



# 基于微流控技术的循环肿瘤细胞分析研究进展

张惠敏<sup>1</sup>, 吴玲玲<sup>1</sup>, 林冰倩<sup>2</sup>, 王奕迪<sup>2</sup>, 毕云鹏<sup>2</sup>, 王伟<sup>1</sup>, 宋彦龄<sup>1</sup>, 杨朝勇<sup>1,2\*</sup>

1. 上海交通大学医学院分子医学研究院, 仁济医院, 上海 200217

2. 谱学分析与仪器教育部重点实验室; 福建省化学生物学重点实验室; 厦门大学化学化工学院, 厦门 361005

\*通讯作者, E-mail: cyyang@xmu.edu.cn

收稿日期: 2019-03-25; 接受日期: 2019-05-06; 网络版发表日期: 2019-06-18

国家自然科学基金(编号: 21735004, 21521004, 21435004)资助项目

**摘要** 癌症的精准诊疗是提高癌症患者生存率和生存质量的重要手段. 液体活检通过采用非侵入采样方式, 获取肿瘤病人全面、准确、实时的基因组、转录组及蛋白组等生物学信息, 是一种新兴的癌症诊断技术, 对癌症精确诊断、个体化治疗、预后评估等方面具有重要意义. 循环肿瘤细胞(CTC)是一种从实体瘤组织脱落进入外周血的肿瘤细胞, 因能提供完整的细胞生物学信息, 是最具应用前景的液体活检靶标. 然而, CTC的数量极其稀少、异质性强、所处外周血环境复杂等特点, 给CTC的富集和分析带来了巨大的技术挑战. 本文将总结本课题组近年来发展的基于CTC液体活检策略, 着重讨论在CTC识别、富集与单细胞分析等方面的研究进展.

**关键词** 液体活检, 循环肿瘤细胞, 核酸适体, 微流控芯片, 单细胞分析

## 1 引言

癌症严重威胁人类的生存健康, 是导致人类死亡的第二大病因. 据统计, 2015年全球约有1750万新发的癌症患者, 870万例死亡与癌症相关<sup>[1]</sup>. 癌症的早期筛查、精确诊断和预后监测是提高癌症患者生活质量及生存率的重要手段. 作为肿瘤诊断的金标准, 组织活检存在取样难、侵入性大、代表性不全、并发症风险高等不足. 近年来, 针对体液(血液、尿液、胸腔积液等)中的生物标志物包括循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)、循环肿瘤DNA (ctDNA)、外泌体(exosome)等的检测技术, 即液体活检, 被认为是癌症

体外检测的重要发展方向<sup>[2]</sup>. 与经典组织活检相比, 液体活检技术具有取样方便、侵入性小、信息全面、无放射性污染、成本低等优势, 是目前最具发展潜力的肿瘤无创诊断和实时疗效监测手段之一, 已成为当前癌症诊断领域的前沿热点<sup>[3]</sup>. CTC是从实体瘤组织脱落进入外周血的、完整的肿瘤细胞, 与肿瘤转移密切相关<sup>[4]</sup>; ctDNA是由肿瘤细胞凋亡释放在外周血中的游离DNA片段, 并携带肿瘤相关的遗传学突变, 能够反应肿瘤组织的突变图谱, 是早期筛查、预后评估的重要监测指标<sup>[5]</sup>; 外泌体是存在于体内的细胞外囊泡, 包含有肿瘤细胞相关的核酸、蛋白质等, 实现细胞间的信息递送, 近年来被发现外泌体是肿瘤检测的重要

引用格式: Zhang H, Wu L, Lin B, Wang Y, Bi Y, Wang W, Song Y, Yang C. Recent progress on microfluidic technology-based circulating tumor cell analysis. *Sci Sin Chim*, 2019, 49: 1220–1236, doi: 10.1360/SSC-2019-0033

靶标之一<sup>[6]</sup>。相比于碎片化的ctDNA片段和纳米尺度的外泌体, CTC由于其完整的细胞性质, 不仅能够提供肿瘤病灶的基因组变异、mRNA表达异常、蛋白质组变化等物质信息改变, 还能从细胞形态、迁徙能力、药物刺激响应研究等方面对肿瘤的转移、耐药机制进行研究, 能全面、系统地反映肿瘤病灶的分子病理分型, 因此尤为受到关注。大量研究证明, CTC的检测分析在肿瘤诊断、病程监测、疗效评估、药物开发、个体化治疗等方面具有重大意义。

CTC早在1869年就被Ashworth等<sup>[7]</sup>发现报道, 但直到20世纪90年代中期, CTC相关研究报道才逐渐增多, 主要原因在于CTC的检测分析存在较多技术挑战。首先, CTC数量极少, 通常1 mL外周血中仅含有1~100个CTC, 而血细胞的数量数以亿计<sup>[8]</sup>。在如此庞大复杂的背景细胞下, 很难实现CTC的高灵敏检测。因此, 发展高效的富集方法是CTC检测分析的关键步骤和重要前提。目前主要有两类富集方法<sup>[9]</sup>, 第一类是基于CTC和血细胞尺寸、密度、介电性等物理特性差异, 通过微过滤、离心、介电泳等方法实现CTC的富集。但这类方法存在特异性差、纯度低等不足。另一类是基于CTC和血细胞表面标志物差异, 利用识别分子修饰的磁珠或微纳芯片亲和富集CTC。这类方法具有剪异性强、剪度高等优点, 是目前最常用的CTC富集策略。但CTC存在不同的亚群, 无通用标志物; 且有些CTC会发生上皮-间质转化(EMT), 其标志物表达水平处于动态变化中<sup>[10,11]</sup>。目前通常采用的上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)抗体亲和富集CTC的方法, 会“漏检”EpCAM低/不表达的CTC, 也难以实现CTC的分型捕获。因此, 发展高效、特异的新型识别分子, 实现CTC富集和分型分析具有重要的意义。

肿瘤组织内和肿瘤组织间都存在异质性的肿瘤细胞, 来源于实体瘤CTC同样存在较强的异质性<sup>[12,13]</sup>。研究表明, 只有少数CTC具有转移能力及肿瘤耐药性突变等。传统以细胞群体为对象的分析方法, 容易掩盖细胞-细胞之间微小的差异, 难以实现CTC肿瘤异质性的研究。因此, 单细胞水平的CTC组学研究具有重要的意义<sup>[14]</sup>。为实现CTC的单细胞分析, 需要解决两个技术难题: (1) 对富集捕获的CTC实现无损释放, 方便下游培养及表征分析, 获得CTC的真实生物学信息<sup>[15]</sup>; (2) 建立高通量单细胞分析平台, 精准地挖掘CTC与正常

细胞、CTC之间的异质性, 检测CTC的组学变化, 进而推动肿瘤转移机制研究及个体化治疗的发展<sup>[16]</sup>。

微流控技术是在微米级通道内进行流体控制以实现微量的生物、化学相关实验过程的新兴技术。基于微型化、自动化、集成度高、分析速度快等优点, 微流控技术在CTC分离富集和单细胞分析中具有显著的优势。通过对微通道、腔体的结构设计, 能够针对CTC的物理、生化性质实现剪异性分离与富集。另一方面, 通过微孔、卡槽、微液滴等单细胞分散手段的组合, 实现对捕获的CTC进行高通量分散操控, 并提供纳升到皮升的反应空间, 达到对CTC的高效精准单细胞分析, 是极具前景的分离分析技术<sup>[17]</sup>。

针对基于CTC液体活检的发展和临床应用需求, 本课题组从发展新型高亲和力的识别分子、建立高效富集CTC的微流控平台、构筑高通量的单细胞分析方法三个层面解决目前CTC测不准、数不全的难题和单细胞检测分析的需求(图1)。本工作将总结本课题组在核酸适体筛选新策略、CTC高效富集方法及高通量单细胞分析方法的研究进展。

## 2 循环肿瘤细胞识别策略

利用识别分子与CTC标志物相互作用的CTC亲和富集方法, 由于其高特异性的识别方式, 使得CTC的富集纯度得到质的提高。常见的CTC细胞表面抗原识别分子包括抗体(antibody)、多肽(peptide)、核酸适体(aptamer)等。这些识别分子, 以CTC细胞表面的剪异性标志物, 如EpCAM、MUC-1、PSMA、HER2、叶酸受体等为靶标实现高剪异性、高亲和性的识别富集。

其中, 抗体由于其特异、专一、亲和力高、剪异性广等优势, 是CTC亲和富集法中最常用的识别分子<sup>[18,19]</sup>。但由于其抗原-抗体的相互作用方式, 使得CTC释放时, 需要采用蛋白酶水解消化细胞膜上抗原的方式以破坏细胞与抗体间的作用, 进而造成细胞损伤, 不利于下游分析。与抗体相比, 多肽分子量小、生物剪定性好且易于大量合成; 可通过表面展示技术(噬菌体展示、核糖体展示等)实现特定受体的识别肽筛选。Wang等<sup>[20]</sup>通过筛选获得了可以剪异性识别EpCAM的多肽, 结合磁性纳米颗粒可实现乳腺癌CTC的富集。但由于其亲和力和多样性的局限性, 使得其临床应用受到了限制。而核酸适体, 作为一种由体外筛选得

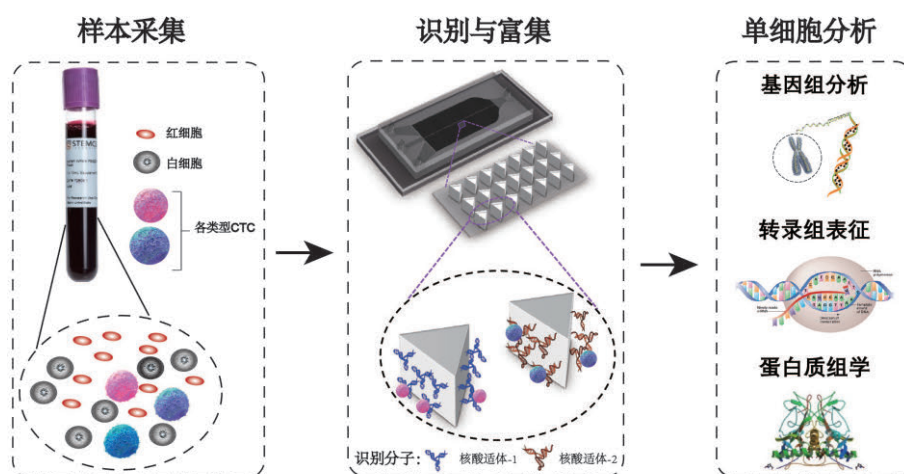


图 1 循环肿瘤细胞分析过程示意图(网络版彩图)

Figure 1 Scheme of CTC recognition, enrichment and single cell analysis (color online).

到的核酸序列, 可以通过核酸酶、互补链等方式破坏其三级构型, 从而改变适体的亲和力, 实现CTC的无损释放<sup>[21]</sup>. 因此, 核酸适体是CTC富集和释放的理想识别分子.

核酸适体是通过体外指数富集配体进化技术(systematic evolution of ligands by EXponential enrichment, SELEX)筛选得到的高亲和性、高特异性与靶标分子结合的单链寡核苷酸<sup>[22]</sup>. 基于核酸适体对靶标识别的特点, 它又被成为“化学抗体”, 在CTC研究领域具有以下优点<sup>[23]</sup>. (1) 靶标种类广: 以肿瘤细胞膜蛋白或肿瘤细胞为靶标, 已经筛选出众多识别CTC的核酸适体, 可用于CTC多表型研究; (2) 易合成修饰、批次间差异小: 有利于可控、高效地将适体修饰于捕获界面; (3) 尺寸小: 能高效识别细胞膜表面靶标蛋白, 有利于CTC富集及膜蛋白表型分析等; (4) 筛选可操作性好: 通过增加筛选条件, 获得全血等复杂体系中高稳定、高亲和性的核酸适体; (5) 空间结构折叠实现靶标识别, 可通过核酸酶、互补序列等实现CTC无损释放. 鉴于以上优点, 核酸适体被认为是CTC富集捕获的理想识别探针.

## 2.1 核酸适体筛选技术

核酸适体通常是通过SELEX从随机单链核酸文库中筛选得到, 其筛选过程如下: (1) 文库构建, 人工合成库容量约为 $10^{13-15}$ 的单链寡核苷酸文库, 文库设置为两端引物序列固定, 中间为20~50个随机碱基, 库容

量理论上为 $4^n$ , 其中 $n$ 为随机碱基数; (2) 筛选富集, 将文库与靶标混合孵育, 通过孵育时间、洗涤条件等设置筛选压力, 淘汰不结合及结合力差的分子, 富集高亲和力的核酸分子; (3) 扩增, 以洗脱下来的核酸序列为模板, 进行PCR扩增, 生成次级文库, 以备下一轮筛选; (4) 甄别与表征, 对最终富集的文库进行扩增测序, 甄别出结合力好、特异性佳的序列, 并表征其解离常数. 以这样的筛选方式, 通常需要10~20轮的富集才能获得有潜力的候选核酸适体序列, 操作繁琐、耗时、昂贵, 且成功率低. 建立快速、有效、高通量、通用性好的新型筛选方法具有重要的意义. 基于此, 本课题组发展了基于高通量液滴技术的核酸适体筛选及表征新方法.

### 2.1.1 琼脂糖液滴筛选技术

传统的核酸适体筛选过程中, 对富集文库进行PCR扩增, 是生成次级文库的手段. 然而, 由于PCR扩增过程中的序列偏好性, 特别是当靶标分子在文库中所占比例极低时, 扩增偏差可能会掩盖掉亲和力高的靶标序列, 造成筛选失败<sup>[24]</sup>. 为解决这一问题, 本课题组<sup>[25,26]</sup>发展了基于微流控液滴技术的单分子扩增方法, 将核酸序列进行物理分割, 创造平行、无竞争的反应条件, 实现液滴中单分子的扩增, 消除整体扩增的偏好性. 在此基础上, 结合琼脂糖液滴技术, 我们进一步发展了一种高效甄别最优候选序列的新方法(图2(a))<sup>[27]</sup>. 该方法利用微流控液滴技术把富集文库序列以

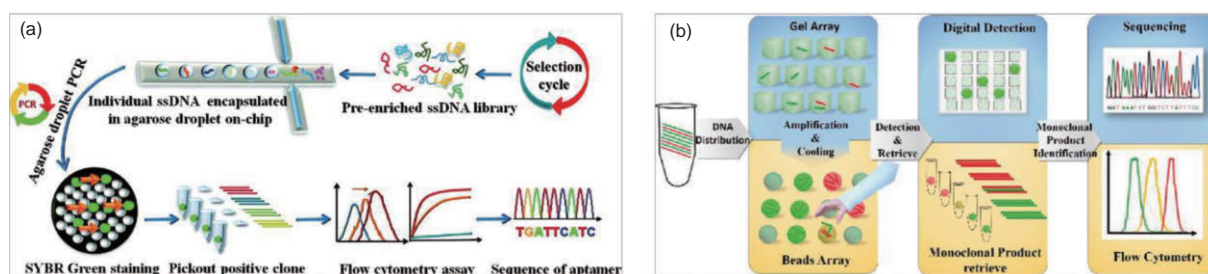


图2 (a) 基于琼脂糖液滴技术的筛选方法<sup>[27]</sup>; (b) 基于按压式琼脂糖液滴技术的筛选方法<sup>[28]</sup> (网络版彩图)

Figure 2 (a) Highly parallel single molecule amplification approach aptamer selection [27]; (b) scheme of single molecular SELEX by microwell array method [28] (color online).

单分子形式从空间上分隔到大量皮升级琼脂糖液滴里。以这些琼脂糖液滴作为独立的反应腔体进行单分子扩增, 得到每个文库分子的单克隆产物。利用低熔点琼脂糖液滴的“液-固”转换, 把单克隆序列固定在琼脂糖微球中, 方便后续清洗、存储与挑选等操作。通过对每个单克隆琼脂糖微球的序列进行亲和力与选择性表征, 即可获得目标结合序列。该方法突破了传统SELEX中所需的测序、合成、甄选等繁琐、昂贵、耗时的步骤, 通过直接对单克隆液滴进行结合能力和选择性的快速评价, 从而对富集后的文库进行高通量单分子甄选, 大大地提高了SELEX的效率, 降低了筛选成本。

为了克服液滴生成过程中对仪器的依赖和简化液滴生成操作, 我们开发了一种按压式阵列微流控芯片, 只需简单操作即可生成高通量琼脂糖液滴(图2(b))<sup>[28]</sup>。将加热的液态琼脂糖按压入聚二甲氧基硅氧烷(PDMS)阵列芯片中, 利用加热的硅油, 可在20 s内生成成千上万个粒径均一的液滴。该芯片的设计克服了液滴生成芯片对仪器的依赖性及传统方法生成的液滴因随液相飘动难以长时间监测的不足; 利用琼脂糖固-液转换的特点, 达到了单一微球的回收与进一步分析的目的。通过对筛选文库的扩增, 在无需测序的前提下, 成功地从核酸混合物中, 分离出了具有与靶标蛋白特异性结合的克隆产物, 简化了筛选过程、降低了筛选成本。

### 2.1.2 单克隆表面展示技术

琼脂糖液滴微流控技术大大提高了核酸适体的筛选效率。但该方法仍需对大量的单克隆微球进行逐一表征, 限制了筛选效率。为了进一步提高核酸适体筛选效率, 本课题组<sup>[29]</sup>发展了一种基于单克隆表面展示

技术的核酸适体筛选新方法(图3)。通过将扩增引物偶联在微球上, 利用油包水液滴产生单分子反应体系, 即保证每个液滴中只有一个文库分子序列以及扩增引物微球, 经单分子扩增可以将单分子序列复制并扩增到微球表面, 从而获得单克隆微球文库。每个文库微球展示一种序列, 但其拷贝数可以达到几百到几千万。通过单克隆微球库与靶标结合, 可视化地表征表面展示序列与靶标结合程度, 直接挑选获得能和靶标分子结合的单克隆微球, 获得高质量核酸适体候选序列。该方法通过单分子液滴扩增避免了传统扩增中的偏好性, 保证了文库的多样性; “一球一序列”的表面展示技术, 实现筛选过程中分子识别的可视化监控; 单个微球展示了单条序列的结合能力, 保证了个体信息不被整体信息掩盖, 提高了筛选成功率。相比于传统SELEX技术, 该方法避免了对富集寡核苷酸文库进行繁琐的克隆测序及结合力表征步骤, 在无需测序合成的条件下就可以得到序列的亲和能力, 进而择优测序表征, 因此更加经济、高效。基于以上优点, 单克隆表面展示技术将会给核酸适体人工体外筛选、功能核酸进化的研究带来新的机遇。

### 2.2 核酸适体亲和力表征

在核酸适体筛选进程中, 必须对从文库富集得到的候选序列进行结合力表征。通常通过测定候选序列与靶标的解离常数 $K_d$ 以评估其结合强度。 $K_d$ 值是通过考察一系列浓度的核酸适体与靶标结合情况, 拟合趋势线, 计算获得。常用的测定方法包括电泳迁移率变动分析法(EMSA)<sup>[30]</sup>、流式细胞术(FCM)<sup>[31]</sup>、荧光偏振分析法<sup>[32]</sup>、表面等离子共振法(SPR)<sup>[33]</sup>及等温滴定量热法(ITC)<sup>[34]</sup>等。这些方法均需要逐个浓度依次测量、操作相对繁琐、应用范围有一定的局限性。

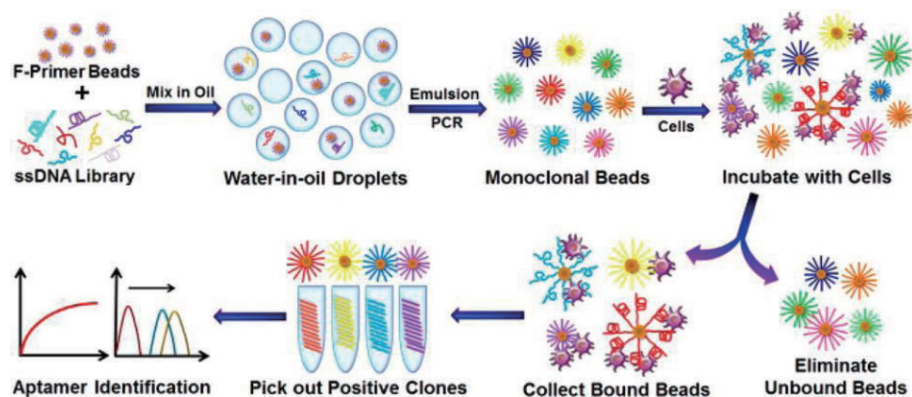


图 3 基于单克隆表面展示技术的核酸适体筛选原理图<sup>[29]</sup> (网络版彩图)

Figure 3 Monoclonal surface display SELEX [29] (color online).

本课题组<sup>[35]</sup>发展了一种便携式的Afi-chip装置, 可用于核酸适体解离常数的快速测定. Afi-chip是基于滑动芯片Slip-chip<sup>[36]</sup>发展而来的, 具有样品用量少、反应时间短、成本低、便携性好、通用性高等优势. 其原理如图4所示, 将SELEX技术富集得到候选序列进行生物素化标记, 并与靶标混合孵育、洗涤后, 与链霉菌亲和素化的Catalase形成“靶标-候选核酸适体-Catalase”三明治结构. 在Afi-chip中, 通过滑动连通垂直通道和隔离水平通道, 促使Catalase与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>反应, 产生O<sub>2</sub>推动染料运动, 实现分析结果的距离输出. 如图4所示, Afi-chip能够同时进行6组样品的分析, 每组样本含有3个重复腔体, 在5 min内就可完成一个解离常数的测定. Afi-chip可用于监测核酸适体的筛选进程及表征文库

的结合能力, 靶标范围可涵盖小分子、蛋白质及细胞, 具有良好的通用性.

近年来, 基于传统SELEX方法及我们发展的核酸适体筛选新方法, 本课题组以肿瘤细胞相关蛋白和肿瘤细胞系为筛选靶标, 成功筛选出多种高亲和力的核酸适体序列, 包括针对前梯度蛋白同系物Anterior Gradient Homolog 2/AGR2<sup>[37]</sup>、表皮生长因子受体EGFR<sup>[38]</sup>、酪氨酸磷酸酶Shp2<sup>[39]</sup>、上皮细胞黏附因子EpCAM<sup>[40]</sup>、乳腺癌扩增性抗原1 (AIB1)<sup>[41]</sup>等蛋白及乳腺癌细胞系MDA-MB-231<sup>[31]</sup>、转移性结肠癌组织来源SW 620<sup>[42]</sup>、胶质母细胞瘤多形性细胞系K308<sup>[43]</sup>、T98G<sup>[44]</sup>等细胞的核酸适体. 这些核酸适体为不同肿瘤CTC的研究提供了有力的识别工具. 尤其

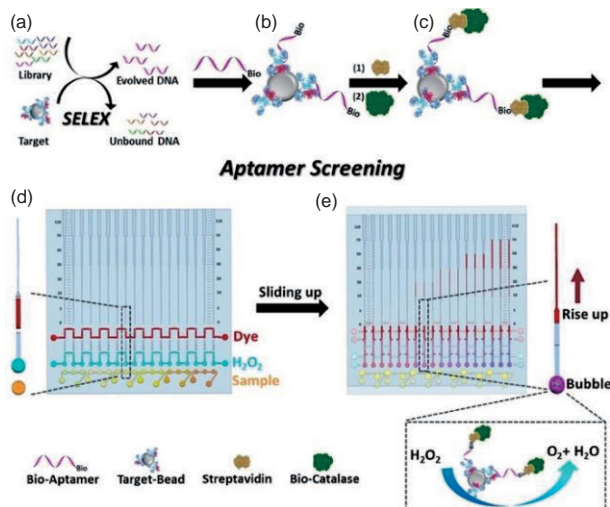


图 4 基于Afi-chip的核酸适体结合能力表征法<sup>[35]</sup> (网络版彩图)

Figure 4 Evaluation of aptamer affinity by Afi-Chip [35] (color online).

是以EpCAM为靶标的SYL3C核酸适体,已被广泛应用于CTC的检测<sup>[45,46]</sup>、富集<sup>[47~52]</sup>、分型分析<sup>[21]</sup>等。

### 3 循环肿瘤细胞富集策略

由于CTC数量极其稀少及所处的外周血环境极其复杂<sup>[53]</sup>,检测CTC首先要对其进行有效的分离和富集。过去的10年中,科研工作者针对CTC和血细胞的物理属性差异或表面标志物表达差异,发展了众多CTC分离富集方法。本部分将结合本课题组的工作,对各类分离方法进行简要的介绍。

#### 3.1 传统分离方法

免疫磁分离法是最传统和常用的CTC分离技术。其中,最具代表的当属CellSearch<sup>®</sup>系统,它采用抗EpCAM抗体包被的免疫磁珠捕获和分选CTC,再利用染料标记的抗EpCAM抗体、抗角蛋白CK (CTC标志物)抗体和抗白细胞共同抗原CD45 (白细胞标志)抗体,及细胞核染色DAPI来区分CTC与白细胞。CellSearch<sup>®</sup>系统是第一个也是唯一获得美国食品和药物管理局(U. S. Food and Drug Administration, FDA)批准进入临床使用的CTC检测仪器。基于CellSearch<sup>®</sup>系统的CTC检测可用于转移性前列腺癌、乳腺癌和结肠癌的预后评估和疗效监测。然而,该技术并不能捕获EpCAM低/不表达的CTC,而这类细胞被认为是发生EMT的具有侵袭性的CTC亚群<sup>[9]</sup>。另外,它还存在富集效率和纯度低、破坏细胞活性等不足<sup>[54]</sup>。因此,仍需发展高效、高纯度、低损伤的CTC富集技术。

#### 3.2 微流控分离方法

微流控技术是近年来提高CTC富集效率和纯度的重要技术之一。相比于传统的免疫磁分离,微流控芯片技术具有自动化、微型化、高通量、可集成下游分析等优点,在CTC检测分析中显示了巨大优势。近年来,研究人员已经发展了基于物理属性分离、亲和分离及两者联用的微流控平台。

##### 3.2.1 基于物理属性的分离方法

基于CTC与血细胞在尺寸、介电性、密度等物理属性上存在差异,发展了多种免标记的CTC分离法。具有代表性的方法有:(1)微过滤法<sup>[55,56]</sup>。CTC直径约在

10~25  $\mu\text{m}$ 之间,一般大于血细胞,利用聚对二甲苯二维滤膜装置<sup>[57]</sup>、三维滤膜装置<sup>[58]</sup>等拦截大尺寸的CTC而允许血细胞通过,可实现CTC高通量富集;(2)流体动力学法。不同尺寸的细胞随流体在微通道内层流运动时,因受力差异聚集在不同流体层而被分离。例如,确定性侧向位移微阵列<sup>[59,60]</sup>、螺旋通道芯片<sup>[61]</sup>等都能实现CTC高通量分离。(3)双向电泳法。双向电泳法可以定向操控可极化的颗粒,利用CTC与血细胞之间的介电性质差异,可实现CTC富集。例如,利用弯曲电极<sup>[62]</sup>、光学透明电极<sup>[60]</sup>等实现外周血中细胞的极化操控,实现CTC的分离。但由于电极芯片制作加工的繁琐性和捕获操纵的复杂性在一定程度上限制了双向电泳法的发展。

基于物理属性的CTC分离方法的优势在于免标记细胞、高通量;不依赖于细胞标志物的表达水平,可避免在亲和分离法中由于CTC抗原表达量差异造成的漏检。但这类方法易损失与白细胞物理性质有重叠的CTC,特异性差、富集效率和纯度低。尽管如此,它仍是CTC分离领域的一个重要组成部分,涵盖了多学科的理论精髓;特别是当它与亲和识别原理相结合时,能在很大程度上弥补自身的不足,未来依然有很好的发展前景。

##### 3.2.2 亲和分离方法

亲和分离方法是利用CTC与血细胞的表面标志物表达差异,通过在芯片基底表面修饰识别分子(如抗体、多肽、核酸适体等),利用识别分子与细胞靶标分子间高特异性的亲和作用,实现特异、高效的CTC分离。目前,基于微流控技术的亲和富集手段包括利用微柱阵列<sup>[18]</sup>、鱼骨结构<sup>[63]</sup>、纳米基底<sup>[64]</sup>等。这些微纳结构的设计虽然增加了CTC与识别分子的碰撞概率,提高了CTC的捕获效率,但是同时也增加了背景细胞的碰撞概率,导致CTC纯度低。为解决这一难题,本课题组发展了确定性侧向位移原理的微柱阵列芯片,选择性地增加CTC与微柱表面识别分子的碰撞概率,实现了CTC的高效率、高纯度富集。

(1)结合物理分离和抗体识别的SDI-Chip。确定性侧向位移原理(deterministic lateral displacement, DLD)由Huang等<sup>[65]</sup>在2004年首次报道,其原理是在芯片微通道内构建微柱阵列,每列微柱均按一侧方向发生偏移,形成周期性重复。在微柱阵列中会形成N条层流性

的流束, 当层流中的颗粒质点中心在流束内时, 颗粒将一直保留在流束内流动; 当颗粒的尺寸大于临界值, 颗粒在流经微柱时会与微柱发生碰撞, 并且其质点中心会因碰撞而移入相邻的上方流束, 则此时颗粒发生侧向位移, 往上平移了一个流束. 从宏观来看, 大颗粒在微通道内将不断与微柱碰撞并沿着微柱阵列偏移方向侧向移动, 而小颗粒则一直保持水平前进的方向, 最终实现不同尺寸颗粒的分离.

利用CTC的尺寸大于血细胞的物理特性, 及细胞表面标志物的表达差异, 我们<sup>[66]</sup>设计了DLD式微柱阵列, 并在微柱表面修饰抗EpCAM抗体, 进而构建了CTC高效率、高纯度富集的微流控芯片(SDI-Chip, 图5). 根据DLD原理, 大尺寸的CTC会在微通道内不断与微柱碰撞并发生侧向位移, 而小尺寸的血细胞则沿着层流水平前进不与柱子碰撞, 选择性增强了CTC与微柱的碰撞概率. 实验证明, 在全血环境下, CTC的富集效率为 $92.2\% \pm 6.4\%$ , 纯度高达 $82.3\% \pm 3.8\%$ .

在DLD原理的前提下, 我们利用多物理场仿真模

拟(COMSOL Multiphysics<sup>®</sup>)技术对微柱形状、旋转角度等参数进行优化, 获得了具有特定倾斜角的三棱柱结构. 倾斜的三棱柱周围可产生梯度流体剪切力, 三角形顶端最大, 沿着棱边逐渐降低. 只有当抗体的“捕获”力大于剪切力的时候, 才能实现细胞的捕获. 因此, 细胞的捕获位置可用来评估抗原的表达量, 实现CTC标志物表达水平的表征. 从三角形顶端沿着边缘, 其抗原表达量依次降低. 借助该特点, SDI-Chip在无需外加其他行为的情况下, 即可实现高-中-低不同EpCAM表达水平的CTC全富集和表达量分析. 大量临床样本实验结果表明, SDI-Chip能够有效区分健康人群和癌症患者, 及不同分期的结肠癌病人. 并且, SDI-Chip使用PDMS材料, 替代了先前研究者们使用的玻璃、硅材料等, 从材料成本到加工耗费上有了极大的缩减, 更适于临床使用推广.

我们<sup>[67]</sup>还将该芯片拓展到孕妇外周血中循环胎儿细胞的捕获应用, 构建了具有“增频”碰撞的微流控芯片(FETAL-Chip, 图6).

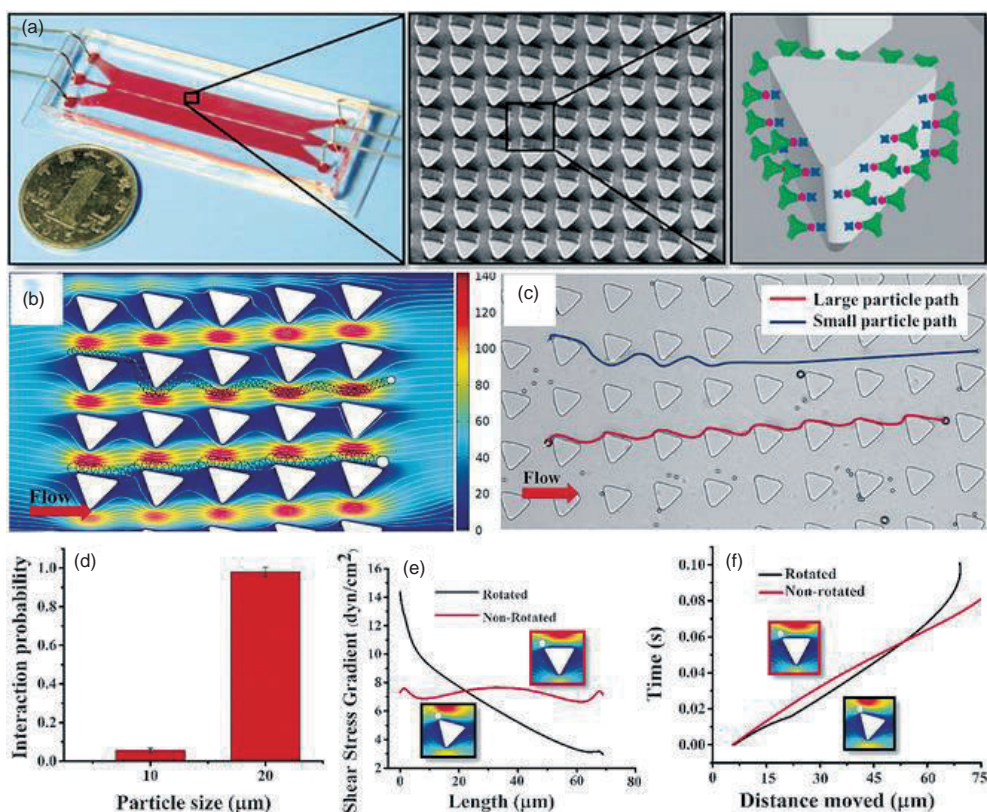


图5 SDI-Chip用于循环肿瘤细胞富集的原理及理论模拟<sup>[66]</sup> (网络版彩图)

Figure 5 Scheme of SDI-Chip for CTC enrichment [66] (color online).

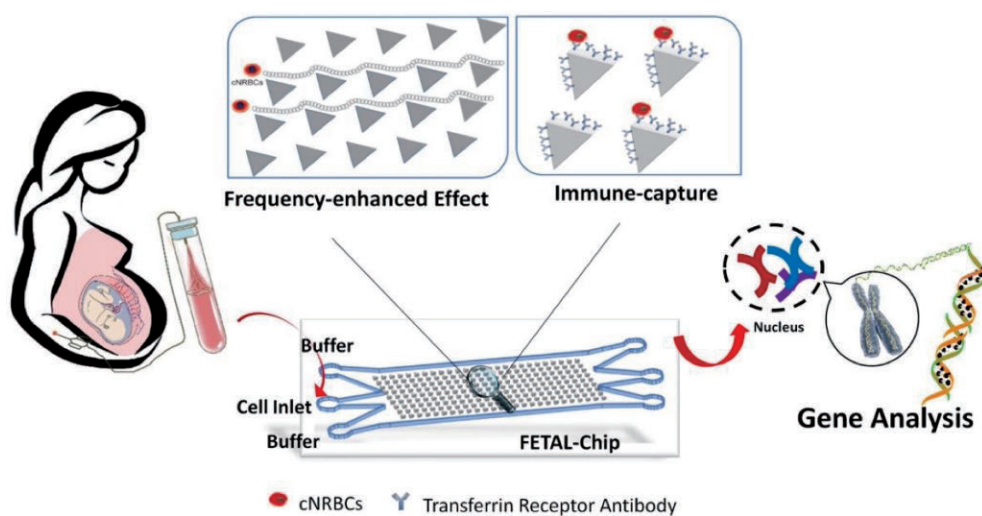


图6 基于FETAL-Chip的孕妇外周血中循环胎儿细胞富集策略<sup>[67]</sup>(网络版彩图)  
Figure 6 Scheme of circulating fetal cell enrichment by FETAL-Chip [67] (color online).

循环胎儿细胞(circulating fetal cell, CFC)是母体外周血中存在的胎儿细胞,来源于滋养层细胞的脱落或是母血交换过程中进入母体循环的胎儿细胞。相比于孕妇外周血中信息不完整的游离DNA,循环胎儿细胞携带完整的胎儿遗传学信息,被认为是最有潜力的非侵入性产前诊断靶标。同是外周血中存在的稀有细胞,CFC与CTC存在类似的挑战。通常认为1 mL孕妇外周血中含有1~10个CFC,而血细胞背景数以亿计<sup>[68]</sup>。CFC的分离富集除了传统的流式细胞术<sup>[69]</sup>、磁分选术<sup>[70]</sup>外,微流控技术也是重要的发展方向。目前,主要的技术手段是基于免疫识别的CFC亲和富集方式。例如, Tseng课题组<sup>[71]</sup>利用PLGA纳米芯片结合EpCAM抗体,实现了从10 mL外周血分离出胎儿滋养层细胞; Zhao课题组<sup>[72,73]</sup>制备壳聚糖纳米基底HA/CTS NPs Chips以及聚吡咯ITO芯片,结合免疫抗体捕获实现了胎儿有核红细胞的分离等。为了实现CFC的高效富集,我们在SDI-Chip的基础上,对微柱阵列的临界尺寸进行了优化,使阵列产生的微流体能够规律性地引导CFC的运动轨迹,增加CFC与微柱的碰撞概率,实现“增频”效应。同时,使用胎儿细胞特异的识别分子实现胎儿细胞高效率、高纯度富集。利用FELTA-Chip的分离富集作用,我们在孕7周的孕妇外周血中,仅2 mL外周血就能实现>5个CFC的捕获;并结合荧光定量PCR技术,实现了胎儿基因的特异性检测。CFC高效率、高纯度的富集使得以CFC为靶标的下一代无创产

前检测成为可能。

(2) 基于多价核酸适体识别的AP-Octopus-Chip。CTC的无损释放是下游分析的重要前提<sup>[15]</sup>。核酸适体作为一种新型识别分子,通过形成三维空间构象识别靶标物,因此可利用核酸酶、互补序列等手段破坏或改变适体的空间构象,实现CTC的无损释放。目前,基于核酸适体富集和无损释放CTC的工作已有较多报道<sup>[74,75]</sup>。但核酸适体存在复杂基质中稳定性和亲和力差等不足,一定程度上制约了基于适体的亲和捕获法的广泛应用。

针对上述问题,本课题组通过将核酸适体修饰于金纳米粒子表面构建多价核酸适体探针。一方面,通过纳米材料修饰提高适体在全血中的稳定性;另一方面,通过该探针的多价识别提高与CTC的亲和力。基于多价核酸适体探针发展了AP-Octopus-Chip,模仿章鱼的结构实现CTC的高效率富集(图7)<sup>[48]</sup>。该微流控芯片由上万个微柱构成DLD阵列,即可在微米尺度上选择性增加CTC与微柱的碰撞频率。在纳米尺度上,每个微柱布满了修饰有上百条核酸适体的金纳米颗粒。这些核酸适体像章鱼的触手一样,可以通过多价协同效应实现肿瘤细胞的高亲和力、高效率捕获。实验证明,多价核酸适体的结合力比单价核酸适体提高了100倍,捕获效率提高了3倍,解决了单价核酸适体在实际应用中亲和力不足的问题。此外,被捕获的细胞可以通过加入富含巯基且生物相容性好的谷胱甘肽分



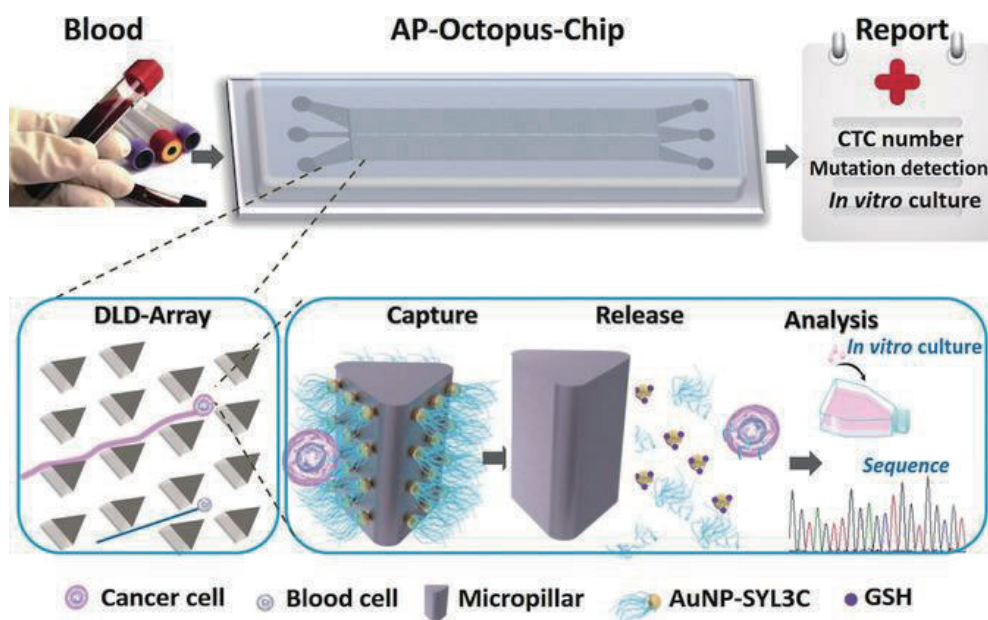


图 7 AP-Octopus-Chip的工作原理图<sup>[48]</sup> (网络版彩图)

Figure 7 Working principle of the AP-Octopus-Chip [48] (color online).

子进行配体交换反应, 破坏核酸适体和纳米金连接的金硫键, 从而保证了CTC无损释放. 释放后的细胞活性可以达到95.8%, 可实现下游的细胞培养及基因突变检测. 41例正常、前列腺癌、结肠癌临床样本的盲测结果表明, 仅需1 mL外周血就可以区分肿瘤患者和健康人样本. 临床检出率达到100% (38/38), 其中包括T1N0M0分期样本, 利用配体交换效应, CTC的释放效率可达到75%以上. AP-Octopus-Chip利用仿生章鱼结构, 提高了核酸适体在全血环境中的稳定性和结合力, 实现了CTC的高效富集和无损释放, 为CTC的下游分析提供了有力的工具.

#### 4 循环肿瘤细胞单细胞分析

肿瘤在发生后, 随着时间的演化, 可能发生从原发性肿瘤细胞到突变型肿瘤细胞的变化, 及从原发灶到转移灶的空间转移. CTC是肿瘤细胞突破基底膜进入血液的小细胞团或单细胞, 必然也存在着跟肿瘤一样的异质性. 已经有不少研究证明, CTC从表型、基因型及转录型分析上, 均存在异质性. 例如, de Luca等<sup>[76]</sup>对转移性乳腺癌的CTC进行高通量测序分析其基因突变, 其结果表明同一个病人的5个CTC中均存在不同的基因突变, 且病人-病人之间也存在较大的差异

性, 揭示了CTC单细胞分析的重要性.

传统的分析方法通过群体细胞的平均值来分析细胞状态, 掩盖了个体细胞间的差异, 导致大量细胞个体信息的丢失, 也使得极少部分拥有特殊功能或致病能力的细胞被忽视<sup>[77]</sup>. 这些平均化的研究已经无法满足CTC在临床检测上的需要, 特别是用来指导个性化诊疗. 因此, 亟需发展针对单细胞的分析方法用于CTC的生物信息学分析. 基于单细胞的高通量分析方法是针对每个细胞进行区别性分析与研究, 并对大量单细胞的状态与信息分布情况进行统计的方法<sup>[78]</sup>, 这种方法的优点在于既不会丢失丰富的单细胞信息, 也仍保留细胞群体信息. 为满足单细胞分析方法的迫切要求, 本课题组结合微流控技术, 发展了针对细胞表型、基因组学及转录组学分析的高通量单细胞分析方法.

##### 4.1 单细胞三维培养及异质性分析

CTC的表型分析是研究CTC转移机制的有效手段之一. 综合分析CTC的生物物理特性, 包括细胞的变形性、黏附性、微环境及增殖性的考察, 判断CTC单细胞水平与普通细胞系单细胞水平的差异, 对研究肿瘤的转移机制具有重要的意义.

CTC的增殖性是其发生转移后成瘤的重要因素, 而CTC的异质性决定了不是所有的CTC细胞都具有较

强的增殖能力. 单细胞增殖性的研究除了传统的有限稀释法外, 还包括微通道中的卡槽<sup>[79]</sup>、液滴<sup>[80]</sup>等方法. 这些培养条件均是属于二维的培养条件, 容易造成细胞营养物质的丢失和有害物质的积累, 无法真正模拟肿瘤微环境. 而细胞三维培养是有别于二维培养的, 致力于模拟生物体内真实环境的单细胞培养条件<sup>[81-83]</sup>. 例如, Weitz等<sup>[84]</sup>利用海藻酸钠的微液滴实现单细胞的分散以及长达15 d的细胞3D培养; Mooney等<sup>[85]</sup>为解决液滴3D培养中泊松分布造成的大量液滴和细胞的丢失, 发展了具有选择性交联含有细胞凝胶前体的液滴, 实现细胞微滴的收集及三维培养. 在已有研究中, 三维培养条件仍存在众多的困难, 如难以重复的三维培养基条件、复杂的操作以及较高的成本, 令三维水平的单细胞增殖研究受到了严重的限制.

为研究CTC单细胞增殖水平的异质性, 我们开发了能够进行单细胞三维培养的高通量胶原蛋白微阵列 (micro-collagen gel array,  $\mu$ CGA)<sup>[86]</sup>, 对单细胞增殖异质性及耐药性进行考察. 胶原蛋白微阵列的制备是在PDMS模板的诱导下, 采用按压式的方法, 即可在15 min内生成10000个3D阵列, 并实现细胞的单分散

性分布(图8). 在普通的细胞增殖培养环境下, 在 $\mu$ CGA芯片中单细胞展示了增殖异质性, 其中部分细胞增殖存活时间超过一个月. 并且, 阵列式的开放培养条件, 可通过毛细管吸取等方式, 定时、定点取出单细胞团进行基因组学、转录组学的研究. 除了增殖异质性的研究, 我们也分析了肿瘤细胞在群体水平和单细胞水平耐药性的差异. 相比于群体细胞实验获得药物响应浓度 $IC_{50}$ , 单细胞水平分析展示了更低浓度的药物响应, 在比 $IC_{50}$ 更低几个数量级的药物浓度下, 肿瘤细胞的增殖也会被有效抑制, 可为给药方针提供新的参考值.

$\mu$ CGA芯片具有操作简单、无需依赖仪器的优势, 大大降低了单细胞分析操作的复杂性; 且I型胶原蛋白具有生物相容性好、制备简单、价格低廉等优势, 大大降低了单细胞研究的门槛, 给单细胞的表型分析提供了新方法、新思路.

## 4.2 单细胞基因分析

### 4.2.1 基于高通量琼脂糖液滴的单细胞靶基因分析

遗传变异, 包括缺失、突变、重排, 是生物进化背

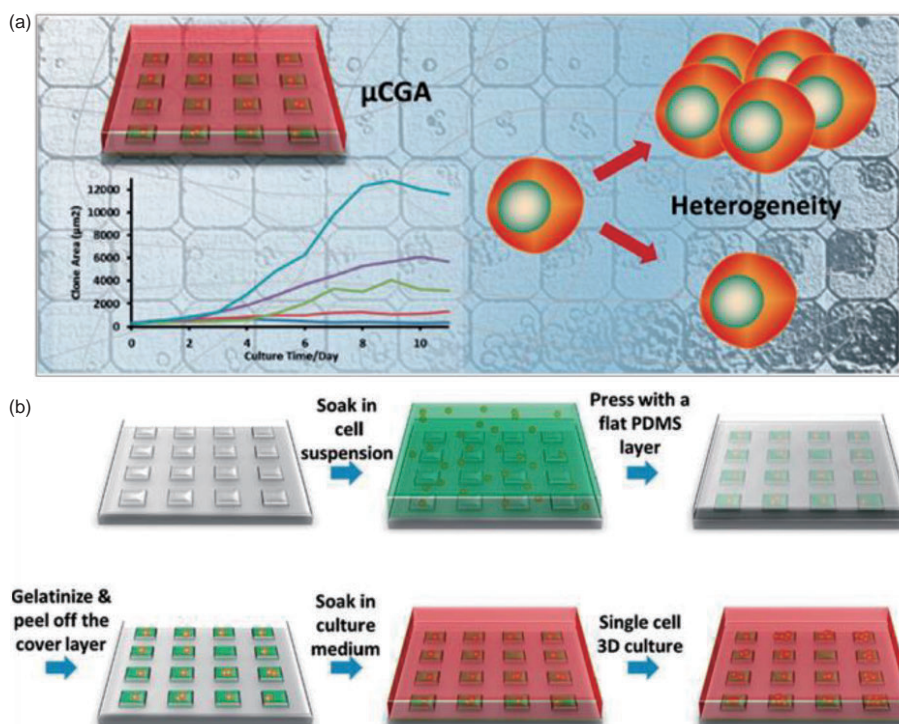


图8 (a) 单细胞三维培养和异质性分析; (b)  $\mu$ CGA的制备过程<sup>[86]</sup> (网络版彩图)

Figure 8 (a) Scheme of single-cell 3D culture and cell proliferation heterogeneity analysis; (b) preparation of  $\mu$ CGA chip [86] (color online).

后最重要的推动力,也是肿瘤细胞能够无限制增殖及侵袭转移的一个重要因素<sup>[87]</sup>。因此,遗传变异可作为生物标志物来区分癌细胞与正常细胞,区分具有侵袭能力的癌细胞与普通癌细胞。然而,遗传突变往往含量稀少,且被掩埋在大大过量的非突变背景中,检测挑战性极高。要实现这种罕见的变异检测,必须满足单分子、单细胞的敏感性,才能实现在高背景下的稀有突变检测。

液滴PCR技术(droplet PCR or emulsion PCR, ePCR)是几十年来发展的一种新型核酸绝对定量技术<sup>[88]</sup>。液滴PCR是利用成千上万的微小腔体(油包水液滴、微阵列等)将反应模板进行有限稀释,实现单分子或者单细胞的分隔,实现进行PCR反应及扩增产物的荧光标记。更重要的是,液滴PCR方法可通过泊松分布原理及阳性液滴的个数比例得出靶标分子的起始浓度,实现核酸的绝对定量检测,无需依赖标准曲线<sup>[89]</sup>。相比于传统的实时荧光定量PCR,液滴PCR具有以下优势:(1)由于其单分子扩增的特点,液滴PCR技术可实现核酸的单分子检测,灵敏度低至0.001%<sup>[90]</sup>;(2)终点PCR检测法,不依赖Ct值(即每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数),不依赖扩增效率,能克服PCR抑制剂的影响,特别适合于基质复杂样本,如体液、水样、土壤中DNA的绝对定量检测<sup>[91]</sup>;(3)单分子扩增方式,能够避免PCR反应中的扩增偏好,有效区分罕见突变、精确区分浓度差异,具有更好的准确度、精密度和重复性,是罕见遗传变异分析的有力手段<sup>[90]</sup>。但由于仪器和液滴通量的限制,基于液滴PCR技术的突变检测易因液滴个数的统计不足而产生假阴性现象。2003年Vogelstein等<sup>[92]</sup>在液滴PCR技术的基础上发展了BEAMing技术(即beads, emulsion, amplification, and magnetics)。通过固定相磁珠的引入,可在乳液PCR的过程中将溶液相的单分子突变检测转移到磁珠表面,然后通过流式细胞术等高通量的荧光计数方式对磁珠进行分群表征,具有通量高、速度快等优势。BEAMing技术已经在基因稀有突变的检测中得到广泛的应用<sup>[93,94]</sup>。然而,BEAMing技术需要引入固定相-磁珠,为实现DNA-磁珠的一比一配对,需借助两次泊松分布实现,产生大量空液滴,造成试剂和靶标的浪费,同时PCR反应需要在磁珠表面完成,存在固相PCR效率低等不足,造成灵敏度低、假阴性等问题。为弥补BEAMing技术的不足,提高基因突变的检出率,

我们提出了一种基于琼脂糖技术的液滴PCR方法,将具有固-液转换性质的琼脂糖引入液滴PCR体系,避免两次泊松分布及低效率固相PCR扩增,大大提高了罕见突变的检出率<sup>[95]</sup>。

我们将PCR引物偶联在液相的琼脂糖分子上,连同PCR反应组分作为水相分子,进行液滴的生成,即琼脂糖液滴。液相的琼脂糖分子,允许单次泊松分布实现单个核酸分子的包裹,以及PCR过程中液滴均相状态的保持,避免了固相PCR效率低的问题。乳液扩增后,琼脂糖可在温度控制下转换成琼脂糖微球,经过荧光染料染色,含有模板细胞的微球会发出荧光,可以用荧光显微镜、流式细胞术(FACS)等分析手段进行后续处理。

我们将琼脂糖液滴PCR方法应用于稀有致病菌的检测,规避了常规平板培养检测耗时、检测灵敏度低、检测量有限的缺陷,大大提高了致病菌的检出率。以病原体大肠杆菌O157:H7作为目标分析物,在大量非突变背景细胞K12的存在下,进行突变靶标的检测(图9(a))。通过微流控芯片单细胞包裹、单分子扩增,结合流式细胞仪荧光计数,我们实现了在100000个*E. Coli* K12背景细胞中单个致病大肠杆菌O157:H7细胞的快速、高通量、高灵敏检测。

这项技术展示了在大背景下分析单个分子、单个细胞的遗传突变分析能力,为我们在CTC稀有突变、拷贝数变异检测来进行癌症分型分析提供了技术支持。

#### 4.2.2 单细胞全基因组分析

全基因组分析相比于靶基因分析,能全面进行突变基因的筛查,提供更多关于肿瘤起源和发展的相关信息。特别是二代测序技术(next generation sequencing, NGS)的发展,使得CTC基因组和转录组的表征成为可能。然而,只有皮克量级的单细胞基因组,难以直接用于测序分析。为了应对这一挑战,近年来已经发展了几种全基因组扩增技术(whole genome amplification, WGA),以提高整个基因组的扩增均匀性并匹配NGS分析。迄今为止,多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)、多次退火环状循环扩增技术(MALBAC)这两种全基因组扩增方式已经广泛应用于CTC全基因组的扩增。Heitzer等<sup>[96]</sup>利用CellSearch®平台分离结肠癌患者外周血中的CTC,然后联合MDA

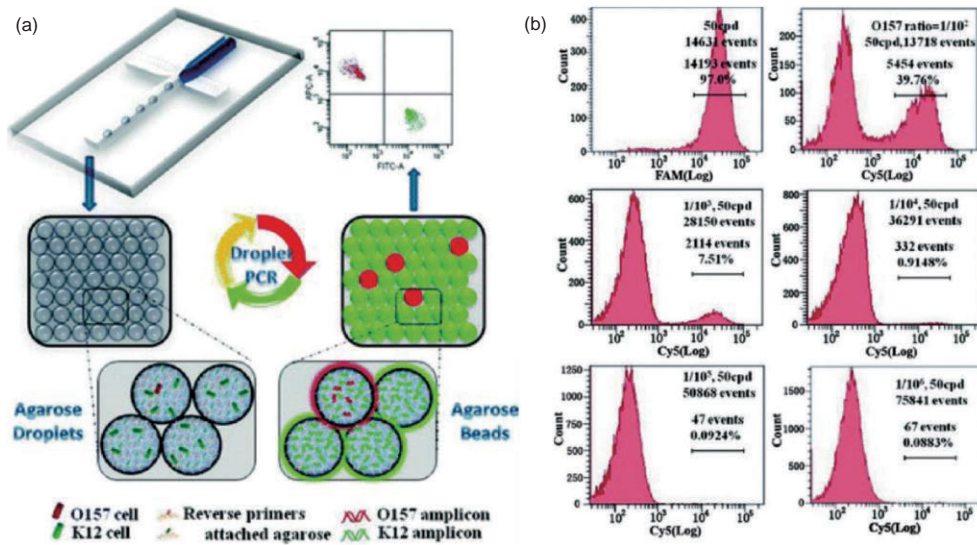


图9 (a) 基于琼脂糖液滴的单细胞检测技术; (b) 高背景*E. coli* K12中*E. coli* O157的高灵敏检测<sup>[95]</sup> (网络版彩图)  
Figure 9 (a) Single cell detection by agarose droplets; (b) *E. coli* O157 detection from plenty of *E. coli* K12 [95] (color online).

扩增技术放大所获得的CTC基因组信息, 用于基因杂交阵列分析和全基因组测序. 并从CTC的基因组中发现了原发灶及转移灶相关的基因突变信息. 然而, MDA是一种非线性的全基因组扩增方法, 这种非模板依赖性的酶反应, 容易“无中生有”产生大量的DNA片段. 于2012年由谢晓亮课题组<sup>[97]</sup>提出来的多次退火环状循环扩增技术(MALBAC)是一种准线性的扩增方式, 利用特殊引物使得扩增产物首尾互补成环, 降低了非特异性扩增, 其高保真度更适用于拷贝数变异(copy number variation, CNV). 随后, 他们利用MALBAC技术对结直肠癌患者外周血中分离出来的24个CTC进行单碱基多样性及拷贝数变异的分析<sup>[98]</sup>. 结果显示, CNV是基因组变异的主要方式之一, 具有癌症类型特异性, 并展示了基于非侵入性CTC的癌症诊断的应用前景.

### 4.3 单细胞基因表达分析

基因表达的异质性往往是由不同的衍生基因组(甲基化、突变、有丝分裂过程的染色体分配等)、细胞循环和微环境等造成的<sup>[99]</sup>. 深入分析CTC基因表达的差异更能全面了解癌症转移机制. 为实现高通量的单细胞基因表达分析, 我们利用液滴微流控平台, 发展了一种能够高通量分析单细胞基因表达的微流体装置(图10)<sup>[25]</sup>. 液滴生成方式采用双水相入口设计, 分别递送模板RNA/细胞、RT-PCR试剂/细胞裂解缓冲液,

制备高度均一、单分散的单分子/单细胞液滴. 为利用流式细胞仪实现高通量的数据统计分析, 我们在液滴微流控体系引入琼脂糖溶液, 而替代传统的微球. 琼脂糖的引入首先避免了细胞-微球配对需要进行的两次泊松分布; 其次, 在逆转录扩增反应过程中, 琼脂糖处于溶液状态, 避免了固相表面扩增效率低的问题. 实验结果表明, 琼脂糖基质中可实现高效率的逆转录扩增. 同时单细胞RT-PCR分析展示了单细胞水平上Ep-CAM基因表达的明显差异. 这项工作首次实现了琼脂糖液滴中的单拷贝基因的RT-PCR, 将为病毒RNA检测和CTC单细胞基因表达分析提供有力的工具.

除了单基因表达量检测之外, 基于单细胞的全转录组测序方法在过去几年中已经取得了显著的进展. 例如, 2012年Sandberg课题组<sup>[100]</sup>建立了一种强大的mRNA测序方法, 简称“Smart-Seq”, 用于全长的转录组分析, 大大提高了单细胞转录组测序的覆盖率. 该课题组将Smart-Seq方法应用于黑色素瘤CTC的检测, 并发现了不同的基因表达模式, 包括潜在的生物标志物和与逃避免疫监视有关的基因. 该研究为RNA-Seq用于单个CTC细胞研究的可行性提供了有价值的证明.

最近, Haber等<sup>[101]</sup>利用CTC-iChip来进行前列腺癌CTC的分离及单细胞转录组分析. 从分离得到的77个CTC的单细胞转录图谱分析, 发现了关键信号通路基因相对于原发灶明显上调. 同时, 还在各个CTC之间

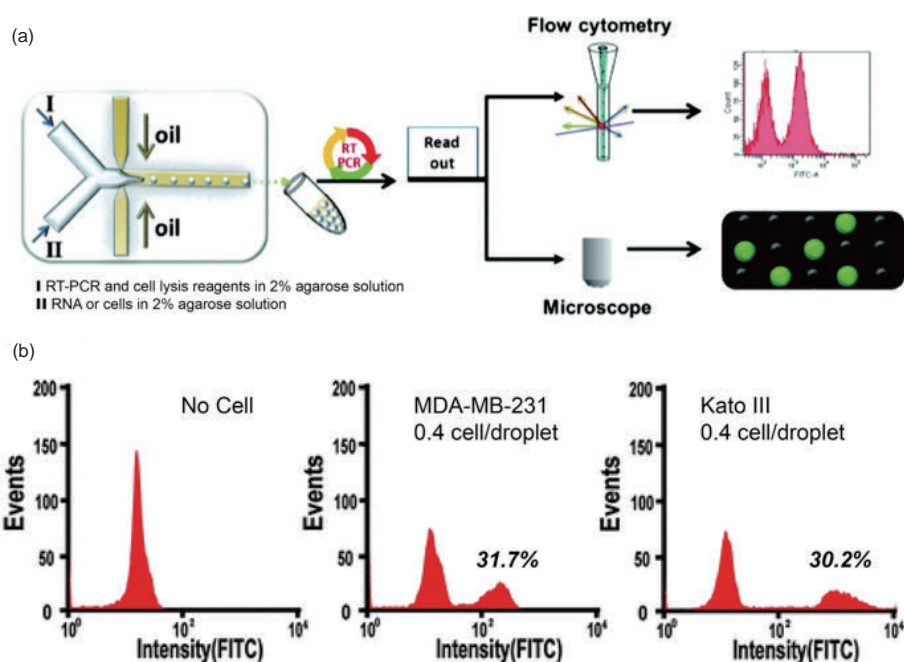


图 10 (a) 基于液滴技术的单细胞基因表达分析; (b) 不同EpCAM表达量的细胞分析结果<sup>[25]</sup> (网络版彩图)

Figure 10 (a) Single cell gene expression analysis by microfluidic droplet technology; (b) EpCAM expression level analysis [25] (color online).

发现了雄激素受体(AR)基因的表达异质性和剪接变异。因此,通过单细胞转录组测序揭示的AR信号传导的显著异质性可以鉴定肿瘤抗药性的潜在临床机制。类似的工作也在Ting等<sup>[102]</sup>的工作中得到报道。利用CTC-iChip对胰腺癌CTC进行富集及单细胞RNA测序,揭示了细胞外基质基因的高表达,导致胰腺癌的远端扩散。

上述基于单细胞基因表达分析的研究进展,使得CTC单细胞基因表达分析成为可能。然而,大多数已开发的RNA测序技术仅限于分析poly(A)尾巴的mRNA信息,不能分析其他也具有重要功能的RNA类型,如microRNA、环状RNA等。因此,仍需开发针对所有RNA种类的通用转录组分析方法。

## 5 结论与展望

CTC作为液体活检技术中的重要靶标,已被美国临床肿瘤学会推荐为肿瘤标志物,可作为肿瘤TNM分期的重要补充。外周血中CTC的个数和生物学信息与实体瘤组织存在一定的量效关系,因此,CTC个数检测及组学信息分析对肿瘤诊断、疗效监测、预后评

估、个体化治疗的临床应用及肿瘤转移及抗药性等机制的研究具有重大意义<sup>[103,104]</sup>。然而,由于其个数少、异质性强,CTC检测分析仍存在巨大的挑战。首先需要选择高通量、高效率的CTC分离富集方法。以免识别为核心的富集手段,虽能实现高效、高纯度的CTC富集,但是依赖标志物表达的分选方法容易漏掉低表达/不表达的CTC,而这些CTC往往是侵袭能力的亚群。此外,免疫识别过程需要考虑到识别分子与细胞之间的作用力,限制了微通道中的流体速度进而限制了芯片的通量,另外,以细胞物理性质差异实现CTC富集的物理分离方法,虽可以规避免疫识别过程,提高通量。然而物理分离方法,一般纯度较低、丢失率较高,容易漏掉与血细胞有尺寸重叠的CTC亚群,限制了其临床应用。因此,结合多种原理,实现CTC分离富集,将会是未来CTC分离技术发展的核心思路。

核酸适体作为高特异、高亲合力的识别分子,虽可通过体外筛选技术获得任何肿瘤细胞靶标的识别分子,但大量研究表明,核酸适体在外周血环境中,容易受到核酸酶、缓冲环境等干扰,使其稳定性和结合力受到影响。因此,以外周血等复杂基质为筛选条件的核酸适体筛选方法的开发,将会大大扩展核酸适体分

子在CTC识别富集中的应用. 此外, 利用纳米材料、聚合物等提高核酸适体的稳定性, 构建核酸适体多价效应等方式, 也将大大提高现有核酸适体的使用范围.

CTC的数目虽能做为肿瘤分期的补充, 但是CTC本身携带的组学信息更具有研究意义. 要实现CTC的下游分析, 首先需要实现CTC的无损释放. 已经有不少课题组开发了CTC的释放方法, 如温度响应<sup>[105]</sup>、核酸酶水解<sup>[75]</sup>、光切割<sup>[64]</sup>. 这些方法虽在细胞系实验中展示了>95%的释放效率, 但是在临床样本体系, 仍存在释放效率低、损失率高等问题. 因此, 亟需发展适用于临床应用的CTC释放方法.

CTC单细胞分析技术是CTC研究的重点方向. CTC单细胞测序方法可以比较CTC与原发灶、转移灶以及转移淋巴结中基因组、转录组及表观遗传组的差异, 为认识肿瘤发生、发展及转移的生物学机制提供全新的视角. 例如, 2017年, Gao等<sup>[106]</sup>对一位结肠癌患者的CTC、原发灶肿瘤细胞、转移淋巴结细胞进行了

全基因组测序分析, 发现CTC拷贝数变异(CNV)存在较大的异质性, 揭示了可能只有部分肿瘤细胞可能形成转移灶. 因此, 单细胞全基因组测序提供了从根源上分析原发灶、CTC、转移灶的遗传变异的手段, 揭示肿瘤转移机制的可能性.

其次, 单细胞转录组测序和表观遗传学分析技术也处于蓬勃发展的状态. 单细胞转录组扩增技术的发展解决了单细胞转录组样品量少而难以检测的问题, 实现了对单细胞全转录组的测序. 特别是以液滴微流控技术和编码技术为基础的Drop-seq<sup>[107]</sup>和inDrop<sup>[107]</sup>技术发展, 使得快速、便宜、高通量的单细胞RNA测序成为了可能. 基于液滴微流控的商用高通量单细胞转录组平台已经广泛应用于细胞分型、干细胞增殖与分化、肿瘤异质性研究、脑/神经系统发育、免疫异常研究等领域. 随着CTC富集技术的发展, 高通量单细胞转录组测序技术必将在CTC领域发挥不可替代的作用.

## 参考文献

- 1 Global Burden of Disease Cancer Collaboration. *JAMA Oncol*, 2017, 3: 524–548
- 2 Chi KR. *Nature*, 2016, 532: 269–271
- 3 Pantel K, Alix-Panabières C. *Cancer Res*, 2013, 73: 6384–6388
- 4 Alix-Panabieres C, Pantel K. *Clin Chem*, 2013, 59: 110–118
- 5 Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, Pacey S, Baird R, Rosenfeld N. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17: 223–238
- 6 Liu C, Zhao J, Tian F, Cai L, Zhang W, Feng Q, Chang J, Wan F, Yang Y, Dai B, Cong Y, Ding B, Sun J, Tan W. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3: 183–193
- 7 Ashworth TR. *Med J Australia*, 1869, 14: 146–149
- 8 Coumans FAW, Ligthart ST, Uhr JW, Terstappen LWMM. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 5711–5718
- 9 Song Y, Tian T, Shi Y, Liu W, Zou Y, Khajvand T, Wang S, Zhu Z, Yang C. *Chem Sci*, 2017, 8: 1736–1751
- 10 Nieto MA, Huang RYJ, Jackson RA, Thiery JP. *Cell*, 2016, 166: 21–45
- 11 Micalizzi DS, Haber DA, Maheswaran S. *Mol Oncol*, 2017, 11: 770–780
- 12 Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11: 129–144
- 13 Zhang C, Guan Y, Sun Y, Ai D, Guo Q. *Cancer Lett*, 2016, 374: 216–223
- 14 Heymann D, Tellez-Gabriel M. Circulating tumor cells: the importance of single cell analysis. In: Gu J, Wang X, Eds. *Single Cell Biomedicine. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol 1068. Singapore: Springer, 2018. 45–58
- 15 Wu L, Xu X, Sharma B, Wang W, Qu X, Zhu L, Zhang H, Song Y, Yang C. *Small Methods*, 2019: 1800544
- 16 Hosokawa M, Hayata T, Fukuda Y, Arakaki A, Yoshino T, Tanaka T, Matsunaga T. *Anal Chem*, 2010, 82: 6629–6635
- 17 Prakadan SM, Shalek AK, Weitz DA. *Nat Rev Genet*, 2017, 18: 345–361
- 18 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
- 19 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 Nanotechnol*, 2013, 8: 735–741

- 20 Bai L, Du Y, Peng J, Liu Y, Wang Y, Yang Y, Wang C. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 4080–4088
- 21 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
- 22 Fang X, Tan W. *Acc Chem Res*, 2010, 43: 48–57
- 23 Zhang H, Zhou L, Zhu Z, Yang C. *Chem Eur J*, 2016, 22: 9886–9900
- 24 Polz MF, Cavanaugh CM. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 3724–3730
- 25 Zhang H, Jenkins G, Zou Y, Zhu Z, Yang CJ. *Anal Chem*, 2012, 84: 3599–3606
- 26 Zhu Z, Jenkins G, Zhang W, Zhang M, Guan Z, Yang CJ. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403: 2127–2143
- 27 Zhang WY, Zhang W, Liu Z, Li C, Zhu Z, Yang CJ. *Anal Chem*, 2012, 84: 350–355
- 28 Li X, Zhang D, Zhang H, Guan Z, Song Y, Liu R, Zhu Z, Yang C. *Anal Chem*, 2018, 90: 2570–2577
- 29 Zhu Z, Song Y, Li C, Zou Y, Zhu L, An Y, Yang CJ. *Anal Chem*, 2014, 86: 5881–5888
- 30 Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. *Genes Dev*, 2003, 17: 3011–3016
- 31 Li X, Zhang W, Liu L, Zhu Z, Ouyang G, An Y, Zhao C, Yang CJ. *Anal Chem*, 2014, 86: 6596–6603
- 32 Samokhvalov AV, Safenkova IV, Eremin SA, Zherdev AV, Dzantiev BB. *Anal Chem*, 2018, 90: 9189–9198
- 33 Scarano S, Mascini M, Turner APE, Minunni M. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25: 957–966
- 34 Capila I, Linhardt RJ. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41: 390–412
- 35 Song Y, Shi Y, Li X, Ma Y, Gao M, Liu D, Mao Y, Zhu Z, Lin H, Yang C. *Anal Chem*, 2016, 88: 8294–8301
- 36 Song Y, Zhang Y, Bernard PE, Reuben JM, Ueno NT, Arlinghaus RB, Zu Y, Qin L. *Nat Commun*, 2012, 3: 1283
- 37 Wu J, Wang C, Li X, Song Y, Wang W, Li C, Hu J, Zhu Z, Li J, Zhang W, Lu Z, Yang CJ. *PLoS ONE*, 2012, 7: e46393
- 38 Kang D, Wang J, Zhang W, Song Y, Li X, Zou Y, Zhu M, Zhu Z, Chen F, Yang CJ. *PLoS ONE*, 2012, 7: e42731
- 39 Hu J, Wu J, Li C, Zhu L, Zhang WY, Kong G, Lu Z, Yang CJ. *Chembiochem*, 2011, 12: 424–430
- 40 Song Y, Zhu Z, An Y, Zhang W, Zhang H, Liu D, Yu C, Duan W, Yang CJ. *Anal Chem*, 2013, 85: 4141–4149
- 41 An Y, Wu J, Yang B, Zhu Z, Gao M, Yu C, Yang CJ. *J Mol Evol*, 2015, 81: 179–185
- 42 Li X, An Y, Jin J, Zhu Z, Hao L, Liu L, Shi Y, Fan D, Ji T, Yang CJ. *Anal Chem*, 2015, 87: 4941–4948
- 43 Wu Q, Wu L, Wang Y, Zhu Z, Song Y, Tan Y, Wang XF, Li J, Kang D, Yang CJ. *Biosens Bioelectron*, 2016, 80: 1–8
- 44 Wu Q, Wang Y, Wang H, Wu L, Zhang H, Song Y, Zhu Z, Kang D, Yang C. *Analyst*, 2018, 143: 2267–2275
- 45 Zheng T, Zhang Q, Feng S, Zhu JJ, Wang Q, Wang H. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 2288–2291
- 46 Sheng Q, Cheng N, Bai W, Zheng J. *Chem Commun*, 2015, 51: 2114–2117
- 47 Song P, Ye D, Zuo X, Li J, Wang J, Liu H, Hwang MT, Chao J, Su S, Wang L, Shi J, Wang L, Huang W, Lal R, Fan C. *Nano Lett*, 2017, 17: 5193–5198
- 48 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
- 49 Sun N, Liu M, Wang J, Wang Z, Li X, Jiang B, Pei R. *Small*, 2016, 12: 5090–5097
- 50 Zhou G, Lin M, Song P, Chen X, Chao J, Wang L, Huang Q, Huang W, Fan C, Zuo X. *Anal Chem*, 2014, 86: 7843–7848
- 51 Sun N, Li X, Wang Z, Zhang R, Wang J, Wang K, Pei R. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 12638–12643
- 52 Wang Z, Sun N, Liu M, Cao Y, Wang K, Wang J, Pei R. *ACS Sens*, 2017, 2: 547–552
- 53 Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 329–340
- 54 Jackson JM, Witek MA, Kamande JW, Soper SA. *Chem Soc Rev*, 2017, 46: 4245–4280
- 55 Fan X, Jia C, Yang J, Li G, Mao H, Jin Q, Zhao J. *Biosens Bioelectron*, 2015, 71: 380–386
- 56 Liu Y, Li T, Xu M, Zhang W, Xiong Y, Nie L, Wang Q, Li H, Wang W. *Lab Chip*, 2018, 19: 68–78
- 57 Zheng S, Lin H, Liu JQ, Balic M, Datar R, Cote RJ, Tai YC. *J Chromatography A*, 2007, 1162: 154–161
- 58 Zheng S, Lin HK, Lu B, Williams A, Datar R, Cote RJ, Tai YC. *Biomed Microdevices*, 2011, 13: 203–213
- 59 Loutharback K, D'silva J, Liu LY, Wu A, Austin RH, Sturm JC. *AIP Adv*, 2012, 2: 042107
- 60 Alshareef M, Metrakos N, Juarez Perez E, Azer F, Yang F, Yang X, Wang G. *Biomicrofluidics*, 2013, 7: 011803
- 61 Warkiani ME, Guan G, Luan KB, Lee WC, Bhagat AAS, Kant Chaudhuri P, Tan DSW, Lim WT, Lee SC, Chen PCY, Lim CT, Han J. *Lab Chip*, 2014, 14: 128–137
- 62 Jen CP, Chang HH, Huang CT, Chen KH. *Microsyst Technol*, 2012, 18: 1887–1896

- 63 Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, Yu M, Miyamoto DT, Waltman BA, Rothenberg SM, Shah AM, Smas ME, Korir GK, Floyd Jr. FP, 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
- 64 Zhao L, Lu YT, Li F, Wu K, Hou S, Yu J, Shen Q, Wu D, Song M, OuYang WH, Luo Z, Lee T, Fang X, Shao C, Xu X, Garcia MA, Chung LWK, Rettig M, Tseng HR, Posadas EM. *Adv Mater*, 2013, 25: 2897–2902
- 65 Huang LR, Cox EC, Austin RH, Sturm JC. *Science*, 2004, 304: 987–990
- 66 Ahmed MG, Abate MF, Song Y, Zhu Z, Yan F, Xu Y, Wang X, Li Q, Yang C. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 10681–10685
- 67 Zhang H, Yang Y, Li X, Shi Y, Hu B, An Y, Zhu Z, Hong G, Yang CJ. *Lab Chip*, 2018, 18: 2749–2756
- 68 Rezaei M, Winter M, Zander-Fox D, Whitehead C, Liebelt J, Warkiani ME, Hardy T, Thierry B. *Trends Biotech*, 2019, 37: 632–644
- 69 Herzenberg LA, Bianchi DW, Schröder J, Cann HM, Iverson GM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 1453–1455
- 70 Breman AM, Chow JC, U'Ren L, Normand EA, Qdaisat S, Zhao L, Henke DM, Chen R, Shaw CA, Jackson L, Yang Y, Vossaert L, Needham RHV, Chang EJ, Campton D, Werbin JL, Seubert RC, van den Veyver IB, Stilwell JL, Kaldjian EP, Beaudet AL. *Prenat Diagn*, 2016, 36: 1009–1019
- 71 Hou S, Chen JF, Song M, Zhu Y, Jan YJ, Chen SH, Weng TH, Ling DA, Chen SF, Ro T, Liang AJ, Lee T, Jin H, Li M, Liu L, Hsiao YS, Chen P, Yu HH, Tsai MS, Pisarska MD, Chen A, Chen LC, Tseng HR. *ACS Nano*, 2017, 11: 8167–8177
- 72 He Z, Guo F, Feng C, Cai B, Lata JP, He R, Huang Q, Yu X, Rao L, Liu H, Guo S, Liu W, Zhang Y, Huang TJ, Zhao X. *J Mater Chem B*, 2017, 5: 226–235
- 73 Feng C, He Z, Cai B, Peng J, Song J, Yu X, Sun Y, Yuan J, Zhao X, Zhang Y. *Theranostics*, 2018, 8: 1301–1311
- 74 Sheng W, Chen T, Kamath R, Xiong X, Tan W, Fan ZH. *Anal Chem*, 2012, 84: 4199–4206
- 75 Shen Q, Xu L, Zhao L, Wu D, Fan Y, Zhou Y, Ouyang WH, Xu X, Zhang Z, Song M, Lee T, Garcia MA, Xiong B, Hou S, Tseng HR, Fang X. *Adv Mater*, 2013, 25: 2368–2373
- 76 de Luca F, Rotunno G, Salvianti F, Galardi F, Pestrin M, Gabellini S, Simi L, Mancini I, Vannucchi AM, Pazzagli M, di Leo A, Pinzani P. *Oncotarget*, 2016, 7: 26107–26119
- 77 Krasnitz A, Kendall J, Alexander J, Levy D, Wigler M. *Trends Mol Med*, 2017, 23: 594–603
- 78 Altschuler SJ, Wu LF. *Cell*, 2010, 141: 559–563
- 79 di Carlo D, Wu LY, Lee LP. *Lab Chip*, 2006, 6: 1445–1449
- 80 El Debs B, Utharala R, Balyasnikova IV, Griffiths AD, Merten CA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 11570–11575
- 81 Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 839–845
- 82 Tibbitt MW, Anseth KS. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 103: 655–663
- 83 Justice BA, Badr NA, Felder RA. *Drug Discovery Today*, 2009, 14: 102–107
- 84 Utech S, Prodanovic R, Mao AS, Ostafe R, Mooney DJ, Weitz DA. *Adv Healthcare Mater*, 2015, 4: 1628–1633
- 85 Lienemann PS, Rossow T, Mao AS, Vallmajo-Martin Q, Ehrbar M, Mooney DJ. *Lab Chip*, 2017, 17: 727–737
- 86 Guan Z, Jia S, Zhu Z, Zhang M, Yang CJ. *Anal Chem*, 2014, 86: 2789–2797
- 87 Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. *Nature*, 2009, 458: 719–724
- 88 Vogelstein B, Kinzler KW. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9236–9241
- 89 Quan P L, Sauzade M, Brouzes E. *Sensors*, 2018, 18: 1271
- 90 Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA, Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, Colston BW. *Anal Chem*, 2011, 83: 8604–8610
- 91 Singh G, Sithebe A, Enitan AM, Kumari S, Bux F, Stenström TA. *J Water Health*, 2017, 15: 505–508
- 92 Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 8817–8822
- 93 Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz Jr LA, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 16368–16373
- 94 Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz Jr LA. *Nat Med*, 2008, 14: 985–990



- 95 Zhu Z, Zhang W, Leng X, Zhang M, Guan Z, Lu J, Yang CJ. *Lab Chip*, 2012, 12: 3907–3913
- 96 Heitzer E, Auer M, Gasch C, Pichler M, Ulz P, Hoffmann EM, Lax S, Waldispuehl-Geigl J, Mauermann O, Lackner C, Höfler G, Eisner F, Sill H, Samonigg H, Pantel K, Riethdorf S, Bauernhofer T, Geigl JB, Speicher MR. *Cancer Res*, 2013, 73: 2965–2975
- 97 Zong C, Lu S, Chapman AR, Xie XS. *Science*, 2012, 338: 1622–1626
- 98 Ni X, Zhuo M, Su Z, Duan J, Gao Y, Wang Z, Zong C, Bai H, Chapman AR, Zhao J, Xu L, An T, Ma Q, Wang Y, Wu M, Sun Y, Wang S, Li Z, Yang X, Yong J, Su XD, Lu Y, Bai F, Xie XS, Wang J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 21083–21088
- 99 Tang F, Lao K, Surani MA. *Nat Methods*, 2011, 8: S6–S11
- 100 Ramsköld D, Luo S, Wang YC, Li R, Deng Q, Faridani OR, Daniels GA, Khrebtukova I, Loring JF, Laurent LC, Schroth GP, Sandberg R. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 777–782
- 101 Miyamoto DT, Zheng Y, Wittner BS, Lee RJ, Zhu H, Broderick KT, Desai R, Fox DB, Brannigan BW, Trautwein J, Arora KS, Desai N, Dahl DM, Sequist LV, Smith MR, Kapur R, Wu CL, Shioda T, Ramaswamy S, Ting DT, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. *Science*, 2015, 349: 1351–1356
- 102 Ting DT, Wittner BS, Ligorio M, Vincent Jordan N, Shah AM, Miyamoto DT, Aceto N, Bersani F, Brannigan BW, Xega K, Ciciliano JC, Zhu H, MacKenzie OC, Trautwein J, Arora KS, Shahid M, Ellis HL, Qu N, Bardeesy N, Rivera MN, Deshpande V, Ferrone CR, Kapur R, Ramaswamy S, Shioda T, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. *Cell Rep*, 2014, 8: 1905–1918
- 103 Krebs MG, Hou JM, Ward TH, Blackhall FH, Dive C. *Ther Adv Med Oncol*, 2010, 2: 351–365
- 104 Khan MS, Kirkwood A, Tsigani T, Garcia-Hernandez J, Hartley JA, Caplin ME, Meyer T. *J Clin Oncol*, 2013, 31: 365–372
- 105 Reátegui E, Aceto N, Lim EJ, Sullivan JP, Jensen AE, Zeinali M, Martel JM, Aranyosi AJ, Li W, Castleberry S, Bardia A, Sequist LV, Haber DA, Maheswaran S, Hammond PT, Toner M, Stott SL. *Adv Mater*, 2015, 27: 1593–1599
- 106 Gao Y, Ni X, Guo H, Su Z, Ba Y, Tong Z, Guo Z, Yao X, Chen X, Yin J, Yan Z, Guo L, Liu Y, Bai F, Xie XS, Zhang N. *Genome Res*, 2017, 27: 1312–1322
- 107 Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, Tallapragada N, Veres A, Li V, Peshkin L, Weitz DA, Kirschner MW. *Cell*, 2015, 161: 1187–1201

## Recent progress on microfluidic technology-based circulating tumor cell analysis

Huimin Zhang<sup>1</sup>, Lingling Wu<sup>1</sup>, Bingqian Lin<sup>2</sup>, Yidi Wang<sup>2</sup>, Yunpeng Bi<sup>2</sup>, Wei Wang<sup>1</sup>, Yanling Song<sup>1</sup>, Chaoyong Yang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Spectrochemical Analysis & Instrumentation, Ministry of Education; Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

\*Corresponding author (email: cyyang@xmu.edu.cn)

**Abstract:** Accurate cancer theranostics is important to improve the survival rate and life quality. Circulating tumor cell (CTC) is a type of tumor cells that spread through peripheral blood after detaching from a solid tumor, which is the most promising target in liquid biopsy. It offers non-invasive sampling for cancer diagnosis and real-time monitor of biological tumor information to study the mechism of tumor metastasis. However, the extreme rarity and heterogeneity of CTC pose a huge technical challenge for CTC profiling. Various technologies have been proposed. This review aims to provide in-depth insights into CTC related research work from Yang's group, including CTC targeting molecule discovery, microfluidic-based enrichment and high-throughput single cell analysis.

**Keywords:** liquid biopsy, circulating tumor cell, aptamer, microfluidic technology, single-cell analysis

**doi:** 10.1360/SSC-2019-0033