

智能凝胶在细胞三维培养中的研究进展

马丹丹, 胡 克, 马晓娥, 周乃珍, 顾 宁, 张天柱*

(东南大学生物科学与医学工程学院, 江苏省生物材料与器件重点实验室, 南京 210009)

摘要:与传统的体外二维细胞培养(2D 培养)相比, 体外三维细胞培养(3D 培养)因能更好地模拟细胞外基质(ECM)而备受关注。智能水凝胶不仅具有良好的生物相容性, 其特殊的结构性能能有效模拟细胞外基质, 实现细胞 3D 培养, 而且通过智能凝胶简单的响应性, 可以改变细胞生长的微环境, 实现在三维空间内对细胞进行特异性的培养和研究。本文基于智能凝胶和细胞 3D 培养, 综述了智能凝胶的类型、在细胞 3D 培养中的应用, 以及智能凝胶对细胞生长和行为的影响。

关键词:智能水凝胶; 三维细胞培养; 温度响应; pH 响应; 光响应

近几年用于细胞培养的水凝胶的研究热点, 逐渐集中于如何模拟体内 ECM 的特殊性能(如细胞粘附配体等), 从而进一步研究不同性能对细胞行为的影响^[1,2], 因而对外界环境的刺激具有灵敏反应的智能凝胶备受关注^[3]。传统水凝胶对外界环境(如温度、pH 值等)的变化不敏感, 尽管传统水凝胶已经成功应用于细胞培养, 但大部分都基于细胞 2D 培养, 且不能实现智能响应, 所以不能有效模拟细胞在体内生长的微环境, 也无法满足人们在三维空间内培养和研究细胞的需求。利用智能凝胶进行细胞培养, 不仅能实现细胞 3D 培养, 有效模拟 ECM, 而且通过外界环境的简单变化, 引起水凝胶可逆响应, 无需引入对细胞有害的因素, 就可以控制细胞生长的微环境(例如弹性、硬度等), 观察细胞随微环境变化的应激反应, 实现细胞在凝胶中吸附/分离可控。

此外, 智能凝胶还易于修饰氨基酸、多肽和具有特殊功能的聚合物等, 实现从不同角度对细胞进行培养和研究^[4~6]。不仅如此, 智能凝胶还可以通过动态可调的培养体系, 在时间和空间上控制细胞生长微环境^[7], 从而控制细胞的形貌、状态、增殖和分化, 为我们研究细胞微环境的动态变化对细胞的影响, 研究从干细胞分化到肿瘤细胞转移的过程提供平台^[8~11]。因此, 智能凝胶在细胞 3D 培养领域前景可观。

1 智能凝胶类型

对外界环境的刺激具有灵敏反应性的大分子水凝胶被称为智能生物材料(或智能凝胶)^[3]。智能凝胶会随外界环境(如温度、pH 值、光、电场、离子强度等)的微小变化, 产生相应的物理结构和化学性质的变化, 根据不同的响应情况, 可分为: 温度敏感性水凝胶^[12~14]、pH 敏感性水凝胶^[15~17]、光敏感性水凝胶^[18~20]、电场敏感性水凝胶^[21~25]等。

1.1 温度敏感性水凝胶

温度敏感性水凝胶是最常见的一类智能水凝胶, 该类水凝胶能够感知外界的温度变化, 并产生相应的物理性质和化学性质变化, 在某一温度附近的溶胀比变化可达到几倍到几十倍, 这一温度叫做该水凝胶的相转变温度或最低临界共溶温度(LCST)。当温度高于 LCST 时, 该类水凝胶会失水收缩, 发生相离; 当温度低于 LCST 时, 凝胶的状态能发生可逆的变化, 在水中溶胀。在温敏性水凝胶中, 研究最多的

10.14028/j.cnki.1003-3726.2015.12.006

收稿: 2014-11-29; 修回: 2015-06-02;

基金项目: 中国国家重大基础研究项目(2011CB933503), 国家重大科学仪器设备开发专项(2011YQ03013403), 苏州科技项目(ZXY201440);

作者简介: 马丹丹(1989—), 女, 硕士研究生, 主要从事生物医用高分子材料的研究;

* 通讯联系人, E-mail: zhangtianzhu@seu.edu.cn.

是聚 *N*-异丙基丙烯酰胺 (poly-*N*-isopropylacrylamide, PNIPAM) 水凝胶, 其 LCST 为 32℃, 在它接近 32℃ 时有一个剧烈的相变, *N*-异丙基丙烯酰胺的线型聚合物水溶液在 32℃ 以下时, 溶液清澈透亮, 但当温度高于 32℃ 时, 溶液分相, 析出沉淀, 该过程可逆^[26]。温敏性水凝胶的该项性能使其在生物传感和催化、酶的固定、药物的靶向定位等方面应用广泛, 随着组织工程的发展, 在细胞 3D 培养方面也具有广阔的应用前景^[27]。

1.2 pH 敏感性水凝胶

pH 响应性水凝胶是指其溶胀或去溶胀随 pH 值变化而变化的水凝胶, 并且这种体积或形态上的改变具有可逆性。如图 1, 是 Ding 等研究的乙二醇改性壳聚糖/苯甲醛-聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯-苯甲醛(GC/OHC-PEO-PPO-PEO-CHO)聚合物在 pH 变化时的相变示意图^[28]。对于 pH 敏感的水凝胶, 离子间作用力是引起水凝胶发生体积相转变的主要作用力, 具有 pH 响应性的高分子中大都含有可以离子化的基团, 随着溶液 pH 值的变化, 接受或者释放出质子, 同时导致大分子链段间及大分子与水之间氢键的解离, 引起溶解度的改变。pH 响应性水凝胶因具有该性能, 在生物传感、药物控制释放、生物材料培养提纯、蛋白质活性控制等方面具有重要应用。

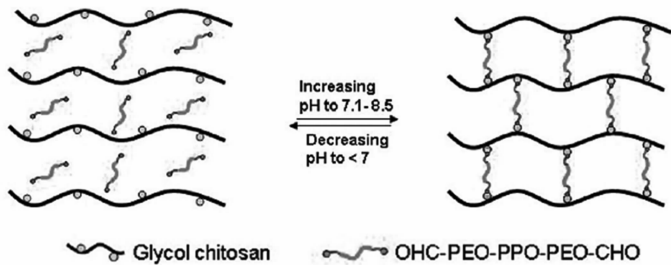


图 1 GC/OHC-PEO-PPO-PEO-CHO 聚合物随 pH 变化时的相转变机制^[28]

Figure 1 Suggested mechanism of the phase transition of GC/OHC-PEO-PPO-PEO-CHO upon pH changes^[28]

1.3 光敏感性水凝胶

构成光敏感性水凝胶的聚合物分子链含有能在光刺激下发生构型变化的基团, 即光敏部分。当光敏部分经光辐射时, 会发生顺反异构转变, 从而导致其溶胀体积变化。通过引入光敏基团, 可以得到此类水凝胶。例如, 偶氮苯在紫外光(UV)照射下可发生顺反异构转变, 当构成水凝胶的聚合物含有偶氮芳环时, 该水凝胶就具有 UV 敏感性^[29]。Harada 等就是利用偶氮苯的这种特性, 通过 α -环糊精(α -CD)对客体分子的不同识别能力, 构建了光响应的凝胶系统^[30]。图 2 是 β -环糊精(β -CD)和偶氮苯(Azo)分别在紫外光和可见光照射下, 主客体作用示意图。

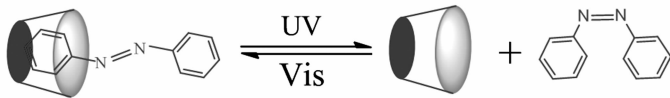


图 2 β -环糊精和偶氮苯主客体作用示意图

Figure 2 Schematic representation of the host-guest interaction between β -CD and Azo

1.4 电场敏感性水凝胶

电场敏感性水凝胶的溶胀易受电场的影响, 其一般是电解质凝胶。这类凝胶因为分子链上带有可在电场中发生迁移的可离子化的基团, 在电场的作用下, 凝胶网络内外离子浓度发生变化, 从而使凝胶的体积或是形态发生变化。根据电场敏感性水凝胶的这种原理, 白渝平等^[31]制备了物理交联的聚乙烯醇(PVA)/聚丙烯酸(PAA)水凝胶, 并研究了该水凝胶在直流电场作用下的弯曲响应性能。

2 智能凝胶在细胞三维培养中的应用

智能凝胶因其生物相容性、生物可降解性、智能响应性等诸多优势,已应用于组织工程的各个领域。随着对智能凝胶研究的不断深化和发展,越来越多的研究人员致力于将其应用于细胞三维培养的研究。

2.1 温度敏感性水凝胶在细胞三维培养中的应用

温度敏感性水凝胶,如 PNIPAM 水凝胶,当在室温时,PNIPAM 水凝胶成液态,细胞可分散其中,当温度增加到体温时,该水凝胶呈固态,细胞被包裹在其中。利用该原理,明胶枝接 PNIPAM^[32,33] 等温度响应性水凝胶已经被用做细胞 3D 培养支架。

但是这种凝胶会随着时间的延长而收缩,不利于细胞培养液的输送,制约了细胞在其内部的生长,限制了其在细胞培养中的进一步应用。Zhang 等研究发现^[34],向 PNIPAM 微凝胶中加入一定量的丙烯酸(AA)制备出 P(NIPAM-AA)凝胶,可使凝胶的脱水收缩作用降低,成胶温度升高,在不同的温度下,可实现凝胶/溶胶可逆。用该智能凝胶培养 Hep G2 细胞,在室温下将细胞与凝胶溶液混合,当温度加热到 37℃ 时,凝胶成固态,形成细胞培养 3D 支架,细胞在凝胶内部增殖并形成多细胞球,当温度降低到室温时,凝胶支架逐渐变成液态,多细胞球从凝胶中释放出来,该方法可大规模的制备多细胞球,且不对细胞产生任何伤害。多细胞球制备过程如图 3 所示。

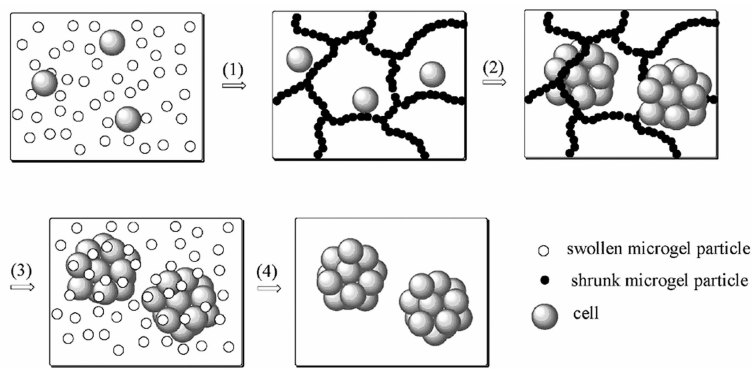


图 3 利用温敏性 PNIPAM 凝胶制备多细胞球示意图^[34]

Figure 3 Fabrication of multicellular spheroids using reversible hydrogels from thermosensitive PNIPAM microgels^[34]

2.2 pH 敏感性水凝胶在细胞三维培养中的应用

一般情况下,适于细胞生长的 pH 应严格控制在在 7.2~7.6 范围内,pH 过高或过低都会对细胞的生长造成严重的伤害,所以,相比于温度响应性凝胶基底,pH 响应性凝胶基底更难用于细胞培养。

Tanaka 等^[35]制备了 pH 响应性的 ABA 型三嵌段共聚物凝胶,其中 A 段是 pH 响应的聚[2-(二异丙基氨基)乙基甲基丙烯酸酯](PDPA),B 段是具有良好生物相容性的聚[2-(甲基丙烯酰氧基)-乙基磷酸胆碱](PMPC),用该凝胶培养细胞,通过调节 pH 改变凝胶的弹性,来改变细胞生长的力学环境,从而研究细胞在不同力学环境中的形貌变化,如图 4 所示。

Chen 等通过精确控制壳聚糖表面 pH,来调节生长在其表面的细胞的吸附和分离,如图 5 所示,壳聚糖表面覆盖一层纤连蛋白,作为细胞培养的基底,在 pH 为 7.2 时,细胞在基底表面有很好的吸附性,当 pH 升高到 7.65 时,纤连蛋白从壳聚糖表面脱离,细胞在基底表面的吸附性明显降低^[36]。

2.3 光敏感性水凝胶在细胞三维培养中的应用

光敏感水凝胶由于操作简单、条件易控,在细胞 3D 培养中已经有很多应用。Zhang 等^[37]研究制备了光降解超分子凝胶,用于细胞的 2D 和 3D 培养。该智能凝胶通过自组装,连接修饰有光触发器的短肽,该光触发器是联芳基取代的唑基,这种物质在温和的光照下,分子内即可快速转变为吡唑啉基团,该基团可破坏自组装,导致凝胶的迅速降解。实验证明,该光降解水凝胶在紫外光照射 3min 后开始降解,

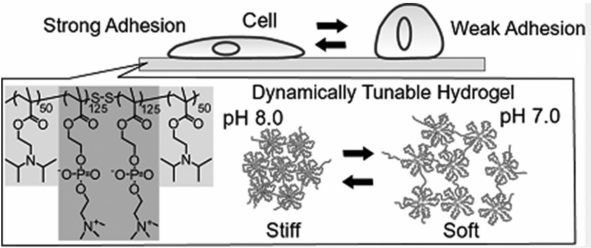


图 4 pH 响应性凝胶在不同弹性下,对细胞形貌影响示意图^[35]

Figure 4 The influence of elasticity tunable hydrogel on cells morphology^[35]

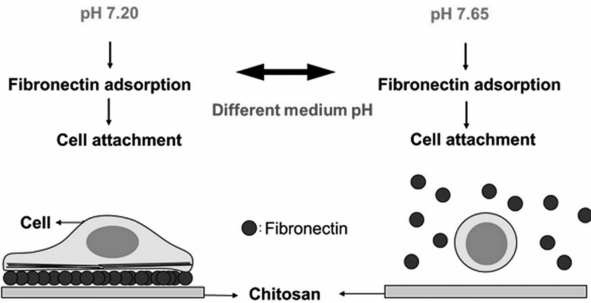


图 5 pH 值、纤连蛋白吸附和细胞在壳聚糖上粘附关系示意图^[36]

Figure 5 Schematic representation of the relationship among medium pH, fibronectin adsorption, and cell attachment on chitosan^[36]

在紫外光照射 10min 后可完全溶解。

无论细胞生长在该智能凝胶的表面(2D 培养)还是内部(3D 培养),均可实现细胞生长微环境的光可控。当该智能凝胶用于细胞 3D 培养时,混有细胞的凝胶粘稠溶液可在 5min 内迅速形成固态凝胶,细胞被包裹在凝胶内部,凝胶表面附有培养液。细胞在凝胶内部具有很高的活性,凝胶也具有良好的机械强度和生物相容性。在无紫外光照射下,包裹有细胞的凝胶稳定性可持续一周,但在紫外光照射 2min 的条件下,包裹有细胞的凝胶的稳定性明显下降,但仍可保持 108h。图 6 为该光敏感水凝胶的组装示意图。

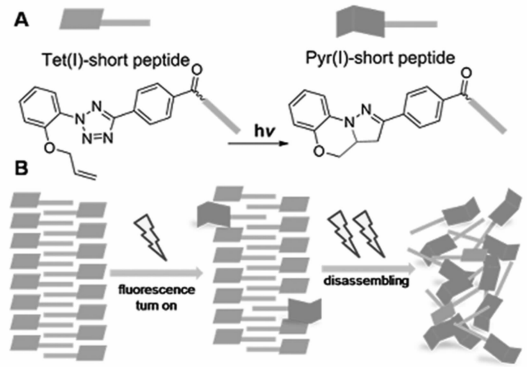


图 6 (A)光敏性水凝胶组件;(B)自组装水凝胶的光响应性^[37]

Figure 6 (A) Components of the photoresponsive hydrogelator;

(B) Photoresponse of the self-assembled hydrogels^[37]

2.4 其它智能凝胶在细胞三维培养中的应用

通过一些特殊的化学反应,在水凝胶上修饰具有特异性的功能团,使凝胶图案化,该凝胶用于细胞 3D 培养,可为细胞的培养和研究量身定制具体方案。

Anseth 课题组^[38]通过结合点击反应和正交反应两种化学反应的优势,制备了理想的图案化智能凝胶,为在三维空间内培养和研究细胞提供了生物材料平台。通过点击反应,形成具有空间网状结构的凝胶,用于包裹细胞;通过正交反应,连接不同的功能单体(例如荧光标记的 RGD 序列),使凝胶图案化,促进细胞生长,观察细胞行为。该凝胶有效模拟了 ECM,实现了在三维空间中,观察细胞的迁移、增殖和形态变化等的行为。此外,该材料生物相容性非常好,与传统的培养细胞的凝胶相比,用该智能凝胶培养的细胞具有更高的活性,并且由于功能单体变更简单,该智能凝胶材料可为用于不同目的的 3D 细胞研究,提供独特的生物材料平台。

3 智能凝胶支架对细胞生长的影响

近年来,越来越多的研究表明,细胞生长微环境中的生物因素、化学因素、力学因素等均会对细胞生长产生影响。实验证明,用水凝胶做细胞培养支架,模拟细胞外基质,对细胞的活性、铺展能力、形貌和分化迁移等均有重要影响^[39, 40]。

3.1 智能凝胶支架对细胞活性和铺展能力的影响

智能凝胶材料本身生物相容性非常好,且易于修饰氨基酸、多肽等能促进细胞生长的生物活性物质,所以与传统的培养细胞的凝胶相比,用智能凝胶培养的细胞具有更高的活性。

Anseth 课题组用荧光标记的 RGD 序列修饰智能凝胶,与未修饰荧光标记的 RGD 序列的凝胶相比,修饰后的凝胶能促进细胞生长,具有更高的活性^[38]。Zhang 课题组制备的温敏性智能凝胶可促进细胞形成多细胞球,研究表明,细胞在凝胶成球的情况下,比单层细胞具有更高的活性^[34]。众多实验表明,智能凝胶因其特殊的性能,可促进细胞生长,提高细胞活性。

研究发现,智能凝胶的降解能力、弹性等均会对细胞的铺展能力产生影响。Murphy 等^[41]用聚乙二醇二丙烯酸酯(PEG-diacrylate)与二硫苏糖醇(DTT)通过光交联反应制备空间网状结构智能水凝胶,调节光交联度可控制水凝胶的溶胀和降解性能。实验发现,用该凝胶进行细胞 3D 培养,凝胶的降解能力对细胞的行为有重大影响,提高网状凝胶的降解能力,可提高细胞的活性,促进细胞在凝胶中的铺展行为。智能凝胶的可降解能力之所以会影响细胞的活性和铺展,是因为具有网状结构的凝胶,其网孔的大小对营养的输送、细胞排泄物的疏散以及对包裹在其中的细胞的机械力都有很大影响。为提高细胞的活性,促进细胞铺展,Hubbell 等在 PEG 网络结构中修饰含有不稳定酶的肽序列,其可随细胞分泌的蛋白酶降解,从而促使 PEG 凝胶的降解。此外,一些生物活性肽的加入,如 RGD 等也能促进细胞在凝胶中的活性和铺展。Tanaka 等用制备的 pH 响应性智能凝胶培养细胞,发现当 pH 升高,凝胶弹性增大时,细胞与凝胶基底接触面积增大,铺展能力增强;当 pH 减小,凝胶弹性减小时,细胞与凝胶基底接触面积减小,呈球状^[35]。

因此,活性肽的加入、智能凝胶降解能力和弹性的变化均会对细胞的活性和铺展能力产生影响。

3.2 智能凝胶支架对细胞分化和迁移的影响

研究表明,智能凝胶的响应性引起的细胞生长微环境的变化,对细胞的迁移和分化均有重要影响。Tayalia 等^[42]利用双光子聚合制备 3D 细胞生长支架,可以精确控制支架的空隙大小,从而研究细胞在此 3D 支架上的吸附和生长情况。结果表明细胞在 3D 结构上的生长速率比 2D 上高,当 3D 结构的孔径变小,细胞的生长速率下降。通过这个方法可以系统的研究生物材料的机械性质、吸附蛋白的浓度、生物降解率等因素对细胞在 3D 结构中的生长、迁移等的影响。Neethu 等^[43]通过混合明胶和白蛋白,制备可生物降解的蛋白基质,作为细胞三维培养的支架,用于研究该支架对成骨干细胞分化的影响,结果表明,该支架可以提高生物相容性以及促进成骨干细胞分化为软骨细胞。Liu 等^[44]对右旋糖酐-g-赖氨酸和水凝胶的三维复合结构用于平滑肌细胞的生长做出研究,通过调节右旋糖酐与水凝胶的浓度和配比,来调整支架的机械性能和吸水程度。实验表明,较为柔软的支架对于细胞的生长速率、细胞网络的建立、细胞的

增殖都有很好的影响。

4 总 结

用智能凝胶进行细胞 3D 培养,通过简单的响应,就可改变细胞生长的微环境,能实现多样化培养和研究细胞。智能凝胶的响应性引起凝胶性能的变化,对细胞的活性、铺展能力、形貌、迁移和分化能具有重要影响,从而为进一步深入研究细胞行为提供平台。因此,智能凝胶在细胞 3D 培养领域,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Lutolf M P, Hubbell J A. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 47~55.
- [2] Saltzman W M, Olbricht W L. *Nat Rev Drug Discovery*, 2002, 1: 177~186.
- [3] Zhao F, Ma M L, Xu B. *Chem Soc Rev*, 2009, 38: 883~891.
- [4] Luo Y, Shoichet M S. *Nat Mater*, 2004, 3: 249~253.
- [5] Muraoka T, Koh C Y, Cui H G, Stupp S I. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 5946~5949.
- [6] Anseth K S. *Nature*, 2008, 453: 5.
- [7] Kloxin A M, Kasko A M, Salinas C N, Anseth K S. *Science*, 2009, 324: 59~63.
- [8] Guilak F, Cohen D M, Estes B T, Gimble J M, Liedtke W, Chen C S. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 17~26.
- [9] Hwang N S, Varghese S, Elisseeff J. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 6: 199~214.
- [10] Wolf K, Wu Y I, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 893~904.
- [11] Tayalia P, Mendonca C R, Baldacchini T, Mooney D J, Mazur E. *Adv Mater*, 2008, 20: 4494~4498.
- [12] Lyer G, Tillekeratne L M V, Coleman M R, Nadarajah A. *Polymer*, 2008, 49(17): 3737~3743.
- [13] Schmaljohann D. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58(15): 1655~1670.
- [14] Zhang N, Knoll W. *Anal Chem*, 2009, 81: 2611~2617.
- [15] Mandracchia D, Pitarresi G, Palumbo F S. *Biomacromolecules*, 2004, 5: 1973~1982.
- [16] Popescu M T, Mourtas S, Pampalakis G. *Biomacromolecules*, 2011, 12: 3023~3030.
- [17] Kozlovskaya V, Kharlampieva E, Chang S J. *Am Chem Soc*, 2009, 21: 2158~2167.
- [18] Chen X, Hong L, You X, Wang Y, Zou G, Su W, Zhang Q. *Chem Commun*, 2009 (11): 1356~1358.
- [19] Wang Y P, Ma N, Wang Z Q. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 2823~2826.
- [20] Liao X J, Chen G S, Liu X X. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 4409~4413.
- [21] Moschou E A, Madou M J, Bachas L G, Daunert S. *Sensor Actuat B-Chem*, 2006, 115: 379~383.
- [22] O'Grady M L, Kuo P L, Parker K. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2009, 2 (2): 343~346.
- [23] Yao L, Krause S. *Macromolecules*, 2003, 36(6): 2055~2065.
- [24] Moschou E A, Madou M J, Bachas L G, Daunert S. *Sens Actuators B-Chem*, 2006, 115: 379~383.
- [25] Otero T F, Broschart M J. *Appl Electrochem*. 2006, 36: 205~214.
- [26] Tasdelen B, Kayaman-Apohan N, Güven O, Baysal B M. *Radiat Phys Chem*, 2004, 69(4): 303~310.
- [27] Carmen A L, Concheiroa A, Dubovikb A S. *Controlled Release*, 2005, 102: 629~641.
- [28] Ding C X, Zhao L L, Liu F Y. *Biomacromolecules*, 2010, 11: 1043~1051.
- [29] Chen X, Hong L, You X. *Chem Commun*, 2009: 1356~1358.
- [30] Tomatsu I, Hashidzume A, Harada A. *Macromolecules*, 2005, (38): 5223~5227.
- [31] 白渝平,陈莹,杨荣杰,谭惠民. *高分子材料科学与工程*, 2002, 18 (2): 74~76.
- [32] Ohya S, Nakayama Y, Matsuda T. *J Artif Organs*, 2005, 7: 181~186.
- [33] Ibusuki S, Fujii Y, Iwamoto Y, Matsuda T. *Tissue Eng*, 2003, 9: 371~383.
- [34] Gan T, Guan Y, Zhang Y. *J Mater Chem*, 2010, 20(28): 5937~5944.
- [35] Yoshikawa H Y, Rossetti F F, Kaufmann S. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(5): 1367~1374.
- [36] Chen Y H, Chung Y C, Wang I J. *Biomaterials*, 2012, 33: 1336~1342.
- [37] He M, Li J, Tan S. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(50): 18718~18721.
- [38] Deforest C A, Polizzotti B D, Anseth K S. *Nat Mater*, 2009, 8(8): 659~664.
- [39] Ma Y H, Tang Y Q, Billingham N C, Armes S P, Lewis A L. *Biomacromolecules*, 2003, 4: 864~868.

[40] Madsen J, Armes S P, Bertal K, Lomas H, MacNeil S, Lewis A L. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 2265~2275.

[41] Hudalla G A, Eng T S, Murphy W L. *Biomacromolecules*, 2008, 9(3): 842~849.

[42] Tayalia P, Mendonca C R, Baldacchini T. *Adv Mater*, 2008, 20: 4494~4498.

[43] Mohan N, Nair P D, Tabata Y. *J Mater Sci; Mater Med*, 2009, 20;S49~S60.

[44] Liu Y X, Chan-Park M B. *Biomaterials*, 2010, 31: 1158~1170.

A Review of Smart Hydrogel for 3D Cell Culture

MA Dan-dan, HU Ke, MA Xiao-e, ZHOU Nai-zhen, GU Ning, ZHANG Tian-zhu*
(*Key Laboratory of Biological Materials and Devices, School of Biological Science and Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210009, China*)

Abstract; Compared with the traditional two-dimensional (2D) cell culture, in vitro three-dimensional (3D) cell culture is much closer to the growth microenvironment of cells. The smart hydrogel has good biocompatibility. The special structure and property of smart hydrogel can mimic the extracellular matrix (ECM) and help us achieve the goal of 3D cells culture. Furthermore, the smart hydrogel also has sensitive response to the external environment stimulus, which can change the cells' microenvironment and enable us to study cell behaviors in 3D model. In this review, we discuss the smart hydrogel and 3D cell culture, review the different types of smart responsive hydrogel and introduce the influence of 3D scaffold on cell behaviors.

Key words; Smart hydrogel; Three-dimensional cell culture; Thermo-responsive; pH-Responsive; Photo-responsive