



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.11.020
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.11.020
China Journal of General Surgery, 2023, 32(11):1804-1812.

· 文献综述 ·

乳腺癌循环肿瘤细胞微流控芯片检测研究进展

尉卓凡¹, 宁智文², 胡波², 袁时芳¹

(1. 中国人民解放军空军军医大学第一附属医院 甲乳血管外科, 陕西 西安 710032; 2. 西安电子科技大学 生命科学技术学院, 陕西 西安 710126)

摘要

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。不可预测的转移性复发是乳腺癌患者治疗失败、复发乃至死亡的主要原因。循环肿瘤细胞 (CTC) 被定义为从原发肿瘤处脱落并进入循环或淋巴系统的肿瘤细胞。研究证实, CTC 的检测可以为乳腺癌的诊断、治疗策略的制定和预后评估提供重要的临床信息。作为液体活检的重要检测对象之一, CTC 能够简单地通过抽取患者的血液来收集。然而, 大多数 CTC 在循环中死亡, 只有极少数存活并侵犯远处器官。数量上的稀缺、CTC 的异质性以及血液中复杂成分的干扰使得 CTC 的准确检测成为一个巨大的挑战。针对 CTC 的生物和物理特性开发的各种检测方法往往需要在检测前对 CTC 进行分离和富集, 但吸附、洗脱和转移等预处理过程不可避免地会造成 CTC 的损失, 而耗时、操作复杂、设备昂贵等问题也限制了 CTC 的临床应用, 因此迫切需要开发新的检测技术。以微加工结构为特征的微流控技术近年来受到了广泛关注与研究, 微流控技术可以精确控制微米级的流体和细胞, 因而成为一种特别适合检测稀有 CTC 的方法。微流控芯片具有成本低、操作简单、低耗材、高通量、实时检测等优势, 其小型化的特点可将多种检测技术集成于微尺度中, 为 CTC 的分离、鉴定和表征提供了一个高效的平台, 有助于对肿瘤患者进行个体化分析与治疗。最近, 三维 (3D) 打印技术的兴起为微流控芯片的制造提供了更高效、个性化的方式, 避免了传统微流体器件制作方法步骤复杂、耗时等问题。逐层打印出的 3D 结构将促进微流控芯片实现更高效率和更高通量, 并将推动实验室技术成功应用于临床, 为肿瘤的生物学和临床研究开辟新视野, 为乳腺癌的诊断治疗提供前所未有的机会。本文中, 笔者分析了近年来 CTC 的不同检测手段的特点, 阐述了微流控技术在乳腺癌 CTC 检测中的应用研究, 以及 3D 打印微流控芯片技术前沿, 并对 3D 打印微流控芯片技术在乳腺癌 CTC 检测中的应用前景进行了展望。

关键词

乳腺肿瘤; 肿瘤细胞, 循环; 芯片实验室装置; 综述

中图分类号: R737.9

Research progress of microfluidic chip detection of circulating tumor cells in breast cancer

WEI Zhuofan¹, NING Zhiwen², HU Bo², YUAN Shifang¹

(1. Department of Thyroid, Breast and Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. School of Life Science and Technology, Library, Xidian University, Xi'an 710126, China)

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划重点基金资助项目 (2021JZ-26)。

收稿日期: 2023-04-30; 修订日期: 2023-06-12。

作者简介: 尉卓凡, 中国人民解放军空军军医大学第一附属医院硕士研究生, 主要从事乳腺癌早期诊断与治疗方面的研究。

通信作者: 袁时芳, Email: shifangy@fmmu.edu.cn

Abstract

Breast cancer is the most common malignant tumor in women. Unpredictable metastatic relapse is a major reason for treatment failure, recurrence, and even death in breast cancer patients. Circulating tumor cells (CTCs) are defined as tumor cells that detach from the primary tumor and enter the circulatory or lymphatic system. Studies have confirmed that the detection of CTCs can provide important clinical information for the diagnosis, developing treatment strategies, and prognosis assessment of breast cancer. As one of the key targets for liquid biopsies, CTCs can be collected simply by extracting a patient's blood. However, most CTCs die in the circulation, with only a very small number surviving and invading distant organs. The scarcity in numbers, heterogeneity of CTCs, and interference from complex components in blood pose significant challenges to the accurate detection of CTCs. Various detection methods developed based on the biological and physical properties of CTCs often require separation and enrichment of CTCs before detection. However, preprocessing steps like adsorption, washing, and transfer inevitably result in CTC loss. Moreover, time-consuming, complex procedures, and expensive equipment further limit the clinical application of CTC detection. Therefore, there is an urgent need for the development of new detection technologies. Microfluidic technology, characterized by microfabricated structures, has received significant attention and research in recent years. Microfluidic technology allows for precise control of micrometer-scale fluids and cells, making it particularly suitable for detecting rare CTCs. Microfluidic chips offer advantages such as low cost, simplicity of operation, low consumables, high throughput, and real-time detection. Their miniaturization allows for the integration of various detection techniques into a micro-scale platform, providing an efficient platform for the isolation, identification, and characterization of CTCs, contributing to personalized analysis and treatment of cancer patients. Recently, the rise of three dimension (3D) printing technology has provided a more efficient and personalized approach to the fabrication of microfluidic chips, avoiding the complexities and time-consuming aspects of traditional microfluidic device production. Layer-by-layer printed 3D structures will promote higher efficiency and throughput of microfluidic chips, facilitating the successful application of laboratory techniques in clinical settings. This opens up new perspectives for biological and clinical research on tumors and offers unprecedented opportunities for the diagnosis and treatment of breast cancer. In this article, the authors analyze the characteristics of different CTC detection methods in recent years, elucidate the application of microfluidic technology in the detection of breast cancer CTCs, and the cutting-edge technology of 3D-printed microfluidic chips, and provide an outlook on the application prospects of 3D-printed microfluidic chips in the detection of CTCs in breast cancer.

Key words

Breast Neoplasms; Neoplastic Cells, Circulating; Lab-On-A-Chip Devices; Review

CLC number: R737.9

在世界范围内,乳腺癌已成为最常见的肿瘤,是女性癌症患者死亡的主要原因^[1],通过生物标志物早期识别其转移和复发情况至关重要。循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)最早由Ashworth发现,其数量和生物学特征等包含着癌症进展和治疗反应的关键信息,被认为是转移性乳腺癌(metastatic breast cancer, MBC)的独立预后因素之一^[2]。CTC的检测为研究癌症转移提供了一种

无创方法。作为CTC临床应用研究最广泛的肿瘤之一,已经开发了各种针对乳腺癌CTC的检测方法。然而,传统检测方法大多无法实现标准化的检测过程^[3],不完整不准确的检测结果限制了CTC在临床中的应用。与之相比,微流控芯片为CTC的全面研究带来了可能^[4],凭借在特异度、敏感度、通量、效率上的优势,微流控芯片具有将CTC实时检测应用于临床的巨大潜力。其中三维(3D)

打印技术可实现标准化的微流控芯片制造，从而获取更多关于肿瘤有价值的信息，推动 CTC 从指导肿瘤预后到预测肿瘤进展，为乳腺癌的精准治疗提供前所未有的机会。本文对基于不同原理的 CTC 检测方法进行总结，着重分析了乳腺癌 CTC 的微流控检测研究现状及进展，对 3D 打印微流控芯片的广阔应用前景进行了展望。

1 常见的 CTC 检测方法与存在问题

外周血中的 CTC 浓度非常低，大多数癌症患者每毫升血液中仅 1~10 个 CTC^[5]，因此需要高敏感度和高特异度的技术来检测。根据 CTC 区别于血细胞的独特性质，常见的检测方法大致可分为两类，即基于生物特性和基于物理特性的方法。

1.1 基于生物特性的方法

基于 CTC 的生物学特征，通常利用附着在磁性物质表面的细胞表面标志物抗体等来筛选 CTC。

阳性富集通过靶向 CTC 表面的特异性抗原来实现，通常可实现高纯度富集。CellSearch 系统使用涂有上皮细胞黏附分子（epithelial cell adhesion molecule, EpCAM）抗体的铁磁颗粒，对 CTC 进行

免疫磁分离并计数^[6]，Cristofanilli 等^[7]检测了 177 例 MBC 患者的血液样本后得出结论：每 7.5 mL 血液中 CTC \geq 5 个的患者，其无进展生存期（progression free survival, PFS）和总体生存期（overall survival, OS）更短。然而该方法易造成假阴性率高，现已停止生产和临床应用。另外，CTC 经上皮-间充质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）过程后会导导致 EpCAM 的下调或丢失^[8]，从而逃避阳性富集系统，即使是使用多种抗体组合的 AdnaTest，也无法完全解决 CTC 抗原异质性导致的假阴性问题^[9]。阴性富集策略往往通过抗体靶向、消耗外周血细胞，最常用的是抗 CD45 抗体^[10]，以高敏感度反向捕获缺乏充分表达 EpCAM 的 CTC。但单独使用此方法时往往降低了细胞纯度，故通常与其他方法结合使用，例如 Wu 等^[11]开发的 CanPatrol 技术先裂解红细胞（RBC），再用磁珠消耗 CD45⁺的白细胞（WBC），在乳腺癌患者血液样本中检测到 CTC 及肿瘤微栓子。但是这种方法可能导致 CK⁺/CD45⁺或“双阳性”细胞的 CTC 被去除以致低估其数量^[5]。常见的基于生物特性 CTC 检测技术及其应用特点见表 1。

表 1 常见的基于生物特性 CTC 检测方法总结

Table 1 Summary of common CTC detection methods based on biological characteristics

技术	原理	标志物	检测过的癌种	优势	缺点
CellSearch [®] ^[6-7,9]	基于抗 EpCAM 抗体涂层的铁磁颗粒,进行免疫磁分离	EpCAM	乳腺癌、肺癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌、膀胱癌	敏感度高,半自动,可重复,获得 FDA 批准	无法捕获 EpCAM 表达水平低的 CTC,无法进行后续分析
AdnaTest [®] ^[9,12]	基于抗体组合的免疫磁分离,通过 RT-PCR 分析	EpCAM、CEA、MUC-1、HER-2、EGFR、PSA 等	乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、卵巢癌	高敏感度和特异性,可进行下游分析	WBC、核酸等污染导致假阳性结果,忽略 EpCAM 阴性的 CTC
MagSweeper ^[13]	基于抗 EpCAM 抗体靶向免疫磁珠进行分离	EpCAM	乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌	敏感度高,CTC 的纯度高,高处理量	昂贵,CTC 被固定无法进行分析,忽略 EpCAM 阴性的 CTC
CanPatrol ^[11]	基于磁珠去除 CD45 ⁺ 的 WBC	CD45	乳腺癌、鼻咽癌、肺癌、食管癌、肝癌、结肠癌	不依赖 EpCAM 的表达,可保持 CTC 活性	特异度低,部分 CTC 被意外去除

1.2 基于物理特性的方法

CTC 以尺寸、密度、可变形性及介电性与血细胞相区别，一些技术据此可以快速分离富集 CTC 而无需标记。

Drucker 等^[14]测试了几种方法，其中 RosetteSep[™]使用抗体将血样中的 PBMC 与 RBC 交联形成免疫玫瑰花结，然后密度梯度离心将其去除，在

MDA-MB-231 细胞加标实验中 CTC 的捕获效率约为 40%，在 15/28 例 MBC 患者的血样中检测到 CTC，ScreenCell[™]使用微滤器基于细胞大小差异分离 CTC，在加标实验中表现为 55% 的回收率，并在 8 例 MBC 患者中的 6 例检测到 CTC，这两种设备在低至 2 个 CTC/mL 的水平下保证足够的敏感度。但此类方法容易忽略较小的 CTC 和与 WBC 具有相似变形

能力的 CTC, 导致假阴性结果。密度梯度离心法利用了 CTC 和 WBC 的比重差异, 如 Ficoll 法和 OncoQuick 法, 后者因结合了离心和过滤而具有更高的捕获率^[15]。另外, 基于 CTC 与血细胞之间介电性差异, ApoStream[®] 通过介电泳 (dielectrophoresis, DEP) 进行 CTC 的富集^[9], Le Du 等^[16]在 47 例乳腺癌患者的血样中检测 CTC, 并联合其他细胞标志物对 CTC 进行染色区分 3 种 CTC 表型 (上皮型、间质型、癌症干细胞样 CTC)。此方法虽然可以分离出单个 CTC, 但处理效率较慢, 且细胞纯度较低, 电场亦会影响细胞表面活性和表面特征, 影响后续分析^[17]。

基于免疫亲和力的捕获方法虽然特异度很高, 但受限于 CTC 表面标志物的表达, 迄今为止, CTC 的异质性使其无法使用通用的特异性抗体来富集。而物理方法摆脱了靶向特定抗原的限制, 未经抗体标记的 CTC 也更利于后续表征分析, 但离心、稀释等预处理步骤会损失部分 CTC, 捕获的 CTC 纯度并不令人满意^[18]。以上大多数 CTC 检测技术非常耗时, 需要熟练的操作人员和昂贵仪器。因此, 需要开发新的检测技术, 使 CTC 的检测更加方便、准确和高效。常见的基于物理特性 CTC 检测技术及其应用特点见表 2。

表 2 常见的基于物理特性 CTC 检测方法总结

Table 2 Summary of common CTC detection methods based on physical characteristics

技术	原理	标志物	检测过的癌种	优势	缺点
ISET ^[19]	基于细胞大小进行过滤	—	乳腺癌、肺癌、肝癌、结肠直肠癌、黑色素瘤	敏感度高, 简单, 价格低, 无需标记	特异度低, 处理慢, 易出现膜堵塞
RosetteSep [™] ^[14]	抗体标记改变细胞密度后, 基于密度梯度分离 CTC	CD45、CD66b、血型糖蛋白 A 等抗体混合物	乳腺癌、肝癌、胰腺癌、结直肠癌	敏感度高, 快速, 不依赖 EpCAM 表达	回收率低, 易受 WBC、RBC 干扰
ScreenCell ^[14]	基于细胞大小富集 CTC	—	乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、黑色素瘤	快速, 价格低, 易于生产, 可对捕获的 CTC 分析和培养	特异性差, 无法捕获体积较小的 CTC, RBC 干扰
The Ficoll-Paque [®] ^[15]	基于密度梯度离心	—	乳腺癌、肝癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、前列腺癌	快速方便, 价格低, 可保持 CTC 活性	敏感度和特异度低, 受离心时间、温度影响
OncoQuick [®] ^[15]	基于过滤去除 RBC 和 WBC, 并用密度梯度离心富集 CTC	—	乳腺癌、结直肠癌	高敏感度, 高通量, 价格低, CTC 回收率高	特异度低, 纯度低, 有样品损失
ApoStream [®] ^[9,16-17]	基于介电泳原理	—	乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌	无需标记, 快速, 可分离单个 CTC, 可保持 CTC 活性	通量小, 纯度低

2 乳腺癌 CTC 的微流控芯片检测

微流控技术在 CTC 检测中的应用出现于最近十几年, 微流控技术以高通量和敏感度精确控制微米级的流体和细胞, 旨在将所有实验室设备和功能集成到数十毫米尺寸的设备中, 并以较低的成本和较短的分析时间对化合物进行微处理和微量分析。与传统方法相比, 微流控芯片具有操作自动化、消耗样品少、敏感度高、通量大等优势, 并可将过滤、离心、磁选等集成到微尺度中^[20]。小型、集成化的微流控芯片实现了 CTC 富集、分离和分析的一站式过程, 显著减少了处理时间并

提高捕获效率, 为开发真正的即时诊断设备创造了可能。该技术对 CTC 的检测方法大致可分为两类: 基于标记的检测和无标记的检测。

2.1 基于标记的检测

基于标记的方法依赖免疫亲和原理, 微流控芯片精确控制流体的流动速度和方向, 通过影响 CTC 表面抗原与抗体的相互作用从而直接影响捕获效率。针对不同的细胞表面抗原, 此类方法可以进一步分为正向富集或负向富集。

2.1.1 正向富集 基于 CTC 的抗原表达, 正向富集法最常用的是 EpCAM。Nagrath 等^[21]制作的 CTC-Chip 利用具有 EpCAM 抗体涂层的微柱, 使用不同

类型肿瘤患者的全血样本中进行测试,在115/116个样本中发现了CTC,其中乳腺癌患者($n=10$)全血样本分离的CTC数量为5~176个/mL,捕获的平均纯度为60%。随后又进一步开发了人字形芯片(HB-Chip),通过产生微涡流使血细胞被动混合,增强了CTC与抗体包被芯片表面之间的相互作用,其捕获效率比CTC-Chip提升了26.3%。类似地,微柱阵列、混沌混合、几何增强混合和波浪人字形结构等微流控平台,凭借几何功能化微结构可优化免疫捕获效率^[22-24]。例如借助混沌混合^[23]和波浪形HB芯片^[24]的优点制作了T- μ FS微流体系统,将 10^3 ~ 10^4 个MCF-7细胞加标于200 μ L全血中后捕获,效率为83.3%~94.2%,且细胞存活率为94.6%,这为完整、自动地捕获和释放高活性CTC带来可能^[25]。免疫磁泳法多用EpCAM抗体偶联磁性纳米颗粒(magnetic nanoparticles, MNP),随后在磁场中富集与之结合的CTC。Wang等^[26]制备了含有抗EpCAM抗体的水凝胶包被的MNP,将MCF-7细胞加标入血液中模拟CTC的捕获,效率约96%,同时检测了5例癌症患者和5名健康志愿者提供的血样,结果在患者血液样本中发现1~12个CTC,而在健康血液样本中未检测到CTC,初步证明了其在临床实践中的实用性。同样,Wu等^[27]用中性粒细胞膜对免疫磁性纳米颗粒进行表面功能化得到Neu-IMNs,可以同时减少非特异性蛋白质的吸附和WBC的干扰,并增强与CTC的相互作用,成功从19/20个乳腺癌患者血液样本中分离出具有高纯度和高活力的CTC,将其培养并进行了基因突变分析。正向富集依赖特定的标记物保证了高敏感度和纯度,然而一些低表达或不表达EpCAM的“正常样”CTC^[28]会减弱检测的敏感度,从而对肿瘤监测和治疗效果的评估。

2.1.2 负向富集 负向富集靶向并去除背景细胞来实现CTC的分离。Mishra等^[29]提出了¹PCTC-iChip,以惯性分离阵列设备去除RBC和血小板,结合高梯度磁性细胞分选仪去除WBC并富集CTC,该团队将荧光标记的乳腺癌CTC掺入健康供体的血样中,回收率为 $(89.2 \pm 5.7)\%$,并对其进行了分子分析。然而,此方法虽然降低了血细胞被误识别为CTC的可能性,但分离纯度通常较低,因此通常需要多次分离过程^[30],而且磁场中背景细胞的移动可能会导致部分CTC丢失^[31]。此外,Szczerba等^[32]发现CTC-WBC簇的存在将增大乳腺癌转移的

潜能,负向富集法可能会意外去除与WBC相关的CTC。基于标记的技术常利用特异性抗体靶向捕获CTC,但这种方法受限于细胞的蛋白质表达。另外,由于抗体不可逆结合且不易降解,抗体标记也会影响CTC的完整性和活力^[33],因此会影响后续分析。

2.2 基于无标记的检测

无标记法旨在减少使用特异性抗体而导致的误差,既不影响细胞活力和基因表达谱,更有利于CTC的下游分析,并有望实现更高的捕获率^[34]。其中主动分选需要借助外力,通常利用电场、磁场、声波或者光学驱动,而被动分选使用特定的通道结构、流体动力或空间位阻来检测CTC,常基于尺寸或惯性力进行分选。

2.2.1 主动分选 主动分选主要通过施加外力操纵细胞来分离CTC。基于细胞的电生理特性,DEP利用介电粒子与电场之间的相互作用将CTC分离、捕获^[9,35]。Jahangiri等^[36]在AC-CSC芯片上施加低频交流电场后,让不同表型的乳腺癌细胞系(MCF-10A、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-468)分别通过AC-CSC芯片,发现肿瘤细胞的极化程度相对更低,且不同表型的乳腺癌细胞有其特定的极化频率,同时,将MDA-MB-231细胞与WBC混合来模拟患者血液样本,捕获了约90%的肿瘤细胞。Varmazyari等^[37]利用基于DEP的微流控装置,在保证细胞活力的情况下将乳腺癌MDA-MB-231细胞与WBC分离,回收率和纯度分别接近95%和100%。类似地,不同细胞在声场下受到不同的力,据此也可将CTC分选、富集^[33]。例如,Zhang等^[38]将交变频率声场应用于微流控芯片,实现了从外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中无损分离三种不同的肿瘤细胞(MCF-7、A549、HCT116),即使在CTC与PBMC大小相近情况下也能实现有效分离,有效率达95%,而PBMC的污染率仅1%,为验证该方法的临床应用可能性,在4例不同类型和阶段的癌症患者中进行测试,平均收集到75.5个CTC/mL。光学微流体系统也可以用来分离CTC^[39]。Hu等^[40]使用叶酸将同源RBC与CTC偶联,得到的CC-RBC具有更大的体积和折射率,因此在光流体系统中的激光照明下可被精确分离,将人乳腺癌MCF-7细胞添加到2 mL血样中测试,保持CTC膜和功能的完整性的同时,达到92%的纯度和90%的回收率。

2.2.2 被动分选 在 1 项多中心临床试验^[41]中, Parsortix[®]系统基于细胞大小差异富集 CTC, 对 216 例 MBC 患者和 205 名健康志愿者的外周血进行测试, 证明了该系统能够富集 CTC 并进行后续下游分析, 该系统已获得 FDA 批准用于 MBC 的 CTC 富集。依赖物理屏障微结构的建模往往很困难, 而利用流体动力学惯性效应, 即可实现连续和精确控制流体而无需调节任何微观物理结构。Akbarataj 等^[42]使用具有梯形横截面的不同曲率半径的螺旋微通道, 利用惯性升力结合迪恩涡流产生的拖拽力将 CTC 聚焦于内部出口, 在 2.5 mL/min 的流速下实现 90% 的效率, 捕获的 MCF-7 细胞高度存活。Zhu 等^[43]制造了 PJMJ 微流体分选仪, 将肿瘤细胞 (A549、H460、MCF-7、H226 细胞) 加标入 WBC 中模拟临床样本, 实现了 90.57%~94.14% 的高回收率和 48.67%~79.05% 的纯度, 并且成功从 MBC 和肺癌患者的血液样本中分离 CTC, 捕获率为每 5 mL 样本 7~226 个 CTC, 验证了其临床实用性。

无标记策略不会影响细胞活力及基因表达谱, 更快的样品处理确保了较大通量, 然而 CTC 的异质性以及背景细胞的重叠, 导致其回收率和纯度并不令人满意。

3 新兴的集成技术及 3D 打印微流控芯片

目前, 对 CTC 的研究已经不限于单纯枚举数量, 已有研究将基于各种原理的检测手段集成在微流控芯片中, 结合各自的优势并实现互补, 在有效分离和富集 CTC 后对其进行分子表征, 据此可以帮助阐明肿瘤转移机制、寻找治疗靶点及监测药物效应等^[44]。

Wang 等^[45]设计了一种楔形微流控芯片, 用免疫微粒标记 WBC 后在明场显微镜下区分 CTC 并进行全自动化的计数、鉴定, 将 MCF-7、SK-BR-3 等细胞系掺入血液中, 通过该芯片的形态识别可快速区分肿瘤细胞并进行捕获。Lee 等^[46]基于免疫磁泳和荧光标记设计了 Mag-Gradient 芯片, 将 MNP 与 HER-2 结合, 利用 3 种生物标志物 (HER-2、ER 和 PR) 的差异性表达, 对 4 种不同亚型乳腺癌细胞系 (BT-474、SK-BR-3、MCF-7 和 MDA-MB-231) 的混合物进行实验, 借助磁场和免疫荧光信号完成乳腺癌 CTC 捕获和分型。Green 等^[47]使用一种双模块微流控设备 PillarX, 其中 Pillar 装置基于细胞大

小和可变形性, 而 X-磁装置使用偶联 EpCAM 抗体的 MNP, 二者串联来捕获 CTC 簇和单个 CTC, 除使用 MDA-MB-231 荷瘤小鼠进行测试外, 在 6 例 MBC 患者的血样 (500 μ L) 中成功检测出 CTC (12~79 个) 和 CTC 簇 (5~16 个)。Schwab 等^[48]制造的 MyCTC 芯片, 能够在同一集成化设备中对肿瘤细胞进行捕获、培养扩增和药物敏感性测试, 在加标癌细胞系样本中的回收率分别为 95%~98% 和 97%~99%, 并且成功在 1 例 MBC 患者血液样本中捕获了单个 CTC 和 CTC 簇。Lv 等^[49]设计了一种近红外 (near infrared, NIR) 光响应微流控芯片, 并通过侧流微阵列 (lateral flow microarray, LFM) 芯片和光热响应系统的组合, 在保证高活性的前提下实现单个 CTC 的捕获和无损释放, 将 MCF-7 细胞加标到全血中以模拟患者血液样本, 捕获的纯度为 (90 \pm 2) %。

传统的微流控设备基于光刻的制造工艺, 复杂的制造步骤、昂贵的材料成本、耗时的制作过程均限制了微流控设备从实验室到实际临床实施的转化^[50]。与之相比, 3D 打印技术具有相对灵活性、直接性和快速原型制作的能力, 能够逐层打印出多种复杂的三维结构, 增加了微流控芯片的功能表面积, 为精确和小型的微流控芯片制造提供便利^[51], 此外, 各种适宜的原材料的出现将不断丰富微流控设备的应用范围, 促进其在研究和临床环境中被广泛接受。

Chen^[52]等提出了一种 3D 类河湾截面微流控芯片, 主要利用剪切梯度升力与迪恩曳力实现 CTC 的惯性聚焦及富集, 将荧光标记的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞掺入兔全血进行实验, 其最佳回收率和富集比分别可达到 95.0% 和 1.90。本课题组^[53]使用 4 台商用 3D 打印机设计并打印了矩形截面蛇形微流控芯片模型, 模拟确定了最佳通道曲率和流速并成功聚焦 MCF-7 细胞。最近, Chu 等^[54]借助 3D 打印技术将 WBC 捕获通道和微滤装置结合在同一微流体设备中, 利用抗 CD45 抗体捕获 WBC, 同时用过滤器耗竭 RBC、血小板等, 由此分离富集 CTC, 将人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞掺入健康志愿者提供的全血中测试设备性能, 肿瘤细胞的平均恢复率为 91.4%, 并且保持了完整性及活力, 也在转移性肿瘤患者 (前列腺癌、胰腺癌) 的外周血样本分离出 CTC, 表明该装置适用于不同的临床情境。

3D打印微流控芯片可以为CTC检测和早期监测肿瘤转移开辟新机会,可以预测,3D打印技术在未来将会成为微流控芯片制造领域最为重要方法之一,为CTC检测广泛应用于临床提供有益的见解。

4 总结与展望

CTC的检测可以为乳腺癌的进展提供有价值的临床见解,监测患者在治疗期间的反应并为治疗方案的制定提供参考。微流控技术以其成本低廉、操作简单、试剂消耗少、小型化、快速等独特优势,越来越多地应用于CTC分离、鉴定和表征的各项研究中。3D打印技术凭借设计灵活性,克服了微流控设备功能表面积有限的不足,为微流控芯片制造提出了一种更优方案。在未来,期望微流控芯片将常规用于CTC的即时检测,这对研究乳腺癌及其转移机制的研究具有重要意义,将在癌症的早期诊断、预后的观察,以及患者的个性化治疗方面发挥关键作用。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:尉卓凡负责调研整理文献,设计论文框架,论文撰写,根据修改意见进行论文修订;宁智文负责调研整理文献,对论文中微流控等专业领域部分做出修改解释;胡波负责协助确定研究选题,提供相关材料支持,论文修订,对微流控领域相关知识提供见解与指导;袁时芳提出并确定研究选题,确定论文结构框架,明确论文撰写内容,论文修订,给予指导性意见。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] Fridrichova I, Kalinkova L, Ciernikova S. Clinical relevancy of circulating tumor cells in breast cancer: epithelial or mesenchymal characteristics, single cells or clusters?[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20):12141. doi: 10.3390/ijms232012141.
- [3] Ramos-Medina R, López-Tarruella S, del Monte-Millán M, et al. Technical challenges for CTC implementation in breast cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13(18):4619. doi: 10.3390/cancers13184619.
- [4] Zhuang J, Xia L, Zou Z, et al. Recent advances in integrated microfluidics for liquid biopsies and future directions[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 217:114715. doi: 10.1016/j.bios.2022.114715.
- [5] Yang YP, Giret TM, Cote RJ. Circulating tumor cells from enumeration to analysis: current challenges and future opportunities[J]. *Cancers*, 2021, 13(11): 2723. doi: 10.3390/cancers13112723.
- [6] Dirix L, Buys A, Oeyen S, et al. Circulating tumor cell detection: a prospective comparison between CellSearch® and RareCyte® platforms in patients with progressive metastatic breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2022, 193(2): 437–444. doi: 10.1007/s10549-022-06585-5.
- [7] Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(8):781–791. doi: 10.1056/NEJMoa040766.
- [8] Lin D, Shen L, Luo M, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 404. doi: 10.1038/s41392-021-00817-8.
- [9] Russo GI, Musso N, Romano A, et al. The role of dielectrophoresis for cancer diagnosis and prognosis[J]. *Cancers*, 2021, 14(1): 198. doi: 10.3390/cancers14010198.
- [10] Descamps L, Le Roy D, Deman AL. Microfluidic-based technologies for CTC isolation: a review of 10 years of intense efforts towards liquid biopsy[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4):1981. doi: 10.3390/ijms23041981.
- [11] Wu SY, Liu ZM, Liu SY, et al. Enrichment and enumeration of circulating tumor cells by efficient depletion of leukocyte fractions[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2014, 52(2): 243–251. doi: 10.1515/cclm-2013-0558
- [12] Bittner AK, Keup C, Hoffmann O, et al. Molecular characterization of circulating tumour cells identifies predictive markers for outcome in primary, triple-negative breast cancer patients[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(15):8405–8416. doi: 10.1111/jcmm.15349.
- [13] Talasz AH, Powell AA, Huber DE, et al. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(10):3970–3975. doi: 10.1073/pnas.0813188106.
- [14] Drucker A, Teh EM, Kostyleva R, et al. Comparative performance of different methods for circulating tumor cell enrichment in metastatic breast cancer patients[J]. *PLoS One*, 2020, 15(8): e0237308. doi: 10.1371/journal.pone.0237308.
- [15] Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood[J]. *Cytometry*, 2002, 49(4):150–158. doi: 10.1002/cyto.10161.
- [16] Le Du F, Fujii T, Kida K, et al. EpCAM-independent isolation of circulating tumor cells with epithelial-to-mesenchymal transition

- and cancer stem cell phenotypes using ApoStream® in patients with breast cancer treated with primary systemic therapy[J]. *PLoS One*, 2020, 15(3):e0229903. doi: [10.1371/journal.pone.0229903](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229903).
- [17] Zhang Y, Li YF, Tan ZC. A review of enrichment methods for circulating tumor cells: from single modality to hybrid modality[J]. *Analyst*, 2021, 146(23):7048–7069. doi: [10.1039/d1an01422f](https://doi.org/10.1039/d1an01422f).
- [18] Guo LH, Liu C, Qi ML, et al. Recent progress of nanostructure-based enrichment of circulating tumor cells and downstream analysis[J]. *Lab Chip*, 2023, 23(6): 1493–1523. doi: [10.1039/d2lc00890d](https://doi.org/10.1039/d2lc00890d)
- [19] Zeng HL, Veeramootoo JS, Ma G, et al. Clinical value and feasibility of ISET in detecting circulating tumor cells in early breast cancer[J]. *Transl Cancer Res TCR*, 2020, 9(7): 4297–4305. doi: [10.21037/tcr-19-2662](https://doi.org/10.21037/tcr-19-2662).
- [20] He ST, Wei JL, Ding L, et al. State-of-the-arts techniques and current evolving approaches in the separation and detection of circulating tumor cell[J]. *Talanta*, 2022, 239:123024. doi: [10.1016/j.talanta.2021.123024](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123024).
- [21] Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology[J]. *Nature*, 2007, 450(7173): 1235–1239. doi: [10.1038/nature06385](https://doi.org/10.1038/nature06385).
- [22] Lin ZJ, Luo GY, Du WX, et al. Recent advances in microfluidic platforms applied in cancer metastasis: circulating tumor cells' (CTCs) isolation and tumor-on-A-chip[J]. *Small*, 2020, 16(9): e1903899. doi: [10.1002/sml.201903899](https://doi.org/10.1002/sml.201903899).
- [23] Stroock AD, Dertinger SKW, Ajdari A, et al. Chaotic mixer for microchannels[J]. *Science*, 2002, 295(5555):647–651. doi: [10.1126/science.1066238](https://doi.org/10.1126/science.1066238).
- [24] Wang S, Thomas A, Lee E, et al. Highly efficient and selective isolation of rare tumor cells using a microfluidic chip with wavy-herringbone micro-patterned surfaces[J]. *Analyst*, 2016, 141(7): 2228–2237. doi: [10.1039/C6AN00236F](https://doi.org/10.1039/C6AN00236F).
- [25] Wang C, Xu Y, Li SN, et al. Designer tetrahedral DNA framework-based microfluidic technology for multivalent capture and release of circulating tumor cells[J]. *Mater Today Bio*, 2022, 16: 100346. doi: [10.1016/j.mtbio.2022.100346](https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100346).
- [26] Wang ZL, Wu ZE, Sun N, et al. Antifouling hydrogel-coated magnetic nanoparticles for selective isolation and recovery of circulating tumor cells[J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(3): 677–682. doi: [10.1039/d0tb02380a](https://doi.org/10.1039/d0tb02380a).
- [27] Wu X, Lin Z, Zhao C, et al. Neutrophil membrane-coated immunomagnetic nanoparticles for efficient isolation and analysis of circulating tumor cells[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 213: 114425. doi: [10.1016/j.bios.2022.114425](https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114425).
- [28] Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101(1):61–66. doi: [10.1093/jnci/djn419](https://doi.org/10.1093/jnci/djn419).
- [29] Mishra A, Dubash TD, Edd JF, et al. Ultrahigh-throughput magnetic sorting of large blood volumes for epitope-agnostic isolation of circulating tumor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(29):16839–16847. doi: [10.1073/pnas.2006388117](https://doi.org/10.1073/pnas.2006388117).
- [30] Civelekoglu O, Frazier AB, Sarioglu AF. The origins and the current applications of microfluidics-based magnetic cell separation technologies[J]. *Magnetochemistry*, 2022, 8(1): 10. doi: [10.3390/magnetochemistry8010010](https://doi.org/10.3390/magnetochemistry8010010).
- [31] Topa J, Grešner P, Żaczek AJ, et al. Breast cancer circulating tumor cells with mesenchymal features-an unreachable target? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(2):81. doi: [10.1007/s00018-021-04064-6](https://doi.org/10.1007/s00018-021-04064-6).
- [32] Szczerba BM, Castro-Giner F, Vetter M, et al. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression[J]. *Nature*, 2019, 566(7745):553–557. doi: [10.1038/s41586-019-0915-y](https://doi.org/10.1038/s41586-019-0915-y).
- [33] Lu N, Tay HM, Petchakup C, et al. Label-free microfluidic cell sorting and detection for rapid blood analysis[J]. *Lab Chip*, 2023, 23(5):1226–1257. doi: [10.1039/D2LC00904H](https://doi.org/10.1039/D2LC00904H).
- [34] Farshchi F, Hasanzadeh M. Microfluidic biosensing of circulating tumor cells (CTCs): recent progress and challenges in efficient diagnosis of cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 134: 111153. doi: [10.1016/j.biopha.2020.111153](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111153).
- [35] Al-Ali A, Waheed W, Abu-Nada E, et al. A review of active and passive hybrid systems based on Dielectrophoresis for the manipulation of microparticles[J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1676: 463268. doi: [10.1016/j.chroma.2022.463268](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463268).
- [36] Jahangiri M, Ranjbar-Torkamani M, Abadijoo H, et al. Low frequency stimulation induces polarization-based capturing of normal, cancerous and white blood cells: a new separation method for circulating tumor cell enrichment or phenotypic cell sorting[J]. *Analyst*, 2020, 145(23):7636–7645. doi: [10.1039/d0an01033b](https://doi.org/10.1039/d0an01033b).
- [37] Varmazyari V, Habibiyani H, Ghafoorifard H, et al. A dielectrophoresis-based microfluidic system having double-sided optimized 3D electrodes for label-free cancer cell separation with preserving cell viability[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 12100. doi: [10.1038/s41598-022-16286-0](https://doi.org/10.1038/s41598-022-16286-0).
- [38] Zhang Y, Zhang ZA, Zheng DB, et al. Label-free separation of circulating tumor cells and clusters by alternating frequency acoustic field in a microfluidic chip[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3338. doi: [10.3390/ijms24043338](https://doi.org/10.3390/ijms24043338).
- [39] Witek M, Freed IM, Soper S. Cell separations and sorting[J]. *Anal Chem*, 2020,92(1):105–131. doi: [10.1021/acs.analchem.9b05357](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05357).
- [40] Hu X, Zhu D, Chen M, et al. Precise and non-invasive circulating tumor cell isolation based on optical force using homologous

- erythrocyte binding[J]. *Lab Chip*, 2019, 19(15): 2549–2556. doi: [10.1039/c9lc00361d](https://doi.org/10.1039/c9lc00361d).
- [41] Cohen EN, Jayachandran G, Moore RG, et al. A Multi-Center Clinical Study to Harvest and Characterize Circulating Tumor Cells from Patients with Metastatic Breast Cancer Using the Parsortix® PC1 System[J]. *Cancers*, 2022, 14(21): 5238. doi: [10.3390/cancers14215238](https://doi.org/10.3390/cancers14215238).
- [42] Akbarnataj K, Maleki S, Rezaeian M, et al. Novel size-based design of spiral microfluidic devices with elliptic configurations and trapezoidal cross-section for ultra-fast isolation of circulating tumor cells[J]. *Talanta*, 2023, 254: 124125. doi: [10.1016/j.talanta.2022.124125](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124125).
- [43] Zhu Z, Wu D, Li S, et al. A polymer-film inertial microfluidic sorter fabricated by jigsaw puzzle method for precise size-based cell separation[J]. *Anal Chimica Acta*, 2021, 1143: 306–314. doi: [10.1016/j.aca.2020.11.001](https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.11.001).
- [44] Ring A, Nguyen-Sträuli BD, Wicki A, et al. Biology, vulnerabilities and clinical applications of circulating tumour cells[J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(2):95–111. doi: [10.1038/s41568-022-00536-4](https://doi.org/10.1038/s41568-022-00536-4).
- [45] Wang SB, Hong SL, Cai SJ, et al. Negative depletion mediated brightfield circulating tumour cell identification strategy on microparticle-based microfluidic chip[J]. *J Nanobiotechnol*, 2020, 18(1):70. doi: [10.1186/s12951-020-00623-4](https://doi.org/10.1186/s12951-020-00623-4).
- [46] Lee J, Kwak B. Simultaneous on-chip isolation and characterization of circulating tumor cell sub-populations[J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 168: 112564. doi: [10.1016/j.bios.2020.112564](https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112564).
- [47] Green BJ, Marazzini M, Hershey B, et al. PillarX: a microfluidic device to profile circulating tumor cell clusters based on geometry, deformability, and epithelial state[J]. *Small*, 2022, 18(17):2106097. doi: [10.1002/sml.202106097](https://doi.org/10.1002/sml.202106097).
- [48] Schwab FD, Scheidmann MC, Ozimski LL, et al. MyCTC chip: microfluidic-based drug screen with patient-derived tumour cells from liquid biopsies[J]. *Microsyst Nanoeng*, 2022, 8: 130. doi: [10.1038/s41378-022-00467-y](https://doi.org/10.1038/s41378-022-00467-y).
- [49] Lv SW, Zheng D, Chen ZX, et al. Near-infrared light-responsive size-selective lateral flow chip for single-cell manipulation of circulating tumor cells[J]. *Anal Chem*, 2023, 95(2):1201–1209. doi: [10.1021/acs.analchem.2c03947](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c03947).
- [50] Bhat MP, Thendral V, Uthappa UT, et al. Recent advances in microfluidic platform for physical and immunological detection and capture of circulating tumor cells[J]. *Biosensors*, 2022, 12(4): 220. doi: [10.3390/bios12040220](https://doi.org/10.3390/bios12040220).
- [51] Safhi AY. Three-dimensional (3D) printing in cancer therapy and diagnostics: current status and future perspectives[J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(6):678. doi: [10.3390/ph15060678](https://doi.org/10.3390/ph15060678).
- [52] Chen ZZ, Zhao L, Wei LJ, et al. River meander-inspired cross-section in 3D-printed helical microchannels for inertial focusing and enrichment[J]. *Sens Actuat B Chem*, 2019, 301: 127125. doi: [10.1016/j.snb.2019.127125](https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127125).
- [53] Yin PJ, Zhao L, Chen ZZ, et al. Simulation and practice of particle inertial focusing in 3D-printed serpentine microfluidic chips via commercial 3D-printers[J]. *Soft Matter*, 2020, 16(12): 3096–3105. doi: [10.1039/d0sm00084a](https://doi.org/10.1039/d0sm00084a).
- [54] Chu CH, Liu RX, Ozkaya-Ahmadov T, et al. Negative enrichment of circulating tumor cells from unmanipulated whole blood with a 3D printed device[J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 20583. doi: [10.1038/s41598-021-99951-0](https://doi.org/10.1038/s41598-021-99951-0).

(本文编辑 熊杨)

本文引用格式:尉卓凡, 宁智文, 胡波, 等. 乳腺癌循环肿瘤细胞微流控芯片检测研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(11):1804–1812. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.11.020](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.11.020)

Cite this article as: Wei ZF, Ning ZW, Hu B, et al. Research progress of microfluidic chip detection of circulating tumor cells in breast cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2023, 32(11):1804–1812. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.11.020](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.11.020)