

基于微流控技术的疾病标志物即时检测研究进展

蒋汶君 唐曲 顾锡娟 冀海伟* 吴丽* 秦玉岭*

(南通大学公共卫生学院, 南通 226019)

摘要 基于微流控技术的分析装置具有便携性好、灵敏度高、自动化和低成本等优点,可对疾病进行快速现场检测,尤其适用于缺少昂贵分析检测设备的欠发达地区。此外,该装置无需专业的医疗操作人员和特定的操作环境,更易于家庭化普及。本文总结了基于微流控技术的即时检测(Point-of-care testing, POCT)器件的设计与开发,讨论了基于微流控的 POCT 设备在传染病、肿瘤和慢性病应用方面的最新研究进展,并对基于微流控技术的疾病标志物 POCT 领域的未来发展方向进行了展望。

关键词 即时检测; 微流控; 疾病诊断; 生物标志物; 评述

随着世界范围内的传染病、肿瘤和慢性病等疾病的发病率和死亡率逐年增加,如何构建能有效检测和监测这些疾病的方法一直是科学难题^[1-2]。目前,疾病诊断的常用方法主要有病理学检查、血液学检测和影像学诊断等,这些检查方法大多依赖昂贵的测试仪器和专业的操作人员^[3]。为避免在检测操作过程中的污染问题,通常需要在特定环境中进行。虽然依赖于组织取样的病理分析手段具有较高的准确性,但检测结果的等待时间长且有创操作^[4]。依赖于放射性检验的技术对病人有潜在的辐射,有可能对患者造成二次伤害^[5]。尽管依赖于血液检查的液体活检分析方法具有微创、快捷和易于动态监测等优点,但也存在技术复杂和设备昂贵等缺点^[6]。因此,开发简单、快速、灵敏和准确的检测方法,对于现场即时检测(Point-of-care testing, POCT)具有非常重要的现实意义。

微流控技术(Microfluidic technology)是一种可精确控制和操控微尺度流体的技术,可实现分析处理全过程自动化和高效化,因其具有检测试剂消耗量少、灵敏度高和分析成本低等优点^[7],近年来已成为 POCT 领域的研究热点,并在诸多床旁检测领域发挥了越来越重要的作用。POCT 是指能够在现场条件下实现的快速检测。近十余年,基于微流控的 POCT 设备发展迅速,在疾病诊断中显示出巨大的应用前景^[8-9],如已商业化的用于检测妊娠的试纸条和艾滋病自测试纸等。目前已开发出许多新型检测方法,如电化学检测、荧光检测、比色检测、化学发光检测、表面等离子体共振检测和磁性检测等^[10]。此外,随着纳米技术、微机电系统(Micro-electro-mechanical system, MEMS)技术和材料科学的发展,POCT 设备种类日益增多,如芯片实验室(Lab-on-a-chip, LOC)设备^[11]、盘上实验室设备(Lab-on-a-disc, LOAD)^[12]、微流体纸基设备(Microfluidic paper-based analytical devices, μ PADs)^[13]、侧向流动设备(Lateral flow devices)和等温核酸扩增设备(Isothermal nucleic acid amplification devices, INAA)^[14]等,将这些设备与人工智能结合,促进了基于微流控的 POCT 设备朝着更便携和更智能的方向发展。

新型冠状病毒感染、猴痘病毒的出现凸显了快速现场检测的重要性。传统实验室检测方法结果存在一定的滞后性,并且需要专业的操作人员,无法对样本进行“即时即地”分析。基于微流控的 POCT 设备已经广泛应用于传染病或肿瘤检测^[15-18],近年来该领域发展迅速,出现了大量创新性的研究工作。本文主要介绍了基于微流控的 POCT 设备在传染病、肿瘤和慢性病诊断应用中的最新研究进展,并对其在医学检测领域的研究现状进行了总结,对其发展前景进行了展望。

2022-11-28 收稿; 2023-01-28 接受

国家自然科学基金项目(Nos. 31901045, 32171452, 31901056)、江苏特聘教授计划项目(Nos. 06200048, 06200053)和江苏省杰出青年基金项目(No. BK20220060)资助。

* E-mail: jihaiwei64@ntu.edu.cn; wuli8686@ntu.edu.cn; yiqin@ntu.edu.cn

1 在传染病诊断中的应用

1.1 病毒检测

1.1.1 新型冠状病毒

新型冠状病毒感染对全球公共卫生构成巨大挑战,其中,严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)具有高传染性,早期误诊(假阴性)可导致快速社区传播^[19]。鉴于 SARS-CoV-2 感染病例数量增加迅速、缺乏有效新型冠状病毒感染疫苗和抗病毒治疗方法^[20],阳性感染者的快速筛查对于早发现和防止疫情进一步扩大具有重大意义,因此迫切需要研发一种快速、高通量和高灵敏检测 SARS-CoV-2 的现场方法。Lin 等^[21]设计了一种集荧光检测分析仪和 SARS-CoV-2 微芯片于一体的可用于检测 3 种生物标志物(IgG、IgM 和抗原)的微流控免疫检测平台(图 1A)。该平台利用抗体捕获样品中的生物标志物,形成抗原抗体复合物,并在毛细作用下迁移,可与荧光区被标记的二抗进行特异结合,在 15 min 内根据芯片内产生的荧光强度对 SARS-CoV-2 进行识别。这种新型集成诊断设备有望在监测新型冠状病毒感染中发挥重要作用。侧向流免疫层析测定(Lateral flow test, LFT)作为新型冠状病毒抗体血清学检测方法之一,具有成本低、便携性好和操作简单等优点,适合在医疗资源有限的地区开展使用,但该方法分析时间易受样本物理特性的影响,样本过于黏稠,则分析耗时较长,且此方法需要以固定化抗体作为配体,所选抗体必须具有较高的亲和力、敏感性和特异性,因此如何缩短反应时间、提高反应效率是今后需着重考虑的问题。

近年来,基于微流控技术的逆转录-聚合酶链反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)和簇状规则间隔短回文重复序列(Clustered regularly spaced short palindromic repeats, CRISPR)已被用于 SARS-CoV-2 检测^[22-23]。目前,RT-PCR 是诊断 COVID-19 的金标准方法^[24],微流控设备的介入可提高 RT-PCR 的检测精度,缩短检测时间。Ji 等^[25]开发了一种基于 RT-PCR 的离心微流控装置,该装置包括微流控芯片、驱动电机、光学检测系统和温度控制系统,采用 LED 光源作为激发光源,使用带有发射滤光片的光电倍增管收集荧光信号,可在 1.5 h 内对 SARS-CoV-2 进行检测(图 1B)。离心微流控通过调节转速控制液体流动,无需外加设备控制流体,是一种环境友好并可降低医疗压力的设备。由于病毒潜伏期和个体携带病毒量的差异以及采样人员的不规范操作,都可导致 RT-PCR 检测结果不准确,而微流控芯片检测过程的标准化和自动化可能会对改善这些问题。为了进一步缩短检测时间,Zhang 等^[26]研发了一种无需核酸扩增的方案,并将这种检测技术命名为“MARVE(多路复用、无核酸扩增、单核苷酸分解的病毒进化)”。该检测技术利用 Ag⁺与 DNA 探针和脲酶相互作用,将分析整合到可折叠纸基中,通过改变溶液 pH 值,利用智能手机进行分析,可在 30 min 内提供肉眼容易识别的比色测定结果。但是,该方法不能对 SARS-CoV-2 基因中的未知变异进行精确鉴定,只能作为一种辅助方法,并且由于缺少核酸扩增步骤,因此其敏感度低于 RT-PCR。

与 RT-PCR 相比,LAMP 的优点在于可恒温扩增、检测时间短、无需特殊的 PCR 设备^[27-29]。Davidson 等^[30]设计了一种以唾液为分析样本的纸基微流控 POCT 设备,基于 LAMP 分析可在 60 min 内检测唾液样本中的 SARS-CoV-2,通过产生肉眼可见的颜色变化确定是否感染 SARS-CoV-2,并且仅通过改变 LAMP 引物即可实现对多种病原体的检测。Natsuhara 等^[31]设计了一种可连续分配液体的微流控芯片,通过 LAMP 的比色分析可对每个腔室的传染病进行检测,如新型冠状病毒感染和甲乙型流感等(图 1C)。将 LAMP 整合到微流控系统中可进一步减少试剂消耗和降低对人员操作的要求^[32],但基于 LAMP 的比色分析容易产生大量 DNA 副产物,有可能会以气溶胶的形式造成残留污染,并且测试成本较高,需要一定的测试时间,其颜色变化与外加热源有关。

新型冠状病毒感染的快速诊断需依赖于快速、低成本和高灵敏度的检测设备,并且应与现有的远程医疗技术相兼容,以方便数据访问和远程管理。Farshidfar 等^[33]设计了一种基于智能手机的微流控 POCT 设备,通过在智能手机上设定相应检测程序,对唾液中的 SARS-CoV-2 进行定量检测,有助于在疾病发展空窗期进行早期诊断。通过将检测方法与智能手机进行模块化结合,构建了一种便携和用户友好的核酸、蛋白质或其它生物标志物检测平台。

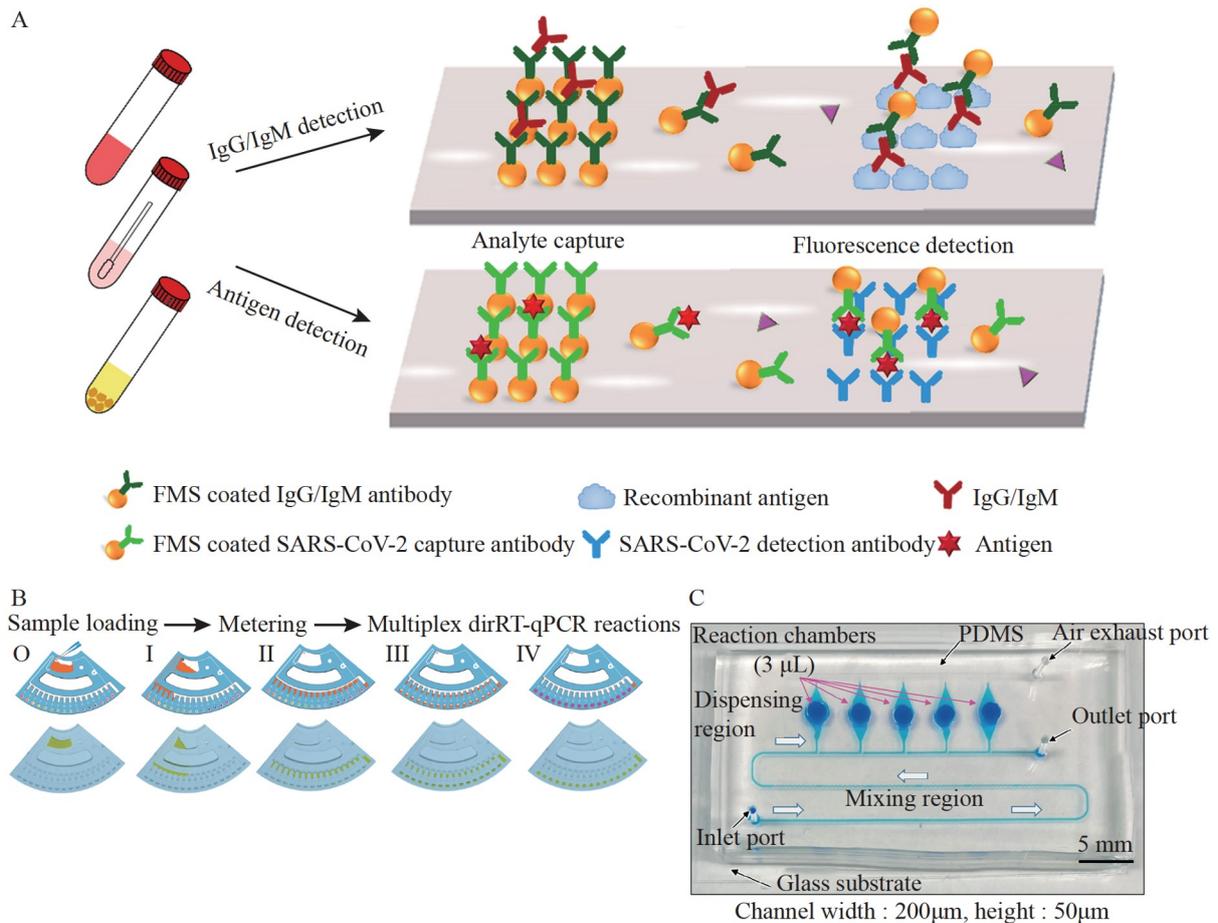


图1 基于微流控技术的严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2)的检测: (A)侧向流免疫层析测试(LFT)^[21]; (B)逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)^[25]; (C)环介导等温扩增(LAMP)^[31]

Fig.1 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) detection based on microfluidic technology: (A) Lateral flow test (LFT)^[21]; (B) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)^[25]; (C) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)^[31]

CRISPR 被称为“分子剪刀”,是一种强大的基因编辑技术^[34]。Chen 等^[35]开发了一种双 CRISPR/Cas12a 辅助的逆转录-重组酶介导扩增(Reverse transcription-recombinase polymerase amplification, RT-RAA)检测的离心微流控平台。该平台可在 30 min 内自动检测 1 copy/ μ L 的新冠病毒,实现了 SARS-CoV-2 的快速、现场、自动化和超灵敏的检测,可用于传染病的居家快速检测。CRISPR 技术检测时间短且不依赖复杂设备,但该技术的脱靶效应(Off-target effect)和 crRNA 的设计复杂性会影响检测结果的准确性。

1.1.2 人类免疫缺陷病毒的检测

艾滋病(Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)作为一种常见的传染病,由于缺乏有效的疫苗和抗病毒药物,其治疗仍是一项重大挑战。尽管几种潜在的疫苗正处于临床试验的不同阶段^[36],但大多数患者由于无法获得即时诊断而不清楚自身状况,并且在感染早期很难将人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)感染的一系列症状与普通感冒发烧引起的症状区分开来,因此艾滋病的 POCT 对公共卫生至关重要。目前,商业化的艾滋病自测试纸属于初筛检测,易受到自身免疫系统疾病(如红斑狼疮)、病原微生物感染(如甲肝、乙肝)和肿瘤(如淋巴瘤)的影响而造成假阳性^[37]。Yang 等^[38]研发了带有手持式光学读取器的一次性微流体免疫测定盒,采用间接免疫测定法,通过与胶体金纳米颗粒结合的葡萄球菌蛋白 A(SPA)从尿液样本中捕获 HIV 抗体,利用毛细作用力通过侧向流动免疫层析来实现尿液 HIV 检测,是一种简单、快速和灵敏的 HIV POCT 装置,但手持式设备成本较高(70 美元),人群适用性仍有待进一步考察。

1.2 寄生虫的检测

疟疾是由人类疟原虫感染引起的寄生虫病,诊断方法有光学显微镜直接观察法、PCR 和快速诊断测试(Rapid diagnostic test, RDT)^[39]等,这些诊断方法需要专业的操作人员对感染的细胞进行观察,不适用于资源匮乏地区。因此,研发高灵敏、操作简单和安全的疟原虫检测技术是十分必要的。Malpartida-Cardenas 等^[40]研究了一种针对 Kelch 13 基因的新型分子检测方法,通过基于 LAMP 反应的电化学方法检测溶液的 pH 值的变化,能够快速和特异地检测恶性疟原虫疟疾。该方法首次使用来自恶性疟原虫临床分离物的 DNA 样本,在芯片上进行 DNA 定量检测,并进一步验证了与抗青蒿素疟疾相关的 C580Y 单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)检测结果,可用于资源有限地区的恶性疟原虫疟疾的快速筛查。Ghosh 等^[41]开发了一种可与智能手机联用的微通道毛细管流动分析(Microchannel capillary flow assay, MCFA)平台,用于自动检测疟疾生物标志物(Plasmodium falciparum histidine rich protein 2, PfHRP2)。MCFA 平台可针对不同生物标记物进行定制,但该平台耗电量大,运行 10 min 将消耗高达 6% 的手机电量,在不给智能手机持续充电的情况下仅可连续对 16 个疟疾样本进行检测,因此在后续设备的优化过程中,需考虑如何在节省电量的情况下同时进行高通量检测。

1.3 细菌的检测

人感染细菌后,会发生一系列生理或病理变化。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌是引起细菌感染的常见病原菌,常规检测方法主要为微生物培养法,通过形态学和生物化学等方法对微生物进行鉴定^[42]。这些方法通常需要 3~5 d 才能对其进行确认,不能满足急性感染病的快速诊断要求。Xue 等^[43]研发了一种以二氧化锰纳米花(MnO₂ NFs)作为标记物的微流控比色生物传感器。该传感策略将免疫磁性纳米颗粒(MNPs)、样品和 MnO₂ NFs 在螺旋微混合器中充分混合孵育,形成 MNP-细菌-MnO₂ 夹心复合物,在微流控芯片的分离室进行磁捕获,然后注入 H₂O₂-TMB 底物,使夹心复合物上的 MnO₂ NFs 被模拟酶催化,生成黄色产物,用智能手机对其图像进行测量和处理,从而确定沙门氏菌的数量(图 2A)。该装置利用 MnO₂ NFs 作为信号探针,可对生物信号进行有效放大,但是该研究并未进行实际临床样本的检测。Zhang 等^[44]研发了一种基于 LAMP 的嵌入式纸基微芯片,通过离心力将大肠杆菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌均匀分布到反应室中,引入钙黄绿素荧光分子对目标产物进行检测,通过更换试剂,芯片同样可用于其它领域的核酸分析,但该芯片缺少大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌相应临床样本的验证,在临床样本中是否存在基质效应仍有待考察。微流控芯片在样品分离、核酸扩增等方面具有一定的优势,但需注意在检测过程中多重食源性病原体之间的交叉污染。

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)的常用检测方法有痰涂片、痰培养和分子检测等^[45]。近年来,基于分子检测的结核病诊断技术发展迅速,鉴于常规的利用 MTB DNA 检测对 MTB 的潜在感染进行早期诊断的方法需要昂贵的测试仪器和专业的操作人员,Zhou 等^[46]基于纸基微流控技术设计了一种低成本光热生物传感方法(图 2B)。DNA 捕获探针经过修饰固定在纸基上,靶序列被 DNA 捕获探针捕获,然后与 AuNP 标记的检测探针结合,形成夹心复合物,AuNP 在 H₂O₂ 存在下催化 TMB 氧化反应生成 TMB 的氧化产物(OX-TMB),OX-TMB 可作为强光热剂在 808 nm 激光照射下将目标浓度信息转换为温度信号,使用温度计可对纸基设备上的 MTB DNA 进行 DNA 温度计测量。这是首次尝试对纸基混合微流控器件进行光热分析,该方法构思巧妙,但需考虑在测量过程中出现的热损耗,因此应尽可能选用高精度的热敏元件。

2 在肿瘤诊断中的应用

肿瘤诊断和治疗仍是一项全球性的医学挑战,目前常用诊断方法包括肿瘤标志物检查、病理学检测和影像学诊断,这些检测方法价格昂贵且结果等待时间长,不利于家庭自检和便携化检测,而小型便携式的检测手段有利于及早发现肿瘤,提高治愈率,延长患者寿命。Lim 等^[47]研发了一种基于微流控芯片的外泌体 mRNA 传感器(Exosomal mRNA sensor, exoNA),通过集成微流控芯片和 3D 水凝胶纳米结构,对血液中乳腺癌相关的外泌体 ERBB2 进行检测,有望用于乳腺癌的快速现场检测。基于催化发夹组装(Catalytic hairpin assembly, CHA)的探针由脂质体携带被物理包埋在水凝胶中,水凝胶遇水膨胀,保持多孔结构,加

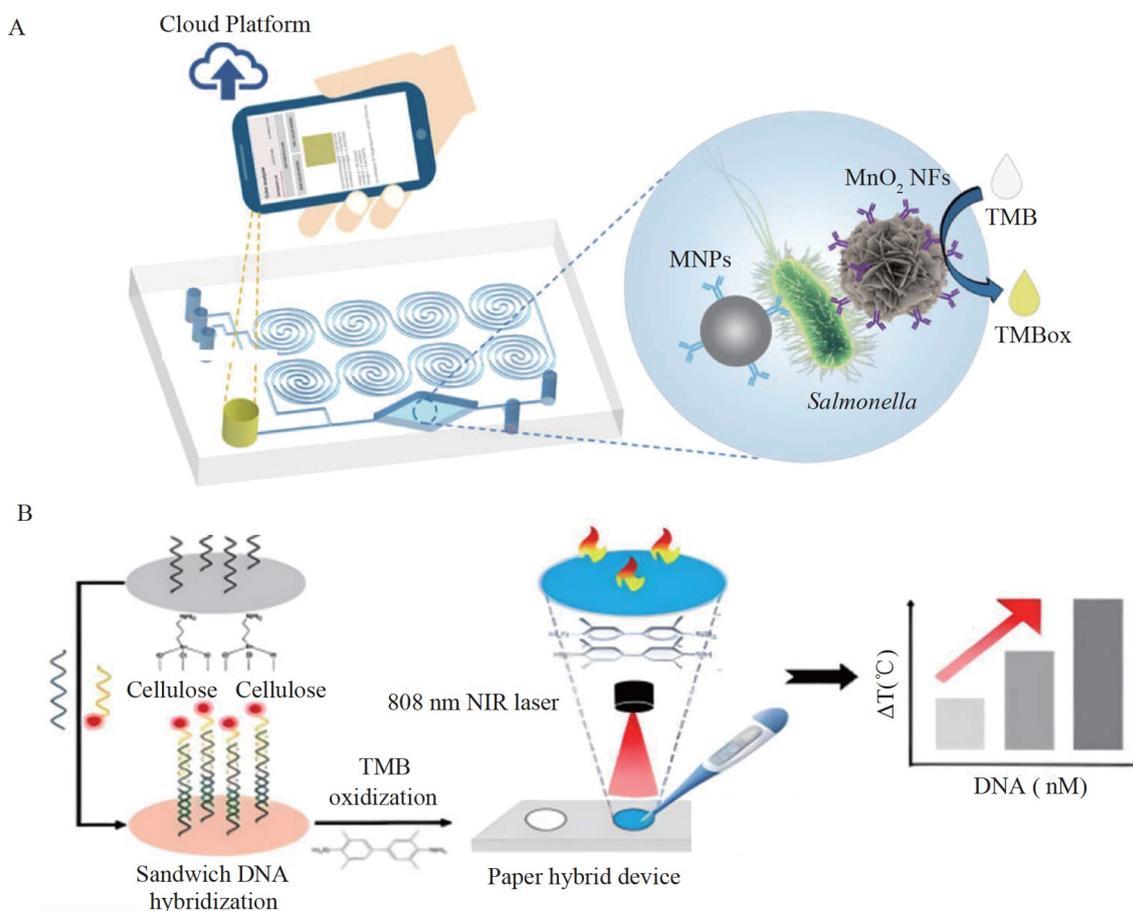


图2 (A) 沙门氏菌比色检测生物传感器示意图^[43]; (B) 结核分枝杆菌(MTB)DNA 光热生物传感示意图^[46]

Fig.2 (A) Schematic of detection of *Salmonella* by colorimetric biosensor^[43]; (B) Illustration of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) DNA photothermal biosensing^[46]

入使脂质体降解的 Triton X-100, 探针被释放出来, 从临床样本中分离的外泌体被分解, 靶基因与探针组之间的 CHA 反应被激活进而放大荧光信号(图 3A)。该设备利用真空驱动的无电源微流控芯片, 通过对微量流体精确控制, 提高了反应灵敏度和准确性, 此外, 该策略还克服了现有基因诊断方法的局限性, 有利于建立液体活检和预后监测等现场诊断平台。

人乳头瘤病毒(Human papilloma virus, HPV)已成为宫颈癌等疾病中公认的病毒致癌因子, HPV16 和 HPV18 的持续感染通常与宫颈癌的发生发展相关^[48], HPV 分型检测和液基薄层细胞学检查(Thin-prep cytology test, TCT)为宫颈癌的常用筛查手段, 取样操作可能会引起患者不适, 并且依赖于熟练的操作人员。虽然 HPV 分子检测已成为鉴定病毒感染和确定其特定类型的重要方法, 但目前对于 HPV 的感染诊断仍需要复杂仪器和繁琐的操作过程, 费时费力。Appidi 等^[49]研发了一种可原位形成金纳米粒子的无标记比色技术(Label-free colorimetric technique, C-ColAur)用于临床样本的检测, 敏感性为 96.42%, 特异度为 87.5%, 可在 1 min 内对宫颈癌进行定性检测, 这也是金纳米粒子首次应用于比色策略中作为筛查宫颈癌的手段, 该技术在肿瘤护理点检测方面显示出巨大的应用前景。Zhao 等^[50]建立了一种集微流控芯片、离心平台、温度控制板和荧光检测器于一体的检测系统, 该系统将细胞裂解、核酸纯化、等温扩增和实时荧光检测集成到一个装置, 在 40 min 内对 5 种高危 HPV(16、18、39、45、52)进行检测, 该装置比常规 qPCR 分析速度更快、诊断通量更大(可同时进行 40 个 LAMP 反应)、所用试剂更少。这些技术在资源有限的地区具有替代 qPCR 检测的潜力, 但仅能对宫颈癌进行快速定性或半定量检测, 无法做到准确测定 HPV 病毒载量, 因此检测性能还有待提高。

Shi 等^[51]研发了一种将多通道芯片与便携式气体压力计相结合的微流控设备,对肺癌进行筛查。设计了 4 种 DNA 四面体探针作为捕获探针,固定在芯片不同区域,4 种与肺癌相关的 miRNA 与捕获探针特异结合,使用环形烘箱洗掉通道中的未结合试剂,通过便携式气压计进行定量检测,气体压力与 miRNA 的浓度对数之间存在线性关系,这是便携式气压计首次应用到纸芯片中作为肺癌的筛查手段(图 3B)。来自生物体液的外泌体已成为一种潜在的新型肿瘤标志物, Yu 等^[52]提出了另一种高度集成的外泌体分离检测(Exosome separation and detection, ExoSD)芯片,该芯片从细胞培养上清液中分离外泌体,通过免疫荧光技术高灵敏地检测来自于胃癌细胞的外泌体,从而实现胃癌的早期诊断。ExoSD 芯片已被证明是可用于外泌体分离和监测的前沿平台,该平台可将技术扩展到其它细胞来源的外泌体或细胞分离的检测过程。基于微流控技术的外泌体分析方法具有检测时间短、试剂消耗少等优点,可在一定程度上满足大量临床样本中外泌体的快速检测要求,但通常需要与注射器和荧光检测仪等配套设备结合使用,在一定程度上限制了使用场景。

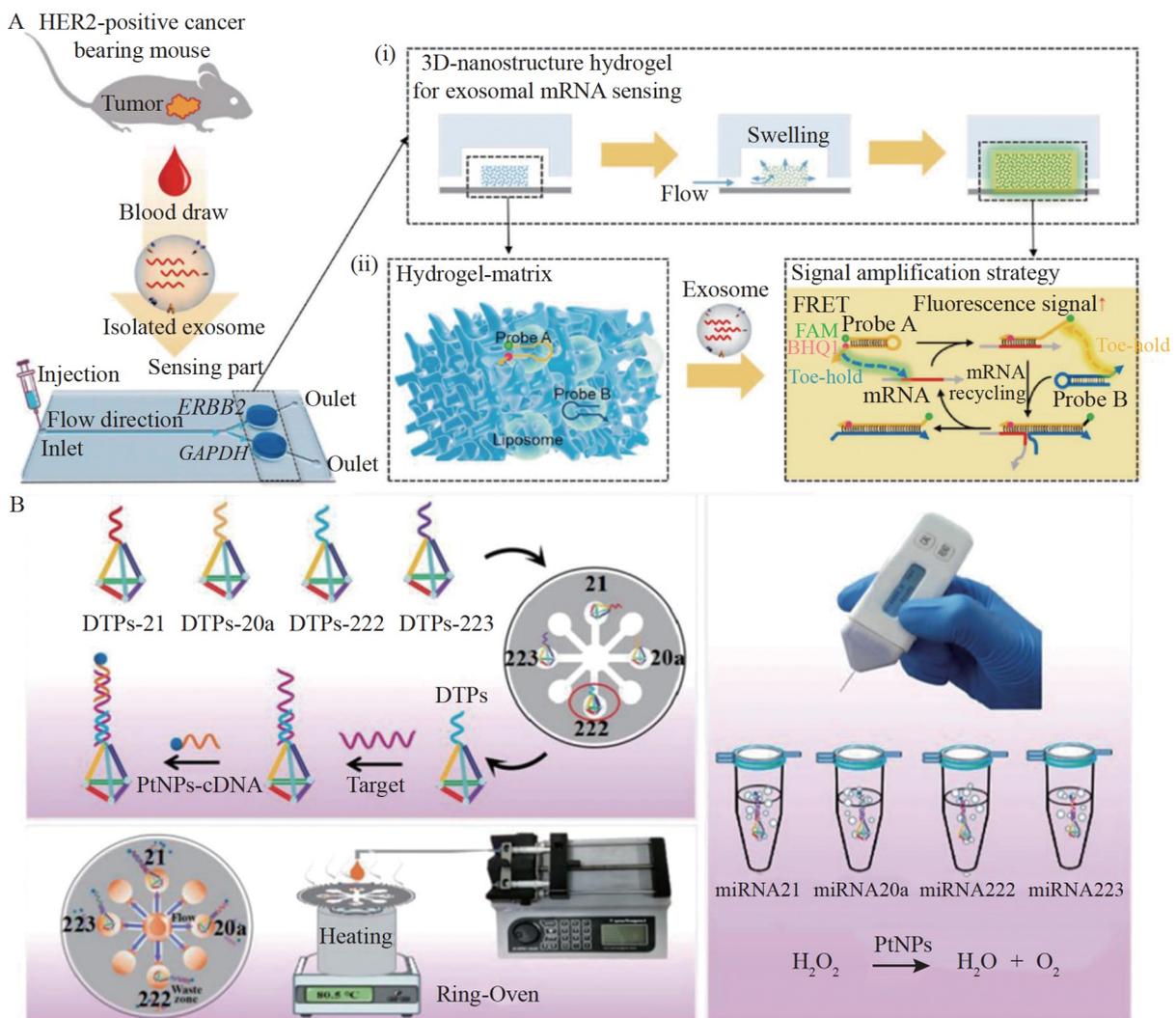


图3 (A) exoNA 传感芯片示意图^[47]; (B) 微流控设备联合气体压力计对肺癌进行检测示意图^[51]

Fig.3 (A) Schematic of exoNA sensing chip^[47]; (B) Schematic of microfluidic-based device combined with gas pressure bioassay for lung cancer detection^[51]

基于微流控的 POCT 设备作为一种新兴技术在肿瘤早期诊断中显示出良好的应用前景,也可以用于肿瘤治疗,如 Kim 等^[53]模拟了经脑转移的非小细胞肺癌的脑肿瘤微环境,并构建 3D 微流控装置,开发了一种可单独收集多种细胞培养基的方法,该模型为精准治疗和临床前评估针对转移和耐药肿瘤的全新治

疗方案提供了一种潜在的药物筛选模型。目前,通过建立肿瘤微环境模型进行抗癌药物筛选已成为研究热点,但大多数筛选平台仍处于初级发展阶段,因此实验前需要更复杂、更准确地建模,才能为后续实验数据提供可靠的支撑,肿瘤芯片不仅可推动各种新型免疫治疗技术的发展,还可作为连接体外平台和动物模型之间的桥梁。

3 在慢性病诊断中的应用

慢性病发病率在全球范围内已达到流行病的比例^[54],大多数慢性病(糖尿病、高血压、冠心病、肺病和肾病等)通常难以一次性治愈,加之欠发达地区缺乏及时的医疗服务,常造成慢性病患者得不到及时有效的诊断而耽误治疗^[55],因此,慢性病的快速现场检测显得尤为重要。

糖尿病是一种由多病因引起的代谢紊乱性疾病,血糖水平是监测糖尿病的重要参数。糖尿病患者通常伴有一种或多种并发症,高脂血症是最常见也是最重要的一种,可诱发心血管疾病,同时检测血糖、甘油三酯和总胆固醇的含量可以更好地监测疾病进展。Li 等^[56]研发了基于智能手机的扇形微流控装置,通过离心将血清样本均匀分配到 4 个反应室中,使用带有 LED 光源的智能手机对体系中过氧化物酶-H₂O₂ 产生的颜色变化进行捕捉和分析,同时检测葡萄糖、甘油三酯和总胆固醇 3 项指标。该装置通过与智能手机联用,使糖尿病、高脂血症检测更加便携化和智能化。连续、实时地监测血糖有利于糖尿病治疗, Pu 等^[57]提出了一种基于柔性电子学的表皮生物微流控技术,实现了可穿戴式葡萄糖检测,通过增强皮肤渗透性,能够在短时间内以较小的电流密度透皮提取足够的透皮间质液(Transdermal interstitial fluid, ISF),从而有效减少长期侵入式采血所引起的皮肤刺激。近年来,新兴的可穿戴设备促进了汗液、唾液和尿液等生物标志物的检测,这些设备使慢性病检测能够以一种低成本、高通量、无需专业技术支持的方式出现在护理点检测平台。

慢性肾脏疾病(Chronic kidney disease, CKD)也是医疗保健系统重要的检测工作,尽早识别危险因素或找到合适的生物标记物有助于在发病前实施早期治疗。Rossini 等^[58]基于比色法研发了一种可对尿液肌酐和尿酸进行定量检测的微流控纸基分析装置,目标产物浓度与颜色强度呈现良好的线性关系。Fan 等^[59]构建的微流控纸基芯片平台可对唾液中尿酸浓度进行定量测定,利用尿酸和铁氰化钾组成氧化还原系统,通过 Fe³⁺ 与反应产物亚铁氰化钾进行显色,该装置不仅解决了背景信号干扰的问题,还将灵敏度提高了近 2 个数量级,利用两个不同品牌的智能手机进行拍照,以比色卡为基准消除不同手机之间的色差,确保检测方法的准确性和普适性(图 4A)。该平台通过拟合手机拍摄的色卡 RGB 值和参考灰阶色卡的 RGB 值对手机拍摄的图片颜色进行校正,但不同品牌手机中的相机参数会有差异,手机拍照呈现的并非原图,容易受色卡的打印色差、样本的显色差异等因素影响,应考察多款手机,以评估其普适性。此外,尿白蛋白、尿素氮和胱抑素 C 等均可作为慢性肾脏疾病的辅助指标,若同时进行多重生物标志物检测,可有效提高慢性肾脏疾病的检出率。

急性心肌梗死(Acute myocardial infarction, AMI)已成为近年来人类面临的主要疾病风险之一,肌钙蛋白(Troponin, Tn)是心肌损伤的特异性标志物,可在急性症状出现前几天逐渐升高至纳克水平^[60], Yu 等^[61]研发了基于低成本热敏纤维纸的光热生物传感系统。该系统通过级联酶联反应放大目标信号,使用含有热变色染料的功能纤维纸作为传感器,将目标信号转化为激光照射下的热信号,设计便携式高通量靶标蛋白监测设备,以满足护理点检测 Tn 的需要(图 4B)。该方法可促进便携式生物传感器中热变色材料的开发,但仅对单一心脏生物标志物进行测定,在早期 AMI 阶段不足以说明问题。为了克服这种局限, Lim 等^[62]研发了一种快速微流控纸基设备,可同时检测多种生物标记物,如糖原磷酸化酶同工酶、肌钙蛋白和肌酸激酶,该设备通过毛细作用将目标检测物分流到单独检测区,在 10 min 内通过比色定量测定检测区靶标浓度。该设备显著缩短了分析时间,并降低了多重心脏生物标记物的检测成本,但该设备产物显色不均,定量检测结果的准确性还需进一步改进。

表 1 总结了基于微流控的 POCT 设备在传染病、肿瘤和慢性病检测和诊断中的应用情况。

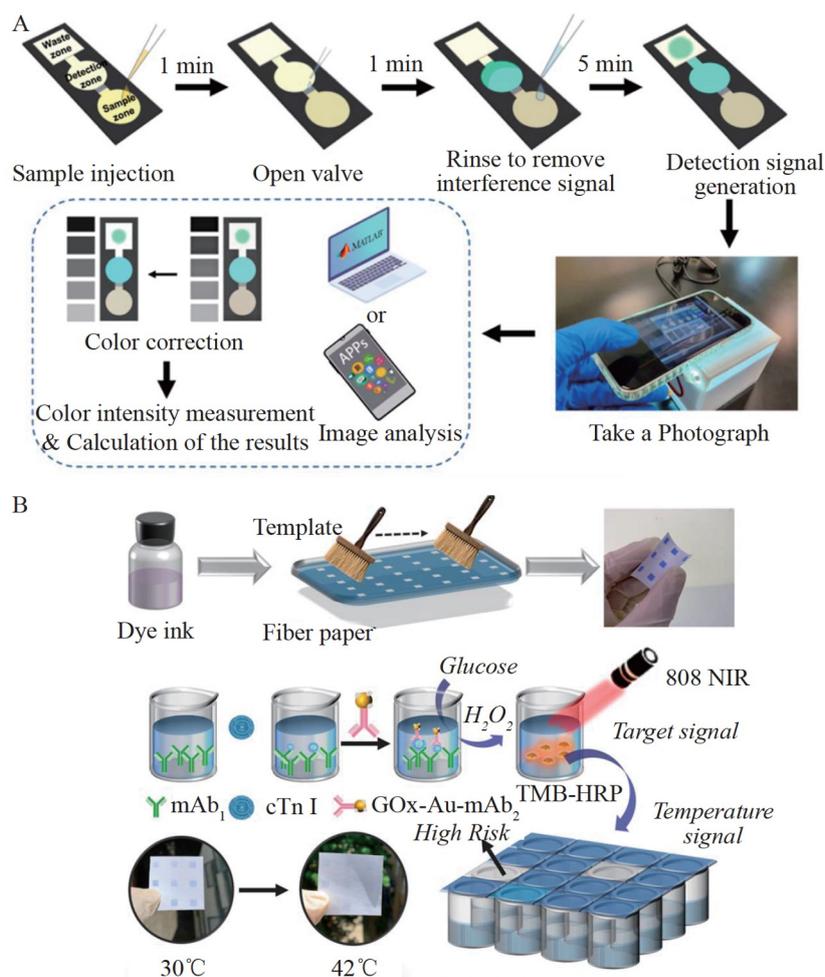


图4 (A) 唾液尿酸比色检测流程^[59]; (B) 急性心肌梗死(AMI)光热生物传感示意图^[61]

Fig.4 (A) Schematic illustration of colorimetric test process for saliva uric acid^[59]; (B) Schematic diagram of photothermal biosensing in acute myocardial infarction (AMI)^[61]

4 总结与展望

随着微流控技术的发展,基于微流控技术的 POCT 设备已被应用于传染病、肿瘤和慢性病检测等领域,并与智能手机或其它检测器件结合,大数据、5G 技术、人工智能和远程医疗的出现使得该技术展现出巨大应用前景。微流控技术具有集成小型化、自动化、高通量、试剂损耗量少、样本需求量和环境友好等优点,微流控器件已成为发展 POCT 的首选。

虽然基于微流控技术的 POCT 设备提供了强大且快速的检测方法,但仍面临许多挑战。分析前需要对样品进行预处理,以降低测量过程中产生的误差。样本来源多样化,如尿液、全血、血浆、汗液、粪便和唾液等的理化性质不同,经过适当的预处理后才可作为检测设备的目标分析物,这对于非医学专业人员是个挑战。传染性疾病 POCT 未来的发展可能更加侧重使用原始临床样本,无需对样本进行预处理。从分析诊断的角度来看,需要进一步拓展和设计以提高诊断设备特异性和灵敏度,减少假阳性和假阴性的结果,此外还需提高设备的稳定性和检测结果的再现性。从检测方法来看,大多数检测方法仍以比色检测为主,因此如何有效消除背景干扰也是需要解决的问题。未来还需建立更多比色结果数据库,编程到智能手机或其它附件中,提高检测结果的准确度和灵敏度。从市场竞争力来看,成熟的微流控产品研发成本高、回报周期长、资金需求大,并且在欠发达地区缺乏相应指导标准和行为准则,而这些对于行业产品的开发都是十分必要的。因此,微流控行业需借鉴其它行业的成功经验,加大对微流控领域的生物学投资,制定相应标准措施和行为指南,使得该项技术能够尽早投入临床使用。

表1 基于微流控的即时检测(POCT)设备在传染病、肿瘤和慢性病检测和诊断中的应用

Table 1 Applications of microfluidic-based point-of-care testing (POCT) devices in detection and diagnosis of infectious diseases, tumors and chronic diseases

疾病种类 Disease classification	靶标 Detection target	检测方法 Testing method	样本 Sample	特点 Feature	文献 Ref.
新型冠状病毒感染 Corona virus disease 2019 (COVID-19)	抗原、抗体 Antigen, antibody	纸基荧光 Paper-based fluorescence		时间短, 特异性高 Short time and high specificity	[21]
	新冠病毒核酸 SARS-CoV-2	逆转录-聚合酶链反应 RT-PCR		金标准 Gold standard	[25]
		环介导等温扩增 LAMP	唾液、血清、咽拭子 Saliva, serum, and pharyngeal swabs	恒温扩增 Isothermal amplification	[30-31]
		簇状规则间隔短回文 重复序列 CRISPR		特异性高 High specificity	[35]
		智能手机微流体系统 Microfluidic system based on smartphone		便携 Portability	[33]
艾滋病 AIDS	人类免疫缺陷病毒 Human immunodeficiency virus	微流体免疫测定盒 Microfluidic immunoassay box	尿液 Urine	方便、快速 Convenience and rapidity	[38]
疟疾 Malaria	螺旋桨结构域基因 13 Kelch 13	微流控电化学 Microfluidic electrochemistry	血清 Serum	定量、特异性高 Quantification and high specificity	[40]
	富组氨酸蛋白 2 Plasmodium falciparum histidine rich protein 2	微通道毛细管流动 Microchannel capillary flow assay (MCFA)		灵敏度高、耗电 High sensitivity and electricity cost	[41]
肺结核 Tuberculosis	结核分枝杆菌 Mycobacterium tuberculosis DNA	光热传感 Photothermal sensing	结核分枝杆菌分离株 Mycobacteria tuberculosis Isolates	成本低 Low cost	[46]
宫颈癌 Cervical cancer	人乳头瘤病毒 Human papilloma virus	荧光、比色 Fluorescence, colorimetry	子宫颈细胞 Cervical cells	定性或半定量检测 Qualitative or semi- quantitative detection	[49-50]
乳腺癌、胃癌 Breast cancer, stomach cancer	特异性外泌体 Specific exosomes	纸基外泌体芯片 Paper-based exosome chip	血清 Serum	灵敏度高、特异性高 High sensitivity and high specificity	[47, 52]
肺癌 Lung cancer	微小核糖核酸 miRNA	气体压力测定 Gas pressure bioassay	血清 Serum	灵敏度高、特异性高 High sensitivity and high specificity	[51]
糖尿病、高血脂 Diabetes and hyperlipidemia	葡萄糖、甘油三酯、 总胆固醇 Glucose, triglycerides and total cholesterol	比色 Colorimetry	血清、透皮间质液 Serum, transdermal interstitial fluid	便携、用户友好 Portable and user-friendly	[56-57]
慢性肾脏疾病 Chronic renal disease (CKD)	肌酐、尿酸 Creatinine, uric acid	比色 Colorimetry	尿液、唾液 Urine, saliva	快速、低成本 Rapidity and low cost	[58-59]
急性心肌梗死 AMI	糖原磷酸化酶同工酶、肌 钙蛋白、肌酸激酶 Glycogen phosphorylase isozyme, troponin	光热传感、比色 Photothermal sensing, colorimetry	血清 Serum	高通量、快速 High throughput and rapidity	[61]

References

- [1] YANG S M, LV S, ZHANG W, CUI Y. *Sensors*, 2022, 22(4): 1620.
- [2] XU D, HUANG X, GUO J, MA X. *Biosens. Bioelectron.*, 2018, 110: 78-88.
- [3] XIAO M, TIAN F, LIU X, ZHOU Q, PAN J, LUO Z, YANG M, YI C. *Adv. Sci.*, 2022, 9(17): e2105904.
- [4] CHEW E J C, TAN P H. *Pathobiology*, 2023, 90(3): 209-218.
- [5] MA J W, LI M. *Transl. Cancer Res.*, 2021, 10(9): 4217-4231.
- [6] MA X, OU K, LIU X, YANG L. *Front. Oncol.*, 2022, 12: 969866.
- [7] ARSHAUSKY-GRAHAM S, SEGAL E. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2022, 179: 247-265.
- [8] REGMI S, POUDEL C, ADHIKARI R, LUO K Q. *Biosensors*, 2022, 12(7): 459.
- [9] WANG X, HONG X Z, LI Y W, LI Y, WANG J, CHEN P, LIU B F. *Mil. Med. Res.*, 2022, 9(1): 11.
- [10] WANG C, LIU M, WANG Z, LI S, DENG Y, HE N. *Nano Today*, 2021, 37: 101092.
- [11] HOCHSTETTER A. *Micromachines*, 2020, 11(5): 468.
- [12] YANG J, ZHANG Y, LIU G, ZHOU S, XIA Y, LI Z, ZHANG C, WANG G. *Microfluid. Nanofluid.*, 2022, 26(2): 10.
- [13] MARTINEZ A W. *Bioanalysis*, 2011, 3(23): 2589-2592.
- [14] TRINH T N D, LEE N Y. *Chemosensors*, 2022, 10(4): 123.
- [15] BHATTACHARJEE G, MAURYA R, ALZHRANI K J, GOHIL N, LAM N L, SINGH V. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2022, 187(1): 241-248.
- [16] SACHDEVA S, DAVIS R W, SAHA A K. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2021, 8: 602659.
- [17] KUMAR S, NEHRA M, KHURANA S, DILBAGHI N, KUMAR V, KAUSHIK A, KIM K H. *Int. J. Nanomed.*, 2021, 16: 383-402.
- [18] CARNEIRO M C C G, RODRIGUES L R, MOREIRA F T C, SALES M G F. *Sensors*, 2022, 22(9): 3221.
- [19] YIN H, TONG Z, SHEN C, XU X, MA H, WU Z, QI Y, MAO H. *Lab Chip*, 2022, 22(14): 2671-2681.
- [20] GANGULI A, MOSTAFA A, BERGER J, AYDIN M Y, SUN F, RAMIREZ S A S, VALERA E, CUNNINGHAM B T, KING W P, BASHIR R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2020, 117(37): 22727-22735.
- [21] LIN Q, WEN D, WU J, LIU L, WU W, FANG X, KONG J. *Anal. Chem.*, 2020, 92(14): 9454-9458.
- [22] LU S, LIN S, ZHANG H, LIANG L, SHEN S. *Micromachines*, 2021, 12(6): 697.
- [23] ZHANG S, SU X, WANG J, CHEN M, LI C, LI T, GE S, XIA N. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2022, 52(2): 413-424.
- [24] GUPTA N, AUGUSTINE S, NARAYAN T, O'RIORDAN A, DAS A, KUMAR D, LUONG J H T, MALHOTRA B D. *Biosensors*, 2021, 11(5): 141.
- [25] JI M, XIA Y, LOO J F C, LI L, HO H P, HE J, GU D. *RSC Adv.*, 2020, 10(56): 34088-34098.
- [26] ZHANG T, DENG R, WANG Y, WU C, ZHANG K, WANG C, GONG N, LEDESMA-AMARO R, TENG X, YANG C, XUE T, ZHANG Y, HU Y, HE Q, LI W, LI J. *Nat. Biomed. Eng.*, 2022, 6(8): 957-967.
- [27] KANG T, LU J, YU T, LONG Y, LIU G. *Biosens. Bioelectron.*, 2022, 206: 114109.
- [28] FAN Z, SUN Y, LIN J M. *Chemosensors*, 2022, 10(7): 247.
- [29] YU Z, LYU W, YU M, WANG Q, QU H, ISMAGILOV R F, HAN X, LAI D, SHEN F. *Biosens. Bioelectron.*, 2020, 155: 112107.
- [30] DAVIDSON J L, WANG J S, MARUTHAMUTHU M K, DEXTRE A, PASCUAL-GARRIGOS A, MOHAN S, PUTIKAM S V S, OSMAN F O I, MCCHESENEY D, SEVILLE J, VERMA M S. *Biosens. Bioelectron.*: X, 2021, 9: 100076.
- [31] NATSUHARA D, SAITO R, AONUMA H, SAKURAI T, OKAMOTO S, NAGAI M, KANUKA H, SHIBATA T. *Lab Chip*, 2021, 21(24): 4779-4790.
- [32] ANAHTAR M N, MCGRATH G E G, RABE B A, TANNER N A, WHITE B A, LENNERZ J K. M, BRANDA J A, CEPKO C L, ROSENBERG E S. *Open Forum Infect. Dis.*, 2021, 8(2): ofaa631.
- [33] FARSHIDFAR N, HAMEDANI S. *Mol. Diagn. Ther.*, 2020, 24(4): 371-373.
- [34] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, RICHARDS M, BOYAVAL P, MOINEAU S, ROMERO D A, HORVATH P. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [35] CHEN Y, ZONG N, YE F, MEI Y, QU J, JIANG X. *Anal. Chem.*, 2022, 94(27): 9603-9609.
- [36] SAFAVIEH M, KAUL V, KHETANI S, SINGH A, DHINGRA K, KANAKASABAPATHY M K, DRAZ M S, MEMIC A, KURITZKES D R, SHAFIEE H. *Nanoscale*, 2017, 9(5): 1852-1861.
- [37] THARAKAN S, FAQAH O, ASGHAR W, ILYAS A. *Biosensors*, 2022, 12(11): 949.
- [38] YANG W, YANG D, GONG S, DONG X, LIU L, YU S, ZHANG X, GE S, WANG D, XIA N, YU D, QIU X. *Biomed. Microdevices*, 2020, 22(2): 39.
- [39] YIN J, LI M, YAN H, ZHOU S, XIA Z. *Front. Med.*, 2022, 16(1): 10-16.

- [40] MALPARTIDA-CARDENAS K, MISCOURIDES N, RODRIGUEZ-MANZANO J, YU L S, MOSER N, BAUM J, GEORGIU P. *Biosens. Bioelectron.*, 2019, 145: 111678.
- [41] GHOSH S, AGGARWAL K, VINITHA T U, NGUYEN T, HAN J, AHN C H. *Microsyst. Nanoeng.*, 2020, 6(1): 5.
- [42] AHN H, BATULE B S, SEOK Y, KIM M G. *Anal. Chem.*, 2018, 90(17): 10211-10216.
- [43] XUE L, JIN N, GUO R, WANG S, QI W, LIU Y, LI Y, LIN J. *ACS Sens.*, 2021, 6(8): 2883-2892.
- [44] ZHANG M, LIU J, SHEN Z, LIU Y, SONG Y, LIANG Y, LI Z, NIE L, FANG Y, ZHAO Y. *BMC Microbiol.*, 2021, 21(1): 197.
- [45] DAS D, PANIGRAHI P K. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 2020, 58(2): 271-289.
- [46] ZHOU W, SUN J, LI X J. *Anal. Chem.*, 2020, 92(21): 14830-14837.
- [47] LIM J, KANG B, SON H Y, MUN B, HUH Y M, RHO H W, KANG T, MOON J, LEE J J, SEO S B, JANG S, SON S U, JUNG J, HAAM S, LIM E K. *Biosens. Bioelectron.*, 2022, 197: 113753.
- [48] CAIRD H, SIMKIN J, SMITH L, VAN NIEKERK D, OGILVIE G. *Curr. Oncol.*, 2022, 29(2): 1117-1122.
- [49] APPIDI T, MUDIGUNDA S V, KODANDAPANI S, RENGAN A K. *Nanoscale Adv.*, 2020, 2(12): 5737-5745.
- [50] ZHAO X, LI X, YANG W, PENG J, HUANG J, MI S. *Analyst*, 2021, 146(16): 5102-5114.
- [51] SHI L, LIU W, LI B, YANG C J, JIN Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2021, 13(13): 15008-15016.
- [52] YU Z X, LIN S J, XIA F F, LIU Y L, ZHANG D, WANG F, WANG Y P, LI Q C, NIU J Q, CAO C X, CUI D X, SHENG N Q, REN J Z, WANG Z G, CHEN D. *Biosens. Bioelectron.*, 2021, 194: 113594.
- [53] KIM H, SA J K, KIM J, CHO H J, OH H J, CHOI D H, KANG S H, JEONG D E, NAM D H, LEE H, LEE H W, CHUNG S. *Adv. Sci.*, 2022, 9(22): 2201785.
- [54] SAYANI S, MUZAMMIL M, SALEH K. *Ther. Adv. Chronic Dis.*, 2020, 11: 2040622319900084.
- [55] LIU K Z, TIAN G, KO A C T, GEISSLER M, BRASSARD D, VERES T. *Biomed. Microdevices*, 2020, 22(2): 29.
- [56] LI J, SUN Y, CHEN C, SHENG T, LIU P, ZHANG G. *Anal. Chim. Acta*, 2019, 1052: 105-112.
- [57] PU Z, ZHANG X, YU H, TU J, CHEN H, LIU Y, SU X, WANG R, ZHANG L, LI D. *Sci. Adv.*, 2021, 7(5): eabd0199.
- [58] ROSSINI E L, MILANI M I, CARRILHO E, PEZZA L, PEZZA H R. *Anal. Chim. Acta*, 2018, 997: 16-23.
- [59] FAN K, ZENG J, YANG C, WANG G, LIAN K, ZHOU X, DENG Y, LIU G. *ACS Sens.*, 2022, 7(7): 2049-2057.
- [60] PAJAK A, JANKOWSKI P, ZDROJEWSKI T. *Kardiol. Pol.*, 2022, 80(1): 5-15.
- [61] YU Z, GONG H, XUE F, ZENG Y, LIU X, TANG D. *Anal. Chem.*, 2022, 94(38): 13233-13242.
- [62] LIM W Y, THEVARAJAH T M, GOH B T, KHOR S M. *Biosens. Bioelectron.*, 2019, 128: 176-185.

Progress in Point-of-Care Testing of Disease Markers Based on Microfluidic Technology

JIANG Wen-Jun, TANG Qu, GU Xi-Juan, JI Hai-Wei*, WU Li*, QIN Yu-Ling*
(School of Public Health, Nantong University, Nantong 226019, China)

Abstract The emergence of monkeypox virus and new coronavirus infections have highlighted the importance of early detection. Microfluidics-based assays have many advantages such as portability, high sensitivity, automation and low cost, allowing for rapid on-site disease detection, which is especially important in less developed areas where expensive analytical equipment is unavailable. Furthermore, the device does not require professional operators or a specific operating environment, making it more easily accessible at home. This review summarized the design and development of microfluidic-based point-of-care testing (POCT) devices, discussed the recent advances in microfluidic-based POCT devices for infectious disease, oncology and chronic disease applications, and provided a summary and outlook on current microfluidics research.

Keywords Point-of-care testing; Microfluidics; Disease diagnosis; Biomarkers; Review

(Received 2022-11-28; accepted 2023-01-28)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31901045, 32171452, 31901056), the Jiangsu Specially-Appointed Professor Program (Nos. 06200048, 06200053) and the Excellent Youth Foundation of Jiangsu Scientific Committee (No. BK20220060).