

·综述·

循环胎儿细胞的分离、富集现状与进展

苏奕达¹ 凌小婷¹ 吴祖浩² 黄一芳¹¹广西医科大学第一附属医院检验科,广西高校临床检验诊断学重点实验室,南宁 530021;²广西医科大学基础医学院,南宁 530021

通信作者:黄一芳,Email:yfy004462@sr.gxmu.edu.cn

【摘要】 循环胎儿细胞已被证实含有完整的细胞结构以及胎儿全套基因组信息,对循环胎儿细胞的分离与检测是无创产前诊断非整倍体疾病、染色体微缺失、单基因性疾病的重要策略之一。然而循环胎儿细胞的含量极低,对循环胎儿细胞的分离与检测仍具有一定的挑战。近年来,多种微流控技术、新型纳米材料等新型循环胎儿细胞分离、富集方法得到应用与发展。循环胎儿细胞的两大类新型分离、富集方法在文中得以总结,并对各类新型分离方法的原理、优缺点及分离效果进行比较。

【关键词】 产前诊断; 循环胎儿细胞; 分离方法; 微流控芯片; 纳米材料和微球材料
基金项目: 国家自然科学基金(82201913); 广西自然科学基金(2024GXNSFBA010209)

The current status and progress in the isolation of circulating fetal cellsSu Yida¹, Ling Xiaoting¹, Wu Zuhao², Huang Yifang¹¹Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University/Key Laboratory of Clinical Laboratory Medicine of Guangxi Department of Education, Nanning 530021, China; ²School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China
Corresponding author: Huang Yifang, Email:yfy004462@sr.gxmu.edu.cn

【Abstract】 Circulating fetal cells have been proven to contain complete cellular structures and comprehensive fetal genome information, enabling non-invasive prenatal diagnosis of aneuploidy diseases, chromosomal microdeletions, and monogenic diseases. However, due to the low abundance of these rare fetal cells in maternal peripheral blood, their isolation and detection remains challenging. In recent years, novel isolation and enrichment techniques, such as microfluidic technologies and novel nanomaterials, for circulating fetal cells enrichment have been continuously advancing. This review provides a comprehensive summary of two novel methodologies for the isolation and enrichment of circulating fetal cells. Their separation principles, advantages, limitations, as well as the separation efficiencies will also be described.

【Key words】 Prenatal diagnosis; Circulating fetal cells; Isolation methods; Microfluidics; Nanomaterials and microsphere materials

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82201913); Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2024GXNSFBA010209)

循环胎儿细胞是指胎儿发育过程中进入母体外周血中的一类稀有细胞。该类细胞主要包含以下5种类型:有核红细胞(fetal nucleated red blood cells, fNRBC)、滋养层细胞、干细胞、白细胞以及祖细胞等;其中有核红细胞与滋养层细胞为数量最多、研究最广泛的细胞类型^[1]。这些细胞

含有一整套胎儿基因组信息,通过对这些细胞的基因组、转录组信息进行分析,对胎儿遗传性疾病的诊断具有重要的意义。基于循环胎儿细胞的无创产前诊断(non-invasive prenatal diagnostics, NIPD)即通过获取这些循环胎儿细胞进行分析,从而对胎儿遗传性疾病、胎儿状态进行产前诊断

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20240419-00199

收稿日期 2024-04-19 本文编辑 唐栋

引用本文:苏奕达,凌小婷,吴祖浩,等.循环胎儿细胞的分离、富集现状与进展[J].中华检验医学杂志,2025,48(3):425-428. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20240419-00199.

中华医学杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究



的策略,可使孕妇有效避免有创性伤害、宫内感染、流产等不利后果的发生,是目前产前诊断研究的重要方向之一。与游离胎儿 DNA 相比,循环胎儿细胞具有含完整的细胞结构、基因组连续性好、不受母体外周血 DNA 污染等优点。然而,循环胎儿细胞的含量极低,据报道 $10^6 \sim 10^7$ 个外周血白细胞中仅含有约 6 个循环胎儿细胞^[2]。发展新型、有效的循环胎儿细胞分离技术具有重要的临床意义。

循环胎儿细胞的分离、富集方法可分为传统方法与新型方法两大类。传统的分离方法主要包括流式细胞分选法、磁性细胞分选法、过滤法、密度梯度离心法等。由于循环胎儿细胞数量十分稀少,传统的富集方法仍无法避免漏检与错检。且传统方法还存在以下不足与限制:(1)这些传统方法对样本的量有一定的要求,样本量较少、靶细胞数目少的样本分选效果不佳;(2)传统的分选方法敏感度较差,部分方法如流式细胞分选法、磁性细胞分选法对抗体依赖性大,然而针对循环胎儿细胞的抗体特异性欠佳。因此,近年来,针对循环胎儿细胞的新型富集方法也在不断地探索与发展中。这些新型循环胎儿细胞的分离方法主要分为以下两大类:(1)微流控芯片型富集方法;(2)以纳米材料和微球材料为基础的富集方法。微流控芯片型富集方法,其利用微流控芯片可以有效增强样本处理通量以及增大胎儿细胞与芯片的结合面积,提高捕获率;还可以通过微流体与纳米技术相结合提高循环胎儿细胞的捕获效率、纯度、灵敏度和再现性。以纳米材料为基础的富集方法包括微球法、微孔法和微柱法,利用纳米结构基板增大接触面积来提高细胞相互黏附的作用,通过纳米材料的特殊特性可更好地捕获胎儿细胞。这些新型的分离方法进一步推进了循环胎儿细胞检测在临床上的应用。

一、微流控芯片型富集方法

(一)抗转铁蛋白受体标记的微流控芯片

微流控芯片的发展极大促进了循环胎儿细胞的富集效率。Zhang 等^[3]设计了一种提高接触频率的、抗转铁蛋白受体标记的微流控芯片,该芯片结合了物理分离和亲和捕获,根据侧向位移分离的原理,通过该策略可增大细胞与微柱的接触频率,再利用抗转铁蛋白受体作为捕获抗体,可用于高效富集和鉴定循环胎儿细胞,即来自母体血液中的循环有核红细胞,抗转铁蛋白受体标记的微流控芯片可以显著增强胎儿细胞与抗体包被的微柱之间的相互作用,以提高捕获效率,同时最大限度地减少非特异性吸附。结果显示,在妊娠后 7 周就可在 2 ml 外周血中检测到循环有核红细胞,且在往后的整个妊娠过程中均可检测。总之,该芯片能利用较小的血量实现循环有核红细胞的富集,结合基因组分析为发展基于循环胎儿细胞的 NIPD 技术提供了有力的工具。

(二)用于分离循环滋养层细胞的纳米黏微流控芯片

2017 年, Hou 等^[4]报道了一种用于分离循环滋养层细胞(circulating trophoblasts, CTB)的纳米黏微流控芯片。该芯片含有聚甲基丙烯酸甲酯材料构筑的成百上千条纳米柱,在这些纳米柱上通过链霉素亲和素修饰抗上皮细胞黏

附分子抗体,可对 CTB 进行捕获。结果表明通过短串联重复序列分析可证明通过该芯片获取的 CTB 为胎儿细胞来源,通过基于微阵列的比较基因组杂交分析可对患有 21-三体、18-三体、13-三体及其他染色体异常及微缺失的胎儿进行诊断。通过大规模临床研究的验证后发现,这种基于 CTB 的无创产前检测方法具有发展成为一种 NIPD 方案的广阔前景。

2021 年, Afshar 等^[5]对纳米黏微流控芯片进行改良,并尝试将该芯片用于富集子痫孕妇外周血中的 CTB,结果发现子痫孕妇外周血中不仅含有单个的 CTB,而且还可以富集到一定数量的滋养层细胞簇,且单个 CTB 的数量与滋养层细胞簇的数量在子痫孕妇中明显比正常孕妇多,通过机器学习的方法,利用 CTB 的数量与滋养层细胞簇的数量差异可对孕妇产前发病进行预测。该方法是一种具有广阔发展前景的无创检测技术,仅利用纳米黏微流控芯片,就可准确地识别单一的 CTB 和 CTB 细胞簇。

(三)液体扫描微流控平台

该微流控平台最初用于富集循环肿瘤细胞。Sonek 等^[6]证明了液体扫描微流控平台可以持续地捕获和富集循环胎儿细胞,特别是 CTB。简而言之,该平台每一个模块包含 8 个微芯片,而每个微芯片又包含 150 个具有高纵横比的并行通道,它的高通量特性可以快速地对低至 1 ml 的全血进行处理;该平台可以直接从全血中捕获目标细胞,而不需要进行初步的分离,捕获滋养层细胞的芯片表面涂上含有酶切位点的寡核苷酸,寡核苷酸连接捕获抗体,从而富集目标细胞。结果表明,在 8 例胎儿患有非整倍体疾病的孕妇外周血中,7 例通过该方法获取 CTB 进行荧光原位杂交分析的样本可被正确诊断。该方法不需要对全血进行预处理,从而减少了富集前循环胎儿细胞的损失,此外,富集过程是自动化的,仅持续 3 h,具有良好的发展前景。

(四)惯性微流控

Lin 等^[7]提出了一种方法,用于分离和鉴定来自母体循环的滋养层细胞。该方法设计了一种微流控稀有细胞盘,可在 30 min 内处理 15 ml 的血液,去除红细胞,以及红细胞结合的白细胞,同时分离滋养层细胞。另外,该方法为了最大限度地减少细胞损失,采用免疫荧光染色标记滋养层细胞。结果显示,标记细胞平均回收率为 91.0%,白细胞去除率为 99.91%。每个微柱可回收多达 4 个单个细胞,使单个靶细胞的回收效率达到 100%。该方法的设计新颖,巧妙地利用“盘”状结构进行稀有胎儿细胞分离,具有一定的研究价值和前景。

Wei 等^[8]提出了一种微球辅助惯性微流控芯片,实现了高通量胎儿 fNRBC 的捕获和释放。利用改进的“人”字形结构作为微小漩涡生成单元,结合弯曲通道,大大增加了流动条件下靶细胞与芯片内免疫抗体的接触时间,从而实现更好的捕获性,在检测妊娠早期的 fNRBC 中表现出较高的灵敏度。这种“人”字形结构的惯性微流控芯片进一步拓宽了惯性微流控的设计思路,在临床样本验证中具有较好的分

离效果,基于此类惯性微流控的富集方法具有一定的潜力,但仍需进一步验证。

2020 年 Huang 等^[9]的团队提出了一种能快速、有效地从孕妇外周血样本中富集 CTB 的芯片。微流控芯片 CelutriateChip 1 拥有四级弯曲通道、双通道的独特结构设计,在惯性和 Dean 微流的作用下,具有较大尺寸的 CTB 能够有效地与血液细胞进行分离。在进行条件优化后,利用该芯片可以在 5 min 内从 2 ml 全血中富集到 CTB,平均回收率可达 52.3% 至 65.8%,白细胞去除率可达 99.95%。更重要的是,从芯片收集的回收液可以在单细胞水平上分离,并用于下游免疫荧光染色和遗传基因分型。对 30 例孕妇进行的临床试验结果表明,该芯片可从 86.67% 的孕妇外周血中成功获取 CTB。通过对稀有 CTB 进行测序,可以准确检测出 HBB 基因的单碱基变异。该方法为从孕妇的全血样本中富集 CTB 提供了一个有效的手段和平台,同其他采用微流控芯片的方法一样,表明该方法具有良好的发展前景。

(五)联合性微流控芯片

联合性微流控芯片的方法指的是将纳米材料、微球材料及其他分离策略纳入微流控体系,组建联合分离系统的策略。联合型的分离方法可在一定程度上弥补单纯微流控方法检测的不足,有望提高分离效果。Gur 等^[10]报道的多孔芯片联合纳米磁珠进行靶细胞分离的方法,该芯片包含 4 种孔径的微孔,分别为 15、20、30 和 60 μm 从上游至下游进行排列。在细胞模拟实验中,经过 145 min 的分离,该系统能捕获 90% 的靶细胞,且 98% 的细胞纯度为 100%。但该方法目前主要集中在富集模拟实验样本中的滋养层细胞,未来在真实临床样本的应用等方面还有待进一步的挖掘和探索。

Byeon 等^[11]发明了一种两步法负选性芯片,用于富集孕妇外周血中的胎儿 fNRBC。该芯片为“X”型构造,含有两个入口与两个出口,底座修饰了磁性材料。第一步样本进行两次红细胞离心聚集后,对红细胞进行裂解,并与抗 CD45 修饰的磁珠和抗 CD66b 修饰的磁珠进行孵育,随后第二步经过微流控芯片进行负选分离。当孵育后的标本经过微流控芯片时,抗 CD45 修饰的磁珠结合的白细胞在磁场排斥力的作用下向出口 1 移动,而抗 CD66b 修饰的磁珠结合的 fNRBC 在磁场吸引力的作用下向出口 2 移动,从而实现 fNRBC 的分离。结果表明通过该策略分离得到的 fNRBC 纯度为 20%~100%,平均纯度为 87.8%。得益于采用两步法负选性芯片的高富集纯度,其有望用于高灵敏度的 NIPD。

Zhang 等^[12]首次成功地构建了一个结合确定性横向位移模式微阵列的微流控芯片,可用于高效分离和释放未经处理全血中的循环胎儿有核红细胞。为了提高细胞捕获效率,该芯片使用了确定性横向位移原理,在微通道中嵌入了数百万根三角形柱,确定性横向位移阵列允许大于临界直径的细胞突破层流并连续与柱碰撞,从而捕获目标细胞。此外,三角柱增加了细胞-抗体的接触时间,从而进一步提高了捕获效率,较小的细胞会停留在原始的流体层中,从而最大限度地减少与细胞柱的碰撞,以避免非特异性吸附。

该芯片使用全血处理,不需要任何初始处理,细胞损失小;全血捕获效率高(约为 90%),白细胞吸附量小(0.078%);得益于联合型方法的优势,其有望能进一步提高循环胎儿细胞的富集效率。

Wang 等^[13]首先使用明胶包覆、修饰了抗 CD147 的微球捕获 fNRBC。利用微球捕获的 fNRBC 与正常血细胞之间的大小差异,该芯片可以有效地纯化 fNRBC。最后,通过酶法降解明胶涂层,将纯化的 fNRBC 从微球中温和地释放出来。该方法细胞捕获效率约为 81%,纯度为 83%,细胞释放存活率超过 80%。此外,此方法还在真实孕妇外周血中成功检测到 fNRBC,平均每毫升为 24 个 fNRBC。总之,该方法为从妊娠期分离 fNRBC 提供了一种具有潜力的策略,并为未来促进 NIPD 的研究提供了新的思路。

二、以纳米材料、微球材料为基础的富集方法

(一)微球技术

Zhang 等^[14]提出了一种微珠捕获方法,该微珠被自组装的二氧化锰纳米颗粒包裹,然后用特异性抗体进行修饰,利用二氧化锰纳米颗粒的三维纳米结构,提高了 fNRBC 的分离效率。随后,通过使用草酸溶解二氧化锰纳米颗粒涂层来释放 fNRBC,该方法在荧光原位杂交和短串联重复序列分析后确认了分离的细胞为 fNRBC,微球的特殊材料特性可有望提高其与循环胎儿细胞的接触概率,提高分离效果。

Dong 等^[15]指出通过将纳米颗粒或纳米球组装到基板上而制造的纳米结构基板具有更大的表面积,从而增强了稀有细胞捕获率。羟基磷灰石纳米颗粒/壳聚糖、生物素聚吡咯和明胶纳米颗粒也被组装在微芯片中,并与抗 CD147 结合,用于从母体血液样本中捕获 fNRBC。这些聚合物纳米颗粒嵌入的微芯片的平均捕获效率为 80%,纯度为 85%,富集得到的 fNRBC 存活率为 90%。微球技术近年来得到了较大的发展,捕获 fNRBC 具有效率高、纯度高、存活率高的特点,是具有发展前景的一项技术。

Wei 等^[16]用 fNRBC 特异性抗体(抗 CD147)对明胶包覆的二氧化硅微珠进行修饰,以捕获血液样本中的目标细胞。然后,微珠结合的 fNRBC 和正常血细胞之间的密度差异可以通过改进的高密度梯度分离方法来进行纯化。通过酶降解微珠表面的明胶膜,可以实现 fNRBC 的无损释放,使捕获的靶细胞温和释放,效率高达 84%,纯度为 80%,这种简单可靠的 fNRBC 检测方法可能具有实现简易 NIPD 的潜力。

(二)纤维材料吸附手段、适配体

1. 基于硅的微流控平台:Ma 等^[17]提出了一种基于硅的微流控细胞富集系统,能够捕获母体外周血中的循环胎儿细胞,捕获的细胞在芯片上进行荧光原位杂交或回收用于分子遗传分析。该平台的捕获率约为 88.1%,在所有受试孕妇的 2 ml 血液成功捕获了 2~71 个 fNRBC,总体捕获率约为 9.75 个 fNRBC 每毫升母体外周血,且捕获的 fNRBC 被证实是胎儿来源。该方法具有较高的捕获效率,在 fNRBC 捕获和非侵入性产前诊断中可能具有一定的应用前景。

2. 基于适配体的 fNRBC 富集:Li 等^[18]提出了一种新的

思路,利用适配体从母体外周血中分离循环胎儿 fNRBC。结果表明,所开发的适配体具有良好的特异性和亲和力,能使 fNRBC 高效富集。与抗体相比,此方法可以在最终富集的产物中获得更高的纯度(>94.0%)和良好细胞活力(>96.0%)的 fNRBC。此外,通过对富集的 fNRBC 的染色体分析,对胎儿性别鉴定和三体综合症的筛查获得了较高的准确性。该方法为筛选 fNRBC 特异性配体提供了一个有效的策略,并显示了基于 fNRBC 的 NIPD 的广泛应用潜力。

这些新型方法同时具备一些明显的优点:(1)利用微流控分选平台精细的微流体优势以及新型纳米材料、微球分选平台独特的材料特征,使循环胎儿细胞的富集敏感性、特异性明显提高;(2)微流控分选平台、纳米材料分离设备尺寸较小、易于不同实验室内布置、开展;(3)微流控分选平台、纳米材料分离往往操作简便,很多方法无须进行预处理,全血样本即可进行直接处理、分析,在一定程度上避免循环胎儿细胞的丢失;(4)微流控分选平台、纳米材料分离更利于进一步的下游分析,如芯片上的免疫荧光反应以及单细胞挑选、单细胞扩增;(5)联合型的微流控芯片可采用多种原理相结合的方式,例如将纳米微球、磁珠与微流控平台结合,进一步提升富集效果。总之,这些新型方法克服了传统方法存在的缺点,展现了新型方法学的独特优势,有望提高外周血稀有胎儿细胞的富集效果。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] Choolani M, Mahyuddin AP, Hahn S. The promise of fetal cells in maternal blood[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2012, 26(5): 655-667. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2012.06.008.
- [2] Emad A, Bouchard EF, Lamoureux J, et al. Validation of automatic scanning of microscope slides in recovering rare cellular events: application for detection of fetal cells in maternal blood[J]. *Prenat Diagn*, 2014, 34(6): 538-546. DOI: 10.1002/pd.4345.
- [3] Zhang H, Yang Y, Li X, et al. Frequency-enhanced transferrin receptor antibody-labelled microfluidic chip (FETAL-Chip) enables efficient enrichment of circulating nucleated red blood cells for non-invasive prenatal diagnosis[J]. *Lab Chip*, 2018, 18(18): 2749-2756. DOI: 10.1039/c8lc00650d.
- [4] Hou S, Chen JF, Song M, et al. Imprinted NanoVelcro Microchips for Isolation and Characterization of Circulating Fetal Trophoblasts: Toward Noninvasive Prenatal Diagnostics[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(8): 8167-8177. DOI: 10.1021/acsnano.7b03073.
- [5] Afshar Y, Dong J, Zhao P, et al. Circulating trophoblast cell clusters for early detection of placenta accreta spectrum disorders[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4408. DOI: 10.1038/s41467-021-24627-2.
- [6] Sonek J, Muller R, Muller-Cohn J, et al. Identification of fetal aneuploidy with dual-probe fluorescence in situ hybridization analysis in circulating trophoblasts after enrichment using a high-sensitivity microfluidic platform[J]. *Prenat Diagn*, 2021, 41(13): 1701-1708. DOI: 10.1002/pd.6046.
- [7] Lin SY, Lu LK, Hsu WF, et al. A Systemic Approach to Isolate, Retrieve, and Characterize Trophoblasts from the Maternal Circulation Using a Centrifugal Microfluidic Disc and a Multiple Single-Cell Retrieval Strategy[J]. *Anal Chem*, 2023, 95(6): 3274-3282. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c04260.
- [8] Wei X, Chen K, Guo S, et al. Emerging Microfluidic Technologies for the Detection of Circulating Tumor Cells and Fetal Nucleated Red Blood Cells[J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2021, 4(2): 1140-1155. DOI: 10.1021/acsabm.0c01325.
- [9] Huang Y, Yu S, Chao S, et al. Isolation of circulating fetal trophoblasts by a four-stage inertial microfluidic device for single-cell analysis and noninvasive prenatal testing[J]. *Lab Chip*, 2020, 20(23): 4342-4348. DOI: 10.1039/d0lc00895h.
- [10] Gur O, Chang CL, Jain R, et al. High-purity isolation of rare single cells from blood using a tiered microchip system[J]. *PLoS One*, 2020, 15(3): e0229949. DOI: 10.1371/journal.pone.0229949.
- [11] Byeon Y, Ki CS, Han KH. Isolation of nucleated red blood cells in maternal blood for Non-invasive prenatal diagnosis[J]. *Biomed Microdevices*, 2015, 17(6): 118. DOI: 10.1007/s10544-015-0021-3.
- [12] Zhang H, Yang Y, Liu Y, et al. Stimuli-Responsive Microfluidic Interface Enables Highly Efficient Capture and Release of Circulating Fetal Cells for Non-Invasive Prenatal Testing[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(13): 9281-9286. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01622.
- [13] Wang Z, Cheng L, Wei X, et al. High-throughput isolation of fetal nucleated red blood cells by multifunctional microsphere-assisted inertial microfluidics[J]. *Biomed Microdevices*, 2020, 22(4): 75. DOI: 10.1007/s10544-020-00531-2.
- [14] Zhang Q, Zhang K, Guo Y, et al. The isolation and analysis of fetal nucleated red blood cells using multifunctional microbeads with a nanostructured coating toward early noninvasive prenatal diagnostics[J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(13): 3047-3054. DOI: 10.1039/d1tb00005e.
- [15] Dong J, Chen JF, Smalley M, et al. Nanostructured Substrates for Detection and Characterization of Circulating Rare Cells: From Materials Research to Clinical Applications[J]. *Adv Mater*, 2020, 32(1): e1903663. DOI: 10.1002/adma.201903663.
- [16] Wei X, Ao Z, Cheng L, et al. Highly sensitive and rapid isolation of fetal nucleated red blood cells with microbead-based selective sedimentation for non-invasive prenatal diagnostics[J]. *Nanotechnology*, 2018, 29(43): 434001. DOI: 10.1088/1361-6528/aad8c4.
- [17] Ma GC, Lin WH, Huang CE, et al. A Silicon-based Coral-like Nanostructured Microfluidics to Isolate Rare Cells in Human Circulation: Validation by SK-BR-3 Cancer Cell Line and Its Utility in Circulating Fetal Nucleated Red Blood Cells[J]. *Micromachines (Basel)*, 2019, 10(2): 132. DOI: 10.3390/mi10020132.
- [18] Li X, Wang T, Xie T, et al. Aptamer-mediated enrichment of rare circulating fetal nucleated red blood cells for noninvasive prenatal diagnosis[J]. *Anal Chem*, 2023, 95(12): 5419-5427. DOI: 10.1021/acs.analchem.3c00115.

