

基于动态共价交联水凝胶的电化学传感器监测 三维培养细胞释放一氧化氮

白杨 刘雪娇 熊涵之 周贇璠 陈旭* 杨文胜

(北京化工大学, 化工资源有效利用国家重点实验室, 北京 100029)

摘 要 采用氧化海藻酸钠(Sodium alginate oxide, OSA)与酰肼聚乙二醇(Polyethylene glycol-dihydrazide, PEG-DH)通过缩合反应生成酰肼键,制得能够可逆断裂和重建的动态 OSA/PEG-DH 水凝胶网络,实现了对细胞所处动态三维(3D)微环境的模拟。Mn(III)内消旋四(*N*-甲基-4-吡啶基)卟啉五氯化物(5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl) porphyrinato manganese (III), MnTMPyP)通过与 OSA 之间的静电作用实现在 OSA/PEG-DH 水凝胶中的稳定复合,并作为传感元件实现对一氧化氮(NO)的电化学检测。采用紫外-可见吸收光谱法(UV-Vis)、扫描电子显微镜(SEM)、流变测试、循环伏安法(CV)和计时电流法(*i-t*)等研究了 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 复合水凝胶的特征及其修饰电极对 NO 的电化学检测性能。结果表明,传感器对 NO 的检测灵敏度为 $1.03 \mu\text{A}\cdot\text{L}/(\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^2)$,检出限为 17 nmol/L ($S/N=3$),具有良好的选择性。本研究制备的 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 复合水凝胶具有 3D 多孔结构和良好的生物相容性,可用于三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的 3D 培养,制备的传感器可用于原位监测细胞释放 NO。

关键词 动态共价交联水凝胶; 一氧化氮; 电化学检测; 三维细胞培养

一氧化氮(NO)作为信号分子参与人体内多种生理和病理过程,与肿瘤的发生、转移和扩散进程具有密不可分的关系^[1],因此,原位实时监测细胞释放的 NO 对揭示致病机理和开发治疗药物具有非常重要的意义。细胞释放的 NO 具有半衰期短、浓度低和反应活性高等特点,研究者已开发多种分析手段^[2-5]用于检测生物体系中的 NO,其中,电化学法因具有成本低廉、操作简单、性能稳定、分析响应快以及易于实现在体监测等优势而被广泛应用于监测细胞释放的活性小分子^[6-7]。目前,对细胞释放 NO 的监测研究主要是基于细胞在溶液中悬浮^[8]或者基于二维(2D)细胞培养技术^[9]。三维(3D)细胞培养能更大程度地模拟体内微环境,更真实地呈现细胞的状态和功能^[10]。基于 3D 细胞培养技术开发的 NO 电化学检测近年来开始出现, Qin 等^[11]将软骨细胞培养于表面固定了多肽-金纳米管的 3D 多孔聚二甲基硅氧烷支架上,并实现了拉伸刺激下对 3D 培养软骨细胞释放 NO 的实时监测。Hu 等^[12]基于蚕茧衍生的分层多孔碳纤维网络,设计了一种结合 3D 细胞培养技术的 NO 电化学传感器。

在生物体内,细胞处于动态的微环境,即细胞在黏附和生长过程中,由于形态或体积的改变,会对其所在的微环境施加局部应力,促使周围基质发生局部变形和重塑^[13]。目前,已报道的用于开发电化学传感器的 3D 细胞培养支架还不能够较好地模拟细胞微环境的动态特性,而基于动态共价键(包括硼酸酯键^[14]、酰肼键^[15]和亚胺键^[16]等)能够实现水凝胶的可逆断裂和重组,进而模拟细胞所处的动态微环境,适应细胞所施加的局部应力,不影响也不限制细胞在 3D 微环境中的形态改变^[17]。

本研究以氧化海藻酸钠(OSA)与酰肼聚乙二醇(PEG-DH)通过缩合反应生成酰肼键,制得能够可逆断裂和重建的动态 OSA/PEG-DH 水凝胶网络,实现了对细胞所处动态 3D 微环境的模拟。OSA/PEG-DH 动态共价交联水凝胶为 3D 细胞培养平台,以 MnTMPyP 为电化学传感元件,制备 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶,基于此构建的电化学传感器可以原位监测 3D 培养的三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞释放的 NO(图 1)。此传感器在检测 NO 时具有较宽的响应范围和较低的检出限,其传感界面受损后 10 min 即可

2023-05-10 收稿; 2023-06-23 接受

国家自然科学基金项目(No. 201874005)资助。

* E-mail: chenxu@mail.buct.edu.cn

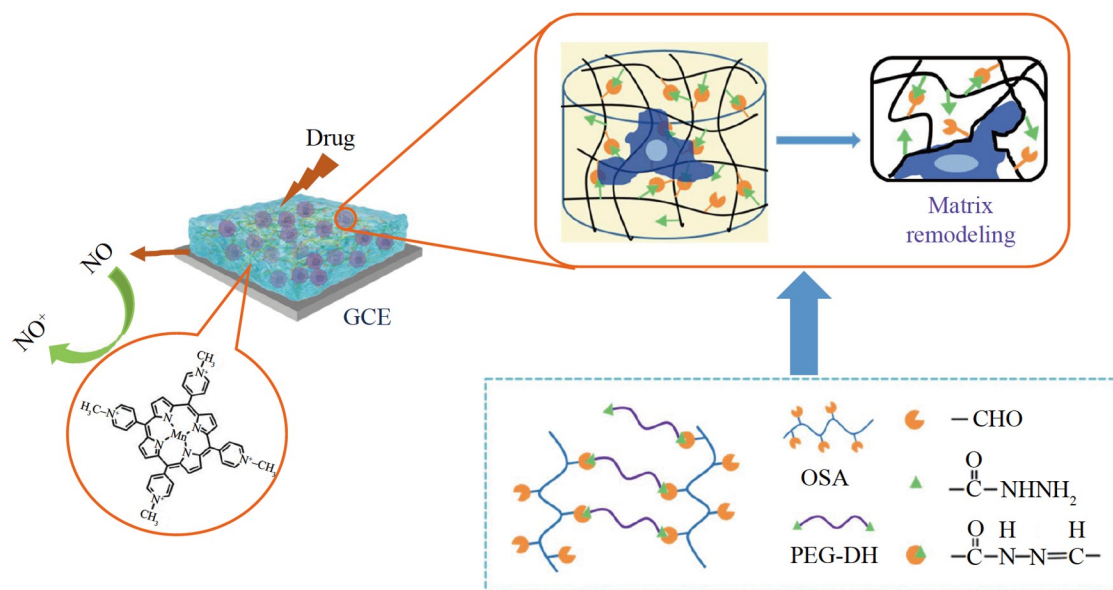


图1 构建的电化学传感器用于监测 3D 培养 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 动态共价交联水凝胶中的 MDA-MB-231 细胞释放 NO 的示意图

Fig.1 Schematic diagram of the electrochemical sensor for monitoring NO released by MDA-MB-231 cells 3D cultured in OSA/MnTMPyP/PEG-DH dynamic covalently crosslinking hydrogel

OSA: 氧化海藻酸钠(Sodium alginate oxide); MnTMPyP: Mn(III)内消旋四(*N*-甲基-4-吡啶基)卟啉五氯化物(5,10,15,20-tetrakis(*N*-Methylpyridinium-4-yl) porphyrinato manganese (III)); PEG-DH: 酰肼聚乙二醇(Polyethylene glycol-dihydrazide); GCE: 玻碳电极(Glassy carbon electrode)

自愈合,实现了对 NO 电流响应的及时恢复。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

MCR 301 流变仪(奥地利安东帕公司); SUPRA55 型扫描电子显微镜(德国蔡司公司); TSC SP5 激光扫描共聚焦显微镜(德国徕卡仪器有限公司); CHI660E 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司); Nano-ZS 粒度仪(英国 Malvern 公司); UVmini-1240 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。采用三电极体系:未修饰或修饰的 GCE(直径 3 mm)为工作电极,铂丝作为辅助电极,Ag/AgCl 电极为参比电极。

海藻酸钠(Sodium alginate, SA, 上海阿拉丁试剂有限公司); 酰肼聚乙二醇(2000 Da, 96%, 上海芃硕生物公司); 高碘酸钠(NaIO_4 , 北京百灵威试剂公司); Mn(III)内消旋四(*N*-甲基-4-吡啶基)卟啉五氯化物(MnTMPyP, 85%, 西格玛奥德里奇贸易有限公司); 亚硝酸钠(NaNO_2 , 99%, 上海麦克林生化科技有限公司); 其它试剂均为分析纯。磷酸盐缓冲溶液(PBS)采用 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 配制; 实验用水为去离子水。

1.2 实验方法

1.2.1 OSA及OSA/MnTMPyP/PEG-DH水凝胶的制备

将 10 g SA 分散在 50 mL 无水乙醇中, 5.4 g NaIO_4 溶于 50 mL 去离子水中, 将二者混合, 避光搅拌 6 h 后, 通过加入与 NaIO_4 等物质的量的乙二醇终止反应。搅拌 1 h 后, 加入 20 g NaCl。加入 200 mL 无水乙醇, 抽滤, 再用去离子水溶解沉淀, 重复此操作步骤 4 次, 将制得的产物在 40 °C 下真空干燥, 得到 OSA 固体。通过盐酸羟胺滴定法测量 OSA 的醛基含量^[18], 测得制备的 OSA 的氧化度约为 50%。

取适量 OSA 置于 0.1 mol/L PBS(pH = 7.4)中, 超声溶解, 得到 40 mg/mL OSA 溶液, 采用相同方法制得 80 mg/mL PEG-DH 溶液。将 MnTMPyP 用去离子水溶解后, 加入到 OSA 溶液中超声 10 min, 得到 OSA/MnTMPyP 溶液。将等体积的 PEG-DH 溶液与 OSA/MnTMPyP 溶液超声混合, 静置约 1.5 h 后, 得到 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶, MnTMPyP 在水凝胶中的浓度为 0.5 mg/mL。将等体积的 OSA 溶液和

PEG-DH 溶液超声混合,得到 OSA/PEG-DH 水凝胶。

1.2.2 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶修饰 GCE 的制备

GCE 依次用 1、0.3 和 0.05 μm 粒径的 Al_2O_3 粉末进行抛光打磨,分别用去离子水、无水乙醇、去离子水超声清洗 3 次,将其置于氮气气氛下干燥,随后用 UV 照射对 GCE 进行消毒杀菌。将 6 μL OSA/MnTMPyP/PEG-DH 溶液滴加于 GCE 表面上,待其成胶,得到 OSA/MnTMPyP/PEG-DH/GCE。采用相同方法制备 OSA/PEG-DH/GCE。

1.2.3 NO 标准溶液的制备

根据文献[19]的方法制备饱和 NO 溶液。在整套装置中持续通入 N_2 40 min 后,进行 NO 的制备。在 4 mol/L NaNO_2 溶液中逐滴缓慢地加入 2 mol/L H_2SO_4 溶液,通过歧化反应生成 NO 和 NO_2 气体,用 4 mol/L NaOH 溶液对副产物 NO_2 气体进行吸收,最后用 PBS 收集制备纯化后的 NO 气体,室温下,饱和 NO 溶液的浓度为 1.8 mmol/L,在 4 $^\circ\text{C}$ 可避光保存 3 h,现用现配。

1.2.4 3D 细胞培养

MDA-MB-231 细胞购自湖南丰晖生物科技有限公司,采用含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 L-15 培养基,于细胞培养箱内(37 $^\circ\text{C}$, 100%空气)培养。在 PEG-DH 溶液中加入 MDA-MB-231 细胞悬液后,得到含有细胞的 80 mg/mL PEG 溶液,将 OSA/MnTMPyP 溶液与含有细胞的 PEG-DH 溶液等体积混合,取 6 μL 混合溶液(6.7×10^5 cells/mL)滴涂在 GCE 上,于培养箱中静置培养,使其在 GCE 表面原位成胶,将其置于培养箱中进行 3D 细胞培养,进行电化学测试。

1.2.5 电化学测试及原位监测细胞释放的 NO

在 0.1 mol/L PBS(pH 7.0)中添加不同浓度的 NO,采用循环伏安(CV)和计时电流($i-t$)法检测修饰电极的电流响应。采用 $i-t$ 法检测 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶中 3D 培养的 MDA-MB-231 细胞释放的 NO,待电流信号稳定后,将佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA)加入到电解液中,刺激 MDA-MB-231 细胞释放 NO。

2 结果与讨论

2.1 材料表征

如图 2A 所示,将 PEG-DH 溶液与 OSA 溶液进行等体积混合,在生理 pH 值和室温条件下制得 OSA/PEG-DH 水凝胶,制备反应机理见电子版文后支持信息图 S1。采用红外光谱(FTIR)对制得的 OSA 以及 OSA/PEG-DH 水凝胶进行表征。如图 2B 所示。相较于曲线 a,曲线 b 在 1735 cm^{-1} 处出现了一个新的吸收峰,归属于 OSA 的醛基对称振动吸收峰,在 2860 cm^{-1} 处出现的吸收峰是另一个醛基特征峰(CO—H 振动吸收峰),这表明成功制备了 OSA^[20]。曲线 c 在 3430 cm^{-1} 出现的宽吸收峰可归属于酰胺键上 N—H 的伸缩振动峰,曲线 c 中不含有曲线 b 的两处醛基特征峰,进一步说明 OSA 参与反应,生成了 OSA/PEG-DH 水凝胶,醛基消失,表明 OSA/PEG-DH 水凝胶被成功制备;曲线 c 在 1624 cm^{-1} 处出现的吸收峰可能既包含了 C=N 的吸收峰,又包含了 C=O 的吸收峰。

如图 2C 所示,通过目视观察 OSA/PEG-DH 水凝胶的自愈合过程。为了进一步表征 OSA/PEG-DH 水凝胶的自愈合能力,先对 OSA/PEG-DH 水凝胶进行固定频率为 1 rad/s 的应变扫描测试。如图 2D 所示,当应变为 100%时,曲线出现交叉,表明在应变为 100%时,水凝胶网络开始被完全破坏,并转化为溶胶态,即发生了溶胶-凝胶转变^[21];当施加的应变超过 100%时, G'' (损耗模量) $> G'$ (储能模量),表明凝胶已转变为溶胶。根据图 2D 的测试结果,设置小应变为 1%、大应变为 600%,进行固定频率为 1 rad/s 的重复动态应变阶跃测试。如图 2E 所示,当应变为 1%时, $G' > G''$,水凝胶呈现凝胶状态;当应变增加到 600%时, $G' < G''$,水凝胶变为类液体状态;当应变再降回 1%后, G' 和 G 值几乎立即恢复到初始状态,测试连续重复 3 次,表明 OSA/PEG-DH 水凝胶具有可重复的自愈合性能^[20]。

OSA 的 Zeta 电位为 -54.4 mV,说明 OSA 处于负电位的状态,这可归因于 OSA 链中存在部分解离的羧酸基团,即 $-\text{COO}^-$; MnTMPyP 的 Zeta 电位为 4.8 mV,说明其处于正电位状态(见电子版文后支持信息图 S2A)。因此, MnTMPyP 与 OSA 通过静电作用实现了非共价复合。在 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水

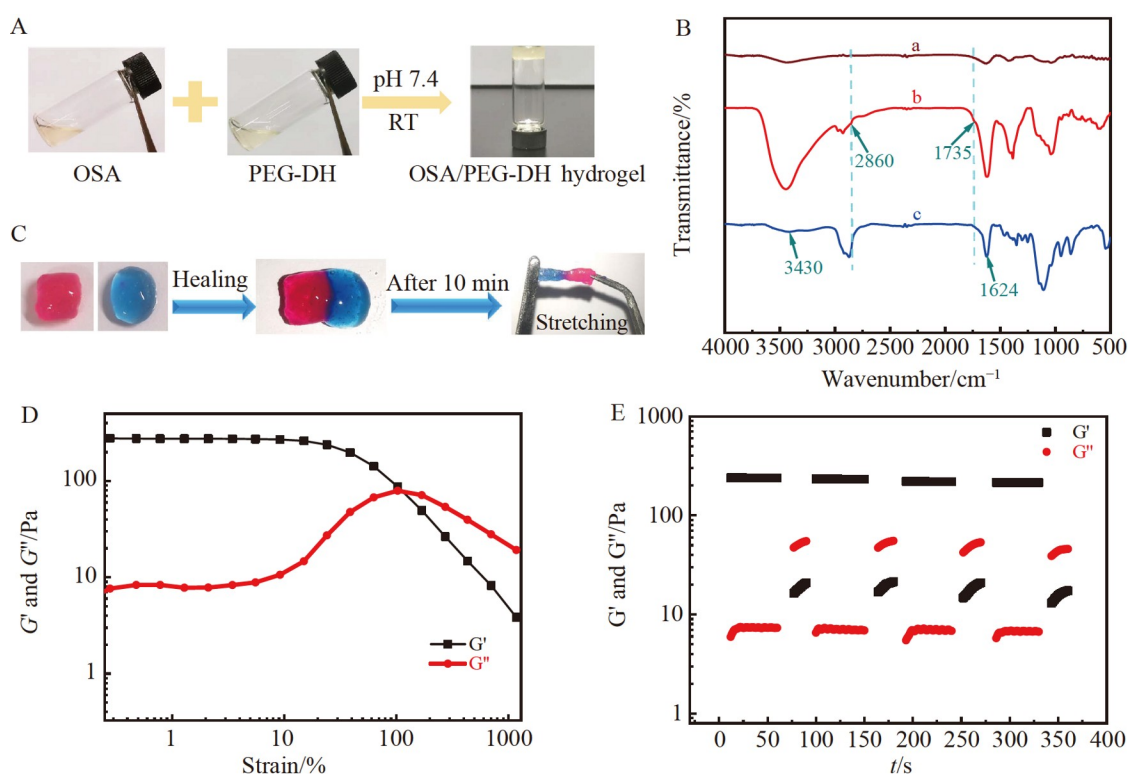


图2 (A) OSA/PEG-DH 水凝胶的制备过程照片; (B) 海藻酸钠(SA, a)、OSA(b)和 OSA/PEG-DH 水凝胶(c)的傅里叶变换红外光谱表征; (C) OSA/PEG-DH 水凝胶的自愈合过程照片; (D) 采用应变扫描法测定 OSA/PEG-DH 水凝胶的流变性能; (E) 采用重复动态应变阶跃测试测定 OSA/PEG-DH 水凝胶的自愈合特性

Fig.2 (A) Preparation of OSA/PEG-DH hydrogel; (B) Fourier transform infrared spectroscopy characterization of (a) sodium alginate (SA), (b) OSA and (c) OSA/PEG-DH hydrogel; (C) Photographs of the self-healing process of OSA/PEG-DH hydrogel; (D) Detection of rheological properties of OSA/MnTMPyP/PEG-DH hydrogel using a strain sweep and (E) Detection of self-healing properties of the OSA/MnTMPyP/PEG-DH hydrogel using repeated dynamic strain step tests

凝胶的紫外-可见吸收光谱(电子版文后支持信息图 S2B)中, MnTMPyP 溶液的光谱出现强 Soret 带(462.3 nm)和弱 Q 带(562.5 nm)^[22], OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶的 Soret 带和 Q 带分别在 463.1 和 564.4 nm 处。OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶与 MnTMPyP 溶液的紫外-可见吸收峰的位置几乎完全重合,说明锰卟啉被成功复合在水凝胶中;与游离基卟啉相关的 Soret 带未发生蓝移,说明复合水凝胶中 MnTMPyP 的构型没有发生改变^[23]。将 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶冷冻干燥 48 h 后,采用 SEM 对其断面进行形貌表征(电子版文后支持信息图 S2C)。OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶呈现 3D 网络多孔结构,其孔径在 50~100 μm 之间,而细胞直径通常在 10~20 μm 之间,表明这种 3D 网络多孔结构能够从空间上很好地容纳细胞,并包容细胞在 3D 空间内进行有利的生长黏附、营养物质的运输和废物代谢。采用能量色散(EDS)对 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶进行了元素分析(电子版文后支持信息图 S2D),Mn(MnTMPyP 的特征元素)的 EDS 元素分布图像表明, MnTMPyP 在 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶中均匀分布。为了证明 MnTMPyP 能够在水凝胶中稳定固定,对修饰 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶的 GCE 进行了 CV 测试(见电子版文后支持信息图 S3)。记录了 OSA/MnTMPyP/PEG-DH/GCE 在 0.1 mol/L PBS 溶液(pH 7.0)中扫描 1 圈(曲线 a)和 100 圈(曲线 b)的循环伏安响应,可以观察到 CV 曲线几乎没有明显变化,表明 MnTMPyP 能够被稳定固定在 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶中。

2.2 不同修饰电极的电化学表征及其对 NO 的电化学响应

测定了不同修饰电极在 0.1 mol/L PBS(pH 7.0)中的 CV 响应(图 3A)。在 -0.5~0.3 V 的电化学窗口下, MnTMPyP/GCE(曲线 a)在 -0.217 和 -0.067 V 处出现了一对氧化还原峰,根据公式 $E_0 = (E_{\text{pa}} + E_{\text{pc}})/2$,

计算 MnTMPyP 的形式氧化还原电位为 -0.142 V 。OSA/MnTMPyP/PEG-DHHG/GCE 也表现出一对相似的氧化-还原峰,但其氧化-还原峰峰差比 MnTMPyP/GCE 的氧化-还原峰峰差大 34 mV ,说明 OSA/PEG-DH 水凝胶对 MnTMPyP 和 GCE 之间的直接电子转移存在影响。在 OSA/PEG-DHHG/GCE 上仅检测到了充电电流,这表明 OSA/MnTMPyP/PEG-DHHG/GCE 在 CV 图中的氧化-还原峰来源于 MnTMPyP 的活性中心,即 Mn(III)/Mn(II)的还原和氧化^[24]。

采用 CV 法分析了 NO 在不同修饰电极上的电化学响应。如图 3B 所示,未加入 NO 时,OSA/MnTMPyP/PEG-DHHG/GCE 表现出典型的电容性行为(曲线 a);加入 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ NO 后,OSA/MnTMPyP/PEG-DHHG/GCE 在 0.90 V 处出现了一个明显的催化氧化峰(曲线 b)。OSA/PEG-DHHG/GCE 对 NO 无电化学响应(曲线 d)。上述实验结果表明,OSA/MnTMPyP/PEG-DHHG/GCE 对 NO 的催化氧化活性主要来自 MnTMPyP。

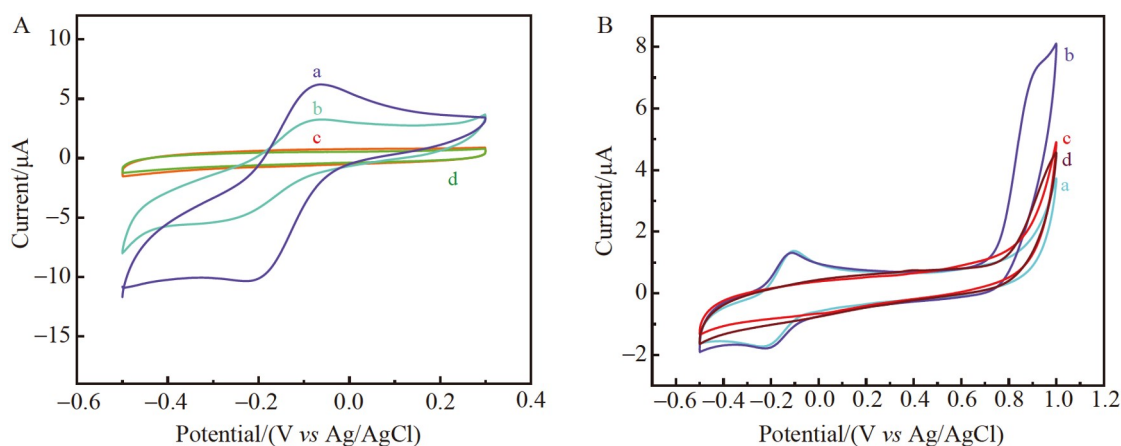


图3 (A) MnTMPyP/GCE(a)、OSA/MnTMPyP/PEG-DHHG/GCE(b)、OSA/PEG-DHHG/GCE(c)和 GCE (d)在 0.1 mol/L PBS (pH 7.0)中的循环伏安(CV)图,扫速为 0.1 V/s ; (B) OSA/MnTMPyP/PEG-DHHG/GCE(a、b)和 OSA/PEG-DHHG/GCE(c、d)在 0.1 mol/L PBS (pH 7.0)中加入 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ NO 前(a、c)后(b、d)的 CV 图,扫速为 0.1 V/s

Fig.3 (A) Cyclic voltammetry (CV) characterization of (a) MnTMPyP/GCE, (b) OSA/MnTMPyP/PEG-DHHG/GCE, (c) OSA /PEG-DHHG/GCE and (d) GCE in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0), scan rate is 0.1 V/s ; (B) CVs of OSA/MnTMPyP/PEG-DHHG/GCE (a, b) and OSA/PEG-DHHG/GCE (c, d) in the absence (a, c) and presence (b, d) of $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ NO in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0), scan rate is 0.1 V/s

2.3 传感器对NO的传感性能研究

通过 $i-t$ 法(应用电位为 0.9 V)评估 OSA/MnTMPyP/PEG-DHHG/GCE 对 NO 的电化学传感性能。如图 4A 所示,NO 的浓度在 $0.036\sim 126\text{ }\mu\text{mol/L}$ 范围内,电流响应随 NO 浓度增加而增大,线性回归方程为 $y(\mu\text{A}) = 0.073x(\mu\text{mol/L}) + 0.121 (R^2 = 0.996)$ (图 4B),检测 NO 的灵敏度为 $1.03\text{ }\mu\text{A}\cdot\text{L}/(\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^2)$,检出限为 17 nmol/L ($S/N = 3$)。

通过差分脉冲伏安法(DPV)表征 OSA/MnTMPyP/PEG-DHHG/GCE 在检测 NO 时的自愈合性能。如图 4C 所示,传感器对 $36\text{ }\mu\text{mol/L}$ NO 具有良好的电流响应(曲线 b)。采用锋利的刀片割划水凝胶传感器表面后,立即对损伤后的传感器进行 DPV 测试,发现其对 $36\text{ }\mu\text{mol/L}$ NO 的电流响应下降约 22.4% (曲线 c),与传感界面损伤之前相比,峰电位正移 0.04 V (图 4D)。将表面损伤后的传感器放置在室温下,不进行任何的外部干预,使其自愈合, 5 min 后,传感器对 $36\text{ }\mu\text{mol/L}$ NO 的电流响应恢复到受损前的 85.9% (曲线 d);自愈合 10 min 后,电流响应恢复到受损前的 98.1% (曲线 e),此时峰电位回到损伤前的位置。上述结果表明,传感器的传感界面在遭受损伤后能够在短时间内快速恢复其对 NO 的传感能力。

通过 $i-t$ 法(应用电位为 0.9 V)考察了 OSA/MnTMPyP/PEG-DHHG/GCE 的选择性。 $18\text{ }\mu\text{mol/L}$ 干扰物质(Glu、Lys、 H_2O_2 、 Cl^- 、CA、AA、 NO_3^- 及 NO_2^-)的电流响应均小于 $18\text{ }\mu\text{mol/L}$ NO 电流响应的 8.0% (电子版文后支持信息图 S4A),说明传感器对 NO 有很好的选择性。OSA/MnTMPyP/PEG-DHHG/GCE

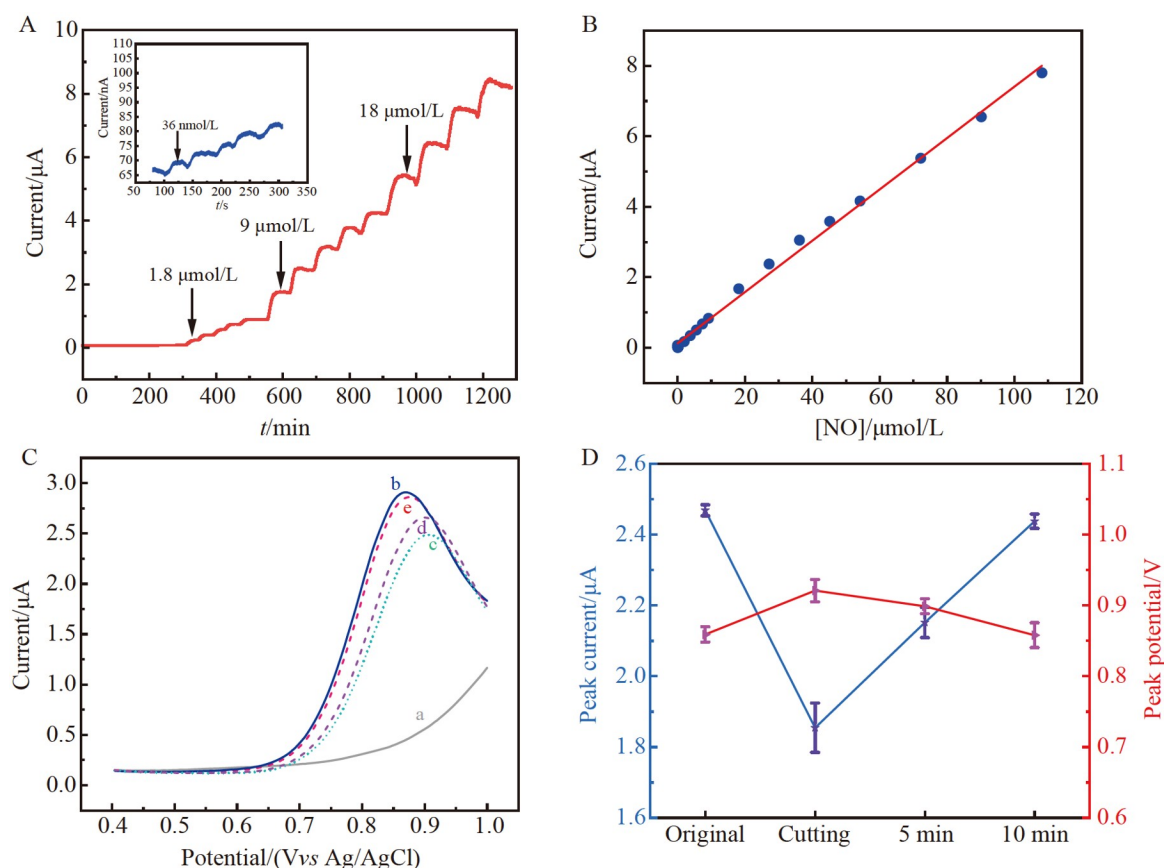


图4 (A) 传感器在含有 NO 的 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 中的计时电流响应图 (工作电位为 0.90 V); (B) NO 电流响应与其浓度的线性关系曲线; (C) 传感器在 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 中加入 36 μmol/L NO 前 (a) 后 (b) 的差分脉冲伏安 (DPV) 图, 修饰电极表面受到机械损伤后 (c) 和分别经过 5 min (d) 以及 10 min (e) 自愈后检测 36 μmol/L NO 的 DPV 曲线; (D) 图 C 中峰电流和峰电位的变化曲线

Fig.4 (A) Amperometric response of the sensor at 0.9 V in PBS (pH = 7.0) containing different concentrations of NO; (B) Linear relationship between the current response of NO and logarithm of NO concentration; (C) Differential pulse voltammetry (DPV) diagram of the sensor in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) before (a) and after (b) addition of 36 μmol/L NO, the electrochemical response of the modified electrodes to 36 μmol/L NO after mechanical damage (c), and self-healing for 5 min (d) and 10 min (e); (D) The corresponding curve of changes in peak current and peak potential in Fig.4C

在 4 °C 下保存 72 h 后, 传感器的电流响应仍然保持在初始电流响应值的 97.4%, 表明此传感器具有良好的稳定性 (见电子版文后支持信息图 S4B)。在相同条件下制备的 5 根 OSA/MnTMPyP/PEG-DH HG/GCE 对 9 μmol/L NO 的电流响应的相对标准偏差 (RSD) 为 3.6%, 表明电极的制备重现性良好。采用同一根 OSA/MnTMPyP/PEG-DH HG/GCE 对 9 μmol/L NO 进行电化学检测, 5 次检测结果的 RSD 为 2.0%, 表明此传感器具有优良的检测重现性。

2.4 原位监测 3D 培养 MDA-MB-231 细胞释放的 NO

采用 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶模拟细胞所处的动态 3D 微环境, 通过激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 能观察到水凝胶内的细胞簇分布在不同高度, 其整体呈现 3D 的分布状态^[25-26] (图 5A)。通过 CCK-8 法评估 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶的体外细胞毒性, 发现 3D 培养于水凝胶中的 MDA-MB-231 细胞经不同培养时间的细胞存活率均大于 92% (电子版文后支持信息图 S5), 证明此水凝胶具有良好的生物相容性。

通过检测 MDA-MB-231 细胞释放的 NO 考察所制备电化学传感器的实时检测性能。在 1 mL PBS (pH = 7.0) 中, OSA/MnTMPyP/PEG-DH/cell HG/GCE 经 PMA (1 μg/mL) 刺激后产生的电流响应为 434.4 nA (图 5B 中曲线 a), 而不含细胞的传感器无任何电流响应, 表明电流响应不是加入 PMA 引起的, 而是细胞

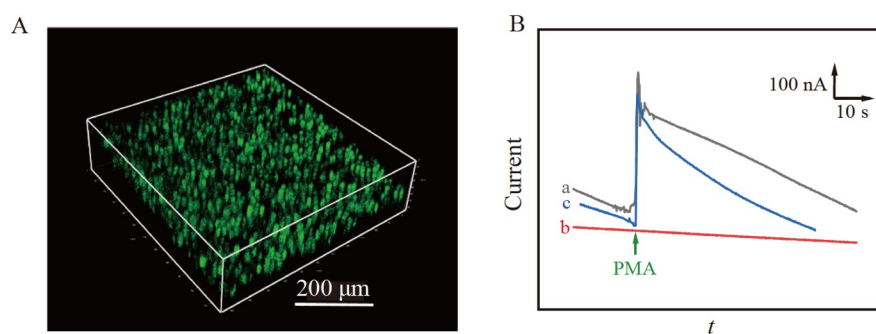


图5 (A) MDA-MB-231 细胞在水凝胶中的激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)图像; (B) OSA/MnTMPyP/PEG-DH/cell HG/GCE(a)和 OSA/MnTMPyP/PEG-DH HG/GCE(b)以及切割后的含有细胞的传感器(c)在 PBS(pH = 7.0)中经佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA)刺激得到的计时电流图

Fig.5 (A) Laser scanning confocal microscope (LSCM) image of MDA-MB-231 cells in hydrogel; (B) Amperometric responses of OSA/MnTMPyP/PEG-DH/cell HG/GCE (a), OSA/MnTMPyP/PEG-DH HG/GCE (b) and the sensor containing cells after cutting in PBS (c) under stimulation with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)

经药物刺激后释放 NO 导致的。为了考察在实际监测 3D 培养细胞释放 NO 过程中传感器的自愈合性能,将相同条件下制备的 OSA/MnTMPyP/PEG-DH/MDA-MB-231cell HG/GCE 的表面进行切割后,置于 PBS 中进行 *i-t* 测试, 600 s 后注射 PMA(1 $\mu\text{g/mL}$), 电流响应为 421.7 nA(图 5B 中曲线 c),为未经切割处理的电极所得电流响应的 97.1%,表明传感界面基本愈合。实验结果表明,此传感器能够对受损界面进行自修复从而实现 NO 电流响应的快速恢复。基于动态共价交联水凝胶所构建的电化学传感器不仅能够模拟细胞生长所需要的动态微环境,而且传感界面因具有优异的自愈合性,能够修复外界潜在的机械损伤。

3 结论

本研究制备了 OSA/MnTMPyP/PEG-DH 水凝胶,基于此构建了电化学传感平台,实现了原位监测 3D 培养的 MDA-MB-231 细胞释放的 NO。OSA/PEG-DH 水凝胶通过动态酰胺键实现可逆的断裂和重组,模拟细胞所处的动态微环境。MnTMPyP 作为传感器的敏感元件,通过对 NO 的电催化氧化实现了对 NO 浓度的定量分析。传感器对 NO 的检测灵敏度为 $1.03 \mu\text{A}\cdot\text{L}/(\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^2)$,检出限为 17 nmol/L($S/N = 3$),损伤后的传感界面对 NO 的电流响应能及时恢复。本研究为模拟细胞动态微环境以及监测细胞行为等研究奠定了基础。

References

- [1] ALMEIDA B, ROGERS K E, NAG O K, DELEHANTY J B. *ACS Sens.*, 2021, 6(5): 1695-1703.
- [2] XU G, WEI F, CEN Y, CHENG X, HU Q. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2020, 6(11): 6086-6094.
- [3] DENG Y, QI H, MA Y, LIU S, ZHAO M, GUO Z, JIE Y, ZHENG R, JING J, CHEN K, DING H, LV G, ZHANG K, LI R, CHENG H, ZHAO L, SHENG X, ZHANG M, YIN L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2022, 119(34): e2208060119.
- [4] HAN S, YANG L, LIU M, LI H, SONG X. *Chem. Eng. J.*, 2023, 463: 142383.
- [5] XIAO P, LIANG M, YANG S, SUN Y, LI J, GU Z, ZHANG L, FAN Q, JIANG X, WU W. *Biomaterials*, 2023, 294: 121993.
- [6] LIU Fu-Xin, DU Shi-Long, LI Lin, LIU Qian, DING Lan, LIU Xiu-Hui. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2021, 49(12): 2086-2095. 刘福鑫, 杜世龙, 李琳, 刘倩, 丁兰, 刘秀辉. *分析化学*, 2021, 49(12): 2086-2095.
- [7] CUI Min, WEN Xiao-Fang, REN Ju-Jie, ZHANG Cong, LI Na, HAN Yuan-Yuan, YU Xu-Dong, JI Xue-Ping. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2020, 48(2): 224-232. 崔敏, 温晓芳, 任聚杰, 张聪, 李娜, 韩元元, 余旭东, 籍雪平. *分析化学*, 2020, 48(2): 224-232.
- [8] ZHU P, LI S, ZHOU S, REN N, GE S, ZHANG Y, WANG Y, YU J. *Chem. Eng. J.*, 2021, 420: 127559.
- [9] XU H, LIAO C, LIU Y, YE B C, LIU B. *Anal. Chem.*, 2018, 90(7): 4438-4444.
- [10] HUANG G, LI F, ZHAO X, MA Y, LI Y, LIN M, JIN G, LU T J, GENIN G M, XU F. *Chem. Rev.*, 2017, 117(20): 12764-12850.
- [11] QIN Y, HU X B, FAN W T, YAN J, CHENG S B, LIU Y L, HUANG W H. *Adv. Sci.*, 2021, 8(13): 2003738.

- [12] HU F X, XIE X L, WANG D P, YANG H B, GU Y, CHEN B, ZHANG C M, RAO Q H, LI Q F, GUO C X. *Sens. Actuators, B*, 2021, 334: 129594.
- [13] CHAUDHURI O, COOPER-WHITE J, JANMEY P A, MOONEY D J, SHENOY V B. *Nature*, 2020, 584(7822): 535-546.
- [14] SMITHMYER M E, DENG C C, CASSEL S E, LEVALLEY P J, SUMERLIN B S, KLOXIN A M. *ACS Macro Lett.*, 2018, 7(9): 1105-1110.
- [15] RICHARDSON B M, WALKER C J, MACDOUGALL L J, HOYE J W, RANDOLPH M A, BRYANT S J, ANSETH K S. *Biomater. Sci.*, 2020, 8(14): 3804-3811.
- [16] WEI Z, GERECHT S. *Biomaterials*, 2018, 185: 86-96.
- [17] RIZWAN M, BAKER A E G, SHOICHET M S. *Adv. Healthcare Mater.*, 2021, 10(12): 2100234.
- [18] CHEN J, LI S, ZHANG Y, WANG W, ZHANG X, ZHAO Y, WANG Y, BI H. *Adv. Healthcare Mater.*, 2017, 6(21): 1700746.
- [19] LIU Y L, QIN Y, JIN Z H, HU X B, CHEN M M, LIU R, AMATORE C, HUANG W H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, 56(32): 9454-9458.
- [20] WANG L, ZHOU W, WANG Q, XU C, TANG Q, YANG H. *Molecules*, 2018, 23(3): 546.
- [21] LIANG Z, ZHANG J, WU C, HU X, LU Y, WANG G, YU F, ZHANG X, WANG Y. *Biosens. Bioelectron.*, 2020, 155: 112105.
- [22] WANG H, FAN Z, CAO T, WU S, CHEN S, TAN D, ZHANG X, TONG Z. *J. Alloys Compd.*, 2021, 887: 161462.
- [23] HALMA M, CASTRO K A D F, PRÉVOT V, FORANO C, WYPYCH F, NAKAGAKI S. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 2009, 310(1-2): 42-50.
- [24] MOURZINA Y G, OFFENHÄUSSER A. *J. Electroanal. Chem.*, 2020, 866: 114159.
- [25] ZHANG H W, HU X B, QIN Y, JIN Z H, ZHANG X W, LIU Y L, HUANG W H. *Anal. Chem.*, 2019, 91(7): 4838-4844.
- [26] HU X B, QIN Y, FAN W T, LIU Y L, HUANG W H. *Anal. Chem.*, 2021, 93(22): 7917-7924.

Electrochemical Sensor Based on Dynamic Covalently Cross-linked Hydrogel for Monitoring Nitric Oxide Released by Three-Dimensional Cultured Cells

BAI Yang, LIU Xue-Jiao, XIONG Han-Zhi, ZHOU Yun-Fan, CHEN Xu*, YANG Wen-Sheng
(State Key Laboratory of Chemical Resource Engineering, Beijing University of
Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract Oxidized sodium alginate (OSA) and hydrazide polyethylene glycol (PEG-DH) formed dynamic acylhydrazone bond through condensation reaction, and a dynamic OSA/PEG-DH hydrogel network with reversible fracture and reconstruction was prepared to simulate the dynamic three-dimensional (3D) microenvironment of cells in this work. Mn(III) meso-tetra(N-methyl-4-pyridyl) porphyrin (MnTMPyP) through the electrostatic interaction with OSA achieved stable recombination in OSA/PEG-DH hydrogel, which could be used for detection of NO. The characteristics of OSA/MnTMPyP/PEG-DH composite hydrogel and the analytical performance of the OSA/MnTMPyP/PEG-DH composite hydrogel modified electrode for NO detection were studied by UV-vis absorption spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), rheological test, cyclic voltammetry (CV) and timing current method (*i-t*). The sensor had a sensitivity of $1.03 \mu\text{A}\cdot\text{L}/(\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^2)$ for detection of NO, with a detection limit of 17 nmol/L ($S/N = 3$), showing good selectivity. OSA/MnTMPyP/PEG-DH composite hydrogel was used for 3D culture of triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells by virtue of its 3D porous structure and good biocompatibility. The sensor was successfully applied to monitor NO released by 3D cultured negative breast cancer MDA-MB-231 cells.

Keywords Dynamic covalently cross-linked hydrogel; Nitric oxide; Electrochemical detection; Three-dimensional cell culture

(Received 2023-05-10; accepted 2023-06-23)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 201874005).