基于二芳基四氮唑修饰短肽的光敏超分子水凝胶

周亮, 何明桃, 李锐, 李金波*, 张艳*

南京大学化学化工学院, 南京 210023

*通讯作者, E-mail: jinboli@nju.edu.cn; njzy@nju.edu.cn

收稿日期: 2019-12-31; 接受日期: 2020-04-16; 网络版发表日期: 2020-04-21

国家自然科学基金(编号: 91753116, 21977043, 21877058)资助项目

摘要 本文报道了一种可对光照响应发生降解的超分子水凝胶, 成胶因子为二芳基四氮唑修饰二肽(MeO-Tet-GA). MeO-Tet-GA在中性缓冲溶液中可发生自组装形成超分子水凝胶, 并且该水凝胶具有良好的机械性能, 动态储能模量 G' 在500 Pa以上. 基于二芳基四氮唑与末端烯烃间的分子间光点击化学反应, 我们可进一步在MeO-Tet-GA超分子水凝胶中修饰亲水性的苯基磺酸钠从而打破水凝胶内部的亲疏水平衡, 进而诱发水凝胶内部纤维结构的破坏以及水凝胶的降解. 此外, 我们尝试了将MeO-Tet-GA超分子水凝胶应用于小鼠乳腺癌4T1细胞的三维培养, 发现MeO-Tet-GA超分子水凝胶具有优良的生物相容性, 在用于细胞三维培养3 d后不会造成明显的4T1细胞死亡. 综上所述, 由MeO-Tet-GA形成的超分子水凝胶是一种潜在的生物材料, 在细胞长期三维培养以及通过光照调节细胞微环境进而研究细胞行为变化方面具有应用前景.

关键词 超分子水凝胶, 分子间光点击化学反应, 细胞三维培养

1 引言

分子自组装在自然界中是一个普遍存在的过程^[1~4], 水凝胶是依赖于成胶因子之间自组装而形成的. 因其具有优良的生物相容性, 水凝胶常被用作生物材料并广泛应用于生物医学领域, 如细胞三维培养、组织再生等^[5]. 与传统的高分子聚合物之间通过共价交联形成的高分子水凝胶不同, 形成超分子水凝胶的小分子化合物之间通过各种非共价相互作用结合, 如氢键、 π - π 相互作用、金属配体配位作用、范德华力、疏水作用等^[6]. 由于这种结合, 超分子水凝胶具有优异的可逆性. 同时, 由于小分子化合物的易修饰性, 通过对小分子成胶因子的化学修饰可使形成的超

分子水凝胶对多种外界刺激如pH^[7]、温度^[8]、酶^[9]、配体-受体相互作用^[10]、光^[11]以及其他刺激产生响应^[12]. 这些智能响应型的超分子水凝胶在外界刺激前后其物理或化学性质可发生显著变化, 进而达到改变细胞或组织微环境的生物学效果, 因此被广泛用于生物工程和生物医学领域. 其中, 光敏超分子水凝胶相比于其他智能超分子水凝胶更是具有独特的优势, 如外界光照可在特定时间和空间开启以实现水凝胶性质的时间和空间分辨控制, 进而可在时间和空间尺度上对周围细胞或组织进行精准的调控. 因而, 发展生物相容性良好的光敏超分子水凝胶对于生物医学应用具有重要的意义.

光敏超分子水凝胶的构筑依赖于在成胶因子中引

引用格式: Zhou L, He MT, Li R, Li J, Zhang Y. Photosensitive supramolecular hydrogel based on biaryltetrazole modified with short peptide. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 612–619, doi: 10.1360/SSC-2019-0173

入光敏小分子基团, 进而通过小分子基团光照前后的变化调节水凝胶性质. 本课题组^[13]早期通过在短肽中修饰具有光致异构性质的螺吡喃小分子构筑了一类光敏成胶因子. 该成胶因子形成的水凝胶在温和的光照条件下可发生光诱导的原位降解. 此类方法构建的光敏超分子水凝胶虽可以通过光照改变水凝胶的性质, 然而却难以在改变水凝胶性质的同时在水凝胶内部引入不同的功能基团. 为解决这一问题, 本课题组^[14,15]以二芳基四氮唑与末端烯烃的“光点击化学反应”为基础, 将二芳基四氮唑作为光敏小分子引入成胶因子中, 通过“光点击化学反应”可对形成的超分子水凝胶进行多样化的修饰与改造. 前期, 本课题组^[16]以可发生分子内光点击反应的二芳基四氮唑修饰短肽构建了一类光降解型超分子水凝胶. 该水凝胶在细胞三维培养以及细胞微环境的光调控等方面展现出了巨大的潜力. 本文以可发生分子间光点击化学反应的二芳基四氮唑修饰短肽构建了一类光敏超分子水凝胶(图1), 并通过分子间光点击化学反应在水凝胶中引入亲水性的苯磺酸钠从而调节水凝胶的降解过程. 此外, 我们还发现该超分子水凝胶具有优良的生物相容性, 可用于细胞的三维培养.

2 实验部分

2.1 实验仪器

核磁共振波谱仪(¹H NMR): 400 MHz Bruker AVANCE III-400 (德国), 溶解样品所用溶剂为氘代二甲亚砜(DMSO-*d*₆), 化学位移 δ 单位为ppm, 偶合常数

图1 基于二芳基四氮唑修饰短肽的光敏超分子水凝胶(网络版彩图)

Figure 1 Photosensitive hydrogel based on the biaryltetrazole (MeO-Tet-COOH) modified with dipeptide (GA) (color online).

J 值单位为Hz, 其中单峰、双峰、三重峰、四重峰、多重峰分别用s, d, t, q, m表示; 荧光光谱仪: 岛津RF-5301 PC荧光光谱仪(日本); 质谱: LCMS-2020分辨质谱仪以及高分辨质谱仪Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS (美国); 扫描电子显微镜(SEM): Hitachi S-4800扫描电子显微镜; 高效液相色谱(HPLC): Thermo U-3000液相分析色谱以及制备色谱系统(美国), 流动相为含有0.1%三氟乙酸(TFA)的色谱纯乙腈和含有0.1%三氟乙酸(TFA)的去离子水的混合; 激光共聚焦成像系统: TCS SP5型双光子激光共聚焦显微镜; 流变仪: Thermo Scientific的HAAKE RheoStress 6000流变仪(美国).

2.2 试剂与方法

N端由9-芴甲氧基羰基(Fmoc)保护的氨基酸以及2-氯三苯甲基氯树脂购自吉尔生化(上海)有限公司(中国). 三氟乙酸以及哌啶购自百灵威(美国)和TCI公司(日本). 小鼠乳腺癌4T1细胞购自上海中乔新舟生物科技有限公司(中国). MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司(中国). 分析试剂均是色谱纯级别, 常规试剂均为分析纯级别.

2.2.1 多肽固相合成(SPPS)

水凝胶因子以及与二芳基四氮唑相连的短肽分子通过经典的多肽固相合成方法合成^[17,18]. 文中所用的二芳基四氮唑也是利用多肽固相合成方法接到树脂上. 首先, 取1倍当量的2-氯三苯甲基氯树脂(100~200目, 载量为1.0 mmol/g)加入到干燥的二氯甲烷(DCM)中溶胀5 min, 之后取1.5倍当量的氨基酸和3倍当量的 N,N -二异丙基乙胺(DIPEA)溶解于二氯甲烷并加入到固相合成管中, 氮气鼓吹2 h. 之后抽干反应液, 使用干燥的二氯甲烷洗涤三次后, 加入封闭液(DCM:MeOH:DIPEA=16:3:1)并用氮气鼓吹15 min, 使得树脂上未反应的活性位点失活. 然后用 N,N -二甲基甲酰胺(DMF)洗涤树脂3次、20%哌啶的DMF溶液洗涤树脂30 min以脱除氨基酸上的Fmoc保护基. 脱除保护基之后再用DMF洗涤树脂3次, 之后取1.5倍当量的第二个氨基酸、1.5倍当量的多肽偶联剂HBTU和3倍当量的DIPEA溶解于DMF并加入到固相合成管中氮气鼓吹2 h, 之后重复利用标准的多肽固相合成方法合成所需要的氨基酸序列. 当所有的氨基酸连接完毕后用DMF洗涤

树脂5次, 之后依次用异丙醇、正己烷、无水乙醚洗涤树脂3次, 再加入适量三氟乙酸并用氮气鼓吹树脂2 h以切除树脂和一些氨基酸的侧链保护基, 切除完毕后将含有产物的三氟乙酸溶液收集, 旋干并加入无水乙醚分散得到粗产品, 之后利用制备高效液相色谱进一步提纯得到纯品。

2.2.2 二芳基四氮唑的合成

1的合成(图2(a))^[19]: 称取对甲酰基苯甲酸6.55 g (43.7 mmol)和对甲苯磺酰肼8.10 g (43.7 mmol)于圆底烧瓶中, 加入100 mL乙醇后80℃加热回流30 min, 利用薄层色谱(TLC)监测反应进程, 反应结束后加入100 mL H₂O至反应液中, 有大量白色沉淀析出, 过滤收集滤饼并用50%乙醇-水溶液洗涤数次, 烘干得白色粉末12.5 g (产率为86%)。

2的合成: 称取对甲氧基苯胺4.04 g (32.5 mmol)溶解于8.4 mL浓盐酸和53.8 mL 50%乙醇-水溶液中, 冰盐浴冷却到0℃; 取NaNO₂ 2.21 g (32.5 mmol)溶解于13.5 mL H₂O中, 放入冰盐浴降温至0℃后在冰盐浴条件下缓慢滴入对甲氧基苯胺溶液中, 滴完后继续反应30 min即可得重氮盐; 取10.3 g (32.5 mmol) **1**溶解于100 mL吡啶中, 丙酮和液氮体系降温至-15℃以下后, 缓慢将重氮盐滴加到**1**的吡啶溶液中, 滴加过程始终保持温度在-15℃以下, 滴加完毕后室温搅拌过夜, 次日加入500 mL 10% HCl溶液至反应液中, 析出大量红色固体, 过滤得滤饼, 并用250 mL乙醇洗涤, 得到粉红色固体5.5 g (产率为42.2%)。 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.26 (s, 1H), 8.29 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 8.16 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 8.09 (d, *J*=9.1 Hz, 2H), 7.24 (d, *J*=9.1 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) 166.7, 163.5, 160.5, 132.6, 130.3, 130.2, 129.5, 126.7, 121.7, 115.1, 55.7。

文中所有筛选的二芳基四氮唑短肽分子(图S1, 网络版补充材料)均通过标准的多肽固相合成方法得到, 并用高效液相色谱纯化得到纯品, 进而进行后续测试。

2.2.3 短肽成胶能力测试

通过加热和调节pH的方法将短肽修饰的四氮唑分子在1×PBS中性缓冲溶液中溶解, 室温25℃下自然冷却静置后利用倒置的方式来判断水凝胶是否形成。最低成胶浓度是通过将高浓度四氮唑短肽分子溶液形

图2 MeO-Tet-COOH的合成及光反应性能。(a) 二芳基四氮唑MeO-Tet-COOH的合成路线;(b) MeO-Tet-COOH与SSS的分子间光点击化学反应;(c) HPLC监测CH₃CN:PBS=1:1溶液中5 mM SSS和1 mM MeO-Tet-COOH在302 nm紫外光照射不同时间后的反应情况(网络版彩图)

Figure 2 Synthesis and photo-click reaction of MeO-Tet-COOH. (a) Synthesis route of biaryl tetrazole; (b) intermolecular photo-click reaction of MeO-Tet-COOH and SSS; (c) HPLC analysis of the reaction mixture of 1 mM MeO-Tet-COOH with 5 mM SSS in CH₃CN:PBS=1:1 upon the 302 nm UV light illumination at different time points (color online).

成的水凝胶加热变成溶液再逐级稀释到低浓度冷却静置后再次通过倒置的方式来确定的。

2.2.4 扫描电子显微镜样品的制备

将水凝胶样品放置在硅片上冷冻干燥后用扫描电子显微镜进行测量。

2.2.5 紫外、荧光和圆二色光谱测试

紫外、荧光以及圆二色光谱的测量均以PBS:乙醇(1:1)为溶剂, 在1 mm厚度的比色皿中测量得到。

2.2.6 流变测试

流变测试是在配备有紫外光照配件的流变仪上测得。测量时将圆锥体和平台之间的距离设定为0.05 mm, 在1%张力的条件下对水凝胶进行动态频率

扫描. 在1%张力和1 rad/s条件下测量得到水凝胶的实时光降解效率. 对于实时的光降解测试, 将厚度约为0.051 mm的水凝胶放于圆锥体和透明的石英板(3 mm)之间. 等待水凝胶形成之后, 用紫外光(EXFO Omnicure S2000 200 W, 使用302 nm的滤光片, 输出功率为100%)照射样品, 连续光照过程中监测储能模量 G' 和初始储能模量 G'_0 之间的比值变化.

2.2.7 细胞培养

将小鼠乳腺癌4T1细胞放置于含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的1640培养基(Gibco)中, 并放在5% CO₂, 37°C的培养箱中培养.

2.2.8 MTT细胞活力检测

将10、100、500 μ M的小分子MeO-Tet-GA与96孔板中5000个/孔的小鼠乳腺癌4T1细胞在5% CO₂, 37°C培养箱中培养1~3 d后, 用MTT比色法对细胞染色并使用酶标仪测定490 nm下的吸光度, 该实验重复3次. 公式计算测得细胞生长抑制率: $\Delta A\% = [(A_0 - A)/A_0] \times 100\%$, 其中 A 和 A_0 分别为实验组(加入小分子)和对照组(DMSO)的平均吸光度值.

2.2.9 4T1细胞的三维培养

细胞以 2×10^6 个/mL的密度均匀分散在2.5 mg/mL MeO-Tet-GA的PBS溶液中, 之后往每个共聚焦皿中加入200 μ L的细胞水凝胶混合液, 室温下静置45 min使水凝胶稳定, 之后将含有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素溶液的DMEM完全培养基加入到水凝胶表面, 并且每隔一天更换一次完全培养基.

2.2.10 细胞存活率测试

细胞在水凝胶中培养一定天数后用试剂盒Live/Dead staining kit (Molecular Probes)进行染色. 首先移除培养皿中的完全培养基再用1 $\times$ PBS中性缓冲溶液洗涤水凝胶除去残留的完全培养基, 之后根据试剂盒说明书用2 μ M calcein AM和4 μ M EthD-1的1 $\times$ PBS稀释液加入到含有细胞的水凝胶表面进行染色. 在5% CO₂, 37°C培养箱中染色30 min后取出并用1 $\times$ PBS中性缓冲溶液洗涤以除去残留的染料, 之后用荧光共聚焦显微镜对细胞活死的状态进行观察.

3 结果与讨论

3.1 二芳基四氮唑的合成与光反应性能

根据Lin等^[20]对于二芳基四氮唑与烯烃间光催化反应动力学研究, 四氮唑N端芳环上的取代基团对反应速率有较大影响, 其中甲氧基等供电子基团可大大提高光点击反应速率. 因此, 我们选择甲氧基取代的二芳基四氮唑(MeO-Tet-COOH)作为光敏小分子基团拟引入成胶因子中. 如图2所示, 我们以对乙酰基苯甲酸和对甲氧基苯胺为原料通过三步合成得到了MeO-Tet-COOH, 产率为42%. 随后, 测试了MeO-Tet-COOH与对苯乙烯磺酸钠(SSS)之间的光反应性能(图2(b)), 我们发现用302 nm的紫外光照射10 min后MeO-Tet-COOH向吡啶啉产物MeO-Pyr-COOH的转化率高达80% (图2(c)).

3.2 二芳基四氮唑短肽成胶因子的筛选和表征

在合成与表征MeO-Tet-COOH之后, 我们以其作为光敏和疏水基团修饰不同短肽以构筑成胶因子. 通过多肽固相合成的方法, 合成了MeO-Tet-GA、MeO-Tet-GGA、MeO-Tet-GAG、MeO-Tet-GF、MeO-Tet-GV等潜在的成胶因子. 随后, 测试了室温25°C下这些二芳基四氮唑修饰短肽在1 $\times$ PBS中性缓冲溶液(pH=7.4)中的成胶性能, 结果如表1所示. 我们发现, MeO-Tet-GA、MeO-Tet-GAG和MeO-Tet-GGA均可形成水凝胶, 其中MeO-Tet-GA和MeO-Tet-GGA的临界成胶浓度在1.5 mg/mL, MeO-Tet-GAG的临界成胶浓度在2.5 mg/mL, 而MeO-Tet-GF在室温不同浓度下均以沉淀的形式存在, MeO-Tet-GV则一直保持溶液状态. 因此, 在后续研究中, 选择以临界成胶浓度较低的MeO-Tet-GA作为研究对象. 我们对MeO-Tet-GA水凝胶进行了表征. 如图3(a)所示, 紫外-可见光谱结果显示该水凝胶最大吸收峰在300 nm附近. 圆二色光谱(CD)结果显示, 该水凝胶在215 nm附近有一个负吸收峰(图3(b)), 表明水凝胶中存在 β 折叠构象^[21]. SEM结果显示, MeO-Tet-GA水凝胶内部有100 nm宽的纳米纤维(图3(c)). 此外, 我们也用振荡流变法测定了水凝胶的机械性能(图3(d)). 流变学的动态频率扫描结果表明, 水凝胶的动态储能模量 G' 在500 Pa以上, 是其动态损耗模量 G'' 的几倍, 说明MeO-Tet-GA水凝胶有类似于固体的性质.

图3 MeO-Tet-GA超分子水凝胶的表征。(a) MeO-Tet-GA水凝胶(2.5 mg/mL)的紫外可见吸收光谱;(b) MeO-Tet-GA水凝胶(2.5 mg/mL)的圆二色光谱;(c) MeO-Tet-GA水凝胶的扫描电子显微镜图;(d) MeO-Tet-GA水凝胶(2.5 mg/mL)的频率扫描流变图

Figure 3 Characterization of MeO-Tet-GA supramolecular hydrogel. (a) UV-Vis spectra of the hydrogel formed by MeO-Tet-GA (2.5 mg/mL); (b) CD spectrum of the MeO-Tet-GA (2.5 mg/mL) hydrogel; (c) the scanning electron micrographs of the MeO-Tet-GA hydrogel (2.5 mg/mL); (d) dynamic frequency sweep of the MeO-Tet-GA hydrogel at 2.5 mg/mL.

表1 二芳基四氮唑修饰短肽分子的成胶性能^{a)}

Table 1 Gelation property of short peptides modified with biaryl-tetrazole^{a)}

Tet-Peptide	pH	<i>c</i> (mg/mL) ^{b)}
MeO-Tet-GA	7.4	1.5
MeO-Tet-GAG	7.4	2.5
MeO-Tet-GGA	7.4	1.5
MeO-Tet-GF	—	—
MeO-Tet-GV	—	—

a) —表示不成胶; b) *c*表示最低成胶浓度

3.3 MeO-Tet-GA水凝胶的光敏性能

在对MeO-Tet-GA水凝胶进行一系列表征后, 我们研究了该水凝胶在发生分子间光点击化学反应(图4(a))后的性质变化。首先, 我们用HPLC监测MeO-Tet-GA (1 mM)和对苯乙烯磺酸钠 (10 mM)之间的反应性能, 结果表明在经过2 min光照后MeO-Tet-GA完全转化为吡唑啉产物(图4(b)), 表明氨基酸GA的连接并不影响甲氧基取代的二芳基四氮唑的光敏性。此外, 二芳基四氮唑短肽分子和对苯乙烯磺酸钠发生光点击反

图4 MeO-Tet-GA超分子水凝胶的光敏性能。(a) 水凝胶因子MeO-Tet-GA与烯烃SSS之间的分子间光点击反应生成吡唑啉产物MeO-Pyr-GA; (b) HPLC监测MeO-Tet-GA (1 mM)和对苯乙烯磺酸钠(10 mM)在CH₃CN:PBS=1:1中的光反应情况; (c) MeO-Tet-GA (2.5 mg/mL)与对苯乙烯磺酸钠(30 mM)混合水凝胶在302 nm紫外光下光照不同时间的图像; (d) 紫外光照射10 min后, HPLC监测MeO-Tet-GA与SSS混合水凝胶中水凝胶因子MeO-Tet-GA向吡唑啉产物MeO-Pyr-GA的转化; (e) 混合水凝胶的动态储能模量随紫外光照射时间的变化(网络版彩图)

Figure 4 The photosensitive properties of hydrogel. (a) The intramolecular photo-click reaction between MeO-Tet-GA and SSS, and the pyrazoline product MeO-Pyr-GA. (b) HPLC analysis of the reaction mixture of MeO-Tet-GA (1 mM) and SSS (10 mM) in CH₃CN:PBS=1:1 upon irradiation. (c) Optical images of the mixed hydrogel of MeO-Tet-GA (2.5 mg/mL) with SSS (30 mM). Images were taken at different time points as indicated in the figure by exposing the hydrogel to 302 nm UV light. (d) HPLC analysis of the hydrogelator MeO-Tet-GA conversion to pyrazoline product MeO-Pyr-GA, after 10 min of UV-light irradiation. (e) The dynamic storage modulus of the mixed hydrogel after UV irradiation (color online).

应生成的吡唑啉产物MeO-Pyr-GA具有荧光发射性质(网络版补充材料S2)。

随后, 我们在MeO-Tet-GA水凝胶中加入对苯乙烯磺酸钠, 并检测了水凝胶在光照后的性质变化。如图4(c)所示, 在光照2 min后水凝胶的颜色发生变化, 而在5~10 min光照后水凝胶发生明显降解。通过高效液相色谱分析, 确证了光照后水凝胶内部发生了分子间光点击化学反应, 并且MeO-Tet-GA的转化率在22%时即可影响水凝胶的性质(图4(d))。同时, 我们也用实时流变方法测定了水凝胶的相变过程中动态储能模量(*G'*)的变化, 发现随着光照时间的增加, 相应的储能模量与初始储能模量的比值逐渐下降(图4(e)), 光照10 min后

下降到初始储能模量的10%. 这些结果表明, MeO-Tet-GA超分子水凝胶具有光敏性能, 可通过分子间光点击化学反应对其物理性质进行调节.

3.4 MeO-Tet-GA水凝胶的生物相容性

为了验证MeO-Tet-GA水凝胶是否具有潜在的生物应用前景, 我们进一步测试了其于细胞之间的生物相容性. 首先, 我们通过噻唑蓝(MTT)比色法测试了MeO-Tet-GA对小鼠乳腺癌4T1细胞是否具有细胞毒性. 发现当采用500 μM MeO-Tet-GA与4T1细胞共孵育3 d后, 细胞的存活率仍在90%以上(图5(a)). 此外, 我们还采用三维培养的方式将4T1细胞培养在MeO-Tet-GA的内部, 并在培养1和3 d后分别利用钙黄绿素-AM和溴乙锭二聚体1检测活细胞和死细胞. 如图5(b, c)所示, 在培养1和3 d后, 4T1细胞存活率仍保持在90%以上. 这些结果表明MeO-Tet-GA水凝胶具有良好的生物相容性, 可以作为细胞培养基质用于研究细胞微环境对细胞行为的影响.

4 结论

本文采用可发生分子间光点击化学反应的二芳基四氮唑作为光敏基团修饰短肽(MeO-Tet-GA), 构建了一类新型的光敏超分子水凝胶. MeO-Tet-GA水凝胶具有良好的机械性能, 并在与对苯乙烯磺酸钠发生分子

补充材料

本文的补充材料见网络版chemcn.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

参考文献

- Lehn JM. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1990, 29: 1304–1319
- Whitesides GM, Mathias JP, Seto CT. *Science*, 1991, 254: 1312–1319
- Luisi PL. *Isr J Chem*, 2015, 55: 906–918
- Du X, Zhou J, Shi J, Xu B. *Chem Rev*, 2015, 115: 13165–13307
- (a) Robinton DA, Daley GQ. *Nature*, 2012, 481: 295–305; (b) Ehrbar M, Rizzi SC, Schoenmakers RG, San Miguel B, Hubbell JA, Weber FE, Lutolf MP. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 3000–3007; (c) Ehrbar M, Sala A, Lienemann P, Ranga A, Mosiewicz K, Bittermann A, Rizzi SC, Weber FE, Lutolf MP. *Biophys J*, 2011, 100: 284–293
- Buerkle LE, Rowan SJ. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 6089–6102
- (a) Das D, Ghosh P, Dhara S, Panda AB, Pal S. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 4791–4803; (b) Wan Y, Liu L, Yuan S, Sun J, Li Z. *Langmuir*, 2017, 33: 3234–3240; (c) Pal A, Shrivastava S, Dey J. *Chem Commun*, 2009, 45: 6997–6999; (d) Zhao Y, Yokoi H, Tanaka M, Kinoshita T, Tan T. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 1511–1518; (e) Li F, He J, Zhang M, Ni P. *Polym Chem*, 2015, 6: 5009–5014; (f) Kameta N,

图5 MeO-Tet-GA超分子水凝胶的生物相容性. (a) 小鼠乳腺癌4T1细胞与10, 100, 500 μM MeO-Tet-GA培养24和72 h后的细胞存活率; (b) 小鼠乳腺癌4T1细胞在MeO-Tet-GA水凝胶中培养1 d后的共聚焦图像; (c) 小鼠乳腺癌4T1细胞在MeO-Tet-GA水凝胶中培养3 d后的共聚焦图像. 用Calcein AM和ethidium homodimer 1分别将活细胞和死细胞染成绿色和红色. 标尺: 200 μm (网络版彩图)

Figure 5 Biocompatibility of MeO-Tet-GA supramolecular hydrogel. (a) Cell viabilities of 4T1 cells incubated with the hydrogelator MeO-Tet-GA (10, 100, 500 μM) for 24 and 72 h. (b) Confocal images of 4T1 cells incubated in MeO-Tet-GA hydrogel for 1 d. (c) Confocal images of 4T1 cells incubated in MeO-Tet-GA hydrogel for 3 d. Calcein AM and ethidium homodimer 1 were utilized to stain live cells and dead cells in green and red, respectively. Scale bar: 200 μm (color online).

间光点击化学反应后其物理性质可发生明显变化. 此外, MeO-Tet-GA水凝胶具有优良的生物相容性, 在与4T1细胞长时间培养后不会造成细胞死亡. 因此, MeO-Tet-GA水凝胶是一种潜在的光敏生物材料, 可用于研究细胞行为变化等. 基于MeO-Tet-GA水凝胶修饰不同功能分子模块以研究干细胞的分化等工作目前正在进行中.

- Masuda M, Shimizu T. *ACS Nano*, 2012, 6: 5249–5258
- 8 (a) Ha W, Yu J, Song X, Chen J, Shi Y. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 10623–10630; (b) Jia XJ, Wang J, Zhong DC, Wu J, Zhao B, Engelsen D, Luo XZ. *RSC Adv*, 2016, 6: 109425; (c) Kiyonaka S, Sugiyasu K, Shinkai S, Hamachi I. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 10954–10955
- 9 (a) Sáez JA, Escuder B, Miravet JF. *Tetrahedron*, 2010, 66: 2614–2618; (b) Qu R, Shen L, Qu A, Wang R, An Y, Shi L. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 16694–16705; (c) Vemula PK, Cruikshank GA, Karp JM, John G. *Biomaterials*, 2009, 30: 383–393
- 10 (a) Soontornworajit B, Zhou J, Snipes MP, Battig MR, Wang Y. *Biomaterials*, 2011, 32: 6839–6849; (b) Pakulska MM, Vulic K, Shoichet MS. *J Control Release*, 2013, 171: 11–16; (c) Zhang Y, Gu H, Yang Z, Xu B. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 13680–13681; (d) Battig MR, Soontornworajit B, Wang Y. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 12410–12413
- 11 (a) Azagarsamy MA, McKinnon DD, Alge DL, Anseth KS. *ACS Macro Lett*, 2014, 3: 515–519; (b) DeForest CA, Anseth KS. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 1816–1819; (c) Xiao X, Hu J, Wang X, Huang L, Chen Y, Wang W, Li J, Zhang Y. *Chem Commun*, 2016, 52: 12517–12520; (d) Qiu Z, Yu H, Li J, Wang Y, Zhang Y. *Chem Commun*, 2009, 23: 3342–3344; (e) Yan B, Boyer JC, Habault D, Branda NR, Zhao Y. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 16558–16561
- 12 (a) Kharkar PM, Kiick KL, Kloxin AM. *Polym Chem*, 2015, 6: 5565–5574; (b) Li X, Li J, Gao Y, Kuang Y, Shi J, Xu B. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 17707–17709; (c) Komatsu H, Matsumoto S, Tamaru S, Kaneko K, Ikeda M, Hamachi I. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 5580–5585; (d) Shigemitsu H, Fujisaku T, Onogi S, Yoshii T, Ikeda M, Hamachi I. *Nat Protoc*, 2016, 11: 1744–1756; (e) Gupta MK, Martin JR, Werfel TA, Shen T, Page JM, Duvall CL. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 14896–14902
- 13 Wang W, Hu J, Zheng M, Zheng L, Wang H, Zhang Y. *Org Biomol Chem*, 2015, 13: 11492–11498
- 14 Herner A, Lin Q. *Top Curr Chem*, 2016, 374: 1
- 15 Lim RKV, Lin Q. *Acc Chem Res*, 2011, 44: 828–839
- 16 He M, Li J, Tan S, Wang R, Zhang Y. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 18718–18721
- 17 Merrifield RB. *J Am Chem Soc*, 1963, 85: 2149–2154
- 18 Carpino L, Han G. *J Org Chem*, 1979, 44: 3739
- 19 Rodriguez-Emmenegger C, Preuss CM, Yameen B, Pop-Georgievski O, Bachmann M, Mueller JO, Bruns M, Goldmann AS, Bastmeyer M, Barner-Kowollik C. *Adv Mater*, 2013, 25: 6123–6127
- 20 Wang Y, Song W, Hu WJ, Lin Q. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 5330–5333
- 21 Behanna HA, Donners JJM, Gordon AC, Stupp SI. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 1193–1200

Photosensitive supramolecular hydrogel based on biaryltetrazole modified with short peptide

Liang Zhou, Ming-Tao He, Rui Li, Jinbo Li^{*}, Yan Zhang^{*}

School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China

**Corresponding author (email: jinboli@nju.edu.cn; njuzzy@nju.edu.cn)*

Abstract: Here we report a photosensitive supramolecular hydrogel formed by MeO-Tet-GA. MeO-Tet-GA can self-assemble to form supramolecular hydrogel in neutral buffer. The formed hydrogel has good mechanical properties, and the dynamic energy storage modulus G' is above 500 Pa. Based on the intermolecular photo-click reaction between biaryltetrazole and the terminal alkene, we could further modify the hydrogel with hydrophilic sodium 4-vinylbenzenesulfonate to disturb the hydrogel and induce the degradation of hydrogel. We also tried to use this supramolecular hydrogel for three-dimensional culture of mouse breast cancer 4T1 cells. We found that MeO-Tet-GA has excellent biocompatibility and did not cause significant 4T1 cell death after three days of culture. Overall, this work demonstrates that supramolecular hydrogel formed by MeO-Tet-GA holds great promise in long-term three-dimensional cell culture and in studying cell behaviors through photo-modulation of cell microenvironment.

Keywords: supramolecular hydrogel, intermolecular photo-click reaction, three-dimensional cell culture

doi: [10.1360/SSC-2019-0173](https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSC-2019-0173)