

糖化温敏凝胶的制备及其与 HepG2 细胞相互作用研究*

贺晓凌^{1,2} 王金燕¹ 肖 飞¹ 陈 莉^{1**}

(¹天津市改性功能纤维重点实验室 天津工业大学¹ 材料科学与工程学院 ²环境与化学工程学院 天津 300160)

摘 要 利用自由基聚合合法合成了半乳糖糖化温敏凝胶(P(NIPAAm-co-GAC))和壳聚糖糖化温敏凝胶(P(NIPAAm-co-CSA)),对其温度响应性和溶胀性能进行了研究,结果表明,两种糖化温敏凝胶在水中和细胞培养基中均显示较好的温度响应性,以及比聚(*N*-异丙基丙烯酸酰胺)温敏凝胶(PNIPAAm)更好的溶胀性能.进一步研究人肝肿瘤细胞(HepG2)在凝胶表面的细胞行为发现,HepG2 在 P(NIPAAm-co-GAC)、PNIPAAm 凝胶表面吸附量及活性较高,表现出良好的生长趋势,而在 P(NIPAAm-co-CSA)凝胶表面吸附量和活性很低,其增殖受到抑制.通过降低环境温度,能使培养在 P(NIPAAm-co-GAC)和 PNIPAAm 凝胶表面的 HepG2 细胞发生自动脱附,避免了酶解法对细胞功能造成的损伤,并且细胞片层比单个细胞表现出更快的脱附速率.研究细胞转接行为表明,通过温度诱导得到的细胞片层,其生物活性远远大于通过酶解法得到的细胞的生物活性.

关键词 *N*-异丙基丙烯酸酰胺,壳聚糖,半乳糖,温敏凝胶,生物相容性,脱附

近年来,组织工程学的研究与应用取得了飞速发展,在组织工程研究中,寻找能充分发挥组织再生潜力的细胞外基质材料是核心内容.对材料与生物体相互作用机制的大量基础研究表明,组织和器官中细胞的行为除了受基因序列、蛋白质的调控外,还受外界环境因素的影响^[1,2].支架材料的化学成分不同,对细胞的吸附、生长及功能等方面的影响不同,如成纤维细胞在纤粘连蛋白基质上增殖加快,在层粘连蛋白基质上增殖减慢.而上皮细胞对纤粘连蛋白及层粘连蛋白的增殖反应则相反^[3~5].细胞与支架材料的相互作用也影响着细胞的吸附、增殖与分化.在生物环境中,细胞和材料的相互作用是细胞表面受体与细胞外生物材料所能提供的相应配体之间的相互分子识别,即二者产生特异性结合作用,细胞必须与材料黏附,才能进行迁移、分化和增殖^[6,7].细胞在体外培养扩增后,要使形成的细胞片层从其支架材料脱附,传统的方法是以蛋白酶如胰蛋白酶和分散酶使细胞外基质(ECM)降解,从而使培养细胞脱附,此时常损及细胞与细胞间连接蛋白和细胞膜上表达的受体蛋白^[8~10],因此,研究支架材料的化学成分对细胞行为的影响以及增加支架材料的细胞识别位点,对构建细胞最优体外生长微环境至关重要.探讨如何实现细胞的无损伤脱附,得到具

有较强生命力的活体组织,达到对受损部位的完美修复也是组织工程研究中所需解决的关键问题.

聚(*N*-异丙基丙烯酸酰胺)(PNIPAAm)是最典型的温敏高分子,独特的温度响应性使其在组织工程、药物释放等领域得到研究与应用^[11~13].日本的冈野光夫(Okano)研究小组根据 PNIPAAm 的温度响应性,达到了细胞的无损伤脱附. PNIPAAm 水溶液的最低临界温度(lower critical solution temperature, LCST)为 32℃,在此温度下,PNIPAAm 发生亲/疏水性质的转变.冈野光夫等将 *N*-异丙基丙烯酸酰胺(NIPAAm)接枝聚合于组织培养用聚苯乙烯(TCPS)板表面,经 PNIPAAm 修饰的 TCPS 表面,37℃时相对疏水,但在 32℃下呈现亲水性,因而在 37℃适于各种细胞黏附、铺展和增殖,降温至 32℃以下,细胞自动从表面脱附,可避免酶解法对细胞功能所造成的损伤^[8~10]. PNIPAAm 虽然具有良好的温度响应性,但由于本身生物相容性较差,它的应用受到很大限制,为增强生物相容性,许多研究工作将生物相容性好的物质,如葡聚糖、海藻酸等与 NIPAAm 结合使用^[14,15].

半乳糖由于具有与肝细胞表面去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)进行特异性结合的功能,多被用作肝细胞培养支架材料^[16~18].壳聚糖是现今所发

* 2009-06-08 收稿,2009-08-13 修稿.天津市应用基础及前沿技术计划项目(项目号 09JCZDJC23100)资助和国家自然科学基金(基金号 20574051)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: ljpuchenlis@163.com

现的唯一具有明显碱性、带有正电荷的天然多糖,具有良好的生物可降解性、生物相容性、可利用的活性基团以及与葡糖胺聚糖相似的结构,在组织工程中得到广泛的应用^[19-21]。本研究为增加细胞结合位点,增强材料的生物相容性,并实现细胞的无损伤脱附,分别将以含双键的半乳糖基单体(GAC)和含双键的壳聚糖基单体(CSA)与 NIPAAm 共聚,制备了半乳糖糖化温敏凝胶(P(NIPAAm-co-GAC))和壳聚糖糖化温敏凝胶(P(NIPAAm-co-CSA)),研究了人肝肿瘤细胞 HepG2 在其上的细胞行为,比较研究了材料不同化学成分对细胞行为的影响,并利用材料的温度响应性,达到了细胞的无损伤脱附。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

人肝肿瘤细胞(HepG2),天津市药物研究所;DMEM 干粉培养基,美国 Gibco-BRL;胰蛋白酶 1:250(牛胰),联星生物;特级胎牛血清(FBS),天津市药物研究所;噻唑蓝(MTT),美国 Sigma 公司;SABC-Cy3 试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司;青霉素(100 units/mL)、链霉素(100 units/mL)、甘油(试剂级)等,天津市血研所。

细胞培养箱,HERA 型,德国 Heraeus 公司;光

学倒置显微镜,XDS-1B 型,重庆光电仪器有限公司;生物显微镜,XS2-H 型,重庆光电仪器有限公司;酶联免疫检测仪, Σ 960 型,美国 Metertech 公司。

1.2 凝胶的制备与表征

不同比例凝胶制备方法按本实验室方法制备^[22]。制备半乳糖糖化温敏凝胶 P(NIPAAm-co-GAC),以乙二醇对乳酸酸中的羧基改性,然后与丙烯酸(AA)反应,制得 GAC,其结构如图 1 所示。GAC 与 NIPAAm 按不同比例($r = \text{GAC}/\text{GAC} + \text{NIPAAm}$,其中 r 为质量百分比, r 越大表示糖化温敏凝胶中糖含量越高),以 N,N -亚甲基双丙烯酰胺(MBAA)为交联剂,通过自由基聚合得到 P(NIPAAm-co-GAC)凝胶;制备壳聚糖糖化温敏凝胶 P(NIPAAm-co-CSA),以丙烯酸(AA)与壳聚糖(CS)中氨基反应,制得 CSA,其结构如图 1 所示。CSA 与 NIPAAm 按不同比例($r = \text{CSA}/\text{CSA} + \text{NIPAAm}$),以 MBAA 为交联剂,通过自由基聚合得到 P(NIPAAm-co-CSA)凝胶。将所得凝胶用直径为 24 mm 的模具切成小块,浸泡入蒸馏水中平衡,去除未反应的残余分子。将各组凝胶烘干后,通过红外光谱、核磁共振谱和元素分析等方法对其结构进行了表征。

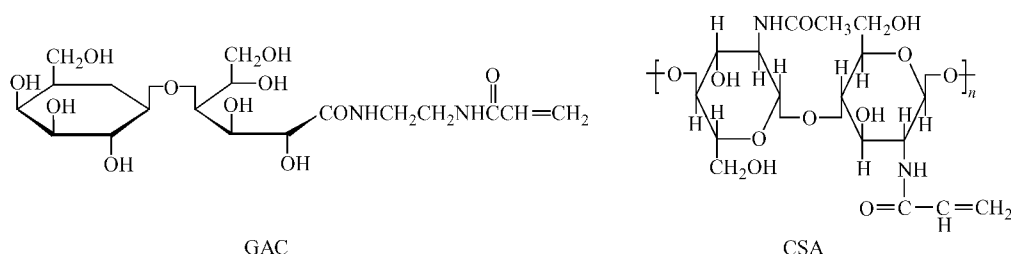


Fig. 1 Chemical structures of the monomer GAC and CSA

1.3 凝胶溶胀性与温度响应性研究

取室温下达溶胀平衡的凝胶,用称重法测定水凝胶在 20~50℃ 间的溶胀率。水凝胶在每个温度下保持 24 h 后,取出凝胶,用湿润的滤纸拭去凝胶表面带出的水分,称重,溶胀率(SR)定义为 $SR = W_s/W_d$,式中 W_s 为凝胶在某一温度下达到溶胀平衡时的质量, W_d 为凝胶干燥至恒重时的质量。

1.4 细胞吸附与形态观察

将不同比例的 P(NIPAAm-co-GAC)凝胶、P(NIPAAm-co-CSA)凝胶和 PNIPAAm 凝胶用 75%

医用酒精浸泡 10 min 后,用灭菌的磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗 3 次,再用 DMEM/F12 清洗 3 次,以 15 W 紫外灯照射 20 min,然后在含有 10% FBS 和双抗的培养基中 4℃ 预培养 1 天。将经过上述处理的各凝胶样品,放入 24 孔聚苯乙烯细胞培养板(TCPS)内,按 3×10^4 个细胞/mL 的密度种植 HepG2 细胞到各凝胶表面,放入 37℃,5% CO_2 条件的细胞培养箱中培养,每隔 2 天,取一组凝胶片用光学倒置显微镜观察细胞形态并进行图像采集,取另一组凝胶片以胰酶消化,以血球计数板对细胞进行计数,绘制细胞生长曲线。

1.5 MTT 测试

将细胞接种密度调整为 3×10^4 个细胞/mL, 吹匀, 每孔加入 2 mL 细胞悬液接种到 24 孔细胞培养板内的凝胶片上, 放置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 每隔 2 天换液, 在每 2 天的时间点利用 MTT 比色试验的方法分析细胞在样品上的活性。

每板孔加 200 μL 的 MTT 溶液 (5 mg/mL) 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵化 4 h 后, 小心吸弃孔内培养上清液, 再向每孔内加入 300 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 置于低速摇床上振荡 10 min, 使细胞内的甲臍充分溶解, 每孔分 3 次, 每次吸出 100 μL 至 96 孔板, 以酶联免疫检测仪测定每孔溶液的吸光度 (OD), 选定波长为 570 nm 处。

1.6 细胞脱附与转载行为研究

细胞以 3×10^4 个细胞/mL 的密度种植在各材料表面, 37°C 环境中培养 1 天, 换液后转至 20°C 细胞培养箱中, 每隔一定时间, 以血球计数板对凝胶表面细胞计数, 考察单个细胞脱附行为; 细胞在 37°C 环境中培养 4 天后形成细胞片层, 换液后转至 20°C 细胞培养箱中, 每隔一定时间, 以血球计数板对凝胶表面细胞计数, 考察细胞片层脱附行为。将控温脱附所得细胞以 3×10^4 个细胞/mL 的密度种植在 96 孔细胞培养板, 以用胰酶消化液从细胞培养瓶中消化得到的细胞为参照, 以 MTT 法检测细胞活性, 研究细胞的转载行为。

2 结果与讨论

2.1 凝胶的结构表征

通过红外光谱和核磁共振谱测试可知, 在 P(NIPAAm-co-GAC) 的红外光谱中, 1651 cm^{-1} 处出现酰胺键特征峰, 963 cm^{-1} 处的双键吸收峰消失, 说明 NIPAAm 与 GAC 发生了共聚反应, 形成了共聚凝胶。在 GAC 的核磁共振谱中, $\delta = 4.28 \sim 3.11$ 处的多重峰来源于糖环质子峰, $\delta = 6.55 \sim 5.95$ 为 $\text{C}=\text{CH}_2$ 的质子峰, $\delta = 11.99$ 处未出现 $-\text{COOH}$ 的质子峰, 这些结果说明已合成 GAC 单体。在 P(NIPAAm-co-CSA) 的红外光谱中, 1653 cm^{-1} 处出现酰胺键的特征峰, 961 cm^{-1} 处的双键吸收峰消失, 说明 NIPAAm 与 CSA 发生了共聚反应, 形成了共聚凝胶。通过元素分析可知, CS 中 N% (8.23% ~ 8.35%) 高于 CSA 中 N% (6.31% ~ 6.40%), 是因为 AA 中不含 N, CS 与 AA 羧合后导致 N% 下降; 而 P(NIPAAm-co-CSA) 中 N% (10.23% ~ 10.27%) 又升高, 是因为引入了含 N 的 NIPAAm,

这些结果证明已合成了 P(NIPAAm-co-CSA) 凝胶^[22]。

2.2 凝胶的溶胀性与温度响应性

图 2、图 3 分别为不同比例 P(NIPAAm-co-GAC) 凝胶、P(NIPAAm-co-CSA) 凝胶在水中和在细胞培养基中溶胀率随温度的变化曲线。由图可知, 各凝胶在水中和细胞培养基中均具有温度响应性, 随温度升高凝胶溶胀率降低, P(NIPAAm-co-GAC) 系列凝胶体积相转变温度在水中和细胞培养基中均在 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 范围, P(NIPAAm-co-CSA) 系列凝胶在水中体积相转变温度在 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 范围, 而在培养基中体积相转变温度低于 30°C , 但随凝胶中糖含量增加, 各凝胶体积相转变温度增加, 溶胀率增大。同一比例凝胶, 在水中体积相转变温度和溶胀率均高于在细胞培养基中。这是因为半乳糖和壳聚糖中均含有大量羟基, 能与水分子形成更多的氢键, 破坏这些氢键需要更多的能量, 导致体积相转变温度升高, 糖中羟基的存在, 使凝胶亲水性增强, 从而使凝胶溶胀率增大。细胞培养基中含有大量无机盐 (如 NaCl , NaHCO_3), 氨基酸, D-Glucose 等组分, 其中的盐类会对胶体体系产生“盐析”现象。凝胶在水中, 水分子在其周围形成一个规则排列的水化层, 当有盐类 (如 NaCl 、 NaHCO_3 等) 加入时, 盐离子会破坏凝胶周围高度取向的水化层, 从而使 PNIPAAm 分子链疏水性增强, 使其 LCST 降低^[23]。

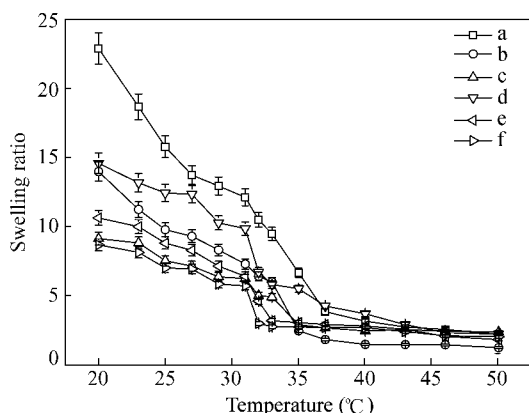


Fig. 2 Temperature dependence of the SR of poly(NIPAAm-co-GAC) hydrogels with $r = 0.5$ (a), $r = 0.2$ (b), $r = 0$ (c) in water and $r = 0.5$ (d), $r = 0.2$ (e), $r = 0$ (f) in cell culture medium

2.3 不同凝胶材料表面细胞相容性研究

细胞形态是研究细胞在材料表面行为的一个重要方面, 通过相差显微镜观察了 HepG2 细胞在

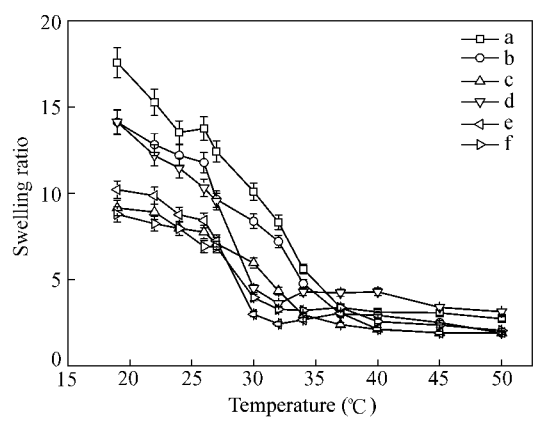


Fig. 3 Temperature dependence of the SR of poly(NIPAAm-co-CSA) hydrogels with $r = 0.2$ (a), $r = 0.125$ (b), $r = 0$ (c) in water and $r = 0.2$ (d), $r = 0.125$ (e), $r = 0$ (f) in cell culture medium

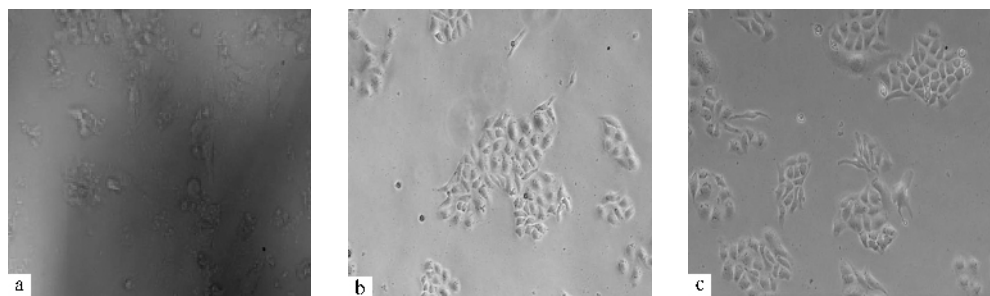


Fig. 4 Phase contrast microscope imagines (100 $\times$) of HepG2 cell cultured on the surfaces of different hydrogels after 4 days
a) Poly(NIPAAm-co-CSA) ($r = 0.2$); b) PNIPAAm; c) Poly(NIPAAm-co-GAC) ($r = 0.2$)

通过细胞生长曲线的测绘,以 PNIPAAm 凝胶为参照,研究了 HepG2 细胞在不同凝胶材料表面的生长情况,结果见图 5。从图中可以看出,在 P(NIPAAm-co-GAC)凝胶表面培养的 HepG2 细胞表现出最快的增殖速率,在较短的时间内细胞发生融合,半乳糖的引入促进了 HepG2 细胞的生长;而在 P(NIPAAm-co-CSA)凝胶表面培养的 HepG2 细胞虽然在细胞生长初期表现出细微的增殖现象,但培养 4 天后,细胞的生长受到抑制。这是因为半乳糖与肝细胞表面去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)具有特异结合性,将半乳糖引入 PNIPAAm 凝胶,增加了 HepG2 细胞与材料之间的结合位点,增强了细胞的吸附力,从而促进了细胞的分化与增殖;而壳聚糖不具有与肝细胞的特异结合性,并具有抗癌作用,有报道称壳聚糖在体外可抑制肝癌、白血病等多种癌细胞的生长,并抑制肿瘤细胞的 DNA 合成^[24,25],本实验所选用的细胞株 HepG2 为肝肿瘤细胞,壳聚糖的引入抑制了其生长。从图中还可看出不同含量半乳糖和壳聚糖

不同凝胶支架表面的形态,如图 4 所示。从图中可以看出,细胞培养 4 天后,壳聚糖糖化温敏凝胶 P(NIPAAm-co-CSA)表面的细胞仍然保持最初的圆形,未表现出生长的趋势,且吸附量很低,只有零星单个细胞散落在凝胶表面。而在半乳糖糖化温敏凝胶 P(NIPAAm-co-GAC)表面的细胞呈现伸展状态,表现出良好的生长趋势,细胞吸附量很高,多个细胞通过细胞间相互作用和细胞运动聚集在一起,形成聚集状态。在 PNIPAAm 凝胶表面的细胞虽然也表现出较好的吸附能力和生长趋势,但不及细胞在 P(NIPAAm-co-GAC)凝胶表面的吸附力强,增殖程度大,这说明半乳糖能有效地促进 HepG2 细胞在材料表面的吸附与增殖,而壳聚糖不利于 HepG2 细胞在材料表面的吸附。

对 HepG2 细胞生长情况的影响。对不同比例的 P(NIPAAm-co-GAC)凝胶,在细胞培养初期,共聚凝胶中半乳糖含量对细胞生长无太大影响,而在细胞指数增殖期,即在细胞培养 4~6 天期间,半乳糖含量对细胞生长影响明显,随半乳糖含量增加,细胞的生长受到极大促进,6 天后,细胞增殖进入平台区,半乳糖含量对细胞生长的影响又变得不明显。对不同比例 P(NIPAAm-co-CSA)凝胶,在细胞培养初期,与 P(NIPAAm-co-GAC)凝胶对 HepG2 细胞的影响相类似,无太大影响,但在细胞培养 6 天后,细胞的生长受到抑制,共聚凝胶中壳聚糖含量越高,细胞生长受抑制程度越明显,在细胞培养第 8 天,细胞的生长受到极大抑制,随壳聚糖含量增加,凝胶表面活细胞数量锐减。这些研究结果表明半乳糖由于与肝细胞具有特异结合性,能促进 HepG2 细胞的生长,而壳聚糖具有抗癌作用,极大地抑制了 HepG2 细胞的生长。

为更准确地反映细胞的生长情况,采用 MTT 方法,对细胞的活性进行了检测。图 6 为 HepG2 细

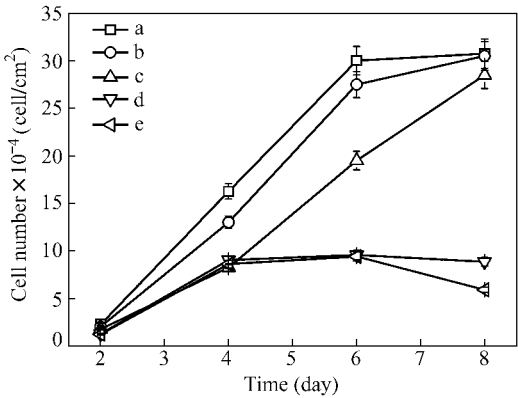


Fig. 5 Growth curves of HepG2 cell cultured on the surfaces of different hydrogels

a) Poly(NIPAAm-co-GAC) ($r = 0.5$) ;b) Poly(NIPAAm-co-GAC) ($r = 0.2$) ;c) PNIPAAm ;d) Poly(NIPAAm-co-CSA) ($r = 0.125$) ;e) Poly(NIPAAm-co-CSA) ($r = 0.2$)

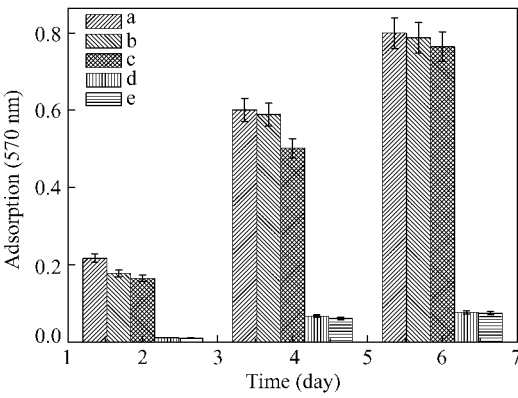


Fig. 6 Viability of HepG2 cell after culturing 2, 4, 6 days for different hydrogels

a) Poly(NIPAAm-co-GAC) ($r = 0.5$) ;b) Poly(NIPAAm-co-GAC) ($r = 0.2$) ;c) PNIPAAm ;d) Poly(NIPAAm-co-CSA) ($r = 0.125$) ;e) Poly(NIPAAm-co-CSA) ($r = 0.2$)

胞在不同凝胶表面培养 2、4、6 天后的细胞活性。以 PNIPAAm 凝胶为参照,培养在 P(NIPAAm-co-GAC) 凝胶表面的细胞表现出最高的活性,且随培养时间的延长,细胞活性迅速提高,比如细胞在培养 4 天后的活性是培养 2 天后活性的 4 倍,而 PNIPAAm 凝胶表面的细胞活性在 2 天和 4 天之间的提高不到 3 倍,这说明半乳糖的引入能有效地提高细胞的增殖速率,在较短的时间里就可以实现细胞的融合,而在 PNIPAAm 凝胶表面的细胞增殖速率则相对缓慢,需要较长的时间达到融合。同前两种凝胶相比较,培养在 P(NIPAAm-co-CSA) 凝胶表面的细胞活性远远低于前者,比如培养 6 天后,P(NIPAAm-co-GAC) 凝胶表面细胞的活性是 P(NIPAAm-co-CSA) 凝胶表面细胞活性的 10 倍之多。并且不同含量半乳糖和壳聚糖对 HepG2 细胞活性的影响不同,如图 6 所示,凝胶中随半乳糖含量的增加,细胞活性提高,而随壳聚糖含量的升高,细胞活性降低,壳聚糖含量仅占凝胶总质量的 20% 时,就对 HepG2 细胞的生长产生强烈的抑制作用。这些实验结果表明半乳糖的引入极大地促进了 HepG2 细胞的生长,而壳聚糖的引入则抑制了该细胞的生长,这与通过绘制细胞生长曲线研究细胞生长情况所取得的实验结果相吻合。

2.4 HepG2 细胞的温度诱导脱附行为研究

细胞在材料表面吸附、分化和增殖后形成的细胞片层要从材料表面脱附,采用传统酶解法,常常会破坏细胞片层的完整性,以及损伤细胞功能。本研究利用 PNIPAAm 在其 LCST 附近的亲/疏水转变,实现了细胞的无损伤脱附。由于 HepG2 细

胞在 P(NIPAAm-co-CSA) 凝胶表面的生长受到抑制,未能得到较好的细胞片层,所以只对 HepG2 细胞在 P(NIPAAm-co-GAC) 凝胶表面的温度诱导脱附行为进行了研究。

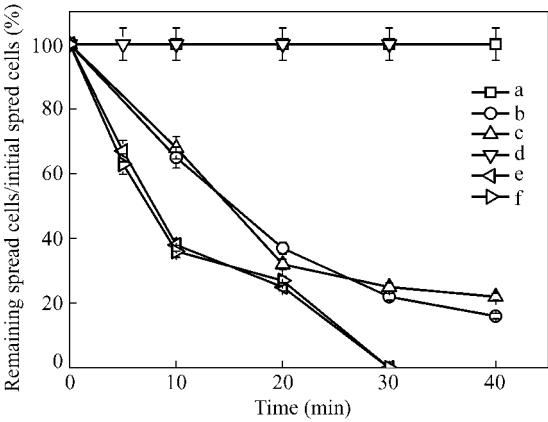


Fig. 7 Comparison of time-dependent detachment behavior of single cells and cell sheets

a) Single cells on TCPS ;b) Single cells on PNIPAAm ;c) Single cells on poly(NIPAAm-co-GAC) ($r = 0.5$) ;d) Cell sheets on TCPS ;e) Cell sheets on PNIPAAm ;f) Cell sheet on poly(NIPAAm-co-GAC) ($r = 0.5$)

图 7 为 HepG2 细胞培养 1 天后得到的单个细胞和培养 4 天后达到融合状态所形成的细胞片层从 TCPS、PNIPAAm 和 P(NIPAAm-co-GAC) ($r = 0.5$) 凝胶表面脱附行为的比较。从图 7 中可以看出,当温度从 37℃ 降到 20℃,凝胶表面细胞数量减少,细胞发生自动脱附,这是因为,PNIPAAm 的化学结构中具有亲水部分和疏水部分,其水溶液的 LCST 为 32℃,当温度高于 32℃ 时,PNIPAAm 高

分子链收缩,表现疏水性,适于细胞黏附、铺展和增殖,当温度低于 32°C 时,PNIPAAm 高分子链伸展,表现亲水性,在支架材料和细胞之间形成一个水化层,使细胞从材料表面自动脱附.而 TCPS 板因不具备温度响应性,在其表面培养的细胞,当环境温度降低后,未发生自动脱附.比较单个细胞和细胞片层的脱附速率可知,细胞片层的脱附速率比单个细胞快,10 min 后,细胞片层有 64% 的细胞发生了脱附,而单个细胞只有 32% 发生脱附,30 min 后,细胞片层已全部从材料表面脱附,而单个细胞尚有 25% 未发生脱附,这是因为细胞片层形成细胞与细胞的连接网络,大的收缩力加速了细胞脱附过程,在 Okano 的研究中也有相类似的报道^[10].从图 7 中还可看出,PNIPAAm 凝胶和 P(NIPAAm-co-GAC)凝胶表面的细胞脱附速率无太大区别,这是由两种因素决定的,一方面,由前文所述凝胶温度响应性可知,P(NIPAAm-co-GAC)凝胶中由于 GAC 组分的存在,具有比 PNIPAAm 凝胶更强的亲水性和更高的溶胀率,这一性质有利于共聚凝胶在低温下的吸水溶胀,从而会加快细胞从其表面的脱附,但另一方面,由于半乳糖具有与肝细胞的特异结合性,GAC 的引入增强了凝胶表面与细胞的吸附力,从而阻碍细胞从其表面脱附.上述两种相反因素共同作用的结果,就使共

聚凝胶与均聚凝胶表现出对细胞几乎相同的脱附速率.

2.5 HepG2 细胞转载行为研究

为了验证通过降温而自然回收的 HepG2 细胞是否具有活性,研究了其转载行为,通过 MTT 法对其活性进行了检测,并以通过酶解法从 TCPS 板消化下的细胞活性为参照,结果见图 8.从图 8 中可以看出,通过温度诱导自然回收的 HepG2 细胞,随培养时间的延长,细胞数量增多,活性提高,表现出很好的生长趋势,并且细胞活性均高于使用消化酶从 TCPS 板得到的细胞的活性,这说明在温度敏感凝胶表面通过降温脱附可以完整地保留细胞的活性,避免了酶解法对细胞造成的损伤.从图中还可以看出,随半乳糖含量的增多,细胞活性提高,这说明半乳糖的引入不仅提高了凝胶材料的细胞相容性,而且提高了脱附细胞的生物活性.

3 结论

通过自由基聚合法合成了半乳糖糖化温敏凝胶(P(NIPAAm-co-GAC))和壳聚糖糖化温敏凝胶(P(NIPAAm-co-CSA)),对其温度响应性进行了研究.通过细胞形态观察、生长曲线绘制和 MTT 测试等方法对 HepG2 细胞在 P(NIPAAm-co-GAC)和 P(NIPAAm-co-CSA)表面的生长情况进行了比较研究,结果表明,半乳糖的引入有效地提高了凝胶支架材料的细胞相容性,而壳聚糖的引入则抑制了 HepG2 细胞在凝胶表面的生长.进一步研究了 HepG2 细胞在 P(NIPAAm-co-GAC)凝胶表面的温度诱导脱附行为以及脱附细胞的活性,结果表明,通过降低环境温度,HepG2 细胞在凝胶表面可以发生自动脱附,温度诱导脱附细胞的活性高于酶解法得到的细胞活性,这证明所制备的 P(NIPAAm-co-GAC)凝胶不仅具有较高的生物相容性,而且具有温度响应性,可通过控制温度达到细胞的无损伤脱附,为研制新型组织工程用支架材料提供新思路 and 实验依据.

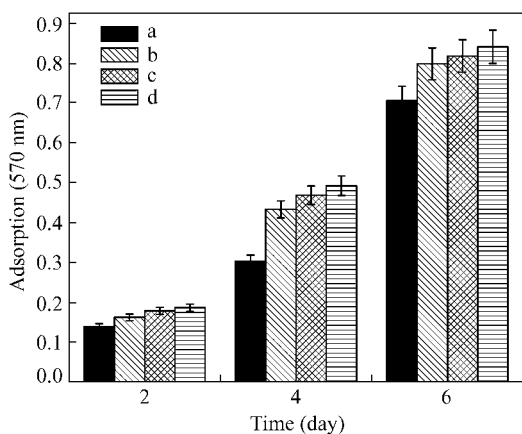


图 8 Viability of HepG2 cell detached from different surfaces
a) TCPS ; b) PNIPAAm ; c) Poly(NIPAAm-co-GAC) ($r = 0.2$) ;
d) Poly(NIPAAm-co-GAC) ($r = 0.5$)

REFERENCES

- 1 CaCampillo-Fernandez A J, Ruiz-Moreno J M. *Biomacromolecules*, 2007, 8 :2429 ~ 2436
- 2 da Silva R M P, Mano J F, Reis R L. *Trends Biotechnol*, 2007, 25 (12) :577 ~ 583
- 3 Malmström J, Adolfsson E, Emanuelsson L. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19 (9) :2983 ~ 2992
- 4 Barron M, Franklin L, Woodall J Jr. *Biomed Sci Instrum*, 2007, 43 :248 ~ 253
- 5 Jiao Wei(焦微), Lu Yan(陆艳), Zhao Xia(赵霞). *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research(中国组织工程研究与临床康复)*, 2009, 13 (8) :1541 ~ 1544
- 6 Cho C S, Akaike T. *Biomaterials*, 2006, 27 :576 ~ 585
- 7 Lu Haiwei(陆海伟), Lu Qinghua(路庆华). *Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 2003, 24 (12) :2324 ~ 2326
- 8 Yang J, Okano T. *Biomaterials*, 2007, 28 :5033 ~ 5043
- 9 Masuda S, Okano T. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60 :277 ~ 285
- 10 Hatakeyama H, Kikuchi A, Yamato M, Okano T. *Biomaterials*, 2006, 27 :5069 ~ 5078
- 11 Prabakaran M, Mano J. F. *Carbohydr Polym*, 2006, 63 :153 ~ 166
- 12 Lorenzo C A, Grinberg V Y. *J Controlled Release*, 2005, 102 :629 ~ 641
- 13 Plunkett K N, Berkowski K L, Moore J S. *Biomacromolecules*, 2005, 6 :632 ~ 637
- 14 Xiao F, Chen L. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 2009, 71 :13 ~ 18
- 15 Cho J H, Kim S H, Lee J W. *Biomaterials*, 2004, 25 :5743 ~ 5751
- 16 Kamruzzaman Selim K M, Kang I K. *Biomaterials*, 2007, 28 :710 ~ 716
- 17 Chua K N, Lim W S, Mao H Q. *Biomaterials*, 2005, 26 :2537 ~ 2547
- 18 Kang I K, Kim G J, Kwon O H, Ito Y. *Biomaterials*, 2004, 25 :4225 ~ 4232
- 19 Martino A D, Sittinger M, Risbud M V. *Biomaterials*, 2005, 26 :5983 ~ 5990
- 20 Fukuda J, Robert L. *Biomaterials*, 2006, 27 :5259 ~ 5267
- 21 Wang Yinsong(王银松), Li Yingxia(李英霞), Song Ni(宋妮). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2004, (3) :348 ~ 382
- 22 Wang J Y, Chen L, Zhao Y P. *Mater Sci Mater Med*, 2009, 20 :583 ~ 590
- 23 Eeckman F, Amighi K, Moës A J. *Int J Pharm*, 2001, 222 :259 ~ 270
- 24 Dashwood R H. *Biochem Mol Biol*, 2003, 36 (1) :35 ~ 42
- 25 Pae H O, Seo W G, Kim N Y. *Leuk Res*, 2001, 25 (4) :339 ~ 346

SYNTHESIS OF GLYCOSYLATED THERMO-RESPONSIVE HYDROGELS AND THEIR INTERACTIONS WITH HepG2 CELLS

HE Xiaoling^{1,2}, WANG Jinyan¹, XIAO Fei¹, CHEN Li¹

(¹ Tianjin Key Laboratory of Fiber Modification and Functional Fiber, ¹ School of Materials Science and Engineering,

² School of Environment and Chemical Engineering, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300160)

Abstract A series of galactose glycosylated thermoresponsive hydrogel (P(NIPAAm-co-GAC)) and chitosan glycosylated thermoresponsive hydrogel (P(NIPAAm-co-CSA)) were synthesized by free radical polymerization with different ratios. The temperature responsibility of the copolymerized hydrogels was investigated. The lower critical solution temperature (LCST) of P(NIPAAm-co-GAC) hydrogels was 30 ~ 35°C in distilled water and cell culture media. However, the LCST of P(NIPAAm-co-CSA) hydrogels was 30 ~ 35°C in distilled water and lower than 30°C in cell culture media, respectively. Furthermore, behaviors of HepG2 cell cultured on the P(NIPAAm-co-GAC), P(NIPAAm-co-CSA) and poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) hydrogels were investigated. Cell morphologies on different hydrogels scaffolds were photographed under a phase contrast microscope equipped with a digital camera. Investigation of the growth behaviors and viability of HepG2 cells on different hydrogels indicated that HepG2 cell grew very well on the surface of P(NIPAAm-co-GAC) and PNIPAAm hydrogels. However, the growth of HepG2 cell was inhibited on the surface of P(NIPAAm-co-CSA) hydrogels. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazoliumromide (MTT) assay was used to quantify the cell viability of HepG2 on different hydrogels.

Cell viability on P(NIPAAm-co-GAC) hydrogels was 10 times higher than that on P(NIPAAm-co-CSA) hydrogels after 6 day 's incubation. Moreover, the viability of HepG2 cell increased with increasing the amount of introduced galactose. On the contrary, the viability of HepG2 cell decreased with increasing the amount of introduced chitosan. Investigation of the temperature induced detachment indicated that the cell could be spontaneously detached from the surface of poly(NIPAAm-co-GAC) hydrogels by lowing temperature, which could avoid the damage to the cells caused by enzymatic digestion. The detachment rate of cell sheets was much faster than that of single cells, which was indicated by the detachment rate of 64% for cell sheets and 32% for single cells after 10 min at low temperature. Investigation of cells transshipment indicated that the viability of cells obtained by temperature induced detachment was much higher than that obtained by enzymatic digestion. In conclusion, the introduction of chitosan into PNIPAAm was not favorable for the growth of HepG2, but the incorporation of galactose greatly facilitated its growth. Further more, intact cell sheets could be obtained by controlling the environmental temperature. All these results provided a novel method and experimental basis for developing materials used in tissue engineering.

Keywords *N*-isopropylacrylamide, Chitosan, Galactose, Thermo-responsive hydrogl, Biocompatibility, Detachment