

温敏性半乳糖基化壳聚糖水凝胶的制备及其对 HL-7702 细胞增殖行为影响的研究*

毕思信¹ 杨宁¹ 杨森坤¹ 贺晓凌¹ 张青松¹ 陈莉^{1**}
朱争艳² 高英堂² 杜智²

(¹天津市改性功能纤维重点实验室 天津工业大学材料科学与工程学院 天津 300387)

(²天津市人工细胞重点实验室 天津第三中心医院 天津 300170)

摘要 以壳聚糖(CS)为原料,在1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳-二亚胺盐酸盐(EDC·HCL)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的活化作用下,合成了半乳糖基化壳聚糖(GC)单体,并与N-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm)反应,制备了温敏性半乳糖基化壳聚糖N-异丙基丙烯酰胺共聚水凝胶(Gal-CS-g-PNIPAAm).通过红外光谱(FTIR)、光电子能谱(XPS)和扫描电子显微镜(SEM)等测试方法对其成分和结构进行了表征,并对其溶胀率和表面亲疏水性进行了研究.在Gal-CS-g-PNIPAAm凝胶表面培养人正常肝细胞系(HL-7702),研究其生长、脱附及转染(再增殖)行为.结果表明Gal-CS-g-PNIPAAm水凝胶具有良好的温度响应性和生物相容性,与PNIPAAm水凝胶相比,Gal-CS-g-PNIPAAm凝胶表面更有利于HL-7702细胞增殖.将温度降低至临界温度(LCST,32.5℃)以下,细胞可以从凝胶表面自发脱附,与酶消化脱附相比,细胞损伤更少.Gal-CS-g-PNIPAAm凝胶表面脱附的细胞比PNIPAAm凝胶表面脱附的细胞活性更高,表明PNIPAAm水凝胶引入GC单体后,凝胶的生物相容性得到改善,且脱附后细胞的增殖活力明显增加.

关键词 半乳糖基化壳聚糖水凝胶, 温度响应性, 人正常肝细胞系, 细胞脱附, 细胞转染

肝组织工程是目前处于实验初级阶段的一个新兴领域,与其他治疗肝疾病的方法如药物治疗和器官移植相比,肝组织工程不存在无法根治和供体短缺的限制^[1-5].但是在肝组织工程研究中,获取种子细胞时,传统的酶解法对细胞功能的损伤较大的缺点一直困扰着科技人员.Okano等^[6,7]提出了“细胞片层工程”的思想,将细胞在温度响应性支架材料表面培养,待细胞完全融合后,利用材料的温度响应性使细胞片层完整脱落,然后将其植入组织或器官的受损部位.因此制备适合肝细胞生长的支架材料是肝组织工程的关键.

PNIPAAm水凝胶内部网络结构中含有大量的水分,具备流体的性质,与机体组织非常相似,并且柔软、湿润的表面减少了材料对细胞的不良刺激.温敏水凝胶具有温度响应性这一优良特性,使其成为细胞片层组织工程的优选支架材

料^[8-10].但是,PNIPAAm的生物相容性较差,极大限制了PNIPAAm水凝胶的应用.CS分子中含有较多的活性基团(如氨基、羟基),能通过多种化学方法进行修饰,而且具有优良的生物相容性和生物可降解性,是一种理想的细胞外基质材料^[11].壳聚糖和PNIPAAm的相关研究很多,但大多集中在药物缓释和生物分离等方面^[12-15],用于组织工程尤其是细胞片层工程方面的研究则处于初级研究阶段,相关报道较少.本课题组陈莉等^[16]制备了壳聚糖温敏凝胶(P(NIPAAm-co-CSA))支架,并在表面接种L929小鼠成纤维细胞研究其增殖和降温脱附行为,结果显示P(NIPAAm-co-CSA)具有良好的生物相容性和温度响应性.但该温敏凝胶因缺少肝细胞靶向性,在肝组织工程研究和应用中有一定的局限性.半乳糖是肝细胞表面去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)的特异性配

* 2012-09-22 收稿,2012-12-12 修稿;国家自然科学基金(基金号 50973084,31200719)和天津市高等学校科技发展基金(基金号 20100308)资助项目.

** 通讯联系人,E-mail:tjpuchenlis@163.com;bisixin2008@126.com

doi:10.3724/SP.J.1105.2013.12311

体,能够诱导和提高肝细胞在细胞外基质材料表面的黏附^[17].贺晓凌等^[18,19]合成了温敏性半乳糖水凝胶(P(NIPAAm-co-GAC)),并在其表面培养 HepG2 肝肿瘤细胞,结果表明凝胶的生物相容性较纯 PNIPAAm 凝胶有所提高,且具有良好的肝细胞靶向性,有利于肝细胞的黏附和增殖,同时,细胞能够从其表面无损伤脱附.但由于半乳糖的结构中有较强的亲水基团和阴离子化学基团,温敏凝胶中引入过量半乳糖基会不利于 HL-7702 细胞黏附同时也会诱导黏附细胞的凋亡^[20].

CS 是一种生物相容性良好的聚阳离子多糖.本文通过化学改性方法在 CS 主链上引入半乳糖基,并接枝 PNIPAAm 制备具有温度响应性的 Gal-CS-g-PNIPAAm 水凝胶支架材料.通过在其表面接种 HL-7702 细胞,研究细胞在其表面的增殖和脱附情况,并通过 H&E 染色和细胞转染实验进一步验证降温脱附细胞活性优于酶消化脱附的细胞.

1 实验部分

1.1 仪器与材料

NIPAAm,日本 KOHJIN 公司;乳糖酸(LA),苏州亚科化学试剂有限公司;CS(脱乙酰度 > 85%),浙江金壳生物化学公司;NHS、EDC·HCL,上海 Medpep 公司;四甲基乙二胺(TEMED),国药集团化学试剂有限公司;*N,N*-亚甲基双丙烯酰胺(MBA),Solarbio 公司;过硫酸铵(APS),天津市赢达稀贵化学试剂厂;胰蛋白酶,美国 Sigma 公司;DMEM 培养基(低糖),美国 Gibco 公司;胎牛血清(FBS),美国 MDgenics 公司;苏木素-伊红(H&E)染色试剂盒,天津百浩生物科技有限公司;人正常肝细胞系(HL-7702),天津市第三中心医院.

VECTOR 22 红外光谱仪,德国 Bruker 公司;ELMER PH I 5600 型 X 射线光电子能谱仪;DCAT21 动态接触角测试仪,德国 Dataphysics Surface Tension;CK 型倒置相差显微镜(Olympus,Japan).

1.2 Gal-CS-g-PNIPAAm 共聚水凝胶的制备

称取一定量的 LA 溶于 200 mL TEMED/HCL 的缓冲溶液(pH = 4.7)中,分别加入 0.28 g NHS,1.42 g EDC 和 6 g CS,室温条件下搅拌反应 72 h 后,用透析袋(滤过最大相对分子质量为 3500)去离子水透析 4 天,沉析、冷冻、干燥即可得到固体 GC.将上述 GC 单体和 NIPAAm 按质量比为 1:2

溶于 20 mL 质量分数为 1% 的稀盐酸中,加入 0.04 g(APS)作引发剂,充 N₂ 30 min.再加入 0.1 g MBA 交联剂,充 N₂ 10 min,以适量 TEMED 作促进剂,将溶液倒入玻璃板模具中密封,室温反应 48 h 后得到 Gal-CS-g-PNIPAAm 水凝胶.在 37 ℃ 水浴中达到平衡后,将凝胶切成直径为 10 mm 的圆片,用去离子水浸泡 7 天,并隔天换水除去残留物,并置于磷酸盐缓冲溶液(PBS)平衡溶液中待用.

1.3 材料成分和结构表征

将 CS 粉末、GC 粉末及干燥的 Gal-g-PNIPAAm 共聚凝胶通过 KBr 压片测定其红外光谱.MERCURYPLUS 超导核磁共振谱仪测样品核磁,以 1% DCL 为溶剂.通过 ELMER PH I 5600 型 X 射线光电子能谱仪获得样品 XPS 能量图谱和化学元素的含量.将需要测试的样品冷冻干燥后在液氮中淬断后,切取凝胶的纵切面,将其粘到金属板上,喷金后在 SEM 下观察凝胶内部结构.

1.4 细胞生长研究

将 PNIPAAm 凝胶和 Gal-CS-g-PNIPAAm 共聚凝胶载体放入 37 ℃ 环境中平衡 12 h 后置于 48 孔细胞培养板,每孔加入 400 μ L,10 wt% FBS 的 DMEM/F12 培养液,把传代后的 HL-7702 细胞稀释成密度为 8×10^4 个/mL 的细胞悬液,每孔接种 100 μ L.将种植后的细胞培养板置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中继续培养 7 天,每 24 h 更换一次细胞培养液,并在光学倒置显微镜下观察记录细胞的生长状况.

1.5 细胞脱附研究

将培养 7 天后的细胞从 37 ℃ 移至 20 ℃ 环境,10,40 和 120 min 后分别用光学倒置显微镜观察记录细胞的形态.考察共聚水凝胶表面细胞的脱附行为.

脱附后的细胞配制成密度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种至 96 孔板,每孔 100 μ L.4 h 后吸去培养基,用 PBS 溶液洗 2~3 遍.加入固定液 V(甲醇)/V(醋酸) = 9:1, V/V 固定 20 min,甩出固定液并自然风干,HE 试剂盒染色.

1.6 细胞转染研究

收集 Gal-CS-g-PNIPAAm 凝胶和 PNIPAAm 凝胶表面降温脱附的细胞和从 TCPS 板表面胰酶消化的细胞并稀释成浓度大约为 1.5×10^4 个/mL;分别取 10 组各种细胞悬液 200 μ L 种植于 96 孔板中,分别在 1,3 和 5 天时观察细胞的增殖情

况,并用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)法检测细胞的活性.

1.7 统计学方法

应用 SPSS17 统计软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验和方差分析.当任意两组数据差异概率 $p < 0.05$ 时,则认为它们之间存在显著性差异;当 $p < 0.01$ 时,则认为它们之间存在显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 Gal-CS-g-PNIPAAm 共聚凝胶的结构表征

从图 1 红外光谱图中可看出,CS 在 3437 cm^{-1} 处的宽峰为羟基(O—H)的伸缩振动吸收峰和 N—H 伸缩振动吸收峰的重叠峰, 1652 和 1580 cm^{-1} 分别为 CS 的酰胺 I、II 键的特征峰(C=O 伸缩振动吸收峰、 —NH_2 面内弯曲振动吸收峰).GC 的红外图谱与 CS 的相比 3421 cm^{-1} 处的吸收峰变宽,这是因为与 CS 相比,产物 O—H 数目增多, 1632 cm^{-1} 处的酰胺 I 键的特征吸收峰变化明显, 1545 cm^{-1} 处 —NH_2 吸收峰较 CS 弱,说明在 CS 的氨基上发生了酰化反应.

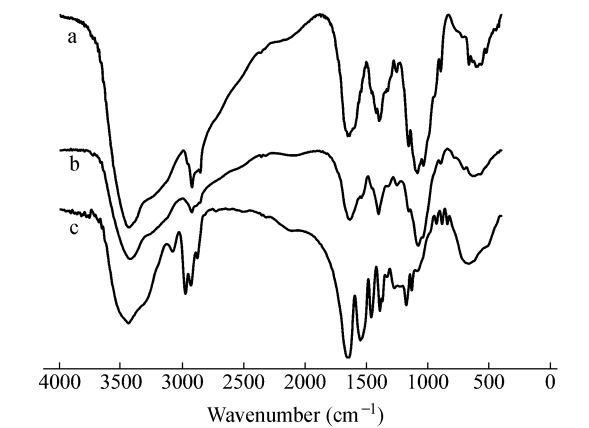


Fig. 1 FTIR spectra of (a) CS, (b) GC and (c) Gal-CS-g-PNIPAAm

CS 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱归属如下, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz , $\text{D}_2\text{O/DCL}$, δ): 4.816 (H_1), 3.099 (H_2), $3.38 \sim 4.0$ (m, 4H), 1.972 (NHCOCH_3 中的 H).GC 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱归属如下, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz , $\text{D}_2\text{O/DCL}$, δ): 1.908 (NHCOCH_3 中的 H), 4.768 (H_1), $4.06, 4.4$ (H'_1, Hc), $3.3 \sim 4.0$ (m, 10H), 3.042 (H_2). $^1\text{H-NMR}$ 结果表明 GC 中 $\delta = 4.06$ 和 4.4 的特征峰属 LA 中的质子 H'_1, Hc .另外,通过与壳聚糖 $^1\text{H-NMR}$ 对比发现, NHCOCH_3 中的质子

H 的特征吸收峰从 1.972 移至 1.098 处,且峰值增强,说明 LA 中的羧基(—COOH)与壳聚糖中的(—NH_2)发生了酰胺化反应.

从 Gal-CS-g-PNIPAAm 凝胶红外图谱可以看出,与 GC 的红外图谱对比,在 1389 and 1365 cm^{-1} 处产生了新的吸收峰,属于 NIPAAm 的吸收峰. Gal-CS-g-PNIPAAm 的酰胺 I、II 键吸收峰从 1632 和 1531 cm^{-1} 分别移至 1643 和 1548 cm^{-1} 处,且峰强明显增加.而 $1035 \sim 1080\text{ cm}^{-1}$ 处醚键(C—O—C)特征吸收峰变化也较为明显^[21],证明 NIPAAm 已成功引入到 GC 上.

对 CS,GC 和 Gal-CS-g-PNIPAAm 的 XPS 谱图进行分析得到样品的各元素含量如图 2 和表 1 所示.可以看出,GC 中 N 元素的含量降低是由于

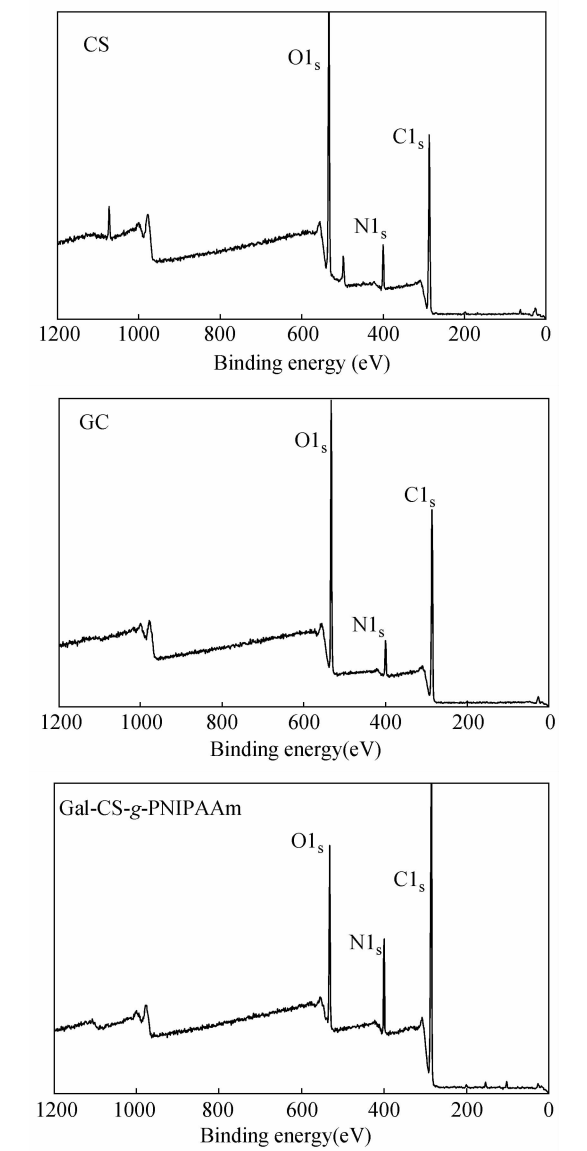


Fig. 2 XPS scan spectra of CS, GC and Gal-CS-g-PNIPAAm

LA 引入到 CS 中导致. Gal-CS-*g*-PNIPAAm 凝胶中 N 元素含量比 GC 中含量高,表明 NIPAAm 的引入使得 GC 中 N 元素含量升高. 另外通过对比 C 和 O 元素的变化可以看出, Gal-CS-*g*-PNIPAAm 凝胶中 C 元素含量升高而 O 元素含量降低进一步说明了 NIPAAm 与 GC 发生了聚合反应.

Table 1 Percentage composition (%) of N in CS, GC and Gal-CS-*g*-PNIPAAm

Samples	Cl _s	Ol _s	Nl _s
CS	57. 71	32. 38	7. 48
GC	65. 06	28. 7	6. 24
Gal-CS- <i>g</i> -PNIPAAm	74. 53	13. 63	10. 42

2.2 凝胶的温度响应性研究

图 3 是 Gal-CS-*g*-PNIPAAm 和 PNIPAAm 凝胶分别在 25 ℃ 和 37 ℃ 水浴中平衡 24 h 后冷冻干燥后的断面 SEM 照片. 由图可知, PNIPAAm 凝胶内部存在均匀规整的孔状结构(图 3(a)和 3(c)), 而 Gal-CS-*g*-PNIPAAm 凝胶内部孔状结构变得不规则, 且孔径变大(图 3(b)和 3(d)). 由于 GC 单体分子结构复杂, 与 NIPAAm 接枝共聚时产生很大的空间位阻, 并且分布在共聚凝胶的直链上, 使共聚凝胶呈现不规则的大孔结构. 同

时, 从图中可以看出, 25 ℃ 平衡温度下共聚凝胶内部孔洞远大于 37 ℃ 平衡温度下共聚凝胶内部孔洞尺寸. 凝胶孔洞尺寸随着温度的升高变小.

图 4 分别为不同比例单体 GC 含量的 Gal-CS-*g*-PNIPAAm 水凝胶和纯 PNIPAAm 水凝胶在 DMEM 培养基中溶胀率随温度变化的曲线. 如图所示, Gal-CS-*g*-PNIPAAm 水凝胶和纯 PNIPAAm 水凝胶在培养基中的溶胀率有相似的变化趋势, 均具有良好的温度响应性, 在一定温度范围内随温度的升高凝胶的溶胀率降低. 各凝胶低临界溶解温度(LCST)在 32 ℃ 左右. 且随着 GC 单体含量的增加溶胀率增大, 这是由于 GC 单体中半乳糖基的亲水作用引起.

表 2 是不同温度下 2 种凝胶的表面接触角, 从表中数据可知, Gal-CS-*g*-PNIPAAm 共聚凝胶的接触角在两种温度下均较纯 PNIPAAm 水凝胶减小, 说明 GC 的引入增大了凝胶的亲水性. 同时, 从表中还可看出, 2 种凝胶表面接触角都随温度的升高而变大, 在低于 LCST 的 25 ℃ 时, 接触角分别为 84°和 54°, 而当环境温度变为大于 LCST 的 37℃时, 接触角分别为 115°和 83°, 两者均显示出亲水性的降低, 表现出很好的温度响应性.

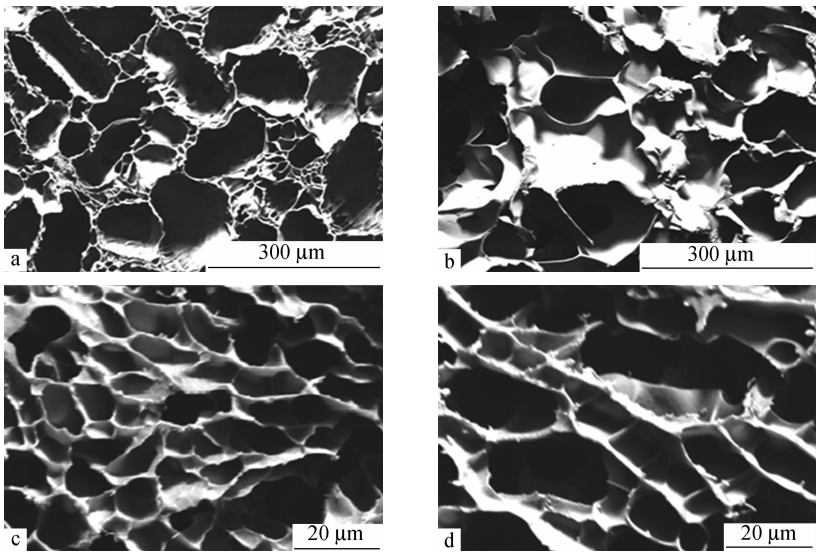


Fig. 3 SEM images of PNIPAAm and Gal-CS-*g*-PNIPAAm hydrogels at different temperature: (a) 25 ℃ PNIPAAm, (b) 25 ℃ Gal-CS-*g*-PNIPAAm, (c) 37 ℃ PNIPAAm and (d) 37 ℃ Gal-CS-*g*-PNIPAAm

2.3 细胞生长行为研究

图 5 是 HL-7702 细胞在 PNIPAAm 和 Gal-CS-*g*-PNIPAAm 种凝胶表面分别培养 3 天和 7 天后的光学显微镜照片. 由图可知, 细胞在 2 种凝胶表面数量随着培养时间的延长均明显增多. 但是, 与

PNIPAAm 凝胶相比, Gal-CS-*g*-PNIPAAm 凝胶表面的细胞数量增加更明显, 说明 Gal-CS-*g*-PNIPAAm 凝胶更有利于 HL-7702 细胞的生长. 图 6 是 HL-7702 细胞在 PNIPAAm 凝胶和 GC-*g*-PNIPAAm 凝胶表面生长柱状图, 从图中可以看

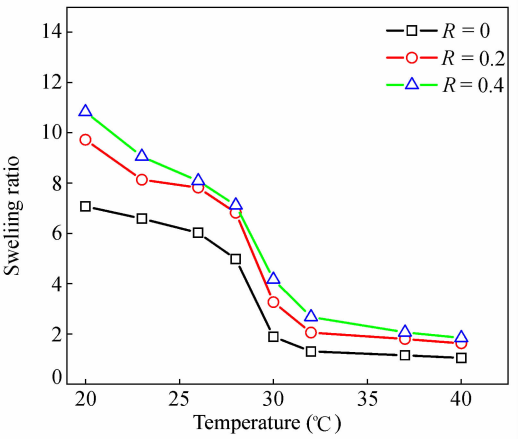


Fig. 4 Temperature dependence of the swelling ratio of Gal-CS-*g*-PNIPAAm hydrogels in cell culture medium

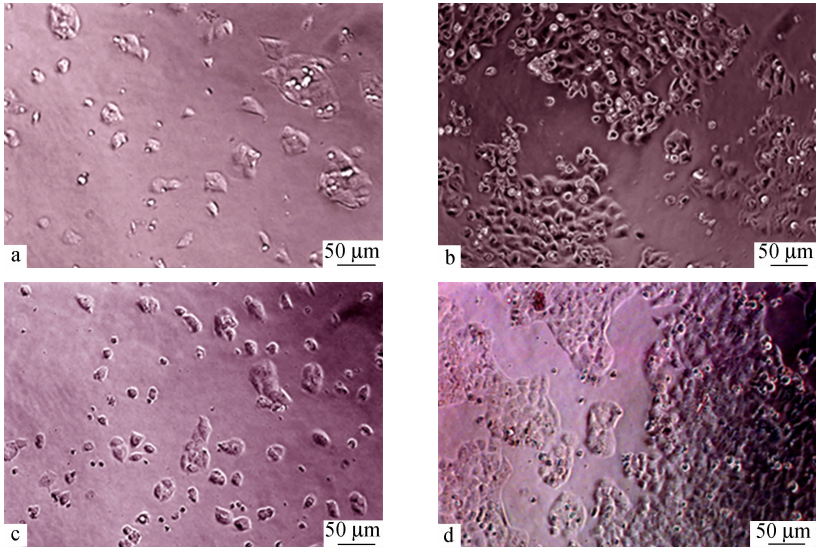


Fig. 5 Images of HL-7702 cells grown on different surfaces: (a), (b) PNIPAAm hydrogel for 3 and 7 days; (c), (d) Gal-CS-*g*-PNIPAAm hydrogel for 3 and 7 days

后,促进了肝细胞的黏附和增殖.图 6(a)和 6(c)中显示部分细胞在凝胶表面未完全伸展,可能是由于种子细胞中存在状态不佳的细胞所致.

2.4 细胞脱附行为研究

图 7 为种植于 Gal-CS-*g*-PNIPAAm 凝胶表面的 HL-7702 细胞,在 37 ℃ 环境下培养 7 天,达到融合状态后降温脱附的过程.从图中可以看到,随低温环境时间的延长,凝胶表面培养的细胞由铺展状态变为圆形(图 7(a)),并从凝胶表面自发脱附(图 7(b)),120 min 后细胞在凝胶表面几乎完全脱附(图 7(c)).这是因为温度低于 LCST (32.5 ℃) 时, Gal-CS-*g*-PNIPAAm 凝胶表面的亲水性增加,而亲水性较大的表面不利于细胞的黏附,细胞可以无损伤脱附.降温脱附的方法可以避免传统酶消化法回收细胞时破坏细胞与细胞之间

Table 2 Contact angles (°) of TCPS, PNIPAAm and GC-*g*-PNIPAAm

Samples	Contact angles(°)	
	<i>T</i> (25℃)	<i>T</i> (37℃)
TCPS	65.5 ± 1.3	67.4 ± 1.6
PNIPAAm	84.8 ± 2.1	115.2 ± 0.8
Gal-CS- <i>g</i> -PNIPAAm	54.8 ± 1.9	83.5 ± 1.1

出,培养 1 天时,细胞在 2 种凝胶表面的增殖差异不大,这是由于细胞进入新环境处于适应期阶段基本不进行分裂增殖,而从第 3 天开始细胞在 GC-*g*-PNIPAAm 凝胶表面的增殖速率明显比细胞在 PNIPAAm 凝胶表面增殖快,这一结果与图 5 所示的结果一致.说明 GC 单体接枝到 PNIPAAm

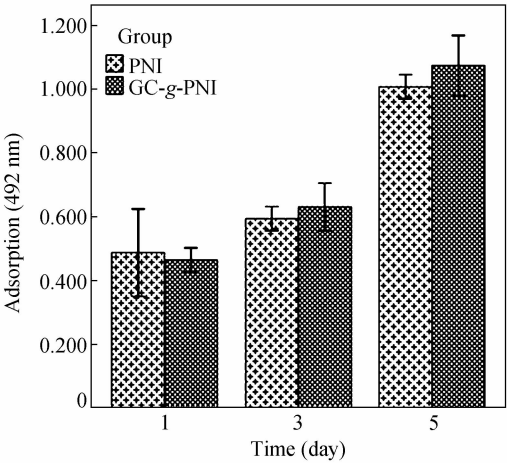


Fig. 6 Proliferation of HL-7702 cells cultured on surfaces of PNIPAAm hydrogel and Gal-CS-*g*-PNIPAAm hydrogel for 1, 3 and 5 days

的连接损害细胞膜表面的离子通道及生长因子受体等细胞膜蛋白,造成细胞功能的损伤。

为了更深入地证明降温脱附法收集细胞优于酶消化法,我们进一步进行了 H&E 染色观察实验。图 8(a)为降温脱附所得细胞 4 h 后重新贴壁形态,图 8(b) 为通过酶消化法所得细胞 4 h 重新贴壁形态。通过观察对比,降温脱附的细胞重新接

种后会快速的贴壁铺展,细胞核和细胞质区分明显。而经酶解法脱附所得细胞由于消化酶的使用,使细胞质收缩,导致细胞短时间内不能迅速贴壁和铺展,细胞核与细胞质不能明显区分。产生这一结果的原因是胰蛋白酶能够水解细胞外基质蛋白和跨膜蛋白,破坏细胞间及细胞与细胞基质间的连接,导致不能快速重新贴壁^[14]。

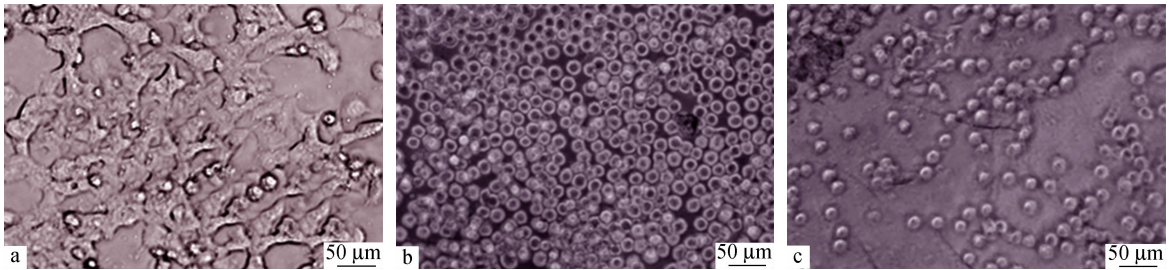


Fig. 7 Photographs of cell morphologies on Gal-CS-g-PNIPAAm hydrogel surface for the process of cell detachment: (a) 10 min, (b) 40 min and (c) 120 min

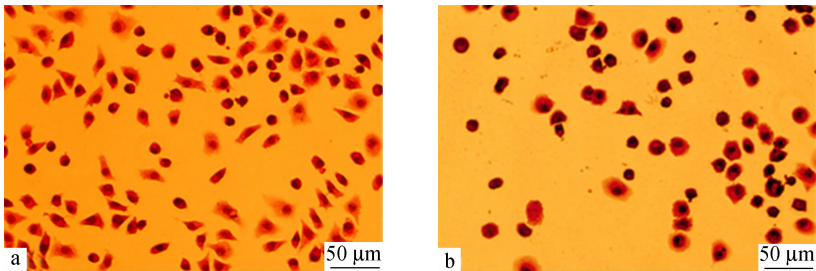


Fig. 8 H&E staining of detached cells: (a) cells detached by lowering temperature and reseeded for 4 h and (b) cells detached by trypsin digestion temperature and reseeded for 4 h

Cells were collected from different methods of detachment. They were then stained with H&E by conventional methods and observed under microscope.

2.5 细胞转栽行为研究

为了考察降温脱附 HL-7702 细胞的活性,进行了细胞转栽实验,检测脱附细胞的重新贴壁增殖活力,并以从 TCPS 板上酶解消化获得的细胞作为对照。由图 9 中细胞转栽培养的结果可知,从 2 种凝胶表面上脱附下来的细胞以及胰酶消化得到的细胞,随着培养时间的延长,细胞数量均逐渐增多。但是从 2 种凝胶表面自发脱附下来的细胞活性明显大于从 TCPS 板上消化得到的细胞活性,这说明,温敏降温脱附完整地保留了细胞的活性,避免了酶解法对细胞造成的损伤。Gal-CS-g-PNIPAAm 上脱附的细胞活性明显大于 PNIPAAm 凝胶表面脱附的细胞活性,说明 GC 单体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增殖活力。

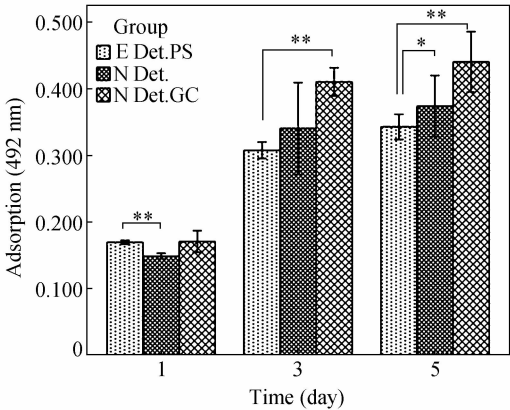


Fig. 9 Comparison of HL-7702 cells transshipment activity: (E Det. PS) E detached cells, (N Det. PNIPAAm) cells detached from PNIPAAm and (N Det. GC) cells detached from Gal-CS-g-PNIPAAm (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

3 结论

将半乳糖基引入到 CS 的结构中制备出温敏性 Gal-CS-*g*-PNIPAAm 共聚水凝胶. Gal-CS-*g*-PNIPAAm 凝胶更有利于 HL-7702 细胞的生长,说明 GC 糖单体的引入不仅改善了 PNIPAAm 水凝胶的生物相容性,而且促进了肝细胞的黏附和增殖. HL-7702 细胞能够在 Gal-CS-*g*-PNIPAAm 共聚

水凝胶表面无损伤脱附. 对自发脱附和酶消化脱附的细胞重新贴壁(再增殖)培养发现,降温脱附的细胞比胰酶消化脱附的细胞再增殖活力更高,而 Gal-CS-*g*-PNIPAAm 共聚水凝胶表面脱附的细胞活力比 NIPAAm 水凝胶脱附的细胞活力高. Gal-CS-*g*-PNIPAAm 水凝胶有望在肝组织工程以及细胞片层工程等方面得到广泛应用.

REFERENCES

- 1 Berthiaume F, Maguire T J, Yarmush M L. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2011, 2: 403 ~ 430
- 2 Ohashi K, Tatsumi K, Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Yoshizato K, Okano T. *Cell Transplantat*, 2012, 21: 429 ~ 436
- 3 Jiankang H, Dichen L, Yaxiong L. *Acta Biomater*, 2009, 5: 453 ~ 461
- 4 Vacanti J P, Langer R. *Lancet*, 1999, 1: 32 ~ 34
- 5 Uygun B E, Uygun K. *Compr Biomater*, 2011, 5: 575 ~ 585
- 6 Yamato M, Okano T. *Mater Today*, 2004, 7: 42 ~ 47
- 7 Sasagawa T, Shimizu T, Sekiya S, Haraguchi Y, Yamato M, Sawa Y, Okano T. *Biomaterials*, 2010, 31(7): 1646 ~ 1654
- 8 Haraguchi K, Takehisa T, Ebato M. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 3267 ~ 3275
- 9 Stile R A, Burghardt W R, Healy K E. *Macromolecules*, 1999, 32: 7370 ~ 7379
- 10 Ito K, Kobayashi J, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. *Biomaterials*, 2006, 27: 3005 ~ 3009
- 11 Dash M, Chiellini F, Ottenbrite R M. *Prog Polym Sci*, 2011, 36: 981 ~ 1014
- 12 Duan C X, Gao J, Zhang D R. *Biomacromolecules*, 2011, 12: 4335 ~ 4343
- 13 Jiang H L, Kim Y K, Lee S M, Park M R, Kim E U, Jin Y M, Arote R, Jeong H J. *Gene Ther*, 2007, 14: 1389 ~ 1398
- 14 Agnihotri S A, Mallikarjuna N N, Aminabhavi T M. *J Control Release*, 2004, 100: 5 ~ 28
- 15 Lin C C, Anseth K S. *Pharm Res*, 2009, 26: 631 ~ 643
- 16 Chen Li(陈莉), Li Shigeng(李世庚), Xiao Fei(肖飞), Zhang Aihua(张爱华), Yao Kangde(姚康德). *Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 2008, 29(5): 1061 ~ 1064
- 17 Cho C S, Seo S J, Park I K, Kim S H, Kim T H, Hoshiba T, Harada I, Akaike T. *Biomaterials*, 2006, 27: 576 ~ 585
- 18 He Xiaoling(贺晓凌), Wang Jinyan(王金燕), Xiao Fei(肖飞), Chen Li(陈莉). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2009, (12): 1274 ~ 1281
- 19 Wang J Y, Xiao F, Zhao Y P, Chen L, Zhang R, Guo G. *Carbohydr Polym*, 2010, 82: 578 ~ 584
- 20 Yang N, Chen L, Yang M K, Bi S X, He X L, Zhu Z Y, Yu M L. *Carbohydr Polym*, 2012, 88: 509 ~ 516
- 21 Duan C X, Zhang D R, Wang F H, Zheng D D, Jia L J, Feng F F, Liu Y, Wang Y C, Tian K L, Wang F S, Zhang Q. *Int J Pharm*, 2011, 409: 252 ~ 259

THERMO-SENSITIVE GALACTOSYLATED CHITOSAN-*g*-
POLY(*N*-ISOPROPYLACRYLAMIDE) HYDROGELS
AND THEIR EFFECTS ON HL-7702 CELLS' BEHAVIORS

Si-xin Bi¹, Ning Yang¹, Miao-kun Yang¹, Xiao-ling He¹, Qing-song Zhang¹, Li Chen¹,
Zheng-yan Zhu², Ying-tang Gao², Zhi Du²

(¹ *Tianjin Key Laboratory of Fiber Modification and Functional Fiber, School of Materials Science and Engineering,
Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387*)

(² *Key Laboratory of Regenerative Medicine, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170*)

Abstract The galactosylated chitosan (GC) was synthesized by the reaction of the amino group of chitosan and carboxyl group of lactobionic acid under the activation of 1ethyl3-(3dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHS). Subsequently, thermo-sensitive galactosylated chitosan-*graft*-poly(*N*-isopropylacrylamide) (Gal-CS-*g*-PNIPAm) hydrogels were prepared *via* free radical polymerization method. The chemical composition and structure of the novel copolymer obtained were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and scanning electron microscopy (SEM), respectively. Thermo-sensitive feature of the hydrogel was studied by measuring its swelling ratio and contact angle. The results showed that Gal-CS-*g*-PNIPAm hydrogels exhibited good temperature response. HL-7702 cell behaviors such as proliferation, detachment and cell transfer were carefully investigated *via* cell culture on the surface of Gal-CS-*g*-PNIPAAm hydrogels *in vitro*. The results indicated that Gal-CS-*g*-PNIPAAm hydrogel exhibited a good biocompatibility. HL-7702 cells cultured on this hydrogel surface proliferated better than on the PNIPAAm hydrogel. Besides, HL-7702 cells could spontaneously detach from the surface of the Gal-CS-*g*-PNIPAAm hydrogel by lowering the temperature below the LCST (32.5 °C), and the detached cells showed less damage than those detached by enzymes from TCPS. Meanwhile, cells detached from Gal-CS-*g*-PNIPAAm hydrogel showed higher viability than those from the PNIPAAm hydrogel, suggesting that introduction of GC monomer to PNIPAAm hydrogel evidently improved the activity of the detached cells.

Keywords Gal-CS-*g*-PNIPAAm hydrogel, Thermo-response HL-7702 cells line, Detachment, Cell transshipment