评述

单哺乳动物细胞封装技术研究进展

杨建民^{1,2}, 郝慧丽¹, 王伟彬¹, 石贤爱^{1,2*}

1. 福州大学生物科学与工程学院, 药物生物技术与工程研究所, 福州 350116;

2. 福州大学, 福建省医疗器械和医药技术重点实验室, 福州 350116

* 联系人, E-mail: shixa@fzu.edu.cn

收稿日期: 2020-01-03; 接受日期: 2020-03-09; 网络版发表日期: 2020-04-08

国家自然科学基金(批准号: 31800796)、福建省自然科学基金(批准号: 2019J01238)和福州大学“旗山学者”海外项目(批准号: GXRC-17049)资助

摘要 细胞封装技术是指将细胞包裹在半透膜或者水凝胶组成的封装层内, 该封装层能够有效阻挡外界大尺寸物质与封装细胞的直接接触, 从而避免免疫细胞、抗体、酶等物质的攻击; 同时保证氧气、营养物质、代谢物等一些尺寸物质的自由交换, 从而维持细胞各项生物学活动和正常功能. 细胞封装技术在生物材料、生物医学以及生命科学等领域具有重要应用前景. 单细胞封装技术, 即将单个活细胞包裹在半透性的封装层内, 是细胞封装向高封装效率、低封装层尺寸、高稳定性封装发展的必然趋势. 单细胞封装系统在提高氧气、营养物质、代谢物等交换效率, 维持细胞活性和各项生物学功能, 以及单细胞水平上的细胞生物组学研究等方面具有显著优势. 本文就基于哺乳动物细胞的单细胞封装技术进行了系统阐述, 重点介绍了单细胞微胶囊封装系统和单细胞纳米封装系统两大单细胞封装制备技术的研究进展, 对单细胞封装系统在细胞治疗、组织工程与再生医学、单细胞生物学分析以及全细胞传感器领域的应用现状进行了分析和归纳. 最后, 对单细胞封装技术所面临的问题和发展前景进行了总结和展望.

关键词 细胞封装, 单细胞, 细胞治疗, 单细胞分析, 再生医学

细胞封装技术是指将细胞包裹在半透性的封装基质中, 该技术在细胞治疗、细胞移植、细胞存储/运输、细胞分析、组织工程以及再生医学等诸多领域具有重要应用价值. 早在1933年, Vincenzo Biseeglie就将高分子膜包裹的人胰岛瘤组织移植到豚鼠腹腔内用于治疗糖尿病, 结果发现膜包裹后的人胰岛瘤细胞可以避免免疫系统的排斥从而保持长时间的活性^[1]. 20世纪50年代, Glenn H. Algire等人开展的一系列试验证实, 采用高分子膜封装方法能够有效防止免疫细胞的

攻击和抗原表达途径的激活, 从而延长无血管移植组织的存活率^[2-4]. 1964年, Thomas M. Chang首次利用高分子界面凝聚反应和界面缩聚反应实现了对红细胞溶血产物(主要成分为酶和蛋白质)的微胶囊封装, 并认为该方法可用于其他蛋白质等生物大分子、水溶性颗粒物、细胞的封装^[5]. 随后, Thomas M. Chang等人发展了一系列微胶囊制备技术, 即通过高分子半透膜将蛋白质、酶、激素、疫苗等生物活性物质包裹起来制备球形微胶囊, 从而起到保护、隔离、缓释以及靶

引用格式: 杨建民, 郝慧丽, 王伟彬, 等. 单哺乳动物细胞封装技术研究进展. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 406-426

Yang J M, Hao H L, Wang W B, et al. Advances in single mammalian cells encapsulation technologies (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 406-426, doi: 10.1360/SSV-2019-0268

向输送的目的, 并在此基础之上提出了“人造细胞(artificial cells)”的理论体系, 希望该体系最终能用于真实细胞的封装^[6,7].

1980年, Anthony M. Sun等人利用液滴形成技术结合海藻酸钠和氯化钙、聚赖氨酸(polylysine, PLL)、以及聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)之间的交联反应, 首次制备了胰岛微胶囊, 并将其植入到链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠腹腔内. 结果发现, 植入的胰岛微胶囊在2~3周内可有效降低糖尿病大鼠的血糖水平; 此外, 细胞长期培养实验发现, 该胰岛微胶囊可以保持形态和功能完整长达15周以上^[8]. 为了提高微胶囊的生物相容性, Anthony M. Sun等人随后建立了海藻酸钠-聚赖氨酸-海藻酸钠(APA)微胶囊制备技术^[9,10]. 与此同时, 研究者们陆续实现了对肝细胞^[11]、杂交瘤细胞^[12]、肾细胞^[13]、基因修饰细胞^[14]的封装, 以及多种细胞的共封装^[15]. 此外, Patrick Soon-Shiong等人在利用胰岛微胶囊技术治疗糖尿病方面进行了大量研究^[16,17], 并于1994年首次将海藻酸钠-氯化钙反应体系构建的胰岛微胶囊注射到I型糖尿病人体内. 临床治疗结果发现, 封装的胰岛细胞能够有效起到调控人体胰岛素水平的作用, 并且未发现明显的副作用^[18]. 自此, 对细胞封装技术的开发和应用逐渐成为生物材料、生物医学以及生命科学领域研究的热

点^[19-21]. 细胞封装技术发展历程见图1.

1 细胞封装技术

细胞封装(cell encapsulation)技术从理论提出至今已经发展了50余年, 其定义可以简单概括为: 将细胞包裹在半透膜或者水凝胶里面, 该半透膜/水凝胶能够有效阻挡外界大尺寸物质与封装细胞的直接接触, 从而避免免疫细胞、抗体、酶等物质的攻击; 同时保证氧气、营养物质、代谢物等一些小尺寸物质的自由交换, 从而维持细胞各项生物学活动和正常功能; 此外, 封装层还能够为细胞起到物理支撑和抵抗外界物理应力的作用^[22,23]. 细胞封装技术示意图见图2.

目前, 根据细胞封装后的形态可将细胞封装技术分为大体积封装(bulk encapsulation)和微胶囊封装(microencapsulation). 大体积封装是指将大量细胞同时封装在水凝胶或者高分子膜里面, 封装后的体积往往在数十微升以上. 该方法主要用于构建细胞支架材料从而用于软骨、骨骼以及皮肤再生等^[24-26]. 然而, 过大的封装体积不利于物质的传输, 容易造成代谢物累积、营养物质供应不足以及缺氧等问题^[27]. 细胞微胶囊封装技术通常采用挤压法(extrusion method)、乳液分散法(emulsion dispersion method)、液滴微流控芯片

图 1 细胞封装技术发展历程(网络版彩图)

Figure 1 Development of cell encapsulation technology (color online)

图2 细胞封装技术示意图(网络版彩图)

Figure 2 Schematic of cell encapsulation technology (color online)

(droplet microfluidics)、微成型技术(micromolding method)等,以海藻酸钠、琼脂糖、胶原蛋白、壳聚糖、透明质酸等高生物相容性的天然高分子材料作为基质,通过金属离子螯合、温度变化、光聚合等方式制备而成^[28]。细胞微胶囊技术有效降低了封装细胞体积,扩展了封装细胞的应用范围,是当前细胞封装研究的主流。细胞封装分类及常用细胞微胶囊封装技术见图3。

随着细胞封装技术的不断丰富和发展,其应用从最初的糖尿病治疗目的^[29~31]逐步扩展到对神经系统疾病^[32,33]、肝功能衰竭^[34]、骨和软骨缺损^[35]、癌症^[36]、心脏衰竭^[37]等多种疾病的治疗研究,以及细胞三维(3D)培养^[38]、干细胞定向增殖分化^[39]、生物传感器^[40]等诸多领域。开发简便、高效的细胞封装方法,构建稳定、可靠的细胞封装系统是细胞封装技术走向实际应用的前提条件。

然而,利用传统封装技术制备的含有多个细胞的微胶囊系统,在实际应用过程中仍存在几项明显的缺陷:(i)封装系统尺寸大。封装后的细胞微胶囊直径通常介于100 μm 到2 mm之间,不利于外界营养物质、氧气以及囊内细胞代谢物和活性分子的交换,因而影响封装细胞的正常生长和功能^[41,42]。同时,过厚的封装层不利于封装细胞对外界或者宿主环境变化做出快速响应。此外,较大尺寸的细胞胶囊增加了移植物的体积,给临床应用增加了困难^[43];(ii)细胞微胶囊尺寸不均一且封装细胞数量随机分布^[44]。不均一的胶囊尺寸和细胞数量在临床应用时难以精确控制移植细胞数量;(iii)封装稳定性低。部分细胞裸露于封装层界面处于未完全封装状态,从而导致封装层表面不稳定,同时

图3 细胞封装分类(A)及常用细胞微胶囊封装技术(B) (网络版彩图)

Figure 3 Classification of cell encapsulation systems (A) and commonly used cell microencapsulation technologies (B) (color online)

容易引发免疫排斥反应^[45]。该现象在降低细胞微胶囊尺寸或者提高细胞浓度时会变得更加严重; (iv) 部分传统封装材料自身性能的局限性。例如, 目前广泛使用的海藻酸钠-氯化钙体系构建的水凝胶封装层, 由于封装层孔隙结构较大不能有效阻挡外界抗体与被封装细胞的接触; 此外, 海藻酸钠材料不具有对动物细胞任何特异性的生物信号和响应反应, 难以维持封装细胞的正常活性和生长^[46]。上述缺陷制约了封装细胞的广泛应用。因此, 减少封装层尺寸、提高封装稳定性、改善封装材料生物相容性、制备单分散的细胞封装系统是细胞封装技术发展的主要目标。

2 单细胞封装技术

近年来, 单细胞封装(single cell encapsulation)技术的出现, 在降低封装细胞尺寸和提升封装稳定性方面具有明显优势, 是目前细胞封装技术发展的新趋势^[46]。相对于传统的多细胞微胶囊系统, 单细胞封装系统的主要优势在于封装胶囊尺寸小。小尺寸的微胶囊具有更大的比表面积, 从而更有利于物质的传递, 如氧气以及营养物质的传输等。研究表明, 当微胶囊直径高于300 μm 时, 囊内细胞难以获取所需的氧浓度, 容易造成细胞缺氧^[47]。因此, 较小尺寸的微胶囊能够有效提高细胞的存活率, 有助于囊内细胞各项生理机能的正常发挥。此外, 较小厚度的封装层加快了囊内细胞对外界或者宿主环境变化的响应。其次, 单细胞封装系统占有的空间体积小, 可减少移植物的体积, 使得体内移植位置更加灵活, 临床应用范围更广。另外, 单细胞封装系统为单个细胞提供了一个特定且独立的微环境, 因此可用于单细胞水平上的细胞生物学分析。

目前, 细胞大体积封装和多细胞微胶囊技术的研究报道比较多, 前者在细胞支架^[48]、可注射水凝胶^[49]等领域应用广泛, 后者主要集中在细胞治疗^[50]、细胞3D培养^[51]以及组织工程^[52]等研究领域。有关这2项细胞封装技术的研究进展可通过一系列出色的综述性文章了解^[22,53-56]。然而, 当前国内外关于单细胞封装技术的综述性文章报道较少。Jeroen Leijten等人综述了单细胞微胶囊系统的研究进展和应用情况, 讨论了该技术发展所面临的挑战^[46]。该综述对单细胞封装技术研究具有重要参考价值, 但是未对单细胞封装另一个重要研究方向“单细胞纳米封装系统”进行介绍。因此,

本文以单细胞封装研究为主题, 全面地介绍和讨论了哺乳动物细胞的单细胞封装技术, 包括微胶囊系统和纳米封装系统, 从出现至今所取得的主要研究进展。

3 单细胞封装技术分类

在单个细胞膜表面构建封装层, 是细胞胶囊微型化发展的必然趋势。单细胞封装技术能够将封装细胞尺寸从原本的几百微米甚至数毫米级别降至100 μm 以内。根据细胞表面封装层厚度(微米或者纳米尺寸), 可以将单细胞封装技术分为单细胞微胶囊封装(single cell microencapsulation)和单细胞纳米封装(single cell nanoencapsulation)。

3.1 单细胞微胶囊封装

单细胞微胶囊封装是指在单个细胞表面构建微米尺度的封装层, 该封装层通常为水凝胶。利用液滴形成技术制备含有单细胞的液滴随后将液滴凝胶化, 即液滴形成-微胶囊法, 是当前单细胞微胶囊封装系统制备的主要方式, 见图4。然而, 采用传统的挤压法和乳液分散法很难得到稳定、均一的含有单个细胞的液滴。随着微流体技术的发展, 液滴制备水平得到显著提高, 单细胞封装逐渐变得可能^[57]。2004年, Shinji Sakai等人将普通的注射器针头和玻璃小管相结合, 利用同向流体(coflowing stream)技术首次得到了直径小于100 μm 包含CHO-K1细胞的液滴, 但该研究未对液滴内的细胞数量分布进行详细考察^[58]。2005年, Daniel T. Chiu等人采用液滴微流控芯片结合光捕获技术首次将单个细胞选择性的封闭于液滴中^[59]。随后, 2008年, David A. Weitz等人利用精巧的芯片通道设计实现了单细胞液滴封装, 并且通过控制细胞悬浮液密度、流体速度等参数, 使单个细胞封装效率达到30%^[60]。以上系列研究证实了微流体技术用于制备含有单个细胞液滴的可行性, 然而包裹细胞的液滴始终处于未凝胶化状态, 因此不能称之为真正意义上的细胞微胶囊封装。2007年, Hirofumi Shintaku等人采用经典的海藻酸钠-氯化钙反应体系, 首次在微流控芯片上面实现了细胞的微胶囊封装。该方法制备的细胞微胶囊尺寸介于104 μm 和167 μm 之间, 明显低于传统挤压法和乳液分散法得到的细胞微胶囊, 其中大部分微胶囊中含有多个细胞^[61]。该项研究拉开了微流体技术制备单细胞微

图4 单细胞微胶囊封装技术。A: 随机单细胞微胶囊封装技术及其常用液滴形成方法; B: 纯单细胞微胶囊封装技术示意图(网络版彩图)

Figure 4 Single cell microencapsulation technology. A: Random single cell microencapsulation technology and its frequently-used droplet formation approaches; B: schematic of pure single cell microencapsulation technology (color online)

胶囊的序幕。

3.1.1 随机单细胞微胶囊封装

Tatsuo Aikawa等人利用含有苯基硼酸基的2-甲基丙烯酸氧乙基磷胆碱聚合物(PMBV)和聚乙烯醇(PVA)混合即成凝胶的反应策略,在多通道微流控芯片上面实现了细胞微胶囊封装。该方法制备的细胞胶囊中细胞存活率高达96%,胶囊尺寸可控制在30~90 μm 范围内,其中制备的40 μm 和52 μm 胶囊中的单个细胞封装效率分别为31%和26%^[62]。David A. Weitz等人利用芯片通道首先制备了含有细胞的海藻酸钠/Ca-EDTA混合液滴,然后采用醋酸降低液滴pH从而释放出EDTA螯合的钙离子,进而通过海藻酸钠-钙离子交联反应制备了单分散、结构均一的单细胞微胶囊。其中,单细胞封装效率为25%,细胞存活率为83%^[63]。Devon M. Headen等人设计了一种多喷嘴的能够同时生

成多个液滴的高通量微流控装置,利用PEG-4MAL和二硫苏糖醇(DTT)之间温和、快速的交联反应,实现了对人间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的高通量封装,并且通过在封装材料中添加RGD肽(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)成分提高了细胞附着能力。该研究还发现,当喷嘴直径为100 μm 时制备的细胞微胶囊细胞活性比喷嘴直径为35 μm 时提高20%左右,且其中空胶囊的比例减半,含有单个细胞的微胶囊比例从20%提高到25%左右^[64]。

上述系列研究表明,通过精巧的微通道设计结合流体作用能够实现单细胞的快速封装。所制备的细胞封装系统尺寸小(通常低于100 μm),细胞存活率高。此外,利用多通道并联技术能够实现细胞微胶囊的高通量制备。然而,采用液滴形成-微胶囊法制备的细胞微胶囊,其细胞数量遵循泊松分布(Poisson distribution)原理。因此,微胶囊中的细胞数量为随机分布,含有大量空胶囊和多个细胞的微胶囊,单个细胞微胶囊比例理论最大值约为37%^[65]。如何突破泊松分布的限制,进一步提高单个细胞的封装率是液滴形成-微胶囊封装法的最大挑战。

Max Chabert和Jean-Louis Viovy通过改进芯片设计同时结合分拣步骤,使得每个液滴中含有单个细胞的比例提高至70%~80%^[66]。Evelien W. M. Kemna等人在液滴形成之前设计了多个环形微通道,利用弯曲通道产生的迪安力(dean forces)使细胞在微通道内分散并有序排列,随后制备单细胞液滴,该方法得到的单细胞封装比例高达77%^[67]。然而,以上2种芯片设计并未用于后续细胞凝胶化封装的研究。Jeroen Leijten等人利用流式细胞仪分拣技术(flow cytometry-based sorting)对封装后的微胶囊进行筛选,通过去除空胶囊和含有多个细胞的胶囊使得单细胞封装比例达到70%^[68]。以上研究表明,通过后期分拣/筛选步骤是目前液滴形成-微胶囊法中提高单细胞微胶囊封装效率的有效途径。

采用微流控通道利用油脂类物质为连续相制备含有细胞的水相液滴,继而通过化学或者物理反应使液滴成胶是当前单细胞微胶囊常用的制备方法。然而,如何从油相中有效收集制备的细胞微胶囊是细胞进行后期培养和应用需要解决的首要问题^[69]。一些研究者开发了不需要油相直接利用细胞溶液生成细胞微胶囊的方法。Jiangjiang Liu等人利用微流控装置开发了一

种用于单细胞微胶囊封装的显微镜投影光刻法(microscope projection photolithography). 研究首先将HepG2细胞、聚乙二醇丙烯酸(PEG-DA)和光引发剂的混合溶液置于微通道内, 随后借助光学显微镜肉眼观测从而选定目标细胞, 并利用细小的UV光束进行光聚合反应从而实现单细胞微胶囊封装. 该方法制备的单细胞胶囊粒径约为50 μm , 且通过优化细胞密度能够使单细胞封装效率接近80%^[70]. 显微镜投影光刻法在单细胞分析方面具有优势, 但是采用人工选定被封装细胞的方式难以满足高通量单细胞微胶囊制备的需求.

喷墨打印技术(inkjet printing technology)不同于微流控芯片需要借助流体作用产生液滴的方式, 该技术基于静电、温度、压电陶瓷形变等驱动方式能够形成低至皮升体积水平的液滴, 在液滴、微球的高通量制备方面具有显著优势^[71,72]. 一系列研究表明, 基于静电驱动、压电陶瓷形变驱动的喷墨打印技术能够实现单个活细胞液滴的快速制备, 且不会对细胞活性造成明显影响^[73,74]. Tao Xu等人采用商用打印机的打印喷头结合海藻酸钠-氯化钙反应体系, 实现了对胰岛素生成细胞(beta-TC6)的高通量微胶囊封装. 该技术每秒钟可制备55000个单分散微胶囊, 其中单细胞微胶囊的比例与细胞溶液密度相关, 最高可达50%. 封装后的细胞存活率均高于89%, 且封装后细胞在胰岛素分泌水平上与未封装细胞相比未有差异^[75]. 喷墨打印技术有效避免了油相物质的使用, 制备的单细胞微胶囊可直接用于后续的细胞培养和应用. 但是, 该技术中液滴形成受溶液导电性能和黏度影响较大, 可选的溶液种类和浓度范围较窄^[76]. 此外, 喷嘴处应力与喷嘴尺寸负相关, 减小喷嘴尺寸使得应力显著增强, 从而影响细胞活力. 因此, 难以采用喷墨打印技术获得较低尺寸的单细胞封装系统.

章维一和侯丽雅等人基于微流体数字化微喷射技术, 通过对细胞管和流动室的双微流体数字化驱动, 实现了对细胞流动节奏的有效控制, 从而实现人体外周血淋巴细胞的单细胞流的动态驱动^[77]. 随后, 他们采用该技术结合海藻酸钠-氯化钙反应体系成功制备了猪卵细胞的单细胞微胶囊, 所得微胶囊粒径均匀, 尺寸为203.5 μm , 并对单细胞微胶囊制备条件和粒径变化规律进行了探究^[78]. 然而, 上述研究未对单细胞有效封装率进行统计. 此外, 由于卵细胞尺寸远大于正常细胞, 因此更容易实现单细胞封装. 该技术能否直接

用于正常哺乳动物细胞的单细胞封装还有待进一步验证.

3.1.2 纯单细胞微胶囊封装

即使通过后期的分拣/筛选步骤, 利用微流控技术制备的单细胞微胶囊也难以避免空胶囊和多细胞胶囊的出现. 因此, 一部分研究者将目光转向了直接在细胞表面构建水凝胶封装层, 从而开发了纯单细胞微胶囊封装系统(pure single cell microencapsulation). Shinji Sakai和Masahito Taya通过在细胞膜表面进行原位酶催化反应, 实现了单个细胞微胶囊的封装, 其中封装层厚度仅为1 μm ^[79]. 该方法首先将带有辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)的生物相容分子(例如PEG分子)锚定在细胞膜表面, 随后将细胞悬浮于带有酚羟基(phenolic hydroxyl, Ph)的高分子(例如海藻酸钠分子)和 H_2O_2 溶液里面, 利用HRP酶催化反应生成凝胶封装层. 整个封装过程可在生理温度和pH条件下进行, 封装后的细胞存活率高于90%, 且细胞封装效率接近100%. 随后, 该课题组基于上述研究基础之上, 利用不同种类细胞膜表面所带抗原差异的特点, 将结合有HRP的抗体通过抗原-抗体生物识别反应锚定在细胞膜表面, 然后利用上述酶催化反应, 实现了细胞的选择性封装. 目标细胞封装效率接近100%. 此外, 所制备的细胞封装层尺寸均一, 厚度约为1 μm , 且封装细胞存活率在90%左右^[80].

David J. Mooney等人将经典的微流控通道与海藻酸钠-氯化钙反应体系进行改进, 从而突破了泊松分布的限制, 实现了高比例的单细胞微胶囊制备^[81]. 该研究首先将碳酸钙纳米颗粒(CaCO_3 -NP)预先吸附(pre-coating)在鼠MSCs细胞表面, 随后将其分散于海藻酸钠溶液中, 并利用微流控通道制备液滴. 然后, 利用醋酸溶液溶解细胞表面的 CaCO_3 -NP使其释放出钙离子, 随着钙离子和海藻酸钠的结合, 细胞膜表面封装层形成. 该方法有效避免了空胶囊的产生, 使单细胞封装比例相对于未进行 CaCO_3 -NP预先吸附的封装方式提高了一个数量级(高达60%). 同时, 极大降低了封装层厚度(厚度约为5.8 μm), 使得细胞占整个胶囊的体积降低至25%, 接近人体组织密度. 接下来, 他们采用类似的策略在单个MSCs细胞表面构建了具有金属基质蛋白酶(metallomatrix protease, MMP)响应性的封装层^[82]. 该研究首先将表面预吸附 CaCO_3 -NP的MSCs细胞注入

微流控通道内, 同时通入未活化的转谷氨酰胺酶因子XIII(FXIII)和含有盐酸、EDTA、RGD的高分子前体溶液。随后, 细胞表面的 CaCO_3 -NP遇盐酸释放钙离子, 钙离子激活FXIII从而促使含有FXIII底物序列的高分子前体发生交联反应, 进而实现单细胞微胶囊封装。该方法中的单个细胞封装比例可达 $(91 \pm 7)\%$ 。此外, 由于高分子前体中同时含有MMP响应的肽序列, 因此该单细胞封装系统具有酶特异响应性。

纯单细胞微胶囊封装技术利用细胞自身表面携带特异抗原的差异性, 或者通过表面修饰技术在细胞表面形成新的结合位点, 从而在细胞表面锚定/结合反应物, 进而通过温和反应形成封装层。该技术从原理上避免了空胶囊的产生, 从而显著提高了单细胞封装比例。然后, 目前关于纯单细胞微胶囊封装系统的研究报道极少, 可用的反应体系亦十分有限。通过细胞膜表面自身抗原进行目标反应物结合的方式对结合位点的特异性、含量以及结合方式的稳定性要求较高。此外, 预先吸附 CaCO_3 -NP形成海藻酸钙凝胶层的方式较为简单, 但是如何防止潜在的纳米颗粒细胞内吞作用、构建成分更为丰富的封装层仍然是亟需解决的问题。

3.2 单细胞纳米封装

单细胞纳米封装, 即将单个活细胞包裹在纳米尺度的封装层内。相比于传统的细胞微胶囊封装技术, 纳米尺度的封装层能有效提高氧气、营养物质的交换效率, 防止细胞缺氧以及细胞饥饿的发生, 从而有效维持细胞活性和各项生物学功能^[83,84]。目前, 国内外关于单个哺乳动物细胞纳米封装的报道并不多, 大量的研究主要集中在酵母菌、小球藻、大肠杆菌等微生物细胞的纳米封装方面^[85-87]。因为这类细胞具有厚实、稳健的细胞壁, 能够帮助细胞忍受封装过程中所使用的不利条件, 易于实现纳米封装。然而, 哺乳动物细胞只有一层极薄而脆弱的细胞膜, 需要极其温和的封装条件来确保细胞存活率, 比如较窄的pH变化范围、特定的离子强度、适宜的温度以及生物相容性高的材料和试剂。已报道的单细胞纳米封装技术主要分为层层自组装法(layer-by-layer assembly, LbL)、仿生封装法(biomimetic/bioinspired encapsulation)以及原位聚合反应法(*in situ* polymerization)等。单细胞纳米封装常用技术见图5。

图5 单细胞纳米封装技术。A: LbL自组装技术; B: 仿生封装法; C: 原位聚合反应法(网络版彩图)

Figure 5 Single cell nanoencapsulation technology. A: LbL self-assembly technology; B: biomimetic encapsulation; C: *in situ* polymerization (color online)

3.2.1 层层自组装技术

用于细胞封装领域的层层自组装技术(LbL), 通常是利用静电吸引(electrostatic interactions)、分子生物识别(biological recognition)、氢键结合(hydrogen bonding)等作用将2种甚至多种高分子依次交替的沉积在细胞表面形成高分子膜, 从而实现细胞的纳米封装。1999年, Helmuth Möhwald等人利用LbL技术在戊二醛固定后的人血红细胞(red blood cells, RBCs)表面交替地静电吸引带有相反电荷的阳离子poly(allylamine hydrochloride) (PAH)和阴离子poly(styrene sulfonate) (PSS), 随后通过分解被封装的RBCs从而制备了高分子中空胶囊^[88], 并且对该方法制备的中空胶囊的通透性和电导性能进行了进一步研究^[89,90]。该研究系首次利用LbL技术在单个哺乳动物细胞表面构建纳米尺度的聚电解质膜, 但是固定后的人RBCs在这里只是

作为生物模板的目的。

2006年, Silke Krol课题组将带正电荷的PAH、PDADMAC (poly-(diallyldimethylammonium chloride))和带负电荷的PSS, 通过LbL技术在人胰岛细胞(簇)表面首次实现了纳米封装层的构建^[91]。该方法制备的PAH/PSS和PDADMAC/PSS纳米封装层能够起到免疫保护的目的, 因此可用于解决异种胰岛细胞或者其它组织在移植过程中的免疫排斥问题。同年, Hiroo Iwata课题组利用细胞表面疏水作用结合聚电解质高分子LbL技术实现了鼠胰岛细胞(簇)的纳米封装^[92]。他们首先将合成的PEG-lipid分子通过疏水作用结合在胰岛细胞膜表面, 然后加入带负电荷的海藻酸钠分子, 使海藻酸钠和PEG-lipid末端的氨基结合, 然后依次加入带正电荷的PLL和带负电荷的海藻酸钠从而形成纳米封装层。该研究发现当胰岛封装系统受到葡萄糖刺激时, 纳米封装层不会影响胰岛素的分泌功能。以上2项关于胰岛细胞的纳米封装研究为进一步的单细胞纳米封装提供了有效参考。

2007年, David K. Mills等人将带正电荷的PLL和带负电荷的透明质酸(hyaluronic acid, HA)通过LbL吸附在单个小鼠MSCs上面, 首次实现了真正意义上的单个哺乳动物活细胞纳米封装^[93]。该研究利用石英晶体微天平(quartz crystal microbalance, QCM)测量和模拟计算得出所制备的细胞纳米封装系统的封装层厚度为6~9 nm, 并且通过调节封装层的通透性和弹性能够使该封装MSCs维持细胞完整形貌和活性长达一周以上。Maryam Tabrizian等人采用带负电荷的海藻酸钠(AL)和带正电荷的壳聚糖-磷酸胆碱(chitosan-graft-phosphorylcholine, CH-PC)交替吸附在人RBCs表面形成内层, 随后采用海藻酸钠(AL)和带正电荷的聚赖氨酸-聚乙二醇(PLL-PEG)构建外层, 制备了复合型的聚合电解质纳米封装层(AL/CH-PC)₄-(AL/PLL-PEG)₂-AL^[94]。该纳米封装系统能够有效抑制外界抗体与封装细胞的结合, 从而降低封装细胞对外源RBCs的固有免疫原性, 但不影响细胞正常的摄氧能力和活性, 该项研究成果向通用性RBCs的制备迈进了重要一步。Jiming Kong等人采用明胶和海藻酸钠分子通过LbL技术首次实现了单个神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的纳米封装, 发现单纯的明胶/海藻酸钠纳米封装层不会影响NSCs的活性、增殖和分化的能力^[95]。

目前, 用于单细胞纳米封装的LbL技术主要是基

于静电吸引作用将带有相反电荷的聚电解质高分子交替沉积在细胞表面, 从而实现细胞纳米封装。尽管大量细胞纳米封装的研究已经证实, 这类经聚电解高分子封装后的细胞仍然能够在较长时间范围内保持较高活性。然而, 亦有部分研究表明聚阳离子特别是合成的聚阳离子会破坏细胞膜表面磷脂双分子层引起细胞表面孔洞形成, 从而使细胞质内的酶释放出来进而导致细胞活性降低甚至死亡^[96]。同时, 聚阳离子电解质的细胞毒性与所带电荷和单体分子量的比值密切相关。常用于细胞纳米封装的聚电解质材料的细胞毒性强弱顺序为: PEI>PLL>聚二甲基二烯丙基氯化铵>PEG^[97,98]。因此, 为提高封装细胞活性, 在进行细胞纳米封装过程中需要降低聚电解质浓度和缩短聚电解质与细胞的作用时间。此外, 依靠静电吸引带有相反电荷聚电解质所形成的纳米封装膜往往稳定性不高、易解离, 需要特定离子强度和pH条件来维持封装效果的稳定性, 并且该方法不适用于表面带弱电性的细胞。

寻找高生物相容性的封装材料和构建高稳定性的纳米封装层是单细胞纳米封装的重要发展方向。Guoping Chen课题组将天然源的明胶分子进行化学修饰之后分别得到带有正负电荷的明胶, 然后通过LbL技术结合温和的硫醇(thiol, SH)-马来酰亚胺(maleimide, Mal)反应在单个HeLa细胞表面形成了稳定的交联的LbL纳米封装膜^[99]。该纳米封装层相比于传统单纯的LbL聚电解质膜表现出较长的细胞保护性和免疫抑制能力, 并且在谷胱甘肽还原剂的作用下能够解离从而实现“on-demand”释放。随后, 该课题组采用类似的策略, 分别在单个HeLa细胞和人MSCs细胞表面构建了酶响应性的纳米封装膜^[100]。所构建的纳米封装系统, 具有较长的封装持续周期并且能够有效防止外界物质的侵袭, 封装细胞在接触人金属基质蛋白酶-7(MMP-7)后可实现“on-site”释放。Guoping Chen课题组的研究成果为单细胞纳米封装系统在细胞传感器以及细胞治疗方面的应用提供了有效途径。

Yuji Teramura等人利用两性分子Mal-PEG-lipid与细胞膜表面的疏水作用, 结合8-臂PEG-SH分子与Mal-PEG-lipid分子之间的Thiol-Mal反应, 分别实现了对单个血红细胞和猪主动脉内皮细胞的纳米封装。所构建的封装层结构稳定且厚度可调^[101]。该研究在单细胞表面构建的高分子封装层含有未反应的Mal基团可用于封装系统的进一步修饰, 从而扩大封装细胞的应用

范围。例如, 将含有Thiol基团的不同生物活性物质通过Thiol-Mal反应修饰在该单细胞纳米封装系统上, 从而调节细胞移植中的免疫反应^[102~104]。

此外, 基于生物分子识别作用的LbL技术解决了聚电解质细胞毒性的问题, 为单细胞纳米封装提供了新的思路。Mitsuru Akashi课题组在基于分子间生物识别作用进行单细胞纳米封装方面取得了一系列重要进展^[105]。该课题组采用纤连蛋白(fibronectin, FN)和明胶分子分别在鼠L929纤维细胞和人脐动脉平滑肌细胞(umbilical artery smooth-muscle cells, UASMC)表面构建了多层的纳米尺度高分子膜。虽然FN和明胶分子在生理条件下均带负电荷, 但是FN含有和胶原蛋白结合的位点, 因此能够借助LbL技术实现单细胞的纳米封装^[106]。该课题组还将FN/明胶构建的纳米封装系统和采用静电吸引得到聚电解质纳米封装系统进行对比研究, 结果发现基于生物识别作用得到的FN/明胶纳米封装层能够显著促进鼠L929纤维细胞的增殖^[107]。此外, 他们在人肝癌细胞(hepatocyte carcinoma, HepG2)表面分别构建了FN/明胶, IV型胶原/层粘连蛋白, 以及poly(diallyldimethylammonium chloride)/PSS (PDPA/PSS)的纳米封装层, 用于保护细胞免于外界物理应力的破坏, 结果表明前2种基于生物识别作用形成的纳米封装层相对于后者聚电解质高分子膜具有较强的抵抗外界物理应力的能力^[108]。

Vladimir V. Tsukruk等人利用氢键结合作用将非离子型、无细胞毒性、生物相容性高的高分子通过LbL方式进行酵母细胞的纳米封装, 结果发现该方法所构建的封装细胞比传统聚电解质方法具有更高的细胞活性^[109,110]。同时, 该封装层具有较高的通透性可以更好地进行营养物质的传输从而维持封装细胞的长期正常生长, 因此该方法能够用于在不利环境下对细胞功能的有效保护。然而, 目前尚未发现利用氢键结合作用进行单个哺乳动物细胞纳米封装的报道。

最近, Yong Wang等人通过杂化链式反应(hybridization chain reaction, HCR)结合聚电解质复合法实现了单哺乳动物细胞的纳米封装, 并将其构建的封装层称之为“仿生细胞壁(biomimetic cell wall, BCW)”^[111]。该研究首先将胆固醇分子修饰的DNA引物通过疏水作用嵌入在细胞膜表面。随后, 加入DNA修饰的海藻酸钠分子和DNA分子, 利用HCR反应在细胞膜表面合成DNA模板框架结构。最后, 加入PLL, 利用PLL和带

负电荷的海藻酸钠之间的静电相互作用形成交联的高分子封装层。该方法避免了PLL与带负电荷细胞膜的直接接触, 有效防止了聚电解质材料对细胞的伤害。

总体而言, LbL自组装技术是目前实现单个哺乳动物细胞纳米封装最可靠地方法^[112]。我们可以通过改变封装高分子材料的种类和沉积次数就能在纳米尺度上对封装层的组成、厚度、形态、结构、透过性以及表面性能进行调控; 同时, 可以通过改变封装分子的电荷密度以及溶液条件来控制细胞纳米封装系统的微观表面形貌和亲和性能; 此外, 可以将特定的生物功能性大分子、导电聚合物、感光聚合物、磁性纳米材料等引入到封装层中去, 形成具有生物功能、导电功能、光活性以及磁性的功能细胞, 或者通过层层沉积不同的功能物质, 可得到多组分的功能性复合膜。但是, 基于静电吸引作用所使用的聚电解质材料的细胞毒性, 以及LbL封装过程中不可避免的多次离心和清洗操作, 都会影响细胞存活率以及导致细胞数量的损失。

3.2.2 仿生封装法

在自然界中, 部分单细胞生物如硅藻、有孔虫、石灰质鞭毛虫等具有保护性的二氧化硅或碳酸钙组成的外骨骼硬壳, 因而表现出较强的生存能力。因此, 通过模拟自然界中这类生物矿化反应, 在脆弱的哺乳动物细胞表面构建坚实、稳定同时具有生物相容性的保护外壳, 能够保护细胞免受不利环境的影响从而扩大他们的应用范围和功能。唐睿康课题组和Insung S. Choi课题组在单细胞仿生矿化(biomimetic mineralization)纳米封装方面均进行了开创性的研究工作, 并且在酵母菌、大肠杆菌、蓝藻和微生物孢子表面制备了纳米尺度的磷酸钙(calcium phosphate, CaP)、二氧化硅等无机封装外壳以及有机/无机杂化外壳^[113~119]。然而, 仿生矿化过程通常会使用较低的pH环境、细胞有毒试剂、高离子浓度溶液等苛刻条件, 会严重影响细胞存活率。因此, 上述方法主要用于具有细胞壁的微生物类细胞的纳米封装, 难以直接用于哺乳动物细胞的封装处理^[87]。

2014年, Insung S. Choi课题组首次在单个哺乳动物细胞表面通过仿生硅化反应成功构建了具有细胞相容性和保护性的二氧化硅封装壳^[120]。他们首先将PEI分子通过静电吸引作用吸附在HeLa细胞表面, 随后引入tetramethyl orthosilicate (TMOS)和3-mercaptopropyl

trimethoxysilane (MPTMS), 经过短时间的硅化反应, 便能在细胞膜表面形成纳米尺度的 SiO_2 壳层. 该研究发现, 封装后的细胞存活率可以达到76.8%, SiO_2 壳层可以有效防止胰酶的攻击和毒性高分子PAH试剂的影响, 以及可控抑制细胞分裂的能力. 该方法还可用于其它哺乳动物细胞如NIH 3T3纤维细胞和Jurkat细胞的封装. 随后, 该课题组在单个HeLa细胞表面通过非共价配位反应的方式构建了金属-有机杂化封装层. 方法是将HeLa细胞悬浮液浸入到含有天然多酚物质-单宁酸(tannic acid, TA)和氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)的细胞培养溶液中, 结果发现细胞表面有TA-Fe(III)反应形成的壳层结构, 且封装后的细胞具有较高的存活率^[85]. 该课题组在后续的研究中发现, TA-Fe(III)反应还能用于NIH 3T3纤维细胞和Jurkat细胞的纳米封装, 构建的纳米封装层能够增强细胞抵抗UV-C辐射以及PEI分子攻击的能力^[121]. 此外, 虽然坚硬的封装层影响了细胞的生长和增殖, 但是可以通过添加适量的乙二胺四乙酸(EDTA)实现纳米封装层的可控降解, 并且释放后的细胞仍能正常的生长.

唐睿康课题组利用癌细胞靶向钙化的策略, 通过简单的反应巧妙地实现了HeLa细胞的纳米封装^[122]. 该研究基于HeLa细胞会过量表达叶酸受体(folate receptors, FR)的原理, 从而促使培养液中添加的叶酸分子在HeLa细胞表面大量聚集. 当添加较高浓度的钙离子溶液后, 利用叶酸和钙离子之间的螯合作用从而在细胞表面形成稳定的CaP封装壳. 然而, 坚硬的CaP封装壳会破坏封装细胞膜的完整性进而导致细胞死亡.

从上述研究报道可以看出, 仿生封装法的反应过程简单、反应时间短, 能够在不同种类的哺乳动物细胞表面快速的形成 SiO_2 、CaP以及金属-有机杂化膜. 但是, 目前利用仿生反应进行单哺乳动物细胞纳米封装的研究并不多, 如何改善细胞存活率以及降低无机外壳对细胞膜的破坏是仿生封装法今后亟需解决的问题.

3.2.3 其他纳米封装方法

Guoping Chen课题组首次报道了利用原位聚合反应(*in situ* polymerization)进行单个哺乳动物细胞纳米封装的研究^[123]. 该封装过程分为2个步骤: 首先是将HeLa细胞膜表面丙烯酸酯化, 即将N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(N-acryloxysuccinimide, NAS)分子和细胞膜表面

蛋白的氨基反应使细胞膜上修饰上乙烯基; 随后, 加入单体、交联剂和引发剂进行原位聚合反应, 从而在细胞表面生成交联的高分子纳米封装膜. 封装层能够有效阻挡金纳米颗粒(AuNPs)、抗体以及PEI分子等外界物质的攻击, 并且保持小分子物质的自由交换从而维持细胞正常活性. 该方法可以用于人MSCs和牛关节软骨细胞(bovine articular chondrocytes, BACs)的纳米封装. 利用该方法构建的单细胞封装系统, 其细胞存活率接近80%, 虽然高于仿生矿化法但是远低于LbL法. 主要原因可能是由于聚合反应产生的自由基会破坏细胞膜从而导致细胞活性降低.

Wei Zhu等人利用纳米颗粒间以及细胞和纳米颗粒之间的快速结合作用, 在哺乳动物细胞表面形成了以纳米颗粒为基础的功能模块化的外骨骼, 并将其称之为“超级细胞(SupraCells)”^[124]. 该研究首先将细胞分散于纳米颗粒溶液中, 随后添加具有特定基团的化学组分. 利用纳米颗粒与特定基团之间的化学反应, 在细胞表面快速形成外骨骼. 这种快速的结合作用避免了胞饮和细胞内吞纳米颗粒的内化途径. 该方法能够在多种哺乳动物细胞表面构建含有不同纳米颗粒成分的细胞外骨骼. 同时, 构建的细胞外骨骼会诱导细胞进入类孢子状态, 即封装细胞不会发生复制和在表面伸展, 而是表现出极端微生物(extremophile)的属性, 例如, 对渗透压力、活性氧、pH变化以及UV具有抵抗力; 以及具有部分非生物属性, 例如具有磁性、导电性以及多荧光特性等. 此外, 当外骨骼分解后, 封装细胞能够恢复至正常的细胞状态.

Tao Gao等人基于生物合成方法采用天然的DNA聚合反应在哺乳动物细胞表面原位合成与编织了DNA高分子聚合物, 在细胞周围组装成“茧(cocoons)”状的DNA网络分子, 从而实现细胞的封装^[125]. 该研究首先在细胞内引入一对特异的DNA引物, 通过协调2组滚环扩增(RCA)反应, 从而在细胞表面扩增出2种串联重复的长单链DNA作为编织材料. 随后, 基于配对原则使扩增出的长单链DNA实现相互交叉与编织, 最终在细胞表面形成网络状结构. 该方法可通过高度可控的DNA聚合反应以及DNA分子精准配对的特性, 实现对多种类型的细胞封装. 同时, 通过调节特异RCA引物的表面密度和反应浓度, 实现细胞表面DNA“茧”多个特性的调控. 以上系列报道为单哺乳动物细胞纳米封装系统的构建提供了新的思路.

4 单细胞封装技术的应用

细胞封装技术的应用取决于所构建细胞封装层的成分、结构以及功能. 因此, 细胞封装技术可以根据封装层所发挥的功能作用来进行应用. (i) 封装层免疫隔离功能: 具有半透性的封装层能够有效防止外界免疫细胞、抗体以及部分细胞因子和封装细胞的直接接触, 从而避免细胞移植过程中发生免疫排斥反应, 因此可以将封装细胞用于细胞移植和细胞治疗目的. (ii) 封装层细胞保护作用: 封装后的细胞具有明显增强的抗物理应力能力, 可用于干细胞封装从而提高干细胞在治疗应用过程中的存活率^[126]. 此外, 封装层能够有效阻挡酶等不利物质以及UV辐射、温度变化等有害环境对封装细胞的影响, 增强细胞在体外环境的活性, 因此, 可用于基于细胞的生物装置和生物传感器的应用等^[127]. (iii) 封装层药物装载功能: 通过在封装层或者被封装细胞内装载药物, 制备基于细胞的药物传输系统, 从而实现体内药物传输和持续释放. (iv) 封装层的细胞3D培养功能: 通过利用封装层模拟细胞外基质给封装细胞提供三维的培养微环境, 从而研究细胞各项生物学变化以及药物筛选分析等. 此外, 细胞3D培养也是组织工程研究中的一项重要手段^[128]. 细胞封装层功能以及单细胞封装技术应用领域见图6.

相对于多细胞封装技术, 将单个细胞限定在特定环境中的单细胞封装技术在细胞移植、细胞治疗、细胞传感器、单细胞研究、药物筛选以及组织工程研究等领域更有优势. 本文主要总结了单细胞封装技术近年来在细胞治疗、组织工程与再生医学、单细胞生物学分析以及全细胞生物传感器4个领域的应用进展.

4.1 细胞治疗

细胞治疗技术是再生医学领域的研究热点也是未来医学的支柱, 其中, 部分基于干细胞的治疗方法已被批准用于临床^[129]. 然而, 在目前细胞治疗方法中, 大多是采用体外细胞扩增培养随后通过全身系统注射或者局部注射的方式将细胞悬浮液输入到人体. 由于注射管道/针头以及血管流通时产生的高物理应力会导致细胞活性降低甚至死亡. 有研究表明, 采用导管或者注射器进行干细胞注射时, 细胞的存活率仅为1%~20%^[126,130]; 同时, 细胞在注射部位的保留能力较低, 难以在病灶部位发挥长期的作用^[131~133]. 此外, 悬浮

图6 细胞封装层功能作用以及单细胞封装技术应用领域 (网络版彩图)

Figure 6 Functions of cell encapsulation shell and application fields of single cell encapsulation technology (color online)

(未粘附)状态的细胞由于细胞外基质信号不足, 由此引发的细胞代谢和增殖抑制甚至离巢凋亡(anoikis)现象也不容忽视. 低细胞存活率和保留能力严重影响了治疗效果, 而单纯依靠提高细胞注射量来提高治疗效果的方法会引发血管堵塞等问题. 因此, 如何提高细胞在注射和血管流通中的存活率, 并且同时抑制细胞离巢凋亡是细胞治疗的关键问题. 单细胞封装技术为解决细胞治疗、组织工程等实际应用过程中, 所面临的物理应力环境, 例如离心、移取、注射、生物打印等, 导致的低细胞存活率难题提供了解决思路^[134].

David W. Courtman等人证实利用单细胞微胶囊封装方法可以有效降低悬浮细胞培养的离巢死亡现象, 以此提高细胞存活率^[135]. 该研究采用添加有纤维连接蛋白和纤维蛋白原的琼脂糖对人MSCs细胞进行微胶囊封装. 由于添加的基质分子可以和细胞膜表面的整合素结合, 进而激活细胞内信号传导通路, 从而提高细胞存活率并改善细胞的代谢和增殖能力. 体外研究发现, 构建的凝胶封装层在成分和结构上起到了类似细胞外基质(ECM)的功能. 因此, 相对于裸露细胞, 封装细胞不仅具有更高的存活率, 而且代谢活动和细胞骨架模式均有增强. 此外, 通过在大鼠后肢进行细胞移植发现, 细胞移植3天后, 通过单细胞微胶囊系统移

植的细胞保留数量是直接注射细胞悬浮液的4~8倍. Mitsuru Akashi等人采用LbL法进行单细胞纳米封装, 结果发现高分子纳米封装层能够有效防止细胞内乳酸脱氢酶(LDH)在高物理应力环境下的泄露从而提高细胞存活率^[108]. 细胞保护效果取决于封装层的厚度, 当封装层厚度高于5 nm时, 封装细胞即使在极端物理应力条件下(高速离心转速10000 r/min, 1676 ×g)的存活率也高于85%. 同时, 通过细胞培养实验发现, LbL高分子封装层不会抑制细胞的生长. Jinkee Hong等人在人MSCs细胞表面采用LbL技术构建了含有RGD的PLL和HA纳米封装层^[136]. 体外研究表明, 封装层能够有效提高细胞在高离心力下的存活率, 而且封装层的RGD通过激活细胞信号通路从而降低细胞离巢死亡现象. 此外, 通过老鼠体内静脉注射试验发现, 封装的MSCs细胞相对于裸露细胞具有明显较高的存活率和归巢效应(homing effect), 并且在肌肉损伤治疗效果方面具有明显优势.

David J. Mooney等人将纯单细胞微胶囊封装方法构建的小鼠MSCs微胶囊经静脉注射输入到小鼠体内^[81]. 结果发现, 封装层能够保护细胞免受免疫系统的攻击, 防止血管内剪切力的影响. 相对于裸露的细胞, 细胞微胶囊系统能够延缓清除动力学, 且细胞在体内可以持续的分泌可溶性细胞因子. 此外, 单细胞微胶囊系统在细胞因子分泌水平上可以比拟未封装细胞, 且高于多细胞大体积凝胶封装方法. 该研究表明, 单细胞微胶囊可以作为一种高效的治疗剂传输系统用于再生医学领域.

4.2 组织工程与再生医学

人体组织和器官是由细胞、ECM以及多种信号分子组成的复杂组合体. 例如, 血管和皮肤就是由多种类型的细胞和ECM层组成的具有高度组织的层次结构. 目前, 在体外构建3D细胞-高分子材料复合体用于组织再生的研究已经取得了显著进步^[137]. 然而, 如何制备一个多层结构的能够包含细胞和具有适当组分和厚度ECM的有效3D复合体仍然是一项挑战. 单细胞纳米封装技术为制备成分、厚度可控的ECM提供了一种较为简便的方法.

Mitsuru Akashi课题组利用LbL技术在细胞表面构建具有不同厚度的纤连蛋白/明胶纳米封装层用以模

拟ECM. 该封装细胞最外层为纤连蛋白分子, 利用纤连蛋白能够促进细胞粘附的特性, 实现了多层细胞的构建. 研究发现, 当纤连蛋白/明胶纳米封装层厚度大于6 nm时, 有利于不同细胞层之间的稳定粘附. 该研究首先构建了4层鼠成纤维细胞(L929)膜, 所制备的膜结构稳定且易从培养基底中剥离. 随后, 采用人脐动脉平滑肌细胞(UASMC)和人脐血管内皮细胞(HUVEC)实现了异种细胞双层结构的有序制备. 该研究方法为体外多层细胞结构, 例如血管、皮肤等的构建提供了新策略^[106]. 在此研究基础之上, Mitsuru Akashi课题组继续采用该纤连蛋白/明胶单细胞纳米封装体系, 依次构建了结构稳定能够产生特定蛋白质和细胞因子的3D多层组织模型^[138]、含有网状血管内皮小管结构的3D组织^[139]、高存活率和结构稳定的3D组织^[140]以及3D血管功能化的人肝脏组织^[141].

3D生物打印技术凭借其快速、灵活的操控方式以及对复杂构造体的精准制备能力, 在组织工程以及再生医学领域具有重要应用潜力^[128,142~145]. 然而, 大多数生物打印通常是将种子细胞直接分散在高分子前驱体溶液里面作为“生物墨水(bioink)”进行打印, 并借助固化反应实现目标物的构筑. 该方式不仅对于细胞活性有一定影响, 而且难以模拟真实组织的组成和结构. 因为天然组织中包含了多尺度模块化设计的特征, 其中, 细胞和基质在空间上被组织成重复的3D构建模块. 这些模块赋予了生物化学和生物物理的作用, 因此可以在单细胞水平上产生功能影响. 此外, 这些模块可以实现细胞和组织微观/宏观环境的拆分, 这是组织多功能性获得的关键因素, 同时也对组织的正常运作至关重要^[146]. 单细胞微胶囊技术为构建这种微观和宏观环境均可调的模块提供了解决思路. 然而, 以往细胞封装系统中, 较低的细胞-封装体积比例无法模拟真实组织中的细胞密度, 因此难以直接作为构建模块. Jeroen Leijten等人通过降低封装层厚度, 制备了直径为35 μm且结构稳定的单细胞微胶囊封装系统, 基于此构建了模块化生物墨水进行3D结构的生物制造方法^[68]. 较薄的凝胶封装层让细胞具有和原生组织相似的细胞密度. 该研究结果表明, 制备的生物墨水能与各种标准生物制造技术相兼容, 用于制造3D多功能生物材料. 同时, 具有高通量、普适性、成本低、直接等优点, 在组织工程以及再生医学领域具有广阔应用前景.

4.3 单细胞生物学分析

传统细胞研究是通过同时检测多个细胞对环境改变的平均响应值来分析细胞的新陈代谢和生物学行为, 然而细胞个体差异以及一些难以捕捉的微弱反应难以被体现. 若能从单个细胞水平上对细胞的形貌、细胞结构、物质含量、代谢产物以及细胞行为进行系统、精确地分析, 有利于全面揭开细胞生物系统的奥秘. 采用生物相容性材料在单个细胞表面构建封装层能够有效地将细胞彼此分离, 为细胞分化和增殖创造一个特定的微环境, 同时为单细胞生物学分析创造了条件. 此外, 封装细胞处于3D环境中其形貌和代谢更加接近体内真实状态, 因此有利于在单细胞水平上研究2D和3D环境下细胞的特征差别, 也适用于建立3D体外疾病模型用以阐明病理发生机制等.

Richard A. Mathies等人利用单细胞微胶囊封装技术实现了单细胞多重基因的高通量检测和测序工作. 该研究首先通过液滴微流控芯片技术将单个细胞和修饰有引物的功能微珠同时封装在琼脂糖微胶囊中. 然后裂解细胞并释放细胞中的基因, 在含有荧光标记的引物缓冲溶液中进行PCR扩增操作. 待PCR扩增完成之后, 收集微珠, 采用流式细胞仪对微珠荧光进行定量分析, 或进一步进行PCR扩增来实现目标基因的测序^[147]. 该方法为探究癌症发生、发展以及化疗响应等机制提供了一种高通量、可靠、高分辨的策略. 随后, Wilhelm T. S. Huck等人采用类似的策略借助单细胞微胶囊封装系统实现了单细胞水平上的细胞因子分泌^[148]和mRNA定量分析^[149]. 此外, 单细胞微胶囊封装系统为单细胞水平上的全基因组^[150]、脂质含量^[151]以及蛋白酶分泌^[152]等分析提供了平台.

Shinji Sakai等人利用细胞微胶囊封装策略实现了在单细胞水平上分析细胞分泌 H_2O_2 的能力^[153]. 该研究在细胞中添加含有酚羟基(phenolic hydroxyl, Ph)和荧光素标记的海藻酸钠分子(Fluor-Alg-Ph)和HRP, 随着 H_2O_2 从细胞分泌释放, H_2O_2 激活HRP进而产生酶催化反应导致Fluor-Alg-Ph发生交联反应并在细胞表面形成凝胶封装层结构. 通过检测封装层的荧光强度, 从而确定单个细胞分泌的 H_2O_2 量. 此外, 该方法对封装细胞的活性没有影响, 并且随着封装层的降解能够实现细胞的“on-demand”释放. 该研究是首次在单细胞水平上检测细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)分泌

情况, 促进了对细胞外ROS影响生理和病理过程的理解.

Jiming Kong等人将胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-1, IGF-1)装载在明胶/海藻酸钠LbL而成的细胞纳米封装层内. 结果发现, 虽然单纯的明胶/海藻酸钠封装层不会影响NSCs的活性、增殖以及分化能力, 但是, IGF-1的加入能够改变被封装神经干细胞NSCs的增殖能力^[95]. 该方法为研究单个神经干细胞生物学行为和功能提供了很好的模型. 同时, 纳米封装层发挥了药物载体的功能, 且较低的pH环境(pH 6.5)可以延长IGF-1的释放周期, 该方法为治疗某些神经系统疾病, 例如中风, 提供了一种潜在的治疗策略. David J. Mooney等人利用纯单细胞微胶囊封装技术实现了对单个MSCs细胞的不同尺寸和不同弹性模量材料的封装^[82]. 该研究发现, 当封装层弹性模量增强时, 单细胞水平上的成骨分化能力亦会增强. 该模型为研究3D培养环境下机械和生化基质对单个干细胞成骨分化和脂肪分化的影响提供了方案.

4.4 全细胞生物传感器

生物传感器是将生物组分固定于传感器表面, 利用生物识别作用, 例如酶与其底物之间的特异性相互作用、抗体与抗原之间的识别作用、核酸链与其互补序列的高亲和力等进行目标物检测, 具有高度的特异性, 能够快速、准确、高灵敏度地检测特定分析物. 基于细胞的生物传感器(cell-based biosensor)或者称之为全细胞生物传感器(whole-cell sensor), 是直接利用完整的、功能性的活细胞作为生物组分, 通过检测活细胞生化效应并经过传感器或变换器将这些效应转换为数字电信号进行分析. 全细胞生物传感器可用于细胞组学分析、高通量疾病诊断、药物筛选、环境毒性检测、生物医学成像等^[154]. 与基于分子生物识别的生物传感器和化学分析相比, 全细胞生物传感器能够对生物活性分析物做出最佳响应, 并且具有广谱的检测能力, 能够检测生物利用度、细胞毒性以及基因毒性等特殊参数^[155~157].

目前, 全细胞生物传感器的研究报道主要集中于微生物细胞, 关于哺乳动物细胞的报道较少^[158]. 如何将脆弱的哺乳动物细胞稳定固定在传感器元件表面并且维持体外环境下细胞的正常活性和代谢, 是全细胞生物传感器发展的瓶颈问题. 大多数细胞固定策略是

对传感器元件表面进行化学涂层修饰或者将化学涂层与表面形貌改变相结合, 然后利用细胞与修饰表面的亲和力、吸附性能、化学反应等实现细胞固定^[159,160]. 然而, 这些策略难以实现细胞的长时间、稳定的固定, 而且固定化过程中采用的化学交联反应或不可逆固定化反应会导致细胞活力降低、代谢异常等副作用. 此外, 细胞培养过程中发生的细胞团聚现象会影响检测结果. 单细胞封装技术通过生物相容性反应构建的半透性水凝胶/高分子封装层, 不仅能够利用空间阻隔效应将细胞独立开来防止细胞团聚, 还能增强其在不利环境中的细胞活性. 同时, 可以通过选择封装层组分来增强细胞在传感器表面的固定能力, 并且通过优化封装层厚度保证氧气、营养物质、代谢产物的正常交换从而维持细胞正常代谢. 此外, 通过在封装层中添加生物功能大分子、导电聚合物、感光聚合物、磁性纳米材料等, 能够形成具有生物功能、导电功能、光活性和磁性的功能细胞, 从而有望扩大全细胞传感器的应用范围^[121,124].

5 总结与展望

单细胞封装技术在降低细胞封装尺寸、精确控制封装细胞数量、提高细胞活性等方面具有显著优势. 目前, 通过液滴微流控技术制备单细胞微胶囊系统和利用LbL技术制备单细胞纳米封装系统是获得单细胞封装系统的两大主要方法. 然而, 液滴微流控技术受限于泊松分布原理, 封装细胞数量呈现随机性, 难以避免大量空胶囊和多细胞微胶囊的产生, 因此单细胞有效封装效率较低; 此外, 利用该方法构建的封装层厚度基本在10 μm 以上, 即封装后细胞的体积相对于原细胞体积通常提高了20倍以上, 因此其应用范围具有一定局限性. 纯单细胞微胶囊技术有效提高了单细胞封装效率, 且封装层厚度可降至1 μm 左右; 同时, 较低的封装层与细胞的体积比例更接近与天然组织中的细胞密度, 有利于组织构建方面的应用. 然而, 当前纯单细胞微胶囊封装的方法不多, 主要采用预先吸附/锚定碳酸钙纳米颗粒或者酶反应物的形式构建海藻酸钠高

子凝胶层, 封装层组分较单一. 如何利用该技术构建组成丰富且具有功能性的封装层是下一步研究的重点. 此外, 高浓度碳酸钙纳米颗粒以及酶催化反应过程中引入的 H_2O_2 对封装细胞的影响也需要进一步深入探究. 在单细胞纳米封装系统构建方面, LbL作为一种经典的方法被广泛使用, 并且通过与生物相容性化学反应相结合可以得到稳定的、具有长期封装效果的封装层. 但是, 如何降低细胞离巢死亡现象, 保持细胞长期活性仍然是十分紧迫的问题.

单细胞封装技术在细胞治疗和单细胞生物学分析领域优势突出, 同时在组织工程与再生医学、全细胞传感器等领域展现出重要应用潜力. 单细胞微胶囊系统能够解决细胞移植过程中面临的细胞免疫排斥和细胞量精确控制等问题; 单细胞纳米封装系统为提高干细胞治疗过程中低细胞存活率提供了解决方法. 同时, 基于单细胞封装技术构建的细胞载药系统具有良好发展前景. 单细胞封装技术为细胞提供了一个可控微环境, 为单细胞组学研究开辟了新的途径. 基于单细胞封装技术构建的3D多层组织技术以及3D生物打印技术为组织工程与再生医学提供了新思路, 即借助封装技术在细胞表面形成适当的ECM层再结合先进的构筑方法在体外模拟构建组织和器官. 此外, 目前基于哺乳动物的全细胞传感器虽然处于起步阶段, 但是单细胞封装技术带来的高细胞存活率以及易功能化修饰等特点, 为开发多功能的细胞传感器提供了可能性.

当然, 单细胞封装技术还面临许多问题急需解决. 例如, 如何获得稳定的、具有长期免疫隔离效果的封装层; 封装的独立细胞之间如何进行交互反应和交流; 封装材料对细胞生物学行为的影响; 如何精确地控制封装层厚度与透过率从而实现细胞代谢物或者生物活性成分的排出, 同时防止外界抗体或者大分子对封装细胞的攻击; 如何调节细胞释放速度或者控制封装层解离速度从而实现细胞的体内传输; 如何批量的生产高度均一的单细胞封装系统用以满足工业化或者临床的要求等. 对以上问题的深入探究将促进单细胞封装技术的发展和应

参考文献

- 1 Bisceglie V. Über die antineoplastische Immunität. Zeitschrift für Krebsforschung (in German). 1934, 40: 141-158

- 2 Prehn R T, Weaver J M, Algire G H. The diffusion-chamber technique applied to a study of the nature of homograft resistance. *J Natl Cancer Inst*, 1954, 15: 509–517
- 3 Algire G H, Weaver J M, Prehn R T. Growth of cells *in vivo* in diffusion chambers. I. Survival of homografts in immunized mice. *J Natl Cancer Inst*, 1954, 15: 493–507
- 4 Weaves J M, Algibe G H, Pbehn R T. The growth of cells *in vivo* in diffusion chambers. II. The role of cells in the destruction of homografts in mice. *J Natl Cancer Inst*, 1955, 15: 1737–1767
- 5 Chang T M S. Semipermeable microcapsules. *Science*, 1964, 146: 524–525
- 6 Chang T M S. Therapeutic applications of polymeric artificial cells. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4: 221–235
- 7 Chang T M S. Artificial cells: Biotechnology, nanomedicine, regenerative medicine, blood substitutes, bioencapsulation, and cell/stem cell therapy. Singapore: World Scientific, 2007
- 8 Lim F, Sun A M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, 1980, 210: 908–910
- 9 O'Shea G. M, Sun A M. Encapsulation of rat islets of Langerhans prolongs xenograft survival in diabetic mice. *Diabetes*, 1986, 35: 943–946
- 10 Limx F, Moss R D. Microencapsulation of living cells and tissues. *J Pharmaceutical Sci*, 1981, 70: 351–354
- 11 Wong H, Chang T M S. Bioartificial liver: Implanted artificial cells microencapsulated living hepatocytes increases survival of liver failure rats. *Int J Artificial Organs*, 1986, 9: 335–336
- 12 Bañó M C, Cohen S, Visscher K B, et al. A novel synthetic method for hybridoma cell encapsulation. *Bio/technology*, 1991, 9: 468–471
- 13 Koo J, Chang T M S. Secretion of erythropoietin from microencapsulated rat kidney cells: Preliminary results. *Int J Artificial Organs*, 1993, 16: 557–560
- 14 Winn S R, Hamang J P, Emerich D F, et al. Polymer-encapsulated cells genetically modified to secrete human nerve growth factor promote the survival of axotomized septal cholinergic neurons.. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 2324–2328
- 15 Liu Z, Ming Swi Chang T. Effects of bone marrow cells on hepatocytes: when co-cultured or co-encapsulated together. *Artificial Cells Blood Substitutes Biotech*, 2009, 28: 365–374
- 16 Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, et al. Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets. *Transplantation*, 1992, 54: 769–774
- 17 Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, et al. Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets.. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 5843–5847
- 18 Soon-Shiong P, Heintz R E, Merideth N, et al. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet*, 1994, 343: 950–951
- 19 Orive G, Santos E, Pedraz J L, et al. Application of cell encapsulation for controlled delivery of biological therapeutics. *Adv Drug Deliver Rev*, 2014, 67–68: 3–14
- 20 Orive G, Santos E, Poncelet D, et al. Cell encapsulation: Technical and clinical advances. *Trends Pharmacological Sci*, 2015, 36: 537–546
- 21 de Vos P, Lazarjani H A, Poncelet D, et al. Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective. *Adv Drug Deliver Rev*, 2014, 67–68: 15–34
- 22 Kang A R, Park J S, Ju J, et al. Cell encapsulation via microtechnologies. *Biomaterials*, 2014, 35: 2651–2663
- 23 Calafiore R, Basta G. Clinical application of microencapsulated islets: Actual perspectives on progress and challenges. *Adv Drug Deliver Rev*, 2014, 67–68: 84–92
- 24 Qi C, Liu J, Jin Y, et al. Photo-crosslinkable, injectable sericin hydrogel as 3D biomimetic extracellular matrix for minimally invasive repairing cartilage. *Biomaterials*, 2018, 163: 89–104
- 25 Filippi M, Dasen B, Guerrero J, et al. Magnetic nanocomposite hydrogels and static magnetic field stimulate the osteoblastic and vasculogenic profile of adipose-derived cells. *Biomaterials*, 2019, 223: 119468
- 26 Zhang Y, Han P. Application of hydrogel in orthopedics (in Chinese). *Int J Orthop*, 2019, 40: 333–337 [张瑜博, 韩培. 水凝胶在骨科中的应用. 国际骨科学杂志. 2019, 40: 333–337]
- 27 Ling Y, Rubin J, Deng Y, et al. A cell-laden microfluidic hydrogel. *Lab Chip*, 2007, 7: 756–762
- 28 Uludag H, De Vos P, Tresco P A. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliver Rev*, 2000, 42: 29–64
- 29 Bochenek M A, Veisoh O, Vegas A J, et al. Alginate encapsulation as long-term immune protection of allogeneic pancreatic islet cells transplanted into the omental bursa of macaques. *Nat Biomed Eng* 2018, 2: 810–821

- 30 Farina M, Alexander J F, Thekkedath U, et al. Cell encapsulation: Overcoming barriers in cell transplantation in diabetes and beyond. *Adv Drug Deliver Rev*, 2019, 139: 92–115
- 31 Li T, Du Z, Sun M, et al. Experimental study of APA microencapsulated porcine islet (in Chinese). *Chin J Biomed Eng*, 2005, 24: 507–509 [李涛, 杜智, 孙铭, 等. APA微囊猪胰岛的实验研究. *中国生物医学工程学报*, 2005, 24: 507–509]
- 32 Sakai K, Teshima T F, Nakashima H, et al. Graphene-based neuron encapsulation with controlled axonal outgrowth. *Nanoscale*, 2019, 11: 13249–13259
- 33 Lathuilière A, Laversenne V, Astolfo A, et al. A subcutaneous cellular implant for passive immunization against amyloid- β reduces brain amyloid and tau pathologies. *Brain*, 2016, 139: 1587–1604
- 34 Dhawan A, Chaijitraruch N, Fitzpatrick E, et al. Alginate microencapsulated human hepatocytes for the treatment of acute liver failure in children. *J Hepatol*, 2019.doi.org/10.1016/j.jhep.2019.12.002
- 35 Saleh L S, Carles-Carner M, Bryant S J. The in vitro effects of macrophages on the osteogenic capabilities of MC3T3-E1 cells encapsulated in a biomimetic poly(ethylene glycol) hydrogel. *Acta Biomater*, 2018, 71: 37–48
- 36 Bhujbal S V, de Vos P, Niclou S P. Drug and cell encapsulation: Alternative delivery options for the treatment of malignant brain tumors. *Adv Drug Deliver Rev*, 2014, 67-68: 142–153
- 37 Choe G, Kim S W, Park J, et al. Anti-oxidant activity reinforced reduced graphene oxide/alginate microgels: Mesenchymal stem cell encapsulation and regeneration of infarcted hearts. *Biomaterials*, 2019, 225: 119513
- 38 Wu F, Ju X J, He X H, et al. A novel synthetic microfiber with controllable size for cell encapsulation and culture. *J Mater Chem B*, 2016, 4: 2455–2465
- 39 Meng D, Yuan Y, Jiang X, et al. An *in vitro* study of mouse bone marrow mesenchymal stem cells encapsulated in alginate-chitosan- alginate microcapsules (in Chinese). *Beijing J Stomatol*, 2019, 27: 196–200 [孟丹, 袁亚飞, 江晓霞, 等. 海藻酸钠-壳聚糖微囊包封小鼠骨髓间充质干细胞的体外研究. *北京口腔医学*, 2019, 27: 196–200]
- 40 Boss C, De Marchi U, Hermant A, et al. Encapsulation of insulin-secreting cells expressing a genetically encoded fluorescent calcium indicator for cell-based sensing *in vivo*. *Adv Healthcare Mater*, 2017, 6: 1600869
- 41 Tan W H, Takeuchi S. Monodisperse alginate hydrogel microbeads for cell encapsulation. *Adv Mater*, 2007, 19: 2696–2701
- 42 Colton C K. Oxygen supply to encapsulated therapeutic cells. *Adv Drug Deliver Rev*, 2014, 67-68: 93–110
- 43 Teramura Y, Kaneda Y, Iwata H. Islet-encapsulation in ultra-thin layer-by-layer membranes of poly(vinyl alcohol) anchored to poly(ethylene glycol)-lipids in the cell membrane. *Biomaterials*, 2007, 28: 4818–4825
- 44 Kumachev A, Greener J, Tumarkin E, et al. High-throughput generation of hydrogel microbeads with varying elasticity for cell encapsulation. *Biomaterials*, 2011, 32: 1477–1483
- 45 Wong H, Chang T M S. The microencapsulation of cells within alginate poly-L-Lysine microcapsules prepared with the standard single Step drop technique-histologically identified membrane imperfections and the associated graft-rejection. *Biomater Artif Cell Im*, 1991, 19: 675–686
- 46 Kamperman T, Karperien M, Le Gac S, et al. Single-cell microgels: Technology, challenges, and applications. *Trends Biotechnol*, 2018, 36, 850–865
- 47 Hallé J P, Leblond F A, Pariseau J F, et al. Studies on small ($< 300 \mu\text{m}$) microcapsules: II-Parameters governing the production of alginate beads by high voltage electrostatic pulses. *Cell transplantation*, 1994, 3: 365–372
- 48 Li X, Chen S, Li J, et al. 3D culture of chondrocytes in gelatin hydrogels with different stiffness. *Polymers*, 2016, 8: 269–283
- 49 Seeto W J, Tian Y, Pradhan S, et al. Rapid production of cell-laden microspheres using a flexible microfluidic encapsulation platform. *Small*, 2019, 15: 1902058
- 50 Santos E, Pedraz J L, Hernández R M, et al. Therapeutic cell encapsulation: Ten steps towards clinical translation. *J Control Release*, 2013, 170: 1–14
- 51 Mabry K M, Schroeder M E, Payne S Z, et al. Three-dimensional high-throughput cell encapsulation platform to study changes in cell-matrix interactions. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 21914–21922
- 52 Correia C R, Reis R L, Mano J F. Design principles and multifunctionality in cell encapsulation systems for tissue regeneration. *Adv Healthcare Mater*, 2018, 7: 1701444
- 53 Desai T, Shea L D. Advances in islet encapsulation technologies. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 338–350
- 54 Rossow T, Lienemann P S, Mooney D J. Cell microencapsulation by droplet microfluidic templating. *Macromol Chem Phys*, 2017, 218:

- 1600380
- 55 Wang J Z, Ding Z Q, Zhang F, et al. Recent development in cell encapsulations and their therapeutic applications. *Mater Sci Eng-C*, 2017, 77: 1247–1260
- 56 Steele J A M, Hallé J P, Poncelet D, et al. Therapeutic cell encapsulation techniques and applications in diabetes. *Adv Drug Deliver Rev*, 2014, 67-68: 74–83
- 57 Pan R. A microfluidic multi-step droplet splitting system for single-cell encapsulation (in Chinese). Academic dissertation. Shenyang: Northeastern University, 2013 [潘如意. 微流控液滴多级分裂系统用于单细胞封装的研究. 沈阳: 东北大学, 2013]
- 58 Sakai S, Kawabata K, Ono T, et al. Preparation of mammalian cell-enclosing subsieve-sized capsules (<100 μm) in a coflowing stream. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 86: 168–173
- 59 He M, Edgar J S, Jeffries G D M, et al. Selective encapsulation of single cells and subcellular organelles into picoliter- and femtoliter-volume droplets. *Anal Chem*, 2005, 77: 1539–1544
- 60 Köster S, Angilè F E, Duan H, et al. Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. *Lab Chip*, 2008, 8: 1110–1115
- 61 Shintaku H, Kuwabara T, Kawano S, et al. Micro cell encapsulation and its hydrogel-beads production using microfluidic device. *Microsyst Technol*, 2007, 13: 951–958
- 62 Aikawa T, Konno T, Takai M, et al. Spherical phospholipid polymer hydrogels for cell encapsulation prepared with a flow-focusing microfluidic channel device. *Langmuir*, 2012, 28: 2145–2150
- 63 Utech S, Prodanovic R, Mao A S, et al. Microfluidic generation of monodisperse, structurally homogeneous alginate microgels for cell encapsulation and 3D cell culture. *Adv Healthcare Mater*, 2015, 4: 1628–1633
- 64 Headen D M, García J R, García A J. Parallel droplet microfluidics for high throughput cell encapsulation and synthetic microgel generation. *Microsyst Nanoeng*, 2018, 4: 17076
- 65 Collins D J, Neild A, deMello A, et al. The Poisson distribution and beyond: methods for microfluidic droplet production and single cell encapsulation. *Lab Chip*, 2015, 15: 3439–3459
- 66 Chabert M, Viovy J L. Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 3191–3196
- 67 Kemna E W M, Schoeman R M, Wolbers F, et al. High-yield cell ordering and deterministic cell-in-droplet encapsulation using Dean flow in a curved microchannel. *Lab Chip*, 2012, 12: 2881–2887
- 68 Kamperman T, Henke S, van den Berg A, et al. Single cell microgel based modular bioinks for uncoupled cellular micro- and macroenvironments. *Adv Healthcare Mater*, 2017, 6: 1600913
- 69 Lee D H, Jang M, Park J K. Rapid one-step purification of single-cells encapsulated in alginate microcapsules from oil to aqueous phase using a hydrophobic filter paper: Implications for single-cell experiments. *Biotech J*, 2014, 9: 1233–1240
- 70 Liu J J, Gao D, Mao S F, et al. A microfluidic photolithography for controlled encapsulation of single cells inside hydrogel microstructures. *Sci China Chem*, 2012, 55: 494–501
- 71 Yang J, Katagiri D, Mao S, et al. Generation of controlled monodisperse porous polymer particles by dipped inkjet injection. *RSC Adv*, 2015, 5: 7297–7303
- 72 Yang J, Katagiri D, Mao S, et al. Inkjet printing based assembly of thermoresponsive core-shell polymer microcapsules for controlled drug release. *J Mater Chem B*, 2016, 4: 4156–4163
- 73 Sun Y, Song W, Sun X, et al. Inkjet-printing patterned chip on sticky superhydrophobic surface for high-efficiency single-cell array trapping and real-time observation of cellular apoptosis. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 31054–31060
- 74 Zeng H, Yang J, Katagiri D, et al. Investigation of monodisperse droplet generation in liquids by inkjet. *Sens Actuat B-Chem*, 2015, 220: 958–961
- 75 Xu T, Kincaid H, Atala A, et al. High-throughput production of single-cell microparticles using an inkjet printing technology. *J Eng Ind*, 2008, 130: 021017
- 76 Chen F, Lin L, Zhang J, et al. Single-cell analysis using drop-on-demand inkjet printing and probe electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2016, 88: 4354–4360
- 77 Mu L, Hou L, Zhang W. Design of flow cytometry based on microfluids digitalization technology (in Chinese). *J Chem Ind Eng (China)*, 2010, 61: 949–954 [穆莉莉, 侯丽雅, 章维一. 基于微流体数字化技术的流式细胞术的设计. 化工学报, 2010, 61: 949–954]

- 78 Li Q, Hou L Y, Zhang W Y. Preparation and Characterization of Single-Cell Micro-capsules (in Chinese). *Chin J Anal Chem*, 2011, 39: 882–885
李清, 侯丽雅, 章维一. 单细胞微胶囊的制备与表征. *分析化学*, 2011, 39: 882–885
- 79 Sakai S, Taya M. On-cell surface cross-linking of polymer molecules by horseradish peroxidase anchored to cell membrane for individual cell encapsulation in hydrogel sheath. *ACS Macro Lett*, 2014, 3: 972–975
- 80 Sakai S, Liu Y, Sengoku M, et al. Cell-selective encapsulation in hydrogel sheaths via biospecific identification and biochemical cross-linking. *Biomaterials*, 2015, 53: 494–501
- 81 Mao A S, Shin J W, Utech S, et al. Deterministic encapsulation of single cells in thin tunable microgels for niche modelling and therapeutic delivery. *Nat Mater*, 2017, 16: 236–243
- 82 Lienemann P S, Rossow T, Mao A S, et al. Single cell-laden protease-sensitive microniches for long-term culture in 3D. *Lab Chip*, 2017, 17: 727–737
- 83 Park J H, Hong D, Lee J, et al. Cell-in-shell hybrids: Chemical nanoencapsulation of individual cells. *Acc Chem Res*, 2016, 49: 792–800
- 84 Park J H, Yang S H, Lee J, et al. Nanocoating of single cells: From maintenance of cell viability to manipulation of cellular activities. *Adv Mater*, 2014, 26: 2001–2010
- 85 Park J H, Kim K, Lee J, et al. A cytoprotective and degradable metal-polyphenol nanoshell for single-cell encapsulation. *Angew Chem Int Edit*, 2014, 53: 12420–12425
- 86 Cao Z, Wang X, Pang Y, et al. Biointerfacial self-assembly generates lipid membrane coated bacteria for enhanced oral delivery and treatment. *Nat Commun*, 2019, 10: 5783
- 87 Chen W, Wang G, Tang R. Nanomodification of living organisms by biomimetic mineralization. *Nano Res*, 2014, 7: 1404–1428
- 88 Moya S, Sukhorukov G B, Auch M, et al. Microencapsulation of organic solvents in polyelectrolyte multilayer micrometer-sized shells. *J Colloid Interface Sci*, 1999, 216: 297–302
- 89 Neu B, Voigt A, Mitlöchner R, et al. . Biological cells as templates for hollow microcapsules. *J Microencapsulation*, 2001, 18: 385–395
- 90 Donath E, Moya S, Neu B, et al. Hollow polymer shells from biological templates: Fabrication and potential applications. *Chem Eur J*, 2002, 8: 5481–5485
- 91 Krol S, del Guerra S, Grupillo M, et al. Multilayer nanoencapsulation. New approach for immune protection of human pancreatic islets. *Nano Lett*, 2006, 6: 1933–1939
- 92 Miura S, Teramura Y, Iwata H. Encapsulation of islets with ultra-thin polyion complex membrane through poly(ethylene glycol)-phospholipids anchored to cell membrane. *Biomaterials*, 2006, 27: 5828–5835
- 93 Veerabadran N G, Goli P L, Stewart-Clark S S, et al. Nanoencapsulation of stem cells within polyelectrolyte multilayer shells. *Macromol Biosci*, 2007, 7: 877–882
- 94 Mansouri S, Merhi Y, Winnik F M, et al. Investigation of layer-by-layer assembly of polyelectrolytes on fully functional human red blood cells in suspension for attenuated immune response. *Biomacromolecules*, 2011, 12: 585–592
- 95 Li W, Guan T, Zhang X, et al. The effect of layer-by-layer assembly coating on the proliferation and differentiation of neural stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 3018–3029
- 96 Moghimi S M, Symonds P, Murray J C, et al. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol Ther*, 2005, 990–995
- 97 Teramura Y, Iwata H. Cell surface modification with polymers for biomedical studies. *Soft Matter*, 2010, 6: 1081–1091
- 98 Fischer D, Li Y X, Ahlemeyer B, et al. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 2003, 24: 1121–1131
- 99 Yang J, Li J, Li X, et al. Nanoencapsulation of individual mammalian cells with cytoprotective polymer shell. *Biomaterials*, 2017, 133: 253–262
- 100 Yang J, Yang Y, Kawazoe N, et al. Encapsulation of individual living cells with enzyme responsive polymer nanoshell. *Biomaterials*, 2019, 197: 317–326
- 101 Teramura Y, Oommen O P, Olerud J, et al. Microencapsulation of cells, including islets, within stable ultra-thin membranes of maleimide-conjugated PEG-lipid with multifunctional crosslinkers. *Biomaterials*, 2013, 34: 2683–2693
- 102 Teramura Y, Iwata H. Improvement of graft survival by surface modification with poly(ethylene glycol)-lipid and urokinase in intraportal islet transplantation. *Transplantation*, 2011, 91: 271–278
- 103 Nilsson P H, Ekdahl K N, Magnusson P U, et al. Autoregulation of thromboinflammation on biomaterial surfaces by a multicomponent

- therapeutic coating. *Biomaterials*, 2013, 34: 985–994
- 104 Cabric S, Sanchez J, Lundgren T, et al. Islet surface heparinization prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet transplantation. *Diabetes*, 2007, 56: 2008–2015
- 105 Matsusaki M, Ajiro H, Kida T, et al. Layer-by-layer assembly through weak interactions and their biomedical applications. *Adv Mater*, 2012, 24: 454–474
- 106 Matsusaki M, Kadowaki K, Nakahara Y, et al. Fabrication of cellular multilayers with nanometer-sized extracellular matrix films. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 4689–4692
- 107 Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M. Control of cell surface and functions by layer-by-layer nanofilms. *Langmuir*, 2010, 26: 5670–5678
- 108 Matsuzawa A, Matsusaki M, Akashi M. Effectiveness of nanometer-sized extracellular matrix layer-by-layer assembled films for a cell membrane coating protecting cells from physical stress. *Langmuir*, 2013, 29: 7362–7368
- 109 Kozlovskaya V, Harbaugh S, Drachuk I, et al. Hydrogen-bonded LbL shells for living cell surface engineering. *Soft Matter*, 2011, 7: 2364–2372
- 110 Carter J L, Drachuk I, Harbaugh S, et al. Truly nonionic polymer shells for the encapsulation of living cells. *Macromol Biosci*, 2011, 11: 1244–1253
- 111 Shi P, Zhao N, Coyne J, et al. DNA-templated synthesis of biomimetic cell wall for nanoencapsulation and protection of mammalian cells. *Nat Commun*, 2019, 10: 2223
- 112 Liu T, Wang Y, Zhong W, et al. Biomedical applications of layer-by-layer self-assembly for cell encapsulation: Current status and future perspectives. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8: 1800939
- 113 Xiong W, Yang Z, Zhai H, et al. Alleviation of high light-induced photoinhibition in cyanobacteria by artificially conferred biosilica shells. *Chem Commun*, 2013, 49: 7525–7527
- 114 Ko E H, Yoon Y, Park J H, et al. Bioinspired, cytocompatible mineralization of silica-titania composites: thermoprotective nanoshell formation for individual *chlorella* cells. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 12279–12282
- 115 Yang S H, Lee K B, Kong B, et al. Biomimetic encapsulation of individual cells with silica. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 9160–9163
- 116 Kim B J, Park T, Moon H C, et al. Cytoprotective alginate/polydopamine core/shell microcapsules in microbial encapsulation. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 14443–14446
- 117 Wang G, Wang L, Liu P, et al. Extracellular silica nanocoat confers thermotolerance on individual cells: A case study of material-based functionalization of living cells. *ChemBioChem*, 2010, 11: 2368–2373
- 118 Yang S H, Kang S M, Lee K B, et al. Mussel-inspired encapsulation and functionalization of individual yeast cells. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 2795–2797
- 119 Wang B, Liu P, Jiang W, et al. Yeast cells with an artificial mineral shell: Protection and modification of living cells by biomimetic mineralization. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47: 3560–3564
- 120 Lee J, Choi J, Park J H, et al. Cytoprotective silica coating of individual mammalian cells through bioinspired silicification. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 8056–8059
- 121 Lee J, Cho H, Choi J, et al. Chemical sporulation and germination: cytoprotective nanocoating of individual mammalian cells with a degradable tannic acid-Fe^{III} complex. *Nanoscale*, 2015, 7: 18918–18922
- 122 Zhao R, Wang B, Yang X, et al. A drug-free tumor therapy strategy: Cancer-cell-targeting calcification. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 5225–5229
- 123 Yang J, Li J, Wang X, et al. Single mammalian cell encapsulation by *in situ* polymerization. *J Mater Chem B*, 2016, 4: 7662–7668
- 124 Zhu W, Guo J, Amini S, et al. SupraCells: living mammalian cells protected within functional modular nanoparticle-based exoskeletons. *Adv Mater*, 2019, 31: 1900545
- 125 Gao T, Chen T, Feng C, et al. Design and fabrication of flexible DNA polymer cocoons to encapsulate live cells. *Nat Commun*, 2019, 10: 2946
- 126 Foster A A, Marquardt L M, Heilshorn S C. The diverse roles of hydrogel mechanics in injectable stem cell transplantation. *Curr Opin Chem Eng*, 2017, 15: 15–23
- 127 Hasturk O, Kaplan D L. Cell armor for protection against environmental stress: Advances, challenges and applications in micro- and nanoencapsulation of mammalian cells. *Acta Biomater*, 2019, 95: 3–31
- 128 Ma X, Qu X, Zhu W, et al. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 2206–2211

- 129 Fischbach M A, Bluestone J A, Lim W A. Cell-based therapeutics: The next pillar of medicine. *Sci Translational Med*, 2013, 5: 179ps7
- 130 Aguado B A, Mulyasmita W, Su J, et al. Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18: 806–815
- 131 van den Akker F, Feyen D A M, van den Hoogen P, et al. Intramyocardial stem cell injection: go(ne) with the flow. *Eur Heart J*, 2017, 38: 184–186
- 132 Feyen D A M, Gaetani R, Doevendans P A, et al. Stem cell-based therapy: Improving myocardial cell delivery. *Adv Drug Deliver Rev*, 2016, 106: 104–115
- 133 Ansboro S, Greiser U, Barry F, et al. Strategies for improved targeting of therapeutic cells: Implications for tissue repair. *eCM*, 2012, 23: 310–319
- 134 Wang X, Rivera-Bolanos N, Jiang B, et al. Advanced functional biomaterials for stem cell delivery in regenerative engineering and medicine. *Adv Funct Mater*, 2019, 29: 1809009
- 135 Karoubi G, Ormiston M L, Stewart D J, et al. Single-cell hydrogel encapsulation for enhanced survival of human marrow stromal cells. *Biomaterials*, 2009, 30: 5445–5455
- 136 Choi D, Lee H, Kim H B, et al. Cytoprotective self-assembled RGD peptide nanofilms for surface modification of viable mesenchymal stem cells. *Chem Mater*, 2017, 29: 2055–2065
- 137 Lutolf M P, Hubbell J A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 47–55
- 138 Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M. Three-dimensional constructs induce high cellular activity: Structural stability and the specific production of proteins and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 402: 153–157
- 139 Nishiguchi A, Yoshida H, Matsusaki M, et al. Rapid construction of three-dimensional multilayered tissues with endothelial tube networks by the cell-accumulation technique. *Adv Mater*, 2011, 23: 3506–3510
- 140 Chetprayoon P, Kadowaki K, Matsusaki M, et al. Survival and structural evaluations of three-dimensional tissues fabricated by the hierarchical cell manipulation technique. *Acta Biomater*, 2013, 9: 4698–4706
- 141 Sasaki K, Akagi T, Asaoka T, et al. Construction of three-dimensional vascularized functional human liver tissue using a layer-by-layer cell coating technique. *Biomaterials*, 2017, 133: 263–274
- 142 Mao H, Gu Z. Polymers in 3D bioprinting: progress and challenges (in Chinese). *Mater China*, 2018, 37: 949–969 [毛宏理, 顾忠伟. 生物3D打印高分子材料发展现状与趋势. *中国材料进展*, 2018, 37: 949–969]
- 143 Yang D, Xia X. 3D printing of biological materials: progress and clinical application (in Chinese). *Chin J Tissue Eng Res*, 2017, 21: 2927–2933 [杨道朋, 夏旭. 3D打印生物材料研究及其临床应用优势. *中国组织工程研究*, 2017, 21: 2927–2933]
- 144 Cui H, Nowicki M, Fisher J P, et al. 3D bioprinting for organ regeneration. *Adv Healthcare Mater*, 2017, 6: 1601118
- 145 Matai I, Kaur G, Seyedsalehi A, et al. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*, 2020, 226: 119536
- 146 Liu J S, Gartner Z J. Directing the assembly of spatially organized multicomponent tissues from the bottom up. *Trends Cell Biol*, 2012, 22: 683–691
- 147 Novak R, Zeng Y, Shuga J, et al. Single-cell multiplex gene detection and sequencing with microfluidically generated agarose emulsions. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 390–395
- 148 Chokkalingam V, Tel J, Wimmers F, et al. Probing cellular heterogeneity in cytokine-secreting immune cells using droplet-based microfluidics. *Lab Chip*, 2013, 13: 4740–4744
- 149 Rakszewska A, Stolper R J, Kolasa A B, et al. Quantitative single-cell mRNA analysis in hydrogel beads. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 6698–6701
- 150 Park E S, Yan J P, Ang R A, et al. Isolation and genome sequencing of individual circulating tumor cells using hydrogel encapsulation and laser capture microdissection. *Lab Chip*, 2018, 18: 1736–1749
- 151 Li M, van Zee M, Riche C T, et al. A gelatin microdroplet platform for high-throughput sorting of hyperproducing single-cell-derived microalgal clones. *Small*, 2018, 14: 1803315
- 152 Vanella R, Ta D T, Nash M A. Enzyme-mediated hydrogel encapsulation of single cells for high-throughput screening and directed evolution of oxidoreductases. *Biotech Bioeng*, 2019, 116: 1878–1886

- 153 Liu Y, Sakai S, Kawa S, et al. Identification of hydrogen peroxide-secreting cells by cytocompatible coating with a hydrogel membrane. *Anal Chem*, 2014, 86: 11592–11598
- 154 Liu Q, Wu C, Cai H, et al. Cell-based biosensors and their application in biomedicine. *Chem Rev*, 2014, 114: 6423–6461
- 155 Guerreiro M R, Freitas D F, Alves P M, et al. Detection and quantification of label-free infectious adenovirus using a switch-on cell-based fluorescent biosensor. *ACS Sens*, 2019, 4: 1654–1661
- 156 Hedayatipour A, Aslanzadeh S, McFarlane N. CMOS based whole cell impedance sensing: challenges and future outlook. *Biosens Bioelectron*, 2019, 143: 111600
- 157 Roggo C, van der Meer J R. Miniaturized and integrated whole cell living bacterial sensors in field applicable autonomous devices. *Curr Opin Biotech*, 2017, 45: 24–33
- 158 Dai B, Wang L, Wang Y, et al. Single-cell nanometric coating towards whole-cell-based biodevices and biosensors. *ChemistrySelect*, 2018, 3: 7208–7221
- 159 Scuratti F, Bonacchini G E, Bossio C, et al. Real-time monitoring of cellular cultures with electrolyte-gated carbon nanotube transistors. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 37966–37972
- 160 Gupta N, Renugopalakrishnan V, Liepmann D, et al. Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives. *Biosens Bioelectron*, 2019, 141: 111435

Advances in single mammalian cells encapsulation technologies

YANG JianMin^{1,2}, HAO HuiLi¹, WANG WeiBin¹ & SHI XianAi^{1,2}

1 College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350116, China;

2 Fujian Key Lab of Medical Instrument and Pharmaceutical Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350116, China

Cell encapsulation technology involves the immobilization of cells in a semipermeable membrane or a hydrogel. The encapsulation shell can effectively prevent immune cells, antibodies, enzymes, and other large-sized substances from attacking the encapsulated cells while allowing the free exchange of small-sized substances such as oxygen, nutrients, and metabolites. Cell encapsulation technology offers numerous benefits in the field of biomaterials, biomedicines, and life sciences. Single cell encapsulation technology, which involves coating individual living cells with semipermeable encapsulation shells, has many advantages over the traditional cell encapsulation technology, including higher encapsulation efficiency, thinner encapsulation shell, and higher encapsulation stability. Single cell encapsulation systems also have significant advantages in improving the exchange efficiency of oxygen, nutrients, and metabolites, maintaining cell viability and functions, and studying cell biochemistry at the single cell level. This article reviews the recent advances in single mammalian cells encapsulation technologies. We examine the research progress of single-cell micro/nano-encapsulation and their applications in cell therapies, tissue engineering and regenerative medicine, single-cell biological analysis, and whole-cell sensors. Finally, the existing issues and future prospects of this field are summarized and discussed.

cell encapsulation, single cell, cell therapy, single cell analysis, regenerative medicine

doi: [10.1360/SSV-2019-0268](https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0268)