

文章编号: 1006-3080(2025)06-0783-10

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20250326003

基于 3D 微流控芯片的水凝胶微胶囊可控生成系统

金 聪¹, 赵旭晟², 郭嘉灏¹, 欧阳立明², 姜国俊¹, 顾 震¹, 王慧锋¹

(华东理工大学 1. 信息科学与工程学院; 2. 生物工程学院, 上海 200237)

摘要: 围绕水凝胶微胶囊制备需求, 利用 3D 微纳打印在快速、低成本和高精度等方面的优势, 发展了基于 3D 微流控芯片的微胶囊制备系统, 该系统通过构建具有 3D 微结构的液滴微流控芯片, 以双层鞘流生成微胶囊颗粒, 并实现微胶囊核壳比例的可控生成。实验结果显示, 利用 3D 微纳打印得到的模具, 通过翻模制造微流控芯片, 可达到高精度与高平整度, 通道尺寸误差均小于 2 μm 。所生成微胶囊的内、外径变异系数均小于 3% 且一致性优异。细胞增殖实验表明, 所生成微胶囊可用于 3D 细胞培养, 证实了所提出方法在规模化细胞培养及再生医学等领域具有广泛应用潜力。

关键词: 微纳加工; 3D 微流控芯片; 液滴微流控; 微胶囊; 3D 细胞培养

中图分类号: TP61; Q813

文献标志码: A

水凝胶微胶囊(以下简称微胶囊)细胞培养作为一种新兴的 3D 细胞培养技术^[1-6], 在生物医药等领域具有广泛应用前景^[7]。它用微流控技术首先将细胞包埋于培养基质, 通过鞘流使含细胞的培养基质形成液滴, 再将液滴包裹于水凝胶外壳中, 形成直径约 100~500 μm 的双层球形核壳结构。水凝胶作为壳层, 提供了机械稳定性以及内外物质的半渗透能力; 核心部分的培养基中添加生物大分子(如透明质酸^[8-9]、胶原蛋白^[10]等), 为三维生长的细胞球提供具有黏附能力的支架, 并可通过调节生物大分子的浓度、交联密度及功能修饰, 更好地支持细胞生长。在实际应用过程中, 这种微胶囊结构具有微环境仿生性、细胞行为与功能保真性等优势, 可悬浮于反应器培养基中进行培养, 避免高流场中剪切力对细胞的损伤^[11-13]。对于环境敏感且稀缺的细胞, 通过微胶囊培养技术可将传统的、依赖人工的平面细胞扩增方式转变为自动化的、过程可控的生物反应器生产方式, 为干细胞等细胞治疗技术从实验室走向临床应用提供规模化生产能力^[14-17]。水凝胶外壳的半透膜特性以及生

物相容性使微胶囊也可作为细胞药物载体, 直接用于体内治疗^[18]。

微胶囊的制备通常采用超疏水表面法^[19]、电喷雾法^[20]、逐层组合法^[21]以及液滴微流控法^[22]。超疏水表面法通过其高疏水性与低表面能, 能使液滴保持球形, 且提高材料的防水防污性能; 电喷雾法可控性高, 生产速率快; 逐层组合法使用多种材料制备微胶囊, 可用于多种应用场景; 液滴微流控法^[22-24]通过调控双层鞘流, 利用多相流体间相互作用, 实现微胶囊的制备。相比其他制备方法, 液滴微流控法具有封装条件温和无害、高通量、工艺操作简单且可重复性高等优点, 生成的微胶囊批次间拥有高度一致性。目前, 基于液滴微流控的微胶囊制备装置主要有两种结构: 同轴毛细管组装结构^[25]及双层聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)结构^[26], 尽管这两种结构皆可形成单分散性良好的微胶囊, 但都有其局限性。同轴毛细管组装结构需手工组装, 导致其重复性差且难以多通道扩展; 双层 PDMS 结构制作复杂且稳定性差, 不易将其固定且易形变, 容易在操

收稿日期: 2025-03-26

基金项目: 国家重大科研仪器研制项目(32327801)

作者简介: 金 聪(1997—), 男, 安徽人, 硕士生, 主要研究方向为微胶囊高通量制备及细胞检测研究。E-mail: 156345702@qq.com

通信联系人: 顾 震, E-mail: guzhen@ecust.edu.cn

引用本文: 金 聪, 赵旭晟, 郭嘉灏, 等. 基于 3D 微流控芯片的水凝胶微胶囊可控生成系统[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2025, 51(6): 783-792.

Citation: JIN Cong, ZHAO Xusheng, GUO Jiahao, et al. A 3D Microfluidic-Based Hydrogel Microcapsule Fabrication System[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2025, 51(6): 783-792.

作过程中发生偏移,存在成本高、制作周期长等局限,难以满足规模化的微胶囊生产,也不利于快速迭代研究。

因此,本文提出一种基于 3D 液滴微流控芯片的高通量、低成本和高均一性的微胶囊制备系统。通过 3D 微纳打印机制作 3D 微流控芯片模具,并通过翻模工艺制备 PDMS 载玻片式微流控芯片,生成了具有厚度可控、大小均一的海藻酸盐水凝胶外壳和透明质酸溶液内核的微胶囊。在此基础上,将肺癌人类肺泡基底上皮细胞(A549 细胞)包埋于微胶囊内并开展培养实验,以验证该制备系统在细胞包埋与培养方面的适用性。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

矿物油、司班 80、无水氯化钙(CaCl_2)、海藻酸钠、透明质酸(Hyaluronic Acid, HA),均购于美国 Sigma-Aldrich 公司;PDMS,购于陶氏有机硅(上海)有限公司。

3D 打印机(上海普利生机电科技有限公司,MP-100-6L 型),等离子清洗机(美国 Harrick Plasma 公司,PDC-32G 型),注射泵(保定兰格恒流泵有限公司,TS-1B/W0109-1B 型),白光干涉扫描仪(西班牙 Sensofar 公司,Sensofar S neox 型),Opera Phenix 高内涵细胞成像分析系统(美国 PerkinElmer 公司,Operetta CLS™ LIVE 型)。

1.2 微流控芯片的设计

用于生成核壳微胶囊的微流控芯片采用 PDMS 与玻璃载玻片构成的双层结构,通过等离子体处理实现键合。芯片包括 3 个独立的溶液输入口和一个输出口^[27],分别用于引入油相、外壳溶液及核心溶液。芯片前半部分为多相液体汇聚区域,由 3 条并联排列的矩形截面微通道组成,由外向内依次为油乳液通道、外壳溶液通道、核心溶液通道,其横截面尺寸(宽度×高度)分别为 $200\ \mu\text{m}\times 250\ \mu\text{m}$ 、 $150\ \mu\text{m}\times 150\ \mu\text{m}$ 、 $100\ \mu\text{m}\times 100\ \mu\text{m}$ 。每条通道最前端预留有打孔区域,为半径 2 mm 的圆形结构,深度与对应流道高度一致,所对应的输入孔直径皆为 0.7 mm。核心溶液与外壳溶液在共流聚焦区域汇聚后有一段共流通道,其横截面尺寸为 $150\ \mu\text{m}\times 150\ \mu\text{m}$ 。芯片后半部分为微胶囊运输区域,该区域前段为横截面尺寸为 $250\ \mu\text{m}\times 250\ \mu\text{m}$ 的直通道,后接一段横截面尺寸为 $350\ \mu\text{m}\times 250\ \mu\text{m}$ 的蛇形通道。两端通道之间设有渐变段,其高度保持为 $250\ \mu\text{m}$,宽度由 $250\ \mu\text{m}$ 平滑过渡

至 $350\ \mu\text{m}$ 。通道尾部区域设置有半径为 1.6 mm 的出口孔,用于连接输出微胶囊的特氟龙软管(内径 $500\ \mu\text{m}$)。

1.3 溶液制备

在无菌超净台中,分别将纯化的海藻酸钠、分子量 $7\times 10^6\ \text{Da}$ 的 HA 和 CaCl_2 粉末在常温下溶解于去离子水中,以制备质量浓度 20 g/L 的海藻酸钠溶液、10 g/L 的 HA 溶液和 1 g/mL 的 CaCl_2 溶液^[28],然后通过 $0.22\ \mu\text{m}$ 无菌滤膜过滤溶液中的杂质与细菌。质量浓度 20 g/L 的海藻酸钠溶液被用作外壳溶液,核心溶液(质量浓度 5 g/L HA 溶液)由等体积的 DEME/F12 培养基(无钙离子且 EDTA 含量低)和质量浓度 10 g/L HA 溶液混合而成。将二维培养的 A549 细胞置于离心机中,以 1500 r/min 的速度离心 5 min,在无菌超净台里用移液枪将细胞分 5 次移液至 HA 溶液中,并将细胞以 4×10^6 个/mL 的密度重悬于核心溶液中。将矿物油(1 mL)、水相 CaCl_2 溶液($100\ \mu\text{L}$)以及司班 80($6.50\ \mu\text{L}$)装入 5 mL 离心管,并使用涡旋混合器(2000 r/min, VM-T2 型,上海泰坦科技股份有限公司)振荡 40 s,以制备油乳液。

1.4 3D 微流控芯片的制作

3D 微流控芯片制作过程需在无尘环境下进行。该微流控芯片由一片玻璃载玻片作为基底,且以基于 PDMS 的微流控通道组成。3D 微流控芯片的制作过程如图 1 所示。首先,利用高精度 3D 打印机一体化制备具有 3D 微流控芯片微通道结构的光敏树脂母模(外轮廓长、宽、高分别为 46、19、7 mm,历时 2.5 h),并将其放入烘箱,于 $60\ ^\circ\text{C}$ 下烘烤 2 h,以完全去除模具内未固化残留液体。在 3D 打印制备过程中,为确保微结构的一致性与制备质量,主要控制以下关键指标:层厚、曝光时间及层间等待时间等。为了兼顾打印效率与结构精度,打印过程分为两阶段进行:第 1 阶段为粗打印,主要用于非微通道结构的快速成型,以提升整体的打印速度,此阶段的打印层厚设置为 $50\ \mu\text{m}$,曝光时间设置为 2.5 s,层间等待时间设置为 5 s;第 2 阶段为细打印,针对微通道区域,采用精细参数设置,以确保微通道结构的成型精度和一致性,此阶段的打印层厚设置为 $2\ \mu\text{m}$,曝光时间设置为 3 s,层间等待时间设置为 30 s。

随后,将 PDMS 预聚物与其固化剂以 10 : 1 的质量比进行混合,真空排气泡后将混合物倒入光敏树脂母模上,并在 $80\ ^\circ\text{C}$ 下固化 4 h。在 PDMS 固化完成后,利用镊子将固化的 PDMS 板取出。将 PDMS 板与玻璃载玻片置于等离子清洗机中,表面处理 1 min。等离子表面处理完成后,将 PDMS 板与玻璃

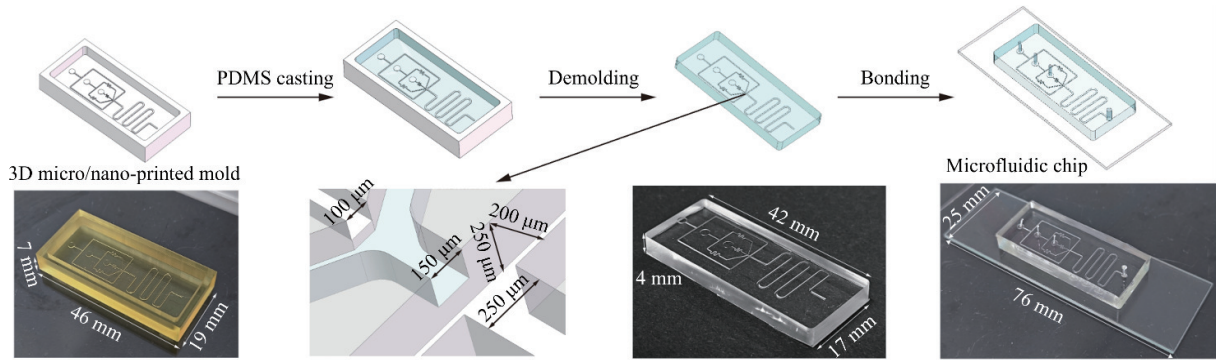


图 1 3D 微流控芯片制作流程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the fabrication process of 3D microfluidic chips

载玻片键合在一起, 封装成 3D 微流控芯片。最后, 将 3D 微流控芯片置于 80 °C 下加热 4 h, 确保玻璃载玻片和 PDMS 之间紧密键合, 提高微通道表面的疏水性^[29]。一个 3D 微流控芯片制作成本为 2.66 元, 制作时间不超过 12 h, 制备步骤操作方便。

1.5 微胶囊图像分析

将收集好的微胶囊置于日本尼康 Ci 型显微镜下, 以 10 倍物镜观察, 并使用相机 (ToupTek Photonic 公司, IUA20000KPA 型) 进行拍摄。利用物镜测微尺对相机软件 ToupView 进行定标, 再用软件对图像中胶囊的外径和内径尺寸进行测量, 并用 ToupView 对微胶囊尺寸进行统计分析。

1.6 微胶囊内细胞染色

在避光环境下, 用移液枪从培养瓶中取出 200 μL、含有微胶囊的培养基至玻璃基底的 96 孔板中, 再加入预先配制好的吖啶橙/碘化丙啶 (体积比 1 : 1) 工作液, 轻轻混匀。避光孵育 15 min 后, 将 96 孔板放入 Opera Phenix 高内涵细胞成像分析系统中观察。在

观察过程中, 活细胞的细胞核被吖啶橙染为绿色, 死细胞的细胞核则因膜破损而被碘化丙啶染为红色, 从而实现微胶囊内细胞存活率的评估。

2 结果与讨论

2.1 3D 微纳打印模具

为分析 3D 微纳打印制作的模具以及微流控芯片 PDMS 层的实际精度, 采用白光干涉扫描仪对 3D 微纳打印模具及 PDMS 层的流动聚焦结构进行扫描(图 2), 以评估其打印精度与平整度, 平整度采用 ISO 12781 平面度标准。

模具的流动聚焦结构底面平整度如图 2(a) 所示。由图中的颜色标尺可知, 该区域最高点与最低点之间的高度差为 4.65 μm, 该区域的颜色分布较为均匀, 表明其平面结构变化缓和。综上, 该 3D 微纳打印模具流动聚焦区域具有较高的表面平整度, 表面形貌整体均匀。

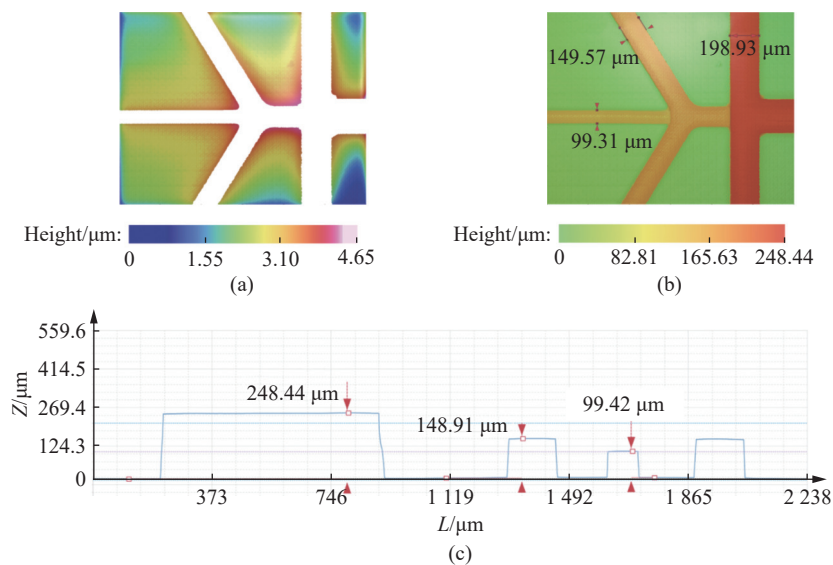


图 2 3D 微纳打印模具内流动聚焦区域平整度 (a)、微通道宽度 (b) 和高度 (c) 检测结果

Fig. 2 Flatness of the flow-focusing region (a), measurement results of microchannel width (b) and height (c) in the 3D micro-nano printed mold

模具的流动聚焦结构处的三相通道扫描结果如图 2(b)、2(c) 所示(其中, L 表示测量轨迹长度), 第 1 个高度峰值(Z)对应油乳液通道, 该通道设计尺寸为 $200\ \mu\text{m}\times 250\ \mu\text{m}$, 实测尺寸为 $198.93\ \mu\text{m}\times 248.44\ \mu\text{m}$; 第 2 个高度峰值对应外壳溶液通道, 其设计尺寸为 $150\ \mu\text{m}\times 150\ \mu\text{m}$, 实测尺寸为 $149.57\ \mu\text{m}\times 148.91\ \mu\text{m}$; 第 3 个高度峰值对应核心溶液通道, 该通道的设计尺寸为 $100\ \mu\text{m}\times 100\ \mu\text{m}$, 实测尺寸为 $99.31\ \mu\text{m}\times 99.42\ \mu\text{m}$ 。根据上述测量数据分析, 该 3D 微纳打印模具在微通道结构上的误差均在 $2\ \mu\text{m}$ 以内, 此精度能够与传统光刻工艺制备的微通道模具相媲美, 甚至更优。

PDMS 层的流动聚焦结构底面平整度如图 3(a) 所示。根据图中的颜色标尺可知, 该区域最高点与

最低点之间的高度差为 $4.81\ \mu\text{m}$, 其颜色分布表明该区域平面结构同样变化缓和。综上, 采用 3D 微纳打印模具制作的 PDMS 微流控芯片平整度能够满足实验需求。由 PDMS 层的流动聚焦结构处的三相通道扫描结果(图 3(b)、3(c))可见, 第 1 个高度峰值对应油乳液通道, 该通道设计尺寸为 $200\ \mu\text{m}\times 250\ \mu\text{m}$, 实测尺寸为 $200.14\ \mu\text{m}\times 251.77\ \mu\text{m}$; 第 2 个高度峰值对应外壳溶液通道, 其设计尺寸为 $150\ \mu\text{m}\times 150\ \mu\text{m}$, 实测尺寸为 $150.56\ \mu\text{m}\times 150.27\ \mu\text{m}$; 第 3 个高度峰值对应核心溶液通道, 该通道的设计尺寸为 $100\ \mu\text{m}\times 100\ \mu\text{m}$, 实测尺寸为 $100.58\ \mu\text{m}\times 100.94\ \mu\text{m}$ 。根据上述测量数据分析, 该 PDMS 板在微通道结构上的误差均在 $2\ \mu\text{m}$ 以内, 此精度能够满足微胶囊生成需求。

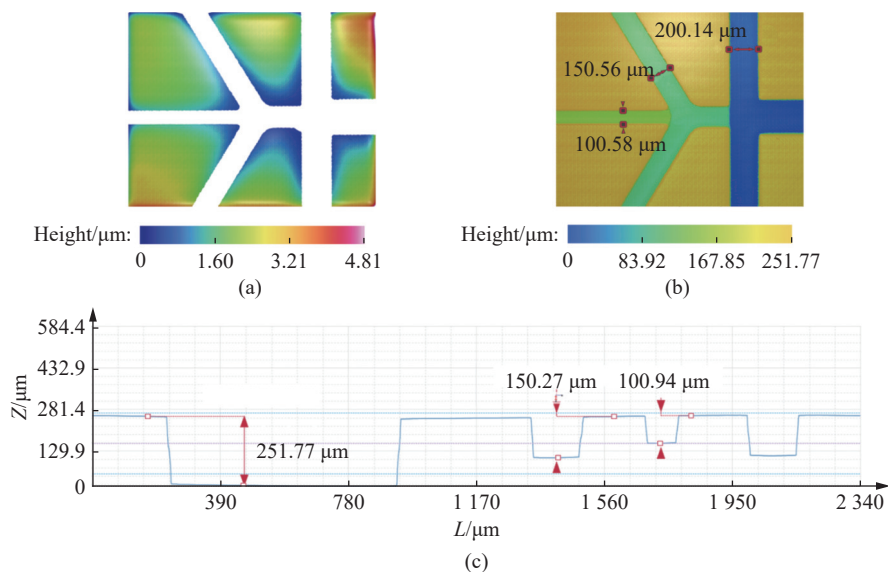


图 3 PDMS 片流动聚焦区域平整度 (a)、微通道宽度 (b) 和高度 (c) 检测结果

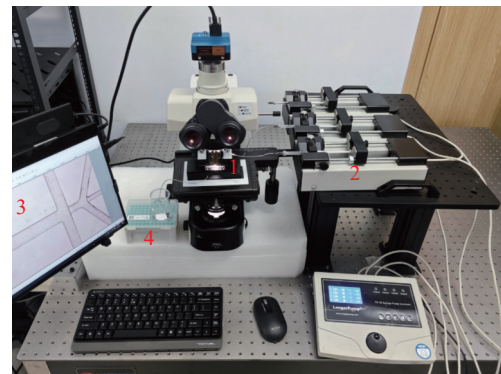
Fig. 3 Flatness of the flow-focusing region (a), measurement results of microchannel width (b) and height (c) in the PDMS plate

2.2 基于 3D 微流控的微胶囊制备

为实现微胶囊高通量生产, 自主搭建一套微胶囊生成系统, 如图 4 所示, 该系统由 4 个核心模块组成, 分别为微流控模块、溶液驱动模块、显微成像模块以及微胶囊收集模块。

微流控模块由微流控芯片与芯片夹具组成。为了固定微流控芯片, 芯片夹具采用双层结构设计, 其中、下层用于承载微流控芯片并提供限位功能, 以防止芯片发生水平方向的偏移, 上层则对微流控芯片施加垂直压力, 使其固定于下层夹具中, 从而保证芯片在实验过程中保持稳定。用于制备核壳微胶囊的微流控芯片通常由两块相同的 PDMS 板拼接而成, 而本文采用的微流控芯片由玻璃载玻片基层与 PDMS 层键合而成。相较而言, 该设计具有低成本、易加工、稳定性高及可清洗重复使用等优势, 提高了微胶囊制备的可操作性。

微流控芯片示意图见图 5(a), 微流控通道位于 PDMS 层, 其中油乳液输入通道的横截面尺寸为



1—Microfluidic module; 2—Solution driving module; 3—Microscopic imaging module; 4—Microcapsule collection module

图 4 高通量微胶囊生成系统

Fig. 4 High-throughput generation system of microcapsule

200 μm ×250 μm , 海藻酸钠溶液输入通道的横截面尺寸为 150 μm ×150 μm , 核心溶液输入通道的横截面尺寸为 100 μm ×100 μm 。为优化流体稳定性, 在海藻酸钠溶液和核心溶液输入通道中设计了一段小型蛇形通道^[30], 其主要作用包括: 一方面, 有效防止油乳液倒灌至海藻酸钠溶液和核心溶液输入通道; 另一方面, 可缓解注射泵运行过程中可能产生的流速波动, 从而降低其对微胶囊生成过程的影响。由于微胶囊的尺寸主要受通道结构尺寸决定, 而油乳液流速波动对微胶囊尺寸的影响可忽略不计, 因此, 油乳液输入通道未加入蛇形通道。

本文采用流动聚焦结构^[31]微流控通道生成微液

滴, 该结构生成的微液滴体积大小更稳定且生产速率更易于控制。如图 5(b)、5(c) 所示, 在微流控芯片中, 两侧对称通道的含钙离子油乳液和中间通道的分散相流体(海藻酸钠溶液和核心溶液)聚焦到主流道中(大型蛇形通道前端处), 由于 Plateau-Rayleigh 不稳定性^[32], 含钙离子油乳液在流动聚焦结构处挤压分散相流体, 使其周期性断裂成大小均一的微液滴。单个微液滴内部呈核壳结构, 海藻酸钠溶液位于外层, 核心溶液位于内层。微胶囊示意图见图 5(d) 所示, 当海藻酸钠溶液与油乳液中的钙离子接触后, 会迅速发生离子交联反应, 形成海藻酸钙水凝胶, 从而形成具有稳定核壳结构的微胶囊。

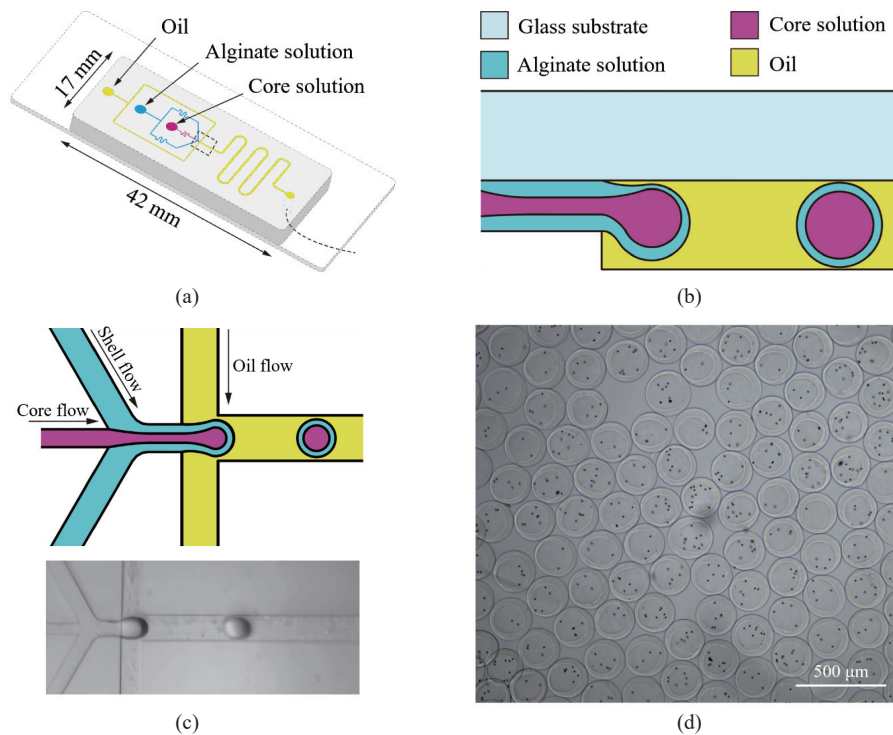


图 5 微流控芯片 (a)、液滴生成截面 (b)、液滴生成表面 (c) 及微胶囊 (d) 示意图

Fig. 5 Schematic diagram of the microfluidic chip (a), droplet generation cross-section (b), droplet generation (c) and microcapsules (d)

现有研究中, 用于微胶囊生成的微流控芯片通常采用从芯片上方接入输入管道和输出管道的设计, 而本文将微流控芯片倒置在芯片夹具中, 并从芯片的下方接入输入输出管道。如图 5(b) 所示, 此设计目的是在微胶囊外壳固化之前, 利用重力作用使核心溶液自然迁移至微胶囊正中心, 从而确保核壳结构的均一性, 避免出现海藻酸钙外壳厚度不均一的问题。倒置方式还有利于微胶囊能更加顺利地出口处进入输出管中, 降低输送管堵塞风险, 提高微胶囊生产的稳定性与可控性。

为了精确控制各溶液流速比, 溶液驱动模块采用高精度注射泵, 能够按照预定顺序将各类溶液以

预定的速度精确注入微流控芯片。为了对微胶囊生成过程进行实时监测, 显微成像模块由计算机与显微镜相机协同构成。显微镜相机可实时采集微胶囊生成过程中的图像, 并将图像数据传输至计算机, 以便于对微胶囊生成过程进行观察与分析。为了保证实验过程中细胞活性, 微胶囊收集模块采用装有 30 mL DEME/F12 培养基的 50 mL 烧杯收集微胶囊, 通过特氟龙管将微流控芯片的输出口与烧杯连接。微液滴在大型蛇形通道以及特氟龙管内流动的时间足以使海藻酸钠溶液与钙离子完成凝胶化反应, 形成稳定的海藻酸钙微胶囊, 并最终进入烧杯里的培养基中。

在高通量微胶囊生成系统搭建完毕后,即可进行微胶囊生成实验,实验中核心溶液流速分别为 40、60、80、100、120 $\mu\text{L}/\text{h}$,核壳流速为 120 $\mu\text{L}/\text{h}$,油液流速为 1500 $\mu\text{L}/\text{h}$ 。实验在冰上收集微胶囊,收集 30 min 后微胶囊自然沉降到烧杯底部。随后,用移液器吸去含油的上清液,并用细胞过滤器将微胶囊从收集液中分离出来,之后用培养基 DMEM/F12 冲洗,以去除任何残留的矿物油乳液。最后,将微胶囊转移至培养瓶中进行观察。整个实验需在无菌、无尘、常温的环境下进行。

2.3 微胶囊表征数据分析

通过此微胶囊生成系统收集到的微胶囊,呈现出较为集中的内外径分布和优异的尺寸均一性,可由其变异系数(Coefficient of Variation, CV)验证上述结论, CV 的公式如下:

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \times 100\% \quad (1)$$

其中, σ 表示标准差, μ 表示平均值。

不同核心溶液流速生成的微胶囊如图 6(a) 所示,随着核心溶液流速的减小,微胶囊内径呈现相应减小的趋势,而外径变化很小。进一步对不同核心溶液流速条件下微胶囊的内外径数据进行统计分析,结果如图 6(b) 所示,可见微胶囊外径稳定分布在 220~250 μm 之间,且内径尺寸与核心溶液流速呈现正线性相关关系。实验数据表明,微胶囊外径尺寸

主要取决于微通道结构尺寸,而核心尺寸可通过调控核心溶液流速进行调节。

为了评估此系统的微胶囊生成质量,对 5 种核心溶液流速(40、60、80、100、120 $\mu\text{L}/\text{h}$)生成的微胶囊内径和外径的分布数据进行统计分析,统计结果如图 7 所示。核心溶液流速为 120 $\mu\text{L}/\text{h}$ 生成的微胶囊的外径均值为 234.96 μm , 变异系数为 1.79%, 内径均值为 184.67 μm , 相应变异系数为 1.79%; 核心溶液流速为 100 $\mu\text{L}/\text{h}$ 生成的微胶囊的外径均值为 238.91 μm , 变异系数为 1.88%, 内径均值为 175.53 μm , 相应变异系数为 1.32%; 核心溶液流速为 80 $\mu\text{L}/\text{h}$ 生成的微胶囊的外径均值为 230.88 μm , 变异系数为 2.15%, 内径均值为 165.72 μm , 相应变异系数为 1.51%; 核心溶液流速为 60 $\mu\text{L}/\text{h}$ 生成的微胶囊的外径均值为 238.53 μm , 变异系数为 2.32%, 内径均值为 155.52 μm , 相应变异系数为 1.28%; 核心溶液流速为 40 $\mu\text{L}/\text{h}$ 生成的微胶囊的外径均值为 227.29 μm , 变异系数为 2.23%, 内径均值为 144.61 μm , 相应变异系数为 1.68%。在 5 种不同核心溶液流速下制备的微胶囊表征数据中,其外径尺寸的最大变异系数为 2.32%, 内径尺寸的最大变异系数为 1.79%, 相比已有研究^[26,33]中外径尺寸的变异系数通常为 3.88%~5.17%, 内径尺寸的变异系数通常为 7.69%~10.23%, 本文所构建系统生成的微胶囊在内外径尺寸方面表现出更高的一致性, 体现出优异的均一性。此外,该系统在 1 min 生成的微胶囊

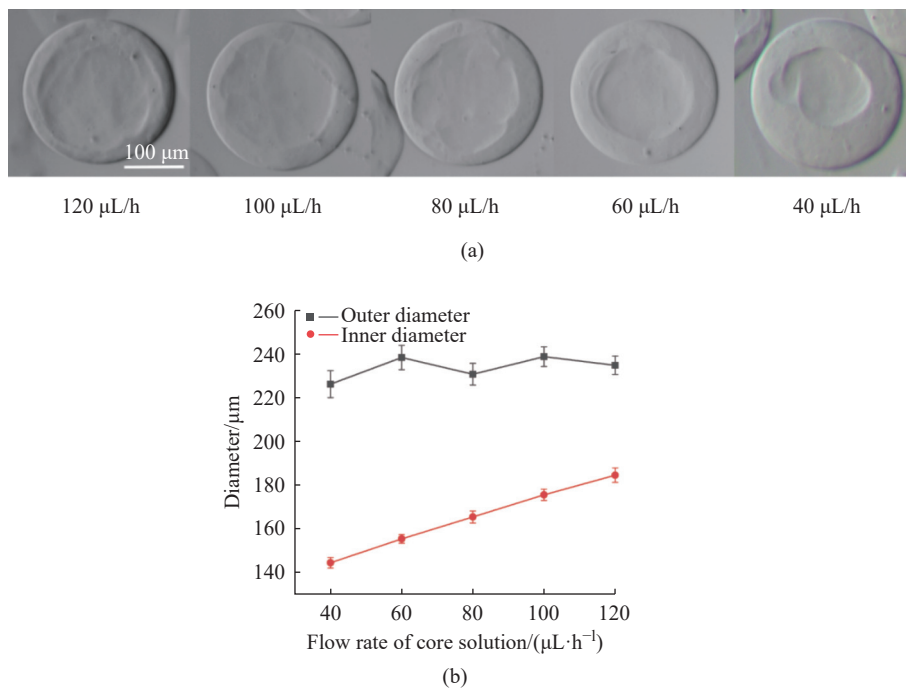


图 6 不同核心溶液流速生成的微胶囊 (a) 及其内/外径统计图 (b)

Fig. 6 Microcapsules generated with different core solution flow rates(a) and statistical distribution of inner/outer diameters(b)

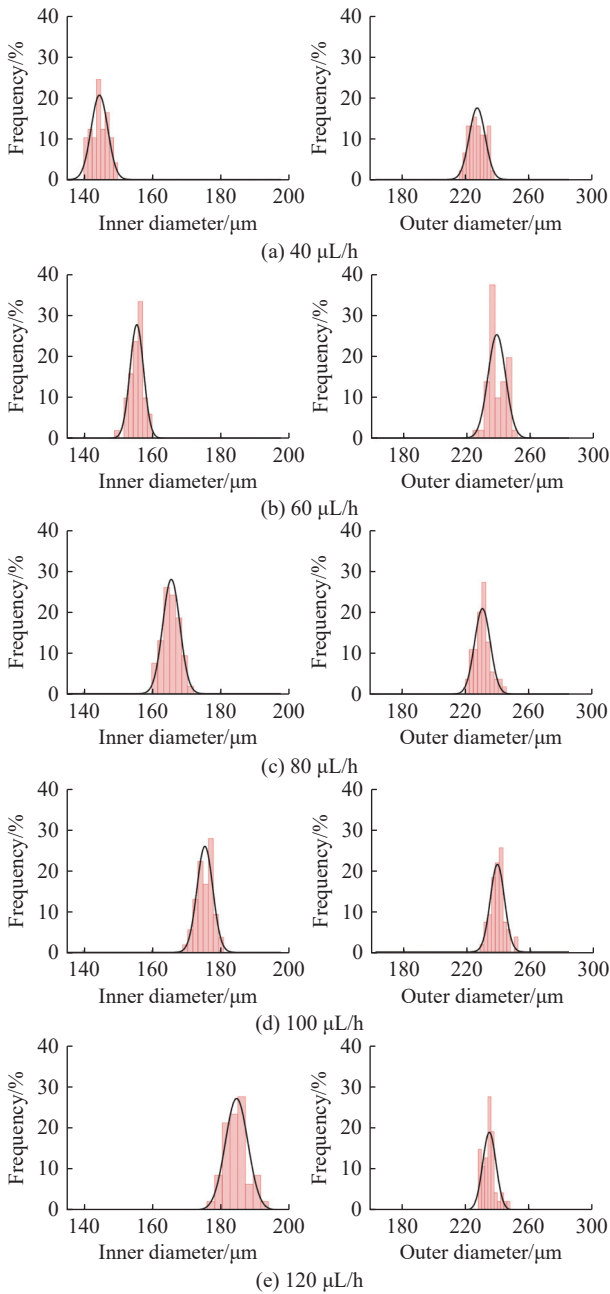


图 7 核心溶液流速为 40 $\mu\text{L/h}$ (a)、60 $\mu\text{L/h}$ (b)、80 $\mu\text{L/h}$ (c)、100 $\mu\text{L/h}$ (d) 和 120 $\mu\text{L/h}$ (e) 的微胶囊内径(左)和外径(右)的统计分布

Fig. 7 Statistical distributions of inner diameter (left) and outer diameter (right) of microcapsules with core solution flow rates of 40 $\mu\text{L/h}$ (a), 60 $\mu\text{L/h}$ (b), 80 $\mu\text{L/h}$ (c), 100 $\mu\text{L/h}$ (d), and 120 $\mu\text{L/h}$ (e)

数量约为 120 个, 可视为高通量生产。

2.4 微胶囊 3D 细胞培养

A549 细胞是一种来源于人肺腺癌的上皮细胞系, 广泛用于肺部疾病、肺癌、药物筛选和毒理学研究。通过微胶囊培养 A549 细胞, 可构建类似体内 3D 培养环境, 更真实地模拟肺癌微环境, 有助于深入研究 A549 细胞在 3D 结构中的增殖、迁移和凋亡等生物学行为。文献 [33] 研究生成的微胶囊外径分布

约为 240 μm , 氧气和营养物质在高度细胞化的组织中的最大扩散距离为 200 μm , 所以生成的微胶囊大小允许所封装的细胞在其中存活、增殖和分化。核心部分体积可使细胞在其中释放分泌物, 以调节适合自身存活和增殖成 3D 球体的微环境。在实验中, 将 A549 细胞以 4×10^6 个/mL 的密度重悬于核心溶液, 按照上述方法, 在常温下通过高精度注射泵以 100 $\mu\text{L/h}$ 的流速输入微流控芯片, 制备微胶囊。为了保证细胞活性, 将微胶囊收集模块置于冰上, 收集完成后, 用 70 μm 的细胞过滤器从收集液中过滤出微胶囊, 并用培养基 DMEM/F12 冲洗 5 次。随后, 将微胶囊转移至含无血清 DMEM/F12 培养瓶中, 并置于 37 $^\circ\text{C}$ 、 $\varphi=5\%$ CO_2 的培养箱中培养, 每隔 1 d 更换一次培养基。换液时, 将培养瓶斜着立起来静置 1 min, 等胶囊沉降到底部后将一半的培养基吸出, 再将新鲜的培养基加入培养瓶中至原有体积, 以维持足够的营养供应。

本文采用细胞活性荧光图像及微胶囊内细胞的明场图像, 对所构建的高通量微胶囊制备系统及其生成微胶囊的生物相容性进行评估。微胶囊内 A549 细胞活性如图 8 所示(其中, 绿色荧光图像代表活细胞, 红色荧光图像代表死细胞), 新生成微胶囊内的细胞以及在微胶囊内培养 7 d 后的细胞, 均表现出较高的存活率, 这表明本文所研制的微胶囊高通量制备系统及其后续提取过程具有良好的生物相容性。

在培养过程中微胶囊处于悬浮状态, 且在成像与培养之间需要反复转移培养瓶, 导致在同一位置连续多日跟踪同一颗微胶囊具有一定挑战性。因此, 本文选取了具有代表性的、显示细胞增殖过程的图像作为实验结果进行分析, 如图 9 所示。新生成微

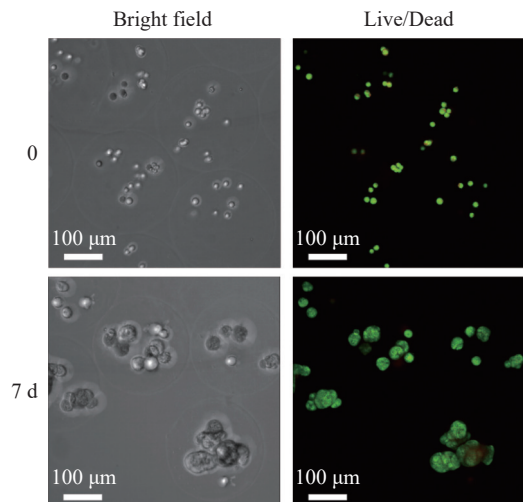


图 8 微胶囊内 A549 细胞明场以及荧光成像

Fig. 8 Bright field and fluorescence imaging of A549 cells in microcapsules

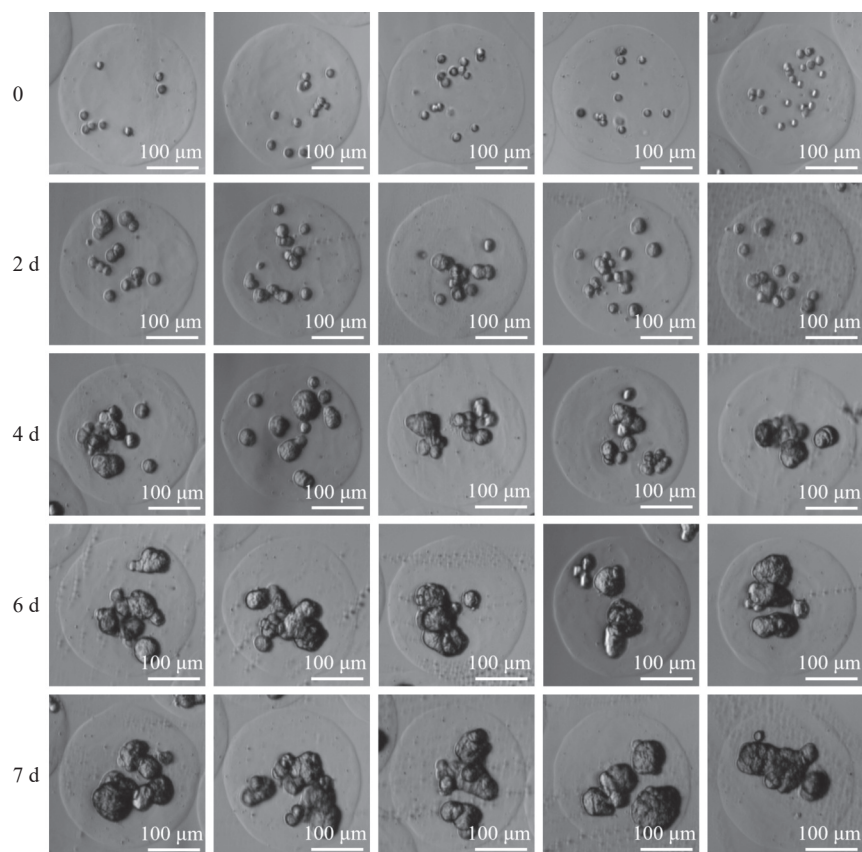


图 9 A549 细胞培养对比图

Fig. 9 Comparative images of A549 cells culture

胶囊内的 A549 细胞随机分布于微胶囊核心部分, 每个微胶囊包裹约 10 个 A549 细胞。在连续培养 7 d 后, 微胶囊的整体形貌和尺寸保持稳定, 而其核心区域的 A549 细胞呈现出明显的增殖和聚集趋势, 最终形成致密的细胞球体。上述结果表明, 本文构建的微胶囊系统不仅可实现 3D 细胞培养, 还具备良好的生物相容性, 具备进一步应用于肿瘤模型构建和药物筛选的潜力。

3 结束语

本文通过 3D 微纳打印, 实现高精度 PDMS 模具的制作, 研制了一种高精度 3D 微流控芯片, 并用于水凝胶微胶囊的高通量制备。白光干涉扫描仪表征结果显示, 所制作模具中关键流动聚焦结构的平面最大高度差为 $4.65 \mu\text{m}$, 微流控通道尺寸误差均在 $2 \mu\text{m}$ 以内。模具翻模所得 PDMS 单元的流动聚焦结构的平面最大高度差为 $4.81 \mu\text{m}$, 微流控通道尺寸误差均在 $2 \mu\text{m}$ 以内, 并能较好地与玻璃键合。所得 3D 微流控芯片通过自主搭建的微胶囊生成系统实现约 120 个/min 的微胶囊制备速度。所生成微胶囊的内径与外径尺寸分布具有高均一性 ($\text{CV} < 3\%$)。在

对各通道流速的实验测试中, 验证了微胶囊内径与核心溶液流速呈正线性相关关系, 为制备不同核心尺寸的微胶囊提供依据。

以 A549 细胞悬液作为核心溶液用于微胶囊制作, 实现细胞装载微胶囊的制备。细胞培养实验结果表明, 所制备微胶囊中的 A549 细胞具有明显增殖和聚集趋势, 证明所生成的微胶囊具有良好的生物相容性。

3D 微纳打印的高精度能够用于面向微胶囊生成的 3D 微流控芯片制作, 并具有操作简单、成本低和制作时间短等优势, 此芯片结构的制作复杂性、操作性及可重复性皆优于同轴毛细管组装结构与双层 PDMS 结构。未来, 它有望广泛用于包括规模化的微胶囊 3D 细胞培养、在线微胶囊质量控制以及微胶囊载药治疗等技术, 为相关研究和应用提供高效、低成本和高精度的制造工具。

参考文献:

- [1] IVANOVSKA J, ZEHNDER T, LENNERT P, *et al.* Biofabrication of 3D alginate-based hydrogel for cancer research: Comparison of cell spreading, viability, and adhesion characteristics of colorectal HCT116 tumor

- cells[J]. *Tissue Engineering: Part C. Methods*, 2016, 22(7): 708-715.
- [2] HE J, ZHANG X, XIA X, *et al.* Organoid technology for tissue engineering[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2020, 12(8): 569-579.
- [3] LOU J, STOWERS R, NAM S, *et al.* Stress relaxing hyaluronic acid-collagen hydrogels promote cell spreading, fiber remodeling, and focal adhesion formation in 3D cell culture[J]. *Biomaterials*, 2018, 154: 213-222.
- [4] FRITSCHEN A, BELL A K, KÖNIGSTEIN I, *et al.* Investigation and comparison of resin materials in transparent DLP-printing for application in cell culture and organs-on a-chip[J]. *Biomaterials Science*, 2022, 10(8): 1981-1994.
- [5] ZITZMANN F D, SCHMIDT S, FRANK R, *et al.* Microcavity well-plate for automated parallel bioelectronic analysis of 3D cell cultures[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2024, 250: 116042.
- [6] WANG H, BROWN P C, CHOW E C Y, *et al.* 3D Cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration[J]. *Clinical and Translational Science*, 2021, 14(5): 1659-1680.
- [7] BARRON C, HE J Q. Alginate-based microcapsules generated with the coaxial electrospray method for clinical application[J]. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2017, 28(13): 1245-1255.
- [8] XU X, GURSKI L A, ZHANG C, *et al.* Recreating the tumor microenvironment in a bilayer, hyaluronic acid hydrogel construct for the growth of prostate cancer spheroids[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(35): 9049-9060.
- [9] 王太兵, 李颖, 贾卓翰, 等. 白蛋白/透明质酸钠纳米颗粒制备及递送顺铂效果 [J]. *功能高分子学报*, 2022, 35(1): 61-67.
- [10] ELENJORD R, ALLEN J B, JOHANSEN H T, *et al.* Collagen I regulates matrix metalloproteinase-2 activation in osteosarcoma cells independent of S100A4[J]. *The FEBS Journal*, 2009, 276(18): 5275-5286.
- [11] CELIK Y, ALPTEKIN K, DEMIRDEN S F, *et al.* A novel low shear horizontal bioreactor design for the production of animal cells: Effect of bioreactor dynamics on the 3D spheroid formation of HepG2[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2023, 196: 108952.
- [12] 张建文, 刘禹, 夏建业, 等. 机械搅拌生物反应器的CFD模拟及剪切力对红花细胞悬浮培养的影响 [J]. *华东理工大学学报 (自然科学版)*, 2016, 42(4): 492-498.
- [13] SEYFOORI A, ASKARI E, RAZZAGHI M, *et al.* High-density culturing of the dermal fibroblast cells on hydrogel-based soft microcarriers for cell therapy application[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 494: 152784.
- [14] YAMANAKA S. Pluripotent stem cell-based cell therapy: Promise and challenges[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(4): 523-531.
- [15] BIEBACK K, FERNANDEZ-MUÑOZ B, PATI S, *et al.* Gaps in the knowledge of human platelet lysate as a cell culture supplement for cell therapy: A joint publication from the AABB and the international society for cell & gene therapy[J]. *Cytotherapy*, 2019, 21(9): 911-924.
- [16] WU X, SU J, WEI J, *et al.* Recent advances in three-dimensional stem cell culture systems and applications[J]. *Stem Cells International*, 2021, 2021: 1-13.
- [17] LADEIRA B M, CUSTÓDIO C A, MANO J F. Core-shell microcapsules: Biofabrication and potential applications in tissue engineering and regenerative medicine[J]. *Biomaterials Science*, 2022, 10(9): 2122-2153.
- [18] FENTON O S, OLAFSON K N, PILLAI P S, *et al.* Advances in biomaterials for drug delivery[J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(29): 1705328.
- [19] GOMES M C, COSTA D C S, OLIVEIRA C S, *et al.* Design of protein-based liquefied cell-laden capsules with bioinspired adhesion for tissue engineering[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2021, 10(19): 2100782.
- [20] HE T, JOKERST J V. Structured micro/nano materials synthesized via electrospray: A review[J]. *Biomaterials Science*, 2020, 8(20): 5555-5573.
- [21] OLIVEIRA M B, HATAMI J, MANO J F. Coating strategies using layer-by-layer deposition for cell encapsulation[J]. *Chemistry: An Asian Journal*, 2016, 11(12): 1753-1764.
- [22] LI W, ZHANG L, GE X, *et al.* Microfluidic fabrication of microparticles for biomedical applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(15): 5646-5683.
- [23] 邱阳, 陈建琦, 徐银香, 等. 复杂结构核-壳微颗粒的微流控制备方法 [J]. *华东理工大学学报 (自然科学版)*, 2015, 41(1): 103-110.
- [24] 刘炳祥, 吴婷, 王振平, 等. 液滴微流控芯片合成单分散PEG水凝胶微球及其粒径调控 [J]. *华东理工大学学报 (自然科学版)*, 2014, 40(2): 182-185.
- [25] SUN H, ZHENG H, TANG Q, *et al.* Monodisperse alginate microcapsules with spatially confined bioactive molecules via microfluid-generated W/W/O emulsions[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(40): 37313-37321.
- [26] XU J, SHAMUL J G, STATEN N A, *et al.* Bioinspired 3D culture in nanoliter hyaluronic acid-rich core-shell hydrogel microcapsules isolates highly pluripotent human iPSCs[J]. *Small*, 2021, 17(33): 2102219.
- [27] KIM C, CHUNG S, KIM Y E, *et al.* Generation of core-shell microcapsules with three-dimensional focusing device for efficient formation of cell spheroid[J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(2): 246-252.

- [28] AGARWAL P, ZHAO S, BIELECKI P, *et al.* One-step microfluidic generation of pre-hatching embryo-like core-shell microcapsules for miniaturized 3D culture of pluripotent stem cells[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(23): 4525-4533.
- [29] LI Y, YAO H, CHEN S, *et al.* Effect of tryptophan metabolites on cell damage revealed by bacteria-cell interactions in hydrogel microspheres[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(2): 2c04355.
- [30] HOU Y, ZHENG Y, ZHENG X, *et al.* Multidimensional controllable fabrication of tumor spheroids based on a microfluidic device[J]. *Lab on a Chip*, 2023, 23(11): 2654-2663.
- [31] MORAGUES T, ARGUIJO D, BENEYTON T, *et al.* Droplet-based microfluidics[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2023, 3(1): 32-53.
- [32] LI Y, SHI Z, XU B, *et al.* Bioinspired plateau-rayleigh instability on fibers: From droplets manipulation to continuous liquid films[J]. *Advanced Functional Materials*, 2024, 34(32): 2316017.
- [33] AGARWAL P, WANG H, SUN M, *et al.* Microfluidics enabled bottom-up engineering of 3D vascularized tumor for drug discovery[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(7): 6691-6702.

A 3D Microfluidic-Based Hydrogel Microcapsule Fabrication System

JIN Cong¹, ZHAO Xusheng², GUO Jiahao¹, OUYANG Liming², JIANG Guojun¹, GU Zhen¹, WANG Huifeng¹

(1. School of Information Science and Engineering; 2. School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: To meet the demand for hydrogel microcapsule fabrication, this study aimed to develop a high-throughput system based on a 3D microfluidic chip for producing core-shell microcapsules. The system uses 3D micro-/nano- printing technology, which offers fast prototyping, low cost, and high precision. This method enables precise control over the structure of the microcapsules. The system includes a droplet microfluidic chip with 3D microstructures, which are fabricated using a dual-layer sheath flow strategy to generate the microcapsules. Experimental results show that the flow-focusing region on the inner bottom surface of the 3D micro-/nano-printed mold has a flatness of 4.65 μm , and the dimensional errors in the three-phase channels are always less than 2 μm . Similarly, the PDMS plate holding the microchannels shows a flatness of 4.81 μm . The channel dimensional errors in the PDMS plate are also within 2 μm . These results indicate that both the mold and the PDMS plate possess high flatness and accuracy, meeting the technical requirements for making microcapsules. Microcapsules with different inner diameters were prepared by changing the flow rate of the core solution (40, 60, 80, 100, 120 $\mu\text{L/h}$), while the outer diameter remained nearly constant. The microcapsules produced by the system have a very low coefficient of variation ($\text{CV}<3\%$) for both outer and inner diameters, showing that the capsules are very uniform in size. Finally, cell culture tests were done to evaluate the biocompatibility and functionality of the microcapsules. A549 cells showed clear growth and clustering after two days of culture inside the microcapsules, confirming that the microcapsules from this system support cell growth well. These results suggest that the system has great potential for large-scale applications in biomedical fields.

Key words: micro-nano fabrication; 3D microfluidic chip; droplet microfluidics; microcapsule; 3D cell culture

(责任编辑: 李娟)