

引文格式:

闫玉玲, 张敏, 鞠秀琴, 等. 自下而上构建人工细胞及其生物医学应用 [J]. 集成技术, 2023, 12(4): 30-50.

Yan YL, Zhang M, Ju XQ, et al. Bottom-up construction of artificial cells and their biomedical applications [J]. Journal of Integration Technology, 2023, 12(4): 30-50.

自下而上构建人工细胞及其生物医学应用

闫玉玲¹ 张敏¹ 鞠秀琴¹ 刘剑波^{1,2*}

¹(湖南大学生物纳米与分子工程湖南省重点实验室 长沙 410082)

²(湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室 长沙 410082)

摘要 构建具有特定细胞模拟功能的人工细胞有助于探索天然生物细胞系统中复杂的生物反应过程和细胞功能, 并为深入了解生命起源提供便利。对于人工细胞的构建方法而言, 无论是基于自上而下的原则, 还是基于自下而上的原则, 在过去的几十年里, 都取得了很大进展, 并得到广泛应用。基于人工细胞构建策略的不同, 人工细胞可分为“自上而下”的人工细胞和“自下而上”的人工细胞。自下而上的合成生物学是一个新兴的互补学科, 它寻求从天然或合成成分中构建人工细胞。自下而上的合成生物学的目标之一是构建或模拟天然生物细胞中存在的复杂路径。人工细胞来源于脂质、聚合物、脂质/聚合物杂化体、天然细胞膜、金属有机框架和凝聚体等。真实细胞内各种物质如蛋白质、基因、线粒体等可以结合在人工细胞表面或包裹在人工细胞内部, 从而使人工细胞被赋予各种功能。此外, 人工细胞不仅可作为载药系统及信息交流载体, 还可代替功能受损的细胞, 恢复机体的正常运转。首先, 介绍基于自下而上策略构建人工细胞的方法和分类; 其次, 讨论人工细胞的多种应用; 最后, 对人工细胞的未来发展前景进行展望。

关键词 人工细胞; 自下而上; 磷脂囊泡; 生物应用

中图分类号 Q811.2 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20231124001

Bottom-up Construction of Artificial Cells and Their Biomedical Applications

YAN Yuling¹ ZHANG Min¹ JU Xiuqin¹ LIU Jianbo^{1,2*}

¹(Key Laboratory for Bio-Nanotechnology and Molecular Engineering of Hunan Province, Hunan University, Changsha 410082, China)

²(State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, Hunan University, Changsha 410082, China)

*Corresponding Author: liujianbo@hnu.edu.cn

Abstract The construction of artificial cells with specific cell mimic functions helps to explore the complex

收稿日期: 2023-11-24 修回日期: 2023-12-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(22177032); 湖南省自然科学基金项目(2022RC3047, 2021GG10013)

作者简介: 闫玉玲, 博士研究生, 研究方向为人工细胞的化学合成; 张敏, 硕士研究生, 研究方向为类囊体人工细胞的构建; 鞠秀琴, 硕士研究生, 研究方向为人工细胞的化学合成; 刘剑波(通讯作者), 博士, 教授, 研究方向为人工细胞的化学合成及化学生物分析与生物医学应用, E-mail: liujianbo@hnu.edu.cn.

biological reaction processes and cellular functions in natural biological cell systems, and provides convenience for the in-depth understanding of the origin of life. Artificial cells construction method, based on the top-down and bottom-up principle, in the past few decades have made great progress and extensive application. Build strategy based on artificial cells, human cells can be divided into “top-down” artificial cells and “bottom-up” cells. Bottom-up complementary branch of synthetic biology is a new, it sought from natural or synthetic ingredients to build artificial cells. One of the goals of bottom-up synthetic biology is to construct or mimic the complex pathways present in the cells of natural organisms. Artificial cells derived from lipids, polymer, lipid/polymer hybrid body, natural cell membrane, metal-organic frameworks and condensed matter and so on. Various substances such as proteins, genes, mitochondria, etc. in real cells can be combined on the surface of artificial cells or wrapped inside artificial cells, thus endowing artificial cells with various functions. Moreover, artificial cells can be used as a drug delivery system and a carrier of information exchange. In addition, artificial cells can also replace the impaired cells to restore the normal operation of the body. Here, first introduced the method based on bottom-up strategy to build artificial cells and classification. Then the various applications of artificial cells are discussed. Finally, the future development of artificial cells is prospected.

Keywords artificial cells; bottom-up; phospholipid vesicles; bioapplications

Funding This work is supported by National Natural Science Foundation of China (22177032) and Natural Science Foundation of Hunan Province (2022RC3047, 2021GG10013)

1 引言

细胞是一切生命形式的基本组成单位^[1], 其结构和复杂的功能一直是分子生命科学领域的研究人员探讨的热点^[2]。但是, 现代细胞生物学对细胞的研究并不局限于细胞结构、细胞之间的交流、细胞功能, 细胞工程、基因工程、生物技术、生物工厂等学科的发展使研究人员需要对细胞进一步深入的研究^[3]。面对机体内受损细胞的不可修复性、细胞离体后容易破损和失活及细胞结构的复杂性等一系列问题, 随着细胞生物学的发展, 研究人员可以通过对活细胞进行改造, 扩大细胞在生物技术领域的应用。但是细胞生物学领域仍面临遗传技术的局限性、基因工程的安全和伦理等方面的问题, 这些问题促使具有特定应用的人工细胞被设计出来^[4], 以替代细胞完成细胞间信息交流、细胞特定功能及生物大分子的运

输。人工细胞的概念最早由 Chang^[5]于 1957 年提出, 他通过天然生物细胞膜中的磷脂成功创造出囊泡, 这是第一个人工细胞。Tian 等^[6]把人工细胞理解成通过接触或非接触相互作用的独立的分隔微结构。人工细胞作为天然生物细胞的仿生模型, 可用来模拟细胞的形态、功能及隔室结构, 甚至可模拟真实细胞的表面形态^[7]。

基于人工细胞构建策略的不同, 人工细胞可分为“自上而下”的人工细胞和“自下而上”的人工细胞^[8]。自上而下的方法从全功能的天然生物细胞开始, 去除其原有基因组, 并引入一个或几个使用基因组技术从核苷酸外部合成的新的基因组, 以获得一个可维持自身生存和繁殖的更复杂的化学系统^[9-11]。自下而上的方法从简单分子出发, 将无生命物质组装成“有生命形式”的区室微结构^[12]。这两种方法的构建形式虽然不同, 但它们可以相互补充。新兴的自下而上合成生

物学领域旨在通过组合和拼凑基本功能成分构建“活的”人工细胞。

通过自下而上的方法创造的具有模拟细胞形态和功能、细胞隔室结构，以及真实细胞表面形态的人工细胞，有利于研究人员在分子细胞水平扩展对细胞内及细胞间的分子作用机制的理解。此外，基于研究人员对化学、生物学和物理学的见解，建立生命体系与非生命体系的联系，为生命起源研究提供相应的理论基础，进一步增加研究人员对天然生物细胞内结构和复杂生化反应的理解。

目前，人工细胞一般由二氧化硅纳米颗粒、微凝胶颗粒、两亲性嵌段共聚物或两亲性蛋白质-聚合物纳米共轭物组成。此外，合成聚合物或生物相关分子可通过液-液相分离过程，即凝聚体或双水相体系，形成膜单元的合成模拟物。这样的生物合成隔间在空间上均起定位和隔离分子及其反应的作用^[13]。因此，人工细胞的一个额外但重要的特征是可包含和支持生化或化学反应途径，从而赋予隔室特定的功能。封闭特定的反应可避免自然细胞中常见的潜在副反应，从而提高系统的效率和可控性。

截至目前，人工细胞作为一个具有开创性和创新性的研究领域，已受到越来越多科学家的关注。在过去几十年中，人工细胞有着广泛的应用^[13-15]，例如，作为药物运输载体^[16-19]、能量输送系统^[20-21]、封装和反应容器^[22-23]，以及材料和信息交换的载体^[24-26]。

2 人工细胞的类型

人工细胞可通过自上而下和自下而上两种方法构建(图 1)，其中，自下而上的构建方法允许使用无生命物质简单、快速和大量地生产人工细胞，所以，本文将重点讨论通过自下而上的方法构建的人工细胞。基于区域化策略的发展，人工细

胞包括磷脂囊泡^[27-28]、凝聚体^[29-30]、聚合物^[31-32]、无机胶体^[33]、蛋白小体^[34]，以及基于金属有机框架的人工细胞^[35]等。



图 1 通过自上而下和自下而上的方法构建人工细胞的示意图

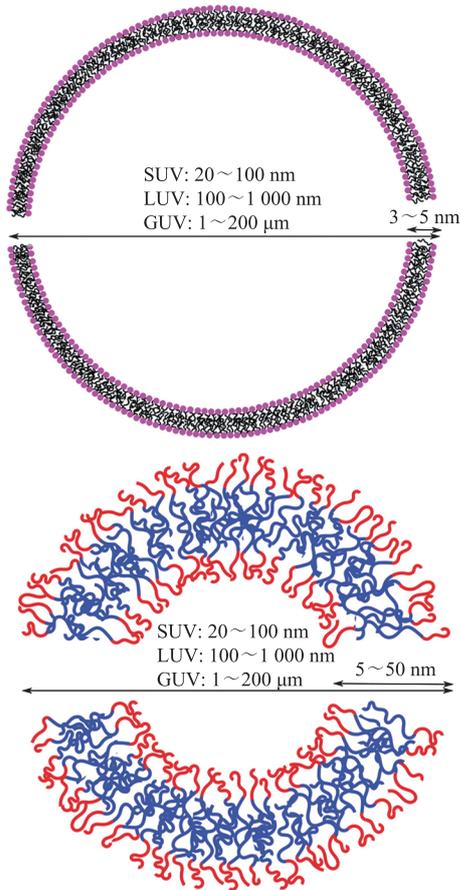
Fig. 1 Schematic representation of artificial cells constructed by top-down and bottom-up approaches

2.1 基于脂质形成的人工细胞

在各种人工细胞中，磷脂囊泡是最常见的。磷脂囊泡是自组装形成的磷脂或胆固醇球形小囊泡^[35]。磷脂是天然生物细胞中细胞膜的主要成分，磷脂囊泡和天然生物细胞一样具有双层膜结构，这种结构可以促进包裹的内容物与磷脂膜的相互作用^[36]。通常，磷脂囊泡为球形囊泡，粒径在 25~1 000 nm 不等。当磷脂分散在水溶液中时，磷脂分子的疏水尾部聚集在一起，磷脂分子的亲水头部则暴露在水相中，形成具有双层结构的囊泡。一般来说，亲水分子被包裹在中心的水核内，而疏水分子则被包裹在疏水双层膜中^[37]。

磷脂囊泡的性质因脂质组成、表面电荷、制备方法的不同有很大差异。合成方法决定所合成的磷脂囊泡的类型，脂质体也可分为两类：多层囊泡(multilayered vesicles, MLV)和单层囊泡。单层囊泡可进一步分为巨大单层囊泡(giant unilamellar vesicles, GUV, 直径>1 μm)、大单层囊泡(large unilamellar vesicles, LUV, 直径为 100~1 000 nm)和小单层囊泡(small unilamellar vesicles, SUV, 直径<100 nm)，以及囊泡内可含有多个小囊泡的多泡囊泡。这些囊泡可用于模

仿各种生物细胞形态。由于 **GUV** 的大小和形态与天然生物细胞相似, 因此, 最常用作人工细胞进行细胞膜的性质研究(图 2)。



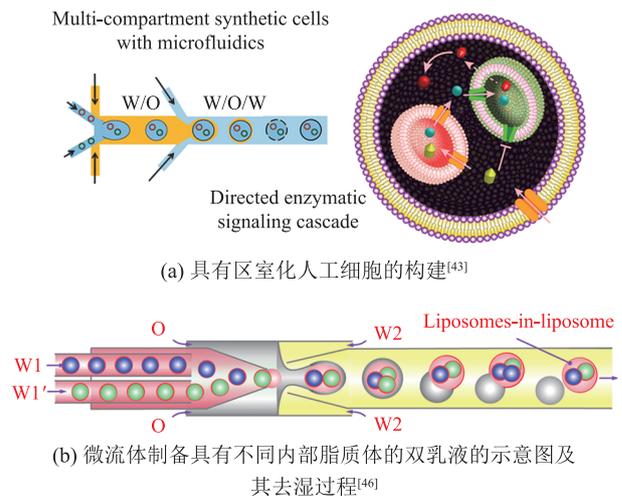
注: SUV 为小单层囊泡; LUV 为大单层囊泡; GUV 为巨大单层囊泡

图 2 不同大小磷脂囊泡的脂膜模型体系^[37]

Fig. 2 Different sizes of phospholipid vesicle lipid membrane model system^[37]

磷脂囊泡用于药物输送已有 50 多年的历史^[38]。磷脂囊泡制剂已被批准用于治疗包括癌症、病毒和真菌感染在内的各种疾病^[39]。磷脂囊泡具有生物相容性好、毒性低、载药量大、释放动力学可控等优点, 但是, 传统的磷脂囊泡易于融合和/或相互聚集, 导致磷脂囊泡的有效载荷不随时间匀速释放。此外, 磷脂囊泡容易被单核吞噬细胞摄取, 这导致其会迅速被全身清除。为克服这些限制, 通过采用表面改性策略, 在磷脂囊泡的表面涂覆惰性的、生物相容性的亲水性聚合物, 如聚乙二

醇, 使磷脂囊泡表面形成亲水性聚合物保护层, 进而保持磷脂囊泡表面的空间稳定性, 减缓单核吞噬细胞系统对磷脂囊泡的清除^[40]。尽管如此, 但磷脂囊泡在封装和控制有效载荷的释放方面仍然存在一些挑战^[41], 特别是在亲水性小分子药物方面^[42]。Shetty 等^[43]使用微流控平台成功制备了单分散性的多腔室囊泡, 以形成具有多室结构的人工细胞。通过共同封装不同种群的磷脂囊泡, 为药物输送系统提供了新思路(图 3(a))。现阶段的大多数研究集中在用合成系统模仿自然界的区隔策略^[44], 开发各种人工细胞和亚细胞类似物, 以模拟基本细胞结构和反应^[45]。Deng 等^[46]基于微流控技术, 利用双乳液模板的去湿过程, 构建了嵌套式磷脂囊泡结构。通过在双层膜中插入纳米孔实现了药物小分子的跨膜运输。该体系在药物输送、区域化纳米或微米级生物反应器方面具有潜在应用(图 3(b))。



(a) 具有区室化人工细胞的构建^[43]

(b) 微流体制备具有不同内部脂质体的双乳液的示意图及其去湿过程^[46]

图 3 磷脂囊泡人工细胞示意图

Fig. 3 Schematic of phospholipid vesicle artificial cells

2.2 基于液液相分离形成的人工细胞

液液相分离(liquid-liquid phase separation, LLPS)作为水性大分子溶液中的常见现象, 可使用多种生物或非生物聚合物实现。高浓度的大分子, 在一个或多个生成的相提供了大分子拥挤环境^[47]。通过 LLPS 形成的微隔室类似于拥挤的活

细胞内部，其中含有高浓度的大分子^[48]，因此，相分离溶液可作为无膜细胞器模型。通过 LLPS 组装形式形成的人工细胞是一种有前途的区室化策略^[49-50]。LLPS 合成人工细胞的组装策略提供了一种形成大分子富集环境的可行方法，从而在无膜细胞器模型中实现细胞内部拥挤，并确保人工细胞与外界环境得以进行物质交换和信息交流。通过 LLPS 形成的人工细胞作为无膜细胞模型，其无膜结构比天然生物细胞更有利于自身与环境进行分子交换。同时，此人工细胞的液体性质促进了液滴内分子扩散，从而保证了局部生化反应的发生。因此，通过 LLPS 形成的人工细胞可作为可选择性隔离生物分子和具有催化活性的“开放”反应器^[50]。

在水溶液中，大分子之间的相互作用可引发不同热力学相的形成，这种现象会产生双水相体系。“分离相分离”指两种(或多种)聚合物或一种聚合物和一种盐在超过阈值浓度的水中，混合物在平衡状态下形成两个不相容的水液相^[51]。这些相都是水相，但每一个相都含有不同的聚合物。最常见和最容易理解的例子是聚乙二醇和葡聚糖形成的双水相体系。水中两种不带电聚合物的相图如图 4 所示。在低浓度的聚合物中，溶液以单相存在，在高浓度时发生相分离。每种聚合物在顶相和底相中的浓度由所在的连接线与共存曲线的交点给出。如图 4 所示，点 2、点 3 和点 4 位于共存曲线之上，以两个相的形式存在。由于点 2、点 3 和点 4 位于同一连接线上，因此它们的顶部和底部阶段分别由点 1(顶部阶段)和点 5(底部阶段)指定，但体积不同^[49]。

更复杂的相行为可能是由具有强相互作用的聚合物形成的，如相反电荷的聚电解质^[52]。当含有聚阳离子的水溶液和含有聚阴离子的水溶液混合时，会形成聚电解质络合物。聚电解质络合物通常不溶于水，因此，它们以新的浓缩聚合物相分离出来，称为复杂的凝聚物。简单凝聚指因溶

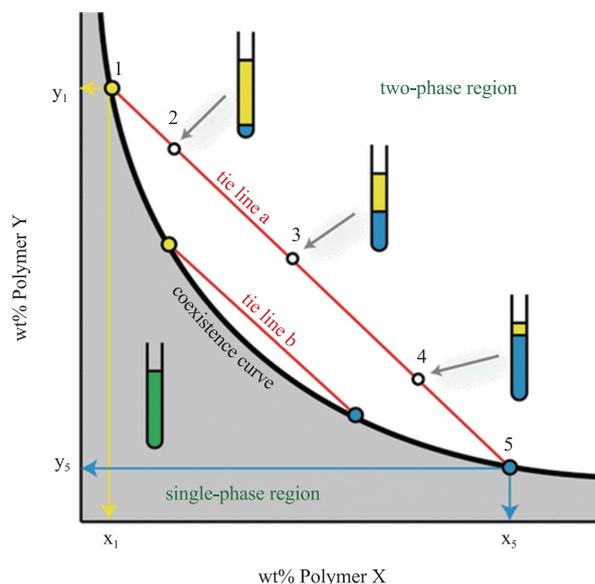


图 4 两种中性聚合物水溶液的通用相图^[49]

Fig. 4 Universal phase diagrams of aqueous solutions of two neutral polymers^[49]

剂化程度降低(例如，通过添加脱水化学剂或温度、pH 值的变化)而导致仅含有一种胶体组分的体系发生相分离，而复杂凝聚指水溶液中两个相反带电分子或胶体因静电相互作用导致的自发相分离。可通过调节液体温度、聚合物浓度和离子强度形成具有不同聚合物组成的液相，还可通过改变组分的分子量或化学计量比调节^[53]。

具有静电介导的相反电荷聚电解质通过 LLPS 形成的无膜分子密集凝聚微滴在细胞模拟工程、合成生物学和生命起源等领域受到广泛关注。Yin 等^[54]构建了一个动态的基于凝聚体的原始细胞模型，该模型可以可逆地自发膜化，并且是通过聚电解质的原位自组织而内源产生的。该模型为具有动态结构属性的人工细胞模型开辟了新的视角(图 5(a))。但无膜细胞器的适用性受到低水平的膜通透性、低包封效率和高物理化学不稳定性严重影响。为解决这一问题，Zhang 等^[55]开发了一种膜结合的大分子拥挤原始细胞模型，磷脂膜在预先形成的聚核苷酸/多糖凝聚液滴表面自发地组装制备人工细胞。与普通凝聚体相

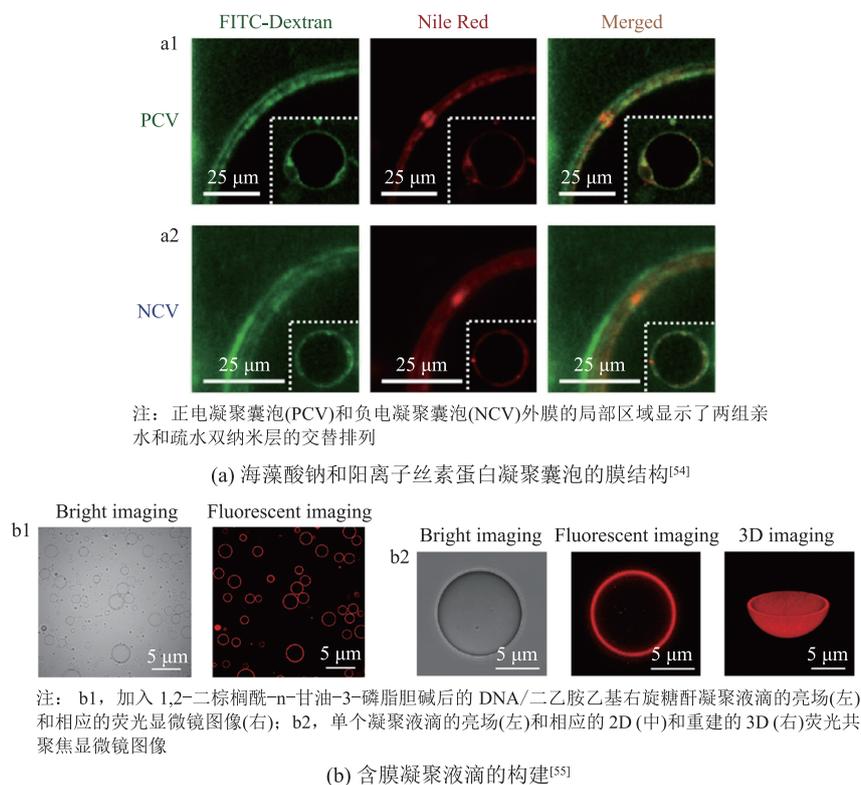


图 5 凝聚型人工细胞构建示意图

Fig. 5 Schematic diagram of the construction of condensed artificial cells

比, 磷脂膜在底层凝聚相上的部分锚定增加了凝聚体坚固性, 降低了膜的流动性, 增加了渗透性(图 5(b))。

2.3 基于聚合物的人工细胞

聚合物是人工细胞和药物载体体系中的最新成员, 与磷脂囊泡相比, 高分子量聚合物单元使聚合物具有更强的机械性和化学结构稳定性^[56]。聚合体可通过多种膜化学方法制备, 并可通过在嵌段共聚物双层中引入孔隙实现半渗透^[57-58]。聚合体是由两亲二嵌段(亲水-疏水)或三嵌段(亲水-疏水-亲水)共聚物构建块组成的囊泡。可以通过将功能配体连接到预制囊泡上, 端基功能化嵌段共聚物的自组装和使用具有生物功能亲水性嵌段的聚合物使聚合体功能化^[59], 形成具有可调渗透性的膜, 以响应外部刺激, 如 pH、温度、离子强度和电场等。Gonçalves 等^[60]通过将酶原位包裹在水核二氧化硅纳米胶囊中合成一种人工纳米细胞

器。该纳米细胞器可通过模拟真核细胞中的分层分隔进行级联反应(图 6(a))。细胞膜独特的通透性对维持细胞内稳态, 使细胞适应微环境变化具有重要意义。细胞内 pH 变化有助于离子转运、内吞、增殖、凋亡。Liu 等^[61]报道了含有席夫碱的 pH 响应性聚合体通过酶催化产酸在双层膜内同时交联和渗透。双层膜的渗透选择性使输入葡萄糖的囊泡内 pH 变化成为可能, 由 pH 梯度调节实现聚合体的通透性, 从而使聚合体可像天然生物细胞一样控制微囊有效载荷的释放(图 6(b))。

3 人工细胞的特性

合成人工细胞对研究天然生物细胞内结构和复杂生化反应具有重要意义。人工细胞作为天然生物细胞的模拟物, 具有与天然生物细胞相似的生物学功能, 如生长、新陈代谢、基因表达、细

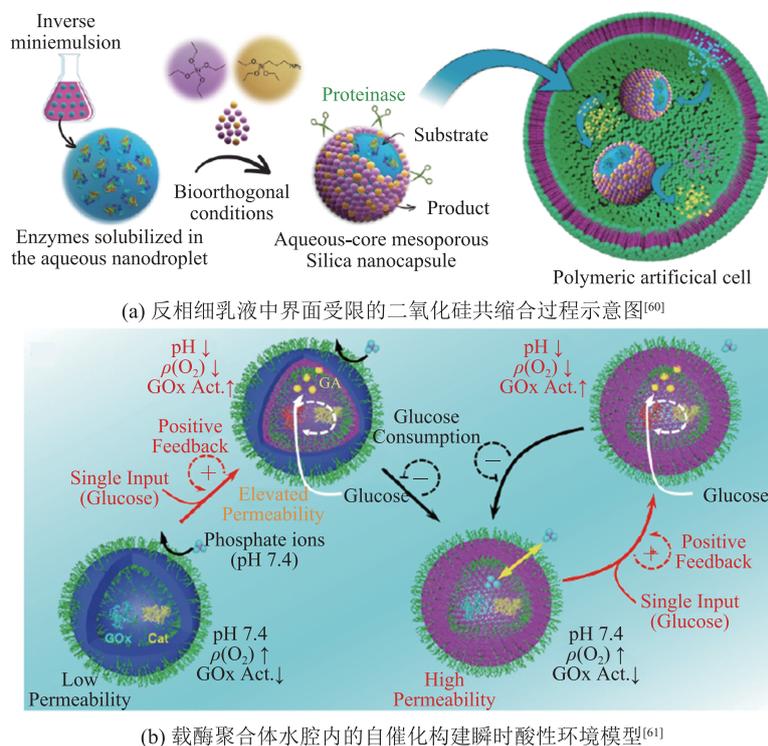


图6 聚合物模型

Fig. 6 The polymer model

胞生长、(生物)化学级联反应和细胞间通信, 这些功能通过在人工细胞系统中包裹生物活性物质实现。

3.1 代谢通路和信号网络

人工细胞是广泛使用的研究细胞结构、功能和生命起源的最佳模型。它们具有部分细胞功能, 包括区隔化、生长和分裂、适应和代谢^[62]。天然生物细胞的新陈代谢和生长所必需的氨基酸、核苷酸、糖类等物质需要细胞不断地从外界环境中获取。其中, 物质跨细胞膜运输是细胞代谢的一个主要过程。

大多数大分子化合物不容易穿透磷脂囊泡的磷脂双分子层, 这是磷脂囊泡作为人工细胞的缺点, 而人工细胞的渗透率在跨膜运输能力中具有重要作用。由纯脂肪酸或磷脂膜制成的人工细胞很难同时实现膜稳定性和对极性溶质的渗透性。脂肪酸膜具有相对较高的通透性, 但脂肪酸不像磷脂那样能够获得维持代谢所需的离子和代谢物

梯度。Jin 等^[63]合成了一种由脂肪酸、磷脂共同组成的人工细胞, 该人工细胞可同时满足膜稳定性和溶质通透性的需要。结果表明, 脂肪酸-磷脂系统可更好地保留被封装的聚合物, 允许溶质进入, 并保留膜两亲体的能力(图 7(a))。然而, 膜不透性物质的跨膜运输是通过胞吞作用和胞吐作用实现的, 涉及膜融合。一般的细胞外囊泡将生物分子(如脂类、蛋白质、核酸和代谢物)从宿主细胞包裹并运输到受体细胞, 介导膜不透分子的跨膜运输, 从而建立细胞间通信网络。由于细胞外囊泡具有良好的跨膜转运效率, 因此, 直径为 40~1 000 nm 的细胞外囊泡已被制备出, 并作为药物载体^[64]。Zhao 等^[65]将分子通过 LUV 和带相反电荷的 GUV 之间的膜融合将 LUV 的物质转运到 GUV 中。结果表明, 可通过不同体积磷脂囊泡之间的融合实现人工细胞内物质的输送, 这为研究复杂的细胞代谢奠定了重要的基础(图 7(b))。其中: 图 7(b1)为罗丹明 B 异硫氰酸

酯-葡聚糖跨膜转运的示意图; 图 7(b2)为基于融合及葡萄糖-6-磷酸在人工细胞内的下游代谢模拟的跨膜分子运输示意图)。

天然生物细胞利用信号交换信息, 并感知天然生物细胞存在的环境, 同时, 细胞间通信对协调多细胞群落中单个细胞的行为至关重要。为了解细胞如何通过细胞间通信协调其行为, 合成生物学领域已进行了合成通信网络工程。Buddingh' 等^[66]通过构建两个磷脂囊泡人工细胞群体之间的通信途径, 证明信号放大对分泌化学物质具有信号传导的作用(图 7(c))。两个磷脂囊泡不仅可通过与天然生物细胞类似的将弱信号转化为强响应信号的信号放大步骤促进相互关联的人工细胞群的发展, 还可通过交换代谢和

位置信息协调更高级别的组织。对于细胞-细胞间的信号通路而言, 膜-蛋白之间的相互作用具有重要意义。通过对天然生物细胞信号转导的深入了解, 一些可以和天然蛋白质^[67]、多肽^[68]和 DNA 折纸^[69]或凝聚物^[70-72]结合的大分子构建信号转导的人工模型被设计出来。Yang 等^[73]构建了一个基于 DNA 的模拟细胞间通信的人工信号转导系统, 通过激活固定在巨型囊泡(giant membrane vesicles, GMV)上的合成跨膜通道控制外部离子的流入, 以类似于天然膜蛋白的作用调节细胞间的信号传递和膜功能, 从而模拟天然生物细胞之间的通信(图 7(d))。

3.2 蛋白质和基因表达

人工细胞实现特定功能的一个关键机制是表

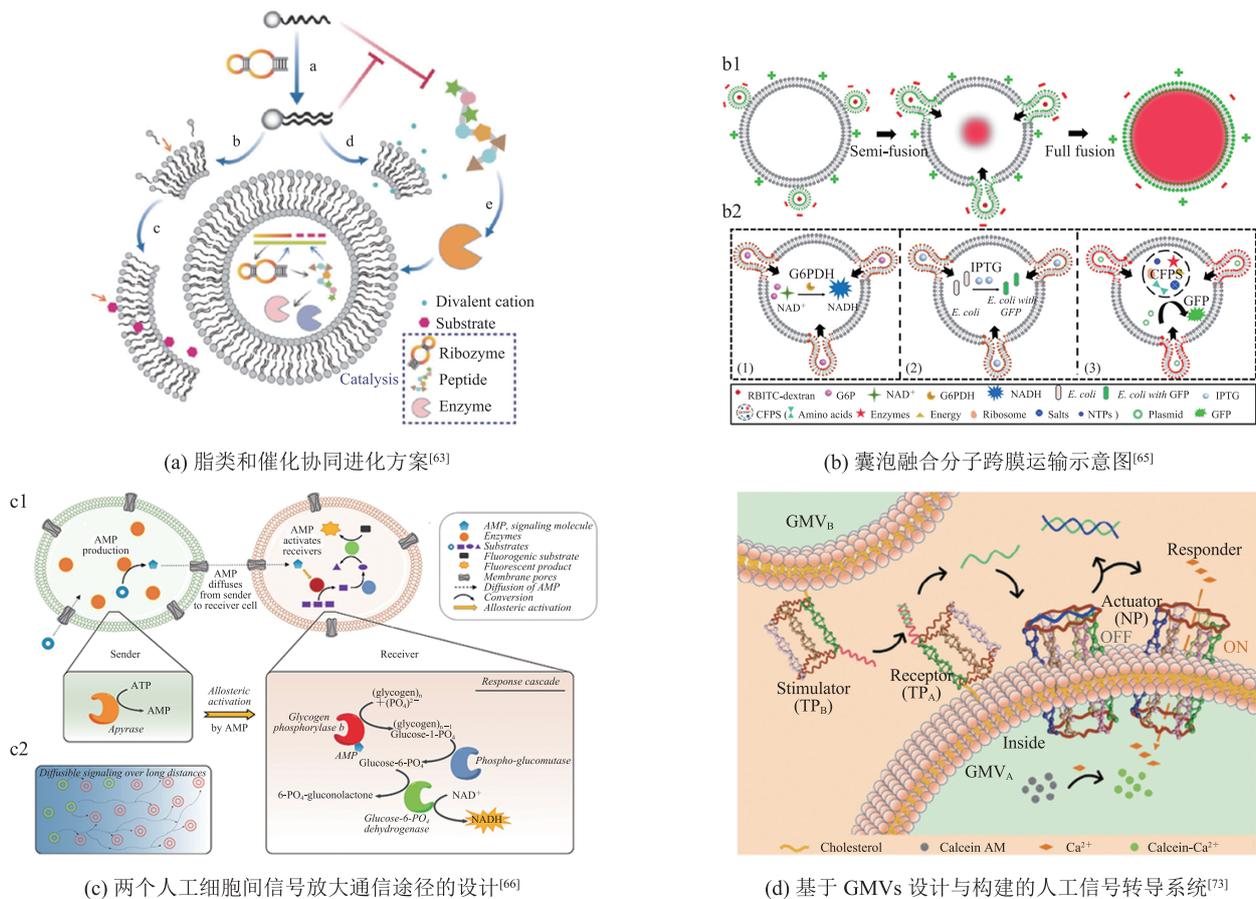


图 7 作为代谢通路与信号网络的人工细胞示意图

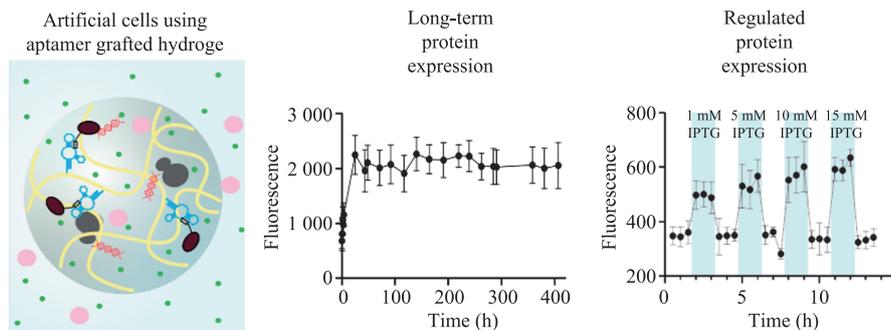
Fig. 7 Schematic representation of an artificial cells as a metabolic pathway and signaling network

达来自基因的蛋白质。为了开发能够进行整个转录和翻译过程的囊泡容器，需要在人工细胞中进行复杂的生化反应。人工细胞内部和外部环境之间的选择性物质交换取决于人工细胞膜的性质。脂质材料通常用于组装这种具有良好膜通透性的人工细胞，磷脂囊泡双层膜外壳可以促进封装的生物分子和磷脂膜之间的分子相互作用^[74]，以建立蛋白质网络^[75]，并体现磷脂囊泡的细胞功能，这在其他区室工具中可能无法实现。Hui 等^[76]的研究表明：在生理密度下，磷脂囊泡锚定的淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶和分化簇 3 (Cluster of Differentiation, CD3 ζ) 的磷酸化速度比在溶液中快数百倍，而且，磷酸化速度与蛋白质密度呈正相关。通过重新构建 T 细胞受体的近端信号网络，将纯化的酶添加到磷脂囊泡中，在双层膜中重建适合这些酶相互作用的化学环境。虽然人工细胞可以包裹能量和营养物质，但是由于人工细胞的运动会消耗能量和营养物质，因此，构建可长期表达蛋白质的人工细胞具有挑战性。图 8(a) 基于水凝胶形成的人工细胞有望成为无

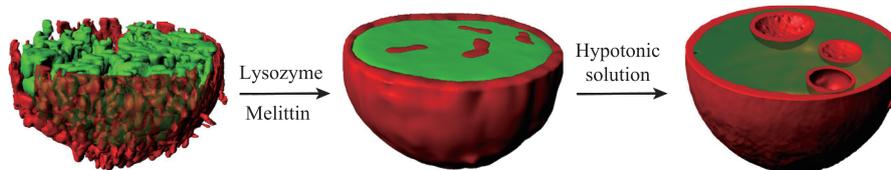
细胞合成生物学研究和生物传感器、基因传递等方面应用更具有生物相容性的研究工具。此外，Xu 等^[78]利用活体材料构建了具有多功能仿细胞特性的膜结合、分子拥挤的人工细胞。通过两个空间分离的细菌菌落 (大肠杆菌和铜绿假单胞菌) 的共同捕获和现场处理，捕获的细菌通过原位裂解自发产生具有功能生物成分的脂膜包裹的人工细胞 (图 8(b))。利用细菌菌落形成的人工细胞继承了多种生物成分，表现出多功能的细胞模拟特性，可进行复杂的加工，比如，通过原代谢活动 (糖酵解) 内源性产生 5'-三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)，并继承了足够的细菌基因表达机制，可实现体外转录和翻译。

3.3 生长、形态改变和分裂

研究人员试图在人工细胞中模拟天然生物细胞的生长、形状改变和分裂过程，从而进一步了解基本生命过程及其调控的知识。细胞的生长是自我复制过程，具体包括膜复制发生时的自我边界层复制和细胞内容物的复制，如基因组复制^[79]。操纵生长、分裂和形态可能会显著扩大人



(a) 基于嫁接适配体的水凝胶基人工细胞的长期蛋白质表达和调控^[77]



(b) 细菌性人工细胞的构建^[78]

图 8 蛋白质和基因表达的人工细胞示意图

Fig. 8 Schematic diagram as protein and gene expression of artificial cells

工细胞在细胞和合成生物学中作为细胞模型系统的用途。

人工细胞边界层的复制是将人工细胞定义为生命实体的一个关键方面。形成不断增长的边界层的一种方法是对其构件进行从头合成, 然后再进行自组装。以前, 从头合成膜的尝试主要基于脂肪酸, 因为它们能够自发地组装成胶束^[80-81]。但基于脂肪酸的膜在本质上是不稳定的, 并且不包括足够大的管腔。相比之下, 生物膜由较为复杂的分子组成, 其中的磷脂是主要成分。虽然通过组装和化学合成类磷脂结构形成囊泡已经取得了一些成功, 但大多数研究集中在向预先存在的膜上添加组分^[82-83], 其中, 磷脂囊泡由于与细胞膜的结构相似而被认为是最合适的模型。但是, 与天然生物细胞膜不同的是, 磷脂囊泡无法补充合成磷脂的催化剂, 这些仿生系统无法维持生长。Eto 等^[84]建立了一个独特的人工细胞系统, 以产生磷脂, 通过结合脂肪酸合成和无细胞基因表达系统, 合成酰基转移酶, 合成的脂肪酸通过无细胞合成的酰基转移酶依次转化为磷脂酸。Eto 等^[84]还在 *GUV* 内进行磷脂合成, 构建了一

个自生长人工细胞的平台(图 9(a))。

虽然人工细胞模拟天然生物细胞的分裂面临很多困难, 但许多研究已经报道了人工细胞分裂的基本方法(如裂变或萌发)。作为自组装的人工细胞, 磷脂囊泡具有与细胞膜相似的磷脂双层边界, 操纵它们的物理特性, 如生长和分裂, 可显著扩大它们在细胞和合成生物学中作为模型系统的用途。但是, 通过外部机械剪切^[84]、膜生长或相分离^[85]导致人工细胞分裂的方法存在缺乏控制、效率低下等问题, 并且在体积或脂质组成方面产生不对称分裂。Deshpande 等^[86]提出了一种基于微流体的策略, 用以实现类似细胞大小(约为 6 μm)磷脂囊泡的机械分裂。该微流体分裂技术提供了一种简单的方法, 用以实现类似细胞大小的磷脂囊泡的对称、高效、快速和无蛋白分裂, 即用以实现磷脂囊泡的快速生产, 对建立人工细胞生长-分裂周期具有重要意义(图 9(b))。

天然生物细胞通过动态的细胞骨架系统使磷脂膜变形, 从而获得与其生物功能密切相关的形状。细胞的形状变化和运动由微管和肌动蛋白丝系统驱动^[87]。然而, 细胞并不仅仅是为了响应细

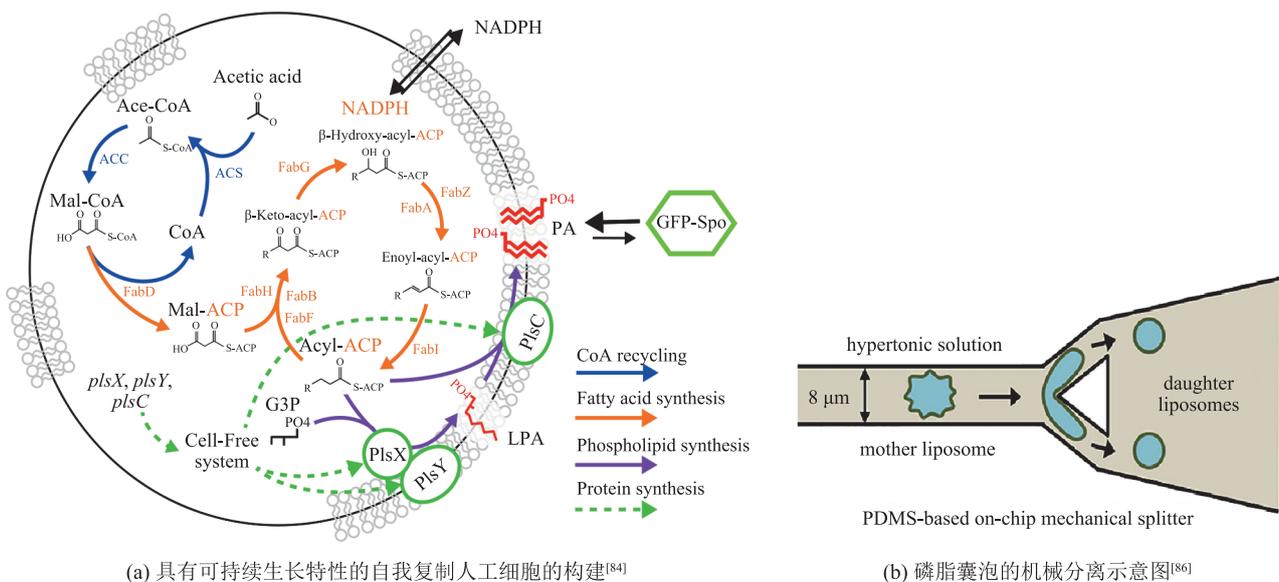


图 9 具有生长、形态改变和分裂功能的人工细胞示意图

Fig. 9 Schematic diagram of an artificial cells with the ability to grow, change shape, and divide

胞外信号而重组它们的形状，而是为了将先前的感官体验整合到细胞响应中，以便在分化过程中形成不同的形状^[88]。Gavriljuk 等^[89]在 GUV 内重组了动态微管，并建立了一个光响应信号系统，以合形态发生膜系统。该膜系统被用来响应光信号，同时保持来自形态因子的局部信号转导的基本原理，这些形态因子产生细胞内微管调节信号梯度。膜系统的形成标志着人工细胞朝着自组织细胞形态发生的生物工程迈出了一步。

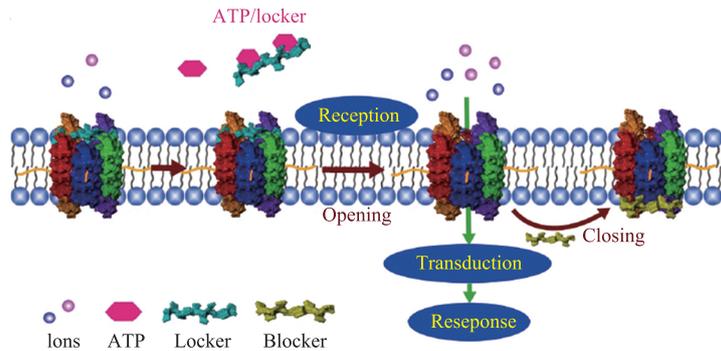
4 人工细胞的应用

作为天然生物细胞模拟物，人工细胞具有良好的生物相容性和天然材料构建的骨架，旨在代替活细胞实现其特定功能。人工细胞可以发挥天然生物细胞的部分功能，如细胞内的基因和蛋白

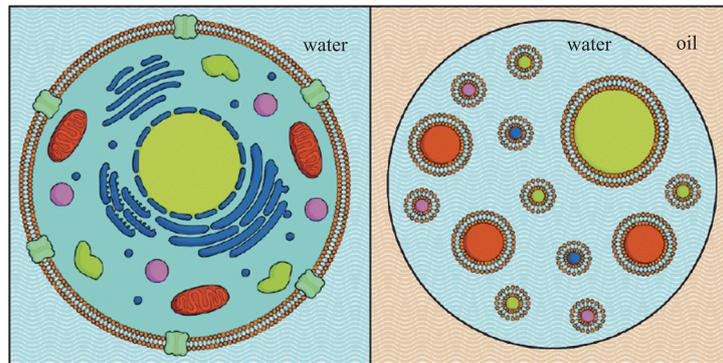
质表达、细胞间信息交流、细胞与外界环境的物质交换等。此外，人工细胞也可以应用在基因治疗、药物靶向递送系统、功能受损细胞替代品等生物学方面。

4.1 信号转导和生化反应容器

具有区域化隔室结构的人工细胞的快速发展为模拟天然生物细胞内复杂的生化反应提供了机会。近几年，一些简单的级联反应和细胞内通信已经在人工细胞中逐步实现^[90]。为维持生物组织的动态平衡，细胞通过接收、传递分子信号，并根据信号通路做出相应的反应，从而实现细胞与外界环境的物质交换和信息交流。Peng 等^[91]使用来自活细胞的巨大囊泡的封闭微环境设计了一个基于 DNA 的人工分子信号系统。通过在仿生囊泡中封装一个信号网络，可实现人工细胞与外界环境分子信号的接收、转导和响应(图 10(a))。



(a) 构建人工分子信号系统的仿生囊泡^[91]



(b) 具有分层细胞样结构的单层脂质囊泡封装在水滴^[92]

图 10 人工细胞作为信号转导和生化反应容器的示意图

Fig. 10 Schematic representation of artificial cells as vessels for signal transduction and biochemical reactions

细胞膜在专门的微环境之间提供物理边界, 人工磷脂囊泡是研究真核细胞膜功能和区隔化的一种通用工具, 其中, 多层囊泡具有多隔室和缓慢释放特性, 已被用于开发多药物给药系统, 并广泛用作研究细胞区隔化的平台和人工细胞模型的支架。Nuti 等^[92]使用微流控平台生成多层液滴系统, 该多层液滴系统具有进行酶级联反应的生化反应潜力(图 10(b))。

4.2 药物输送系统

人工细胞的出现为智能药物输送提供了一个可控化平台, 可以按照目标要求对人工细胞精确编程各种细胞功能。人工细胞应用于人类临床诊断和疾病治疗, 有望实现体内药物释放行为的监测和治疗数据结果的动态反馈。同时人工细胞的表面修饰和外膜的功能化赋予人工细胞智能响应功能。Liu 等^[93]构建了一种智能响应的人工细胞系统, 该系统基于金属-酚网络膜构建, 内置含有酶的金属-有机框架作为类似细胞器的结构。构建的人工细胞具有分子传输调控、信息交流等多种细胞功能, 在药物输送领域具有重要作用(图 11(a))。Yin 等^[94]构建了一种包裹衣康酸的人工凋亡细胞, 具有与自然凋亡细胞相似的细胞形态和膜组成, 人工细胞主要作用于肝脏, 并进一步转运至肝巨噬细胞。该人工细胞调节巨噬细胞功能, 训练具有抗炎记忆特性的肝巨噬细胞, 因此在调控炎症反应和维持肝脏稳态方面显示出逆转急性肝衰竭的治疗潜力(图 11(b))。

4.3 类天然生物细胞功能

生物系统的复杂性和脆弱性使研究人员把增强天然生物细胞功能的焦点转移到开发能模拟天然生物细胞基本功能的人工细胞上。重建细胞的关键功能红细胞缺乏细胞核和大多数细胞器, 具有相对简单的生物学复杂性。对于仿生和重建天然生物细胞功能的人工细胞来说, 红细胞有着独特的潜在仿生学焦点。Guo 等^[95]基于二氧化硅细胞生物复制方法, 提出了一个用于构建多功能

人工红细胞模块的设计概念, 以构建出能充分模仿天然红细胞的人工红细胞。该人工细胞模仿天然红细胞的特性, 具有长循环时间所需要的变形性和天然细胞膜表面(图 12(a))。人工细胞还可以模仿血小板的凝血特性, Hu 等^[96]合成了一种聚合物人工细胞, 其外层来源于天然血小板膜。血小板膜包裹的纳米颗粒减少了巨噬细胞的细胞摄取, 并与受损血管系统和血小板黏附病原体结合。Anselmo 等^[97]建立了具有血小板柔性、中空和圆盘状属性的人工细胞。Anselmo 等^[97]介导了冯·维勒布兰德(von Willebrand)因子和胶原黏附的配体的异多价呈现, 以及对激活的血小板的特定聚集。在体外生理流动条件下, 与球形和刚性盘状人工细胞相比, 类血小板人工细胞表现出更强的表面结合力、定点选择性的黏附性和血小板聚集性, 有效地模拟和优化了天然血小板的止血功能(图 12(b))。人工细胞可以替代天然生物细胞发挥治疗的功能, 各种仿生组件已被提出^[98]。在合成治疗人工细胞的设计中, 一个关键的挑战是模仿天然细胞的高阶功能, 这些功能可以精确地感知外部环境, 做出内部决定并触发反馈^[99]。Chen 等^[100]通过使用合成材料模拟葡萄糖响应性胰岛素分泌来生成人工 β 细胞, 该细胞具有多室的“囊泡中囊泡”上层结构, 并具有葡萄糖代谢系统和膜融合结构。该人工 β 细胞囊括了 β 细胞的一些关键功能, 包括感知血糖水平、内部转导信号和通过囊泡融合动态分泌胰岛素, 从而进一步证明了利用人工细胞将血糖浓度控制在接近正常范围的水平是可行的(图 12(c))。

4.4 酶与基因治疗

人工细胞的内酶和药物的包封、物质跨膜运输和靶向治疗能力使人工细胞在生物医药领域具有广泛应用。研究人员在人工细胞模拟天然生物细胞功能方面的研究, 如细胞内级联反应、基因和蛋白质表达及细胞间通信等, 促进了人工细胞在医学领域的发展。开发具有生物相容性, 同

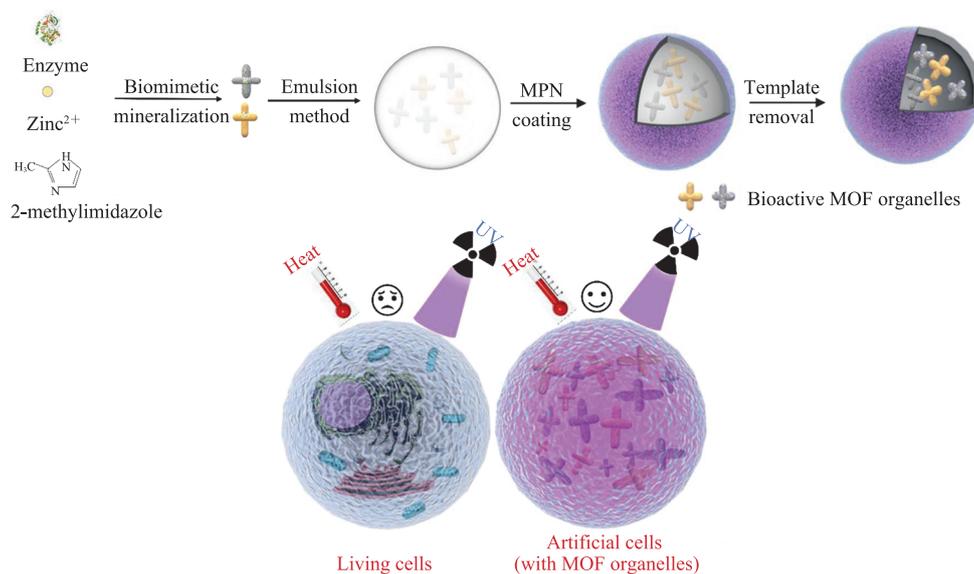
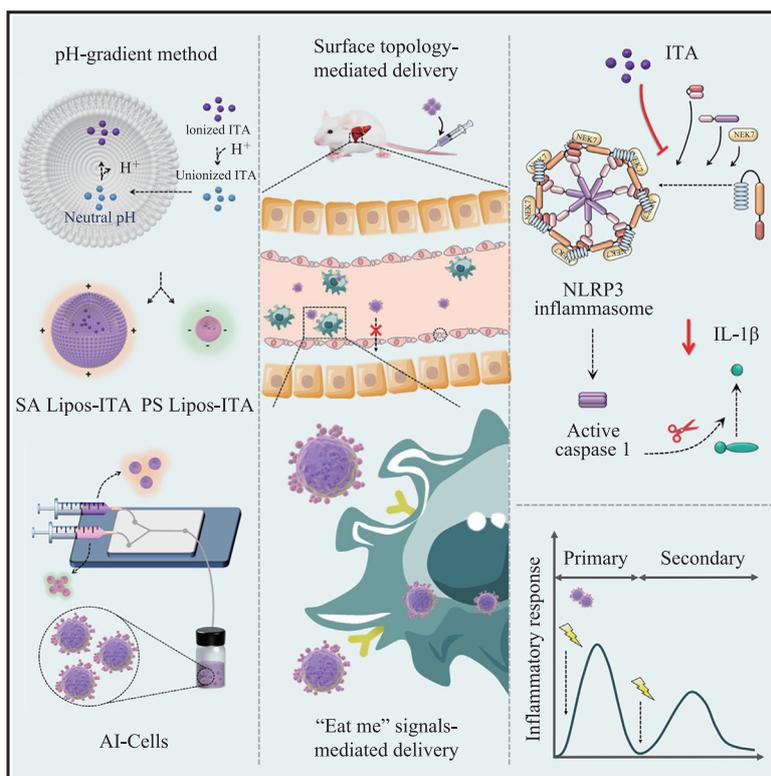
(a) 基于金属-有机框架的人工细胞构建示意图^[93](b) 包裹衣康酸的人工凋亡细胞的构建及对肝巨噬细胞的精确递送和训练^[94]

图 11 人工细胞作为给药系统示意图

Fig. 11 Schematic representation of an artificial cells as a drug delivery system

时能够与天然生物细胞建立同源化学通信通道，且具有治疗性的人工细胞是合成生物学和生物工程的重要挑战。Liu 等^[101]构建一种新的基于生物

来源的凝聚囊泡的人工细胞模型，使用隔离的酶介导空间偶联级联反应，向人工细胞介导的一氧化氮诱导的血管舒张迈出了一步，同时，该模型

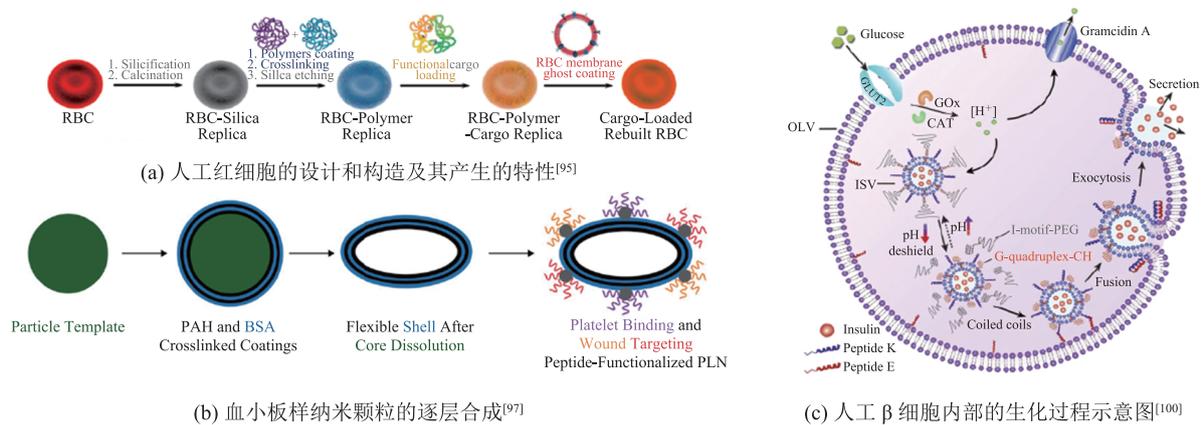


图 12 具有类天然生物细胞功能的人工细胞示意图

Fig. 12 Schematic diagram of an artificial cells with functions similar to natural biological cells

还具有高血液相容性, 并可以增加血液循环时间(图 13(a))。高效、选择性强、不良反应少的特点使基因治疗成为一种治疗癌症很有前途的方法, 开发具有生物相容性和肿瘤细胞靶向性的人工细胞是基因治疗面临的挑战。Zhao 等^[102]利用癌细胞衍生的组蛋白和膜制备人工细胞, 模拟癌细胞的基因保护和转染功能。该人工细胞具有类似癌细胞的免疫逃逸和同源靶向能力, 在体外和体内均表现出较高的生物相容性和基因转染能力, 是一种很有前景的肿瘤基因治疗工具(图 13(b))。

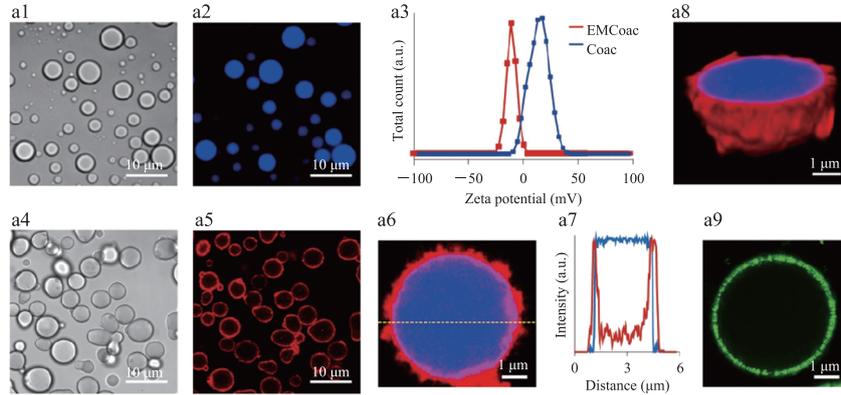
4.5 作为细胞工厂

细胞生物工程的发展使研究人员向更具挑战性的方向深入, 即通过生物化学手段自下而上地在人工细胞中重建生物结构和过程。通过将感兴趣的蛋白质与任何不想要的蛋白质或细胞相互分离, 以形成具有某种特定蛋白质的人工细胞^[103]。当人工细胞中具有完整信号通路所需的蛋白质时, 基于分子细胞和化学、生物学、物理学的见解, 研究人员可以操纵人工细胞模拟天然生物细胞的系统活动^[104], 为找到部分解决生命起源之谜的方法提供了途径。人工细胞作为细胞工厂的核心是内部能量的可持续性产生。自我维持的能量系统是功能化人工细胞的标志, 是人工细胞发展领域的研究人员正在努力尝试

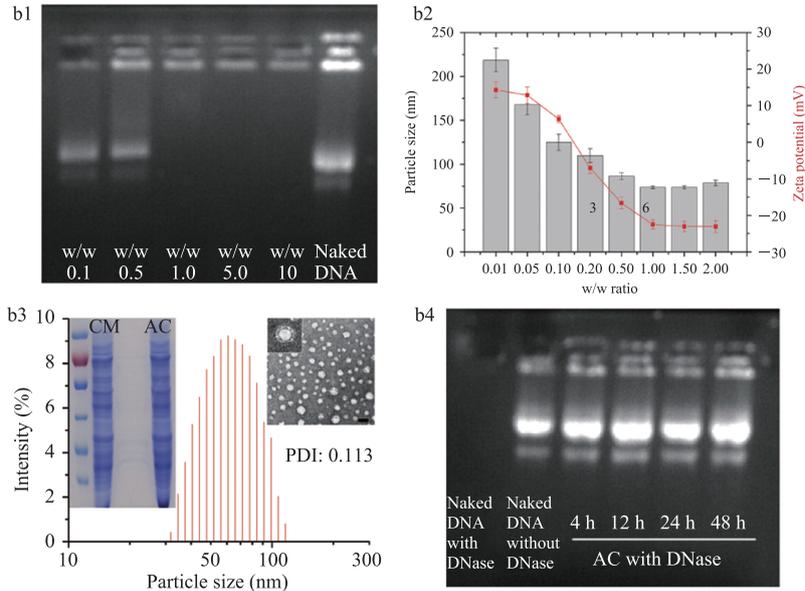
的细胞类型^[105]。三磷酸腺苷几乎是所有生命形式中驱动细胞内生化反应最重要的直接能量来源。在人工细胞中建立更复杂的反应需要 ATP, 因此, 一些研究将 ATP 添加到人工细胞中^[106]。Zheng 等^[107]构建了一种高效的细胞内光驱动生命支持系统, 通过将菠菜类囊体片段与磷脂胆碱和胆固醇重组, 合成类似蛋白脂质体的结构。在红光照射下, 光驱动生命支持系统可使不同细胞系的细胞内 ATP 浓度提高 1.38~2.45 倍。该光能人工细胞器使针对细胞内能量供应的光学疗法的发展成为可能(图 14(a))。Miller 等^[108]构建了一个连接自然和合成生物界的人工光合作用系统, 通过使用微流控技术将光合膜包裹在细胞大小的液滴中, 并进行操作, 以模拟叶绿体的方法。这些液滴样的人工细胞可以通过光驱动酶或酶的级联反应, 并通过其催化特性进行多路实时分析(图 14(b))。

5 总结和展望

在过去的几十年中, 人工细胞的构建是一个迅速崛起的领域, 自下而上构建人工细胞的合成生物学方法成功地重现了生命系统中发生的各种现象。通过自下而上的方法构建具有天然生物细



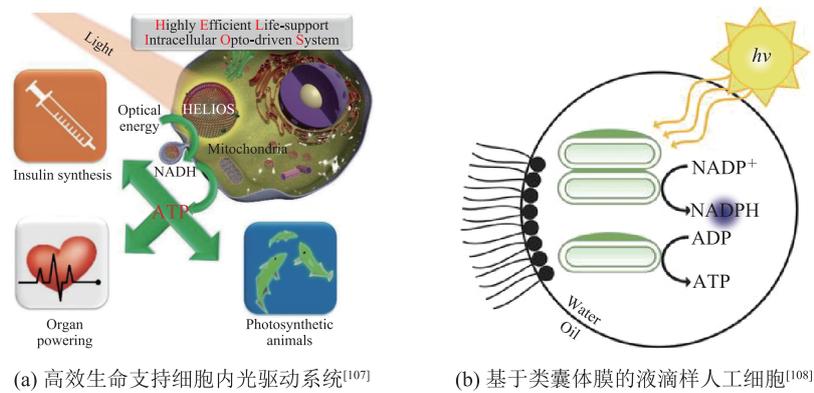
(a) 红细胞膜包裹凝聚体人工细胞的构建与鉴定^[101]



(b) 利用癌细胞衍生的组蛋白和膜制备人工细胞的制备和表征^[102]

图 13 用于酶和基因治疗的人工细胞示意图

Fig. 13 Schematic representation of artificial cells for enzyme and gene therapy



(a) 高效生命支持细胞内光驱动系统^[107]

(b) 基于类囊体膜的液滴样人工细胞^[108]

图 14 人工细胞作为细胞工厂示意图

Fig. 14 Schematic diagram of an artificial cells serving as a cellular factory

胞样的结构, 并显示出天然生物细胞的一些关键特征的人工细胞是研究人员研究的焦点。人工细胞通过结合天然生物细胞的特性获得具有特定功能的类天然细胞, 使得具有特定应用的人工细胞为生物技术的发展提供了前所未有的机会, 因为它们使研究人员能够结合生物系统的特性, 如纳米级效率、治疗、诊断应用的适应性。

利用磷脂和聚合物等材料通过自下而上的方法构建的人工细胞已被证明可以模拟天然生物细胞的一些功能, 包括能量生成、物质跨膜运输、细胞对外部环境的感知等。人工细胞具有的类天然生物细胞功能使其在生物医药领域具有广泛的应用, 比如, 物质和信息交换载体、简单信号处理。人工细胞还有多种治疗用途, 如药物输送、替代天然细胞、特定酶与基因的治疗等。然而, 研究人员对人工细胞的研究仅局限于此, 如何在人工细胞中实现天然生物细胞内复杂的生化反应, 不同人工细胞群体间协同合作, 人工细胞和外界环境的高效交流等仍是众多研究人员面临的挑战性问题。此外, 构建具有完整天然生物细胞所有功能的人工细胞, 自动催化细胞内的生化反应, 以此实现单个细胞、细胞与外界环境之间的简单相互作用, 也是研究人员亟待解决的问题。通过进一步优化, 这些人工细胞有望具有一些天然生物细胞的功能, 并在生命科学研究中发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Wang XJ, Du H, Wang Z, et al. Versatile phospholipid assemblies for functional synthetic cells and artificial tissues [J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(6): 2002635.
- [2] Roodbeen R, Van Hest JCM. Synthetic cells and organelles: compartmentalization strategies [J]. *BioEssays*, 2009, 31(12): 1299-1308.
- [3] Xu C, Hu S, Chen XY. Artificial cells: from basic science to applications [J]. *Materials Today*, 2016, 19(9): 516-532.
- [4] Pohorille A, Deamer D. Artificial cells: prospects for biotechnology [J]. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(3): 123-128.
- [5] Chang TMS. 1957 Report on "method for preparing artificial hemoglobin corpuscles" [D]. Montreal: McGill University, 1957.
- [6] Tian LF, Li M, Patil AJ, et al. Artificial morphogen-mediated differentiation in synthetic protocells [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3321.
- [7] Yoo JW, Irvine DJ, Discher DE, et al. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2011, 10(7): 521-535.
- [8] Luisi PL, Walde P, Oberholzer T. Lipid vesicles as possible intermediates in the origin of life [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1999, 4(1): 33-39.
- [9] Hutchison CA, Peterson SN, Gill SR, et al. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome [J]. *Science*, 1999, 286(5447): 2165-2169.
- [10] Rasmussen S, Chen LH, Nilsson M, et al. Bridging nonliving and living matter [J]. *Artificial Life*, 2003, 9(3): 269-316.
- [11] Miller DM, Gulbis JM. Engineering protocells: prospects for self-assembly and nanoscale production-lines [J]. *Life*, 2015, 5(2): 1019-1053.
- [12] Mann S. Systems of creation: the emergence of life from nonliving matter [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2012, 45(12): 2131-2141.
- [13] Ugrinic M, deMello A, Tang TYD. Microfluidic tools for bottom-up synthetic cellularity [J]. *Chem*, 2019, 5(7): 1727-1742.
- [14] Kobayashi N. Artificial cells for the development of cell therapy [J]. *Cell Transplantation*, 2008, 17(1-2): 3-9.
- [15] Lu Y, Allegri G, Huskens J. Vesicle-based artificial cells: materials, construction methods and applications [J]. *Materials Horizons*, 2022, 9(3): 892-907.

- [16] Hammer DA, Kamat NP. Towards an artificial cell [J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(18): 2882-2890.
- [17] Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review [J]. *Current Drug Delivery*, 2007, 4(4): 297-305.
- [18] Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, et al. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery [J]. *Journal of Controlled Release*, 2008, 126(3): 187-204.
- [19] Sou K, Le DL, Sato H. Nanocapsules for programmed neurotransmitter release: toward artificial extracellular synaptic vesicles [J]. *Small*, 2019, 15(17): 1900132.
- [20] Diltemiz SE, Tavafoghi M, De Barros NR, et al. Use of artificial cells as drug carriers [J]. *Materials Chemistry Frontiers*, 2021, 5(18): 6672-6692.
- [21] Pitard B, Richard P, Duñarach M, et al. ATP synthesis by the F_0F_1 ATP synthase from thermophilic *Bacillus PS3* reconstituted into liposomes with bacteriorhodopsin: 1. Factors defining the optimal reconstitution of ATP synthases with bacteriorhodopsin [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 235(3): 769-778.
- [22] Otrin L, Kleineberg C, Caire da Silva L, et al. Artificial organelles for energy regeneration [J]. *Advanced Biosystems*, 2019, 3(6): 1800323.
- [23] Kùchler A, Yoshimoto M, Luginbùhl S, et al. Enzymatic reactions in confined environments [J]. *Nature Nanotechnology*, 2016, 11(5): 409-420.
- [24] Gaur D, Dubey NC, Tripathi BP. Biocatalytic self-assembled synthetic vesicles and coacervates: from single compartment to artificial cells [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2022, 299: 102566.
- [25] Moon K, Hur J, Kim KP, et al. Surface-functionalizable plant-derived extracellular vesicles for targeted drug delivery carrier using grapefruit [J]. *Advanced Materials Interfaces*, 2023, 10(22): 2300220.
- [26] Qian XM, Westensee IN, Fernandes CC, et al. Enzyme mimic facilitated artificial cell to mammalian cell signal transfer [J]. *Angewandte Chemie*, 2021, 133(34): 18852-18859.
- [27] Seo H, Lee H. Spatiotemporal control of signal-driven enzymatic reaction in artificial cell-like polymersomes [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 5179.
- [28] Albanese P, Mavelli F, Altamura E. Light energy transduction in liposome-based artificial cells [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1161730.
- [29] Deng NN, Yelleswarapu M, Huck WTS. Monodisperse uni- and multicompartment liposomes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(24): 7584-7591.
- [30] Zhang YW, Wang ZF, Li M, et al. Osmotic-induced reconfiguration and activation in membranized coacervate-based protocells [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(18): 10396-10403.
- [31] Tanner P, Baumann P, Enea R, et al. Polymeric vesicles: from drug carriers to nanoreactors and artificial organelles [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44(10): 1039-1049.
- [32] Zhu LJ, Zhao LL, Qu XZ, et al. pH-sensitive polymeric vesicles from coassembly of amphiphilic cholate grafted poly (L-lysine) and acid-cleavable polymer-drug conjugate [J]. *Langmuir*, 2012, 28(33): 11988-11996.
- [33] Gràfe D, Gaitzsch J, Appelhans D, et al. Cross-linked polymersomes as nanoreactors for controlled and stabilized single and cascade enzymatic reactions [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(18): 10752-10761.
- [34] Rodríguez-Arco L, Kumar BVVSP, Li M, et al. Modulation of higher-order behaviour in model protocell communities by artificial phagocytosis [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(19): 6333-6337.
- [35] Huang X, Patil AJ, Li M, et al. Design and

- construction of higher-order structure and function in proteinosome-based protocells [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(25): 9225-9234.
- [36] Kamiya K, Takeuchi S. Giant liposome formation toward the synthesis of well-defined artificial cells [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5(30): 5911-5923.
- [37] Rideau E, Dimova R, Schwille P, et al. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking [J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(23): 8572-8610.
- [38] Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4(2): 145-160.
- [39] Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, et al. Liposomal formulations in clinical use: an updated review [J]. *Pharmaceutics*, 2017, 9(2): 12.
- [40] Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly (ethylene glycol)-protein conjugates [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55(10): 1261-1277.
- [41] Jensen GM, Hodgson DF. Opportunities and challenges in commercial pharmaceutical liposome applications [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2020, 154-155: 2-12.
- [42] Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(1): 36-48.
- [43] Shetty S C, Yandrapalli N, Pinkwart K, et al. Directed signaling cascades in monodisperse artificial eukaryotic cells [J]. *ACS nano*, 2021, 15(10): 15656-15666.
- [44] Engelhart AE, Adamala KP, Szostak JW. A simple physical mechanism enables homeostasis in primitive cells [J]. *Nature Chemistry*, 2016, 8(5): 448-453.
- [45] Tan HL, Guo S, Dinh ND, et al. Heterogeneous multi-compartmental hydrogel particles as synthetic cells for incompatible tandem reactions [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 663.
- [46] Deng N N, Yelleswarapu M, Zheng L, et al. Microfluidic assembly of monodisperse vesosomes as artificial cell models [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(2): 587-590.
- [47] Dix JA, Verkman AS. Crowding effects on diffusion in solutions and cells [J]. *Annual Review of Biophysics*, 2008, 37: 247-263.
- [48] Luby-Phelps K. The physical chemistry of cytoplasm and its influence on cell function: an update [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2013, 24(17): 2593-2596.
- [49] Keating CD. Aqueous phase separation as a possible route to compartmentalization of biological molecules [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2012, 45(12): 2114-2124.
- [50] Martin N. Dynamic synthetic cells based on liquid-liquid phase separation [J]. *ChemBioChem*, 2019, 20(20): 2553-2568.
- [51] Albertsson PÅ. Partition of cell particles and macromolecules in polymer two-phase systems [J]. *Advances in Protein Chemistry*, 1970, 24: 309-341.
- [52] Van der Gucht J, Spruijt E, Lemmers M, et al. Polyelectrolyte complexes: bulk phases and colloidal systems [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, 361(2): 407-422.
- [53] Li M, Huang X, Tang TYD, et al. Synthetic cellularity based on non-lipid micro-compartments and protocell models [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 22: 1-11.
- [54] Yin ZP, Tian LF, Patil AJ, et al. Spontaneous membranization in a silk-based coacervate protocell model [J]. *Angewandte Chemie*, 2022, 134(17): e202202302.
- [55] Zhang YW, Chen YF, Yang XH, et al. Giant coacervate vesicles as an integrated approach to cytomimetic modeling [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(7): 2866-2874.
- [56] Gaitzsch J, Appelhans D, Wang L, et al. Synthetic

- bio-nanoreactor: mechanical and chemical control of polymersome membrane permeability [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(18): 4448-4451.
- [57] Broz P, Driamov S, Ziegler J, et al. Toward intelligent nanosize bioreactors: a pH-switchable, channel-equipped, functional polymer nanocontainer [J]. *Nano Letters*, 2006, 6(10): 2349-2353.
- [58] Kumar M, Grzelakowski M, Zilles J, et al. Highly permeable polymeric membranes based on the incorporation of the functional water channel protein Aquaporin Z [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(52): 20719-20724.
- [59] Pawar PV, Gohil SV, Jain JP, et al. Functionalized polymersomes for biomedical applications [J]. *Polymer Chemistry*, 2013, 4(11): 3160-3176.
- [60] Gonçalves JP, Promlok D, Ivanov T, et al. Confining the sol-gel reaction at the water/oil interface: creating compartmentalized enzymatic nano-organelles for artificial cells [J]. *Angewandte Chemie*, 2023, 135(11): e202216966.
- [61] Liu GH, Tan JJ, Cen J, et al. Oscillating the local milieu of polymersome interiors via single input-regulated bilayer crosslinking and permeability tuning [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 585.
- [62] Hershewe JM, Warfel KF, Iyer SM, et al. Improving cell-free glycoprotein synthesis by characterizing and enriching native membrane vesicles [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 2363.
- [63] Jin J, Kamat NP, Jena S, et al. Fatty acid/phospholipid blended membranes: a potential intermediate state in protocellular evolution [J]. *Small*, 2018, 14(15): 1704077.
- [64] Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(4): 213-228.
- [65] Zhao JJ, Zhang Y, Zhang XX, et al. Mimicking cellular metabolism in artificial cells: universal molecule transport across the membrane through vesicle fusion [J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(9): 3811-3818.
- [66] Buddingh' BC, Elzinga J, van Hest JCM. Intercellular communication between artificial cells by allosteric amplification of a molecular signal [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1652.
- [67] Meijer LHH, Joesaar A, Steur E, et al. Hierarchical control of enzymatic actuators using DNA-based switchable memories [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1117.
- [68] Kumar S, Henning-Knechtel A, Magzoub M, et al. Peptidomimetic-based multidomain targeting offers critical evaluation of $A\beta$ structure and toxic function [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(21): 6562-6574.
- [69] Malwal SR, O'Dowd B, Feng XX, et al. Bisphosphonate-generated ATP-analogs inhibit cell signaling pathways [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(24): 7568-7578.
- [70] Terrell JL, Wu HC, Tsao CY, et al. Nano-guided cell networks as conveyors of molecular communication [J]. *Nature Communications*, 2015, 6(1): 8500.
- [71] Dora Tang TY, Rohaida Che Hak C, Thompson AJ, et al. Fatty acid membrane assembly on coacervate microdroplets as a step towards a hybrid protocell model [J]. *Nature Chemistry*, 2014, 6(6): 527-533.
- [72] Langton MJ, Keymeulen F, Ciaccia M, et al. Controlled membrane translocation provides a mechanism for signal transduction and amplification [J]. *Nature Chemistry*, 2017, 9(5): 426-430.
- [73] Yang QX, Guo ZZ, Liu H, et al. A cascade signaling network between artificial cells switching activity of synthetic transmembrane channels [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 143(1): 232-240.
- [74] Herianto S, Rathod J, Shah P, et al. Systematic

- analysis of phosphatidylinositol-5-phosphate-interacting proteins using yeast proteome microarrays [J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 93(2): 868-877.
- [75] Shim J, Zhou CQ, Gong T, et al. Building protein networks in synthetic systems from the bottom-up [J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 49: 107753.
- [76] Hui E, Vale RD. *In vitro* membrane reconstitution of the T-cell receptor proximal signaling network [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2014, 21(2): 133-142.
- [77] Lai SN, Zhou XY, Ouyang XF, et al. Artificial cells capable of long-lived protein synthesis by using aptamer grafted polymer hydrogel [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 9(1): 76-83.
- [78] Xu C, Martin N, Li M, et al. Living material assembly of bacteriogenic protocells [J]. *Nature*, 2022, 609(7929): 1029-1037.
- [79] Murtas G. Internal lipid synthesis and vesicle growth as a step toward self-reproduction of the minimal cell [J]. *Systems and Synthetic Biology*, 2010, 4(2): 85-93.
- [80] Brea RJ, Hardy MD, Devaraj NK. Towards self-assembled hybrid artificial cells: novel bottom-up approaches to functional synthetic membranes [J]. *Chemistry—A European Journal*, 2015, 21(36): 12564-12570.
- [81] Douliez JP, Houssou BH, Fameau AL, et al. Self-assembly of bilayer vesicles made of saturated long chain fatty acids [J]. *Langmuir*, 2016, 32(2): 401-410.
- [82] Takakura K, Yamamoto T, Kurihara K, et al. Spontaneous transformation from micelles to vesicles associated with sequential conversions of comprising amphiphiles within assemblies [J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(17): 2190-2192.
- [83] Budin I, Devaraj NK. Membrane assembly driven by a biomimetic coupling reaction [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(2): 751-753.
- [84] Eto S, Matsumura R, Shimane Y, et al. Phospholipid synthesis inside phospholipid membrane vesicles [J]. *Communications Biology*, 2022, 5(1): 1016.
- [85] Zhu TF, Szostak JW. Coupled growth and division of model protocell membranes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(15): 5705-5713.
- [86] Deshpande S, Spoelstra WK, Van Doorn M, et al. Mechanical division of cell-sized liposomes [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(3): 2560-2568.
- [87] Huber F, Boire A, López MP, et al. Cytoskeletal crosstalk: when three different personalities team up [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, 32: 39-47.
- [88] Skoge M, Yue H, Erickstad M, et al. Cellular memory in eukaryotic chemotaxis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(40): 14448-14453.
- [89] Gavriljuk K, Scocozza B, Ghasemalizadeh F, et al. A self-organized synthetic morphogenic liposome responds with shape changes to local light cues [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1548.
- [90] Hindley JW, Elani Y, Mcgilvery CM, et al. Light-triggered enzymatic reactions in nested vesicle reactors [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1093.
- [91] Peng RZ, Xu LJ, Wang HJ, et al. DNA-based artificial molecular signaling system that mimics basic elements of reception and response [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 978.
- [92] Nuti N, Verboket PE, Dittrich PS. Multivesicular droplets: a cell model system to study compartmentalised biochemical reactions [J]. *Lab on A Chip*, 2017, 17(18): 3112-3119.
- [93] Liu J, Guo Z, Liang K. Biocatalytic metal-organic framework-based artificial cells [J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29(45): 1905321.
- [94] Yin N, Zhang W, Sun X X, et al. Artificial cells delivering itaconic acid induce anti-inflammatory memory-like macrophages to reverse acute liver

- failure and prevent reinjury [J]. *Cell Reports Medicine*, 2023, 4(8): 101132.
- [95] Guo JM, Agola JO, Serda R, et al. Biomimetic rebuilding of multifunctional red blood cells: modular design using functional components [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(7): 7847-7859.
- [96] Hu CMJ, Fang RH, Wang KC, et al. Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking [J]. *Nature*, 2015, 526(7571): 118-121.
- [97] Anselmo AC, Modery-Pawłowski CL, Menegatti S, et al. Platelet-like nanoparticles: mimicking shape, flexibility, and surface biology of platelets to target vascular injuries [J]. *ACS Nano*, 2014, 8(11): 11243-11253.
- [98] Szostak JW, Bartel DP, Luisi PL. Synthesizing life [J]. *Nature*, 2001, 409(6818): 387-390.
- [99] Lu Y, Aimetti AA, Langer R, et al. Bioresponsive materials [J]. *Nature Reviews Materials*, 2016, 2(1): 16075.
- [100] Chen ZW, Wang JQ, Sun WJ, et al. Synthetic beta cells for fusion-mediated dynamic insulin secretion [J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(1): 86-93.
- [101] Liu SY, Zhang YW, Li M, et al. Enzyme-mediated nitric oxide production in vasoactive erythrocyte membrane-enclosed coacervate protocells [J]. *Nature Chemistry*, 2020, 12(12): 1165-1173.
- [102] Zhao X, Tang DY, Wu Y, et al. An artificial cell system for biocompatible gene delivery in cancer therapy [J]. *Nanoscale*, 2020, 12(18): 10189-10195.
- [103] Roberts MAJ, Cranenburgh RM, Stevens MP, et al. Synthetic biology: biology by design [J]. *Microbiology*, 2013, 159(Pt 7): 1219-1220.
- [104] Jia HY, Schwille P. Bottom-up synthetic biology: reconstitution in space and time [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 60: 179-187.
- [105] Yewdall NA, Mason AF, Van Hest JCM. The hallmarks of living systems: towards creating artificial cells [J]. *Interface Focus*, 2018, 8(5): 20180023.
- [106] Sperl JM, Sieber V. Multienzyme cascade reactions-status and recent advances [J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(3): 2385-2396.
- [107] Zheng DW, Xu L, Li CX, et al. Photo-powered artificial organelles for ATP generation and life-sustainment [J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(52): 1805038.
- [108] Miller TE, Beneyton T, Schwander T, et al. Light-powered CO₂ fixation in a chloroplast mimic with natural and synthetic parts [J]. *Science*, 2020, 368(6491): 649-654.