

高效双光子引发剂及水相中制备水凝胶微结构的研究进展

张维彩^{1,2}, 郑美玲^{1*}

¹中国科学院理化技术研究所仿生智能界面科学中心有机纳米光子学实验室, 北京 100190;

²中国科学院大学未来技术学院, 北京 101407

摘要 对双光子引发剂的设计合成和飞秒激光双光子聚合技术的基本原理进行了简单介绍。着重介绍了用于水凝胶双光子聚合的引发剂的研究进展, 主要包括通过扩大共轭链长度、引入强供/吸电子基团、加入共引发体系等来增大双光子吸收截面, 引入自由基淬灭基团以降低荧光量子产率, 增加引发剂的水溶性来降低微结构细胞毒性等方面。这些研究为生物相容性三维水凝胶微纳结构的制备及应用提供了科学基础, 是更好地模拟体内细胞生长微环境的必要条件。接着, 介绍双光子聚合制备的水凝胶微纳结构及其在组织工程领域中的应用。最后, 对生物相容性水凝胶微结构在应用中存在的问题与未来发展趋势进行总结和展望。

关键词 材料; 双光子引发剂; 水凝胶; 双光子聚合; 微结构; 生物相容性; 组织工程

中图分类号 V261.8

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202148.0202007

1 引言

水凝胶作为一种两亲性网络状的交联高分子聚合材料, 内部的亲水基团可以结合水分子, 外部的疏水基团则遇水膨胀, 且成分类似于细胞外基质, 具有良好的生物相容性, 可以在体外为细胞及组织的生长提供模拟体内的发育环境, 因此被广泛地应用于组织工程与再生医学、药物递送、体外细胞培养等多种领域^[1-2]。研究表明, 材料表面的微结构会影响细胞的生物行为, 因此, 利用微制造技术制备水凝胶微纳图案化表面及支架, 以诱导细胞生长、增殖及迁移, 促进细胞向特定功能分化, 了解细胞行为机制, 是组织工程中的重要研究内容^[3]。

水凝胶微纳结构的制造方法有很多, 包括静电纺丝技术^[4-6]、软光刻^[7]、3D 生物打印^[8-11]、数字微镜器件 (DMD) 无掩模光刻^[12-13]、光学打印^[14]等。Sadeghi 等^[15]利用静电纺丝制备了聚乙烯醇/明胶/硫酸软骨素 (PVA/GE/Cs) 纳米纤维支架, 实验发

现, L929 小鼠成纤维细胞与支架表面有良好的相互作用, 24 h、48 h 后成纤维细胞也能很好地附着在制备好的基底上并不断增殖。Cheng 等^[7]用软光刻技术制备了 PVA 水凝胶微结构, 细胞培养实验展示了 PVA 在使用软光刻进行细胞图案化方面的用途。Yang 等^[9]将胶原 (COL) 或琼脂糖 (AG) 与海藻酸钠 (SA) 混合, 制备出适用于 3D 打印的生物墨水, 通过结合软骨细胞, 构建了体外 3D 打印软骨组织。实验中发现, SA/COL 能明显地促进细胞黏附、加速细胞增殖、增强软骨特异性基因表达, 同时还可以有效地抑制软骨细胞去分化, 从而保存表型。Ge 等^[12]利用 DMD 技术在同一基底上制备 2D 和 3D 图案阵列, 通过细胞培养验证微观结构对细胞黏附和迁移行为的影响。尽管利用这些传统微加工手段制备的水凝胶微结构已有了广泛的应用, 但是由于这些加工方法存在一定的短板, 例如制造灵活性较低、加工结构精度不高, 因此在组织工程领域中的应用受到限制。如何制备具有高精度的真 3D 微结

收稿日期: 2020-08-27; 修回日期: 2020-09-24; 录用日期: 2020-10-26

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFB1104300)、国家自然科学基金 (61975213, 61475164)、中奥国际合作项目 (GJHZ1720)

*E-mail: zhengmeiling@mail.ipc.ac.cn

构仍然是一种挑战。

飞秒激光双光子聚合(TPP)是近年发展起来的一种微纳制造手段,可以实现 3D 微纳结构的可控制备^[16-17]。这种加工手段利用超快脉冲激光使具有双光子吸收(TPA)特性的光敏材料在焦点附近区域聚合。通过控制焦点(或样品)位置的相对移动,材料沿着焦点扫过的路径逐步发生聚合,可实现任意形貌的 3D 微纳结构的制备。此外,由于聚焦点处的作用区域很小,因此可以获得远小于衍射极限尺寸的高精度的微纳结构。利用这一技术制造的高精度微纳结构对研究细胞生长行为、细胞与周围环境的相互作用机制有着重要的意义^[18-21]。国际上已有很多这方面的研究工作,Engelhardt 等^[22]利用飞秒激光双光子聚合技术将合成的明胶甲基丙烯酸酯制备成宽为 $1.2\ \mu\text{m}$ 、高为 $2\ \mu\text{m}$ 、间距为 $4\ \mu\text{m}$ 的微线阵列结构,通过体外培养实验发现,细胞会沿着明胶甲基丙烯酸酯线阵列边界定向生长,形成局灶性黏附。Klein 等^[23]加工了具有不同蛋白结合特性的 3D 支架,并通过在纤连蛋白溶液中浸泡,对这些支架不同部位进行选择功能化,细胞培养实验证明支架上培养的细胞形成的黏附位点带有功能化部分,有助于在 3D 空间中控制细胞的黏附位点的形成,从而调控三维细胞形态的形成。Nava 等^[24-25]通过双光子聚合制备了模拟细胞生长内环境的 3D 笼盒,并在笼盒内壁涂上透明质酸和明胶,研究其控制干细胞命运的可能性。在实验中观察到,透明质酸涂层壁盒内的细胞有更强的代谢活性和骨-软骨谱系定向性,且归巢效应减弱,证明了在体外模拟微环境中可以独立控制各种物理参数,研究在干细胞增殖和分化过程中这些影响因素所起的特殊作用,这有助于推进对干细胞增殖和分化机制的研究。综上所述,双光子聚合制备的水凝胶微结构具有生物相容性好、精度高、形貌可控等特点,在生物医学

领域表现出了巨大的应用潜力。

本文简单介绍了飞秒激光双光子聚合原理,综述了在水凝胶双光子聚合中至关重要的引发剂的研究进展、利用双光子聚合进行水凝胶微纳结构制备的研究现状,并评述了其在组织工程领域中的应用。

2 飞秒激光双光子聚合原理

2.1 双光子吸收特性

在强激光焦点处,材料中的原子或者分子同时吸收两个光子从基态跃迁到激发态的过程,称为 TPA。被吸收的两个光子的频率可以相同也可以不同,同时吸收两个相同频率光子的过程称为简并吸收,而同时吸收两个不同频率光子的过程称为非简并吸收。图 1 是单/双光子吸收原理示意图。单光子吸收是指材料吸收一个光子实现能级跃迁,吸收几率正比于入射光强,这是线性吸收过程。而在双光子聚合中,TPA 是指光刻胶体系中具有 TPA 效应的光敏剂同时吸收两个光子,实现从基态、历经虚拟态、最后跃迁到激发态的过程,吸收几率与入射光强的二次方成正比,这是非线性吸收过程。双光子聚合就是利用材料的这种非线性吸收效应,光敏剂与引发剂分子在激发态下发生电荷转移,引发剂产生活性基团(自由基或阴阳离子)并在激光焦点附近引发单体聚合,从而获得 1D、2D 及 3D 微纳结构。另外,TPA 为长波吸收、短波发射的过程,有效地减小了激发光的瑞利散射和介质吸收等损耗,光的穿透能力强。由于液态树脂对近红外光具有高的透过性,因此只要适当控制入射光强度,使得焦点之外的人射光强不足以引发基于 TPA 效应的化学反应,只有焦点处的光强可以引发反应,即可将反应限制于焦点处极小的区域内。根据预先规划的路径移动焦点,就可以在被加工材料中形成指定形状的微结构。

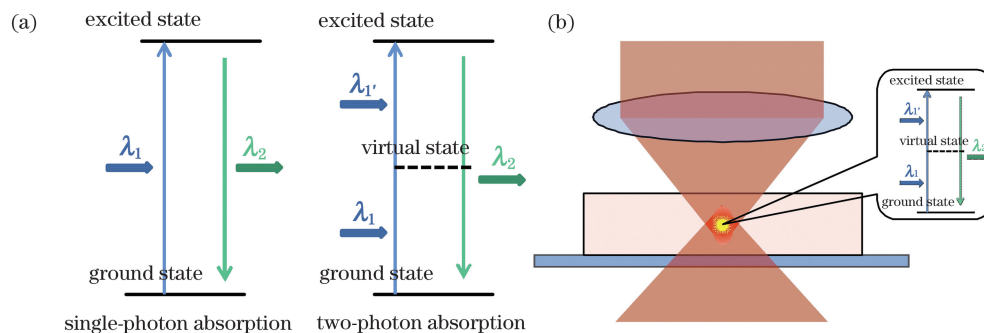


图 1 双光子聚合原理。(a)单/双光子吸收跃迁示意图;(b)双光子聚合示意图

Fig. 1 Two-photon polymerization principle. (a) Schematic of single-/two-photon absorption transition; (b) schematic of two-photon polymerization

2.2 双光子聚合分辨率突破衍射极限

根据瑞利公式 $D = K\lambda/NA$, 其中 K 为与激光线宽和形状相关的常数值, λ 为入射激光波长, NA 为物镜数值孔径, 对于固定波长的激光光斑, 数值 D 通常约为 $\lambda/2$ 。在利用双光子聚合进行微纳结构制造, 即光敏剂分子吸收光子产生自由基并参与到单体分子聚合的过程中, 还伴有自由基淬灭, 所以存在一个聚合阈值, 只有当入射激光能量密度足够高直至超过聚合阈值, 使得自由基的产生量大于淬灭量, 才能产生聚合。由于激光器发出的激光能量分布呈高斯分布, 只有聚焦光斑中心部分光子数密度极高的区域处的激光能量才能达到聚合阈值。在双光子聚合中, TPA 强度与入射光光强的平方成正比, 在紧聚焦的情况下, 吸收仅限于聚焦光斑中心部分尺寸仅为入射光波长立方 (λ^3) 的微小体积内, 这使得 TPA 具有高度空间选择性, 故而能突破经典衍射极限的限制, 实现其他加工方法难以做到的高精度 3D 微纳结构制备。

3 双光子引发剂研究进展

自 2001 年 Kawata 等^[26]通过飞秒激光双光子聚合技术, 采用 SCR500 光敏树脂制备出“微米牛”结构以来, 关于利用双光子聚合制造各种微纳结构及器件的研究层出不穷。将这一聚合技术引入组织工程研究中, 制造具有高精度、任意形貌的 3D 微结构, 模拟细胞外基质, 研究未知的细胞行为(包括黏附、增殖及分化等)受到广泛关注^[27-28]。然而, 为了更准确地掌握细胞与环境中微结构的交互作用及机理, 需要微结构所提供的物理参数更精细可控, 这对加工分辨率提出了更高的要求。而光聚合方法的加工分辨率在很大程度上受限于双光子聚合光引发剂的引发效率, 因此生物用双光子引发剂的开发成为重要的研究课题。

3.1 双光子引发剂设计与合成

双光子引发剂在光聚合过程中起着至关重要的作用, 是影响聚合特性和结构精度的关键。最早的双光子引发剂是对紫外光敏感的有机分子, 如芳香酮类 DEAP、Darocure 1173、Irgacure 369 等, 但是这类引发剂分子通常具有小的 TPA 截面, 引发活性低, 需要较长的曝光时间和较大的激光能量才能实现聚合加工。随着一些具有大的 TPA 截面的双光子引发剂的成功合成, 双光子引发剂的结构与性能的关系受到关注。其中研究最多的双光子引发剂按结构大致可以分为两类。一类是四极矩分子(D-

π -D, A- π -A, D-A-D), 中间是富电子 π 共轭桥, 桥的两侧各有一个缺电子基团或富电子基团; 另一类是偶极分子(D- π -A), 具有高荧光强度富电子的芳香族/烯族共轭桥位于中间, 桥的一侧是一个电子供体(D), 另一侧是一个电子受体(A)。两类结构如图 2 所示。为了提高 TPA 活性, 分子设计工作主要集中在: 通过扩大 π 共轭系统的长度, 或在 π 共轭系统末端使用强供电子基团和吸电子基团来修饰分子的电子结构, 增强分子内电子转移, 从而增大 TPA 截面, 提高双光子引发效率。

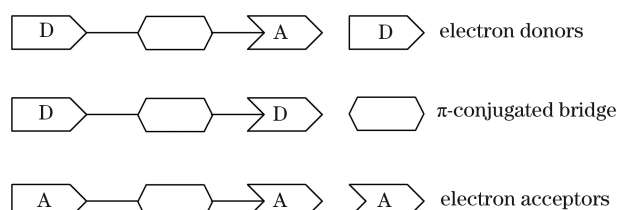
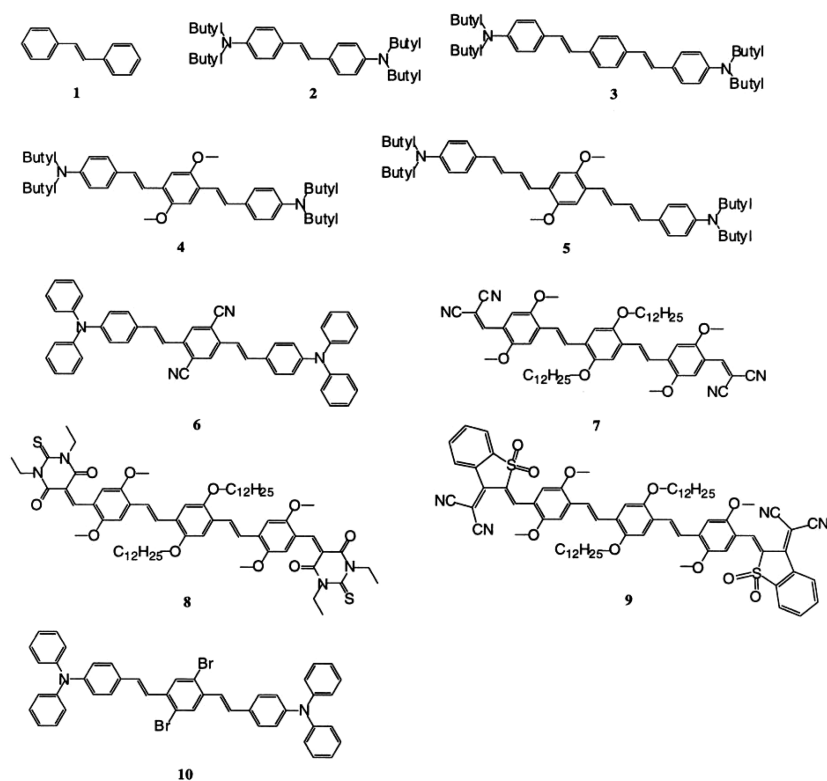


图 2 双光子引发剂的基本设计类型示意图

Fig. 2 Schematic of basic design types of two-photon initiators

早在 1997 年, Ehrlich 等^[29]就发现了一系列具有两个给电子对称取代基的苯乙烯衍生物, 这些衍生物的 TPA 远大于传统的对紫外光敏感的有机分子, 根据他们的报道, 在用纳秒脉冲测量时, 4,4'-二(正丁胺基)二苯代乙烯(BDBAS)和 4,4'-二(二苯基氨基)二苯代乙烯(BDPAS)在可见光波长下具有大的 TPA, 而用二苯胺基取代二正丁胺基时会导致 TPA 的 90 nm 红移, 这说明末端具有供电子取代基的分子的吸收截面明显增大, 证明了分子内的电荷转移(ICT)能够增大分子的 TPA 截面。与此同时, 他们设计合成了一系列基系为 D- π -D, D-A-D, A-D-A 的二苯乙烯苯衍生物, 如图 3 所示。TPA 截面 δ 值异常大, 能达反式二苯乙烯的 400 倍左右, 这与分子中的电荷同时从端基转移到多烯共轭桥有关^[30], 进一步证实 TPA 截面会随分子共轭长度的增加或电荷从分子两端向分子中间对称转移程度的增加而增加。后来, 基于通过扩大 π 共轭系统的长度来增加 TPA 的策略, 他们又设计了一系列以二苯基多烯、双(苯乙烯)苯、联苯等结构为共轭桥, 二苯胺基或二丁胺基等为对称取代团的 D- π -A- π -D 型大 TPA 截面有机分子^[31-32]。

Belfield 等^[33]通过功能化苄环上的 2,7 和 9 位, 合成具有不同供电子能力和吸电子能力取代基(二苯胺、双(4-甲氧基)胺、硝基、苯并噻唑等)的苄衍生物, 发现这种分子具有较大的跃迁偶极矩和强

图 3 双苯乙烯苯为核心的化合物分子结构^[30]Fig. 3 Molecular structure of the compounds with distyrene benzene core^[30]

的 TPA 效应,可作为双光子荧光发色团,为成像和其他双光子相关应用提供了新材料。2014 年, Yang 等^[34]设计合成了具有较高光和热稳定性的咪唑基和苄基衍生物双光子引发剂,最大 TPA 截面分别达 970 GM/重复单元(咪唑基荧光发色团)和 900 GM/重复单元(苄基衍荧光发色团),且在普通有机溶剂中具有较高的溶解性。这些具有高 TPA 效应的全芳香族结构的聚合物在双光子科学技术领域有着广泛前景。最近, Jia 等^[35]通过 Sonogashira 偶联反应,以二苯砜(DPS)为电子受体,咪唑、三苯胺及吩噻嗪为电子供体,合成了三种 A- π -D- π -A 型二苯砜基对称四极分子(C-DSO、P-DSO 及 T-DSO)。二苯砜基染料具有高效的分子内电荷转移特性,在波长为 720~850 nm 时, C-DSO、P-DSO 及 T-DSO 的最大 TPA 截面分别为 285、1059 及 1030 GM。利用 P-DSO 和 T-DSO 进行双酚 A 环氧树脂双丙烯酸酯双光子引发聚合实验,激光阈值分别为 4.11 mW 和 4.55 mW,获得的 3D 结构形貌完整、精度高,因此证明二苯砜基四极分子在 3D 微制造中是很有前景的引发剂。

双光子引发剂分子的平面性、 π 共轭系统的长度和刚性、供体受体类型等都对 TPA 效应有重要

影响,但是它们究竟如何增大引发剂分子 TPA 的具体机理尚不清晰。为了评价 D- π -A- π -D 型双光子引发剂的构效关系, Liska 等^[36-37]以他们合成的三键化合物米氏酮衍生物 M3K 为基础,选择二苯胺、二丁胺基、氢、甲氧基、二甲胺等为供体,酮、吡啶等为受体,共轭双键和三键为主干,合成了吡啶衍生物(M3P 和 M3P⁺)和一系列具有不同强度供体(-H 强度小于 -OMe, -OMe 强度小于 -NMe₂, -NMe₂ 强度小于 -NPh₂)的酮衍生物双光子引发剂。聚合实验发现,二丁胺基的双光子引发剂(B3K)是该系列活性最高的双光子引发剂,仅 0.05% 的质量分数就可以制备出精细的光聚合结构,通过优化参数,得到的最小线宽达 250 nm。通常情况下,双键化合物的 TPA 截面要低于三键的同等化合物,但是实验发现,三键吡啶酮衍生物(M3K)的 TPA 截面(165 GM)小于双键酮衍生物(M2K, 261 GM),这是因为双键存在顺反异构化,所以能减弱所需的光化学过程。由于羰基的吸电子性能远优于吡啶基和吡啶盐,所以酮衍生物双光子引发剂 TPA 截面都很大(200 GM 左右),而吡啶衍生物 M3P 的 TPA 截面仅为 23 GM, M3P⁺ 则无 TPA。与二甲胺(M3K)和二苯胺(P3K)供电子基团相比, B3K 的双光子引发

剂活性最高,研究人员推测是二丁胺基双光子引发剂在光刻树脂中的溶解度较高所致。

在双光子引发剂的结构设计中,能使荧光发色团具有良好共平面性、较长共轭系统,从而具有大跃迁矩,实现低能量激发的除了偶极推拉系统外,还有四极、八极及多极支化系统,因为各支路之间的电子耦合会协同增强,从而获得大的 TPA 效应^[38]。最近, Tromayer 等^[38]制备了一系列多极氨基苯乙烯-1,3,5-三嗪杂环双光子引发剂 BTrz(一臂两极)、2BTrz(两臂四极)、3BTrz(三臂八极),结构如图 4 所示,并利用波长为 800 nm 的 Z 扫描和双光子荧

光法测定了各种衍生物的 TPA 截面,研究了 1~3 个氨基苯乙烯供体臂对 1,3,5-三嗪杂环衍生物 TPA 效应的协同增强。与完善的四极苝叉酮衍生物 M2CMK 进行比较,发现八极三嗪类衍生物比公认的基于酮的四极参比 M2CMK 有更好的 TPA 效应。此外,四极和八极 1,3,5-三嗪杂环衍生物(2BTrz,3BTrz)由于存在协同增强效应,TPA 均大于两极衍生物 BTrz,八极三嗪衍生物表现出最佳的加工窗口。另外,该体系二丁胺基被用作增大溶解度的电子给体,以改善具有高度平面化的芳香族单体有限的溶解度。

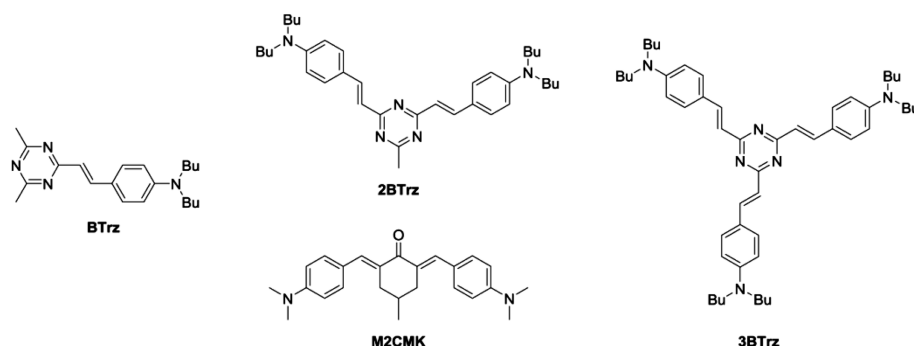


图 4 多极氨基苯乙烯-1,3,5-三嗪杂环衍生物的化学结构^[38]

Fig. 4 Chemical structure of multipolar styrene-1,3,5-triazine heterocyclic derivatives^[38]

关于高活性的双光子引发剂的研究已有很多,然而,大多数报道的高引发活性引发剂也具有高的荧光量子产率,即分子在激光辐射下双光子诱导激发态的弛豫过程比自由基生成过程发生的多,这就意味着自由基生成的概率会降低^[39]。所以双光子引发剂不仅需要大的 TPA 截面,还需要具有高效产生自由基等反应中间体能力(较低荧光量子产率)。针对这一现象, Xing 等^[39]以传统紫外引发剂蒹醌衍生物为基础,以二甲基氨基和甲氧基为供体,

使用苯乙烯延长异位偶联体系,采用 Wittig 反应合成了新型 C_{2v} 对称蒹醌衍生物。这些化合物表现出较强的分子内电荷转移带和较低的荧光量子产率,在 800 nm 波长下,TPA 截面分别为 1635 GM、995 GM,引发剂质量分数为 0.02% 时具有较高的灵敏度,阈值为 3.67 mW。同年,他们^[40]又设计合成了一系列低荧光量子产率的 A- π -D- π -A 型 3,6-双(4-硝基/羰基苯基乙基)咪唑衍生物,如图 5 所示,摩尔分数为 0.18% 时,阈值功率低至 0.8 mW。

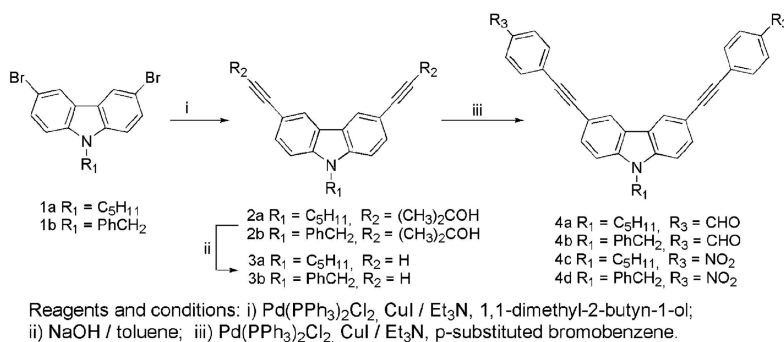


图 5 具有低荧光量子产率的 A- π -D- π -A 型咪唑衍生物的化学结构^[40]

Fig. 5 Chemical structure of A- π -D- π -A carbazole derivative with low fluorescence quantum yield^[40]

要提高聚合过程中双光子引发剂的引发效率,除了降低荧光量子产率外,也可以通过结合高效双

光子引发剂和自由基淬灭基团分子,在聚合的微区域灭活自由基以限制自由基扩散来完成^[41]。Lu

等^[41]合成了一种新型双光子引发剂 3,6-双[2-(4-硝基苯基)-乙基]-9-(4-甲氧基苄基)-咪唑(BNMBC), 其中,甲氧基苄基基团具有自由基淬灭效应,与采用了基硼基作为光引发剂、苯甲醚作为自由基淬灭剂制备的聚合物线条相比,用含有自由基淬灭基团的 BNMBC 制备的聚合物线条体积减小了 20% ~ 30%。这证明与加入相同摩尔分数的自由基淬灭剂相比,在光引发剂中引入自由基淬灭基团具有更有效的自由基扩散围阻效应,有利于精密结构的制备。

综上所述,关于通过延长共轭体系、优化供/吸电子基团、引入共引发基团等设计来增大 TPA 截面,通过加入自由基淬灭剂或者引入自由基淬灭基团以降低荧光量子产率来获得高引发效率双光子引发剂的研究已有很多,并得到了大量的高效引发剂分子,例如苯乙烯基衍生物^[29-32]、葱醌^[39]、芴^[33,35]、咪唑基^[34,40-41]、嘧啶^[42]衍生物等。然而,在双光子引发聚合实验中,它们大部分都是自由基聚合,且多是在有机相中进行的,聚合结构中往往存在各种有机残留物,容易造成细胞毒性,这对在生物组织工程领域的应用极其不利。因此,在实际应用中,需要根据具体应用情况,设计合适的双光子引发剂体系,以避免残留物产生的细胞毒性带来的破坏和干扰。

3.2 高效水溶性双光子引发剂

光在生物组织内的穿透深度(光学窗口)一般处于近红外波长范围内,该波段光对生物组织造成的损伤小,穿透力强。为制造与体内环境相似的微结构和支架环境,前面所述的许多双光子引发剂也在近红外波段得到研究。然而,这些引发剂尽管具有大的吸收截面、良好的引发效率,但是大多易溶于有机溶剂而不溶于水,加工一般需要在有机溶剂中进行,制备的微结构往往因存在有机溶剂残留而产生细胞毒性,这极大地限制了双光子聚合制造的微纳结构在组织工程领域的应用。因此,开发具有良好

的生物相容性、水溶性、高效引发效率的水溶性双光子引发剂尤为重要。

改善双光子引发剂的水溶性一般有两种思路:基于引发剂分子本身进行的分子修饰,如在引发剂中引入离子基团(磺酸根、羧酸钠盐、氨基、季铵盐等)来使引发剂本身具有良好的溶解性;基于引发剂分子作用微环境的适应性改造,例如根据主客体化学原理,利用具有亲疏水性的大分子对引发剂进行包结,或者利用亲水-疏水相互作用封装引发剂分子。

引入离子基团是最常用且最有效的方法。2005年,Woo等^[43]以二苯基苯为框架,在中性前驱体中引入烷基卤化物终端单元,根据三甲胺的季铵化反应提供了水溶性 TPA 荧光团,合成了一系列末端含二烷基氨基供体的有机和水溶性双苯基 TPA 引发剂。芞叉环戊酮染料具有 TPA 截面大、光敏效率高的特点,但是大都疏水。为获得水溶性的芞叉环戊酮染料类双光子引发剂,Wan等^[44]通过在 2,5-双[4-(二乙胺)-芞叉]-环戊酮(BDEA)中引入 4 个羧酸钠基团,合成了一种新型的水溶性芞叉环戊酮染料(BSEA),利用非线性透射法测定了其在水溶液中的 TPA 截面。在波长 800 nm 处,TPA 截面为 287 GM,虽然与原型化合物 BDEA 相比,BSEA 在水溶液中的 TPA 截面减小了一半以上,但仍然大于水溶性氧杂葱染料。Li等^[45]通过经典的醛醇缩合反应合成了一系列以羧酸盐为亲水性官能团、二烷基氨基基团为供体、双键为共轭桥的苯环酮基双光子引发剂,如图 6 所示。由于具有长偶联度、强电子供体和受体的存在,所研究的水溶性双光子引发剂的 TPA 截面在 800 nm 处约为 163 ~ 201 GM。并发现在 MG63 细胞系的暗光下,环戊酮基光引发剂的细胞毒性与众所周知的生物相容性光引发剂 Irgacure 2959 一样低。

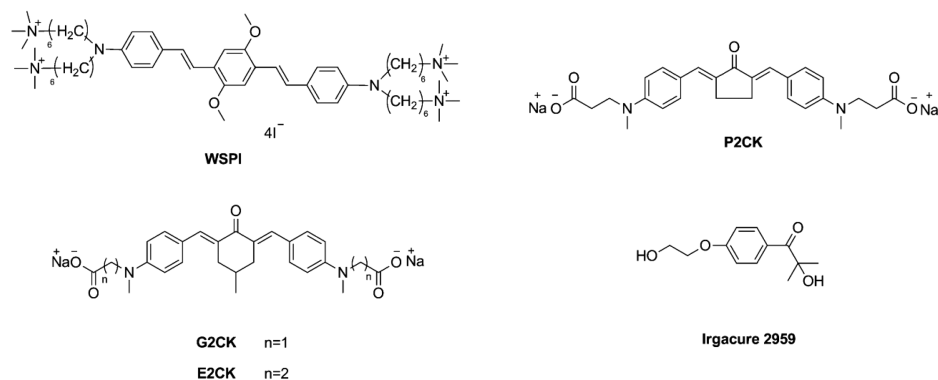


图 6 引入离子基团的水溶性双光子引发剂的化学结构^[45]

Fig. 6 Chemical structure of water-soluble two-photon initiator with ionic groups^[45]

基于主客体化学原理,利用具有较大疏水内腔尺寸和良好水溶性的环糊精、葫芦脲 7 等对疏水性光敏剂进行包结,是一种简单而又绿色环保的水溶性双光子引发剂的制备方法。2009 年, Li 等^[46]利用商品化的光敏剂染料和光引发剂 4,4-二甲基二苯基碘鎓六氟磷酸(DMDPI)开发了一种新型的双光子聚合引发体系,将染料和光引发剂 DMDPI 用甲基化- β -环糊精(Me- β -CD)封装起来,形成超分子复合物,该复合物具有良好的水溶性。染料与引发剂之间的电子转移过程可以发生在分子内络合物中,这种超分子复合物减少了共引发剂的用量,从而显著改善了材料的损伤和降低残留试剂的毒性。2014 年, Xing 等^[47]通过主-客体化学相互作用对具有 C_{2v} 对称结构的疏水性 2,7-双(2-(4-戊氧基苯基)-乙炔基)蒽醌与 2-羟丙基-环糊精进行封装,长

烷基链与疏水 2-羟丙基-环糊精的有效结合保证了引发剂具有良好的水溶性,在水溶液中,波长为 780 nm 时对应的 TPA 截面约为 200 GM,比商用引发剂大很多。此后,他们又以 PF127 聚苯醚为原料,通过亲水-疏水相互作用封装 2,7-双(2-(4-戊氧基苯基)-乙炔基)-蒽醌,制备了具有高引发率的水溶性双光子聚合引发剂^[48]。2019 年,本课题组^[49]以具有相对较大的内腔尺寸和良好的水溶性的葫芦脲 7(CB7)为主体,对咪唑类衍生物 3,6-双[2-(1-甲基吡啶)乙炔基]-9-戊基咪唑二碘化物(BMVPC)进行包结,提出了一种新型水溶性双光子引发剂(如图 7 所示)的制备方法,并确定了 BMVPC 与 CB7 的最佳结合比为 1:1。形成的包结体改变了双光子聚合的微环境,在保证水溶性的同时,使得 TPA 截面增加了约 5 倍。

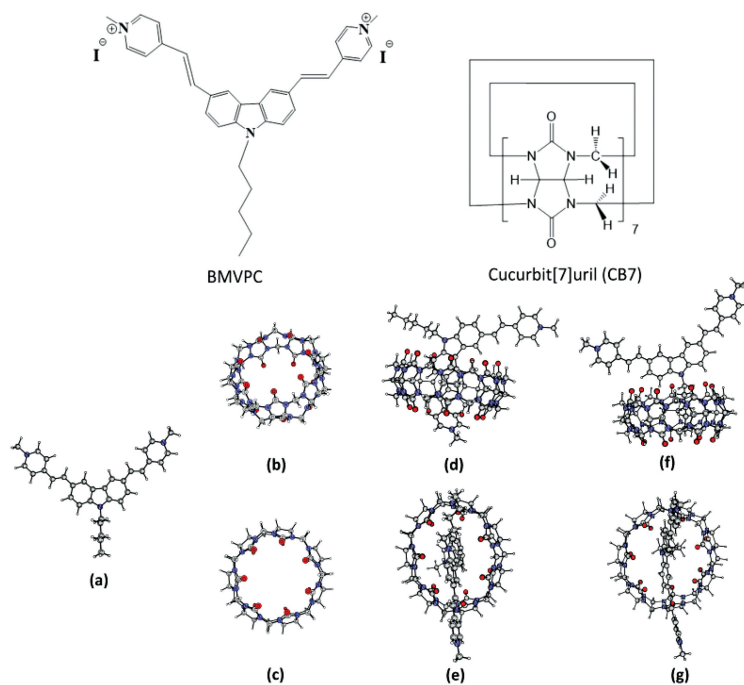


图 7 水溶性双光子引发剂的化学结构式及利用量子化学模拟的主客体化学相互作用得到的构型^[49]

Fig. 7 Chemical structure of water-soluble two-photon initiator and simulated configuration obtained from host guest chemical interaction of quantum chemical^[49]

通过提高双光子引发剂的引发效率,可以有效降低聚合阈值、减小聚合体积、提高加工分辨率,从而获得精细微纳结构。同时,低阈值激光能量对材料的损伤小,甚至能够实现活细胞组织及支架共加工。增加引发剂的水溶性,能够将聚合从有机相转移到水相中,极大程度地避免有机溶剂的残留,降低细胞毒性。然而,除了引发效率、细胞毒性外,组织工程用微结构还要考虑生物相容性及生物可降解性等,因此,设计生物用水溶性双光子引发剂时还需要

平衡取舍,在保证高效率、高精度的同时,兼顾生物安全性和功能性,以满足在组织工程领域的应用需求。

4 水凝胶微结构双光子聚合制备及其在组织工程中的应用

4.1 飞秒激光双光子聚合系统

飞秒激光双光子聚合系统主要包括飞秒激光器、光路传输和控制装置、实时观测系统、三维移动台、计算机及控制软件系统 5 部分,如图 8 所示。以

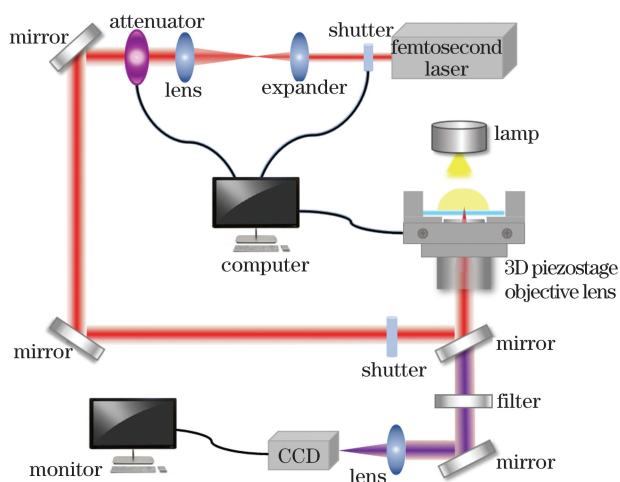


图 8 飞秒激光加工系统

Fig. 8 Femtosecond laser processing system

本课题组的近红外 Ti: 蓝宝石激光器为例, 飞秒激光器主要由泵浦激光光源和光学谐振腔组成, 脉冲宽度为 120 fs, 中心波长为 780 nm, 重复频率为 80 MHz; 光路传输系统主要组成元件有快门、滤光片、扩束管、衰减片、反光镜、物镜等, 具有光路开关控制、杂散光屏蔽、功率调控、光线传输及激光聚焦等功能; 实时观测系统利用显微镜进行激光焦点对准, CCD 相机实时观察; 三维移动台系统由载样台、压电陶瓷驱动器、控制器组成, 控制样品的三维移

动; 计算机及软件控制系统可进行数据转换, 通过编写程序, 三维移动台按照预设图案的轨迹进行空间三维运动, 完成扫描加工。

4.2 双光子聚合水凝胶微纳结构

水凝胶材料根据成分来源可以分为两大类: 天然水凝胶和合成水凝胶。天然水凝胶主要有胶原、明胶、透明质酸、纤维粘连蛋白、藻酸盐及壳聚糖等。这些材料生物相容性好、基本无毒、而且对机体的刺激性很小, 但是机械性能不佳, 需要与其他材料结合使用或者通过物理化学方法进行修饰。为了克服这些限制, 开发了具有一定生物性质的合成水凝胶(聚丙烯酰胺、聚丙烯酸、聚乙烯醇、聚甲基丙烯酸羟乙酯、聚氧乙烯等)。研究人员以这些天然/合成水凝胶(及它们的混合体系)为聚合单体, 制备出了一系列细节复杂、刚度合适的高精度微结构^[50-56]。

Correa 等^[57]分别以三丙烯酸酯单体和壳聚糖为宿主和客体, 使用双光子聚合制备了不同尺寸的立方体微结构, 这些结构中的壳聚糖没有与宿主树脂发生化学反应, 在制备过程中保留了它的生物材料特性。结构具有纳米表面特征, 分辨率约为 700 nm, 完整性良好。Spivey 等^[58]利用高黏度蛋白加工了不接触基底且不发生漂移的 3D 晨星链水凝胶微结构, 如图 9(d) 所示。Lü 等^[59]根据 PEGDA

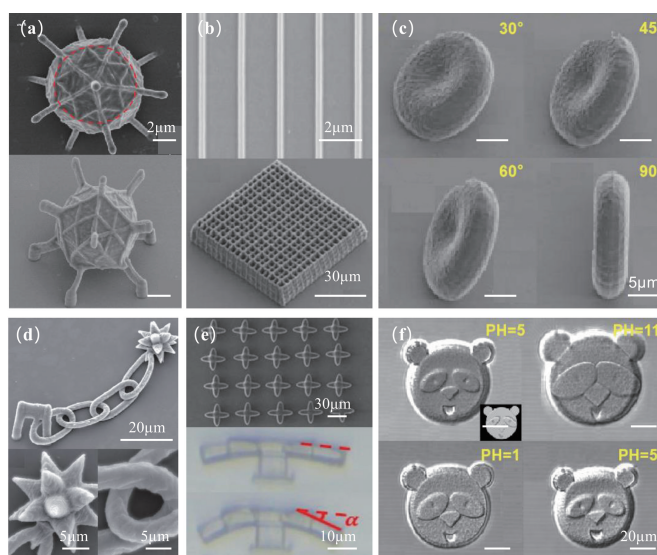


图 9 双光子聚合制备的 3D 水凝胶结构的扫描电子显微镜 (SEM) 图像。(a) 腺病毒水凝胶微结构^[48]; (b) 3D 木堆结构^[47]; (c) 红细胞微结构^[60]; (d) 高黏度蛋白晨星链微结构^[58]; (e) PEGDA 湿度响应性图案及微驱动装置^[59]; (f) pH 响应性熊猫脸蛋白质微结构^[61]

Fig. 9 SEM images of 3D hydrogel structure prepared by two-photon polymerization. (a) Adenovirus hydrogel microstructure^[48]; (b) 3D wood pile structure^[47]; (c) erythrocyte microstructure^[60]; (d) microstructure of high-viscosity-protein Morning star chain^[58]; (e) PEGDA humidity responsive pattern and micro-drive device^[59]; (f) pH-responsive panda face protein microstructure^[61]

水凝胶的湿度响应性,制备了阵列三瓣花和模拟植物叶片的微结构,利用水蒸气驱动实现离散结构的互联和微叶片开关的闭合。同时设计制备了能模拟关节弯曲运动的悬臂结构,如图 9(e)所示,这种类似关节的悬臂结构在湿度驱动下能够定向弯曲 20° ,且能重复几千次,显示了这种响应型微悬臂的记忆性和耐久性。这种湿度响应的微结构有望用在传感器、智能软机器人的构建等领域。

Gou 等^[60]在不同激光功率、扫描速度下制备了具有不同层间距的水凝胶 PEG 红细胞微结构,如图 9(c)所示,研究发现 PEG 微结构在水中的杨氏模量接近软骨组织,有可能在未来作为软骨修复的细胞支架。此外,还发现通过改变层间距或尺寸可以调节微结构的形态,这对探讨微结构与细胞之间的相互作用是有益的。本课题组以 PEGDA 为单体,采用先后合成的两类高引发效率水溶性蒽醌双光子引发剂,制备了模拟腺病毒及木堆高精度 3D 水凝胶微结构,如图 9(a)、(b)所示。在扫描速度为 $10\ \mu\text{m}/\text{s}$ 时,将加工用激光阈值能量从 $8.6\ \text{mW}$ ^[47]降低到 $6.29\ \text{mW}$ ^[48],制备的 3D 水凝胶的横向空间分辨率突破了 $92\ \text{nm}$,为高精细 3D 水凝胶微结构与器件的制备提供了基础。Wei 等^[61]制备了具有可调表面形貌和 pH 响应特性的 3D 牛血清白蛋白

“熊猫脸”微结构,如图 9(f)所示,该结构在 pH 循环中表现出独特的“面部表情”变化,这种形态可控、具有 pH 响应特性的蛋白质微结构在生物医学和生物传感器中具有潜在的应用前景。

4.3 水凝胶微纳结构在组织工程中的应用

基底表面图案化已经被证实会影响细胞的增殖分化,特定的图案设计可以用来控制细胞生长及实现细胞的特定功能化。三维支架能够模拟体内微环境,为细胞提供支持和指导,传递营养物质。制备高分辨率的图案化基底和 3D 支架结构是组织工程研究的有效方法之一^[62-65]。

明胶^[66-69]作为胶原水解产物,具有良好的可生物降解性能和生物相容性,有助于细胞黏附生长,是生物材料的重要成分。Ovsianikov 等^[70]以甲基丙烯酸酯改性明胶(GelMOD)为基础,通过体外降解实验证明改性后的明胶的酶降解能力保持不变。随后采用双光子聚合制造了用于体外细胞培养的 3D 支架,用激光诱导正向转移(LIFT)技术在制备的支架上植入猪间充质干细胞,观察细胞黏附和增殖。实验结果表明,应用成骨刺激后,种子细胞在支架上有钙沉积,并分化为预期的谱系,为支架-细胞相互作用和三维组织形成的系统研究提供了新的视角,如图 10(a)所示。

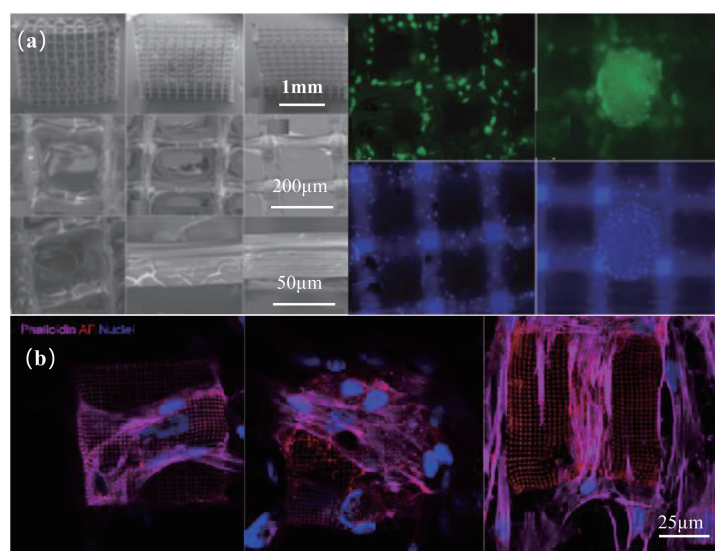


图 10 双光子聚合制备的改性明胶支架。(a)GelMOD 三维支架促进猪间充质干细胞钙沉积^[70]; (b)细胞在聚合度不同的 GelMA 支架上的黏附和侵袭^[71]

Fig. 10 Modified gelatin scaffolds prepared by two-photon polymerization. (a) GelMOD 3D scaffold promoting calcium deposition of porcine mesenchymal stem cells^[70]; (b) cell adhesion and invasion on GelMA scaffolds with different degrees of polymerization^[71]

Brigo 等^[71]报道了双光子聚合制备的具有不同聚合度的高分辨率三维甲基丙烯酸酯改性明胶

(GelMA)水凝胶结构。通过调整工艺参数(激光功率、扫描速度等),得到不同聚合程度的木堆支架,支

架因聚合度不同而具有不同的膨胀变形和刚度。细胞相容性和促进细胞黏附的测试结果表明,三维水凝胶具有生物相容性,能促进细胞黏附和迁移。值得注意的是,聚合度不同的支架,细胞黏附和浸润程度也不同,如图 10(b)所示。由于刚度低,交联度较低的网络结构容易在外力作用下产生形变,因而更有利于细胞迁移和生长。这种现象为在微尺度上研究细胞附着、变形及迁移的行为提供了方法。

PEG 是一种不与蛋白质和细胞相互作用的水凝胶材料,由于其生物相容性好、无毒性,是组织工

程领域理想的基础生物材料,其衍生物 PEGDA 具有良好的光聚合特性,是目前应用最多的双光子聚合水凝胶材料^[72-73]。本课题组^[49]基于 BMVPC 和 CB7 之间的主-客体相互作用,合成了一种水溶性双光子引发剂(BMVPC-CB7 包合物),并与生物相容性 PEGDA 水凝胶一起形成水相光刻胶体系,制备了水凝胶 3D 六角形支架微结构,如图 11 所示。观察到水凝胶结构具有良好的生物相容性和较低的细胞毒性,并将其用于 L929 和 HeLa 活细胞中进行培养和观察。

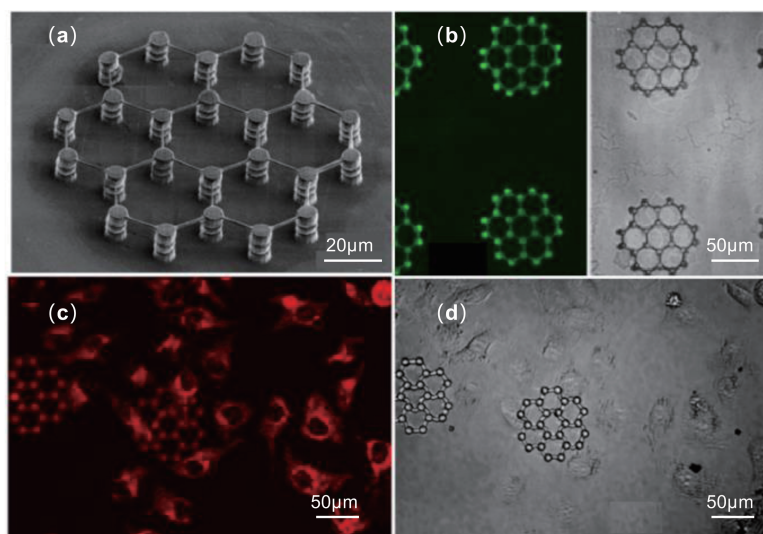


图 11 PEGDA 水凝胶支架上细胞生长及黏附行为^[49]。(a)完整的六角形网格支架的斜向 SEM 图像;(b)共聚焦荧光图像和明场图像;(c) HeLa 细胞和网格支架共培养的共聚焦荧光图像;(d) HeLa 细胞和网格支架共培养的明场图像

Fig. 11 Cell viability and adhesion on PEGDA hydrogel scaffold^[49]. (a) Oblique SEM image of a complete hexagonal grid scaffold; (b) confocal fluorescence image and bright field image; (c) confocal fluorescence image of HeLa cells co-culturing with the grid scaffold; (d) bright field image of HeLa cells co-culturing with the grid scaffold

Accardo 等^[74]制备了 PEGDA 水凝胶 3D 支架结构,支架悬臂直径和孔隙均大于细胞,细胞可以悬挂生长,如图 12 所示。在支架上培养神经 2A 细胞发现,种植在支架外表面的细胞黏附状态良好,呈球形,表面有多个神经延伸,长度为 10~60 μm 。这些神经延伸除了在单个悬臂表面延伸交互外,还可以跨越间隙,与相邻悬臂上的神经延伸相互连接在一起,甚至可以连接 2D 平面上的神经延伸。同时发现,在细胞骨架外沿分布着更多的 F-肌动蛋白,而微管蛋白则在靠近细胞核的骨架区域和比较典型的神经延伸中表达突出,这项工作预示了水凝胶 3D 支架在神经科学领域的新应用。

透明质酸(HA)是人体细胞外基质(ECM)的主要成分,是一种极具吸引力的组织工程支架材料的起始材料^[75]。2014 年,Kufelt 等^[76]利用甲基

丙烯酸缩水甘油酯化 HA,又将 HA 与合成的生物相容性聚合物(如 PEGDA)结合在一起,利用双光子聚合成功地制备了具有不同几何形状和孔径的结构精细的 3D 改性 HA 和 HA-PEG 支架,并采用成骨细胞和成纤维细胞进行了生物相容性分析。壳聚糖也是一种具有生物相容性、可降解性、亲合性的生物功能材料,在生物基础研究和药物缓释领域应用广泛。2015 年,Kufelt 等^[77]又利用具有生物相容性的 PEGDA 改性壳聚糖,制备了具有不同 PEG 组分的光敏水溶性壳聚糖衍生物(CHGM-PEG),并将双光子聚合得到的具有不同结构和不同孔隙度的杂化水凝胶微结构作为体外细胞分化的 3D 模型,以研究干细胞微环境,实验发现,植入到支架上的细胞可以呈现正常的细胞形态并增殖。

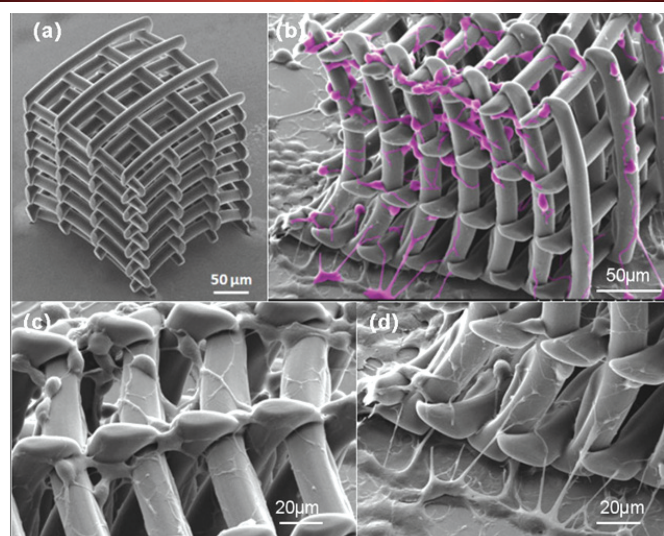


图 12 PEGDA 水凝胶支架上细胞生长及黏附行为^[74]。(a) 3D PEGDA 水凝胶支架的 SEM 图像;(b) 3D PEGDA 水凝胶支架上 neuro2A 细胞定植的 SEM 图像;(c) neuro2A 细胞定植在水凝胶支架上表面的放大图像;(d) 平面基底上的 neuro2A 细胞与支架上的 neuro2A 的连接交互

Fig. 12 Cell viability and adhesion on PEGDA hydrogel scaffold^[74]. (a) SEM image of 3D PEGDA hydrogel scaffold; (b) SEM image of neuro2A cells transplanting on a 3D PEGDA hydrogel scaffold; (c) magnified image of neuro2A cells transplanting on the surface of hydrogel scaffold; (d) connection interaction between neuro2A cells on the planar substrate and neuro2A on the scaffold

5 结束语

综述了水凝胶双光子聚合用引发剂的研究进展,水凝胶微结构的双光子聚合及其在体外培养中诱导细胞增殖、促进分化等方面的应用。双光子聚合具有加工灵活、加工形貌多样、加工精度高等特点,通过这种方法制备的微纳结构可以模拟体内真实的细胞生长环境特征,对研究不同形貌微结构对细胞生长行为的影响以及探索细胞与细胞、细胞与周围环境间的相互作用机制有着重要的意义。为了获得具有高引发效率的双光子引发剂,以提高制备微结构的分辨率,对常规双光子引发剂开展了大量的研究工作,例如提高 TPA 截面、降低荧光量子产率等,获得的引发剂分子具有高引发效率、低聚合阈值。在此基础上,考虑到生物生长环境的需求,在保证 TPA 特性的同时又设计了一系列无细胞毒性的水溶性双光子引发剂,以改善制备的水凝胶 3D 微结构的生物相容性。然而,在生命科学及组织工程的应用中,要求支架能跨维度实现微纳米复合结构的制造,同时需要具有较高精度,明确这种复杂精细结构的物理参数对细胞行为的影响有重要意义。目前,虽然水溶性双光子引发剂的研发工作已初有成效,但仍然存在分子作用机制不明确、引发效率低等问题,仍需深入研究。此外,目前水凝胶双光子聚合

制备的微结构尺寸较小(毫米、微米级别),且制备耗时较长,这不能满足体外大量细胞培养和组织生长的需要,因此利用超快激光快速制备大面积^[78]水凝胶微结构将是未来重要的研究焦点。

参 考 文 献

- [1] Torgersen J, Ovsianikov A, Mironov V, et al. Photo-sensitive hydrogels for three-dimensional laser microfabrication in the presence of whole organisms [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(10): 105008.
- [2] Ge L, Liu L W, Jiang L N, et al. Properties of hydrogel and its applications in biomedicine [J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2015, 32(6): 1369-1373.
葛丽, 刘立伟, 蒋丽娜, 等. 水凝胶的性能及其在生物医学中的应用 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2015, 32(6): 1369-1373.
- [3] Li C W, Davis B, Shea J, et al. Optimization of micropatterned poly(lactic-co-glycolic acid) films for enhancing dorsal root ganglion cell orientation and extension [J]. *Neural Regeneration Research*, 2018, 13(1): 105-111.
- [4] Boudriot U, Dersch R, Greiner A, et al. Electrospinning approaches toward scaffold engineering: a brief overview [J]. *Artificial Organs*, 2006, 30(10): 785-792.
- [5] Timnak A, Gharebaghi F Y, Shariati R P, et al.

- Fabrication of nano-structured electrospun collagen scaffold intended for nerve tissue engineering [J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2011, 22(6): 1555-1567.
- [6] Kim C H, Khil M S, Kim H Y, et al. An improved hydrophilicity via electrospinning for enhanced cell attachment and proliferation[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2006, 78B(2): 283-290.
- [7] Cheng C M, LeDuc P R. Micropatterning polyvinyl alcohol as a biomimetic material through soft lithography with cell culture[J]. *Molecular BioSystems*, 2006, 2(6/7): 299-303.
- [8] Attalla R, Ling C, Selvaganapathy P. Fabrication and characterization of gels with integrated channels using 3D printing with microfluidic nozzle for tissue engineering applications [J]. *Biomedical Microdevices*, 2016, 18(1): 17.
- [9] Yang X C, Lu Z H, Wu H Y, et al. Collagen-alginate asbioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2018, 83:195-201.
- [10] Kengla C, Lee S J, Yoo J J, et al. 3-D bioprinting technologies for tissue engineering applications [J]. *Rapid Prototyping of Biomaterials*, 2020: 269-288.
- [11] Yeong W Y, Chua C K, Leong K F, et al. Indirect fabrication of collagen scaffold based on inkjet printing technique [J]. *Rapid Prototyping Journal*, 2006, 12(4): 229-237.
- [12] Ge Z X, Yu H B, Yang W G, et al. Development of multi-dimensional cellco-culture via a novel microfluidic chip fabricated by DMD-based optical projection lithography [J]. *IEEE Transactions on NanoBioScience*, 2019, 18(4): 679-686.
- [13] Kunwar P, Jannini A V S, Xiong Z, et al. High-resolution 3D printing of stretchable hydrogel structures using optical projection lithography [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(1): 1640-1649.
- [14] Ouyang X, Zhang K, Wu J, et al. Optical μ -printing of cellular-scale micro scaffold arrays for 3D cell culture[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 8880.
- [15] Sadeghi A, Pezeshki-Modaress M, Zandi M. Electrospun polyvinyl alcohol/gelatin/chondroitin sulfate nanofibrous scaffold: fabrication and in vitro evaluation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114: 1248-1256.
- [16] Schlie S, Ngezhayo A, Ovsianikov A, et al. Three-dimensional cell growth on structures fabricated from ORMOCER by two-photon polymerization technique [J]. *Journal of Biomaterials Applications*, 2007, 22(3): 275-287.
- [17] Sun R, Wang C Y, Hu Y L, et al. Femtosecond laser processing hydrogel two-sided god microcolumn and its application [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2019, 46(9): 0902001.
孙锐, 王重宇, 胡衍雷, 等. 飞秒激光加工水凝胶双面神微柱及其应用 [J]. *中国激光*, 2019, 46(9): 0902001.
- [18] Raimondi M T, Eaton S M, Laganà M, et al. Three-dimensional structural niches engineered via two-photon laser polymerization promote stem cell homing [J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9(1): 4579-4584.
- [19] Torgersen J, Qin X H, Li Z Q, et al. Hydrogels for two-photon polymerization: a toolbox for mimicking the extracellular matrix [J]. *Advanced Functional Materials*, 2013, 23(36): 4542-4554.
- [20] Ovsianikov A, Mironov V, Stampfl J, et al. Engineering 3D cell-culture matrices: multiphoton processing technologies for biological and tissue engineering applications [J]. *Expert Review of Medical Devices*, 2012, 9(6): 613-633.
- [21] Jeon H, Hidai H, Hwang D J, et al. Fabrication of arbitrary polymer patterns for cell study by two-photon polymerization process [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, 93A(1): 56-66.
- [22] Engelhardt S, Hoch E, Borchers K, et al. Fabrication of 2D protein microstructures and 3D polymer-protein hybrid microstructures by two-photon polymerization [J]. *Biofabrication*, 2011, 3(2): 025003.
- [23] Klein F, Richter B, Striebel T, et al. Two-component polymer scaffolds for controlled three-dimensional cell culture [J]. *Advanced Materials*, 2011, 23(11): 1341-1345.
- [24] Nava M M, Raimondi M T, Credi C, et al. Interactions between structural and chemical biomimetism in synthetic stem cell niches [J]. *Biomedical Materials*, 2015, 10(1): 015012.
- [25] Nava M M, di Maggio N, Zandrini T, et al. Synthetic niche substrates engineered via two-photon laser polymerization for the expansion of human mesenchymal stromal cells [J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2017, 11(10): 2836-2845.
- [26] Kawata S, Sun H B, Tanaka T, et al. Finer features for functional microdevices [J]. *Nature*, 2001, 412(6848): 697-698.
- [27] Zhang J R, Guan Y C. Surface functional

- microstructure of biomedical materials prepared by ultrafast laser: a review [J]. *Chinese Optics*, 2019, 12(2): 199-213.
- 张佳茹, 管迎春. 超快激光制备生物医用材料表面功能微结构的现状及研究进展 [J]. *中国光学*, 2019, 12(2): 199-213.
- [28] Di J K, Zhou M, Yang H F, et al. Manufacturing micro-biological device and scaffold research with two-photon femtosecond laser technology [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2009, 36(1): 249-254.
- 狄建科, 周明, 杨海峰, 等. 飞秒激光双光子制造生物微器件微支架 [J]. *中国激光*, 2009, 36(1): 249-254.
- [29] Ehrlich J E, Wu X L, Lee I Y, et al. Two-photon absorption and broadband optical limiting with bis-donor stilbenes [J]. *Optics Letters*, 1997, 22(24): 1843-1845.
- [30] Albota M, Beljonne D, Brédas J L, et al. Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections [J]. *Science*, 1998, 281(5383): 1653-1656.
- [31] Kuebler S M, Rumi M, Watanabe T, et al. Optimizing two-photon initiators and exposure conditions for three-dimensional lithographic microfabrication [J]. *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 2001, 14(4): 657-668.
- [32] Cumpston B H, Ananthavel S P, Barlow S, et al. Two-photon polymerization initiators for three-dimensional optical data storage and microfabrication [J]. *Nature*, 1999, 398(6722): 51-54.
- [33] Belfield K D, Schafer K J, Mourad W, et al. Synthesis of new two-photon absorbing fluorene derivatives via Cu-mediated Ullmann condensations [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2000, 65(15): 4475-4481.
- [34] Yang C, Zheng M, Li Y P, et al. Poly(1, 4-diketo-3, 6-diphenylpyrrolo[3, 4-c] pyrrole-alt-3, 6-carbazole/2, 7-fluorene) as high-performance two-photon dyes [J]. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2014, 52(7): 944-951.
- [35] Jia X Q, Han W X, Xue T L, et al. Diphenyl sulfone-based A- π -D- π -A dyes as efficient initiators for one-photon and two-photon initiated polymerization [J]. *Polymer Chemistry*, 2019, 10(17): 2152-2161.
- [36] Liska R, Seidl B. 1, 5-Diphenyl-1, 4-diyne-3-one: a highly efficient photoinitiator [J]. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2005, 43(1): 101-111.
- [37] Pucher N, Rosspeintner A, Satzinger V, et al. Structure-activity relationship in D- π -A- π -D-based photoinitiators for the two-photon-induced photopolymerization process [J]. *Macromolecules*, 2009, 42(17): 6519-6528.
- [38] Tromayer M, Gruber P, Rosspeintner A, et al. Wavelength-optimized two-photon polymerization using initiators based on multipolar aminostyryl-1, 3, 5-triazines [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 17273.
- [39] Xing J F, Chen W Q, Dong X Z, et al. Synthesis, optical and initiating properties of new two-photon polymerization initiators: 2, 7-Bis(styryl)anthraquinone derivatives [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2007, 189(2/3): 398-404.
- [40] Xing J F, Chen W Q, Gu J, et al. Design of high efficiency for two-photon polymerization initiator: combination of radical stabilization and large two-photon cross-section achieved by N-benzyl 3, 6-bis(phenylethynyl)carbazole derivatives [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2007, 17(14): 1433-1438.
- [41] Lu W E, Dong X Z, Chen W Q, et al. Novel photoinitiator with a radical quenching moiety for confining radical diffusion in two-photon induced photo polymerization [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(15): 5650-5659.
- [42] Liu Z J, Chen T, Liu B, et al. Two-photon absorption of a series of V-shape molecules: the influence of acceptor's strength on two-photon absorption in a noncentrosymmetric D- π -A- π -D system [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2007, 17(44): 4685-4690.
- [43] Woo H Y, Liu B, Kohler B, et al. Solvent effects on the two-photon absorption of distyryl benzene chromophores [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(42): 14721-14729.
- [44] Wan X J, Zhao Y X, Xue J Q, et al. Water-soluble benzylidene cyclopentanone dye for two-photon photopolymerization [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2009, 202(1): 74-79.
- [45] Li Z Q, Torgersen J, Ajami A, et al. Initiation efficiency and cytotoxicity of novel water-soluble two-photon photoinitiators for direct 3D microfabrication of hydrogels [J]. *RSC Advances*, 2013, 3(36): 15939-15946.
- [46] Li S J, Li L D, Wu F P, et al. A water-soluble two-photon photopolymerization initiation system: methylated- β -cyclodextrin complex of xanthene dye/aryliodonium salt [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2009, 203(2/3): 211-215.
- [47] Xing J F, Liu J H, Zhang T B, et al. A water soluble

- initiator prepared through host-guest chemical interaction for microfabrication of 3D hydrogels via two-photon polymerization [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(27): 4318-4323.
- [48] Xing J F, Liu L, Song X Y, et al. 3D hydrogels with high resolution fabricated by two-photon polymerization with sensitive water soluble initiators [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, 3(43): 8486-8491.
- [49] Zheng Y C, Zhao Y Y, Zheng M L, et al. Cucurbit [7] uril-carbazole two-photon photoinitiators for the fabrication of biocompatible three-dimensional hydrogel scaffolds by laser direct writing in aqueous solutions [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(2): 1782-1789.
- [50] Koroleva A, Gittard S, Schlie S, et al. Fabrication of fibrin scaffolds with controlled microscale architecture by a two-photon polymerization-micromolding technique [J]. *Biofabrication*, 2012, 4(1): 015001.
- [51] Lee S H, Moon J J, West J L. Three-dimensional micropatterning of bioactive hydrogels via two-photon laser scanning photolithography for guided 3D cell migration [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(20): 2962-2968.
- [52] Barry III R A, Shepherd R F, Hanson J N, et al. Direct-write assembly of 3D hydrogel scaffolds for guided cell growth [J]. *Advanced Materials*, 2009, 21(23): 2407-2410.
- [53] Xiong Z, Zheng C L, Jin F, et al. Magnetic-field-driven ultra-small 3D hydrogel microstructures: preparation of gel photoresist and two-photon polymerization microfabrication [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 274: 541-550.
- [54] Raimondi M T, Eaton S M, Nava M M, et al. Two-photon laser polymerization: from fundamentals to biomedical application in tissue engineering and regenerative medicine [J]. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 2012, 10(1): 55-65.
- [55] Li J Y, Li X J, Luo T, et al. Development of a magnetic microrobot for carrying and delivering targeted cells [J]. *Science Robotics*, 2018, 3(19): eaat8829.
- [56] Greiner A M, Richter B, Bastmeyer M. Micro-engineered 3D scaffolds for cell culture studies [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2012, 12(10): 1301-1314.
- [57] Correa D S, Tayalia P, Cosendey G, et al. Two-photon polymerization for fabricating structures containing the biopolymer chitosan [J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2009, 9(10): 5845-5849.
- [58] Spivey E C, Ritschdorff E T, Connell J L, et al. Multiphoton lithography of unconstrained three-dimensional protein microstructures [J]. *Advanced Functional Materials*, 2013, 23(3): 333-339.
- [59] Lü C, Sun X C, Xia H, et al. Humidity-responsive actuation of programable hydrogel microstructures based on 3D printing [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 259: 736-744.
- [60] Gou X R, Zheng M L, Zhao Y Y, et al. Mechanical property of PEG hydrogel and the 3D red blood cell microstructures fabricated by two-photon polymerization [J]. *Applied Surface Science*, 2017, 416: 273-280.
- [61] Wei S, Liu J, Zhao Y, et al. Protein-based 3D microstructures with controllable morphology and pH-responsive properties [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(48): 42247-42257.
- [62] Tang J, Peng R, Ding J D. The regulation of stem cell differentiation by cell-cell contact on micropatterned material surfaces [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(9): 2470-2476.
- [63] Dai J, Kong N, Lu Y, et al. Bioinspired conical micropattern modulates cell behaviors [J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2018, 1(5): 1416-1423.
- [64] Kämpylä E, Sedláček T, Aydoğan D B, et al. Direct laser writing of synthetic poly(amino acid) hydrogels and poly(ethylene glycol) diacrylates by two-photon polymerization [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2014, 43: 280-289.
- [65] Noh M, Choi Y H, An Y H, et al. Magnetic nanoparticle-embedded hydrogel sheet with a groove pattern for wound healing application [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019, 5(8): 3909-3921.
- [66] Ghorbani F, Zamanian A, Kermanian F, et al. A bioinspired 3D shape olibanum-collagen-gelatin scaffolds with tunable porous microstructure for efficient neural tissue regeneration [J]. *Biotechnology Progress*, 2020, 36(1): e2918.
- [66] Ghorbani F, Zamanian A, Kermanian F, et al. A bioinspired 3D shape olibanum-collagen-gelatin scaffolds with tunable porous microstructure for efficient neural tissue regeneration [J]. *Biotechnology Progress*, 2020, 36(1): e2918.
- [67] Yang L J, Ou Y C. The micro patterning of glutaraldehyde (GA)-crosslinked gelatin and its application to cell-culture [J]. *Lab on a Chip*, 2005, 5(9): 979-984.
- [68] Bello A B, Kim D, Kim D, et al. Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: from cell

- culture to medical applications [J]. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 2020, 26(2): 164-180.
- [69] Lewis P L, Green R M, Shah R N. 3D-printed gelatin scaffolds of differing pore geometry modulate hepatocyte function and gene expression [J]. *Acta Biomater*, 2018, 69: 63-70.
- [70] Ovsianikov A, Deiwick A, van Vlierberghe S, et al. Laser fabrication of three-dimensional CAD scaffolds from photosensitive gelatin for applications in tissue engineering [J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(4): 851-858.
- [71] Brigo L, Urciuolo A, Giullitti S, et al. 3D high-resolution two-photon crosslinked hydrogel structures for biological studies [J]. *Acta Biomaterialia*, 2017, 55: 373-384.
- [72] Ovsianikov A, Gruene M, Pflaum M, et al. Laser printing of cells into 3D scaffolds [J]. *Biofabrication*, 2010, 2(1): 014104.
- [73] Ovsianikov A, Malinauskas M, Schlie S, et al. Three-dimensional laser micro- and nano-structuring of acrylated poly(ethylene glycol) materials and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications [J]. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(3): 967-974.
- [74] Accardo A, Blatché M C, Courson R, et al. Two-photon lithography and microscopy of 3D hydrogel scaffolds for neuronal cell growth [J]. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 2018, 4(2): 027009.
- [75] Toole B P, Wight T N, Tammi M I. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(7): 4593-4596.
- [76] Kufelt O, El-Tamer A, Sehring C, et al. Hyaluronic acid based materials for scaffolding via two-photon polymerization [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(2): 650-659.
- [77] Kufelt O, El-Tamer A, Sehring C, et al. Water-soluble photopolymerizable chitosan hydrogels for biofabrication via two-photon polymerization [J]. *Acta Biomaterialia*, 2015, 18: 186-195.
- [78] Gao W, Zheng M L, Jin F, et al. Fast fabrication of large-area two-dimensional micro/nanostructure by femtosecond laser [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(11): 111421.
- 高文, 郑美玲, 金峰, 等. 飞秒激光快速制备大面积二维微纳结构 [J]. *激光与光电子学进展*, 2020, 57(11): 111421.

Research Progress of Two-Photon Initiator with High Efficiency and Preparation of Hydrogel Microstructure in Aqueous Phase

Zhang Weicai^{1,2}, Zheng Meiling^{1*}

¹Laboratory of Organic Nano Photonics, Key Laboratory of Bio-Inspired Materials and Interfacial Science, Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;

²School of Future Technology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101407, China

Abstract

Significance As is known, biological science research focuses on revealing the essence of life and studying the mystery of growth, development, disease, and aging. To understand all of these, we must begin with understanding the cell behavior. Cell proliferation, differentiation, migration, movement, and other behaviors are closely related to life processes. Thus, understanding the mechanism of these behaviors is of great significance.

The surface microstructure of the material can influence the biological behavior of cells, such as inducing cell growth, proliferation and migration, and promoting specific cell functions. While hydrogels are widely used in tissue engineering and regenerative medicine, drug delivery, *in vitro* cell culture and other fields due to their good biocompatibility and similar composition to extracellular matrix. Therefore, hydrogel micronanometer patterned surfaces and scaffolds prepared by using micro-nano manufacturing technology can provide a more simulated *in vivo* development environment for the growth of cells and tissues *in vitro*, which are of great significance for the exploration of the interaction mechanism between cells and cells, between cells and the surrounding environment.

Femtosecond laser two-photon polymerization (TPP) is a recently developed micro-nano manufacturing method that can realize the controlled preparation of two-dimensional and three-dimensional (2D/3D) micro-nano structures with high precision morphology. The micro-nano structure of hydrogels prepared by this technology, with both the biocompatibility of hydrogels and the mechanical clues, can more accurately simulate the microenvironment of cell

growth *in vivo*, which has attracted more and more attention in the field of tissue engineering. It is worth mentioning that the resolution of the micro-nano structure fabricated by TPP depends largely on the initiator efficiency. A series of efforts has been made to improve the efficiency of photoinitiators, and significant achievements have been made. However, because most of the traditional initiator molecules are soluble in organic solvents, cytotoxicity originating from organic solvent residue in the micro-nano structure will occur. Therefore, it is particularly important to design and prepare biocompatible water-soluble two-photon initiators.

In the past few years, many advances have been achieved in the preparation of hydrogel micro-nano structures by TPP and its application in tissue engineering. However, there are still many challenges in biosafety initiator design and *in vitro* cell culture experiments of hydrogel micro-nano structures. Hence, it is essential to summarize the existing relevant researchs and understand the problems in this field in a more comprehensive way, which has guiding significance for the future development direction and implementation methods of this field.

Progress In this study, the basic principle of femtosecond laser TPP (Fig. 1) and the design and synthesis of a two-photon initiator (Fig. 2) are briefly introduced. The research progress of initiators for TPP of hydrogels is mainly introduced, including expanding the length of conjugation system, introducing strong donor/electron acceptor group, adding a coinitiator system to increase the two-photon absorption cross-section, introducing free radical quenching group to reduce the fluorescence quantum yield, and decreasing the cytotoxicity of microstructures by increasing the water solubility of the initiator. Perry et al. designed a series of D-A- π -D-type organic molecules that increase the two-photon absorption cross-section by expanding the conjugate bridge (Fig. 3). Belfield et al. synthesized fluorene substituents with different electron-donating and electron-absorbing abilities, which had large transition dipole moment and strong two-photon absorption efficiency, providing new materials for imaging and other two-photon related applications. Xing et al. synthesized new C_{2v} symmetric anthraquinone derivatives by Wittig reaction. These compounds exhibit stronger intramolecular charge transfer bands and lower fluorescence quantum yield (Fig. 5). Considering the cytotoxicity of organic solvent residues, the study of water-soluble two-photon initiators has become a hotspot. Bazan's group synthesized a series of organic and water-soluble diphenyl TPA initiators containing dialkyl amino donors by introducing alkyl halide terminal units. On the basis of the principle of host and guest chemistry, the hydrophobic photosensitizer is coated with cyclodextrin and cucurbit urea 7 with large hydrophobic inner cavity size and good water solubility, which is also a simple and environmentally friendly preparation method of a water-soluble two-photon initiator. In our group, Zheng et al. have proposed designing and synthesizing a series of carbazole-based ionic two-photon initiators and further improving its two-photon absorption property by using host-guest chemistry. By varying the chemical microenvironment during polymerization, the TPP of precise configuration in an aqueous phase can be realized, which is important to avoid the cytotoxicity usually caused by conventional two-photon initiators (Fig. 7). These studies are the scientific basis of the fabrication of 3D biocompatible hydrogels' micro-nano structures and are the necessary conditions for better simulating the biological microenvironment *in vitro*. Then, the micro-nano structure of hydrogel made using TPP and the application of these structures in tissue engineering are introduced. Furthermore, the existing problems and the future development trend in the application of biocompatible hydrogel microstructures were summarized and prospected.

Conclusion and Prospect In past decades, conventional TPP initiators have made significant progress. Researchers have made much effort to develop two-photon initiators with high initiation efficiency and low polymerization threshold. A series of water-soluble two-photon photoinitiators without cytotoxicity have been designed, considering biosafety, to improve the biocompatibility of the 3D microstructure of hydrogels while ensuring the two-photon absorption characteristics. At present, although the research and development of water-soluble two-photon photoinitiators have been achieved, there are still some shortcomings, such as understanding the polymerization mechanism and low initiation efficiency, which still need to be further studied. Also, the size of the current TPP hydrogel microstructure is small (nanometer level), unable to meet the needs of a large amount of cell culture and tissue growth *in vitro*, so the rapid preparation of large hydrogel microstructure with TPP will be an important research focus in the future.

Key words materials; two-photon initiator; hydrogel; two-photon polymerization; microstructure; biocompatibility; tissue engineering

OCIS codes 160.5335; 160.1435; 140.3390