

基于微流体技术分选循环肿瘤细胞的方法研究

王正源,徐秀林,王燕

上海理工大学医疗器械与食品学院,上海 200093

【摘要】循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cells, CTCs)主要来源于肿瘤组织自发脱落的外周血液中,其对恶性肿瘤传播转移具有重要影响,已逐渐被认为是肿瘤远处转移的标志。对外周血中极微量的具有特异性、敏感性的CTCs进行分选、富集及检测,不仅有利于肿瘤的早期诊断、疗效评价及复发转移监控,还可以为后续的CTCs鉴定和下游单细胞基因组和转录组测序提供良好基础,为肿瘤靶向治疗提供新策略,在临床上个性化医疗等领域有重要意义。微流控技术可在微米尺度下整合物理、化学及生物学方法,实现对微量CTCs的高通量、高效率以及低成本分选富集,该技术发展迅速并已被广泛研究应用。本文对微流控芯片进行CTCs分选富集及捕获的最新研究进展进行综述,阐述无标记、有标记分选方法的原理及应用实例,分析各种技术的优缺点,对现阶段该领域存在的问题进行讨论,对微流控CTCs分选芯片的应用前景和未来发展趋势进行展望。

【关键词】循环肿瘤细胞;微流体技术;分选;富集;癌症诊断;综述

【中图分类号】R318

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2019)02-0229-05

Microfluidic technology-based method for sorting circulating tumor cells

WANG Zhengyuan, XU Xiulin, WANG Yan

School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

Abstract: Circulating tumor cells (CTCs) are mainly derived from the peripheral blood of tumor tissue that is spontaneously shedding. CTCs have an important influence on the spread and metastasis of malignant tumors and have gradually been considered as a marker of distant metastasis of tumors. The selection, enrichment and detection of a very small amount of specific and sensitive CTCs in peripheral blood are not only helpful for the early diagnosis of tumors, the evaluation of efficacy and the monitoring of recurrence and metastasis, but also conducive to the identification of CTCs and the genome and transcriptome sequencings of downstream single cells, providing a new strategy for targeted therapy of tumors, which is of great significance in personalized medicine. Microfluidics can integrate physical, chemical and biological methods at the microscale to achieve high-throughput, high-efficiency, low-cost sorting and enrichment of a small amount of CTCs. This technology has been rapidly developed in recent years and has been widely applied. Herein, the latest research progresses on microfluidic chip systems in the sorting, enrichment and capture of CTCs are summarized. Moreover, the principle and application examples of the unmarked or labeled sorting method are expounded, and the advantages and disadvantages of various technologies are analyzed. The problems existing at the stage are also discussed. Finally, the applications and future development trends of microfluidic CTCs sorting chips are prospected.

Keywords: circulating tumor cells; microfluidic technology; sorting; enrichment; cancer diagnosis; review

前言

癌症作为重大疾病之一,正严重威胁人类的生命

【收稿日期】2018-10-12

【基金项目】上海市科学技术委员会科研计划项目(15441906200);上海理工大学第10届微创励志创新基金资助项目(YS30810170)

【作者简介】王正源,硕士研究生,研究方向:精密医疗器械, E-mail: wzyuan0521@163.com

【通信作者】徐秀林,教授,研究方向:医疗仪器开发及医疗器械检测技术, E-mail: xxlin100@163.com

健康,因癌症而导致死亡的人数在2030年预计将达到1 300万^[1]。据世界卫生组织(WHO)统计,90%的癌症患者死亡与癌症的转移相关,如果患者在癌症转移发生之前得到诊断和治疗,至少有30%的死亡是可以预防的^[2]。研究癌症的发生发展规律,探索肿瘤早期诊断治疗的新途径已经成为当代社会急需解决的重大问题。在肿瘤组织中脱落,侵袭并进入血液循环的细胞通常称为循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cells, CTCs)。近年医学上研究表明,富集及检测在血液中出现CTCs,不仅有助于肿瘤早期筛查、诊断、疗效评价及复发转移

监控,还可以为肿瘤治疗提供新的策略。

早在1869年,Ashworth首次在癌症死亡患者的血液中发现CTCs,但有关外周血中CTCs的研究近些年才受到广泛关注^[3]。由于在外周血中CTCs含量极少,使得传统细胞分析检测技术无法有效识别^[4]。在过去的10年中,使用CTCs作为实时液体活检已经受到了广泛关注,对这些细胞的进一步分析将会提高对转移性级联、肿瘤演变、异质性和治疗耐药性的认识^[5],强大的细胞分离技术可以快速有效地分离出CTCs并用于下游单细胞基因组和转录组分析。对血液样品进行前处理,通过细胞筛选富集手段初步提高肿瘤细胞的浓度,是增强循环肿瘤细胞检测精度和灵敏度的必要环节。

近年来,围绕CTCs的分选富集与检测研究中,国内外取得了显著成果。美国强生公司的产品CellSearch System于2004年被美国食品和药物管理局(FDA)批准商业化,该产品采用免疫纳米磁颗粒富集上皮来源的肿瘤细胞,能实现对肿瘤细胞的有效富集检测^[6]。磁泳分离技术的核心优势是其操作可连续和工作效率高。流式细胞仪和荧光扫描显微镜也可应用于CTCs分离,这些技术操作简单且需要的工具容易获得,但有资料表明他们会丢失稀少的CTCs使得检出率低并影响细胞活性^[7]。随着微流体技术的进步,促使各种高精度、小型化的装置快速发展,大大提高了CTCs分离过程的效率和回收率。这些小型化系统具有更高的灵敏度、精度,更低的成本以及与下游检测或总体分析系统的兼容性好等优势^[8]。Fluxion Biosciences新开发的微流体平台IsoFlux使用微流体通道确保将磁性颗粒标记的CTCs充分可靠地暴露于密集且强度均匀的磁场中,以实现高效的细胞富集回收^[9];有报道几何增强型免疫捕获芯片,采用几何增强微结构,通过增加靶细胞与抗体包被底物之间的碰撞频率来提高CTCs捕获效率^[10]。根据目前对CTCs的检测分选广泛使用的分离富集方法的原理,其可分为无标记分选和有标记分选两类。

1 无标记分选

无标记分选是一种基于细胞的生物物理特性,如尺寸、密度、变形能力或介电性能等信息,在不需特异性标记的情况下对细胞进行检测和分类的微流控CTCs分选技术^[11]。该类方法因操作简单、成本低及白细胞高消耗的特点,广泛应用于CTCs的分选富集研究。目前用做循环肿瘤细胞无标记分选的常用方法主要有以下几种。

1.1 基于CTCs的大小与变形性差异分选

该分选方法通常情况下也称为微结构过滤技术,利用在大小及变形性等性质上CTCs与其它血细胞存

在差异进行分离。主要结构大致有围堰式、交错流动式、薄膜式及微柱式等类型。通常CTCs和白细胞的粒径分别为15~25 μm 和8~20 μm ,两者粒径不同,通过在芯片微流道中设计微孔、微柱及滤膜结构,当含有CTCs的细胞溶液流过芯片微流道时,大颗粒的CTCs粘附在结构中,血细胞随着缓冲液流出,由于在粒径上CTCs和白细胞粒径有交叉部分,因此一些白细胞在结构中也可能被捕获,但增加缓冲液的流速,依据CTCs与白细胞变形能力的不同可实现二者分离。

Hosokawa等^[12]设计由100×100个8~9 μm 直径的圆孔阵列组成的微流控芯片捕获CTCs。在血液样本中掺入NCI-H358细胞进行实验,采用蠕动泵负压进样,最终肿瘤细胞固定在圆孔上,血细胞则随缓冲液流出,从而成功分离CTCs。结果表明,混在1 mL血液中的10个CTCs可被该系统在15 min内完全捕获,且能很好保持细胞活性。经染色鉴定其分选效率达97%,远高于采用CellSearch系统的分选效率。ClearCell® CX System是Abnova公司基于此原理研发的分离CTCs的产品^[13]。通过在芯片内部设计“爪形”结构的圆柱形微柱阵列捕获CTCs,其捕获过程能动态监测,捕获的CTCs可以进行染色鉴别和计数。Lü等^[14]设计了一种包含过滤和捕获功能的间距渐变式芯片捕获CTCs。为减少芯片堵塞,先经过滤结构滤掉样本中的杂质;循CTCs不能通过间距不同的捕获结构而被捕获,在磷酸盐缓冲液(PBS)中掺入CTCs进行实验,其捕获效率高于90%。Jin等^[15]设计一种不同间距的“棘齿”型微柱阵列芯片捕获CTCs,在健康人血液样本中混入膀胱癌细胞进行实验,其分离效率高于70%。

基于CTCs与其它血细胞在大小和变形性上的差异分选CTCs操作简单、捕获效率高、无表面标志物依赖,因此其应用研究较为广泛成熟。但在应用中也存在一些局限,如该类结构普遍会出现细胞堆积导致微流道堵塞问题;尤其是围堰式结构加工精度要求高、通量低、分选纯度低,肿瘤细胞极易发生堆积和堵塞;薄膜结构的芯片要嵌入薄膜,导致键合要求高,工艺复杂;另外,在较大的机械力作用下,CTCs容易破裂,对分离精度和细胞活性造成一定影响。

1.2 基于细胞力学性质差异分选

1.2.1 基于惯性原理分选 在惯性效应下,直圆柱Poiseuille流动中,颗粒(如血液中的CTCs、白细胞等)迁移主要受垂直于流动方向的两个惯性升力影响,颗粒的平衡位置也由这两个力决定。分别是指向微通道壁的抛物线速度梯度引起剪切诱导的升力(F_s)和作用于颗粒的导致颗粒向微通道中心迁移的壁升力(F_w)^[16]。在这两个力的共同作用下,迁移的颗粒最终在距离壁

约 $0.2D$ 处平衡,其中 D 为圆柱形管的直径^[17]。弯曲微通道结构中,迪安流动在微通道内形成两个反向旋转的漩涡。最终粒子所受到的惯性升力($F_L=F_S+F_w$)和迪恩曳力(F_D)共同作用,决定了粒子在流体中流动过程中的平衡位置。弯流道中不同粒径的细胞由入口处的随机分散状态会逐渐发生惯性聚集,迁移至各自特定的平衡位置,再结合芯片内部结构设计,便实现对CTCs的捕获。中国科学院苏州生物医学工程研究所Chen^[18]依据惯性分选原理,设计了一种混合芯片。该芯片是一个三重并行的螺旋惯性微流控芯片,与若干个可数的倾斜狭缝(螺旋裂缝芯片)相互连接,用于连续分选循环肿瘤细胞。其中,倾斜的狭缝与流体方向约成 60° 夹角。在惯性升力和迪恩曳力相互作用下,不同尺寸的颗粒(CTCs、白细胞及红细胞等)在螺旋微通道的不同流线处实现各自的平衡。沿流动方向设计的倾斜狭缝将分离的流线型颗粒分离到平行的较小的微通道中,连续作用导致原始微通道中某些尺寸的颗粒数量显著减少,可以实现不同尺寸颗粒的惯性分离。同时通过设计试验结合光学吸收检测,证明了这种三重平行化螺旋惯性微流体的整体布置反映了第一主微通道中稳定的流线分布。另外,基于惯性原理分选CTCs技术, Kim等^[19]设计了一种级联的螺旋流道用于CTCs分选, Sun等^[20]设计了一种双螺旋结构用于CTCs分选,实验数据表明,其分选效率和重新捕获率均较高。

1.2.2 基于确定性侧向位移分选 该分选技术是通过在微流控芯片流道内设置若干排与液体流动方向成一定角度的交错排列的微柱阵列,当有细胞溶液在芯片流道内流动时,不同粒径大小细胞的运动轨迹也不相同。尺寸大的细胞(如CTCs)因侧向位移向一侧汇聚,尺寸小的细胞(如红细胞、白细胞等)会沿原轨迹运动,从而实现连续分离,收集到相应的细胞。Loutharback等^[21]首次证明使用此方法能分离CTCs。当细胞混合液流经芯片微流通道后,大粒径的CTCs会向芯片壁面发生侧向移动而富集,而小粒径的其它血细胞继续保持原来的流动方向流动,在侧壁通过收集即实现了CTCs分离。通过在PBS缓冲液中放入MCF-7实验,其分离效率高于85%。Liu等^[22]通过设计实验比较对病人外周血中多种稀有癌细胞采用圆柱与三角形阵列的分选效果,指出流速在小于 $50\mu\text{L}/\text{min}$ 下两者捕获率均较高,随流速增大,圆柱阵列的重新捕获率显著降低,而三角阵列仍能保持较高的捕获率。同时研究人员还探究细胞尺寸与流速对分选效果的影响,得出细胞尺寸越大、流速越低,则分选效果越明显^[16]。

综上所述,基于细胞力学性质差异的分离方法同样是一种依据细胞粒径、形态差异的被动式分选技术。

具有在尺寸上对细胞的敏感度高、分选高通量的优势。但是,基于确定性侧向位移的细胞分选技术也难以避免堵塞问题,且分选效率易受细胞簇的尺寸不一、细胞变形性、微柱尺寸及制造加工的表面质量等因素影响。

1.3 基于细胞电学性能差异分选

介电泳技术分选细胞的原理是基于肿瘤细胞与正常细胞在电学性质方面的差异,因介电力大小和方向不同,细胞在不同介电力作用方向上移动,从而在电场中实现肿瘤细胞的分选。Holmes等^[23]通过将一种带状电极键合安置在微流控芯片上,利用两组电极分别产生正负介电泳力,在电极的不同区段收集不同细胞,成功分离白血病细胞THP-1。Wu等^[24]采用该方法设计了一种类似结构,带状电极的放置方向与流道的主流方向垂直,采用人结肠癌细胞HT-29设计实验进行验证,成功实现了将其从人体血液中分离。Alshareef等^[25]也设计了一种嵌入有电极的用于CTCs分选的微流控芯片,依据不同细胞的交流频率存在差异的原理分离细胞混合液中的MCF-7细胞,其分选效率高于93%。介电泳分选技术虽然操作较简单,但要求细胞溶液通过非均匀电场的时间较长,所以会极大限制微流控芯片流道中微流体流速,大大降低细胞分选效率,难以在临床上广泛应用。由于电场的作用,其对细胞活性、电生理学特性及物理特性也有一定影响。

2 标记分选

在微流体技术中,除了可依据细胞在尺寸、可变形性等物理特性的差异实现分选,还可以通过生物标记,依据细胞在生物学上的特性差异来实现分离。同时随着纳米技术的快速发展,纳米结构,如纳米珠,已广泛应用于CTCs分离富集及检测^[26]。因此,通过结合细胞与纳米结构表面的粘附因子以及基于常规抗体的亲和相互作用,实现对CTCs的分选富集。目前标记分选常用方法主要有:基于抗原抗体亲和性分选、基于纳米颗粒的免疫磁珠分选等。

2.1 基于抗原抗体亲和性分选

基于抗原抗体亲和性反应进行细胞分选是通过在芯片内部通道或微结构上固定标记特定分子,该特定分子一般为与细胞表面抗原对应的特异性抗体或适配体,两者之间通过抗原抗体亲和性反应而特异性结合,在细胞混合溶液通过芯片内部微通道时,目标细胞表面抗原与通道或微结构上的特定分子发生结合,细胞被固定在芯片内,从而将其捕获富集^[27]。再用合适的方法,如通入荧光染料溶液染色标记再清洗,实现对CTCs的鉴定;更换缓冲液,冲洗并回收目标细胞,实现与其它细胞的分离进行下游分析。He等^[28]设计了一种在玻

璃基底上修饰有EpCAM抗体的芯片用于CTCs分离,在健康人血液中掺入人结肠癌组织源细胞HCT116进行实验,实验中CTCs发生特异性结合而留在芯片内,资料表明其效率约为80%。Sheng等^[29]通过几何增强混合型芯片捕获CTCs,为增大细胞与抗体的接触机会以提高捕获效率,芯片内部设计有V形结构。该芯片对混合在细胞混合液中的人胰腺癌细胞的捕获效率可达90%,CTCs经洗脱后可继续培养,用于后续的单细胞测序相关的实验分析。使用亲和性细胞富集技术的主要难点是CTCs生物标志物表达的异质性,包括在上皮-间充质转变(EMT)过程中常见捕获靶标EpCAM的表面表达较低。来自相同肿瘤类型的癌细胞系(如MCF-7和MDA-MB-231)也可能具有不同的EpCAM结合的表面密度。一些白细胞可能与CTCs具有相似的性质,它们常常能在富集的样品中持久存在,从而影响分离CTCs的纯度。为解决这个问题,研究人员采用消耗血细胞的阴性分选技术分离富集CTCs。尽管如此,任何富集CTCs或消耗其它血细胞的生物化学手段都可能由于不均匀的生物标记物表达而失去CTCs,或由于灵敏度和特异性受损而导致假阳性细胞的无效去除;同时抗体结合也可能诱导细胞毒性,这将不利于CTCs的下游测序。鉴于癌症的异质性和单细胞分析的重要性,且由于与抗体包被的磁珠非特异性结合导致CTCs丢失而可能导致CTCs分离的不完全,从而制约人们对CTCs的生物学信息全面掌握。另外,亲和性分选法要在通量和效率综合考虑,流速越大,CTCs与抗体反应的时间越少,虽能提高分选速度,但会导致分选效率降低。

2.2 基于纳米颗粒的免疫磁珠分选

免疫磁珠分选是采用免疫磁珠与微流控芯片相结合分选富集CTCs的技术。大量研究表明利用免疫磁珠分选技术在微流控芯片上分离CTCs操作简便、捕获效率高,并结合PCR技术、细胞培养技术等步骤,能够实现检测集成化和自动化。Kang等^[30]基于纳米颗粒的免疫磁珠技术设计了一种分离CTCs的芯片,在主流道两边设计了很多与主流道相通的且预置有磁铁的小室,当细胞混合液在芯片流道中流动时,CTCs因标记有磁珠而被捕获,白细胞则沿管道出口流出。将2~80个不同数目的乳腺癌细胞混入1 mL小鼠血液中进行实验,实验显示其捕获效率高于90%。Hyun等^[31]设计了一种融合免疫磁珠技术和亲和性分选方法中的阳性分选、阴性分选的微流控芯片用于富集CTCs。通过将表面修饰有CD45抗体的磁珠与细胞混合液中的白细胞结合,最后在一级分选流道区域利用外置磁铁磁珠的吸附作用实现对白细胞的去除;在二级分选流道区域内表面上修饰EpCAM抗体以实现MCF-7(EpCAM⁺)的富

集。基于纳米磁珠的免疫分选技术依赖磁性进行分选,对细胞的捕获和释放易于控制,且无需对管道进行修饰,灵敏度高,在研究中广泛应用。但使用该方法同基于抗原抗体亲和性分选技术一样,受到CTCs表面标志物的限制,且磁珠与样本的孵育预处理也是实验的重要环节。

3 多级分选

近些年来基于微流体技术分选肿瘤细胞取得了显著进展,但每种单一的分选方法都具有灵敏度低或分选效率不高或通量较小的限制。为能实现高通量、高纯度的分选外周血中含量极低的CTCs,研究者们集成多种分选技术,设计出对CTCs多级分选的微流控芯片。Hou等^[32]通过将两个用于CTCs分选用的螺旋微流控芯片进行串联,以实现二次提纯,提高分选效率。通过实验证实其对MCF-7能很好的实现聚集,且在3 mL/h流量下其捕获率高于85%。东南大学倪中华教授课题组基于集成惯性分选技术和介电泳细胞分选技术提出一种多级分选芯片,一级通道通过内侧低、外侧高的梯形截面螺旋结构初级惯性高通量分选血液样本溶液,二级通道通过在高宽高比的矩形截面流道底部安装两组电极依靠介电泳技术实现次级分选CTCs。该芯片整合了两种技术的高通量和高分选效率的优势,为分选CTCs的微流控芯片发展提供了一种新思路^[22]。多级分选微流控芯片因其能够很好地提高分选效果,整合各种分选技术的优势,保证高通量分选的同时,保证对高纯度的要求,使得其在临床上具有更为实际的应用价值。其次级分选流道可以是对废液的再次富集,提高重新捕获率,或是再次通过阴性分选技术除杂,提高实验后样品的纯度。

4 总结与展望

微流控芯片具有体积小、对操作人员要求低、易于满足检测设备对集成化、微型化发展的要求,同时大大降低了实验对试剂的消耗,近些年来在分选CTCs的研究中应用越来越广泛。本文详细阐述了各种无标记及有标记技术的方法原理,并结合成功案例分析了各种方法的优缺点。微流控芯片分选细胞的技术目前仍面临一些挑战:处理大量血液样本耗时久;基于细胞尺寸和变形性的分选技术易遇到堵塞;基于惯性聚焦的分选技术产生的剪切力较大会影响到细胞活性;部分CTCs会丢失表达;验证实验所配置的含有CTCs的溶液并不能完全真实反映临床上病人外周血液中的情况。

尽管目前在微流控芯片推广至临床应用的过程中面临着制备工艺繁杂、可靠性较差等因素的阻碍,但不

可否认其在 CTCs 分选、富集及检测上具有巨大潜力。多级分选芯片集成多种分选技术手段,兼具无标记分选技术通量较高和标记分选技术操控精确的优势,更易满足 CTCs 分选的要求,其目前尚处于实验研究阶段,但其良好的分选效果将成为未来微流控芯片发展的一个主要方向。同时,微流控芯片将向着更加集成化(集成细胞预处理、分选富集、计数诊断及检测分析等功能单元于一体)、微型化、检测功能多样的方向发展,高效率、高精度度以及低成本的检测必将是未来微流控芯片在 CTCs 检测领域的研究重点,为实现肿瘤相关疾病的早期诊断、预后评估及药物治疗效果判定提供可靠的临床数据。

【参考文献】

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] ESMAEILSABZALI H, BEISCHLAG T V, COX M E, et al. Detection and isolation of circulating tumor cells: principles and methods[J]. Biotechnol Adv, 2013, 31(7): 1063-1084.
- [3] CRNIC I, CHRISTOFORI G. Novel technologies and recent advances in metastasis research[J]. Int J Dev Biol, 2004, 48(5-6): 573-581.
- [4] KRIVACIC R T, LADANYI A, CURRY D N, et al. A rare-cell detector for cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(29): 10501-10504.
- [5] ADALSTEINSSON V A, LOVE J C. Toward engineered processes for sequencing-based analysis of single circulating tumor cells[J]. Curr Opin Chem Eng, 2014, 4: 97-104.
- [6] 贾海明, 米泰宇, 杨雯, 等. CellSearch 系统检测胃癌患者循环肿瘤细胞及临床意义[J]. 卫生职业教育, 2017, 35(17): 149-151.
- [7] JIA H M, MI T Y, YANG W, et al. CellSearch system for detecting circulating tumor cells in patients with gastric cancer and its clinical significance[J]. Health Vocational Education, 2017, 35(17): 149-151.
- [7] LARA O, TONG X, ZBOROWSKI M, et al. Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation[J]. Exp Hematol, 2004, 32(10): 891-904.
- [8] WHITESIDES G M. The origins and the future of microfluidics[J]. Nature, 2006, 442(7101): 368-373.
- [9] SCHWARTZ M. Molecular characterization of CTCs[J]. Genet Eng Biotechnol News, 2013, 33: 36-37.
- [10] GLEGHORN J P, PRATT E D, GLEGHORN D D, et al. Capture of circulating tumor cells from whole blood of prostate cancer patients using geometrically enhanced differential immunocapture (GEDI) and a prostate-specific antibody[J]. Lab Chip, 2010, 10(1): 27-29.
- [11] WARKIANI M E, GUAN G, LUAN K B, et al. Slanted spiral microfluidics for the ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells[J]. Lab Chip, 2014, 14(1): 128-137.
- [12] HOSOKAWA M, KENMOTSU H, KOH Y, et al. Size-based isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients using a microcavity array system[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67466.
- [13] TAN S J, YOBAS L, LEE G Y H, et al. Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood[J]. Biomed Microdevices, 2009, 11(4): 883-890.
- [14] LÜ P, TANG Z, LIANG X, et al. Spatially graded segregation and recovery of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients[J]. Biomicrofluidics, 2013, 7(3): 180-204.
- [15] JIN C, MCFAUL S M, MA H, et al. Continuous flow cell separation system using microfluidic ratchets[C]. 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences October 27-31, 2013, Freiburg, Germany.
- [16] 黄笛, 项楠, 唐文来, 等. 基于微流控技术的循环肿瘤细胞分选研究[J]. 化学进展, 2015, 27(7): 882-912.
- [16] HUANG D, XIANG N, TANG W L, et al. Microfluidics-based circulating tumor cells separation[J]. Progress in Chemistry, 2015, 27(7): 882-912.
- [17] CHOI Y S, LEE S J. Holographic analysis of three-dimensional inertial migration of spherical particles in micro-scale pipe flow [J]. Microfluid Nanofluidics, 2010, 9(4-5): 819-829.
- [18] CHEN H. A triplet parallelizing spiral microfluidic chip for continuous separation of tumor cells[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 4042.
- [19] KIM T H, YOON H J, STELLA P, et al. Cascaded spiral microfluidic device for deterministic and high purity continuous separation of circulating tumor cells[J]. Biomicrofluidics, 2014, 8(6): 449.
- [20] SUN J, LIU C, LI M, et al. Size-based hydrodynamic rare tumor cell separation in curved microfluidic channels[J]. Biomicrofluidics, 2013, 7(1): 11802.
- [21] LOUTHERBACK K, D'SILVA J, LIU L, et al. Deterministic separation of cancer cells from blood at 10 mL/min[J]. AIP Adv, 2012, 2(4): 042107.
- [22] LIU Z, HUANG F, DU J, et al. Rapid isolation of cancer cells using microfluidic deterministic lateral displacement structure [J]. Biomicrofluidics, 2013, 7(1): 11801.
- [23] HOLMES D, GREEN N G, MORGAN H. Microdevices for dielectrophoretic flow-through cell separation[J]. IEEE Eng Med Biol Mag, 2003, 22(6): 85-90.
- [24] WU L, YUNG L Y, LIM K M. Dielectrophoretic capture voltage spectrum for measurement of dielectric properties and separation of cancer cells[J]. Biomicrofluidics, 2012, 6(1): 14113. DOI: 10.1063/1.3690470.
- [25] ALSHAREEF M, METRAKOS N, PEREZ E J, et al. Separation of tumor cells with dielectrophoresis-based microfluidic chip [J]. Biomicrofluidics, 2013, 7(1): 011803.
- [26] CHEN W, WENG S, ZHANG F, et al. Nanoroughened surfaces for efficient capture of circulating tumor cells without using capture antibodies[J]. ACS Nano, 2012, 7(1): 566-575.
- [27] 吕晓庆, 李雷, 陈红梅, 等. 微流控芯片技术在循环肿瘤细胞分离中的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2015, 42(4): 301-312.
- [27] LÜ X Q, LI L, CHEN H M, et al. Advances in isolating circulating tumor cells with microfluidic chips[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2015, 42(4): 301-312.
- [28] HE R, ZHAO L, LIU Y, et al. Biocompatible TiO₂ nanoparticle-based cell immunoassay for circulating tumor cells capture and identification from cancer patients[J]. Biomed Microdevices, 2013, 15(4): 617-626.
- [29] 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[J]. Lab Chip, 2014, 14(1): 89-98.
- [30] KANG J H, KRAUSE S, TOBIN H, et al. A combined micromagnetic microfluidic device for rapid capture and culture of rare circulating tumor cells[J]. Lab Chip, 2012, 12(12): 2175-2181.
- [31] HYUN K A, LEE T Y, LEE S H, et al. Two-stage microfluidic chip for selective isolation of circulating tumor cells (CTCs) [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 67: 86-92.
- [32] HOU H W, WARKIANI M E, KHOO B L, et al. Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces[J]. Sci Rep, 2013, 3(7): 1259.

(编辑:黄开颜)