

文章编号:1004-7220(2016)05-0401-07

用于循环肿瘤细胞捕获的鱼骨型微流控芯片的模拟仿真与优化

汪民娇, 王智华, 邓宇亮, 施奇惠

(上海交通大学 系统生物医学研究院, 系统生物医学教育部重点实验室, 上海 200240)

摘要: **目的** 通过对鱼骨型微流控芯片进行模拟仿真与优化, 实现癌症患者外周血中循环肿瘤细胞的高效捕获。**方法** 用 Fluent 15.0 软件对细胞在微流控芯片中的流动进行建模仿真, 通过 MATLAB 编程统计芯片在不同结构参数(鱼骨宽度、鱼骨间隙、鱼骨高度、通道高度)、液体流动方向与流速等条件(共计 250 个条件)下所有细胞可被捕获的位置数目, 预测细胞捕获效率, 并进行实验验证。**结果** 在鱼骨宽度 75 μm 、间隙 125 μm 、深度 70 μm 、通道深度 30 μm 、流体正向且流速 1 mL/h 的条件下, 鱼骨芯片可以达到最高的细胞捕获效率。**结论** 通过计算流体动力学方法对在不同芯片中的细胞捕获进行模拟, 利用 MATLAB 建立捕获效率的统计模型并进行优化, 快速筛选出可获得细胞高效捕获的参数组合, 并通过实验, 对优化的芯片参数进行验证, 实现了循环肿瘤细胞的高效捕获。

关键词: 微流控芯片; 循环肿瘤细胞; 细胞捕获; 流体模拟

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2016.05.401

Analytical modeling and optimization of herringbone micro-fluidic chip for capture of circulating tumor cells

WANG Min-jiao, WANG Zhi-hua, DENG Yu-liang, SHI Qi-hui (*Institute for Systems Biomedicine, Key Laboratory of Systems Biomedicine (Ministry of Education), Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China*)

Abstract: **Objective** To realize the high-efficient capture of circulating tumor cells (CTCs) in the blood of tumor patients by analytic modeling and optimization on the herringbone micro-fluidic chip. **Methods** By simulating the fluid flow within the herringbone chip with Fluent 15.0 and calculating the capture efficiency with MATLAB to understand how geometric parameters (the herringbone groove width, spacing between herringbone grooves, herringbone groove height and channel height), flow rates and flow directions (forward flow, reverse flow) affected the cell-surface contact for capture of the CTCs, the capture efficiency was predicted and then validated by experiments. **Results** The herringbone micro-fluidic chip could achieve the optimal capture rate when the herringbone groove width, spacing between herringbone grooves, herringbone groove height and channel height were 75, 125, 70 and 30 μm , respectively, at a flow rate of 1 mL/h with forward direction. **Conclusions** In this study, cell capture in different micro-fluidic chips is simulated by the method of computational fluid dynamics. The statistic model of capture efficiency is established by MATLAB and optimized to quickly screen a group of physical parameters for high-efficient cell capture. These optimized micro-fluid chip parameters are validated by experiment, which can realize the high-efficient capture of CTCs.

Key words: Micro-fluidic chip; Circulating tumor cells (CTCs); Cell capture; Fluidic simulation

收稿日期:2016-04-07; 修回日期:2016-04-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(81371712), 上海市自然科学基金项目(13ZR145610), 高等学校博士学科点专项科研基金(20130073120106)。

通信作者: 施奇惠, 教授, Tel: (021)34206632; E-mail: qihuishi@sjtu.edu.cn。

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是指从肿瘤病灶脱落并进入血液循环的肿瘤细胞^[1],其能反映肿瘤病灶的分子特征,也是造成肿瘤血行转移的主要原因之一^[2-5]。然而,癌症患者外周血中的CTCs十分稀少,每毫升血液中有多达1千万个白细胞和50亿个红细胞,但仅有几个至几百个CTCs^[6]。美国强生公司的CellSearch系统是目前唯一获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准的CTCs检测设备^[7],但其对CTCs的捕获效率有限且检测成本很高。因此,如何从癌症患者外周血中高效分离CTCs成为肿瘤“液态活检”所面临的重大挑战之一。

微流控技术是一种在微米尺度流道内对液体进行操纵或控制的技术,具有低试剂样本消耗、快速、低成本、高通量、使用简便等优点。将微流控芯片用于循环肿瘤细胞的捕获,捕获方法可分为物理法和生物化学法两大类。目前常用而经典的应用中,属于物理法的有微结构过滤^[8]、惯性分选^[9]、确定性侧向位移^[10]等,属于生物化学法的有借助磁场力的免疫磁珠捕获法^[11]和无需外力场的被动式捕获法^[12]等。微流控芯片经过精心设计,可实现少量血液中循环肿瘤细胞的高效、低成本捕获。最近,有研究报道了一种新的微流控芯片设计,采用惯性分选的原理,高效、高纯度捕获/释放CTCs^[13]。

鱼骨型芯片结构最早由Stroock等^[14]提出,这种结构可以打破低雷诺数时的层流状态,使流线呈现出一种螺旋的形态,从而达到液体混合的目的。该结构在被报道后引起了研究者的广泛关注,并将其拓展到微流控芯片的多种应用中^[15-17],包括DNA分子杂交^[18]、抗原抗体结合^[19]以及微粒分选等^[20]。由于芯片中的鱼骨结构可以增加细胞和壁面之间的碰撞几率,故鱼骨型微流控芯片被用于CTCs捕获;但鱼骨型结构参数较多,再加上液体流动方向与流速的变化,目前对鱼骨型芯片捕获CTCs的系统性模拟仿真与实验验证还鲜有报道^[21]。在抗体负载的微流控芯片中捕获细胞需要满足两个条件,一是细胞中心距离芯片的壁面小于细胞半径,二是细胞在该处所受的剪切力小于细胞表面抗原与壁面上负载的抗体之间的作用力。以往文献虽有分析过细胞与壁面的碰撞情况,但没有分析碰撞时的速度,即力学的分析,同时也未深入分析鱼骨型芯片各种结构

参数、液体流动方向与流速对细胞捕获的影响^[22]。

本研究通过模拟鱼骨型芯片内的流场,探讨鱼骨宽度、间隙、高度和通道高度这些结构参数以及液体流动方向与流速对CTCs捕获的影响,从而筛选得到优化的参数,并进行实验验证。

1 材料和方法

1.1 鱼骨型芯片用于CTCs捕获的数值模拟

1.1.1 几何结构与变量说明 基本算例中,模型全长约15.77 mm,通道上面加工有5个周期不对称、相互错开的鱼骨型微槽;每个周期包含12个微槽,一共有60个鱼骨型微槽,这种设计可保证液体充分混合^[13];微槽臂以1:2及2:1两种比例间隔分布,与芯片的前、后侧面夹角 $\theta = 45^\circ$,两鱼骨侧壁之间的夹角 $\gamma = 90^\circ$,每6个鱼骨一组;通道宽1 mm;一个鱼骨微槽周期(鱼骨槽与鱼骨间隙的宽度和)的 $W_T = 200 \mu\text{m}$,其中鱼骨的宽度为 μW_T ;微流控芯片内结构的总深度 $H = 100 \mu\text{m}$,其中鱼骨的深度为 λH (见图1)。

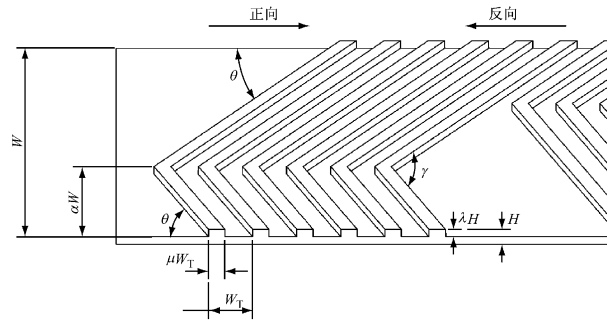


图1 鱼骨型芯片的几何结构示意图

Fig. 1 Schematic illustration of the herringbone micro-fluidic chip

为了寻找最优化条件,研究鱼骨型芯片的几何结构、液体流动方向和流速3种变量对芯片上细胞捕获效率的影响。其中,鱼骨芯片的几何结构通过改变比例宽度系数 μ 、深度系数 λ 来进行调整, $\mu = 0.25, 0.375, 0.5, 0.625, 0.75, \lambda = 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7$,共计 $5 \times 5 = 25$ 种不同的几何结构。图2显示了不同 μ 值下5种鱼骨型芯片的俯视图。液体的流动方向有两种,如图1所示正向为自左向右,反向为自右向左。液体流速 $v = 1, 2, 3, 4, 5 \text{ mL/h}$ 。因此,共计 $25 \times 2 \times 5 = 250$ 种不同的情况,这也充分说明了进行模拟仿真来筛选优化条件的必要性。

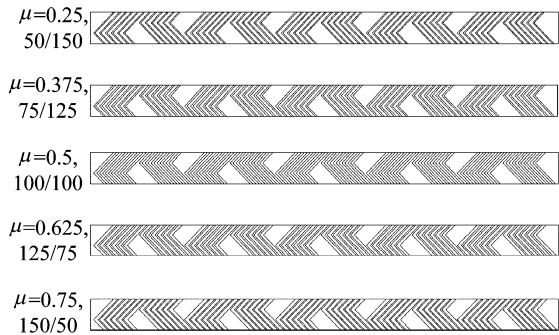


图2 不同 μ 值下鱼骨型芯片的俯视图

Fig.2 Top-view of the herringbone micro-fluidic chip under different μ values

1.1.2 鱼骨型芯片的网格划分 用 Gambit 对模型划分网格,使用六边形/楔形(Hex/Wedge)的网格类型。为保证计算精度同时控制网格数目,分子区域划分网格,当尺寸大于 $50 \mu\text{m}$ 时,网格尺寸为 $10 \mu\text{m}$;小于 $50 \mu\text{m}$ 时,网格的尺寸是(深度/5)。

1.1.3 鱼骨型芯片内流体的迭代计算 在计算及统计之前,需要先对芯片上细胞捕获的模型进行简化,并做出如下假设与求解器设置:

(1) 计算域特征尺寸小($10 \mu\text{m}$ 级),雷诺数小于 100,流动模型选为层流(viscous model);

(2) 血液样本在裂解红细胞后用磷酸盐缓冲液重悬细胞,可视为液体水(water-liquid),即设置流动域(cell zone conditions)为液体水;

(3) 所模拟的肿瘤细胞为刚体小球,流动时跟随液体,故将流线视为细胞的轨迹线;

(4) 忽略细胞之间的相互作用;

(5) 因肿瘤细胞数目很少,故假设细胞从芯片入口处中间位置进入芯片。

设置入口条件为速度入口边界,根据不同流量大小与入口面积计算入口速度;出口条件为压力出口边界,大小为大气压,即表压(gauge pressure)为 0。初始化,计算直至残差曲线平稳。

1.2 计算芯片上 CTCs 的捕获效率

1.2.1 芯片上 CTCs 捕获统计模型的建立 通过灌注的方式在鱼骨型芯片表面修饰抗体,故芯片内的各个壁面都修饰有抗体,可以捕获 CTCs。

为统计芯片上 CTCs 的捕获情况,作出如下假设及简化:

(1) 循环肿瘤细胞一般比血细胞大,大于 $10 \mu\text{m}$ 。为方便统计分析,假定 CTCs 的半径为 $8 \mu\text{m}$;

(2) 流线(细胞轨迹线)与壁面的距离小于细胞半径时,细胞与壁面发生碰撞;

(3) 仅与壁面碰撞的肿瘤细胞能与壁面负载的抗体发生相互作用;

(4) 细胞视为刚体球,仅受斯托克斯阻力(剪切力)及抗原抗体间的黏附力,当剪切力小于黏附力时,细胞可被捕获。在液体中运动的球所受到的剪切力公式为:

$$F = 6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot u(r) \quad (1)$$

式中: η 为液体的黏滞系数,单位 $\text{Pa} \cdot \text{s}$; r 为球的半径,单位 μm ; $u(r)$ 为球表面流体的速度,单位 m/s 。

根据文献[24],细胞表面抗原与固体表面所负载的抗体之间黏附力约为 1.47 nN ,代入式(1)后计算捕获细胞的截止速度,为 $9.67 \mu\text{m/s}$,故认为当细胞中心到壁面距离小于 $8 \mu\text{m}$ 且其速度低于截止速度 $9.67 \mu\text{m/s}$ 时,细胞可被芯片的壁面所捕获,这一碰撞为有效碰撞。通过统计在芯片中所有有效碰撞的数目,从而评估芯片的捕获效率。

1.2.2 芯片上 CTCs 捕获情况统计分析的程序 MATLAB 统计时,主程序读取所有拟合点的坐标值与速度值后,在子程序中先提取流线中被壁面捕获的点,再利用捕获点的坐标值与速度值进行分类,统计鱼骨型芯片中不同区域的捕获情况,绘制可视化图形。

1.3 用微流控芯片捕获 CTCs

EpCAM 是上皮细胞普遍表达的标志物,故 EpCAM 可用于上皮来源的肿瘤细胞的捕获与鉴定,包括结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌等等。基于 EpCAM 捕获血液中的 CTCs 是 CellSearch 系统采取的策略,也是目前主流的基于肿瘤细胞表面抗原捕获 CTCs 的通用方法。选用表面表达 EpCAM 的结肠癌细胞用于实验。

具体的实验步骤如下:对 50 个 EpCAM 阳性的结肠癌细胞 HCT116 进行荧光染色;之后将其掺杂到 1 mL 健康人血液中;然后裂解红细胞并将剩余细胞重悬于 2 mL 磷酸盐缓冲液中;将重悬后的细胞悬液灌注到修饰有 Anti-EpCAM 抗体的鱼骨型芯片中;灌注完以后利用荧光显微镜对芯片内有荧光标记的肿瘤细胞进行计数,计数捕获效率。

2 结果

2.1 鱼骨型芯片内的流体模拟

基于1.1.3节的简化与假设,选取100条发自于入口面中间高度位置的流线,导出流线图(见图3)。通过对比可知,直通道内流线是顺着流动方向呈直线分布,仅在壁面附近的颗粒才能与壁面碰撞,而鱼骨型芯片内流线呈螺旋向前,故可以增加其中颗粒与不同的壁面的碰撞概率。

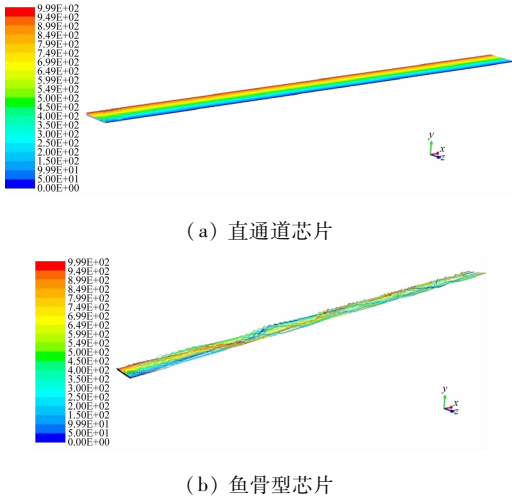


图3 微流控芯片通道内的流线模拟图
Fig.3 Simulated streamline diagram of the pathlines in the micro-fluidic chip (a) Straight channel, (b) Herringbone channel

取 $\mu = 0.625$ 、 $\lambda = 0.7$ 、 $v = 1$ mL/h 这一组参数,绘制3个不同位置的截面的速度云图(见图4)。可以看出,鱼骨微槽内速度较通道内低。在低速下,由于剪切力较低,常低于抗原抗体间的黏附力,故细胞更容易被捕获。

2.2 细胞在鱼骨型芯片内的碰撞情况

将微流控芯片内的壁面分为3类:鱼骨微槽中的上面和侧面(herringbone groove top and sides, HB),通道上表面(channel top, CT)以及通道底面和侧面(channel bottom and sides, CBS)。

图5所示为5种不同流速下碰撞点沿鱼骨型槽高度方向的投影图,同时用颜色来表征碰撞时的速度,鱼骨型芯片结构参数固定为 $\mu = 0.625$ 、 $\lambda = 0.5$,即鱼骨宽度125 μm ,鱼骨间隙75 μm ,鱼骨深度50 μm ,通道高度50 μm 。从图中可以发现,HB面

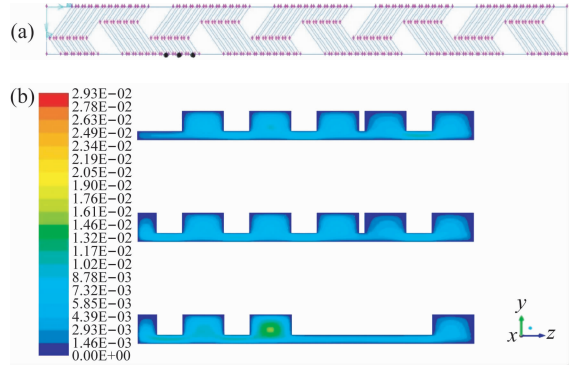


图4 鱼骨型芯片内3个截面的速度云图 (a) 取黑点所在的3个横截面绘制速度云图(从左到右坐标值依次为 $x = 3.7, 4.1, 4.5$ mm), (b) $x = 3.7, 4.1, 4.5$ mm处横截面的速度云图(从上到下)

Fig.4 Velocity contour in 3 different cross-sections of herringbone micro-fluidic chip (a) Location of the 3 cross-sections indicated by black points (from left to right, $x = 3.7, 4.1, 4.5$ mm), (b) Velocity contours at the location of $x = 3.7, 4.1, 4.5$ mm (from top to bottom)

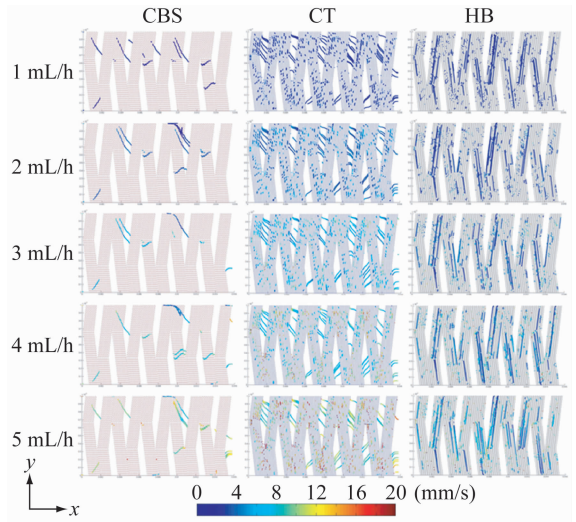


图5 不同流速下壁上碰撞点投影图($\lambda = 0.5, \mu = 0.625$)
Fig.5 Simulated surface contact at different flow rates

和CT面的点远远多于CBS面,即流线与HB面和CT面的碰撞远远多于CBS面,说明细胞在鱼骨型芯片中与壁面的碰撞主要发生在鱼骨内以及通道的上表面,这与Forbes等^[22]的研究结果一致。

从图5中投影点的颜色分布分析碰撞点的速度。一方面,在单个算例中,可以发现在鱼骨内的碰撞点的速度远远小于通道内碰撞点的速度,由1.2.1节分析可知,速度越小,细胞所受的剪切力越小,在

抗原抗体作用力不变的情况下也就越容易被捕获。另一方面,考虑同一种碰撞面的碰撞点在不同流速下的情况,发现当芯片入口流速比较低时,流线与芯片各壁面的碰撞点更多,同时碰撞点处的速度也较低,表示低速时细胞更容易被捕获。

2.3 鱼骨型芯片捕获效率的评估

将速度考虑进去,用有效捕获点(碰撞点中速

度低于捕获截止速度的点)评估芯片的捕获效率,同时计算不同参数条件下的线捕获效率(contacting streamlines, CS),即具有有效捕获点的流线数目占所有流线的比例以及点捕获效率(contacting points, CP),即有效捕获点的数目占所有点的比例,结果如表1所示(仅展示线捕获效率高于90%的算例,液体流动方向为正向)。

表1 不同结构参数(鱼骨宽度/间隙宽度/鱼骨深度/通道深度)及入口流速下点捕获效率和线捕获效率(流动方向为正向)

Tab.1 Percentages of CS and CP with different geometrical parameters (herringbone groove width/ spacing between herringbone grooves/ herringbone groove height/ channel height) and inlet flow rates (forward flow)

$v/(\text{mL} \cdot \text{h}^{-1})$	75/125/50/50		100/100/50/50		125/75/50/50		150/50/50/50	
	CS/%	CP/%	CS/%	CP/%	CS/%	CP/%	CS/%	CP/%
1	—	—	96	9.75	98	6.88	99	4.93
2	—	—	96	10.11	96	7.83	99	4.99
3	—	—	96	12.30	95	5.76	99	4.66
4	—	—	95	11.37	97	6.21	96	3.62
5	—	—	90	6.85	96	3.79	96	2.26
$v/(\text{mL} \cdot \text{h}^{-1})$	75/125/60/40		100/100/60/40		125/75/60/40		150/50/60/40	
	CS/%	CP/%	CS/%	CP/%	CS/%	CP/%	CS/%	CP/%
1	98	23.97	100	18.67	100	8.86	100	4.82
2	98	22.29	100	17.07	100	8.08	100	5.05
3	98	21.92	100	9.72	100	9.82	100	4.02
4	97	21.07	98	11.90	100	6.61	100	3.3
5	92	17.09	91	3.26	99	2.50	97	2.59
$v/(\text{mL} \cdot \text{h}^{-1})$	75/125/70/30		100/100/70/30		125/75/70/30		150/50/70/30	
	CS/%	CP/%	CS/%	CP/%	CS/%	CP/%	CS/%	CP/%
1	100	22.13	100	13.09	100	6.05	100	8.44
2	100	17.12	100	5.72	100	4.32	100	6.32
3	100	16.39	99	6.41	100	1.35	100	4.43
4	94	11.36	95	0.92	90	0.67	100	3.24
5	—	—	—	—	—	—	100	3.69

2.4 鱼骨型芯片捕获效率的实验验证

实验需要大量时间与材料成本,相比而言,模拟统计的方法可快速筛选出实现高效碰撞的参数条件,同时具有高的线捕获效率和点捕获效率的参数条件显然更有利于鱼骨型芯片对 CTCs 的捕获,故选取线捕获效率 >98% 和点捕获效率 >10% 的参数条件进行实验。由 2.2 节的结论可知,流速越低细胞越容易被捕获,结合本课题组以往的经验,将流速定为 1 mL/h,再从中选出几组结构参数,其中包括

液体正向流动下的 4 个条件与反向流动下的 6 个条件。

结果如图 6 所示。对实验数据进行统计学的分析,发现参数 75/125/70/30 (1 mL/h, 平均捕获率 90%) 与参数 100/100/60/40 (1 mL/h, 平均捕获率 88%) 以及参数 100/100/70/30 (1 mL/h, 平均捕获率 85%) 之间没有显著性差异,但仅有 75/125/70/30 (1 mL/h, 平均捕获率 90%) 这一组参数与除上述两组参数外的其他所有参数之间均存在显著性差

异,故可以认为 75/125/70/30 (1 mL/h) 是最优的参数。从计算结果来看,3 组结构参数下线捕获率均为 100%,即所有细胞所在的流线均有机会与抗体修饰的壁面进行至少一次有效碰撞,而点捕获率,即所有有效碰撞点的数目占有所有点的数目则不相同,其中参数 75/125/70/30、100/100/60/40、100/100/70/30 的点捕获率分别为 22.13%、18.67%、13.09%。可以发现,计算所得的有效碰撞次数与实验所得的捕获率有一致性。

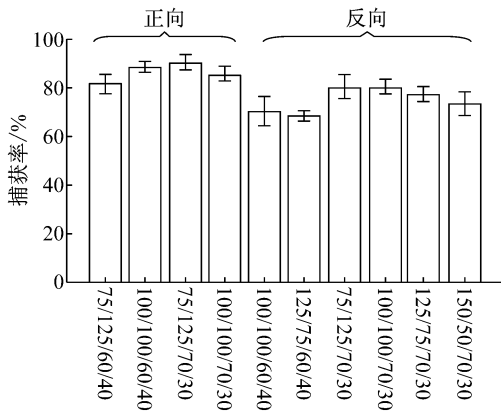


图6 模拟统计选出的参数在实验中的捕获效率

Fig. 6 Capture efficiencies in the herringbone chips with physical parameters selected by computation modeling

3 讨论

循环肿瘤细胞一般存在于肿瘤患者外周血中,数量稀少却具有重要临床意义,它提示了体内肿瘤的存在及转移的可能,可以为肿瘤的诊断治疗提供重要信息。微流控芯片经过精心设计,可实现少量血液中循环肿瘤细胞的高效、低成本捕获。

Stott 等^[12]设计出具有鱼骨型沟槽的微流控芯片,它在直通道的顶端分布有周期性鱼骨型结构的沟槽,该结构大大提高了被血细胞包围的循环肿瘤细胞与修饰有抗 EpCAM 抗体的通道表面的接触概率,Forbes 等^[22]第一次用计算流体力学 (computational fluid dynamics, CFD) 模拟仿真与统计的方法探究鱼骨型芯片中颗粒与各种壁面碰撞的情况,快速筛选出捕获效率高的参数。本研究工作基于流线的捕获效率计算与 Forbes 等^[22]的工作原理是一致的,原理上可行;结果与实验中实际观察到的现象是

吻合的,即细胞基本被捕获在鱼骨结构内以及通道的上表面,而非下表面。相比于 Forbes 对鱼骨型芯片的模拟优化,本研究一方面将碰撞点的速度考虑进去,速度决定剪切力,剪切力越大细胞被捕获的效率越低;并且不仅计算了线捕获效率,还将流线与壁面碰撞次数考虑进去,计算点捕获效率,显然一条流线上只有 1 个捕获点与有 100 个捕获点是完全不同的。另一方面,将模拟统计中效率高的参数条件用于实验去验证计算结果,在实验中获得了 90% 以上的捕获效率。

但由于条件限制,本研究建模时将细胞视为刚体并假设其随流,忽略了细胞的弹性及细胞间的相互作用,将血液的流线视为细胞的轨迹线。下一步的研究计划在建模时将细胞视为离散相,将细胞的黏弹性与细胞间的相互作用加入考虑,单独探究细胞的运动轨迹。

参考文献:

- [1] ASHWORTH TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death [J]. Aust Med J, 1869, 14(3): 146-149.
- [2] PANTEL K, ALIX-PANABIÈRES C. Circulating tumour cells in cancer patients: Challenges and perspectives [J]. Trends Mol Med, 2010, 16(9): 398-406.
- [3] BRUGGER W, BROSS KJ, GLATT M, et al. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumor [J]. Blood, 1994, 183(3): 636-640.
- [4] 傅怡, 吴洁, 孙仁, 等. 造影红细胞对剪切流中肿瘤细胞黏附的影响[J]. 医用生物力学, 2015, 30(2): 99-103.
FU Y, WU J, SUN R, et al. Effects of ghost red blood cells on tumor cell adhesion in shear flow [J]. J Med Biomech, 2015, 30(2): 99-103.
- [5] 傅怡, 王洋, 白帆, 等. 细胞浓度比对剪切流中肿瘤细胞黏附的影响[J]. 医用生物力学, 2015, 30(5): 392-396.
FU Y, WANG Y, BAI F, et al. The effect of concentration ratio on tumor cell adhesion in shear flow [J]. J Med Biomech, 2015, 30(5): 392-396.
- [6] FISCHER AH. Circulating tumor cells: Seeing is believing [J]. Arch Pathol Lab Med, 2009, 133(9): 1367-1369.
- [7] SASTRE J, MAESTRO ML, PUENTE J, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: Correlation with clinical and pathological variables [J]. Ann Oncol, 2008, 19(5): 935-938.

- [8] 刘大渔, 严伟, 梁广铁, 等. 过滤式微流控芯片上的循环肿瘤细胞分选[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(6): 366-370.
- [9] SUN JS, LI MM, LIU C, *et al.* Double spiral microchannel for label-free tumor cell separation and enrichment [J]. *Lab Chip*, 2012, 12(20): 3952-3960.
- [10] LIU ZB, HUANG F, DU JH, *et al.* Rapid isolation of cancer cells using microfluidic deterministic lateral displacement structure [J]. *Biomicrofluidics*, 2013, 7(1): 97-106.
- [11] HUANG YY, CHEN P, WU CH, *et al.* Screening and molecular analysis of single circulating tumor cells using micro-magnet array [J]. *Sci Rep*, 2015, 5, DOI: 10.1038/srep16047.
- [12] STOTT SL, HSU CH, TSUKROV DI, *et al.* Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(43): 18392-18397.
- [13] YEO T, TAN SJ, LIM CT, *et al.* Microfluidic enrichment for the single cell analysis of circulating tumor cells [J]. *Sci Rep*, 2016, 6, DOI: 10.1038/srep22076.
- [14] STROOCK AD, DERTINGER SK, AJDARI A, *et al.* Chaotic mixer for microchannels [J]. *Science*, 2002, 295(5555): 647-651.
- [15] STROOCK AD, DERTINGER SK, WHITESIDES GM, *et al.* Patterning flows using grooved surfaces[J]. *Anal Chem*, 2002, 74(20): 5306-5312.
- [16] WILLIAMS MS, LONGMUIR KJ, YAGER P. A practical guide to the staggered herringbone mixer [J]. *Lab Chip*, 2008, 8(7): 1121-1129.
- [17] HOWELL PB, MOTT DR, FERTIG S, *et al.* A microfluidic mixer with grooves placed on the top and bottom of the channel [J]. *Lab Chip*, 2005, 5(5): 524-530.
- [18] LYNN NS, DANDY DS. Geometrical optimization of helical flow in grooved micromixers [J]. *Lab Chip*, 2007, 7(5): 580-587.
- [19] LIU J, WILLIAMS BA, GWIRTZ RM, *et al.* Enhanced signals and fast nucleic acid hybridization by microfluidic chaotic mixing [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45(22): 3618-3623.
- [20] FOLEY JO, MASHADI-HOSSEIN A, FU E, *et al.* Experimental and model investigation of the time-dependent 2-dimensional distribution of binding in a herringbone microchannel [J]. *Lab Chip*, 2008, 8(4): 557-564.
- [21] HSU CH, CARLO DD, CHEN CD, *et al.* Microvortex for focusing, guiding and sorting of particles [J]. *Lab Chip*, 2008, 8(12): 2128-2134.
- [22] FORBES TP, KRALJ JG. Engineering and analysis of surface interactions in a microfluidic herringbone micromixer [J]. *Lab Chip*, 2012, 12(15): 2634-2637.
- [23] ARIYASU S, HANAYA K, WATANABE T, *et al.* Selective capture and collection of live target cells using a photoreactive silicon wafer device modified with antibodies via a photocleavable linker [J]. *Langmuir*, 2002, 28(36): 13118-13126.