

血清蛋白质对选择性剥离鼠成纤维细胞的影响*

关燕清

(华南师范大学生物技术研究所 广州 510631)

摘 要 探讨血清对细胞剥离的影响. 将温度应答性高分子聚(*N*-异丙基丙烯酰胺/丙烯酸)的叠氮苯胺的衍生物(AzPhPIA)条纹状地光固定在组织培养聚苯乙烯(PS)板上, 并对鼠成纤维细胞(STO)血清培养2h. 温度低于最低临界温度(LCST), 粘附在AzPhPIA-PS上的细胞不能很好地剥离. 选用血清中两种典型蛋白质-白蛋白和纤维粘连蛋白, 模拟血清进行细胞粘附和剥离实验. 结果表明, 纤维粘连蛋白在基板上全面而均匀地附着, 从而加强了细胞与基板表面的粘附性, 使细胞在低温时不易剥离; 白蛋白在基板上的附着是条纹状的, AzPhPIA-PS表面附着白蛋白少, 这说明是由于温度应答性高分子表面亲水性提高, 高分子链伸展而不是白蛋白的阻碍作用引起细胞的脱落. 另外, 表面分析结果表明, 蛋白质的吸收并不影响AzPhPIA-PS材料表面的可湿性.

关键词 温度应答性, 光固定, 细胞的选择性剥离, 血清蛋白质, 荧光标记

近年, 为了精密控制各种各样细胞的机能(例如, 细胞的接着、剥离、成长、分代、代谢等), 有关具有机能性表面人工基材开发的研究十分活跃.

Okano等^[1,2]及陈国平等^[3]报告了将温度应答性高分子聚异丙基丙烯酰胺(Poly(*N*-isopropyl-acrylamide))固定在组织培养聚苯乙烯材料上, 利用温度的变化进行细胞的剥离, 从而实现细胞的回收. 这种利用温度应答性高分子来回收细胞的方法与以往所使用的胰蛋白酶等方法相比较, 是一种既不损伤细胞, 又简单有效的回收方法. 另外, 将材料表面加工成图形状, 用来控制细胞粘附的尝试研究也有报道^[4,5].

1997年, 我们报道了利用具有光活性的温度应答性高分子聚(*N*-异丙基丙烯酰胺/丙烯酸)叠氮苯胺的衍生物(AzPhPIA)有选择性地控制细胞剥离(无血清培养STO细胞)的研究工作^[6]. 由于在PIA上接上了疏水性的叠氮苯基(AzPh-), LCST从38.5℃下降到21.5℃, 比聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)的32℃还低, 能很好地应用在细胞无血清培养后的细胞回收中. 本文将继续探讨比较复杂的血清培养基中STO细胞的剥离, 来评价温度应答性高分子AzPhPIA能否应用在血清培养后的细胞回收中, 并用典型的两种血清蛋白模拟血清系统, 研究血清对细胞剥离的影响.

1 实验部分

1.1 材料

光反应性的温度应答性高分子AzPhPIA(LCST21.5℃)是用叠氮苯胺盐酸盐(4-Azidoaniline hydrochloride)与*N*-异丙基丙烯酰胺和丙烯酸的共聚物PIA(LCST38.5℃)

* 1998-06-14 收稿, 1998-10-31 修稿

合成的^[6]. 其结构式如图 1 所示.

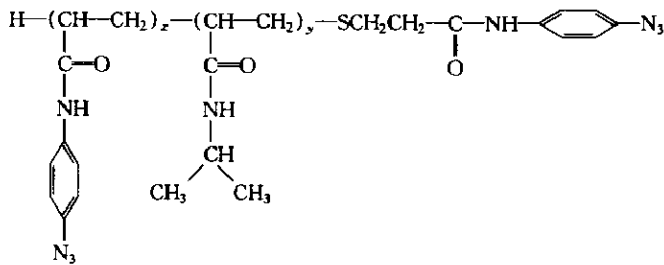


Fig. 1 The structure of AzPhPIA

光掩护罩分别是从 Wako Pure Chem. Ind. Ltd. 和 Nippon Filcon Co., Ltd. (Osaka, Japan) 购买. 组织培养聚苯乙烯皿及 12-well 培养皿是从 Akita Sumitomo Bake Co. (Akita, Japan) 购买.

牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin) 和纤维粘连蛋白 (Fibronectin) 分别是 from Intergen Co. (Purchase, NY) 及 Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan) 购得.

异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate) 和罗达明 B 荧光素 (Rhodamine Bisothiocyanate) 由 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) 提供.

1.2 光固定

光固定的过程如图 2 所示.

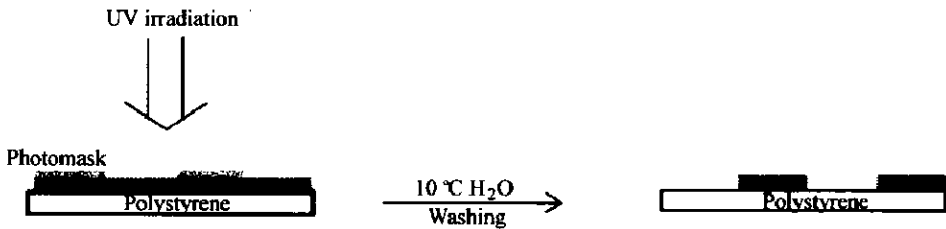


Fig. 2 Procedure of photo-lithography using AzPhPIA

从组织培养聚苯乙烯皿上切割下 2cm² 的基板后, AzPhPIA 的水溶液 (1mg/mL, 0.05mL) 被涂覆在其上, 并在室温下风干. 基板表面覆盖条纹状光掩护罩, 在紫外灯 (Koala, 100W) 下 5cm 处, 照射 10s. 活泼的叠氮基在紫外光线照射下, 能迅速夺取氢, 通过 N—C 键连接 AzPhPIA 与 PSt. 用 10℃ 的蒸馏水洗涤基板 (没有发生光反应的 AzPhPIA 溶解在水里), 直至洗出液中 AzPhPIA 的紫外吸收为零.

位相差显微镜 (Olympas IM) 分别观察 37℃ 和 10℃ 时的基板表面.

1.3 基板的前处理

基板于 12-well 聚苯乙烯培养皿中用 70% 乙醇灭菌 5min 后, 蒸馏水洗涤并风干, 加入含 10% 小牛血清 DEME 培养基、含纤维粘连蛋白 (0.05mg/mL) 及牛血清蛋白 (0.05mg/mL) 的 PBS (–) 溶液各 2mL, 在 37℃, 5% CO₂ 气氛下, 对基板进行 2h 的前处理, 使基板表面覆盖一层蛋白质. 前处理后将蛋白质溶液弃去.

1.4 细胞培养

继代培养的鼠成纤维细胞 STO 用 EDTA(0.02wt%) 和胰蛋白酶(0.25wt%) 的 PBS 溶液处理后, 离心沉降并依次用血清培养基和无血清培养基洗净, 加入无血清 DEME 培养基得到 1×10^6 cells/mL STO 细胞悬浮液. 取此悬浮液 0.1 mL 及 1.9 mL DEME 培养基加入 12-well 聚苯乙烯培养皿中(内有基板), 种植细胞后, 在 37°C , 5% CO_2 气氛下培养 2h. 然后, 保持培养基不变将培养皿在 10°C 的培养箱里放置 30min, 再更换新培养基. 温度变化前后基板表面的细胞用位相差显微镜(Olympas IM)观察.

1.5 荧光标记蛋白质的合成及可视化

异硫氰酸荧光素(Ex: 495nm, Em: 520nm, MW389.39) 和罗达明 B 荧光素(Ex: 554nm, Em: 578nm, MW536.10) 各 1mg, 分别与牛血清白蛋白(MW66,000)100mg 及纤维粘连蛋白(MW200,000~250,000)300mg, 在 10mL, pH9 磷酸缓冲液中, 室温下搅拌反应 2h. 用透析膜(MW1,0000)除去未反应的荧光素, 得到荧光标记蛋白质. 将这些蛋白质按前述的方法覆盖在基板上, 在荧光显微镜(Olympas IX70)下观察.

1.6 表面分析

测量覆盖各种蛋白质的基板及原始聚苯乙烯材料表面上空气泡的接触角, 可以了解蛋白质的附着对基板表面可湿性的影响. 测量前, 两类材料都在 37°C 及 10°C 的温度下放置 24h.

2 结果与讨论

2.1 光固定后的基板表面

在 37°C 和 10°C 时, 对基板表面的观察结果如图 3 所示.

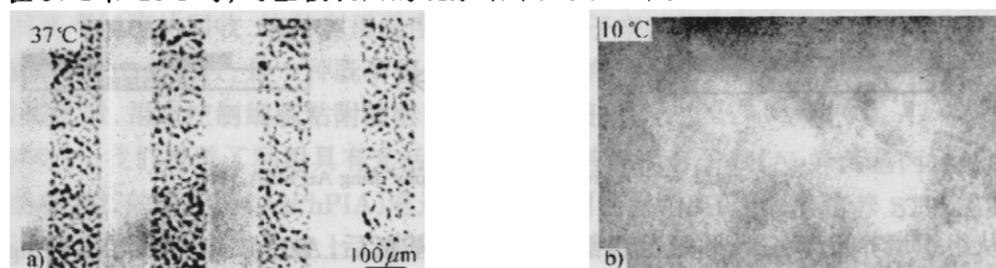


Fig. 3 PSt plate with AzPhPIA immobilized in a specific pattern at 37°C and 10°C

由图 3 可知, 光固定后的基板表面在 37°C 时呈现与光掩护罩相应的条纹图案, 而在 10°C 时条纹图案消失. 这是由于温度下降到 AzPhPIA 的 LCST(21.5°C) 以下时, 基板表面的温度应答性聚合物亲水性增强并溶解, 高分子链处于伸展状态所造成的.

2.2 血清培养基中 STO 细胞的剥离

图 4 为血清培养 STO 细胞的剥离与无血清培养剥离情况进行比较.

无血清培养的情况如图 4a, 4b 所示, AzPhPIA 聚合物上的细胞被剥离. AzPhPIA-PSt 和 PSt 表面分析^[6]的结果, AzPhPIA 聚合物的 LCST 以上温度(37°C)时, 两种表面的接触角都为 58° 左右, LCST 以下温度(10°C)时, AzPhPIA-PSt 的接触角大约为 30° , 而 PSt 表面接触角没有改变. 表面分析的结果证明, 低温时只有 AzPhPIA-PSt 表面亲水性增大, 细

胞的粘附性降低,所以 AzPhPIA-PS_t 表面上的细胞被剥离,表现出图 4b 的条纹图案。

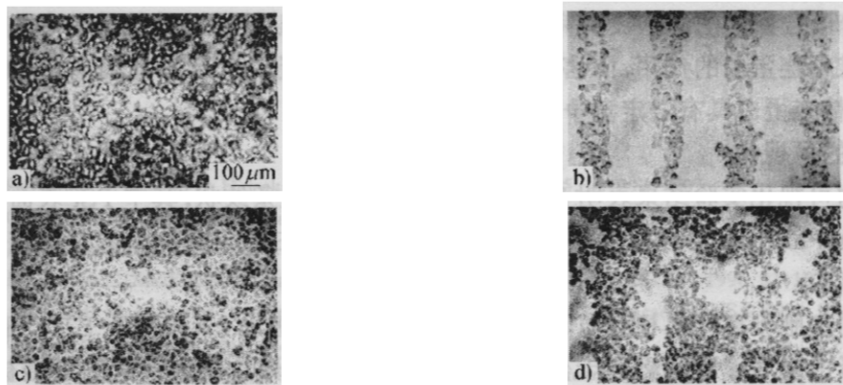


Fig. 4 The detachment of STO cells in serum-free culture(a, b) and serum culture(c, d)

血清培养的情况如图 4c, 4d 所示, 与无血清培养后剥离结果相比较, AzPhPIA-PS_t 表面上的细胞也没有完全剥离. 我们认为, 这可能是基板表面上附着的各种各样蛋白质对细胞的粘附、剥离的影响所造成. 例如, 血清蛋白质中的血清白蛋白是血清中含量最大的蛋白质, 对细胞的粘附、伸展都有阻害作用. 而纤维粘连蛋白是血清中具有与血清白蛋白相反作用的蛋白质, 它对细胞的粘附起促进作用. 这样, 由于血清培养基中存在各式各样的蛋白质, 基板表面上蛋白质的附着机制非常复杂^[7,8]. 因此, 在本研究中, 我们将取两种典型蛋白质-血清白蛋白和纤维粘连蛋白模拟血清蛋白质系统, 对细胞的剥离进行研究.

2.3 蛋白质对 STO 细胞剥离的影响

在图 5a, 5b 中, 基板上首先吸附了纤维粘连蛋白(FN), 细胞经过 2h 培养后, 10℃ 时不能被剥离. 这说明纤维粘连蛋白的存在, 导致细胞和基板表面的粘附性增加.

从图 5c, 5d 可知, 在另一种血清蛋白质-血清白蛋白(用牛血清白蛋白 BSA 表示)的存在下, AzPhPIA-PS_t 表面上的细胞犹如经无血清培养一般, 完全被剥离了.

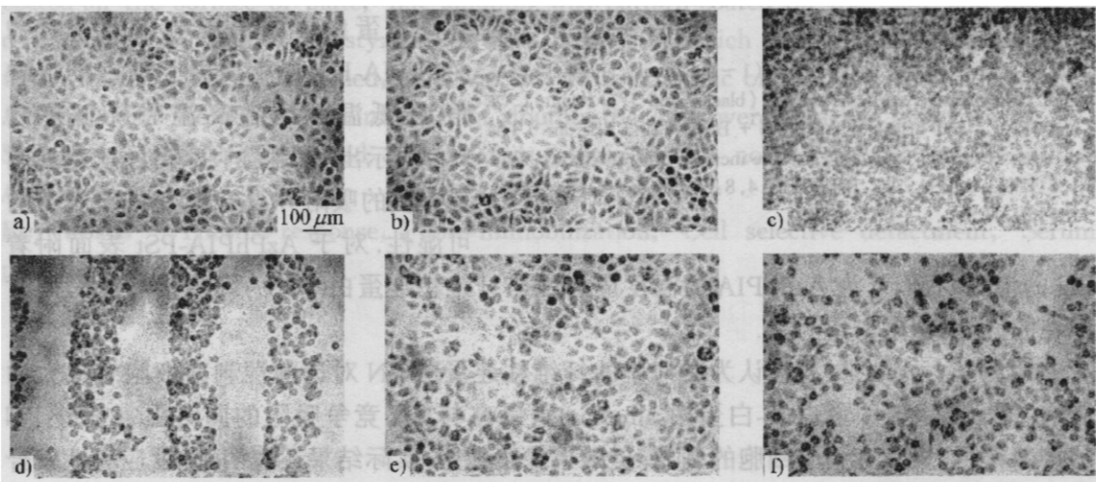


Fig. 5 Effects of serum protein on cells detachment FN(a, b), BSA(c, d), FN + BSA(e, f)

模仿血清进行蛋白质 BSA 与 FN 竞争吸附后的细胞剥离结果(图 5e, 5f)表明, AzPhPIA-PS_t 聚合物上的细胞没有完全被剥离. 由此, 我们认为是血清培养基中的粘附蛋白质——纤维粘连蛋白的作用, 阻害了细胞剥离. 血清白蛋白对选择性剥离细胞没有影响, 而对纤维粘连蛋白具有一定竞争吸附作用.

2.4 蛋白质的可视化

蛋白质的可视化实验结果表明 BSA 在基板上的附着呈条纹状, 其中 PS_t 表面上 BSA 的附着量较 AzPhPIA 聚合物表面多. 然而, 基板上接着蛋白质 FN 的附着却比较均匀全面.

与前面的细胞剥离结果相对照, 吸附蛋白质 BSA 的基板上 2 h 培养后 STO 细胞的剥离情况与无蛋白质培养后的剥离十分相似, 只有 AzPhPIA 聚合物表面上的细胞被剥离. 由于蛋白质 BSA 在 AzPhPIA 聚合物上的附着很少, PS_t 表面上附着多, 我们认为 AzPhPIA 聚合物上细胞被剥离的原因不是 BSA 的阻害作用, 而是低温时基板表面 AzPhPIA 聚合物的亲水性提高, 高分子链伸展引起细胞接着性下降造成的. 另外, 根据前面的研究可知, 吸附接着蛋白质 FN 的基板上细胞培养后, 不能依靠降低温度来剥离细胞. 而蛋白质的可视化实验结果表明接着蛋白质 FN 是全面吸附的, 因此, 我们认为接着蛋白质 FN 的存在使细胞与基板的接着性增加, 从而影响了细胞剥离.

2.5 表面分析

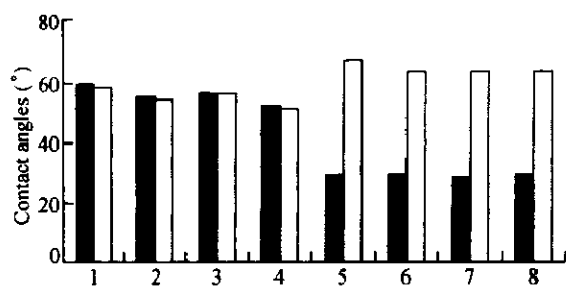


Fig. 6 Water contact angles of PS_t(1~4 columns) and AzPhPIA-PS_t(5~8 columns) surfaces at 10°C (black) and 37°C (white). (1 and 5 FN; 2 and 6 BSA; 3 and 7 FN + BSA; 4 and 8 Serum.) The decrease of contact angle indicates the increase of surface wettability 1, 5: FN; 2, 6: BSA; 3, 7: FN + BSA; 4, 8: Serum (1~4, PS_t; 5~8, AzPhPIA-PS_t)

图 6 为 10°C 及 37°C 时, 覆盖有各种蛋白质的基板 (PS_t 及 AzPhPIA-PS_t) 表面上空气泡的接触角:

从图 6 可知, 吸附有各种蛋白质的组织培养聚苯乙烯 PS_t 基板表面上气泡的接触角在两种温度下基本保持不变, 说明对温度不具有应答性; 吸附有各种蛋白质的温度响应性聚合物 AzPhPIA-PS_t 基板表面上气泡的接触角, 在低温时比在高温时降低了约 33°, 显示出对温度的应答性. 这也说明蛋白质的吸附并没有改变材料表面的可湿性. 对于 AzPhPIA-PS_t 表面附着

FN 的情况, 我们认为 AzPhPIA 的温度应答性与纤维粘连蛋白 FN 的细胞接着性是同时存在的, 但以粘附作用为主.

综合以上的结果, 我们认为血清中的纤维粘连蛋白 FN 对选择性剥离细胞有很大的影响, 另一类主要的蛋白质——白蛋白 albumin 可以在与 FN 竞争吸附的同时阻害部分 FN 的接着作用, 从而有利于细胞的剥离, 但效果并不理想. 实际结果还表明, 温度应答性聚合物 AzPhPIA-PS_t 基板表面可湿性变化不因蛋白质的吸附而改变, 但聚合物长链的伸展作用弱于纤维粘连蛋白 FN 与细胞膜上的粘附受体——Integrin^[9] 家族的相互作用 (FN 与其它接着性蛋白质一样, 具有共同的 Arg-Gly-Asp (RGD) 氨基酸序列, 粘附、伸展以及成长

这些信号就是由于 integrin 家族对 RGD 序列的识别传达到细胞内部^[9]。由以上讨论可知,细胞培养工程中使用温度应答性高分子 AzPhPIA 材料替代胰蛋白酶等方法回收细胞,在血清培养的情况下,尚有一定的局限性。

REFERENCES

- 1 Teruo O, Noriko Y, Minako O, Hideaki S, Yasuhisa S. *Biomaterial*, 1995, 16:297~303
- 2 Teruo O, Noriko Y, Hideaki S, Yasuhisa S. *J Biomed Mater Res*, 1993, 27:1243~1251
- 3 Chen G, Ito Y, Imanishi Y. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 53:339~344
- 4 Mrksich M, Chen C, Xia Y, Dike L, Ingber D, Whitesides G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:10775~10778
- 5 Spargo B, Testoff M, Nielsen T, Stenger D, Hickman J, Rudolph A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:11070~11074
- 6 Ito Y, Chen G, Guan Y, Imanishi Y. *Langmuir*, 1997, 13:2756~2759
- 7 Minhua F, Antonia B, Andre P, Tom B, Adriaan B. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 1995, 7:415~424
- 8 Akihiko K, Hikaru T, Teiji T, Masao H, Kazunori K. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 1996, 8:77~90
- 9 Ruoslahti E, Pierschbacher D. *Science*, 1987, 238:491~497

EFFECTS OF SERUM PROTEIN ON STO CELLS SELECTIVE DETACHMENT

GUAN Yanqing

(*Biotechnology Research Institute, South China Normal University, Guangzhou 510631*)

Abstract The synthetic thermo-responsive polymer azidoaniline-coupled poly(*N*-isopropylacrylamide/acrylic acid)(AzPhPIA) was photo-immobilized on Polystyrene Culture Plates. On the plates, STO cells were cultured for two hours. Under the low critical solution temperature (LCST 21.5°C), detachment experiment showed the cells which were cultured on the thermo-responsive polymer could not be detached completely as the serum-free cell culture. For investigating the effects of serum, we chose two serum protein (albumin and fibronectin) for cell attachment and detachment. The results showed that fibronectin was coated all the surface of plate, but albumin was pattern-coated on the plate and liked to coated on the surface of polystyrene. It was fibronectin which increased cell attachment so that cells could not be detached, and was due to hydrophilic of thermo-responsive polymer AzPhPIA not the attachment influence of albumin that cells were detached under the LCST. Surface analysis demonstrated that coated protein would not affect the wettability of AzPhPIA.

Key words Thermo-response, Photo-immobilization, Cell selective detachment, Serum protein, Fluorescence labeling