



Views & Comments

利用微流控技术应对 COVID-19 和其他肺部疾病的全球挑战

Yuliang Xie^a, Ryan Becker^b, Michael Scott^a, Kayla Bean^a, Tony Jun Huang^c^a Roy J. Carver Department of Biomedical Engineering, College of Engineering, University of Iowa, Iowa City, IA 52242, USA^b Department of Biomedical Engineering, Pratt School of Engineering, Duke University, Durham, NC 27710, USA^c Department of Mechanical Engineering and Materials Science, Pratt School of Engineering, Duke University, Durham, NC 27710, USA

1. 引言

当前，肺部疾病已经成为人类社会面临的最严重的威胁之一。自2019年年底以来，新型冠状病毒肺炎（COVID-19，简称新冠肺炎）在世界范围内肆虐横行，以迅雷不及掩耳之势悄然改变了人类的生活方式，对政治、文化产生了重大的影响。由新冠肺炎引发的肺功能障碍成为病患死亡的主要原因[1]。更有甚者，因为肺部感染，引发严重的心血管损伤[2]和神经系统问题[3]，从而可能导致慢性健康问题。例如，普通人罹患中风和心力衰竭的风险成倍增加。新冠肺炎疫情暴发之前，传染性呼吸道疾病，如严重急性呼吸综合征（SARS）、中东呼吸综合征和流感已经造成数百万人死亡。而哮喘、慢性阻塞性肺病（COPD）、囊性纤维化、特发性肺纤维化（IPF）和肺癌等慢性呼吸道疾病继续影响着世界各地数百万人。

肺部疾病的诊断通常需要在实验室中对DNA进行扩增和测序，完成病原体培养、免疫染色和医学图像分析等相关步骤。而在新冠肺炎疫情不断蔓延的严峻时刻，这种诊断方式暴露出极大的局限性，全球范围内现场采集的样本无法实现快速检测并提供准确的结果。新冠肺炎诊断的缺点凸显了现有测试的一些基本局限性，并激发了对所有肺部疾病诊断技术创新的巨大需求。对那些已经确诊的患者来说，治疗中的主要障碍也会使许多肺部疾病变得致

命。目前，肺部疾病的治疗主要依赖口服或静脉注射药物，通过血液循环到达气道。除了递送至靶器官的效率较差之外，这些递送方法存在高度的非特异性，并且有可能对多个非预期末端器官产生毒性。理想的情况是使用定制的输送方法，能够通过气道准确无误地将药物及时输送到目标器官（即肺部）。

除诊断和治疗之外，要深入了解肺部疾病那些不为人知的秘密，疾病建模方面取得突破和不断创新十分重要。各类医学研究全面揭示了疾病导致的后果，但往往无法揭示潜在的病理生理学。虽然动物模型被广泛应用于疾病研究，但由于其气道结构与人类存在较大差异，这类模型通常无法准确再现病患肺部疾病演变的全过程，影响人们对症状进展和治疗效果的理解。虽然体外细胞研究让人们们对疾病形成和发展的基本机制有所认知，但它们无法复制气道中出现的各类细胞，也无法还原细胞之间的相互作用、身体内部复杂的生理环境及身体组织的微环境。要想更加深入地了解疾病的变化，开发更有效的治疗方法，需要采用更加优化的肺部疾病研究模型来解决上述问题。

2. 微流控技术在肺部疾病治疗中的应用

微流控是一个广泛的技术领域，能够在微纳米尺度空间中操纵流体和颗粒，将声波震动、毛细管传输、光或电

磁场释放的“能量”转化为驱动力（表1 [4–9]）。这些技术可以驱动流体并逆着层流移动颗粒。微流控技术具有多种特质，使其成为了生物医学领域开展科研的不二选择（图1）[10]。首先，微流控技术像一个“多面手”，既能驾驭从几纳米到几毫米大小的物体，又能自如地控制各种物体，如液体、分子、颗粒、细胞，以及小型模式生物，如斑马鱼和秀丽隐杆线虫等。这对肺部疾病研究和治疗具有十分重要的价值。从时间层面上来说，微流控技术可以从微秒（如荧光激活细胞分选中的粒子偏转[11]）横跨至数天（如细胞图案化培养）。这些技术可实现多种功能，如液体转移、混合、提取、颗粒平移、分选、配对和聚集等。其次，微流控技术具有生物相容性，在极低的振幅下也可以通过驱动力工作，能够最大程度地减少或防止细胞和生物分子受到损伤或发生功能性变化。再次，微流控技术适应性强。由于它们的外形尺度，诸如通道设计、设备材料和电源等都可以进行修改，因此能够被更好地集成到更多的仪器或设备当中。最后，与传统方法相比，微流控装置的体积更加精巧，对试剂的消耗更少。大的比表面积使其能够快速散热，在生理相关温度下能够有效处理流体中的悬浮分子和细胞。

表1 微流控技术在肺部疾病诊疗中的机制及应用[4–9]

Microfluidic technologies	Applications in pulmonary disease	Refs.
Acoustic manipulation	Model of particles inhalation	[4–5]
	Model of mucus production	[6]
	Drug delivery	[4]
Droplet manipulation	Influenza biomarker detection	[7]
Electromagnetic focusing	Identification of multiple viruses	[8]
Electrophoresis manipulation	SARS-CoV-2 CRISPR assay	[9]

SARS-CoV-2 CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) assay in to detecting SARS-coronavirus 2 (CoV-2).

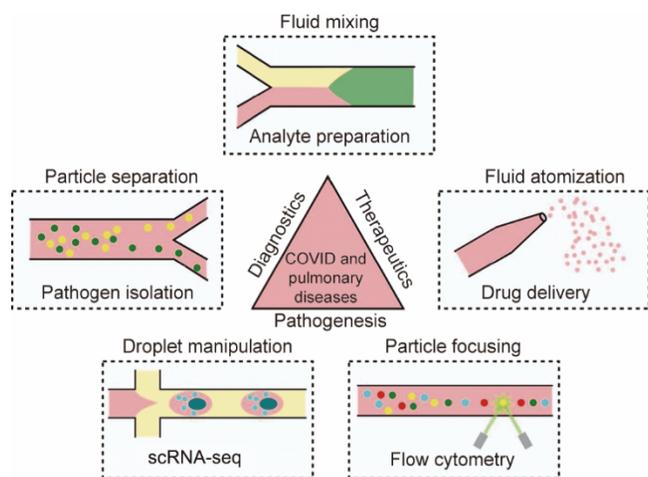


图1. 流体、颗粒和细胞的微流控操作在基础生物学研究、诊断以及新冠肺炎和其他肺部疾病治疗中的应用。

尽管微流控技术优势明显，但在肺部疾病研究和临床实验室中，对于流体和颗粒的研究，样本离心、振荡、混合、过滤、提取和二维（2D）细胞培养这些传统操作方法依然颇受拥趸，长期占据“C位”。想要进一步扩大微流控技术在肺部疾病研究和治疗领域的应用，就要对其出现的背景进行深入了解。众所周知，绝大部分科研项目需要在实验室内完成，各项经费保障到位，需要高度标准化的流程和协议来确保成果的有效性和可重复性。但许多微流控技术标准化程度不够完善，制约了研究人员的积极性，转而对那些存在极大限制的传统设备和操作流程趋之若鹜。但是，诊断（尤其是即时诊断）通常需要在条件有限的环境中进行。为了让微流控装置更好地发挥作用，就必须减少它们对笨重设备的依赖。现在的微流控技术能够与低功耗驱动器（如手机的通用串行总线，即USB端口）集成，并利用无显微镜检测方法（如手机上的相机）进行检测，在仪器设备得到简化的同时，集成后的快速诊断设备也让即时护理变为现实[12]。

3. 微流控技术在肺部疾病研究中的应用

商业化的微流控设备已被应用于分析单细胞水平肺部疾病的机制。在单细胞分析中，从单个细胞中获取遗传、表观遗传和（或）蛋白质组学信息，然后对信息进行进一步整合，以此来研究和解释细胞、细胞状态和环境之间的相互作用[13]。例如，通过设计用于液滴产生和操作的微流控系统，获取了高通量单细胞RNA测序技术（scRNA-seq）[14–15]（图1），并将其成功应用于实际研究。根据离子细胞主要决定离子的跨膜转运这一特性，通过识别离子细胞[16–17]来揭示囊性纤维化的转录组。在另一个案例中，利用流体动力学聚焦和光学检测的流式细胞术在单细胞水平上研究肺部疾病的细胞表型（图1）。Woodruff等[18]通过高维流式细胞术对B细胞反应进行表征，揭示了新冠肺炎患者体内效应细胞和未成熟细胞群存在的显著异质性。

微流控技术也可以用于在细胞水平上建立疾病模型。研究人员使用这些设备将细胞、细菌和寄生虫聚集在一起，以研究疟疾等非肺部疾病的发病机制[19]。在研究肺部疾病的过程中，这种方法可以揭示细菌性疾病的发病机制。与一次只能研究一种细胞类型的传统体外研究相比，此种技术的另外一个潜在优势是可以同步培养多种细胞类型，并且可以更准确地模拟上皮系统的复杂气道[20]。

除了细胞研究之外，微流控作为一种基于细胞、组织和器官水平用于开发疾病模型的工具而拥有巨大的发展前

景。最近，微流控技术侧重于类器官的开发和研究[21]，并被广泛用于研究新冠肺炎[22]和其他气道疾病（包括囊性纤维化、哮喘和癌症）的发病机制[23]。微流控方法以可控和可重复的方式聚集悬浮细胞形成类器官[24]。此外，该类技术还可用于对类器官施加不同程度的机械刺激、化学梯度和剪切应力，以此来分析和研究这些变量如何影响类器官生理学[21]。

此外，肺部疾病的发生可以使用微流控非生物系统进行建模。微流控雾化器[4]能够模拟咳嗽或打喷嚏时飞沫和病原体从鼻子及嘴巴中喷射而出的传播过程。这些模型可以帮助科学家对疾病通过空气传播的机制进行更精准的研究。微流控技术还被用于开发黏膜下腺黏液分泌过程的模型[6]，黏膜下腺是气管和支气管黏液产生的主要部位。在声波驱动下，黏液从含有黏蛋白的囊泡中释放出来，在不同的pH值条件下形成黏液丝，然后引入气流以清除黏液丝，模仿气道上皮纤毛的跳动。这项研究表明，由于囊性纤维化跨膜传导调节因子（CFTR）功能的丧失，黏膜下腺的pH值降低，会损害气道表面黏液的清除，因此，黏膜下腺是囊性纤维化早期发病机制的关键部位。

4. 微流控技术在肺部疾病诊断中的应用

微流控技术非常适合分析物制备（如混合、裂解和聚焦）（图1）。最近科研人员发现，电场梯度可用于在微流控芯片上共同聚焦 Cas12 引导 RNA（gRNA）、报告基因和靶标，以有效加速试剂的混合，以此来检测 SARS-冠状病毒 2 型（CoV-2）成簇的规则间隔短回文重复序列（CRISPR）[9]。通过此种方法，该研究小组在小样本体积（约 100 pL）的微流控芯片上完成了对 SARS-CoV-2 RNA 的快速检测（从采集鼻咽拭子原始样本到得出结果仅需 35 min）。基于实时比色法，Wang 等[8]开发出一种可诊断多种呼吸道病毒的微流控系统。将磁珠与具有集成等温扩增能力的多通道阵列芯片相结合，以此来进行核酸提取，实现了对多种流感病毒和腺病毒高特异性（100%）和高灵敏度（96%）的检测。在另一项研究中，Deng 等[25]利用微流控设备的热泳效应开发了新冠肺炎的快速诊断平台。这种方法将适配体与 SARS-CoV-2 刺突蛋白相结合，通过用温度和聚乙二醇（PEG）浓度梯度分离进行检测。研究人员在 15 min 的处理时间内，达到了每微升约 170 个颗粒（刺突蛋白 $26 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）的检测上限。

微流控技术还可以通过分离和分析病原体、病毒、细胞外囊泡和 DNA 来帮助诊断肺部疾病（图1）。例如，微流控纳米颗粒操作技术被成功用于实施游离细胞 DNA 分离，

而其作为液体活检潜在生物标志物的特殊“身份”引发了外界的极大关注。最近一项研究[26]将患有流感和（或）呼吸道合胞病毒的患者与健康对照组进行比较，发现新冠肺炎患者的游离 DNA 水平升高，且组织来源不同。在另一项研究[27]中，非小细胞肺癌患者的血浆游离 DNA 水平明显高于慢性呼吸道炎症患者和健康人群。

除了能够分离游离细胞 DNA，微流控纳米颗粒操作技术还可用于从生物流体中分离和检测细胞外囊泡。Rosell 等[28]发现新冠肺炎感染会诱导组织因子表达，造成循环组织因子阳性细胞外囊泡水平增高。研究发现，细胞外囊泡在慢性阻塞性肺疾病、肺动脉高压、肺纤维化和哮喘等病理学研究中具有十分重要的意义[29]。Wu 等[30]证明了声流控技术能够从全血样本中快速分离外泌体（一种特殊类型的细胞外囊泡），且这种外泌体具有极高的纯度（98%）和产量（82%）。在之前肺部疾病诊疗中，基于外泌体的诊断和治疗困难重重，这一研究成果不但让声流控技术成为了实施外泌体分离的重要操作手段，也在生物学和医学领域大放异彩，展现出巨大的市场前景和发展潜力。但需要注意的是，在未来发展中，通量也许会成为微流控分离的技术障碍，这一问题有望从稀有细胞的分离实践中得到解决[31]。

微流控技术还可以推动肺部疾病即时诊断的有效实施。与实验室进行的测试相比，即时诊断处理样本的时间较短，可以帮助医生做出更快速和精准的决策。微流控能够显著提升肺部疾病诊断测试的工作效率，在及时挽救生命和减轻疾病传播等方面发挥了积极的作用。纸基微流控装置[32]也被广泛用于肺部疾病诊断，该装置具有进一步降低制造成本并最大程度减少分析仪器使用频率的独特竞争优势[33]。微流控技术与商业产品的融合及集成（如基于离心技术的微流控[34]）、与现有程序（如基于电泳的微流控操作[35]）结合，以及设备设计创新和用户体验升级的迭代改进，已经彻底颠覆了护理技术。

5. 微流控技术在肺部疾病治疗学科中的应用

目前肺部疾病的治疗基于药物的口服输送和全身循环。尽管给药过程十分简单，但工作效率低下，并为身体各个系统带来了潜在的副作用风险，因此，迫切需要对药物递送方法进行创新和改良。与传统的给药方法相比，局部用药将提高药物在特定范围内的浓度，最大程度地减少药物剂量，减轻副作用。微流控技术能够为疾病治疗提供方案，特别适用于局部治疗。采用微流控雾化和液体样品雾化的装置能够取代将药物递送至气道表面的传统方法

(图1)。与传统雾化器或吸入器相比,微流控雾化器通过精确控制液滴大小进行靶向递送,药物的使用剂量较少。为此,Qi等[4]研发出一种基于声学的雾化技术,以便能够将液滴尺寸控制在 $(2.84 \pm 0.14) \mu\text{m}$ 。微流控技术还可以将药物深度渗透至气道,而传统技术难以望其项背。Ramesan等[5]利用声学技术,将纳米颗粒输送到口腔组织上皮细胞 $700 \mu\text{m}$ 的深度。正常来说,在没有声波驱动的条件下,输送深度约为 $100 \mu\text{m}$ 。这种方法可以将药物输送到黏膜下组织,如软骨、结缔组织和气道系统中的神经细胞。尽管前景广阔,但基于微流控技术的药物递送方法仍处于概念验证阶段。为切实推动其临床应用,还需要在系统集成、动物实验和性能临床试验等方面继续攻坚克难,再上新的台阶。

6. 结论与展望

过去几十年中,微流控技术在肺部医学实验和诊疗中,不断解锁出新的功能和应用(图1)。这些应用涵盖了单细胞研究,疾病模型,样品制备,病原体、DNA和囊泡的检测,以及新的药物递送方法等内容。尽管在设备制造、系统集成、吞吐量和标准化操作协议等方面依旧存在重大挑战,但可以预见,微流控技术将继续在肺部疾病的研究、诊断和治疗中发光发热,做出重大贡献。

Acknowledgements

We acknowledge support from the National Institutes of Health (U18TR003778, R01GM141055, R01GM132603, and R01GM135486), National Science Foundation (ECCS-1807601) to Tony Jun Huang, and Roy J. Carver faculty start-up fund and University of Iowa to Yuliang Xie.

References

- [1] Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020; 382(18):1708–20.
- [2] Nishiga M, Wang DW, Han Y, Lewis DB, Wu JC. COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol* 2020;17(9):543–58.
- [3] Ellul MA, Benjamin L, Singh B, Lant S, Michael BD, Easton A, et al. Neurological associations of COVID-19. *Lancet Neurol* 2020;19(9):767–83.
- [4] Qi A, Friend JR, Yeo LY, Morton DAV, McIntosh MP, Spiccia L. Miniature inhalation therapy platform using surface acoustic wave microfluidic atomization. *Lab Chip* 2009;9(15):2184–93.
- [5] Ramesan S, Rezk AR, Yeo LY. High frequency acoustic permeabilisation of drugs through tissue for localised mucosal delivery. *Lab Chip* 2018;18(21):3272–84.
- [6] Xie Y, Lu L, Tang XX, Moninger TO, Huang TJ, Stoltz DA, et al. Acidic submucosal gland pH and elevated protein concentration produce abnormal cystic fibrosis mucus. *Dev Cell* 2020;54(4):488–500.e5.
- [7] Wang Y, Ruan Q, Lei ZC, Lin SC, Zhu Z, Zhou L, et al. Highly sensitive and automated surface enhanced Raman scattering-based immunoassay for H5N1 detection with digital microfluidics. *Anal Chem* 2018;90(8):5224–31.
- [8] Wang R, Zhao R, Li Y, Kong W, Guo X, Yang Y, et al. Rapid detection of multiple respiratory viruses based on microfluidic isothermal amplification and a real-time colorimetric method. *Lab Chip* 2018;18(22):3507–15.
- [9] Ramachandran A, Huyke DA, Sharma E, Sahoo MK, Huang C, Banaei N, et al. Electric field-driven microfluidics for rapid CRISPR-based diagnostics and its application to detection of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020; 117(47):29518–25.
- [10] Ozcelik A, Rufo J, Guo F, Gu Y, Li P, Lata J, et al. Acoustic tweezers for the life sciences. *Nat Methods* 2018;15(12):1021–8.
- [11] Fu AY, Spence C, Scherer A, Arnold FH, Quake SR. A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. *Nat Biotechnol* 1999;17(11):1109–11.
- [12] Farshidfar N, Hamedani S. The potential role of smartphone-based microfluidic systems for rapid detection of COVID-19 using saliva specimen. *Mol Diagn Ther* 2020;24(4):371–3.
- [13] Stuart T, Satija R. Integrative single-cell analysis. *Nat Rev Genet* 2019;20(5): 257–72.
- [14] Klein A, Mazutis L, Akartuna I, Tallapragada N, Veres A, Li V, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell* 2015;161(5):1187–201.
- [15] Macosko E, Basu A, Satija R, Nemesh J, Shekhar K, Goldman M, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* 2015;161(5):1202–14.
- [16] Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE, et al. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* 2018; 560(7718):319–24.
- [17] Plasschaert LW, Zilionis R, Choo-Wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, et al. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* 2018;560(7718):377–81.
- [18] Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, Cashman KS, Saini AS, Haddad NS, et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat Immunol* 2020;21(12):1506–16.
- [19] Collins DJ, Morahan B, Garcia-Bustos J, Doerig C, Plebanski M, Neild A. Two-dimensional single-cell patterning with one cell per well driven by surface acoustic waves. *Nat Commun* 2015;6:8686.
- [20] Li S, Guo F, Chen Y, Ding X, Li P, Wang L, et al. Standing surface acoustic wave based cell coculture. *Anal Chem* 2014;86(19):9853–9.
- [21] Park SE, Georgescu A, Huh D. Organoids-on-a-chip. *Science* 2019;364(6444): 960–5.
- [22] Salahudeen AA, Choi SS, Rustagi A, Zhu J, van Unen V, de la O SM, et al. Progenitor identification and SARS-CoV-2 infection in human distal lung organoids. *Nature* 2020;588(7839):670–5.
- [23] Sachs N, Pappaspyropoulos A, Zomer-van Ommen DD, Heo I, Böttinger L, Klay D, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J* 2019;38(4):e100300.
- [24] Ao Z, Cai H, Wu Z, Ott J, Wang H, Mackie K, et al. Controllable fusion of human brain organoids using acoustofluidics. *Lab Chip* 2021;21(4):688–99.
- [25] Deng J, Tian F, Liu C, Liu Y, Zhao S, Fu T, et al. Rapid one-step detection of viral particles using an aptamer-based thermophoretic assay. *J Am Chem Soc* 2021;143(19):7261–6.
- [26] Andargie TE, Tsuji N, Seifuddin F, Jang MK, Yuen PST, Kong H, et al. Cell-free DNA maps COVID-19 tissue injury and risk of death and can cause tissue injury. *JCI Insight* 2021;6(7):e147610.
- [27] Szepechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, Kupis W, Rudzinski P, Langfort R, et al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. *Br J Cancer* 2015; 113(3):476–83.
- [28] Rosell A, Havervall S, von Meijenfeldt F, Hisada Y, Aguilera K, Grover SP, et al. Patients with COVID-19 have elevated levels of circulating extracellular vesicle tissue factor activity that is associated with severity and mortality-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021;41(2):878–82.
- [29] Holtzman J, Lee H. Emerging role of extracellular vesicles in the respiratory system. *Exp Mol Med* 2020;52(6):887–95.
- [30] Wu M, Ouyang Y, Wang Z, Zhang R, Huang PH, Chen C, et al. Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114(40):10584–9.
- [31] Chen Y, Li P, Huang PH, Xie Y, Mai JD, Wang L, et al. Rare cell isolation and analysis in microfluidics. *Lab Chip* 2014;14(4):626–45.

- [32] Tarim EA, Karakuzu B, Oksuz C, Sarigil O, Kizilkaya M, Al-Ruweidi MKAA, et al. Microfluidic-based virus detection methods for respiratory diseases. *Emergent Mater* 2021;4(1):143–68.
- [33] Pinheiro T, Cardoso AR, Sousa CEA, Marques AC, Tavares APM, Matos AM, et al. Paper-based biosensors for COVID-19: a review of innovative tools for controlling the pandemic. *ACS Omega* 2021;6(44):29268–90.
- [34] Gorkin R, Park J, Siegrist J, Amasia M, Lee BS, Park J-M, et al. Centrifugal microfluidics for biomedical applications. *Lab Chip* 2010;10(14):1758–73.
- [35] Wu D, Qin J, Lin B. Electrophoretic separations on microfluidic chips. *J Chromatogr A* 2008;1184(1–2):542–59.