



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109012207 A

(43)申请公布日 2018.12.18

(21)申请号 201810955749.X

(22)申请日 2018.08.21

(71)申请人 上海宸安生物科技有限公司

地址 201203 上海市浦东新区祖冲之路
1505弄138号6层

(72)发明人 王宇翀 邹立 沈美萍

(74)专利代理机构 上海申浩律师事务所 31280

代理人 秦华毅

(51)Int.Cl.

B01D 63/08(2006.01)

G01N 1/34(2006.01)

G01N 1/40(2006.01)

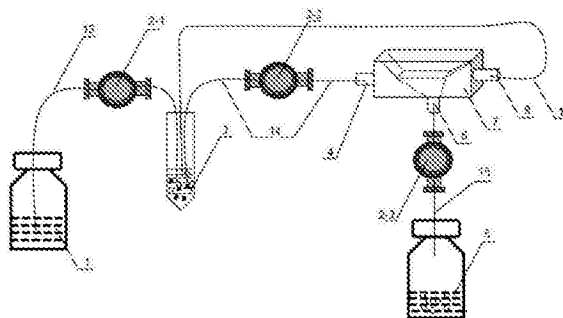
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统

(57)摘要

本发明提供一种循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统,包括待过滤肿瘤细胞液容量瓶(1)、三个蠕动泵:第一蠕动泵(2-1)、第二蠕动泵(2-2)、第三蠕动泵(2-3)、离心管(3)、过滤芯片(7)、经错流过滤的肿瘤细胞液容量瓶(5),如图1所示本发明是基于滤膜过滤以及微流控流体原理发明的一种新方法。错流过滤是水相流动平行于滤膜表面,在滤膜表面形成较大的压力,使细胞进入滤孔进行过滤筛选,过滤后不影响细胞活性从而达到高效富集的效果。本发明循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统达到了高效富集细胞的效果。本发明样品处理简单,样品回收率高,操作简单,使用方便,利于推广,有较好的临床应用前景和较大的社会效益。



1. 一种循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统,其特征在于,所述系统包括待过滤肿瘤细胞液容量瓶(1)、三个蠕动泵:第一蠕动泵(2-1)、第二蠕动泵(2-2)、第三蠕动泵(2-3)、离心管(3)、过滤芯片(7)和经错流过滤的肿瘤细胞液容量瓶(5),图1所示。

2. 根据权利要求1所述一种循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统,其特征在于,所述第一蠕动泵(2-1)设置于待过滤肿瘤细胞液容量瓶(1)与离心管(3)间的管路(13)上;所述第二蠕动泵(2-2)设置于离心管(3)与过滤芯片(7)进液端(4)之间的管路(14)上;所述第三蠕动泵(2-3)设置于过滤芯片(7)废液端(8)与经循环错流过滤的肿瘤细胞液容量瓶(5)之间的管路(15)上。

3. 根据权利要求2所述一种循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统,其特征在于,所述第一蠕动泵(2-1)的运行速度为5-15转/每分钟,第二蠕动泵(2-2)的运行速度为45-60转/每分钟,第三蠕动泵(2-3)的运行速度为10-15转/每分钟。

4. 根据权利要求3所述一种循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统,其特征在于,所述第一蠕动泵(2-1)的运行速度为10转/每分钟,第二蠕动泵(2-2)的运行速度为60转/每分钟,第三蠕动泵(2-3)的运行速度为10转/每分钟。

5. 根据权利要求1所述一种循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统,其特征在于,所述经错流过滤的50毫升离心管(3)用于盛放循环错流过滤的细胞悬液,经过滤后为循环肿瘤细胞,通过管路(14)和循环错流过滤芯片(7)进液端(4),进入循环错流过滤芯片(7)的出液端(8),其余的则从循环错流过滤芯片(7)的废液端(6)通过管路(15)进入经循环错流过滤的肿瘤细胞液容量瓶(5)。

6. 根据权利要求1所述一种循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统,其特征在于,所述循环错流过滤芯片(7)的两个侧面对称设置进液端(4)和出液端(8),在其底部中心部位设置废液端(6),在循环错流过滤芯片(7)的内部底面铺设滤膜(13),滤孔(16)的前端孔径为15-20微米,后端孔径为40-50微米。滤膜的大小与循环错流过滤芯片(7)的内部底面相同;所述循环错流过滤芯片(7)上盖的中间位置设有长为18毫米,宽为8毫米,高为0.5毫米的长方体凹陷,使液体进入后更为快速接触滤膜;所述循环错流过滤芯片(7)下盖设有长为20毫米,宽为8毫米,高为8毫米的四棱锥,使芯片液流快速过滤;图2所示,所述滤膜(12)为水滴形滤孔的滤膜,上小下大的设计。

7. 根据权利要求1所述一种循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统,其特征在于,所述待过滤肿瘤细胞液的液体体系由乙二胺四乙酸、牛血清白蛋白、酚红与泊洛沙姆组成。

8. 根据权利要求1所述一种循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统,其特征在于,所述乙二胺四乙酸浓度为200-300毫克/每升,牛血清白蛋白浓度为2000-3000毫克/每升,酚红浓度为5-10毫克/每升。

一种循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗设备,具体涉及一种用于循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统。

背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞是肿瘤细胞从实体肿瘤病灶中脱落,进入血液和淋巴系统中循环的一类细胞,是病人肿瘤复发以及转移的主要原因。在临床上监测循环肿瘤细胞可早于常规影像学检查手段预估肿瘤复发风险,而且与肿瘤组织取样相比循环肿瘤细胞的采样方法比较方便、快捷、创伤比较小且可以重复取样。但由于循环肿瘤细胞在血液中数量极少,每 10^8-10^9 个外周血细胞才有1个循环肿瘤细胞,目前较为成熟的富集方法可分为两类,一类基于循环肿瘤细胞表面分子标记物进行富集,例如:免疫磁珠富集法,另一类则基于循环肿瘤细胞的物理性质,例如:过滤法以及微流控芯片法。

[0003] 过滤法是通过循环肿瘤细胞的物理大小与其他细胞的不同来进行富集,减少肿瘤细胞的丢失,并且没有破坏它的形态,在很大程度上提高了方法的敏感性和特异性。

[0004] 微流控芯片法是在增加样品处理量的同时,还能提高富集罕见肿瘤细胞的能力,但是这种方法不仅设计困难,而且成本较高,富集细胞的纯度也不够高。

[0005] 错流过滤是一种切向流过滤,需要压力推动过滤的溶液经过滤膜的滤孔,由于推动的速度非常快,液体流速十分迅速,所以不会堵塞滤膜的滤孔。在错流过滤中,过滤液体进入芯片后,液体的运动方向平行于滤膜表面,这有利于增加水力湍流,从而减少细胞在滤膜中堆积。因此,基于错流过滤的优点,本发明开发了一种新型的富集效率更高的循环肿瘤细胞错流过滤系统。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题在于克服上述不足之处,研究设计高效富集效率错流过滤的方法以实现更好的富集循环肿瘤细胞的错流过滤系统。

[0007] 本发明提供一种循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统。

[0008] 本发明循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统是基于滤膜过滤以及微流控流体原理发明的一种新方法。错流过滤是水相流动平行于滤膜表面,在滤膜表面形成较大的压力,使细胞进入滤孔进行过滤筛选,从而达到高效富集的效果。

[0009] 本发明循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统包括待过滤肿瘤细胞液容量瓶1、三个蠕动泵:第一蠕动泵2-1、第二蠕动泵2-2、第三蠕动泵2-3、离心管3、过滤芯片7、经错流过滤的肿瘤细胞液容量瓶5,如图1所示

[0010] 所述第一蠕动泵2-1设置于待过滤肿瘤细胞液容量瓶1与离心管3间的管路13上;所述第二蠕动泵2-2设置于离心管3与过滤芯片进液端4之间的管路14上;所述第三蠕动泵2-3设置于过滤芯片废液端8与经循环错流过滤的肿瘤细胞液容量瓶5之间的管路15上,所述蠕动泵的作用是推进细胞液流的流动。

[0011] 所述第一蠕动泵2-1的运行速度为5-15转/每分钟,第二蠕动泵2-2的运行速度为

45-60转/每分钟,第三蠕动泵2-3的运行速度为10-15转/每分钟。当第一蠕动泵1的运行速度为10转/每分钟,第二蠕动泵2-2的运行速度为60转/每分钟,第三蠕动泵2-3的运行速度为10转/每分钟时,将循环肿瘤细胞从血液中错流过滤的效果最为理想。

[0012] 所述循环错流过滤的50毫升离心管3用于盛放循环错流过滤的细胞悬液,经过滤后为循环肿瘤细胞。通过管路14和循环错流过滤芯片进液端4,进入循环错流过滤芯片7的出液端8,其余的则从循环错流过滤芯片7的废液端6通过管路15进入经循环错流过滤的肿瘤细胞液容量瓶5。

[0013] 所述循环错流过滤芯片7的两个侧面对称设置进液端4和出液端8,在其底部中心部位设置废液端6。在循环错流过滤芯片7的内部底面铺设滤膜13,滤孔16的前端孔径为15-20微米大小,后端孔径为40-50微米。滤膜的大小与循环错流过滤芯片7的内部底面相同;所述循环错流过滤芯片7上盖的中间位置设有长为18毫米,宽为8毫米,高为0.5毫米的长方体凹陷,使液体进入后更为快速接触滤膜;所述循环错流过滤芯片7下盖设有长为20毫米,宽为8毫米,高为8毫米的四棱锥,使芯片液流快速过滤;如图2所示。所述滤膜12为水滴形滤孔的滤膜,上小下大的设计。

[0014] 本发明所述循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统的基本原理是通过利用蠕动泵将要过滤的物质在不同孔径的滤膜孔道中作高速运动后从滤孔中流出,然后进行不停的循环洗脱从而达到最为理想的富集效果。

[0015] 本发明的循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统在肿瘤细胞液循环中分为两端出液,一端为出液端6,一端为废液端8,因此使一定量的液体减少,所以在循环过程中进行同等速度的补充液体,使整个体系更为合理化,实现一个理想的循环错流过滤。

[0016] 本发明循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统,滤膜12的设计较平常设计有所不同。相比较平常的圆孔设计未能达到理想的流体效果,本发明采用水滴形的滤孔。肿瘤细胞由小孔进入,经由液体流动,从大孔流出,如未能经过滤膜过滤的细胞则从滤孔中流入废液处。由此来达到错流过滤的效果。

[0017] 因此,当循环肿瘤细胞不停从进液端4进入,在滤膜12中过滤后从出液端6流出,肿瘤细胞随着第三蠕动泵2-3的运行,肿瘤细胞随着液流弹性形变进入上端为4-6微米大小,下端为8-10微米大小的滤孔,随后对于直径在7-20微米的细胞会由于无法从滤孔的方向流出,直接从滤膜12的下方流出,而对于直径在15-50微米的肿瘤细胞则会从滤孔中的大孔流出。该过滤方法不同于平常垂直过滤。液流方向为横向流动,使肿瘤细胞平行进入芯片7,实现高效过滤的效果。

[0018] 本发明循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统的芯片7的设计是基于伯努利原理。如果管内作稳定流动的理想流体具有压力能、势能和动能三种形式的能量,在任一截面上这三种能量可以互相转换。当液流从芯片7进液端4进入,液流快速地接触滤膜,随后液体覆盖整个滤膜13表面,进行过滤后从出液端6流出。而废液端8的设计带有一定的重力作用,同时外部添加蠕动泵2-3来促使废液流出。废液端8出液以及出液端6出液随着蠕动泵2-2的运行,选取了最为合适的运行速度比例为废液端8出液与出液端6的出液比例为1:6,使各端口的出液速度最为合理更加有效的进行洗脱。

[0019] 本发明循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统,所述待过滤肿瘤细胞液的液体体系采用让细胞能够高压流动的体系,由乙二胺四乙酸、牛血清白蛋白、酚红与磷酸缓冲盐溶液

组成。所述乙二胺四乙酸浓度为200-300毫克、每升,牛血清白蛋白浓度为2000-3000毫克每升,酚红浓度为5-10毫克/每升。

[0020] 所述乙二胺四乙酸可以破坏细胞的桥粒结构,使细胞能够分散成单个细胞,破坏细胞间的粘连。牛血清白蛋白生理、载体、机械保护、中和毒性物质和维持渗透压恒定等作用,也可为细胞生长提供营养物质。酚红能够对于液体的酸碱进行指示,同时使细胞在最为合适的7.6pH值下的液体流动。磷酸缓冲盐溶液一般作为溶剂,起溶解保护试剂的作用。

[0021] 本发明循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统,因液体的流动平行于滤膜表面,同时在液流的带动下细胞能够进入滤膜进行过滤筛选,细胞进入滤孔后能够保持完整,不影响细胞活性,在细胞过滤后,筛选出非循环肿瘤细胞能够随着液流从废液端8流出,而循环肿瘤细胞能够从出液端6流出,同时整体筛选完成后,细胞不会在滤膜管路内残留。本发明循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统达到了高效富集细胞的效果。本发明样品处理简单,样品回收率高,操作简单,使用方便,利于推广,有较好的临床应用前景和较大的社会效益。

附图说明

[0022] 图1本发明循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统示意图

[0023] 1.待过滤细胞液容量瓶1

[0024] 2-1.第一蠕动泵

[0025] 2-2.第二蠕动泵

[0026] 2-3.第三蠕动泵

[0027] 3.离心管

[0028] 4.过滤芯片进液端

[0029] 5.经错流过滤的细胞液容量瓶

[0030] 6.过滤芯片废液端

[0031] 7.过滤芯片

[0032] 8.过滤芯片出液端

[0033] 13.待过滤细胞液容量瓶1与50毫升离心管3间的管路

[0034] 14.离心管3与芯片进液端4之间的管路

[0035] 15.废液端8与经错流过滤的细胞液容量瓶5之间的管路

[0036] 图2本发明循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统芯片结构示意图

[0037] 左上图:9.过滤芯片上盖

[0038] 左下图:10.过滤芯片下盖

[0039] 11.过滤芯片下盖不对称结构

[0040] 右图:12.滤膜

[0041] 16.滤膜滤孔

具体实施方式

[0042] 实施例所用原料与试剂除有另外说明外,可以通过市售得到。

[0043] 实施例1:

[0044] 图1所示,本发明循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统包括待过滤细胞液500毫升容

量瓶1、三个蠕动泵：第一蠕动泵2-1、第二蠕动泵2-2、第三蠕动泵2-3、50毫升离心管3、过滤芯片7、经循环错流过滤的细胞液500毫升容量瓶5，

[0045] 所述第一蠕动泵2-1设置于待过滤细胞液500毫升容量瓶1与50毫升离心管3间的管路(13)上；所述第二蠕动泵2-2设置于50毫升离心管3与过滤芯片7的芯片进液端4之间的管路(14)上；所述第三蠕动泵2-3设置于过滤芯片7的废液端8与经循环错流过滤的细胞液500毫升容量瓶5之间的管路(15)上。

[0046] 所述第一蠕动泵2-1的运行速度为5-15转/每分钟，第二蠕动泵2-2的运行速度为45-60转/每分钟，第三蠕动泵2-3的运行速度为10-15转/每分钟。当第一蠕动泵2-1的运行速度为10转/每分钟，第二蠕动泵2-2的运行速度为60转/每分钟，第三蠕动泵2-3的运行速度为10转/每分钟时，将循环肿瘤细胞从血液中错流过滤的效果最为理想。

[0047] 所述循环错流过滤的50毫升离心管3用于盛放循环错流过滤的细胞悬液，经过滤后为循环肿瘤细胞。通过管路14和循环错流过滤芯片7进液端4，进入循环错流过滤芯片7的出液端8，其余的则从循环错流过滤芯片7的废液端6通过管路15进入经错流过滤后的500ml容量瓶5。

[0048] 所述循环错流过滤芯片7的两个侧面对称设置进液端4和出液端8，在其底部中心部位设置废液端6。在循环错流过滤芯片7的内部地面铺设滤膜12。

[0049] 本发明的循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统在肿瘤细胞液循环中分为两端出液，一端为出液端6，一端为废液端8，因此使一定量的液体减少，所以在循环过程中进行同等速度的补充液体，使整个体系更为合理化，实现一个理想的循环错流过滤。

[0050] 所述循环错流过滤芯片7的两个侧面对称设置进液端4和出液端8，在其底部中心部位设置废液端6。在循环错流过滤芯片7的内部底面铺设滤膜13，滤孔16的前端孔径为15-20微米大小，后端孔径为40-50微米。滤膜的大小与循环错流过滤芯片7的内部底面相同；所述循环错流过滤芯片7上盖的中间位置设有长为18毫米，宽为8毫米，高为0.5毫米的长方体凹陷，使液体进入后更为快速接触滤膜；所述循环错流过滤芯片7下盖设有长为20毫米，宽为8毫米，高为8毫米的四棱锥，使芯片7液流快速过滤；如图2所示。所述滤膜12为水滴形滤孔的滤膜，上小下大的设计。

[0051] 所述滤膜12的设计较平常设计有所不同。相比较平常的圆孔设计未能达到理想的流体效果，本发明采用水滴形的滤孔。肿瘤细胞由小孔进入，经由液体流动，从大孔流出，如未能经过滤膜过滤的细胞则从滤孔中流入废液处。由此来达到错流过滤的效果。

[0052] 因此，当循环肿瘤细胞不停从进液端4进入，在滤膜12中过滤后从出液端6流出，肿瘤细胞随着第三蠕动泵2-3的运行，肿瘤细胞随着液流弹性形变进入上端为4-6微米大小，下端为8-10微米大小的滤孔，随后对于直径在7-20微米的细胞会由于无法从滤孔的方向流出，直接从滤膜12的下方流出，而对于直径在15-50微米的肿瘤细胞则会从滤孔中的大孔流出。该过滤方法不同于平常垂直过滤。液流方向为横向流动，使肿瘤细胞平行进入芯片7，实现高效过滤的效果。

[0053] 本发明循环肿瘤细胞富集的错流过滤系统的芯片7的设计是基于伯努利原理。如果管内作稳定流动的理想流体具有压力能、势能和动能三种形式的能量，在任一截面上这三种能量可以互相转换。当液流从芯片7进液端4进入，液流快速地接触滤膜，随后液体覆盖整个滤膜13表面，进行过滤后从出液端6流出。而废液端8的设计带有一定的重力作用，同时

外部添加蠕动泵2-3来促使废液流出。废液端8出液以及出液端6出液随着蠕动泵2-2的运行,选取了最为合适的运行速度比例为废液端8出液与出液端6的出液比例为1:6,使各端口的出液速度最为合理更加有效的进行洗脱。

[0054] 本实施例中所述待过滤肿瘤细胞液的液体体系采用的循环错流过滤缓冲液为含有乙二胺四乙酸、牛血清白蛋白和酚红的磷酸缓冲盐溶液。配置一升循环错流过滤缓冲液,需要再900毫升的磷酸盐缓冲液中加入250毫克乙二胺四乙酸,2500毫克牛血清白蛋白和6毫克酚红,最后用磷酸盐缓冲液定容到一升。

[0055] 使用时,本发明循环肿瘤富集的细胞错流过滤系统富集循环肿瘤细胞,包括如下步骤:

[0056] 从某医院肺癌病人体内抽取外周血约为7.5毫升,装于EDTA抗凝采血管中。将含抗凝的血液利用离心机1600重力加速度,离心10分钟后从取出。用移液枪吸走上层血浆,剩余为细胞沉淀,加入35毫升红细胞裂解液,将细胞沉底以及红细胞裂解液颠倒混匀10分钟。随后1500转每分钟,离心10分钟,去除上清,剩余为未经循环错流过滤的白细胞以及循环肿瘤细胞沉淀。使用10毫升错流过滤缓冲液重悬上述沉淀,制备得到用于错流过滤分析的细胞悬液。

[0057] 随后用上述发明方法将得到的细胞悬液放入待过滤细胞液500毫升容量瓶1按上述方法进行循环错流过滤得出如下表一的细胞。用Countess II Automated Cell Counter进行细胞计数得出细胞数目。另外利用免疫荧光染色方法标记细胞核以及循环肿瘤细胞,利用荧光成像系统进行成像,得出循环肿瘤细胞数目。

[0058] 实施例1的结果以及与现有技术的微流控芯片富集相比较见表一。

[0059] 表一

[0060]

使用方法	微流控芯片	实施例 1 错流过滤
细胞富集前数目	3×10^7	3×10^7
细胞富集后数目	1×10^6	1×10^5
循环肿瘤细胞数目	60	27
循环肿瘤细胞占比	0.006%	0.027%

[0061] 由表一可见,本发明相较于微流控芯片富集出来的细胞数目较少,但所含循环肿瘤细胞比例高于微流控芯片,且微流控芯片的总体试验运行时间为2小时,而错流过滤的时间约为1小时,操作也更为简单,所使用的时间也较少。

[0062] 实施例2:

[0063] 用从中科院生化细胞所干细胞库购买的胰腺癌细胞株Panc-1

[0064] 同实施例1操作。

[0065] 将实施例2与微流控芯片过滤进行对比,包括如下步骤:

[0066] 将胰腺癌细胞株Panc-1从T25细胞培养瓶中用胰酶消化下来,胰腺癌细胞株从贴壁状态变成悬浮状态,随后1500转每分钟离心10分钟,细胞沉淀于下方,去除上清。用上述发明方法进行循环错流过滤。与离心富集的方法进行比较。

		回收效率	样品处理时间
[0067]	微流控芯片离心富集	50%±10%	≦1 小时
	实施例 2 错流过滤	80%±10%	≦40 分钟

[0068] 由表可知,本错流过滤发明在样品回收效率上远高于离心富集,同时样品处理时间大大减少,更节省时间成本。

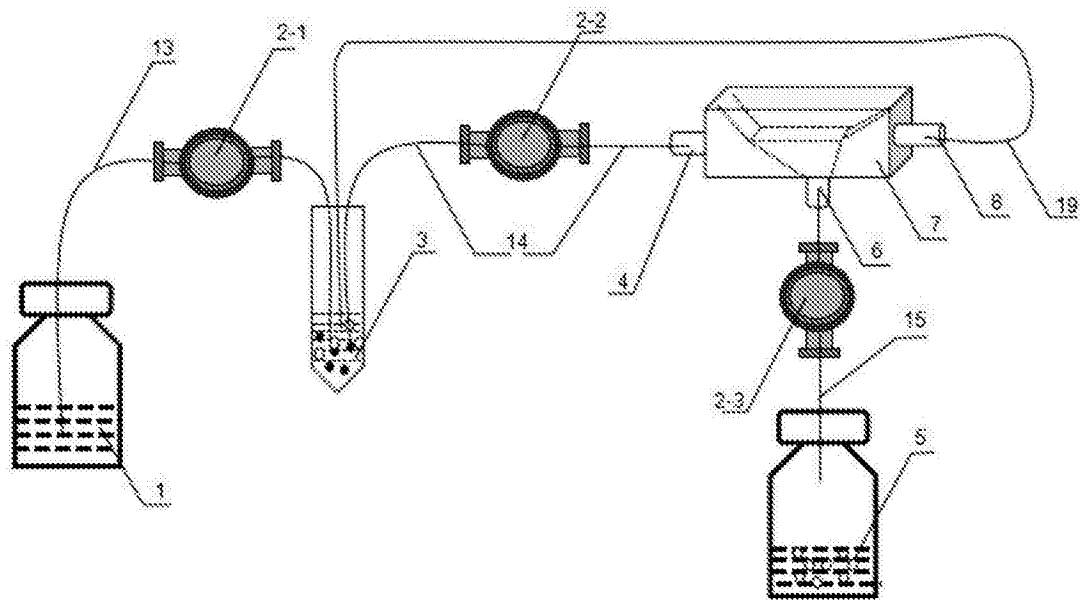


图1

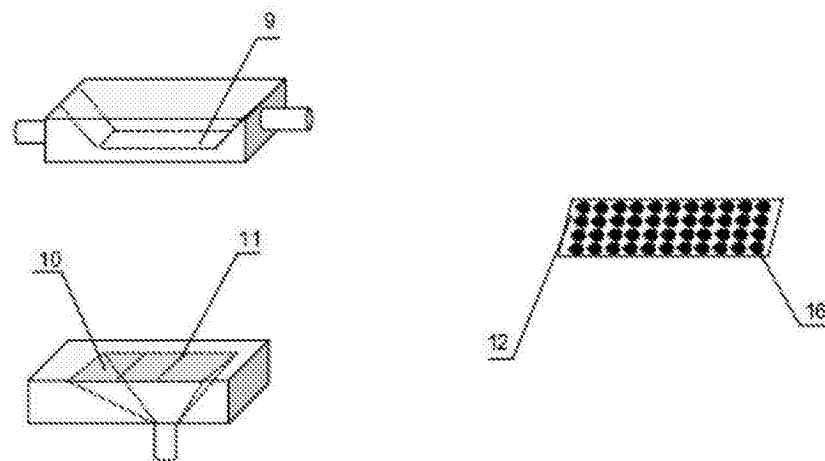


图2