

基于微流控技术的循环肿瘤细胞分选研究*

黄 笛 项 楠 唐文来 张鑫杰 倪中华**

(东南大学 江苏省微纳生物医疗器械设计与制造重点实验室 南京 211189)

摘 要 循环肿瘤细胞(CTCs)出现于癌症患者的外周血中,是一种重要的游离态组织样本,对于癌症的早期诊断和预后评估具有非常重要的临床诊断价值。由于血液中 CTCs 含量极少,对其进行分选富集是 CTCs 检测和分析的一个重要预处理步骤。传统的宏观方法虽然也能实现细胞分离,但存在耗时长、样品需求量大、目标细胞损失严重及硬件设备依赖性高等不足。近年来兴起的微流控技术可在微米尺度范围内集成物理、化学及生物手段,易于实现整体器件的微型化和低成本便携式发展,为稀有 CTCs 的高灵敏度、高效分选提供重要的潜在技术手段。本文综述了微流控技术实现 CTCs 分选的最新研究进展,详细阐述了各种被动、主动分选方法的原理及成功应用实例,分析各方法的优缺点,提出一种新型的多级分选芯片结构,并最后探讨了微流控 CTCs 分选芯片在临床应用中所面临的挑战及未来的发展趋势。

关键词 循环肿瘤细胞 微流控技术 分选 癌症诊断

中图分类号:O652.6; Q2 文献标识码:A 文章编号:1005-281X(2015)07-0882-31

Microfluidics-Based Circulating Tumor Cells Separation*

Huang Di Xiang Nan Tang Wenlai Zhang Xinjie Ni Zhonghua**

(Jiangsu Key Laboratory for Design and Manufacture of Micro-Nano Biomedical Instruments, Southeast University, Nanjing 211189, China)

Abstract Circulating tumor cells (CTCs), a “liquid biopsy” circulating in the cancer patients’ peripheral blood, play an important role in the therapeutic and diagnostic of cancer. Due to the extremely low concentration of CTCs in blood, enrichment has been regarded as an essential pre-treatment step for efficient detection of CTCs. Traditional macroscopic separation schemes have achieved a large success in CTCs enrichment. However, these methods still suffer from some disadvantages such as time consuming, large volume blood samples required, easy to lose target cells and labor-intensive. Microfluidics, which integrates physical, chemical and biological technologies at microscale level, provides a miniaturized, low-cost and portable tool for efficient CTCs separation. In this review, we cover the recent advances in passive and active microfluidic CTCs separation methods. The detail working principles, biomedical applications, advantages and drawbacks of these methods are discussed, and a novel multistage microfluidic chip for CTCs separation is also proposed. Finally, we discuss the critical concerns and the future trends of CTCs separation microfluidic devices in clinical applications.

Key words circulating tumor cells; microfluidic technology; separation; cancer diagnosis

收稿:2015年1月,收修改稿:2015年4月,网络出版:2015年7月1日

* 国家重点基础研究发展计划(973)项目(No. 2011CB707601),国家自然科学基金项目(No. 51375089)和江苏省普通高校研究生创新计划项目(No. CXLX13_080).

The work was supported by the National Basic Research Program of China (No. 2011CB707601), the National Natural Science Foundation of China (No. 51375089), and the Jiangsu Graduate Innovative Research Program(No. CXLX13_080).

** Corresponding author e-mail: nzh2003@seu.edu.cn

Contents

- 1 Introduction
- 2 Passive separation techniques
 - 2.1 Microscale filtration
 - 2.2 Field flow and hydrodynamic fractionation
 - 2.3 Deterministic lateral displacement
 - 2.4 Inertia separation
 - 2.5 Biomimetic separation
 - 2.6 Affinity separation
- 3 Positive separation techniques
 - 3.1 Dielectrophoresis separation
 - 3.2 Magnetic separation
 - 3.3 Acoustic separation
 - 3.4 Optical separation
- 4 Multistage separation
- 5 Conclusion and outlook

1 引言

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是指从原发肿瘤扩散进入外周循环血液系统中的肿瘤细胞^[1],它的出现标志着肿瘤细胞已经开始从病灶组织向四周扩散,从而可能导致更多器官组织产生病变^[2-5]。CTCs可在肿瘤发生的早期出现,且研究表明约90%的癌症死亡案例与CTCs扩散有关^[6,7],因此,CTCs检测在重大疾病的早期预防、治疗效果评估、药物敏感性测试及肿瘤复发监测等医学应用方面具有十分重要的意义^[8-12]。CTCs检测的最大难题在于其数量极少:通常在临床上,人们研究的对象是一个非齐性总体,其中包含了大量的细胞信息,而CTCs对人体正常血细胞的比例仅约为 $1:10^9$,或在1 mL血液中仅有1~100个CTCs^[13,14],因此在检测前必须对其进行分选富集,以去除血液中的大部分红细胞(RBCs)和白细胞(WBCs)。

理想的CTCs分选应能达到以下三点要求:首先要能将尽量多的非目标细胞分离出去,即要有较高的纯度(purity);其次要在特定出口处收集到尽量多的目标细胞,即要有良好的重新捕获率(recovery);最后考虑到CTCs数量稀少导致需要处理的样本量较大以及细胞活性等因素,要求能在短时间内处理大量的样品,即要求有较高的通量(throughput)。传统的细胞分选多在宏观尺度下进行,如离心分选^[15-17]、化学溶解^[18]、基于荧光或磁珠技术的抗体标记分选^[19,20]等,这些方法虽然成熟可靠,但系统复杂、操作繁琐、需要样品量大,在细胞化学进展,2015,27(7):882~912

转移、容器更换及样品化学处理等环节极易造成目标细胞的损失,难以满足上述三点分选要求。另外值得一提的是,作为唯一通过美国食品药品监督管理局认证的用于血液中CTCs分选、计数的商业化产品,CellSearchTM(Veridex, USA)采用外面包被了特异性抗体抗EpCAM(上皮细胞粘附因子)的免疫纳米磁珠,通过抗原抗体反应,与血液中表达EpCAM的CTCs结合,并进一步通过荧光反应识别CTCs^[5,21-23]。该技术虽然拥有较高的灵敏度,但也存在无法在普通家庭或野外环境中使用、仪器及消耗的试剂昂贵、样品转移等预处理环节(尤其是细胞与磁珠结合的环节)会损失大量目标细胞及捕获的细胞难以再次利用等不足。

兴起于20世纪90年代的微流控技术^[24-33],通过微米级别的流道精确操控微升、毫升级别的样品。得益于其器件特征尺寸与细胞尺寸正好匹配^[34],微流控技术在细胞分选应用方面优势巨大,近十年来得到了迅猛的发展,出现了大量原型器件^[35-38]。与常规分选方法相比,这些微流控器件具有消耗样品量少、有较高的分辨精度及灵敏度、易于集成及微型化等优点,且在微流控器件中可以连续地实现样品注入-细胞分选-目标细胞识别的整个过程,这极大地简化了操作,并减少细胞的损失。但相对于目前比较成熟的微纳米硬质小球操控技术,在微尺度下操控细胞面临着额外的挑战:首先,微流控环境中的剪切力、焦耳热、跨膜电势等会影响细胞的活性,从而影响实验结果;其次,细胞在物理、化学及生物学上的特性与普通粒子有很大区别,如细胞的可压缩性、可变形性及尺寸上的多分散性会对以尺寸为基准的分选方法造成困扰,不同细胞因结构不同会对它们在电磁场下的表现造成很大差异等。前期的微流控分选技术多应用于血细胞与血浆或血细胞各组分的分离,这些研究探索为更难实现的循环肿瘤细胞分选打下了良好的理论与实验基础。在此基础上,近年来微流控技术被广泛地应用于CTCs分选研究中,并表现出良好的发展前景。

结合本课题组前期在微纳米粒子惯性迁移^[39-46]、介电泳精确操控^[47-53]及细胞特性表征^[54]等领域的研究经验,本文综述了基于微流控技术实现循环肿瘤细胞分选的最新研究进展,对相关具有启发意义的其他细胞分选应用亦有简单涉及。文章将目前的分选应用归为被动分选与主动分选两大类分别展开阐述:被动分选技术包括微结构过滤、场流及水力分选、确定性侧向偏移、惯性分选、仿生分选、

亲和性分选等方法,一般具有通量高、不需要额外施加作用力场的优点;主动分选技术包括介电泳分选、磁分选、声分选、光分选等方法,一般具有分选精度高的优点。每一种分选方法的研究将详细描述微流控系统的分选原理及应用实例,分析各自存在的优缺点及发展趋势。此外,为弥补单一分选技术的不足,融合一种或多种分选方法的多级分选技术拥有巨大的发展前景,本文也将对其单独阐述,并结合本课题组的研究基础提出一种新型的多级分选芯片结构。最后,本文亦将对微流控技术在稀有细胞分选方面的发展前景作出展望。

2 被动分选技术

不同种类的细胞在尺寸、密度、形状、可变形性及亲和性等物理、生物特性上各不相同,依据这些不同的特性,被动分选技术(passive separation techniques)通过流道内的微结构或微流体对细胞施加作用,从而实现分离。这些分离方法主要包括微结构过滤(microscale filtration)、场流及水力分选(field flow and hydrodynamic fractionation)、确定性侧向偏移(deterministic lateral displacement)、惯性分选(inertia separation)、仿生分选(biomimetic separation)及亲和性分选(affinity separation)等几类。

2.1 微结构过滤

微结构过滤(microscale filtration)依据不同种类细胞在尺寸、形状、可变形性等特性上的差异进行分选,主要有围堰式、微柱式、交错流式及薄膜式4种结构。通过改变围堰与盖片间隙、微柱间距或薄膜孔径,可实现对不同尺寸细胞的筛选。例如饼状红细胞直径约 $6\sim 9\ \mu\text{m}$,厚 $1.8\sim 2.8\ \mu\text{m}$,可以通过 $3\ \mu\text{m}$ 的间隙;球状白细胞直径约 $6\sim 10\ \mu\text{m}$,可以通过 $7\ \mu\text{m}$ 的间隙, Ji等^[55]据此设计了 $3.5\ \mu\text{m}$ 的间隙,分别利用4种结构分离红细胞与白细胞。

围堰式结构又称为坝式结构,通过精确设定围堰顶端与顶盖间的间隙,使得只允许小细胞通过而大细胞被拒止,实现两者分离。该结构早期多用于筛除血液中的所有细胞组分,以得到纯的血浆^[56, 57]。Wilding等^[58]在主流道内制作若干如图1(a)所示距顶部间隙 $3.5\ \mu\text{m}$ 的围堰式结构,成功将红细胞与白细胞分离开来;Chen等^[59]设计了用两个围堰分隔三个“样品池”的结构,将肺腺癌细胞SPC-A-1从血液中分离出来, $5\ \mu\text{m}$ 间隙的围堰对CTCs的重新捕获率高达99%。在上述两种结构

中,围堰结构均垂直于主流动方向,致使目标细胞会逐渐在围堰结构前堆积,形成堵塞。为解决此问题,Chen等^[60]设计与主流动方向平行的围堰结构,通过两条围堰将主流道分成平行的三部分。从中间主流道注入的样品中,红细胞允许从围堰顶端间隙通过进入两侧边流道,而白细胞被约束在主流道内。该结构虽解决了堵塞问题,但分选效果较差。Sim等^[61]设计了一条 $2.79\ \text{cm}$ 的超长围堰结构,围堰间隙 $8\ \mu\text{m}$,并通过EpCAM抗体将微珠修饰到人乳腺癌细胞MCF-7表面。通过微珠修饰的癌细胞尺寸增大,与白细胞不再有重叠部分,使分离更加精确。该结构能达到92%的重新捕获率与52%的纯度,但器件尺寸较大,不利于片上集成。总体来说,围堰式结构在稀有细胞分选方面的应用较少,这主要应是由于围堰式结构加工精度要求高,通量及分选纯度低以及难以解决堵塞问题等因素造成的。

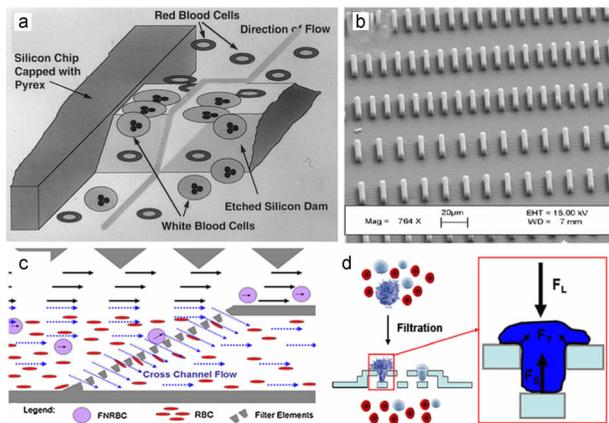


图1 微结构过滤结构示意图:(a)围堰式^[58];(b)微柱式^[63];(c)交错流式^[75];(d)薄膜式^[88]

Fig. 1 Schematic illustrations of microscale filtration: (a) wire type^[58]; (b) pillar type^[63]; (c) cross-flow type^[75]; (d) membrane type^[88]

早在1994年就有采用微柱阵列结构筛选红细胞应用的出现^[62],但采用微柱式结构分选细胞极易在流体流动的方向上形成堵塞,限制了该结构的发展。为缓解堵塞情况的发生,近期一些研究小组设计了若干新型结构。Mohamed等^[63]设计了由4段微柱阵列结构串联而成的分选芯片,如图1(b)所示,微柱间间隙逐渐缩小,注入芯片中的细胞依据其自身尺寸的不同会在不同片段处被捕捉,从而缓解堵塞。该研究组利用4段间隙分别为 20 、 15 、 10 及 $5\ \mu\text{m}$ 的芯片结构,在 $10\ \mu\text{m}$ 间隙处捕捉到神经母细胞瘤细胞(NB cells),而其他血细胞流经整个芯片;利用四段间隙分别为 15 、 10 、 5 及 $2.5\ \mu\text{m}$ 的芯片结

构,在 2.5 μm 间隙微柱处捕捉到白细胞,而红细胞流经整个芯片。实验中捕捉到的神经母细胞瘤细胞对检测小儿颅外肿瘤有重要意义。后期, Mohamed 等同样利用这一原理捕捉胎儿有核红细胞(FNRBCs)^[64],实现其从孕妇外周血中的分离;他们还通过该结构成功地从人血中分选富集了 8 种循环肿瘤细胞^[65]。在最新的研究中,Preira 等^[66]利用间隙渐缩的微柱阵列,依据细胞可变形性的不同,分离了柔性及硬性的 THP-1 细胞,流量达到 12.7 mL/h,但该结构分选后的细胞仍停留在流道内,难以单独富集出来,且该结构不适用于处理含有大量细胞的样品。Tan 等^[67]创新性地提出了另一种过滤结构,结构中每个过滤单元由三根独立的、呈圆弧形布置的微柱构成,微柱间间隙 5 μm 以保证只有尺寸较大的癌细胞不能通过。在过滤单元捕捉到癌细胞后,上游来的其他细胞会因为流阻增大而从旁边绕行。每个过滤单元捕捉一个癌细胞,避免了癌细胞堆积造成的堵塞。通过该结构从血液中分离人乳腺癌细胞(MCF-7)及人结肠癌细胞(HT29),分选效率大于 80%,且分选后细胞保持了良好的活性。McFaul 等^[68]通过改善操作方法以规避堵塞带来的影响,该研究组通过设计上游处间隙大、下游处间隙小的漏斗形微柱阵列分选小鼠淋巴瘤细胞(MLCs)及人外周血单核细胞(PBMCs)。正向流动时,更小更易变形的 PBMCs 可轻易穿过微柱阵列,而较大且不易变形的 MLCs 被捕捉住;此后施加反向流场,MLCs 被从微柱间释放,阵列得以疏通,而此时 PBMCs 由于下游处微柱间间隙较小,无法进入阵列。通过来回反转流场方向可成功分离两种细胞,且目标细胞的重新捕获率及纯度都在 95% 以上。此外,为增加 CTCs 与血细胞在尺寸上的区分度, Kim 等^[69]通过 EpCAM 抗体在 MCF-7 上修饰若干 3 μm 的微珠,使 MCF-7 细胞平均尺寸从 16.6 μm 提升至 25.4 μm ;同时该研究组在每个圆柱的两侧设置弧形凹槽,以在相邻的两个圆柱之间形成一个扩容的 MCF-7 捕捉空间,缓解对细胞的挤压变形。通过这些改进,MCF-7 的重新捕获率可达到 92%。

交错流结构分选细胞虽然在原理上与围堰式或微柱式类似,但在结构上采用了微结构与主流方向呈一定角度的设计。由于被拒止的细胞能继续沿微结构方向运动并最终从出口流出,避免了分选芯片在使用一段时间后间隙处细胞饱和的情况,故可在极大程度上减少堵塞的发生。Ji 等^[55]通过实验比较四种结构,也得出交错流分选效率最高且最易化学进展, 2015, 27(7): 882 ~ 912

于集成的结论。鉴于这些优势,交错流结构应用相对广泛,可分离全血中的血浆^[57, 60, 70, 71]、白细胞^[72, 73]等。近年来一些研究组将交错流结构应用在稀有细胞分选上,如 Murthy 等^[74]在成功分离白细胞与红细胞的工作基础上^[73],采用相同的结构,重新设计尺寸来分选新生大鼠心肌细胞和新生大鼠非心肌细胞。该结构包括一条中间流道与两条侧边流道,通过一系列微型分支流道使两者连通,且两条侧边流道宽度逐渐增加,以保证各分支流道出口处压力一致。使用该芯片可在中间流道出口处收集到大部分 9 ~ 11 μm 新生大鼠心脏细胞,在两侧边流道出口处收集到大部分 7 ~ 9 μm 的新生大鼠非心脏细胞。该流道结构可在分选后仍较好地维持细胞的活性,但通量较低,仅有 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。Lee 等^[75]设计了另一种交错流分选结构,如图 1(c)所示,在该结构中,与主流方向呈 5° 倾角的单排微柱阵列将上游处的主流道在下游处分成两支。在 0.3 mL/min 的通量下,从入口处注入的含有新生胎儿有核红细胞(FNRBCs)及成人无核红细胞(AARBCs)的混合溶液在流经微柱阵列时,尺寸较大的 FNRBCs 沿阵列方向偏转进入上分支流道,重新捕获率达 74%;尺寸较小的 AARBCs 穿过微柱,继续沿原有方向流动进入下分支流道,重新捕获率为 46%。该应用在孕妇非侵入性产前诊断应用方面具有重要意义。值得一提的是, Geng 等^[76-78]将微柱阵列、围堰结构及交错流方法等概念集成到螺旋流道内,结合离心原理实现对血浆的分离。若该结构经过合适的改进,在 CTCs 分选上的应用应也具有一定的潜力。

薄膜分选通过在薄膜上设置孔径,只允许特定尺寸以下的细胞通过以实现分选。早期的研究中多采用多孔聚碳酸甲酯薄膜对 CTCs 进行过滤分选^[79-84],但使用该薄膜存在若干缺陷:首先是薄膜上的孔径随机分布,多次试验往往得到一个上下浮动的分选效率;其次是孔隙率较低,导致通量不高;最后是难以集成入微流控芯片内。值得一提的是国内的刘大渔团队^[85]成功将带有 8 μm 孔径的聚碳酸酯薄膜集成入芯片内,对 HeLa 细胞的重新捕获率可达到 85%。为克服这些缺陷,近年来,一些可微加工、易集成的材料得到广泛应用,通过微加工可在这些材料上精确定义孔径的形状、尺寸及排列,在微流控芯片内集成这些多孔薄膜对细胞进行分选的研究也取得了长足的进展。聚对二甲苯(parylene)作为一种生物相容性材料,且有着良好的延展性,因此

成为制作薄膜的良好选择。Zheng 等^[86]利用带有 11 μm 圆形孔径或 14 μm 椭圆孔径的聚对二甲苯薄膜过滤血液中的人体前列腺癌细胞 LNCaP, 并通过在孔径两侧集成电极进一步对捕获的癌细胞进行基因分析。该芯片可在 10 min 内处理 7.5 mL 的样品, 效率高达 90%。同属该研究组的 Lin 等^[87]利用带有 8 μm 圆形孔径的聚对二甲苯薄膜对肿瘤患者外周血中的多种癌细胞进行分选试验, 研究显示该结构对 CTCs 的重新捕获率大于 90%, 且可直接作为观测、分析平台, 并通过对比表明其分选效果优于 CellSearch。此外, 为避免 CTCs 在孔径处因受到过大的挤压力而失去活性, Zheng 课题组后期又设计了一种 3D 结构的分选薄膜^[88], 如图 1(d) 所示, 该结构由上下两层聚对二甲苯薄膜组成, 上下层孔径的位置相互错开, 下层薄膜对上层孔径处捕捉到的癌细胞施加反向作用力, 起支撑作用。相对于 2D 结构的薄膜, 采用 3D 结构分选 LNCaP 或人体乳腺癌细胞 MCF-7, 可有效减轻对细胞的损伤, 更好地维持细胞的活性。Xu 等^[89]采用聚焦离子束刻蚀, 在 10 μm 厚的聚对二甲苯薄膜上制作了另一种宽 6 μm 长 40 μm 的矩形孔径, 利用该结构对人前列腺癌细胞 PC3 和 DU145 进行分选试验, 在大于 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流量下可达到 90% 的纯度, 分选后的癌细胞浓度提升了 200 倍。除了聚对二甲苯, 聚对二甲基硅氧烷 (PDMS) 亦是制作薄膜的良好材料。Chen 等^[90, 91]采用软光刻技术制作了 10 μm 厚, 面积达到 3 cm \times 3 cm 的超大 PDMS 薄膜层, 同时薄膜层的孔隙率高达 30%, 使用集成该薄膜的芯片可实现 20 mL/min 的极高流量。同时, 该课题组通过在人外周血单核细胞 (PBMCs) 上修饰微珠, 克服了因细胞变形及尺寸不均对分选精度造成的负面影响, 最终获得的细胞纯度大于 97%。Lim 等^[92]则采用硅基制作多孔薄膜, 通过深反应离子束刻蚀, 在直径 5 mm 的硅薄膜上制作 10^5 个 10 μm 微孔, 超高的孔隙密度使得薄膜的孔隙率大于 40%。这些优势保证了可使用该芯片处理未经稀释的血液, 在 1 mL/min 的高流量下对 MCF-7 及人肝癌细胞 HepG2 的重新捕获率大于 80%。此外, 近年来还有一些研究选择镍^[93, 94]、塑料片材^[95]或商业滤纸^[96, 97]等作为制作薄膜的材料, 也都成功实现了对血细胞的分选。薄膜分选的一个不足之处在于其需要在微通道内嵌合薄膜结构, 这对芯片的键合提出了较高的要求, 使工艺趋于复杂; 此外, 虽然上述薄膜结构能部分实现高效、高通量的细胞筛选, 但同围

堰式及微柱式分选一样, 薄膜分选也未能克服堵塞带来的困扰^[55], 以上的研究中鲜有提及堵塞对分选的负面影响, 如何利用薄膜结构实现对大量样品的连续分选目前仍是一个挑战。

微结构过滤可以依据细胞尺寸的不同, 通过精确设定过滤结构实现细胞的分选或富集, 原理简单, 应用研究也较为成熟, 但其特定的设计原理及操作方式致使其仍面临很多局限, 主要包括流量低、易堵塞、细胞族群尺寸不均致使分选效率低等。此外, CTCs 等柔性细胞在间隙处会受到较大的挤压, 产生变形, 尤其在流速上升时其活性会受到较大损伤^[98]。可喜的是目前出现了一些新型结构, 为克服这些局限提供了潜在的解决途径: 如通过增大薄膜面积^[90, 91]及孔隙率^[92]以提高流量、通过排列间隙逐渐缩小的微柱^[63-66]或设置漏斗形微柱^[68]等以避免堵塞、在目标细胞上镶嵌微珠以提高分辨率^[61, 69]、设置双层结构薄膜以提高细胞活性^[88]等。总而言之, 微尺寸过滤作为一种出现较早, 原理、操作都特别简单的分选方法, 仍需要研究者在结构设计、操作方法上不断创新, 如此才有广泛的应用前景。

2.2 场流及水力分选

场流分选 (field flow fractionation, FFF) 及水力分选 (hydrodynamic fractionation) 都是依据在低雷诺数条件下粒子中心的运动轨迹与经过其中心处的流场的速度、轨迹一致的原理, 通过合理设计各入口、出口的结构, 并精确控制入口流速, 实现对不同大小粒子的分离。由于场流分选及水力分选操作方法及分选原理相似, 故本文将其合并为一节讨论。

场流分选是多种技术的集合体, 其通过外场对微通道中的粒子施加垂直于流动方向的场力, 该场力可以是流场力、电场力、重力场力、离心场力等^[99, 100]。Vykoukal 课题组^[101]提出了一种结合介电泳的场流分选技术 (dielectrophoretic field-flow fractionation, DEP-FFF), 如图 2(a) 所示, 在浅平的通道腔体底部布置若干电极, 对通道中的粒子施加负向介电泳力, 并在与沉降力的共同作用下使粒子到达平衡位置, 具有不同介电属性及密度的粒子因而具有不同的悬浮高度。另一方面, 样品流剖面速度特征曲线呈抛物线状, 中间部分流速高, 靠近上下壁面处的流速低, 因此依据悬浮于不同高度的粒子具有的不同运动速度, 可实现两者的分离。利用该原理, Wang 等^[102]在 2 mL/min 的流速下分离了 MDA-435 人乳腺癌细胞和 T 淋巴细胞, 分选后

MDA-435 纯度大于 98%, T 淋巴细胞纯度大于 92%, 整体细胞重新捕获率在 70% 左右。此外, 该课题组还在同样流速下对 MDA-435 与 CD34 + 造血干细胞、单核细胞与 B 淋巴细胞等对象进行分选试验, 并在 0.5 mL/min 流速条件下进行了从血液中富集白细胞的实验, 也都取得了不错的效果。采用类似的设计, Vykoukal 等^[101] 富集酶处理脂肪组织中初始含量极少 (<2%) 的干细胞 NG2 阳性细胞, 初始时将样品流注入腔体中并静置 10 min, 而后施加 1.5 mL/min 的流速, 经过分选, NG2 阳性细胞浓度提升 14 倍。Gascoyne 等^[103] 从外周血中分离出三种癌细胞 (MDA-MB-435, MDA-MB-468 及 MDA-MB-231), 重新捕获率在 90% 以上。而 Shim 等^[104] 则利用 DEP-FFF 结构实现对 CTCs 膜电容、密度及形态等特性的表征。值得注意的是, 不同于其他将不同细胞从不同出口导出的分选技术, DEP-FFF 技术依据粒子不同的运动速度进行分选, 更像是一种

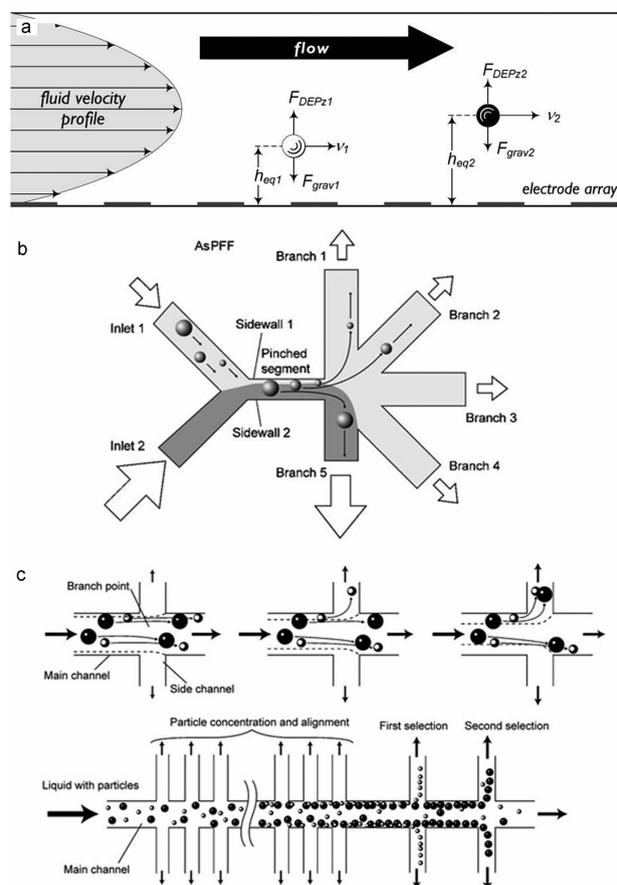


图 2 (a) 场流分选^[101]; (b) 挤压流分选^[107]; (c) 水力分选^[108]

Fig. 2 (a) Field flow fractionation^[101]; (b) pinched flow fractionation^[107]; (c) hydrodynamic filtration^[108]

“洗提”技术^[105], 其出口往往直接与流式细胞仪等仪器相连, 从而直接对分选结果进行分析。一般来说, 场流分选技术可以获得较高的重新捕获率, 但通量偏低 (10^6 cells/min)。

挤压流分选 (pinched flow fractionation, PFF) 也可算是一种场流分选技术, 但不同于传统场流分选的“洗提”技术, 挤压流通过引入鞘液流改变流场, 将大小粒子挤压至主流道壁面处, 并在不同的出口处收集。PFF 的概念最早由 Yamada 等^[106] 提出, 并用其实现了 15 μm 和 30 μm 聚合物粒子的好分离。同属该课题组的 Takagi 等^[107] 在此基础上进行改善, 提出了如图 2 (b) 所示的非对称挤压流分选 (asymmetric pinched flow fractionation, AsPFF) 结构, 实现了更精确的 1 ~ 5 μm 聚合物粒子分选, 并应用于血液中红细胞的分离。PFF 及 AsPFF 在入口及收集段结构、原理均相同: 两个入口, 入口 1 注入混有不同尺寸粒子的样品流, 入口 2 注入不带有粒子的挤压流, 通过合理的控制流速, 在收集段将样品流压迫至靠近壁面处, 同时使其中的粒子紧贴壁面排列。由于粒子半径不同, 大粒子的中心距壁面的距离较小粒子远, 故在放宽的出口处, 大、小粒子将沿着经过其中心的不同流线运动, 进入不同的分支出口, 实现连续分选。相较于 PFF 各分支出口结构相同, 流场均匀分布, AsPFF 将距样品流较远的分支出口设计成较短或较宽的形状, 减小了该出口的流阻, 从而使较大的粒子能够进入其中, 提高分选精度。Takagi 等将血液稀释至 0.3%, 利用 AsPFF 结构, 在 20 $\mu\text{L}/\text{h}$ 的样品流流速下从相邻的两个分支出口处收集到全部的红细胞。有趣的是, Takagi 指出对于非球形的粒子, 其运动轨迹取决于其某方向上的最小尺寸。考虑到红细胞呈圆饼形, 其直径约 8 μm 但厚度仅有 2 μm , 若采用该结构分选其与球状的稀有细胞, 可增大尺寸上的差异性, 提高分选精度。但挤压流分选的缺点亦是显而易见的: 为避免粒子间的堆叠、碰撞, 粒子的浓度不能太高; 为使粒子能沿壁面排列需精确控制样品流与挤压流的流速, 一般两者的流速比约为 1:50, 且同时为避免作用于粒子上的惯性力影响其运动轨迹, 流速不能设计的太高, 这些致使样品流流速偏低。综合这两方面因素, 挤压流分选能处理的样品通量极低, 限制了其在稀有细胞分选上的应用。

在挤压流分选的基础上, Yamada 等^[108] 提出了另一种基于尺寸的被动分选技术——水力分选技术。如图 2 (c) 所示, 该结构由一条主流道和若干条

垂直于该主流道的分支流道组成。在上游处,主流道中的流速较高,流体流经分支流道时会有部分进入分支流道中,而所有粒子仍停留在主流道中并被拖拽至壁面处,且小粒子中心位置距离壁面的距离更近;在主流道中下游处,流速降低,小粒子得以进入分支流道并通过出口收集;在主流道下游处,流速进一步降低,大粒子也得以进入分支流道,并在不同出口处收集,实现两者的分选。据此原理,Yamada等分别分离了 $2.1/3.0\ \mu\text{m}$ 及 $1.0/2.1\ \mu\text{m}$ 的粒子,并在 $20\ \mu\text{L}/\text{min}$ 的条件下实现了对红细胞/白细胞的分离:初始样品中红细胞数量为白细胞的780倍,分离后白细胞的相对浓度提升约29倍。采用类似的结构,Kersaudy-Kerhoas等^[109]实现了红细胞与血浆的分离。在之前的工作基础上,Yamada等^[110]还设计了另一种单侧排列分支的水力分选结构,该结构集成了挤压流分选的概念,通过引入与主流动方向垂直的鞘液流或分流环结构,将粒子挤压至设有分支流道一侧的壁面处,并优化了出口结构。在 $50\ \mu\text{L}/\text{min}$ 的条件下,利用该结构分选平均尺寸约 $20\ \mu\text{m}$ 的肝实质细胞和平均尺寸约 $7\ \mu\text{m}$ 的非实质细胞(包括上皮细胞等),取得了良好的分选效果。类似地,Kim等^[111]采用全血液做为分选对象,并使用裂解液作为鞘液流,红细胞、血小板及血浆等进入分支流道,同时在主流道出口处收集到纯度高达96.9%的白细胞,重新捕获率亦高达97%。由于该技术的分选效果主要取决于运动流线而不是流道尺寸,因此实际应用中对流速控制的要求较高,但可以设计较大的流道尺寸以避免堵塞,提高通量。但另一方面,较大的尺寸及较多的出口使得水力分选难以与其他技术集成,限制了其在稀有细胞分选方面的应用。

Sethu等^[112, 113]设计了另一种鱼骨状的水力分选装置,用于去除红细胞,富集白细胞。该装置设有三个入口,中间入口引入的血液样品被两侧入口引入的鞘液流挤压,聚焦成细束进入混合区。混合区流道较长,呈弯曲形,且在流道底部设有鱼骨状凸起结构。聚焦成束的血液样品与两侧溶解液流经鱼骨状结构时产生水力作用,形成紊流,使得两者能快速混合,红细胞得以被快速溶解,由此可在出口处收集到白细胞。另一种被命名为水泳(hydrophoresis)的水力分选结构通过在流道(上)下壁面设置一系列与主流动方向呈一定角度的条状凸起结构,在流场内产生侧向压力梯度场,驱使其中的粒子发生侧向迁移。采用水泳装置,Choi

等实现了聚苯乙烯粒子^[114]、红细胞与白细胞^[115]以及血小板与血细胞的分离^[116]。Bernate等^[117]在该结构基础上结合沉降作用,使红细胞与白细胞流经条状凸起时偏转不同的角度,亦实现了两者的分离。此外,Choi等^[118]将条状凸起改成V字形凸起,使流体流过时在主流道截面方向上产生漩涡,将不同尺寸的粒子迁移至不同的平衡位置。利用该结构可实现对不同尺寸聚苯乙烯粒子的分离以及对红细胞的聚焦。需要指出的是在流道中设置凸起结构诱导产生水力作用的分选方法通量不高,仅约在 $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ 的量级。

在水力分选结构中,由于尺寸较大的稀有细胞不会进入中上游处的分支结构中,使得可以在下游处收集几乎全部的稀有细胞,重新捕获率接近100%,但该结构的通量及纯度都不高。此外,该结构众多的分支出口也使得操作较为繁琐。

2.3 确定性侧向偏移

确定性侧向偏移(deterministic lateral displacement, DLD)通过一排排交错排列的微柱阵列,依据粒子或细胞尺寸的不同,实现连续分离。不同于传统微尺寸过滤中的柱状阵列只允许小粒子通过而拒止大粒子,DLD阵列允许小于临界尺寸的粒子穿越柱间间隙继续沿主流动方向运动,而大于临界尺寸的粒子在每一排处都会横向迁移至相邻的流线中,从而能沿着与主流动方向成一定角度的轨迹运动,实现两者的连续分离。

Huang等^[119]提出了如图3(a)所示的DLD结构:DLD阵列由一排排立柱组成,每排立柱较上一排偏离三分之一相邻立柱中心距的距离,由此三排形成一个周期。流经相邻立柱间的流体在下一排处遇上阻碍,并沿立柱分岔绕行,据此可将相邻立柱间的流体分成三条流线。当小粒子中心处于流线1中时,其将沿着同一条流线前行,运动轨迹为1-3-2-1,即主流动方向;而对于半径大于柱间流线1宽度的大粒子,其每经过下一排阵列时都会从流线1横向迁移至流线2中,运动轨迹为2-2-2-2,即沿着与主流动呈一定角度的方向移动。通过实验,Huang等定义该临界尺寸为 $2 \times 20\% \times d$,其中 d 为柱间间隙宽度,采用间隙为 $1.6\ \mu\text{m}$ 的DLD圆柱阵列,对聚苯乙烯粒子尺寸的识别精度达到 $20\ \text{nm}$ 。Inglis等对临界尺寸进行了详细地理论分析,并实现了 $2.3 \sim 22\ \mu\text{m}$ 粒子的分选^[120];随后又对边界做出优化,如图3(b)所示,通过将每一排的边界位置移动一个确定的量,降低了边界处非常态流动对分选

效率的影响^[121]。Long 等^[122]则缩小了立柱的尺寸,设计出“点状”的 DLD 阵列,可实现对不同尺寸粒子在多个方向上的偏移,且缩小了的立柱尺寸有利于减轻流阻,提高通量。Beech 等^[123]则在 *Lab Chip* 的封面文章中创新性地提出可调节的 DLD 阵列:采用高弹性的 PDMS 材料制作芯片结构,通过施加外力拉伸芯片可增大柱间间距,实现同一块芯片对不同尺寸范围粒子的分选。

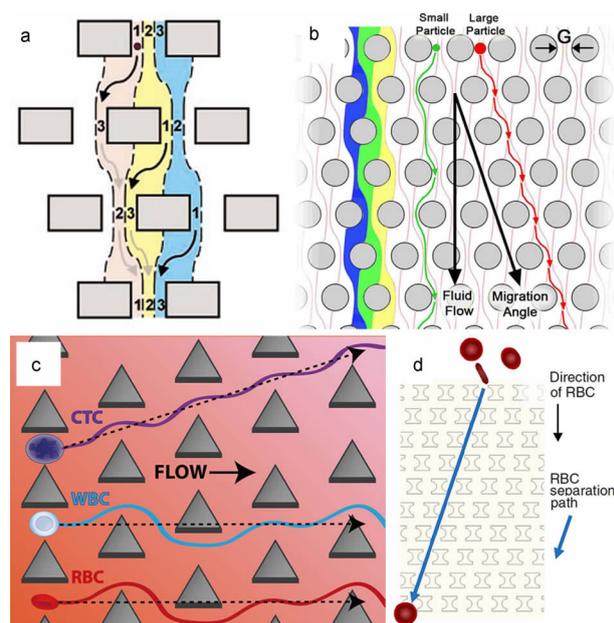


图 3 确定性侧向偏移分选结构示意图:(a)原理图^[119]; (b)圆形 DLD 阵列^[121]; (c)三角形 DLD 阵列^[133]; (d)“I”形 DLD 阵列^[134]

Fig. 3 Schematic illustrations of deterministic lateral displacement separation: (a) principle schematic^[119]; (b) circular DLD array^[121]; (c) triangular DLD array^[133]; (d) I-shaped DLD array^[134]

由于粒子的临界尺寸取决于柱间间距,因此可调节合适的柱间间距以用于尺寸更大的细胞分选。Zheng 等^[124]通过 $14\ \mu\text{m}$ 间距的 DLD 阵列分离了白细胞与红细胞, Davis 等^[125]做了进一步的改进,将不同柱间间距的 DLD 阵列集成在同一流道内,依次从血浆中分离出白细胞、红细胞及血小板,实现了对全血的分离。但采用该方法需要及时把上游处分离出的白细胞从额外的出口导出,以避免在下游更小间距阵列处形成堵塞,增加了芯片的复杂性。Inglis 等^[126]则在一块芯片内平行集成六条边界优化后的 DLD 阵列流道,实现通量大于 $1\ \text{mL}/\text{min}$ 条件下对血液中白细胞的富集,重新捕获率约为 98%,相对浓度提升 10 倍。Beech 等^[127]探究了 DLD 阵列

如何利用细胞形状、可变形性等特性的差异进行分选,并通过实验对红细胞进行分选富集。Artemis 公司的 Huang 等^[128]在设计的产品中集成了 DLD 阵列芯片,在 $0.35\ \text{mL}/\text{h}$ 的流量条件下可去除孕妇外周血中 99.9% 的红细胞,富集到有核红细胞和白细胞。此外, Holm 等^[129]还优化了流道的深度,以突出细长型的寄生锥虫和圆饼状红细胞的形态差异,可移除 99.5% 的红细胞,实现两者的分离。

DLD 阵列中的立柱不仅可以是圆形,亦可以是其他形状。Loutherback 等^[130]设计了三角形的立柱阵列,相比圆形立柱可降低 DLD 芯片的流阻和驱动压力,弱化堵塞发生的可能及细胞变形对分选的影响,同时拥有更宽广的尺寸分选范围。Liu 等^[131]对比了圆柱与三角形 DLD 阵列对外周血中多种稀有癌细胞的分离效果,指出在小于 $50\ \mu\text{L}/\text{min}$ 的低流速下两者均有较高的重新捕获率,但当流速升高时,圆柱阵列的重新捕获率显著降低,而三角阵列仍能保持较高的重新捕获率。Liu 等还探究细胞尺寸、流速与分选效果之间的关系:在 $25\ \mu\text{m}$ 间距的三角阵列中,尺寸较大的 MCF-7 在 $20\sim 2000\ \mu\text{L}/\text{min}$ 的流速范围内均能保持大于 99% 的重新捕获率,而尺寸较小的人乳腺癌细胞 MDAMB231 在低于 $100\ \mu\text{L}/\text{min}$ 的流速条件下重新捕获率近 100%,但当流速上升至 $2000\ \mu\text{L}/\text{min}$ 时重新捕获率显著降低至 80%。由此可见,在 DLD 分选技术中细胞尺寸越大、流速越低,则分选效果越好。此外, Liu 等还在 DLD 阵列出口处设计一排柱间间距从 $25\ \mu\text{m}$ 渐缩至 $8\ \mu\text{m}$ 的微柱,以此保证迁移至中间出口处的 CTCs 不会迁移至两侧出口中,提高重新捕获率。近期, Liu 等^[132]还通过平行集成多条三角阵列 DLD 流道并结合抗体的亲和分选技术,实现了在 $9.6\ \text{mL}/\text{min}$ 的高通量下达到 90% 重新捕获率、50% 纯度的高效分选,分选后 CTCs 富集程度提升 1500 倍。Loutherback 等^[133]还通过在单根 $2.5\ \text{mm}$ 宽, $25\ \text{mm}$ 长的流道内布置 $42\ \mu\text{m}$ 间隙的三角形 DLD 阵列,如图 3(c) 所示,实现 $10\ \text{mL}/\text{min}$ 的超高通量,用其分选血液中的 CTCs,可获得 85% 的 CTCs 重新捕获率。较高的流速可使细胞在芯片中快速通过,在剪切流中暴露的时间短,这保证了其能维持较好的活性,但该实验中 CTCs 富集程度不高,出口处浓度仅为入口处的 3.4 倍。在其他研究中, Zeming 等^[134]还考虑到红细胞形态上非球形的形状特点,设计出如图 3(d) 所示可诱导红细胞产生旋转的“I”形立柱的 DLD 阵列结构,成功从血液中分离出 100% 的红细胞,分选效率

及精度优于传统结构。Ranjan 等^[135]则在此基础上,进一步设计出“T”形、“L”形的立柱结构,并探讨了它们对非球形粒子的分选效果。

DLD 阵列还有一些其他方面的应用。Inglis 等^[136]依据细胞流经 1.2 mm 宽 DLD 阵列后偏移的角度来定义细胞的“水力”尺寸,运用该方法测量细胞尺寸的精度可与商用流式细胞仪比拟,并仅依据尺寸上的差异就能区分良性淋巴细胞与恶性淋巴细胞。Morton 等^[137]在 DLD 阵列中注入多条、独立的化学试剂流束,利用细胞在 DLD 阵列中斜向前行穿越流束的过程,依次完成对细胞的溶解、标记、洗涤等操作。

确定性侧向偏移同样是一种依据粒子尺寸、形态差异的被动分选技术,其优点是对尺寸的分辨率高,具有高通量分选应用的潜力。但是同微结构过滤分选方法一样,DLD 柱状阵列存在堵塞的可能,且细胞簇尺寸不一,细胞的可变形性、微柱的尺寸甚至表面粗糙度等都会对分选效率造成影响。

2.4 惯性分选

惯性分选(inertia separation)作为一种被动分选技术,通常情况下流速较高,雷诺数在 100 左右,因而具有较高的通量。微流控芯片中粒子所受的惯性效应主要包括惯性迁移以及弯流道中的二次流。在直流道惯性迁移微流动中,因流道中间部分流速高,靠近壁面处流速低,故速度梯度场会对其中的粒子施加指向壁面的剪切诱导惯性升力(shear-gradient lift force);而当粒子靠近壁面时,又会受到壁面对其施加的指向流道中心的壁面诱导惯性升力(wall-induced lift force)。剪切诱导惯性升力与壁面诱导惯性升力的合力称为惯性升力(inertial lift force)^[138-141]。直流道中的粒子在特定雷诺数条件下受到惯性升力的作用迁移至特定的平衡位置,如圆形截面流道中粒子迁移至 0.6 半径处的环面上^[142, 143];正方形截面流道中迁移至靠近四个壁面中心处的平衡位置^[144, 145];高深宽比直流道中迁移至靠近长壁面中心的两个平衡位置^[146-149]等。直流道惯性分选作为一种被动分选技术,不需要其他外力场的作用,可通过平行化集成大大提升通量^[150, 151]。

流体流经弯流道时,流道中线处的流体相较于靠近壁面流体处具有更高的流速,在离心力的作用下向外流动;由于流道封闭,外壁面处的流体受挤压被迫沿上下壁面回流,因而形成两个对称的漩涡,该现象被称为 Dean 流或二次流^[152-154]。弯流道中大

于特定尺寸的粒子在惯性升力及 Dean 拽力的共同作用下,由入口处的随机分散状态逐渐迁移至特定的平衡位置,且不同尺寸的粒子具有不同的平衡位置。弯流道对微纳米硬质小球分选富集的研究进展迅猛,出现了弧线形^[146, 155-157]、对称及非对称正弦曲线形^[144, 158, 159]、螺旋形^[160-162]、双螺旋形^[163, 164]等多种结构。

尽管惯性技术在微纳米硬质小球粒子聚焦、分选方面的应用较为成熟,但仅在近些年才被应用于细胞分选上,并获得了广泛关注。直流道相对于弯流道而言,由于其对不同尺寸粒子聚焦的平衡位置近似,故鲜见其在分选方面的应用。这其中,Wu 等^[165]巧妙利用鞘液夹流把样品流聚焦到靠近流道壁面处,根据不同尺寸细胞在惯性升力作用下离开壁面的速度差异来实现分选。如图 4(a)所示,该装置成功地从红细胞中分离出了高纯度的大肠杆菌(*Escherichia coli*, 1 μm),通量为到 18 $\mu\text{L}/\text{min}$,分选后大肠杆菌的纯度高达 99%,相对浓度提升 300 倍。但该分选通量偏低,同时需要精确控制鞘液流速来实现样品流的预聚焦,且不可避免地引入了传统鞘液夹流的众多缺点。Zhang 等^[166]提出了另一种独特的结构,通过利用毛细管中低流速下红细胞的聚集效应加速红细胞与血浆的沉降分层,并通过两次弯折的毛细管结构改变分层方向,进而在下游处较宽的流道腔体中实现两者的分离。该芯片成本低廉,可在处理具有较高血细胞比容样品的条件下实现血浆的连续分离,不易产生堵塞且不损伤血细胞。

除了利用直流道中惯性迁移来实现粒子的高效操控之外,Park 等^[167, 168]设计了缩扩结构(multi-orifice flow fractionation, MOFF)的微流控芯片,通过利用惯性升力和流道结构诱导产生的涡流将粒子排列到两侧或中间的平衡位置,实现对聚苯乙烯粒子的良好分选。Warkiani 等^[169]通过缩扩结构分选血液中的疟原虫,对疟疾检测的灵敏度比传统血涂片法高 100 倍。Bhagat 等^[170]则在传统缩扩结构上略作改进,设计出一种用于分选 CTCs 的缩扩结构微流控芯片,如图 4(b)所示。该缩扩流道由 75 个缩扩单元构成,前 70 个单元为粒子聚焦区域,流道收缩部分宽 20 μm ,将所有细胞迁移至靠近两侧壁面处的平衡位置;后 5 个缩扩单元为粒子收聚区域,关键在于收缩部分流道宽度与癌细胞的尺寸相同,以确保其沿流道中线处移动。使用该器件,该课题组在 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的条件下分离血液中的 MCF-7,重

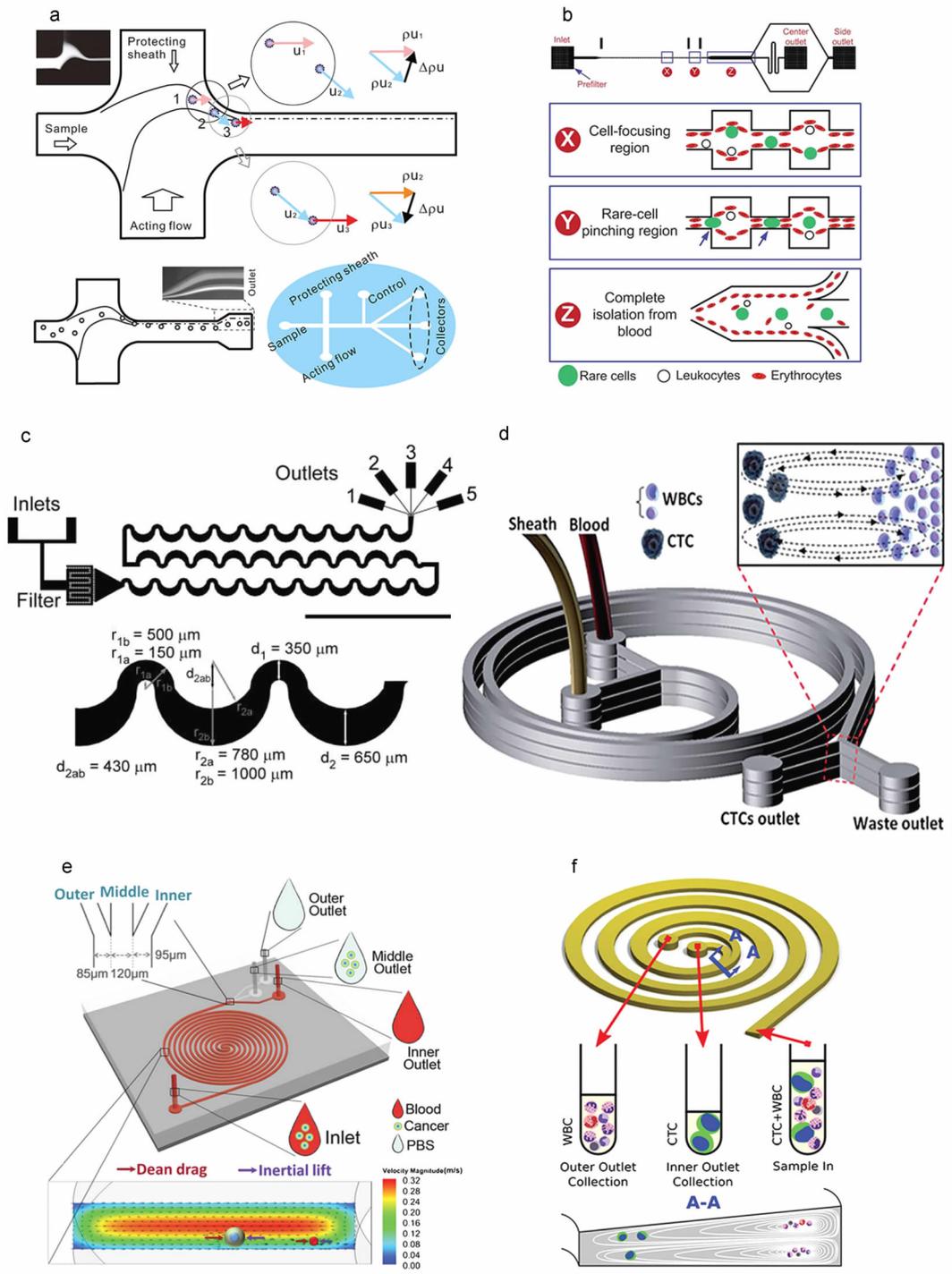


图 4 惯性分选结构示意图：(a) 直流道^[165]；(b) 缩扩流道^[170]；(c) 非对称正弦曲线形流道^[144]；(d) 螺旋流道^[175]；(e) 双螺旋流道^[177]；(f) 梯形截面螺旋流道^[181]

Fig. 4 Schematic illustrations of inertia separation: (a) straight microchannel^[165]; (b) multifurcated microchannel^[170]; (c) asymmetrically curved microchannel^[144]; (d) spiral microchannel^[175]; (e) double spiral microchannel^[177]; (f) slanted spiral microchannel^[181]

获率大于 80%，对红细胞的相对浓度提升 3.25×10^5 倍。但该应用的缺点在于其通用性较差，只适用于 MCF-7 或与其尺寸相同细胞的分选。Hyun 等^[171] 则将四条缩扩流道平行化集成，在 $600 \mu\text{L}/\text{min}$ 的流量下分选 MCF-7/MDA-MB-231 与白细胞，CTCs 重新化学进展，2015，27(7)：882 ~ 912

捕获率在 91% 以上，分选后相对浓度提升 10 倍。但平行化集成带来的一个缺点是出口太多，使操作麻烦。此外，由于该类技术具有多个平衡位置而使其应用范围受到了很大的局限，特别是对于流式细胞仪等应用来说，较多的平衡位置为后续的高精度、

集成微型化检测带来不小挑战。

在弯流道惯性分选芯片中,正弦及螺旋形流道是最常见的两种结构。Di Carlo 等采用非对称正弦形流道成功地将入口处随机分布的红细胞排列成一条线^[144],在此基础上又实现了对血小板的富集:将血液稀释至 2% 后,在 0.9 mL/min 的流量条件下,入口处与血细胞数量比为 0.04 的血小板经如图 4(c)所示结构分选富集后,出口处其相对浓度提升 100 倍^[159]。需要指出的是,正弦结构虽可用于分选富集血小板,但其对不同尺寸细胞聚焦的平衡位置非常接近,更多的是应用于聚焦中。相比而言,结构更加紧凑的螺旋流道可更好地区分不同尺寸的粒子,在稀有细胞分选方面的应用也更加广泛。

相比于传统的螺旋流道仅用于分选两种不同尺寸的粒子,Kuntaegowdanahalli 等^[172]设计了一种具备多粒子分选能力的微型分选器,利用截面尺寸为 $500 \times 130 \mu\text{m}$ 的螺旋流道,在 3 mL/min 的高通量下实现对 10、15 和 20 μm 三种尺寸粒子的连续分选,纯度高达 90%;该装置拓展应用于 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞和 C6 神经胶质瘤细胞的分选,同样达到了一百万细胞/分钟的高通量。Nivedita 等^[173]同样在百万细胞/分钟的通量下分选血细胞,分选效率约为 95%。Lee 等^[174]用单层螺旋流道分选采自成人骨髓的多能间充质干细胞(aMSCs)与采自胎儿的多能间充质干细胞(fMSCs);Warkiani 等^[175]则将三片含有螺旋流道结构的芯片采用叠加的方法集成,实现了大于 7.5 mL/min 的超高通量。如图 4(d)所示,采用该结构分选 CTCs 与白细胞,并辅以其他检测技术,在准备的 10 份血液样品中均成功地检测到了 CTCs。Kim 等^[176]则利用不同流速下平衡位置的变化,设计出级联的螺旋流道,通过中段引出的出口预先筛除部分白细胞。该芯片通过两次分选,最终可去除 97.91% 的白细胞,对 MCF-7 的重新捕获率为 86.76%。

Sun 等^[177]采用双螺旋结构分选全血液中的 MCF-7 及 HeLa 细胞。如图 4(e)所示,双螺旋结构可视为由两条螺旋流道在中间由“S”形结构连接而成。采用该结构分选 CTCs,在 20 mL/h 的通量下可在中间出口处收集到 96.77% 的 CTCs,重新捕获率为 88.5%。同样采用该装置^[178],在 60 mL/h (2.5×10^8 cells/min)的高通量下分选 HeLa 细胞与血细胞,分选效率超过 90%,重新捕获率约为 80%。

相比于传统矩形截面的螺旋流道,采用梯形截面的螺旋形流道可极大地改善了分选效率。梯形截

面流道采用横截面为外侧高、内侧低的梯形结构,与普通矩形截面螺旋流道中大小粒子均聚焦在靠近流道壁内侧不同的是,梯形截面流道中当流速超过某一临界值时,大粒子仍聚焦在靠近内壁面的平衡位置,而小粒子聚焦至靠近流道外壁面的平衡位置。Guan 等^[179]详细阐述了梯形截面螺旋流道的分选机理,并与矩形截面螺旋流道作比较;Wu 等^[180]采用梯形截面螺旋流道分选红细胞与白细胞,分选效率大于 80%;Warkiani 等^[181]则采用该如图 4(f)所示结构分选白细胞与 MCF-7、T24、MDA-MB-231 等循环肿瘤细胞,通量可高达 1.7 mL/min,分选后癌细胞的重获率高于 80%。大小粒子平衡位置的远近对分选效果影响显著,梯形截面螺旋流道中因大小粒子平衡位置较远,使得细胞间相互作用对分选效果的影响显著降低,在稀有细胞分选应用中优势明显,但梯形截面流道的加工较为困难。

通常来说采用惯性技术分选细胞需要先对样品进行稀释操作,以避免粒子间的相互作用导致散焦以及因黏度太大导致使细胞聚焦所需要的流道长度变长。但考虑到其他分选技术亦需要先对样品流稀释,且惯性分选微流控芯片的通量往往比它们高出一两个数量级,达到数毫升每分钟的级别,因此惯性分选仍被视为一种具有巨大通量优势的分选技术。但同时需要指出的是惯性分选作为一种被动分选技术,分选纯度相对较低,尤其是针对分选血液中的稀有癌细胞这类要求有高纯度分选效果的应用,其分选结果很难直接满足临床检测的需求。

2.5 仿生分选

仿生分选(biomimetic separation)方法是参照生物体中血液及微脉管系统一些固有的血液动力学现象,通过仿制具有相似管道结构的微流控芯片,实现对血液中特定组分分离的一种分选方法。微管中的血液动力学效应有很多,如内径小于 300 μm 的血管中红细胞移动至血管中心并在血管壁面处形成无细胞血浆层的现象形成 Fahraeus-Lindqvist 效应:血液黏性随管道内径的降低而降低^[182, 183];当血液流经分支处时,较小的微管分支会撇取无细胞血浆层,形成血浆撇清效应(plasma skimming)^[184];在红细胞聚集至血管中间的同时,白细胞迁移至血管壁附近的血浆层中,形成白细胞边缘效应(leukocyte margination)^[185];Zweifach-Fung 效应是指在微管分岔处红细胞倾向于进入截面较大的分支,白细胞则倾向于进入截面较小分支的现象,该现象亦被称为分支法则(bifurcation law)^[186-188]。

虽然上述效应的机理尚未完全解释清楚,但这些效应已经被复制到微流控芯片系统中。Browne等^[189]利用 Fahraeus-Lindqvist 效应,设计如图 5(a)所示的结构,将红细胞聚集至样品流的新月形前端,实现与血浆的分离,并可后续实现血细胞比容测定、蛋白质量化等。血浆撇清效应(plasma skimming)亦可用于从全血中分离血浆,Faivre等^[190]通过设计简单的突扩结构,在血液流经时人为地放大无细胞层,在 200 $\mu\text{L}/\text{h}$ 的流量下,从三岔出口的两侧收集到 24% 的血浆。采用如图 5(b)的类似的结构,Sollier等^[191]通过拓宽流道结构,将通量提升至 100 $\mu\text{L}/\text{min}$,分离出 10.7% 的血浆。

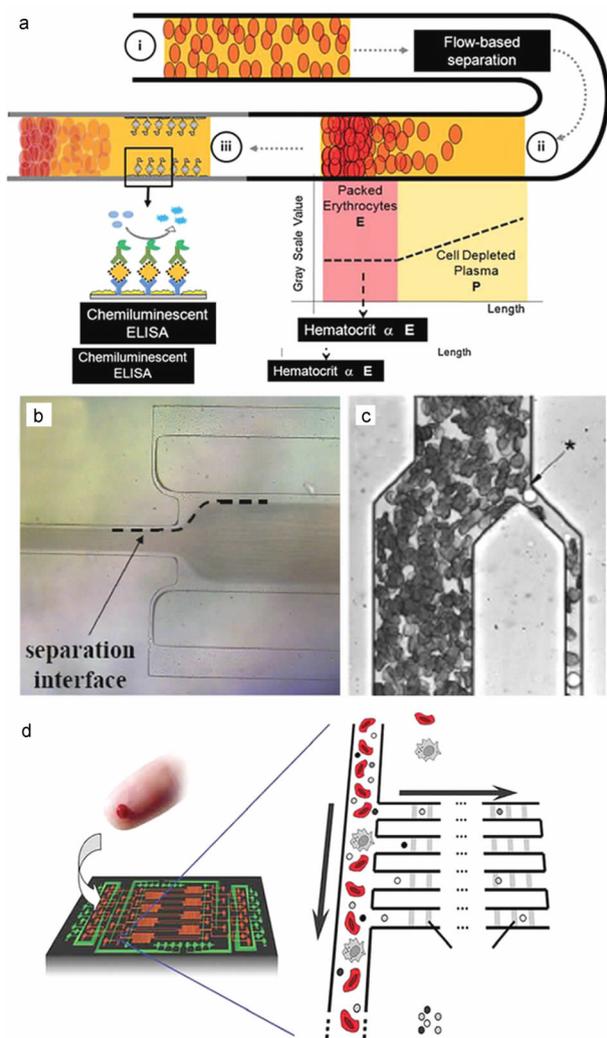


图 5 仿生分选结构示意图:(a) Fahraeus-Lindqvist 效应^[189]; (b) 血浆撇清效应^[191]; (c) 白细胞边缘效应^[192]; (d) Zweifach-Fung 效应^[195]

Fig. 5 Schematic illustrations of biomimetic separation: (a) Fahraeus-Lindqvist effect^[189]; (b) plasma skimming effect^[191]; (c) leukocyte margination^[192]; (d) Zweifach-Fung effect^[195]

白细胞边缘效应(leukocyte margination)可用于分离红细胞和白细胞。Shevkoplyas等^[192]设计了如图 5(c)所示的分岔结构,通过利用白细胞边缘效应及血浆撇清效应富集白细胞。在血液通过多个对称或非对称的分支时,大部分红细胞进入较宽的出口,而处于流道边缘的白细胞进入较细的出口,分选后白细胞对红细胞的相对浓度提升 34 倍。在该方法中,由于流道的高度对分选效果影响不大,Jaggi等^[193]通过提升流道高度使样品通量增加至数毫升每分钟的级别。

Zweifach-Fung 效应同样被用于细胞分离,Yang等^[194]在主流道一侧连续排列的 5 条与血浆出口相连的分支流道,在 10 $\mu\text{L}/\text{h}$ 的流量下处理不同血细胞比容的全血样品,红细胞沿主流道继续流动,而 15%~25% 的血浆从分支流道流出。Fan等^[195]采用如图 5(d)所示的类似的结构分离血浆,并在每个分支流道修饰上不同的生物标记,以富集不同的蛋白质,实现了对样品的直接检测。该芯片可直接处理未经稀释的全血样品,这极大地简化了样品准备步骤,且易于与后续检测器件集成。此外,Geng等^[196]还在双螺旋流道中引入 Zweifach-Fung 效应实现对血浆的分离,在约 240 $\mu\text{L}/\text{h}$ 的通量下分离效率达到 95% 以上。

仿生分选技术依据不同的效应可应用于多个方面,且结构简单、加工工艺可靠、成本低。该分选技术的不足之处在于通量通常较低,多在数十或数百微升每小时的量级,这使得其只能处理微量样品,限制了其在微流控芯片中的应用。但也应看到 Jaggi等^[193]通过改进将通量提升至数毫升每分钟的量级的努力,相信经过持续的发展,仿生技术在处理稀有细胞样品时也具有一定的潜力。

2.6 亲和性分选

在微流控技术中,除了可依据细胞在尺寸、可变形性等物理特性上的差异实现分选,还可通过生物标记,依据细胞在生物学上的特性差异实现分离。亲和性分选(affinity separation)方法通过固定在微流控装置内的特定分子,与样品流中的目标细胞相黏合,从而将其捕捉、富集,实现与其他细胞的分离^[197, 198]。特定分子与目标细胞之间的黏合多是通过抗原抗体之间的特异性结合实现,最常用的特定标记物仍是上皮细胞黏附分子(EpCAM)^[199],商业化产品 CellSearchTM即是通过该分子黏合 CTCs。

由于亲和性分选的灵敏度主要取决于特定分子与目标细胞的接触程度,故具有较大表面积体积比

的微流控芯片成为亲和性分选方法的一个强有力工具。传统的微流控芯片中直接将抗体结合在管道内^[200],而不制作特殊的内结构,由于微流控芯片中的样品多处于层流状态,使得只有靠近壁面的细胞才能被捕捉,而处于样品流内部的细胞没有与抗体相接触的机会,致使分离效率相对较低。为解决此问题,Nagrath等^[201]设计了名为“CTC-chip”的芯片,如图6(a)所示,通过在硅基上刻蚀许多结合EpCAM抗体的微柱,增大与仍呈层流状态的样品流的接触面积。使用该芯片直接对癌症患者的血液进行检测,在116份样品总量中的115份中成功检测到了CTCs,识别率大于99%。由于该芯片可直接对患者血液进行检测,不需要稀释、标记等操作,在2 mL/h通量条件下,分选纯度大于47%的同时还具有较高的灵敏度,因此具有较高的临床应用价值。Gleghorn等^[202]对微柱的空间排列进行优化,以进一步增加对目标细胞的接触率,成功地从血液中捕获约85%的前列腺癌细胞LNCaP。Kurkuri等^[203]则在透明的PDMS微柱上修饰抗EpCAM抗体,可在显微镜下观察捕获过程,从全血样品中黏合肺癌细胞H69或乳腺癌细胞SK-Br-3,捕获率在70%以上。此外,Wang等^[204]将立柱的尺寸从微米级降至纳米级,通过湿法化学刻蚀制作密集排列的100~200 nm直径微柱,对CTCs的捕获率为45%~65%,

同时较好地保持了细胞的活性(84%~91%);而Lyer等^[205]通过研究得出纳米微柱长度与细胞凸起长度相当时有最优捕获效率的结论。其他的一些纳米材料,如埃洛石纳米管^[206]亦被成功地集成至微流控芯片中,以提高抗体与CTCs的接触面。Stott等^[207]设计了“HB-chip”,如图6(b)所示,通过在流道顶端设计鱼骨状结构,在样品流中诱导产生微漩涡,以此提高CTCs与结合了EpCAM抗体的流道壁的接触。通过平行集成多条流道,可将通量提升至1 mL/h,采用该芯片处理人工配置的含PC3前列腺癌细胞的血液样品,对PC3捕获率达91.8%以上。为进一步增加抗原抗体的接触,Wang等^[208]将由化学刻蚀加工的纳米微柱基底与含有鱼骨状结构的PDMS盖片相集成,设计出如图6(c)所示的微流控芯片,除去鱼骨状结构的混匀作用,纳米微柱更高的表面积体积比,亦可大大提升抗EpCAM对CTCs的捕获能力。通过这些努力,该芯片实现了从全血中以大于95%的高特异性分选富集MCF-7肿瘤细胞。

除了采用EpCAM抗体,还有很多其他特定分子可用来捕获CTCs。P-选择素配体(P-selectin ligands)是另一种亲和性分选中较常见的选择。Choi等^[209]在流道底部平行排列倾斜的条状突起,并在其表面浸润P-选择素配体。如图6(d)所示,样

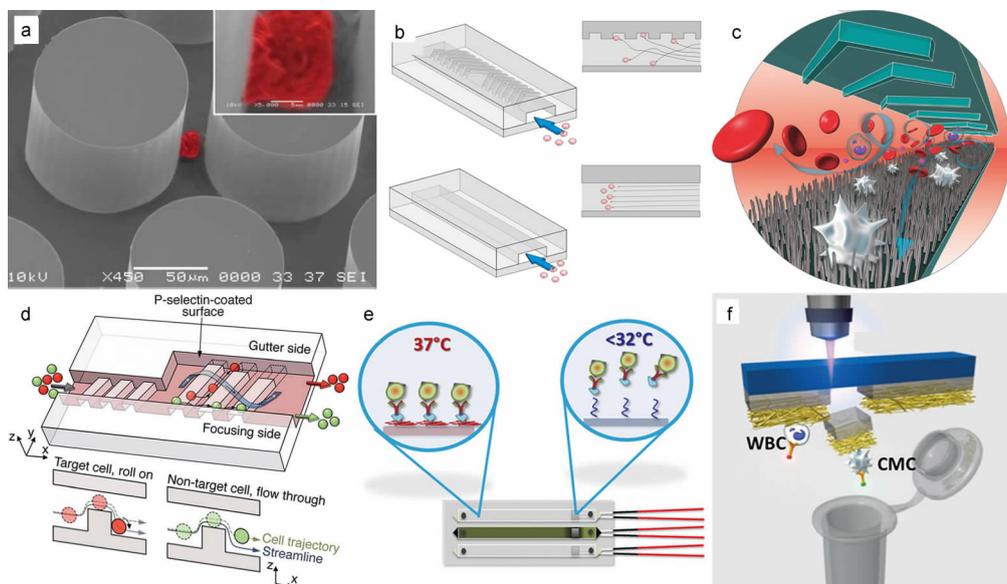


图6 亲和性分选结构示意图:(a)修饰抗体的微柱阵列^[201]; (b)鱼骨型微漩涡发生器^[207]; (c)修饰抗体的纳米微柱^[208]; (d)配体-受体相互作用^[209]; (e)基于PNIPAAm的细胞释放^[221]; (f)基于激光显微切割的细胞释放^[223]

Fig. 6 Schematic illustrations of affinity separation; (a) antibody-coated pillar array^[201]; (b) microvortex-generating herringbone chip^[207]; (c) antibody-coated nanopillars^[208]; (d) ligand-receptor interaction^[209]; (e) release of captured cells based on PNIPAAm^[221]; (f) release of captured cells based on laser microdissection (LMD)^[223]

品流过时, 血癌细胞 HL60 因受到亲和力作用沿凸起方向偏转, 而其他血细胞则倾向于沿垂直与凸起的方向翻过, 向另一侧迁移, 实现连续分选。Bose 等^[210]采用相似的原理, 采用金条纹图案代替凸起结构, 并在金层上修饰 P-选择素配体, 实现白细胞与红细胞的分离, 分选纯度在 92% 以上。Karnik 等^[211]则在流道中呈倾斜条带状的修饰 P 选择素受体 (P-selectin receptor), 相互作用的细胞沿受体条带边缘滚动, 实现连续分离。此外, E-选择素 (E-selectin)^[212]、生物素适体 (biotin aptamer)^[213]、糖基化 (glycosylation)^[214-216] 等特定分子亦被成功应用于捕获 CTCs, Li 等^[217]更是通过在芯片不同区域修饰不同抗体实现了对不同细胞的捕获。更进一步地, 除了将黏合分子修饰在流道表面的方法外, 近年来还出现了如打印抗体点阵捕获 T-淋巴细胞^[218], 或通过纳米级粗糙度的玻璃表面捕获 CTCs^[219] 的亲性和分选方法。

亲和性分选技术因可以特异性地黏合目标细胞, 故可获得较其他分选技术更高的纯度, 但如何在施加更高剪切力的情况下, 实现对目标细胞的捕获后再释放成为一个挑战。Gurkan 等^[220, 221]采用热敏材料聚 *N*-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAAm) 制作微流道, 如图 6(e) 所示, 该种材料在 37 °C 时可与蛋白牢固的结合, 而在低于 32 °C 时则会将蛋白释放。利用该特性, 通过进一步修饰抗体可捕获约 89% 的 CD4⁺ T 淋巴细胞, 而降温后可释放约 59% 的细胞。Shah 等^[222]则将 EpCAM 抗体修饰到可降解的藻酸盐生物高聚物上, 通过向流道中注入藻酸盐裂合酶, 释放 99% ± 1% 被捕获的前列腺癌细胞 PC3。另一种释放细胞的方法是采用激光显微切割 (LMD) 技术, Hou 等^[223]将静电纺丝纳米纤维覆盖在 LMD 覆膜载玻片上, 并通过流道上端的鱼骨状结构以提高接触率。如图 6(f) 所示, 对于通过抗体黏合到纳米纤维上的循环黑色素瘤细胞 (CMC), 可用激光将其周围一小片覆膜切割释放。该方法对操作精度要求较高, 且一次只能释放一个细胞, 效率较低。此外, Ariyasu 等^[224]还介绍了一种采用光致断裂连接基团 (ANP) 将抗体连接至基底表面的方法, 通过光化学裂解, 释放捕捉到的目标细胞。

上述亲和性分选直接特异性地捕获目标细胞, 可将其称为阳性选择法。相应地, 另一类捕获目标细胞以外的其他细胞, 而后将其弃除以获得目标细胞的分选方法, 称为阴性选择法。显然, 阴性选择法避开了“捕获后再释放”的困扰。Lustberg 等^[225]对化学进展, 2015, 27(7): 882 ~ 912

混有 CTCs 的血液样品, 先溶解掉其中的红细胞, 再采用免疫磁珠的方法, 通过 CD45 黏合白细胞并将其去除, 从而获得 CTCs。经由该方法, 可将人乳腺癌细胞富集 1000 倍, 而对头颈鳞癌细胞 (SCCHN) 的富集程度最高可达 10⁷ (7log₁₀) 倍。在最新的研究中, Hyun 等^[226]将阳性选择法与阴性选择法相结合, 设计出一种两级亲和分选芯片。对于初始样品中经由 CD45 抗体结合有纳米磁珠的白细胞, 通过在一级芯片外侧集成磁铁的方式将其吸附至流道上下壁面处, 即以阴性选择法去除之; 而对于进入二级分选芯片中的混杂肿瘤细胞, 通过在流道表面修饰 EpCAM 抗体吸附 MCF-7 (EpCAM +), 而 MDA-MB-231 (EpCAM-) 则从出口流出, 即以阳性选择法实现两者的分离。二级芯片中同样采用了在上壁面处设置条状凸起的经典方式, 以增强细胞与壁面的接触。该两级分选芯片可在 400 μL/min 的高通量下, 实现将目标肿瘤细胞富集程度提高 763 倍。

总体来说, 阳性选择法直接捕捉目标细胞, 特异性较高; 而阴性选择法不以目标细胞作为黏合对象, 可保持其较高的活性, 且可以富集多种细胞。最近也有研究指出相对于由外力破坏带入循环血液中的被动型 CTCs, 主动性发生上皮-间质转化而由病灶进入循环血液的主动型 CTCs 表面标记物的表达相对较低, 更不易被捕捉。考虑到肿瘤转移多由主动型 CTCs 引发, 从这个角度说阴性选择法更具意义。但不论是阳性选择法还是阴性选择法, 亲和性分选的一大困扰在于有些细胞会存在丢失表达的现象。此外, 从生物学的角度来说, 所有采用亲和性方法捕获目标细胞的应用都会引入抗体或配体与细胞表面抗原的特异性接触, 而这些接触可能会改变细胞自身的生理学特性^[227, 228], 因此 EpCAM 在临床上的应用也具有一定的争议^[229-231]。

3 主动分选技术

主动分选技术 (positive separation techniques) 通过外力场对样品流中的细胞施加作用力, 从而致使其分离, 其分选精度往往高于被动分选技术。这些分选方法主要包括介电泳分选 (dielectrophoresis separation)、磁分选 (magnetic separation)、声分选 (acoustic separation)、光分选 (optical separation) 等几类。

3.1 介电泳分选

介电泳技术 (dielectrophoresis, DEP) 是通过在不带电、可极化的中性粒子周围施加非均匀电场, 使

其内部产生偶极子,从而驱使其移动的一项技术。DEP作为一种主动分选技术,具有极高的操控精度,其所需的非均匀电场可由直流电(DC)^[232, 233]、交流电(AC)或直流偏置的交流电^[234]产生。近年来,该技术得到了广泛的关注^[235-241],可用于细胞捕捉^[242]、鉴别^[243]、聚焦^[244]、分离^[245, 246]等应用研究。

为了更深入地了解介电泳分选原理,Gascoyne等^[247]建立了用介电泳技术分选粒子的分析模型,Hughers^[248]则通过精简模型,得到了非均匀电场中粒子所受介电泳力“经典”公式:

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_m r^3 \text{Re}[K(\epsilon)] \nabla E_{rms}^2$$

式中, ϵ_m 为悬浮介质介电常数, r 为粒子半径, ∇E_{rms} 为电场梯度, $\text{Re}[K(\epsilon)]$ 为 Clausius-Mossotti 因子的实部。Clausius-Mossotti 因子决定了粒子的受力方向,可由下式表示:

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad \epsilon^* = \epsilon - i \frac{\sigma}{\omega}$$

其中 ϵ_p^* 、 ϵ_m^* 分别为粒子和悬浮介质的复合介电常数,分别由各自的介电常数 ϵ 、电导率 σ 以及电场角频率 ω 确定。当 $\text{Re}[K(\epsilon)] > 0$ 时,粒子向电场强度强的方向移动,称为正介电泳(positive DEP, pDEP);而当 $\text{Re}[K(\epsilon)] < 0$ 时,粒子向电场强度弱的方向移动,称为负介电泳(negative DEP, nDEP)。从以上公式可以看出,粒子受力不仅与电场频率、梯度,以及细胞和介质的电导率及介电常数等参数有关,还在很大程度上取决于粒子半径的大小,这使得使用介电泳技术分离不同尺寸的细胞成为可能。依据生成非均匀电场的不同方法,可将介电泳技术大致分如下几类:①依据不同形状的微尺寸电极产生非均匀电场;②依据非均质悬浮介质产生非均匀电场;③行波介电泳;④光诱导介电泳。其中,在稀有细胞分选方面应用最多的仍是依靠微尺寸电极产生非均匀电场。

通过近些年的发展,人们设计了各种形状的微电极结构来分选细胞。早在1995年,Becker等^[249]就对癌细胞的介电属性进行了研究,并据此设计了城墙状的电极阵列,通过将人乳腺癌细胞MDA231吸附在电极上实现与血细胞的分离。Sabuncu等^[250]也采用类似的结构,实现对克隆的鼠黑素瘤细胞B16F10的分离。Vykoukal等^[251]则通过该结构,利用哺乳动物细胞多在低频时受负向介电泳作用力,在高频时受正向介电泳作用力的特性,鉴别了各白细胞亚群的分选频率。带状电极是最简单常见

的电极结构,Wu等^[252]采用与主流方向垂直的带状电极从血液中分离人结肠癌细胞HT-29,并在不同电导率溶液介质中对该细胞的介电属性进行了研究。Holmes等^[253]采用相似的结构,但前一组电极在流道上下壁面上均有分布,施加负介电泳力使粒子聚焦至同一高度;而仅分布在下壁面的第二组电极施加正介电泳力,将不同细胞收集到电极的不同区段,实现对单核白血病细胞THP-1的分离。Gao等^[254]采用与主流方向平行的三条电极,在流道内注入高电导率溶液,结合电动流体力学,将MDA-MB-231从血液中分离,分离效率达到98%,但通量低于0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。不同活性的同一种细胞也具有不同的介电属性,Doh等^[255]将三条倾斜的带状电极集成到的微管道内分离死、活酵母菌,如图7(a)所示,通过施加合适的电场,使受正向介电泳作用的活性酵母菌偏离管道中心向两边偏移,从两侧出口流出;受负向介电泳作用的死酵母菌运动方向不变,从中间出口流出。死、活酵母菌的分离纯度最高可分别达到72.7%及97.3%。同样是将倾斜的电极集成在流道内,Hu等^[256]为进一步提高分选精度,将介电响应标记物特异性地连接到大肠杆菌表面,从而显著增加与其他细胞介电响应特性的差异。采用这一方法可极大地提高分选的灵敏度和分析通量,在300 $\mu\text{L}/\text{h}$ 的流量下可去除99.9%的其他细胞,分选后目标细胞相对浓度提升200倍以上。Alazzam等^[257]在带状电极内设置插齿形结构,并将四条电极做扩展-闭合状布置,可成功地使乳腺癌细胞沿流道边缘移动,而血细胞聚焦至流道中间。同样是插齿形结构,Han等^[258]如图7(b)所示将插齿形电极斜跨整个流道,使经过的粒子发生不同程度的偏转以实现分离。此外,最近研发出的商业仪器ApoStreamTM^[259](如图7(c)所示)亦采用与主流方向垂直的插齿电极结构生成非均匀电场,借鉴了DEP-FFF的思想并融合EpCAM抗体技术,使受正介电泳力的CTCs被吸附至下壁面处向前流动,从特定出口收集;而受负介电泳的其他细胞悬浮在一定高度,越过电极向前运动,从废液口收集。该仪器分选MDA-MB-231细胞可达到75%的重新捕获率,且在分选7天后仍能保持97%的活性。

除了带状电极,还有很多其他的微电极形状。An等^[260]依据人乳腺癌细胞MCF-7及MCF-10A在电导率及介电属性上的不同,设计扇叶形状的3D电极结构,实现两者的连续分离,分离效率分别为86.67%和98.73%。Yang等^[261]将一组三角形的

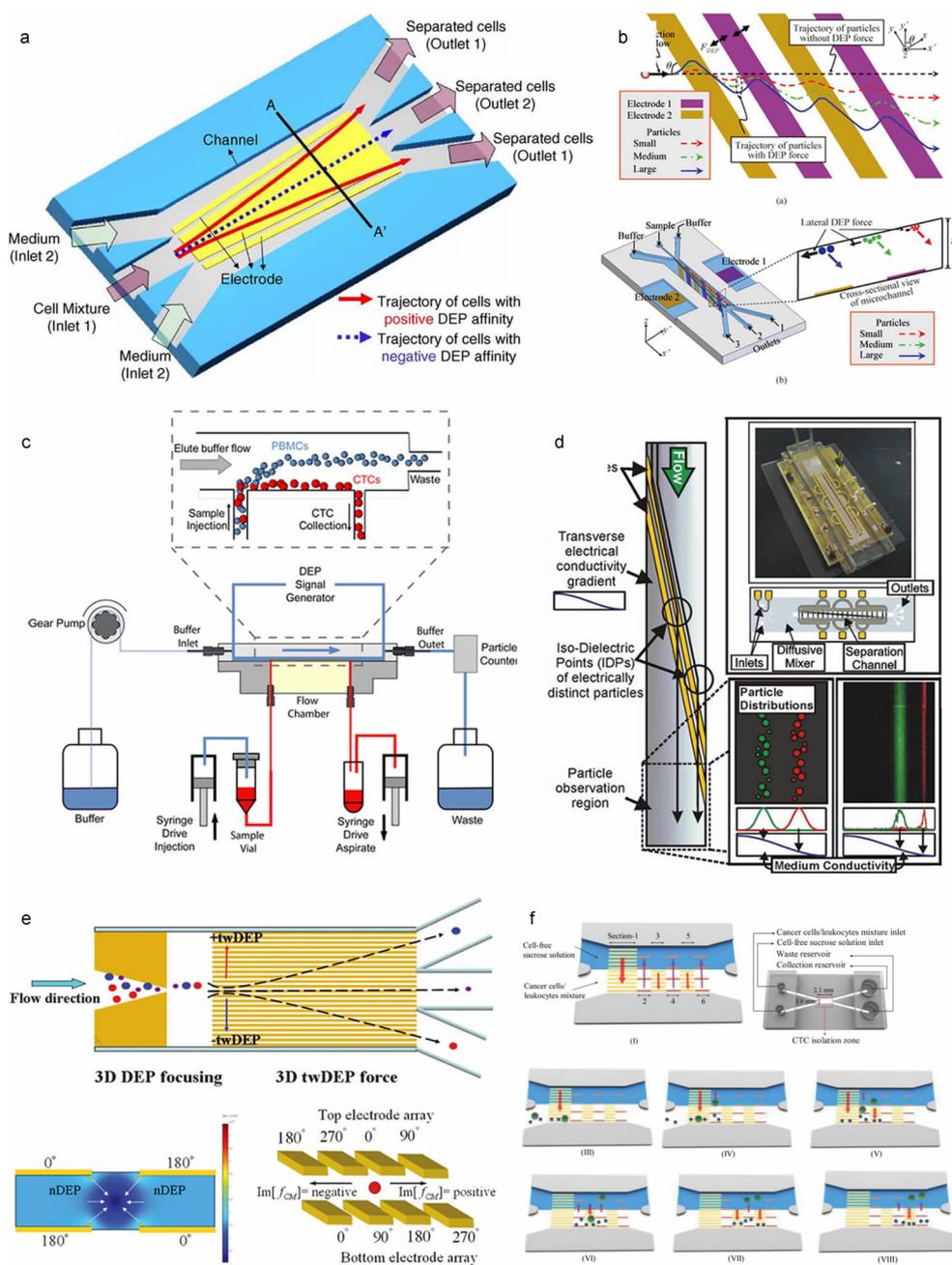


图7 介电泳分选结构示意图：(a)带状电极^[255]；(b)插齿电极^[258]；(c) ApoStream™^[259]；(d)渐变电导率溶液^[267]；(e)行波介电泳^[273]；(f)光诱导介电泳^[275]

Fig. 7 Schematic illustrations of dielectrophoresis separation: (a) three banding electrodes^[255] ; (b) interdigitated electrode^[258] ; (c) ApoStream™^[259] ; (d) electrical conductivity gradient medium^[267] ; (e) traveling wave dielectrophoresis^[273] ; (f) optically induced dielectrophoresis^[275]

ITO 电极铺设在流道底部,电极间间隙与主流道呈 45°,在该低成本分选芯片上施加合适的 AC 信号,可将受负介电泳力的结肠癌细胞 HCT-116 偏转至分支流道中,与人胚肾细胞 HEK 293 及大肠杆菌区分开来;近些年同组的 Alshareef 等^[262] 又采用同样的结构实现了 HCT-116 与 MCF-7 的分选,在 0.1

$\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速下分选效率达到 93%。Jen 等^[263] 则设计了同心的圆环电极,通过递进的施加正介电泳作用实现对宫颈癌细胞 HeLa 的富集,捕获率达到 76%。其他可用于分离稀有细胞的电极形状还包括点阵状^[264]、对称曲线形^[265]、梯形^[266]等。

在非均质悬浮介质周围施加电压,亦可产生非

均匀电场。这里的非均质悬浮介质即可由不同介电属性或电导率的溶液配比而成,亦可通过在流道中设置绝缘块的方式形成。Vahey 等^[267]在流道两个入口分别注入混有细胞的高电导率溶液及无细胞的低电导率溶液,如图 7(d)所示,通过微混合器,溶液的电导率在流道宽度上形成从高到低的平滑过渡。配合与主流动方向呈 4°角安置的电极,溶液中的细胞由电导率高的一侧向电导率低的一侧迁移,直至在某一个恰当的溶液电导率处达到平衡位置,失去极性。该方法成功应用于分选死、活酿酒酵母菌细胞,以及小鼠非胸腺依赖性细胞 BA/F3^[268]。值得一提的是该分选方法不依赖于尺寸,避免了细胞族群尺寸不对分选精度造成的影响,且可拓展应用于多种细胞的同时分选。Kang 等^[232]通过设计合适形状的流道结构,在流道入口与分支出口之间形成一矩形绝缘块的效果,并通过浸入样品池中的铂丝电极在各入口、出口样品流中施加不同的电压,生成非均匀电场。样品流中的 MCF-7 与白细胞因尺寸差异而受到不同大小的负介电泳力,从而被偏转至不同的分支流道中。该方法由于不需要制作微电极,使得成本较低,但施加的高压直流信号容易产生焦耳热效应,对细胞活性造成损伤。此外,在流道中设置 X 形的绝缘结构^[269],或悬浮直径 100 μm 的硅球^[270]亦能生成非均匀电场,实现对细胞的分离。

行波介电泳 (traveling wave dielectrophoresis, twDEP) 的概念最早由 Hagedorn 等^[271]提出,该方法是在平行排列的电极上施加相隔一定相位的交流电压,从而在垂直电极的方向上形成行波介电泳。采用行波介电泳可脱离流体驱动,通过交变电场的变化驱使微粒前行。Bunthawin 等^[272]详细介绍了带壳球体在行波介电泳下的受力情况,并采用行波介电泳实现了对酵母细胞的驱动;Cheng 等^[273]采用 3D 电极结构,将负介电泳与行波介电泳集成。如图 7(e)所示,先通过 nDEP 对粒子实现初始聚焦,以提高分选精度,再通过平行与主流动方向的电极施放行波介电泳,使不同细胞偏转向不同的方向,在 4 μL/min 的流量下高效地分离了红细胞和葡萄球菌。Cen 等^[274]将行波介电泳与电渗流技术相集成,对淋巴瘤细胞 Daudi 及骨髓瘤细胞 NCI-H929 进行特性表征,且可对死、活癌细胞进行分离。

光诱导介电泳 (optically induced dielectrophoresis, ODEP) 是基于光电效应,通过投影到光电薄膜 (一般是氢化非晶硅, α-Si:H) 上的光学图案生成虚拟电极,其最大的优势在于可通过调整光斑形状提供

动态、可重构的微电极,并降低制作成本。Huang 等^[275]采用如图 7(f)所示的光诱导介电泳芯片实现对 CTCs 的分离。该芯片采用 6 组移动的光斑,第 1、3、5 组光斑用于将所有细胞拖拽至流道的下侧面,而第 2、4、6 组光斑用于将 CTCs 拖拽至位于流道上侧的缓冲液中。采用该设计可实现 PC-3、OEC-M1 等与白细胞的分离,能达到 70% 左右的重获率与纯度,但其通量仅有 0.1 μL/min。该课题组还利用 ODEP 技术,在 T 形流道中用动态矩形光斑驱动死、活软骨细胞,实现两者的分离,分离后活软骨细胞的纯度及活性分别约为 78.3% 和 96.4%^[276]。此外,Chiou 等^[277]也有采用圆形光斑负介电泳将活性 B 淋巴细胞聚集至光环中间收集,实现与死细胞分离的报道。

总体来说,介电泳分选作为一种主动分选技术,具有比其他分选技术更高的精度,在数量极少的稀有细胞分选应用中别具优势。但是为达到良好的分选精度,需要粒子通过非均匀电场的时间足够长,这极大地限制了介电泳芯片的流速,其通量往往在数微升每分钟甚至数十微升每小时的量级,难以直接应用于临床。此外,介电泳芯片中因引入电场,需要额外考虑电解效应、焦耳热效应^[245, 278-282]等对细胞活性的影响,细胞自身内部离子分布不均对细胞的电生理学特性,以及物理特性的影响亦需要考虑。最后,引入电场易使得操作更为繁琐:为达到良好的分选效果,需要精确调控电压、频率、流速、悬浮介质的介电属性及电导率等因素。良好的悬浮介质对分选结果至关重要^[103, 243, 259],其除了要能实现溶液中的细胞的良好偏转,还应能较好地保持细胞的活性及生理特征,并尽量降低电导率以弱化焦耳热效应的影响^[283]。

3.2 磁分选

磁力分选 (magnetic separation) 通过在微流控芯片周围施加磁场,可依据细胞自身磁性的不同进行分选富集^[284]。通常来说,脱氧血红蛋白和高铁血红蛋白中的未配对电子使其呈顺磁性,而氧合血红蛋白共价键中的电子使其呈抗磁性。Zborowski 等^[285]研究了含有这些血红蛋白的红细胞在平均强度 1.4 T、平均梯度 0.131 T/mm 的磁场中的迁移特性,并据此实现分离。近期 Nam 等^[286]则通过对不同性状红细胞的分选实现对疟疾的检测。采用相似的原理,Han 等^[287-289]早期设计了多种芯片结构用于分选红细胞和白细胞,这些芯片中细胞仅在距铁磁材料边缘小于 100 μm 的距离内受力明显,致使

分选效率偏低：如最优的实验结果可分离出 93.5% 的红细胞及 97.4% 的白细胞，但该结果是在 $5 \mu\text{L}/\text{h}$ 的超低通量下实现的。后期，该课题组的 Jung 等^[290] 改进了芯片结构，通过在玻璃基底上嵌入多条与主流动呈 11° 角的带状铁磁性材料，在整个流动区域内制造高梯度磁场，使细胞受到侧向磁力。采用该结构可将通量提升至 $75 \mu\text{L}/\text{h}$ ，同时保持相似的分选纯度及重新捕获率。Furlani 等^[291] 建立了如图 8(a) 所示磁力分选模型，很好地解释了磁力分选的原理。该模型流道指向垂直向下，由重力驱动流体流动，并在临近流道的位置布置一排软磁铁，通过偏置磁场使其磁化。血液流过时，顺磁性的红细胞与抗磁性的白细胞将在垂直主流动的方向上向相反的方向移动，实现两者分离，但该模型并没有被实验验证。

依据细胞自身磁性不同进行分选虽然使样品准备过程较为简单，但细胞自身磁性特性差异并不是特别明显，以致常常达不到理想的分选效果。在细胞上标记磁珠可以大大提高其对磁场的敏感性，较好地解决分选精度问题。分选标记有磁珠 CTCs 最简单直接的方法是在流道外放置一块磁铁将其吸附，而同时让其他细胞流过^[292]。Kang 等^[293] 设计了如图 8(b) 所示的典型流道结构，该结构在流道一侧设置一排微腔，通过磁铁吸引将标记磁珠的 CTCs 捕捉到其中，而由于流道中流体呈层流状态，无磁珠标记的白细胞将平直流向出口。对于捕获的 CTCs，只要将磁体移至流道的另一侧即可将其释放。Casavant 等^[294, 295] 更是将 CTCs 分离、染色、分析等单元集成到一块芯片上，通过移动外部磁铁驱使 CTCs 依次进入各功能单元，完成检测过程。Pamme 等^[296] 在垂直流场方向上施加磁场，依据不同尺寸及磁化率的粒子有不同的偏转幅度实现分离，该芯片亦可拓展应用于细胞分选。通过流道外部手持磁体驱动 CTCs 虽然操作简单，成本低廉，但流道内埋的磁性材料能提供更强的磁场强度^[297]。近年来 Han 课题组的 Kim 等^[298] 采用如图 8(c) 所示优化后的芯片结构，在流道底部嵌入与主流动方向呈 5.7° 角铁磁性材料，成功地从外周血中分选富集修饰有免疫纳米磁珠的人乳腺癌细胞 SKBR-3，该分选芯片可达到 90% 的重新捕获率，97% 的纯度，同时通量提升至 $5 \text{ mL}/\text{h}$ 。Issadoore 等^[299] 更是直接将微流道铺设在 NdFeB 永磁材料上，设计出自组装磁力分选微流控芯片，实现乳腺癌细胞 SK-Br-3 的高效分离。

磁力分选中除了通过磁性材料分选目标细胞，还

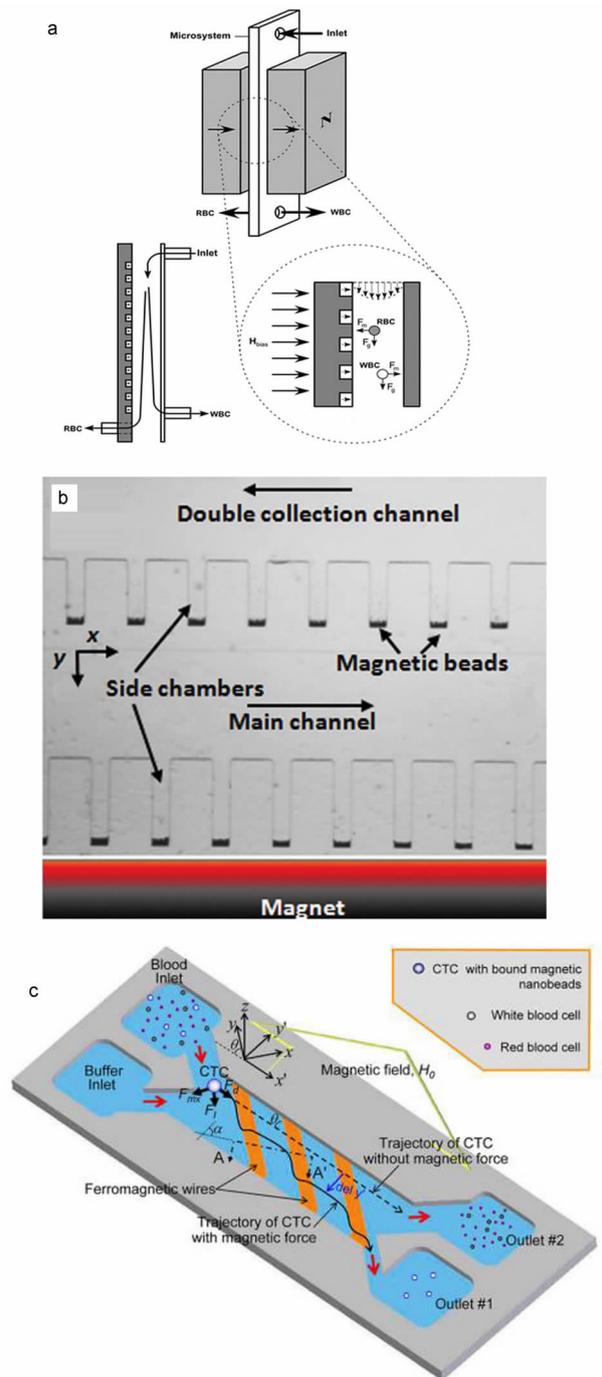


图 8 磁分选结构示意图：(a) 依据细胞自身磁性分选^[291]；(b) 外部电极分选磁珠细胞^[293]；(c) 内部电极分选磁珠细胞^[298]

Fig. 8 Schematic illustrations of magnetic separation: (a) separation by inherent magnetism properties of cells^[291]; (b) magnetic beads coated cells separation by external magnet^[293]; (c) magnetic beads coated cells separation by embedding magnet^[298]

有一些其他的研究。通过磁珠捕获目标细胞是另一种较常用的方法。Sivagnanam 等^[300] 在包被链霉菌

和素的磁珠上修饰 5D10 单克隆抗体及纤维连接蛋白,通过磁场辅助经典自组装的方式将其排列在流道底部并用其捕捉 MCF-7,捕获率达到 $85\% \pm 10\%$ 。Saliba 等^[301]在流道底部打印六角形的“磁阱”阵列,通过施加垂直于流道的磁场可将修饰有抗 EpCAM 抗体的磁珠链状堆叠在磁阱上,采用该芯片可将 B 淋巴细胞从 T 淋巴细胞中分离出来,重新捕获率大于 98%。类似地,Horak 等^[302]在流道内将修饰有白蛋白的磁珠链状堆叠,对 MCF-7 的捕获率为 50%。Plouffe 等^[303]则在流道周围布置一圈导线并通入电流,生成垂直于主流动方向的磁场,使两侧样品流中标记有磁性粒子的目标细胞迁移入中间的缓冲液中,用之分离 MCF-7,重新捕获率大于 85%,纯度大于 90%。此外,还有一些研究将电磁铁嵌入微流道分选磁性粒子^[304, 305],但这些研究方案设备、加工更为复杂,因引入电流对细胞性状的负面影响也较大;亦有一些研究采用负选择法^[306, 307],通过去除其他细胞而获得剩余的目标细胞。

由于穿透细胞的磁场不太会与细胞功能或磁化标记相冲突,因此磁分选技术基本不会对细胞造成损伤。相对依靠细胞自身磁性特性进行分选的研究来说,通过在细胞上修饰免疫磁珠可以显著提升分选精度,但这依赖于细胞与磁珠间的结合程度,且使样品准备过程更为复杂。此外,磁力分选技术亦存在通量低、费时的缺陷。

3.3 声分选

声分选(acoustic separation)是在微流控芯片周围施加超声波场,使其中的悬浮粒子受到声辐射力作用。当超声波场在流道横截面上形成驻波时,声辐射力会驱使粒子迁移至压力波节点或压力波波腹的位置,据此,可通过声场实现对细胞的分选^[308-310]。

要在微流道中产生声辐射力,需要流道尺寸与超声频率匹配,且某一方向上的尺寸为波长一半的整数倍^[311]。满足这些先决条件后,超声波场中粒子所受声辐射力 $F_{Acoustic}$ 可由下式表示:

$$F_{Acoustic} = - \left(\frac{\pi P_0^2 V_p \beta_f}{2\lambda} \right) \left(\frac{5\rho_p - 2\rho_f}{2\rho_p + \rho_f} - \frac{\beta_p}{\beta_f} \right) \sin \left(\frac{4\pi x}{\lambda} \right)$$

式中, P_0 为压力振幅, V_p 为粒子体积, λ 为波长, β_f 、 β_p 分别为流体和粒子的相对压缩率, ρ_f 和 ρ_p 则分别为流体和粒子的密度。由该式可知,采用声场技术,可依据粒子在尺寸、密度及可压缩性上的不同实现分选。进一步地,不同密度的粒子受力方向可能不同,并被驱动至不同的平衡位置:高密度粒子停

留在节点处,低密度粒子停留在波腹处。据此, Peterssoon 等^[312, 313]在流道横截面上施加超声驻波,如图 9(a)所示,将密度较高的红细胞聚焦至流道中心的节点处,将密度较低的脂质小球聚焦至流道两边的波腹处,分离效率大于 95%。类似地,亦可用声波技术将红细胞^[314]、酵母菌^[315]等聚焦至流道中间以实现对其富集。Nordin 等^[316]在流道横截面的横竖两个方向上施加驻波,将红细胞及前列腺癌细胞聚焦至流道中心线的位置,富集程度约为 200 倍。

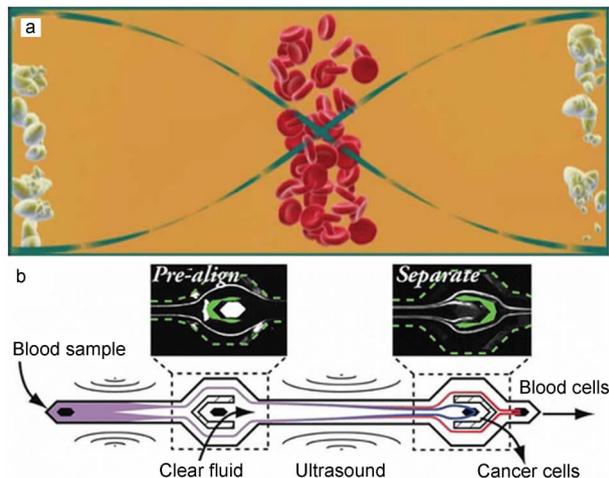


图 9 声分选结构示意图:(a)依据密度分选^[313];(b)依据尺寸分选^[311]

Fig. 9 Schematic illustrations of acoustic separation: (a) separation by density^[313]; (b) separation by size^[311]

依据尺寸不同分选的原理与密度不同,从上述受力表达式可以看出,相同密度不同尺寸的粒子受力方向相同,这使得其会聚焦至同一平衡位置,但力的大小与体积成正比,这使得较大体积的粒子有更快的迁移速度,研究者们可以据此实现分离^[317]。Augustsson 等^[311]设计如图 9(b)所示的芯片,先在流道上游处施加驻波,将样品流中的前列腺癌细胞(DU145, PC3, LNCaP)及白细胞聚焦至靠近流道壁面的两侧,再在流道中游处施加第二组驻波,使所有细胞向位于流道中心的节点位置迁移。依据尺寸及形态上的不同,CTCs 具有较大的迁移速度,可在中间出口处收集;而白细胞迁移速度较小,从两侧出口收集。此外,该芯片在垂直方向上亦施加一组驻波,将所有细胞聚焦至同一高度,以降低抛物线形流速界面对分选精度的影响。采用该芯片分选 CTCs,在 $280 \mu\text{L}/\text{min}$ 的通量下可达到 $72.5\% \sim 93.9\%$ 的重新捕获率以及 $79.6\% \sim 99.7\%$ 的纯度,而对于经多聚甲醛修饰过的细胞样品,重新捕获率及纯度都能有

进一步提升。基于相同的原理, Petersson 等^[318]分选不同尺寸的聚苯乙烯粒子, 分辨精度小于 $1\ \mu\text{m}$, 对血液组分的实验可较好地分离红细胞与血小板, 但尺寸最大的白细胞迁移速率在两者之间, 对此他们并未给出解释; 而 Dykes 等^[319]则成功将白细胞从血小板中分离出来, 分选效率大于 98%。此外, 理论上说, 采用声波技术可依据细胞间可压缩性的不同实现分离, 但笔者仅见到该方法应用于低密度聚乙烯小球与聚苯乙烯粒子的分选^[320], 尚未检索到应用于细胞分选的相关文章。

值得一提的是, 近期 Burguillos 等^[321]通过对声场处理后的人前列腺癌细胞 DU145, LNCaP, PC3, VCaP/血小板及白细胞在活性、增殖性及炎症反应特性方面的探索, 系统地研究了声场对细胞性状的影响, 得出当工作电压小于 $10\ \text{V}_{\text{pp}}$ 时, 细胞性状几乎不受影响的结论; Evander 等^[322]也在研究中指出驻波中的神经干细胞仍能保持较好的活性, 可见声场技术几乎不会影响细胞的活性。在主动分选方法中, 声分选虽然通量较高, 但分选纯度偏低, 且必须选择合适的材料以便将驻波施加到细胞上^[308], 设备、操作也较为复杂, 这应是声波技术在稀有细胞分选上应用较少的主要原因。

3.4 光分选

光分选 (optical separation) 技术是近期兴起的一项分选技术, 可依据粒子或细胞在光学特性上的不同进行分离。

光镊 (optoelectronic tweezers, OET) 是光分选的一种重要技术手段, 多用于单个细胞的捕捉^[323-326]。Liberal 等^[327]最近提出了一种 3D 光镊结构, 如图 10(a) 所示, 在芯片基底上集成含有四条独立光纤的光纤束, 并通过四块棱镜将四束激光折射至同一焦点上以捕捉细胞。相较于传统的 2D 光镊, 3D 光镊可更好地限制细胞在高度方向上的运动。光镊亦可用于同时操控多个细胞, Ohta 等^[328]结合光诱导介电泳技术, 通过一细一粗两条扫描光斑形成光镊, 分别捕捉急性白血病 T 淋巴细胞 Jurkat 及尺寸是其两倍大的 HeLa 细胞, 实现两者分离, 并探讨了施加信号频率与光斑扫描速度之间的关系, 给出最优频率。Shah 等^[329]将能生成平行于流道底面电场的横向光镊 (lateral-field optoelectronic tweezers, LOET) 与介质上电湿润 (electrowetting-on-dielectric, EWOD) 技术相结合, 实现微滴内多个 HeLa 细胞的自动聚焦及溶剂交换。通过更换不同的溶剂, 该技术可实现对微量样品的多步分析。

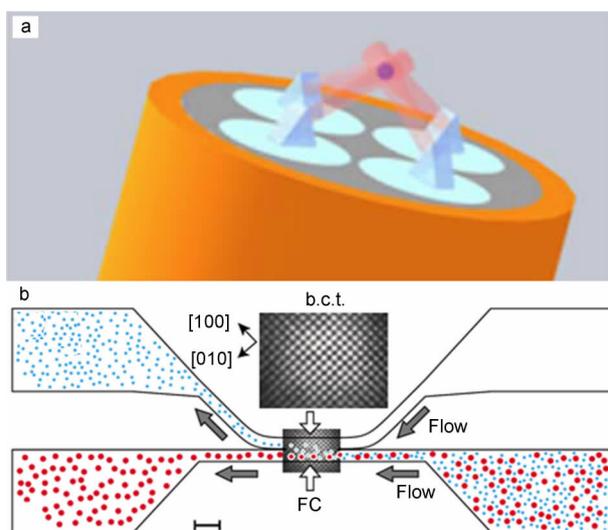


图 10 光分选结构示意图: (a) 三维光镊^[327]; (b) 光学连续分选^[330]

Fig. 10 Schematic illustrations of optical separation: (a) 3D optical tweezer^[327]; (b) optical lattice continuous separation^[330]

通常来说, 光镊技术仅能捕捉可数的细胞数量, 较适用于对微量样品的分析检测, 但不能对大量样品实现连续处理。为突破此局限, MacDonald 等^[330]提出一种连续分选装置, 如图 10(b) 所示, 将样品流引入分离腔, 通过强光干涉使粒子发生不同的偏转, 依据二氧化硅小球与聚合物微球在折射率上的不同, 以及 $2\ \mu\text{m}$ 和 $4\ \mu\text{m}$ 蛋白质微囊在尺寸上的不同分别实现连续分离, 分选效率大于 96%。值得一提的是, 对于拥有复杂细胞膜及细胞器结构的细胞而言, 不同细胞应具有不同的折射率, 这使得该项技术可拓展应用于细胞分选。此外, Milne 等^[331]提出另一种分选精度更高的连续分选装置, 可分辨 $2.47\ \mu\text{m}$ 与 $3.01\ \mu\text{m}$ 的二氧化硅微球, 通量为 40 微粒/秒; Guck 等^[332]利用细胞的变形性, 通过聚焦光束对细胞进行计数分选, 通量依然较低。

光分选技术操控微量样品精度极高, 但目前来说仍极少见到光分选成功应用于稀有细胞的案例, 这主要可能是由于其芯片结构复杂、成本高、分选效率过低等因素造成的。此外, 光学技术的分选机理也有待进一步的研究。

4 多级分选

微流控的各种技术近年来都取得了长足的发展, 但每种方法都有其局限性, 存在分选纯度不高、通量偏低等不足, 尤其是面向外周血中含量极低的

CTCs 分选,难以同时满足高通量、高纯度的分选要求。为此,研究者们采取将单一技术重复操作,或将多种技术相集成的方法,设计出各种不同的多级分选(multistage separation)微流控芯片。

在多级分选微流控芯片中,惯性技术因其结构简单,样品制备容易,在高通量的同时还能保证较高的分选纯度而备受研究者们青睐。惯性技术中最简单的就是直流道结构,Tanaka 等^[333]设计了一种四级分选微流控芯片,如图 11(a)所示,该芯片利用在矩形截面微流道中粒子在惯性升力作用下逐渐迁移至离流道中线 0.6 W 的位置处的原理(W 是流道宽度的一半),将 MDA-MB-231 癌细胞逐渐迁移至无红细胞层中,从而实现两者的分离。芯片通量达到 565 $\mu\text{L}/\text{min}$,可分离出约 85% 的 MCF-7,分离后癌细胞的浓度提升 12 倍。Parichehreh 等^[334]在高深宽比直流道两侧引入对红细胞亲和性好的蔗糖溶液,并通过惯性效应强化亲和分选的效果,通过将两级直流道串联起来可将红细胞去除率从约 96% 提升至大于 99%,而稀有细胞(T 淋巴母细胞 MOLT-3, MCF-7)的重新捕获率保持在 98%。

缩扩流道同直流道一样在整体上具有易于集成的平直结构,且因引入涡流使其对细胞的分选效果更好,因此在多级分选芯片中常常见到缩扩结构。一般来说,缩扩结构难以兼顾纯度及重新捕获率两项分选指标^[168]。为解决此问题,Moon 等^[335]设计了如图 11(b)所示的两级分选装置(multi-stage multi-orifice flow fractionation, MS-MOFF),第二级采用和第一级完全相同的两条缩扩结构,对第一级流道两边出口处包含大部分血细胞和残余 MCF-7 循环肿瘤细胞的样本进行进一步分选提纯。相对于单级缩扩流道,采用该芯片进行聚苯乙烯粒子实验^[336]可大大提升重新捕获率(从 73.2% 升至 88.7%),同时保证纯度下降不多(从 91.4% 降至 89.1%);用之富集 MCF-7 亦可将重新捕获率从 88.8% 提升至 98.9%,同时保持 126 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的较高通量。值得一提的是,细胞实验中因 CTCs 数量太少,即使仅有 0.01%~1% 红细胞混入中间出口也会显著降低 MCF-7 的纯度,再加上缩扩结构本身平衡位置不稳定,以及细胞株在尺寸上的差异性,致使 MS-MOFF 结构的分选 MCF-7 纯度仅有 0.3%。为克服此不足,将缩扩结构与分选精度高的介电泳技术相结合,充分利用细胞在介电属性的差异进一步分选提纯提供了一个良好的解决方案。Moon 等^[337]提出如图 11(c)所示的 MOFF + DEP 芯片,将缩扩

结构中间出口与含有两组斜插齿电极的介电泳芯片相连接,通过 MOFF 结构去除大部分血细胞,而介电泳中的第一组电极将 MOFF 粗分选出的所有细胞排列至流道壁面处,第二组电极则仅将 CTCs 迁移至流道中心,实现精确分选。该芯片成功集成了惯性芯片的高通量优势与介电泳技术的高纯度优势,可去除 99.24% 的红细胞及 94.23% 的白细胞,在同样 126 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的通量条件下分选 MCF-7 纯度达到 16.24%,重新捕获率为 75.81%,相对浓度提升 162 倍。Shen 等^[338]则提出了另一种更简单的多级结构,将 MOFF 与微尺寸过滤结构将集成。如图 11(d)所示,在缩扩结构中间出口两侧设置两排间隙为 10 μm 的立柱,允许血细胞通过而保留 CTCs。用之分选 MCF-7 及 HeLa 细胞,在 2.24×10^7 细胞/分钟的通量下可获得大于 90% 的重新捕获率,相对浓度提升 2.02×10^5 倍。

除了缩扩流道,惯性分选中的另一种重要结构螺旋流道亦可集成至多级分选芯片中。Bhagat 等^[339]提出了将缩扩流道与螺旋流道相集成的概念:第一级采用缩扩流道,在 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流量下移除 99% 的红细胞和 99% 的白细胞,并从中间的出口处收集到 90% 的 MCF-7 癌细胞;第二级采用螺旋流道,对第一级分选结果进行进一步提纯。该设计虽是两级分选的概念,但实际上由两块芯片构成,实验时需将缩扩流道出口处的样品收集后再注入螺旋流道入口处,操作复杂,而这主要是由于螺旋流道入口处于中间位置,难以集成造成的。Hou 等^[340]设计了两级螺旋流道结构的芯片,如图 11(e)所示,通过芯片外独立的微管将一级螺旋流道 CTCs 出口与二级螺旋流道入口相连通。二级螺旋流道主要用于对一级分选结果进一步分离提纯,去除混入其中的白细胞和红细胞。利用该芯片,在 3 mL/h 的流量下,MCF-7 重获率大于 85%,对红细胞、白细胞的相对浓度分别提升 10^9 和 10^3 倍。此外,该文章通过巧妙地设计矩形螺旋流道深宽比,使得流道中只有大细胞能实现聚焦,而小细胞在入口处鞘液流的辅助下保持在相对集中的位置,依此实现分离,其思想值得借鉴。

另一种被动分选技术确定性阵列偏移(DLD)亦常被集成至多级分选芯片中。Huang 等^[128]设计了两级分选芯片用于分选孕妇血液中的有核红细胞(NRBCs),通过一级 DLD 结构去除 RBC 及血小板,再依据 NRBCs 与 WBC 之间的磁性差异进行二级磁分选。使用该芯片可去除约 99.99% 的非目标细胞,并在 58 份样品中全部成功检测到 NRBCs。

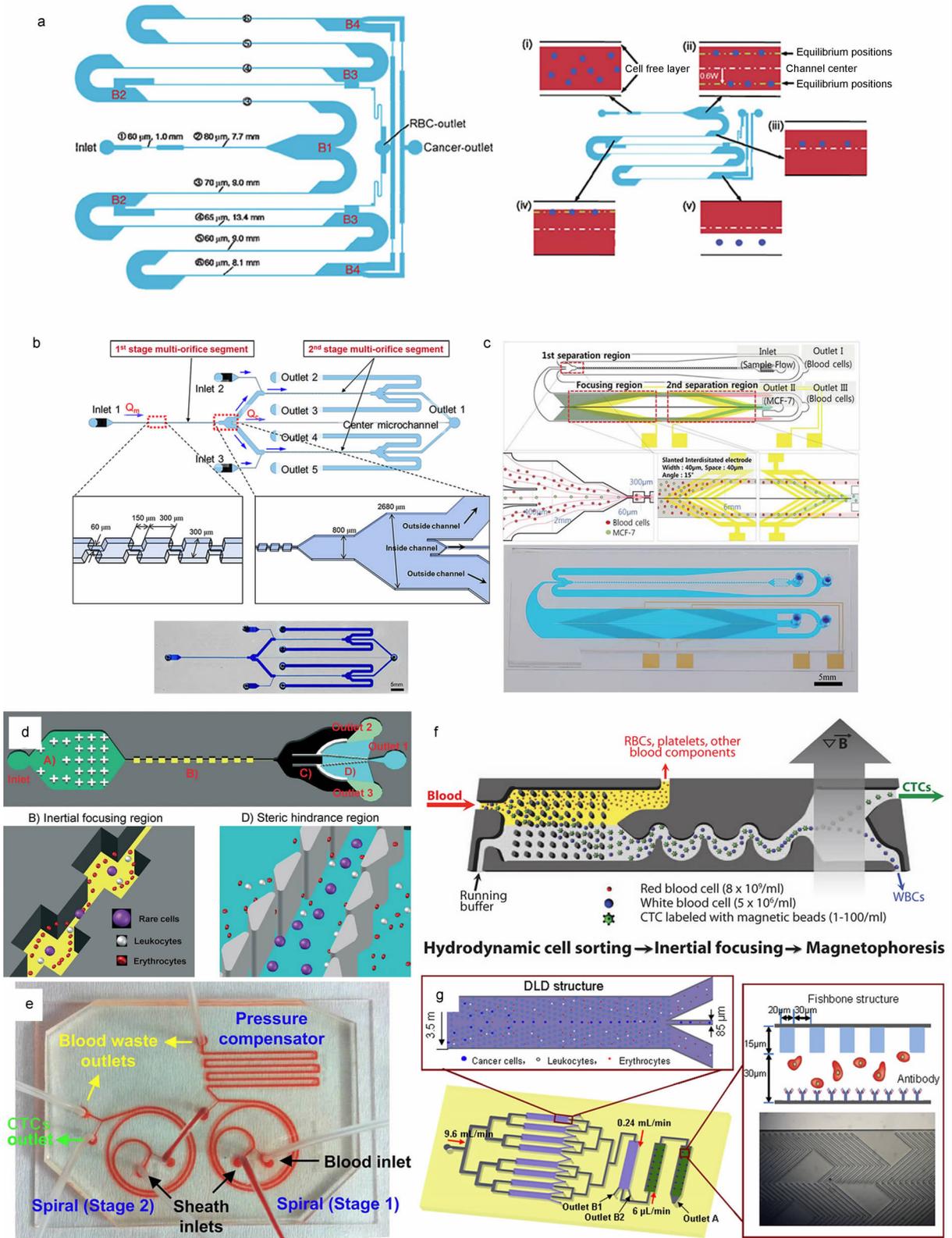


图 11 多级分选结构示意图：(a)四级直流通道^[333]；(b)两级缩扩流道^[335]；(c)缩扩结构+介电泳^[337]；(d)缩扩结构+微结构过滤^[338]；(e)两级螺旋流道^[340]；(f)确定性侧向偏移+惯性+磁性分选^[341]；(g)两级确定性侧向偏移+亲和性分选^[132]

Fig. 11 Schematic illustrations of multistage separation: (a) four-stage straight microchannel^[333]；(b) MS-MOFF^[335]；(c) MOFF + DEP^[337]；(d) MOFF + microscale filtration^[338]；(e) two-stage spiral microchannel^[340]；(f) DLD + inertia + magnetic separation^[341]；(g) DLD + DLD + affinity separation^[132]

Ozkumur 等^[341]将 DLD、惯性及磁分选技术相结合,设计出如图 11(f)所示的三级分选芯片。其中一级 DLD 结构用于移除血液中的红细胞、血小板、血浆及蛋白质等;二级正弦型惯性微流道结构用于将进入其中的 WBC 及 CTCs 聚焦至同一平衡位置;三级分选采用磁力分选,通过对预先标记的白细胞或循环肿瘤细胞施加磁场实现两者的分离。采用该芯片, Ozkumur 等成功实现了 MDA-MB-231、SKBR3 及 MCF10A 等从循环血液中的良好分离, 通量高达 8 mL/h (10^7 cells/s)。Liu 等^[132]则将 DLD 与亲和性分选技术相结合,设计出另一种三级分选芯片。如图 11(g)所示,一级结构集成六条 DLD 流道以提高通量,各自从中间出口分选出 MCF-7 及部分 WBCs,经二级 DLD 进一步提纯后,三级修饰有抗 EpCAM 抗体的鱼骨状结构再精确捕捉 MCF-7。使用该芯片可达到 9.6 mL/min 的超高通量,仅前两级 DLD 结构就可将 MCF-7 相对浓度提升 1500 倍,重新捕获率大于 90%,纯度大于 50%。但需要指出的是该实验中样品浓度相对较低,仅有 10^2 cells/mL。

在其他的一些多级分选技术中, Kapishnikov 等^[317]将三级声分选流道相串联,依据大尺寸粒子在声场中迁移速度大于小粒子的原理实现血细胞与血浆的分离,分选效率高达 99.975%。此外,前文介绍的螺旋流道芯片^[176]、仿生分选芯片^[192]、介电泳分选芯片^[275]等也都在同一结构内集成了多级分选的概念。

总体来说,多级分选微流控芯片中二(三)级分选结构的功能多有不同,可以是对一级分选出的结果进行再次去杂,以提高纯度^[132, 275, 317, 334, 337-340];可以是对一级遗弃的废液再次富集,以提高重新捕获率^[335, 336];亦可是通过一二级结构分别去除样品中相同或不同种类的非目标细胞^[128, 132, 176, 192, 226, 333, 341]。但不论是基于何种原理,多级分选均可以显著优化分选效果。此外,考虑到 CTCs 含量极少,为获得足够多的 CTCs 细胞需要采集大量血液样品,多级分选芯片中多会引入被动分选技术,保证了较高的通量。这些使得多级分选微流控芯片在临床上更具有实际应用价值。

本课题组长期从事微流控芯片的研究工作,在微流控芯片加工工艺^[342, 343]、惯性流中粒子迁移的仿真^[39-42]与实验^[43-46]、介电泳精确操控纳米粒子^[47-51]或纳米线^[52, 53]等方面取得了丰厚的研究成果。基于本课题组的研究基础,本文提出一种集成梯形截面螺旋流道及介电泳技术的新型多级分选微

流控芯片(如图 12 所示),应用于 CTCs 分选富集有望显著提高通量、纯度及重新捕获率等关键分选指标,具备一定的临床应用发展前景。

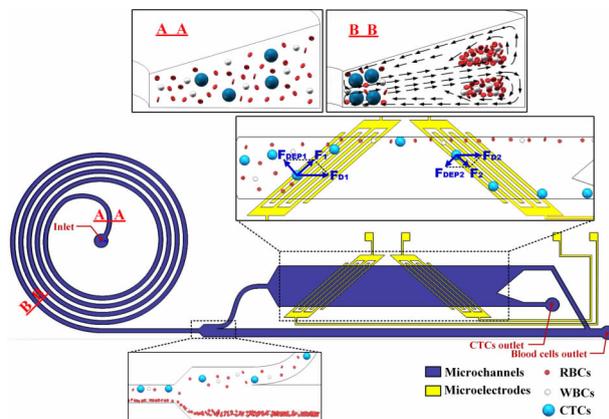


图 12 结合梯形截面螺旋流道及介电泳技术的新型 CTCs 多级分选微流控芯片

Fig. 12 A novel microfluidic chip integrated slanted spiral microchannel and dielectrophoresis technique for CTCs separation

如图 12 所示,本研究方案的一级结构采用内侧低、外侧高的梯形截面螺旋流道,对含有 CTCs 的原始血液样品进行高通量粗分选。相较而言,较多采用的缩扩结构因平衡位置范围较大致使分选纯度偏低;而传统的矩形截面螺旋流道则因特定平衡位置距离过近,处理高浓度样品时细胞间的相互作用对分选结果影响很大。采用梯形截面螺旋流道可将 CTCs 和血细胞分别聚焦至内、外侧壁面处,在保持高通量的同时还有较高的分选纯度,减轻二级分选的压力。螺旋流道出口处设置突扩结构,放大细胞流平衡位置间的距离,之后大部分血细胞进入血细胞出口,CTCs 及混杂的少量血细胞进入二级分选结构。本研究方案的二级结构采用超高宽深比的矩形截面流道,适当降低流速以提高分选精度。流道底部铺设两组斜插齿电极,第一组电极对所有细胞施加负介电泳作用,将其迁移至上壁面处;第二组电极仅对尺寸较大的 CTCs 施加介电泳作用,将其迁移至下壁面处,实现精确分选。该多级分选微流控芯片针对 CTCs 分选的苛刻要求,巧妙地集成了梯形截面螺旋流道的高通量优势及斜插齿电极介电泳分选的高纯度优势,为微流控芯片 CTCs 分选的临床应用提供一种潜在的重要技术手段。

5 总结与展望

微流控芯片可以在微尺寸环境下精细地操控细

胞,显著地降低了样品及试剂的消耗,易于实现分选器件的微型化。近年来稀有细胞分选芯片发展迅猛,在实现高通量、高纯度的分选目标上取得了长足的进展,其不仅可以应用于从血液中分选 CTCs,亦可拓展应用到从胸膜液、腹膜液、脑脊液、尿液等其他体液中富集稀有细胞。

本文详细阐述了各种被动及主动分选技术,并分析其各自的优势与不足。总体来说,微流控芯片应用于稀有细胞分选的不足主要表现在耗时长、效果差、细胞活性受损三个方面。首先在通量上,大部分芯片的操控对象均是经稀释后的样品,若用其处理 7.5 mL 标准血液样品则可能需要长达数小时的时间。被动分选技术中,可拓宽流道尺寸的微尺寸过滤和拥有较高流速的惯性分选技术更容易实现较高的通量,但前者易堵塞且分选不连续,后者较高流速产生的高剪切力可能会损伤细胞的活性,两者都不利于对捕获细胞的后续分析。主动分选方法中的电、磁、声、光等技术手段通量更低,多在数十微升每小时的级别,难以应用于临床。其次在分选效果上,尽管目前很多研究可在某一分选指标上达到 90% 以上的良好效果,但大多是采用人工配置的样品,并不能真实表现临床采集的体液条件,这其中一是由于配备样品中的 CTCs 含量远高于实际血液中,另一方面是因为培养获得的 CTCs 较原始 CTCs 在性状上与白细胞相差更大。考虑到 CTCs 的内在性状与白细胞有很大重叠,白细胞数量远多于 CTCs 的事实使得分选出的样品中往往含有较多的白细胞。即便是基于抗原抗体吸附的方法,也存在有些 CTCs 丢失表达的现象,而这些意味着很多实验可能高估了其应用于临床的效果。此外,通量和纯度在大多数芯片中往往是互相制约的两个指标,通量上升则意味着纯度下降,反之亦然,如何兼顾两者是微流控分选技术发展的又一挑战。最后,考虑到捕获到的细胞可能含有不同的亚型,或是同一类细胞的不同生长阶段,后续的表型分析对临床诊断具有重要意义,这对捕获细胞的活性提出了较高的要求。但是,微通道中微结构的挤压,高剪切流的流场,外加的电场、声场等都会对细胞的活性造成一定的损伤,对后续分析造成困扰。

相较而言,通常来说被动分选技术具有较高的通量,主动分选技术操控更精确,因此,将多种技术融合,尤其是将主动与被动分选技术合理融合的多级分选芯片能撷取各家优点,更易实现稀有细胞的分选要求。尽管目前的多级分选芯片还都只是原型

器件,在芯片设计、加工工艺上也更复杂些,但其良好的分选效果使其正吸引越来越多的目光,是未来商业化发展的一个主要方向。

尽管目前来说,繁杂的制备工艺,精细的操作要求及较差的可靠性等限制使得将稀有细胞分选微流控芯片推广至临床应用仍面临重重困难,但不可否认其在基于体液的分选、分析上具有巨大的潜力。在总结分析前人工作的基础上,我们提出如下展望:(1)在同一块芯片内融合多种分选技术,实现体外循环筛选稀有细胞;(2)集成细胞分选、计数、诊断、分析等功能单元,在一块芯片上实现对样品的全部复杂操作;(3)舍弃注射泵、信号发生器等贵重仪器,制备便携、廉价的多功能微流控芯片,使其走出实验室。相信在不远的将来,人们也许就能在家中自己实现重大疾病早期检测、药物治疗效果评估等功能。

参 考 文 献

- [1] Aggarwal C, Meropol N J, Punt C J, Iannotti N, Saidman B H, Sabbath K D, Gabrail N Y, Picus J, Morse M A, Mitchell E, Miller M C, Cohen S J. *Ann. Oncol.*, 2013, 24: 420.
- [2] Ross A A, Cooper B W, Lazarus H M, Mackay W, Moss T J, Ciobanu N, Tallman M S, Kennedy M J, Davidson N E, Sweet D, Winter C, Akard L, Jansen J, Copelan E, Meagher R C, Herzig R H, Klumpp T R, Kahn D G, Warner N E. *Blood*, 1993, 82: 2605.
- [3] Bilkenroth U, Taubert H, Riemann D, Rebmann U, Heynemann H, Meye A. *Int. J. Cancer*, 2001, 92: 577.
- [4] Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sreter L, Tulassay Z. *Clin. Cancer Res.*, 2001, 7: 4080.
- [5] Naoe M, Ogawa Y, Morita J, Omori K, Takeshita K, Shichijyo T, Okumura T, Igarashi A, Yanaihara A, Iwamoto S, Fukagai T, Miyazaki A, Yoshida H. *Cancer (Hoboken, NJ, U. S.)*, 2007, 109: 1439.
- [6] Mehlen P, Puisieux A. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, 6: 449.
- [7] Pantel K, Alix-Panabieres C. *Trends Mol. Med.*, 2010, 16: 398.
- [8] Ejeckam G C, Sogbein S K, Mcleish W A. *Can. Med. Assoc. J.*, 1979, 120: 336.
- [9] Cristofanilli M, Budd G T, Ellis M J, Stopeck A, Matera J, Miller M C, Reuben J M, Doyle G V, Allard W J, Terstappen L W M M, Hayes D F. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 351: 781.
- [10] Hou J M, Krebs M G, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain R K, Priest L J C, Greystoke A, Zhou C, Morris K, Ward T, Blackhall F H, Dive C. *J. Clin. Oncol.*, 2012, 30: 525.
- [11] Balic M, Williams A, Lin H, Datar R, Cote R J. *Annu. Rev. Med.*, 2013, 64: 31.
- [12] Bidard F C, Fehm T, Ignatiadis M, Smerage J B, Alix-Panabieres C, Janni W, Messina C, Paoletti C, Muller V,

- Hayes D F, Piccart M, Pierga J Y. *Cancer Metastasis Rev.*, 2013, 32: 179.
- [13] Liotta L A, Saidel M G, Kleinerman J. *Cancer Res.*, 1976, 36: 889.
- [14] Miller M C, Doyle G V, Terstappen L W. *J. Oncol.*, 2010, 2010: 617421.
- [15] Kreuger A, Akerblom O, Hogman C F. *Vox Sang.*, 1975, 29: 81.
- [16] Lozada J L, Caplanis N, Proussaefs P, Willardsen J, Kammeyer G. *J. Oral Implantol.*, 2001, 27: 38.
- [17] Pasqualetti D, Ghirardini A, Cristina A M, Vaglio S, Fakeri A, Waldman A A, Girelli G. *Transfus. Apher. Sci.*, 2004, 30: 23.
- [18] Renzi P, Ginns L C. *J. Immunol. Methods*, 1987, 98: 53.
- [19] Bonner W A, Sweet R G, Hulett H R, Herzenbe L A. *Rev. Sci. Instrum.*, 1972, 43: 404.
- [20] Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. *Cytometry*, 1990, 11: 231.
- [21] Allard W J, Matera J, Miller M C, Repollet M, Connelly M C, Rao C, Tibbe A G J, Uhr J W, Terstappen L W M M. *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10: 6897.
- [22] De Bono J S, Scher H I, Montgomery R B, Parker C, Miller M C, Tissing H, Doyle G V, Terstappen L W, Pienta K J, Raghavan D. *Clin. Cancer Res.*, 2008, 14: 6302.
- [23] Liu M C, Shields P G, Warren R D, Cohen P, Wilkinson M, Ottaviano Y L, Rao S B, Eng-Wong J, Seillier-Moiseiwitsch F, Noone A M, Isaacs C. *J. Clin. Oncol.*, 2009, 27: 5153.
- [24] Whitesides G M. *Nature*, 2006, 442: 368.
- [25] 方肇伦 (Fang Z L), 徐章润 (Xun Z R), 方瑾 (Fang J). *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2006, 18(2): 1577.
- [26] 冯颖 (Feng Y), 王敏 (Wang M). *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2006, 18(07/08): 966.
- [27] 耿利娜 (Geng L N), 姜萍 (Jiang P), 徐建栋 (Xu J D), 车宝泉 (Che B Q), 屈锋 (Qu F), 邓玉林 (Deng Y L). *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2009, 21(9): 1905.
- [28] 姜萍 (Jiang P), 屈锋 (Qu F), 谭信 (Tan X), 李勤 (Li Q), 耿利娜 (Geng L N), 邓玉林 (Deng Y L). *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2009, 21(9): 1895.
- [29] 冷川 (Leng C), 张晓清 (Zhang X Q), 鞠焜先 (Ju H X). *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2009, 21(4): 687.
- [30] 瞿祥猛 (Qu X M), 林荣生 (Lin R S), 陈宏 (Chen H). *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2011, 23(1): 221.
- [31] 王立凯 (Wang L K), 冯喜增 (Feng X Z). *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2005, 17(3): 482.
- [32] 徐溢 (Xu Y), 吕君江 (Lv J J), 范伟 (Fan W), 温志渝 (Wen Z Y). *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2007, 19(5): 820.
- [33] 徐溢 (Xu Y), 张剑 (Zhang J), 徐平洲 (Xu P Z), 卢倩 (Lu Q), 曾雪 (Zeng X), 温志渝 (Wen Z Y). *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2007, 19(1): 186.
- [34] Yeo L Y, Chang H C, Chan P P Y, Friend J R. *Small*, 2011, 7: 12.
- [35] Cima I, Yee C W, Iliescu F S, Phyto W M, Lim K H, Iliescu C, Tan M H. *Biomicrofluidics*, 2013, 7: 011810.
- [36] Hyun K A, Jung H I. *Lab Chip*, 2014, 14: 45.
- [37] Sajeesh P, Sen A K. *Microfluid. Nanofluid.*, 2014, 17: 1.
- [38] Yu Z T F, Yong K M A, Fu J P. *Small*, 2014, 10: 1687.
- [39] Sun D K, Wang Y, Jiang D, Xiang N, Chen K, Ni Z H. *Appl. Phys. Lett.*, 2013, 103: 071905.
- [40] Sun D K, Xiang N, Jiang D, Chen K, Yi H, Ni Z H. *Chin. Phys. B*, 2013, 22: 114704.
- [41] Sun D K, Jiang D, Xiang N, Chen K, Ni Z H. *Chin. Phys. Lett.*, 2013, 30: 074702.
- [42] Jiang D, Sun D K, Xiang N, Chen K, Yi H, Ni Z H. *Biomicrofluidics*, 2013, 7: 034113.
- [43] 项楠 (Xiang N), 朱晓璐 (Zhu X L), 倪中华 (Ni Z H). *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2011, 23(9): 1945.
- [44] Xiang N, Chen K, Sun D K, Wang S F, Yi H, Ni Z H. *Microfluid. Nanofluid.*, 2013, 14: 89.
- [45] Xiang N, Yi H, Chen K, Sun D K, Jiang D, Dai Q, Ni Z H. *Biomicrofluidics*, 2013, 7: 044116.
- [46] Xiang N, Chen K, Dai Q, Jiang D, Sun D, Ni Z. *Microfluid. Nanofluid.*, 2015, 18: 29.
- [47] 朱晓璐 (Zhu X L), 倪中华 (Ni Z H). *东南大学学报 (自然科学版) (Journal of Southeast University (Natural Science Edition))*, 2007, 37(5): 861.
- [48] Zhu X L, Yi H, Ni Z H. *Biomicrofluidics*, 2010, 4: 013202.
- [49] Ni Z H, Zu S C, Chen K. *Sci. China: Technol. Sci.*, 2011, 54: 3035.
- [50] Zhu X L, Gao Z Q, Yin Z F, Ni Z H. *Microfluid. Nanofluid.*, 2010, 9: 981.
- [51] Zhu X L, Yin Z F, Ni Z H. *Microfluid. Nanofluid.*, 2012, 12: 529.
- [52] Chen K, Quan Y, Song C, Xiang N, Jiang D, Sun D, Yang J, Yi H, Ni Z. *Sens. Actuators A*, 2014, published online, DOI: 10.1016/j.sna.2014.07.025.
- [53] Chen K, Xiang N, Quan Y L, Zhu X L, Sun D K, Yi H, Ni Z H. *Microfluid. Nanofluid.*, 2014, 16: 237.
- [54] 唐文来 (Tang W L), 项楠 (Xiang N), 黄笛 (Huang D), 张鑫杰 (Zhang X J), 顾兴中 (Gu X Z), 倪中华 (Ni Z H). *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2014, 26(6): 1050.
- [55] Ji H M, Samper V, Chen Y, Heng C K, Lim T M, Yobas L. *Biomed. Microdevices*, 2008, 10: 251.
- [56] VanDelinder V, Groisman A. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 3765.
- [57] Crowley T A, Pizziconi V. *Lab Chip*, 2005, 5: 922.
- [58] Wilding P, Kricka L J, Cheng J, Hvichia G, Shoffner M A, Fortina P. *Anal. Biochem.*, 1998, 257: 95.
- [59] Chen Z Z, Zhang S Y, Tang Z M, Xiao P F, Guo X Y, Lu Z H. *Surf. Interface Anal.*, 2006, 38: 996.
- [60] Chen X, Cui D F, Liu C C, Li H. *Sens. Actuators B*, 2008, 130: 216.
- [61] Sim T S, Minseok S, Moon H S. *Proceedings of the Sixteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2012)* (Eds. Fujii T, Hibara A, Takeuchi S, et al.). Okinawa. 2012. 1114

- [62] Wilding P, Pfahler J, Bau H H, Zemel J N, Kricka L J. *Clin. Chem.*, 1994, 40: 43.
- [63] Mohamed H, McCurdy L D, Szarowski D H, Duva S, Turner J N, Caggana M. *IEEE T. NanoBiosci.*, 2004, 3: 251.
- [64] Mohamed H, Turner J N, Caggana M. *J. Chromatogr. A*, 2007, 1162: 187.
- [65] Mohamed H, Murray M, Turner J N, Caggana M. *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216: 8289.
- [66] Preira P, Grandne V, Forel J M, Gabriele S, Camara M, Theodoly O. *Lab Chip*, 2013, 13: 161.
- [67] Tan S J, Yobas L, Lee G Y H, Ong C N, Lim C T. *Biomed. Microdevices*, 2009, 11: 883.
- [68] McFaul S M, Lin B K, Ma H S. *Lab Chip*, 2012, 12: 2369.
- [69] Kim M S, Sim T S, Kim Y J, Kim S S, Jeong H, Park J M, Moon H S, Kim S I, Gurel O, Lee S S, Lee J G, Park J C. *Lab Chip*, 2012, 12: 2874.
- [70] Chen X, Cui D F, Zhang L L. *Chin. Sci. Bull.*, 2009, 54: 324.
- [71] Tachi T, Kaji N, Tokeshi M, Baba Y. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 3194.
- [72] Van Delinder V, Groisman A. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 2023.
- [73] Sethu P, Sin A, Toner M. *Lab Chip*, 2006, 6: 83.
- [74] Murthy S K, Sethu P, Vunjak-Novakovic G, Toner M, Radisic M. *Biomed. Microdevices*, 2006, 8: 231.
- [75] Lee D, Sukumar P, Mahyuddin A, Choolani M, Xu G L. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217: 1862.
- [76] Geng Z X, Ju Y R, Wang W, Li Z H. *Sens. Actuators B*, 2013, 180: 122.
- [77] Geng Z, Xu Z, Wang W, Su W, Li Z. 2010 10th IEEE International Conference on Solid-State and Integrated Circuit Technology (ICSICT 2010) (Eds. Tang T A, Jiang Y L). Shanghai: IEEE, 2010. 1474
- [78] Ju Y, Geng Z, Wang Q, Li Z. *Proceedings of the Sixteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2012)* (Eds. Fujii T, Hibara A, Takeuchi S, et al.). Okinawa: 2012. 1102
- [79] Desitter I, Guerrouahen B S, Benali-Furet N, Wechsler J, Janne P A, Kuang Y A, Yanagita M, Wang L L, Berkowitz J A, Distel R J, Cayre Y E. *Anticancer Res.*, 2011, 31: 427.
- [80] Hou J M, Krebs M, Ward T, Sloane R, Priest L, Hughes A, Clack G, Ranson M, Blackhall F, Dive C. *Am. J. Pathol.*, 2011, 178: 989.
- [81] De Giorgi V, Pinzani P, Salvianti F, Panelos J, Paglierani M, Janowska A, Grazzini M, Wechsler J, Orlando C, Santucci M, Lotti T, Pazzagli M, Massi D. *J. Invest. Dermatol.*, 2010, 130: 2440.
- [82] Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schutze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Brechot C, Paterlini-Brechot P. *Am. J. Pathol.*, 2000, 156: 57.
- [83] Pinzani P, Salvadori B, Simi L, Bianchi S, Distanti V, Cataliotti L, Pazzagli M, Orlando C. *Hum. Pathol.*, 2006, 37: 711.
- [84] Rostagno P, Moll J L, Bisconte J C, Caldani C. *Anticancer Res.*, 1997, 17: 2481.
- [85] 刘大渔 (Liu D Y), 严伟 (Yan W), 张琼 (Zhang Q), 马薇 (Ma W), 梁广铁 (Liang G T), Lee Y K. *分子诊断与治疗杂志 (Journal of Molecular Diagnostics and Therapy)*, 2012, 4 (06): 366.
- [86] Zheng S, Lin H, Liu J Q, Balic M, Datar R, Cote R J, Tai Y C. *J. Chromatogr. A*, 2007, 1162: 154.
- [87] Lin H K, Zheng S Y, Williams A J, Balic M, Groshen S, Scher H I, Fleisher M, Stadler W, Datar R H, Tai Y C, Cote R J. *Clin. Cancer Res.*, 2010, 16: 5011.
- [88] Zheng S Y, Lin H K, Lu B, Williams A, Datar R, Cote R J, Tai Y C. *Biomed. Microdevices*, 2011, 13: 203.
- [89] Xu T, Lu B, Tai Y C, Goldkorn A. *Cancer Res.*, 2010, 70: 6420.
- [90] Huang N T, Chen W Q, Oh B R, Cornell T T, Shanley T P, Fu J P, Kurabayashi K. *Lab Chip*, 2012, 12: 4093.
- [91] Chen W Q, Huang N T, Oh B, Lam R H W, Fan R, Cornell T T, Shanley T P, Kurabayashi K, Fu J P. *Adv. Healthcare Mater.*, 2013, 2: 965.
- [92] Lim L S, Hu M, Huang M C, Cheong W C, Gan A T L, Looi X L, Leong S M, Koay E S C, Li M H. *Lab Chip*, 2012, 12: 4388.
- [93] Hosokawa M, Asami M, Nakamura S, Yoshino T, Tsujimura N, Takahashi M, Nakasono S, Tanaka T, Matsunaga T. *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, 109: 2017.
- [94] Hosokawa M, Hayata T, Fukuda Y, Arakaki A, Yoshino T, Tanaka T, Matsunaga T. *Anal. Chem.*, 2010, 82: 6629.
- [95] Didar T F, Li K B, Tabrizian M, Veres T. *Lab Chip*, 2013, 13: 2615.
- [96] Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, Henry C S, Laiwattanapaisal W. *Lab Chip*, 2012, 12: 3392.
- [97] Vella S J, Beattie P, Cademartiri R, Laromaine A, Martinez A W, Phillips S T, Mirica K A, Whitesides G M. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 2883.
- [98] Kuo J S, Zhao Y X, Schiro P G, Ng L Y, Lim D S W, Shelby J P, Chiu D T. *Lab Chip*, 2010, 10: 837.
- [99] Roda B, Zattoni A, Reschiglian P, Moon M H, Mirasoli M, Michelin E, Roda A. *Anal. Chim. Acta*, 2009, 635: 132.
- [100] Rambaldi D C, Reschiglian P, Zattoni A. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399: 1439.
- [101] Vykoukal J, Vykoukal D M, Freyberg S, Alt E U, Gascoyne P R C. *Lab Chip*, 2008, 8: 1386.
- [102] Wang X B, Yang J, Huang Y, Vykoukal J, Becker F F, Gascoyne P R C. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 832.
- [103] Gascoyne P R C, Noshari J, Anderson T J, Becker F F. *Electrophoresis*, 2009, 30: 1388.
- [104] Shim S, Gascoyne P, Noshari J, Hale K S. *Integr. Biol.*, 2011, 3: 850.
- [105] Giddings J C. *Science*, 1993, 260: 1456.
- [106] Yamada M, Nakashima M, Seki M. *Anal. Chem.*, 2004, 76:

- 5465.
- [107] Takagi J, Yamada M, Yasuda M, Seki M. *Lab Chip*, 2005, 5: 778.
- [108] Yamada M, Seki M. *Lab Chip*, 2005, 5: 1233.
- [109] Kersaudy-Kerhoas M, Dhariwal R, Desmulliez M P Y, Jovet L. *Microfluid. Nanofluid.*, 2010, 8: 105.
- [110] Yamada M, Kano K, Tsuda Y, Kobayashi J, Yamato M, Seki M, Okano T. *Biomed. Microdevices*, 2007, 9: 637.
- [111] Kim M, Jung S M, Lee K H, Kang Y J, Yang S. *Artif. Organs*, 2010, 34: 996.
- [112] Sethu P, Anahtar M, Moldawer L L, Tompkins R G, Toner M. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 6247.
- [113] Sethu P, Moldawer L L, Mindrinos M N, Scumpia P O, Tannahill C L, Wilhelmy J, Efron P A, Brownstein B H, Tompkins R G, Toner M. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 5453.
- [114] Choi S, Park J K. *Lab Chip*, 2007, 7: 890.
- [115] Choi S, Song S, Choi C, Park J K. *Lab Chip*, 2007, 7: 1532.
- [116] Choi S, Ku T, Song S, Choi C, Park J K. *Lab Chip*, 2011, 11: 413.
- [117] Bernate J A, Liu C, Lagae L, Konstantopoulos K, Drazer G. *Lab Chip*, 2013, 13: 1086.
- [118] Choi S, Song S, Choi C, Park J K. *Small*, 2008, 4: 634.
- [119] Huang L R, Cox E C, Austin R H, Sturm J C. *Science*, 2004, 304: 987.
- [120] Inglis D W, Davis J A, Austin R H, Sturm J C. *Lab Chip*, 2006, 6: 655.
- [121] Inglis D W. *Appl. Phys. Lett.*, 2009, 94: 013510.
- [122] Long B R, Heller M, Beech J P, Linke H, Bruus H, Tegenfeldt J O. *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 2008, 78: 046304.
- [123] Beech J P, Tegenfeldt J O. *Lab Chip*, 2008, 8: 657.
- [124] Zheng S, Tai Y C, Kasdan H. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 2005, 1: 1024.
- [125] Davis J A, Inglis D W, Morton K J, Lawrence D A, Huang L R, Chou S Y, Sturm J C, Austin R H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, 103: 14779.
- [126] Inglis D W, Lord M, Nordon R E. *J. Micromech. Microeng.*, 2011, 21: 054024.
- [127] Beech J P, Holm S H, Adolfsson K, Tegenfeldt J O. *Lab Chip*, 2012, 12: 1048.
- [128] Huang R, Barber T A, Schmidt M A, Tompkins R G, Toner M, Bianchi D W, Kapur R, Flejter W L. *Prenatal Diagn.*, 2008, 28: 892.
- [129] Holm S H, Beech J P, Barrett M P, Tegenfeldt J O. *Lab Chip*, 2011, 11: 1326.
- [130] Louterback K, Chou K S, Newman J, Puchalla J, Austin R H, Sturm J C. *Microfluid. Nanofluid.*, 2010, 9: 1143.
- [131] Liu Z B, Huang F, Du J H, Shu W L, Feng H T, Xu X P, Chen Y. *Biomicrofluidics*, 2013, 7: 011801.
- [132] Liu Z B, Zhang W, Huang F, Feng H T, Shu W L, Xu X P, Chen Y. *Biosens. Bioelectron.*, 2013, 47: 113.
- [133] Louterback K, D' Silva J, Liu L, Wu A, Austin R H, Sturm J C. *AIP Adv.*, 2012, 2: 042107.
- [134] Zeming K K, Ranjan S, Zhang Y. *Nat. Commun.*, 2013, 4: 1625.
- [135] Ranjan S, Zeming K K, Jureen R, Fisher D, Zhang Y. *Lab Chip*, 2014, 14: 4250.
- [136] Inglis D W, Davis J A, Zieziulewicz T J, Lawrence D A, Austin R H, Sturm J C. *J. Immunol. Methods*, 2008, 329: 151.
- [137] Morton K J, Louterback K, Inglis D W, Tsui O K, Sturm J C, Chou S Y, Austin R H. *Lab Chip*, 2008, 8: 1448.
- [138] Ho B P, Leal L G. *J. Fluid Mech.*, 1974, 65: 365.
- [139] Di Carlo D, Edd J F, Humphry K J, Stone H A, Toner M. *Phys. Rev. Lett.*, 2009, 102: 094503.
- [140] Asmolov E S. *J. Fluid Mech.*, 1999, 381: 63.
- [141] Chun B, Ladd A J C. *Phys. Fluids*, 2006, 18: 031704.
- [142] Segre G, Silberberg A. *Nature*, 1961, 189: 209.
- [143] Choi Y S, Lee S J. *Microfluid. Nanofluid.*, 2010, 9: 819.
- [144] Di Carlo D, Irimia D, Tompkins R G, Toner M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, 104: 18892.
- [145] Kim Y W, Yoo J Y. *J. Micromech. Microeng.*, 2008, 18: 065015.
- [146] Gossett D R, di Carlo D. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 8459.
- [147] Bhagat A A S, Kuntaegowdanahalli S S, Papautsky I. *Phys. Fluids*, 2008, 20: 101702.
- [148] Mach A J, di Carlo D. *Biotechnol. Bioeng.*, 2010, 107: 302.
- [149] Bhagat A A S, Kuntaegowdanahalli S S, Papautsky I. *Microfluid. Nanofluid.*, 2009, 7: 217.
- [150] Hur S C, Tse H T K, di Carlo D. *Lab Chip*, 2010, 10: 274.
- [151] Hansson J, Karlsson J M, Haraldsson T, Brismar H, van der Wijngaart W, Russom A. *Lab Chip*, 2012, 12: 4644.
- [152] Di Carlo D. *Lab Chip*, 2009, 9: 3038.
- [153] R D W. *Philos. Mag.*, 1927, 20: 208.
- [154] Berger S A, Talbot L, Yao L S. *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 1983, 15: 461.
- [155] Yoon D H, Ha J B, Bahk Y K, Arakawa T, Shoji S, Go J S. *Lab Chip*, 2009, 9: 87.
- [156] Oozeki N, Ookawara S, Ogawa K, Lob P, Hessel V. *AICHE J.*, 2009, 55: 24.
- [157] Ookawara S, Oozeki N, Ogawa K, Lob P, Hessel V. *Chem. Eng. Process.*, 2010, 49: 697.
- [158] Oakey J, Applegate R W, Arellano E, di Carlo D, Graves S W, Toner M. *Anal. Chem.*, 2010, 82: 3862.
- [159] Di Carlo D, Edd J F, Irimia D, Tompkins R G, Toner M. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 2204.
- [160] Bhagat A A S, Kuntaegowdanahalli S S, Kaval N, Seliskar C J, Papautsky I. *Biomed. Microdevices*, 2010, 12: 187.
- [161] Bhagat A A S, Kuntaegowdanahalli S S, Papautsky I. *Lab Chip*, 2008, 8: 1906.
- [162] Russom A, Gupta A K, Nagrath S, di Carlo D, Edd J F, Toner M. *New J. Phys.*, 2009, 11: 075025.
- [163] Seo J, Lean M H, Kole A. *J. Chromatogr. A*, 2007, 1162: 126.
- [164] Seo J, Lean M H, Kole A. *Appl. Phys. Lett.*, 2007, 91: 090801.

033901.

- [165] Wu Z G, Willing B, Bjerketorp J, Jansson J K, Hjort K. *Lab Chip*, 2009, 9: 1193.
- [166] Zhang X B, Wu Z Q, Wang K, Zhu J, Xu J J, Xia X H, Chen H Y. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 3780.
- [167] Park J S, Song S H, Jung H I. *Lab Chip*, 2009, 9: 939.
- [168] Park J S, Jung H I. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 8280.
- [169] Warkiani M E, Tay A K P, Khoo B L, Xu X F, Han J, Lim C T. *Lab Chip*, 2015, published online, DOI: 10.1039/C4LC01058B.
- [170] Bhagat A A S, Hou H W, Li L D, Lim C T, Han J Y. *Lab Chip*, 2011, 11: 1870.
- [171] Hyun K A, Kwon K, Han H, Kim S I, Jung H I. *Biosens. Bioelectron.*, 2013, 40: 206.
- [172] Kuntaegowdanahalli S S, Bhagat A A S, Kumar G, Papautsky I. *Lab Chip*, 2009, 9: 2973.
- [173] Nivedita N, Papautsky I. *Biomicrofluidics*, 2013, 7: 054101.
- [174] Lee W C, Shi H, Poon Z Y, Nyan L M, Kaushik T, Shivashankar G V, Chan J K Y, Lim C T, Han J, van Vliet K J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014, 111: E4409.
- [175] Warkiani M E, Khoo B L, Tan D S W, Bhagat A A S, Lim W T, Yap Y S, Lee S C, Soo R A, Han J, Lim C T. *Analyst*, 2014, 139: 3245.
- [176] Kim T H, Yoon H J, Stella P, Nagrath S. *Biomicrofluidics*, 2014, 8: 064117.
- [177] Sun J S, Li M M, Liu C, Zhang Y, Liu D B, Liu W W, Hu G Q, Jiang X Y. *Lab Chip*, 2012, 12: 3952.
- [178] Sun J S, Liu C, Li M M, Wang J D, Xianyu Y L, Hu G Q, Jiang X Y. *Biomicrofluidics*, 2013, 7: 011802.
- [179] Guan G F, Wu L D, Bhagat A A S, Li Z R, Chen P C Y, Chao S Z, Ong C J, Han J Y. *Sci. Rep.*, 2013, 3: 01475.
- [180] Wu L D, Guan G F, Hou H W, Bhagat A A S, Han J. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 9324.
- [181] Warkiani M E, Guan G F, Luan K B, Lee W C, Bhagat A A S, Chaudhuri P K, Tan D S W, Lim W T, Lee S C, Chen P C Y, Lim C T, Han J. *Lab Chip*, 2014, 14: 128.
- [182] Goldsmith H L, Cokelet G R, Gaehtgens P. *Am. J. Physiol.*, 1989, 257: H1005.
- [183] Zhou R H, Chang H C. *J. Colloid Interface Sci.*, 2005, 287: 647.
- [184] Pries A R, Secomb T W, Gaehtgens P. *Cardiovasc. Res.*, 1996, 32: 654.
- [185] Goldsmith H L, Spain S. *Microvasc. Res.*, 1984, 27: 204.
- [186] Fung Y. *Microvasc. Res.*, 1973, 5: 34.
- [187] Schmidchonbein G W, Skalak R, Usami S, Chien S. *Microvasc. Res.*, 1980, 19: 18.
- [188] Yen R T, Fung Y C. *Am. J. Physiol.*, 1978, 235: H251.
- [189] Browne A W, Ramasamy L, Cripe T P, Ahn C H. *Lab Chip*, 2011, 11: 2440.
- [190] Faivre M, Abkarian M, Bickraj K, Stone H A. *Biorheology*, 2006, 43: 147.
- [191] Sollier E, Rostaing H, Pouteau P, Fouillet Y, Achard J L. *Sens. Actuators B*, 2009, 141: 617.
- [192] Shevkoplyas S S, Yoshida T, Munn L L, Bitensky M W. *Anal. Chem.*, 2005, 77: 933.
- [193] Jaggi R D, Sandoz R, Effenhauser C S. *Microfluid. Nanofluid.*, 2007, 3: 47.
- [194] Yang S, Undar A, Zahn J D. *Lab Chip*, 2006, 6: 871.
- [195] Fan R, Vermesh O, Srivastava A, Yen B K H, Qin L D, Ahmad H, Kwong G A, Liu C C, Gould J, Hood L, Heath J R. *Nat. Biotechnol.*, 2008, 26: 1373.
- [196] Geng Z, Zhang L, Ju Y, Wang W, Li Z. *The 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences 2011 (MicroTAS 2011)* (Eds. Landers J). Seattle: CBMS, 2011. 224.
- [197] Bernard A, Michel B, Delamarche E. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 8.
- [198] Zhang Z L, Crozatier C, Le Berre M, Chen Y. *Microelectron. Eng.*, 2005, 78/79: 556.
- [199] Litvinov S V, Velders M P, Bakker H A M, Fleuren G J, Warnaar S O. *J. Cell Biol.*, 1994, 125: 437.
- [200] Kotz K T, Xiao W, Miller-Graziano C, Qian W J, Russom A, Warner E A, Moldawer L L, De A, Bankey P E, Petritis B O, Camp D G, Rosenbach A E, Goverman J, Fagan S P, Brownstein B H, Irimia D, Xu W H, Wilhelmy J, Mindrinos M N, Smith R D, Davis R W, Tompkins R G, Toner M, Injury I H R. *Nat. Med. (NY, U. S.)*, 2010, 16: 1042.
- [201] Nagrath S, Sequist L V, Maheswaran S, Bell D W, Irimia D, Ulkus L, Smith M R, Kwak E L, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis U J, Tompkins R G, Haber D A, Toner M. *Nature*, 2007, 450: 1235.
- [202] Gleghorn J P, Pratt E D, Denning D, Liu H, Bander N H, Tagawa S T, Nanus D M, Giannakakou P A, Kirby B J. *Lab Chip*, 2010, 10: 27.
- [203] Kurkuri M D, Al-Ejeh F, Shi J Y, Palms D, Prestidge C, Griesser H J, Brown M P, Thierry B. *J. Mater. Chem.*, 2011, 21: 8841.
- [204] Wang S T, Wang H, Jiao J, Chen K J, Owens G E, Kamei K I, Sun J, Sherman D J, Behrenbruch C P, Wu H, Tseng H R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48: 8970.
- [205] Iyer S, Gaikwad R M, Subba-Rao V, Woodworth C D, Sokolov I. *Nat. Nanotechnol.*, 2009, 4: 389.
- [206] Hughes A D, Mattison J, Powderly J D, Greene B T, King M R. *J. Visualized Exp.*, 2012, 64: e4248.
- [207] Stott S L, Hsu C H, Tsukrov D I, Yu M, Miyamoto D T, Waltman B A, Rothenberg S M, Shah A M, Smas M E, Korir G K, Floyd F P, Gilman A J, Lord J B, Winokur D, Springer S, Irimia D, Nagrath S, Sequist L V, Lee R J, Isselbacher K J, Maheswaran S, Haber D A, Toner M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, 107: 18392.
- [208] Wang S T, Liu K, Liu J A, Yu Z T F, Xu X W, Zhao L B, Lee T, Lee E K, Reiss J, Lee Y K, Chung L W K, Huang J T, Rettig M, Seligson D, Duraiswamy K N, Shen C K F, Tseng H R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, 50: 3084.

- [209] Choi S Y, Karp J M, Karnik R. *Lab Chip*, 2012, 12: 1427.
- [210] Bose S, Singh R, Hanewich-Hollatz M, Shen C, Lee C H, Dorfman D M, Karp J M, Karnik R. *Sci. Rep.*, 2013, 3: 02329.
- [211] Karnik R, Hong S, Zhang H, Mei Y, Anderson D G, Karp J M, Langer R. *Nano Lett.*, 2008, 8: 1153.
- [212] Launiere C, Gaskill M, Czaplewski G, Myung J H, Hong S, Eddington D T. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 4022.
- [213] Sheng W A, Chen T, Katnath R, Xiong X L, Tan W H, Fan Z H. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 4199.
- [214] Simone G, Neuzil P, Perozziello G, Francardi M, Malara N, di Fabrizio E, Manz A. *Lab Chip*, 2012, 12: 1500.
- [215] Simone G, Malara N, Trunzo V, Perozziello G, Neuzil P, Francardi M, Roveda L, Renne M, Prati U, Mollace V, Manz A, di Fabrizio E. *Small*, 2013, 9: 2152.
- [216] Padler-Karavani V. *Cancer Lett. (NY, U. S.)*, 2014, 352: 102.
- [217] Li P, Gao Y, Pappas D. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 8140.
- [218] Zhu H, Stybayeva G, Macal M, Ramanculov E, George M D, Dandekar S, Revzin A. *Lab Chip*, 2008, 8: 2197.
- [219] Chen W Q, Weng S N, Zhang F, Allen S, Li X, Bao L W, Lam R H W, Macoska J A, Merajver S D, Fu J P. *ACS Nano*, 2013, 7: 566.
- [220] Gurkan U A, Anand T, Tas H, Elkan D, Akay A, Keles H O, Demirci U. *Lab Chip*, 2011, 11: 3979.
- [221] Gurkan U A, Tasoglu S, Akkaynak D, Avci O, Unluisler S, Canikyan S, MacCallum N, Demirci U. *Adv. Healthcare Mater.*, 2012, 1: 661.
- [222] Shah A M, Yu M, Nakamura Z, Ciciliano J, Ulman M, Kotz K, Stott S L, Maheswaran S, Haber D A, Toner M. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 3682.
- [223] Hou S, Zhao L B, Shen Q L, Yu J H, Ng C, Kong X J, Wu D X, Song M, Shi X H, Xu X C, OuYang W H, He R X, Zhao X Z, Lee T, Brunicardi F C, Garcia M A, Ribas A, Lo R S, Tseng H R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52: 3379.
- [224] Ariyasu S, Hanaya K, Watanabe E, Suzuki T, Horie K, Hayase M, Abe R, Aoki S. *Langmuir*, 2012, 28: 13118.
- [225] Lustberg M, Jatana K R, Zborowski M, Chalmers J J. *Recent Results Cancer Res.*, 2012, 195: 97.
- [226] Hyun K A, Lee T Y, Lee S H, Jung H L. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 67: 86.
- [227] Santisteban M, Reiman J M, Asiedu N K, Behrens M D, Nassar A, Kalli K R, Haluska P, Ingle J N, Hartmann L C, Manjili M H, Radisky D C, Ferrone S, Knutson K L. *Cancer Res.*, 2009, 69: 2887.
- [228] Frederick B A, Helfrich B A, Coldren C D, Zheng D, Chan D, Bunn P A, Raben D. *Mol. Cancer Ther.*, 2007, 6: 1683.
- [229] Challen G A, Boles N, Lin K K Y, Goodell M A. *Cytometry, Part A*, 2009, 75A: 14.
- [230] Mavrou A, Kouvidi E, Antsaklis A, Souka A, Tzeli S K, Kolialexi A. *Prenatal Diagn.*, 2007, 27: 150.
- [231] Van der Gun B T F, Melchers L J, Ruiters M H J, de Leij L F M H, McLaughlin P M J, Rots M G. *Carcinogenesis*, 2010, 31: 1913.
- [232] Kang K H, Kang Y, Xuan X, Li D. *Electrophoresis*, 2006, 27: 694.
- [233] Iliescu C, Xu G L, Loe F C, Ong P L, Tay F E H. *Electrophoresis*, 2007, 28: 1107.
- [234] Patel S, Showers D, Vedantam P, Tzeng T R, Qian S Z, Xuan X C. *Biomicrofluidics*, 2012, 6: 034102.
- [235] Meighan M M, Staton S J R, Hayes M A. *Electrophoresis*, 2009, 30: 852.
- [236] Khoshmanesh K, Nahavandi S, Baratchi S, Mitchell A, Kalantar-zadeh K. *Biosens. Bioelectron.*, 2011, 26: 1800.
- [237] Cemazar J, Miklavcic D, Kotnik T. *Inform. MIDEM J. Microelect. Elect. Compon. Mater.*, 2013, 43: 143.
- [238] Martinez-Duarte R. *Electrophoresis*, 2012, 33: 3110.
- [239] Pethig R, Menachery A, Pells S, de Sousa P. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010, 2010: 182581.
- [240] Zhang C, Khoshmanesh K, Mitchell A, Kalantar-zadeh K. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 396: 401.
- [241] Pethig R. *Biomicrofluidics*, 2010, 4: 022811.
- [242] Iliescu C, Xu G L, Samper V, Tay F E H. *J. Micromech. Microeng.*, 2005, 15: 494.
- [243] Flanagan L A, Lu J, Wang L, Marchenko S A, Jeon N L, Lee A P, Monuki E S. *Stem Cells (Durham, NC, U. S.)*, 2008, 26: 656.
- [244] Cheng I F, Chang H C, Hou D, Chang H C. *Biomicrofluidics*, 2007, 1: 021503.
- [245] Iliescu C, Tresset G, Xu G L. *Biomicrofluidics*, 2009, 3: 044104.
- [246] Gagnon Z, Mazur J, Chang H C. *Biomicrofluidics*, 2009, 3: 044108.
- [247] Gascoyne P R C, Vykoukal J. *Electrophoresis*, 2002, 23: 1973.
- [248] Hughes M P. *Electrophoresis*, 2002, 23: 2569.
- [249] Becker F F, Wang X B, Huang Y, Pethig R, Vykoukal J, Gascoyne P R C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, 92: 860.
- [250] Sabuncu A C, Liu J A, Beebe S J, Beskok A. *Biomicrofluidics*, 2010, 4: 021101.
- [251] Vykoukal D M, Gascoyne P R C, Vykoukal J. *Integr. Biol.*, 2009, 1: 477.
- [252] Wu L Q, Yung L Y L, Lim K M. *Biomicrofluidics*, 2012, 6: 014113.
- [253] Holmes D, Green N G, Morgan H. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, 2003, 22: 85.
- [254] Gao J, Riahi R, Sin M L Y, Zhang S F, Wong P K. *Analyst*, 2012, 137: 5215.
- [255] Doh I, Cho Y H. *Sens. Actuators A*, 2005, 121: 59.
- [256] Hu X Y, Bessette P H, Qian J R, Meinhardt C D, Daugherty P S, Soh H T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, 102: 15757.
- [257] Alazzam A, Stiharu I, Bhat R, Meguerditchian A N. *Electrophoresis*, 2011, 32: 1327.

- [258] Han K H, Han S I, Frazier A B. *Lab Chip*, 2009, 9: 2958.
- [259] Gupta V, Jafferji I, Garza M, Melnikova V O, Hasegawa D K, Pethig R, Davis D W. *Biomicrofluidics*, 2012, 6: 024133.
- [260] An J, Lee J, Lee S H, Park J, Kim B. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 394: 801.
- [261] Yang F, Yang X M, Jiang H, Bulkhauls P, Wood P, Hrushesky W, Wang G R. *Biomicrofluidics*, 2010, 4: 013204.
- [262] Alshareef M, Metrakos N, Perez E J, Azer F, Yang F, Yang X M, Wang G R. *Biomicrofluidics*, 2013, 7: 011803.
- [263] Jen C P, Chang H H. *Biomicrofluidics*, 2011, 5: 034101.
- [264] Cheng J, Sheldon E L, Wu L, Heller M J, O'Connell J P. *Anal. Chem.*, 1998, 70: 2321.
- [265] Wang M W. *Electrophoresis*, 2012, 33: 780.
- [266] Jubery T Z, Dutta P. *Electrophoresis*, 2013, 34: 643.
- [267] Vahey M D, Voldman J. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 3135.
- [268] Vahey M D, Voldman J. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 2446.
- [269] Jen C P, Chen W F. *Biomicrofluidics*, 2011, 5: 044105.
- [270] Iliescu C, Xu G L, Ong P L, Leck K J. *J. Micromech. Microeng.*, 2007, 17: S128.
- [271] Hagedorn R, Fuhr G, Muller T, Gimsa J. *Electrophoresis*, 1992, 13: 49.
- [272] Bunthawin S, Wanichapichart P, Tuantranont A, Coster H G L. *Biomicrofluidics*, 2010, 4: 014102.
- [273] Cheng I F, Froude V E, Zhu Y X, Chang H C, Chang H C. *Lab Chip*, 2009, 9: 3193.
- [274] Cen E G, Dalton C, Li Y L, Adamia S, Pilarski L M, Kaler K V I S. *J. Microbiol. Methods*, 2004, 58: 387.
- [275] Huang S B, Wu M H, Lin Y H, Hsieh C H, Yang C L, Lin H C, Tseng C P, Lee G B. *Lab Chip*, 2013, 13: 1371.
- [276] Huang S B, Liu S L, Li J T, Wu M H. *Int. J. Autom. Smart Technol.*, 2014, 4: 83.
- [277] Chiou P Y, Ohta A T, Wu M C. *Nature*, 2005, 436: 370.
- [278] Catterall W A. *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, 64: 493.
- [279] Tsong T Y. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1113: 53.
- [280] Voldman J. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2006, 8: 425.
- [281] Ramos A, Morgan H, Green N G, Castellanos A. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 1998, 31: 2338.
- [282] Tay F E H, Yu L M, Pang A J, Iliescu C. *Electrochim. Acta*, 2007, 52: 2862.
- [283] Iliescu C, Yu L M, Xu G L, Tay F E H. *J. Microelectromech. Syst.*, 2006, 15: 1506.
- [284] 沈玉勤(Shen Y Q), 姚波(Yao B), 方群(Fang Q). *化学进展(Progress in Chemistry)*, 2010, 22(1): 133.
- [285] Zborowski M, Oстера G R, Moore L R, Milliron S, Chalmers J J, Schechter A N. *Biophys. J.*, 2003, 84: 2638.
- [286] Nam J, Huang H, Lim H, Lim C, Shin S. *Anal. Chem.*, 2013, 85: 7316.
- [287] Han K H, Frazier A B. *Lab Chip*, 2006, 6: 265.
- [288] Han K H, Frazier A B. *J. Microelectromech. Syst.*, 2005, 14: 1422.
- [289] Han K H, Frazier A B. *J. Appl. Phys.*, 2004, 96: 5797.
- [290] Jung J, Han K H. *Appl. Phys. Lett.*, 2008, 93: 223902.
- [291] Furlani E P. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2007, 40: 1313.
- [292] Huang Y Y, Hoshino K, Chen P, Wu C H, Lane N, Huebschman M, Liu H Y, Sokolov K, Uhr J W, Frenkel E P, Zhang J X J. *Biomed. Microdevices*, 2013, 15: 673.
- [293] Kang J H, Krause S, Tobin H, Mammoto A, Kanapathipillai M, Ingber D E. *Lab Chip*, 2012, 12: 2175.
- [294] Casavant B P, Guckenberger D J, Berry S M, Tokar J T, Lang J M, Beebe D J. *Lab Chip*, 2013, 13: 391.
- [295] Casavant B P, Strotman L N, Tokar J J, Thiede S M, Traynor A M, Ferguson J S, Lang J M, Beebe D J. *Lab Chip*, 2014, 14: 99.
- [296] Pamme N, Eijkel J C T, Manz A. *J. Magn. Magn. Mater.*, 2006, 307: 237.
- [297] Smistrup K, Lund-Olesen T, Hansen M F, Tang P T. *J. Appl. Phys.*, 2006, 99: 08P102.
- [298] Kim S, Han S I, Park M J, Jeon C W, Joo Y D, Choi I H, Han K H. *Anal. Chem.*, 2013, 85: 2779.
- [299] Issadore D, Shao H L, Chung J, Newton A, Pittet M, Weissleder R, Lee H. *Lab Chip*, 2011, 11: 147.
- [300] Sivagnanam V, Song B, Vandevyver C, Bunzli J C G, Gijs M A M. *Langmuir*, 2010, 26: 6091.
- [301] Saliba A E, Saias L, Psychari E, Minc N, Simon D, Bidard F C, Mathiot C, Pierga J Y, Fraissier V, Salamero J, Saada V, Farace F, Vielh P, Malaquin L, Viovy J L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, 107: 14524.
- [302] Horak D, Svobodova Z, Autebert J, Coudert B, Plichta Z, Kralovec K, Bilkova Z, Viovy J L. *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2013, 101: 23.
- [303] Plouffe B D, Mahalanabis M, Lewis L H, Klapperich C M, Murthy S K. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 1336.
- [304] Choi J W, Liakopoulos T M, Ahn C H. *Biosens. Bioelectron.*, 2001, 16: 409.
- [305] Ramadan Q, Samper V, Poenar D, Yu C. *J. Magn. Magn. Mater.*, 2004, 281: 150.
- [306] Yang L Y, Lang J C, Balasubramanian P, Jatana K R, Schuller D, Agrawal A, Zborowski M, Chalmers J J. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 102: 521.
- [307] Zborowski M, Chalmers J J. *Anal. Chem.*, 2011, 83: 8050.
- [308] Laurell T, Petersson F, Nilsson A. *Chem. Soc. Rev.*, 2007, 36: 492.
- [309] Wiklund M, Hertz H M. *Lab Chip*, 2006, 6: 1279.
- [310] Shi J J, Huang H, Stratton Z, Huang Y P, Huang T J. *Lab Chip*, 2009, 9: 3354.
- [311] Augustsson P, Magnusson C, Nordin M, Lilja H, Laurell T. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 7954.
- [312] Petersson F, Nilsson A, Holm C, Jonsson H, Laurell T. *Analyst*, 2004, 129: 938.
- [313] Petersson F, Nilsson A, Holm C, Jonsson H, Laurell T. *Lab Chip*, 2005, 5: 20.
- [314] Lenshof A, Ahmad-Tajudin A, Jaras K, Sward-Nilsson A M, Aberg L, Marko-Varga G, Malm J, Lilja H, Laurell T. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 6030.

- [315] Hawkes J J, Coakley W T. *Sens. Actuators B*, 2001, 75: 213.
- [316] Nordin M, Laurell T. *Lab Chip*, 2012, 12: 4610.
- [317] Kapishnikov S, Kantsler V, Steinberg V. *J. Stat. Mech. : Theory Exp.*, 2006, 2006: P01012.
- [318] Petersson F, Aberg L, Sward-Nilsson A M, Laurell T. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 5117.
- [319] Dykes J, Lenshof A, Astrand-Grundstrom I B, Laurell T, Scheduling S. *PLoS One*, 2011, 6: e23074.
- [320] Gupta S, Feke D L, Manas-Zloczower I. *Chem. Eng. Sci.*, 1995, 50: 3275.
- [321] Burguillos M A, Magnusson C, Nordin M, Lenshof A, Augustsson P, Hansson M J, Elmer E, Lilja H, Brundin P, Laurell T, Deierborg T. *PLoS One*, 2013, 8: e64233.
- [322] Evander M, Johansson L, Lilliehorn T, Piskur J, Lindvall M, Johansson S, Almqvist M, Laurell T, Nilsson J. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 2984.
- [323] Ashkin A, Dziedzic J M. *Ber. Bunsen. Phys. Chem.*, 1989, 93: 254.
- [324] Ashkin A, Dziedzic J M, Yamane T. *Nature*, 1987, 330: 769.
- [325] Kaneta T, Makihara J, Imasaka T. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 5791.
- [326] Li M Q, Xu J, Romero-Gonzalez M, Banwart S A, Huang W E. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2012, 23: 56.
- [327] Liberale C, Cojoc G, Bragheri F, Minzioni P, Perozziello G, La Rocca R, Ferrara L, Rajamanickam V, di Fabrizio E, Cristiani I. *Sci. Rep.*, 2013, 3: 01258.
- [328] Ohta A T, Chiou P Y, Phan H L, Sherwood S W, Yang J M, Lau A N K, Hsu H Y, Jamshidi A, Wu M C. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, 2007, 13: 235.
- [329] Shah G J, Ohta A T, Chiou E P Y, Wu M C, Kim C J. *Lab Chip*, 2009, 9: 1732.
- [330] MacDonald M P, Spalding G C, Dholakia K. *Nature*, 2003, 426: 421.
- [331] Milne G, Rhodes D, MacDonald M, Dholakia K. *Opt. Lett.*, 2007, 32: 1144.
- [332] Guck J, Schinking S, Lincoln B, Wottawah F, Ebert S, Romeyke M, Lenz D, Erickson H M, Ananthakrishnan R, Mitchell D, Kas J, Ulvick S, Bilby C. *Biophys. J.*, 2005, 88: 3689.
- [333] Tanaka T, Ishikawa T, Numayama-Tsuruta K, Imai Y, Ueno H, Matsuki N, Yamaguchi T. *Lab Chip*, 2012, 12: 4336.
- [334] Parichehreh V, Medepallai K, Babbarwal K, Sethu P. *Lab Chip*, 2013, 13: 892.
- [335] Moon H S, Kwon K, Hyun K A, Sim T S, Park J C, Lee J G, Jung H I. *Biomicrofluidics*, 2013, 7: 014105.
- [336] Sim T S, Kwon K, Park J C, Lee J G, Jung H I. *Lab Chip*, 2011, 11: 93.
- [337] Moon H S, Kwon K, Kim S I, Han H, Sohn J, Lee S, Jung H I. *Lab Chip*, 2011, 11: 1118.
- [338] Shen S F, Ma C, Zhao L, Wang Y L, Wang J C, Xu J, Li T B, Pang L, Wang J Y. *Lab Chip*, 2014, 14: 2525.
- [339] Bhagat A A S, Hou H W, Huang S, Lim C T, Han J. *The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences 2010 (MicroTAS 2010)* (Eds. Verpoorte S). Groningen: CBMS, 2010. 1391.
- [340] Hou H W, Warkiani M E, Khoo B L, Li Z R, Soo R A, Tan D S W, Lim W T, Han J, Bhagat A A S, Lim C T. *Sci. Rep.*, 2013, 3: 01259.
- [341] Ozkumur E, Shah A M, Ciciliano J C, Emmink B L, Miyamoto D T, Brachtel E, Yu M, Chen P I, Morgan B, Trautwein J, Kimura A, Sengupta S, Stott S L, Karabacak N M, Barber T A, Walsh J R, Smith K, Spuhler P S, Sullivan J P, Lee R J, Ting D T, Luo X, Shaw A T, Bardia A, Sequist L V, Louis D N, Maheswaran S, Kapur R, Haber D A, Toner M. *Sci. Transl. Med.*, 2013, 5: 3005616.
- [342] Sha J J, Ni Z H, Liu L, Yi H, Chen Y F. *Nanotechnology*, 2011, 22: 175304.
- [343] Xiang N, Yi H, Chen K, Wang S F, Ni Z H. *J. Micromech. Microeng.*, 2013, 23: 025016.