

1. 推荐奖种：医学科学技术奖

2. 项目名称：基于微流控芯片技术检测循环肿瘤细胞的基础和临床应用研究

3. 推荐单位：江苏省医学会

4. 推荐意见：

血液中的循环肿瘤细胞（Circulating Tumor Cells, CTCs）由于其直接来源于肿瘤组织，具有肿瘤组织的特性，可以直接反应肿瘤的大小、类型，辅助判断存活时间，并可用于疗效评价、复发及转移的监测。

南通大学附属医院丛辉、陈宏梅、钱晨、茅国新等同志联合中国科学院上海微系统与信息技术研究所、重庆大学、宁波大学在国家重点基础研究发展计划（973）计划、国家自然科学基金和南通市科技计划等项目的资助下完成了基于微流控芯片技术检测循环肿瘤细胞的基础和临床应用研究这一项目。项目组以价格低廉的聚二甲基硅氧烷（PDMS）为基质材料，根据 CTCs 的特性，设计并构建了具有自主知识产权的微流控芯片检测 CTCs 技术平台，将 CTC 单细胞捕获、鉴定、裂解、核酸提取、基因扩增等功能集成于一体的单细胞检测体系，研究了 CTCs 单细胞的基因突变情况及基因异常表达，找出与肿瘤疗效、复发转移监测及靶向治疗密切相关的 CTCs 单细胞分子特征，构建高灵敏、高特异的 CTCs 单细胞检测及鉴定新方法，建立了有效的个体化治疗指导及肿瘤复发转移监测体系。研究成果得到国内外同行认可，已在国内外期刊发表论文 80 余篇。该研究为肿瘤临床诊断和靶向治疗提供新的技术平台和分子靶点，为今后相关技术在临床应用提供基础理论和临床试验依据。经认真审阅，该项目推荐材料真实可靠，候选单位、候选人具备获奖条件，提交资料齐全，符合要求，不存在知识产权纠纷或项目完成单位、完成人员排序争议。同意申报中华医学科技奖。

5. 项目简介：

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的重大疾病。外周血液中的循环肿瘤细胞（Circulating Tumor Cells, CTCs）具有肿瘤组织的特性，可以直接反应肿瘤的大小、类型，辅助判断患者存活时间，并可用于疗效评价、复发及转移的监测等。肿瘤细胞的异质性无处不在，导致临床上治疗肿瘤时面临巨大的挑战，个体化治疗和精准治疗的重要性越发凸

显。肿瘤单细胞分析可更好的发挥 CTCs 的肿瘤监测作用、有助于肿瘤靶向用药及耐药的判断，从而提高肿瘤个体化治疗的效果以及预后监测。项目组针对肿瘤细胞异质性，结合微流控芯片技术的优势，设计并制作微流控芯片，在芯片上实现肿瘤细胞的单细胞分离及培养，在线 PCR 检测，并以中国发病率较高的肺癌及乳腺癌患者为病例模型，检测肿瘤单细胞表面特性的差异，研究不同肿瘤细胞参与肿瘤转移复发的机制，为肿瘤的精准诊疗提供依据。

2、主要技术创新点

(1) CTCs 检测平台构建：外周血液中 CTCs 检测具有重要的临床价值，但外周血中含有大量的血细胞，而 CTCs 的数量极其稀少，这成为阻碍 CTCs 临床应用的瓶颈。项目组设计了基于尺寸的微流控芯片，采用微电子机械系统(Microelectro Mechanical Systems, MEMS)制作工艺和 PDMS 软刻蚀技术制作六边形柱子微流控芯片，并依据 CTCs 细胞表面的各种蛋白标记物，成功构建了具有较好灵敏度和特异性 CTCs 检测体系。在此基础上我们进一步开发了每张芯片含 26208 微孔的阵列微流控芯片，实现了对 CTC 单细胞的捕获、裂解、RT-PCR 为一体的检测体系，可克服 CTCs 细胞裂解得到的核酸量极少，常规测序或荧光定量 PCR 方法无法检测的技术困境。该检测体系具有制作简单、成本低廉、易于操作，灵敏度高（单细胞检测）和准确性好等优点，为 CTC 单细胞基因的检测提供了一种新的技术平台。

(2) 以项目组构建的微流控芯片为平台检测了肺癌和乳腺癌患者外周血液中 CTCs，发现联合 CD45、CK、DAPI 能够大大提高 CTCs 检测的灵敏度和特异性；通过多种标志物对 CTCs 进行标记，该芯片能实现对多种亚型 CTCs 的检测；在临床应用中发现，外周血液中 CTCs 的数量与肿瘤的分期、转移、预后有着密切相关的联系，可为疾病的诊断和预后提供重要价值。

(3) 本项目中构建的阵列微流控芯片上的微孔既可以作为前期捕获单细胞的工具，又可以作为细胞裂解后 PCR 扩增过程的数字微反应器。通过不断摸索、方法改进，实现了将 PCR 反应体系限定在微反应区，提高了单细胞的核酸扩增效率，将乳腺癌单细胞 HER2 基因的在线检测成为现实，为实现个体化精准治疗提供有力工具。

3、成果推广

研究成果已在国内外期刊发表论文 80 余篇。部分研究结果获得江苏省卫健委新技术引进二等奖 1 项。此外所建方法在多家医院推广应用，并在继续教育学习班上交流推广。

6. 知识产权证明目录:

1. 基于矿物油饱和 PDMS 材料的数字 PCR 芯片的制作方法. 专利号: CN201310306080.9.
2. 一种模块化组装式微泵、使用方法及应用. 专利号: CN201110238664.8.
3. 基于离心微流控技术的稀少细胞分离检测系统及方法. 专利号: CN201210545205.9。
4. 一种高强度可逆键合微流控芯片的制作方法. 专利号: CN201210556630.8.
5. 高通量自动定量分配和混合的微流控芯片、方法及应用. 专利号: CN201210559854.4.
6. 一种基于非接触式介电电泳力操控捕获微颗粒和细胞的微流控装置及方法, 专利号: CN201910237756.0.
7. 一种基于微孔阵列芯片的单细胞基因检测方法, 专利号: CN201811427223.0.
8. 一种基于尺寸检测循环肿瘤细胞的微流控装置及方法, 专利号: CN201610398852.X.
9. 一种基于纳米金增强的多种肺癌标志物的高灵敏检测方法, 专利号: CN201110211260.X.
10. 一种集循环肿瘤细胞捕获、裂解与核酸检测于一体的微流控芯片及其装置以及方法, 专利号: CN201910249655.5.

7. 代表性论文目录:

1. Bead-based microarray immunoassay for lung cancer biomarkers using quantum dots as labels[J]. *Biosens Bioelectron.* 2016 Jun 15;80:300-306. doi: 10.1016/j.bios.2016.01.084. PMID: 26852198.
2. A microfluidic chip integrated with a high-density PDMS-based microfiltration membrane for rapid isolation and detection of circulating tumor cells[J]. *Biosens Bioelectron.* 2015 Sep 15;71:380-386. doi: 10.1016/j.bios.2015.04.080. Epub 2015 Apr 24. PMID: 25950932.
3. A microfluidic chip based on surfactant-doped polydimethylsiloxane (PDMS) in a sandwich configuration for low-cost and robust digital PCR[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical,* 2017 245:414-422.
4. EGFR point mutation detection of single circulating tumor cells for lung cancer using a micro-well array[J]. *Biosens Bioelectron.* 2019 Aug 15;139:111326. doi: 10.1016/j.bios.2019.111326. Epub 2019 May 14. PMID: 31129389.

5. Highly sensitive detection and mutational analysis of lung cancer circulating tumor cells using integrated combined immunomagnetic beads with a droplet digital PCR chip[J]. *Talanta*. 2018 Aug 1;185:229-236. doi: 10.1016/j.talanta.2018.03.083. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29759193.
6. Advances in liquid biopsy using circulating tumor cells and circulating cell-free tumor DNA for detection and monitoring of breast cancer[J]. *Clin Exp Med*. 2019 Aug 19(3):271-279. doi: 10.1007/s10238-019-00563-w.
7. Clinical significance of circulating tumor cells from lung cancer patients using microfluidic chip[J]. *Clin Exp Med*. 2018 May 18(2):191-202. doi:10.1007/s10238-018-0485-6. PMID: 29445889.
8. A "place n play" modular pump for portable microfluidic applications. *Biomicrofluidics*, 2012, 6(1): 014118.
9. 外周血循环肿瘤细胞和游离 DNA 联合检测在乳腺癌辅助诊断中的临床价值[J]. *中华检验医学杂志*. 2019, 42(8): 662-668.
10. 一种用于核酸高灵敏检测的液滴式数字聚合酶链式反应芯片[J]. *高等学校化学学报*. 2017,10(07): 1140-1147.

8. 完成人情况，包括姓名、排名、职称、行政职务、工作单位、对本项目的贡献

姓名	排名	职称	行政职务	工作单位	对本项目的贡献
丛辉	1	主任技师	副主任	南通大学附属医院	在本项目所列的创新点 1、（生物医学工程学其他学科）微流控芯片设计、制作以及检测体系构建；2、（实验诊断学（检验医学））利用构建技术平台研究了肺癌和乳腺癌患者外周血 CTC 相关特性，探讨其临床应用价值；3、（实验诊断学（检验医学））微孔阵列芯片检测乳腺癌 CTC 单细胞的研究等方面均有极大贡献。
贾春平	2	副研究员	无	中国科学院上海微系统与信息技术研究所	在本项目所列的创新点 1、（生物医学工程学其他学科）微流控芯片设计、制作以及检测体系构建中主要从事芯片基质材料的选择与优化研究，贡献突出。
陈宏梅	3	副主任护师	无	南通大学附属医院	在本项目所列的创新点 2、（实验诊断学（检验医学））利用收集肺癌和乳腺癌患者临床相关资料，并进行统计学分析，探讨其临床应用价值等方面均有一定贡献。
赵建龙	4	研究员	无	中国科学院上海微系统与信息技术研究所	在本项目所列的创新点 1、3，负责课题的总体指导。
李刚	5	教授	无	重庆大学	在本项目所列的创新点 1、3，负责微流控芯片的键合、流速控制、数字 PCR 的研究。
金庆辉	6	教授	所长	宁波大学	在本项目所列的创新点 1、3，负责课题的总体指导，微流控芯片的设计、键合、稳定性研究。
郇晚蕾	7	讲师	无	宁波大学	在本项目所列的创新点 1、3，负责微流控芯片检测 CTC 的实验条件摸索，优化。
钱晨	8	主管技师	无	南通大学	在本项目所列的创新点 2、（实验诊断学（检验医学））利用构建技术平台研究了肺癌和乳腺癌

				附属医院	患者外周血 CTC 相关特性，探讨其与临床病理参数的相关性；3、（实验诊断学（检验医学））微孔阵列芯片检测乳腺癌 CTC 单细胞的研究等方面均有较大贡献。
茅国新	9	主任医师	无	南通大学附属医院	在本项目所列的创新点 2，指导临床资料收集，协助研究肺癌和乳腺癌患者外周血 CTC 相关特性，探讨其临床应用价值等方面均有较大贡献。

9. 完成单位情况，包括单位名称、排名，对本项目的贡献

单位名称	排名	对本项目的贡献
南通大学附属医院	1	南通大学附属医院在项目的研究过程中给予了人、财、物等多方面的支持。医院通过多种渠道提供技术交流的机会，积极创造条件，吸引国内外高层次人才来院进行工作或交流。 在科研经费上给予项目组一定的投入，并提供项目实施所需的各项仪器设备。及时帮助课题组解决项目进展过程中出现的各种问题，保证项目顺利进行定期检查项目进展情况，要求项目组按时完成科研任务，及时总结研究成果。
中国科学院上海微系统与信息技术研究所	2	中国科学院上海微系统与信息技术研究所传感技术联合国家重点实验室具有国内最先进的 MEMES 加工线，长期从事生物芯片、生物传感器的研究。基于循环肿瘤细胞 CTCs 在肿瘤精准诊疗中的重要意义，利用微加工技术，在微流体芯片上刻蚀了可拦截 CTCs 及 CTCs 团的过滤微管道，将待测标本或全血在自行研发的芯片自动进样仪驱动下流入反应池，通过过滤微管道拦截及逐级捕获 CTCs 及 CTCs 团，再用免疫（检测细胞角蛋白 CK 等上皮肿瘤标志物抗体、间质转化标志物及免疫治疗标志物等）荧光的方法对 CTCs 及 CTCs 团块进行分型鉴定及检测。该套检测体系内的微流控芯片、CTCs 芯片自动进样仪及配套试剂盒已达到产业化水平，经过后续研发及产业化推动，将会广泛应用于临床，必将对肿瘤的精准诊疗具有重要意义。

重庆大学	3	重庆大学在项目的研究过程中给予了人、财、物等多方面的支持。在科研经费上给予项目组一定的投入，并提供项目实施所需的各项仪器设备。及时帮助课题组解决项目进展过程中出现的各种问题，保证项目顺利进行定期检查项目进展情况，要求项目组按时完成科研任务，及时总结研究成果。
宁波大学	4	宁波大学信息科学与工程学院先进智能传感技术实验室拥有科研级微纳器件加工平台，微流控芯片制作、性能测试及表征设备以及生化测试相关实验条件。实验室利用电子学、信息技术和生物技术等多学科交叉的综合优势，研发了一系列微纳生物传感器，应用于医疗诊断领域。针对肿瘤细胞的异质性以及基因分型在肿瘤靶向治疗中的重要性，本研究团队开发了基于微腔阵列的肿瘤单细胞基因检测芯片，将肿瘤单细胞捕获、裂解、PCR 扩增和信号读取功能集成于一体。通过对肺癌细胞系（H1975 和 A549 细胞）、正常人白细胞和循环肿瘤细胞中 mRNA 检测，验证了该检测装置可以对上千个细胞进行单细胞水平多重基因平行检测。在 H1975 细胞中和肺癌病人 CTCs 样本中均检测到表达不同热点突变类型（EGFR-L858R 突变或者 EGFR-T790M 突变）的肿瘤细胞，进一步说明了 CTC 单细胞水平基因检测的重要意义。该方法有望应用于 CTCs 单细胞基因分型，为肿瘤诊断和治疗提供有价值的指导信息。