



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Medical Engineering—Article

基于液滴微流控的分级结构反蛋白石多孔支架用于仿生三维细胞共培养

邵长敏^{a,b,c}, 刘羽霄^d, 池俊杰^d, 叶方富^{b,c,e,*}, 赵远锦^{a,b,d,*}

^a Department of Rheumatology and Immunology, Institute of Translational Medicine, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China

^b Oujiang Laboratory (Zhejiang Lab for Regenerative Medicine, Vision and Brain Health), Wenzhou 325038, China

^c Wenzhou Institute, University of Chinese Academy of Sciences, Wenzhou 325016, China

^d State Key Laboratory of Bioelectronics, School of Biological Science and Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China

^e Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 November 2019

Revised 9 March 2020

Accepted 8 June 2020

Available online 6 November 2021

关键词

微流控
反蛋白石
细胞培养
液滴
生物材料

摘要

三维(3D)细胞培养具有更好地模拟天然组织特异性的优势,在药物开发、毒性测试和组织工程中发挥着重要作用。然而,现有的3D细胞培养的支架或微载体通常尺寸有限,并且在模拟生物体内血管复合体方面表现不佳。因此,本研究提出了一种通过简单的微流控方法制备的新型分级结构反蛋白石多孔支架,用于促进3D细胞共培养。该支架是基于微流控乳液液滴模板和惰性聚合物聚合的复合概念构建的。研究表明,该支架能够保证细胞培养过程中的营养供给,从而实现大面积的细胞培养。此外,通过在该支架中连续种植不同的细胞,本文还开发了内皮细胞包裹肝细胞的3D细胞共培养系统,用于构建功能化组织。研究表明,该支架用于细胞共培养系统,有助于维持肝细胞特定的体内功能。该分级结构反蛋白石多孔支架为3D细胞培养甚至仿生组织的构建奠定了基础。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

三维(3D)细胞培养能够在培养过程中为细胞提供更接近体内生存条件的微环境[1–5]。同时,3D培养中的细胞可以通过紧密连接或间隙连接在细胞之间以及细胞与细胞外基质之间建立连接,形成类似于体内细胞生长的3D结构[6–9]。因此,3D细胞培养不仅可以保留体内细胞微环境的物质结构基础,还可以体现细胞培养的直观性和条件可控性。这些优势促使3D细胞培养快速发展,并在各个领域(如组织工程、生物制药加工、毒性测试等)中广泛应用[10–16]。目前,3D细胞培养的最大局限在于:

由于培养面积过大造成的营养供应不足,内部细胞在堆积过程中容易发生坏死。而由于丰富的微血管和微循环,这种坏死情况在体内是不会发生的。受这种现象的启发,诸多多孔材料或微通道已被构建用于3D细胞培养[17–22]。然而,由于缺乏有效的营养运输通道,大多数多孔材料通常尺寸太小,无法防止细胞坏死[23–25]。此外,传统的多孔材料无法有效模拟生物体内血管复合物的3D结构。因此,开发具有更复杂结构的新型多孔材料以实现3D细胞培养仍然值得期待。

本研究提出了一种通过液滴微流控方法制备的新型分级结构反蛋白石多孔支架(图1)。反蛋白石支架由于具

* Corresponding authors.

E-mail addresses: fye@iphy.ac.cn (F. Ye), yjzhao@seu.edu.cn (Y. Zhao).

有可控制的孔隙大小和从模板中继承的均匀孔隙而备受关注，其中模板中的孔隙是由密堆积的单分散微球或液滴晶格组成的[26–29]。同时，由于出色的流体控制能力，微流控技术能够为不同的应用，如微球模板或反蛋白石支架的液滴晶格制备高度单分散的乳剂[30–36]。基于3D结构特征，反蛋白石支架已广泛应用于光学材料、生物传感器、细胞支架等的构建[37–39]。然而，由于孔隙填充结构简单，且支架成分单一，目前使用反蛋白石支架进行3D血管化的研究仍然很少。

因此，通过乳液液滴模板和惰性聚合物聚合的复合概念，本研究构建了一种分级结构反蛋白石多孔支架，实现了3D血管的整合。在本文中，我们证明了所制备的支架在细胞培养过程中能够保证充足的营养供应，从而实现细胞的大面积培养。此外，通过在该支架中连续种植不同的细胞，本文还建立了内皮细胞包裹肝细胞的3D共培养系统，用于构建特定的功能组织。这种共培养系统能够促进较高水平的白蛋白和细胞色素P450（CYP450）的分泌，表明该支架中的共培养系统有助于维持肝细胞的活性和功能。这些特性使该分级结构反蛋白石多孔支架可作为理想的仿生支架用于组织工程和其他生物学研究。

2. 材料和方法

2.1. 材料

甲基丙烯酸酐化明胶（GelMA）由本实验室自行合成[40]。明胶（猪皮）、甲基丙烯酸酐、聚环氧乙烷（PEO，平均分子量为900 000）、光引发剂2-羟基-2-甲基丙酮（HMPP）、疏水剂十八烷基三氯硅烷（OTS）、聚

（乙二醇）嵌段-聚（丙二醇）嵌段-聚（乙二醇）（F108）和十二烷基硫酸钠（SDS）均从美国Sigma-Aldrich公司获得。去离子水来自于Milli-Q纯水机，其他试剂均为分析级。

2.2. 分级结构反蛋白石支架的制备

通过乳液模板牺牲法制备分级结构反蛋白石支架。简单地说，将内相管和外相管在一个方管中进行组装，得到微流控装置。其中，内相管是一个由微电极拉制器（P-97, Sutter, USA）制备的尖端直径为80 μm 的玻璃毛细管，并用OTS进行疏水处理。该微流控装置在组装后用AB胶加固密封。内相为甲基硅油，外相为GelMA/PEO溶液。内相和外相的典型流速分别为0.4 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 和2 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 。实验前将GelMA（质量分数为20%）和PEO（质量分数为1.5%）水溶液以4:1的体积比混合，制备外相溶液。同时，在外相溶液中加入SDS（2%，表面活性剂）、F108（2%，表面活性剂）和HMPP（1%，光引发剂）。然后通过微蠕动泵（Harvard PHD 2000, Harvard Apparatus, USA）将相应的液体引入装置中，甲基硅油在内相管的出口被GelMA/PEO水溶液剪切成液滴。液滴自组装成六方密堆积结构后，外相溶液在紫外线下聚合。利用正己烷和乙醇进行至少5次超声去除油滴，最终得到第一级结构的反蛋白石GelMA/PEO支架。之后，将制备的GelMA/PEO支架浸泡在磷酸盐缓冲溶液（PBS）中至少48 h，从光交联的GelMA水凝胶中去除PEO相。为了观察PEO在水凝胶中的渗出，将PEO分子与异硫氰酸荧光素（FITC）分子偶联，进行PEO浸出试验。简而言之，将FITC（10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）与1.5% PEO溶液的混合溶液透析一周后冻干。按照上述

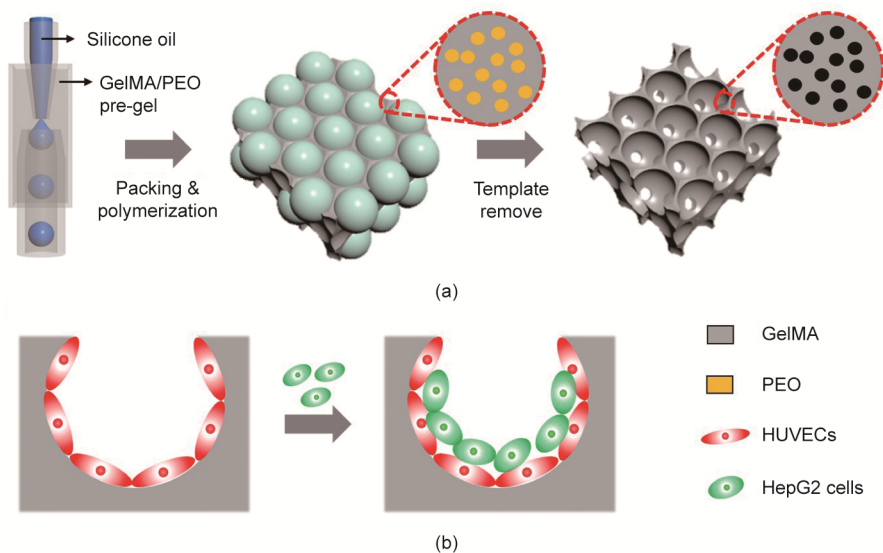


图1. (a) 分级结构反蛋白石多孔支架的制备示意图；(b) 3D细胞共培养示意图。

方法得到聚合的 GelMA/PEO 水凝胶，然后放入 PBS 中。使用酶标仪 (Synergy HT, BioTek, USA) 测定水凝胶中释放的 PEO 的吸光度。最后，PEO 从支架中渗出后生成二级结构的反蛋白石 GelMA/PEO 支架。

2.3. 细胞培养

将人肝癌细胞 (HepG2, 上海细胞库) 和人脐静脉内皮细胞 (HUVEC, 中国通派生物科技有限公司) 培养在配制的培养基 (DMEM 高糖培养基+10% 的胎牛血清+1% 的青霉素和链霉素) 中。将所有细胞置于二氧化碳 (CO₂) 培养箱 (Heracell 150, Thermo, USA) 中，在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。将 GelMA/PEO 支架浸泡在浓度为 75% 的酒精中，并放置于超净台紫外线下消毒至少 4 h。然后用 PBS 清洗支架三次后，将其转移到六孔板 (Corning, USA)。将浓度为 6×10^5 个细胞 \cdot mL⁻¹ 的 HUVEC 悬浮液 50 μ L 种植于支架顶部，然后缓慢加入 2 mL 培养基。实验过程中每天更换培养基。用 5 μ mol \cdot L⁻¹ 的 calcein-AM (Molecular Probes, USA) 染色细胞，观察细胞生长情况。在细胞共培养实验中，首先将 6×10^5 个细胞 \cdot mL⁻¹ 的 HUVEC 种植于支架，然后将 HepG2 细胞 (5×10^5 个细胞 \cdot mL⁻¹) 接种到支架中进行共培养。采用 5 μ mol \cdot L⁻¹ 的 calcein-AM 和 5 μ mol \cdot L⁻¹ 的 DiD (Molecular Probes, USA) 分别对 HepG2 和 HUVEC 进行染色，观察细胞在支架中的分布。采用 MTT 法测定细胞增殖率。简单来说，将支架置于 24 孔板中，加入 MTT 含量为 10% 的培养基。在培养箱中孵育 4 h 后，移走液体，然后加入 500 μ L 的二甲亚砷使晶体溶解。用酶标仪测定吸光度 (OD)。用大鼠白蛋白酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (Abcam, UK) 测定白蛋白含量。采用人 CYP450 3A4 酶联免疫吸附测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 检测 CYP450 活性。

2.4. 表征

微流控液滴的生成用显微镜 (AE2000, Motic, China) 和串联的相机 (S-PRI F1, AOS Technologies AG, Switzerland) 记录。利用光学显微镜 (Olympus BX51, Japan) 和场发射扫描电子显微镜 (SEM, S-300N, Hitachi, Japan) 对制备的支架结构进行表征。利用共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM, Olympus FV10i) 对细胞进行观察。

3. 结果和讨论

在本实验中，采用微流控技术制备的水包油 (O/W) 单乳液液滴作为模板，制备分级结构反蛋白石支架，如

图 1 所示。选用 GelMA 和 PEO 混合溶液作为分级结构反蛋白石支架的骨架材料。GelMA 是一种生物相容性良好的水凝胶，在 3D 细胞培养和组织工程领域有着广泛的应用[41-43]。同样，由于 PEO 具有生物相容性、惰性和易于修饰等优点，在水凝胶支架材料的制备中常被用作致孔剂[44-45]。在此背景下，我们将 GelMA 和 PEO 的混合物置于微流控装置中，然后去除 PEO 组分，制备出分级结构反蛋白石支架。

在本实验中，将玻璃毛细管同轴组装在一个载玻片上，制成了一个玻璃微流控装置。内相管用于引入分散相 (如甲基硅油)，外相管用于引入连续相 (如 GelMA 与 PEO 混合溶液)，最外侧的方形毛细管用于记录液滴在线生成过程。如图 2 (a) 所示，甲基硅油在内相管出口被 GelMA/PEO 溶液乳化形成液滴。通过调节两相溶液的流速，可以控制产生的液滴大小和支架对应的孔径。结果表明，随着分散相流速的增加，液滴直径明显增大，而连续相速率与液滴直径呈相反关系[图 2 (b)]。

如图 2 (c)、(d) 所示，生成的液滴尺寸均匀、球形度良好、单分散性高，是制备反蛋白石支架的理想模板。液滴组装成六方密堆积结构后，再将预凝胶溶液聚合，通过正己烷和乙醇洗去油相，最终得到了分级结构反蛋白石支架的第一个层次结构 (即均质的大孔结构)。利用光学显微镜和 SEM 对制备的 GelMA/PEO 支架进行观察，如图 3 所示。观察发现，GelMA/PEO 支架具有均匀且相互连通的大孔结构[图 3 (a)]。此外，相邻的孔洞通过多个均匀的窗口相互连接，有利于细胞长期培养过程中营养物质的运输和废物的排出[图 3 (b)]。

通过上述方法制备反蛋白石支架的第一级结构后，将生成的 GelMA/PEO 支架在 PBS 中浸泡至少 48 h，去除固化的 GelMA 水凝胶中的 PEO，形成第二级结构。为了观察 PEO 在水凝胶中的渗出情况，将 PEO 分子与 FITC 分子偶联，进行 PEO 浸出试验。结果发现，随着时间的推移，PEO 逐渐渗出，48 h 后吸光度变化趋于平缓 (见附录 A 中的图 S1)。通过 SEM 和 CLSM 的 3D 重建，观察合成的多孔微观结构。结果表明，PEO 渗出后产生了二级微孔结构 [图 3 (c)、(d)]。这些多孔网络结构能够大大缩短细胞之间的距离，保证在大面积和长期细胞培养过程中充足的氧气和营养物质的运输。

为了模拟体内血管网络的结构，将制备的支架用于培养 HUVEC。首先，我们研究了材料的生物相容性。具体来说，HUVEC 分别与 GelMA 水凝胶和 GelMA/PEO 复合膜共培养 1 d、3 d、5 d 和 7 d，然后用 calcein-AM 染色后经 CLSM 观察。如附录 A 中的图 S2 所示，HUVEC 在 Gel-

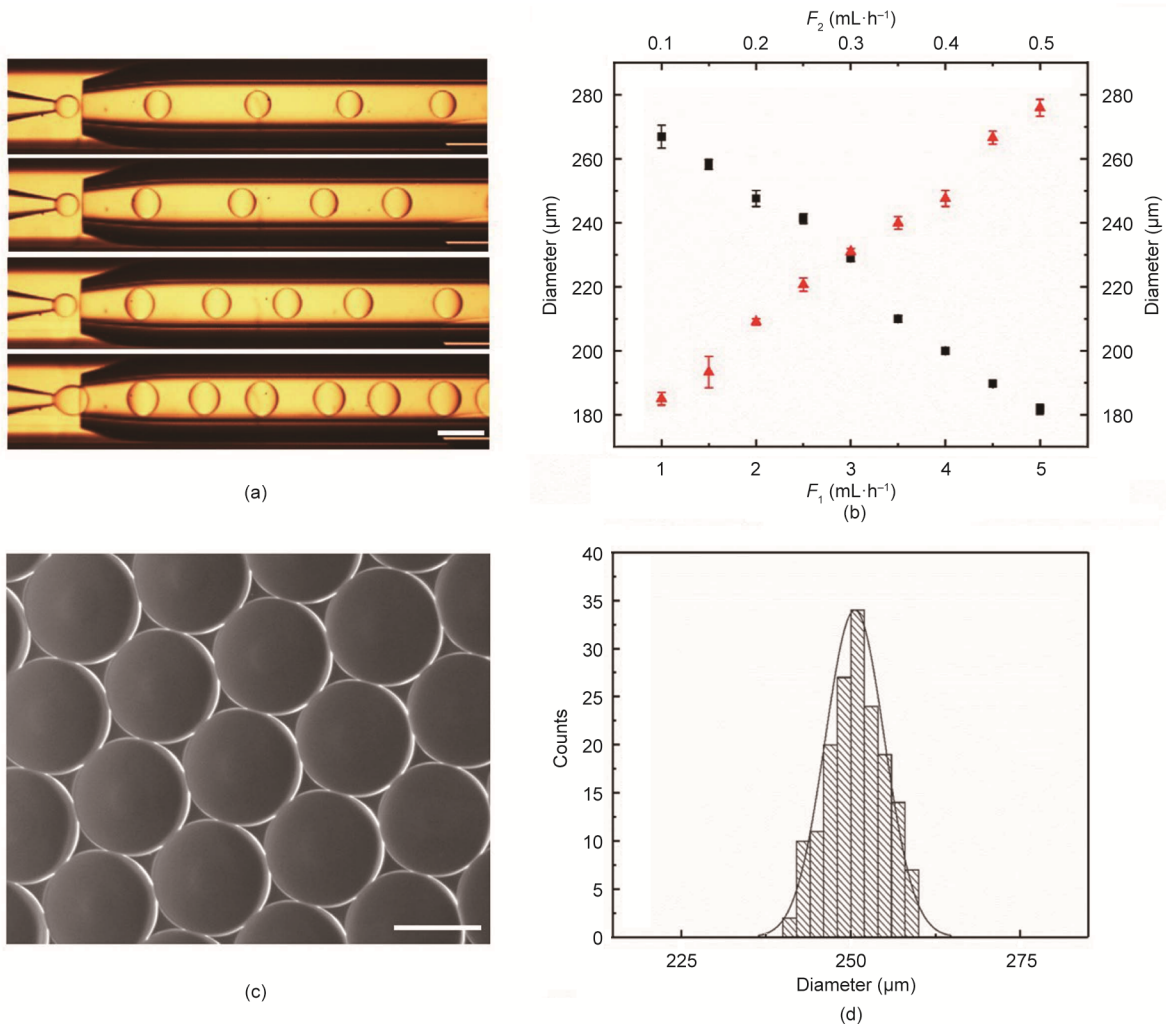


图2. 微流控制备的液滴模板。(a) 不同内相流速下液滴在线生成图像 (标尺为 500 μm); (b) 液滴直径与流速的关系 ($n=3$) (F_1 : 外相流速, 黑色方块; F_2 : 内相流速, 红色三角形); (c) 自组装的液滴模板 (标尺为 200 μm); (d) 液滴粒径分布 (变异系数为 4.35%)。

MA 水凝胶和 GelMA/PEO 复合膜中增殖良好, 与 MTT 法的定量结果一致。这些结果表明制备的支架材料具有理想的细胞生物相容性。

随后, 为了验证支架在 3D 细胞培养中的性能, 在第 1、3、5、7 和 15 天, 通过 CLSM 对由上述两种材料制备的支架中的 HUVEC 的增殖进行定性观察, 并通过 MTT 法定量评估 (图 4)。结果表明, 前 3 天细胞在两个支架中增殖均良好。然而, 3 d 后, GelMA 支架中的细胞增殖明显小于 GelMA/PEO 支架。这是由于传统支架在体外长期培养过程中, 支架内缺乏氧气和营养物质, 细胞容易坏死, 而我们的分级结构反蛋白石支架能够克服这一限制。此外, 在两种支架上生长的细胞形态也有明显差异。如附录 A 中的图 S3 所示, 与 GelMA 支架中生长的细胞相比, GelMA/PEO 支架中生长的细胞更容易黏附在支架壁上, 呈梭形形态。这些结果表明, 与普通无孔的 GelMA 支架相比, GelMA/PEO 支架能有效促进细胞的生长、黏附、

增殖和迁移, 原因是分级的多孔结构更有利于细胞所需的氧气和营养物质的运输。

基于 GelMA/PEO 支架在 3D 细胞培养中的优越性能, 本研究构建了一种新型的 3D 仿生血管网络, 该血管网络对于研究大面积细胞培养中复杂的细胞-细胞和细胞-细胞外基质相互作用具有重要意义。为此, 将 HUVEC 均匀接种于 GelMA/PEO 支架中, 通过 calcein-AM 染色后经 CLSM 和 SEM 进行观察 (见图 5 和附录 A 中的图 S4), 可以观察到细胞均匀地生长于支架的孔洞中。如图 5 所示, 接种后第一天, 细胞均匀分布于支架的整个表面, 并主要在支架的骨架上拉伸。在培养的过程中, 细胞占据了大部分孔隙空间, 形成了 3D 细胞网络。此外, 通过 CLSM 层扫观察内部细胞的生存能力 (见附录 A 中的图 S5)。结果发现, 支架中的细胞在不同深度和位置均生长良好, 这解决了传统支架在大面积细胞培养过程中由于缺氧气和营养, 内部细胞容易坏死的问题。因此, 改进支架的微观结

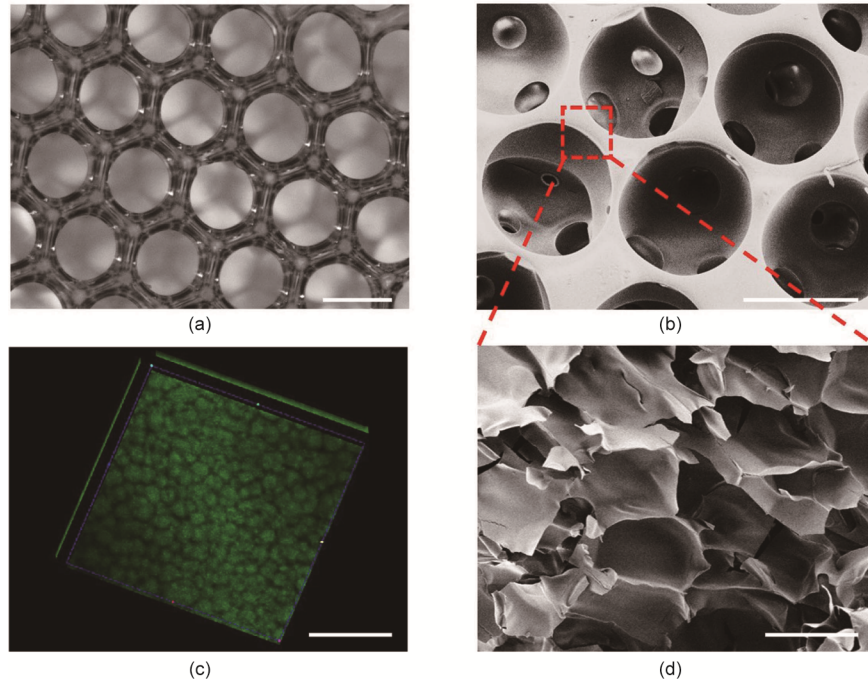


图3. 分级结构反蛋白石多孔支架的结构表征。(a) 支架第一级结构的光学显微镜图像；(b) 支架第一级结构的SEM图像；(c) GelMA/PEO水凝胶第二级结构的3D重建荧光图像；(d) GelMA/PEO水凝胶第二级结构的SEM图像。(a)~(d)标尺分别为200 μm 、200 μm 、100 μm 、10 μm 。

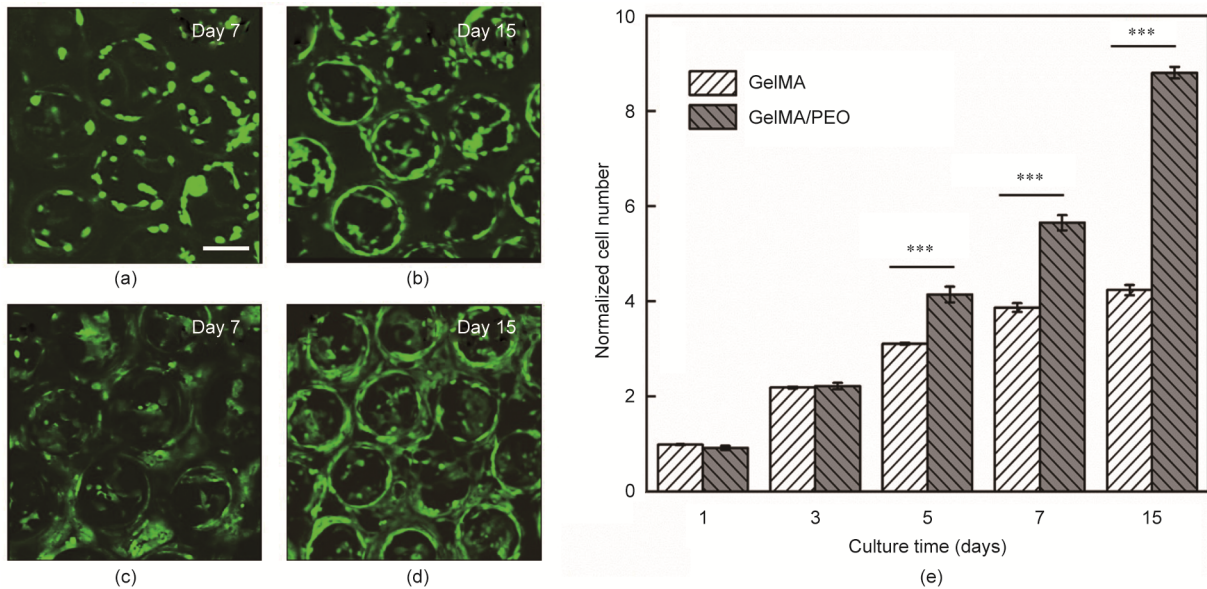


图4. (a)~(d) CLSM 3D重建荧光图像 (标尺为200 μm)。 (a)、(b) GelMA支架中生长的HUVEC；(c)、(d) GelMA/PEO支架中生长的HUVEC；(e) MTT法检测在GelMA和GelMA/PEO支架中培养的HUVEC的增殖 (***) $p < 0.001$, $n = 3$ 。

构可以使细胞均匀分布于分级结构的GelMA/PEO支架中，同时防止支架内细胞坏死，促进细胞与细胞之间的信号传导。

为了进一步开发所制备的分级结构GelMA/PEO支架的功能，通过依次将不同细胞植入支架中，实现了内皮细胞包裹肝细胞的3D多层细胞共培养系统(图6)。将HUVEC和HepG2细胞植入支架中进行培养。为了检测细胞在支架中的生长状态，分别用DiD细胞标记液(红色)和

calcein-AM(绿色)对HUVEC和HepG2细胞进行染色。利用CLSM获得支架中共培养细胞的图像[图6(a)]。结果表明，接种到支架上的两种细胞在共培养过程中均表现出良好的活性，从细胞共培养系统的侧面也可以看出两个细胞是分层的。

最后，本研究检测了肝细胞与HUVEC共培养后与肝脏相关的酶的分泌水平，白蛋白和CYP450是肝细胞培养中细胞生理学的关键参数。结果表明，与普通的GelMA

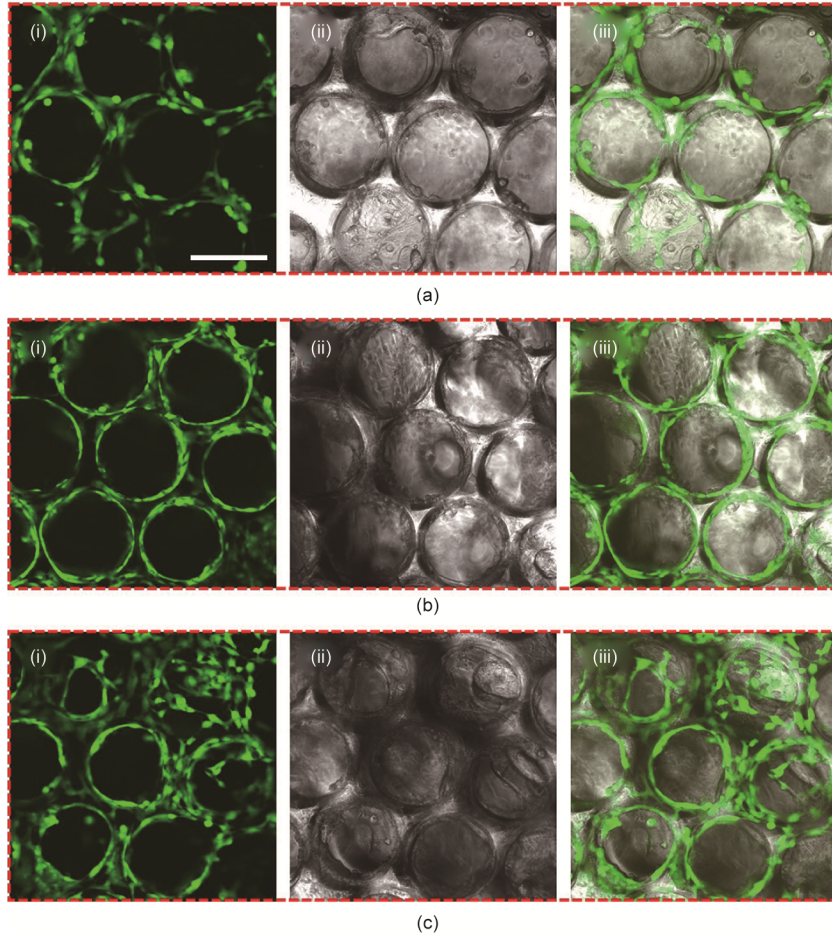


图5. 在 GelMA/PEO 支架中培养的 HUVEC 的 CLSM 图像 (标尺为 200 μm)。 (a) 第 1 天、 (b) 第 3 天、 (c) 第 7 天: (i) 荧光图像、 (ii) 明场图像、 (iii) 叠加图像。

支架相比, 在 GelMA/PEO 支架中肝细胞和 HUVEC 共培养分泌了更高水平的白蛋白和 CYP450 [见图 6 (b)、(c) 及附录 A 中的图 S6]。 GelMA/PEO 支架共培养肝细胞的白蛋白分泌量和 CYP450 表达量分别是普通 GelMA 支架共培养肝细胞的 1.36 倍和 1.17 倍。这些结果表明, 在 GelMA/PEO 支架中共培养的肝细胞在培养过程中能够保持酶活性, 且表现出比 GelMA 支架更高的酶活性。本研究制备的 GelMA/PEO 支架的这些特点使其在组织工程领域具有广阔的应用前景。

4. 结论

总之, 本研究提出了通过简单的微流控方法制备一种分级结构的反蛋白石多孔支架促进 3D 细胞培养。该支架的设计采用了一种复合概念, 包括乳液滴模板和惰性聚合物聚合。结果表明, 设计的支架在细胞增殖过程中保证了充足的营养供应, 从而实现了细胞的大面积培养。此外, 通过在支架中连续接种不同的细胞, 建立了内皮细胞包裹

肝细胞的 3D 共培养体系, 构建了具有一定功能的肝细胞组织。这种共培养系统促进了较高水平的白蛋白和 CYP450 的分泌, 表明支架中的共培养系统有助于维持肝细胞的活性和功能。该支架将为体外构建类器官提供了新的思路。

致谢

本项目由国家重点研发计划项目(2020YFA0908200)、国家自然科学基金项目(52073060、32101159、61927805)、深圳市重点基础研究发展计划项目(JCYJ2019081315261-6459)和中国科学院大学温州研究院启动基金(WI-UCASQD2019007)资助。

Compliance with ethics guidelines

Changmin Shao, Yuxiao Liu, Junjie Chi, Fangfu Ye, and Yuanjin Zhao declare that they have no conflict of in-

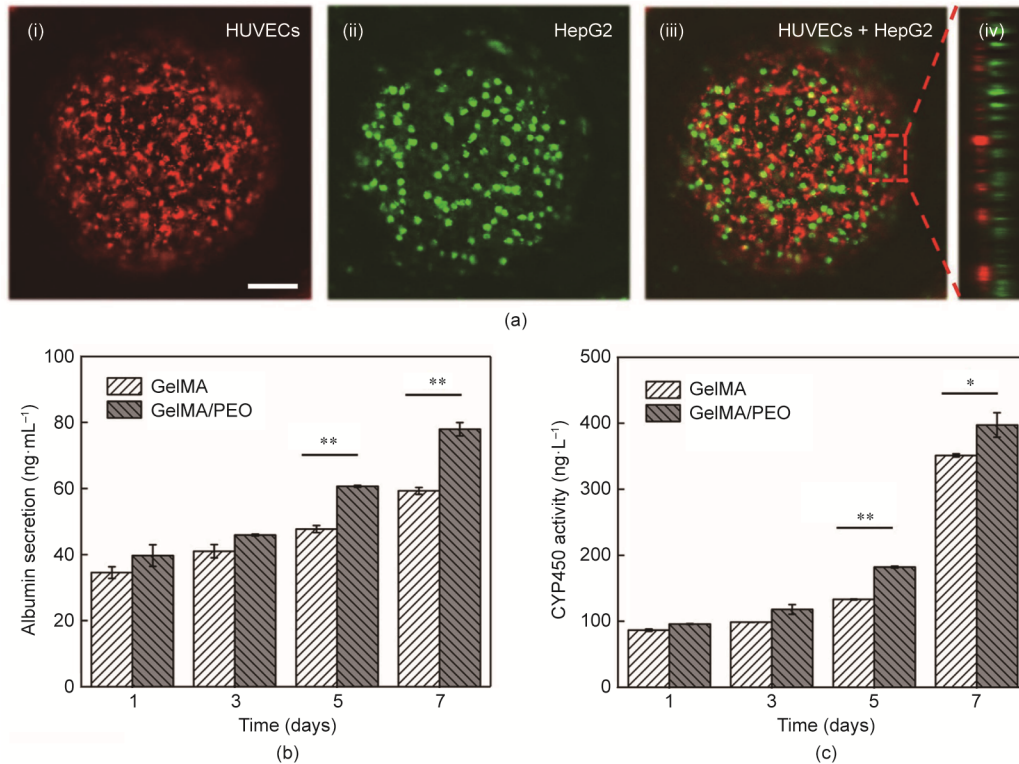


图6. (a) 培养7 d后, HUVEC (红色) 和 HepG2 细胞 (绿色) 在 GelMA/PEO 支架中共培养的 CLSM 图像: (i) HUVEC; (ii) HepG2; (iii) 叠加图像; (iv) 侧视图 (标尺为 100 μm)。 (b) GelMA 和 GelMA/PEO 支架中与 HUVEC 共培养的 HepG2 细胞的白蛋白分泌和 CYP450 的表达情况 ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $n = 3$)。

terest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.06.031>.

References

- [1] Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 1988;240(4849):177–84.
- [2] Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 2003;83(2):173–80.
- [3] O' Brien LE, Zegers MMP, Mostov KE. Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(7):531–7.
- [4] Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol* 2014;12(4):207–18.
- [5] Wang J, Zou MH, Sun LY, Cheng Y, Shang LR, Fu FF, et al. Microfluidic generation of Buddha beads-like microcarriers for cell culture. *Sci China Mater* 2017;60(9):857–65.
- [6] Schmeichel KL, Bissell MJ. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci* 2003;116(12):2377–88.
- [7] Liu W, Zhong Z, Hu N, Zhou Y, Maggio L, Miri AK, et al. Coaxial extrusion bioprinting of 3D microfibrillar constructs with cell-favorable gelatin methacryloyl microenvironments. *Biofabrication* 2018;10(2):024102.
- [8] Liu YX, Huang Q, Wang J, Fu FF, Ren JA, Zhao YJ. Microfluidic generation of egg-derived protein microcarriers for 3D cell culture and drug delivery. *Sci Bull* 2017;62(18):1283–90.
- [9] Abbott A. Biology's new dimension. *Nature* 2003;424(6951):870–2.
- [10] Wang N, Peng Y, Zheng W, Tang L, Cheng S, Yang J, et al. A strategy for rapid construction of blood vessel-like structures with complex cell alignments. *Macromol Biosci* 2018;18(5):1700408.
- [11] Ying GL, Jiang N, Maharjan S, Yin YX, Chai RR, Cao X, et al. Aqueous two-phase emulsion bioink-enabled 3D bioprinting of porous hydrogels. *Adv Mater* 2018;30(50):1805460.
- [12] Qi S, Zhang P, Ma M, Yao M, Wu J, Mäkilä E, et al. Cellular internalization-induced aggregation of porous silicon nanoparticles for ultrasound imaging and protein-mediated protection of stem cells. *Small* 2019;15(1):1804332.
- [13] Zhang H, Liu D, Wang L, Liu Z, Wu R, Janoniene A, et al. Microfluidic encapsulation of prickly zinc-doped copper oxide nanoparticles with VD1142 modified spermine acetalated dextran for efficient cancer therapy. *Adv Health Mater* 2017;6(11):1601406.
- [14] Nam S, Stowers R, Lou J, Xia Y, Chaudhuri O. Varying PEG density to control stress relaxation in alginate-PEG hydrogels for 3D cell culture studies. *Biomaterials* 2019;200:15–24.
- [15] Waddell SJ, de Andrés MC, Tsimbouri PM, Alakpa EV, Cusack M, Dalby MJ, et al. Biomimetic oyster shell-replicated topography alters the behaviour of human skeletal stem cells. *J Tissue Eng* 2018;9:2041731418794007.
- [16] Feng C, Zhang W, Deng C, Li G, Chang J, Zhang Z, et al. 3D printing of lotus root-like biomimetic materials for cell delivery and tissue regeneration. *Adv Sci* 2017;4(12):1700401.
- [17] Rieu C, Parisi C, Mosser G, Haye B, Coradin T, Fernandes FM, et al. Topotactic fibrillogenesis of freeze-cast microridged collagen scaffolds for 3D cell culture. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019;11(16):14672–83.
- [18] Liu ZH, Li YZ, Li W, Lian WH, Kemell M, Hietala S, et al. Close-loop dynamic nanohybrids on collagen-ark with *in situ* gelling transformation capability for biomimetic stage-specific diabetic wound healing. *Mater Horiz* 2019;6(2):385–93.
- [19] Zhang YS, Yao J. Imaging biomaterial-tissue interactions. *Trends Biotechnol* 2018;36(4):403–14.
- [20] Zheng W, Jiang X. Synthesizing living tissues with microfluidics. *Acc Chem Res* 2018;51(12):3166–73.

- [21] Dong RH, Liu Y, Mou L, Deng JQ, Jiang XY. Microfluidics-based biomaterials and bioelectronics. *Adv Mater* 2019;31(45):1805033.
- [22] Hippler M, Lemma ED, Bertels S, Blasco E, Barner-Kowollik C, Wegener M, et al. 3D scaffolds to study basic cell biology. *Adv Mater* 2019;31(26):1808110.
- [23] Cai Y, Wu F, Yu Y, Liu Y, Shao C, Gu H, et al. Porous scaffolds from droplet microfluidics for prevention of intrauterine adhesion. *Acta Biomater* 2019;84:222–30.
- [24] Nguyen L, Bang S, Noh I. Tissue regeneration of human mesenchymal stem cells on porous gelatin micro-carriers by long-term dynamic *in vitro* culture. *Tissue Eng Regen Med* 2019;16(1):19–28.
- [25] Zhu K, Yu Y, Cheng Y, Tian C, Zhao G, Zhao Y. All-aqueous-phase microfluidics for cell encapsulation. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019;11(5):4826–32.
- [26] Fu F, Shang L, Chen Z, Yu Y, Zhao Y. Bioinspired living structural color hydrogels. *Sci Robot* 2018;3(16):eaar8580.
- [27] Wang X, Guo Y, Nan X, Shi S, Wang X, Zhang X. Preparation of inverse opal adsorbent by water-soluble colloidal crystal template to obtain ultrahigh adsorption capacity for salicylic acid removal from aqueous solution. *J Hazard Mater* 2019;371:362–9.
- [28] Choi SW, Xie J, Xia Y. Chitosan-based inverse opals: three-dimensional scaffolds with uniform pore structures for cell culture. *Adv Mater* 2009;21(29):2997–3001.
- [29] Jones WM, Zhang RY, Murty E, Zhu XT, Yao YF, Manohara H, et al. Field emitters using inverse opal structures. *Adv Funct Mater* 2019;29(16):1808571.
- [30] Shang L, Cheng Y, Zhao Y. Emerging droplet microfluidics. *Chem Rev* 2017;117(12):7964–8040.
- [31] Guo D, Xiao J, Chen J, Liu Y, Yu C, Cao M, et al. Superhydrophobic “aspirator”: toward dispersion and manipulation of micro/nanoliter droplets. *Small* 2015;11(35):4491–6.
- [32] Yu Y, Fu F, Shang L, Cheng Y, Gu Z, Zhao Y. Bioinspired helical microfibers from microfluidics. *Adv Mater* 2017;29(18):1605765.
- [33] Lee SS, Kim SH. Controlled encapsulation of cholesteric liquid crystals using emulsion templates. *Macromol Res* 2018;26(12):1054–65.
- [34] Song Y, Michaels TCT, Ma Q, Liu Z, Yuan H, Takayama S, et al. Budding-like division of all-aqueous emulsion droplets modulated by networks of protein nanofibrils. *Nat Commun* 2018;9(1):2110.
- [35] Chang CB, Wilking JN, Kim SH, Shum HC, Weitz DA. Monodisperse emulsion drop microenvironments for bacterial biofilm growth. *Small* 2015;11(32):3954–61.
- [36] Kim B, Lee S, Kim SH. Double-emulsion-templated anisotropic microcapsules for pH-triggered release. *Adv Mater Interfaces* 2018;5(4):1701472.
- [37] Kim M, Choe YE, Kim GH. Injectable hierarchical micro/nanofibrous collagen-based scaffolds. *Chem Eng J* 2019;365:220–30.
- [38] Huang Y, Song XN, Deng J, Zha CY, Huang WJ, Wu YL, et al. Ultra-dispersed molybdenum phosphide and phosphosulfide nanoparticles on hierarchical carbonaceous scaffolds for hydrogen evolution electrocatalysis. *Appl Catal B* 2019;245:656–61.
- [39] Wu YX, Zhang K, Yang B. Ordered hybrid micro/nanostructures and their optical applications. *Adv Opt Mater* 2019;7(7):1800980.
- [40] Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* 2015;73:254–71.
- [41] Klotz BJ, Gawlitta D, AJWPRosenberg, Malda J, Melchels FPW. Gelatin-methacryloyl hydrogels: towards biofabrication-based tissue repair. *Trends Biotechnol* 2016;34(5):394–407.
- [42] Kessler L, Gehrke S, Winnefeld M, Huber B, Hoch E, Walter T, et al. Methacrylated gelatin/hyaluronan-based hydrogels for soft tissue engineering. *J Tissue Eng* 2017;8:2041731417744157.
- [43] Lee BH, Shirahama H, Kim MH, Lee JH, Cho NJ, Tan LP. Colloidal templating of highly ordered gelatin methacryloyl-based hydrogel platforms for three-dimensional tissue analogues. *NPG Asia Mater* 2017;9(7):e412.
- [44] Peters EB, Christoforou N, Leong KW, Truskey GA, West JL. Poly(ethylene glycol) hydrogel scaffolds containing cell-adhesive and protease-sensitive peptides support microvessel formation by endothelial progenitor cells. *Cell Mol Bioeng* 2016;9(1):38–54.
- [45] Shim K, Kim SH, Lee D, Kim B, Kim TH, Jung Y, et al. Fabrication of micrometer-scale porous gelatin scaffolds for 3D cell culture. *J Ind Eng Chem* 2017;50:183–9.