

文章编号:1004-7220(2019)02-0139-06

循环肿瘤细胞的微流控芯片分离及其物理性质测量分析

张晟泓¹, 魏桥栋¹, 刘洁¹, 陆云姝², 龚晓波¹

(1.上海交通大学 工程力学系, 上海 200240; 2.上海交通大学医学院附属新华医院 普外科, 上海 200092)

摘要:目的 建立一种使用微吸管测量具有良好生理活性的循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)弹性模量的方法。方法 使用商品化的微流控芯片富集血液中具有良好生理活性的 CTCs,使用 EpCAM 抗体确定 CTCs,并使用微吸管测量其弹性模量,同时与癌细胞系弹性模量相对比。结果 对于癌细胞系的弹性模量,不仅在不同细胞系间存在较大的差异,在同一细胞系间也存在较大的异质性。血液中 CTCs 相比于同种癌细胞系属于弹性模量较小的癌细胞。结论 该方法能够获得生理活性较好的 CTCs 并测量其弹性模量,为进一步研究 CTCs 力学特性与癌症诊断和治疗预后之间的相关关系,推进癌细胞物理标志物的发展提供细胞力学数据支持。

关键词:癌症转移; 循环肿瘤细胞; 微流控芯片; 细胞力学; 微吸管力学测量

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2019.02.005

Microfluidic Chip Separation and Physical Property Measurement of Circulating Tumor Cells

ZHANG Shenghong¹, WEI Qiaodong¹, LIU Jie¹, LU Yunshu², GONG Xiaobo¹

(1. Department of Engineering Mechanics, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;
2. Department of General Surgery, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Abstract: **Objective** To establish a new method to measure the elastic modulus of living circulating tumor cells (CTCs) by micropipette aspiration. **Methods** Living CTCs were enriched by commercial microfluidic chips and identified individually using EpCAM antibody under fluorescence microscope. The elastic modulus of CTCs was measured using micropipette aspiration and compared with cancer cell lines. **Results** For the elastic modulus of different cancer cell lines, heterogeneity was found not only between the different types of cancer cell lines but also inside the same cell line. The CTCs in breast cancer had a smaller elasticity modulus compared with MCF-7 cancer cell line. **Conclusions** This method can measure the elastic modulus of living CTCs, which provides cell mechanics data for studying the relationship between physical properties of CTCs and diagnosis of cancers, as well as developing the physical biomarkers of tumor cells.

Key words: metastasis; circulating tumor cells (CTCs); microfluidic chip; cell mechanics; micropipette aspiration

收稿日期:2019-02-28; 修回日期:2019-03-11

基金项目:国家自然科学基金项目(11872040,81702588)

通信作者:龚晓波,副教授,博士研究生导师,E-mail: x.gong@sjtu.edu.cn

在癌症患者中,超过 90% 的死亡是由于癌症转移引起^[1]。因此,充分了解肿瘤如何从原发灶转移到其他部位,并阻止这一过程已经成为癌症领域研究热点。近些年人们认识到肿瘤的力学性质对于肿瘤转移有着关键作用,肿瘤的力学性质也开始逐渐成为研究热点,一般在组织及细胞两个水平开展。对于组织水平上肿瘤的力学性质,由于肿瘤组织易于获得,目前研究较为成熟,甚至有可以在肿瘤原位直接测量肿瘤弹性模量进行临床诊断的手段^[2]。而对于单细胞水平的力学性质,对于肿瘤细胞系的力学性质研究较多,均发现癌细胞的弹性模量随着癌症恶性程度增加而减小^[3-5]。对于在体癌细胞,一些研究也发现胸水中的转移癌细胞相对于正常细胞表现出较低的弹性模量,同时随着转移能力的提高,弹性模量进一步减小^[6-9]。

然而受限于血液中循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)极低的数量以及分离方法的限制,对于 CTCs 的力学性质研究较少。目前主要的分离方法有三类^[10]:基于生物化学的分离方法、基于物理性质的分离方法以及复合方法,但只有基于物理性质的分离方法可以获得生理活性较好的 CTCs 用于力学性质分析。本文基于 CTCs 直径较大的物理特性,利用环形微流道方法分离 CTCs。相对于其他方法,该方法优势明显,如有较高的分离效率、分离细胞纯度较高、生理活性较好,对于大量样本通量高、适用于不同类型的癌症、操作较为稳定^[11]。

微吸管吮吸技术最早由 Mitchison 和 Swann 于 1954 年在测量海胆卵的弹性性质时引入^[12],并由 Band 和 Burton 于 1964 年用于测量红细胞膜的力学特性^[13],随后被广泛用于测量各种细胞的弹性、黏弹性以及细胞黏附性质。该技术使用一根直径小于细胞直径的微吸管吮吸细胞,在显微镜下测量细胞被吸入微吸管的长度与吮吸压强之间的关系,推测细胞的力学性质。微吸管吮吸技术的测量范围为 $10 \text{ pN} \sim 10^4 \text{ nN}$ ^[14],最大的优点是操作较为方便,用途广泛。作为显微镜引导下的可视测量技术,微

吸管吮吸技术较为适合在大量细胞中寻找并测量稀有细胞,且可用于转移细胞进行进一步后续处理。鉴于该技术的测量范围与精度均符合要求,本文使用微吸管吮吸技术进行细胞弹性模量的测量。

本文使用基于细胞大小的流体力学分离方法获得有较好生理活性的 CTCs,并使用微吸管技术测量 CTCs 弹性模量,同时与现有的癌细胞系弹性模量进行对比。研究结果为进一步研究 CTCs 力学特性与癌症诊断和治疗预后之间的相关关系提供新的方法,希望能够寻找到一种新的癌细胞标志物,为恶性肿瘤的临床诊断提供新的辅助性依据。

1 材料和方法

1.1 CTCs 富集

2018 年 4 月~2018 年 6 月,于上海交通大学附属新华医院采集乳腺癌患者以及胆囊癌患者血液标本。均采用 K_2EDTA 采血管采血 7~8 mL。所有样本置于冰盒中 $0 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下在 2 h 内运抵实验室,在 3 h 内开始处理。CTCs 分离采用 FXCTCs 分离仪 CTChip(FR-1 CBB-FR001001, Clearcell 公司,新加坡)标准分离步骤。

将血液转移到 50 mL 离心管中,加入血样体积 3 倍的红细胞裂解液(Clearcell 公司,新加坡),混匀,置于摇床上裂红 10 min。观察裂解后的血液,若样本未成为深红色澄清液体则继续裂解,但最长裂解时间不超过 15 min。若裂解好的血样中有絮状凝血,用 $40 \mu\text{m}$ 孔径的流式过滤网过滤。将裂解好的样本在室温下 $500 g$ 离心 10 min,取出弃去上清液,留下 0.2 mL 下层细胞沉淀。加入 4.3 mL 重悬液(Clearcell 公司,新加坡)充分吹打并重悬下层细胞沉淀。若重悬液中有絮状凝血,用 $40 \mu\text{m}$ 孔径的流式过滤网过滤,再加入 0.15 mL 冲洗液补足损失液体。将 4.5 mL 液体上样到 CTC 分离仪上,运行标准分离程序,分离样本中的 CTCs。运行结束后,取下 11.5 mL CTCs 及 10^3 数量级白细胞混合悬液。在室温下 $500 g$ 离心 10 min,弃去上清液留下 0.1 mL 底部沉淀。

1.2 CTCs 免疫染色定位

向 0.1 mL 沉淀中加入 2.5 μL EpCAM-PE 流式抗体 (Miltenyi 公司, 德国), 充分吹打使其均匀混合, 在避光条件下室温孵育 2 h。将沉淀转移到 1.5 mL 微量离心管中, 使用 0.2 mL 1X HBSS (Gibco 公司, 美国) 冲洗 15 mL 离心管 3 次, 使液体全部转移到微量离心管中, 使用 HBSS 500 g 离心 5 min, 洗涤细胞沉淀 3 次, 将沉淀转移至显微划分板 (微域公司, 中国) 上, 静置 15 min, 使细胞沉降到玻片底部。将显微划分板置于倒置荧光显微镜上 (IX7, Olympus 公司, 日本), 逐一观察划分, 分别拍摄明场以及荧光图像, 确认细胞的位置。

1.3 微吸管测量癌细胞弹性模量

使用自主搭建的微吸管吮吸系统, 主要包括压力系统、显微操作系统, 微吸管、显微镜拍摄系统 (见图 1)。

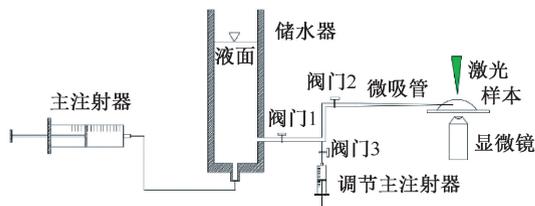


图 1 压力系统示意图

Fig.1 Schematic diagram of the pressure system

压力系统由横截面积 2.1 cm^2 、总长 20 cm 的容器提供负压, 最大负压 2 kPa, 压力变化由注射泵推动主注射器吸取储水器中的水实现, 吸取速度 4 mL/min, 液面下降速率为 32 mm/s, 压力改变速率为 3.11 Pa/s。微吸管直径范围为 8~10 μm , 吸入长度不超过 2 倍管径。所有微吸管采用相同的参数制作, 保证在吸入长度内, 直径变化小于 3%, 进行计算时忽略此误差。在 40 倍物镜加 1.6 倍放大下以 0.2 帧/s 速率拍摄图像, 此时相邻帧之间压强变化为 15.5 Pa。图像经过标定每个像素点对应 0.122 μm 。实验过程中保持室温在 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 。

微吸管使用拉针仪 (Sutter 公司, 美国) 将外径 1 mm、内径 0.58 mm 玻璃管 (Sutter 公司, 美国) 拉成在 8~10 μm 内径段变化较为平缓的玻璃微管, 之

后使用显微熔断仪 (Narishige 公司, 日本) 将玻璃微管在 8 μm 左右断成管口较为平整的玻璃微吸管, 确保在直径 2 倍长度内, 直径变化小于直径的 3%。使用前将玻璃微吸管外壁使用 3% BSA (Sigma 公司, 德国)/HBSS 溶液润湿, 针内使用 2% Pluronic (Clearbridge 公司, 新加坡)/HBSS 溶液灌注, 直至微吸管针头有液滴冒出, 完全排出微吸管中的气泡。

癌细胞系使用含 10% FBS (Biological Industries 公司, 以色列) 及 1% 青链霉素 (生工公司) 的高糖 DMEM 培养基 (Biological Industries 公司, 以色列), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。实验时吸去细胞培养皿内含有血清的培养基, 用 2 mL HBSS 冲洗两次, 加入 2 mL HBSS, 用移液枪用力吹打细胞, 使细胞从贴壁状态变为悬浮细胞。吸取 1 mL 细胞悬浮液, 滴于载玻片上。

测量癌细胞时首先调节注射器调节储水容器液面高度, 使得细胞能够稍稍吸入微吸管中, 提升微吸管, 使其脱离载玻片表面。打开注射泵, 逐渐增加微吸管内负压, 打开相机记录吸入过程。

1.4 数据处理及分析

本文推测, CTCs 的力学特性与癌细胞系类似。在固体模型中, 由于线弹性固体模型对于实验数据的拟合较为简单, 且能很好地符合细胞在微吸管中的反应, 故采用线弹性固体模型计算细胞的弹性模量。

线弹性固体模型最早在 1988 年由 Theret 引入细胞微吸管测量^[15]。微吸管实验时, 玻璃微吸管直径小于细胞直径, 微吸管内持续不断增大的负压, 微吸管材质为玻璃相对细胞几乎不发生形变。因此, 该模型将细胞视为一个无限大的均质线弹性半空间线弹性固体, 被内部有 ΔP 的负压的中空圆柱管吮吸。中空圆柱管内径为 a , 外径为 b , 且为刚性材料。

对于两种边界条件: 在中空圆柱管的吮吸过程中, 在任何一个负压值下, 固体均能取得平衡位置或吸入长度不变。由固体力学知识均可导出:

$$E = \frac{3}{2\pi} \times \Phi \times \Delta P \times \frac{R_p}{L_p} \quad (1)$$

式中: E 为细胞弹性模量; Φ 为管口系数, 当 $(b-a)/a=0.2$ 时, $\Phi \approx 2.1$; P 为吮吸压强; R_p 为玻璃微吸管内半径; L_p 为细胞吸入微吸管长度。

在实际使用中, 由于无法测得 ΔP 与 L_p 的绝对值, 采用将 ΔP 作为横坐标与 L_p 作为纵坐标作图, 取图像线性拟合斜率作为两者比值 k 带入公式计算:

$$E = \frac{3}{2\pi} \times \Phi \times R_p \times \frac{1}{k} \quad (2)$$

使用 Image J 以及 NIS-elements BR 软件处理图像, 以微吸管中轴为基准线, 细胞最前方白色边缘为细胞前沿, 管口后端最暗部位管口位置, 测量细胞吸入长度到管口的距离; 以吸入细胞上下边缘测量微吸管直径(见图 2)。在计算时忽略微吸管和细胞之间的摩擦力。线性拟合数据, 选取斜率带入计算。

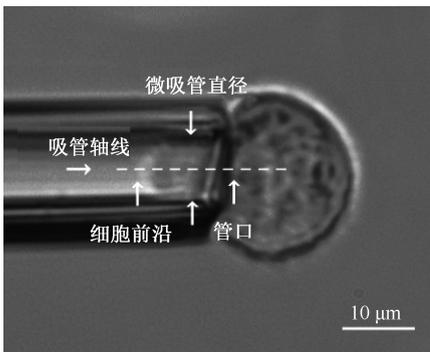


图 2 测量吸入长度及微吸管直径时位置选取

Fig.2 Position selection when measuring suction length and diameter of micropipette

2 结果

2.1 癌细胞系弹性模量

对于不同的细胞, 细胞质和细胞核的占比(核质比)不同, 吮吸细胞时的形态也大不相同。对于核质比较大、几乎全为细胞核的细胞系, 如 MCF-7 细胞系, 测得的几乎全是细胞核的弹性模量; 对于核质比较小的细胞, 如 SKOV-3 细胞系, 很难测得细

胞核的弹性模量; 对于核质比介于两者之间的细胞, 管径细胞直径的比值对于测得的是细胞哪一部分的弹性模量关系较大, 如 HeLa 细胞系。图 3 所示为 3 种细胞系的弹性模量分布。

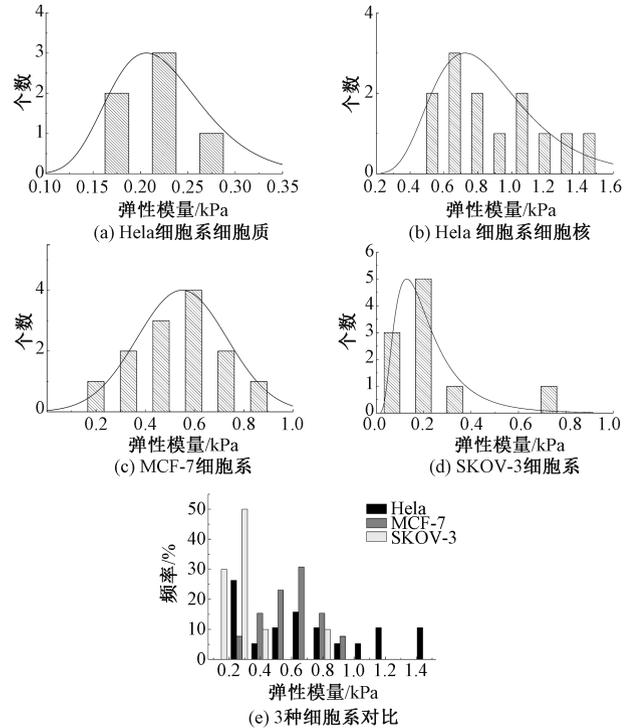


图 3 3 种细胞系弹性模量分布

Fig.3 Comparison of elastic modulus distribution among three cell lines (a) Cytoplasm of HeLa cell lines, (b) Nucleus of HeLa cell lines, (c) MCF-7 cell lines, (d) SKOV-3 cell lines, (e) Comparison of three cell lines.

测量结果表明, 恶性肿瘤细胞的细胞间异质性较大, 在相同细胞系中不同细胞的弹性模量差异较大。对于核质比较大的细胞系(MFC-7), 细胞弹性模量集中在细胞核弹性附近; 对于核质比较小的细胞系, 测得的基本上为较小的细胞质弹性模量; 对于细胞核占比适中的细胞系(HeLa 细胞系), 细胞的弹性模量呈现出非常大的差异。参考 SKOV-3 细胞系弹性模量将 HeLa 细胞系分为小于 400 Pa 的细胞质弹性模量与大于 400 Pa 的细胞核弹性模量, 均较为符合对数正态分布, 细胞质弹性模量均值为 217.7 Pa, 细胞核弹性模量均值为 820.5 Pa。MCF-7 细胞系的细胞核弹性模量较为符合正态分

布,均值为 549.2 Pa。SKOV-3 细胞系细胞质弹性模量较为符合对数正态分布,均值为 184.7 Pa。

2.2 CTCs 弹性模量

在分析的 16 例乳腺癌血液以及 14 例胆胆囊癌血液样本中,由于样本均为肿瘤早期,仅有 1 例患者检测出 4 个 CTC,该患者于 2014 年诊断双侧乳腺癌伴腋窝淋巴结转移,进行内分泌药物治疗,未进行手术。本研究测得其中 1 个 CTC 的弹性模量为 231.5 Pa,对比 MCF-7 乳腺癌细胞系的弹性模量,属于弹性模量较低的癌细胞(见图 4)。

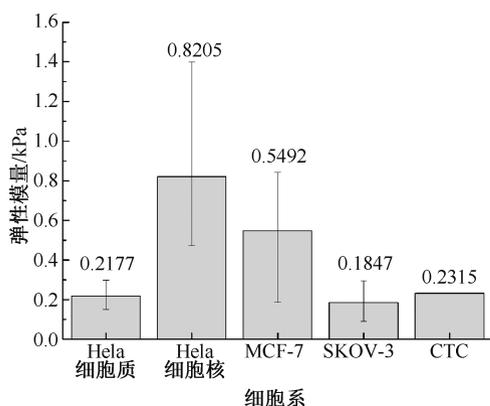


图 4 CTC 弹性模量与细胞系平均弹性模量对比

Fig.4 Comparison between the elastic modulus of CTCs and the mean elastic modulus of cell lines

3 讨论与结论

CTCs 作为癌症远端转移的重要一环,其力学性质与转移能力密切相关。本实验初步验证了微流控芯片分离 CTCs 并使用微吸管吮吸方法测量 CTCs 弹性模量的方法,同时测量 3 种癌细胞系的弹性模量作为对比。结果发现,癌细胞的弹性模量在细胞系内以及不同细胞系间均存在较大异质性;不同核质比的细胞系在吮吸时有不同的表现;但不同细胞系弹性模量分布近似符合对数正态分布或正态分布。从晚期乳腺癌样本中分离的 CTCs 弹性模量对应乳腺癌细胞系细胞属于弹性模量较低的癌细胞,与癌症转移理论基本符合。

本文初步验证了使用微流控芯片分离 CTCs 并

使用微吸管吮吸方法测量 CTCs 弹性模量的方法,积累了一定的癌细胞系弹性模量数据,但由于临床血样中分离到 CTCs 的样本数较小,还不能确定 CTCs 总体的弹性模量分布以及随着癌症病情发展的变化。但研究结果为后续开展大量的 CTCs 力学性质测量实验以寻找癌细胞力学标志物提供了细胞力学数据支持。之后将继续在不同临床分期的癌症患者血样中分离 CTCs 并测量其力学性质,研究 CTCs 力学性质与癌症发展之间的关系。同时,CTCs 具体在转移的哪一过程中发生了何种程度的力学性质变化以及其中的生物化学机理,也是非常值得探讨的问题。

参考文献:

- [1] CHAFFER C, WEINBERG R. A perspective on cancer cell metastasis [J]. *Science*, 2011, 20, 331 (6024): 1559-1564.
- [2] YU X, WANG H, NING X, *et al.* Needle-shaped ultrathin piezoelectric microsystem for guided tissue targeting via mechanical sensing [J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2(3): 165-172.
- [3] LEKKA M, LAIDLER P, GIL D, *et al.* Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy [J]. *Eur Biophys J*, 1999, 28(4): 312-316.
- [4] DARLING EM, ZAUSCHER S, BLOCK JA, *et al.* A thin-layer model for viscoelastic, stress-relaxation testing of cells using atomic force microscopy: Do cell properties reflect metastatic potential [J]. *Biophys J*, 2007, 92(5): 1784-1791.
- [5] BRUNNER C, NIENDORF A, KAS JA. Passive and active single-cell biomechanics: A new perspective in cancer diagnosis [J]. *Soft Matter*, 2009, 5(11): 2171-2178.
- [6] CROSS SE, JIN YS, RAO J, *et al.* Nanomechanical analysis of cells from cancer patients [J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(12): 780-783.
- [7] REMMERBACH TW, GUICK J, KÄS J. Oral cancer diagnosis by mechanical phenotyping [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(5): 1728-1732.
- [8] SWAMINATHAN V, MYTHREYE K, O'BRIEN ET, *et al.* Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient

- tumor cells and in cancer cell lines [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(15): 5075-5080.
- [9] GOSSETT DR, TSE HTK, LEE SA, *et al.* Hydrodynamic stretching of single cells for large population mechanical phenotyping [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(20): 7630-7635.
- [10] ALIXPANABIÈRES C, PANTEL K. Challenges in circulating tumor cell research [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(9): 623-631.
- [11] WARKIANI ME, KHOO BL, WU L, *et al.* Ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells from blood using spiral microfluidics [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(1): 134-148.
- [12] MITCHISON JM, SWANN MM. The mechanical properties of the cell surface II. The unfertilized sea-urchin egg [J]. *J Exp Biol*, 1954, 31(3): 461-472.
- [13] RAND RP, BURTON AC. Mechanical properties of the red cell membrane: I. Membrane stiffness and intracellular pressure [J]. *Biophys J*, 1964, 4(2): 115-135.
- [14] SURESH S. Biomechanics and biophysics of cancer cells [J]. *Acta Mater*, 2007, 55(12): 3989-4014
- [15] THERET DP, LEVESQUE MJ, SATO M, *et al.* The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial cell micropipette measurements [J]. *J Biomech Eng*, 1988, 110(3): 190-199.