



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

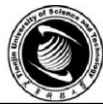
《天津科技大学学报》网络首发论文

题目：用于多能干细胞培养的海藻酸钠水凝胶的性能研究
作者：杨春雪，李紫杉，高志贤，刘继锋
DOI：10.13364/j.issn.1672-6510.20250071
收稿日期：2025-04-07
网络首发日期：2025-07-28
引用格式：杨春雪，李紫杉，高志贤，刘继锋. 用于多能干细胞培养的海藻酸钠水凝胶的性能研究[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250071>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250071

用于多能干细胞培养的海藻酸钠水凝胶的性能研究

杨春雪^{1,2}, 李紫杉^{1,2}, 高志贤², 刘继锋¹

(1. 天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457;
2. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050)

摘要: 针对传统平面培养体系中诱导多能干细胞存在的细胞结构完整性不足和组织界面缺失等问题, 本研究建立了一种基于海藻酸钠水凝胶的诱导多能干细胞三维共培养体系。通过钙离子介导的离子交联法制备海藻酸钠水凝胶, 采用扫描电子显微镜对其微观形貌进行观察。通过细胞染色、免疫荧光标记及实时荧光定量聚合酶链式反应等实验对细胞活性、多能性维持及分化潜能进行系统评估。形态学分析显示该培养条件下的细胞均保持典型的多能干细胞克隆形态。实验结果表明, 海藻酸钠水凝胶作为理想的 3D 细胞培养支架材料, 能够有效维持诱导干细胞的高效增殖能力, 并保持多能性相关基因的稳定表达, 显示出优良的细胞培养性能。

关键词: 海藻酸钠水凝胶; 多能诱导干细胞; 细胞分化

中图分类号: Q813.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

Properties of Sodium Alginate Hydrogels for Pluripotent Stem Cell Culture

YANG Chunxue^{1,2}, LI Zishan^{1,2}, GAO Zhixian², LIU Jifeng^{1#}

(1. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Institute of Environmental Medicine and Operational Medicine, Academy of Military Sciences, Tianjin 300050, China)

Abstract: To address the issues of compromised cellular structural integrity and lack of tissue interfaces in conventional monolayer culture of induced pluripotent stem cells, this study established a novel three-dimensional co-culture system based on sodium alginate hydrogel, with traditional Matrigel-based monolayer culture serving as control. The alginate hydrogel was fabricated through calcium ion-mediated ionic crosslinking, and its microstructure was characterized using scanning electron microscopy. Cell viability, pluripotency maintenance and differentiation potential were systematically evaluated in both culture systems through live/dead staining, immunofluorescence labeling and quantitative real-time polymerase chain reaction assays. Morphological analysis revealed that cells maintained typical pluripotent stem cell colony morphology under both culture conditions. Experimental data indicate that sodium alginate hydrogel, serving as an ideal 3D cell culture scaffold material, effectively sustains the highly efficient proliferative capacity of induced stem cells while maintaining stable expression of pluripotency-associated genes, demonstrating excellent cell culture performance.

Key words: sodium alginate; induced pluripotent stem cells; stem cell differentiation

近几十年来, 胚胎干细胞 (ESCs) 凭借其体外无限增殖和多向分化潜能等特性, 已成为干细胞研究的重要模型^[1]。由于其涉及人类胚胎使用的伦理争议持续发酵, 相关研究受到严格限制。在此背景下, 诱导

多能干细胞 (iPSCs) 因其突破性的重编程技术而成为新的研究热点。iPSCs 不仅具有与 ESCs 相似的长期自我更新能力, 还能分化为源自外胚层、中胚层和内胚层三大胚层的所有细胞类型^[2], 通过转录因子重

收稿日期: 2025-04-07; 修回日期: 2025-05-19

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1202900)

作者简介: 杨春雪(2000—), 女, 河北沧州人, 硕士研究生; 通信作者: 刘继锋, 教授, jfliu@tust.edu.cn

编程技术将体细胞逆转为诱导多能干细胞^[3]。iPSCs 不仅完全保留长期自我更新能力,更具备独特的临床应用优势^[4-5]:可进行自体移植,彻底规避免疫排斥反应;完全规避胚胎使用相关的伦理争议;可作为疾病建模的理想平台,建立患者特异性疾病模型;表现出接近受精卵的全能性;具有显著的体外增殖优势。

水凝胶作为一种仿生高分子材料,在组织工程领域展现出独特的应用价值。一方面,该材料优异的生物相容性与微环境模拟能力,为细胞提供了理想的生长条件,显著支持细胞的黏附、增殖、迁移及定向分化等生物学行为^[6]。另一方面,以水为分散介质的亲水性交联网络,使其兼具良好的溶胀性能和机械柔顺性(弹性模量 0.1~100 kPa),可动态维持结构稳定性^[7]。随着智能生物材料的发展,刺激响应型水凝胶(对温度/pH/光等外界刺激产生可逆响应)、自愈合可注射水凝胶(具有动态共价键/超分子作用)以及神经传导性水凝胶(整合导电聚合物/生物电活性成分)等功能化水凝胶不断涌现。新型功能化水凝胶为再生医学提供了创新解决方案。Ma 等^[8]制备具有空间可调机械特性的水凝胶材料,并将其用于指导干细胞生长。Tsou 等^[9]论述了生物医学领域常用的不同类型的水凝胶,并进一步探究了水凝胶如何与干细胞相互作用。Madl 等^[10]总结了微环境参数对维持干细胞特性和控制各种干细胞类型分化的影响。最新研究将 iPSCs 与水凝胶相结合,构建三维培养系统,水凝胶不仅可以模拟体内微环境、促进干细胞功能维持,还为组织工程提供优化平台。这种组合系统能显著提升干细胞的增殖效率和分化均一性。因此,水凝胶可以实现满足干细胞工业化扩增需求,此外还可以用作模拟器官发育微环境的仿生复杂系统。

海藻酸钠水凝胶在 iPSCs 培养中展现出区别于其他合成或天然水凝胶的显著优势。乙二胺四乙酸(EDTA)螯合可逆解交联,实现无损细胞回收,显著优于不可逆交联的明胶。海藻酸钠水凝胶可以调节孔径,其中大孔(50~200 μm)促进细胞团簇形成,微孔(5~50 μm)优化营养/代谢物扩散,以上作用优于均质单一孔径结构的聚乙二醇水凝胶。另外该凝胶成分明确,不含动物源成分符合临床级所需培养要求,优于基底胶 Matrigel 的未知成分风险。重要的是,此种凝胶具有灭菌稳定性,灭菌后力学性能损失小。

因此,本研究采用离子交联法制备海藻酸钠水凝胶,并对水凝胶的理化性能进行系统表征。基于海藻酸钠水凝胶构建 iPSCs 三维共培养体系,重点探究海

藻酸钠水凝胶的三维微环境对 iPSCs 干性维持的影响机制,通过对干细胞的细胞活性、多能性维持及分化潜能方面的测定,评估海藻酸钠水凝胶是否能够用于 iPSCs 三维共培养体系的构建。

1 材料与方法

1.1 材料

iPSCs 购自中国科学院动物研究所国家干细胞资源库。

磷酸盐缓冲溶液(1×PBS)、4%多聚甲醛、吐温-20、4%组织细胞固定液、Triton X-100、结晶紫,北京索莱宝科技有限公司;碱性磷酸酶染色试剂盒、碱性磷酸酶定量试剂盒、支原体检测试剂盒、DAPI 染色液、Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒、细胞裂解液,碧云天生物技术有限公司;ReLeSRTM、Matrigel、Y27632、mTeSR Plus,天津奥博森生物科技公司;牛血清白蛋白、胎牛血清,赛默飞世尔科技公司;海藻酸钠、氯化钙,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;驴血清,武汉赛维尔生物科技有限公司;OCT3/4 一抗、SOX2 一抗、NANOG 一抗、MYC 一抗、SSEA4 一抗、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗,艾博抗(上海)贸易有限公司;RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR Green QPCR SuperMix,北京全式金生物技术有限公司。

HCP-168 型二氧化碳细胞培养箱,青岛海尔股份有限公司;TD-5M 型低速台式离心机,四川蜀科仪器有限公司;DZKW 型水浴锅,上海科恒实业发展有限公司;CC001S 型细胞计数器,西安中团生物科技有限公司;Quattro 型场发射扫描电子显微镜,赛默飞世尔科技有限公司;LGJ-12A 型冷冻干燥机,北京四环起航科技有限公司;Kinexus Lab+型旋转流变仪,德国耐驰仪器有限公司;Ts2-FL 型倒置相差显微镜,尼康映像仪器销售(中国)有限公司。

1.2 海藻酸钠水凝胶的制备

离子交联法制备 3 种不同硬度的水凝胶^[11]。分别制备 2%、1%、0.5%前体溶液,经 0.22 μm 微孔滤膜除菌后备用。取 50 μL 上述海藻酸钠溶液,滴入 1%氯化钙溶液,使其发生溶胶-凝胶转变。完成后加入 PBS 洗涤 2 次,每次 5 min。将 3 种水凝胶分别命名为 2% AH、1% AH、0.5% AH。

1.3 海藻酸钠水凝胶表征

1.3.1 扫描电子显微镜表征

采用扫描电子显微镜 (SEM) 对海藻酸钠水凝胶的微观形貌进行系统表征^[12], 将合成的水凝胶样品处理后置于冷冻干燥机中, 在 0.1 mbar 真空度下持续干燥 6 h。使用 ACE200 型低真空溅射镀膜机在 15 mA 工作电流下对样品表面金膜溅射。在 5 kV 加速电压、适宜工作距离条件下采集二次电子信号图像。通过 ImageJ 软件对至少 5 个不同视野的 SEM 图像进行孔径统计分析。

1.3.2 流变学测定

采用旋转流变仪对海藻酸钠水凝胶体系进行系统的动态流变学表征^[13]。将直径为 30 mm 不同浓度的海藻酸钠水凝胶球样品转移到模具中, 以未交联的海藻酸钠溶液作为阴性对照。在 (25±0.1) °C 恒温条件下, 采用平板-平板测量系统进行测试; 施加 0.1%~100% 应变振幅扫描, 固定角频率 1 Hz, 记录应力松弛曲线, 时间扫描模式持续 250 s, 采样间隔 10 s, 将瞬时应力值归一化为初始应力, 采用非线性回归拟合应力松弛曲线, 依据 Maxwell 模型计算特征松弛时间 ($\tau/2$, 即应力衰减至初始值 50% 所需时间)。

1.3.3 吸水率测定

将海藻酸钠水凝胶样品置于真空干燥箱中干燥 24 h 后, 记录初始质量记为 m_0 。将样品置于去离子水中, 在不同时间点测定水凝胶的质量记为 m_t 。根据式 (1) 计算吸水率 (R_{WA})。

$$R_{WA} = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.4 溶胀率测定

取干燥完成的海藻酸钠水凝胶 (m_0), 在 37 °C 浸泡在磷酸盐缓冲溶液中, 在特定时间点, 将样品从溶剂中取出, 干燥并称量 (m_s)^[11]。根据式 (2) 计算溶胀率 (R_{SR})。

$$R_{SR} = \frac{m_s - m_0}{m_0} \times 100\% \quad (2)$$

1.4 海藻酸钠水凝胶的生物相容性

采用标准化方法进行 iPSCs 的扩增培养^[14]。在 mTeSR plus 培养基中添加 50 U/mL 青霉素和 50 µg/mL 链霉素, 配制成完全培养基。将基质胶包被的培养板在 37 °C、5% CO₂ 条件下稳定 2 h。选择状态良好的细胞接种到基质胶包被培养板上培养, 培养条件为 37 °C、5% CO₂。当细胞融合度达 70%~80% 时, 采用 Accutase 酶消化法收集细胞, 300g 离心 5 min 后计数, 按实验需求与水凝胶材料构建三维共培养体

系。

1.4.1 细胞存活测定

采用 Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒测定细胞活力。将对数生长期的细胞接种到水凝胶中, 观察细胞在水凝胶中的细胞形态是否正常。培养至第 5 天, 将水凝胶中的细胞释放并收集, 用 PBS 洗涤, 去除多余的裂解液。洗涤完成后, 用试剂盒对细胞进行染色, 在激光共聚焦显微镜成像。所有图像在 ImageJ 1.8.0 中进行调整、处理和分析。

1.4.2 细胞增殖能力测定

采用细胞计数法对海藻酸钠水凝胶包封细胞连续培养过程中的细胞增殖能力进行测定。实验组选用海藻酸钠水凝胶培养, 对照组则选择用基质胶培养, 在细胞培养后每天收集细胞并计数。

1.4.3 碱性磷酸酶染色

选取细胞状态良好的细胞, 离心收集后染色。收集的细胞用磷酸盐缓冲溶液多次洗涤。加入细胞组织固定液固定细胞, 固定时间 2 min, 用磷酸盐缓冲溶液多次洗涤去除细胞固定液; 将 3 mL 碱性磷酸酶显色缓冲液、10 µL BCIP 溶液和 20 µL NBT 溶液混合配制成染色反应液, 滴入染色反应液, 确保染液能充分覆盖细胞, 室温避光孵育 30 min。反应完成后弃掉反应液并加入磷酸盐缓冲溶液漂洗, 处理完成后置于显微镜下观察拍照。

1.5 海藻酸钠水凝胶中细胞的全能性测定

1.5.1 酶含量

用 2.5 mL 检测缓冲液溶解显色底物冻干粉配制显色溶液。用检测缓冲液将 10 µL p-Nitrophenol 溶液稀释至 200 µL 配成标准品工作液。将实验组和对照组细胞充分裂解后, 离心取上清液用于碱性磷酸酶的检测。分别加入 4、8、16、24、32、40 µL 标准品工作液, 混匀后在 37 °C 培养箱中孵育 5 min, 反应完成后每孔加入 100 µL 反应终止液终止反应, 使用酶标仪测定样品在 405 nm 处的吸光度。

1.5.2 免疫荧光染色

通过免疫荧光染色分析细胞的全能性^[15]。将实验组细胞接种到水凝胶中, 对照组细胞接种到基质胶包被培养板上培养, 37 °C、5% CO₂ 培养并且每天更换培养基, 细胞表型和形态用荧光显微镜分析。对细胞生长状态良好的细胞进行消化收集并固定, 之后加入 Triton X-100 通透 15 min。处理完成后加入封闭液封闭非特异性结合位点。处理好的细胞加入 100 µL 一

抗, 4 °C 孵育过夜。次日, 回收一抗后加入二抗孵育, 反应完成后回收二抗并清洗细胞, 全程避光操作。用 DAPI 染色液标记细胞核后滴加封片剂。使用激光共聚焦显微镜采集图像, 调整合适的激发/发射波长。

1.5.3 定量聚合酶链反应(qPCR)

采用 qPCR 分析 iPSCs 相关基因的表达情况^[16]。

使用 RNA 提取试剂提取细胞 RNA 并测定含量。使用 TransGen Biotech 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。用 SYBRGreen qPCR SuperMix 试剂盒对目的基因表达水平定量检测。以 GAPDH 为内参基因, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对目的基因进行表达量标准化处理及相对定量分析。用于 qPCR 分析的引物序列见表 1。

表 1 qPCR 分析引物序列

Tab. 1 Primer sequences for qPCR analysis

基因名称	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACCTTCTCATGG
SOX2	GCCGAGTGGAACTTTTGTCTG	GGCAGCGTGTACTTATCCTTCT
NANOG	TTTGTGGGCTGAAGAAAACCT	AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG
OCT3/4	CTGGGTTGATCCTCGGACCT	CCATCGGAGTTGCTCTCCA
SSEA4	GATCTGCGCGTGTGGACTA	GAGGGCGACTCGAAGTTCAT

1.6 数据处理

采用 Prism 软件处理实验数据, 采用“平均值±标准差”表示, *和**表示组间有显著性差异 ($P<0.05$ 和 $P<0.01$), ns 表示组间无显著性差异 ($P>0.05$)。

2 结果与分析

2.1 水凝胶微观形貌

不同质量分数海藻酸钠水凝胶扫描电子显微镜图如图 1 所示。2% AH 组呈现致密的三维网状结构,

孔壁厚度显著; 1% AH 组形成较为疏松的网状结构, 平均孔径增大; 0.5% AH 组结构完整性较差, 出现明显的结构塌陷和孔壁断裂。

随着海藻酸钠质量分数从 2% 降至 0.5%, 水凝胶的孔径显著增大, 结构稳定性下降。2% AH 和 1% AH 组可以保持完整的多孔结构, 适合细胞生长和物质交换。0.5% AH 组因结构破损严重, 无法提供稳定的三维培养微环境, 故不采用该质量分数进行细胞培养。

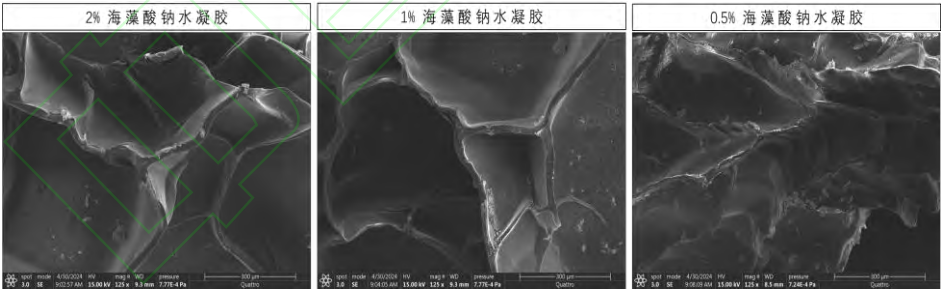
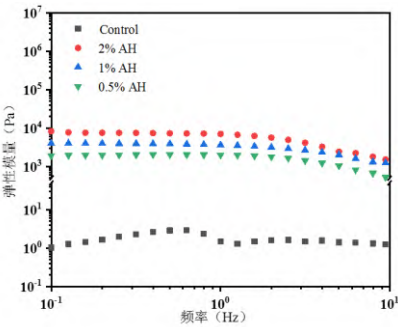


图 1 不同质量分数海藻酸钠水凝胶扫描电子显微镜图

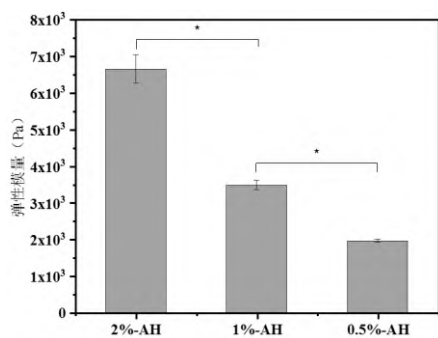
Fig. 1 Scanning electron microscopy of sodium alginate hydrogels with different mass fractions

2.2 水凝胶流变性能分析

不同结构形态的水凝胶具有不同的储能模量^[17]。海藻酸钠水凝胶流变学分析结果如图 2 所示。



(a) 25 °C 条件下海藻酸钠水凝胶储能模量



(b) 1 Hz 处的水凝胶储能模

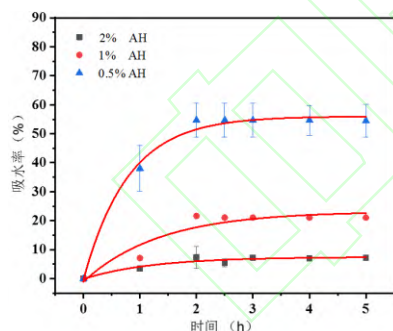
图 2 海藻酸钠水凝胶流变学分析

Fig. 2 Rheological analysis of sodium alginate hydrogel

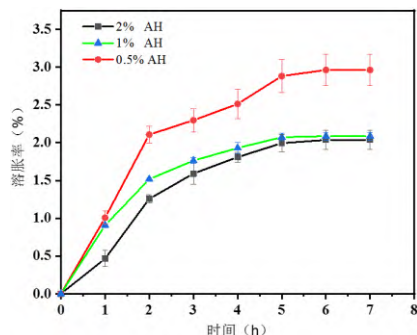
3 种质量分数的海藻酸钠水凝胶的弹性模量均高于未交联溶液, 证实离子交联有效形成了具有弹性的三维网络结构。在 1 Hz 测试频率下观察到 2% AH 组 $G' = (1745.67 \pm 187.15)$ Pa, 1% AH 组 $G' = (806.50 \pm 34.76)$ Pa, 0.5% AH 组 $G' = (389.83 \pm 12.89)$ Pa, 呈现显著的质量分数-模量正相关性。弹性模量差异反映交联密度差异, 水凝胶机械强度排序为 2% AH > 1% AH > 0.5% AH, 该趋势与 SEM 观察的结构完整性高度一致。

2.3 水凝胶物理性能

海藻酸钠水凝胶的性能表征结果如图 3 所示 ($n=3$)。



(a) 水凝胶的吸水率



(b) 水凝胶的溶胀率

图 3 海藻酸钠水凝胶的性能表征

Fig. 3 Measurement of sodium alginate hydrogel properties

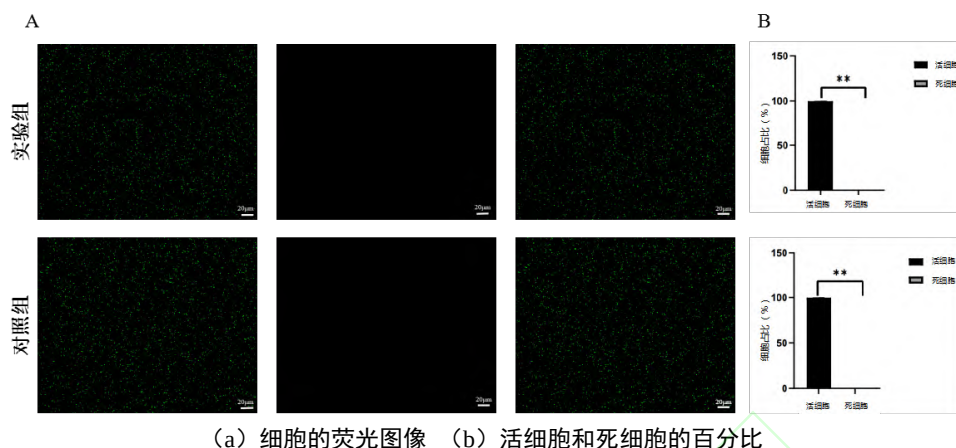
海藻酸钠水凝胶的吸水率呈现显著质量分数依赖性, 吸水率表现为 2% AH < 1% AH < 0.5% AH。低质量分数海藻酸钠水凝胶 (0.5% AH) 具有更大的平均孔径和更高孔隙率, 为其提供了更强的溶胀能力。高质量分数海藻酸钠水凝胶 (2% AH) 的交联密度较 0.5% AH 提高, 显著延缓结构降解。0.5% AH 组虽然展现优异的吸水性能, 但 72 h 内结构完整性丧失。2% AH 组与 1% AH 组在 7 d 培养周期内保持稳定的三维结构, 因此更适合长期细胞培养。

2.4 海藻酸钠水凝胶在干细胞培养中的应用

海藻酸钠水凝胶可以模拟组织的结构特性, 使其成为探索细胞附着和生长的平台。调整细胞基质的物质力学是细胞培养的重要组成部分^[18]。传统的平面培养所表现出的弹性模量不在生理范围内, 可能导致细胞表现出异常特性, 如扁平形态、异常极化等, 因此研究立体培养细胞^[19]。目前应用最广泛的细胞体外仿生培养机制为基质胶, 但成分复杂, 操作过程繁琐以及价格昂贵等限制了细胞生物的规模性发展。海藻酸钠水凝胶可以针对性的改善以上问题。这种仿生基质可以改变浓度、重新配置结构、交联和互穿, 以适应不同类型的细胞增殖。因此, 将制备的海藻酸钠水凝胶应用于细胞培养, 通过细胞活性、碱性磷酸酶测定、免疫荧光染色、qPCR 等分析海藻酸钠水凝胶能否用于细胞培养。

2.4.1 细胞活性

根据上述不同浓度的海藻酸钠水凝胶的基本性能进行选择, 在后续实验中选择 1% 海藻酸钠水凝胶 (1% AH, 后续记为 AH 水凝胶) 用于培养细胞的培养。采用 AH 水凝胶对细胞进行培养即为实验组, 对照组采用基质胶对细胞进行培养。海藻酸钠水凝胶中细胞的活力如图 4 所示, 其中活细胞呈现绿色, 死细胞呈现红色。



(a) 细胞的荧光图像 (b) 活细胞和死细胞的百分比

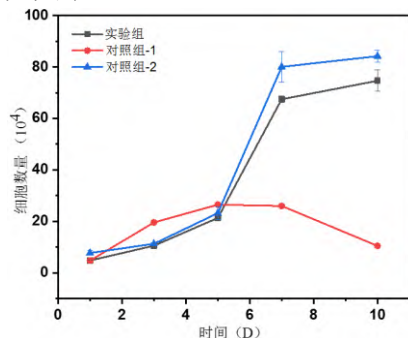
图 4 海藻酸钠水凝胶中细胞的活力

Fig. 4 Viability of cell in sodium alginate hydrogel

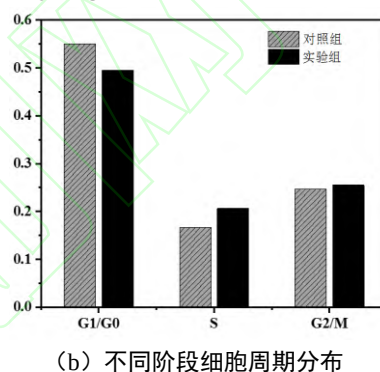
基质胶中的活细胞率为 99.72%，死细胞率为 0.24%。海藻酸钠水凝胶中的活细胞率为 99.79%，死细胞率为 0.21%，结果显示海藻酸钠水凝胶可以维持细胞的生长增殖。在培养过程中仍然会有死亡的细胞存在，这和细胞团的形成以及营养物质、氧浓度分布不均有很大关系^[20]。

2.4.2 细胞增殖

干细胞增殖效应是指干细胞的自我复制或分裂能力，以形成更多的干细胞^[21]。细胞生长与细胞周期分布如图 5 所示 ($n=6$)。各组细胞均呈现典型的对数期增长特征，证实该时段为理想的增殖培养周期。3D-Matrigel (对照组-2) 和海藻酸钠水凝胶 (实验组) 较传统平面培养 (对照组-1) 展现出更显著的增殖优势。细胞内的 DNA 含量会随细胞周期进程而发生周期性变化，通过流式细胞术可以测定出细胞内的相对 DNA 含量，从而分析出细胞周期各个阶段的比例。与对照组相比，实验组细胞的细胞周期各时相没有明显变异。另外，实验组细胞比对照组细胞具有更长的 S 期，这与细胞进行快速的有丝分裂以及较强的增殖潜能有很大关系。



(a) 细胞生长曲线



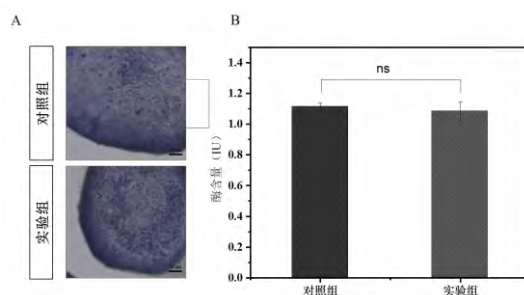
(b) 不同阶段细胞周期分布

图 5 细胞生长与细胞周期分布

Fig. 5 Cell growth and cell cycle distribution

2.4.3 碱性磷酸酶

采用碱性磷酸酶染色法检测海藻酸钠水凝胶培养 (实验组) 与基质胶培养 (对照组) 的细胞分化情况，结果如图 6 所示。两组细胞的碱性磷酸酶表达水平无明显差异；定量分析表明，两种培养条件下的细胞均未发生分化，且表达水平相当。



(a) 碱性磷酸酶定性分析 (b) 碱性磷酸酶定量

图 6 碱性磷酸酶测定结果

Fig. 6 Alkaline phosphatase assay

2.4.4 免疫荧光染色

免疫荧光染色实验^[22]检测了两种培养条件下细

胞的蛋白表达情况。对细胞进行 OCT3/4 (红色)、SOX2 (绿色)、MYC (绿色) 以及 NANOG (绿色) 免疫染色, 细胞核用 DAPI (蓝色) 染色, 结果如图 7 所示。SOX2、OCT3/4、MYC 和 NANOG 蛋白均在细胞核中特异性表达, 其中目标蛋白分别呈现红色或绿色荧光 (荧光素标记), 细胞核由 DAPI 染成蓝色。实验组 (海藻酸钠水凝胶) 与 Matrigel 对照组相比, 蛋白表达水平无明显差异。这表明海藻酸钠水凝胶能够为干细胞培养提供与 Matrigel 相当的微环境, 具备作为替代培养基质的潜力。

2.4.5 qPCR 结果

采用 qPCR 方法^[23]评估海藻酸钠水凝胶体系中诱导干细胞维持干性的相关基因表达。海藻酸水凝胶中细胞干性标记物的表达与基质中细胞干性标记物的表达如图 8 所示 ($n=3$)。全能性基因的表达分析显示, 与 Matrigel 对照组相比, 海藻酸钠水凝胶培养

组的 SOX2、OCT3/4、NANOG 和 SSEA4 的相对表达量均无显著差异 ($P>0.05$)。

SOX2 作为经典 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键调控因子, 通过构建多层次转录调控网络, 在干细胞生物学中执行核心功能, 包括维持多能性稳态与自我更新能力, 抑制分化程序以保留未分化表型, 调控细胞极性建立不对称分裂模式, 整合微环境信号决定谱系定向分化路径。OCT3/4 是维持 iPSCs 未分化状态的关键因子, NANOG 具有抑制分化基因和促进多能性基因表达的双重功能, 而 SSEA4 则参与细胞黏附和干细胞多能性维持。这些结果表明, 水凝胶培养体系能有效维持细胞的干性特征, 其多能性基因表达与 Matrigel 组相当。因此, 该海藻酸钠水凝胶材料可作为理想的细胞培养基质, 在保持细胞分化潜能方面表现出良好的性能。

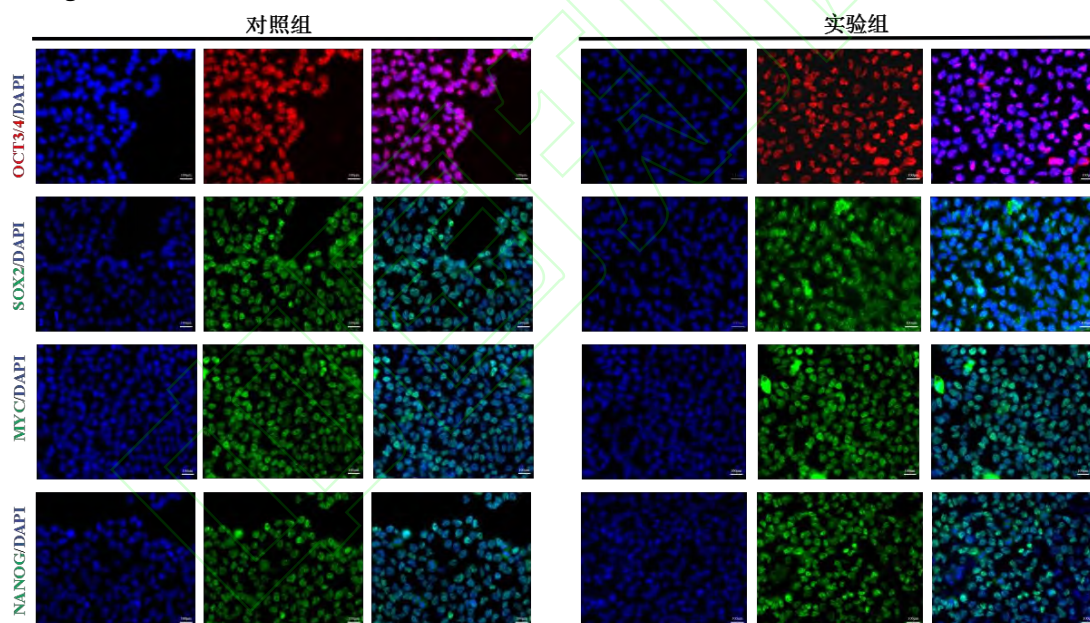


图 7 免疫荧光染色结果

Fig. 7 Immunofluorescence staining

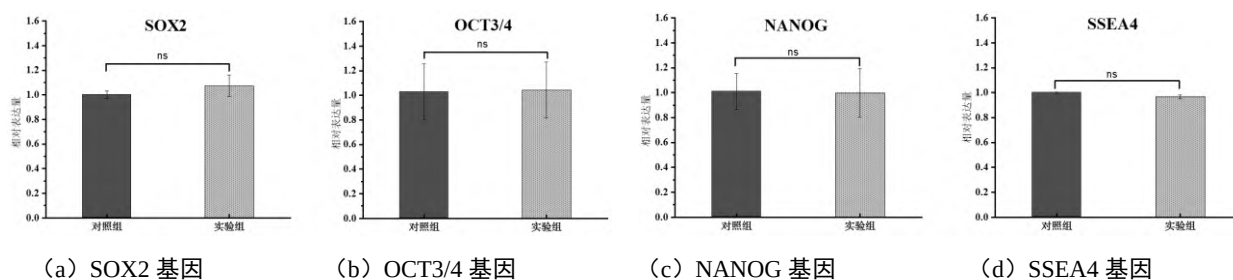


图 8 海藻酸水凝胶中细胞干性标记物的表达与基质中细胞干性标记物的表达

Fig. 8 Expression of cell stemness markers in sodium alginate hydrogel versus stromal cell stemness markers

3 讨 论

诱导干细胞技术的出现很好地解决了因人类组织与动物模型之间的差异而阻碍对人类各种病理机制充分理解的问题。作为一类由体细胞基因编程^[24]的新的干细胞可以多向分化。调整培养条件可以使诱导干细胞向心肌^[25]、神经^[22]、软骨^[26]等方向进行分化。以 iPSCs 衍生的心肌细胞为例,该模型被广泛应用于研究人类心肌组织的生理特性。由于 iPSCs 在体外培养中能够维持稳定的表型特征,使其成为组织工程领域重要的种子细胞来源^[27]。在培养过程中,维持细胞的多能性状态至关重要。培养完成后,需通过流式细胞术检测多能性标志物(如 OCT4、SOX2、NANOG 等),并结合免疫荧光染色评估其向心肌细胞分化的潜能。

生物材料在细胞培养的效率和成就中发挥着重要作用,它们可以作为支持细胞生长和分化的支架^[28]。本研究选用海藻酸钠制备仿生基质,通过 SEM 观察发现,所制备的水凝胶具有均匀的多孔结构。这种多孔特性为细胞提供了良好的微环境,有利于营养物质的传输和细胞间相互作用,从而促进细胞增殖与聚集。基于理化性质分析,选择 1%海藻酸钠水凝胶进行后续生物相容性实验。结果表明,该水凝胶对包裹的细胞无毒性作用,并能有效维持细胞增殖过程中的多能性。

与传统体外模型相比,海藻酸钠水凝胶包裹细胞的培养体系具有显著优势:其稳定的三维结构可支持长达数周的实验观察,而常规药物筛选实验通常仅能维持 72 h。这一特性使其在长期药效评估和毒性测试中具有重要应用价值。此外,该水凝胶体系完全由生物材料构建,不仅能促进细胞增殖,还能促进细胞-基质相互作用原位产生拟胚体,为类器官培养提供理想平台。

仿生材料的选择需与目标细胞类型匹配,以实现最佳的生物相容性和功能表现^[29]。就本实验选取的海藻酸钠水凝胶而言,该材料与诱导干细胞的结合可以生成多种器官类型。尽管目前海藻酸钠水凝胶在类器官培养中的应用仍处于发展阶段^[30],但是本研究证实,海藻酸钠水凝胶与诱导多能干细胞的结合具有良好的适用性,可用于多种类器官的构建。

参考文献:

- [1] TILMAN U E, ANNALISE A, KATRIN A M, et al. Direct 3D-bioprinting of hiPSC-derived cardiomyocytes to generate functional cardiac tissues[J]. *Advanced materials*, 2023, 35(52): e2305911.
- [2] YIN S, CAO Y. Hydrogels for large-scale expansion of stem cells[J]. *Acta biomaterialia*, 2021, 128:1-20.
- [3] SHI Y, DESPONTIS C, DO J T, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds[J]. *Cell stem cell*, 2008, 3(5): 568-574.
- [4] STEPHANIE F-W, SAVANNAH F, MAXIMILIAN B, et al. Generation of complex bone marrow organoids from human induced pluripotent stem cells[J]. *Nature methods*, 2024, 21(5): 868-881.
- [5] LOMOIO S, TESCO G. A 3D bioengineered neural tissue model generated from human iPSC-derived neural precursor cells[M]//*Stem Cell-Based Neural Model Systems for Brain Disorders*. New York, NY: Springer US, 2023: 185-192.
- [6] MA Y, WANG X, SU T, et al. Recent advances in macroporous hydrogels for cell behavior and tissue engineering[J]. *Gels*, 2022, 8(10): 606.
- [7] SHARMA G, THAKUR B, NAUSHAD M, et al. Applications of nanocomposite hydrogels for biomedical engineering and environmental protection[J]. *Environmental chemistry letters*, 2018, 16: 113-146.
- [8] MA Y, LIN M, HUANG G, et al. 3D spatiotemporal mechanical microenvironment: a hydrogel-based platform for guiding stem cell fate[J]. *Advanced materials*, 2018, 30(49): 1705911.
- [9] TSOU Y H, KHONEISSER J, HUANG P C, et al. Hydrogel as a bioactive material to regulate stem cell fate[J]. *Bioactive materials*, 2016, 1(1): 39-55.
- [10] MADL C M, HEILSHORN S C. Engineering hydrogel microenvironments to recapitulate the stem cell niche[J]. *Annual review of biomedical engineering*, 2018, 20(1): 21-47.
- [11] CHOOI W H, NG C Y, OW V, et al. Defined alginate hydrogels support spinal cord organoid derivation, maturation, and modeling of spinal cord diseases[J]. *Advanced healthcare materials*, 2023, 12(9): 2202342.
- [12] JIAO W, LI X, SHAN J, et al. Study of several alginate-based hydrogels for in vitro 3D cell cultures[J]. *Gels*, 2022, 8(3): 147.

- [13] MOXON S R, CORBETT N J, FISHER K, et al. Blended alginate/collagen hydrogels promote neurogenesis and neuronal maturation[J]. *Materials science and engineering: C*, 2019, 104: 109904.
- [14] ALSOBAIE S, ALSOBAIE T, ALSHAMMARY A F, et al. Alginate beads as a promising tool for successful production of viable and pluripotent human-induced pluripotent stem cells in a 3D culture system[J]. *Stem cells and cloning: advances and applications*, 2023: 61-73.
- [15] VANDERSLICE E J, GOLDING S G H, JACOT J G. Vascularization of PEGylated fibrin hydrogels increases the proliferation of human iPSC-cardiomyocytes[J]. *Journal of biomedical materials research part A*, 2024, 112(4): 625-634.
- [16] TSAI Y H, CZERWINSKI M, WU A, et al. A method for cryogenic preservation of human biopsy specimens and subsequent organoid culture[J]. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 2018, 6(2): 218-222.
- [17] YAVITT F M, BROWN T E, HUSHKA E A, et al. The effect of thiol structure on allyl sulfide photodegradable hydrogels and their application as a degradable scaffold for organoid passaging[J]. *Advanced materials*, 2020, 32(30): 1905366.
- [18] LIU F, CHEN Q, LIU C, et al. Natural polymers for organ 3D bioprinting[J]. *Polymers*, 2018, 10(11): 1278.
- [19] HUH D, HAMILTON G A, INGBER D E. From 3D cell culture to organs-on-chips[J]. *Trends in cell biology*, 2011, 21(12): 745-754.
- [20] DOS SANTOS K S, OLIVEIRA L T, DE LIMA FONTES M, et al. Alginate-based 3D A549 cell culture model to study *Paracoccidioides* infection[J]. *Journal of fungi*, 2023, 9(6): 634-650.
- [21] DOGAN L, SCHEURING R, WAGNER N, et al. Human iPSC-derived mesodermal progenitor cells preserve their vasculogenesis potential after extrusion and form hierarchically organized blood vessels[J]. *Biofabrication*, 2021, 13(4): 045028.
- [22] ZHOU J, WU Y, TANG Z, et al. Alginate hydrogel cross-linked by Ca^{2+} to promote spinal cord neural stem/progenitor cell differentiation and functional recovery after a spinal cord injury[J]. *Regenerative biomaterials*, 2022, 9: rbac057.
- [23] ZHU L, SHEN J, AN H, et al. Hyaluronic acid-based self-repairing hydrogel preparation and 3D cell culture[J]. *Journal of polymer research*, 2022, 29(5): 170.
- [24] KANTON S, BOYLE M J, HE Z, et al. Organoid single-cell genomic atlas uncovers human-specific features of brain development[J]. *Nature*, 2019, 574(7778): 418-422.
- [25] CAO H, ZHOU Q, LIU C, et al. Substrate stiffness regulates differentiation of induced pluripotent stem cells into heart valve endothelial cells[J]. *Acta biomaterialia*, 2022, 143: 115-126.
- [26] DUMUR F. Recent advances on water-soluble photoinitiators of polymerization[J]. *European polymer journal*, 2023, 189: 111942.
- [27] AGTEN H, VAN HOVEN I, VISEU S R, et al. In vitro and in vivo evaluation of 3D constructs engineered with human iPSC-derived chondrocytes in gelatin methacryloyl hydrogel[J]. *Biotechnology and bioengineering*, 2022, 119(10): 2950-2963.
- [28] MUTHUMARI B, KUMAR B V, KAVITHA M, et al. Optimization of sodium alginate-galactoxylglucan blended hydrogel beads through ionotropic gelation method[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2023, 242: 124630.
- [29] GAN Z, QIN X, LIU H, et al. Recent advances in defined hydrogels in organoid research[J]. *Bioactive materials*, 2023, 28: 386-401.
- [30] PANGJANTUK A, KAOKAEN P, KUNHORM P, et al. 3D culture of alginate-hyaluronic acid hydrogel supports the stemness of human mesenchymal stem cells[J]. *Scientific reports*, 2024, 14(1): 4436.