

# 全自动检测和分选全血中白细胞的 微流控芯片装置研究

宋振玉<sup>1</sup> 张晓娟<sup>2</sup> 宋永欣<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>青岛胶州中心医院放疗科, 青岛 266300; <sup>2</sup>青岛胶州第三人民医院, 青岛 266300; <sup>3</sup>大连海事大学, 大连 116026)

**摘要** 在生物学和医学研究中从全血中分离和纯化白细胞有着广泛的需求。该文报道了一种可全自动、连续从全血中检测和分离白细胞的微流控芯片装置。样品中的每个细胞流经微通道中的阻抗脉冲检测区时, 均会产生一个电阻脉冲信号(resistive pulse sensing, RPS)并且其幅值大小表示细胞的粒径大小。当白细胞通过检测区时, 会产生幅值较大的信号, Labview程序对采集到的RPS信号进行分析、处理并自动触发电动分选过程, 从而将白细胞分至目标通道, 而全血中的红细胞则流至废液池。该微流控芯片装置具有系统简单、全自动操作和目标细胞无标记等特点, 有望发展成为便携式白细胞分选装置。

**关键词** 微流控芯片; 细胞分选; 阻抗脉冲

## Automatic Detecting and Sorting White Blood Cells from the Whole Blood Sample via a Microfluidic Chip Device

Song Zhenyu<sup>1</sup>, Zhang Xiaojuan<sup>2</sup>, Song Yongxin<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Radiotherapy, Jiaozhou Central Hospital of Qingdao, Qiangdao 266300, China;

<sup>2</sup>The Third People's Hospital of Jiaozhou, Qiangdao 266300, China; <sup>3</sup>Dalian Maritime University, Dalian 116026, China)

**Abstract** There is increasing demand on the white blood cells sorted from the whole blood sample in the biological and medical researches. We reports a microfluidic lab on chip device by which the white blood cells can be automatically and continually detected and sorted from the whole blood cells. While each cell of the sample solution passes through the resistive pulse sensing gate, a resistive signal pulse is generated. The magnitude of the signal represents the size of the cell. For the white blood cell which is larger in volume, a signal with larger magnitude is generated. The Labview program acquires the RPS signals and triggers the cell sorting process once a white blood cell is detected, thus sorting the white blood cell into the target channel. For the red blood cells, they are transported to the waste reservoir. The device described here is simple, automatic and label-free. It has the potential to become a portable device for white blood cell sorting.

**Keywords** microfluidic chip; cell sorting; resistive pulse sensing

在生物学和医学领域中, 全血中分离出某种特定的细胞(如白细胞)具有广泛的应用价值。例如, 骨髓移植患者巨细胞病毒感染的早期诊断以及白血

病免疫分型的诊断等, 均需要从全血中纯化白细胞。此外, 白细胞的分离也是较为重要的一个环节, 分离后白细胞的活性和纯度直接决定着后续研究结果的

收稿日期: 2015-08-03 接受日期: 2015-10-19

国家高技术研究发展计划项目(批准号: 2015AA020409)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0411-84723553, E-mail: yongxin@dlmu.edu.cn

Received: August 3, 2015 Accepted: October 19, 2015

This work was supported by the National High Technology Research and Development Programme of China (Grant No.2015AA020409)

\*Corresponding author. Tel: +86-411-84723553, E-mail: yongxin@dlmu.edu.cn

网络出版时间: 2015-11-06 18:20:10 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151106.1820.006.html>

可靠性和准确性。

对于全血白细胞分离,目前较为常用的方法是采用沉降法,包括自然沉降法<sup>[1]</sup>和聚合物加速沉降法<sup>[2]</sup>。沉降法是依据白细胞密度较大的原理,采用自然静置或加入某些高分子聚合物,使白细胞和红细胞自然分层,从而实现分离。沉降法分离白细胞操作简单,但分离精度较低,分离所需的时间较长,细胞的活性也较差。对于某种特定种类白细胞的分离,则可采用密度梯度离心法、物理吸附法、细胞电泳法、免疫磁珠法、流式细胞术等<sup>[3-7]</sup>。但这些方法耗时较长,并且需要较多的血液样品。

微流控芯片技术可以在一片几平方厘米的芯片上实现传统的样品处理、进样、混合、分选、检测等过程的集成,具有消耗样品量少、有较高的分辨精度和灵敏度、易于集成及微型化等优点。随着微流控芯片技术的不断发展和进步,许多研究者尝试采用该技术实现血细胞的分离,如荧光分选法、免疫磁珠法以及多种基于尺寸大小的细胞分选法<sup>[8-11]</sup>等。荧光分选法的精度高,但是标记荧光后的目标细胞很难用于后续相关研究,如PCR或DNA扩增等。

磁力分选技术是使用特异性磁珠来结合目标细胞,利用外加磁场来分离和操控目标细胞,具有特异性强和分选精度高等特点,但是分离效果显著依赖于细胞与磁珠间的结合程度,因此样品制备过程较为复杂和费时。基于细胞尺寸不同对其进行分选是一种无标记的细胞分选方法。其中,过滤法是目前最为简单的细胞分选方法, Ji等<sup>[12]</sup>在通道中设计了不同尺度的微结构,实现了红细胞和白细胞的分离。微结构过滤法原理简单,但通道易堵塞、并且分选效率较低。此外,采用介电泳法也可以实现不同尺寸细胞的分离和操控<sup>[13-17]</sup>。介电泳法避免了细胞堵塞通道的缺点,但仍存在其他缺点,如直流介电泳法需要施加上百伏的电压,极易损伤甚至裂解细胞;而交流介电泳则需要复杂的电极微加工过程。水力分离技术也被用于不同尺寸细胞的分离。Yamada等<sup>[18]</sup>采用水力分选技术,在20  $\mu\text{L}/\text{min}$ 的条件下,实现了红细胞和白细胞的分离,将白细胞的相对浓度提高了约29倍。但该方法需要精确控制多种流体,操作较为复杂。确定性侧向偏移可实现不同尺寸细胞的连续分离,近几年获得了较为广泛的关注<sup>[19-20]</sup>,该方法的优点是具有较高的分离精度和通量,但是同微结构过滤分选方法一样,细胞易堵塞DLD柱状阵列,

并且需要精确加工微柱的尺寸以提高分选效率。此外,水力分离法通常需要在操作过程中精确调控细胞样品和缓冲液的流速,这也增加了该技术获得广泛应用的难度。

近几年,惯性技术也被应用于血细胞分选。Zhang等<sup>[21]</sup>利用该方法实现了红细胞与血浆的加速分离,但惯性法通常需要较高的流速,且相关剪切应力易对细胞造成损伤。亲和性分选是通过在微通道中固定特异性抗体,可将样品中的目标细胞捕捉、富集,实现高纯度的分离<sup>[22-27]</sup>。亲和性方法需要样品中的细胞与特异性抗体充分的接触,并且捕获后的目标细胞自身的生理学特性会受到一定的影响<sup>[28-29]</sup>。此外,Shevkoplyas等<sup>[30]</sup>利用白细胞边缘效应及血浆撇清效应富集白细胞,但该方法的纯化精度不高。关于微流控芯片技术应用于血细胞分选研究更为详细的资料详见相关综述文献<sup>[31-33]</sup>。

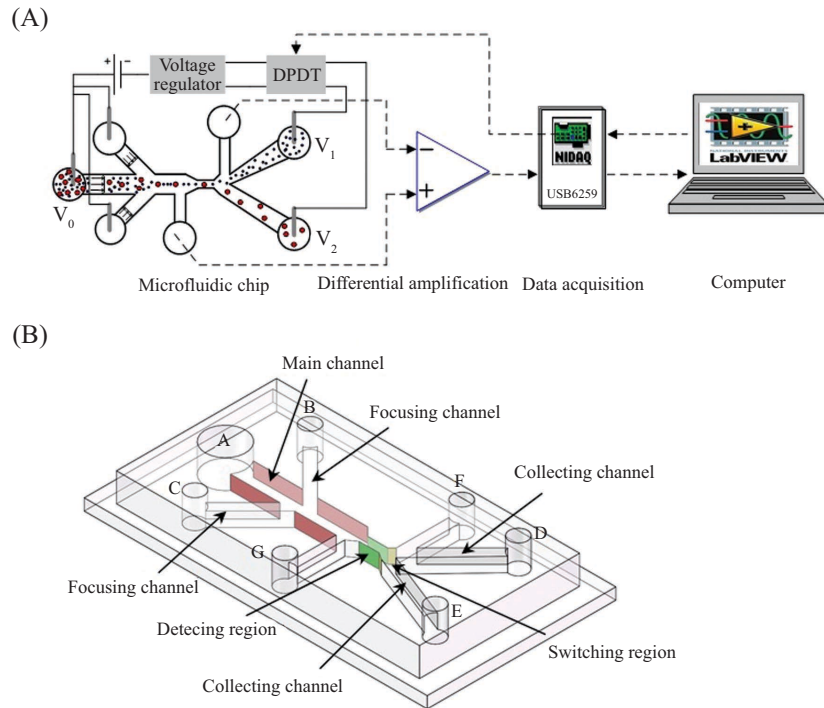
为克服现有白细胞分选技术在实际应用过程中存在的不足之处,本文报道了一种可全自动、连续从全血中检测和分离白细胞的微流控芯片装置。本方法基于不同体积的细胞经过阻抗脉冲检测区时产生的电阻脉冲信号(resistive pulse sensing, RPS)幅值的不同,可全自动地触发电动分选过程,从而将白细胞和极少量的红细胞分至目标通道。与其他血细胞分选方法相比,本方法无需对细胞标记,并且具有系统简单、全自动操作等优点,特别适合于操控样品中含量较少的目标细胞。

## 1 工作原理及系统

本分选系统主要由微流控分选芯片、差分放大电路、双刀双掷继电器(double pole double throw, DPDT)、数据采集仪(NI USB6259, NI, USA)、集成Labview数据处理程序的计算机等组成,如图1所示。

微流控分选芯片可分为上游区、检测区、下游区以及两个RPS检测通道。上游区包括样品主通道和两个聚焦通道(用于使样品中的细胞沿通道中心线顺序经过RPS检测区);下游区有两个细胞收集通道,用于分别收集目标细胞和杂质细胞。检测区和两个检测通道组成了用于检测细胞大小的差分阻抗脉冲传感器。

本研究采用差分阻抗脉冲传感器来检测细胞的体积大小,其工作原理为:当细胞经过检测区域时,会排挤出等体积的电解质溶液。由于细胞的电



A: 电阻脉冲白细胞分选系统; B: 微流控分选芯片。

A: RPS white blood cell sorting system; B: the sorting microfluidic chip.

图1 电阻脉冲白细胞分选系统和微流控分选芯片

Fig.1 RPS based white blood cell sorting system and the microfluidic chip

导率远小于电解质溶液的导电率,因此,细胞通过检测区域时会使检测区的电阻会发生变化,从而产生一个电压脉冲信号<sup>[34-36]</sup>。该信号的幅值反映了细胞的体积大小。由于采用双检测通道和差分放大电路,系统的绝大部分噪音可被差分消除,检测的信噪比较高,从而可获得较高的检测精度。

白细胞的分选是通过其RPS信号触发双刀双掷开关,继而转换细胞收集通道间的电渗流实现的。实验过程中,首先在通道及缓冲液储液池B~G中滴加等量的PBS缓冲液(pH7.5),之后将制备好的样品添加到进样池A中,并按照系统设计将7个电极分别插入A~G储液池并连接电路,在电渗流的驱动下,A中样品被输送到主通道,流经与B、C储液池联通的通道后被聚焦逐个通过RPS检测区。当有细胞经过检测区时,与F、G储液池中的电极相连的差分放大器将检测到的微小信号进行放大处理,并将处理后的信号送至数据采集仪,由Labview程序进行处理。系统中的Labview程序主要具有以下功能:(1)控制采集模块对经过放大的RPS数据进行采集,实现样品计数功能;(2)对采集到的RPS信号峰值进行逐个对比分析;(3)如果检测到的RPS信号峰值符合目标细胞信号峰值特征,数据采集仪输出电压信

号,驱动分选执行机构双刀双掷继电器(DPDT),交换D、E储液池中电压值 $V_1$ 、 $V_2$ ,从而改变电渗流(electroosmotic flow, EOF)的流动方向,目标细胞就会随着电渗流流向设定的收集储液池,从而实现目标细胞的全自动分选。

## 2 实验材料与步骤

### 2.1 微流控芯片的设计与加工

图1B所示的微流控芯片用AutoCAD绘图软件进行设计,然后用高分辨率打印机(1 000 dpi)将图形文件打印在塑料掩膜上。微流控芯片主通道宽 $100\ \mu\text{m}$ ,长 $5\ \text{mm}$ ,RPS检测区长为 $30\ \mu\text{m}$ ,宽 $15\ \mu\text{m}$ 。RPS检测通道的长为 $5\ \text{mm}$ ,宽 $30\ \mu\text{m}$ ;两聚焦通道对称布置,其尺寸为 $6\ \text{mm}\times 50\ \mu\text{m}$ (长 $\times$ 宽);对称布置的上下收集通道的尺寸长为 $6\ \text{mm}$ ,宽为 $100\ \mu\text{m}$ ,整个芯片的高度为 $20\ \mu\text{m}$ 。每个通道两端均有一个储液孔,其中A孔为全血样品孔,B、C、F和G孔用于滴加PBS缓冲液,D、E为细胞收集储液池。实验所用的PDMS(polydimethylsiloxane)微流控芯片通过在硅基模具上倾倒液态PDMS及其固化剂获得,将PDMS芯片采用等离子清洗器处理后,与载玻片(世泰,CITOGLAS  $24\ \text{mm}\times 60\ \text{mm}\times 0.15\ \text{mm}$ )实现永久

键合。微流体芯片模具采用软光刻技术<sup>[37]</sup>加工而成。软光刻使用负性光刻胶(SU-8 2015, MicroChem Co., Newton, MA)在硅片(4" N/PHOS, Montco Silicon Technology Inc., Spring City, PA)上加工而成。

## 2.2 样品制备及实验步骤

血样取自校医院体检健康者, 满18周岁, 无家族遗传病史、服药史、其他有毒有害化学物质接触史、近期感染等, 检报告中血常规、胸片等无异常, 3个月内未曾接受放疗或化疗。采集肘静脉血, 收集在EDTA抗凝管中。

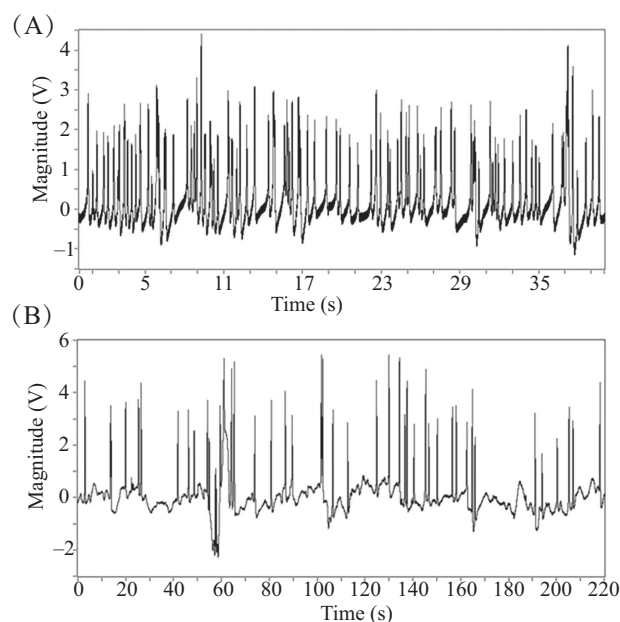
由于白细胞在全血中所占比例仅为红细胞的千分之一, 为能在较短的实验过程中验证分选技术的有效性, 研究时采取人为加入一定数量白细胞的方法, 将红、白细胞的数量比例调整到约为80:1。白细胞是通过采用红细胞裂解液(NH<sub>4</sub>CL2009, 天津灏洋生物制品科技有限责任公司)将全血中的红细胞裂解处理而获得的, 具体步骤如下: 取新鲜抗凝血1 mL, 加入1 mL红细胞裂解液, 充分混匀, 放置5 min; 放入台式微量离心机中4 000 r/min离心5 min, 去上清, 加入稀释一倍的裂解液, 混匀, 放入台式微量离心机中4 000 r/min离心5 min, 得到灰白色沉淀, 用PBS定容至1 mL。

实验时, 首先在微流控芯片的各个储液池中滴加一定量的PBS缓冲液, 然后在A孔中加入10  $\mu$ L全血样品和10  $\mu$ L白细胞样品, 将微流控芯片固定在倒置显微镜(Ti-E, Nikon, Japan)下, 并在各个储液池中插入电极, 用于电渗运输样品和聚焦液。实验过程中, 细胞的运动和分选过程由CCD相机(DS-Qi1Mc, Nikon, Japan)以12帧/秒进行拍摄。

## 3 结果与讨论

### 3.1 红细胞和白细胞的RPS信号

图2显示了系统检测到的红细胞和白细胞的



A: 红细胞的RPS信号; B: 白细胞的RPS信号。

A: RPS signals of red blood cells; B: RPS signals of white blood cells.

图2 血细胞的RPS信号

Fig.2 RPS signals of different blood cells

RPS信号, 每个向上的幅值大于1 V的信号均是由血细胞经过RPS检测区产生的, 而幅值小于1 V的向上的信号是由于缓冲液中的杂质或血小板产生的(通过在显微镜下逐一观察每个细胞经过检测区产生的RPS信号进行确认)。从图2中可见, 绝大多数红细胞RPS信号幅值小于2.5 V(图2A), 而绝大多数白细胞产生的信号幅值均大于2.5 V(图2B)。其主要原因是, 正常成熟的红细胞直径范围为7~8.5  $\mu$ m, 而白细胞体积比红细胞大, 直径分布在6~20  $\mu$ m。根据RPS检测理论, 体积较大的白细胞产生的RPS信号的幅值也较大。

由于有一定量的红细胞在尺寸上与白细胞有重叠, 确定不同尺寸的血细胞所占的比例, 有助于确定最佳的RPS信号触发信号阈值, 即在保证将全部的白细胞分选至目标通道的同时, 混入最少量的

表1 全血中不同种类的白细胞的粒径范围及所占的百分比

Table 1 Size distributions and percentages for the white blood cells of different types

类别 Types	所占比例(%) Percentage (%)	直径大小( $\mu$ m) Diameter ( $\mu$ m)
Neutrophile granulocyte	50~75	10~13
Eosinophile granulocyte	0.5~5	13~15
Basophilic granulocyte	0~1	10~12
Lymphocyte		
Macrolymphocyte	2~4	10~15
Small lymphocyte	18~36	6~10
Monocyte	3~8	14~20

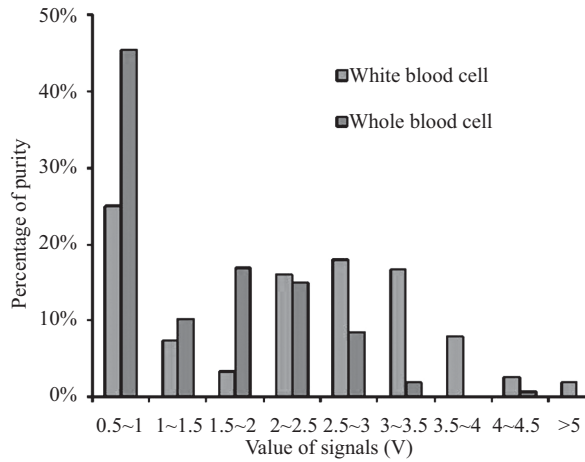


图3 白细胞及全血RPS信号分布

Fig.3 RPS signal distributions of white blood cells and the whole blood cells

红细胞。表1显示了全血中不同种类的白细胞的粒径范围及所占的百分比情况。可见, 红细胞与小淋巴细胞在尺寸上有一定范围的重合, 但重合不超过30%。

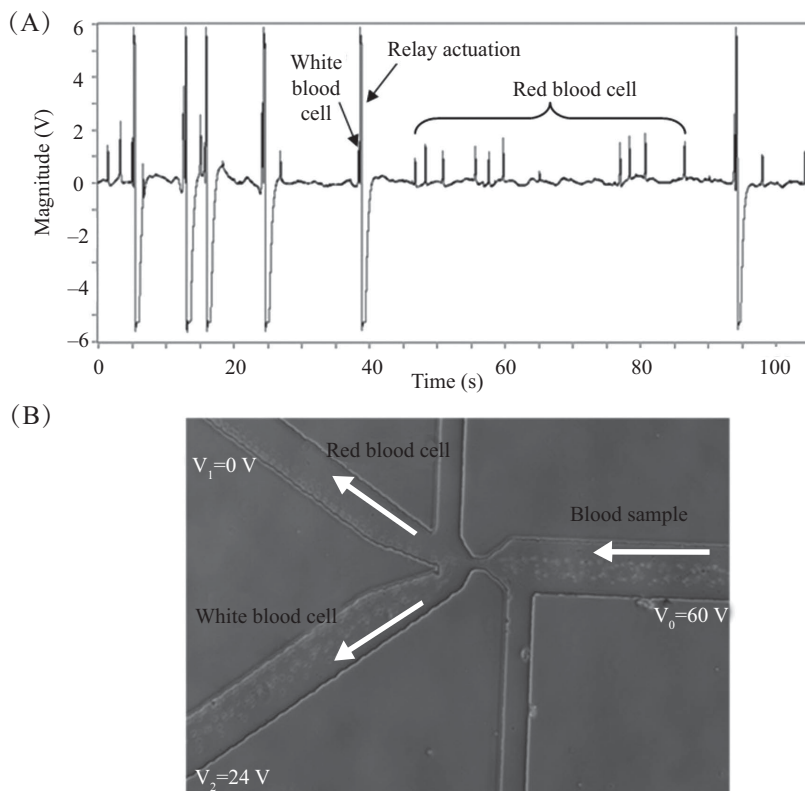
图3A和图3B分别显示了产生不同RPS信号幅值的全血细胞和白细胞所占的百分比情况。由图3

可以看出, 在RPS信号幅值大于2.5 V的所有细胞里, 白细胞约占82%, 所以本实验将分选电压值设定为2.5 V时, 分选后的白细胞的理论纯度可达82%。

### 3.2 白细胞的分选

图4显示了分选白细胞过程中RPS信号及细胞运动轨迹情况(B、C孔施加的聚焦电压为60 V)。由图4A可见, 系统检测到白细胞后, 均会触发双刀双掷继电器的动作, 并且会产生一个幅值为6 V左右的脉冲扰动, 由于双刀双掷继电器的动作延时, 其脉冲扰动时间大致为200 ms。

除分选触发电压外, 细胞进入RPS检测区前的聚焦效果也会影响白细胞的分选精度。为避免多个细胞同时通过检测区造成的误差, 本文在芯片的主通道上设置了两条聚焦通道, 通过在聚焦通道两端施加电压产生电渗流来实现电动聚焦。为避免过高的电场强度对细胞造成损伤, 本文使用的聚焦电压较低, 因此, 在主通道中, 细胞未聚焦成单细胞线宽。但是, 芯片的检测区与主通道采用渐缩通道进行连接, 可进一步进行物理聚焦。目前, 还有多种其他较为成熟的在微流控芯片上进行样品聚焦的方法, 在



A: 分选过程中RPS信号; B: 细胞分选轨迹。

A: RPS signals during cell sorting; B: cell trajectories during cell sorting.

图4 分选过程中RPS信号和细胞分选轨迹

Fig.4 RPS signals and cell trajactories during cell sorting process

实际应用中,可根据样品的浓度,选择合适的聚焦方法,从而获得不同的聚焦效果。

## 4 结论

本文报道了一种基于血细胞尺寸差异的细胞分选方法,搭建了分选系统,实现了从全血样品中全自动、连续检测和分选白细胞。研究结果表明,由于白细胞的尺寸较大,其产生的RPS信号幅值也大于血液样品中的红细胞。当分选芯片检测区的体积为 $30\ \mu\text{m}\times 15\ \mu\text{m}\times 20\ \mu\text{m}$ 时,设定RPS信号触发信号阈值为2.5 V时,理论上分选后的白细胞的理论纯度可达82%。本微流控芯片装置具有系统简单、全自动操作和细胞无标记等特点,有望发展成为便携式白细胞分选装置。

## 参考文献 (References)

- 喻 陆, 廖立生. 肾小管上皮细胞分离方法和原代培养. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册[Yu Lu, Liao Lisheng. Foreign Medical Sciences (section of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine)] 1995; 16(6): 257-9.
- 王 珂, 周长满, 于恩华. 成年大鼠嗅球和鼻腔嗅黏膜成鞘细胞的分离、培养与鉴定. 解剖学报(Wang Ke, Zhou Changman, Yu Enhua. Isolation and characterization of cultured ensheathing cells from adult rat olfactory bulbs and nasal olfactory mucosa. Actaanatomica Sinica) 2002; 33(5): 488-90.
- 彭齐荣, 袁爱力, 赖卓胜, 朱 薇. 肝细胞的大量制备技术. 中华肝脏病杂志(Peng Qirong, Yuan Aili, Lai Zhuosheng, Zhu Wei. Chinese Journal of Hepatology) 2000; 8(1): 11-3.
- 孙晓东, 钟雪云. 原发性肝癌细胞原代培养制备过程中细胞分离的改良. 中国病理生理杂志(Sun Xiaodong, Zhong Aiyun. Chinese Journal of Pathophysiology) 1998; 14(6): 767-8.
- Raghavarao KS, Dueser M, Todd P. Multistage magnetic and electrophoretic extraction of cells, particles and macromolecules. Adv Biochem Eng Biotechnol 2000; 68: 139-90.
- 卫朝霞, 刘永波. 一种新的内皮细胞分离方法. 河南职工医学院学报(Wei Zhaoxia, Liu Yongbo. A new endothelial cell separation method. Journal of Henan Medical College for Staff and Workers) 2003; 15(3): 7-8.
- Ujam LB, Clemmitt RH, Chase HA. Cell separation by expanded bed adsorption: Use of ion exchange chromatography for the separation of *E. coli* and *S. cerevisiae*. Bioprocess Engineering 2000; 23(3): 245-50.
- Barteneva NS, Ketman K, Fasler-Kan E, Potashnikova D, Vorobjev IA. Cell sorting in cancer research-diminishing degree of cell heterogeneity. Biochim Biophys Acta 2013; 1836(1): 105-22.
- Jackson EL, Lu H. Advances in microfluidic cell separation and manipulation. Curr Opin Chem Eng 2013; 2(4): 398-404.
- Dong Y, Skelley AM, Merdek KD, Sprott KM, Jiang C, Pierceall WE, et al. Microfluidics and circulating tumor cells. J Mol Diagn 2013; 15(2): 149-57.
- Jarvas G, Guttman A. Modeling of cell sorting and rare cell capture with microfabricated biodevices. Trends Biotechnol 2013; 31(12): 696-703.
- Ji HM, Samper V, Chen Y, Heng CK, Lim TM, Yobas L. Silicon-based microfilters for whole blood cell separation. Biomed Microdevices 2008; 10(2): 251-7.
- Zhu J, Canter RC, Keten G, Vedantam P, Tzeng TR, Xuan X. Continuous-flow particle and cell separations in a serpentine microchannel via curvature-induced dielectrophoresis. Microfluid Nanofluid 2011; 11(6): 743-52.
- Kang Y, Li D, Kalams SA, Eid JE. DC-Dielectrophoretic separation of biological cells by size. Biomed Microdevices 2008; 10(2): 243-9.
- Mernier G, Piacentini N, Tornay R, Buffi N, Renaud P. Cell viability assessment by flow cytometry using yeast as cell model. Sensor Actuat B Chem 2011; 154(2): 160-3.
- Salomon S, Leichle T, Nicu L. A dielectrophoretic continuous flow sorter using integrated microelectrodes coupled to a channel constriction. Electrophoresis 2011; 32(12): 1508-14.
- Jia Y, Ren Y, Jiang H. Continuous dielectrophoretic particle separation using a microfluidic device with 3D electrodes and vaulted obstacles. Electrophoresis 2015; 36(5): 1744-53.
- Yamada M, Seki M. Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics. Lab Chip 2005; 5(11): 1233-9.
- Huang R, Barber TA, Schmidt MA, Tompkins RG, Toner M, Bianchi DW, et al. A microfluidics approach for the isolation of nucleated red blood cells (NRBCs) from the peripheral blood of pregnant women. Prenat Diagn 2008; 28(10): 892-9.
- Holm SH, Beech JP, Barrett MP, Tegenfeldt JO. Separation of parasites from human blood using deterministic lateral displacement. Lab Chip 2011; 11(7): 1326-32.
- Zhang XB, Wu ZQ, Wang K, Zhu J, Xu JJ, Xia XH, et al. Gravitational sedimentation induced blood delamination for continuous plasma separation on a microfluidics chip. Anal Chem 2012; 84(8): 3780-6.
- Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. Nature 2007; 450(7173): 1235-9.
- Gleghorn JP, Pratt ED, Denning D, He L, Bander NH, Tagawa ST, et al. Capture of circulating tumor cells from whole blood of prostate cancer patients using geometrically enhanced differential immunocapture (GEDI) and a prostate-specific antibody. Lab Chip 2010; 10(1): 27-9.
- Kurkuri MD, Al-Ejeh F, Shi JY, Palms D, Prestidge C, Griesser HJ, et al. Plasma functionalized PDMS microfluidic chips: Towards point-of-care capture of circulating tumor cells. Chem 2011; 21: 8841-8.
- Wang S, Wang H, Jiao J, Chen KJ, Owens GE, Kamei K, et al. Three-dimensional nanostructured substrates toward efficient capture of circulating tumor cells. Angew Chem Int Ed Engl 2009; 48(47): 8970-3.
- Iyer S, Gaikwad RM, Subba-Rao V, Woodworth CD, Sokolov I. Atomic force microscopy detects differences in the surface brush of normal and cancerous cells. Nat Nanotechnol 2009; 4: 389-93.
- Hughes AD, Mattison J, Powderly J D, Greene BT, King MR.

- Rapid isolation of viable circulating tumor cells from patient blood samples. *J Vis Exp* 2012; 64: e4248.
- 28 Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens MD, Nassar A, Kalli KR, *et al.* Immune-induced epithelial to mesenchymal transition *in vivo* generates breast cancer stem cells. *Cancer Res* 2009; 69(7): 2887-95.
- 29 Frederick BA, Helfrich BA, Coldren CD, Zheng D, Chan D, Bunn PA Jr, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(6): 1683-91.
- 30 Shevkopyas SS, Yoshida T, Munn LL, Bitensky MW. Biomimetic autoseparation of leukocytes from whole blood in a microfluidic device. *Anal Chem* 2005; 77(3): 933-7.
- 31 Lu XQ, Li L, Chen HM. Advances in isolating circulating tumor cells with microfluidic chips. *Prog Biochem Biophys* 2015; 42(4): 301-12.
- 32 Shields CW 4th, Reyes CD, Lopez GP. Microfluidic cell sorting: A review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation. *Lab Chip* 2015; 15(5): 1230-49.
- 33 黄 笛, 项 楠, 唐文来, 张鑫杰, 倪中华. 基于微流控技术的循环肿瘤细胞分选研究. *化学进展*(Huang Di, Xiang Nan, Tang Wenlai, Zhang Xinjie, Ni Zhonghua. Microfluidics-based circulating tumor cells separation. *Progress in Chemistry*) 2015; 27(7): 882-912.
- 34 Wu XD, Kang YJ, Wang YN, Xu DY, Li DY, *et al.* Microfluidic differential resistive pulse sensors. *Electrophoresis* 2008; 29(13): 2754-9.
- 35 Song YX, Zhang HP, Chon CH, Chen S, Pan XY, Li DQ. Nanoparticle detection by microfluidic resistive pulse sensor with a submicron sensing gate and dual detecting channels-two stage differential amplifier. *Sensor Actuat B-Chem* 2011; 155(2): 930-6.
- 36 Song YX, Zhang HP, Chon CH, Chen S, Pan XY, Li DQ. Counting bacteria on a microfluidic chip. *Anal Chem Acta* 2010; 681(1/2): 82-6.
- 36 Xia YN, Whitesides GM. Soft lithography. *Annual Review of Materials Science* 1998; 28: 153-84.