

· 综 述 ·

基于液滴微流控的细胞凝胶微球研究进展

张彩云¹, 曾毅¹, 许娜^{1*}, 张志凌^{2*}

1 武汉科技大学生命科学与健康学院 生物医学研究院, 湖北 武汉 430065

2 武汉大学化学与分子科学学院, 湖北 武汉 430072

张彩云, 曾毅, 许娜, 张志凌. 基于液滴微流控的细胞凝胶微球研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 74-85.

ZHANG Caiyun, ZENG Yi, XU Na, ZHANG Zhiling. Cell-loaded hydrogel microspheres based on droplet microfluidics: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 74-85.

摘 要: 液滴微流控技术在微纳米尺度上对多种流体的流动进行精确控制, 从而能够以高通量的方式生成结构可调和成分可控的微纳米液滴。通过结合合适的水凝胶材料和制造方法, 可以将单个或多个细胞高效地封装进水凝胶中, 制备细胞凝胶微球。细胞凝胶微球可以为细胞的增殖、分化等提供一个三维的、相对独立可控的微环境, 在三维细胞培养、组织工程与再生医学、干细胞研究和单细胞研究等生命科学领域具有重要价值。本文主要综述了基于液滴微流控技术的细胞凝胶微球的制备及其在生物医学领域的应用, 并对未来的研究工作提出了展望。

关键词: 液滴微流控; 细胞凝胶微球; 三维细胞培养; 单细胞研究; 肿瘤疫苗

Cell-loaded hydrogel microspheres based on droplet microfluidics: a review

ZHANG Caiyun¹, ZENG Yi¹, XU Na^{1*}, ZHANG Zhiling^{2*}

1 Institute of Biology and Medicine, College of Life Sciences and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, Hubei, China

2 College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China

Abstract: Droplet microfluidics technology offers refined control over the flows of multiple fluids in micro/nano-scale, enabling fabrication of micro/nano-droplets with precisely adjustable structures and compositions in a high-throughput manner. With the combination of proper hydrogel materials and preparation methods, single or multiple cells can be efficiently

资助项目: 湖北省教育厅科学研究计划中青年人才项目(Q20201110); 武汉科技大学研究生创新创业基金(JCX2021070)
This work was supported by the Young and Middle-Aged Talents Project of Science Research Program of Hubei Provincial Department of Education (Q20201110) and the Wuhan University of Science and Technology Graduate Innovation and Entrepreneurship Fund (JCX2021070).

*Corresponding authors. E-mail: XU Na, naxu@wust.edu.cn; ZHANG Zhiling, zlzhang@whu.edu.cn

Received: 2022-04-27; Accepted: 2022-09-01; Published online: 2022-09-05

encapsulated into hydrogels to produce cell-loaded hydrogel microspheres. The cell-loaded hydrogel microspheres can provide a three-dimensional, relatively independent and controllable microenvironment for cell proliferation and differentiation, which is of great value for three-dimensional cell culture, tissue engineering and regenerative medicine, stem cell research, single cell study and many other biological science fields. In this review, the preparation methods of cell-loaded hydrogel microspheres based on droplet microfluidics and its applications in biomedical field are summarized and future prospects are proposed.

Keywords: droplet microfluidics; cell-loaded hydrogel microspheres; three-dimensional cell culture; single-cell analysis; tumor vaccine

凝胶微球作为一种先进的功能材料, 在多个领域均具有重要的应用价值, 尤其是作为细胞载体, 它可以很好地模拟细胞在体内的生存环境, 为细胞提供一种新颖的三维培养方式。而基于液滴微流控技术生成的微球因其尺寸、结构和组成便于调控, 已成为制备细胞凝胶微球最有效的技术之一。本文综述了利用液滴微流控技术制备细胞凝胶微球的基本原理和方法, 重点介绍了细胞凝胶微球在生物医学领域的应用。

1 液滴微流控

微流控技术是一种可以在微纳米尺度上处理和操控少量液体(10^{-9} – 10^{-18} L)系统的技术^[1], 基于微流控技术的装置称为微流控芯片, 具有微型化、集成化等特点。液滴微流控是指通过微通道内互不相容的多相流体生成离散的液

滴, 并对其进行操控^[2]。基于微流控技术生成的液滴具有单分散性好、无交叉污染、可重复性高等优点, 广泛应用于生物、化学、物理等多个学科领域, 成为微流控领域的一个重要分支。

生成液滴的方法和技术有很多种, 根据液滴生成过程中是否施加外部能量, 可以分为被动法和主动法。被动法生成液滴, 是指利用不同的微通道结构使不混溶的分散相和连续相流体在通道连接处相遇, 通过调节通道结构、两相流速大小及流速比, 可以在通道连接处下游生成大小可控的液滴^[3]。根据通道几何形状的不同, 被动法生成液滴(表 1)又可以分为 T 型通道法(T-junction)^[4]、流聚焦法(flow-focusing)^[5]和共轴流法(co-flow)^[6]。主动法生成液滴是指在液滴生成过程中, 通过局部施加电场力^[7]、磁场力^[8]和离心力^[9]等外力控制液滴的生成(表 2)。

表 1 被动法生成液滴的特点和微通道结构简图

Table 1 Characteristics and microchannel geometry of the passive method for droplets formation


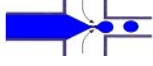
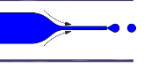
Passive method	Channel characteristics	Channel geometry
T-junction	The device is simple to fabricate, but the droplets generated have low monodispersity and narrow size range	
Flow-focusing	The droplets' sizes are well controllable and can be down to a few hundred nanometers	
Co-flow	The co-flow geometry avoids the droplets contacting the channel wall and prevents the effect of shear force on the droplets	

表2 主动法生成液滴的原理和特点

Table 2 Principles and characteristics of the active method for droplets formation

Active method	Principle	Characteristic
Electric force	Droplets are generated by the interface displacement of two phases under the action of electric force	Easier control; low efficiency; harmful to biological samples
Magnetic force	Droplets are generated by the continuous phase shearing the dispersed phase under the action of magnetic force	Fast response speed; good biocompatibility; complex operating procedures; high cost
Centrifugal force	Droplets are generated under the combined action of centrifugal force and surface tension	High efficiency; capable of generating complex droplets; low monodispersity

近年来,液滴微流控技术的发展主要体现在以下几个方面:在芯片制造方面,由于新材料的不断引入和技术的进步,微流控芯片经历了由硅^[10]、玻璃^[11]、聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)^[12]到纸基材料^[13]的变化;在液滴生成动力学方面,深入研究了液滴的生成原理,即液滴通常是在被动的流体压力或主动的外部驱动下生成的,了解其独特的流体动力学可以对液滴及液滴界面进行精确控制,也使得设计新颖的液滴微流控系统来生成和操纵具有不同结构和功能的液滴成为可能^[14];在应用方面,随着理论和技术的进步,液滴微流控在微反应器^[15-16]、组织工程与再生医学^[17]、药物输送^[18]、人工细胞^[19]、肿瘤免疫疗法^[20]和单细胞研究^[21]等诸多领域均占据了重要的一席。

2 细胞凝胶微球的制备

液滴微流控技术能够以高通量的方式制备大小、成分和功能可控的单分散液滴,这些液滴可以封装一种或多种细胞,作为模板来制备具有特定理化性质且能够抗剪切应力的细胞凝胶微球。用来进行封装细胞的水凝胶材料种类繁多,主要可以分为两大类:一类是天然高分子,包括海藻酸盐、壳聚糖、琼脂糖、明胶、纤维蛋白原和多肽等;另一类是合成聚合物,包括聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、聚丙烯酸(polyacrylic acid, PAA)和聚乙烯醇

(polyvinyl alcohol, PVA)等^[22-23]。天然高分子具有良好的生物相容性和可降解性,合成聚合物在机械性能和生化信号的可控性方面具有优势,因此,实际应用中通常采用混合水凝胶,结合二者的优势,能够为细胞提供可控的微环境和必要的锚定位点,并调控细胞的生命活动。

在典型的细胞封装过程中,含有细胞的水凝胶前体溶液经过连续相的剪切,形成一个个单分散液滴,通过触发交联,形成细胞凝胶微球。微球的尺寸、形状、孔隙率和机械性能可以通过改变微通道尺寸、两相流速、水凝胶材料、水凝胶浓度以及交联密度等因素来调节。根据封装细胞的水凝胶材料的不同,制备细胞凝胶微球的交联方式各异,主要包括光交联、离子交联和温度诱导交联等(图1)。

2.1 光交联

光交联通常是在可聚合材料中加入光引发剂,待生成前体液滴后再将其置于可见光或紫外光的照射下引发聚合^[24]。这一过程发生速度快,可在数秒内诱导交联,液滴稳定性好,对细胞的损伤较小,是目前应用最广泛的交联方法之一。光交联的关键除了光引发剂的选择和严格控制光引发剂的浓度与光照时间外,选择合适的可聚合材料也很重要^[25]。目前,可用于构建光交联的生物相容性水凝胶材料主要包括透明质酸、明胶和壳聚糖等天然大分子^[26-28]以及聚乙二醇、聚丙烯酰胺和聚丙烯酸酯等合成

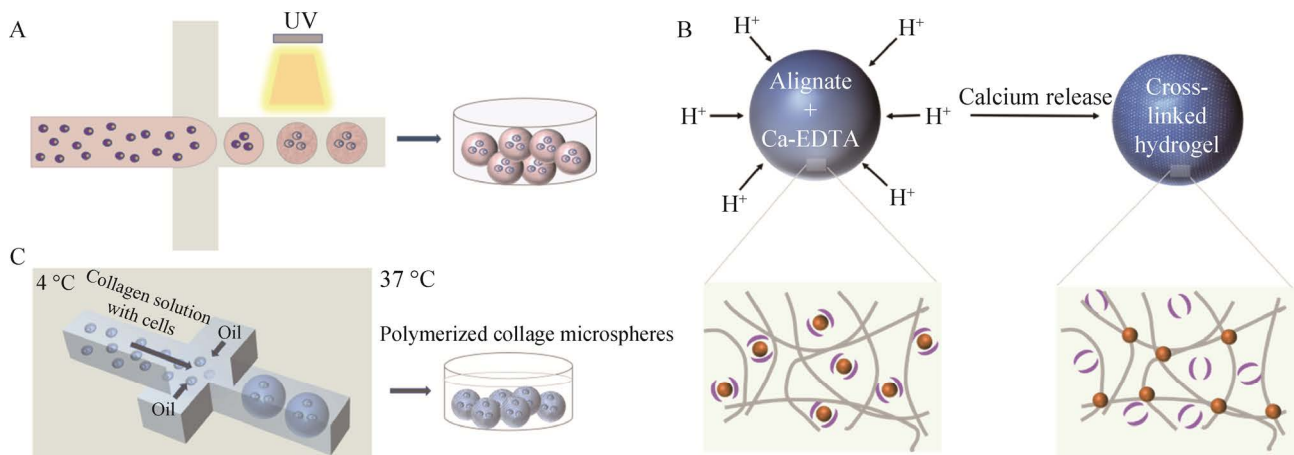


图 1 细胞凝胶微球的制备方式 A: 光交联. B: 离子交联. C: 温度诱导交联

Figure 1 Preparation methods of cell-loaded hydrogel microspheres. A: Photo-induced cross-linking. B: Ionic-induced cross-linking. C: Temperature-induced cross-linking.

大分子^[29-30]。Finklea 等^[17]将人诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 包裹在聚乙二醇修饰的纤维蛋白原前体液滴中, 液滴在可见光下照射 1.6 s 即可完成交联, 形成载 hiPSCs 的凝胶微球。聚乙二醇修饰的纤维蛋白原水凝胶显示出优异的生物相容性和机械性能, 载 hiPSCs 凝胶微球在诱导分化第 8 天即可分化为心脏组织, 该工程化心脏组织呈现自主收缩功能, 并保持自发收缩长达 3 年以上, 能够对药理学和电刺激产生反应。

2.2 离子交联

可用于细胞封装的离子交联水凝胶主要包括海藻酸盐和壳聚糖, 其中海藻酸盐是研究最多的材料之一。海藻酸盐对二价阳离子 (如 Ca^{2+}) 有很强的亲和力, 其带负电荷的多糖残基可以与 Ca^{2+} 发生离子反应, 从而触发交联, 交联剂 Ca^{2+} 的浓度显著影响海藻酸盐水凝胶的交联度^[31-32]。当 Ca^{2+} 浓度较高时, 形成的海藻酸盐水凝胶结构比较紧密, 特别是水凝胶的外部会直接接触含有 Ca^{2+} 的水溶液, 从而在接触瞬间发生固化。而当 Ca^{2+} 浓度较低时, 固化速度

相对较慢, 形成的海藻酸盐水凝胶结构更均匀, 具有更高的机械稳定性。由于离子交联发生迅速, 当液滴形成和凝胶化同时进行, 容易导致微通道堵塞以及凝胶化不均匀, 因而 Utech 等^[33]以钙-乙二胺四乙酸 (Ca-EDTA) 络合物的形式提供 Ca^{2+} 。他们将 Ca-EDTA 络合物水溶液与多肽 (Arg-Gly-Asp, RGD) 修饰的海藻酸盐水溶液均匀混合作为分散相, 此时由于 Ca^{2+} 与 EDTA 络合, Ca^{2+} 不会与海藻酸盐发生交联。当液滴形成后, 通过向连续相中添加低浓度的乙酸降低液滴中的 pH, 使得 Ca-EDTA 络合物发生解离并释放出 Ca^{2+} , 进而引发交联。Utech 等^[33]利用该方式制备了包裹间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 的海藻酸钙凝胶微球, 可以观察到微球中的 MSCs 在培养过程中稳定增殖, 培养至第 15 天时细胞存活率仍保持在 70% 以上。

2.3 温度诱导交联

温敏材料通常都是通过分子间的氢键、疏水作用、范德华力以及 π - π 作用等较弱的相互作用而形成的, 温度的改变会影响或破坏这些

作用,从而使凝胶状态发生改变^[34]。故可以通过调节外界温度,触发对温度敏感的水凝胶发生交联。可用于细胞封装的温度敏感性水凝胶主要包括胶原蛋白、琼脂糖、明胶和壳聚糖等天然大分子^[23]。此外,还可以通过在天然水凝胶上修饰人工合成基团,比如在壳聚糖上修饰 PEG 或 PVA 大分子,进一步优化水凝胶的温度敏感性、溶解性和机械性能^[35]。已知胶原蛋白处于 4 °C 时是液体状态,而当温度上升到 37 °C 时则转变为凝胶态。基于此, Kukla 等^[36]在 4 °C 环境下将原代人肝细胞(primary human hepatocyte, HPP)重悬于 I 型大鼠尾胶原蛋白溶液中,借助流聚焦型液滴微流控芯片生成了包裹 HPP 的胶原蛋白前体液滴。收集液滴并将其置于 37 °C 环境下孵育以促进胶原蛋白凝胶化,最终形成平均直径在 267.4 μm 左右的“微组织”。这种“微组织”不仅可以作为 3D 人体肝脏模型用于临床前药物开发,还可以通过与不同细胞共培养来研究肝脏疾病中细胞-细胞和细胞-细胞外基质(extracellular matrix, ECM)之间的相互作用。

3 细胞凝胶微球在生物医学领域的应用

人体内的细胞存在于由蛋白质和多糖组成的复杂三维微环境—ECM 中,天然的 ECM 是一种动态的、层次分明的物质,它不仅是细胞的结构基础,也是触发和调节细胞行为的生化 and 生物物理因素的来源^[37]。然而,现有的细胞培养大多是建立在二维培养皿培养的基础上,这种二维培养难以真实地反映细胞的体内微环境。水凝胶具有高含水量、生物相容性、降解性和多孔性等与天然 ECM 相似的独特性能,并且可以方便地调整其组成、结构、机械性能和

生化性能,因而其作为一种人工 ECM 在生物医学领域发挥着重要的作用^[38]。基于液滴微流控生成的细胞凝胶微球呈三维多孔结构,粒径通常在 60–200 μm 之间,其多孔结构和高表体比有利于氧气和营养物质的输入以及代谢废物的输出,能够使细胞在保持高活力的同时免受周围微环境的影响。此外,还可以在水凝胶中加入适宜的生长因子,构建能够控制细胞生长、增殖和分化的人工 ECM,生长于其中的细胞可以很好地与包裹它的水凝胶相互作用,因而这是一种有前途的体外三维细胞培养平台^[39-40]。本节主要讨论三维细胞凝胶微球在组织工程与再生医学、单细胞研究、肿瘤疫苗等领域的应用(图 2)。

3.1 组织工程与再生医学

组织是由多种类型的细胞和细胞外基质共同组成的复杂结构。基于液滴微流控的细胞凝胶微球可以作为构建组织工程的支架,应用于器官模型、肿瘤模型和载干细胞可注射水凝胶支架等领域的研究^[41-43]。

3.1.1 器官模型

人体器官是由多种组织构成的,为了模拟人体器官,需要构建不同类型的细胞在人工 ECM 中呈空间分布的三维模型。利用基于液滴微流控的凝胶微球封装不同类型的细胞,有望构建体外组织或器官模型。Chen 等^[44]通过控制液滴生成了胶囊核心封装肝细胞、壳层封装成纤维细胞的核壳微胶囊,核壳结构使得肝细胞和成纤维细胞在空间上实现了独立又连接的共培养,加强了同型和异型细胞的细胞间相互作用,进而促进了肝脏特异性功能的表达。这样形成的体外三维肝脏模型,每个微胶囊中都是一个微型人工肝,有望用于高通量药物筛选。若将该模型中的肝细胞和成纤维细胞用其他细胞代替,则可以构建其他组织或器官模型。此

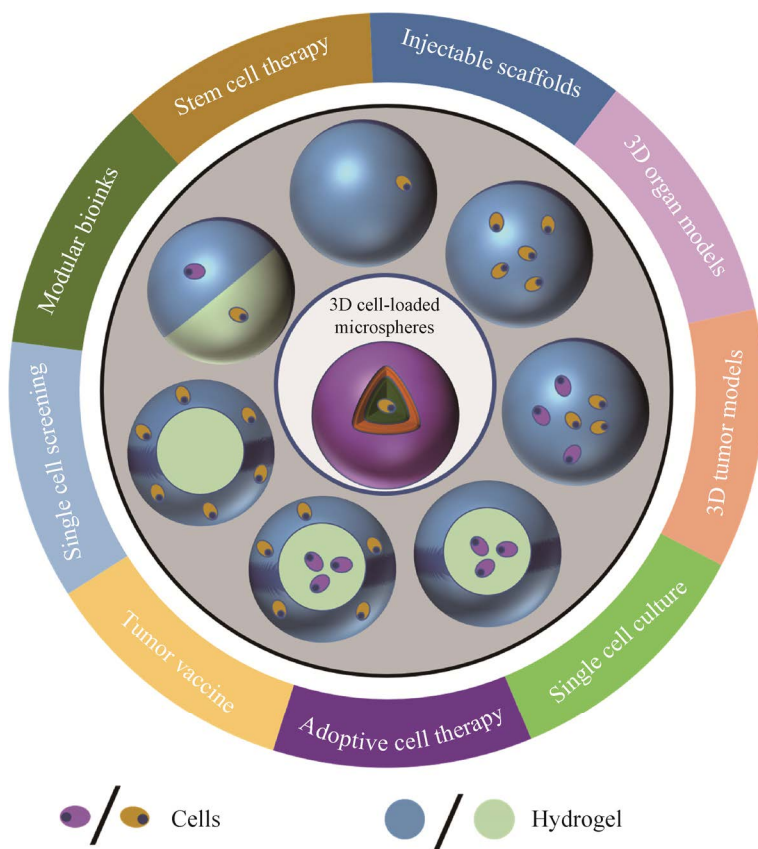


图 2 细胞凝胶微球在生物医药领域的应用

Figure 2 The applications of cell-loaded hydrogel microspheres in biomedical fields.

外, Finklea 等^[17]通过诱导包裹在凝胶微球中的 hiPSCs 定向分化,形成了工程化心脏组织微球,成功构建了可以在体外培养长达 3 年以上的微型人工心脏,有望用于临床转化和高通量药物测试。

3.1.2 肿瘤模型

肿瘤异质性使得肿瘤药物研究成本高、效率低。如何构建更真实的肿瘤组织模型,提高药物研究的效率,是目前肿瘤治疗中的热点和难点。Jang 等^[45]将肠型胃癌细胞系 AGS 和弥漫型胃癌细胞系 Hs746T 分别封装在骨胶原凝胶微球中,构建了三维肿瘤组织模型,用于评估胃癌细胞和 ECM 之间的相互作用以及肿瘤细胞的耐药性。结果表明,三维肿瘤组织中某些蛋白的表达与二维培养的肿瘤细胞相比存

在显著差异,比如二维平台的 E-钙黏蛋白其相对 mRNA 表达水平显著高于 AGS 和 Hs746T (2.7 倍和 8.3 倍)的三维平台,而 N-钙黏蛋白的相对 mRNA 表达水平则在 AGS 和 Hs746T 的三维平台中比二维平台分别高出 2.2 倍和 5.7 倍。在耐药性方面,低浓度药物处理下的细胞在二维和三维之间的存活率没有显著差异,而当给予较高浓度药物刺激时,三维肿瘤模型耐药性更强。因此,开发可以模拟肿瘤微环境的体外三维肿瘤模型,对于高通量抗癌药物的筛选和分析至关重要。Agarwal 等^[46]通过将癌细胞包裹在核壳微凝胶中,再将其与人脂肪来源于细胞(human adipose-derived stem cells, hADSCs)和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)组装起来进行灌注

培养,成功构建了人类肿瘤三维微环境,形成了三维血管化肿瘤组织。研究发现,在工程化三维微环境中的细胞可以产生比二维培养更大的肿瘤组织,且三维血管化微肿瘤对化疗药物盐酸阿霉素的耐药性分别是无血管微肿瘤和二维培养癌细胞的 4.7 倍和 139.5 倍。该三维肿瘤模型具有高保真度,对于研究微环境对肿瘤进展、侵袭和转移的影响,以及制定有效的抗癌策略具有重要价值。

3.1.3 可注射干细胞水凝胶

干细胞具有自我更新和多向分化潜能,被认为是治疗疾病的“万能细胞”。在干细胞凝胶微球中,干细胞能够通过细胞-细胞、细胞-微环境间的相互作用,调节自身活力、生长和分化,同时,水凝胶可以为组织再生提供支架,并通过注射直接输送到受损组织,避免手术创伤^[47-48]。An 等^[49]在单细胞水平上将大鼠 MSCs 封装进细胞粘附肽修饰的海藻酸凝胶微球,注射到胫骨消融大鼠损伤部位。载 MSCs 凝胶微球在诱导成骨分化 7 d 后,表现出显著的促进成骨形成和矿化能力。这说明干细胞凝胶微球可以促进骨再生,并以微创方式治疗骨缺损。Griffin 等^[50]构建了一种可注射的、相互连接的微孔退火颗粒(microporous annealed particle, MAP)凝胶支架,该支架的化学和物理性能可以通过微流控制来制造。此外,MAP 凝胶支架可以注射成形成任何形状,为细胞生长提供一个机械稳定的微孔网络支架。在体外,封装进 MAP 凝胶支架的细胞在 48 h 内增殖,形成了广泛的三维网络。在体内,该支架促进了细胞迁移,使得皮肤组织在 5 d 内快速再生,形成组织结构。因此,结合这种 MAP 凝胶支架所具有的微孔隙和可注射性,有望为体内组织再生搭建一条新途径。

3.2 单细胞研究

单细胞研究能够在基因组和蛋白质组水平上检测出细胞群之间的细胞异质性,在阐明细胞应答、疾病发生机制等方面发挥着重要作用。液滴微流控可以将单个细胞快速高效地封装在液滴中,允许对单细胞进行高通量分析和操作,大大提高了分析的准确性和灵敏性^[51-52]。目前,基于液滴微流控的单细胞研究主要集中在单细胞培养/共培养、单细胞克隆筛选等方面。

3.2.1 单细胞培养/共培养

细胞异质性是影响细胞行为的重要因素,揭示细胞异质性首先需要构建单细胞培养体系。Tiemeijer 等^[53]将单个巨噬细胞封装在细胞粘附肽修饰的聚异氰酸酯(polyisocyanide, PIC)凝胶微球中,比较了多细胞培养、悬浮单细胞培养、PIC 凝胶球单细胞培养模式对巨噬细胞极化的影响。结果显示,与悬浮单细胞培养模式相比,巨噬细胞在 PIC 凝胶球单细胞培养模式中表现出更高的细胞活力和增强的 M2 型极化,在多细胞培养中,M2 极化进一步加强。此外,Dolega 等^[54]在基质胶微球中包裹单个前列腺细胞,培养 6 d 后即可观察到前列腺细胞分化为腺泡细胞,这表明在基质胶微环境中,单个前列腺细胞可以独立发育分化为腺泡细胞。从更广泛的角度来看,该系统可以用来研究自分泌信号的作用机制。

细胞-细胞相互作用会显著影响细胞行为,因此构建单细胞共培养体系,对于研究单个细胞之间的细胞-细胞相互作用具有重要的意义,而液滴微流控是有效构建单细胞共培养体系的方法之一。Zhang 等^[55]利用两种水凝胶前体溶液的快速凝胶化制备了具有两个独立腔室的 Janus 微粒,通过将单个 MSC 和单个 HUVEC 分别封装进两个独立腔室,研究 HUVEC 作为生态位细胞在 MSC 成骨分化中的作用(图 3A、3B)。

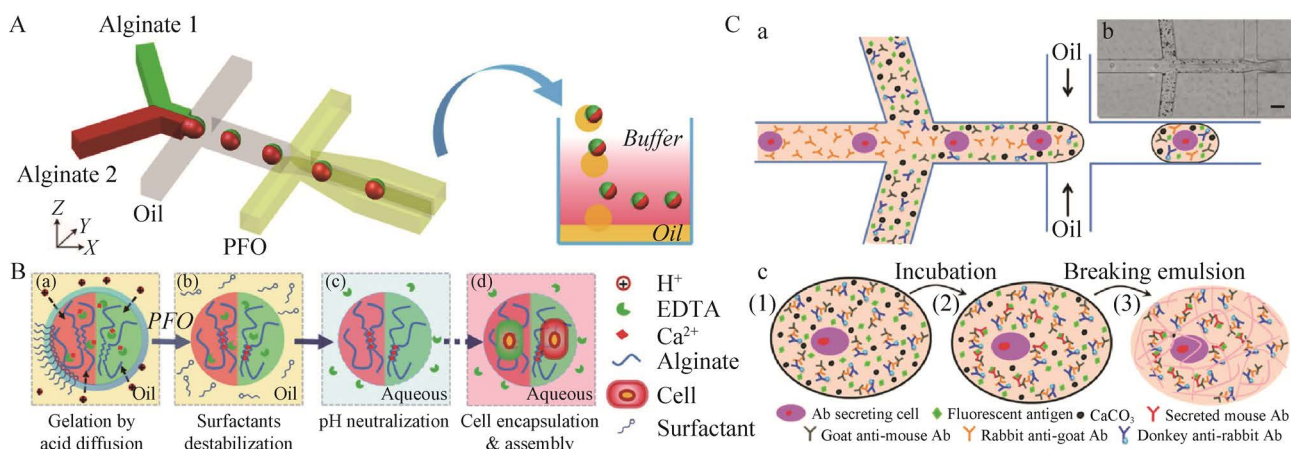


图3 单细胞分析示例^[55-56] A: 用于生成 Janus 微粒的 PDMS 芯片示意图^[55]. B: Janus 藻酸盐凝胶形成机理示意图^[55]. C: 海藻酸盐凝胶球免疫分析示意图^[56]

Figure 3 Schematic illustration of single-cell analysis examples^[55-56]. A: PDMS microfluidic device for the production of Janus microgels^[55]. B: The mechanism of forming Janus microgels^[55]. C: Immunoassay using alginate microspheres^[56].

结果发现,与单独封装 MSC 相比,只有在 MSC 和 HUVEC 共培养时,才能观察到早期的成骨分化。这表明 MSC 和 HUVEC 之间的相互作用可以影响干细胞的命运。

3.2.2 单细胞克隆筛选

单细胞克隆筛选是指在异质细胞群中筛选出目标细胞,在生物医学诊疗,特别是细胞与基因治疗研究中具有重要的意义。为了筛选出能够分泌抗原特异性抗体的单细胞, Akbari 等^[56]基于液滴微流控系统生成了包裹单个抗体分泌细胞和 IgG 高分子量捕获复合物的海藻酸盐液滴,然后通过离子交联形成凝胶微球,并将其用于捕获分泌的抗体。由于微球具有多孔结构,可以在捕获细胞分泌抗体的同时,轻松去除未结合的抗原,快速、高效地筛选出符合要求的特异性抗体分泌细胞(图 3C)。这一方法显著提高了筛选效率,已被用于从杂交瘤细胞中筛选抗 TNF- α 的抗体分泌细胞。

此外, Lin 等^[57]开发了一种微流控单细胞培养方法,用于从细胞系和肿瘤组织中筛选并

扩增结直肠癌干细胞(cancer stem cells, CSCs)。他们通过结合海藻酸盐水凝胶与液滴微流控,在芯片上形成了高密度凝胶微球阵列,从而实现单细胞封装和非粘附性培养。经过 14 d 的培养后,从海藻酸盐凝胶中释放已经形成肿瘤球的细胞,一次可以回收约 6 000 个活细胞。经证实,回收的细胞具有 CSCs 的遗传和表型特征,且存在多个 CSCs 特异性靶点。总之,这种凝胶球单细胞培养提供了一种便捷的筛选、回收 CSCs 的方法,对深入理解癌症生物学和开发个性化 CSCs 靶向治疗有潜在的帮助。

3.3 肿瘤免疫治疗

肿瘤免疫疗法是通过重启并维持肿瘤-免疫循环,增强并恢复机体正常的抗肿瘤免疫反应,从而控制并清除恶性肿瘤细胞的一种肿瘤治疗方法。肿瘤免疫治疗已展示出强大的血液肿瘤治愈能力,但在实体肿瘤治疗方面进展缓慢,这主要是因为实体肿瘤具有复杂的肿瘤微环境和强大的免疫逃逸能力。为此,近年来,不少研究者尝试将生物材料与肿瘤免疫疗法相

结合, 调控肿瘤微环境或研发肿瘤疫苗, 用以提高治疗效率^[58-59]。

Tian 等^[60]设计了一种“分离-封装一体化”的微流控芯片, 使血液单核细胞分离过程和细胞凝胶微球形成过程同时在一个芯片上完成, 快速制备出一种单核细胞肿瘤疫苗。在该体系中, 海藻酸盐凝胶微球不仅提高了单核细胞的抗原摄取能力, 而且促进了脾脏中抗原特异性 CD8⁺T 细胞的产生, 使机体获得了强大的细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxicity T lymphocyte, CTL)反应。此外, 在微球中封装具有特定功能的免疫佐剂进行联合治疗, 可以获得增强的抗肿瘤效果, 故 Tian 等在制备单核细胞疫苗的基础上再将抗 PD-1 抗体也封装进凝胶微球, 制备出一种“鸡尾酒疫苗”, 该疫苗在乳腺癌小鼠模型中具有良好的治疗和预防效果。进一步地, Tian 等^[61]将佐剂 TLR1/2、IL-21 与来源于肿瘤宿主外周血中的单个 CD8⁺T 细胞一起封装进凝胶球中, 制备成过继性 T 细胞疗法(adoptive T cell therapy, ATCT)注射剂。凝胶微球和包裹于其中的佐剂为 T 细胞的快速增殖提供了良好的微环境, 并显著提高了 CD8⁺T 细胞的占比, 特别是具有出色抗肿瘤能力的低分化 T 细胞占比大幅增加。该注射剂在治疗黑色素瘤小鼠的过程中, 能够显著抑制肿瘤的生长, 激发 CTL 反应, 提高了荷瘤小鼠的存活率。基于凝胶微球的肿瘤免疫疗法有望为实体瘤的治疗带来新的研究思路, 也拓展了细胞凝胶微球在个性化治疗方面的应用。

4 总结与展望

本文综述了基于液滴微流控技术制备细胞凝胶微球的基本原理及方法, 着重介绍了液滴的生成、交联和细胞凝胶微球在生物学领域的应用。随着液滴微流控技术的快速发展, 复

杂通道的设计和液滴凝胶的控制方法已日趋成熟, 细胞凝胶微球在生命科学与医学领域展现出广阔的应用前景。然而, 细胞凝胶微球在生物学领域的推广和临床应用转化中, 仍然面临着许多挑战。首先, 液滴微流控技术更多的是在实验室中开展, 工厂化大规模批量生产仍然存在困难; 其次, 细胞的生存条件严格, 如何构建可控的微环境需要进一步探索; 再次, 控制微球中的细胞封装数量仍然是一个巨大的挑战。改善或解决以上问题, 是未来细胞凝胶微球液滴微流控技术的主要研究方向。

REFERENCES

- [1] WHITESIDES GM. The origins and the future of microfluidics[J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 368-373.
- [2] SHANG LR, CHENG Y, ZHAO YJ. Emerging droplet microfluidics[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(12): 7964-8040.
- [3] SARTIPZADEH O, NAGHIB SM, SEYFOORI A, RAHMANIAN M, FATEMINIA FS. Controllable size and form of droplets in microfluidic-assisted devices: effects of channel geometry and fluid velocity on droplet size[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2020, 109: 110606.
- [4] ZHANG L, YANG YJ, XIONG JY, WU Z, XIE ZX, PANG DW, ZHANG ZL. Absolute quantification of particle number concentration using a digital single particle counting system[J]. *Mikrochimica Acta*, 2019, 186(8): 529.
- [5] FENG X, YI Y, YU X, PANG DW, ZHANG ZL. Generation of water-ionic liquid droplet pairs in soybean oil on microfluidic chip[J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(3): 313-319.
- [6] LI J, MAN J, LI ZN, CHEN HS. Fabricating high-viscosity droplets using microfluidic capillary device with phase-inversion co-flow structure[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(134): 57313.
- [7] TEO AJT, YAN MH, DONG J, XI HD, FU YS, TAN SH, NGUYEN NT. Controllable droplet generation at a microfluidic T-junction using AC electric field[J]. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2020, 24(3): 1-9.

- [8] LIU J, TAN SH, YAP YF, NG MY, NGUYEN NT. Numerical and experimental investigations of the formation process of ferrofluid droplets[J]. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2011, 11(2): 177-187.
- [9] MORIMOTO Y, ONUKI M, TAKEUCHI S. Mass production of cell-laden calcium alginate particles with centrifugal force[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2017, 6(13): 2017, 6(13): 1601375.
- [10] TERRY SC, JERMAN JH, ANGELL JB. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer[J]. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 1979, 26(12): 1880-1886.
- [11] XU J, WU D, HANADA Y, CHEN C, WU SZ, CHENG Y, SUGIOKA K, MIDORIKAWA K. Electrofluidics fabricated by space-selective metallization in glass microfluidic structures using femtosecond laser direct writing[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(23): 4608-4616.
- [12] SHAKERI A, KHAN S, DIDAR TF. Conventional and emerging strategies for the fabrication and functionalization of PDMS-based microfluidic devices[J]. *Lab on a Chip*, 2021, 21(16): 3053-3075.
- [13] ARANTES IVS, PAIXÃO TRLC. Couple batch-injection analysis and microfluidic paper-based analytical device: a simple and disposable alternative to conventional BIA apparatus[J]. *Talanta*, 2022, 240: 123201.
- [14] ZHU PG, WANG LQ. Passive and active droplet generation with microfluidics: a review[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 17(1): 34-75.
- [15] PAN LJ, TU JW, MA HT, YANG YJ, TIAN ZQ, PANG DW, ZHANG ZL. Controllable synthesis of nanocrystals in droplet reactors[J]. *Lab Chip*, 2017, 18(1): 41-56.
- [16] ZENG YM, PAN LJ, WANG DJ, FAN YL, SHU DY, PANG PDW, ZHANG PZL. Interfacial synthesis of Ag₂S/ZnS core/shell quantum dots in a droplet microreactor[J]. *Chemistry Select*, 2020, 5(20): 5889-5894.
- [17] FINKLEA FB, TIAN Y, KERSCHER P, SEETO WJ, ELLIS ME, LIPKE EA. Engineered cardiac tissue microsphere production through direct differentiation of hydrogel-encapsulated human pluripotent stem cells[J]. *Biomaterials*, 2021, 274: 120818.
- [18] EJETA F. Recent advances of microfluidic platforms for controlled drug delivery in nanomedicine[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2021, 15: 3881-3891.
- [19] KAMIYA K. Development of artificial cell models using microfluidic technology and synthetic biology[J]. *Micromachines*, 2020, 11(6): 559.
- [20] WANG Y, JIN RN, SHEN BQ, LI N, ZHOU H, WANG W, ZHAO YJ, HUANG MS, FANG P, WANG SS, MARY P, WANG R, MA P, LI RN, TIAN YJ, CAO YJ, LI FB, SCHWEIZER L, ZHANG HK. High-throughput functional screening for next-generation cancer immunotherapy using droplet-based microfluidics[J]. *Science Advances*, 2021, 7(24): eabe3839.
- [21] ZHOU WM, YAN YY, GUO QR, JI H, WANG H, XU TT, MAKABEL B, PILARSKY C, HE G, YU XY, ZHANG JY. Microfluidics applications for high-throughput single cell sequencing[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 312.
- [22] MOHAMED MGA, AMBORKAR P, SAMANIPOUR R, YANG AN, GHAFOOR A, KIM K. Microfluidics-based fabrication of cell-laden microgels[J]. *Biomicrofluidics*, 2020, 14(2): 021501.
- [23] VELASCO D, TUMARKIN E, KUMACHEVA E. Microfluidic encapsulation of cells in polymer microgels[J]. *Small: Weinheim an Der Bergstrasse, Germany*, 2012, 8(11): 1633-1642.
- [24] IFKOVITS JL, BURDICK JA. Review: photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications[J]. *Tissue Engineering*, 2007, 13(10): 2369-2385.
- [25] TOMAL W, ORTYL J. Water-soluble photoinitiators in biomedical applications[J]. *Polymers*, 2020, 12(5): 1073.
- [26] HAN GD, KIM JW, NOH SH, KIM SW, JANG EC, NAH JW, LEE YG, KIM MK, ITO Y, SON TI. Potent anti-adhesion agent using a drug-eluting visible-light curable hyaluronic acid derivative[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2019, 70: 204-210.
- [27] WU W, NI Q, XIANG Y, DAI Y, JIANG S, WAN LP, LIU XN, CUI WG. Fabrication of a photo-crosslinked gelatin hydrogel for preventing abdominal adhesion[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(95): 92449-92453.
- [28] BIAN SQ, ZHENG ZQ, LIU Y, RUAN CS, PAN HB, ZHAO XL. A shear-thinning adhesive hydrogel reinforced by photo-initiated crosslinking as a fit-to-shape tissue sealant[J]. *Journal of Materials*

- Chemistry B, 2019, 7(42): 6488-6499.
- [29] XU CC, LEE WH, DAI GH, HONG Y. Highly elastic biodegradable single-network hydrogel for cell printing[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(12): 9969-9979.
- [30] NICOL E. Photopolymerized porous hydrogels[J]. *Biomacromolecules*, 2021, 22(4): 1325-1345.
- [31] SMITH AM, SENIOR JJ. Alginate hydrogels with tuneable properties[J]. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 2021, 178: 37-61.
- [32] KUO CK, MA PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(6): 511-521.
- [33] UTECH S, PRODANOVIC R, MAO AS, OSTAFE R, MOONEY DJ, WEITZ DA. Microfluidic generation of monodisperse, structurally homogeneous alginate microgels for cell encapsulation and 3D cell culture[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2015, 4(11): 1628-1633.
- [34] XIAO Y, GU YH, QIN L, CHEN L, CHEN XL, CUI WH, LI FL, XIANG N, HE XA. Injectable thermosensitive hydrogel-based drug delivery system for local cancer therapy[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 200: 111581.
- [35] RAHMANIAN-DEVIN P, BARADARAN RAHIMI V, ASKARI VR. Thermosensitive chitosan- β -glycerophosphate hydrogels as targeted drug delivery systems: an overview on preparation and their applications[J]. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2021, 2021: 6640893.
- [36] KUKLA DA, CRAMPTON AL, WOOD DK, KHETANI SR. Microscale collagen and fibroblast interactions enhance primary human hepatocyte functions in three-dimensional models[J]. *Gene Expression*, 2020, 20(1): 1-18.
- [37] HUANG GY, LI F, ZHAO X, MA YF, LI YH, LIN M, JIN GR, LU TJ, GENIN GM, XU F. Functional and biomimetic materials for engineering of the three-dimensional cell microenvironment[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(20): 12764-12850.
- [38] YANG JZ, ZHANG YS, YUE K, KHADEMOSSEINI A. Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering[J]. *Acta Biomaterialia*, 2017, 57: 1-25.
- [39] MOHAJERI M, ESKANDARI M, GHAZALI ZS, GHAZALI HS. Cell encapsulation in alginate-based microgels using droplet microfluidics; a review on gelation methods and applications[J]. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 2022, 8(2): 022001.
- [40] NAMGUNG B, RAVI K, VIKRAMAN PP, SENGUPTA S, JANG HL. Engineered cell-laden alginate microparticles for 3D culture[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2021, 49(2): 761-773.
- [41] FENG Q, LI DG, LI QT, CAO XD, DONG H. Microgel assembly: fabrication, characteristics and application in tissue engineering and regenerative medicine[J]. *Bioactive Materials*, 2021, 9: 105-119.
- [42] NEWSOM JP, PAYNE KA, KREBS MD. Microgels: modular, tunable constructs for tissue regeneration[J]. *Acta Biomaterialia*, 2019, 88: 32-41.
- [43] YOO JJ, CHO CS, JO I. Applications of organoids for tissue engineering and regenerative medicine[J]. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2020, 17(6): 729-730.
- [44] CHEN Q, UTECH S, CHEN D, PRODANOVIC R, LIN JM, WEITZ DA. Controlled assembly of heterotypic cells in a core-shell scaffold: organ in a droplet[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(8): 1346-1349.
- [45] JANG M, KOH I, LEE SJ, CHEONG JH, KIM P. Droplet-based microtumor model to assess cell-ECM interactions and drug resistance of gastric cancer cells[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41541.
- [46] AGARWAL P, WANG H, SUN MR, XU JS, ZHAO ST, LIU ZG, GOOCH KJ, ZHAO Y, LU XB, HE XM. Microfluidics enabled bottom-up engineering of 3D vascularized tumor for drug discovery[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(7): 6691-6702.
- [47] SALEHI SS, SHAMLOO A, HANNANI SK. Microfluidic technologies to engineer mesenchymal stem cell aggregates-applications and benefits[J]. *Biophysical Reviews*, 2020, 12(1): 123-133.
- [48] ZHENG Z, TAN Y, LI Y, LIU Y, YI GH, YU CY, WEI H. Biotherapeutic-loaded injectable hydrogels as a synergistic strategy to support myocardial repair after myocardial infarction[J]. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 2021, 335: 216-236.
- [49] AN CF, LIU WJ, ZHANG Y, PANG B, LIU H, ZHANG YJ, ZHANG HY, ZHANG LY, LIAO HB,

- REN CL, WANG HN. Continuous microfluidic encapsulation of single mesenchymal stem cells using alginate microgels as injectable fillers for bone regeneration[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 111: 181-196.
- [50] GRIFFIN DR, WEAVER WM, SCUMPIA PO, DI CARLO D, SEGURA T. Accelerated wound healing by injectable microporous gel scaffolds assembled from annealed building blocks[J]. *Nature Materials*, 2015, 14(7): 737-744.
- [51] XU X, WANG JX, WU LL, GUO JJ, SONG YL, TIAN T, WANG W, ZHU Z, YANG CY. Microfluidic single-cell omics analysis[J]. *Small: Weinheim an Der Bergstrasse, Germany*, 2020, 16(9): e1903905.
- [52] SUN JD, GAO L, WANG LP, SUN XL. Recent advances in single-cell analysis: encapsulation materials, analysis methods and integrative platform for microfluidic technology[J]. *Talanta*, 2021, 234: 122671.
- [53] TIEMEIJER BM, SWEEP MWD, SLEEBOOM JF, STEPS KJ, van SPRANG JF, DE ALMEIDA P, HAMMINK R, KOUWER PHJ, SMITS AIPM, TEL J. Probing single-cell macrophage polarization and heterogeneity using thermo-reversible hydrogels in droplet-based microfluidics[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 715408.
- [54] DOLEGA ME, ABEILLE F, PICOLLET-D'HAHAN N, GIDROL X. Controlled 3D culture in matrigel microbeads to analyze clonal acinar development[J]. *Biomaterials*, 2015, 52: 347-357.
- [55] ZHANG LY, CHEN KW, ZHANG HY, PANG B, CHOI CH, MAO AS, LIAO HB, UTECH S, MOONEY DJ, WANG HN, WEITZ DA. Microfluidic templated multicompartiment microgels for 3D encapsulation and pairing of single cells[J]. *Small*, 2018, 14(9): 1702955.
- [56] AKBARI S, PIRBODAGHI T. A droplet-based heterogeneous immunoassay for screening single cells secreting antigen-specific antibodies[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(17): 3275-3280.
- [57] LIN DG, CHEN X, LIU Y, LIN Z, LUO YZ, FU MP, YANG N, LIU DY, CAO J. Microgel single-cell culture arrays on a microfluidic chip for selective expansion and recovery of colorectal cancer stem cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(37): 12628-12638.
- [58] WANG H, MOONEY DJ. Biomaterial-assisted targeted modulation of immune cells in cancer treatment[J]. *Nature Materials*, 2018, 17(9): 761-772.
- [59] WU D, YU YR, ZHAO C, SHOU X, PIAO Y, ZHAO X, ZHAO YJ, WANG SQ. NK-cell-encapsulated porous microspheres *via* microfluidic electrospray for tumor immunotherapy[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(37): 33716-33724.
- [60] TIAN YS, XU CM, FENG J, HUANGFU YY, WANG K, ZHANG ZL. Personalized gel-droplet monocyte vaccines for cancer immunotherapy[J]. *Lab on a Chip*, 2021, 21(22): 4414-4426.
- [61] TIAN YS, WANG K, XU CM, FENG J, ZHANG ZL. Non-invasive T cells adoptive immunotherapy for solid tumor with gel anti-tumor T-cell injections[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 439: 135839.

(本文责编 陈宏宇)