

基于微流控的细胞操纵方法与应用

孙东, 罗涛

香港城市大学生物医学工程系, 中国香港 999077

摘要 微流控技术可实现微量液体的精密操控和多种功能模块的微型化集成, 在细胞操纵方面具有精确、高效和低成本等传统手段无法比拟的优点, 近些年成为学科交叉领域的研究热点之一。从细胞操纵的原理方法及应用出发, 综述了微流控细胞操纵领域的最新研究进展, 探讨、总结了各种细胞操纵方法的优缺点, 并展望了微流控细胞操纵技术的发展趋势。

关键词 微流控; 细胞操纵; 细胞分选; 细胞富集; 单细胞捕获

细胞是构成生命体的基本单元, 研究细胞的结构和功能对于生命规律的探索、疾病的诊断与治疗以及药物的筛选研发都具有极其重要的意义。临床与科学研究应用中所涉及的细胞分析通常需要对细胞样本进行多样化的操纵, 传统手段在操纵微米尺度细胞样本方面存在着效率低、精度差以及成本高等缺点。

微流控(microfluidics)是一种处理或操纵微量流体的技术, 其涉及化学、流体力学、微电子、材料学、生物学等交叉学科。微流控芯片作为微流控系统的核心, 也常被称为芯片实验室(lab-on-a-chip, LOC)和微全分析系统(micro total analytical system, μ -TAS)^[1]。利用微流控芯片进行生物样本处理与分析近些年已经成为微流控领域的研究热点, 多样化细胞样本处理与分析任务往往需要对细胞样本进行多样化操作, 如富集、分选和捕获等。在微流控芯片上, 不仅能进行群体细胞的高效操纵, 而且能进行单细胞层面的精准操纵。

当前, 基于微流控的细胞操纵方法主要分为主动式与被动式两大类。主动式指利用主动控制所产生的外力实现流体和细胞的操纵, 常见的有阀控、电控、磁控、光控和声控, 具有可控性好、准确度高等优点。被

动式方法利用结构与流体、细胞与流体以及细胞与结构间的交互耦合作用, 即流体动力学的原理实现对流道内的流体与细胞运动的精确控制, 其具有系统简单、样本处理通量高等优点。本文总结近年来基于微流控芯片的细胞操纵方法与应用研究现状, 介绍当前各种细胞操纵方法的基本原理, 分析各种方法的优缺点, 并展望微流控在细胞操纵领域的未来发展方向。

1 基于流体动力学的细胞操纵

由于流体在微流通道中黏性力远大于惯性力, 芯片内的流体流动大部分情况下为层流。利用层流的几何规律性, 可以实现细胞在通道中的有序排布。如图1(a)所示, 在层流模式下, 可利用多通道主动控制的鞘流实现通道内的细胞样本聚焦^[2]。鞘流聚焦具有极好的可控性, 不仅能实现细胞样本聚焦宽度的调节, 同样也能实现细胞聚焦位置的控制。此外, 鞘流聚焦可以适用于几乎所有细胞样本, 因而也是目前应用最为成熟广泛的细胞聚焦方法。基于鞘流聚焦可实现基于光学和电学检测的细胞计数^[3]。此外, 高效的细胞分离往

收稿日期: 2018-05-31; 修回日期: 2018-07-25

基金项目: 国家自然科学基金委员会与香港研究局联合科研资助基金项目(N_CityU102/15)

作者简介: 孙东, 教授, 研究方向为基于细胞的生物医学工程、机器人与自动控制技术, 电子信箱: medsun@cityu.edu.hk

引用格式: 孙东, 罗涛. 基于微流控的细胞操纵方法与应用[J]. 科技导报, 2018, 36(16): 29-38; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2018.16.003

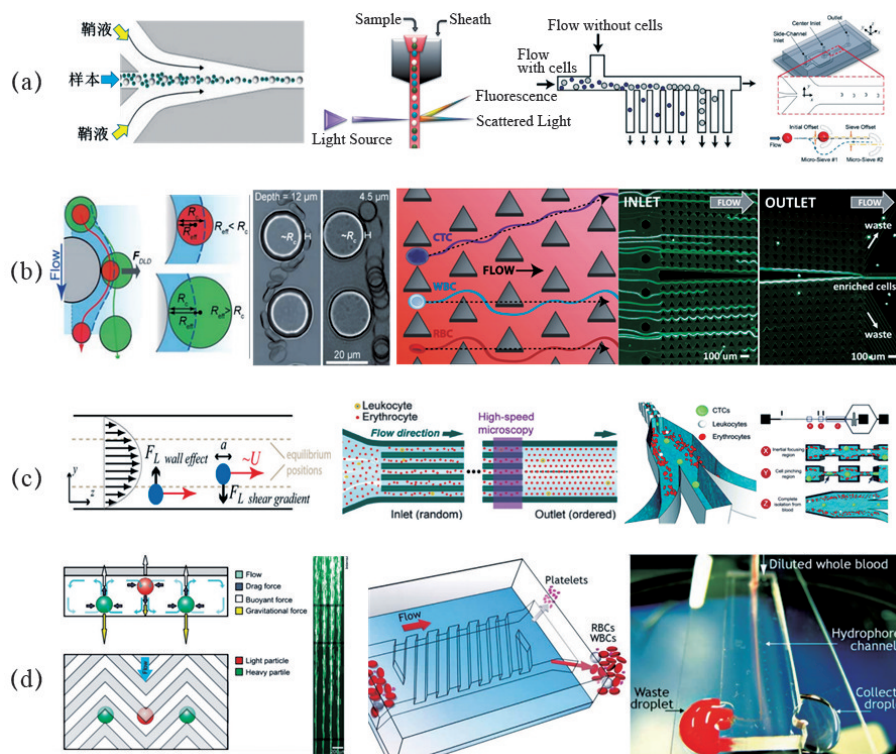
往需要对细胞样本进行预先聚焦,当细胞样本被鞘流聚焦到微流通道一侧时,不同尺寸的细胞可基于捏流分离(pinch flow fractionation, PFF)原理实现分离^[4]。鞘流聚焦同样可以用来进行高效的单细胞捕获。U形微筛^[5]是常见的单细胞捕获结构,合理的微筛尺寸设计可以保证单细胞捕获的确定性。Raymond等^[6]利用鞘流聚焦并结合U形微筛位置的合理布局,实现了肿瘤细胞的顺序、高效单细胞捕获。

确定性侧向位移(DLD)技术指利用精确设计的微柱阵列实现细胞操纵。如图1(b)所示,该方法基于细胞与微柱阵列间的相互作用。微柱阵列中的大细胞与微柱阵列碰撞后发生侧向位移,向一侧汇聚,而小细胞在与微柱阵列碰撞后并不发生侧移;按照其原流向流过阵列,不同大小细胞的侧向偏移角度会不一样,因而可基于DLD实现不同尺寸细胞的分离^[7]。该方法具有实验过程简单、结构紧凑、重现性好等优点,但是仅依靠尺寸无法实现大小形状相似细胞的精确分选,限制了其在诸如细胞亚型分析等领域的应用。目前,大部分DLD芯片基于圆形微柱阵列,已经可以实现快速、高回收率的富集分选CTCs,然而大多只能工作在较低流

速下,因此,其样本处理通量仍不能满足临床应用的要求。Sturm等^[8]采用三角形微柱阵列提高了DLD芯片的细胞样本处理通量,实现了在最高达10 mL/min流量下从血液细胞中分离CTCs。

如图1(c)所示,惯性微流控技术基于惯性升力对细胞进行操纵,利用流动聚焦原理可实现大小、形状及变形能力不同的细胞的聚焦与分离^[9]。其芯片结构简单,单位时间内的细胞样本处理量大,且对细胞损伤较小,有利于保持较高的细胞存活率^[10]。然而,细胞间相互作用会大大降低该技术的细胞操纵效率,因此,仅适用于工作在一定的细胞浓度内,所以,基于该技术的血液细胞分选通常需要预先稀释血液样本^[11-12]。

基于各向异性微结构诱导产生的二次流同样被广泛应用于微流芯片内的细胞操纵。如图1(d)所示,该方法通常在微流道内集成鱼骨头^[13-14]、倾斜阵列^[15-16]等有规律的微结构在垂直于主要流体方向的截面内产生二次涡流,细胞在涡流的驱动下会与通道结构产生相互作用,从而逐渐偏离起始流线。该技术可用于实现细胞在微流通道内的无鞘流聚焦^[17],同时也可利用该技术分离不同尺寸大小和密度的细胞^[18]。



(a) 基于鞘流聚焦的细胞操纵^[2-4,6]; (b) 基于确定性侧向位移(DLD)微柱阵列的细胞操作^[7,19]; (c) 基于惯性微流体的细胞操纵^[10,12,20]; (d) 基于各向异性微结构诱导二次流的细胞操纵^[18,21-22]

图1 常见的基于流体动力学原理的细胞操纵方法

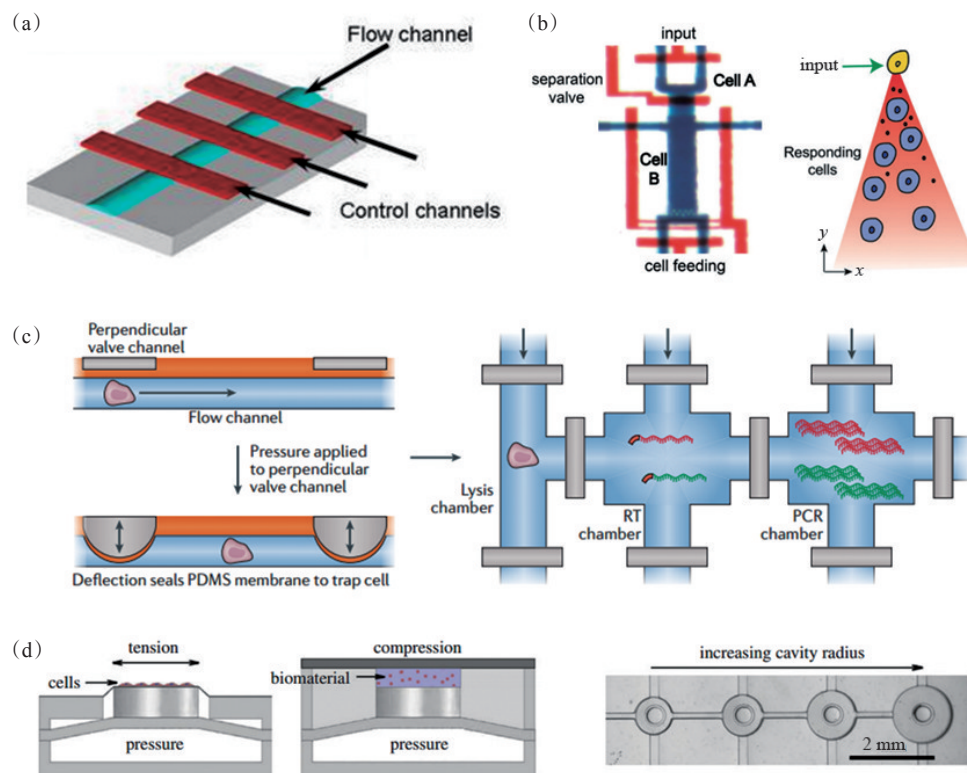
Fig. 1 Hydrodynamics based cell manipulation methods

2 机械式的细胞操纵

机械式细胞操纵指通过外部施加机械力的方法直接或者间接地实现细胞操纵。目前,最常用的机械式方法为基于多层柔性薄膜的有源气动微阀控制。Quake 研究组^[23]率先提出了多层 PDMS 软蚀刻技术 (multilayer soft lithography), 在单个微流控芯片上整合了可以快速、准确控制流体流动的有源气动微阀。该气动微阀的发明使在芯片上实现高密度的流体控制和大规模的功能集成成为可能, 因而在微流控技术的发展历程中具有里程碑意义, 该气动微阀也常被称为 Quake valve。其结构示意图如图 2(a)^[24]所示, 其包含流动层与控制层, 两层之间为可变形薄膜。当通过控制层施加压力时, 薄膜变形与流动层通道贴合, 阻断流动层的液体流通, 反之, 当控制层不施加压力或者施加较小压力时, 流动层则呈现打开或半打开状态。如图 2(a)所示, 如果在一条流道上顺序排列了 3 个阀, 通过对 3 个阀开关状态的调控可实现蠕动泵的功能。因此, 基于主动阀可实现微量细胞样本在芯片内的精确、灵活

操纵, 同时还具有体积小、响应快、寿命长、工艺简单、成本低等优势, 被广泛用于群体和单个细胞的操纵。

图 2(b)所示为基于主动阀控制的自动化微流控细胞共培养系统^[25], 该系统同时具备活细胞成像功能。基于该共培养系统, 研究人员从时间和空间角度研究了化学刺激调控下的单个免疫细胞的二次应激信号的产生及其在其他组织细胞中间的传播过程。有别于传统上研究细胞群体与群体、单细胞和单细胞之间的交互作用, 该微流体装置可通过气动阀的精确控制实现单个免疫细胞与多个组织细胞的可控共培养。如图 2(c)所示, 基于有源气动微阀可实现微流控芯片上高通量的单细胞分离、裂解、反转录和基因组扩增等一些列操作^[26]。基于该技术, 美国 Fluidigm 公司开发了一款名为 C1™ Single-Cell Auto Prep System 的单细胞自动化预处理系统, 该系统可以一次性自动分离处理 96 个悬浮状态的单细胞, 目前该系统已经在全球很多高校和研究机构被用来进行单细胞基因组学研究^[28-29]。除了通过控制流体流动实现细胞操纵, 气动微阀还被用于产生机械力对细胞进行机械刺激, 且可实现对细胞施力、频



(a) 微流芯片中常用 Quake valve 的结构示意^[24]; (b) 阀控细胞配对与相互作用研究^[25]; (c) 阀控单细胞分离用于单细胞 PCR^[26];
 (d) 主动阀控制下的细胞机械刺激^[27]

图2 基于主动阀控制的细胞操纵

Fig. 2 Active valve controlled cell manipulation

率及作用时间的控制。在正常生理条件下,诸多细胞如骨细胞、心肌细胞及血管内皮细胞往往处在复杂的力学环境当中,细胞在生长过程中会受到外界机械力的刺激。因此,构建一个具备动态机械力刺激的细胞培养环境,对于研究机械刺激对细胞增殖和分化等方面的调控作用显得极其重要^[30-31]。如图2(d)所示为微流控芯片上典型的机械刺激细胞培养结构^[27],通过调控下层气动阀的进气压力,动态机械刺激便通过可变形的弹性薄膜施加于细胞、生物材料和组织上。通过在单一芯片上集成不同直径的压力腔室,可在同一芯片上的不同空间位置同时施加多路机械刺激信号。同时,该设计还可在可变形薄膜内集成应力传感,方便实现施加于细胞之上机械应力的实时在线读取。尽管气动微阀在细胞操纵上具有精度高、响应快等传统手段无法比拟的优点,但其外部控制设备过于复杂,如何简化芯片的外部操作,使之适应研究人员的工作习惯,是基于气动微阀控制的大规模集成微流控芯片需要不断改进的技术问题。

3 电控细胞操纵

常见的电控细胞操纵方法有两种:基于介电泳效应(DEP)和基于诱导电荷电渗效应(ICEO)。DEP力为粒子在非均匀电场中受到极化后与电场相互作用而产生的力。该作用力会引起粒子在非均匀电场中漂移运动,因而可利用DEP力实现生物细胞操纵。介电泳力的表达式为^[32]

$$F_{\text{DEP}} = 2\pi\epsilon_m r^3 \text{Re}[K(\omega)] \nabla E^2 \quad (1)$$

$$K(\omega) = (\epsilon_{\text{cell}}^* - \epsilon_m^*) / (\epsilon_{\text{cell}}^* + 2\epsilon_m^*) \quad (2)$$

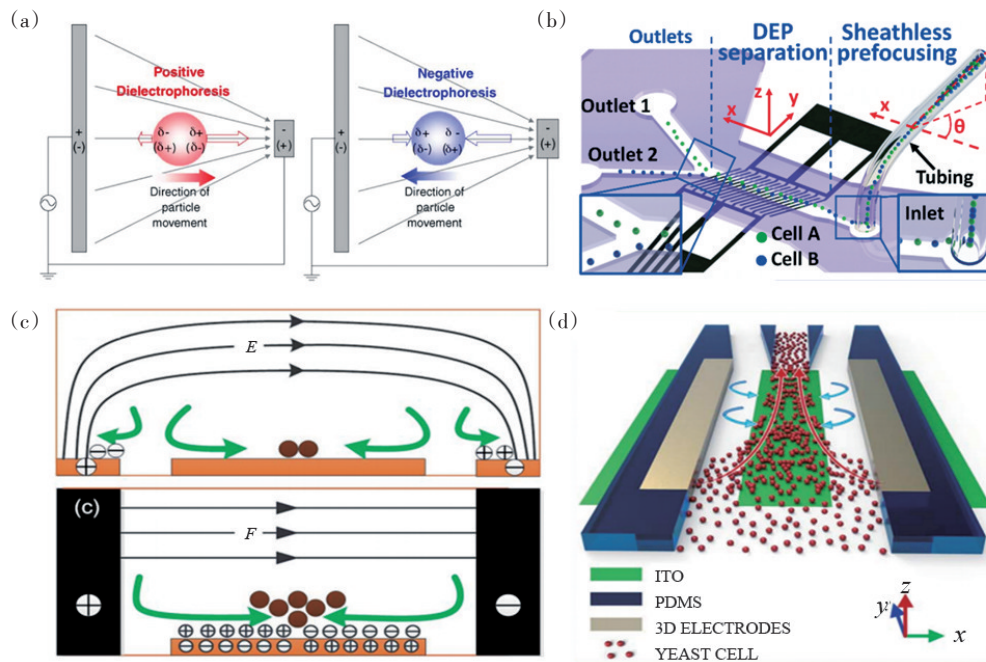
$$\epsilon^* = \epsilon - j\sigma/\omega \quad (3)$$

式中, F_{DEP} 为细胞所受的DEP合力; ϵ_m 为细胞所处悬浮液的介电常数; r 为细胞半径; E 为电场标量强度值; $K(\omega)$ 为克劳修斯-莫索提因子,也常称CM因子; ϵ_{cell}^* 为细胞的复合介电常数; ϵ_m^* 为悬浮液的复合介电常数; σ 为电导率; ω 为交流电场角频率。

可见,细胞所受DEP力的大小取决于细胞尺寸、细胞和周围溶液的介电性质、电场的梯度及电场频率。如图3(a)所示,DEP可分为正向和负向两种^[33],当 $\text{Re}[K(\omega)] > 0$ 时,细胞受到正向力的作用而往强电场区域运动,当 $\text{Re}[K(\omega)] < 0$ 时,细胞受到负向力的作用而向弱电场区域运动。 $\text{Re}[K(\omega)] = 0$ 所对应的电场频率

被称为临界频率,此时细胞所受介电泳力为0。因此,有明显临界频率特征的两种细胞可通过介电泳效应在微流控芯片内实现分离。DEP芯片的细胞操纵效率很大程度上取决于芯片电极的结构,当前大多数DEP芯片内的电极都是基于薄膜工艺的平面结构^[34]。如图3(b)所示为一种基于平面叉指倾斜电极的细胞分离芯片^[32],该芯片利用重力沉降效应进行细胞预聚焦,当聚焦细胞流过倾斜电极表面时,细胞由于不同大小DEP力的作用而实现分离。该设计被成功用来完成了两种尺寸相同的白血病细胞(THP-1细胞与OCI-AML3)的高效分离。除了在细胞分离方面的应用,DEP芯片还被广泛用于病原体富集^[35]、细胞图案化^[36-38]、单细胞捕获^[39-40]等方面。DEP在细胞操纵方面具有易与微流控系统结合、免标记、对稀有细胞的高选择性等优点。DEP细胞操纵系统需在低电导率的溶液中操纵细胞,而常见的生理溶液,如血液、尿液等大多是高电导率,需要对细胞样本做严格的预处理,限制了操纵样本,因此目前还没有基于DEP的细胞操纵技术在临床领域成熟应用。

ICEO是发生在物体表面的一种电化学反应,体现为一种电动条件下的非线性流体流动现象。如图3(c)所示,在外加电场作用下,电场引起的诱导电荷扩散引发滑移形式的局部流体流动,而这些诱导扩散电荷分布在固/液界面上的边界薄层中,即双电层中。正因为双电层的存在,才使得可将电场力作用在流体分子上,进而操控微流体运动^[41]。图3(d)所示为一种基于3D激励电极结构的ICEO芯片,通道底部中间铺设的不接电的长条形金属板为悬浮电极,当在激励电极两侧电极施加交变电场时则可获得悬浮电极表面的ICEO涡流。涡流在悬浮电极中央速度非常小,因而细胞可在涡流作用下被聚焦到悬浮电极中央^[42]。基于ICEO,可实现细胞在特定区域内的高效富集^[43],也可实现指定区域内高通量、非接触的单细胞捕获^[44]。同时,ICEO还可当作微泵实现微流道内的可控流体输送^[41]。ICEO微流控芯片可实现电极阵列与微通道小尺度集成,结构紧凑,易于加工,且悬浮电极无需外部电信号接入,因而可根据不同应用场景进行设计布局。然而,由于ICEO微流控芯片依赖诱导二次流,在连续进样的情况下,其细胞操纵效率与精度将随着流速增大而大打折扣,因而该方法同样在连续样本操纵上存在通量低的弊端。



(a) 基于介电泳的细胞操纵原理示意图^[33]; (b) 用于细胞连续分离的介电泳芯片示意图^[23]; (c) 基于诱导电荷电渗的细胞操纵原理示意图^[42]; (d) 基于诱导电荷电渗的连续细胞聚焦^[42]

图3 电控细胞操纵

Fig. 3 Electrical cell manipulation

4 磁控细胞操纵

磁控细胞操纵是指利用永磁铁或电磁铁对细胞进行操纵。由于细胞本身通常既不表现顺磁性,也不表现逆磁性,往往需要对细胞用免疫纳米磁珠进行表面修饰。表面改性的纳米磁珠通过抗体与抗原的特异性作用黏附在细胞表面,因而磁控法为一种基于标记的操纵方法^[45]。如图4(a)^[46-48]所示,在外部磁场作用下,结合了磁珠的细胞在磁力驱动下会偏移原来的流线^[46],因此,有磁珠结合与无磁珠结合的细胞可通过外部磁场操控实现高效分离与捕获^[47-48]。磁控法目前已经被普遍用于在微流控芯片上分离纯化CTCs,通过正向富集的方法,表面有磁珠特异性吸附的CTCs可以被准确地从血细胞中分离出来^[49]。正向富集法需要提前知道CTCs有别于其他血液细胞的特异性表面标志物,因而只能针对目前已知的肿瘤细胞进行分离。反之,负向耗散法可实现血液中肿瘤细胞的体外分离,该方法使用磁珠与白细胞特异性结合,通过磁控操纵逐级耗散白细胞达到分离纯化CTCs的目的。该方法无需对

CTCs进行磁珠吸附,适用于目前几乎所有类型肿瘤细胞的分离^[50]。

基于免疫磁珠的方法进行细胞样本的操纵简单可靠,目前已经成熟应用于许多大型分析检测平台。然而,此方法很难做到同时分离纯化多种细胞,且后续细胞与表面磁珠的分离也很困难。此外,磁珠吸附可能会对细胞膜蛋白和结构产生损害,不利于后续进一步的细胞培养分析,使其应用场景受限。

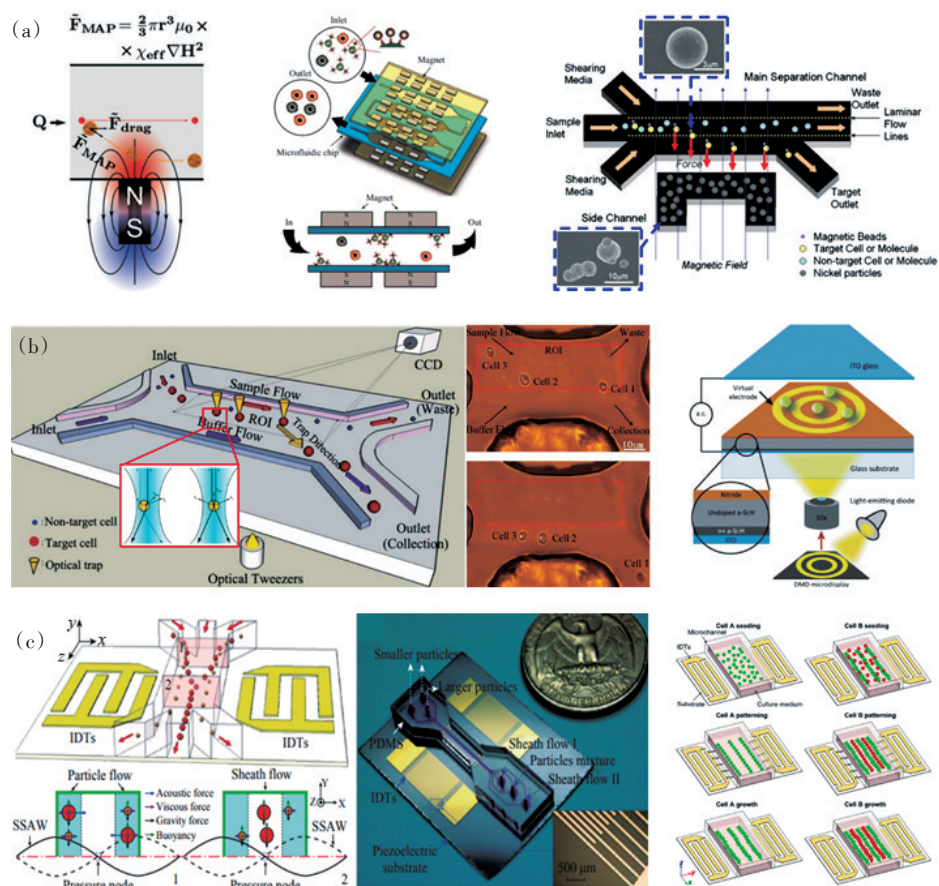
5 光控细胞操纵

光控细胞操纵手段目前有两种,即基于光镊和光诱导介电泳(OIEP)的细胞操纵方法。光镊对粒子的操纵能力首先被美国科学家 Arthur Ashkin 发现,他发现强聚焦的激光束可以把介质当中折射率较高的物体拽向激光束的中间部位,并进一步在1987年首次发表了单光束梯度激光的光镊效应^[51]。基于单色激光的光镊对尺度介于纳米与几十微米之间的粒子都具有可操纵性,也可利用光镊实现对活体生物细胞的操纵。且

基于机器人辅助控制的光镊可实现细胞的多维度自动化操纵,已被用于细胞力学^[52]、细胞输运^[53]、细胞迁移^[54]等方面的研究。光镊不仅能实现非连续流下的细胞操纵,也可结合微流控芯片实现连续流下的细胞操纵,其中最典型的应用当属光镊增强的微流控细胞分选^[55]。如图4(b)中左图^[55]所示,首先通过鞘流实现细胞样本在通道上游的聚焦,通过细胞的荧光特征进行图像识别,光镊自动捕获并拖动目标细胞使其发生跨流线的侧向位移,从而使目标细胞被收集到特定出口。该方法具备准确度高、非侵入等优点。但光镊对细胞产生的操纵力往往处于皮牛量级,因而连续流下的细胞操纵要求细胞进样流速不能太高,且光镊对细胞很难做到一次性大批量,这两点限制了光镊在高通量细胞操纵方面的应用。此外,光镊系统外围庞大的光路系统难以小型化,因而其成本也较高。

ODEP是一种基于DEP基础上开发出来的一种新型微粒操纵技术,其粒子受力机制与传统DEP一样,即使用非均匀电场极化粒子并对其产生DEP力。两者的不同点在于非均匀电场产生方式,相比传统介电泳操纵,ODEP无需预先加工电极图案。如图4(b)中右图^[56]所示,可利用DMD投影仪经显微镜头投射光斑图案到芯片基底上生成灵活可控的虚拟电极^[56]。其工作原理类似光伏发电,非晶硅基底材料在光的激发下产生光生载流子,导致光照区载流子浓度升高从而使光照区电导率迅速增加,进而导致光照区和暗区分压不同,在粒子操纵空间内产生非均匀电场,从而实现细胞等生物粒子的DEP操纵。

ODEP同样具备普通DEP非接触、损伤小的优点,因而也被广泛用于多样化的细胞操纵,如CTCs分离^[59]、水凝胶内的细胞图案化^[60]及在连续流下分离提取细胞



(a) 磁控细胞操纵及其应用; (b) 光控细胞操纵, 左图为光镊自动化操纵下的细胞连续分离, 右图为光诱导介电泳操纵细胞; (c) 声控细胞操作, 左图为基于SSAW的微流控细胞连续分离, 右图为基于SSAW的两种细胞图案化共培养

图4 磁、光、声控细胞操纵

Fig. 4 Magnetic, optical and acoustic cell manipulation

核^[61]等。和普通光镊相比,ODEP具有设备简单,可实现小型化,且对操纵粒子的光学性质没有要求,因而具有极大的灵活性。但是ODEP同样存在和普通介电泳一样的固有缺陷,即需在低电导率的溶液中操纵细胞,因而也限制了其他临床上的应用。且ODEP芯片的基底由于沉积非晶硅而不透明,影响了利用倒置生物显微镜进行活细胞成像。

6 声控细胞操纵

声控细胞操纵方法基于声波进入微流体后所产生的复杂的流-固耦合效应来实现细胞操纵。声波形式上分为体波与表面波,声表面波(SAW)是一种只能在固体表面传播的弹性声波,其能量大部分集中在基底表面以下深度约几个波长范围内^[62]。由于SAW芯片具有频率较高、能量集中、穿透性好、便于集成等优点,近些年已被大量研究用来进行微流控芯片上的细胞操纵。叉指换能器(IDTs)常被用来产生声表面波,通过调节叉指电极的叉指间距可实现对SAW共振频率的调控。SAW共振频率可达GHz,故可用来实现微米甚至亚微米颗粒的精确操控。此外,改变IDTs的形状还可实现对声场分布的调控,使该操纵方法具备极大的灵活性。SAW器件采用标准维纳加工工艺加工,具备极好的重复性和一致性,且平面加工方法使其可实现与微流控芯片的集成。当声波传播进入流体媒介中,流体通过吸收声波而获得动量,从而发生整体移动,这种现象被称为声流效应。当流体中的粒子尺寸远小于波长且质量很小,那么它就会随着流体运动,这样即实现了对流体中粒子运动的操控。基于声流可以在微流控芯片上实现细胞样本的富集、筛选等操作,例如Cooper课题组^[63]利用声流实现了血液液滴内疟疾感染与未感染红细胞的富集和分离。由于被疟疾感染的红细胞密度小于正常红细胞,因而在声流操纵下,未感染红细胞被富集在液滴中间,而被感染细胞则被富集与液滴边缘。整个过程可在5 s内完成,由此快速实现了病原体的非标记富集与分离。如图4(c)左图所示,当两列频率相同声表面波相向传播产生叠加时,就会产生声表面波驻波(SSAW)。在SSAW的影响下,粒子将会受到驻波声辐射力,进而聚集在波腹或波节位置,粒子会汇聚于波腹还是波节取决于粒子和周围媒介的性质,如密度和可压缩系数。声辐射力主要是由于粒子对声波

产生反射、折射、吸收等效应,进而导致动量在声波与颗粒之间发生交换。声辐射力的大小与SSAW的波长、振幅及粒子的尺度和密度等物理性质相关。近些年,大量研究工作在微流控芯片上产生SSAW实现了细胞的精准高通量操纵,如细胞分选^[64]、单细胞捕获^[65]、细胞图案化共培养^[66]。图4(c)左图^[67]所示,不同尺寸的细胞由于所受声辐射力不同,因此在连续流动的流体中,尺寸大的细胞产生了往波节方向的较大侧向偏移,而小细胞偏移不明显,因而利用SSAW实现了基于尺寸差异的细胞连续分离^[67]。图4(c)右图^[68]为Huang课题组基于SSAW通过顺序图案化排列的方法实现了两种细胞的图案化共培养,两种细胞在通道内不同位置排列的实现基于使用频率相同而相位相反的两组激励信号。

声控技术在细胞操纵上具有非接触、无损伤、穿透性较好等优点。然而,声控技术在微流控细胞操纵领域的应用还处于起步阶段,仍有大量问题有待解决,譬如需要进一步研究声波、流体和细胞之间的非线性相互作用。当前的声控芯片大多基于LiNbO₃基片,材料单一,亟待研究基于新型压电材料的声波器件基片。

7 结论

利用微流控技术进行生物细胞的多样化高效操纵一直是交叉学科领域的研究热点。综述了用于微流控细胞操纵的常见方法及其应用,并对各类方法的优缺点进行了讨论总结。可以看出,每种方法都存在着其固有优势与缺陷。总体上,基于流体动力学的被动式方法可实现细胞样本的高通量操纵,但是其在细胞操纵精度与灵活性上存在不足;而电控、光控等主动式方法具有准确度高、可灵活控制的优点,但由于电、光、声、磁场在操纵微米尺度细胞上存在操作力较小等缺点,因而无法做到连续流体下的高通量细胞操纵。因此,实际应用中,往往需要结合多种方法,在保证高通量的同时实现高效、准确的细胞操纵,并尽可能减轻对细胞造成的附加损伤。目前能够胜任各种细胞操纵任务的完美方法几乎不存在,因而在研究过程中应将多种方法加以结合,实现1+1>2的效果是微流控细胞操纵领域今后需要研究的方向,同时,要不断改进现有技术,并开发用于细胞操纵的新方法与新技术。此外,从实验与理论模拟上研究揭示流体光学、流体细胞力学以及微流体力学等微流控中涉及的基础理论规律也将

成为助力微流控细胞操纵技术发展的重要手段。最后,基于当前几乎所有微流控细胞操纵方法都是进行体外的细胞操纵,因此未来将微流控芯片植入皮下、血管等组织器官中,实现直接在人体内进行精密的细胞操纵预分析,实现疾病的无创、微创诊断与治疗也是值得期望的方向。

参考文献(References)

- [1] 刘琳, 厉坤鹏, 胡志敏, 等. 微流控芯片在细胞分选中的分析技术进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(5): 727-733.
Liu Lin, Li Kunpeng, Hu Zhimin, et al. Progress in analytical techniques of microfluidic chip on cell sorting[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2013, 35(5): 727-733.
- [2] Huh D, Bahng J H, Ling Y, et al. Gravity-driven microfluidic particle sorting device with hydrodynamic separation amplification[J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(4): 1369-1376.
- [3] Adan A, Alizada G, Kiraz Y, et al. Flow cytometry: Basic principles and applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 37(2): 163-176.
- [4] Shields C W 4th, Reyes C D, López G P. Microfluidic cell sorting: A review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation[J]. Lab on a Chip, 2015, 15(5): 1230-1249.
- [5] Di C D, Wu L Y, Lee L P. Dynamic single cell culture array [J]. Lab on a Chip, 2006, 6(11): 1445-1449.
- [6] Tran Q D, Kong T F, Hu D, et al. Deterministic sequential isolation of floating cancer cells under continuous flow[J]. Lab on a Chip, 2016, 16(15): 2813-2819.
- [7] Beech J P, Holm S H, Adolfsson K, et al. Sorting cells by size, shape and deformability[J]. Lab on a Chip, 2012, 12(6): 1048-1051.
- [8] Louterback K, D' Silva J, Liu L, et al. Deterministic separation of cancer cells from blood at 10 mL/min[J]. AIP Advances, 2012, 2(4): 042107.
- [9] Zhang J, Yan S, Yuan D, et al. Fundamentals and applications of inertial microfluidics: A review[J]. Lab on a Chip, 2016, 16(1): 10-34.
- [10] Di C D. Inertial microfluidics[J]. Lab on a Chip, 2009, 9(21): 3038-3046.
- [11] Kuntaegowdanahalli S S, Bhagat A S, Papautsky I. Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels[J]. Lab on a Chip, 2009, 9(20): 2973-2980.
- [12] Bhagat A A S, Hou H W, Li L D, et al. Pinched flow coupled shear-modulated inertial microfluidics for high-throughput rare blood cell separation[J]. Lab on a Chip, 2011, 11(11): 1870-1878.
- [13] Sungyoung S. A continuous-flow microfluidic syringe filter for size-based cell sorting[J]. Lab on a Chip, 2015, 15(5): 1250-1254.
- [14] Song S, Choi S. Field-free, sheathless cell focusing in exponentially expanding hydrophoretic channels for microflow cytometry[J]. Cytometry Part A, 2013, 83(11): 1034-1040.
- [15] Choi S, Ku T, Song S, et al. Hydrophoretic high-throughput selection of platelets in physiological shear-stress range[J]. Lab on a Chip, 2011, 11(3): 413-418.
- [16] Karp J M, Karnik R. A cell rolling cytometer reveals the correlation between mesenchymal stem cell dynamic adhesion and differentiation state[J]. Lab on a Chip, 2014, 14(1): 161-166.
- [17] Zhao Q, Zhang J, Yan S, et al. High-throughput sheathless and three-dimensional microparticle focusing using a microchannel with arc-shaped groove arrays[J]. Scientific Reports, Nature Publishing Group, 2017, 7: 41153.
- [18] Hsu C, Carlo D, Chen C, et al. Microvortex for focusing, guiding and sorting of particles[J]. Lab on a Chip, 2008, 8(12): 2128-2134.
- [19] Louterback K, Silva J D, Liu L, et al. Deterministic separation of cancer cells from blood at 10 mL/min[J]. AIP Advances, 2012, 2: 042107.
- [20] Hur S C, Tseb T K H, Di C D. Sheathless inertial cell ordering for extreme throughput flow cytometry[J]. Lab on a Chip, 2010, 10(3): 274-280.
- [21] Choi S, Ku T, Song S, et al. Hydrophoretic high-throughput selection of platelets in physiological shear-stress range[J]. Lab on a Chip, 2011, 11(3): 413-418.
- [22] Choi S, Song S, Choi C, et al. Continuous blood cell separation by hydrophoretic filtration[J]. Lab on a Chip, 2007, 7(11): 1532-1538.
- [23] Unger M A, Chou H, Thorsen T, et al. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography[J]. Science, 2000, 288(5463): 113-117.
- [24] Melin J, Quake S R. Microfluidic large-scale integration: The evolution of design rules for biological automation[J]. Annual Review of Biophysics, 2007, 36: 213-231.
- [25] Frank T, Savaş Tay. Automated co-culture system for spatio-temporal analysis of cell-to-cell communication[J]. Lab on a Chip, 2015, 15(10): 2192-2200.
- [26] Prakadan S M, Shalek A K, Weitz D A. Scaling by shrinking: empowering single-cell "omics" with microfluidic devices[J]. Nature Reviews Genetics, 2017, 18(6): 345.
- [27] Macqueen L, Sun Y, Simmons C A. Mesenchymal stem cell mechanobiology and emerging experimental platforms[J]. Journal of the Royal Society Interface, 2013, 10(84): 20130179.

- [28] Zhao D, Lin M, Pedrosa E, et al. Characteristics of allelic gene expression in human brain cells from single-cell RNA-seq data analysis[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 860.
- [29] Acosta J R, Joost S, Karlsson K, et al. Single cell transcriptomics suggest that human adipocyte progenitor cells constitute a homogeneous cell population[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2017, 8(1): 250.
- [30] Gauvin R, Parenteau-Bareil R, Larouche D, et al. Dynamic mechanical stimulations induce anisotropy and improve the tensile properties of engineered tissues produced without exogenous scaffolding[J]. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(9): 3294-3301.
- [31] Stoppel W L, Kaplan D L, Iii L D B. Electrical and mechanical stimulation of cardiac cells and tissue constructs[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 96: 135-155.
- [32] Luo T, Fan L, Zeng Y, et al. A simplified sheathless cell separation approach using combined gravitational-sedimentation-based prefocusing and dielectrophoretic separation[J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(11): 28-33.
- [33] Doh I, Cho Y. A continuous cell separation chip using hydrodynamic dielectrophoresis (DEP) process[J]. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2005, 121(1): 59-65.
- [34] Prabhakarandian B, Pant K, Klarmann G J, et al. Continuous-flow sorting of stem cells and differentiation products based on dielectrophoresis[J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(5): 1320-1328.
- [35] Su W, Gao X, Jiang L, et al. Microfluidic platform towards point-of-care diagnostics in infectious diseases[J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1377(1996): 13-26.
- [36] Chu H K, Huan Z, Mills J K, et al. Three-dimensional cell manipulation and patterning using dielectrophoresis via a multi-layer scaffold structure[J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(3): 920-930.
- [37] Huan Z, Member S, Chu H K, et al. Characterization of a honeycomb-like scaffold with dielectrophoresis-based patterning for tissue engineering[J]. *IEEE Transactions on Mechatronics*, 2017, 64(4): 755-764.
- [38] Ho C, Lin R, Chang W, et al. Rapid heterogeneous liver-cell on-chip patterning via the enhanced field-induced dielectrophoresis trap[J]. *Lab on a Chip*, 2006, 6(6): 724-734.
- [39] Mittal N, Voldman J. nDEP microwells for single-cell patterning in physiological media[J]. *Lab on a Chip*, 2007, 7(9): 1146-1153.
- [40] Thomas R S, Morgan H, Green N G. Negative DEP traps for single cell immobilisation[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(11): 1534-1540.
- [41] Castellanos A, Green N G, Morgan H, et al. Pumping of liquids with ac voltages applied to asymmetric pairs of micro-electrodes[J]. *Physical Review*, 2003, 67(5): 056302.
- [42] Jia Y, Jiang H. Continuous-flow focusing of microparticles using induced-charge electroosmosis in a microfluidic device with 3D AgPDMS electrodes[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(82): 66602-66610.
- [43] Wong P K, Chen C, Wang T et al. Electrokinetic bioprocessor for concentrating cells and molecules[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(23): 6908-6914.
- [44] Wu Y, Ren Y, Tao Y, et al. Large-scale single particle and cell trapping based on rotating electric field induced-charge electroosmosis[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(23): 11791-11798.
- [45] 黄爽, 何永清, 焦凤. 微流控芯片中颗粒/细胞磁操控的研究进展[J]. *分析化学*, 2017, 45(8): 1238-1247.
Huang Shuang, He Yongqing, Jiao Feng. Advances of particles/cells magnetic manipulation in microfluidic chips[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(8): 1238-1247.
- [46] Lee W, Tseng P, Di D. *Microtechnology for cell manipulation and sorting*[M]. Berlin: Springer, 2016.
- [47] Lin Y A, Wong T, Bhardwaj U. Formation of high electromagnetic gradients through a particle-based microfluidic approach [J]. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2007, 17(7): 1299.
- [48] Lin S, Chen D, Xie Y, et al. Single cell manipulation technology[J]. *Nano Biomedical Engineering*, 2015, 7(3): 75-91.
- [49] Ozkumur E, Shah A M, Ciciliano J C, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and-independent sorting of rare circulating tumor cells[J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(179): 179ra47.
- [50] Karabacak N M, Spuhler P S, Fachin F, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(3): 694-710.
- [51] Ashkin A, Dziedzic J M, Yamane T. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams[J]. *Nature*, 1987, 330(6150): 769-771.
- [52] Wang K, Cheng J, Cheng S H, et al. Probing cell biophysical behavior based on actin cytoskeleton modeling and stretching manipulation with optical tweezers[J]. *Applied Physics Letters*, 2013, 103(8): 083706.
- [53] Hu S, Sun D. Automatic transportation of biological cells with a robot-tweezer manipulation system[J]. *The International Journal of Robotics Research*, 2011, 30(14): 1681-1694.
- [54] Gou X, Yang H, Fahmy T M, et al. Direct measurement of cell protrusion force utilizing a robot-aided cell manipulation system with optical tweezers for cell migration control[J]. *The International Journal of Robotics Research*, 2014, 33(14):

- 1782–1792.
- [55] Wang X, Chen S, Kong M, et al. Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies[J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(21): 3656–3662.
- [56] Chiou P Y, Ohta A T, Wu M C. Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images[J]. *Nature*, 2005, 436(7049): 370–372.
- [57] Shi J J, Huang H, Stratton Z, et al. Continuous particle separation in a microfluidic channel via standing surface acoustic waves (SSAW)[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(23): 3354–3359.
- [58] Li S, Guo F, Chen Y, et al. Standing surface acoustic wave based cell coculture[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(19): 9853–9859.
- [59] Chiu T, Chao A, Chou W, et al. Optically-induced-dielectrophoresis (ODEP)-based cell manipulation in a microfluidic system for high-purity isolation of integral circulating tumor cell (CTC) clusters based on their size characteristics[J]. *Sensors & Actuators B: Chemical*, 2018, 258: 1161–1173.
- [60] Hu W, Ishii K, Ohta A T. Cell Patterning in a hydrogel using optically induced dielectrophoresis[C]//2016 International Conference on Optical MEMS and Nanophotonics (OMN). Piscataway NJ: IEEE, 2016: 6–7.
- [61] Huang S, Hung L, Lee G. Continuous nucleus extraction by optically-induced cell lysis on a batch-type microfluidic platform[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(8): 1447–1456.
- [62] 蒋鹏, 孟龙, 蔡飞燕, 等. 基于声表面波的微操控技术研究进展[J]. *集成技术*, 2013, 2(5): 42–47.
- Jiang Peng, Meng Long, Cai Feiyan, et al. Progress in micro-scale acoustic manipulation based on surface acoustic wave [J]. *Journal of Integration Technology*, 2013, 2(5): 42–47.
- [63] Bourquin Y, Syed A, Reboud J, et al. Rare-cell enrichment by a rapid, label-free, ultrasonic isopycnic technique for medical diagnostics[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(22): 5587–5696.
- [64] Li S, Ding X, Mao Z, et al. Standing surface acoustic wave (SSAW)-based cell washing[J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(1): 331–338.
- [65] Guo F, Mao Z, Chen Y, et al. Three-dimensional manipulation of single cells using surface acoustic waves[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(6): 1522–1527.

Microfluidics based cell manipulation: Methods and applications

SUN Dong, LUO Tao

Department of Biomedical Engineering, City University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China

Abstract With the microfluidics, the precise control of micro-liquids and the miniaturized integration of multiple functionalities can be achieved, with incomparable advantages in the cell manipulation in terms of precision, efficiency and cost. Therefore, the microfluidics has become an interdisciplinary research hot spot in recent years. From the perspective of the cell manipulation methods and the corresponding applications, this paper reviews the latest progress in the field of the microfluidic cell manipulation, and discusses the advantages and disadvantages of various cell manipulation methods, and then analyzes the trend of the microfluidics based cell manipulation.

Keywords microfluidics; cell manipulation; cell sorting; cell enrichment; single-cell trapping ●



(责任编辑 刘志远)