

· 综述 ·

基于微流控芯片的人工细胞研究进展

杨雁婷¹, 邓吉楠², 杨军^{2*}

1 西南大学 动物科学技术学院, 重庆 400715

2 重庆大学 生物工程学院, 重庆 400030

杨雁婷, 邓吉楠, 杨军. 基于微流控芯片的人工细胞研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2100-2119.

YANG Yanting, DENG Jinan, YANG Jun. Advances in artificial cells based on microfluidic chips[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2100-2119.

摘要: 合成生物学的主要目标之一是自下而上地构建人工细胞。它不仅能深入理解生命的起源和细胞功能, 还能在人工细胞底盘、组织模型、工程治疗递送系统和药物筛选工具等领域发挥关键作用。然而, 这一目标的实现极具挑战, 细胞结构的复杂性、基础模块的微型化和多样性对构建方法提出了极高要求。微流控芯片作为一种先进的分析系统, 为人工细胞的构建提供了一种有效工具, 能够更精确地控制其结构及局部微环境, 成为当前研究的首选途径。本文综述了基于微流控芯片的人工细胞构建、操作与分析方法, 强调了微环境对生命系统和人工自我维持体系的重要性, 展示了人工细胞在多个关键生物医学领域的广泛应用。通过探讨不同微流控方法的优缺点及其在各种应用中的表现, 帮助研究人员更深入地理解人工细胞相关研究。最后, 对基于微流控技术的人工细胞研究的未来发展进行了展望, 期待这一领域能够取得更大突破和进步。

关键词: 合成生物学; 巨型脂质体; 微环境; 区室结构

Advances in artificial cells based on microfluidic chips

YANG Yanting¹, DENG Jinan², YANG Jun^{2*}

1 College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400030, China

Abstract: One of the main goals of synthetic biology is to build artificial cells in a bottom-up manner, which not only facilitates the deep understanding of the origin of life and cell function but also plays a critical role in the research fields such as the development of artificial cell chassis, tissue models, engineering drug delivery systems, and drug screening tools. However,

资助项目: 国家自然科学基金(21827812, 81871450)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21827812, 81871450).

*Corresponding author. E-mail: bioyangjun@cqu.edu.cn

Received: 2024-01-30; Accepted: 2024-04-22; Published online: 2024-04-24

achieving this goal is extremely challenging. The complexity of cell structures and the miniaturization and diversity of basic modules pose high requirements for the construction methods. The microfluidic chip, as an advanced microanalysis system, serves as an effective tool for building artificial cells. It can accurately control the structure and local microenvironment of artificial cells, becoming the preferred approach for the current research on synthetic life. This article reviewed the methods of constructing, manipulating, and analyzed artificial cells based on microfluidic chips, emphasized the importance of the microenvironment for life systems and artificial self-sustaining systems. In addition, this article demonstrated the wide applications of artificial cells in multiple critical biomedical fields. Exploring the advantages, disadvantages, and application performance of different microfluidic methods can enrich our knowledge about artificial cell research. Finally, we made an outlook on the development of artificial cell research based on microfluidics, expecting that this field can achieve greater breakthroughs and progress.

Keywords: synthetic biology; giant liposomes; microenvironment; compartment structure

生命体是自然界中最复杂且精妙的存在，其起源一直激发着人们的探索欲望。细胞是生命系统的基本构成单位和研究基石。然而，细胞的复杂性和脆弱性为生命探索带来了极大挑战。合成生物学开辟了一个全新的视角：从简单成分出发，构建在形式和/或功能上类似生物细胞的人工仿生结构并赋予其活细胞属性^[1]。这些称为人工细胞的合成结构集成了各种生物构建块，展现出特定的细胞机制，可以用于探索生物过程和生命起源，并作为仿生系统在某些应用中替代甚至超越活细胞。人工细胞研究有望为生物学带来突破性的新见解，并在生物技术领域创造新的机会。

人工细胞能在特定环境中生长并展现出一定的自主性和自我繁殖能力^[2]。构建人工细胞主要有自上而下和自下而上 2 种方法。前者利用生物技术去除活细胞中不必要的基因和细胞器，直至获得能够存活的最小单位。而后者旨在从简单非生命成分开始，逐步构建具有细胞功能的仿真体，从而避免细胞的复杂性。自下而上方法一般利用细胞膜类似物模拟细胞膜内外区隔。同时，在内部构建细胞器等区室结构，

模拟生物细胞的关键组成部分。通过容纳酶和基因等生物活性物质，支持生化反应途径，为区室赋予特定功能。与生物细胞相比，人工细胞复杂性大大降低，可以保持对变量的完全控制，更易于研究和设计。因此，自下而上方法不仅可以为生命起源等研究提供有价值的见解，而且人造细胞系统也可能成为合成生物学研究的通用平台。

微流控技术的飞速发展推动了人工细胞研究的进步。微流控是一种在小体积流体中操控微米尺度结构的技术，可以对流体、分子、颗粒和细胞等进行精确控制。微流控芯片成本低、消耗少，能够对人工细胞及其环境进行控制。它可以创造出更复杂的区室和难以通过其他方式实现的结构，为人工细胞的制备、操作和分析提供一个多功能平台。本文对利用微流控芯片构建人工细胞的潜在路径进行综述，在芯片的特定微环境中，可以组装具有生长、自主和自我繁殖能力的微结构系统，进行高度受控的生化反应。这一领域的发展将有力推动人工细胞的研究进程，并在塑造自下而上合成生物学的未来路线方面发挥核心作用。

1 人工细胞的主要分类

人工细胞拥有一个界定其内部与外部环境的屏障,其功能与细胞膜类似。形成屏障时可产生微囊泡、凝聚物、微液滴等多种结构类型,这也成为其主要分类依据。其中,双层膜包裹水核所形成的微囊泡结构与生物细胞形态相似,是最常见的类型。而脂质膜因其独特的生物相容性和细胞膜相似性而最具吸引力,其主要构成单元——磷脂具有亲水头部和疏水尾部,可在水环境中自组装成特定囊泡结构——脂质体(liposomes)。由于与天然生物膜的相似性以及膜蛋白的兼容性,脂质体已成为构建人工细胞的一种“金标准”;脂质体根据大小和脂双层数量可分为小单层脂质体(small unilamellar vesicles, SUVs, <100 nm)、大单层脂质体(large unilamellar vesicles, LUVs, 100–1 000 nm)、巨型单层脂质体(giant unilamellar vesicles, GUVs, >1 μm)和多层脂质体(multilamellar vesicles, MLVs)等^[3]。其中, GUVs 与细胞尺寸相当,是人工细胞最常用的一种底盘结构。但是,脂质体膜缺乏蛋白质和糖类,也缺少细胞骨架的支撑作用。相较于脂质体,聚合物囊泡(polymersomes)展现出更好的机械性能和稳定性,对外部环境变化相对不敏感,具有更高强度和更长寿命,能够更有效地包载内容物。此外,其基本构成单元嵌段共聚物可以根据需求定制其理化性质。然而,聚合物囊泡具有不利于膜蛋白或分子孔/通道嵌入的缺点。为结合脂质和聚合物囊泡的优点,脂质/聚合物混合囊泡(hybrid vesicles)应运而生^[4],它兼具了脂质体的生物相容性和聚合物囊泡的结构稳定性,可以更好地控制和调整其理化性质以适应各种应用场景。随着微流控技术的不断进步,推动了液滴制备及应用研究的飞速发展。与细胞尺寸大致相当的油包水(water-in-oil, W/O)等

微液滴(droplets)在人工细胞构建中应用越来越广泛^[5]。这些液滴与天然活细胞有相似的内部环境,为了保持其稳定性,通常需要使用磷脂和人工表面活性剂等进行包裹。由于油水界面较强的界面张力,这些油包水液滴展现出更高的稳定性和可操作性。

除了常见膜包水结构,研究人员还探索出一些非典型结构类型。例如,液滴界面双层(droplet interface bilayers, DIBs)^[6-7]由微阱内相互接触的两个脂质化水滴之间组装的脂双层膜形成。脂双层面积更小,更适合膜的特异性研究。此外,还有胶体(colloidosomes)^[8]、金属有机框架(metal-organic frameworks, MOFs)^[9]和凝聚体(coacervates)^[10]等结构,将固体材料按一定方式组装在一起,包被生物材料及液体成分形成复合体,实现类细胞功能。相对囊泡结构来说,这些结构具有较好的稳定性和多样性,是未来人工细胞构建研究的重要方向。人工细胞的主要分类及优缺点总结见表1。

2 微流控芯片上人工细胞的构建

由于人工细胞材料和结构的多样性,构建方法也各有千秋。微流控技术是一种强大的工具,它利用精确的操控手段,在微流体环境中将有机和无机分子按照特定方式组装成类似细胞的微结构系统。为了提升制备效率,可以利用微阵列芯片的高通量或者液滴微流控技术的连续操作。除了简单囊泡结构,微流控技术还能够在其内部精确地包裹核酸、蛋白质等生物组分,甚至形成各种复杂胞内微结构,还可以对初步构建的人工细胞进一步地改造和优化,实现更复杂的细胞结构和功能。

2.1 囊泡结构的制备

以脂质体为例,基于两性分子的囊泡构建主要有两类方法。第一类方法需要首先制备出

表 1 人工细胞的分类及其主要特性

Table 1 Classification and main characteristics of artificial cells

Artificial cells	Structural units	Advantages	Limitations	References
Liposomes	Phospholipid	High biocompatibility, functionalization, and biomimicry	High permeability, lateral mobility, and sensitivity, low stability and chemical versatility	[3,11-35]
Polymersomes	Amphiphilic polymers	High stability, tough and more chemical versatility	Low molecular permeability and lateral mobility	[36-37]
Hybrid vesicles	Phospholipid/polymers	High stability, controllability, and functionalization	Exhaustive formation process, phase separation, domain fission	[4]
Droplets	Phospholipid, polyelectrolytes, biomacromolecules	Good monodispersity and convenient preparation	Organic residues	[5,38-48]
DIBs	Phospholipid	Good cell communication model, high biocompatibility	High membrane permeability, low stability and chemical versatility	[6-7,43]
Colloidosomes	Inorganic and/or organic polymers	High chemical versatility, low mass transfer resistance	Low encapsulation rate, harsh chemical crosslinking process	[8]
MOFs	Metal/organic materials	High stability and specific surface area	Complex preparation process	[9,49-50]
Coacervates	Polyelectrolytes, biomacromolecules	Mimic biological condensed phases, high biocompatibility	Structural instability	[10,51]

脂双层膜，然后按一定规律卷曲封闭，包裹水相内容物形成封闭囊泡。该方法需要先在固体表面上借助有机溶剂进行涂布，形成层状磷脂干膜，再加入水溶液使磷脂分子水合形成巨型囊泡。这一方法简单、高效和易执行，但 GUVs 尺寸不均匀，膜结构控制困难，伴有多层副产物，装载效率低，另外酶、DNA 和电解质^[11]等会阻碍膜的自发膨胀。实践中，采用微孔阵列结构来约束脂质膜分布和水合过程，可以解决 GUVs 尺寸均匀性差等问题(图 1A)^[12]。同时，在制备过程中引入一些非电解质，可以减小电解质因素的影响，增强水合作用^[13]。改善水合作用更主要的方式是电形成。在出芽过程中额外施加高交变电流有助于产生细胞大小的单分散囊泡，但这一方法一般不适合带电磷脂和较高离子浓度。通过调整电场频率和振幅，可以得到优化的电形成工艺^[15-17]。电形成等水合方法都具有操作简单、结构可控、无有机残留等

优点，但是包载率较低、受环境因素的影响较大。其他物理作用也可以用于囊泡形成，如微流体喷射方法可以机械地吹出具有不对称脂质小叶的 GUVs^[18]。

第二类方法则主要基于乳液。首先在油相中形成的水相液滴可以在油/水界面上包被单层脂膜。随后，通过相转移等方式，在去除液滴周围油相的同时形成另一单层脂膜，从而构建出脂质体。相转移方法可以形成内外不对称 GUVs，对理解生物细胞的胞吞和胞吐、膜蛋白折叠、膜力学特性等具有重要意义。此外，该方法还具有尺寸的高度可控性和均一性，包封效率 100%，并可逐层制作多层囊泡结构^[19]。由于在乳液液滴形成和相转移上的显著优势，液滴微流控技术成为了被广泛采用的相转移类方法，在包囊效率、产率、膜结构和尺寸可控性方面具有显著优势^[39-41]。通过先得到结构、尺寸一致性很高的单层膜包被囊泡，然后相转移形成所需

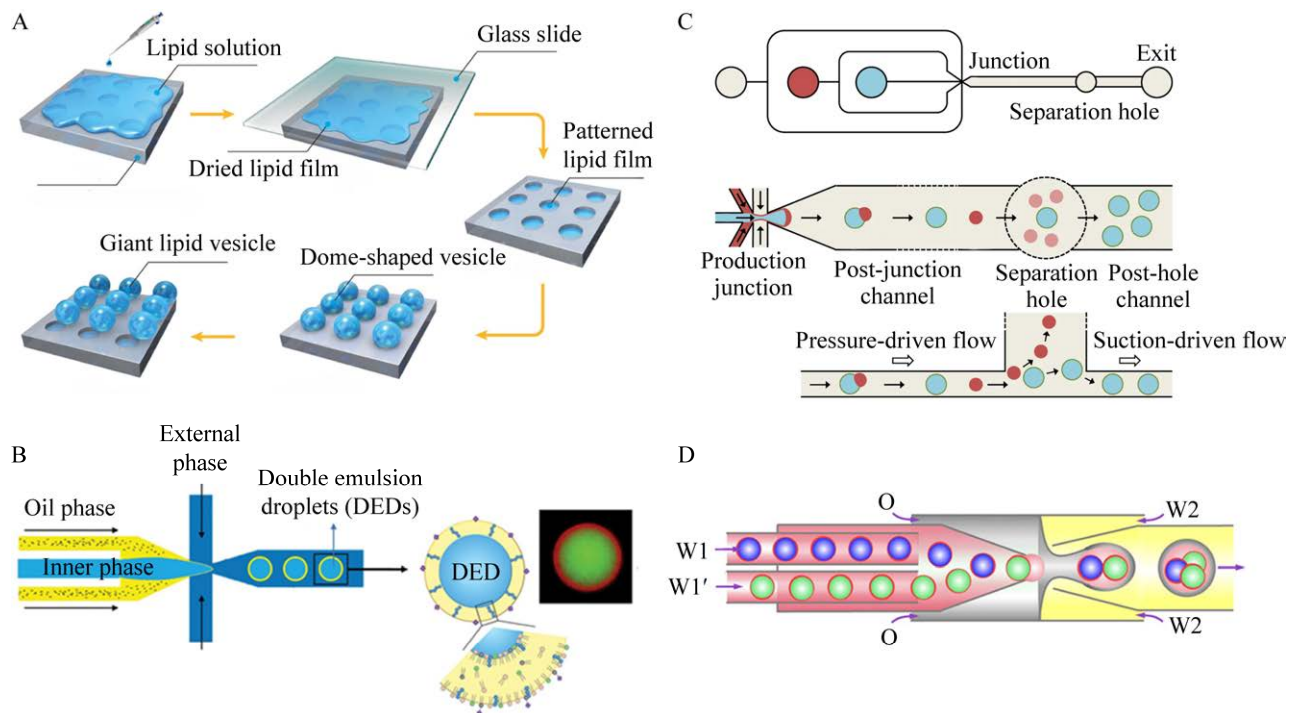


图 1 几种常见的人工细胞微流控构建方法

Figure 1 Several common microfluidic methods for artificial-cell construction. A: Preparation of giant lipid vesicles on hydrophilic polydimethylsiloxane (PDMS) microarray chip^[12]. B: Double-emulsion droplets generation on a flow focusing microfluidic device^[3]. C: Octanol-assisted liposome assembly-based liposome production and purification^[14]. D: Microfluidic preparation of double emulsions with distinct interior liposomes and the dewetting process^[38].

双层膜结构，两步操作可利用不同微流控模块分别完成。目前，最常用的一种液滴微流控策略涉及水/油/水(water/oil/water, W/O/W)液滴，也称双乳液，在单步聚焦流微流控芯片上使用较大液滴封装小液滴连续生成(图 1B)^[3]；最内层水相含有所需装载的亲水分子，组成膜的两亲分子溶解在油相中，形成稳定水/油/水乳液后去除中间油相溶剂；液滴产率可达数百个/s，具有极高的单分散性(CV<5%)。在此基础上演化出辛醇辅助的脂质体组装(图 1C)^[14]等新方法。并且通过油包水-油包水三重乳液滴，可以组装不对称囊泡^[42]。此外，液滴裂变、介电泳力和电润湿力都可用于产生基于液滴的人工细胞结构。随着微加工和微流控技术的飞速发展，众多创

新的制备方法纷纷涌现，如利用 3D 打印技术制造人工细胞成为一种具有挑战性的尝试，实现难度小、产率高，但囊泡尺寸较大且不易形成复杂内部结构^[5]。

2.2 胞内区室化构建

区室化是生物学的一个普遍组织原则，通过区室化可以实现复杂但明确的空间内容和功能组织，允许不同化学环境共存，建立化学梯度，维持非平衡状态并隔离不相容成分。此外，区室化还采用分工原则来提高工艺效率和生产力。为了构建更具有生物相似性的人工细胞，常利用自组装过程形成区室化结构^[52]。微流控操作可以对自组装过程实现更精确控制，实现区室结构的逐一组装^[43-45]，也可以通过产

生多层、多囊泡脂质体来实现多区室结构^[20]。此外,通过选择性图案化器件,微流控操作可以产生基于液滴面间双层的区室化脂质结构^[46]。在静态区室化结构基础上,利用液-液相分离方法,还可以构建由化学和机械信号触发的动态区室化结构,实现局部蛋白质浓度调控等功能^[52-53]。液滴微流控技术可以有效控制多室囊泡,精确定义区室数量、大小以及其脂质组成和内容物,还可以通过膜通道进行功能化,利用信号级联实现区室间通信^[21]。采用多步骤微流控策略,通过双乳液模板的脱湿来分级组装嵌套脂质体结构,可以形成同心、偏心和多室脂质体。并且,通过这些多区室结构可以实现类似“细胞核”的转录、核酸包膜运输等功能,将纳米孔插入双层膜中可以实现跨核膜的运输过程(图 1D)^[38]。然而,膜中残余油相仍需进一步解决^[47]。基于液滴的多室人工细胞还可以利用气动、加热和磁性元件进行远程操作,实现各种后处理功能^[54]。LUVs 与细胞器尺寸相当,可直接用于细胞内区室构建,同时也可以采用 SUVs 作为基础的自组装区室结构^[22,55]。

2.3 非膜组分的装载

人工细胞非膜组分的装载主要有 3 种方式:第一种是在膜上和膜内特定区域组装设定组分^[56]。第二种是利用生物或化学等手段,由已有组分产生新组分,如利用无细胞表达系统在内部重建蛋白质生产能力^[57-59]。其中,使用黏土微凝胶系统能够创造高产的蛋白质合成分隔微环境^[60],具有较好生物相容性和多孔性质的水凝胶可实现长时间胞内蛋白表达^[61]。Zhou 等^[62]将无细胞转录和翻译系统的蛋白质固定在水凝胶聚合物骨架上,并将质粒模板和核糖体封装在水凝胶内;在营养物质和能量持续供应下,人工细胞可稳定表达蛋白质至少 11 d;使用 *lac* 操纵子实现了对蛋白质表达的调控,可以快速

响应喂食缓冲液中异丙基- β -D-1-硫代半乳糖苷浓度的变化。Lai 等^[63]以及 Ouyang 等^[64]在此基础上加以改进,使稳定的蛋白质表达时间分别提高到 16 d 和 30 d。第三种方式则利用人工细胞的操作手段,如物理穿孔、跨膜运输等实现膜上或膜内成分改变。

2.4 其他细胞结构的构建

除了膜结构构建及内容物装载,还需要构建细胞骨架^[36,65-66]、细胞壁^[50]和鞭毛^[67]等特征结构。将细胞骨架系统包裹在人工细胞中,能够利用浸润原理改变细胞形状、调节细胞体积,进而完成迁移和有丝分裂等复杂任务。微水凝胶网络可以模拟细胞骨架,增强脂质体对渗透冲击的抵抗力,并可以通过固定纳米颗粒进行功能化^[68]。此外,一些高聚物材料,如聚乙二醇^[69]和聚(N-异丙基丙烯酰胺)^[70],也可以形成类似细胞骨架结构。植物细胞的完整性很大程度上依赖细胞壁。因此,在人工植物细胞中构建类细胞壁结构也是必不可少的^[71]。纤维素纳米纤维和果胶是常用构建材料^[72],可以将果胶与纤维素工程嵌合蛋白或半纤维素网络连接,实现细胞壁模拟^[73]。纤毛通过协调异时运动,在自我推进、食物捕获和细胞运输中发挥重要作用。在 μm 尺度上模拟具有运动功能的纤毛结构一直是一个巨大挑战。最近,Zhang 等^[74]通过 3D 打印制备了一种附着在硬磁微粒上的丝素蛋白水凝胶束,采用磁性驱动方式实现了具有生物相容性和异相可编程性的人工纤毛功能,人工纤毛表现出稳定的驱动性能、高温抗性和高机械耐久性,可产生多种动作模式。

2.5 非囊泡人工细胞的制备

非囊泡人工细胞的形成大多依赖自组装方法,通过复杂的整体协同作用,在多个尺度上将分子组织成有序结构。这一方法简单且快速,但所形成的人工细胞尺寸单分散性较差,生产

效率也较低。微流控技术可以提高自组装过程的可控性^[75]。除了自组装,非囊泡人工细胞的微流控制备还可以采用物理化学聚合方法,在加热或紫外线照射下将液滴聚合为固体微粒。为了降低制备过程中产生的有毒自由基的影响,可以采用热诱导物理凝胶化和冷冻凝固等方法。

3 人工细胞的微流控操作

微流控芯片的一个关键优势在于其强大的集成功能,能够将多个功能模块整合至单个芯片上。本研究组曾在单一芯片上集成了制备、收集和分析模块,在人工细胞有效制备后即可对其进行进一步操作^[23]。多种操作的集成具有突出优点,如人工细胞形成和分析间隔显著缩短,有利于时间敏感实验;避免了样品转移操作导致的群体偏差,并可以消除各种污染风险。

3.1 捕获、移动、形状控制

芯片上人工细胞的捕获定位是进行静态观察、结构和环境操作等实验的前提。其中,被动捕获手段利用了细胞自身特性、流体控制和各种微结构。例如,沉淀法通过增加人工细胞密度,利用重力将其牵引至观察室底部。这种方法设计简单,但高密度物质可能会对脂质膜等结构和性质产生影响。此外,沉淀法无法实现完全固定化。化学、生物偶联也是一种简单可行的固定方法。其中,基于生物素-亲和素偶联的方式最为常见,但需要预先修饰,过程较复杂,标记物可能对细胞功能造成一定影响。目前,在膜上组装血小板整合素等黏附蛋白成为更可行的一种操作方式^[76]。为了提高人工细胞固定的牢固程度,通常需要借助各种微结构^[77]。这类方法不需要外围设备,但也存在人工细胞脱逃风险,而且流动力会对膜有一定剪切作用。利用各种物理作用可以对人工细胞进行更有效的操控。其中,光镊具有高时空控制水平,可

将单个人工细胞定位在微通道特定位置,还可以通过集成光阱来同时约束多个细胞^[78]。将光镊与微流动池结合,可以直接推拉长度超过半毫米的脂质纳米管;此外,用光捕获微球推动脂质纳米管,还能准确测量其机械性能^[79]。然而,光镊的通量仍然不够高且设备昂贵。介电电泳力控制精度高、灵活可变,是目前主流的操作方法;但是,集成微电极的加工工艺较为复杂,且电场可能引入电解等负面影响^[80]。

3.2 分选

人工细胞制备往往无法达到理想的单分散性,通常需要挑选出具有特定特征的个体,以便后续研究^[81]。同时,囊泡制备和操作过程中产生的一些残留成分和副产物也会对后续应用造成干扰^[82]。因此,制备后的分选操作非常关键。微流控分选方法可以从多分散的初始群体中选择具有合适特征的目标人工细胞,从而大大降低对制备技术的要求。这些方法包括基于各种光学特征和特定标记物的主动分选方法和基于介电电泳的被动分选方法等。其中,介电电泳分选应用广泛,能实现较高的分选通量,还可以与荧光检测相结合。在实际操作中,基于尺寸的被动分选最简单。可以使用微捕获柱(图 2A)^[81],利用微柱间隙或者一些微型捕获陷阱来捕获人工细胞,从而基于尺度差异实现分选功能,也可以改变微通道高度,根据细胞在不同流层中的行为进行过滤(图 2B)^[82]。

3.3 局部注射

在人工细胞构建及后续研究中,往往需要在膜上或内部添加特定材料,以满足设计要求^[83]。因此,局部注射成为了一种关键技术,能够精准地将所需组件加入现有对象中,对于按特定顺序激活反应或实现自下而上的逐步组装具有重要意义。通过显微注射等手段,将特定组分导入目标对象,进而对已形成区室进行操作或

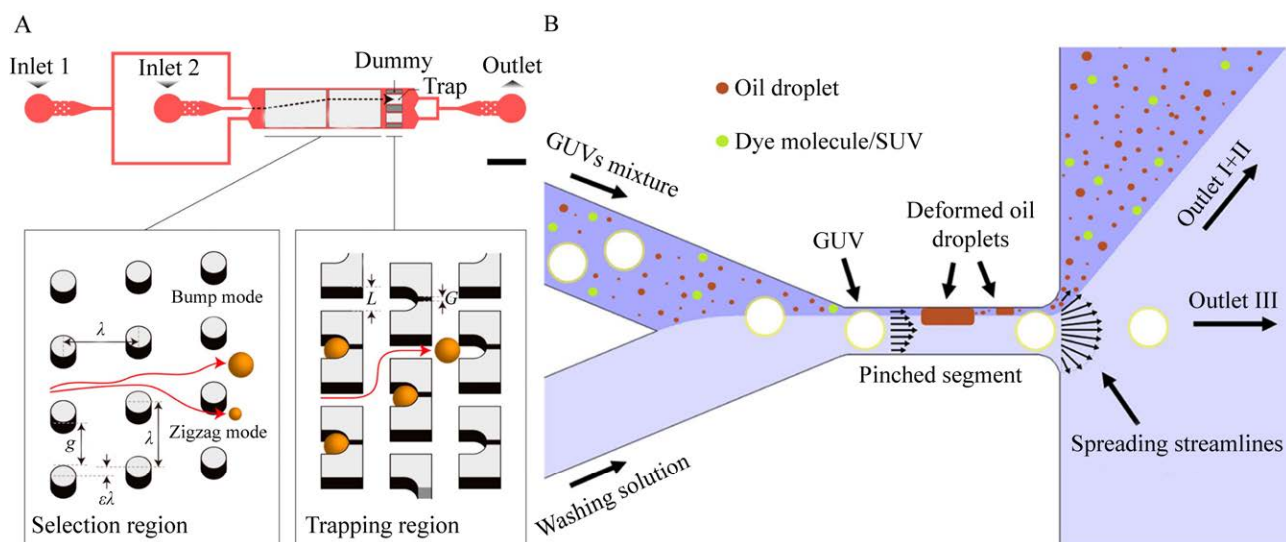


图2 人工细胞的微流控分选方法

Figure 2 Microfluidic sorting method for artificial cells. A: Integrated microfluidic system for size-based selection and trapping of giant vesicles^[81]. B: Vesicles purification using a narrow pinched-segment with a width comparable to the diameter of GUVs^[82].

按顺序添加多种成分。尽管这种方式操作精度高且定量可控，但效率相对较低。为了提高物质递送效率，研究人员采用阵列化电穿孔技术完成了大量单一人工细胞的同时注射操作，能够精确控制每个囊泡的内容物^[24-25]。这种技术不仅简单可靠，而且效率较高，未来应用可能更加广泛。此外，Yuan 等^[48]通过精确调控微通道内的压力，即使不施加电场也能将氯化钙注入含有碳酸钠的流动液滴中，从而实现可控的晶体制备反应，获得碳酸钙晶体微颗粒。

4 微流控芯片上人工细胞的分析及行为研究

芯片上人工细胞的分析主要涵盖两个关键方面。一是针对细胞膜的研究，如膜融合。另一部分与其内容物紧密相关，通过将生物活性物质封装在囊泡内，深入探究基因表达、细胞生长、生化级联反应以及细胞间通讯等诸多生物学过程。

4.1 膜基本参数的测量

人工细胞大多具有类细胞膜结构，对其深入分析对于理解和评估所构建的人工细胞至关重要。对于任何新型人工细胞膜系统，都应对其膜性质及其与外部缓冲液/试剂的相互作用进行充分表征。常见膜结构参数包括尺寸^[84]和膜层数等多个方面。此外，借助微流控技术的精确力学操作，可以测量膜的一些基本物理特性，如弹性、刚度、转变温度以及黏度等^[85]。

4.2 生长、融合及分裂

人工细胞的尺寸增加和个数变化能够模拟天然细胞的生长、融合及分裂等基本特征。生长主要表现在细胞内容物和膜的增加^[26]。内容物增加通常与基因表达相关，而膜生长则基于不断整合微环境中的游离膜成分物质。增殖则主要关注基因复制和膜分裂^[86]。通过转录和翻译，在原位生成蛋白质的能力是构建人工细胞的核心挑战^[87]。融合不仅对细胞功能(胞吞、胞吐、外泌体转运、神经信号传递等)至关重要，

而且也可以触发人工细胞系统的反应。人工细胞可借助促融试剂介导融合,而基于融合蛋白的融合方法更接近于自然过程。此外,还可以在人工细胞膜构建时添加特定结构来诱导囊泡脂质膜间紧密接触并融合。一些物理作用如光镊或电场也可以促进脂质膜融合^[27]。分裂主要依赖于囊泡表面体积比的增加和膜上负曲率改变,控制脂质成分或脂质体封装内容物等方式来诱导膜分裂^[88]。直接改变膜成分是最有效的手段之一。例如,在周围介质中添加具有特定链长和头部基团的脂质,可以通过其在脂质膜上的整合对膜曲率的影响来实现脂质体分裂^[89];该方法表明 L 型细菌的分裂是由表面积相对于体积的过度积累所驱动的,细胞几何形状在控制分离染色体的相对位置和移动中也起着主导作用,这一研究证明了几何效应在一系列关键细胞功能中的重要性。另一种方法是利用外部因素,主要通过物理作用如温度或机械作用来分裂脂质体。由于脂质体的脆弱性,机械作用诱导分裂的位置往往难以控制。因此,在许多情况下,触发分裂过程需要同时叠加多种刺激和相应的微操作方法,如膜相分离和渗透压或温度变化的组合,从而提高分裂过程的可控性。

4.3 级联的胞内反应

生物活细胞中的代谢过程和信息传递等活动,通常依赖于一系列由酶催化的级联反应。与此同时,级联反应在合成生物学研究也有着举足轻重的地位。巨型囊泡作为微米尺度的封闭空间,为开展微量化学和生物化学反应提供了理想环境。单一囊泡中可以装载单一试剂或完整反应体系,在加入另一种试剂后触发特定反应过程,如蛋白质表达。此外,级联反应还可以基于多个独立区室结构,按照一定的顺序完成,如不同区室之间的通信和时空可调的

复杂反应网络^[36,90]。

4.4 跨膜运输

跨膜运输直接影响细胞感知、细胞间通讯以及复杂的细胞反应能力。然而,大多数大分子化合物难以穿过磷脂双层,而脂肪酸膜则具有相对较高的渗透性。因此,通过脂肪酸和磷脂形成混合囊泡膜,可以提高大分子化合物的通透性并按需调节。此外,膜的温度相变特性也可以用来调节通透性,实现选择性物质递送^[91]。纳米孔^[37,92-93]和膜融合也是重要的跨膜物质传输途径,对大分子尤为重要。例如,利用静电介导的膜融合技术,可以将葡萄糖-6-磷酸、异丙基 β -D-硫代半乳糖苷等小分子和质粒 DNA 等大分子从带负电荷的 LUVs 运输到带正电荷的 GUVs 中(图 3A)^[28],以触发 NAD^+ 参与的酶反应、细菌基因表达以及来自质粒 DNA 的绿色荧光蛋白的表达。当然,要实现最佳的跨膜运输能力,最有效的方法仍是模仿天然细胞的各种跨膜通道蛋白结构。然而,除了蜂毒素等简单蛋白结构外,构建复杂跨膜蛋白仍有较高难度。

4.5 能量代谢

随着人工细胞对复杂功能的追求,维持新陈代谢至关重要。将化学能或光能等转化为能量源,可以模拟天然细胞的自给自足。人工细胞内可以承载多种酶,通过级联催化反应将化学能转化为 ATP。然而,鲜有研究能够实现真正的能量再生。由于缺乏能量和物质回收机制,人造细胞的新陈代谢往往会随着营养物质的消耗或废物的积累而迅速终止^[94]。光能作为能量来源一直备受关注。在装载类囊体的聚合物人工细胞中,可以利用光驱动质子泵产生质子梯度,随后合成 ATP(图 3B)^[29];以此为基础,驱动胞内级联生化反应,将葡萄糖催化转化为

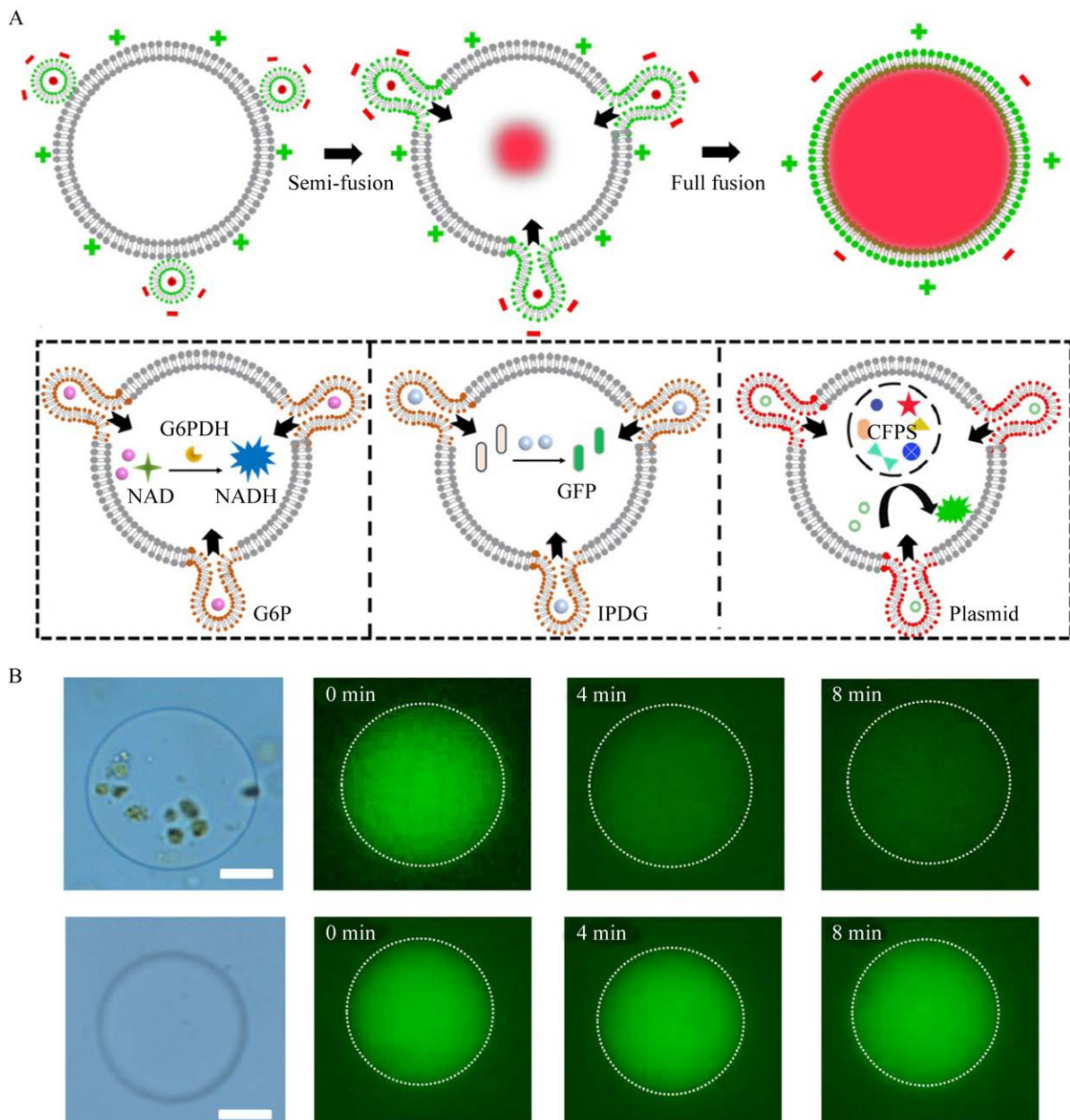


图3 跨膜物质传递及能量代谢^[28-29]

Figure 3 Transmembrane material transfer and energy metabolism. A: Transmembrane molecule transport based on fusion and their downstream metabolic mimicking inside the artificial cells^[28]. B: Time-dependent fluorescence images of pH varying inside GUVs with (top row) and without thylakoids (bottom row) under illumination^[29]. Scale bars: 20 μm .

6-磷酸葡萄糖酸内酯，同时将 NADP^+ 转化为 NADPH 。将进行光合作用的原核细胞封装在 GUVs 中模拟叶绿体，在光照下也能使 ADP 转化为 ATP ^[95]，或将光能转化为化学能以产生葡萄

糖分子^[96]。通过光合囊泡和去膜鞭毛，可以提高光驱动能量模块和运动功能单元的生物相容性和效率^[67]，实现鞭毛推进与拍频耦合。此外，还可以模拟呼吸过程，将线粒体封装在明胶基

人工细胞中, 在 24 h 内持续产生 ATP^[97]。

4.6 细胞内及细胞间的信息交流

化学信号交流对于维持生命的正常运行非常重要。人工细胞内的级联酶反应设计可以模拟化学信号通信。例如, 在两个人工细胞器中分别引入葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶, 加入 Amplex 红作为信号分子; 当胞外葡萄糖分子通过醇溶蛋白孔进入含葡萄糖氧化酶细胞器时, 会触发一系列反应最终产生 H_2O_2 ; 这一分子随后被转运到另一个细胞器, 在辣根过氧化物酶的催化下将 Amplex 红氧化为红色间苯二酚, 从而实现信息交流^[30]。此外, 还有基于光开关通讯机制的人工细胞器间通讯方法^[98]。在两个囊泡连接部分嵌入跨膜蛋白, 可以赋予直接的信号传递和物质交换能力, 还可以通过分泌分子的扩散或运输来实现细胞间信息传递^[51,99-101]。Yang 等^[102]设计了光响应的、DNA 编码的发送-接收结构, 人工细胞由蛋白质-聚合物微囊泡构成, 分子通信则通过扩散的 DNA 信号来实现; 使用微流控捕获阵列控制发送和接收人工细胞的空间分布, 并用光设置一个从单个发送细胞发出的信号梯度, 通过 DNA 链置换激活接收细胞; 该研究揭示单个发送细胞的有效信号范围由接收细胞的密度和通透性、细胞外信号降解、信号消耗和催化再生等多因素决定; 他们还构建了一个三群体结构, 将两个发送细胞嵌入接收细胞阵列中, 实现布尔逻辑运算。除了一对一的发射-接收模式, 还可以使用单一刺激触发多种反应, 形成复杂化学反应网络并实现信号特异性识别^[103]。光信号作为一种灵活的信息载体, 也被用于信息交流, 触发细胞间的黏附等作用^[104]。人工细胞间以及人工细胞与活细胞间^[105]的通信, 不仅有助于人工组织结构构建, 还为“仿生技术”发展注入了新的活力。

4.7 多细胞结构及组织构建

随着研究的不断深入, 将单独细胞连接在一起, 通过物质和信息的交流, 可以构建出类似生物组织的多单元结构, 展现出比单个人工细胞更复杂和高级的特性^[106]。多细胞结构构建常常采用 DIBs 网络方法。通过包有脂质单层的油包水液滴互相接触, 在界面处形成双层膜, 从而构建出由独立囊泡组成的网络; 在双层膜上工程化跨膜蛋白质, 可以在独立囊泡间建立通讯联系; 利用细胞间的发送-接收通讯机制, 如蛋白质递送引起的 ssDNA 信使释放^[107], 实现群体感应通讯行为^[31]。此外, 在人工细胞群体中, 通过级联反应方式还可以提高信号强度, 实现较远或较弱信号的有效识别^[108]。

5 人工细胞与微环境

环境对生命的生存至关重要。稳定的外部环境有助于简化生命所需功能, 而贫瘠且多变的环境则要求生物具备一系列强大的生存能力。因此, 生命需要在复杂环境中找到微妙的平衡。在模仿生命时, 需要一个稳定、具体和丰富的环境, 以减少人工细胞的内部复杂性和功能性。微流控芯片为这一挑战提供了精致的解决方案。结合各种微结构和微操作技术, 可以从全局或局部操纵流体微环境, 将特定生化组分输送到细胞周围, 从而改变其环境组成。人工细胞可以通过化学通讯激活或抑制感觉通路。例如, 环境中的小分子触发剂能够控制蛋白质-配体间的相互作用。这种刺激响应行为是许多生物过程的基础, 也是生物仿生研究的关键。刺激源可以是生物或化学性质的, 如 pH 变化、酶反应等^[109-110], 也可以是物理性质的, 如光、温度、超声波、磁场、压力等^[111]。通过组合多种刺激, 可以实现多重响应性。例如,

pH 敏感的人工细胞可使用阴离子脂质衍生物制成,在不同 pH 环境下表现出膜结构域的变化。基于磷脂的不同相变温度可以产生对温度敏感的膜特性,实现内容物的装载和释放等功能。光刺激具有高可控性,是一种简单、非侵入性、高效和按需的触发方式。人工细胞研究中更关注一些类似于生物学的效应,如基因表达的调节。人工细胞可以自我调节基因表达以应对“细胞外”环境变化。例如, Liu 等^[49]利用细胞外 pH 来控制金属-有机框架人工细胞中绿色荧光蛋白的表达,通过多步催化反应代谢生物分子。

6 人工细胞的应用

人工细胞作为生物研究模型,有助于深入探究细胞如何从简单的分子结构组装形成复杂生命单元,并发展出极其复杂的生物功能,从而更全面理解生命起源的本质。同时,由于人工细胞的区室化效应,化学反应和生物合成作用得以显著增强,为智能响应性生物材料、个性化药物的靶向递送系统以及功能受损细胞的替代等领域的快速发展提供了有力支持。

6.1 膜生物学研究

细胞膜是细胞屏障,能够防止胞外物质自由进入,从而保持胞内环境的相对稳定,确保各种生化反应的有序进行。然而,为了完成特定的生理功能,细胞需要与周围环境进行信息、物质和能量的交换,必须具备一套完善的物质转运体系。人工细胞研究可以更深入地探索细胞膜结构与功能的一些核心问题,如膜的不对称性、脂筏结构、跨膜转运^[112-113]、膜蛋白、膜与环境的相互作用^[114-115]等。微流控技术可以精确操控膜的生成,制备传统方法难以实现的不对称膜结构,研究膜内外的横向异质性。然而,

不对称脂质囊泡由于缺乏生物细胞膜中其他成分的支持,其不对称性的维持极具挑战性。脂质的扩散会在短期内导致不对称性消失。嵌段聚合物更容易通过合成方法调整其结构、形状、尺寸和带电性等。不同种类聚合物可以自发选择其在膜内外的分布,从而实现长期不对称性。除了横向异质性,同一单膜层还可能存在侧向异质性,形成所谓“脂筏”结构。尽管越来越多的脂质体模型表明,选用适当的脂质并按一定比例搭配可以形成脂质域,但这种结构的形成和维持都相当困难,因此具体机制仍不明确。除了膜结构外,膜转运等功能研究也非常重要^[116]。如何通过膜结构的构建实现可控的跨膜物质和信号交换,一直是人工细胞膜基础研究中的热点。除了基于渗透和跨膜通道辅助的物质传输外,膜在刺激响应下的形态变化所引起的物质转运(胞吞和胞吐)也备受关注^[32]。

6.2 反应容器及微载体

人工细胞的特殊区室结构为多种复杂反应提供了一个极其实用的研究平台。在脂质体内液中,酶的稳定性远超相同溶液中的游离状态^[33],可能是内部能维持反应物浓度,而且膜表面能提供额外的酶固定空间。借助通道蛋白,在外部信号激发下,可以实现膜内多酶控制的级联生化反应。多区室结构各区室间化学物质的连续选择性释放也能够实现特定级联反应^[117]和有效通信^[34]。为了增强区室内成分释放的可控性,使用乳液相转移生成三元(二油酰磷脂酰胆碱/二棕榈酰磷脂酰胆碱/胆固醇) GUVs,加热到一定转变温度时,可以实现内部荧光染料和肽货物的释放,并通过改变囊泡组成调节释放温度;采用激光等单独寻址和释放触发技术能实现按需调控的反应过程,在智能合成生物系统研发中具有巨大应用潜力^[118]。此外,巨型囊泡

不仅可作为微反应容器,还能构建各种微载体,选择性保护有效载荷并递送到细胞内环境中,在刺激触发或精确时空控制下释放,是极具吸引力的递送工具^[35]。

6.3 信息交换及传感分析

尽管人工细胞在信号传导和通信方面取得了显著进步,但与天然细胞间的复杂通信相比仍有许多不足。除了人工细胞间的信息交换,它们还能与生物细胞进行交流,进而影响生物细胞的行为。对人工细胞间相互调节的研究有助于发展具有复杂通信机制的人工细胞群,借助信号的获取、传输和识别可实现新型传感检测的功能。一个典型的实例是将基因工程微生物嵌入膀胱细胞模拟物中,用作生物传感模块来实时监测外部环境中的乳酸,将膜穿透性 α -溶血素孔嵌入囊泡膜中以便人工细胞感知外部乳酸浓度;一旦乳酸穿过细胞膜,LldR调节蛋白就会与其结合并诱导lldPRD启动子,然后驱动绿色荧光蛋白表达,产生可测量的荧光^[119]。

6.4 医学应用

人工细胞在基因和蛋白质表达、胞内级联反应和细胞间通讯等方面的作用,为其医学应用提供了有力支持。利用人工细胞膜伪装,可有效排除循环肿瘤细胞分离时受到的血细胞和蛋白质干扰,提高收集效率^[120]。人工细胞在药物开发方面也具有巨大潜力。利用癌症细胞衍生的组蛋白和膜,可有效模拟癌症细胞的基因保护和转染功能^[121]。同时,人工细胞还可作为药物运送的载体,诱导细胞内部级联的反应。例如,含有转录和翻译所需分子机制的人工脂质囊泡可在肿瘤内合成抗癌蛋白,发挥治疗作用;人工细胞被设计成独立系统,从微环境中获取营养以触发蛋白质合成;当预先加载DNA、氨基酸和供能分子时,每个细胞中最多可合成 2×10^7 个蛋白拷贝,包括多种具有诊断

和治疗活性、分子量高达66 kDa的蛋白质;将编码为分泌铜绿假单胞菌外毒素的人工细胞与4T1乳腺癌细胞一起孵育,可以使大多数肿瘤细胞死亡,对患4T1肿瘤的小鼠进行局部人工细胞注射后,肿瘤细胞表现出明显的凋亡过程^[122]。此外,人工细胞还可模拟外源入侵细胞,在免疫治疗中极具可行性^[3]。

7 结论与展望

生物科学、工程学等多领域的迅速进步使我们可以逐步揭开生命的神秘面纱,人工细胞研究也因此受到前所未有的关注。然而,细胞微小而精妙的结构对构建技术提出了极为苛刻的要求,微流控芯片技术凭借其独特的优势脱颖而出。芯片内部结构尺寸与细胞相近,能够高效操控流体、微囊泡和生物分子。通过将传统实验室的功能微缩至芯片上,可以实现对人工细胞、亚细胞结构及细胞外微观环境的精确调控,快速、高效地生成具有优良单分散性、膜和内容物可控的人工细胞。不仅如此,微流控芯片还能通过调控膜内外组分和集成多种检测手段,模拟和探索人工细胞的多种生物学功能,如代谢、生长、分裂、物质及信号传递等。这些研究不仅深化了我们对细胞结构和功能的理解,更为人工细胞在细胞模型、药物载体、复杂微反应器等领域的应用开辟了广阔道路。

然而,尽管微流控技术在人工细胞研究领域取得了显著进展,但仍面临多重挑战。微流控技术的复杂的微观操作对芯片设计、加工方法以及检测手段提出了极高要求。同时,生物细胞的复杂性和脆弱性使得人工细胞研究仍局限于简单膜结构和生物学过程的模拟,难以实现对细胞内外组分的精准调控和复杂细胞功能的完全复制。此外,人工细胞在实际应用中也面临诸多难题。例如,在构建基于人造细胞的

药物输送系统时,需要进一步提高其主动识别、跨膜转运和生物学表达能力。同时,如何构建胞内复杂的区室化结构和反应网络也是当前亟待解决的问题。

尽管如此,微流控技术与合成生物学的融合正在不断取得新的突破。随着新材料和新技术的不断涌现,创新的微流控装置和手段正逐步推广应用,为人工细胞的深入研究和未来应用奠定了坚实基础。微流控技术在创建、维持和操控人工细胞方面的卓越表现有望使其在合成生物学中发挥核心作用。展望未来,随着微流控和微加工技术的不断进步,能够在芯片中集成更精细的微结构、微电极等功能单元,实现更精确的时空操控。细胞内外基本结构的精确定位、细胞骨架和胞内细胞器的构建、各单元结构的按需工作等都将使我们对细胞结构和功能有更清晰的认识。与生物细胞类似的功能网络的构建,将使人工细胞具备更多的生物学属性。同时,针对合成生物学和临床医学等应用需求,定制具有主动识别、自主运动、按需生产等独特功能的人工细胞产品也将成为可能。我们期待着一个全新的合成生物学时代的到来,其中人工细胞将作为重要推动力量,引领科学探索的新篇章。人工细胞研究不仅代表着科学领域的前沿探索,更蕴含着开启未来无限可能的希望。

REFERENCES

- [1] YEWDALL NA. Life brought to artificial cells[J]. *Nature*, 2022, 609: 900-901.
- [2] MITCHISON TJ, FIELD CM. Toward synthetic cells[J]. *Science*, 2019, 366(6465): 569-570.
- [3] CHEN JY, AGRAWAL S, YI HP, VALLEJO D, AGRAWAL A, LEE AP. Cell-sized lipid vesicles as artificial antigen-presenting cells for antigen-specific T cell activation[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2023, 12: 2203163.
- [4] WANG Y, CHANG TMS. A polymer-lipid membrane artificial cell nanocarrier containing enzyme-oxygen biotherapeutic inhibits the growth of B16F10 melanoma in 3D culture and in a mouse model[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2021, 49(1): 461-470.
- [5] LI J, BAXANI DK, JAMIESON WD, XU W, ROCHA VG, BARROW DA, CASTELL OK. Formation of polarized, functional artificial cells from compartmentalized droplet networks and nanomaterials, using one-step, dual-material 3D-printed microfluidics[J]. *Advanced Science*, 2020, 7(1): 1901719.
- [6] KORNER JL, ELVIRA KS. The role of temperature in the formation of human-mimetic artificial cell membranes using droplet interface bilayers (DIBs)[J]. *Soft Matter*, 2021, 17(39): 8891-8901.
- [7] STEPHENSON EB, ELVIRA KS. Biomimetic artificial cells to model the effect of membrane asymmetry on chemoresistance[J]. *Chemical Communications*, 2021, 57(53): 6534-6537.
- [8] XU Z, HUECKEL T, IRVINE WTM, SACANNA S. Transmembrane transport in inorganic colloidal cell-mimics[J]. *Nature*, 2021, 597: 220-224.
- [9] YANG JZ, LIN CY, FENG Y, WANG C, GE J, LU Y. Chemical-triggered artificial cell based on metal-organic framework[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 450: 138480.
- [10] YIN YD, NIU L, ZHU XC, ZHAO MP, ZHANG ZX, MANN S, LIANG DH. Non-equilibrium behaviour in coacervate-based protocells under electric-field-induced excitation[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10658.
- [11] WANG Q, LI WM, HU N, CHEN X, FAN T, WANG ZY, YANG Z, CHENEY MA, YANG J. Ion concentration effect (Na^+ and Cl^-) on lipid vesicle formation[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 155: 287-293.
- [12] FAN T, WANG Q, HU N, LIAO YJ, CHEN X, WANG ZY, YANG Z, YANG J, QIAN SZ. Preparation of giant lipid vesicles with controllable sizes by a modified hydrophilic polydimethylsiloxane microarray chip[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2019, 536: 53-61.
- [13] WANG Q, HU N, LEI JC, QING QR, HUANG J, TAO K, ZHAO SX, SUN K, YANG J. Formation of giant lipid vesicles in the presence of nonelectrolytes: glucose, sucrose, sorbitol and ethanol[J]. *Processes*, 2021, 9(6): 945.
- [14] DESHPANDE S, DEKKER C. On-chip microfluidic

- production of cell-sized liposomes[J]. *Nature Protocols*, 2018, 13(5): 856-874.
- [15] LI WM, WANG Q, YANG Z, WANG WG, CAO Y, HU N, LUO HY, LIAO YJ, YANG J. Impacts of electrical parameters on the electroformation of giant vesicles on ITO glass chips[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, 140: 560-566.
- [16] WANG Q, ZHANG XL, FAN T, YANG Z, CHEN X, WANG ZY, XU J, LI YY, HU N, YANG J. Frequency-dependent electroformation of giant unilamellar vesicles in 3D and 2D microelectrode systems[J]. *Micromachines*, 2017, 8(1): 24.
- [17] JIANG LH, WANG Q, LEI JC, TAO K, HUANG J, ZHAO SX, HU N, YANG J. Mechanism study of how lipid vesicle electroformation is suppressed by the presence of sodium chloride[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 206: 111951.
- [18] GOTANDA M, KAMIYA K, OSAKI T, MIKI N, TAKEUCHI S. Automatic generation system of cell-sized liposomes[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 292: 57-63.
- [19] IP T, LI QE, BROOKS N, ELANI Y. Manufacture of multilayered artificial cell membranes through sequential bilayer deposition on emulsion templates[J]. *Chembiochem*, 2021, 22(13): 2275-2281.
- [20] ZILBERZWIGE-TAL S, LEVIN A, TOPRAKCIOGLU Z, KNOWLES TPJ, GAZIT E, ELBAZ J. Programmable on-chip artificial cell producing post-translationally modified ubiquitinated protein[J]. *Small*, 2019, 15(31): 1901780.
- [21] DENG NN, YELLESWARAPU M, HUCK WTS. Monodisperse uni- and multicompartiment liposomes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(24): 7584-7591.
- [22] GÖPFRICH K, HALLER B, STAUFER O, DREHER Y, MERSDORF U, PLATZMAN I, SPATZ JP. One-pot assembly of complex giant unilamellar vesicle-based synthetic cells[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(5): 937-947.
- [23] WANG ZY, WU CX, FAN T, HAN XW, WANG Q, LEI JC, YANG J. Electroformation and collection of giant liposomes on an integrated microchip[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2019, 30(2): 353-358.
- [24] MOU QY, XU ML, DENG JN, HU N, YANG J. Studying the roles of salt ions in the pore initiation and closure stages in the biomembrane electroporation[J]. *APL Bioengineering*, 2023, 7(2): 026103.
- [25] MOU QY, BAI YQ, XU ML, LV D, DENG JN, HU N, YANG J. Microarray chip and method for simultaneous and highly consistent electroporation of multiple cells of different sizes[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(22): 8533-8540.
- [26] DERVAUX J, NOIREAUX V, LIBCHABER AJ. Growth and instability of a phospholipid vesicle in a bath of fatty acids[J]. *The European Physical Journal Plus*, 2017, 132(6): 284.
- [27] KAMIYA K, ARISAKA C, SUZUKI M. Investigation of fusion between nanosized lipid vesicles and a lipid monolayer toward formation of giant lipid vesicles with various kinds of biomolecules[J]. *Micromachines*, 2021, 12(2): 133.
- [28] ZHAO JJ, ZHANG Y, ZHANG XX, LI C, DU H, SØNDERSKOV SM, MU W, DONG MD, HAN XJ. Mimicking cellular metabolism in artificial cells: universal molecule transport across the membrane through vesicle fusion[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(9): 3811-3818.
- [29] SU ZW, ZHANG XX, WANG WC, DONG MD, HAN XJ. Light-harvesting artificial cells for the generation of ATP and NADPH[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2023, 41(1): 57-63.
- [30] LI SB, WANG XJ, MU W, HAN XJ. Chemical signal communication between two protoorganelles in a lipid-based artificial cell[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(10): 6859-6864.
- [31] LLOPIS-LORENTE A, BUDDINGH' BC, MARTÍNEZ-MÁÑEZ R, van HEST JCM, ABDELMOHSEN LKE. Quorum sensing communication between lipid-based artificial cells[J]. *Chemical Communications*, 2023, 59(5): 579-582.
- [32] CANS AS, WITTENBERG N, KARLSSON R, SOMBERS L, KARLSSON M, ORWAR O, EWING A. Artificial cells: unique insights into exocytosis using liposomes and lipid nanotubes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(2): 400-404.
- [33] NOIREAUX V, LIBCHABER A. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(51): 17669-17674.
- [34] ELANI Y, LAW RV, CES O. Vesicle-based artificial cells as chemical microreactors with spatially segregated reaction pathways[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5305.
- [35] SINCARI V, JÄGER E, LOUREIRO KC, VRAGOVIC

- M, HOFMANN E, SCHLENK M, FILIPOVÁ M, RYDVALOVÁ E, ŠTĚPÁNEK P, HRUBÝ M, FÖRSTER S, JÄGER A. pH-dependent disruption of giant polymer vesicles: a step towards biomimetic membranes[J]. *Polymer Chemistry*, 2023, 14(4): 443-451.
- [36] SEO H, LEE H. Spatiotemporal control of signal-driven enzymatic reaction in artificial cell-like polymersomes[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 5179.
- [37] OH J, KIM B, LEE SM, KIM SH, SEO M. Semipermeable microcapsules with a block-polymer-templated nanoporous membrane[J]. *Chemistry of Materials*, 2018, 30(1): 273-279.
- [38] DENG NN, YELLESWARAPU M, ZHENG LF, HUCK WTS. Microfluidic assembly of monodisperse vesosomes as artificial cell models[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(2): 587-590.
- [39] SUN M, LI ZD, WANG SY, MARYU G, YANG Q. Building dynamic cellular machineries in droplet-based artificial cells with single-droplet tracking and analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(15): 9813-9818.
- [40] CLEMENTE I, TORBENSEN K, Di COLA E, ROSSI F, RISTORI S, ABOU-HASSAN A. Exploring the water/oil/water interface of phospholipid stabilized double emulsions by micro-focusing synchrotron SAXS[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(57): 33429-33435.
- [41] SHIMANE Y, KURUMA Y. Rapid and facile preparation of giant vesicles by the droplet transfer method for artificial cell construction[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 873854.
- [42] ARRIAGA LR, HUANG YT, KIM SH, ARAGONES JL, ZIBLAT R, KOEHLER SA, WEITZ DA. Single-step assembly of asymmetric vesicles[J]. *Lab on a Chip*, 2019, 19(5): 749-756.
- [43] BAYOUMI M, BAYLEY H, MAGLIA G, SAPRA KT. Multi-compartment encapsulation of communicating droplets and droplet networks in hydrogel as a model for artificial cells[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45167.
- [44] STAUFER O, SCHRÖTER M, PLATZMAN I, SPATZ JP. Bottom-up assembly of functional intracellular synthetic organelles by droplet-based microfluidics[J]. *Small*, 2020, 16(27): 1906424.
- [45] MICHELIN G, MAERKL SJ. Direct encapsulation of biomolecules in semi-permeable microcapsules produced with double-emulsions[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 21391.
- [46] TRANTIDOU T, REGOUTZ A, VOON XN, PAYNE DJ, CES O. A “cleanroom-free” and scalable manufacturing technology for the microfluidic generation of lipid-stabilized droplets and cell-sized multisomes[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 267: 34-41.
- [47] KRAFFT D, CASTELLANOS SL, LIRA RB, DIMOVA R, IVANOV I, SUNDMACHER K. Compartments for synthetic cells: osmotically assisted separation of oil from double emulsions in a microfluidic chip[J]. *Chembiochem*, 2019, 20(20): 2604-2608.
- [48] YUAN H, PAN Y, TIAN JX, CHAO YC, LI JM, CHEUNG SHUM H. Electricity-free picoinjection assisted droplet microfluidics[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 298: 126766.
- [49] LIU J, GUO ZY, LI Y, LIANG JY, XUE JY, XU JT, WHITELOCK JM, XIE L, KONG B, LIANG K. pH-gated activation of gene transcription and translation in biocatalytic metal-organic framework artificial cells[J]. *Advanced NanoBiomed Research*, 2021, 1(1): 2000034.
- [50] SHI L, LI AL, ZHANG WW, WU HS, CHI YW. Endowing chloroplasts with artificial “cell walls” using metal-organic frameworks[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(21): 11582-11592.
- [51] MASHIMA T, van STEVENDAAL MHME, CORNELISSENS FRA, MASON AF, ROSIER BJHM, ALTENBURG WJ, OOHORA K, HIRAYAMA S, HAYASHI T, van HEST JCM, BRUNSVELD L. DNA-mediated protein shuttling between coacervate-based artificial cells[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2022, 61(17): e202115041.
- [52] LONG MS, JONES CD, HELFRICH MR, MANGENEY-SLAVIN LK, KEATING CD. Dynamic microcompartmentation in synthetic cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(17): 5920-5925.
- [53] ZUBAITE G, HINDLEY JW, CES O, ELANI Y. Dynamic reconfiguration of subcompartment architectures in artificial cells[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(6): 9389-9400.
- [54] LI J, JAMIESON WD, DIMITRIOU P, XU W, ROHDE P, MARTINAC B, BAKER M, DRINKWATER BW, CASTELL OK, BARROW DA.

- Building programmable multicompartiment artificial cells incorporating remotely activated protein channels using microfluidics and acoustic levitation[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 4125.
- [55] HALLER B, GÖPFRICH K, SCHRÖTER M, JANIESCH JW, PLATZMAN I, SPATZ JP. Charge-controlled microfluidic formation of lipid-based single- and multicompartiment systems[J]. *Lab on a Chip*, 2018, 18(17): 2665-2674.
- [56] NOBA K, ISHIKAWA M, UYEDA A, WATANABE T, HOHSAKA T, YOSHIMOTO S, MATSUURA T, HORI K. Bottom-up creation of an artificial cell covered with the adhesive bacterionanofiber protein AtaA[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(48): 19058-19066.
- [57] HO KKY, LEE JW, DURAND G, MAJUMDER S, LIU AP. Protein aggregation with poly(vinyl) alcohol surfactant reduces double emulsion-encapsulated mammalian cell-free expression[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174689.
- [58] van RAAD D, HUBER T. *In vitro* protein synthesis in semipermeable artificial cells[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(5): 1237-1244.
- [59] FUKUMOTO M, TONOOKA T. Construction of an artificial cell capable of protein expression at low temperatures using a cell extract derived from *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Processes*, 2021, 9(2): 212.
- [60] JIAO Y, LIU Y, LUO D, HUCK WTS, YANG DY. Microfluidic-assisted fabrication of clay microgels for cell-free protein synthesis[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(35): 29308-29313.
- [61] HEIDA T, KÖHLER T, KAUFMANN A, MÄNNEL MJ, THIELE J. Cell-free protein synthesis in bifunctional hyaluronan microgels: a strategy for *in situ* immobilization and purification of his-tagged proteins[J]. *ChemSystemsChem*, 2020, 2(3): e1900058.
- [62] ZHOU XY, WU H, CUI M, LAI SN, ZHENG B. Long-lived protein expression in hydrogel particles: towards artificial cells[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(18): 4275-4279.
- [63] LAI SN, ZHOU XY, OUYANG XF, ZHOU H, LIANG YJ, XIA J, ZHENG B. Artificial cells capable of long-lived protein synthesis by using aptamer grafted polymer hydrogel[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(1): 76-83.
- [64] OUYANG XF, ZHOU XY, LAI SN, LIU Q, ZHENG B. Immobilization of proteins of cell extract to hydrogel networks enhances the longevity of cell-free protein synthesis and supports gene networks[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(4): 749-755.
- [65] SAKAMOTO R, MAEDA YT. Unveiling the physics underlying symmetry breaking of the actin cytoskeleton: an artificial cell-based approach[J]. *Biophysics and Physicobiology*, 2023, 20(3): e200032.
- [66] KUROKAWA C, FUJIWARA K, MORITA M, KAWAMATA I, KAWAGISHI Y, SAKAI A, MURAYAMA Y, NOMURA SI M, MURATA S, TAKINOUE M, YANAGISAWA M. DNA cytoskeleton for stabilizing artificial cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(28): 7228-7233.
- [67] AHMAD R, KLEINEBERG C, NASIRIMAREKANI V, SU YJ, GOLI POZVEH S, BAE A, SUNDMACHER K, BODENSCHATZ E, GUIDO I, VIDAKOVIĆ-KOCH T, GHOLAMI A. Light-powered reactivation of flagella and contraction of microtubule networks: toward building an artificial cell[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(6): 1490-1504.
- [68] LI DY, ZHOU ZH, YU YL, DENG NN. Microfluidic construction of cytoskeleton-like hydrogel matrix for stabilizing artificial cells[J]. *Chemical Engineering Science*, 2022, 264: 118186.
- [69] GARENNE D, LIBCHABER A, NOIREAUX V. Membrane molecular crowding enhances MreB polymerization to shape synthetic cells from spheres to rods[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(4): 1902-1909.
- [70] SAUTER D, SCHRÖTER M, FREY C, WEBER C, MERSDORF U, JANIESCH JW, PLATZMAN I, SPATZ JP. Artificial cytoskeleton assembly for synthetic cell motility[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2023, 23: 2200437.
- [71] DEIANA L, RAFI AA, NAIDU VR, TAI CW, BÄCKVALL JE, CÓRDOVA A. Artificial plant cell walls as multi-catalyst systems for enzymatic cooperative asymmetric catalysis in non-aqueous media[J]. *Chemical Communications*, 2021, 57(70): 8814-8817.
- [72] PAULRAJ T, WENNMALM S, WIELAND DCF, RIAZANOVA AV, DÉDINAITÉ A, GÜNTHER POMORSKI T, CÁRDENAS M, SVAGAN AJ. Primary cell wall inspired micro containers as a step towards a synthetic plant cell[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 958.

- [73] NOTOVA S, CANNAC N, RABAGLIATI L, TOUZARD M, MANTE J, NAVON Y, COCHE-GUÉRENTE L, LEROUXEL O, HEUX L, IMBERTY A. Building an artificial plant cell wall on a lipid bilayer by assembling polysaccharides and engineered proteins[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(10): 3516-3528.
- [74] ZHANG SZ, HU XH, LI M, BOZUYUK U, ZHANG RJ, SUADIYE E, HAN J, WANG F, ONCK P, SITTI M. 3D-printed micrometer-scale wireless magnetic cilia with metachronal programmability[J]. *Science Advances*, 2023, 9(12): eadf9462.
- [75] LEATHERS A, WALCZAK M, BRADY RA, AL SAMAD A, KOTAR J, BOOTH MJ, CICUTA P, Di MICHELE L. Reaction-diffusion patterning of DNA-based artificial cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144: 17468-17476.
- [76] FROHNMAYER JP, BRÜGGEMANN D, EBERHARD C, NEUBAUER S, MOLLENHAUER C, BOEHM H, KESSLER H, GEIGER B, SPATZ JP. Minimal synthetic cells to study integrin-mediated adhesion[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2015, 54(42): 12472-12478.
- [77] YANDRAPALLI N, SEEMANN T, ROBINSON T. On-chip inverted emulsion method for fast giant vesicle production, handling, and analysis[J]. *Micromachines*, 2020, 11(3): 285.
- [78] VIVEK A, BOLOGNESI G, ELANI Y. Fusing artificial cell compartments and lipid domains using optical traps: a tool to modulate membrane composition and phase behaviour[J]. *Micromachines*, 2020, 11(4): 388.
- [79] DOLS-PEREZ A, MARIN V, AMADOR GJ, KIEFFER R, TAM D, AUBIN-TAM ME. Artificial cell membranes interfaced with optical tweezers: a versatile microfluidics platform for nanomanipulation and mechanical characterization[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(37): 33620-33627.
- [80] FANALISTA F, BIRNIE A, MAAN RN, BURLA F, CHARLES K, PAWLIK G, DESHPANDE S, KOENDERINK GH, DOGTEROM M, DEKKER C. Shape and size control of artificial cells for bottom-up biology[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(5): 5439-5450.
- [81] KAZAYAMA Y, TESHIMA T, OSAKI T, TAKEUCHI S, TOYOTA T. Integrated microfluidic system for size-based selection and trapping of giant vesicles[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(2): 1111-1116.
- [82] TIVONY R, FLETCHER M, AL NAHAS K, KEYSER UF. A microfluidic platform for sequential assembly and separation of synthetic cell models[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(11): 3105-3116.
- [83] SPENCER AC, TORRE P, MANSY SS. The encapsulation of cell-free transcription and translation machinery in vesicles for the construction of cellular mimics[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2013(80): e51304.
- [84] ADAMS KL, ENGELBREKTSSON J, VOINOVA M, ZHANG B, EVES DJ, KARLSSON R, HEIEN ML, CANS AS, EWING AG. Steady-state electrochemical determination of lipidic nanotube diameter utilizing an artificial cell model[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(3): 1020-1026.
- [85] ROBINSON T, DITTRICH PS. Observations of membrane domain reorganization in mechanically compressed artificial cells[J]. *Chembiochem*, 2019, 20(20): 2666-2673.
- [86] LAVICKOVA B, LAOHAKUNAKORN N, MAERKL SJ. A partially self-regenerating synthetic cell[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 6340.
- [87] DEYAMA T, MATSUI Y, CHADANI Y, SEKINE Y, DOI N, FUJIWARA K. Transcription-translation of the *Escherichia coli* genome within artificial cells[J]. *Chemical Communications*, 2021, 57(80): 10367-10370.
- [88] ZONG W, MA SH, ZHANG XN, WANG XJ, LI QC, HAN XJ. A fissionable artificial eukaryote-like cell model[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(29): 9955-9960.
- [89] WU LJ, LEE S, PARK S, ELAND LE, WIPAT A, HOLDEN S, ERRINGTON J. Geometric principles underlying the proliferation of a model cell system[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4149.
- [90] SHETTY SC, YANDRAPALLI N, PINKWART K, KRAFFT D, VIDAKOVIC-KOCH T, IVANOV I, ROBINSON T. Directed signaling cascades in monodisperse artificial eukaryotic cells[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(10): 15656-15666.
- [91] KIM JW, LEE SS, PARK J, KU M, YANG J, KIM SH. Smart microcapsules with molecular polarity- and temperature-dependent permeability[J]. *Small*, 2019, 15(21): 1900434.
- [92] ZHANG XL, XU ML, YANG J, HU N. Ion transport in pH-regulated double-barreled nanopores[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(14): 5642-5650.
- [93] INUI M, HAMADA Y, SEJIMA N, UEDA N, KATAYAMA T, ONO K, NAGAHAMA K. Exportin-inspired artificial cell nuclear-exporting

- nanosystems[J]. *Nanoscale Advances*, 2022, 4(12): 2637-2641.
- [94] BENEYTON T, KRAFFT D, BEDNARZ C, KLEINEBERG C, WOELFER C, IVANOV I, VIDAKOVIĆ-KOCH T, SUNDMACHER K, BARET JC. Out-of-equilibrium microcompartments for the bottom-up integration of metabolic functions[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2391.
- [95] ALTAMURA E, ALBANESE P, MAROTTA R, MILANO F, FIORE M, TROTTA M, STANO P, MAVELLI F. Chromatophores efficiently promote light-driven ATP synthesis and DNA transcription inside hybrid multicompartment artificial cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(7): e2012170118.
- [96] YANG BY, LI SB, MU W, WANG Z, HAN XJ. Light-harvesting artificial cells containing cyanobacteria for CO₂ fixation and further metabolism mimicking[J]. *Small*, 2022, 19(13): 2201305.
- [97] WESTENSEE IN, BRODSZKIJ E, QIAN XM, MARCELINO TF, LEFKIMMIATIS K, STÄDLER B. Mitochondria encapsulation in hydrogel-based artificial cells as ATP producing subunits[J]. *Small*, 2021, 17(24): 2007959.
- [98] ZHAO QH, CAO FH, LUO ZH, HUCK WTS, DENG NN. Photoswitchable molecular communication between programmable DNA-based artificial membraneless organelles[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2022, 61(14): e202117500.
- [99] BUDDINGH' BC, LLOPIS-LORENTE A, ABDELMOHSEN LKEA, van HEST JCM. Dynamic spatial and structural organization in artificial cells regulates signal processing by protein scaffolding[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(47): 12829-12834.
- [100] TOPARLAK ÖD, ZASSO J, BRIDI S, SERRA MD, MACCHI P, CONTI L, BAUDET ML, MANSY SS. Artificial cells drive neural differentiation[J]. *Science Advances*, 2020, 6(38): eabb4920.
- [101] QIU HM, LI FR, DU YC, LI RX, HYUN JY, LEE SY, CHOI JH. Programmable aggregation of artificial cells with DNA signals[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(6): 1268-1276.
- [102] YANG S, PIETERS PA, JOESAAR A, BÖGELS BWA, BROUWERS R, MYRGORODSKA I, MANN S, de Greef TFA. Light-activated signaling in DNA-encoded sender-receiver architectures[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(11): 15992-16002.
- [103] ZHU CX, ZHOU ZX, GAO XJ, TAO YH, CAO XW, XU Y, SHEN YF, LIU SQ, ZHANG YJ. Cascade nanozymatic network mimicking cells with selective and linear perception of H₂O₂[J]. *Chemical Science*, 2023, 14(24): 6780-6791.
- [104] CHAKRABORTY T, WEGNER SV. Cell to cell signaling through light in artificial cell communities: glowing predator lures prey[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(6): 9434-9444.
- [105] QIAN XM, WESTENSEE IN, FERNANDES CC, STÄDLER B. Enzyme mimic facilitated artificial cell to mammalian cell signal transfer[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2021, 60(34): 18704-18711.
- [106] RAMSAY K, LEVY J, GOBBO P, ELVIRA KS. Programmed assembly of bespoke prototissues on a microfluidic platform[J]. *Lab on a Chip*, 2021, 21(23): 4574-4585.
- [107] YANG QX, GUO ZZ, LIU H, PENG RZ, XU LJ, BI C, HE YQ, LIU QL, TAN WH. A cascade signaling network between artificial cells switching activity of synthetic transmembrane channels[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(1): 232-240.
- [108] BUDDINGH' BC, ELZINGA J, van HEST JCM. Intercellular communication between artificial cells by allosteric amplification of a molecular signal[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1652.
- [109] MATSUO M, HIRATA Y, KURIHARA K, TOYOTA T, MIURA T, SUZUKI K, SUGAWARA T. Environment-sensitive intelligent self-reproducing artificial cell with a modification-active lipodeoxyribozyme[J]. *Micromachines*, 2020, 11(6): 606.
- [110] PAN J, DU YC, QIU HM, UPTON LR, LI FR, CHOI JH. Mimicking chemotactic cell migration with DNA programmable synthetic vesicles[J]. *Nano Letters*, 2019, 19(12): 9138-9144.
- [111] HO KKY, LEE LM, LIU AP. Mechanically activated artificial cell by using microfluidics[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32912.
- [112] LI Z, TANG YY, ZHANG L, WU JM. Label-free study of the function of ion channel protein on a microfluidic optical sensor integrated with artificial cell membrane[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(2): 333-341.
- [113] KORNER JL, STEPHENSON EB, ELVIRA KS. A bespoke microfluidic pharmacokinetic compartment model for drug absorption using artificial cell membranes[J]. *Lab on a Chip*, 2020, 20(11):

- 1898-1906.
- [114] KI SH, PARK JK, SUNG C, LEE CB, UHM H, CHOI EH, BAIK KY. Artificial vesicles as an animal cell model for the study of biological application of non-thermal plasma[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2016, 49(8): 085401.
- [115] FENG YP, ZHANG YJ, LIU GG, LIU XT, GAO SX. Interaction of graphene oxide with artificial cell membranes: role of anionic phospholipid and cholesterol in nanoparticle attachment and membrane disruption[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 202: 111685.
- [116] YOSHIDA K, FUJIWARA N. Numerical estimation of acetonitrile adsorption into simple artificial cell membranes[J]. *ChemistrySelect*, 2021, 6(48): 14013-14018.
- [117] QUALLS ML, SAGAR R, LOU JC, BEST MD. Demolish and rebuild: controlling lipid self-assembly toward triggered release and artificial cells[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2021, 125(47): 12918-12933.
- [118] KARAMDAD K, HINDLEY JW, BOLOGNESI G, FRIDDIN MS, LAW RV, BROOKS NJ, CES O, ELANI Y. Engineering thermoresponsive phase separated vesicles formed *via* emulsion phase transfer as a content-release platform[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(21): 4851-4858.
- [119] TRANTIDOU T, DEKKER L, POLIZZI K, CES O, ELANI Y. Functionalizing cell-mimetic giant vesicles with encapsulated bacterial biosensors[J]. *Interface Focus*, 2018, 8(5): 20180024.
- [120] ZHOU XX, ZHANG YJ, KANG K, ZHU NH, CHENG J, YI QY, WU Y. Artificial cell membrane camouflaged immunomagnetic nanoparticles for enhanced circulating tumor cell isolation[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2022, 10(16): 3119-3125.
- [121] ZHAO X, TANG DY, WU Y, CHEN SQ, WANG C. An artificial cell system for biocompatible gene delivery in cancer therapy[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(18): 10189-10195.
- [122] KRINSKY N, KADURI M, ZINGER A, SHAINSKY-ROITMAN J, GOLDFEDER M, BENHAR I, HERSHKOVITZ D, SCHROEDER A. Synthetic cells synthesize therapeutic proteins inside tumors[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2018, 7(9): 1701163.

(本文责编 郝丽芳)