

# 快报

## 由微芯片技术的罕见循环肿瘤细胞在癌症患者隔离

Sunitha Nagrath<sup>1\*</sup>, Lecia五Sequist<sup>2\*</sup>, Shyamala Maheswaran<sup>2</sup>, 达芙妮W.贝尔<sup>2</sup>, 丹尼尔Irimia<sup>1</sup>, 林赛Ulkus<sup>2</sup>, 马修R.史密斯<sup>2</sup>, 尤尼斯L.郭某<sup>2</sup>, Subba Digumarthy<sup>2</sup>, 阿罗那Muzikansky<sup>2</sup>, 瑞安保<sup>2</sup>, 尤利西斯J.巴利斯<sup>1</sup>, 罗纳德·汤普金斯G.<sup>1</sup>, 丹尼尔·哈伯A.<sup>2</sup> & 梅米特·托纳<sup>1</sup>

活肿瘤来源的上皮细胞（循环肿瘤细胞或CTC）havebeen识别inperipheral血液fromcancer患者和可能是棘手的转移性疾病的起源<sup>1,4</sup>。

虽然极为罕见，CTC的表示与肿瘤组织的非血液学癌症的检测，鉴定和监测的信息源，以侵入性活组织检查的潜在替代<sup>5,6</sup>。

来识别，隔离，传播andmolecularly characterizeCTC亚群可能进一步癌症干细胞生物标志物的发现和扩大转移的生物学的理解能力。对于isolatingCTCs目前的策略是有限的，以产生非常低的收率和纯度的复杂分析方法<sup>7</sup>。

在这里，我们描述了一种独特的微流体平台（“CTC-芯片”），其能够从外周全血样品活CTC的高效和选择性分离的，由目标CTC的与抗体（EpCAM的）的相互作用介导的发展下精确地包被的微柱受控层流的条件，并且没有样品的所需预标记或处理。的CTC-芯片成功鉴定的CTC在患有转移性肺癌，前列腺癌，胰腺癌，乳腺癌和结肠癌中的116（99%）的样品115中的外周血，与一系列每毫升5-1,281CTCs和大约纯度50%。此外，在的CTC 7/7患者分离早期前列腺癌。鉴于CTC-芯片的高灵敏度和特异性，我们测试了其潜在效用inmonitoring响应于抗癌治疗。患者withmetastatic癌症进行全身治疗小队列中，如通过标准的射线照相的方法测定在CTC数随时间的变化相关的相当好与疾病的临床过程。因此，CTC-芯片提供了用于患有癌症的患者的CTC的准确识别和测量一个新的和有效的工具。它在推动这两个癌症生物学研究和临床癌症管理广泛的影响，包括检测，诊断癌症andmonitoring<sup>10</sup>。

CTC的是罕见的，包括少至每10一个小区<sup>9</sup>在转移癌患者血液血液学细胞，因此他们的隔离提出了一个巨大的技术挑战<sup>7,9,11-13</sup>。微流体实验室上的单芯片器件为细胞分选和稀土小区检测的独特机会；他们已经成功地用于微流体流式细胞仪<sup>14</sup>，连续基于大小的分离<sup>15,16</sup>。

和色谱分离<sup>17</sup>。尽管他们在微沟道操作的简单液体微升量成功<sup>14,18,19</sup>，它们迄今显示出处理大量的细胞和流体复杂的全血样品（毫升）的能力有限<sup>20-22</sup>。

在这里，我们描述了能够有效地和可重复地从患者的常见上皮肿瘤（图1，和补充图1）血液中的CTC隔离开发和微流体装置（即“CTC-芯片”）的应用程序。的CTC-芯片（图1b）由微柱阵列（补充图1c），其是由化学官能用抗上皮细胞粘附分子（EpCAM的，也被称为TACSTD1）抗体。抗EpCAM提供了从普通血液CTC捕获的特异性，因为EpCAM的经常被肺癌，结直肠癌，乳腺癌，前列腺癌，头颈部和肝起源的癌过表达，并且是从血液系统细胞中不存在<sup>23,24</sup>。

决定的CTC-芯片上细胞捕获效率两个基本参数是：（1）流速，因为它影响细胞接触微柱的持续时间；和（2）的剪切力，其必须足够低，以确保最大的细胞附着微柱。优化这些参数，我们采用理论分析表征与内分布微柱细胞的相互作用

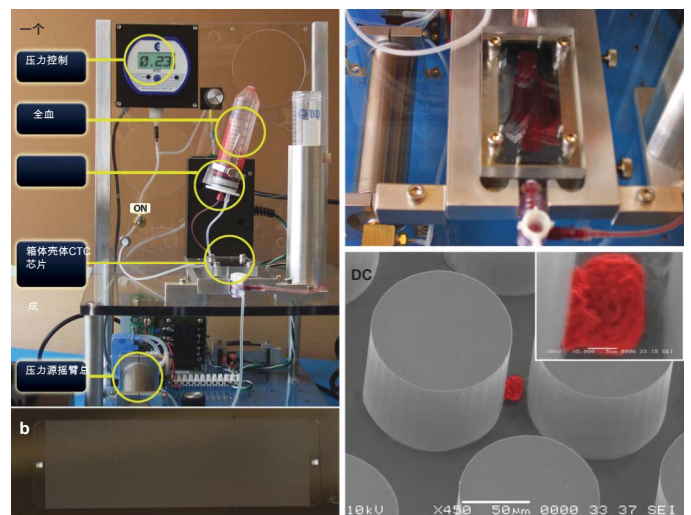


图1 | 使用微流体装置从全血中的CTC的分离。一个，工作站设置为CTC分离。将样品连续混合上的摇臂，并且使用pneumaticpressure调节泵通过芯片泵送。b，的CTC-芯片与硅蚀刻微柱。c，全血中流动通过微流体装置。d，一个capturedNCI-H1650肺癌细胞的扫描电子图像掺入血液（伪彩色红色）。该插图示出了电池的highmagnification图。

<sup>1</sup> 手术和微机电资源中心，麻省总医院，哈佛医学院和施莱恩斯儿童医院，马萨诸塞州波士顿02114，USA。

<sup>2</sup> 马萨诸塞州总医院癌症中心，哈佛医学院，马萨诸塞州波士顿02114，USA。（现地址：美国国家人类基因组研究所/NIH癌症遗传学分会，马里兰州贝塞斯达20892，USA（DWB）；病理学，密西根大学健康系统，密歇根州安阿伯48109，USA（UJB）系。

\* 这些作者同等贡献的纸张。

流路 ( 补充图1c和2 )。简单地说, 模拟表示的等边三角形布置, 具有50 微米微柱和50微米之间距离 微米个移位每3行后, 成为最高效的几何布置。对于1毫升/小时的给定的体积流动速率 $v_1$ 通过该装置, 由微柱表面附近的细胞所经历的最大剪切应力, 估计是

**0.4达因/厘米<sup>2</sup>在H 568和预期的最大速度为460 微米/秒<sup>2</sup> ( 补充图2b-d )**, 有利于根据线性剪切应力室研究最大细胞附着 ( 补充图的范围内。3 )。对模拟结果的基础上, 我们制造了含有内的970微米78,000微柱阵列的CTC-芯片<sup>2</sup>表面。

以确定捕获效率, 我们在100 cells/ml掺入非小细胞肺癌 ( NSCLC ) 细胞 ( NCI-H1650 ) 到磷酸盐缓冲盐水 ( PBS ) <sup>21</sup>和捕获的利用CTC-芯片加标癌细胞。NSCLC细胞约的EpCAM包被的微柱在视觉上明显的, 而没有癌细胞看出以下流过未涂覆的帖子 ( 补充图4a-c ) 中。所计算出的捕获效率是65%, 并且在速率2.5毫升/上文H显著降低<sup>21</sup> ( 图2a ), 大概是由于增加的剪切应力, 与我们的模拟预测相一致。捕获效率的流速小于未增强

**0.75毫升/小时<sup>21</sup>, 导致我们选择取适量涂于脸部h的流量<sup>21</sup>为后续研究。**

为了确定CTC捕获的效率蜂窝EpCAMexpression的效果, 我们比较中具有变化的EpCAM表达, 包括非小细胞肺癌NCI-H1650细胞癌细胞系捕获速率

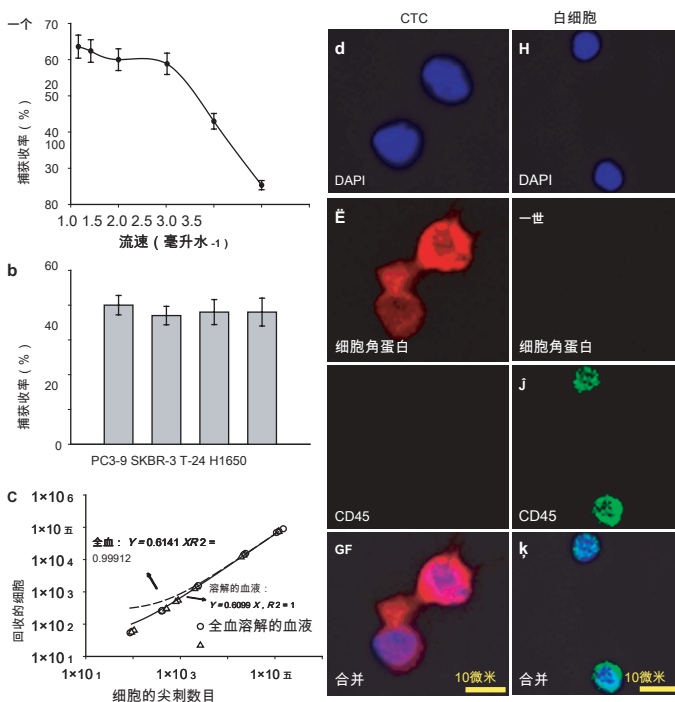


图2| CTC捕获和枚举。a, 捕获效率, 流速的函数。显示的数据代表平均超过三个装置测量, 并且每个误差条代表平均值的标准误差。b, 从缓冲器捕获产量掺有每毫升的四个不同的细胞系100个细胞: 前列腺 ( PC3-9 ), 乳腺癌 ( SKBR-3 ), 膀胱 ( T-24 ), 和非小细胞肺癌 ( NCIH1650 )。重复在至少3个装置的每个数据点。误差条表示每个实验中测量的标准偏差。

c, 用于各种靶细胞浓度, 全血进行比较来裂解血液样本的捕获效率的回归分析。该图表示对加标回收的细胞数量细胞的数量。

d - k, 更高的放大倍率 ( 20 3 ) 捕获的CTC和从NSCLC患者, 用DAPI染色细胞血液学, 和细胞角蛋白和CD45的图像。合并的图像识别面板的CTC d - g 和血液学细胞在面板 h - k。

和乳腺癌SKBR-3细胞中, 每with.500,000细胞抗原; 前列腺癌PC3-9细胞, 用每细胞约50000抗原; 和膀胱癌T-24细胞, 用每细胞约2000抗原<sup>25</sup>。每个细胞系在100 cells/ml的浓度掺入PBS<sup>21</sup>和分析, 从而在所有情况下的平均捕获产量of.65% ( 图2b )。有趣的是T-24细胞具有相对低的EpCAM表达进行了尽可能有效捕获为高级别抗原表达细胞。我们认为, 这是由于CTC芯片内固有的增强细胞 - 底物相互作用。

为了评估多种生理状况下细胞捕获, 我们进行了一系列实验, 其中NCI-H1650细胞掺入全血从健康献血者。浓度范围为每毫升全血50~50,000的肿瘤细胞悬浮液进行了分析, 得到回收率of.60%在所有情况下 ( 图2c )。为了评估红细胞在流动路径的潜在空间位阻, 用溶解的血液从健康捐赠者重复这些研究。捕获率均为条件下具有可比性 (  $R^2$  五 0.99; 图2c )。使用全血和来自NSCLC患者裂解样品 ( 补充图4D, E ) 获得类似的结果。因此, 我们的结论是, CTC芯片不需要bloodsample预处理。

已经优化了CTC芯片与癌症衍生细胞的数量控制, 我们测试了从癌症患者捐献的全血样本捕获的CTC的能力。共116个样品从68例上皮癌症, 包括非小细胞肺癌 (  $\bar{n}$  五 55 ), 前列腺癌 (  $\bar{n}$  五 26 ), 胰腺癌 (  $\bar{n}$  五 15 ), 乳腺癌 (  $\bar{n}$  五 10 ) 和结肠 (  $\bar{n}$  五 10 ) 进行了研究。大多数患者有转移性疾病; 然而, 26 7的受试者患有前列腺癌有治疗, 临床局部用治疗意图 ( 补充表2 ) 前列腺切除术之前收集的标本疾病。血的平均体积analysedwas2.7毫升每个样品 ( 范围0.9~5.1毫升 )。我们还研究了从20个健康个体样品中 ( 3.0 6 0.4毫升 ( 平均 6 的每个受试者血液 ) 作为对照SD ) ( 附加表1 )。

从一组患者样品的捕获的CTC使用了全面的图像分析算法识别, 由染色的用4,6 -二巯基-2-苯基吲哚 ( DAPI ) 对DNA含量, 用若丹明结合的抗 - 细胞角蛋白 ( 也称为KERSMCR ) 抗体上皮细胞, 和fluoresceinconjugated抗CD45抗体用于血液学细胞 ( 图2d-k和补充图5 )。通过抗EpCAM包被的微柱和染色角蛋白捕获的细胞进行评分为CTC, 而CD45阳性细胞被评分为污染正常血液学细胞。由捕获的CTC呈现的形态特征是恶性细胞, 包括具有高核大蜂窝大小是一致的: 质比和可见核仁 ( 图2D-G )。捕获细胞的平均存活率为98.5 6 2.3% ( 平均 6 SD ), 通过在视每CTC-芯片在从肺获得的4个样品的10个高倍视野评估细胞膜完整性 ( 确定  $\bar{n}$  五 2 ) 和前列腺癌 (  $\bar{n}$  五 2 ) 癌症患者。的CTC中的116进行分析 ( 0.99% ) 的患者样本115进行了鉴定, 与单个负样本不同于与结肠直肠癌的患者的小体积样品 ( 0.9毫升 )。CTC的数目分离自5至不等每1281毫升NSCLC ( 155 6 236 ( 平均 6 SD ) 每毫升的CTC ), 16至292 ( 86 6 78 ) 用于转移性前列腺, 25至174 ( 94 6 63 ) 局限性前列腺癌中, 9到831 ( 196 6 228 ), 用于胰腺癌, 5至176 ( 79 6 52 ), 用于乳腺癌和42~375 ( 121 6 127 ), 用于结肠直肠癌 ( 图3a, b ) 中。CTC的与临床局限性前列腺癌的受试者在数字接近那些在转移性前列腺癌的患者的是由我们的技术和值得进一步研究的高灵敏度使一个新的发现。平均纯度捕获, 如通过细胞角蛋白的比限定<sup>1</sup>以CD45<sup>1</sup>细胞, 在非小细胞肺癌的52%, 在转移性前列腺癌49%, 在局部前列腺癌53%, 在胰腺癌53%, 在乳腺癌中的60%, 并且在结肠癌 ( 图3c ) 67%。在20名健康受试者均无任何可识别的CTC ( 附加表1 )。在这些结果的基础上, 我们计算出的灵敏度 ( 99.1% ) 和

在所有5种恶性肿瘤的CTC芯片的特异性 ( 100% )。最后, 我们评估CTC捕获采用分体式样的重现性和表现出较高的实验可重复性 (  $R^2$  五 0.98; 补充图4f )。

以确定所捕获的细胞是否适合于随后的分子分析, 我们测试了两个具体的肿瘤标志物的表达: 前列腺特异性抗原 ( PSA; 也称为KLK3 ) 在前列腺癌和甲状腺转录因子-1 ( TTF-1; 也称为NKX2-1 ) 在肺癌。这些标记物的特异性表达是显著的免疫染色 ( 图4a, b和d, e ) 中, 并通过在微芯片和PCR与单个转录物的反转录 ( RT-PCR ) 扩增 ( 图捕获的CTC的直接裂解证实。图4c中, f )。综合考虑, 50% 的捕获活的CTC的纯度 ( 两个量级比现有技术更高版本 ) <sup>26</sup>。在CTC芯片提供了基于CTC分子分析, 一个强大的机会。

为了证明我们的方法的独特的临床潜力, 我们评估了CTC负担变化的预测在接受抗癌治疗癌症患者的肿瘤体积变化的能力。患者与开始了第一或第二线的全身治疗方案先进的基于上皮的恶性肿瘤均符合要求。血液样本在基线和在随后的就诊次数收取; 患者之间的确切后续进度而变化。计算断层 ( CT扫描 ) 是根据标准临床实践在基线和定期进行。对于eachCT扫描, 我们计算了sumof的一维大小在所有显著和可衡量的肿瘤部位的厘米, 按照该RECIST标准化体系 <sup>27</sup>。所有患者基线和至少

一个后续CTC样品和CT扫描进行分析, 其中包括患者的非小细胞肺癌 (  $n$  五 3 ), 结肠直肠癌 (  $n$  五 2 ), 胰腺癌 (  $n$  五 3 ) 和食道癌 (  $n$  五 1 ) ( 图3d-i )。CTC的绝对数量捕获并不一定与肿瘤的大小相对应, 并且可以通过其它因素的影响。每在CTC数量和每肿瘤大小百分比变化百分比变化到最后一次测量之间的相关性, 从第一, 是所有9个例分析过, 并且得到的0.68 Pearson相关系数 (  $P$  五 0.03 )。从患者的一个小样本这些结果表明, CTC量与临床反应和临床非对治疗的反应相关相当好 ( 图3d-i和补充图6 ), 表明监测使用CTC-芯片治疗响应可以最终是一个强大的工具, 使准确的, 早期的决策。这种方法的临床影响可能会很大, 而且可能使病人暴露于毒性从无效的疗法减少和引导他们对他们的特异性肿瘤最活跃的治疗。

其他方法来充实或排序从外周血中的CTC已经先前公布, 包括流式细胞术 <sup>28</sup>。

免疫磁珠<sup>9</sup>, 高通量光学成像系统<sup>29</sup>, 和光纤阵列扫描<sup>12</sup>。免疫磁珠纯化<sup>1,13,30</sup>是目前引领技术在临床环境中, 与报道的成功在测试例肺癌, 前列腺癌, 结肠癌, 乳腺癌和胰腺癌的一部分识别的CTC<sup>30</sup>。

然而, 这种方法分离少量的CTC ( 4 6 24 ( 平均 6 SD ) 每毫升在肺; 11 6 118在乳腺癌; 10 6 33前列腺; 和1 6 在两种结肠癌和胰腺癌2 )  $\Rightarrow$  具有非常低的纯度 ( 0.01-0.1 % ) <sup>26</sup>。和低的产率 ( 的患者20-60% ) <sup>30</sup>。该

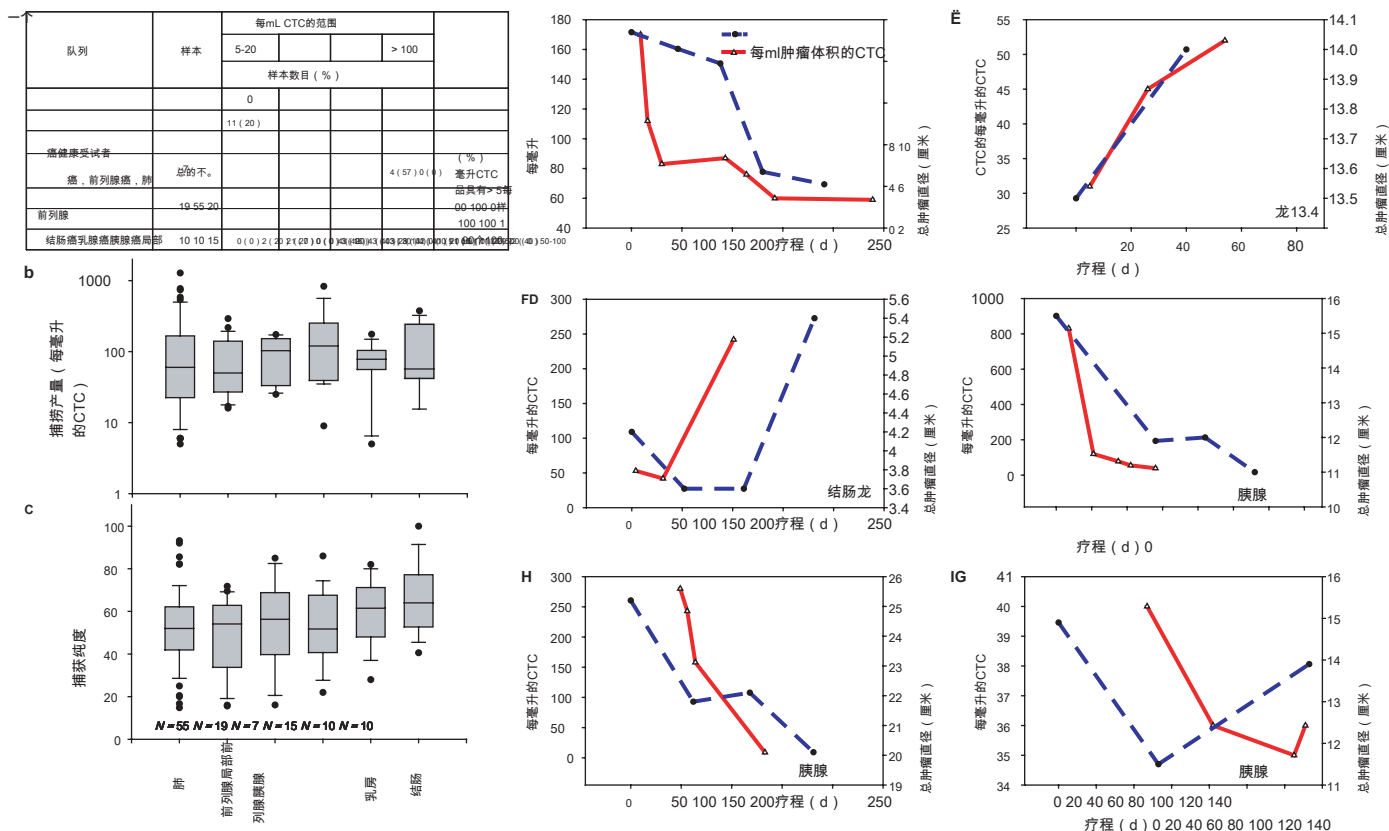


图3|从癌症患者的CTC计数。一个, 样品的总结andCTC每个血液1毫升计数患者的各种晚期癌症和局部前列腺癌。b, 每1毫升血液的CTC, 由诊断的频率。箱形图呈现出中值, 下和上四分位数 (第25, 第75百分位数)。摆在第10和第90百分位数以外的数据点被示出为异常值。c, 捕获的CTC的纯度 (CTC的比与总的有核细胞), 通过诊断。d - i, 串行CTCassessmen t。CTC量 (红色), 并作为一维总和测量肿瘤大小 (蓝色) 在CT扫描的所有显著肿瘤部位, 过抗癌治疗的过程中有很好的相关九个病人。其中六个在这里显示, 对他们来说, 诊断和特异性治疗是: 非小细胞肺癌, 1号线卡铂, 紫杉醇 (d); 非小细胞肺癌, 第二行培美曲塞 (e); 结肠直肠癌, 1stline 5FU, 伊立替康 (f); 胰腺癌, 第一行吉西他滨, 贝伐单抗 (g); 胰腺癌, 第一线吉西他滨 (h); 胰腺癌, 第一行吉西他滨, 厄洛替尼 (i)。基线CT扫描治疗开始前和CTC开始测量或在第一次治疗后不久。

与低灵敏度，选择性和基于磁珠技术的产量相关“生物噪音”的电平会阻碍以动态方式以及用于早期癌症检测其能力以监测对治疗的反应。因此，这种方法迄今证明临床效用仅作为毛预后工具，患者分类成高和低风险类别<sup>1</sup>。相反地，高灵敏度（在1个十亿血细胞1个目标小区），选择性（0.47%纯度），和CTC-芯片的产率（99%）使得它非常适合于响应于癌症治疗的实时监控。

此外，CTC-芯片是在于其排序稀有细胞在单一步骤中直接from whole血液唯一的。从技术角度来看，因为CTC芯片是可以成功process millilitre的全血量第一微流体装置，这是可能的。与此相反，基于磁珠系统<sup>2,3</sup>需要多个“批量”半自动化的准备步骤（离心，洗涤和温育），导致稀有细胞的显著比例的损失和/或破坏。除了它的简单性，所述CTC-芯片是用于在各种临床情况下，包括在呕吐量和在微柱的抗体的变化，从而允许其它类型的稀少循环细胞中的捕获的潜在用途容易适应。在CTC芯片的一步法性质和多功能性使之有利于定点服务的使用及快速集成到临床实践中。

最后，CTC-芯片是独特的，因为其柔和性（最大剪切应力为0.4达因厘米<sup>22</sup>）允许活细胞的分离，而基于磁珠方法只能分离物固定的，不可存活的细胞<sup>30</sup>。所捕获的细胞在固定微柱在静止性质允许洗出非特异性结合的白细胞，产生了10<sup>6</sup>-倍的富集，纯度水平是数量级比现有技术高两个数量级。分离浓缩的，可行的CTC的能力使得CTC-芯片分子访问稀有CTC亚群的理想工具诸如转移性前体细胞或癌细胞。

总之，CTC-芯片捕获大量在单一步骤from whole血液中的活的CTC的无需预先稀释，预先贴标签，预固定或任何其他处理步骤。这里描述的技术和微流控稀土细胞捕获技术的更广泛的应用到癌症患者保持显著承诺识别血源性转移的关键生物学决定，并提供一个强大的平台，旨在早期诊断和癌症纵向监测。

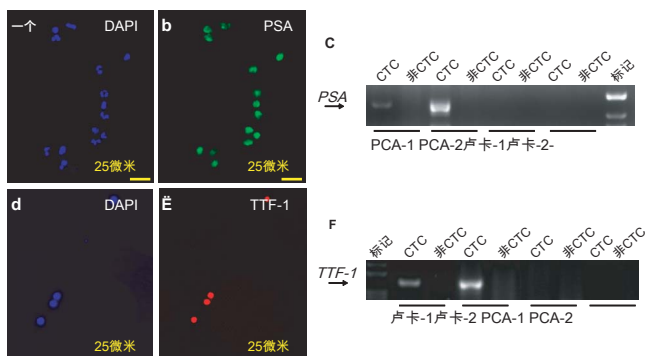


图4 | CTC的表征肿瘤特异性的分子标记。一个，b，的CTC弗罗马前列腺癌患者为DAPI和PSA表达染色阳性。c，的RT-PCR扩增PSA转录物被认为是在两名患者的前列腺癌（PCA），但不是在两例肺癌（卢卡），并且仅在富集的CTC相对于非富集级分（非CTC）血液级分。d，e，从染色和DAPI TTF-1的患者NSCLC的CTC。f，RT-PCR显示了表达TTF-1两个肺癌患者（卢卡），这是在两例前列腺癌（PCa）中不存在，并且仅当RNA从富集的CTC血液级分洗脱，而不是非富集级分（非CTC）。

## 方法概要

Thermofluidic系统（图1a）由在硅蚀刻microfluidic芯片的（图1b），歧管包围芯片（图1c，和补充图1B），和一个气动泵（图1a），以确立流过捕获模块（图1c）。微流体系统的示意性的补充图中示出。图1b。芯片的尺寸是25毫米×36毫米，为19mm的有效捕获区域351毫米。它包含微柱等边三角形阵列，100微米高和100微米直径，平均50微米微柱之间间隙（补充图1c）。对于增加的流体动力学效率，正三角形阵列的重复的图案是由50垂直移动微米在整个芯片每隔三行最大化结构微柱和细胞之间的相互作用。此阵列包含

的970毫米表面积内78000个微柱<sup>2</sup>。微柱用深反应离子蚀刻（DRIE）由Silex的制造。血液样本的采集和处理，宏-微的CTC，细胞活力和分子测定的耦合，鉴定和计数在方法描述。

全部方法和任何相关的引用是纸在www.nature.com/nature在线版本。

接受了2月1日；接受17 2007年10月。

1. Cristofanilli, M. 等。循环肿瘤细胞，疾病进展，和存活在转移性乳腺癌。N.英格兰。J.医学。351，781-791（2004）。

2. Steeg, PS肿瘤转移：机械的见解和临床的挑战。自然医学。12，895-904（2006）。

3. 古普塔，GP & Massague, J.癌症转移：构建框架。细胞127，679-695（2006）。

4. Reya, T., 莫里森，SJ，克拉克，MF & 威斯曼，IL干细胞，癌症和癌干细胞。性质414，105-111（2001）。

5. Mocellin, S., 勒，D., 安布罗西，A., 耐帝，D. & 罗西，CR循环肿瘤细胞的患者with melanoma的预后价值的系统评价and metaanalysis. 临床。癌症研究。12，4605-4613（2006）。

6. Smerage, JB & 海斯，DF的测量和在乳腺癌的循环肿瘤细胞的治疗意义。BR. J.癌症94，8-12（2006）。

7. 罗尔，A. 等。增加手术的非小细胞肺癌后循环播散上皮细胞的数量被监测by MAINTRAC（R）是用于复发的预测的初步报告。世界J.外科杂志。ONCOL. 3，18（2005）。

8. 布劳恩，S. & 马斯，C.循环肿瘤细胞in metastatic乳腺癌朝向个性化治疗？N.英格兰。J.医学。351，824-826（2004）。

9. Zieglschmid, V., 的Hollmann, C. & Bocher, 播散的肿瘤细胞在外周血的O.检测。暴击。启临床。实验室。科学。42，155-196（2005）。

10. 基于Ablood-贝尔，DW & 哈伯，DA测试用于肺癌表皮生长因子受体的突变。临床。癌症研究。12，3875-3877（2006）。

11. 卡恩，HJ 等。在乳房的血液循环肿瘤细胞的计数癌症患者过过富集：与疾病分期的相关性。乳腺癌癌症研究。对待。86，237-247（2004）。

12. Krivacic, RT 等。用于癌症的稀土细胞检测器。PROC. 国家科学院。科学。美国101，10501-10504（2004）。

13. Racila, E. 等。检测和血液中的癌细胞的特征。PROC. 国家科学院。科学。美国95，4589-4594（1998）。

14. 斌，AY，斯宾塞，C., 舍雷尔，A., 阿诺德，FH & 地震，SR微制造荧光激活细胞分选仪。自然生物技术。17，1109年至1111年（1999年）。

15. 戴维森，JA 等。确定性流体力学：取血分离。PROC. 国家科学院。科学。美国103，14779-14784（2006）。

16. 黄，LR，考克斯，EC，奥斯汀，RH & 斯特姆，通过确定性横向位移JC连续颗粒分离。科学304，987-990（2004）。

17. 昌，WC，李，LP & Liepmann, D.仿生技术用于基于附着力的收集和在一个微流体通道的细胞的分离。实验室芯片5，64-73（2005）。

18. Whitesides的，GM起源和微流体的未来。性质442，368-373（2006）。

19. 香港，JW与地震，SR综合纳升系统。自然生物技术。21，1179年至1183年（2003年）。

20. 调色剂，M. & Irimia, D.血上的单芯片。Annu. 启生物医学。工程。7，77-103（2005）。

21. Dittrich的，PS & 曼茨，A.实验室上的单芯片：药物发现微流体。性质启药物发现。5，210-218（2006）。

22. 埃尔-阿里，J., Sorger, PK & 詹森，芯片上KF细胞。性质442，403-411（2006）。

23. 去了，PT 等。在人类癌症中常见的EpCAM蛋白表达。哼。病理学。35，122-128（2004）。

24. Balzar, M., 冬季，MJ，德波尔，CJ & 李维诺夫，SV的17-A抗原（EP-CAM）的生物学。J.分子。医学。77，699-712（1999）。

25. 施，CG 等。上皮细胞粘附分子的细胞中的表达存在于血液和原发性及转移性肿瘤。诠释。肿瘤学杂志。27，49-57（2005）。

26. 横渡，DA 等。循环肿瘤细胞的全局基因表达谱。癌症研究。65，4993-4997（2005）。

27. Therasse, P. 等。新准则评估固体对治疗的反应肿瘤。欧洲组织的癌症，全国研究与治疗



美国癌症研究所，加拿大国家癌症研究所。J.国家科 癌症研究所。 92， 205-216 ( 2000 )。

28. Terstappen，LW 等。 流动输血术原理和可行性  
医学。上皮来源的肿瘤细胞在外周血的枚举。 VOX桑。 74 ( 增刊。2 )，269-274 ( 1998 )。

29. Kraeft，SK 等。 隐匿性肿瘤细胞的可靠和灵敏的识别使用  
改进的罕见事件成像系统。 临床。癌症研究。 10， 3020-3028 ( 2004 )。

30.阿拉德，WJ 等。 肿瘤细胞以所有主要的外周血  
癌而不是在健康受试者或患者的非恶性疾病。  
临床。癌症研究。 10， 6897-6904 ( 2004 )。

补充信息 链接到文件在[www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature)在线版本。

致谢 我们感谢A.阿明的技术援助，进行实验时，O.乌尔塔多用于洁净室的工作，S.穆尔蒂的表面化学，

L. Romonosky用于细胞计数，D.海德数字图片和D.波尔森的插图。我们也感谢R.卡普尔和他的团队提供技术援助。作者承认从美国国立卫生研究院 ( toM.T. ) 和多丽丝公爵杰出的临床科学家奖 ( 以DAH ) 的资金。

作者投稿 SN，LVS，RGT，DAH andM.T. 设计和进行研究。SM，DWB和LU进行基因表达分析; DI促进了微流控系统。MRS，麋鹿和PR获得的临床样本。UJB细胞病理学上提供的输入; AM进行统计分析; 和SD进行放射测量。SN，LVS，DWB，SM，

DI，DAH和MT参与数据分析和手稿的写作。

作者信息 重印和权限的信息，请[www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints)。作者宣称竞争的经济利益：在细节自然[www.nature.com/](http://www.nature.com/)陪纸张的全文HTML版本。函授和要求的材料应给MT ( [mtoner@hms.harvard.edu](mailto:mtoner@hms.harvard.edu) )。

## 方法

血液标本采集和处理。血液样本从患者之前绘制的晚期实体肿瘤，并在马萨诸塞州总医院的IRB批准的协议下，化疗后。血液标本也从健康供体获得知情同意后制定。所有标本收集到含有抗凝剂EDTA vacutain er管中并在24小时内进行处理。样品收集和样品处理之间，全血样本保存在4 ù 在摇摆平台上C到防止细胞沉降。对于使用溶解的血液，NH实验4 氧加入到全血在10：1的体积/体积比率，并混合，在室温下15-20分钟。在200离心G（10 ù C）5分钟，除去上清液，将沉淀重新悬浮于缓冲液等体积的，并在4存储在实验室混合器 ù C。

宏微观耦合。要建立通过芯片的流，下面的方法被采纳成与宏观流体泵送系统的微芯片。的硅芯片用氮气吹扫，并用压敏粘合带（3M公司，圣保罗）密封。然后将密封的微流体装置放置在透明5.1厘米 3 7.6 cm plasticmanifold由基部，顶盖和隔板（补充图1b）的。该基座具有用于流体处理的入口和出口端口。歧管基座具有6个引导金属柱，在高度各1mm时，使器件保持在适当位置，并与所述入口和出口端口对准。放置在底座和顶盖之间的金属隔板防止在该设备上的机械应力。底座和顶盖由螺丝固定，提供了防漏组件withminimumdead体积。为了便于操作的端口尺寸使得标准引诱件都可以使用。

一种充气宏流控驱动系统是专门通过themicrofluidic CTC-芯片控制流程，如图1a所示。它使用气动泵，压力调节器和一个数字压力显示器精美控制用于驱动血液弗罗马的空气的压力密封的样品容器插入所述CTC-芯片。摇臂组件提供在整个实验样品混合。通过芯片运行样品之前，设备置换为

缓冲区的3.0毫升。血液样品的等分试样5毫升测量到锥形管中，密封，置于摇臂单元上和连接到所述俘获装置具有低死体积接头（图1a）。样品被允许运行实验之前在摇臂混合至少5分钟。气动泵打开，并根据所要求的流量的压力调节。在实验后，CTC-芯片用10.00毫升PBS在10毫升h冲洗21以除去任何非特异性结合的细胞。

鉴定并通过荧光显微镜的CTC枚举。的Olympus SZX（奥林巴斯美国）与自动PROSCAN阶段（现有Scientific）的直立反射镜被用于图像的微流体芯片。该芯片是在1毫米自动扫描3使用可编程阶段和专业的Q Capture软件（Media Cybernetics）1毫米网格格式。捕获的图像（在100 3总放大），仔细检查和满足预定条件的对象进行计数。色彩，亮度和形态特征，如细胞大小，形状和核大小确定潜在的CTC和排除细胞碎片和非特异性细胞被认为。细胞角蛋白染色呈阳性（细胞角蛋白1）和Met的表型的形态特征进行评分为CTC。细胞计数表示为细胞的每1毫升血液的数量（每毫升的CTC）。通过细胞角蛋白细胞计数1也证实了一组患者（中 $\bar{n}$  5 8）使用三重染色（细胞角蛋白1，DAPI1，CD452）。为了评估运营商间可变性，从各芯片的同一组扫描的图像的（ $\bar{n}$  5 12）由不知道对方的结果的两个不同的操作者进行分析。CTC的回归分析计算由多个运营商证明相关系数（ $|R_2|$ ）的

0.992与1.04的斜率，这表明在从图像计数的CTC误差的百分比低和细胞计数的该枚举是运营商之间的高度可重复的。

细胞活力。细胞活力与LIVE / DEAD活力测定试剂盒测定。这种分析是基于活细胞和死细胞的细胞膜完整性的细胞内酯酶活性。简言之，capturedCTCs在室温下以2:1的溶液中温育30分钟 米 中号钙黄绿素AM和4 米 在PBS中制备中号溴化乙锭。在温育期结束时，将芯片用的11毫升 3 在显微镜下PBS和可视化。

分子生物学研究。总RNA从使用Picopure RNA分离试剂盒根据制造商的指示细胞中分离，并使用TransP lex全转录扩增试剂盒（RubiconGenomics）进行线性扩增。的509个碱基对的编码humanPSA使用下述引物对（正义和反义循环前列腺肿瘤细胞的互补DNA扩增regionwas，5 9 3 9）：初级PCR，TTGTGGGAG GCTGGGAGTG和CCTTCTGAGGGTGAAC TTGCG；次级PCR，（GGCAGGTGCTTGTGGCCTCTCG TGG和GTCA TTGGAAA TAACATGGAGGTCC）。该TTF-1成绩单是使用下面的引物对

（正义和反义，5 9 3 9）：初级PCR，CTGCAACGGCAACCTGGGCAACATG和CAGGTACTTCTGT TG CTTGAAGCG；第二次PCR，CAGGACACCATGAGGAACAGCGCCTC和CAGGTACTTCTGTTGCTTG AAGCG。

建模和理论设备优化。微柱几何形状和微柱阵列的排列在设计CTC-芯片的过程中进行了系统的研究。三种不同的微柱分布和安排进行了测试：正方形阵列，对角正方形阵列和一个等边三角形阵列。由微柱为方形和三角形分布的面积占计算公式如下：

对于正方形阵列，

$$E \sim \frac{\pi - \theta}{2} \frac{1}{\sin^2 \frac{\theta}{2}} \quad d \propto \frac{1}{\sin^2 \frac{\theta}{2}}$$

对于三角形阵列，

$$E \sim \frac{2\pi - \theta}{3} \frac{1}{\sin^2 \frac{\theta}{3}} \quad d \propto \frac{1}{\sin^2 \frac{\theta}{3}}$$

哪里一个 是微柱半径和  $\theta$  是相邻的微柱之间的中心到中心的距离。因此，对于一个给定的间距betweencmicroposts，增加在微柱的半径增加了密度微柱，从而获得更高的捕获区。

对于每个分配的流体动力学效率由德拉蒙德和塔希尔导出的解析解的基础上计算 $s_1$ 并且被确定为有效的捕获长度与微柱之间的平均间隔的比率。有效捕获长度是基于由从流函数计算的气缸为古典拦截限制轨迹。因此，对于一个等边三角形的distributionofmicroposts，所述flowdistribution由下式给出 $s_1$ ：

$$U \sim \frac{F}{8\pi\eta L N_1} \left\{ E_1 \{ 1 : 497504972 \pm 2 E_2 \{ E_2 \{ 0 : 739137296 E_4 \pm 2 : 534189018 E_5 \pm 93652 E_d \} \} \right\}$$

哪里  $\bar{u}$  是微柱之间的平均速度， $F$  是在电池的每单位长度上作用的力， $\eta$  是流体的粘度，和  $E$  如由等式（2）给出。

我们评估使用三种不同的微柱阵列分布细胞捕获的效率，发现捕获的计算流体动力学效率为微柱之间的间距的函数是最大与等边三角形的微柱结构，并用更短的中心到中心的改进的微柱（补充图1a）之间的间隔。然而，在微柱的间距过度减小可能导致微柱之间细胞的物理捕获；因此，我们选择了50 米 米距离betweencmicroposts所计算的最佳间距，这将产生65％的理论捕获效率。因此，流体动力学（流动分布和细胞的轨迹），用于微柱的正三角形阵列分布的详细的计算分析使用可商购的有限元求解器的微流体COM SOL来执行的。

为了确保CTC-chipwould是敏感的并且允许用于高通量，我们采用使用COMSOL表征与所述流动路径内的分布微柱细胞的相互作用数值分析。两个因素必须实现高CTC捕获是：（1）流速的优化以最大化细胞和化学修饰的微柱之间的接触频率，和（2）的剪切力的优化，以确保它们比那些有利于细胞附着到该帖子。微柱的尺寸，间距和沿流分布是确定的流速和剪切应力的关键变量。因此，我们建模的流动性和细胞相互作用的微柱对一个等边三角形阵列（补充图1b）。我们发现，所述三角形排列微柱导致非线性流线，促进与表面微柱细胞接触。对于1毫升h的体积流量 $q_1$ 通过装置（图2a），预期的最大速度为460 米  $s \pm 21$ 和微柱（补充图1c）之间的中途发生。我们还观察到，通过一个微柱的表面附近的细胞所经历的预期最大剪切应力为0.4达因厘米 $2_2$ 在H 5 68 o（补充图1d），远低于生理上有毒的水平，并在该最大细胞附着预期会发生，如通过实验线性剪切应力室研究（补充图2）确定的范围内。总之，分析表示的正三角形排列微柱用50 米 微柱之间并具有50米的距离 米 每3行微柱之后m个移位是最有效的微柱几何布置和间隔。应用1毫升h的体积流量 $q_1$

通过该装置产生的细胞的高通量有效捕获与lownon-specific结合

使表面功能性的。的CTC-芯片surfacewasmade使用抗生物素蛋白 - 生物素化学EpcAM的抗体功能性 $s_2$ 。在芯片的表面是

在室温下45分钟的乙醇，用4% ( V / V ) 3-巯基丙基三甲氧基硅烷改性，然后用偶联剂处理过的 N- maleimidobutyryloxy琥珀酰亚胺酯 ( GMBS, 1 米 M )，从而导致GMBS附着到微柱。接着，将芯片用10处理米 GML 2:1 中性在室温下30分钟，导致固定到GMBS，然后用PBS冲洗，以除去过量的抗生物素蛋白。最后，生物素化的抗体的EpCAM以10:1的浓度 米 GML 2:1 在磷酸盐缓冲溶液 ( PBS )，用1% ( W / V ) BSA和0.09% ( 重量/体积 ) 叠氮化钠被允许为15-30分钟，用PBS洗涤之前进行反应。该芯片是空气干燥并贮存在环境温度下长达三个星期，直到使用。

细胞系的实验。 的人非小细胞肺癌 ( NSCLC ) 细胞系NCI-H1650保持并培养在RPMI-1640培养基中1.5m m至汇合。L- 谷氨酰胺在37补充有10%胎牛血清 0 下在5%CO 2，与湿度。吸气增长mediumwas和细胞培养用胰蛋白酶10分钟。的溶液中加入甲蛋白缓冲液，淬灭蛋白酶活性。然后将细胞预标记有使用由制造商提供的标准协议细胞示踪橙色。将细胞滴度通过countingwith血细胞计数器确定。细胞的期望的浓度通过在PBS中的原始细胞悬浮液的系列稀释thenprepared。标记的细胞掺入全血。

固定和捕获细胞的染色。 捕获的细胞通过流动固定

1%PFA的PBS中，通过0.9毫升在3.0毫升小时设备 2:1 20分钟。该芯片随后用0.2% Triton X-100的0.9毫升的在PBS中10分钟的溶液中以诱导细胞渗透性，并允许细胞内染色洗涤。要确定任何约束淋巴细胞，抗CD45原液0.9毫升 ( 50 米 的在PBS中的1毫升抗体原液 ) 升通过在3毫升小时芯片通过 2:1

30分钟，随后洗涤PBS以除去过量的抗体。为了识别上皮细胞，抗角蛋白原液0.9毫升 ( 50 米 的在PBS中的1毫升抗体原液 ) 升通过在3毫升小时芯片通过 2:1 30分钟，随后洗涤PBS。最后，以允许细胞核的鉴定，

的DAPI溶液0.9毫升 ( 10 米 在去离子水1毫升DAPI试剂 ) 的升通过在3毫升小时芯片通过 2:1，15分钟，随后洗涤PBS。该芯片被从歧管移出，擦拭干附近的流体端口，并在4在黑暗中储存 u C，直到成像。

使用线性剪切海伦 - 肖室剪切应力研究。 剪应力在细胞捕获了重要作用。最佳剪切应力应当施加使得一个能够以足够高的流速捕获的癌细胞的最大数量。为了找到最佳的流量，我们研究了细胞捕获usingHele-S hawmicrofluidic室剪切应力的影响<sup>32</sup>。这些腔室 ( 补充图2d ) 的几何形状是这样的，剪切应力沿腔室长度 ( 补充图2e ) 线性变化，从而允许一个宽范围的剪切应力的研究对于给定的流速。培养的肺癌细胞掺入PBS溶液中，然后通过海伦 - 肖室通过以恒定的流速由具有-EpCAM抗体功能。由于剪切应力沿着通道降低，细胞的密度附着到

表面微柱增加 ( 补充图2A-C )。剪切应力对细胞的粘附通过EpCAM的抗体 - 抗原结合 ( 补充图2f ) 的效果表明，8达因厘米<sup>22</sup>是最佳剪切速率，从而导致200 cellsmm的捕获<sup>22</sup>的功能捕获表面。

从病人的血液中检测CTC捕获。 在正文中描述的更广泛的临床测试之前，我们使用的血液样本晚期NSCLC患者最初的临床实验。首先，我们评估了全血样本和红细胞裂解样品中sixNSCLCpatients中CTC捕获效率。分离的细胞显示在补充图3a所示。白色箭头指向的CTC和绿色箭头白细胞。在示出了角蛋白阳性的高倍率视图的左上角中的插图 ( 细胞角蛋白 1 ) CTCand插图左下角呈现aCD45 1 白细胞。捕获eachcasewas细胞的总数量进行分析，以计算每MLOF血液 ( 补充图3b ) capturedCTCs。与尖刺细胞实验一致，我们没有观察到差异显著在癌症患者中的从全血或溶解的血液的CTC计数，确认CTC-芯片可以被用于分离的CTC直接fromwhole血液而不需要任何预处理。分裂sampleswas testedwithaWilcoxon匹配对之间的reproducibilityof CTCmeasurements符号秩双侧检验，结果为低。

材料。 自Gelest得到3-巯基丙基三甲氧基硅烷。乙醇 ( 200度 )，组织培养瓶中，血球和血清学吸管购自Fisher Scientific。胎牛血清 ( FBS ) 和

0.5M乙二胺四乙酸 ( EDTA ) 购自GIBCO公司。二甲亚砜 ( DMSO )，叠氮化钠，得到fromSigma冻干牛血清白蛋白 ( BSA ) 和用于处理湿气敏感的硅烷的手套袋内。偶联剂GMBS ( N- 的y马来酰亚胺琥珀酰亚胺酯 )，NHS-LC-LC-生物素 ( 琥珀酰亚胺基66 - ( 生物素酰胺 ) 自Pierce Biotechnology获得-6-己酰胺己酸酯 )，和荧光素结合的中性亲和素。从R & d系统获得的生物素化小鼠抗人抗EpCAM。人非小细胞肺癌系NCIH1650，前列腺细胞系PC3-9，乳腺癌细胞系SKBR-3和膀胱癌细胞系T-24购自美国典型培养物保藏中心，和RPMI-1640生长培养基购自Invitrogen公司。橙 ( 5- ( 和6 - ) - ( ( 4-氯甲基 ) - 苯甲酰基 ) 氨基 ) 四甲基苄丹明; CMTMR ) 和绿色 ( 5-氯甲基二乙酸酯; CMFDA ) 购自Molecular Probes公司获得的细胞追踪染料。抗细胞角蛋白PE ( CAM 5.2，用藻红蛋白缀合的 )，CD45 FITC，荧光核染料核染料49，6-二胍基-2-苯基吡啶 ( DAPI ) 和10毫升vacutainer管中购自BD Biosciences。

31. 德拉蒙德，JE & 塔希尔，MI层流粘性流通过并行实心圆柱体的规则阵列。 诠释。J.多相流 10， 51 5-539 ( 1984 )。

32. 穆尔蒂，SK，仙，A.，Tompkins的，RG和碳粉，对人淋巴细胞隔离usingmicrofluidic室流动和表面条件的影响M.。 朗缪尔 20， 11649-11655 ( 2004 )。