(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107287107 A
(43)申请公布日 2017.10.24

(21)申请号 201610190332.X

(22)申请日 2016.03.30

(71)申请人 无锡纳奥生物医药有限公司
地址 214000 江苏省无锡市滨湖区马山梅梁西路88号

(72)发明人 亓立峰

(74)专利代理机构 杭州千克知识产权代理有限公司 33246
代理人 赵芳 冷红梅

(51)Int.Cl.
C12M 1/36(2006.01)
C12M 1/02(2006.01)
C12M 1/00(2006.01)
C12N 5/09(2010.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种循环肿瘤细胞分离设备、系统及方法

(57)摘要

本发明属于生物及医学检测领域，涉及一种将血液样品中的循环肿瘤细胞从混合细胞群体中高纯度分离出来的设备、系统和方法。所述循环肿瘤细胞分离的设备和系统，包括但不限于控制模组、进样模组，分离模组、和收集模组。所述控制模组用于设定设备运行参数，包括稀释液体积、反应时间、进样速度、清洗参数等，所述进样模组采用多路阀模块和蠕动泵模块用于将检测样品自动稀释并启动样品多通道同步分离，所述分离模组包括磁铁模块和分离器模块，磁铁模块用于分离吸附免疫标记磁微粒标记的血液白细胞，细胞分离器模块用于从多细胞群体中富集分离CTC，收集模组用于收集经分离的循环肿瘤细胞悬液。本发明提供了一种循环肿瘤细胞分离设备和系统，以及用于分离鉴定循环肿瘤细胞的方法。

CN 107287107 A

1.一种循环肿瘤细胞自动化分离设备，由进样装置、分离装置、收集装置和控制装置组成，其特征在于：所述进样装置由多个由蠕动泵控制的进样针和搅拌棒组成，所述分离装置由磁铁模块和分离器模块组成，所述分离器模块由多个单通道微流控芯片组成，所述微流控芯片为螺旋形通道，通道宽度为100~1000微米，高度为50~200微米，长度为10~100厘米，所述微流控芯片设置有1个进样口和2~3个出样口，进样口与进样装置的进样针连通，出样口分别与循环肿瘤细胞管道和细胞废液管道连通；所述收集装置通过循环肿瘤细胞管道与分离装置连通；所述控制装置为计算机或单片机，设置有控制屏和控制板。

2.如权利要求1所述的设备，其特征在于所述微流控芯片由上层 PDMS、PMMA聚合物芯片和下层的玻片或者硅片载体封接而成，或者由PC材质塑料注塑而成。

3.如权利要求2所述的微流控芯片，其特征在于芯片通道内侧由两亲性聚合物(如PEG-PCL,PCL-PEG,PCL-PLA-PEG, PMAL等)通过疏水作用涂层修饰。

4.一种循环肿瘤细胞分离方法，所述方法包括：

待测血液样品经抗凝处理或红细胞裂解处理后，加入样品管中与抗CD45免疫磁微粒预孵育，得到细胞悬液；

样品管细胞悬液中加入稀释液，搅拌混合15~20分钟后，启动磁铁模块将磁微粒吸附到样品管壁，抽取样品管中的样本液以0.5~5 ml/min流速进入单通道微流控芯片中进行分离；所述微流控芯片为螺旋形通道，通道宽度为100~1000微米，高度为50~200微米，长度为10~100厘米；

于单通道微流控芯片出样口获得循环肿瘤细胞细胞悬液。

5. 如权利要求1所述的方法，其特征在于所述步骤(1)为：待测血液样品经红细胞裂解处理后，1500rpm离心去除裂解红细胞，重新分散于50ml样品管中，每样品管内加有5ml含有0.1~1%BSA、1~5 mM EDTA的PBS，pH7.5，同时每管加入100 ~500μl 1 mg/ml免疫磁微粒。

一种循环肿瘤细胞分离设备、系统及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种循环肿瘤细胞分离设备、系统及方法。

背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞(CTC)是从原生癌细胞组织上脱落下来进入人体外周血液及组织中的循环癌细胞,CTC对于癌症的早期诊断、治疗效果的评估有极其重要的意义。由于CTC数量极其稀少,每 10mL 血液可能仅含几个到几十个循环肿瘤细胞,却有高达约 1 亿个白细胞和500亿个红细胞(ZheXN,CherML,BonfilRD,Am.J.Cancer Res.2011,1,740-751),在数量巨大的背景细胞的干扰下无法对循环肿瘤细胞直接检测,这种检测包括基因突变、表面标志物、细胞活性、分泌蛋白谱以及力学性质等,所以将CTC从外周血中分离出来成为循环肿瘤细胞检测前的必须的步骤。在过去的几十年间,人们开发了很多种用以捕获癌细胞的技术,如荧光免疫法、磁性免疫法等。然而,这些技术所需的仪器昂贵,操作方法复杂,推广难度大。因此,开发高通量、快速分离、操作简单的CTC捕获仪器是非常有意义的。

[0003] 目前从人外周血中分离CTC的方法主要可分为两类,这两类方法同时也代表了从复杂生物学样品中分离稀有细胞的主要策略。一类方法是基于CTC与血液中其他细胞物理性质的差异,如密度、大小、软硬程度等的不同实现CTC与其他细胞的分离,比如通过8微米孔径的过滤网进行过滤去除小于8微米尺寸的白细胞,但是此类方法具有较高杂细胞背景,同时获取的肿瘤细胞由于需要重新洗脱导致难以存活并进行后续实验;另一类方法主要基于CTC与血液中其他细胞表面标志物的差异,基于循环肿瘤细胞表面的特异性抗原,通过固定在基底表面或磁性颗粒上的针对循环肿瘤细胞表面特异性抗原的抗体或核算适配体实现循环肿瘤细胞的特异性捕获并与血液中其他细胞实现分离。CellSearch系统对循环肿瘤细胞的分离就是基于这种方法。此类技术缺陷在于只能捕获上皮来源肿瘤细胞,具有较高假阴性,漏检其他不同来源肿瘤细胞,入间质来源、干细胞来源等肿瘤细胞。

[0004] 近年来通过将微流控技术与抗体/适配体捕获相结合发展出了一系列的循环肿瘤细胞芯片捕获技术,可以保持 CTC 的活性,为了提高其微通道的捕获效率,目前的研究重点均集中在微通道表面的形状上,如微柱阵列芯片(N.Engl. J.Med.2008,359,366-377)、表面具有周期性凹凸结构“鱼骨型”芯片(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2010,107,18392-18397)等。但是,此类技术和系统均存在以下缺陷:

1)捕获的CTC纯度较低,存在非特异性吸附,容易出现假阳性。

[0005] 2)捕获的肿瘤细胞被固定于芯片表面,无法释放进行后续的检测。

发明内容

[0006] 本发明目的是提供一种能够解决以上问题的循环肿瘤细胞(CTC)捕获设备和方法。

[0007] 一种循环肿瘤细胞分离设备,由进样装置、分离装置、收集装置和控制装置组成,所述进样装置由多个由蠕动泵控制的进样针和搅拌棒组成,用于将检测样品自动稀释并启

动样品多通道同步分离，所述分离装置由磁铁模块(用于分离吸附免疫标记磁微粒标记的血液白细胞)和分离器模块(用于从多细胞群体中富集分离CTC)组成，所述分离器模块由多个单通道微流控芯片组成，所述微流控芯片为螺旋形通道，通道宽度为100~1000微米，高度为50~200微米，长度为10~100厘米，所述微流控芯片设置有1个进样口和2~3个出样口，进样口用于将去除白细胞后的细胞样品导入微流控芯片，出样口用于将经分离后的循环肿瘤细胞和细胞废液分别导入收集管道和废液管道，进样口与进样装置的进样针连通，出样口分别与循环肿瘤细胞管道和细胞废液管道连通；所述收集装置(用于收集经分离的循环肿瘤细胞悬液)通过循环肿瘤细胞管道与分离装置连通；所述控制装置为计算机或单片机，设置有控制屏和控制板，用于设置设备运行参数，包括稀释液体积、反应时间、进样速度、清洗参数等。

[0008] 具体的，所述微流控芯片由上层 PDMS或PMMA聚合物芯片和下层的玻片或者硅片载体进行封接而成，或者采用PC塑料注塑而成。微流控芯片由芯片通道内侧由两亲性聚合物(如PEG-PCL，PCL-PEG，PCL-PLA-PEG)通过疏水作用涂层修饰。

[0009] 该设备属于自动化进样、高效分离富集CTC系统，所述的设备和系统能够一次性处理多个外周血样品同步分离，样品处理体积可达到20ml，经分离后细胞体积在1ml左右，能够直接用于细胞培养、基因提取等后续实验。解决了循环肿瘤细胞捕获非特异性和无法富集捕获的循环肿瘤细胞等技术瓶颈，本CTC分离设备和系统对CTC富集回收效率大于90%，对白细胞去除效率大于99.99%以上。

[0010] 本发明还涉及一种循环肿瘤细胞分离方法，所述方法包括：

(1)待测血液样品经抗凝处理或红细胞裂解处理后，加入样品管中与抗CD45抗体标记的免疫磁微粒预孵育，得到细胞悬液；

(2)样品管细胞悬液中加入稀释液，搅拌混合15~20分钟后，启动磁铁模块将磁微粒吸附到样品管壁，抽取样品管中的样本液以0.5~5 ml/min流速进入单通道微流控芯片中进行分离；所述微流控芯片为螺旋形通道，通道宽度为100~1000微米，高度为50~200微米，长度为10~100厘米；

(3) 于单通道微流控芯片出样口获得循环肿瘤细胞细胞悬液。

[0011] 具体的，所述步骤(1)为：待测血液样品经红细胞裂解处理后，1500rpm离心去除裂解红细胞，重新分散于50ml样品管中，每样品管内加有5ml含有0.5%BSA、2mM EDTA的PBS，pH7.5，同时每管加入100μl1mg/ml免疫磁微粒。

[0012] 本发明主要是通过免疫磁微粒去除部分外周血中白细胞背景，通过非标记微流控芯片通道无创分离富集CTC。通过免疫磁微粒对白细胞去除和微流控芯片物理分离实现CTC高纯度无创分离，完整保持了CTC活性。如附图2所示，本发明所公开的循环肿瘤细胞分离仪工作原理为：稀释液通过蠕动泵吸入到已加有临床样品和抗CD45磁珠免疫磁微粒试剂的样品管中，自动搅拌混匀，室温反应15min，启动加磁，在磁场作用下吸附被免疫磁微粒结合的白细胞，吸附10min后，在保持磁场作用下，将样品管中液体导入细胞分离器，经过分离器内在孔道分离作用，将目的循环肿瘤细胞分离，进入样品管A、B，其余非循环肿瘤细胞则进入废液通道。

[0013] 本发明研发了能够通过非抗体依赖物理分离CTC的微流控芯片系统，与现有微流控系统相比，具有无需抗体标记、不损伤肿瘤细胞的独特优势。本发明综合纳米磁微粒去除

白细胞技术和微流控芯片分离技术，能够显著提高所分离CTC细胞纯度。

[0014] 本发明提供的技术方案与现有技术相比，具有以下的优点和特点：

1)非抗体依赖，CTC分离纯度高。有效解决现有技术对循环肿瘤细胞分离非特异性。通过免疫磁微粒去除白细胞，结合微流控芯片物理分离肿瘤细胞。与现有Cell Search捕获系统仅局限捕获上皮来源肿瘤细胞相比，提高了CTC捕获范围，同时大大提高CTC纯度。

[0015] 2)无创分离，保持CTC活性，由于采用微流控物理分离方式，实现了对CTC高效富集，所获得的CTC细胞悬液不需固定于芯片或磁柱上，无需经过二次洗脱，有效保持了CTC活性。可用于CTC后续基因检测、细胞培养、药敏实验等。

[0016] 3)系统操作简单，高通量进样，自动化成都高。

[0017] 4)成本更低，本设备和系统技术方案成本更低，结合后续细胞形态染色，更易于基层医疗体系市场推广。

附图说明

[0018] 图1为本发明所述循环肿瘤细胞分离设备结构示意图。

[0019] 图2为本发明所述的循环肿瘤细胞分离系统工作原理图。图中清洗A液为外周血样品稀释液，清洗B液为设备保养液，主要为次氯酸钠成分。

[0020] 图3为分离出的肺癌CTC细胞形态图；

图4为胰腺癌CTC荧光图像图；

图5为分离出的乳腺癌CTC细胞形态图。

具体实施方式

[0021] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述，但本发明的保护范围并不仅限于此：

实施例1：

如图1所示，本发明提供的循环肿瘤细胞捕获设备包括控制模块(1:控制屏，7:控制板)、进样模块(2:进样针及搅拌棒)、分离模块(5:加磁器，3:分离器)、收集模块(4:样品收集架)。

[0022] 所述分离器由多个单通道微流控芯片组成，所述微流控芯片由上层 PDMS聚合物芯片和下层的硅片载体可逆封接而成，为螺旋形通道，通道宽度为600微米，高度为100微米，长度为50厘米，微流控芯片内壁涂布两亲性聚合物PEG-PCL，所述微流控芯片设置有1个进样口(和进样针连通)和2个出样口(循环肿瘤细胞出样口和废液出样口)，去除白细胞后的细胞样品由进样口进入微流控芯片，分离后的循环细胞悬液由循环细胞出样口经收集管道输送至收集架的样品出口流出，由样品收集管收集。

[0023] 为了说明本系统与现有其它循环肿瘤细胞分离系统性能差异。分别将$1x10^3$个人工培养的eGFP表达的肿瘤细胞MGC803各分散于健康人全血样本2ml，分别通过本专利公开的NextctcCTC捕获仪和Cell search捕获系统进行CTC分离。荧光显微镜观察计数分离后的细胞悬液中MGC803数量，计算捕获率。Nextctc捕获率为81％，大于Cell Search捕获率60％。

[0024] 为了说明本设备和系统分离循环肿瘤细胞工作过程，本发明选择肺癌确诊患者13

人，经伦理批准和患者知情同意后，每人抽取外周血3ml，置入EDTA抗凝管中。

[0025] 循环肿瘤细胞分离过程：

1)、样品准备：经红细胞裂解处理后，1500rpm离心后，去除裂解红细胞，重新分散于加有5ml含有0.5%BSA、2mM EDTA的PBS中(pH7.5)的50ml离心管(样品管)中，同时加入100μl1mg/ml的抗CD45抗体标记的免疫磁微粒(其中CD45抗体购自Abcam公司，磁珠为自制1mM羧基化水溶性溶液)。

[0026] 2)将样品管置入设备Nextctc样品架上，仪器开始运行程序1分钟，控制屏提示输入病人信息，设置运行参数后，点击开始。仪器注入稀释液，搅拌电机运行，稳定10分钟，磁铁推送电机运行，将磁珠吸附到样品管管壁，蠕动泵抽取样本以3 ml/min流速经分离器流入样品收集架上的样品收集管。

[0027] 3)捕获CTC的鉴定。将样品收集管收集的CTC细胞悬液，经Gimsa-Wright染色处理，显微镜拍照，鉴定肿瘤细胞形态。同时采用荧光标记的抗PanCK抗体、抗CD45抗体以及DAPI染色，计数CK阳性、CD45阴性的CTC数量。

[0028] 表1:13例分离的临床肺癌患者外周血样本中捕获的CTC数量统计表

对应编号	临床样本编号	CTC数量
1	1290116367	18
2	1290116169	55
3	1290113745	19
4	1290115989	17
5	1290113893	8
6	129081107H	15
7	129062040H	18
8	129085516H	3
9	129063465H	1
10	129085489H	10
11	129084389H	＞100
12	129084767H	23
13	129085414H	21

图3为分离出的肺癌CTC细胞形态图，结果显示CTC细胞形态完整，细胞核，细胞膜界线清楚。细胞直径尺寸约15微米，明显大于周围尺寸小的中性粒细胞和白细胞。表明，本发明公开的设备和方法能够高效富集循环肿瘤细胞。

[0029] 实施例2:

选择胰腺癌确诊患者5人，经伦理批准和患者知情同意后，每人抽取外周血7.5 ml，置入EDTA抗凝管中。

[0030] 循环肿瘤细胞分离过程：

1)、样品准备：经红细胞裂解处理后，1700rpm离心后，去除裂解红细胞，重新分散于加有5ml含有0.5%BSA、2mM EDTA的PBS中(pH7.5)的50ml离心管(样品管)中，同时加入50ul1mg/ml免疫磁微粒。

[0031] 2)将样品管置入设备Nextctc样品架上，仪器开始运行程序1分钟，控制屏提示输

入病人信息，设置运行参数后，点击开始。仪器注入稀释液，搅拌电机运行，稳定15分钟，磁铁推送电机运行，将磁珠吸附到样品管管壁，蠕动泵抽取样本以2 ml/min流速经分离器流入样品收集架上的样品收集管。

[0032] 3)捕获CTC的鉴定。将样品收集管收集的CTC细胞悬液，经Gimsa-Wright染色处理，显微镜拍照，鉴定肿瘤细胞形态。同时采用荧光标记的抗PanCK抗体、抗CD45抗体以及DAPI染色，计数CK阳性、CD45阴性的CTC数量。

[0033] 图4为胰腺癌CTC荧光图像图，结果显示CK阳性CD45阴性的细胞为循环肿瘤细胞(CTC)，DAPI阳性表明具有完整细胞核形态。表明本发明设备能够有效分离胰腺癌CTC。

[0034] 实施例3:

选择乳腺癌确诊患者5人，经伦理批准和患者知情同意后，每人抽取外周血5ml，置入EDTA抗凝管中。

[0035] 循环肿瘤细胞分离过程：

1)、样品准备:经红细胞裂解处理后，1800rpm离心后，去除裂解红细胞，重新分散于加有5ml含有0.5%BSA、2mM EDTA的PBS中(pH7.5)的50ml离心管(样品管)中，同时加入80ul 1mg/ml免疫磁微粒。

[0036] 2)将样品管置入设备Nextctc样品架上，仪器开始运行程序1分钟，控制屏提示输入病人信息，设置运行参数后，点击开始。仪器注入稀释液，搅拌电机运行，稳定15分钟，磁铁推送电机运行，将磁珠吸附到样品管管壁，蠕动泵抽取样本以2.5 ml/min流速经分离器流入样品收集架上的样品收集管。

[0037] 3)捕获CTC的鉴定。将样品收集管收集的CTC细胞悬液，经Gimsa-Wright染色处理，显微镜拍照，鉴定肿瘤细胞形态。同时采用荧光标记的抗PanCK抗体、抗CD45抗体以及DAPI染色，计数CK阳性、CD45阴性的CTC数量。

[0038] 图5为分离出的乳腺癌CTC细胞形态图，结果显示所分离出的乳腺癌CTC细胞形态明显区分于白细胞，细胞尺寸明显大于白细胞，CTC具有清晰的细胞形态结构。该乳腺癌患者处于临床一期阶段，表明本发明设备、系统和方法能够有效实现肿瘤早期阶段的鉴定和CTC分离。

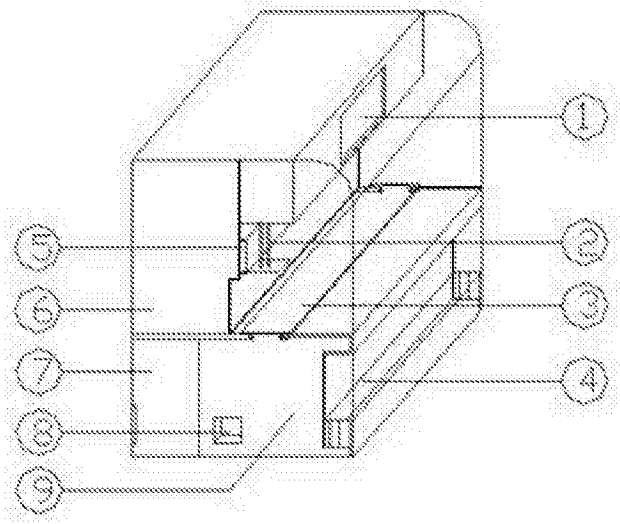


图1

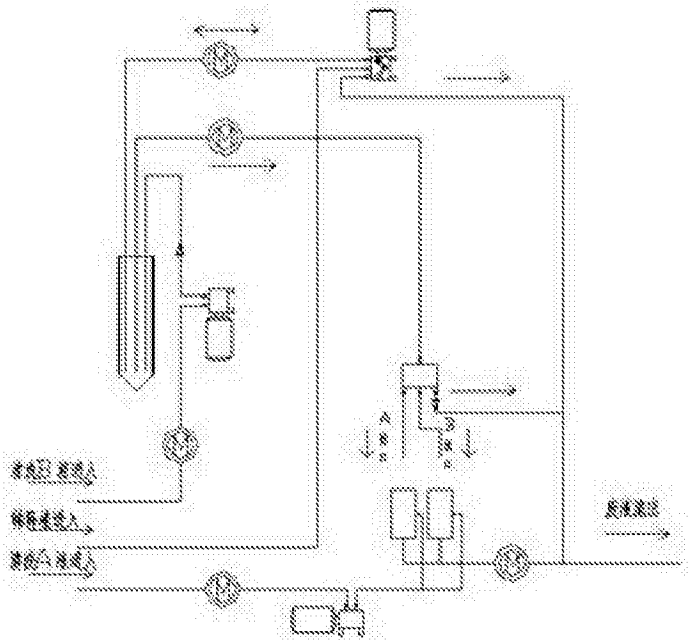


图2

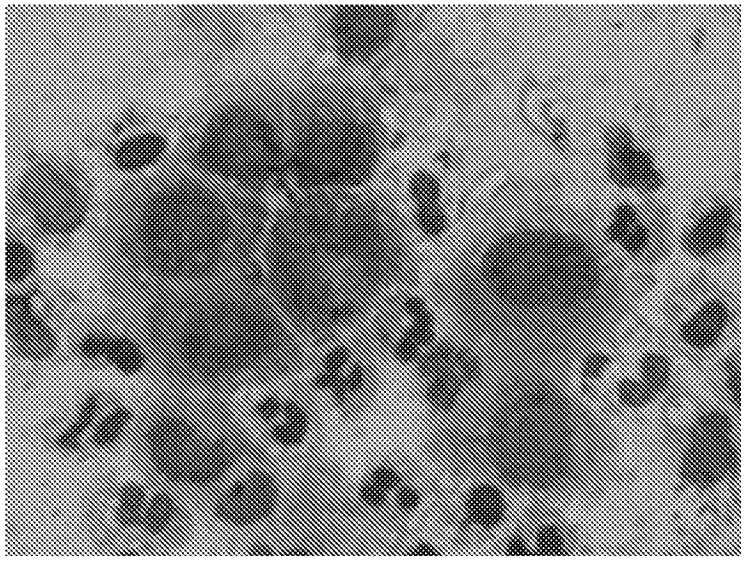


图3

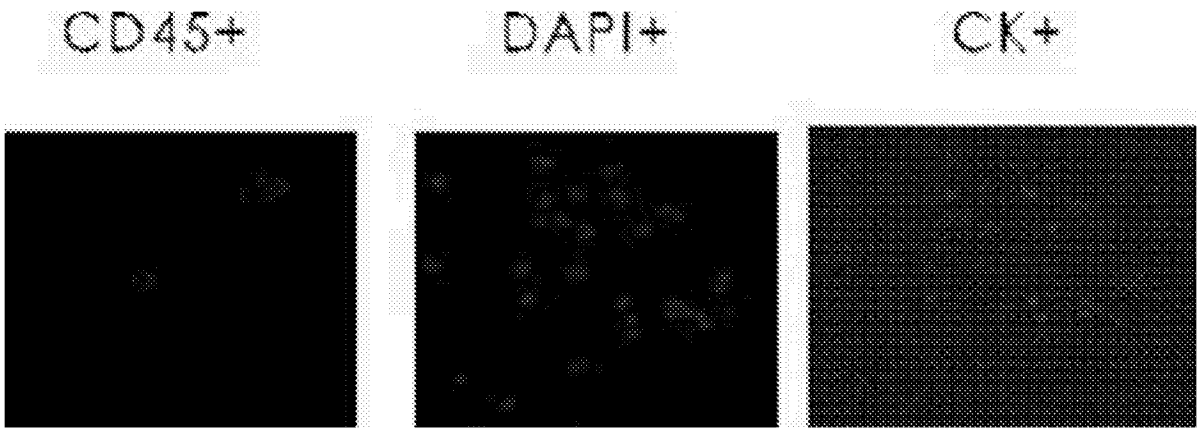


图4

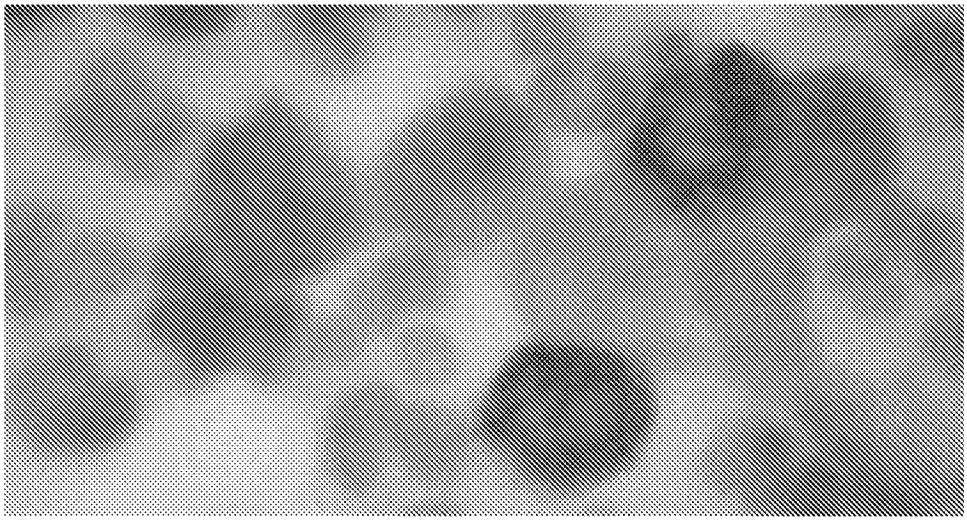


图5