



微流控技术在循环肿瘤细胞异质性分析领域的应用

唐曲¹, 胡文琪¹, 陈欢欢², 毛天智², 冀海伟², 吴丽^{2*}, 秦玉岭^{2*}, 丛辉^{1,3*}

1. 南通大学附属医院医学检验科, 南通 226001

2. 南通大学公共卫生学院, 南通 226019

3. 南通大学附属医院输血科, 南通 226001

*通讯作者, E-mail: wuli8686@ntu.edu.cn; yiqin@ntu.edu.cn; huicjs@163.com

收稿日期: 2021-05-14; 接受日期: 2021-06-29; 网络版发表日期: 2021-10-18

国家自然科学基金青年基金(编号: 31901056)和江苏特聘教授(编号: 06200053)资助项目

摘要 循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)的检测是液体活检的重要组成部分, 可以通过低损伤甚至无创的方法达到检测体液中肿瘤细胞的目的. 肿瘤细胞在增殖、转移过程中极易产生多种类型的变异, 如基因突变、蛋白质组学和表观遗传学改变等, 这导致肿瘤细胞个体间发生差异, 给临床诊疗带来巨大挑战. 通过CTCs检测技术分析肿瘤细胞之间的个体差异, 对于癌症诊断、治疗和预后判断等有非常重要的意义. 微流控分析技术平台因其尺寸小、易操控、成本低等优点成为CTCs检测分析领域的研究热点. 本综述主要介绍了基于微流控分析的单细胞技术在肿瘤细胞异质性研究中的应用.

关键词 循环肿瘤细胞, 微流控技术, 单细胞捕获, 异质性

1 引言

随着基础医学和临床医学研究的不断深入, 液体活检逐渐成为医学领域的研究热点之一. 液体活检主要检测外周血液中的循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)、循环内皮细胞(circulating endothelial cells, CECs)、循环基质细胞(circulating stromal cells, CStCs)等循环细胞^[1,2]和核酸类包括循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、循环游离细胞DNA(circulating free DNA, cfDNA)、微小RNA(microRNA, miRNA)以及细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs, 主

要是外泌体)等^[3,4]. 液体活检具有非侵入性、微创的优点, 可在较大程度上实现病程期间的连续监测. 目前液体活检技术在肿瘤的诊断、疗效监测以及肿瘤的复发与转移等方面均有广泛应用^[5].

CTCs分析被认为是肿瘤患者的实时“液体活检”^[6]. 相比于外泌体检测、核酸分析等液体活检方法, CTCs分析更为简便和精准. CTCs是由实体肿瘤脱落产生的、处于外周循环中的肿瘤细胞, 包括单个的游离细胞和细胞团簇(文中将团簇也划入单细胞分析里面), 细胞的遗传特性以及表达特性都与原发实体肿瘤细胞存在关联. 在肿瘤发展和治疗(靶向药物、化疗或

引用格式: Tang Q, Hu W, Chen H, Mao T, Ji H, Wu L, Qin Y, Cong H. Application of microfluidics-based technologies in the analysis of circulating tumor cells heterogeneity. *Sci Sin Chim*, 2022, 52: 52–70, doi: 10.1360/SSC-2021-0116

免疫疗法)过程中, 基因突变易导致肿瘤细胞传代间存在差异, 进而产生耐药性, 并发生肿瘤的迁移侵袭和复发, 这也是患者死亡的一大主因^[7]. 因基因组的不稳定性造成细胞在表观遗传状态、代谢状态、分化阶段、侵袭潜能等方面都存在一定的差异, 即肿瘤细胞之间的异质性表达^[8]. 细胞群的整体分析结果有时并不能真实有效地反映细胞个体之间的差异, 而单细胞分析手段可实现肿瘤细胞异质性研究, 可反映患者实际情况, 避免因对大量样本整体性研究导致差异化个体的分析被掩盖的情况发生^[9]. 因此, CTCs的单细胞异质性分析对了解肿瘤的发生发展和研究肿瘤耐药机理具有重要意义.

相较于外周血液中的红细胞(red blood cells, RBCs)和白细胞(white blood cells, WBCs)的数量, 血液样本中的CTCs数量十分稀少, 因此CTCs单细胞的有效捕获和下游分析尚面临许多挑战. 再者, CTCs的表面具有很多特异性的蛋白改变, 如在上皮-间充质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)过程中, CTCs逐渐从上皮细胞表型转化为间充质表型, 在外周血中表现为混合的E/M状态^[10]. 单从EMT过程中细胞状态的转变, 就可得出不同的CTCs之间是具有表达差异的, 即具有异质性. CTCs的基因型和表型都能够作为细胞分析的对象, 从而用来研究肿瘤的转移侵袭以及药物治疗反应等^[11]. 另外, CTCs在全血中循环转移时, 很多会直接被机体清除, 半衰期只有约1~2.4 h^[12]. CTCs本身也会分泌多种细胞因子并募集血小板等细胞黏附包裹在表面, 从而帮助其逃脱免疫细胞的杀伤作用^[13], 这些都给CTCs的研究增加了难度.

传统的流式细胞荧光分选技术(fluorescent-activated cell sorting, FACS)主要依赖于细胞表面的特定蛋白与标记荧光的抗体结合, 根据荧光强度、颜色等实现单个细胞的分选, 但FACS法在检测过程中会破坏细胞的活性, 导致无法进行细胞分选后的一些下游分析. 该法分析成本较高、依赖昂贵设备, 且样本量需求大、耗时长.

基于微流控芯片的单细胞分析是新近兴起的一类技术, 其分析成本低, 且制作材质多样(如硅、玻璃和聚合物等), 可以根据实际需求选择不同材料, 具有良好的生物相容性. 微流控芯片能够结合多种芯片组件和分析手段, 具有高通量、高灵敏度以及高分辨率^[14]的优势. 例如, Fluidigm(流达公司)上市的C1芯片单细

胞分析装置已经能够实现单细胞分析^[15], 但该芯片构造复杂、仪器设备昂贵、检测费用高、可测细胞数量有限(96个细胞), 仍需进一步改进. 本文总结了近年来报道的能够实现CTCs分离捕获和下游分析的微流控技术(图1), 从细胞捕获技术和单细胞分析方法两方面进行了讨论, 主要针对的是肿瘤细胞, 也有部分工作涉及其他人体细胞, 以期为今后的高灵敏度和特异性的CTCs单细胞分析提供思路.

2 细胞捕获技术

对CTCs进行分析的前提是去除外周全血中的RBCs和WBCs、血小板以及血浆, 最终获得稀有CTCs, 此过程即为CTCs捕获过程. 实现CTCs的高效捕获是对单细胞进行下游异质性分析的前提和基础. CTCs细胞捕获的方法主要包括亲和作用、物理法以及微液滴法等. 这些单细胞捕获技术的原理不同, 捕获效率也存在一定的差异. 本部分对这些技术展开讨论, 并将其在表1中进行了比较汇总.

2.1 亲和作用捕获

亲和作用是指一些生物分子的特定结构基团能够与其他分子高度特异性识别并结合, 如抗体-抗原、适配体之间的相互作用. 当实验条件改变时, 这种结合作

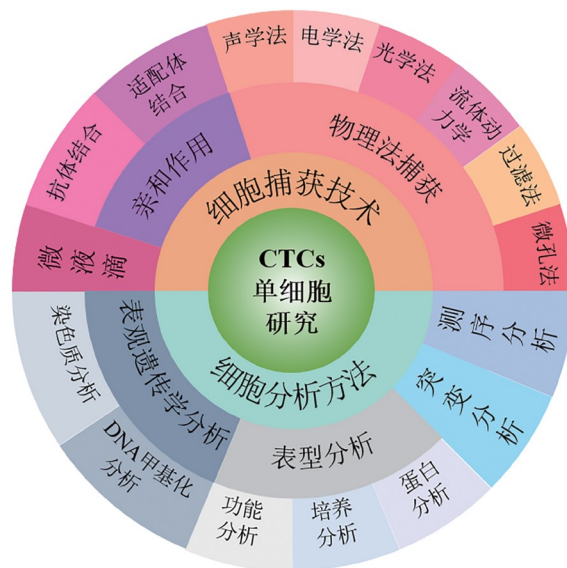


图1 CTCs单细胞研究技术概览(网络版彩图)

Figure 1 Overview of CTCs single cell analysis (color online).

用会消失^[16]。例如,亲和层析技术利用分子之间的特异性、可逆性结合以及非共价作用可实现基于分子识别的蛋白质纯化^[17]。利用亲和作用原理构建能匹配细胞表面特殊蛋白结构的相应抗体或适体对细胞进行捕获是常见的CTCs捕获方式。该方法的特异性较强,但捕获通量低、富集时间长,同时抗体或适体的制备增加了检测成本。此外,对于细胞表面特定生物标志物不存在或表达丰度非常低的一类CTCs而言,该法很难对其实现有效捕获^[18]。因此,在利用亲和作用对单细胞进行捕获的过程中,特定生物标志物的设计尤其重要。下面分别介绍了基于抗原-抗体和适配体之间相互作用的单细胞捕获的成功案例。

2.1.1 抗体结合

利用抗原抗体结合对细胞进行捕获已成为现今常用的CTCs捕获手段之一。CELLSEARCH®系统是迄今为止唯一获得美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于肿瘤患者预后评估的CTCs分离方法。但以抗原抗体结合为基本原理的捕获方法无法回避的缺点是CTCs表面抗体的不确定性,如在癌症上皮间质样改变EMT过程中,CTCs表面抗原的丢失或改变会造成捕获结果假阴性^[19]。

传统的方法是利用芯片中通道表面包被的抗体和CTCs表面的抗原发生抗原抗体结合,在未进行预处理的外周全血样本中高效、选择性地分离活性CTCs,该法捕获效率较高,在释放出细胞后还可对细胞进行下游生物学分析^[20,21]。流速和剪切力是决定CTC芯片上细胞捕获效率的两个主要参数。流速会影响细胞-微柱接触的持续时间,而低剪切力能保证细胞-微柱附着的最大化^[20]。因此,通过对捕获条件的优化可提高细胞捕获效率。如图2a所示,Zhu等^[22]提出了一种基于确定性侧向位移(deterministic lateral displacement, DLD)原理设计的微流控装置,能够根据细胞的尺寸大小增加其与微柱的碰撞。CTCs可以被微柱表面修饰有两种特异性抗体抗上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)抗体和抗脱唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)抗体捕获。该装置对肝细胞癌患者检测灵敏度高达97.8%,特异性达100%。

此外,免疫磁分离系统也经常被用于CTCs的捕获。利用修饰有抗EpCAM抗体的免疫磁性纳米颗粒对

细胞进行捕获,随后利用磁场作用将CTCs分离,抑或是利用负性磁分选去除WBCs等细胞。该法可实现高效率细胞捕获以及荧光信号的分析,并且在去除磁场冲洗掉细胞后芯片可重复利用^[23,24](图2b)。

除了在芯片通道表面以及磁性颗粒表面结合抗体这两种细胞捕获技术外,利用不同材料连接抗体对CTCs进行捕获也是目前研究的热点之一。聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)(PIPAAm)可通过共价键结合到硅纳米线衬底(SiNWS)上。37℃时由于生物素-链霉素和素作用,PIPAAm结合EpCAM抗体捕获CTCs。当温度降低到4℃时可将细胞释放^[25]。

此外,如图2c所示,在官能化的氧化石墨烯修饰的金图案表面,可通过交联剂GMBS (*N*- γ -maleimidobutyryloxy succinimide ester)与亲和素结合,利用生物素亲和素作用将生物素化EpCAM抗体固定到其表面,进而利用抗原抗体作用实现CTCs的捕获^[26]。在此方法基础上,Yoon等^[27]在后续研究中利用聚合物和氧化石墨烯-聚乙二醇(GO-PEG)复合物进行膜表面修饰,通过交联剂结合亲和素,实现了与生物素化抗体的共轭连接。之后利用热敏聚合物-GO膜的温度可调节特性,实现了在常温下捕获细胞、低温(低于12℃)时释放细胞。亦有学者利用表面修饰有抗体的碳纳米管组成的微柱结构,以显著增加细胞和微柱表面抗体之间的亲和作用^[28]。利用抗体捕获细胞可以较大程度地保留细胞活性,能够实现细胞捕获与分析集成化,不仅可以缩短整体分析时间,也可以降低检测过程中细胞污染的概率。

2.1.2 适配体结合

在体外利用配体指数富集法系统演化分析技术(SELEX,可以用来确定任何核酸结合蛋白的最佳结合序列)从人工合成的随机寡核苷酸序列中快速筛选得到的一段寡核苷酸序列被称为适体^[29],该序列对靶分子(小分子、蛋白质等)甚至整个细胞具有较高的特异性亲和力。目前常见的一些适体主要是针对细胞表面标志物,如EpCAM^[30]、EGFR(epidermal growth factor receptor)^[31]等。作为一种类似于抗体的核酸分子,适体克服了抗体的种属特异性,官能团易于修饰且结构稳定,可通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增,成本较低^[32]。

Abate简化体积条形图芯片(a volumetric bar chart

表 1 细胞捕获方法总结

Table 1 Summary of cell capture technologies

细胞捕获方法	方法评价(优点及不足)	捕获装置	捕获效率(涉及的细胞)	临床样本
亲和法	优点: 特异性捕获CTCs, 有针对性和释放	Synergetic-Chip ^[22]	90% (HuH-7细胞) 88% (SK-HEP-1细胞)	是
	不足: (1) 细胞表面的特异性标志物表达低甚至没有(例如EMT过程中EpCAM减少表达); (2) CTCs表面可能会有血小板等正常血小板黏附导致CTCs无法暴露表面标志物	LPCTC-iChip ^[23]	86% (MGH-BRx-142细胞)	否
		graphene oxide chip ^[26]	73% (3~5个MCF-7细胞/mL全血)	是
			94.2% (10~20个MCF-7细胞/mL全血)	
			87.3% (100个MCF-7细胞/mL全血)	
			Ap2D-CTC chip ^[34]	最高达到90% (MCF-7、SKBR3、MDA-MB-231, VCaP细胞)
适体捕获	优点: 特异性强, 利于细胞后续释放	适体鸡尾酒芯片 ^[36]	最高达到80% (A549、H460、H292、H1299、SK-MES-1细胞)	是
	不足: (1) 具有针对性的适体设计难度大; (2) 需探索适体的种类选择等, 比抗体更复杂			
	ApTDN-Chip ^[39]	87.4% (缓冲液中SW480细胞) 85.4% (全血中MCF-7细胞)	是	
物理法	优点: 对细胞的物理伤害较小, 细胞操纵较为精准	3D声学镊子芯片 ^[44]	—	否
	不足: (1) 难以实现CTCs的特异性捕获分离; (2) 操作要求较高			
	优点: 可依据细胞的介电常数不同进行分离; 可原位进行核酸等分析	SD-DEP chip ^[51]	最高达到91.7% (K562细胞)	否
	不足: (1) 操作要求较高; (2) 分析通量不高			
	优点: 可实现不同光学常数细胞的分离	光学分离系统 ^[64]	90%以上(MCF-7细胞)	否
	不足: 可能会造成细胞活性降低			
	优点: 对细胞活性无损或低损, 设备简单	two-stage i-DLD sorter ^[70]	91.34% (MCF-7细胞)	否
	不足: (1) 强烈依赖细胞尺寸、变形特性等; (2) 对芯片内流体的控制要求高; (3) 对芯片结构设计要求高	co-flow 微流控系统 ^[73]	97.1% (50个HepG2细胞/mL全血) ~98.2% (5000个HepG2细胞/mL全血)	否
优点: 设备简单, 操作过程简便	FAST disc ^[88]	95.9%±3.1% (MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-436、HCC78、AGS细胞)	是	
不足: (1) 装置易堵塞; (2) 依赖细胞尺寸, 有漏检或纯度不高的可能性				
微孔法	优点: 细胞之间相互隔离, 可避免交叉污染	DW装置 ^[92]	77% (A549、MDA-MB-435细胞)	否
不足: 根据泊松分布规律, 会存在空白孔, 或一个孔中存在多个细胞				
微液滴法	优点: 体积小、无交叉污染、兼容性强、应用广泛	SIFT芯片 ^[96]	—	否
	不足: (1) 存在空白液滴, 增加试剂成本; (2) 流体控制要求高(保证封装效率); (3) 依赖于油水界面特性			

chip, V-Chip)后利用sgc8适体(一种针对在细胞表面靶向人蛋白酪氨酸激酶7 (PTK7)的CCRF-CEM白血病细胞的DNA适体)缀合的纳米颗粒对CCRF-CEM白血病细胞进行捕获。该研究明确了流体移动的距离与样本中CTCs数量之间的线性相关性, 并能够在大量白细胞存在时定量检测CTCs, 通过肉眼观察刻度的变化来量化细胞与H₂O₂反应产生O₂推动流体的位移量, 灵敏度较高。不过, 该装置不能进行后续细胞分析且细胞不能

再回收, 对细胞的活性有所损伤, 准确性也有待提高^[33]。

对细胞进行多维度分析可进一步提高单细胞分析的效率和准确度, 而且可初步分析细胞表型。利用抗体结合细胞作为对照, Labib等^[34]发现纳米粒子/适体共轭物可显著提高细胞捕获效率。如图2d所示, 检测时首先用Ficoll法分离单个核细胞, 随后由抗CD15抗体标记的磁性纳米球进行负性选择。将选择后的细胞与

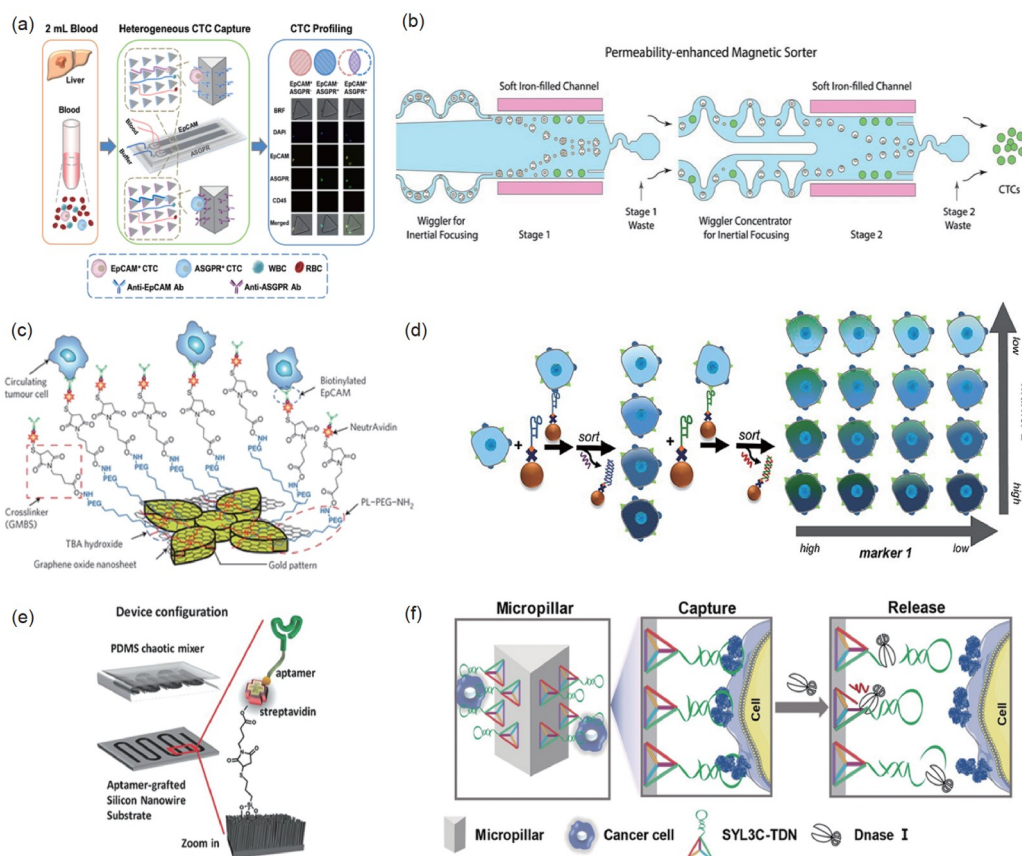


图2 亲和法捕获CTCs技术。(a~c) 抗体结合捕获CTCs^[22,23,26]; (d~f) 适配体结合捕获CTCs^[34,36,38] (网络版彩图)

Figure 2 Affinity-based cell capture technologies. (a~c) Antibody-dependent capture^[22,23,26]; (d~f) aptamer-dependent capture^[34,36,38] (color online).

适体磁性纳米球混合孵育后注入芯片中, 根据第一表面标记物含量将其分为4个亚群, 随后使用互补的反义DNA链释放四个亚群. 用针对第二表面标记物的特异性适体标记该磁性纳米颗粒对细胞进行二维分离. 在将细胞分类为16个亚群后, 使用与第二适体互补的反义DNA链释放细胞, 最后在16孔板中培养48 h后进行细胞分析. 不过, 该芯片只能实现亚群的分离, 不能在芯片内进行后续的分析. Poudineh等^[35]则利用EpCAM特异性适体标记的磁性纳米颗粒捕获细胞, 然后根据表型(EpCAM表达水平)再分成不同的亚群. 该芯片的优势在于首先利用物理捕获器对细胞进行捕获. 细胞捕获之后, 该芯片主要依赖于单个细胞亚群向CXCL16趋化剂的迁移程度不同, 对细胞的趋化表型进行分选, 分为非迁移、M1 (最小迁移)、M2 (中等迁移)、M3 (高迁移)或已迁移四种, 以研究细胞的迁移行为.

除了单一适体捕获细胞之外, Zhao等^[36]提出了一种适体鸡尾酒的方法, 利用多种适体的组合对CTCs进行高效捕获, 可以动态监测CTCs计数, 为患者预后和治疗反应等提供参考(图2e).

由于DNA纳米结构具有良好的生物相容性、较强的组织穿透性和在生物流体中的稳定性, 因此利用DNA纳米结构整合适体分子可提高适体分子对细胞捕获的效率^[37]. 如图2f所示, 顶点悬垂核酸适体的四面体DNA纳米结构(SYL3C-TDN)可以通过化学修饰的方法锚定到芯片(ApTDN-Chip)上, 适体可识别CTCs表面的EpCAM, 从而实现细胞的有效捕获. 随后使用Dnase I将细胞释放, 最后通过液滴数字PCR扩增技术进行下游基因突变分析^[38].

2.2 物理法捕获

相比于生物标记手段, 物理法捕获细胞无需标

记、高效灵活, 而且能最大程度地维持细胞活性, 有利于下游分析. 常见的物理法主要有声学法、电学法、光学法、流体动力学法、微孔法等.

2.2.1 声学法

因声场可以通过介质作用到细胞等微小颗粒, 近年来, 声学“镊子”(acoustic tweezers)在单细胞分析领域备受关注^[39]. 表面声波(surface acoustic wave, SAW)作为声学镊子的一个亚类, 已被成功地用于细胞聚焦、分选、操纵、富集、裂解、芯片内PCR以及生物传感等领域^[40]. Devendran等^[41]将声学方法与微流控技术结合对单细胞进行捕获操控, 形成阵列图案, 从而实现单细胞分析. 需要指出的是, 在使用基于声学的微流控芯片时, 需根据不同细胞类型对细胞的操作范围进行调控, 否则会影响细胞形态、黏附性和增殖活性等生理学特征.

高频表面声波二维(2D)声力场可以高效捕获人工合成的球形聚苯乙烯颗粒、疟原虫感染的红细胞和淋巴细胞^[42], 但2D声波对3D空间中单个细胞的控制力略显不足. 可以通过调节由两个正交放置的驻波表面声波(standing SAW, SSAW)的叠加所引起的3D声场分布, 利用产生的3D场声波对单细胞进行捕获. 一旦细胞被捕获便可改变声场中表面声波的频率和相位, 从而形成芯片内的3D捕获结点阵列. 该法最大的优点是可以在保持细胞活性的情况下精准地对细胞以及颗粒进行操控^[43]. 此外, 利用波数-螺旋声学镊子动态重塑SAW声场的分布, 通过适当地调节对应子阵列的相位差, 可以独立控制每个势阱的位置. 研究人员利用此法已成功地对U937和HeLa细胞进行捕获和操控, 并能实现装置的重复使用^[44](图3a).

2.2.2 电学法

介电泳(dielectrophoresis, DEP)是基于非均匀电场中不同介电性质的细胞受到不同的介电力这一物理特性实现对细胞的操控和捕获^[45]. 此外, 光电镊子(optoelectronic tweezers)通过结合光学感应的DEP法可对液体中的细胞进行更高水平的捕获和操纵^[46]. 与亲和捕获技术相比, 基于DEP的方法具有设计简单、通量高的优点^[47]. 目前较多微流控装置集成了DEP以及下游分析手段, 使高效率的单细胞分析成为可能.

DEP的固有缺陷在于交流电装置工作时会产生热

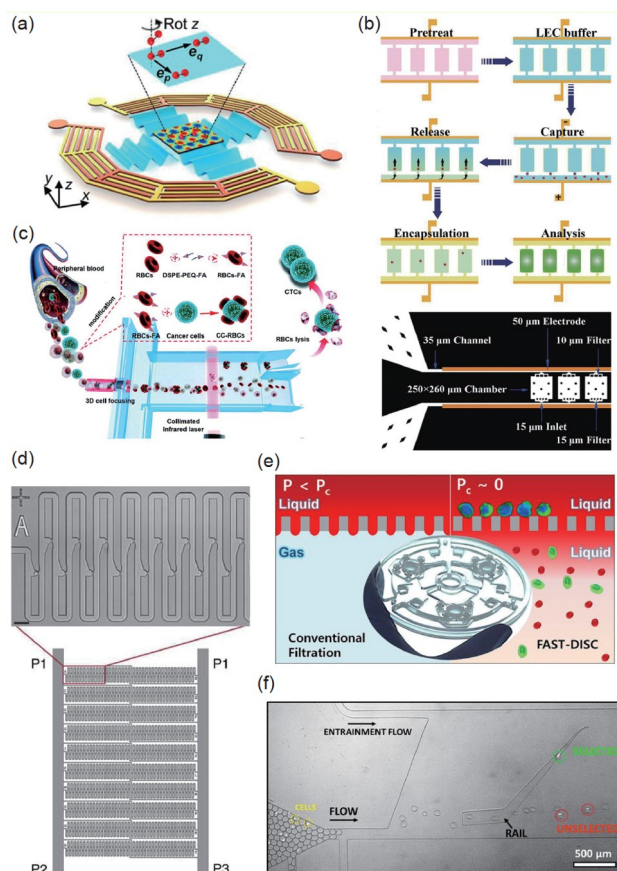


图3 物理法捕获细胞. (a) 声学法捕获^[44]; (b) DEP法单细胞捕获^[51]; (c) 光学捕获^[64]; (d) 流体动力学法单细胞捕获^[79]; (e) 离心过滤法捕获^[88]; (f) 液滴法细胞分选^[96] (网络版彩图)

Figure 3 Physical properties-based cell capture technologies. (a) Acoustic separation [44]; (b) dielectrophoretic capture [51]; (c) optical trapping [64]; (d) hydrodynamic capture [79]; (e) microfiltration [88]; (f) microdroplet for cell separation [96] (color online).

量, 进而影响细胞活性和细胞内结构成分等. Kim等^[48]将芯片隔离为多个陷阱捕获孔, 可缓解DEP产生热量导致的细胞损伤, 并防止与其他细胞发生交叉污染. Bai等^[49]则利用dTNT (DEP-trapping-nanowell-transfer)-seq(sequencing)芯片装置证实其对单细胞的捕获率可达91.84%, 并将其转移用于结合条形码珠, 以进行单细胞mRNA转录组学分析, 并证明了该法在转录水平上对细胞状态几乎没有影响. Toriello等^[50]通过电场的正负极变化来捕获不同种类具有生理活性的单细胞. 驱动电场和硫化电池的组提供了充分的细胞附着力, 使得细胞足以克服漂洗或试剂的流动力, 便于进行单细胞的捕获和后续的分析. 不过, 芯片开放结构可能会引起交叉污染.

另外, 如图3b所示, DEP技术可将多个操作步骤集成在便携式的一体化芯片中完成^[51]. CTC-FIND (CTC enrichment by size-based filtration and immunomagnetic negative selection followed by dielectrophoretic concentration)方法则是先采用物理和免疫分离细胞的方法, 后基于DEP微流控装置实现了CTCs高效率富集纯化, 其后还可进行细胞突变的异质性检测^[52]; 在微流控芯片中还可对捕获的单细胞进行电融合操作, 并实现对单个细胞轨迹的控制^[53]. 另外, 利用DEP还可以将细胞成对分离, 从而对不同细胞之间的相互作用进行分析^[54,55].

双极电极(bipolar electrode, BPE)在结构上与DEP有所不同, 具有阴阳两极, 可同时驱动氧化反应和还原反应. 双极电极阵列的设计保留了DEP的固有优势, 还具有电场无线控制、操作灵活以及可重复使用的优点, 可提高单细胞捕获率. 在BPE阵列上可利用DEP定向操纵单个细胞^[56]. BPE产生的介电场力, 可利用法拉第离子FIE和FID (Faradaic ion enrichment and depletion)对电场梯度的影响实现对单细胞的捕获和排斥, 并可保证细胞的活性^[57]. 利用基于BPE阵列的微流控芯片进行细胞操纵和分析的不足在于可能存在细胞之间的试剂污染, 限制了其在下游细胞分析中的应用.

2.2.3 光学法

1970年, Ashkin^[58]提出了利用连续可见激光的辐射压力可以导致自由悬浮颗粒的加速, 并在实验中实现了透明乳胶球和气泡的定向移动. 在后续多年研究中, Ashkin等^[59,60]利用这一原理对颗粒、细胞、病毒等进行了分选和操纵, 这一技术也正式被命名为单束光梯度力阱(single-beam gradient traps), 即光镊子.

光镊子主要利用聚焦激光束的辐射压力以非侵入性的方式实现对细胞、粒子的分离和操纵^[61], 近些年其在单细胞操纵方法的研究越发受到关注^[62]. 在DEP技术中简要描述的光电镊子则是对光镊子的改进, 采用低亮度的光源(发光二极管或卤素灯)对单个细胞进行操控^[63].

最近, Hu等^[64]提出了利用细胞之间光学常数(细胞大小和平均折射率)的差异, 使用光学驱动力对CC-RBCs (RBC共轭结合CTCs)进行精确分离. 在研究中, Hu等利用修饰有叶酸(folic acid, FA)的同种红细胞与肿瘤细胞表面叶酸受体(folate receptor, FR)之间的结

合作用形成CC-RBCs使得细胞之间光学参数不同, 从而实现微流控芯片中的CC-RBCs分离(图3c). 最终从血液中分离出纯度高(92%以上)、回收率高(90%以上)的CTCs, 并能保证CTCs的细胞膜完整, 维持较好的生物活性.

2.2.4 流体动力学法

流体动力学芯片不需要外加光、电、声、磁等物理学方法, 仅通过芯片结构设计调整对流体行为进行控制, 最终实现细胞捕获. 该方法是真正意义上的无创/微创细胞捕获技术.

基于微流控芯片的CTCs捕获流体动力学方法主要包括依赖于细胞尺寸差异的惯性聚焦^[65]、夹流分离(pinched flow fractionation, PFF)、黏弹性流分离、确定性侧向位移、剪切诱导扩散(shear-induced diffusion, SID)、微涡流等方法, 以及依赖于细胞其他物理属性(可变形性^[66]、密度^[67]、表面电荷^[68]等)的流体动力学方法.

Abdulla等^[69]设计了由两个螺旋通道和一个之字形通道组成的级联微流控设备, 利用惯性升力, Dean阻力和离心力可将CTCs从全血细胞中分离出来, 整个过程可在20 min内完成, 分离纯度并不高, 但可以实现多种类CTCs的分离. Xiang等^[70]将螺旋通道惯性聚焦方法与DLD法相结合, 进一步提高了细胞分离效率, 血细胞的总去除率达到了99.94%, 分离的肿瘤细胞纯度可达93.59%. 因此, 多种流体动力学方法可结合在一起进行CTCs的级联分离. 此外, 这些惯性聚焦分离的微流控装置还可以与流式细胞仪结合^[71], 提高分离效率, 从而做到便携无鞘流式细胞分析. 除惯性聚焦方法外, Pødenphant等^[72]报道了利用夹流分离从大量白细胞中分离LS174T结肠癌细胞的装置, 通过对流体流动的通道精心设计, 最终在装置的两个出口通道分别收集到不同大小尺寸的细胞或颗粒. Tian等^[73]则是采用惯用于颗粒分离的黏弹性流^[74]的方法在微流控装置中对全血中的肿瘤细胞进行了分离. 该方法将稀释的PEO(0.05%)溶液作为核心流, 诱导液体样品和核心流之间的稳定界面产生了界面弹性升力与惯性升力的竞争, 从而导致大小不同的细胞在界面上发生迁移得以进行细胞分离. Zhou等^[75]设计了集成细胞分离、细胞培养、原位细胞分析的微流控装置. 该装置使用夹心流通道设计诱导SID的产生, 实现根据体积大小

的细胞分离, 还可以减少流体剪切力对细胞活性的损伤, 从而进行原位细胞培养及检测. Khojah等^[76]开发了一种新的利用微涡流分离尺寸不一的细胞的装置. 在此研究中, 他们探索了空腔的涡流特性, 并表征了三个选择性细胞捕获阶段(雷诺数不同), 三个阶段捕获的细胞大小是不同的, 最终可以进行大小不同的细胞分离. 但是文章中多提及该分离装置的可重复性, 即侧重点多为探究细胞大小的一致性, 忽略了最终细胞回收率、捕获效率的问题.

最近, Wlodkowic等^[77]利用微阵列流体动力学芯片被动捕获单个肿瘤细胞, 在捕获过程中细胞可免受剪切应力的影响. 最终能够实现对单细胞长时间多次连续的观察, 对活细胞的凋亡过程进行分析. 还可以优化该捕获芯片的尺寸以提高捕获效率. 此外, 还可利用高密度悬浮障碍物阵列捕获单个细胞, 捕获的细胞数与悬浮障碍物的尺寸成正比相关^[78]. Kimmerling等^[79]采用单细胞捕获阵列高通量捕获1600个白血病细胞, 并通过荧光信号量化游离/结合的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)的变化, 分析活细胞的代谢变化(图3d).

2.2.5 过滤法

基于CTCs与正常血细胞之间的大小差异, Vona等^[80]利用过滤方法对全血中的CTCs进行了分离. 此后, 过滤手段多被用于CTCs的分离, 并出现了很多商用过滤方法^[81]. 过滤法主要包括膜过滤、微腔阵列过滤^[82]、微孔过滤^[83]等方法, 本文主要介绍了膜过滤装置. 膜过滤主要是利用膜上的微孔对细胞进行过滤, 现有很多种材质的过滤膜, 主要包括聚对二甲苯、聚碳酸酯、Parylene-C、Parylen、Pyrelen-C等^[84].

2010年, Lin等^[85]设计了一种简易的聚对二甲苯薄膜过滤装置和手动注射器注射系统, 直接从人外周血中捕获CTCs, 回收率较高, 但存在的最大问题是血细胞量多时可能会出现堵塞, 从而造成假阴性的结果. Harouaka等^[86]制备了一种柔性微弹簧阵列(flexible micro spring array, FMSA)设备, 可在10 min内从7.5 mL未处理全血中捕获CTCs. 该装置具有聚合物微弹簧的微过滤结构, 根据CTC的大小和变形性对其进行富集. 此外还可以优化设备孔隙度, 在进行全血处理时不会发生堵塞, 这是对Lin等^[85]设计的升级处理. 然而, 滤膜表面孔阵列的制作也存在一定难度, 需要保证膜的完

整性以及孔径大小的一致性. Hernández-Castro等^[87]提出一种真空辅助紫外微模塑(vacuum assisted UV micro-molding, VAUM)来制备等孔聚合物膜的方法, 获得了规则的孔分布和几何形状.

很多膜过滤装置均是利用注射泵提供的压力进行的细胞过滤分离, 利用离心对细胞进行分离的过滤装置也是膜过滤法的一种. 在传统离心过滤中, 进样时的进样端是气体环境, 这就会造成膜两边的压力不平衡, 导致全血输送不均匀. 如图3e所示, Kim等^[88]则从压力平衡这方面入手, 将进样端的气体环境改成了液体环境使得压力平衡进样均匀, 采用孔径为8 μm 的径迹刻蚀聚碳酸酯膜分离CTCs, CTCs的回收率大大提高, 可达到95.9% $\pm$ 3.1%.

过滤法在分离CTCs中存在一定优势: 不需要对全血进行前处理, 不受表面标记物的影响. 不过, 很多CTCs体积与正常白细胞的大小差异并不明显, 这就会导致很多CTCs会随着白细胞等正常细胞被滤除. 因此, 有报道认为利用亲和作用间接使细胞体积变大会更好分离^[89], 但这也是依赖于细胞标记物的方法, 仍有局限性.

2.2.6 微孔法

微孔法捕获主要是凭借细胞的重力沉降至微阵列微孔中实现单细胞捕获, 还可进行下游的核酸分析或转录组分析等^[90,91]. 有小微孔组(捕获孔)和大微孔组(培养孔)的芯片称为双孔(dual-well, DW)芯片. 该双孔芯片可以获得约77%的单细胞捕获效率, 捕获后的细胞可在培养孔中进行增殖分化^[92]. 根据泊松分布规律, 微孔的单细胞捕获效率较低, 多数微孔中会捕获多个细胞, 微单元内细胞的数量不可控, 分析过程中的人为因素造成的问题无法避免. 但是, 微孔装置的优势在于能够将下游分析集成到芯片上, 而且各个微孔之间相互独立, 可在有效微孔内避免交叉污染. 现已上市的SMARTer@ICELL8@ Single-Cell System单细胞分析系统可以实现高通量、高效的细胞分选, 并且可以较好地保持细胞的活性, 很多研究以其作为上游单细胞捕获的装置^[93].

2.3 微液滴法

基于液滴微流控技术的装置在商业化单细胞分析中应用较为广泛, 如10x Genomics公司开发的Chro-

mium单细胞分析平台和Sniperdx公司的SAG-100液滴工作平台就是将液滴技术应用到单细胞测序中, 实现高通量分析. 液滴分析技术具有体积小、无交叉污染、可通过封装试剂、核酸引物等物质后结合多种下游分析技术实现单细胞分析的优点^[94]. 虽然商业化的液滴封装技术存在设备昂贵、流体动力学条件不易控制^[95]、空白液滴增加试剂成本等不足, 但在优化实验条件后, 该技术能够以高通量实现单细胞的封装, 油包水结构可最大程度地保证细胞的独立, 有利于下游分析.

液滴微流控技术-界面张力分选(sorting by interfacial tension, SIFT)技术是在不使用标记或活性分选成分的情况下, 根据液滴不同的pH值分离为具有不同糖酵解能力的细胞^[96] (图3f). 将液滴技术与拉曼光谱技术结合不仅可以提高信噪比, 还可提供单细胞代谢物酶促反应产物累积的空间, 将Au纳米颗粒作为信号增强剂可迅速达到检测的阈值^[97]. 与单独的细胞分离模式相比, 组合分离模式在高通量和特异性方面有了较大进步^[98]. 当液滴捕获细胞后, 由于液滴中微珠表面的抗体可以结合细胞分泌的蛋白, 产生荧光信号, 随后可以利用荧光激活信号分选细胞, 使用介电泳力将单细胞液滴分离, 还能保持细胞的活性^[99].

3 单细胞分析方法

下游细胞分析是CTCs捕获的目的, 通过对细胞基因测序、表达、活性功能等方面的检测可实现单细胞异质性分析. 单细胞的分析对肿瘤患者病情监测、疗效判断等方面具有重要的价值. 目前CTCs单细胞的研究主要集中于酶学、分子水平、染色体水平、表观遗传学、蛋白等方面. 本部分针对这些应用展开讨论, 各种分析方法技术特点总结在表2中.

3.1 酶学分析

相比基因选择性表达所导致的不同类型的细胞中所含的酶类和表达活性不同, 同类型细胞间的酶活性表达也存在差异. 通过对细胞的酶学检测可以了解细胞功能及其生理活性状态.

结合液滴微流控技术对单细胞酶促反应分析已趋于成熟. 利用单个液滴封装底物(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP)、金纳米颗粒以及人肝癌细

胞HepG2, 通过测量大量细胞液滴可获得酶催化产物的表面增强拉曼光谱, 据此可实现对单个细胞的碱性磷酸酶(ALP)异常活性表达的分析, 从而应用于ALP相关疾病的诊疗^[97]. Guo等^[100]采用2D亲水微柱芯片制作了体积为4 nL的液滴微反应器, 可成功对HepG2中的 β -半乳糖苷酶(β -gal酶)活性进行分析.

Kim等^[48]借助流体动力学芯片对细胞进行捕获, 利用荧光探针对捕获的PC3细胞染色, 由EP (electroporation)脉冲引起的细胞膜裂解释放出 β -gal酶, 随后与 β -gal酶的荧光底物荧光素二- β -D-半乳糖苷(fluorescein-di- β -D-galactopyranoside, FDG)反应, 通过测量每个封闭细胞的孔中荧光强度的变化, 高度灵敏地检测单细胞内酶的活性. Di Carlo等^[78]联合流体动力学-扩散模型, 对三种细胞(HeLa、293T、Jurkat)进行羧酸酯酶动力学分析, 通过酶浓度的不同判断细胞的类别. 酶反应虽然具有专一性, 但有时也会出现交叉污染. Xu等^[101]结合多功能移液管以及纤维引导的IR-B激光对单细胞进行定向局部加热, 利用二磷酸荧光素检测NG108-15和HEK 293细胞内的ALP对周围温度改变的活性变化, 可在提高分析效率的同时有效避免交叉污染.

不过, 酶学分析要求在细胞捕获阶段保证细胞内酶的活性, 保持细胞的完整性, 这就对前期细胞捕获有微损或无损的要求.

3.2 基因突变分析

基因突变分析技术在精准医学中应用较为广泛^[51]. Park等^[102]结合MagSifter (Magnetic Sifter)和纳米孔装置基于免疫磁珠原理对CTCs进行捕获. 随后利用多重荧光探针对单细胞进行多基因同步检测. Autebert等^[103]则利用免疫磁性颗粒对脑脊液中CTCs进行捕获之后, 主要利用qPCR (quantitative real-time PCR)对PIK3CA基因突变进行分析. Lee等^[104]制备的OPEN-chip (on-chip post-processing ENabling chip)芯片采用滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)手段对转移性乳腺癌人表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)基因、PIK3CA突变以及转移性胰腺癌的KRAS基因进行扩增, 从而对基因突变患者的CTCs进行分析. 他们将细胞的捕获与分析集成在一个芯片中进行, 节省了分析过程的时间与试剂成本, 但该法在细胞裂解进行扩增时也存在交叉污

表 2 单细胞分析方法总结
Table 2 Summary of single cell analysis

单细胞分析手段	检测意义	不足
酶学分析	可以单独研究单细胞的酶学活性, 分析结果有助于了解细胞功能及其生理活性状态; 而且细胞内一些酶活性的变化会导致细胞功能的改变从而促进肿瘤的转移侵袭等表型改变	细胞捕获时需要保证细胞的活性
测序分析	对单细胞进行DNA或mRNA转录组测序可对细胞的遗传组成有更全面的了解; 通过对单细胞测序的结果分析可以获得单细胞的分化轨迹, 还可以帮助精确识别关键的基因组或转录组的特征, 从而做到有效识别肿瘤的存在	依赖前期测序文库的建立
基因突变分析	芯片内分析可节约分析时间, 结果易判断(荧光信号); 检测肿瘤细胞的突变有助于对肿瘤耐药以及治疗过程监测等	只能针对已知突变分析
表观遗传学分析	DNA甲基化分析 基于微流控芯片的甲基化分析可以实现高通量分析检测肿瘤等疾病中存在的DNA甲基化改变(甲基化增强表达或丢失), 有利于理解肿瘤发生的分子机制以及早期诊断, 还可以节约试剂成本	检测灵敏度受限
	染色质分析 基于微流控技术的单细胞的染色质分析能够有针对性地精准分析单个细胞的转录过程; 有助于了解细胞的转录调控过程及转录活性以及细胞的基因调控机制和细胞类型	灵敏度等受限
表型分析	细胞功能分析 基于微流控技术可以实现单细胞的功能分析, 能够检测单细胞的细胞凋亡、增殖活性等	只能获得简单的表型结果
	细胞培养分析 基于微流控技术的单细胞培养可以较好地隔离单个细胞, 对单细胞状态进行分析, 对细胞的代谢状况追踪以及不同细胞之间的相互作用的分析有益	细胞活性要求高, 培养环境严格
	细胞蛋白分析 在肿瘤治疗耐药性、监测免疫反应和指导免疫治疗以及高通量药物筛选方面具有指导意义	与酶学分析相似, 需要保证细胞的完整性(细胞内蛋白); 如果检测分泌蛋白, 还需保证细胞活性

染风险。在微流控芯片中对单细胞进行基因突变分析不仅做到了高通量分析, 还节省了分析的时间和成本。

此外, 将FISH (fluorescence *in situ* hybridization)技术结合到微流控芯片中, 可在一定程度上实现细胞内特定核酸序列的定位检测。由于FISH技术操作过程中需要使用溶剂和热处理, Perez-Toralla等^[105]利用环烯烃共聚物(cyclic olefin copolymers, COCs)热塑性材料来制作微流控芯片。该芯片可以对肿瘤细胞系的基因突变、扩增等进行片上FISH分析, 实现基因的定量检测和表征。Zhang等^[106]则是在单细胞阵列芯片中利用FISH技术对细胞突起的核酸进行了定位检测, 验证了细胞突起中RAB13 mRNAs的存在。将FISH技术融合到微流控芯片中可以节省FISH探针的使用量, 明显缩短FISH的检测时间, 而且可以节省人工成本, 实现自动化分析^[107]。若可进一步实现原位FISH与其他分析技术的联合检测将获取更多CTCs的细胞信息, 使检测

更有效灵敏。

3.3 细胞测序分析

分析单个CTCs的基因型和表型有助于更好地理解肿瘤的生物学进化^[108], 深度DNA测序还可用于跟踪细胞生长过程中的群体进化遗传异质性的改变^[109]。单细胞的mRNA谱分别受细胞分化阶段和环境等内外因素的影响而变化, 转录组测序可以在基因表达水平上对细胞异质性进行分析^[9]。因此, 对单细胞进行DNA或mRNA转录组测序可对细胞的遗传组成有更全面的了解。利用微流控技术可以实现单细胞的高通量测序, 从而观察单细胞的遗传异质性。

单细胞测序主要利用特定引物结合单细胞内靶核苷酸序列后进一步扩增获得测序文库, 继而对测序文库进行测序获得单细胞序列信息^[91]。由于服从泊松分布规律, 微阵列沉降法的最终单细胞捕获效果并不理

想, 相比于液滴微流控技术的单细胞测序灵敏度偏低。

将液滴微流控技术与单细胞DNA条形码技术相结合, 并用于多种单细胞高通量的基因或转录组测序, 具有广阔的应用前景^[110,111](图4b)。目前这方面的研究较多, 而且实验方案多种多样。如图4c所示, 基于流体动力差流阻力原理产生类液滴装置的单细胞捕获率可达到90%, 回收率接近100%。此法与CEL-seq、Drop-seq、MARS-seq、SCR-seq等测序方法相比具有较高的灵敏度和准确性以及高通量的优势^[112]。

多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)反应是一种依赖于随机引物以及 Φ 29DNA聚合酶的高保真等温扩增技术, 可以得到高度均匀的扩增产物, 且普遍大于10 kb, 扩增完整性也较好, 适用于全基因组扩增。Kim等^[113]利用免疫亲和作用捕获

CTCs, 后经脉冲激光实现微结构表面的CTCs分离回收, 将MDA与NGS (next-generation sequencing)测序技术结合, 获得最终的测序分析结果。Gole等^[114]报道的微孔置换扩增系统(microwell displacement amplification system, MIDAS)弥补了MDA的不足。MIDAS是一种高通量聚合酶克隆方法, 能够将单细胞随机分布到数百至数千个纳升的微孔中, 同时高通量扩增其遗传物质以用于细胞测序。该方法减少了扩增偏差, 能够以1~2 Mb的分辨率检测人类原代成熟神经元单拷贝数变化, 有利于细胞群的基因组多样性分析。

3.4 细胞表观遗传学分析

在人体内, 不同种类的正常细胞DNA组成相同, 但是基因表达会存在差异。这些基因表达的差异虽可

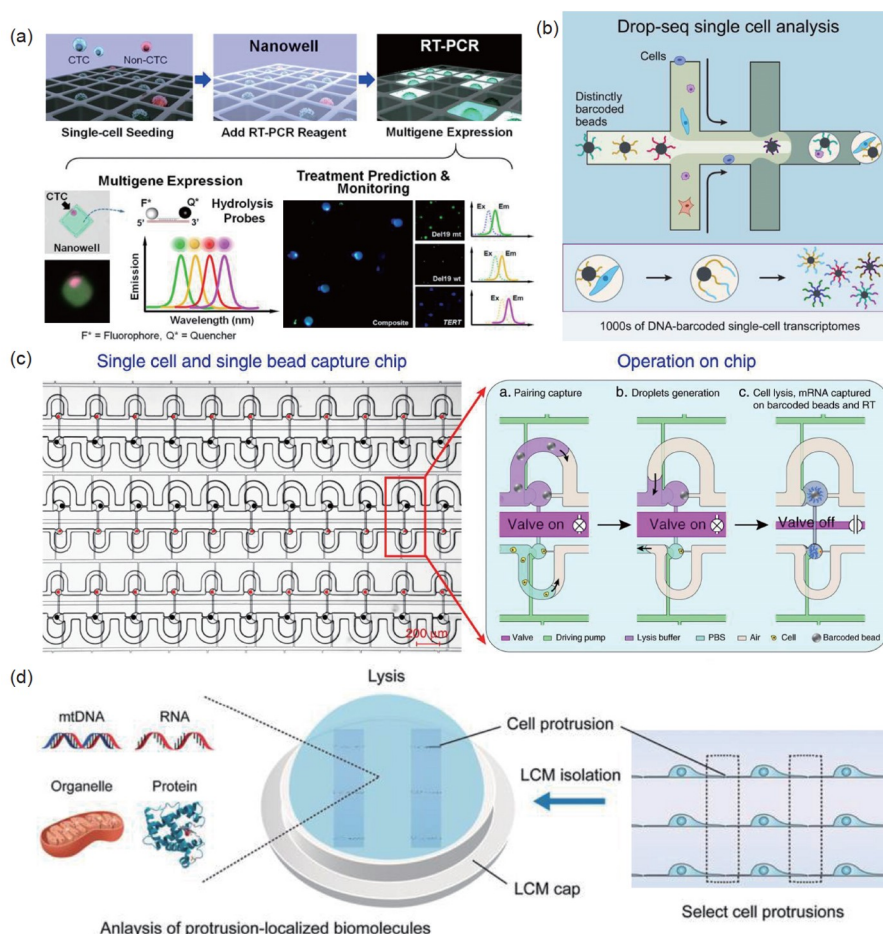


图4 细胞分析方法。(a) 基因突变分析^[102]; (b, c) 细胞测序分析^[110,112]; (d) 细胞功能分析^[106] (网络版彩图)

Figure 4 Technologies for single cell analysis. (a) Mutation detection [102]; (b, c) single-cell sequencing [110,112]; (d) cell function testing [106] (color online).

通过有丝分裂得以保留,在短期内是可遗传的,但不涉及DNA序列的改变,这种稳定的改变即“表观遗传”^[115].表观遗传学主要包括DNA甲基化、染色质活性、基因组印记等.虽然细胞的表观遗传学分析较为成熟,但普遍存在试剂昂贵、过程较为繁琐等缺点,而微流控技术可在一定程度上克服这些缺点.

3.4.1 DNA甲基化分析

在肿瘤等疾病的发生中存在DNA甲基化程度的改变(甲基化表达或丢失),基于微流控技术的单细胞DNA甲基化分析将有助于研究单细胞表观遗传学的异质性,对疾病的发生机制有更好的了解.单细胞甲基化限制性分析(single-cell restriction analysis of methylation, SCRAM)结合了单细胞甲基化敏感的限制性内切酶(methylation-sensitive restriction enzyme, MSRE)酶切和多路复用微流控qPCR芯片,可在48个单细胞中确定高达24个位点的甲基化状态,检测结果准确.但该方法只能区分以下两种情况:(1)特定位点的所有等位基因都是未完全甲基化的;(2)至少有一个等位基因是甲基化的^[116].另外,Ronen等^[117]使用DNA荧光探针以及甲基化序列特异性的核酸内切酶消化方法对单细胞的DNA甲基化酶活性检测,可以实现数千个单细胞的甲基化动态分析.此外,在微流控芯片中进行甲基化分析可以明显减少试剂用量,节约了试剂成本.

3.4.2 染色质分析

对染色体进行分析可以了解细胞的转录调控过程及转录活性,了解细胞的基因调控机制和细胞类型.用单细胞染色质活性表示细胞表观基因组亚群的方法,通过ATAC-seq (assay for transposase-accessible chromatin using sequencing)法进行细胞表面标记的表达与转录因子的可变性相关检测,可用于识别细胞中功能不同的亚群^[118].dscATAC-seq (droplet single-cell assay for transposase-accessible chromatin using sequencing)平台利用微液滴封装TN5转座酶处理的单细胞开放染色质和PCR试剂、结合引物的微珠,然后进行PCR扩增和测序实现高通量染色质可及性(chromatin accessibility)的分析^[119].不仅可以利用转座酶对细胞进行可及性染色质提取,还可利用染色质沉淀将染色质分离、与细胞mRNA联合检测等^[120].

除了直接对染色质可及性分析,在微流控芯片中

还可实现染色质免疫沉淀分析.scChIP-seq (single-cell chromatin immunoprecipitation followed by sequencing)方法可以在单细胞分辨率下检测获得性三阴性乳腺癌化疗耐药性模型,对组蛋白翻译后对染色质状态的修饰进行染色质共沉淀分析,可鉴定出细胞是否允许转录(H3K4me3)或具有抑制性(H3K27me3)^[121].

3.5 细胞表型分析

细胞表型主要包括细胞的凋亡、增殖、迁移、侵袭等.对细胞表型进行基于微流控技术的快速、有效分析不仅能够节约试剂成本,还有助于了解细胞的基因表达差异、药物反应等.

3.5.1 细胞功能分析

细胞共培养模型有助于更好地理解体内不同细胞间的相互作用.当其与延时显微镜结合使用时,可以分析细胞的迁移行为,进一步分析单个细胞间相互作用.而与芯片分析结果相比,利用FACS连续观察仅能得出细胞群的平均值,无法确定是否存在单个细胞在连续不同的时间表现出的不同结果,且不能保证细胞活性^[122].Wlodkowic等^[77]在实验中使用星形孢菌素(staurosporine, STS)诱导肿瘤细胞的凋亡,随后对细胞凋亡进行定量分析,这对于研究肿瘤细胞对抗癌药物的反应具有重要价值.Wood等^[90]通过不同的DNA修复酶判断不同的细胞损伤类型,随后根据不同的细胞修复时间、彗星尾巴长度等判断DNA损伤的程度,最终可以实现高通量检测DNA的损伤,在流行病学和药物筛选方面都具有研究潜力.热塑性“片上胰岛”芯片可同时实现16个胰岛细胞的单细胞物理诱捕.当胰岛细胞在受到不同浓度葡萄糖刺激后会分泌胰岛素.为了检测单细胞分泌的胰岛素含量和浓度,主要利用过量荧光标记的胰岛素来竞争性地结合芯片中加入的定量胰岛素抗体,从而根据最终的荧光强弱实现胰岛素浓度的定量检测^[123].如图4d所示,PG-Chip (protrusion-generating chip)可以利用捕获器高通量捕获单个乳腺癌细胞组成细胞阵列.在对单细胞培养一段时间后,具有迁移能力的细胞便会形成细胞突起,随后利用激光捕获显微切割将细胞突起切割提取其mRNA,在基因水平验证细胞的转移潜力,并通过动物实验验证转移的发生,可用于多种细胞迁移侵袭能力的分析^[106].

3.5.2 细胞培养分析

对捕获的肿瘤细胞进行体外培养可以获得细胞的代谢物质, 或通过不同类型细胞的共培养来研究细胞之间的相互作用, 这对于细胞功能的检测十分有利。

细胞共培养可以研究体内周围基质细胞对肿瘤细胞生长的影响, 比单细胞独立培养更具优势。在每个微孔的下游边缘带有缺口微通道的U型流体动力微捕获器芯片, 可以高通量地捕获单细胞, 随后对细胞动力学进行观察, 并发现单细胞异质性是细胞的固有特性^[124]。在由内部悬浮培养室(单个肿瘤细胞)、外部附着培养室(单个黏附的基质细胞)和狭窄连接通道组成的芯片结构中进行细胞培养, 随后根据细胞计数和体积的测量, 发现两种细胞共同培养后, 肿瘤细胞的增殖明显加快、体积明显增大, 说明基质细胞可明显影响肿瘤细胞的生长^[125]。共培养装置利用两个互相连接的微孔或小培养室将两种细胞分别捕获进行共培养, 这种装置的优势在于可以明显地观察肿瘤细胞增殖情况, 但在培养过程中有可能存在交叉污染。

Chen等^[126]设计了一种更具有优势的装置, 细胞培养液通过半透膜渗透进入培养层滋养细胞, 能够保证持续的新鲜培养液供应。在基质细胞与癌细胞共培养期间, 癌细胞明显增殖加快, 比起单独培养时细胞数量明显增加, 而且在共培养期间是依赖于不混溶的油隔离技术, 以简单而稳定的方式实现稳定的通道隔离。而在芯片细胞捕获培养的基础上, 利用激光对芯片表面进行照射产生气泡从而使捕获的单细胞发生物理分离回收, 相比于胰酶化细胞, 能更好地保留细胞活力和膜蛋白并进行下游的基因分析^[15]。此外, 还可以通过控制环境因素研究其对细胞培养的影响。

3.5.3 细胞蛋白分析

细胞的蛋白分析主要包括一些膜表面蛋白、分泌蛋白、细胞质内蛋白以及分泌的一些蛋白酶类, 也包括细胞外囊泡中的蛋白(此处不做介绍)。蛋白表达能够帮助理解细胞现实的状态, 单细胞蛋白分析在临床应用广泛, 特别是在肿瘤学领域方面, 包括肿瘤治疗耐药性、监测免疫反应和指导免疫治疗以及高通量药物筛选方面^[127]。这里着重介绍了细胞膜蛋白以及细胞分泌蛋白的分析。

前文细胞亲和作用捕获中提到的细胞膜表面存在

多种特异性蛋白。利用这些膜蛋白不仅可以对CTCs进行捕获, 还可以对单细胞进行分析, 通过分析细胞表面蛋白的表达量对肿瘤的严重程度做出判断。现在使用较多的分析方法是免疫荧光分析。Miyamoto等利用单细胞免疫荧光分析对激素反应性前列腺癌的雄激素受体信号做出了表征。他们将两种荧光信号结合即PSA (prostate-specific antigen)和PSMA (prostate-specific membrane antigen)信号, 根据HB (herringbone-chip)芯片^[121]捕获的CTCs检测的不同荧光数据结果对前列腺癌的状况做出判断^[128]。目前大多采用免疫荧光染色的方式对细胞蛋白进行染色从而对CTCs的数量进行检测。抗CK (cytokeratin)荧光抗体染色则主要针对肿瘤细胞, 抗CD45荧光抗体染色主要针对全血中的白细胞^[129,130], 但也包括一些肿瘤特异性抗原的免疫荧光染色, 如针对乳腺癌细胞的HER2染色和胰腺癌细胞的ZEB-1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1)染色^[26]。

应用免疫荧光染色对细胞进行计数和形态学分析是一种相对其他单细胞分析技术较为简单的方法, 因此常被用来模拟全血进行细胞捕获时计算细胞回收率。在单细胞分析中荧光技术应用广泛, 现已开发了多种荧光检测手段对细胞内的活性分子进行检测, 在其他综述中也有总结^[131]。

细胞的分泌蛋白检测与芯片内细胞培养有较多联系, 上文中的细胞培养主要涉及单细胞之间的共培养。而在分析单细胞分泌蛋白时, 则需要将单个细胞隔离, 对细胞在培养过程中分泌的蛋白进行收集并检测。研究者利用单细胞条形码芯片(single-cell barcode chip, SCBC)对单细胞分泌的蛋白质进行了多重分析, 并对单细胞分泌蛋白之间的相互作用和细胞信号相关通路进行了探索^[132,133]。SCBC芯片对蛋白的分析原理主要是通过微腔阵列的表面修饰多种类型的蛋白抗体对细胞分泌的蛋白进行捕获, 其后用荧光二抗对捕获的细胞裂解释放的蛋白进行定量检测。抗体是通过偶联单链DNA片段后与芯片阵列表面互补的DNA单链结合从而被间接修饰到芯片表面的。由于芯片表面原先修饰的单链DNA是无序且各不相同的(每个阵列), 使得每个阵列中形成了DNA条形码, 在抗体结合之后便转化成抗体条形码。在理论上该芯片可以检测30~40种蛋白质, 主要取决于表面修饰抗体的类型。此外, 利用该芯片还可以观察细胞在培养期间的运动情况, 并可以用作细胞表面蛋白分析。该芯片技术的不足在于没

有做到真正的单细胞分析, 仍会存在有多个细胞隔离在一起的情况。

4 总结

微流控技术在CTCs异质性研究领域的应用潜力和研究难度是并存的。多年来, 液体活检中的CTCs分析一直是肿瘤研究中的热点。临床跟踪结果明确表明CTCs与疾病的发生发展密切相关^[134]。CTCs可用于肿瘤的预后复发检测, 其数量的改变还可以帮助评估早期治疗效果并指导治疗中的患者分级^[135]。但是, 将CTCs用作肿瘤的早期诊断标志物尚有困难, 需要提高CTCs捕获技术的灵敏度或增加采血量^[108]。虽然针对CTCs的捕获以及分析的方法层出不穷, 但是真正能够实现在较少量的体液, 如血液中将CTCs识别且高效捕获并进行后续分析仍然需要不断的探索。大量研究工作是在模拟全血中加入数量极多的CTCs去验证自身方法的回收率和纯度, 在应对实际样本中极低含量的无遗漏、高效率分析依然难度较大。

本文论及的CTCs捕获方法中, 在利用细胞表面标志物进行亲和作用捕获时, 由于存在EMT或者外周血细胞对CTCs的黏附包裹^[13]等情况, 最终无法将全血中的CTCs完全捕获, 这就造成了一定的假阴性率。利用尺寸等物理特性进行分离的方式在某些肿瘤中可能是奏效的, 但是在一些已经报道的肿瘤中仍具有局限性。因此, 只通过一种捕获方式对CTCs进行捕获难以满足要求。有一些研究者提出了将不同的方法结合起来, 如

将细胞尺寸特性与细胞变形性结合^[136]或将尺寸与细胞膜电容差异结合^[68], 但仍有一定的局限性。我们需要探索更加有效的方式对CTCs进行捕获。研究者还需要进一步探索如何能够实现更有效的CTCs富集分选, 将CTCs富集捕获技术与分析技术串联起来也十分有必要, 以此可节省分析时间、分析成本, 还可最大程度地避免交叉污染。

在对细胞进行有效捕获后还需实现后续的有效分析。如何能够最大程度地利用捕获的CTCs是对于工作者的挑战。实现对稀有细胞的精准分析, 这对临床应用是极有价值的。此外, 由于CTCs存在细胞异质性, 含量少、来之不易, 实现对捕获到的单个CTCs进行多重交叉的分析以获得尽可能多且全面的细胞信息也是非常具有潜力的研究方向。

对单细胞进行分析的理想方法应遵循高通量和低成本, 而传统的分析方法难以同时实现这两个要求^[98]。基于微流控技术进行单个CTCs分析的目的是实现低成本、高效的单细胞捕获以及独立的下游多重分析。然而, 如今大多数的微流控芯片装置高通量水平不足, 另外一些装置虽在理论上可以达到高通量但细胞捕获效率较低。现有的一些分析方法能够适应绝大部分细胞检测的要求, 但测序过程中信号噪声的出现、荧光分析中的背景干扰等均会对细胞检测有影响, 检测的性能仍需要提高。而单细胞检测芯片的集成可以简化分析过程中繁琐的步骤, 并能够减少交叉污染。因此, 探索基于微流控技术的高效富集和高效下游检测技术的集成应用将是未来CTCs单细胞分析的重点。

参考文献

- 1 Cima I, Kong SL, Sengupta D, Tan IB, Phyo WM, Lee D, Hu M, Iliescu C, Alexander I, Goh WL, Rahmani M, Suhaimi NAM, Vo JH, Tai JA, Tan JH, Chua C, Ten R, Lim WJ, Chew MH, Hauser CAE, van Dam RM, Lim WY, Prabhakar S, Lim B, Koh PK, Robson P, Ying JY, Hillmer AM, Tan MH. *Sci Transl Med*, 2016, 8: 345ra89
- 2 Adams DL, Adams DK, He J, Kalhor N, Zhang M, Xu T, Gao H, Reuben JM, Qiao Y, Komaki R, Liao Z, Edelman MJ, Tang CM, Lin SH. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 5948–5958
- 3 Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14: 531–548
- 4 Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakakis F, Bardelli A. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10: 472–484
- 5 Jeffrey SS, Toner M. *Lab Chip*, 2019, 19: 548–549
- 6 Alix-Panabières C, Pantel K. *Clin Chem*, 2013, 59: 110–118
- 7 Dagogo-Jack I, Shaw AT. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15: 81–94
- 8 Lawson DA, Kessenbrock K, Davis RT, Pervolarakis N, Werb Z. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 1349–1360
- 9 Deng Y, Finck A, Fan R. *Annu Rev Biomed Eng*, 2019, 21: 365–393

- 10 Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, Campbell K, Cano A, Casanova J, Christofori G, Dedhar S, Derynck R, Ford HL, Fuxe J, García de Herreros A, Goodall GJ, Hadjantonakis AK, Huang RY, Kalcheim C, Kalluri R, Kang Y, Khew-Goodall Y, Levine H, Liu J, Longmore GD, Mani SA, Massagué J, Mayor R, McClay D, Mostov KE, Newgreen DF, Nieto MA, Puisieux A, Runyan R, Savagner P, Stanger B, Stemmler MP, Takahashi Y, Takeichi M, Theveneau E, Thiery JP, Thompson EW, Weinberg RA, Williams ED, Xing J, Zhou BP, Sheng G. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 341–352
- 11 Kelley SO, Pantel K. *Clin Chem*, 2020, 66: 89–96
- 12 Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LWMM, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 8152–8162
- 13 Haemmerle M, Stone RL, Menter DG, Afshar-Kharghan V, Sood AK. *Cancer Cell*, 2018, 33: 965–983
- 14 Whitesides GM. *Nature*, 2006, 442: 368–373
- 15 Chen YC, Baac HW, Lee KT, Fouladdel S, Teichert K, Ok JG, Cheng YH, Ingram PN, Hart AJ, Azizi E, Guo LJ, Wicha MS, Yoon E. *ACS Nano*, 2017, 11: 4660–4668
- 16 Ruigrok VJB, Levisson M, Eppink MHM, Smidt H, van der Oost J. *Biochem J*, 2011, 436: 1–13
- 17 Gautam S, Loh KC. *Biotechnol Adv*, 2011, 29: 840–849
- 18 Shen Z, Wu A, Chen X. *Chem Soc Rev*, 2017, 46: 2038–2056
- 19 Alix-Panabières C, Pantel K. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 623–631
- 20 Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M. *Nature*, 2007, 450: 1235–1239
- 21 Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, Yu M, Miyamoto DT, Waltman BA, Rothenberg SM, Shah AM, Smas ME, Korir GK, Floyd Frederick P, J, Gilman AJ, Lord JB, Winokur D, Springer S, Irimia D, Nagrath S, Sequist LV, Lee RJ, Isselbacher KJ, Maheswaran S, Haber DA, Toner M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 18392–18397
- 22 Zhu L, Lin H, Wan S, Chen X, Wu L, Zhu Z, Song Y, Hu B, Yang C. *Anal Chem*, 2020, 92: 15229–15235
- 23 Mishra A, Dubash TD, Edd JF, Jewett MK, Garre SG, Murat Karabacak N, Rabe DC, Mutlu BR, Walsh JR, Kapur R, Stott SL, Maheswaran S, Haber DA, Toner M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 16839–16847
- 24 Chang CL, Huang W, Jalal SI, Chan BD, Mahmood A, Shahda S, O'Neil BH, Matei DE, Savran CA. *Lab Chip*, 2015, 15: 1677–1688
- 25 Hou S, Zhao H, Zhao L, Shen Q, Wei KS, Suh DY, Nakao A, Garcia MA, Song M, Lee T, Xiong B, Luo SC, Tseng HR, Yu H. *Adv Mater*, 2013, 25: 1547–1551
- 26 Yoon HJ, Kim TH, Zhang Z, Azizi E, Pham TM, Paoletti C, Lin J, Ramnath N, Wicha MS, Hayes DF, Simeone DM, Nagrath S. *Nat Nanotech*, 2013, 8: 735–741
- 27 Yoon HJ, Shanker A, Wang Y, Kozminsky M, Jin Q, Palanisamy N, Burness ML, Azizi E, Simeone DM, Wicha MS, Kim J, Nagrath S. *Adv Mater*, 2016, 28: 4891–4897
- 28 Chen GD, Fachin F, Colombini E, Wardle BL, Toner M. *Lab Chip*, 2012, 12: 3159–3167
- 29 Tuerk C, Gold L. *Science*, 1990, 249: 505–510
- 30 Song Y, Shi Y, Huang M, Wang W, Wang Y, Cheng J, Lei Z, Zhu Z, Yang C. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 2236–2240
- 31 Wan Y, Liu Y, Allen PB, Asghar W, Mahmood MAI, Tan J, Duhon H, Kim Y, Ellington AD, Iqbal SM. *Lab Chip*, 2012, 12: 4693–4701
- 32 Iliuk AB, Hu L, Tao WA. *Anal Chem*, 2011, 83: 4440–4452
- 33 Abate MF, Jia S, Ahmed MG, Li X, Lin L, Chen X, Zhu Z, Yang C. *Small*, 2019, 15: 1804890
- 34 Labib M, Green B, Mohamadi RM, Mephram A, Ahmed SU, Mahmoudian L, Chang IH, Sargent EH, Kelley SO. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 2476–2479
- 35 Poudineh M, Labib M, Ahmed S, Nguyen LNM, Kermanshah L, Mohamadi RM, Sargent EH, Kelley SO. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 163–168
- 36 Zhao L, Tang C, Xu L, Zhang Z, Li X, Hu H, Cheng S, Zhou W, Huang M, Fong A, Liu B, Tseng HR, Gao H, Liu Y, Fang X. *Small*, 2016, 12: 1072–1081
- 37 Zhang Y, Tu J, Wang D, Zhu H, Maity SK, Qu X, Bogaert B, Pei H, Zhang H. *Adv Mater*, 2018, 30: 1703658
- 38 Zhang J, Lin B, Wu L, Huang M, Li X, Zhang H, Song J, Wang W, Zhao G, Song Y, Yang C. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 14115–14119
- 39 Ozcelik A, Rufo J, Guo F, Gu Y, Li P, Lata J, Huang TJ. *Nat Methods*, 2018, 15: 1021–1028

- 40 Ding X, Li P, Lin SCS, Stratton ZS, Nama N, Guo F, Slotcavage D, Mao X, Shi J, Costanzo F, Huang TJ. *Lab Chip*, 2013, 13: 3626–3649
- 41 Devendran C, Carthew J, Frith JE, Neild A. *Adv Sci*, 2019, 6: 1902326
- 42 Collins DJ, Morahan B, Garcia-Bustos J, Doerig C, Plebanski M, Neild A. *Nat Commun*, 2015, 6: 8686
- 43 Guo F, Mao Z, Chen Y, Xie Z, Lata JP, Li P, Ren L, Liu J, Yang J, Dao M, Suresh S, Huang TJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 1522–1527
- 44 Tian Z, Yang S, Huang PH, Wang Z, Zhang P, Gu Y, Bachman H, Chen C, Wu M, Xie Y, Huang TJ. *Sci Adv*, 2019, 5: eaau6062
- 45 Gagnon ZR. *Electrophoresis*, 2011, 32: 2466–2487
- 46 Ke LY, Kuo ZK, Chen YS, Yeh TY, Dong M, Tseng HW, Liu CH. *Lab Chip*, 2018, 18: 106–114
- 47 Lin Z, Luo G, Du W, Kong T, Liu C, Liu Z. *Small*, 2020, 16: 1903899
- 48 Kim SH, Fujii T. *Lab Chip*, 2016, 16: 2440–2449
- 49 Bai Z, Deng Y, Kim D, Chen Z, Xiao Y, Fan R. *ACS Nano*, 2020, 14: 7412–7424
- 50 Toriello NM, Douglas ES, Mathies RA. *Anal Chem*, 2005, 77: 6935–6941
- 51 Qin Y, Wu L, Schneider T, Yen GS, Wang J, Xu S, Li M, Paguirigan AL, Smith JL, Radich JP, Anand RK, Chiu DT. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 11378–11383
- 52 Kim SH, Ito H, Kozuka M, Takagi H, Hirai M, Fujii T. *Lab Chip*, 2019, 19: 757–766
- 53 Kirschbaum M, Guernth-Marschner CR, Cherré S, de Pablo Peña A, Jaeger MS, Kroczeck RA, Schnelle T, Mueller T, Duschl C. *Lab Chip*, 2012, 12: 443–450
- 54 Yoshimura Y, Tomita M, Mizutani F, Yasukawa T. *Anal Chem*, 2014, 86: 6818–6822
- 55 Wu CH, Chen RF, Liu Y, Yu ZM, Jiang YW, Cheng X. *Lab Chip*, 2017, 17: 4008–4014
- 56 Wu Y, Ren Y, Tao Y, Hou L, Jiang H. *Anal Chem*, 2018, 90: 11461–11469
- 57 Anand RK, Johnson ES, Chiu DT. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 776–783
- 58 Ashkin A. *Phys Rev Lett*, 1970, 24: 156–159
- 59 Ashkin A, Dziedzic JM, Yamane T. *Nature*, 1987, 330: 769–771
- 60 Ashkin A, Dziedzic JM. *Science*, 1987, 235: 1517–1520
- 61 Ashkin A. *Science*, 1980, 210: 1081–1088
- 62 Zhang H, Liu KK. *J R Soc Interface*, 2008, 5: 671–690
- 63 Chiou PY, Ohta AT, Wu MC. *Nature*, 2005, 436: 370–372
- 64 Hu X, Zhu D, Chen M, Chen K, Liu H, Liu W, Yang Y. *Lab Chip*, 2019, 19: 2549–2556
- 65 Huang D, Man J, Jiang D, Zhao J, Xiang N. *Electrophoresis*, 2020
- 66 Park ES, Jin C, Guo Q, Ang RR, Duffy SP, Matthews K, Azad A, Abdi H, Todenhöfer T, Bazov J, Chi KN, Black PC, Ma H. *Small*, 2016, 12: 1909–1919
- 67 Durmus NG, Tekin HC, Guven S, Sridhar K, Arslan Yildiz A, Calibasi G, Ghiran I, Davis RW, Steinmetz LM, Demirci U. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E3661–E3668
- 68 Hosseini SA, Abdollahad M, Zanganeh S, Dahmardeh M, Gharooni M, Abiri H, Alikhani A, Mohajerzadeh S, Mashinchian O. *Small*, 2016, 12: 883–891
- 69 Abdulla A, Liu W, Gholamipour-Shirazi A, Sun J, Ding X. *Anal Chem*, 2018, 90: 4397–4405
- 70 Xiang N, Wang J, Li Q, Han Y, Huang D, Ni Z. *Anal Chem*, 2019, 91: 10328–10334
- 71 Gong Y, Fan N, Yang X, Peng B, Jiang H. *Electrophoresis*, 2019, 40: 1212–1229
- 72 Pødenphant M, Ashley N, Koprowska K, Mir KU, Zalkovskij M, Bilenberg B, Bodmer W, Kristensen A, Marie R. *Lab Chip*, 2015, 15: 4598–4606
- 73 Tian F, Cai L, Chang J, Li S, Liu C, Li T, Sun J. *Lab Chip*, 2018, 18: 3436–3445
- 74 Yuan D, Zhao Q, Yan S, Tang SY, Alici G, Zhang J, Li W. *Lab Chip*, 2018, 18: 551–567
- 75 Zhou J, Tu C, Liang Y, Huang B, Fang Y, Liang X, Ye X. *Analyst*, 2020, 145: 1706–1715
- 76 Khojah R, Stoutamore R, Di Carlo D. *Lab Chip*, 2017, 17: 2542–2549
- 77 Wlodkowic D, Faley S, Zagnoni M, Wikswo JP, Cooper JM. *Anal Chem*, 2009, 81: 5517–5523
- 78 Di Carlo D, Aghdam N, Lee LP. *Anal Chem*, 2006, 78: 4925–4930
- 79 Kimmerling RJ, Lee Szeto G, Li JW, Genshaft AS, Kazer SW, Payer KR, de Riba Borrajo J, Blainey PC, Irvine DJ, Shalek AK, Manalis SR.

- Nat Commun*, 2016, 7: 10220
- 80 Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. *Am J Pathol*, 2000, 156: 57–63
- 81 Miller MC, Robinson PS, Wagner C, O'Shannessy DJ. *Cytometry*, 2018, 93: 1234–1239
- 82 Hosokawa M, Yoshikawa T, Negishi R, Yoshino T, Koh Y, Kenmotsu H, Naito T, Takahashi T, Yamamoto N, Kikuhara Y, Kanbara H, Tanaka T, Yamaguchi K, Matsunaga T. *Anal Chem*, 2013, 85: 5692–5698
- 83 Ilyas A, Asghar W, Kim Y, Iqbal SM. *Biosens Bioelectron*, 2014, 62: 343–349
- 84 Khetani S, Mohammadi M, Nezhad AS. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115: 2504–2529
- 85 Lin HK, Zheng S, Williams AJ, Balic M, Groshen S, Scher HI, Fleisher M, Stadler W, Datar RH, Tai YC, Cote RJ. *Clin Cancer Res*, 2010, 16: 5011–5018
- 86 Harouaka RA, Zhou MD, Yeh YT, Khan WJ, Das A, Liu X, Christ CC, Dicker DT, Baney TS, Kaifi JT, Belani CP, Truica CI, El-Deiry WS, Allerton JP, Zheng SY. *Clin Chem*, 2014, 60: 323–333
- 87 Hernández-Castro JA, Li K, Meunier A, Juncker D, Veres T. *Lab Chip*, 2017, 17: 1960–1969
- 88 Kim TH, Lim M, Park J, Oh JM, Kim H, Jeong H, Lee SJ, Park HC, Jung S, Kim BC, Lee K, Kim MH, Park DY, Kim GH, Cho YK. *Anal Chem*, 2017, 89: 1155–1162
- 89 Kim MS, Kim J, Lee W, Cho SJ, Oh JM, Lee JY, Baek S, Kim YJ, Sim TS, Lee HJ, Jung GE, Kim SI, Park JM, Oh JH, Gurel O, Lee SS, Lee JG. *Small*, 2013, 9: 3103–3110
- 90 Wood DK, Weingeist DM, Bhatia SN, Engelward BP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 10008–10013
- 91 Bose S, Wan Z, Carr A, Rizvi AH, Vieira G, Pe'er D, Sims PA. *Genome Biol*, 2015, 16: 120
- 92 Lin CH, Hsiao YH, Chang HC, Yeh CF, He CK, Salm EM, Chen C, Chiu IM, Hsu CH. *Lab Chip*, 2015, 15: 2928–2938
- 93 Mezger A, Klemm S, Mann I, Brower K, Mir A, Bostick M, Farmer A, Fordyce P, Linnarsson S, Greenleaf W. *Nat Commun*, 2018, 9: 3647
- 94 Collins DJ, Neild A, deMello A, Liu AQ, Ai Y. *Lab Chip*, 2015, 15: 3439–3459
- 95 Baroud CN, Gallaire F, Dangla R. *Lab Chip*, 2010, 10: 2032–2045
- 96 Zielke C, Pan CW, Gutierrez Ramirez AJ, Feit C, Dobson C, Davidson C, Sandel B, Abbyad P. *Anal Chem*, 2020, 92: 6949–6957
- 97 Sun D, Cao F, Cong L, Xu W, Chen Q, Shi W, Xu S. *Lab Chip*, 2019, 19: 335–342
- 98 Hosic S, Murthy SK, Koppes AN. *Anal Chem*, 2016, 88: 354–380
- 99 Mazutis L, Gilbert J, Ung WL, Weitz DA, Griffiths AD, Heyman JA. *Nat Protoc*, 2013, 8: 870–891
- 100 Guo XL, Wei Y, Lou Q, Zhu Y, Fang Q. *Anal Chem*, 2018, 90: 5810–5817
- 101 Xu S, Ainla A, Jardemark K, Jesorka A, Jeffries GDM. *Anal Chem*, 2015, 87: 381–387
- 102 Park S, Wong DJ, Ooi CC, Kurtz DM, Vermesh O, Aalipour A, Suh S, Pian KL, Chabon JJ, Lee SH, Jamali M, Say C, Carter JN, Lee LP, Kuschner WG, Schwartz EJ, Shrager JB, Neal JW, Wakelee HA, Diehn M, Nair VS, Wang SX, Gambhir SS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E8379–E8386
- 103 Autebert J, Coudert B, Champ J, Saias L, Guneri ET, Lebofsky R, Bidard FC, Pierga JY, Farace F, Descroix S, Malaquin L, Viovy JL. *Lab Chip*, 2015, 15: 2090–2101
- 104 Lee AC, Svedlund J, Darai E, Lee Y, Lee D, Lee HB, Kim SM, Kim O, Bae HJ, Choi A, Lee S, Jeong Y, Song SW, Choi Y, Yeom H, Lee CS, Han W, Lee DS, Jang JY, Madaboosi N, Nilsson M, Kwon S. *Lab Chip*, 2020, 20: 912–922
- 105 Perez-Toralla K, Mottet G, Guneri ET, Champ J, Bidard FC, Pierga JY, Kljanić J, Draskovic I, Malaquin L, Viovy JL, Descroix S. *Lab Chip*, 2015, 15: 811–822
- 106 Zhang P, Han X, Yao J, Shao N, Zhang K, Zhou Y, Zu Y, Wang B, Qin L. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 13700–13705
- 107 Rodriguez-Mateos P, Azevedo NF, Almeida C, Pamme N. *Med Microbiol Immunol*, 2020, 209: 373–391
- 108 Keller L, Pantel K. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19: 553–567
- 109 Rugbjerg P, Sommer MOA. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 869–876
- 110 Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemesh J, Shekhar K, Goldman M, Tirosh I, Bialas AR, Kamitaki N, Martersteck EM, Trombetta JJ, Weitz DA, Sanes JR, Shalek AK, Regev A, McCarroll SA. *Cell*, 2015, 161: 1202–1214
- 111 Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, Tallapragada N, Veres A, Li V, Peshkin L, Weitz DA, Kirschner MW. *Cell*, 2015, 161: 1187–1201
- 112 Zhang M, Zou Y, Xu X, Zhang X, Gao M, Song J, Huang P, Chen Q, Zhu Z, Lin W, Zare RN, Yang C. *Nat Commun*, 2020, 11: 2118

- 113 Kim O, Lee D, Chungwon Lee A, Lee Y, Bae HJ, Lee HB, Kim RN, Han W, Kwon S. *Small*, 2019, 15: 1902607
- 114 Gole J, Gore A, Richards A, Chiu YJ, Fung HL, Bushman D, Chiang HI, Chun J, Lo YH, Zhang K. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 1126–1132
- 115 Jaenisch R, Bird A. *Nat Genet*, 2003, 33: 245–254
- 116 Cheow LF, Quake SR, Burkholder WF, Messerschmidt DM. *Nat Protoc*, 2015, 10: 619–631
- 117 Ronen M, Avrahami D, Gerber D. *Lab Chip*, 2014, 14: 2354–2362
- 118 Litzenburger UM, Buenrostro JD, Wu B, Shen Y, Sheffield NC, Kathiria A, Greenleaf WJ, Chang HY. *Genome Biol*, 2017, 18: 15
- 119 Lareau CA, Duarte FM, Chew JG, Kartha VK, Burkett ZD, Kohlway AS, Pokholok D, Aryee MJ, Steemers FJ, Lebofsky R, Buenrostro JD. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 916–924
- 120 Chen S, Lake BB, Zhang K. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1452–1457
- 121 Gosselin K, Durand A, Marsolier J, Poitou A, Marangoni E, Nemati F, Dahmani A, Lameiras S, Reyat F, Frenoy O, Pousse Y, Reichen M, Woolfe A, Brenan C, Griffiths AD, Vallot C, Gérard A. *Nat Genet*, 2019, 51: 1060–1066
- 122 He CK, Chen YW, Wang SH, Hsu CH. *Lab Chip*, 2019, 19: 1370–1377
- 123 Gliberman AL, Pope BD, Zimmerman JF, Liu Q, Ferrier JP, Kenty JHR, Schrell AM, Mukhitov N, Shores KL, Tepole AB, Melton DA, Roper MG, Parker KK. *Lab Chip*, 2019, 19: 2993–3010
- 124 Chen H, Sun J, Wolvetang E, Cooper-White J. *Lab Chip*, 2015, 15: 1072–1083
- 125 Chen YC, Zhang Z, Fouladdel S, Deol Y, Ingram PN, McDermott SP, Azizi E, Wicha MS, Yoon E. *Lab Chip*, 2016, 16: 2935–2945
- 126 Chen YC, Cheng YH, Kim HS, Ingram PN, Nor JE, Yoon E. *Lab Chip*, 2014, 14: 2941–2947
- 127 Labib M, Kelley SO. *Nat Rev Chem*, 2020, 4: 143–158
- 128 Miyamoto DT, Lee RJ, Stott SL, Ting DT, Wittner BS, Ulman M, Smas ME, Lord JB, Brannigan BW, Trautwein J, Bander NH, Wu CL, Sequist LV, Smith MR, Ramaswamy S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. *Cancer Discovery*, 2012, 2: 995–1003
- 129 Hoshino K, Huang YY, Lane N, Huebschman M, Uhr JW, Frenkel EP, Zhang X. *Lab Chip*, 2011, 11: 3449–3457
- 130 Poudineh M, Aldridge PM, Ahmed S, Green BJ, Kermanshah L, Nguyen V, Tu C, Mohamadi RM, Nam RK, Hansen A, Sridhar SS, Finelli A, Fleshner NE, Joshua AM, Sargent EH, Kelley SO. *Nat Nanotech*, 2017, 12: 274–281
- 131 Fan Y, Dong D, Li Q, Si H, Pei H, Li L, Tang B. *Lab Chip*, 2018, 18: 1151–1173
- 132 Shi Q, Qin L, Wei W, Geng F, Fan R, Shik Shin Y, Guo D, Hood L, Mischel PS, Heath JR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 419–424
- 133 Kravchenko-Balasha N, Shin YS, Sutherland A, Levine RD, Heath JR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 5520–5525
- 134 Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, Isakoff SJ, Ciciliano JC, Wells MN, Shah AM, Concannon KF, Donaldson MC, Sequist LV, Brachtel E, Sgroi D, Baselga J, Ramaswamy S, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. *Science*, 2013, 339: 580–584
- 135 Alix-Panabières C, Pantel K. *Cancer Discov*, 2016, 6: 479–491
- 136 Ren X, Foster BM, Ghassemi P, Strobl JS, Kerr BA, Agah M. *Anal Chem*, 2018, 90: 7526–7534

Application of microfluidics-based technologies in the analysis of circulating tumor cells heterogeneity

Qu Tang¹, Wenqi Hu¹, Huanhuan Chen², Tianzhi Mao², Haiwei Ji², Li Wu^{2*}, Yuling Qin^{2*}, Hui Cong^{1,3*}

¹ Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China

² School of Public Health, Nantong University, Nantong 226019, China

³ Department of Blood Transfusion, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China

*Corresponding authors (email: wuli8686@ntu.edu.cn; ylqin@ntu.edu.cn; huicjs@163.com)

Abstract: Circulating tumor cells (CTCs) play a critical role in the fluid biopsy, which has great potential for the low-invasive or even non-invasive analysis of tumor cells in body fluids. During the process of proliferation and metastasis, variation among tumor cells frequently occurs, including gene mutations, proteomic and epigenetic changes, bringing in great challenges to clinical diagnosis and treatment. Single CTCs analysis can reveal the intrinsic heterogeneity among the tumor cells, which is significant for early cancer diagnosis, therapeutic response and prognosis prediction. Microfluidic-based technologies for CTCs analysis have been considered as a skillful way because of its small size, easy manipulation, low cost and so on. In this review, we mainly discuss the application of microfluidics involved single-cell technology for providing novel insights into cellular heterogeneity and cancer evolution.

Keywords: circulating tumor cells, microfluidic technology, single cell capture, heterogeneity

doi: [10.1360/SSC-2021-0116](https://doi.org/10.1360/SSC-2021-0116)