

• 综 述 •

微流控芯片技术在循环肿瘤细胞检测中的应用研究

张满分 综述, 丛 辉 审校

(南通大学附属医院医学检验科, 江苏南通 226001)

关键词: 微流控芯片; 循环肿瘤细胞; 捕获; 富集; 纯化

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 23. 031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)23-3305-05

肿瘤细胞从原发灶脱落, 进入外周血液形成循环肿瘤细胞 (CTCs), 随后迁移到远处器官形成转移灶, 这是导致大多数肿瘤患者死亡的主要原因^[1]。现有文献表明 CTCs 具有较高的临床应用价值^[2]。Zhang 等^[3]认为剔除疾病组织学分期、分子亚型、不同个体治疗、患者复发或转移与否等因素, 检测外周血液中 CTCs (5 个/7. 5 mL) 即可预测患者预后。这表明 CTCs 在监测肿瘤转移及预后判断中应用价值不可小觑。

近年来, CTCs 检测技术的革新成为科技研究人员关注的热点。目前 CTCs 富集和检测技术大部分基于其一种或多种特性将其与正常血细胞区分, 如生物学特性 (表面蛋白表达、突变、特定基因的表达、活力和侵袭能力) 和 (或) 物理性能 (尺寸、密度、电荷和变形性) 等。利用生物学特征分离 CTCs 的原理是基于上皮起源细胞表面的蛋白质标记物——上皮细胞黏附因子 (EpCAM) 的表达, 其代表性产品 CellSearch (Veridex, LLC, Raritan, NJ, USA) 是目前 FDA 唯一批准的可用于临床的检测系统^[4]。目前该系统主要用于监测肿瘤是否发生转移^[5-7]。但肿瘤在转移进程中, CTCs 会发生首次出现 (EMT) 而变成间充质细胞^[8-9]。部分 CTCs 的抗原表达会因为 EMT 的过程中被下调或丧失而不能被 CellSearch 系统检出, 这是该系统的致命缺陷。另外该系统的昂贵费用也限制了其临床上地推广应用。

微流控芯片技术集样本预处理和分析于一体, 将原本需要一个综合实验室才能完成的工作简化到微小的芯片上, 检测过程可实现自动化^[10], 其核心原理是将硅、玻璃或聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 通过微加工, 制作出不同结构、不同尺寸微米量级的管道, 用于细胞分选。捕获和富集是 CTCs 技术的关键所在, 目前已经开发了多种用于 CTCs 捕获或富集的微流控芯片平台^[11], 综合了细胞分离的多种机制, 包括磁力、亲和色谱、尺寸和 (或) 基于可变形性、介电泳的机制等。另外微流控芯片还可富集纯化活化的 CTCs, 这有益于下游的生物学分析^[12]。

1 用于 CTCs 分离的微流控芯片技术

目前富集分离 CTCs 的原理主要有 4 种: (1) 抗原抗体亲和性分选法; (2) 细胞物理差异分选法, 根据细胞尺寸、变形性以及不同大小的细胞在流场中的力学特性进行分选; (3) 免疫磁珠分选法, 利用抗体标记的磁珠进行分选; (4) 细胞电化性能差异分选法。

1.1 亲和性分选法 亲和性分选法是一种通过高亲和力配体与待选细胞选择性相结合, 从而捕获肿瘤细胞的方法。近年来, 一些基于免疫亲和力或纳米材料微流控技术已经开发出来^[13-16]。Kwak 等^[17]开发了具有微柱阵列结构的 CTCs 芯片, 该实验选择具有不同 EpCAM 表达水平的 MCF-7 和 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞。在 Mag-Gradient 芯片中分离出 95. 7% EpCAM 阳性的 CTCs 和 79. 3% EpCAM 阴性 CTCs。Mag-Gradient 芯片可在 1 h 内分离出 3 mL 异质 CTCs 样品。

Wang 等^[18]利用生物相容性原理将 sLex-AP 涂覆在羟基磷灰石/壳聚糖复合涂层 (HA/CTS) 纳米膜上形成 CTCs 捕获平台, 并在肝细胞癌患者血液中实现了 CTCs 的捕获和鉴定, 检出率为 59. 5% [25/42, (2±2) 个 CTC/2 mL]。此外, 该作者还发现 CTCs 阳性率和 CTCs 的数量、肿瘤大小、门静脉肿瘤血栓以及肿瘤-淋巴结转移 (TNM) 相关。亲和性分选法特异性高, 能分选不同种类的细胞。目前大部分研究人员都将 EpCAM 作为 CTCs 细胞特异性的抗原标志物。但是, 同一肿瘤细胞的不同亚型会表达不同的 EpCAM, 如人乳腺癌细胞系的 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞^[17]。而且, 在肿瘤的转移进程中, CTCs 会发生 EMT^[8], 因此, 这部分 CTCs 不能被依赖 EpCAM 表达的微流控芯片检测, 但 EpCAM 表达阴性 CTCs 已经被证明具有更大的浸润性和侵袭性^[20]。目前该类方法的实验研究基本是选用细胞株进行, 并不能反应临床样品复杂性。

1.2 物理特性分选

1.2.1 基于细胞尺寸和变形性差异 大部分 CTCs 稍大于正常血细胞 [单个 CTCs 直径 12~25 μm, 红细胞 (RBC) 约 8 μm, 白细胞 (WBC) 7~15 μm]^[21]。基于细胞大小的分离过滤平台如 PARSORTIX 和 SCREENCELL 等可捕获尺寸较大的 CTCs, 而较小的 WBC、血小板 (PLT) 和 RBC 被流体冲走^[22]。由 Warkiani 等^[23-24]开发的螺旋微流体芯片, 主要是利用曲线微通道中存在的流体动力进行细胞分选。该技术可以捕获活的 CTCs, 细胞回收率达 85%。Hyun 等^[25]设计开发了一种微流体芯片 p-MOFF 装置以分离 EpCAM 阴性的 CTCs。该芯片利用 CTCs 的物理性质如尺寸、形状、密度等特性, 完全不依赖于 CTCs 表面的 EpCAM 特性, 可高通量的收集完整的异质性 CTCs。作者利用 p-MOFF 系统分离 24 名乳腺癌患者外周血液中的 CTCs, 只有 4 名患者 (4/24, 16%) CTCs 的 EpCAM 阳性。这也反应了乳腺癌患者血液中存在大量 EpCAM 阴性的 CTCs^[26]。Kulasighe 等^[27]用螺旋微流控技术检测头颈部癌症 (HNC) 患者的 CTCs, 在 24 例早期或晚期 HNC 患者中, 有 13 例检测到 CTCs, 而且在这 13 例中有 7 例甚至观察到 CTCs 簇。其他基于大小和变形性的微流控相关技术相关文献见表 2。

基于细胞大小和变形性的微流控芯片操作简单, 捕获效率高, 能实现高通量 CTCs 的分选, 无需依赖细胞表面标志物, 可用多种抗体进行标记。但其效率可能受到患者血液中 CTCs 异质性的影响, 而且, 细胞具有变形性, 操作条件若不严格控制, 可能会导致 CTCs 的损失。此外, 部分 CTCs 尺寸与白细胞相似, 故容易有重叠部分。

1.2.2 基于细胞力学性质差异

1.2.2.1 基于惯性力 基于惯性力将肿瘤细胞从血液分离, 也是利用肿瘤细胞与血细胞大小的差异, 该方法一般为“收紧-扩张”结构。Bhagat 等^[33]设计了一种基于流体剪切力分离

血液中 CTCs 的芯片;细胞流进芯片后在流体力作用下分流,体积不同的细胞分别进入不同管道,从而实现肿瘤细胞的富集与分离;该研究用 MCF-7 细胞作回收试验,其回收率达 80%,单个微通道处理能力为 8~10 个 CTCs/min。该芯片通过改变“夹紧”宽度,可用于分离外周血白细胞和胎儿有核红细胞等。虽然该方法操作简单、具有可回收活细胞的能力,但获取 CTCs 纯度低,富集的细胞中易掺杂大量其他细胞。

1.2.2.2 确定性侧向移位 确定性侧向移位(DLD)也是利用肿瘤细胞比正常血细胞稍大的物理特性,设计分选临界半径介于 CTCs 和血细胞间的 DLD 阵列。CTCs(大于临界半径)与微柱阵列碰撞后向一侧聚集,而正常血细胞(小于临界半径)碰撞后不侧移,保持原液路流过阵列,据此实现 CTCs 的分选富集。OKANO 等^[34]设计了一种基于 DLD 微流控芯片,其微柱顶部具有不同的倾斜方向。在测试中样品溶液形成鞘流进入微柱阵列区。小细胞遵循流体流线并以“之”字形样式行进分离至小细胞出口。由于与微柱阵列(“碰撞模式”)的相互作用,大的细胞穿过流线,并沿着柱阵列一个微小的角度流动。最终,大、小细胞从不同出口流出,达到分离目的。这种设计可实时监测通道是否堵塞。

Liu 等^[36]利用确定性侧向位移阵列和基于亲和力的细胞捕获架构的组合设计了一种微流控芯片,使用此芯片分离乳腺癌细胞,通量为 9.6 mL/min,可实现 90%捕获率和 50%以上的捕获纯度。这为 CTCs 捕获提供了一种有前景的方法,具有高回收率,高纯度和高稳定性的优点,并且在癌细胞培养和药物筛选中表现出潜在的能力。

1.3 免疫磁珠分选 基于免疫磁珠分离的微流控技术是将免疫磁珠技术与微流控技术相结合的一种技术。Huang 等^[39]设计了由动力控制进行免疫磁性纳米筛选的微流控系统。实验中作者以 SkBr3,PC3 和 Colo2.05 细胞为研究对象,其捕获率分别为 97%,107%和 94%。CHANG 等^[40]使用微芯片与免疫磁珠,高通量射流和基于尺寸大小的过滤系统分离 CTCs。经抗体标记的磁珠与含有靶向抗原的 CTCs 相结合,然后将混合样本通过具有 8 μm 直径孔阵列的微芯片流体室。通过磁

场作用检测大于孔径的 CTCs,清除未结合 CTCs 的游离珠粒和其他较小的颗粒。该芯片对 MCF-7 细胞的捕获率为 89%。

基于免疫磁珠的微流控芯片技术将免疫磁分离和微流控技术各自的优势结合起来,大大提高检出率。但是,由于循环肿瘤细胞存在异质性,其细胞表面的抗原标志物也会发生变化,因此,应用单一-抗原标志物对 CTCs 进行检测有一定限制。另外,抗体成本高,稳定性差,也是应用过程中必须考虑的问题。

1.4 介电电泳分选法 介电电泳(DEP)技术利用的是位于非匀称电场中的中性微粒,由于介电极化的作用而产生的平移运动。介电电泳力的大小取决于悬浮微粒的大小,悬浮微粒和所处悬浮媒介的电特性(介电常数和电导率),电场强度和频率,悬浮媒介的黏度等参数。肿瘤细胞和正常细胞对固定频带的交流频率不同。所以,与电泳或其他常规分离方法相比较,介电电泳拥有更高的选择性,更易控制性和更高的分离效率^[43-48]。

Moon 等^[46]通过组合多孔流动分离(MOFF)和介电电泳(DEP)细胞分离技术,成功地将人乳腺癌细胞 MCF-7 与加标血细胞样品分离。流体力学分离利用血细胞的大量和高通量过滤,因为它可以适应非常高的流速。DEP 分离在精确的后处理中有一定作用,可以提高分离效率。这两种不同分选技术的串联组合可实现高速连续流通分离,无需标记物。该芯片以 126 μL/min 的流速观察到 MCF-7 细胞增加了 162 倍。该分离技术能有效去除红细胞和白细胞,分离效率分别为 99.24%和 94.23%。

与传统电泳不同,DEP 不依赖于固定在细胞上的净电荷,并且仅发生在不均匀的电场中。重要的是,DEP 的方向不是依从电场的方向,而是由产生场的系统中的不对称定义的场梯度的方向确定的。介电电泳分离肿瘤细胞能实现较高的输出纯度,但是随着流速的增大,微弱的介电场力对细胞控制力会逐渐的降低,细胞纯度会相应下降,所以,较低的流速才能保证其具有高分离效能。

表 1 亲和性分选法捕获 CTCs 相关文献

捕获单元	抗体类型	样品来源	捕获效率(%)	参考文献
壳聚糖纳米颗粒底物	Anti-EpCAM	MCF-7 细胞混于 WBC	90	[13]
壳聚糖纳米纤维(CNFs)	Anti-EpCAM	人胃癌细胞(KATO III)	82~96	[14]
TiO ₂ 纳米棒阵列	Anti-EpCAM	MCF-7 细胞混于 WBC	85~95	[15]
人字形 NP-HBCTC-Chip 芯片	Anti-EpCAM	PC3 和 MDA-MB-231 细胞混于全血	—	[16]
蛇形微柱阵列	Anti-EpCAM	MCF-7 和 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞	95.7~79.3	[17]
HA/CTS	Anti-EpCAM	42 例肝细胞患者血液	61.6	[18]
蛇形微通道	Anti-EpCAM	21 例晚期非小细胞肺癌患者血液	90.49	[19]

注:“—”表示该项无数据。

表 2 基于细胞大小和变形性差异捕获 CTCs 相关文献

捕获单元	管道特征	捕获间距	样品来源	捕获效率(%)	参考文献
微孔过滤器	曲线微通道	10 μm	PC3/DU145/MCF-7 细胞悬浮液,癌症病人血液	90	[22]
螺旋微流体	PDMS 微柱	—	MDA-MB-231,MCF-7,T24 细胞	≥85	[23-24]
p-MOFF 芯片	MOFF 通道	10 μm	MCF-7 细胞混于血液	75	[25]
螺旋片	曲线微通道	—	58 例乳腺癌和肺癌患者血液	100	[26]

续表 2 基于细胞大小和变形性差异捕获 CTCs 相关文献

捕获单元	管道特征	捕获间距	样品来源	捕获效率(%)	参考文献
螺旋片	曲线微通道	14 μm	FaDu, CAL27, RPMI2650, MDA-MB-468 细胞混于血液和 HNC 患者血液	54	[27]
—	PDMS 微柱	100 μm	PC-9 细胞混于血液/ACC-MESO-4 混于血液	88.0/38	[28]
微通道阵列	PDMS 微柱	12 μm	MCF-7 和 MDA-MB231 细胞悬液	92-97	[29]
间距不等的微柱	PDMS 微柱	—	五种 NSCLC 细胞系(A549, H460, H292, H1299 和 SK-MES-1 细胞混悬液	≥ 50	[30]
间距不等的微柱	PDMS 微柱	10 μm	H446, SK-MES-1 和 A549 细胞悬液	82.7	[31]

注：“—”表示该项无数据。

表 3 基于细胞力学性质差异捕获 CTCs 相关文献

捕获单元	流体特征	样品	捕获效率(%)	参考文献
水平微通道	涡旋	MCF-7、OVCAR-5、M395、PC-3、A549 细胞	36.8	[32]
—	水平流体	MCF-7 细胞混于血液	80	[33]
DLD 阵列	水平流体	小鼠骨髓瘤细胞(SP2/O 细胞)	78.2	[34]
DLD 阵列	水平流体	WM164, MB231, PC9, PC3-9, SKBR3 和 LBX1 细胞系	97 $\pm$ 2.7	[35]
DLD(镜面三角形微孔阵列)	水平流体	MCF-7 细胞混于血液	90	[36]
μ -LaFF 分离芯片	横向流与垂直流合并入过滤器	MCF-7 和 Jurkat 克隆 E6-1 血细胞系	95	[37]

表 4 免疫磁珠分选法捕获 CTCs 相关文献

捕获单元	磁珠连接抗体或配体类型	样品	捕获效率(%)	参考文献
磁偏转通道	Anti-EpCAM	SKBR3, PC3-9, MDA-MB-231, MCF10A-LBX 细胞	98.6 $\pm$ 4.3, 89.7 $\pm$ 4.5, 77.8 $\pm$ 7.8, 10.9 $\pm$ 3.0	[38]
永久磁体阵列	Anti-EpCAM	SkBr3, PC3, ColO2.05 细胞	97, 107, 94	[39]
微孔阵列	Anti-EpCAM	MCF-7 细胞混于血液	89	[40]
自制分离容器	Anti-EpCAM	A549 细胞混于血液, 56 例 NSCLC 患者血液	≥ 68	[41]
免疫磁珠阵列	EpCAM, HER2 和 EGFR	A431 细胞和 HeLa 细胞	79	[42]

注：“—”表示该项无数据。

表 5 介电电泳分选法捕获 CTCs 相关文献

捕获单元	电泳类型	样品	捕获效率(%)	参考文献
DLD 微柱阵列	磁电泳	WM164, MB231, PC9, PC3-9, SKBR3 和 LBX1 细胞系	97 $\pm$ 2.7	[35]
—	介电电泳	Capan-1, PANC-1 和 BxPC-3 细胞	—	[43]
T 形微通道	光诱导介电泳(ODEP)	PC-3 细胞混于血液	100	[44]
PDMS 磁盘微通道	磁电泳	MCF-7 细胞混入血液	88	[45]
MOFF 阵列	介电电泳	RBC, WBC, MCF-7 细胞	93.31	[46]

注：“—”表示该项无数据。

2 结 论

CTCs 的检测是临床上亟需解决的问题, 由于外周血 CTCs 水平极低, 这使得富集分离 CTCs 成为挑战。目前, 各种 CTCs 检测技术得到迅速发展^[47]。微流控芯片技术具有低成本、快速、高通量及操作简单等优势, 利用微流控芯片可实现 CTCs 的高速、高纯度的分选富集。因此微流控芯片一出现就成为研究及应用的热点^[48-49]。

近年来 CTCs 检测技术大量涌现, 但大多处于研发阶段, 尚未应用于临床, 缺乏大规模临床验证。多数微流控技术是对 CTCs 的富集, 研究单个 CTC 的相关技术还处于起步阶段, 通过对外周循环单个肿瘤细胞进行测序, 探索肿瘤基因组及相应的基因突变, 能加深人们对肿瘤异质性、疾病进展和转移的理解^[50], 从而为肿瘤诊断和个体化治疗提供新的思路。随着微流控相关技术的研究不断深入, 其在临床中的应用指日可待。

参考文献

[1] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.

[2] Massague J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells[J]. Nature, 2016, 529(7586): 298-306.

[3] Zhang J, Wang HT, Li BG. Prognostic significance of circulating tumor cells in small-cell lung cancer patients: a meta-analysis[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(19): 8429-8433.

[4] Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases

- [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(20): 6897-6904.
- [5] Riethdorf S, Fritsche H, Mulier V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer; a validation study of the CellSearch system[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(3): 920-928.
 - [6] Mj CMG. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 351(8): 781-791.
 - [7] Janni W, Rack B, Terstappen LW, et al. Pooled analysis of the prognostic relevance of circulating tumor cells in primary breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(10): 2583-2593.
 - [8] Aceto N, Nicola A, Aditya DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis[J]. Cell, 2014, 158(5): 1110-1122.
 - [9] Ksiazkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells[J]. Pathobiology, 2012, 79(4): 195-208.
 - [10] Volpatti LR, Yetisen AK. Commercialization of microfluidic devices[J]. Trends in Biotechnology, 2014, 32(7): 347-350.
 - [11] Hajba L, Guttman A. Circulating tumor-cell detection and capture using microfluidic devices[J]. Trend Anal Chem, 2014, 59(2): 9-16.
 - [12] Trifanny Y, Jin TS, Leng LC, et al. Microfluidic enrichment for the single cell analysis of circulating tumor cells[J]. Sci Rep, 2016, 6(24): 22076.
 - [13] Sun N, Wang J, Ji L, et al. A cellular compatible chitosan nanoparticle surface for isolation and in situ culture of rare number CTCs[J]. Small, 2015, 11(40): 5444-5451.
 - [14] Sun N, Liu M, Wang J, et al. Chitosan nanofibers for specific capture and nondestructive release of CTCs assisted by pCBMA brushes[J]. Small, 2016, 12(36): 5090-5097.
 - [15] Sun N, Li X, Wang Z, et al. A multiscale TiO₂ nanorod array for ultrasensitive capture of circulating tumor cells[J]. Acs Appl Mater Interfaces, 2016, 8(20): 12638-12643.
 - [16] Park MH, Reategui E, Li W, et al. Enhanced isolation and release of circulating tumor cells using nanoparticle binding and ligand exchange in a microfluidic chip[J]. J A M Chem Soc, 2017, 139(7): 2741-2749.
 - [17] Kwak B, Lee J, Lee D, et al. Selective isolation of magnetic nanoparticle-mediated heterogeneity subpopulation of circulating tumor cells using magnetic gradient based microfluidic system[J]. Biosens Bioelectron, 2016, 88(15): 153-158.
 - [18] Wang S, Zhang C, Wang G, et al. Aptamer-mediated transparent-biocompatible nanostructured surfaces for hepatocellular circulating tumor cells enrichment[J]. Theranostics, 2016, 6(11): 1877-1886.
 - [19] He W, Xu D, Wang Z, et al. Detecting ALK-rearrangement of CTC enriched by nanovelcro chip in advanced NSCLC patients[J]. Oncotarget, 2016, 3(10): 1068-1111.
 - [20] Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition[J]. Science, 2013, 339(6119): 580-584.
 - [21] Zheng S, Lin H, Liu JQ, et al. Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells[J]. J Chromatogr, 2007, 1162(2): 154-161.
 - [22] Xu L, Mao X, Imrali A, et al. Optimization and evaluation of a novel size based circulating tumor cell isolation system[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0138032.
 - [23] Warkiani ME, Khoo BL, Wu L, et al. Ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells from blood using spiral microfluidics[J]. Nature Protocols, 2016, 11(1): 134-148.
 - [24] Warkiani ME, Khoo BL, Tan DS, et al. An ultra-high-throughput spiral microfluidic biochip for the enrichment of circulating tumor cells[J]. Analyst, 2014, 139(13): 3245-3255.
 - [25] Hyun KA, Koo GB, Han H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(17): 24677-24687.
 - [26] Khoo BL, Warkiani ME, Tan DS, et al. Clinical validation of an ultra high-throughput spiral microfluidics for the detection and enrichment of viable circulating tumor cells[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e99409.
 - [27] Kulasinghe A, Tran TH, Blick T, et al. Enrichment of circulating head and neck tumour cells using spiral microfluidic technology[J]. Sci Rep, 2017, 7(15): 42517.
 - [28] Chikaishi Y, Yoneda K, Ohnaga T, et al. EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with a 'universal CTC-chip'[J]. Oncology Reports, 2017, 37(1): 77.
 - [29] Hosseini SA, Abdolhad M, Zanganeh S, et al. Nanoelectromechanical chip (NELMEC) combination of nanoelectronics and microfluidics to diagnose epithelial and mesenchymal circulating tumor cells from leukocytes[J]. Small, 2016, 12(7): 882-882.
 - [30] Zhao L, Tang C, Xu L, et al. Enhanced and differential capture of circulating tumor cells from lung cancer patients by microfluidic assays using aptamer cocktail[J]. Small, 2016, 12(8): 1072-1081.
 - [31] Gao W, Yuan H, Jing F, et al. Analysis of circulating tumor cells from lung cancer patients with multiple biomarkers using high-performance size-based microfluidic chip[J]. Oncotarget, 2011, 8(8): 12917-12928.
 - [32] Sollier E, Go DE, Che J, et al. Size-selective collection of circulating tumor cells using Vortex technology[J]. Lab on A Chip, 2013, 14(1): 63-77.
 - [33] Bhagat AA, Hou HW, Li LD, et al. Pinched flow coupled shear-modulated inertial microfluidics for high-throughput rare blood cell separation[J]. Lab Chip, 2011, 11(11): 1870-1878.
 - [34] Okano H, Konishi T, Suzuki T, et al. Enrichment of circu-

- lating tumor cells in tumor-bearing mouse blood by a deterministic lateral displacement microfluidic device[J]. *Biomedical Microdevices*, 2015, 17(3):9964.
- [35] Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(3):694-710.
- [36] Liu Z, Zhang W, Huang F, et al. High throughput capture of circulating tumor cells using an integrated microfluidic system[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 47C(18):113-119.
- [37] Lee SW, Hyun KA, Kim SI, et al. Continuous enrichment of circulating tumor cells using a microfluidic lateral flow filtration chip[J]. *J Chromatogr*, 2015, 1377(3120):100-105.
- [38] Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(179):179-184.
- [39] Huang C, Smith JP, Saha TN, et al. Characterization of microfluidic shear-dependent epithelial cell adhesion molecule immunocapture and enrichment of pancreatic cancer cells from blood cells with dielectrophoresis[J]. *Biomed microfluidics*, 2014, 8(4):044107.
- [40] Chang CL, Huang W, Jalal SI, et al. Circulating tumor cell detection using a parallel flow micro-aperture chip system[J]. *Lab Chip*, 2015, 15(7):1677-1688.
- [41] Ji J L, Jiang YZ, Tang QQ, et al. Detection of circulating tumor cells using a novel immunomagnetic bead method in lung cancer patients[J]. *J Clin Lab Anal*, 2016, 30(5):656-662.
- [42] Lu NN, Xie M, Wang J, et al. Biotin-triggered decomposable immunomagnetic beads for capture and release of circulating tumor cells[J]. *Acs Applied Materials Inter-*
- faces*, 2015, 7(16):8817-8826.
- [43] Gascoyne PR, Shim S. Isolation of circulating tumor cells by dielectrophoresis[J]. *Cancers*, 2014, 6(1):545-579.
- [44] Tzu-Keng C, Wen-Pin C, Huang SB, et al. Application of optically induced dielectrophoresis in microfluidic system for purification of circulating tumour cells for gene expression analysis-cancer cell line model[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(20):32851.
- [45] Kirby D, Glynn M, Kijanka G, et al. Rapid and cost-efficient enumeration of rare cancer cells from whole blood by low-loss centrifugo-magnetophoretic purification under stopped-flow conditions[J]. *Cytometry A*, 2014, 87(1):74-80.
- [46] Moon HS, Kwon K, Kim SI, et al. Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP)[J]. *Lab Chip*, 2011, 11(6):1118-1125.
- [47] Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies[J]. *Molecular Oncology*, 2016, 10(3):374-394.
- [48] Qian W, Zhang Y, Chen W. Capturing cancer: emerging microfluidic technologies for the capture and characterization of circulating tumor cells[J]. *Small*, 2015, 11(32):3850-3872.
- [49] Ming Y, Li Y, Xing H, et al. Circulating tumor cells: from theory to nanotechnology-based detection[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8(8):35.
- [50] Ignatiadis M, Dawson SJ. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality? [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(12):2304-2313.
- (收稿日期:2017-05-13 修回日期:2017-07-26)
-
- (上接第 3304 页)
- [2] 苏杰英, 杨兆军, 陆菊明, 等. 肝酶异常与中国成人胰岛素抵抗和糖尿病患病相关[J]. *中华糖尿病杂志*, 2015, 7(1):26-30.
- [3] Kushwaha S, Vikram A, Jena Gb. Protective effects of enalapril in streptozotocin-induced diabetic rat: studies of DNA damage, apoptosis and expression of CCN2 in the heart, kidney and liver[J]. *J Appl Toxicol*, 2012, 32(9):662-672.
- [4] 曹仁颐. 血糖异常老年人的心血管病: ADA 与 WHO 糖尿病诊断标准的比较[J]. *国外医学: 内分泌学分册*, 2000, 20(6):328-329.
- [5] 贾继东, 程留芳, 许建明, 等. 常用肝脏生物化学试验的临床意义及评价共识[J]. *中华保健医学杂志*, 2010, 12(3):161-168.
- [6] 司丁, 魏兆勇, 陈如通, 等. 恩替卡韦抗病毒治疗对肝性糖尿病患者血糖控制及肝功能的影响研究[J]. *中国全科医学*, 2012, 15(27):3124-3126.
- [7] 范文哲, 张应强, 王于, 等. 经肝动脉化疗栓塞肝细胞癌诱发肝源性糖尿病的危险因素分析[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(33):2562-2565.
- [8] Cotler Sj, Kallwitz E, Tencate V, et al. Diabetes and hepatic oxidative damage are associated with hepatitis C progression after liver transplantation[J]. *Transplantation*, 2007, 84(5):587-591.
- [9] 袁松松, 向天新, 刘娟, 等. 133 例肝硬化并发糖尿病患者发病相关危险因素和预后分析[J]. *实用肝脏病杂志*, 2015, 20(1):43-46.
- [10] 朱培华, 黄敬垣, 叶萌. 超声二维斑点追踪显像技术评价 2 型糖尿病患者左心室心肌扭转运动及其与 C 肽水平的关系[J]. *中国全科医学*, 2014(18):2156-2159.
- [11] Ishii T, Fukano K, Shimada K, et al. Proinsulin C-peptide activates α -enolase: implications for C-peptide-cell membrane interaction[J]. *J Biochem*, 2012, 152(1):53-62.
- [12] 刘薇, 华琳, 张雪莲, 等. 2 型糖尿病患者 C 肽水平与糖尿病视网膜病变的关系研究[J]. *中国全科医学*, 2013, 16(23):2667-2670.
- (收稿日期:2017-06-22 修回日期:2017-08-06)