

飞秒激光双光子聚合制备 3D 水凝胶微结构及其应用

武昕宜^{1,2}, 段琦^{1,2}, 宾凡淳^{1,2}, 郑美玲^{1*}¹中国科学院理化技术研究所仿生材料与界面科学重点实验室, 有机纳米光子学实验室, 北京 100190;²中国科学院大学, 北京 101407

摘要 双光子聚合加工技术是基于双光子吸收效应的一种新型的微纳制造技术,已被广泛应用于微纳光子学、微机电系统、组织工程等领域。采用双光子聚合加工技术制备的 3D 水凝胶微结构形貌可控,而且具有高精度、适当的刚度以及良好的生物相容性等优势,可以更好地在体外模拟体内微环境,因而在生物医学领域展现出了巨大的应用潜力。本文简要介绍了双光子聚合加工技术的原理,综述了水溶性光引发剂的研究进展,着重介绍了双光子聚合加工技术制备水凝胶的研究现状及其在仿生学、生物医学等领域的应用。

关键词 材料; 双光子聚合; 水凝胶; 生物相容性; 微结构; 细胞支架; 组织工程

中图分类号 V261.8

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL230764

1 引言

水凝胶是一种具有三维(3D)空间网络结构的交联聚合物材料,其亲水基团可与水分子结合,将水分子连接在网状结构内部,而疏水部分则遇水膨胀。水凝胶具有一定的几何外形以及与软组织相似的含水量,在保持形状的同时能够变形,这些特性不仅使其可在体外模拟细胞外基质(ECM),还能使其以可控的方式定位和递送治疗蛋白,作为细胞移植的运载工具,因而水凝胶在组织工程、药物递送、再生医学等生物医学领域被广泛应用^[1-2]。制备水凝胶微结构的方法众多,包括光刻法^[3]、湿法纺丝^[4]、3D 生物打印^[5-6]、磁模板法^[7]等。Nakashima 等^[8]通过光刻和湿法刻蚀,利用玻璃板上的海藻酸盐薄膜制备了不同细胞类型的细胞微图案,有助于改进由异质细胞形成的人工组织的制备方法。Yang 等^[9]通过湿法纺丝制备了直径可调的连续水凝胶微纤维,并发现微纤维的直径取决于灌注速度和凝固转速。Ersumo 等^[10]通过 3D 生物打印使用 BioBots Beta 气动挤出机制备了交联明胶基水凝胶,测试其力学性能和溶胀性能后发现其弹性模量和最佳挤出压力都随着聚合物含量的增加而增大,印刷分辨率随着印刷速度和喷嘴规格的增加而提高。Lacko 等^[11]利用磁模板法去除可溶性磁性海藻酸盐颗粒在外加磁场下形成的具有一定取向的柱状结构后得到了排列整齐的管状微结构支架,该支架可促进细胞重塑。但是,上述微加工制备方法因比较复杂,而且制备出的微结构精细度不高、形貌不可调控等,限制了水凝胶微结

构在生物医药领域的发展。

近年来,激光直写技术快速发展,目前已成为国内外的研究热点。其中的飞秒激光双光子聚合(TPP)加工技术采用近红外激光作为光源,是一种具有任意可设计真三维加工能力和高穿透深度的新型微纳制造技术,可以制备任意高分辨率的三维微纳结构,已被广泛应用于微纳光子学、微机电系统、组织工程、药物递送等领域。与单光子相比,双光子吸收概率与激光功率的平方成正比,因此光聚合反应仅仅发生在激光焦点中心处光子数密度极高的区域,可以突破光学衍射极限的限制,实现具有超高分辨率微纳结构的精细加工。

采用 TPP 加工技术制备的 3D 水凝胶微结构具有形貌可控、精度高、刚度适当以及良好的生物相容性等优势,可以更好地在体外模拟组织工程等领域所需的体内微环境(尤其是三维环境)中研究细胞形状与细胞功能之间的相关性,以及研究细胞与基质间相互作用背后的机理,因而在生物医学领域具有巨大的应用潜力^[12]。Costa 等^[13]使用两种 TPP 装置(商业化 TPP 装置和定制的 TPP 装置)制备了基于木堆结构的 3D 支架,研究了支架尺寸及其力学性能对骨髓间充质干细胞黏附和增殖的影响。实验结果表明:涂覆纤维连接蛋白的大间隙木堆结构表现出了更高的增殖率,3D 支架几何结构和材料的结合在共培养环境下细胞行为的研究方面具有很大潜力。Zhang 等^[14]采用 TPP 加工技术制备了生物相容性 3D 水凝胶微支架,并通过调节孔隙率(从 69.7% 到 89.3%)研究了细胞行为的调制,结果显示:利用 3D 微支架可以实现对纤维状肌动蛋白形

收稿日期: 2023-04-05; 修回日期: 2023-05-28; 录用日期: 2023-05-30; 网络首发日期: 2023-06-10

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)

通信作者: *zhengmeiling@mail.ipc.ac.cn

状的显著调控。Huang 等^[15]在多光子共聚焦扫描激光显微镜下,采用 TPP 技术使用含有亲水性光引发剂和甲基丙烯酸缩水甘油酯改性明胶的高生物相容性生物墨水,制备了封装正常小鼠成纤维细胞(L929)的 3D 水凝胶支架,并且未在激光照射区域内观察到对 L929 细胞的明显损伤。他们的实验结果显示:经 4 d 孵育后,支架内的 L929 增殖能力强且占据了支架内的大部分可用空间。这一结果验证了该生物墨水在生物打印领域的应用潜力。总而言之,不同于传统技术制备的水凝胶(精度低且缺陷不可控),通过 TPP 加工技术制备的水凝胶微结构具有形貌可控、加工分辨率高等优势,并且由于 TPP 的加工条件比较温和,使用近红外光进行激发,适合在细胞存在的情况下诱导聚合,因此具有良好的生物相容性,在生物打印、组织工程等生物医药领域具有广阔的应用前景。

目前的双光子聚合材料主要由光引发剂、单体及交联剂组成,可分为负性光刻胶和正性光刻胶,最常用的是含丙烯酸低聚物或环氧树脂的负性光刻胶。尽管丙烯酸酯类聚合物表现出了一定的生物相容性,但其水解产物具有毒性,采用该类材料制备的 3D 微支架在细胞培养时会影响细胞活性。制备水凝胶常用的光刻胶包括商业光刻胶、多糖、聚乙二醇(PEG)和蛋白质基光刻胶,它们可在光引发剂的作用下发生局域化反应。以丙烯酸酯或环氧化合物等有机基团功能化的无机(—Si—O—Si—)为主链的商业光刻胶有机改性陶瓷在双光子聚合加工技术中得到广泛应用。有机改性

陶瓷具有大硬度、化学稳定性、热稳定性、光学透明性等优异性能,其有机侧链可以交联形成持久且具有生物相容性的固体。PEG 已被美国食品药品监督管理局(FDA)批准作为食品添加剂、药物配方和化妆品等行业的原料,此外,其以良好的生物相容性被广泛用于组织工程,适合在 TPP 加工中用于制备 3D 水凝胶。

2 双光子聚合原理及加工系统

2.1 双光子聚合过程

双光子吸收(TPA)效应是指分子同时吸收两个能量低于其跃迁至最低激发态能级能量的光子,从基态跃迁至激发态的一种三阶非线性光学效应,其中吸收率与入射光强度呈非线性关系。单光子吸收和双光子吸收过程如图 1 所示。图 1(a)为单光子激发过程。当激发光的能量等于物质的基态与激发态之间的能量差时,处于基态的电子吸收一个光子从基态跃迁至激发态,一段时间后通过辐射跃迁过程返回基态,释放出荧光,该现象被称为“单光子激发荧光”。当激发光的波长为单光子激发波长的两倍时,激发光的能量只有原来的一半,无法将基态电子激发到激发态(只有极高的光子密度才能使基态电子同时吸收两个光子,使处于基态的电子跃迁至激发态),该现象如图 1(b)所示,此时可以认为基态与激发态之间存在一个虚拟态,它可将两个光子的能量叠加,使基态电子跃迁至激发态,此即双光子吸收过程。

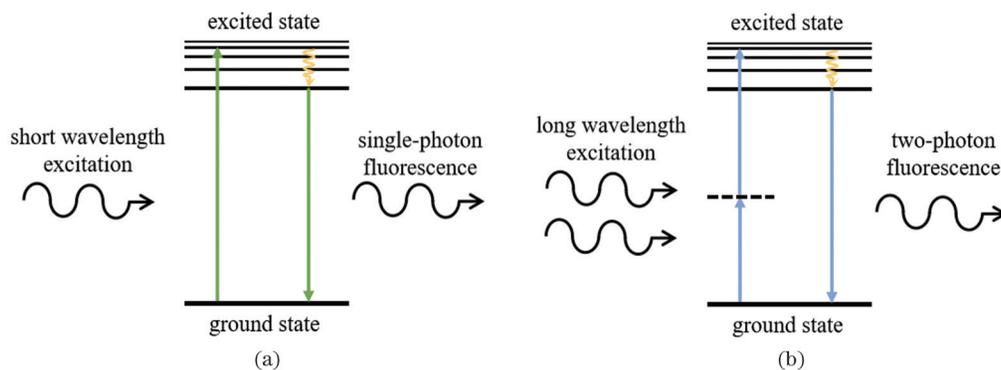


图 1 单光子与双光子激发过程示意图。(a)单光子激发过程;(b)双光子激发过程

Fig. 1 Schematic diagrams of single-photon and two-photon excitation processes. (a) Single-photon excitation process; (b) two-photon excitation process

在双光子聚合过程中,由于单个近红外光光子的能量要远低于材料分子的吸收带隙,材料需要吸收两个光子的能量才能发生聚合,即光敏物质同时吸收两个光子后跃迁到激发态,紧接着分解产生自由基或阳离子等活性物种,从而引发单体发生聚合反应。由于材料的双光子吸收率与入射光强呈非线性关系,只有当激光焦点处的功率达到双光子聚合阈值时才能发生聚合反应,即该过程具有局域化激发的特点。因此,通过控制激光强度可以使达到双光子聚合阈值的材料区

域远小于通过透镜聚焦后光斑的面积,从而使聚合结构的尺寸远小于光的衍射极限。

根据引发单体聚合的活性物种的不同,双光子聚合可分为自由基聚合和阳离子聚合。在此过程中,引发剂分子或染料敏化引发剂体系同时吸收两个光子跃迁到激发单重态,并通过系间窜越到达激发三重态,随后裂解产生自由基或阳离子等活性物种,或者通过夺取氢给体的质子产生自由基等活性物种。活性物种引发单体发生聚合反应,最终通过链终止或者链转移失

活形成聚合物^[16]。

2.2 双光子聚合加工系统

飞秒激光双光子微纳加工系统主要由光源、光束整形模块、三维样品台模块、实时观察模块和软件控制模块构成,如图 2 所示^[17]。利用飞秒激光振荡器(中心波长 800 nm)作为激发光源,在光路中放置快门调节曝光时间,并放置衰减器调节激光功率,控制激光能量。飞秒激光光束经扩束镜扩束后通过激光

功率衰减器和反射镜,最后经由大数值孔径物镜聚焦到待加工材料内部。利用三维微移动系统(三维移动台或二维振镜与一维移动台组合)控制激光焦点按照预先设计的三维轨迹对光刻胶材料进行扫描。实验装置配有照明光源、二向色镜及 CCD,用于加工过程的实时观察。当激光能量达到双光子聚合阈值后引发待加工材料发生聚合反应,经后处理,即可获得聚合物 3D 微结构。

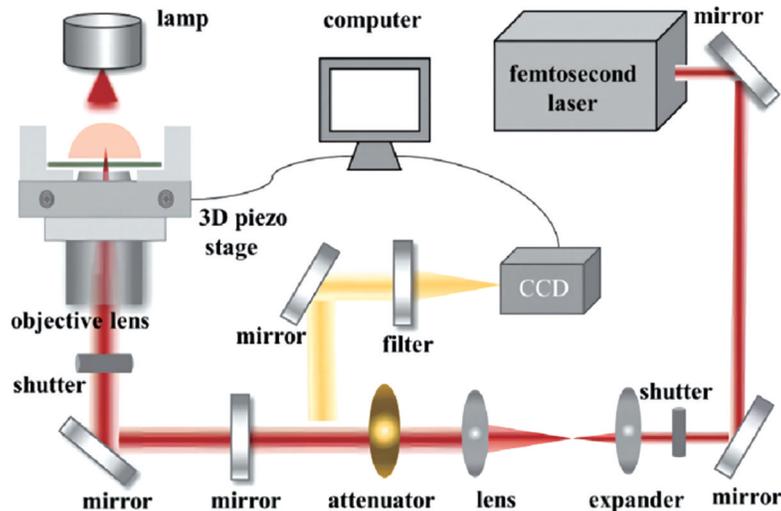


图 2 飞秒激光双光子微纳加工示意图^[17]

Fig. 2 Scheme of femtosecond laser two-photon micro-nano manufacturing^[17]

3 双光子引发剂的研究进展

光刻胶是双光子聚合过程中必不可少的材料,可分为负性光刻胶和正性光刻胶,其基本成分通常为光引发剂、单体和交联剂。其中用于自由基生成的光引发剂在双光子聚合过程中至关重要,制备出的微结构的精度在很大程度上依赖于双光子引发剂的引发效率。双光子引发剂是 TPP 前驱体材料的重要组成部分,其在激光辐射下同时吸收两个能量较低的长波长光子,从基态跃迁到激发态,进而引发单体发生聚合。最初的关于双光子引发剂的分子设计策略由 Perry 和 Marder 提出^[18-19],主要包括:1) 具有较大 TPA 截面的发色基团;2) 具有高引发效率的化学官能度;3) 生色团的激发导致化学功能性激活的机制。由于分子内电荷转移是 TPA 的“驱动力”,因此需要电子给体或电子受体基团。此外,共面的 π 共轭桥导致的扩展电荷分离态是提高分子内电荷转移效率的重要因素。

双光子引发剂的引发效率会影响制备的 3D 微结构的分辨率,故而开发高效且具有生物相容性的双光子引发剂成为了研究热点。Xing 等^[20-23]设计合成了具有大 TPA 截面、低荧光量子效率和 C_{2v} 对称结构的双光子引发剂,该双光子引发剂包括一系列蒽衍生物、蒹醌衍生物、咪唑衍生物等,如图 3 所示。二维 V 型低对称性的分子结构一方面可以在保证分子 TPA 截面的

同时降低荧光量子效率,从而提高自由基产生效率,另一方面可以引入苯基来稳定产生的自由基,进而提高局部自由基浓度,实现低的阈值功率。前期,他们利用 Wittig 反应合成了一种 C_{2v} 对称的蒹醌衍生物 2,7-二(2-(4-二甲氨基苯基)-乙烯基)蒹醌(BDPVA),其表现出了较低的荧光量子效率和较大的 TPA 截面,质量分数为 0.02% 的 BDPVA 在扫描速度为 10 $\mu\text{m/s}$ 时对应 3.67 mW 的低阈值功率。但是,该引发剂在有机溶剂和树脂中的溶解性较差,因而在 TPP 中的应用受限^[21]。紧接着,他们又设计合成了具有 $A-\pi-D-\pi-A$ C_{2v} 型结构的 9-苯基-3,6-双(4-硝基苯乙炔基)咪唑(BBNC)高感光引发剂,其在 800 nm 波长附近具有很大的 TPA 截面,物质的量分数为 0.18% 的 BBNC 表现出了 0.8 mW 的低阈值功率。蒹具有良好的共平面性,有利于 TPA 截面的提高^[20],因此,Xing 等设计合成了一系列 C_{2v} 型蒹衍生物。这些衍生物具有特殊的对称结构和较强的给电子能力,因此具有较低的阈值功率和较高的光引发敏感性。二维 V 型低对称性分子设计理念的提出为开发高引发效率的双光子引发剂提供了参考。

双光子引发剂由于平面结构和共轭体系的存在导致其水溶性较差,往往需要在光刻胶体系中加入有机溶剂助溶。但有机溶剂残留易对生物环境造成较大影响,并且会导致制备的结构精度差,从而限制了其在组织工程等生物医药领域的应用。因此,亟须发展水

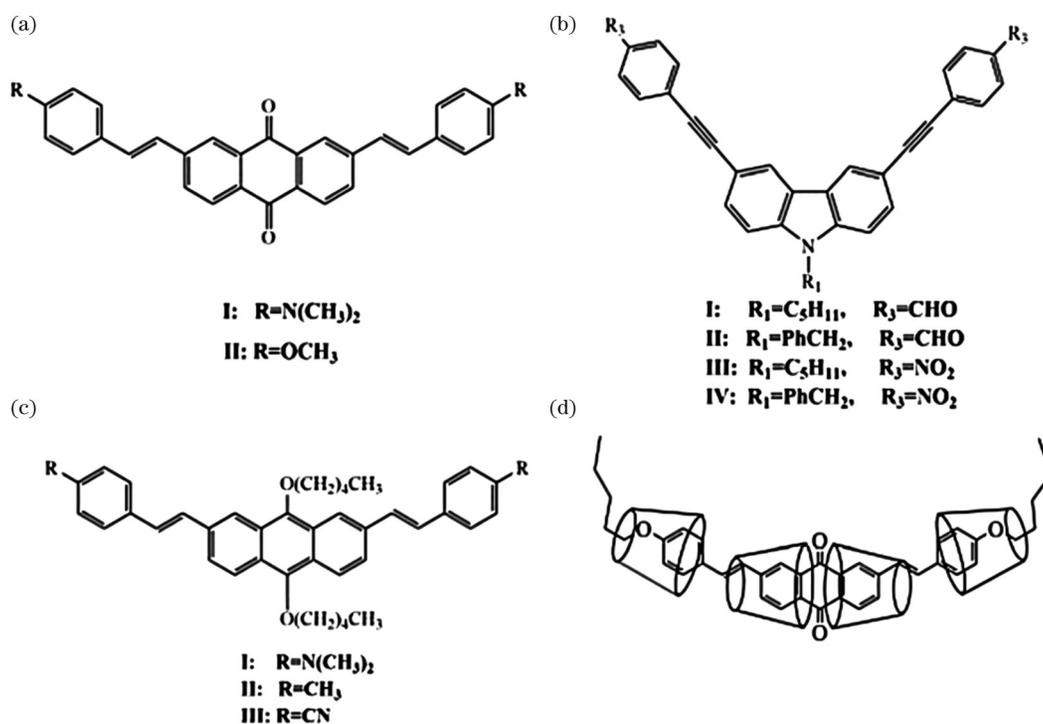


图 3 具有 C_{2v} 对称结构的双光子引发剂^[23]。(a)蒽醌类双光子引发剂;(b)咪唑类双光子引发剂;(c)蒽类双光子引发剂;(d)蒽醌类双光子引发剂与环糊精组装的水溶性双光子引发剂

Fig. 3 TPP photoinitiator with C_{2v} symmetric structure^[23]. (a) Anthraquinone TPP photoinitiator; (b) carbazole TPP photoinitiator; (c) anthracene TPP photoinitiator; (d) water-soluble TPP photoinitiator assembled by anthraquinone TPP photoinitiator and cyclodextrin

溶性好且具有良好双光子吸收特性的双光子引发剂。

Xing 等^[24]提出了一种采用主客体化学作用高效制备水溶性双光子引发剂的方法,即:先通过 Wittig 反应合成疏水性双光子引发剂 2,7-二(2-(4-戊氧基-苯基)-乙烯基)蒽醌,再将其与 2-羟丙基-β-环糊精进行组装,借助主客体化学作用制备出水溶性双光子引发剂,如图 3(d)所示。该水溶性双光子引发剂具有大的 TPA 截面和低的阈值功率,通过该引发剂制备出的 3D 水凝胶微结构具有高的分辨率。Zheng 等^[25]基于

咪唑乙烯基吡啶盐衍生物与葫芦[7]脲(CB7)之间的主客体相互作用合成了水溶性 BMPVC-CB7 光引发剂,其 TPA 截面相比 BMPVC 约增加了 5 倍,提高了制备水凝胶所需光引发剂的双光子吸收特性。同时,Zheng 等将其与具有良好生物相容性的聚乙二醇二丙烯酸酯作为水凝胶单体制备了分辨率高达 180 nm 的 3D 水凝胶支架微结构。Gao 等^[26]通过主客体相互作用制备了一种新型离子型咪唑水溶性光引发剂(如图 4 所示),其具有 3.7 mW 的低阈值功率和 180 nm 的

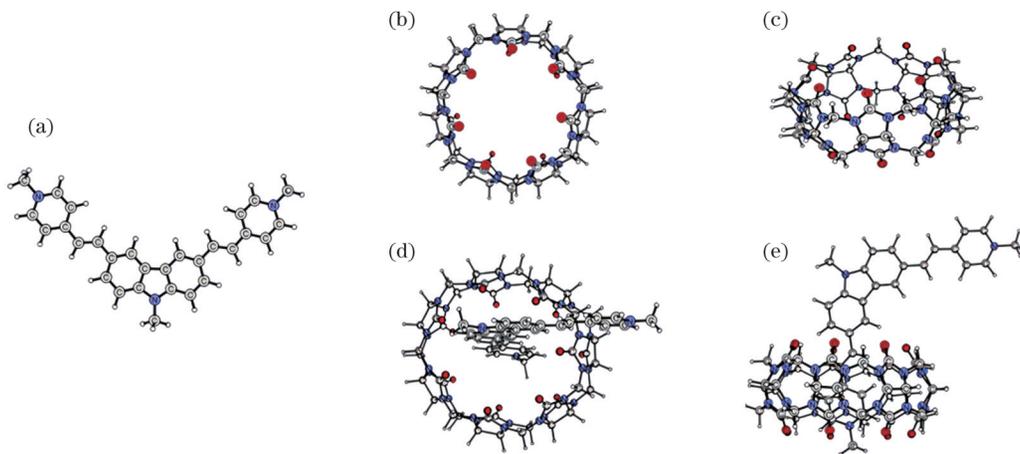


图 4 利用量子化学模拟的主客体化学相互作用得到的水溶性双光子引发剂构型^[26]。(a)BMVMC 的优化结合构型示意图;(b)CB7 的俯视图;(c)CB7 的侧视图;(d)优化几何构型的 CB7/BMVMC 的俯视图;(e)CB7/BMVMC 的侧视图

Fig. 4 Configuration of water-soluble two-photon initiator obtained from the host-guest chemical interaction simulated by quantum chemistry^[26]. (a) Optimized binding configurations of BMVMC; (b) bird view of CB7; (c) side view of CB7; (d) bird view of CB7/BMVMC with optimized geometrical configuration; (e) side view of CB7/BMVMC

高分辨率,可在水相环境下实现具有良好生物相容性的 3D 水凝胶微支架结构的制备。最近, Bin 等^[27]将基于阴离子的离子型咪唑水溶性双光子引发剂 3,6-双[2-(1-甲基吡啶)乙烯基]-9-甲基咪唑二对甲苯磺酸酯(BT)用于 3D 水凝胶微结构的制备, CB7 与该引发剂可形成结合比为 1:1 的主客体复合物(CB7/BT),从而提高了双光子引发剂的水溶性,实现了 6.3 mW 的阈值功率以及 127 nm 的特征尺寸。Bin 等在实验中发现:与前期用碘离子作为阴离子的引发剂相比,以对甲苯磺酸作为阴离子的引发剂与 CB7 的结合能更高, TPA 截面更大,以聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)为单体制备的光刻胶前驱体的 TPP 分辨率更高。此外, Xing 等^[28]还利用 PF127 聚苯醚通过亲水-疏水相互作用封装 2,7-二(2-(4-戊氧基-苯基)-乙炔基)蒽醌,制备

了具有低阈值功率、高引发效率的水溶性双光子引发剂,其横向空间分辨率突破了 92 nm。

另外,引入非离子表面活性剂或修饰亲水基团也可以制备出水溶性光引发剂。Jhaveri 等^[29]使用非离子表面活性剂 PF127 增加 2,2-二甲氧基-2-苯基苯乙酮在水中的溶解度,通过引发甲基丙烯酸-2-羟乙酯和 PEGDA 聚合制备了水凝胶微结构。Li 等^[30]通过羟醛缩合反应合成了一系列含有羧酸钠盐(羧酸钠盐可以改善水溶性)的环状苄基酮类双光子引发剂,其化学结构如图 5 所示,结果显示:基于环戊酮的光引发剂与光引发剂 Irgacure 2959 具有相同的生物相容性。Huang 等^[31]合成了一系列水溶性亚苄基环烷酮染料 T1、T2、T3,它们的最大 TPA 截面分别为 567、808、231 GM,该类分子具有低的阈值功率和良好的生物相容性。

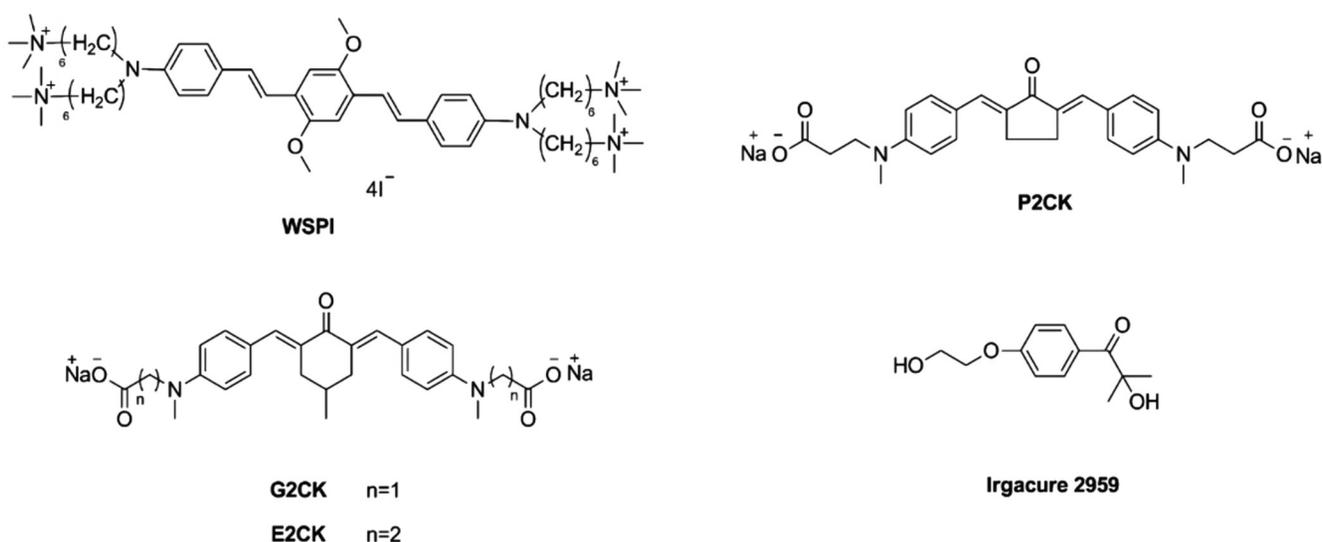


图 5 引入离子基团的水溶性双光子引发剂的化学结构^[30]

Fig. 5 Chemical structure of water-soluble TPP initiator with ionic groups^[30]

双光子引发剂的引发效率在很大程度上决定了 TPP 的效率,而双光子引发剂引发效率的提高对于降低阈值功率、提高所制备微结构的分辨率有着重要意义。通过增加双光子引发剂的水溶性可以防止有机溶剂残留对生物环境造成的影响,从而降低细胞毒性。但若要将其应用于组织工程等生物医药领域还需要考虑双光子引发剂是否具有生物相容性和生物可降解性。目前制备水溶性双光子引发剂还存在一些挑战:引入修饰基团、利用主客体化学作用虽然可以在一定程度上改善引发剂的水溶性,但要将其应用于生物医药领域,还需要平衡好引发效率和生物相容性,以制备兼具高引发效率和生物可降解性的水溶性双光子引发剂。

4 TPP 加工制备水凝胶微结构及其应用

4.1 TPP 加工制备水凝胶微结构

用于生物医药领域的水凝胶通常来源于人工合成

材料或天然衍生材料。合成材料的性能便于控制,但普遍缺乏生物相容性;明胶、蛋白质、透明质酸等天然衍生材料虽然具有良好的生物相容性,但其力学性能通常较差,需要进行一定的化学修饰。国内外使用合成/天然水凝胶以及对其进行化学修饰的水凝胶材料制备了一系列水凝胶微结构。

人工合成水凝胶材料的性能可调控,通常具有良好的力学性能,如丙烯酸酯类水凝胶材料等,可用于微驱动器、微流控等领域。孙洪波课题组^[32]通过飞秒激光直写离子交换光致聚合物聚(2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸)制备了离子交换微结构,在水溶液中带负电荷的微结构可以通过静电作用吸附带正电荷的金属离子、纳米颗粒或蛋白质,用于芯片功能化的部件。离子交换微结构在柔性芯片功能化方面展现出了应用潜力,为器官芯片系统提供了新的可能。Scarpa 等^[33]采用一种优化的方案实现了高分子质量(10 kDa, 1 Da=1 u)PEGDA 的 TPP 制备,获得了金字塔和圆顶状微结构。在微尺度下对微结构进行力学表征和 pH 响应

性测试,结果显示,可以通过调节 PEGDA 的浓度和/或几何形状来改变所制备结构的溶胀响应,为自主设计与制备具有机械和 pH 响应性能的 3D 水凝胶微结构提供了途径,该微结构有望用于生物传感器或作为执行器、泵和微筛的微流控平台。Xiong 等^[34]采用含有 0.96% (质量分数) Fe_3O_4 纳米颗粒的磁性凝胶光刻胶制备了磁场驱动的 3D 水凝胶微结构,并详细研究了含有不同 Fe_3O_4 纳米颗粒的凝胶光刻胶的 TPP 加工特性,结果显示: Fe_3O_4 纳米颗粒质量分数为 0.32% 的凝胶光刻胶的双光子聚合线宽最小可达 106 nm,长度为 12.4 μm 、直径为 10.6 μm 的 3D 水凝胶微钉结构在外磁场驱动下发生了明显且可逆的弯曲行为。Xing 等^[28]利用水溶性双光子引发剂在接近 TPP 阈值功率的激光下制备了高精度模拟腺病毒形貌的微结构,如图 6(a) 所示,进一步证明了 TPP 加工技术可以实现 3D 水凝胶微结构的高精细制备。Gou 等^[35]研究了不同激光功率、写入速度和层间距对 PEG 微结构在空气

中杨氏模量的影响,测定了不同层间距微结构在水中的杨氏模量(为 3.50~6.52 MPa),制备了不同姿态和尺寸的三维红细胞微结构,如图 6(b) 所示。Liu 等^[36]通过牺牲-支架-介导的双光子光刻策略实现了复杂 3D 水凝胶晶体微结构的制备,并发现借助可降解的水凝胶支架可以克服飞秒激光对纳米粒子自组装的扰动效应,从而制备出不同组成、几何外形和可变结构色的水凝胶态和固态胶体晶体微结构。Liu 等^[36]通过改变激光扫描速度构建了莲花状结构的多色三维微结构、内部具有悬浮球的立方体框架水凝胶微结构以及构建在微柱阵列上的水凝胶“桥”微结构,如图 6(c) 所示。此外,Xing 等^[24]以高效水溶性双光子引发剂 WI、分子质量为 700 Da 的 PEGDA 单体为前驱体,在平均功率为 9.7 mW、扫描速度为 30 $\mu\text{m}/\text{s}$ 的条件下制备了类似细胞支架且具有三维木堆结构的 3D 水凝胶,如图 6(d) 所示,为 TPP 加工技术在水相中制备水凝胶微结构提供了一种策略。

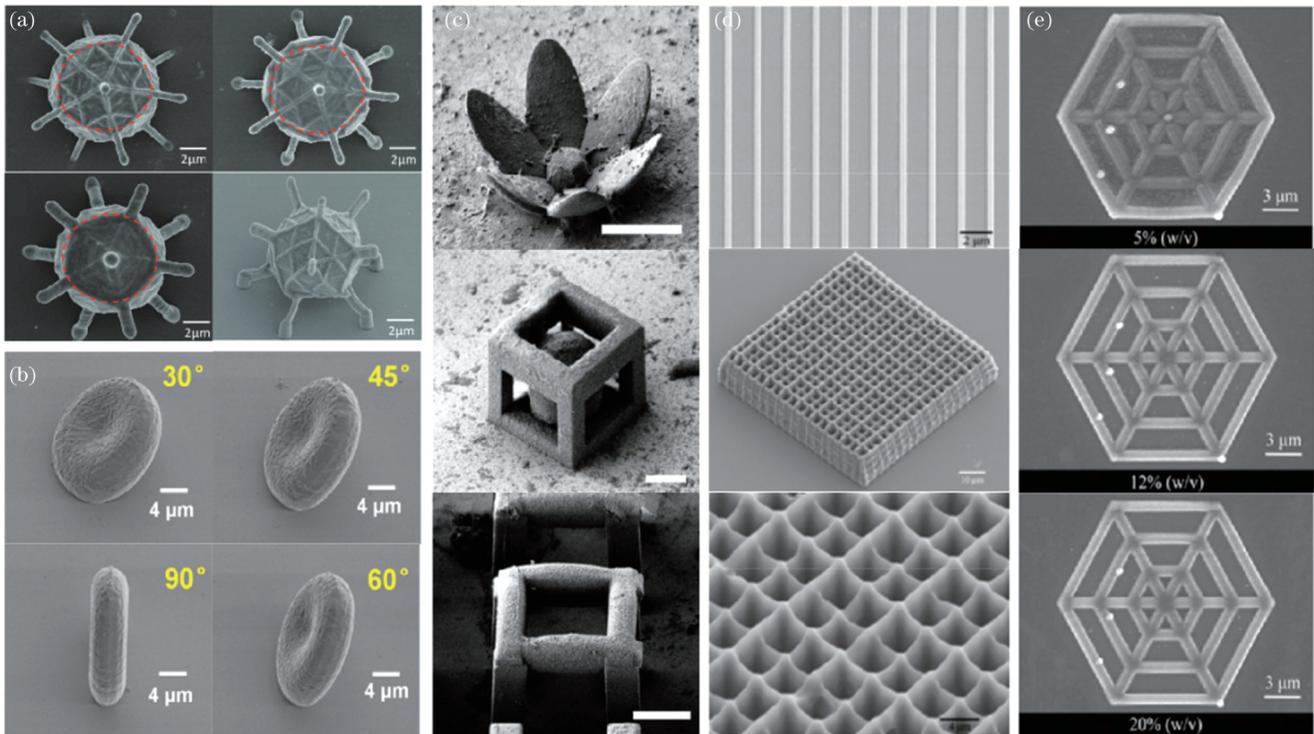


图 6 TPP 制备的 3D 水凝胶微结构的扫描电子显微镜 (SEM) 图像。(a) 腺病毒水凝胶微结构^[28];(b) 红细胞微结构^[35];(c) 莲花状微结构、内部有悬浮球的立方体框架微结构及微柱阵列上的水凝胶“桥”微结构^[36];(d) 三维木堆微结构^[24];(e) 单层蜘蛛网微结构^[37]
Fig. 6 Scanning electron microscopy (SEM) images of three-dimensional (3D) hydrogel microstructure prepared by TPP. (a) Adenovirus hydrogel microstructure^[28]; (b) red blood cell microstructure^[35]; (c) lotus-like microstructure, cube frame microstructure with suspended spheres inside and hydrogel “bridge” microstructure on the micro column array^[36]; (d) 3D woodpile microstructure^[24]; (e) single-layer spider web microstructure^[37]

组织工程等生物医药领域往往对水凝胶微结构的生物相容性、生物可降解性有着更高的要求,因此,常用天然水凝胶材料作为水凝胶前驱体,如明胶基、蛋白基等水凝胶材料。Yuan 等^[37]采用质量浓度为 12% 的光敏性 GelMA 水凝胶溶液,在激光扫描速度为 150 $\mu\text{m}/\text{s}$ 、激光功率为 7.8 mW、层间距为 150 nm 的条件下,制备

了具有良好生物相容性的单层蜘蛛网形 3D 微支架,如图 6(e) 所示。Qin 等^[38]合成了明胶水解物乙烯基酯 (GH-VE) 并将其与还原牛血清白蛋白衍生物进行共聚。硫醇-烯共聚物的光流变学分析表明:其相比纯 GH-VE 聚合开始得更快且末端模量更高,从而使得 TPP 制备出了更精细和更稳定的水凝胶微结构;自由

基介导的巯基-乙烯基酯光聚合的效率使得其在较低激光功率(低至 20 mW)下也可以获得较高的 TPP 写入速度(50 mm/s),而且其细胞毒性可以忽略不计。Sun 等^[39]利用非接触式无掩模飞秒激光直写技术,在水相中采用以多样性再生丝素蛋白为中心的生物墨水制备了具有良好弹性的任意 3D 微结构,结果显示:以丝素蛋白和金属离子分别作为生物还原剂和氧化剂,通过激光诱导丝素蛋白氧化/交联和金属光还原可以实现可控金属含量的 3D 蚕丝/金属复合微纳器件,为制备金属/生物大分子复合微纳器件提供了新思路。Nekrasov 等^[40]提出了基于纳米线 TPP 和直接激光写入的功能化 BSA@GO 复合纳米结构的制备方法,并对 BSA@GO 纳米线的局部电学性能和力学性能进行探究,实验结果表明:改善的局部力学性能在飞秒激光脉冲与新型复合结构的相互作用中展现出了 BSA 与 GO 的协同效应。Pennacchio 等^[41]开发了一种含有偶氮苯交联剂的明胶基水凝胶,可以通过 TPP 对其进行

精细微图案化,也可以通过光照对其进行可控刺激,并且光引发的明胶微结构膨胀诱导了被限制的 NIH-3T3 细胞的面内核变形。

4.2 3D 水凝胶微结构在仿生学中的应用

刺激响应行为是生命系统中的一个基本现象。在自然界中,动植物的刺激响应行为与其生存、繁衍息息相关,模仿自然界中的刺激响应行为对于解决生命科学中存在的问题具有重要意义。近年来,受自然界生物刺激响应行为的启发,基于仿生学的具有响应外界刺激并产生可控形变能力的水凝胶微器件引起了研究人员的兴趣,这些基于 pH、温度、湿度^[42]等条件的刺激响应型微器件可以应用于仿生器件、可穿戴电子设备、精密传感器等领域。

Xiong 等^[43]采用一种非对称 TPP 微加工方法制备了尺寸和形状可控的刺激响应型非对称水凝胶微悬臂梁结构,如图 7(a)所示。他们以丙烯酰胺作为单体、以 2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸钠作为共聚单

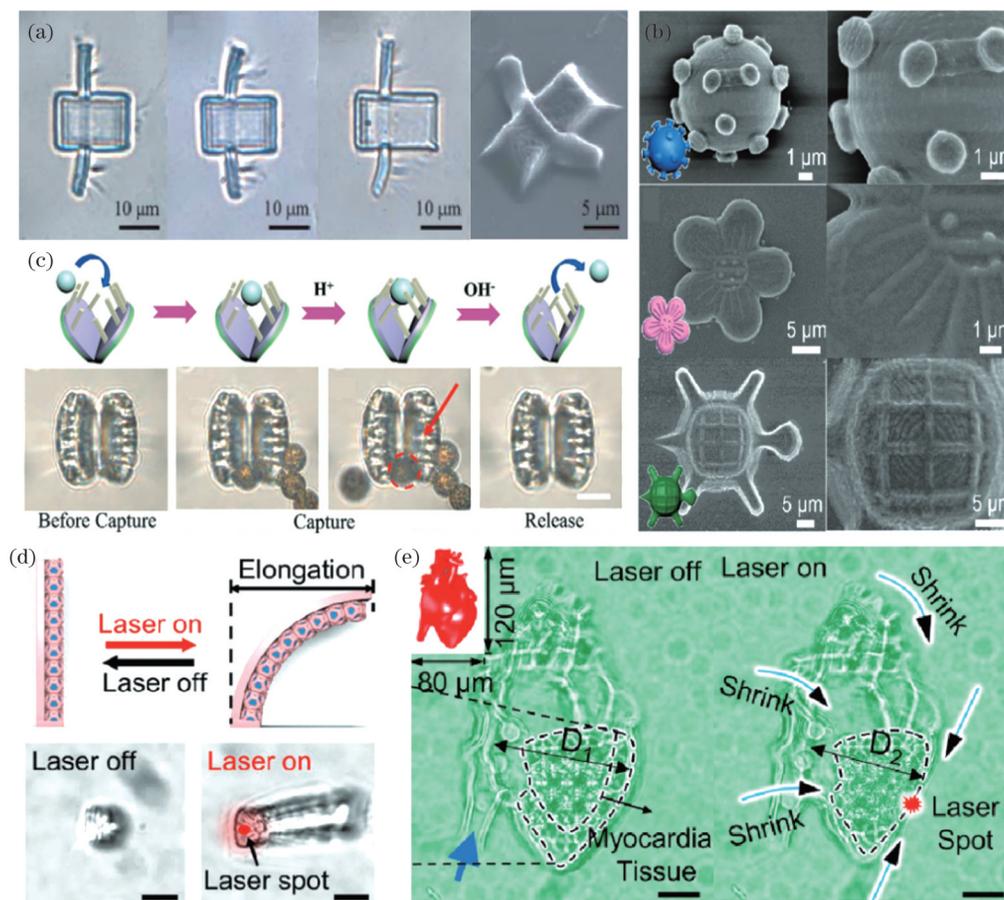


图 7 TPP 制备的刺激响应型微结构。(a)可逆离子响应型水凝胶微悬臂梁在水、1 mol/L NaCl 溶液、再次在水中的 SEM 图像以及干燥微悬臂梁的 SEM 图像^[43]; (b)仿冠状病毒、梅花、乌龟微结构^[27]; (c)仿生水凝胶微驱动器捕获和释放行为示意图及明场图像^[44]; (d)有无光刺激时微柱纤毛的示意图和光学显微照片^[45]; (e)无光刺激和有光刺激时微型心脏的光学显微照片^[45]

Fig. 7 Microstructures with stimulus-response fabricated by TPP. (a) SEM images of reversible ion responsive hydrogel microcantilever in water, 1 mol/L NaCl solution, again in water and dry microcantilever^[43]; (b) microstructures of imitated coronavirus, plum blossom and tortoise^[27]; (c) schematic diagrams and bright field images of capture and release behavior of biomimetic hydrogel micro actuator^[44]; (d) schematic and optical micrographs of the micropillar cilia with and without light stimulation^[45]; (e) optical micrograph of the micro heart without and with light stimulation^[45]

体、以 N,N' -亚甲基双丙烯酰胺作为交联剂、以苯偶酰作为光引发剂,将 2-苄基-2-(二甲氨基)-4'-吗啉基丁酮溶于甲醇、二甲基亚砷和甘油组成的混合溶剂中,制备了水凝胶前驱体。可逆的离子响应型水凝胶微悬臂梁由于对外界离子的不对称形变而表现出了吸引和可控弯曲行为,被证明有望应用于微驱动器和微操作器,在生物医学微器件开发方面具有广阔的前景。Bin 等^[27]设计并构建了一系列 3D 水凝胶微结构,并在 22 $\mu\text{m}/\text{s}$ 速度下,分别以 13.8、13.2、11.8 mW 的功率制备了结构完整、边缘清晰的冠状病毒、梅花、乌龟微结构,如图 7(b)所示。从放大后的 SEM 图像中可以看到:冠状病毒结构表面光滑且顶部有圆形突起,梅花结构中花瓣和花蕊的褶皱比较明显,乌龟结构的龟甲纹理和身体各部分都与设计模型一致,展现了主客体复合物 CB7/BT 在制备 3D 水凝胶微结构方面的巨大潜力。受捕蝇草应对外界刺激响应行为的启发,Wang 等^[44]从仿生学的角度出发,利用飞秒激光对含有甲基丙烯酸二甲氨基乙酯的刺激响应型光刻胶进行加工,制备出了一种基于仿生非对称结构的智能响应型水凝胶微驱动器,如图 7(c)所示。结果显示,通过改变 pH 值,该微驱动器可以实现对微目标的抓取和释放行为,并可对抓取和释放行为进行调节,变形时间为 1.2 s,恢复时间为 0.3 s,在精密传感器、智能微机器人等领域展现出了一定的应用潜力。Deng 等^[45]通过一步 4D 打印策略开发了碳纳米管掺杂复合水凝胶,其在增强交联网络光吸收的同时,也提高了热导率和力学模量,从而显著提高了三维微结构的光灵敏度和响应速度。同时,他们通过集成实体结构和巴基球组装结构制备了各向异性的微柱纤毛结构,如图 7(d)所示,并成功打印出迄今最小的可用于心动周期的具有可编程光刺激响应性的跳动人工心脏,如图 7(e)所示,为微纳集成系统、组织工程等领域的三维微机械设计和制备提供了新策略。

此外, Lee 等^[46]制备了整体尺寸为 10~30 μm 且形状不同的三维 BSA 蛋白水凝胶微结构,并通过在纳米尺度上对激光写入 z 轴距离进行纳米级调制来控制 BSA 的交联密度,进而以高精度量化和控制微结构的溶胀程度,实现了可控的定向响应性。Lee 等采用这种分段模量的方法设计了具有刺激诱导手性的形状变化的微结构,并制造了能响应 pH 变化的自支撑三维微捕获器,如图 8(a)所示。对于药物递送系统来说,持续给药载体的智能响应性也是一个关键。Wei 等^[47]通过 TPP 加工技术制备了具有可调表面形貌和 pH 响应特性的 BSA 基三维微结构,并对包括激光功率、扫描速度和层间距等的加工参数进行了优化,在溶胀比为 1.08~2.71 的范围内实现了 BSA 微结构形貌的可调控以及微结构的宽范围 pH 响应。此外他们还制备了具有可逆 pH 响应特性的熊猫面部孔状微图案[如图 8(b)所示]以及可以通过改变 pH 值

调节孔径的网状分子筛结构。Ma 等^[48]利用飞秒激光仿生制造了人工肌肉骨骼系统,以刚性 SU-8 作为骨架,以 pH 响应蛋白 BSA 作为智能肌肉,通过连续的片上 TPP 策略在预设的构型中依次构建了 pH 响应的蜘蛛微机器人[如图 8(c)所示]以及一种可实现定位、驱动、搬运、释放的三维智能微夹钳[如图 8(d)所示],该策略为直接打印多材料微机器人提供了新的制备方法。胡昕宇等^[49]通过 TPP 技术制备了一种 pH 响应的基于蛋白质基水凝胶的微机械“手臂”,通过改变环境的 pH 值可以使微机械“手臂”完成捕捉和释放。该工作对于研制生物检测、细胞操控的微器件极具参考价值。

结构色是可见光在微纳米尺度上与某些结构特征发生散射、衍射或干涉而产生的颜色,如蝴蝶的翅膀及贝壳表面的颜色会随着观察角度的变化而改变。刺激响应型结构色(SCs)表面可通过外界刺激产生可调的光学性能,从而应用于微传感器、防伪等领域。在信息加/解密^[50]和智能执行器等微功能结构领域,SCs 可以起到增强可视化和提高识别性的作用。传统的制备宏观 SCs 表面的方法因需要固定的模板或复杂的后处理,而且其结构变形所需的 pH 往往不适合生物医学应用,因而并不适用于制备微观多色 SCs 表面。利用 TPP 技术通过飞秒激光直写 4D 打印微观 SCs 表面已经被用于构建微执行器^[51]等领域。Liu 等^[52]通过飞秒激光直写法和改性的 pH 响应性水凝胶在溶液条件下实现了 4D 打印的微观刺激响应型 SCs 表面。具有不同横向和轴向结构参数的 3D 正交光栅堆叠木堆结构因不同木堆层对透射光束的衍射而呈现出不同的颜色。调节溶液 pH,双变色的鱼和蝴蝶图案化结构(如图 9 所示)可在视觉上产生可逆色彩转换,为传感器、防伪标签等提供了一种理想的着色方法。

4.3 3D 水凝胶微结构在生物医药领域的应用

TPP 加工制备的水凝胶微结构在生物医药领域展现出了巨大潜力,因此水凝胶前驱体的生物相容性、生物可降解性、刺激响应性等物理化学性质受到了国内外的广泛关注。除了常用的含有丙烯酰胺类、PEG/PEGDA 等的高分子材料以外,由糖类、蛋白质类、明胶衍生物等具有生物相容性材料制备的水凝胶微结构也被广泛研究,并被应用于药物递送、细胞工程等生物医药领域。

药物递送常用于靶向治疗,但将药物精准运输到病灶部位并释放仍具挑战性,因此可用于显微样品操控和靶向药物递送的微机器人受到广泛关注。在生物医学和生物工程领域,微型机器人因具有较小的尺寸以及在人体内的运行优势而在生物医药领域具有一定的应用潜力。Peters 等^[53]提出了一种由 Fe_3O_4 纳米颗粒、PEGDA 和季戊四醇三丙烯酸酯组成的超顺磁性聚合物材料,其中水凝胶人工细菌鞭毛结构利用弱旋

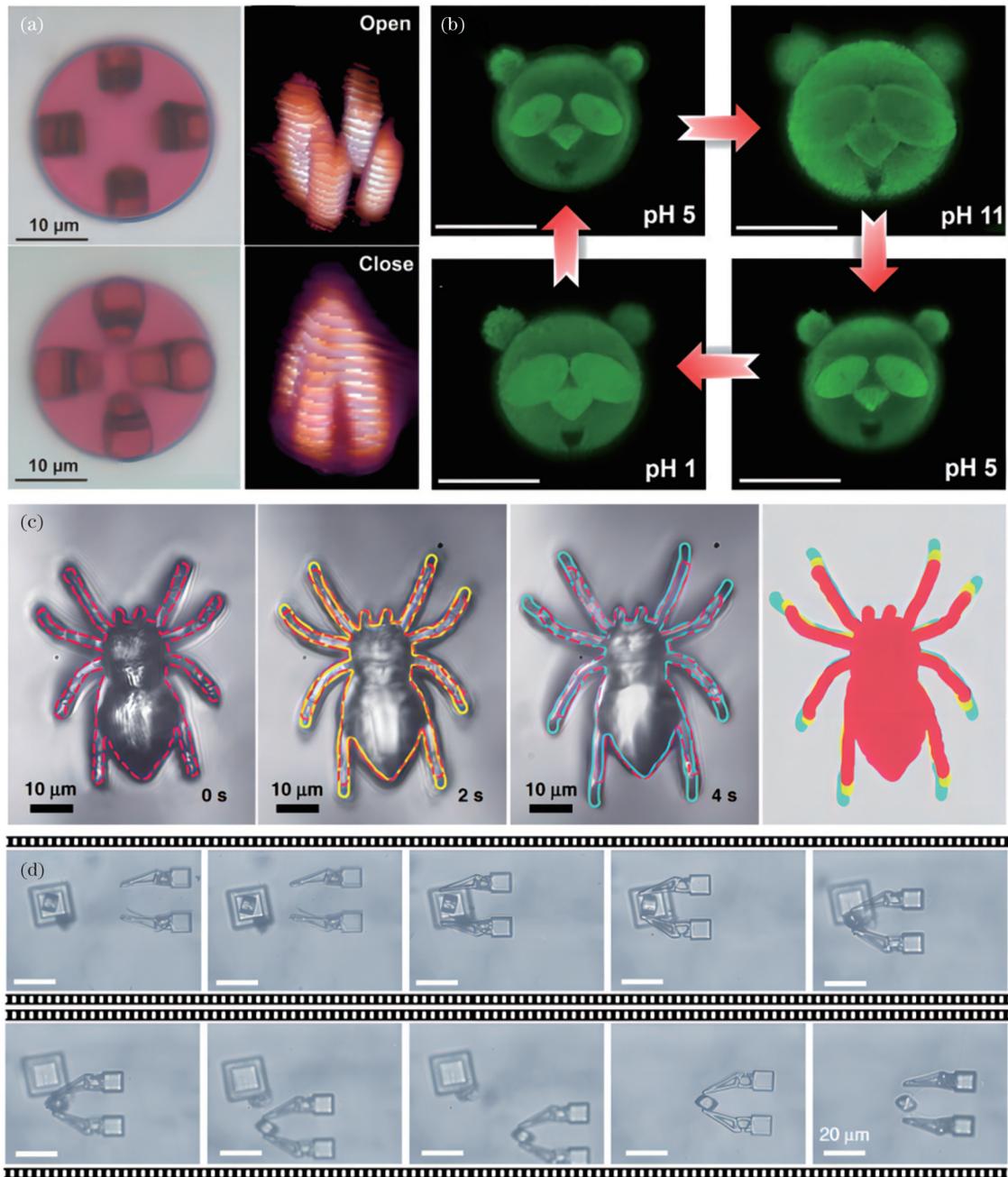


图 8 具有刺激响应的仿生微器件。(a)BSA 蛋白动态可逆 3D 陷阱状结构的光学显微镜和 3D 拉曼成像检测结果(pH 为 5 时表现为直立和“打开”,pH 从 5 变化到 11 时,4 个双柱结构向内弯曲,相互靠近)^[46]; (b)具有可逆变形的 3D 熊猫浮雕在改变 pH 值时的共聚焦荧光图像^[47]; (c)pH 值从 13 切换到 5 时微蜘蛛的驱动^[48]; (d)操纵的真实过程(定位、驱动、搬运、释放)^[48]

Fig. 8 Bionic micro-device with stimulus-response. (a) Dynamic reversible 3D trap structure of BSA protein was detected by optical microscope and 3D Raman imaging (the structure was upright and “open” when pH was 5, and four double-column structures bent inward and closed to each other when pH changed from 5 to 11)^[46]; (b) confocal fluorescence images of the 3D panda relief with reversible deformation at changing pH values^[47]; (c) actuation of the micro-spider when the pH value was switched from 13 to 5^[48]; (d) actual process of manipulation (positioning, driving, handling, and releasing)^[48]

转磁场进行无线驱动,并基于螺旋推进运动将药物靶向运输到 3T3 成纤维细胞。该聚合物材料的降解产物具有很低的细胞毒性,可在生理环境中降解并排出体外。该方法为水凝胶微器件的便捷制备、高效驱动及其在药物递送领域的应用提供了新的解决方案。然而,在进入人体时,微型机器人需要面对来自人体免疫系统抵御外来威胁的防御机制。Cabanach 等^[54]首次

利用 TPP 技术制备了用于 3D 打印水凝胶微机器人的两性离子光刻胶,并制备出了能避免被免疫细胞识别的非免疫原性两性离子微机器人,这种两性离子材料还可以进行充分的功能化,如可调力学性能、磁性纳米粒子的嵌入、生物分子的封装以及表面功能化。此外,经巨噬细胞检测超 90 h 后,该两性离子机器人仍未被发现,如图 10(a)所示,证明了其隐身特性,为制备生

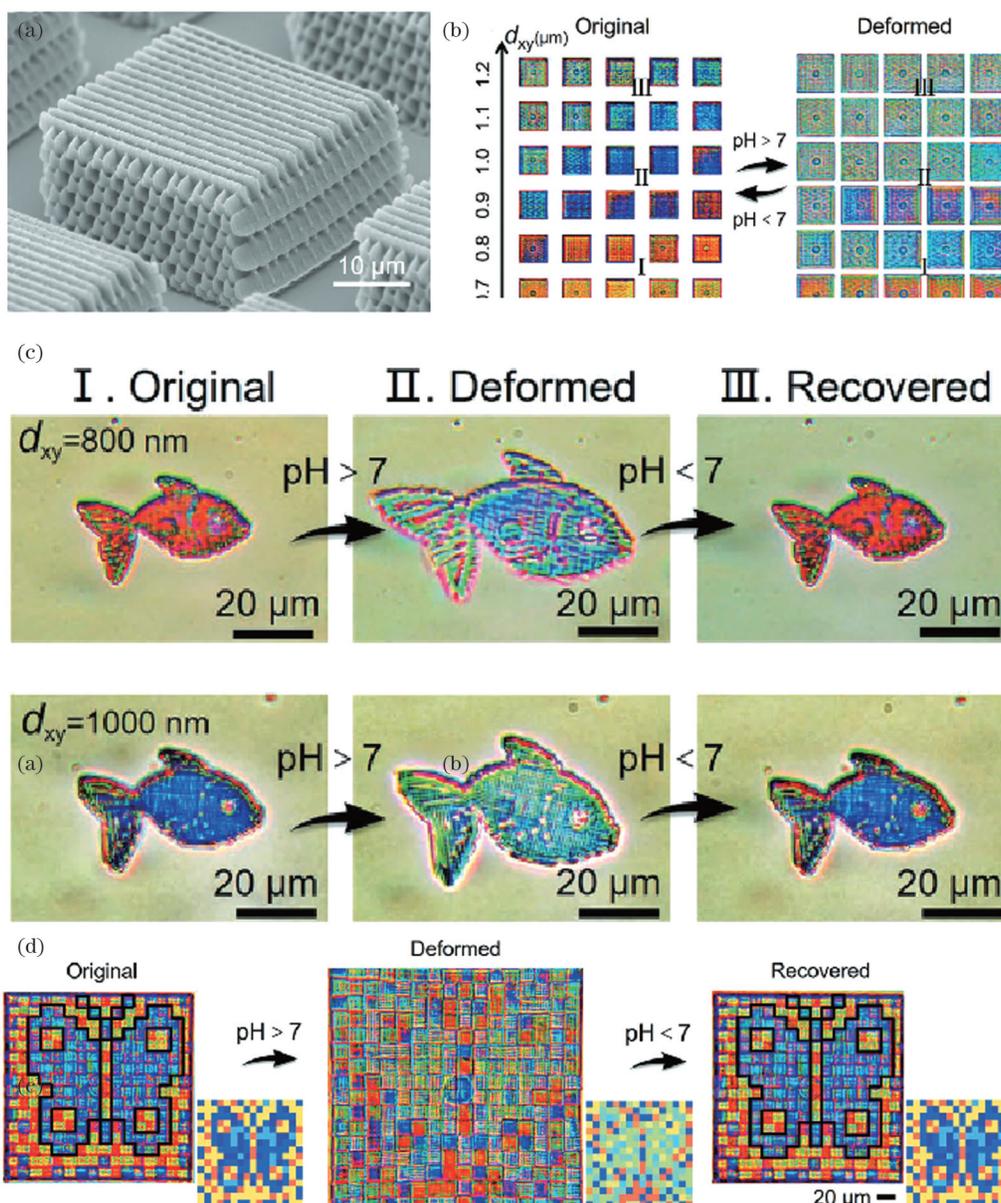


图9 仿生刺激响应型结构色微器件^[52]。(a)木堆结构的SEM图像;(b)在透射模式下用物镜观察到的原始或变形状态下木堆结构的不同颜色;(c)红、蓝木堆鱼在原始、变形和恢复状态下的颜色变化;(d)pH响应型蝴蝶图像

Fig. 9 Structural color micro-device with stimulus-response^[52]. (a) SEM image of the woodpile structure; (b) different colors of woodpile structures in original or deformed status were observed by the objective lens in transmittance mode; (c) the color change of red and blue woodpile fish in original, deformed, and recover status, respectively; (d) images showing the pH-responsive butterfly painting

物医药领域的微型机器人和微型设备提供了新方法。Xin等^[55]利用飞秒激光TPP技术,通过在pH响应型水凝胶中编码异质结构,开发出了环境自适应形状变形微机器人,其浸入Fe₃O₄纳米颗粒悬浮液后具备磁驱动能力。他们设计了一种通过打开和关闭嘴巴实现封装和可控释放药物DOX的磁性形状变形微型鱼(SMMFs),如图10(b)所示,SMMFs可在外加磁场和不同pH环境下实现人工血管网络中局部HeLa细胞的治疗。

在细胞工程领域,细胞所处的3D微环境力学特性可以调控重要的细胞过程。3D微支架可以在组

织形成的初始阶段起到支撑细胞的作用,同时微支架的孔隙率和内部孔隙组织会影响细胞迁移,从而对支架的生物降解动力学、机械稳定性以及营养物质扩散起到主要作用。构建具有预设几何形状和孔隙率的3D水凝胶微环境在组织工程和再生医学中具有重要意义。若要实现可以调控细胞行为、控制细胞迁徙和细胞相互作用的3D支架,就需要能按照预设结构构建三维微结构的技术,因此,具备高精度和真3D加工能力的TPP技术无疑是一个较好的选择。Hippler等^[56]利用基于β-环糊精丙烯酸酯和金刚烷丙烯酸酯的主客体水凝胶,通过飞秒激光TPP

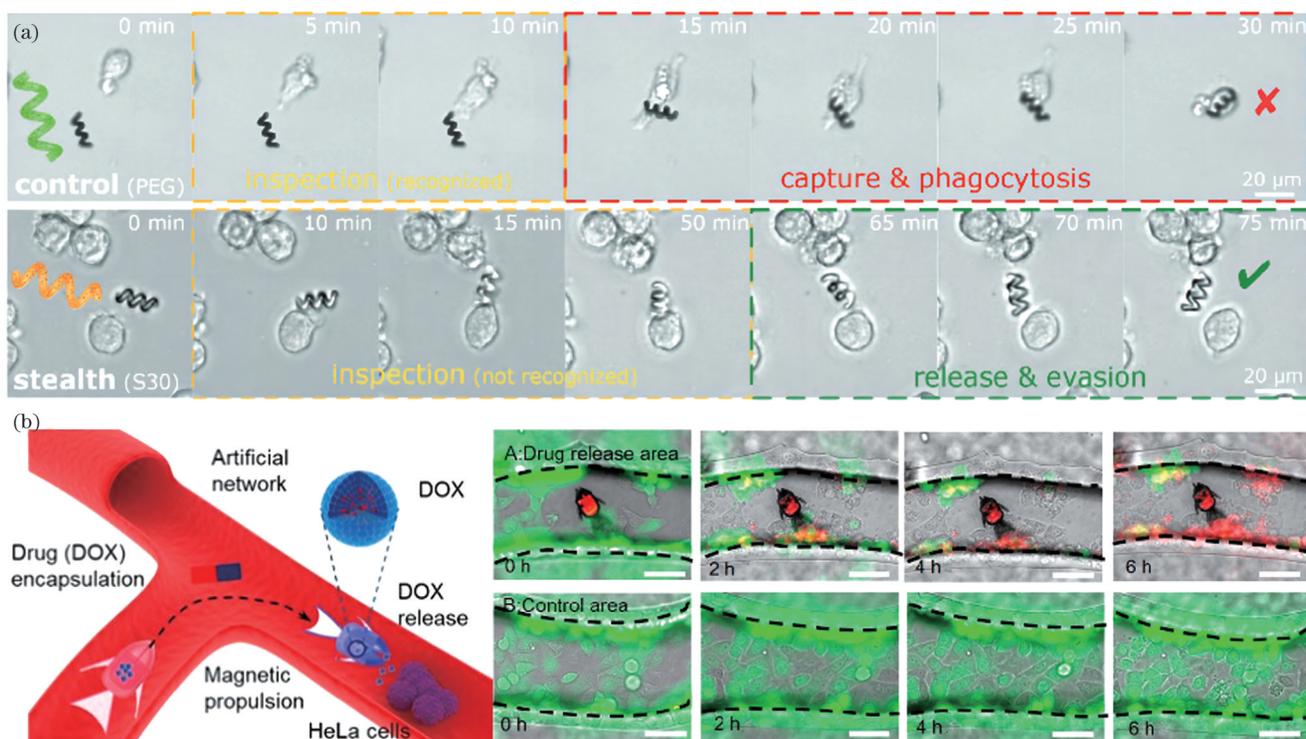


图 10 TPP 技术在药物递送领域的应用。(a)传统 PEG 微机器人与 S30 微机器人遇到巨噬细胞时的对比^[54]；(b)磁性 SMMFs 通过形状变形靶向释放 DOX 治疗癌细胞示意图以及药物释放区域和对照区域 HeLa 细胞活力的图像^[55]

Fig. 10 Application of TPP technology in drug delivery. (a) Comparison between traditional PEG and S30 microrobots when they encountered macrophages^[54]; (b) schematic illustration of magnetic SMMFs for targeted DOX release to treat cancer cells by shape morphing, and snapshots of the viability of HeLa cells in the DOX-releasing area and the control area^[55]

技术制备了刺激响应型复合微支架。该微支架由抗蛋白质吸附基底、蛋白质黏附梁和中央刺激响应主客体水凝胶组成，它可在生理条件下通过应用可溶性竞争客体进行可逆驱动，在定制的微环境下可同时拉伸单个细胞并研究其动态行为。基于 PEGDA 的三维微结构具有细胞相容性以及类似于 ECM 的特性，用于培养细胞时能够保持细胞活性，在组织工程中便于研究三维环境下细胞与基质间的相互作用机理。Ovsianikov 等^[57]利用 TPP 技术在分子质量为 742 Da 的 PEGDA 上制备了三维微结构，并结合激光诱导前向转移 (LIFT) 方法将细胞接种到所制备的高度多孔三维细胞支架上 [如图 11(a) 所示]，这一结果证明了该技术是可能将多种类型细胞打印到 3D 支架的。这种体外制备的高孔隙率 PEG 细胞培养基中的孔结构对于细胞运输营养物质和代谢废物有利，还能促进细胞的附着、分裂和迁移。LIFT 和 TPP 相结合的方法为在微尺度上实现三维多细胞组织的构建以及人工合成 ECM 提供了一种新的方法。Accardo 等^[58]通过 TPP 技术实现了自支撑的 PEGDA 3D 水凝胶支架，其由 Neuro2A 细胞定植形成神经突起或连接。实验结果显示支架外表面的 Neuro2A 细胞呈现球状，黏附状态良好，且在细胞表面有多个神经延伸，如图 11(b) 所示。他们发现细胞骨架外沿分布着更多的纤维状肌动蛋白，而微管

蛋白则在靠近细胞核的骨架部分以及比较典型的神经延伸中表达突出，该结果展现了 3D 水凝胶支架在神经科学领域的应用潜力。Zheng 等^[25]将通过主客体相互作用合成的水溶性 BMPVC-CB7 作为双光子引发剂，在功率为 12.0 mW、扫描速度为 110 μm/s 的条件下于水溶液中进行加工，制备了分辨率为 180 nm、尺寸为 100 μm × 100 μm × 20 μm 的 3D 水凝胶支架微结构 [如图 11(c) 所示]，微支架由一系列具有较高机械强度的大直径支柱以及支柱之间相对柔软的纳米线组成。将 HeLa 细胞与支架微结构共孵育，通过共聚焦荧光显微镜进行成像，结果发现支架上的细胞保留了其形态并保持了良好的生长状态，这表明制备的三维细胞支架具有良好的生物相容性和较低的细胞毒性，在组织工程领域具有一定的应用潜力。

为了研究三维微支架对细胞行为的调控作用，Zhang 等^[14]利用飞秒激光 TPP 加工技术，基于 PEGDA、PE-3A 等生物相容性材料，制备了一系列不同孔径尺寸的 3D 水凝胶微支架，通过改变支柱与支柱的间距在 69.7% 到 89.3% 之间调节支架孔隙率，研究了不同孔径的 3D 水凝胶微支架对细胞行为的调控作用，如图 12 所示。实验结果表明，三维微支架可以对纤维状肌动蛋白进行显著调控。相对于平面基底而言，三维细胞支架上培养的细胞具有更多的片状伪足，

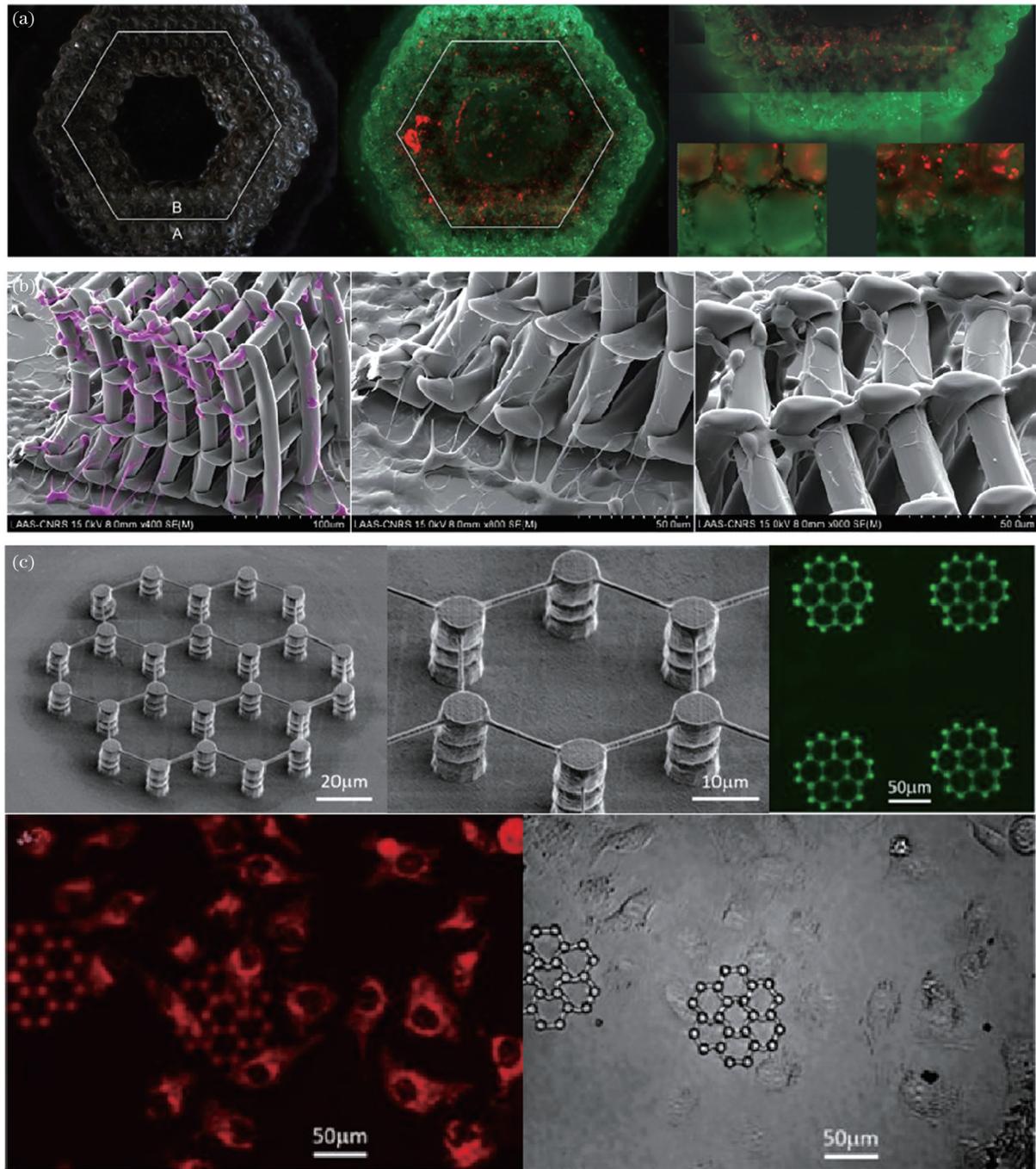


图 11 PEGDA 3D 水凝胶支架。(a)通过 LIFT 方法将支架与细胞共培养的暗场成像、LIFT 后不同类型细胞的荧光图像以及边界区域的详细图像^[57]; (b)PEGDA 水凝胶支架上细胞的生长及黏附行为^[58]; (c)完整的六角形网络支架的斜向 SEM 图像、共聚焦荧光图像和明场图像, 以及 HeLa 细胞和网格支架共培养的共聚焦荧光图像和明场图像^[25]

Fig. 11 PEGDA 3D hydrogel scaffold. (a) Dark-field image of co-culture of scaffold and cell by LIFT, fluorescence image of different types of cells and detailed image of boundary area after LIFT^[57]; (b) cell growth and adhesion behavior on PEGDA hydrogel scaffold^[58]; (c) oblique SEM image, confocal fluorescence image and bright field image of a complete hexagonal grid scaffold, and confocal fluorescence image and bright field image of HeLa cells co-culturing with the grid scaffold^[25]

单个细胞的三维形状更加复杂。呈现三维分布的细胞可以提高信息交换和物质传输效率, 在组织工程领域具有巨大的应用潜力。

细胞工程领域需要亲水性单体等能提高支架生物活性的材料, 因此, 天然 ECM 中的成分被广泛研究并用作加工单体。天然水凝胶材料透明质酸(HA)是 ECM 的主要成分, 广泛分布于人体组织中, 是 TPP 加

工制备水凝胶微结构时常用的生物材料, 但其力学性能不佳, 因此通常会将 HA 与 PEGDA 等结合进行化学修饰后再制备水凝胶微结构。Kufelt 等^[59]为了改善 HA 的力学性能, 先用甲基丙烯酸缩水甘油酯化 HA, 然后将其与 PEGDA 原位结合并进行共价交联, 接着采用 TPP 加工技术制备了几何形状和孔径均不相同的精细三维 HA 和 HA-PEGDA 微支架, 同时用人表皮

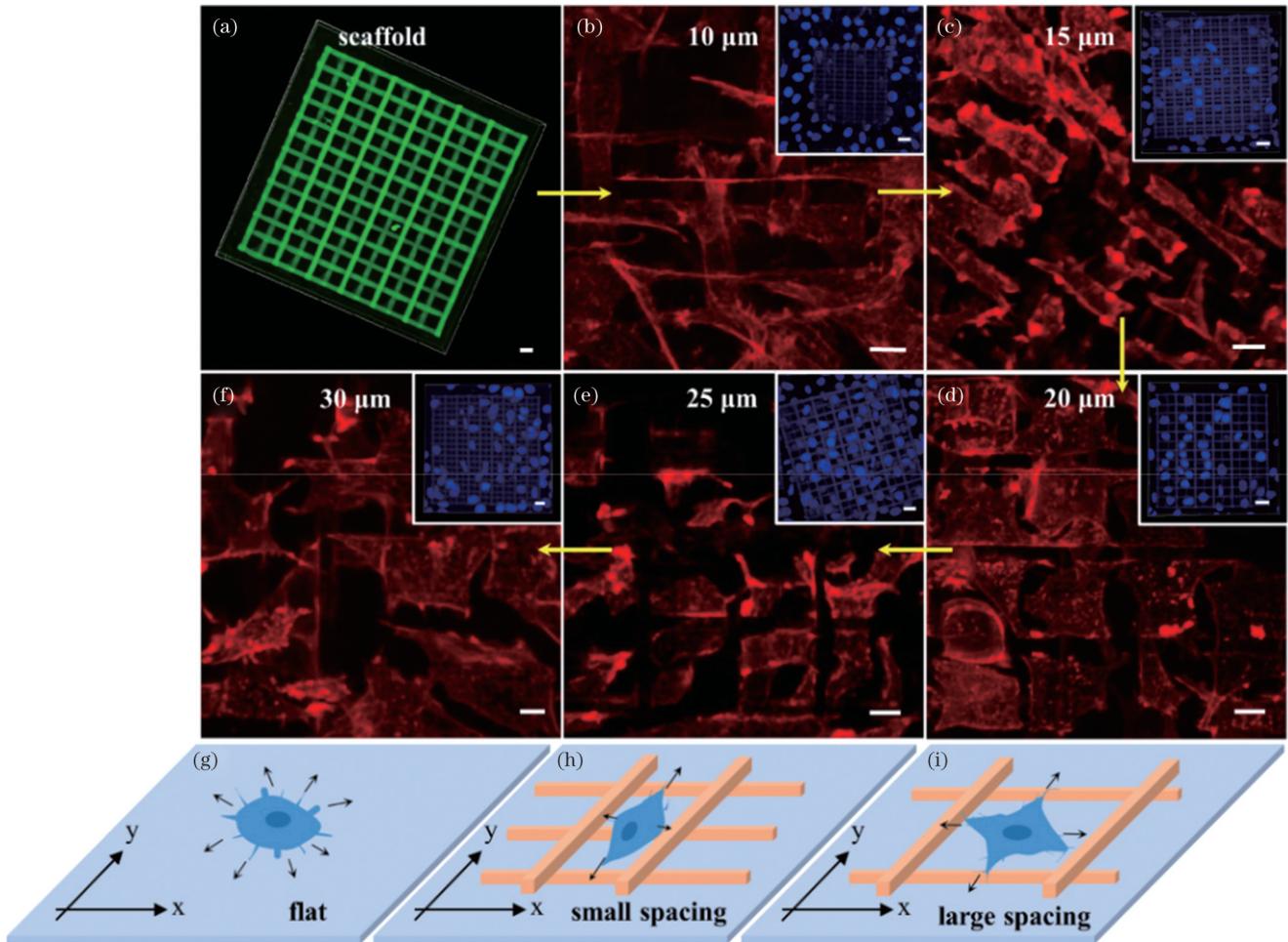


图 12 支柱间距分别为 10、15、20、25、30 μm 的支架和生长在 3D 微支架上的细胞的共聚焦荧光显微图像以及丝状伪足通过感知信息调节纤维状肌动蛋白合成机制的示意图^[14]

Fig. 12 Confocal fluorescent microscopy images of scaffold and cells grown on 3D microscaffolds with strut spacing of 10, 15, 20, 25, 30 μm , and schematic of the mechanism for regulating F-actin synthesis through sensing information by filopodia^[14]

生长因子功能化 HA, 以增强其生物相容性。壳聚糖 (CH) 也是一种具有生物相容性、生物可降解性的生物材料, 但该材料的微观结构限制了其作为引导组织形成的功能性支撑材料的应用, 因此可以利用 TPP 技术将化学修饰的 CH 应用于可重复 3D 细胞支架的生物制造。Kufelt 等^[60] 将 CH 与 PEGDA 进行复合和交联以调节材料的力学性能和生物化学性能, 并将 CH 与光敏修饰的血管内皮生长因子 (VEGF) 共价交联。研究表明: 改性 CH 具有生物相容性, VEGF 可以增强其生物活性, 3D CH 支架可以成功接种细胞, 在组织工程中的应用前景广阔。Yu 等^[61] 制备了透明质酸钠 (SH) 和羧甲基壳聚糖的 3D 水凝胶细胞支架, 获得了 2.94 mW 的最小加工阈值功率和 80 nm 的特征线宽。研究结果显示: 可以通过调节水凝胶中交联剂的含量优化 3D 水凝胶支架的力学性能。细胞在 SH 和壳聚糖支架上生长的共聚焦荧光图像显示细胞支架在 488 nm 激光激发下表现出了更强的荧光, 该工作为组织工程提供了一种简单的制备三维生物相容性水凝胶细胞支架的方法。

此外, TPP 还能直接对包埋微生物的光刻胶前驱体进行加工。牛血清白蛋白 (BSA) 是从牛血清中分离出的球蛋白, 由具有许多可氧化残基的氨基酸组成, 其光交联反应是通过吸收色氨酸等基团或通过光敏材料氧化氨基酸残基产生过氧自由基进行的。通过 TPP 技术制备的 BSA 微结构同样具有良好的生物相容性。Hasselmann 等^[62] 在 BSA 与核黄素 5'-单磷酸钠水合物的水凝胶前驱体中实现了 TPP 在活细菌存在下的原位交联, 并通过细胞膜渗漏和运动性实验测定了交联前后暴露在前驱体溶液中的细菌的活性。研究表明, 这种亚微米尺度下高度局域化结构的制造以及该结构所具有的生物相容性使得该方法可用于固定单个预选细菌, 这也说明通过附着的微结构控制运动动力学是有可能的。

除了 3D 微支架以外, 高分辨率的图案化基底同样会影响细胞的生长。Pennacchio 等^[63] 先对明胶进行改性, 然后采用 TPP 技术对经过化学修饰的明胶进行图案化, 以在微米尺度上制备具有指向性的水凝胶模块, 从而有助于生成有序的体外组织。明胶微结构的表面

上被引入了一种特殊的线性形貌,该形貌的存在强烈地增强了细胞排列,从而在结构内外产生定向的人真皮组织前驱体(HD- μ TP),进一步增加了建立完全排列的HD- μ TP的可能性。生物学研究结果验证了HD- μ TP取向与这种拓扑结构之间的强关联性。

5 结束语

本文综述了双光子引发剂的研究进展以及双光子聚合水凝胶微结构在细胞培养、细胞行为调控、响应型微器件等方面的应用。TPP技术不仅在微纳光学、微机电系统等方面有所应用,而且在组织工程、药物递送等生物医学领域也具有一定应用潜力,其主要优势在于制备出的微纳结构形貌可控并且加工分辨率高。通过TPP制备的水凝胶微结构可以模仿天然的ECM,在体外提供3D微环境,从而控制附着在微结构上的细胞迁移、增殖、分化等行为,对于系统研究细胞-基质间的相互作用机理具有重要意义。然而,TPP技术在制备水凝胶微结构时通常耗时较长,因此需要高引发效率的双光子引发剂。为适用于水相环境的光交联,双光子引发剂需具有水溶性,可采用主客体化学作用、亲水疏水相互作用、化学修饰等策略来提高双光子引发剂的水溶性。同时,为了使水凝胶微结构适合细胞培养,要求双光子引发剂的细胞毒性尽可能低,因此,具有高引发效率和生物相容性的水溶性双光子引发剂成为了研究热点。TPP加工技术制备的水凝胶微结构在仿生领域、生物医药领域具有一定的应用潜力。从仿生学角度制备的一系列具有刺激响应功能的水凝胶微器件被广泛研究,以实现其在仿生微器件、精密传感器等领域的应用。在生物医药领域,糖类、蛋白质类、明胶衍生物等具有生物相容性的材料也已被广泛应用于制备3D水凝胶微结构,但这些材料制备的微结构往往存在力学性能不足等缺陷,可通过化学修饰、掺杂有机聚合物等方法改善其加工性能。

目前,TPP技术制备水凝胶微结构还存在一些挑战:1)采用TPP技术制备水凝胶微结构通常耗时较长,且难以批量化加工;2)具有良好的非线性吸收特性、生物相容性的水凝胶光刻胶前驱体材料亟待研发,且其双光子聚合作用机制尚不明确。因此,未来需要进一步开发提高TPP加工效率的技术策略,如并行处理技术、高速扫描技术、混合加工技术、面投影曝光等,以快速制备兼具大尺寸^[64]和高精细度的3D水凝胶微结构;同时,还应关注新型水凝胶光刻胶前驱体材料的研发及其双光子聚合过程中的物理化学机制研究。

参 考 文 献

- [1] Mather M L, Tomlins P E. Hydrogels in regenerative medicine: towards understanding structure-function relationships[J]. *Regenerative Medicine*, 2010, 5(5): 809-821.
- [2] Lai W F, He Z D. Design and fabrication of hydrogel-based nanoparticulate systems for *in vivo* drug delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 243: 269-282.
- [3] Sumaru K, Takagi T, Morishita K, et al. Fabrication of pocket-like hydrogel microstructures through photolithography[J]. *Soft Matter*, 2018, 14(28): 5710-5714.
- [4] Chalard A, Joseph P, Souleille S, et al. Wet spinning and radial self-assembly of a carbohydrate low molecular weight gelator into well organized hydrogel filaments[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(32): 15043-15056.
- [5] Chen N, Zhang X B, Lyu J Y, et al. Preparation of a novel regenerated silk fibroin-based hydrogel for extrusion bioprinting[J]. *Soft Matter*, 2022, 18(38): 7360-7368.
- [6] Wang Z J, Kumar H, Tian Z L, et al. Visible light photoinitiation of cell-adhesive gelatin methacryloyl hydrogels for stereolithography 3D bioprinting[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(32): 26859-26869.
- [7] Singh I, Lacko C S, Zhao Z Y, et al. Preparation and evaluation of microfluidic magnetic alginate microparticles for magnetically templated hydrogels[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2020, 561: 647-658.
- [8] Nakashima Y, Yamamoto Y, Hikichi Y, et al. Creation of cell micropatterns using a newly developed gel micromachining technique[J]. *Biofabrication*, 2016, 8(3): 035006.
- [9] Yang Y, Liu X L, Wei D, et al. Automated fabrication of hydrogel microfibers with tunable diameters for controlled cell alignment[J]. *Biofabrication*, 2017, 9(4): 045009.
- [10] Ersumo N, Witherel C E, Spiller K L. Differences in time-dependent mechanical properties between extruded and molded hydrogels[J]. *Biofabrication*, 2016, 8(3): 035012.
- [11] Lacko C S, Singh I, Wall M A, et al. Magnetic particle templating of hydrogels: engineering naturally derived hydrogel scaffolds with 3D aligned microarchitecture for nerve repair[J]. *Journal of Neural Engineering*, 2020, 17(1): 016057.
- [12] 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.
- [13] Costa B N L, Adão R M R, Maibohm C, et al. Cellular interaction of bone marrow mesenchymal stem cells with polymer and hydrogel 3D micro scaffold templates[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(11): 13013-13024.
- [14] Zhang W C, Zheng M L, Liu J E, et al. Modulation of cell behavior by 3D biocompatible hydrogel microscaffolds with precise configuration[J]. *Nanomaterials*, 2021, 11(9): 2325.
- [15] Huang X, Zhang Y X, Shi M Q, et al. A highly biocompatible bio-ink for 3D hydrogel scaffolds fabrication in the presence of living cells by two-photon polymerization[J]. *European Polymer Journal*, 2021, 153: 110505.
- [16] 郑美玲, 金峰, 董贤子, 等. 双光子光聚合与功能微纳结构制备[J]. *影像科学与光化学*, 2017, 35(4): 413-428.
- [17] Zheng M L, Jin F, Dong X Z, et al. Two-photon photopolymerization and functional micro/nanostructure fabrication[J]. *Imaging Science and Photochemistry*, 2017, 35(4): 413-428.
- [17] 张维彩, 郑美玲. 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[J]. *中国激光*, 2021, 48(2): 0202007.
- [17] Zhang W C, Zheng M L. Research progress of two-photon initiator with high efficiency and preparation of hydrogel microstructure in aqueous phase[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(2): 0202007.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Xing J F, Zheng M L, Chen W Q, et al. C_{2v} symmetrical two-photon polymerization initiators with anthracene core: synthesis, optical and initiating properties[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2012, 14(45): 15785-15792.
- [23] Xing J F, Zheng M L, Duan X M. Two-photon polymerization microfabrication of hydrogels: an advanced 3D printing technology for tissue engineering and drug delivery[J]. Chemical Society Reviews, 2015, 44(15): 5031-5039.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Gao W, Chao H, Zheng Y C, et al. Ionic carbazole-based water-soluble two-photon photoinitiator and the fabrication of biocompatible 3D hydrogel scaffold[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021, 13(24): 27796-27805.
- [27] Bin F C, Guo M, Li T, et al. Carbazole-based anion ionic water-soluble two-photon initiator for achieving 3D hydrogel structures[J]. Advanced Functional Materials, 2023: 2300293.
- [28] 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.
- [29] Jhaveri S J, McMullen J D, Sijbesma R, et al. Direct three-dimensional microfabrication of hydrogels via two-photon lithography in aqueous solution[J]. Chemistry of Materials, 2009, 21(10): 2003-2006.
- [30] 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.
- [31] Huang X, Wang X P, Zhao Y X. Study on a series of water-soluble photoinitiators for fabrication of 3D hydrogels by two-photon polymerization[J]. Dyes and Pigments, 2017, 141: 413-419.
- [32] Wang H A, Zhang Y L, Zhu R, et al. Femtosecond laser direct writing of ion exchangeable multifunctional microstructures[J]. Optics Letters, 2018, 43(5): 1139-1142.
- [33] Scarpa E, Lemma E D, Fiammengio R, et al. Microfabrication of pH-responsive 3D hydrogel structures via two-photon polymerization of high-molecular-weight poly(ethylene glycol) diacrylates[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2019, 279: 418-426.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] Liu K L, Ding H B, Li S, et al. 3D printing colloidal crystal microstructures via sacrificial-scaffold-mediated two-photon lithography[J]. Nature Communications, 2022, 13: 4563.
- [37] Yuan Y P, Chen L, Shi Z Y, et al. Micro/nanoarchitectonics of 3D printed scaffolds with excellent biocompatibility prepared using femtosecond laser two-photon polymerization for tissue engineering applications[J]. Nanomaterials, 2022, 12(3): 391.
- [38] Qin X H, Torgersen J, Saf R, et al. Three-dimensional microfabrication of protein hydrogels via two-photon-excited thiol-vinyl ester photopolymerization[J]. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2013, 51(22): 4799-4810.
- [39] Sun Y L, Li Q, Sun S M, et al. Aqueous multiphoton lithography with multifunctional silk-centred bio-resists[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8612.
- [40] Nekrasov N, Yakunina N, Nevolin V, et al. Two-photon polymerization of albumin hydrogel nanowires strengthened with graphene oxide[J]. Biomimetics, 2021, 6(4): 66.
- [41] Pennacchio F A, Fedele C, De Martino S, et al. Three-dimensional microstructured azobenzene-containing gelatin as a photoactuable cell confining system[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(1): 91-97.
- [42] 邓春三, 范旭浩, 陶宇峰, 等. 基于湿度刺激响应水凝胶的飞秒激光四维打印研究[J]. 中国激光, 2021, 48(2): 0202016.
- Deng C S, Fan X H, Tao Y F, et al. Femtosecond laser four-dimensional printing based on humidity responsive hydrogels[J]. Chinese Journal of Lasers, 2021, 48(2): 0202016.
- [43] Xiong Z, Zheng M L, Dong X Z, et al. Asymmetric microstructure of hydrogel: two-photon microfabrication and stimuli-responsive behavior[J]. Soft Matter, 2011, 7(21): 10353-10359.
- [44] Wang J Y, Jin F, Dong X Z, et al. Flytrap inspired pH-driven 3D hydrogel actuator by femtosecond laser microfabrication[J]. Advanced Materials Technologies, 2022, 7(8): 2200276.
- [45] Deng C S, Liu Y C, Fan X H, et al. Femtosecond laser 4D printing of light-driven intelligent micromachines[J]. Advanced Functional Materials, 2023, 33(11): 2211473.
- [46] Lee M R, Phang I Y, Cui Y, et al. Shape-shifting 3D protein microstructures with programmable directionality via quantitative nanoscale stiffness modulation[J]. Small, 2015, 11(6): 740-748.
- [47] Wei S X, Liu J E, Zhao Y Y, et al. Protein-based 3D microstructures with controllable morphology and pH-responsive properties[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(48): 42247-42257.
- [48] Ma Z C, Zhang Y L, Han B, et al. Femtosecond laser programmed artificial musculoskeletal systems[J]. Nature Communications, 2020, 11: 4536.
- [49] 胡昕宇, 马卓晨, 韩冰, 等. 飞秒激光制备蛋白质智能软体执行器[J]. 中国激光, 2021, 48(14): 1402001.
- Hu X Y, Ma Z C, Han B, et al. Femtosecond laser fabrication of protein-based smart soft actuators[J]. Chinese Journal of Lasers, 2021, 48(14): 1402001.
- [50] 孙锐, 王重宇, 胡衍雷, 等. 飞秒激光加工水凝胶双面神经柱及其应用[J]. 中国激光, 2019, 46(9): 0902001.
- Sun R, Wang Z Y, Hu Y L, et al. Processing and application of hydrogel Janus micropillars based on femtosecond laser[J]. Chinese Journal of Lasers, 2019, 46(9): 0902001.
- [51] Del Pozo M, Delaney C, Bastiaansen C W M, et al. Direct laser writing of four-dimensional structural color microactuators using a photonic photoresist[J]. ACS Nano, 2020, 14(8): 9832-9839.
- [52] Liu B R, Dong B, Xin C, et al. 4D direct laser writing of submerged structural colors at the microscale[J]. Small, 2023, 19(2): 2204630.
- [53] Peters C, Hoop M, Pané S, et al. Degradable magnetic composites for minimally invasive interventions: device fabrication, targeted drug delivery, and cytotoxicity tests[J]. Advanced Materials, 2016, 28(3): 533-538.
- [54] Cabanach P, Pena-Francesch A, Sheehan D, et al. Zwitterionic 3D-printed non-immunogenic stealth microrobots[J]. Advanced Materials, 2020, 32(42): 2003013.
- [55] Xin C, Jin D D, Hu Y L, et al. Environmentally adaptive shape-morphing microrobots for localized cancer cell treatment[J]. ACS Nano, 2021, 15(11): 18048-18059.
- [56] Hippler M, Weißenbruch K, Richler K, et al. Mechanical stimulation of single cells by reversible host-guest interactions in

- 3D microscaffolds[J]. *Science Advances*, 2020, 6(39): eabc2648.
- [57] Ovsianikov A, Gruene M, Pflaum M, et al. Laser printing of cells into 3D scaffolds[J]. *Biofabrication*, 2010, 2(1): 014104.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] 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.
- [61] Yu H, Liu J E, Zhao Y Y, et al. Biocompatible three-dimensional hydrogel cell scaffold fabricated by sodium hyaluronate and chitosan assisted two-photon polymerization[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2019, 2(7): 3077-3083.
- [62] Hasselmann N F, Horn W. Attachment of microstructures to single bacteria by two-photon patterning of a protein based hydrogel [J]. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 2018, 4(3): 035004.
- [63] Pennacchio F A, Casale C, Urciuolo F, et al. Controlling the orientation of a cell-synthesized extracellular matrix by using engineered gelatin-based building blocks[J]. *Biomaterials Science*, 2018, 6(8): 2084-2091.
- [64] 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.
- 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.

Femtosecond Laser Two-Photon Polymerization of 3D Hydrogel Microstructures and Their Applications

Wu Xinyi^{1,2}, Duan Qi^{1,2}, Bin Fanchun^{1,2}, Zheng Meiling^{1*}

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

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101407, China

Abstract

Significance Extracellular matrix (ECM), which has an important impact on cell morphogenesis, adhesion, proliferation, and differentiation, is a dynamic and complex microenvironment. However, the mechanism by which cells receive and process information through ECM remains unclear. Therefore, investigating the mechanism of interaction between cells and the ECM will be of great significance in cell culture, tissue engineering, and other fields.

Research has shown that the microstructure of a material surface can regulate the proliferation, differentiation, and migration of cells. Hydrogels have a certain geometric shape and moisture content similar to soft tissue, and thus can simulate the ECM *in vitro* as well as locate and deliver therapeutic proteins in a controlled manner as a vehicle for cell transplantation. The patterned surfaces of hydrogels, cell scaffolds, and other microstructures prepared via micro/nano fabrication technology can simulate the growth and development environment of cells *in vitro*, particularly in a three-dimensional (3D) environment, enabling analysis of the correlation between the shape and function of cells, as well as of the mechanism behind the interaction between cells and the matrix. Traditional methods for preparing hydrogel microstructures have shortcomings including low accuracy and difficulty in regulating the morphology, which limits their application in the future.

Two-photon polymerization (TPP) technology, which uses a deep-penetrating near-infrared laser as the light source, is a new micro-nano manufacturing technology with true 3D fabrication capability and high penetration depth. It can be used to fabricate 3D micro-nano structures with arbitrary high resolution and is widely used in micro-nano photonics, micro-electromechanical systems, tissue engineering, and other fields. The 3D hydrogel microstructure prepared using TPP technology has a controllable morphology, high precision, appropriate stiffness, and good biocompatibility. This can better simulate the *in vitro* microenvironment required in tissue engineering and other fields, demonstrating its great potential for practical applications in the biomedical field. However, most photoinitiators lead to residues in organic solvents, and the generated cytotoxicity has corresponding effects on the biological environment. Therefore, it is necessary to design and prepare biocompatible water-soluble TPP initiators.

In summary, the application of hydrogel microstructures prepared using TPP technology in cell culture has made some progress, but there are still a series of challenges in the design of biocompatible TPP photoinitiators as well as in the application of bionics, tissue engineering, and other fields. Therefore, it is essential to summarize the relevant research for a comprehensive understanding of the hurdles in the application of hydrogel microstructures and future development directions.

Progress In this review, the principle of two-photon polymerization and the research progress on photoinitiators are briefly introduced. Moreover, synthesis methods for water-soluble TPP photoinitiators with high initiation efficiencies have been introduced, including host-guest chemistry, hydrophobic interactions, introduction of non-ionic surfactants, and modification of hydrophilic groups. To enable 3D hydrogel microstructures to be fully applied in the field of biomedicine, TPP photoinitiators must exhibit lower cytotoxicity. Xing *et al.* efficiently prepared water-soluble TPP photoinitiators with high TPA cross sections and low threshold power through the Witting reaction and host-guest chemical interactions, and fabricated a high-resolution 3D hydrogel microstructure. Gao *et*

al. prepared a new ionic water-soluble carbazole photoinitiator through host-guest interactions (Fig. 4) and achieved the low laser threshold of 3.7 mW and high resolution of 180 nm, while the 3D hydrogel microstructure maintained great biocompatibility in an aqueous environment. Introducing a nonionic surfactant or modifying hydrophilic groups is a simple and efficient method for improving water solubility. Li *et al.* synthesized a series of cyclic benzylketone-based TPP photoinitiators containing sodium carboxylates to enhance the water solubility through an aldol condensation reaction. They were evaluated in the dark using the MG63 cell line and found to have low cytotoxicity. Subsequently, the preparation of a 3D hydrogel microstructure via TPP and its application in biomimetics and biomedicine are introduced. Inspired by the response of the flytrap to external stimuli, Wang *et al.* used femtosecond laser fabrication technology to obtain intelligent responsive hydrogel microdrivers based on bionic asymmetric structures (Fig. 7), achieving and adjusting the grasping and release behavior of microtargets by changing the pH value. Zhang *et al.* designed and prepared a series of 3D hydrogel microstructures with different pore sizes using biocompatible materials, such as PEGDA and PE-3A. The porosity of the scaffold was adjusted from 69.7% to 89.3% by changing the pillars and pillar spacing of the scaffold, and by regulating the cell behavior of the 3D hydrogel microstructures with different pore sizes (Fig. 12). Finally, problems in the application of 3D hydrogel microstructures and their development prospects are summarized.

Conclusions and Prospects In recent years, many studies have focused on developing photoinitiators with high initiation efficiencies and low thresholds. To realize photo-crosslinking in an aqueous environment, a series of water-soluble TPP photoinitiators with high initiation efficiencies have been designed and prepared, expanding their applications in biomedical fields such as tissue engineering and drug delivery. Although some progress has been achieved in research on water-soluble TPP photoinitiators, the specific polymerization mechanism in aqueous environments requires further exploration. However, current TPP technology cannot satisfy the requirement for the rapid preparation of a large number of hydrogel microstructures, which hinders the mass culture of cells and tissues *in vitro*. Therefore, in future, the rapid fabrication of large-area hydrogel microstructures using TPP should be considered.

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