品前处理必不可少, 比如用牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的 PBS 作为缓冲液 (仅限于裂解红细胞后的样品), 对血液进行稀释以及改进微通道的几何结构等. 基于力学性质差异分选的方法除了可以分离 CTCs 外, 还非常适合分离血液中的血浆、血小板等.

3 免疫磁珠分选

免疫磁珠分选是根据免疫磁珠的原理设计的微流控芯片的方法, 是免疫磁珠结合微流控芯片本身的优势所设计的芯片, 免疫磁珠分选过程在微流控芯片内进行, 可使用微小磁铁, 节省试剂和耗材, 另外, 微流控芯片内部可根据实验需要设计成

多种微结构, 有利于增加带磁珠的细胞与磁铁碰撞机会, 即增加了捕获效率, 因此, 微流控芯片技术与免疫磁珠相结合, 可使芯片兼具免疫磁珠和微流控芯片双重优势, 成为微流控芯片捕获 CTCs 一种常用的方法(图 1c(F)). 越来越多的研究表明, 微流控芯片上利用免疫磁珠分选法分离 CTCs 能够简化操作步骤、提高捕获效率, 再结合分子生物学检测芯片进行后续 PCR、染色、细胞继续培养等步骤, 能够实现检测的连续化、集成化和自动化.

Earhart 等^[54]在氮化硅薄膜上镀 12 μm 厚的磁性软坡莫合金, 制成尺寸为 7 mm×7 mm、过滤微孔直径 40 μm 的磁性滤网芯片. CTCs 与磁性微球结合而被标记, 血液样品流过滤网时, 血细胞从微孔通过, 而磁性微球标记的 CTCs 则被捕获在微孔边缘. Kang 等^[55]设计了一种微磁-微流控 CTCs 分离芯片, 该芯片有一条主管道, 主管道两边有很多与之相通的小室, 每个小室中均装有磁铁, 当样品流经主管道时, 由于细胞在小室处所受的流体剪切力最小, 已经包被了磁珠的 CTCs 就会在磁场的作用下被捕获在小室中. 该系统所用样品为在 1 ml 小鼠血液中掺杂了 2~80 个不同数量的乳腺癌细胞, 其捕获效率可达 90%, 并且捕获到的 CTCs 可正常培养 7 天. 其他利用免疫磁珠原理捕获细胞的微流控芯片整理于表 4.

磁化作用不仅可以用在分离 CTCs 的微流控装置上, 还可以用在 CTCs 检测的微流装置上. Issadore 等^[56]设计了一种利用霍尔效应检测和计数磁化 CTCs 的芯片. 基底材料上装配一个探测器阵

列, 探测器上游是流体聚焦管道, 血液样品先经过这一管道形成单一细胞液流, 每个磁化的 CTCs 经过霍尔探测器时诱导产生一个霍尔电压, 从而可实现 CTCs 计数. 该方法的准确度高达 100%, 远高于 CellSearch, 该系统检测效率为 10^7 个细胞 / 分钟. 通过进一步优化数据采集电极, 该系统有望达到更高通量(10^9 个细胞 / 分钟). 尽管该系统不能够分离出 CTCs, 但是它效率高、准确度高、不依赖于现有的光学检测平台, 是一个自动化、低成本、便携式的 CTCs 计数工具.

Table 4 Summary of immunomagnetic beads method to capture CTCs
表 4 免疫磁珠分选法捕获 CTCs 文献总结

捕获单元	磁珠连接抗体或配体类型	样品	捕获效率 / %	参考文献
磁性滤网	Anti-EpCAM	H-1650, HCC827, LNCaP, PC-3, T24 细胞混于血液, 肺癌病人血液	> 90	[54]
带磁铁小室的 PDMS 微管道	Anti-EpCAM	乳腺癌小鼠模型血液	90	[55]
磁性微球、PDMS 双向收集管道	Anti-EpCAM	M6C 细胞混于血液	87	[57]
磁球、金电极	Anti-EpCAM	MCF-7 细胞混于血液	> 70	[58]
磁球、玻璃基底上的 APTES 点阵列	5D10	MCF-7 细胞混于白血病细胞	85	[59]
磁球、玻璃基底垂直微柱阵列	CD19	淋巴细胞混于白血病细胞, 7 例淋巴瘤病人血液	97	[60]
纳米粒子(NPs)、PDMS 微管道	Anti-EpCAM	COLO205 细胞混于血液	90	[61]
纳米粒子(NPs)、PMMA 微管道	EGFR	SK-BR-3、MDA-MB-231 细胞混于血液,	-	[62]
纳米粒子(NPs)、PDMS 微管道	EGFR、Her2、EpCAM	BT-474、MCF-7、HCT-116、HT-29、CT-26、Gli-36 细胞混于血液	-	[63]
纳米粒子(NPs)、PDMS 微管道	EGFR、Her2、neu、EpCAM、MUC-1	50 例腹腔内肿瘤病人血液	-	[64]
PDMS 微管道	Sgc8	CCRF-CEM 细胞悬液	> 80	[65]
MMA 曲线管道	PSMA	LNCaP 细胞混于血液	90	[66]
椭圆玻璃微柱	Sgc8、TD05、KDED2a-3、KCHA10	CCRF-CEM、Ramos、DLD-1、HCT-11 细胞混于血液	> 95	[67]

-: 文章中未提.

免疫磁珠分选法选择性高, 灵敏度高, 芯片管道无需修饰, 其依赖磁性分选可很好地控制细胞捕获与释放. 但是, 由于样品需与修饰抗体的磁珠孵育进行预处理, 与抗原 - 抗体亲和力分选一样, CTCs 表面标志物的选择也成了免疫磁珠分选法一个限制因素, 且孵育效果、清洗过程都会造成细胞损失, 另外, 磁性富集也会造成带磁珠的细胞在入口处由于接触磁铁而聚集, 在芯片入口和磁场区域之间加一段缓冲管道, 可能会改善这种聚集现象. 免疫磁珠与大小 - 变形性原理相结合(如图 1c(G)), 或优化芯片内部结构、使连接磁珠的细胞与磁铁充分碰撞, 都有利于提高芯片的捕获效率.

4 双向电泳分选法

双向电泳(dielectrophoresis, DEP)是微流控芯

片上一种常用的细胞分选方法, 其原理是不同类型的细胞在电场中介电性质不同, 所受介电力的大小和方向不同, 在不同介电力作用下向不同方向移动, 在电场中实现目的细胞的分选(图 1d).

Alshareef 等^[68]设计了一种带有光学透明电极的 DEP 分选器, 该芯片以丙烯酸塑料为顶层材料, 玻璃为基底材料, 利用不同细胞交流频率不同的特性, 从 HCT-116 细胞中成功分离出混入的 MCF-7 细胞, 通过设置不同的参数, 如交流电频率、电压、流速等, 可对捕获效率进行优化, 分选效率可达到 93%. 其他利用双向电泳原理捕获细胞的微流控芯片整理于表 5.

双向电泳法分选 CTCs, 可直接对细胞进行选择性操控, 无需依赖于 CTCs 的特异性表面标志物, 方便对 CTCs 进行计数, 不同细胞介电特性不

Table 5 Summary of DEP method to capture CTCs

表 5 双向电泳分选法捕获 CTCs 文献总结

捕获单元	电泳类型	样品	捕获效率 /%	参考文献
氧化铟锡电极、丙烯酸塑料管道	传统 DEP	HCT-116 和 MCF-7 细胞混合样品 PBS 悬液	93	[68]
石英衬底电极、PDMS 微管道	传统 DEP	MDA-MB-231 细胞混于血液中	95	[69]
PDMS 微管道两侧有液体电极	绝缘体介电泳(cDEP)	THP-1 细胞悬液	> 90	[70]
金电极、PDMS 微管道	传统 DEP	MCF-7 细胞混于血液中	75.18	[71]
ApoStream™ 芯片	介电泳	SKOV3, MDA-MB-231 细胞混于血液	~ 75	[72]
泪珠状 PDMS 微柱	绝缘体介电泳(cDEP)	THP-1,MDA-MB-231,PC-1 细胞混于红细胞中	-	[73]
PDMS 微柱阵列液体电极	绝缘体介电泳(cDEP)	MDA-MB-231, MCF-10A, MCF-7 细胞悬液	90	[74]

—: 文章中未提。

同使分选后纯度高, 此方法最大的优势是可将不同癌种表面标志物表达相同、尺寸相似、形态相似的细胞分离出来。但是在较大的流速下, 微弱的电泳力没有充足时间感应流过的 CTCs, 从而难以达到快速分选。该方法存在的另一个问题是电场力可能会对细胞活性和表面特性产生影响, 不利于对 CTCs 进行后续培养和分子特性分析。双向电泳分选法分选时间长, 但准确率高, 因此, 较适合于少量细胞的分选。

以上我们总结了近些年来用于 CTCs 捕获的微流控芯片系统的最新研究进展, 抗原 - 抗体亲和性分选法和免疫磁珠分选法特异性高, 利用特异性抗体分选出的 CTCs 可用于进行肿瘤细胞与正常细胞物理特性差异的研究, 而依靠物理特征差异分选出的 CTCs 可用于研究不同的表面标志物表达, 分选出不同表型的 CTCs 可进行单细胞基因组测序、转录组测序等。微流控芯片技术由于其自身特点在细胞分选方面具有一定的优势, 包括芯片体积小、速度快、通量高、操作简便、样品和试剂消耗低、易在芯片上集成多用途功能部件等。经过十多年的发展, 该技术已经在 CTCs 分选中越来越广泛的应用, 有望在将来成为 CTCs 富集和检测工具之一。该技术目前也面临着一些技术上和临床上的挑战: 芯片通道空间小, 实验过程中管道容易被堵塞; 有些特殊的芯片造价昂贵不便于推广应用; 在进行细胞分选时, 有些方法难以确保较高的细胞活性; 缺乏统一的 CTCs 表面标志物等。如何改进微流控芯片技术在进行细胞分选时所遇到的上述问题, 充分发挥其优势, 将是接下来研究的关键。

CTCs 检测的灵敏度和可靠性非常重要, 7.5 ml 血液中有 1~5 个 CTCs 在临床上都是有意义的^[75],

假阴性和假阳性都可能对样品分析、临床诊断产生重要影响^[76]。随着纳米技术的不断发展, 功能化纳米材料修饰的微流控芯片广泛应用于 CTCs 的富集和检测^[77]。适配体能提供特异性 CTCs 靶点, 因此微流控芯片的应用也许可以向研究基于新的 CTCs 捕获探针(如核酸适配体探针等)方面发展, 寻找特异性强的适配体探针, 以提高 CTCs 检测的可靠性。抗体连接的功能性纳米粒子能够为 CTCs 与抗体的结合提供更大的接触表面积, 因此纳米技术也成为细胞分选中备受瞩目的一项新技术。另外, 采用多种捕获方法相结合, 充分利用各自的优点设计 CTCs 捕获微流控芯片是将来的发展趋势。Karabacak 等^[78]开发的利用确定性侧向位移、惯性聚焦和磁场力分选 CTCs 的微流控芯片, 称为 CTC-iChip, 第一部分利用确定性侧向位移将红细胞、血小板与白细胞和 CTCs 分开, 白细胞和 CTCs 流入下一捕获单元, 第二部分利用弯曲的微管道将白细胞和 CTCs 按单细胞排列开来, 连接了抗白细胞表面抗原的抗体的磁珠与白细胞结合, 第三部分的磁场力将连接磁珠的白细胞和 CTCs 分开, 收集口处即可收集 CTCs, 1 h 可处理 8 ml 血液, 捕获率高达 97%, 该芯片已成功实现对癌症患者外周血 CTCs 的捕获, 并可进行后续培养、单细胞免疫染色和单细胞转录组测序分析; Yu 等^[79]利用该芯片分离的乳腺癌 CTCs, 并对捕获到的 CTCs 进行了 EMT 的动态过程分析; 还利用分离后培养的 CTCs 进行药物敏感性试验^[80]。

现在多种多样的 CTCs 分选微流控芯片已经商业化或正在发展成为产品, 比如依赖抗体的 CTCs 芯片(On-Q-ity, Waltham, MA)、依据大小变形性原理的 ClearCell™ 系统(Clearbridge BioMedics,

Singapore)、依据免疫磁珠的 IsoFlux™ 系统 (Fluxion)、依据流体动力学特征的 Apostream™ (Apocell) 和根据双向电泳原理的 DEPArray™ 系统等。然而, 不同设备在不同的实验室中, CTCs 的检测和计数难以确保重复^[81], 因此, 开发具有高度可重复性的 CTCs 微流控芯片检测系统成为当前研究的重点, 只有这样才能成为临床上可靠、实用的工具, 为 CTCs 检测、预测病人预后情况、研究癌症的多样性以及生物学特征提供更多的可能。相信在不远的将来, 微流控芯片技术在 CTCs 分离、富集方面的应用将更加成熟, 微流控芯片技术在临床上的应用更加广泛。

参 考 文 献

- [1] Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**(6): 449–458
- [2] Steeg P S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*, 2006, **12**(8): 895–904
- [3] Balic M, Williams A, Lin H, *et al.* Circulating tumor cells: from bench to bedside. *Annu Rev Med*, 2013, **64**: 31–44
- [4] Fischer A H. Circulating tumor cells: seeing is believing. *Arch Pathol Lab Med*, 2009, **133**(9): 1367–1369
- [5] Paterlini-Brechot P, Benali N L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett*, 2007, **253**(2): 180–204
- [6] Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, *et al.* Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(3): 920–928
- [7] Wang X, Qian X, Beitler J J, *et al.* Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles. *Cancer Res*, 2011, **71**(5): 1526–1532
- [8] Hashimoto M, Barany F, Xu F, *et al.* Serial processing of biological reactions using flow-through microfluidic devices: coupled PCR/LDR for the detection of low-abundant DNA point mutations. *Analyst*, 2007, **132**(9): 913–921
- [9] Liu P, Seo T S, Beyor N, *et al.* Integrated portable polymerase chain reaction-capillary electrophoresis microsystem for rapid forensic short tandem repeat typing. *Anal Chem*, 2007, **79**(5): 1881–1889
- [10] Kim S M, Burns M A, Hasselbrink E F. Electrokinetic protein preconcentration using a simple glass/poly (dimethylsiloxane) microfluidic chip. *Anal Chem*, 2006, **78**(14): 4779–4785
- [11] Emrich C A, Medintz I L, Chu W K, *et al.* Microfabricated two-dimensional electrophoresis device for differential protein expression profiling. *Anal Chem*, 2007, **79**(19): 7360–7366
- [12] Bhagat A A S, Bow H, Hou H W, *et al.* Microfluidics for cell separation. *Med Biol Eng Comput*, 2010, **48**(10): 999–1014
- [13] VanDijken J, Kaigala G V, Lauzon J, *et al.* Microfluidic chips for detecting the t (4;14) translocation and monitoring disease during treatment using reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of IgH-MMSET hybrid transcript. *Mol Diagn*, 2007, **9**(3): 358–367
- [14] He R, Zhao L, Liu Y, *et al.* Biocompatible TiO₂ nanoparticle-based cell immunoassay for circulating tumor cells capture and identification from cancer patients. *Biomed Microdevices*, 2013, **15**(4): 617–626
- [15] Sheng W, Ogunwobi O O, Chen T, *et al.* Capture, release and culture of circulating tumor cells from pancreatic cancer patients using an enhanced mixing chip. *Lab Chip*, 2014, **14**(1): 89–98
- [16] Launier C, Gaskill M, Czaplewski G, *et al.* Channel surface patterning of alternating biomimetic protein combinations for enhanced microfluidic tumor cell isolation. *Anal Chem*, 2012, **84**(9): 4022–4028
- [17] Nagrath S, Sequist L V, Maheswaran S, *et al.* Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 2007, **450**(7173): 1235–1239
- [18] Stott S L, Hsu C H, Tsukrov D I, *et al.* Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(43): 18392–18397.
- [19] Adams A A, Okagbare P I, Feng J, *et al.* Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(27): 8633–8641
- [20] Kumeria T, Kurkuri M D, Diener K R, *et al.* Label-free reflectometric interference microchip biosensor based on nanoporous alumina for detection of circulating tumour cells. *Biosens Bioelectron*, 2012, **35**(1): 167–173
- [21] Mittal S, Wong I Y, Deen W M, *et al.* Antibody-functionalized fluid-permeable surfaces for rolling cell capture at high flow rates. *Biophys J*, 2012, **102**(4): 721–730
- [22] Wang S, 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*, 2011, **50**(13): 3084–3088
- [23] Prang N, Preithner S, Brischwein K, *et al.* Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines. *Brit J Cancer*, 2005, **92**(2): 342–349
- [24] Kemmner W. Currently used markers for CTC isolation-advantages, limitations and impact on cancer prognosis. *J Clin Exp Pathol*, 2011, **1**(1): 102
- [25] Yu M, Bardia A, Wittner B S, *et al.* Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, 2013, **339**(6119): 580–584
- [26] Gorges T M, Tinhofer I, Drosch M, *et al.* Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 2012, **12**(1): 178
- [27] Tan S J, Yobas L, Lee G Y, *et al.* Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood. *Biomed Microdevices*, 2009, **11**(4): 883–892
- [28] Lim L S, Hu M, Huang M C, *et al.* Microsieve lab-chip device for rapid enumeration and fluorescence *in situ* hybridization of

- circulating tumor cells. *Lab Chip*, 2012, **12**(21): 4388–4396
- [29] Hosokawa M, Kenmotsu H, Koh Y, *et al.* Size-based isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients using a microcavity array system. *PloS One*, 2013, **8**(6): e67466
- [30] Jin C, McFaul S M, Ma H, *et al.* Continuous flow cell separation system using microfluidic ratchets. 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences October 27–31 2013[C], Freiburg, Germany
- [31] Lv P, Tang Z, Liang X, *et al.* Spatially graded segregation and recovery of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. *Biomicrofluidics*, 2013, **7**(3): 034109
- [32] Kim M S, Sim T S, Kim Y J, *et al.* SSA-MOA: a novel CTC isolation platform using selective size amplification (SSA) and a multi-obstacle architecture (MOA) filter. *Lab Chip*, 2012, **12** (16): 2874–2880
- [33] Li P, Stratton Z S, Dao M *et al.* Probing circulating tumor cells in microfluidics. *Lab Chip*, 2013, **13**(4): 602–609
- [34] Xu T, Lu B, Tai Y C, *et al.* A cancer detection platform which measures telomerase activity from live circulating tumor cells captured on a microfilter. *Cancer Res*, 2010, **70**(16): 6420–6426
- [35] Zheng S, Lin H K, Lu B, *et al.* 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood. *Biomed Microdevices*, 2011, **13**(1): 203–213
- [36] Lin H K, Zheng S, Williams A J, *et al.* Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res*, 2010, **16**(20): 5011–5018
- [37] Mohamed H, Murray M, Turner J N, *et al.* Isolation of tumor cells using size and deformation. *J Chromatogr A*, 2009, **1216** (47): 8289–8295
- [38] Lee S W, Kang J Y, Jung H I, *et al.* Microfluidic detection of circulating tumor cells (CTC) using side filtration-based capture, 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. Germany: Freiburg, 2013, 365–367
- [39] Preira P, Grandne V, Forel J M, *et al.* Passive circulating cell sorting by deformability using a microfluidic gradual filter. *Lab Chip*, 2013, **13**(1): 161–170
- [40] Sollier E, Go D E, Che J, *et al.* Size-selective collection of circulating tumor cells using Vortex technology. *Lab Chip*, 2014, **14**(1): 63–77
- [41] Morton K J, Sturm J, Austin R, *et al.* Nanoimprinted fluidic device for continuous separation of nanoparticles. *Proc of μ TAS*, 2006, **1**: 1014–1016
- [42] Davis J A, Inglis D W, Morton K J, *et al.* Deterministic hydrodynamics: Taking blood apart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(40): 14779–14784
- [43] Louterback K, D'Silva J, Liu L, *et al.* Deterministic separation of cancer cells from blood at 10 ml/min. *AIP Advances*, 2012, **2**(4): 042107
- [44] Warkiani M E, Khoo B L, Tan D S W, *et al.* Circulating tumor cell (CTC)enrichment: ultra high throughput processing of clinically relevant blood volumes using a multiplexed spiral biochip // 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. Germany: Freiburg, 2013: 1156–1158
- [45] Guan G, Warkiani M E, Luan K B, *et al.* High throughput circulating tumor cell isolation using trapezoidal inertial microfluidics, 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. Germany: Freiburg, 2013, 23–25
- [46] Kim M S, Moon H S, Kim S S, *et al.* A novel fully automated centrifugal microfluidic platform with massive volume capability to isolate circulating tumor cells, 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. Germany: Freiburg, 2013, 958–960
- [47] Moon H S, Kwon K, Hyun K A, *et al.* Continual collection and re-separation of circulating tumor cells from blood using multi-stage multi-orifice flow fractionation. *Biomicrofluidics*, 2013, **7**(1): 014105
- [48] Liu Z, Huang F, Du J, *et al.* Rapid isolation of cancer cells using microfluidic deterministic lateral displacement structure. *Biomicrofluidics*, 2013, **7**(1): 011801
- [49] Okano H, Suyama K, Ariyasu S, *et al.* Screening of circulating tumor cells in tumor-bearing mouse blood by a deterministic lateral displacement microfluidic device, 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. Germany: Freiburg, 2013, 1021–1023
- [50] Sun J, Liu C, Li M, *et al.* Size-based hydrodynamic rare tumor cell separation in curved microfluidic channels. *Biomicrofluidics*, 2013, **7**(1): 011802
- [51] Warkiani M E, Guan G, Luan K B, *et al.* Slanted spiral microfluidics for the ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells. *Lab Chip*, 2014, **14**(1): 128–137
- [52] Sun J, Li M, Liu C, *et al.* Double spiral microchannel for label-free tumor cell separation and enrichment. *Lab Chip*, 2012, **12** (20): 3952–3960
- [53] Hyun K A, Jung H I. Advances and critical concerns with the microfluidic enrichments of circulating tumor cells. *Lab Chip*, 2012, **14**(1): 45–56
- [54] Earhart C M, Hughes C E, Gaster R S, *et al.* Isolation and mutational analysis of circulating tumor cells from lung cancer patients with magnetic sifters and biochips. *Lab Chip*, 2014, **14**(1): 78–88
- [55] Kang J H, Krause S, Tobin H, *et al.* A combined micromagnetic-microfluidic device for rapid capture and culture of rare circulating tumor cells. *Lab Chip*, 2012, **12**(12): 2175–2181
- [56] Issadore D, Chung J, Shao H, *et al.* Ultrasensitive clinical enumeration of rare cells *ex vivo* using a micro-hall detector. *Sci Transl Med*, 2012, **4**(141): 141ra92–141ra92
- [57] Kang J H, Krause S, Tobin H, *et al.* A combined micromagnetic-microfluidic device for rapid capture and culture of rare circulating tumor cells. *Lab Chip*, 2012, **12**(12): 2175–2181
- [58] Chung Y K, Reboud J, Lee K C, *et al.* An electrical biosensor for the detection of circulating tumor cells. *Biosen Bioelectron*, 2011, **26**(5): 2520–2526
- [59] Sivagnanam V, Song B, Vandevyver C, *et al.* Selective breast

- cancer cell capture, culture, and immunocytochemical analysis using self-assembled magnetic bead patterns in a microfluidic chip. *Langmuir*, 2010, **26**(9): 6091–6096
- [60] Saliba A E, Saias L, Psychari E, *et al.* Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(33): 14524–14529
- [61] Hoshino K, Huang Y Y, Lane N, *et al.* Microchip-based immunomagnetic detection of circulating tumor cells. *Lab Chip*, 2011, **11**(20): 3449–3457
- [62] Lee H, Sun E, Ham D, *et al.* Chip-NMR biosensor for detection and molecular analysis of cells. *Nat Med*, 2008, **14**(8): 869–874
- [63] Lee H, Yoon T J, Figueiredo J L, *et al.* Rapid detection and profiling of cancer cells in fine-needle aspirates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(30): 12459–12464
- [64] Haun J B, Castro C M, Wang R, *et al.* Micro-NMR for rapid molecular analysis of human tumor samples. *Sci Transl Med*, 2011, **3**(71): 71ra16–71ra16
- [65] Phillips J A, Xu Y, Xia Z, *et al.* Enrichment of cancer cells using aptamers immobilized on a microfluidic channel. *Anal Chem*, 2008, **81**(3): 1033–1039
- [66] Dharmasiri U, Balamurugan S, Adams A A, *et al.* Highly efficient capture and enumeration of low abundance prostate cancer cells using prostate-specific membrane antigen aptamers immobilized to a polymeric microfluidic device. *Electrophoresis*, 2009, **30** (18): 3289–3300
- [67] Sheng W, Chen T, Kamath R, *et al.* Aptamer-enabled efficient isolation of cancer cells from whole blood using a microfluidic device. *Anal Chem*, 2012, **84**(9): 4199–4206
- [68] Alshareef M, Metrakos N, Perez E J, *et al.* Separation of tumor cells with dielectrophoresis-based microfluidic chip. *Biomicrofluidics*, 2013, **7**(1): 011803
- [69] Alazzam A, Stiharu I, Bhat R, *et al.* Interdigitated comb-like electrodes for continuous separation of malignant cells from blood using dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 2011, **32**(11): 1327–1336
- [70] Shafiee H, Sano M B, Henslee E A, *et al.* Selective isolation of live/dead cells using contactless dielectrophoresis (cDEP). *Lab Chip*, 2010, **10**(4): 438–445
- [71] Moon H S, Kwon K, Kim S I, *et al.* Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP). *Lab Chip*, 2011, **11**(6): 1118–1125
- [72] Gupta V, Jafferji I, Garza M, *et al.* ApoStream™, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics*, 2012, **6**(2): 024133
- [73] Bhattacharya S, Chao T C, Ros A. Insulator-based dielectrophoretic single particle and single cancer cell trapping. *Electrophoresis*, 2011, **32**(18): 2550–2558
- [74] Henslee E A, Sano M B, Rojas A D, *et al.* Selective concentration of human cancer cells using contactless dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 2011, **32**(18): 2523–2529
- [75] Tibbe A G J, Miller M C, Terstappen L W M M. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytom Part A*, 2007, **71**(3): 154–162
- [76] Kraan J, Sleijfer S, Strijbos M H, *et al.* External quality assurance of circulating tumor cell enumeration using the CellSearch® system: a feasibility study. *Cytom Part B-Clin Cy*, 2011, **80**(2): 112–118
- [77] 白林灵, 杨延莲, 王 琛. 循环肿瘤细胞富集和检测的纳米技术. *生物化学与生物物理进展*, 2013, **40**(10): 955–962
- Bai L L, Yang Y L, Wang C. *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(10): 955–962
- [78] Ozkumur E, Shah A M, Ciciliano J C, *et al.* Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Science*, **5** (179): 179ra47. doi:10.1126/scitranslmed.3005616
- [79] Yu M, Bardia A, Wittner B S, *et al.* Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, 2013, **339**(6119): 580–584
- [80] Yu M, Bardia A, Aceto N, *et al.* *Ex vivo* culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science*, 2014, **345**(6193): 216–220
- [81] Parkinson D R, Dracopoli N, Petty B G, *et al.* Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med*, 2012, **10**(1): 138–158

Advances in Isolating Circulating Tumor Cells With Microfluidic Chips*

LÜ Xiao-Qing¹⁾, LI Lei^{2)**}, CHEN Hong-Mei³⁾, CHEN Peng^{4)**}, LIU Jing²⁾

¹⁾ *Research Center of Basic Medical Science, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;*

²⁾ *Key Laboratory of Cryogenics, Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences & Beijing Key Laboratory of Cryo-Biomedical Engineering, Beijing 100190, China;*

³⁾ *Institute of Semiconductors, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100083, China;*

⁴⁾ *Center for Lung Cancer Diagnosis and Treatment, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China)*

Abstract Circulating tumor cells (CTCs) are shed by primary or metastatic tumors, undergo the epithelial-mesenchymal transition, and enter into the peripheral blood of patients with metastatic cancers. Its critical roles in cancer research and clinical diagnostics are gradually being recognized. The presence of CTCs, especially the number in peripheral blood can not only be used for early diagnosis of cancer but also be used to assess prognosis, and monitor tumor metastasis and recurrence. Microfluidic chip as a high-throughput, miniaturized cell experimental platform has been used in CTCs sorting. In this review, we highlight recent progresses of CTCs capturing of microfluidic chip system and focus on the capture theory, chip structure and capture efficiency of various types of chips. At last, we prospect for the application foreground of microfluidic chip technology in CTCs isolation.

Key words microfluidic chip, circulating tumor cells (CTCs), tumor metastasis, cell sorting

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0309

* This work was supported by grants from Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences (KJZD-EW-TZ-L03-6), Natural Science Foundation of Tianjin (13JCYBJC23600), The National Natural Science Foundation of China (61078074) and China Postdoctoral Science Foundation (2014M550794).

**Corresponding author.

LI Lei. Tel: 86-10-82543766, E-mail: lileilei@mail.ipc.ac.cn

CHEN Peng. Tel: 86-22-23340123, E-mail: chenpengdoc@sina.com

Received: February 2, 2015 Accepted: March 5, 2015