

综述

聚 N-异丙基丙烯酰胺细胞培养平台的研究进展

杨磊¹, 刘天庆², 范晓光³, 王菲¹, 李政¹

1 辽宁石油化工大学环境与生物工程学院, 辽宁 抚顺 113001

2 大连理工大学大连市干细胞与组织工程研发中心, 辽宁 大连 116024

3 中国石油抚顺石化分公司, 辽宁 抚顺 113008

杨磊, 刘天庆, 范晓光, 等. 聚 N-异丙基丙烯酰胺细胞培养平台的研究进展. 生物工程学报, 2015, 31(2): 172-182.

Yang L, Liu TQ, Fan XG, et al. Advances in poly (N-isopropylacrylamide) based platforms for cell culture. Chin J Biotech, 2015, 31(2): 172-182.

摘要: 聚 N-异丙基丙烯酰胺 (poly(N-isopropylacrylamide), PNIPAAm), 温敏性聚合物, 可利用其温敏特性替代酶类物质或细胞刮刀用于贴壁细胞的收获, 从而有效避免酶解和机械损伤, 可为生物医药领域提供品质优良的种子细胞。重点阐述促进细胞有效粘附和快速脱附的温敏性 PNIPAAm 二维平面的研发情况, 包括选取特殊基材、引入亲水基团、调节反应物比率、控制聚合物厚度/密度、提供适宜外力等方式, 从而有效改善细胞对温敏性平面的适应性并降低染菌风险以及减少低温处理对细胞的影响。同时介绍 PNIPAAm 微载体、支架和凝胶等温敏性三维培养介质的研究进展, 此方式不仅增加细胞生长面积, 更可以模拟体内微环境, 从而保持细胞原始生理特征, 同时实现大规模扩增和非酶解收获细胞以及组织器官修复和重构的目标。最后简单说明 PNIPAAm 培养平台的应用, PNIPAAm 的研发为再生医学的发展提供了崭新思路。

关键词: 聚 N-异丙基丙烯酰胺, 温敏性聚合物, 细胞培养介质, 干细胞, 细胞片层工程

Received: April 14, 2014; **Accepted:** September 1, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31170945).

Corresponding author: Lei Yang. Tel: +86-24-56861705; E-mail: leiyang1982@yahoo.com

国家自然科学基金 (No. 31170945) 资助。

网络出版时间: 2014-09-24

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140226.html>

Advances in poly (N-isopropylacrylamide) based platforms for cell culture

Lei Yang¹, Tianqing Liu², Xiaoguang Fan³, Fei Wang¹, and Zheng Li¹

¹ School of Environmental and Biological Engineering, Liaoning Shihua University, Fushun 113001, Liaoning, China

² Dalian R&D Center for Stem Cell and Tissue Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

³ Fushun Petrochemical Company, China National Petroleum Corporation, Fushun 113008, Liaoning, China

Abstract: Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm), a temperature-responsive polymer, can be potentially applied to replace enzymes or cell scrapers to recover attached cells. Taking full advantage of this unique function of PNIPAAm, cells can be protected from enzymatic hydrolysis and mechanical treatment, thereby to provide ideal seed cells with high quality for biomedical fields. In this review we describe the method to facilitate cell effective adhesion and rapid detachment on thermoresponsive two dimensional surfaces, including selecting special substrate, introducing hydrophilic group, adjusting reactant ratio, controlling polymer thickness/density, providing appropriate external force, so as to effectively improve adherent cell adaptability to thermoresponsive surfaces, depress the risk of bacterial contamination and reduce the effect of low-temperature treatment on the cells. The three dimensional cell culture systems involved in temperature-sensitive microcarriers, scaffolds and gels were briefly discussed. The application based on the platforms for cell culture was also presented.

Keywords: poly (N-isopropylacrylamide), temperature-responsive polymer, cell culture substrate, stem cell, cell sheet engineering

在材料表面良好粘附对体外培养的贴壁细胞十分重要, 将影响其迁移、增殖、分化等生理活动, 同时从培养基底有效脱附也是细胞繁衍后代和维持性状的必要过程。目前常用的细胞回收方式包括酶解法和机械法, 但此二法均在某种程度损伤膜蛋白致使细胞功能缺失。为了向生物医药领域提供品质优良的种子细胞, 有必要采用非酶解非机械方式将细胞与培养表面分离。研究表明温敏型聚合物 PNIPAAm 可有效替代传统方法进行细胞回收, 主要利用其自身具有随温度变化而呈现表面和整体性质转换的特性来控制细胞粘附抑或脱附。采用此种收获方式, 细胞伴随完整膜蛋白和粘附蛋白共同脱离, 同时细胞间连接蛋白也未遭受破坏。因此, 运用 PNIPAAm 的降温回收法与传统收获方法相比, 能够保持细胞更强的生长特性或分化潜

能。本文将综述近年来以 PNIPAAm 为主体的温敏性二维、三维细胞培养平台的研发及应用情况。

1 温敏性 PNIPAAm 二维平面

20 世纪 90 年代初, 日本学者 Okano 团队^[1]首次将 PNIPAAm 用于细胞培养和收获过程。他们采用电子束照射的方式将 NIPAAm 单体聚合接枝于聚苯乙烯培养皿, 使材料表面具有温敏特性, 当温度高于最低临界溶液温度 (Lower critical solution temperature, LCST) 时其表面呈现疏水性, 而温度降低时则转化为亲水性, 接种于此智能表面的细胞仅通过变温调节就可控制其粘附生长或脱附回收。至此开创了温敏性材料用于细胞培养的新纪元。我们采用自由基聚合法以 NIPAAm、甲基丙烯酸羟丙酯 (HPM) 和甲基丙烯酸 (3-三甲氧基硅) 丙酯 (TMSPM)

为原料合成了 P(NIPAAm-co-HPM-co-TMSPM) 共聚物, 然后采用旋转涂膜法和真空退火法在盖玻片上形成共聚物膜, 并且成功地将它们应用于细胞的培养和非酶解收获过程^[2-3]。

早期研究表明虽然温敏性培养介质可实现贴壁细胞的自发脱附, 但由于细胞完全覆盖基底表面, 使 PNIPAAm 类材料在降温处理过程只能从边缘向中心区域逐步发生水合作用, 导致细胞完全脱附达数小时之久, 这一方面增加了细胞染菌的风险, 另一方面难以评估长时间暴露于低温环境对细胞造成的影响。因此, 研究人员努力寻求促进细胞有效粘附和快速脱附的温敏性 PNIPAAm 二维平面。

1.1 选取特殊基材

将 PNIPAAm 接枝或涂覆于特殊基材表面, 如亲水性的聚合物层或通透性良好的多孔膜, 可使降温溶液在基材边缘和底部同步渗透, 加速 PNIPAAm 的水合作用, 从而促进细胞的快速脱附。Akiyama 等^[4]在 PNIPAAm 与培养板之间引入亲水性聚丙烯酰胺, 降温过程中间层的快速水合加速了细胞或细胞片层的脱附速率。Kwon 等^[5]采用聚(对苯二甲酸乙二醇酯)多孔膜作为 PNIPAAm 接枝的基底材料, 结果表明无论分散细胞还是细胞片层从温敏性多孔膜完全脱附的时间均少于从纯 PNIPAAm 表面分离的时间。Oh 等^[6]将 PNIPAAm 接枝于聚苯乙烯纳米纤维垫, 结果表明人成纤维细胞在其上的脱附速率远大于在 PNIPAAm 接枝聚苯乙烯培养皿的速率。

1.2 引入亲水基团

亲水性物质的加入可促使温敏性材料降温过程的快速水合从而减少细胞完全脱附的时间, 同时引入亲水链段会提升温敏性聚合物的

LSCT, 因此无需过度降温就可达到优越的细胞脱附效果。Ebara 等^[7]在 PNIPAAm 合成过程引入 2-羧基异丙基丙烯酰胺, 用于牛主动脉内皮细胞的快速脱附, 结果显示在 20 °C 绝大部分细胞在 60 min 内从共聚物表面脱离, 而粘附在纯 PNIPAAm 表面上的细胞仅处于起始脱附阶段。Liu 等^[8]考察 L929 细胞在 PNIPAAm-聚乙二醇(PEG) 纳米复合水凝胶上的生长和脱附情况, 结果表明细胞在温敏性水凝胶上增殖状态良好并未受到亲水组分的影响, 且在降温处理时展现快速的脱附能力。Kim 等^[9]将高度吸湿性聚合物聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)(HEMA) 和 PNIPAAm 共同接枝于细胞培养板, 并与常规 PNIPAAm 接枝培养板比较, 结果表明细胞从 PHEMA-PNIPAAm 接枝培养板全部脱附时间仅为 13 min, 而对照组则需 75 min。Wang 等^[10]将 NIPAAm、丙烯酸和壳聚糖合成新型的温敏性凝胶, 壳聚糖的加入可促进细胞粘附, 而丙烯酸的引入则加快细胞的脱附速率。上述结果证实温敏性终产物中的羟基、羧基、酯基等基团确为细胞的快速脱附提供了良好的亲水环境。我们同样在聚合物制备过程引入亲水性 HPM 成分, 结果表明不同类型细胞均可在 10 min 内从各自适宜的 P(NIPAAm-co-HPM-co-TMSPM) 共聚物膜完全脱附。

1.3 调节反应物比率

生物材料的化学组成会影响其结构和性质, 如表面润湿性、粗糙度、溶胀性能、机械强度等, 从而波及细胞各项生理活动。PNIPAAm 与功能成分(如亲水性、促粘附、带电荷物质等)之间的比例, 以及材料整体呈现的电荷极性、密度和 LCST 等参数均会影响细胞的粘附和脱附, 所以需要通过系列实验来确定最佳反应物

混合比率。Ohya 等^[11]制备具有不同接枝密度的 PNIPAAm-明胶水凝胶,用于确定最佳反应物混合比率 (P/G)。人脐带血静脉上皮细胞可粘附和铺展于具有较高 P/G 的水凝胶,因为此水凝胶表面更为粗糙且具备较高的机械强度,同时互穿微孔可促进营养物质的扩散。Kong 等^[12]考察 PNIPAAm 与亲水性[3-(甲基丙烯酰胺基)丙基]-二甲基(3-硫代丙基)氢氧化铵内盐的比例对 NIH3T3 细胞粘附和脱附的影响,结果证明最优反应物配比为 75 : 1。Liu 等^[13]将 NIPAAm 和带电单体合成纳米复合凝胶。结果表明 L929 细胞的增殖与电荷极性和密度相关,含有小于 5% 甲基丙烯酸-N,N-二甲基氨基乙酯的阳离子凝胶可促进细胞增殖,而含有 2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸钠的阴离子凝胶相对抑制细胞生长;降温处理后,细胞可从含有 1% 离子单体的复合凝胶快速脱附,但更高单体含量制备的表面却不再支持细胞的快速脱附,这可能是溶胀效果不佳或静电吸引增强所致。

我们研究的最终目的是制备温敏性聚合物膜,实现贴壁细胞在其上的粘附和降温脱附。选用聚合-涂覆二步成膜方案,合成的终产物作为聚合物膜的前体,其组分的选择和比例的控制都要利于温敏性聚合物膜的制备和性能的调整。分别选取 NIPAAm、TMSPM 和 HPM 三种双键类单体,采用自由基聚合法将三者合成新型的 P(NIPAAm-co-HPM-co-TMSPM) 共聚物。图 1 展示了共聚物分子结构中的功能基团和反应基团^[14]。

NIPAAm 作为主体反应物,在终产物中占用足够比例,可有效维持 PNIPAAm 的温敏特性,酰胺键和异丙基键作为共聚物膜的功能基团

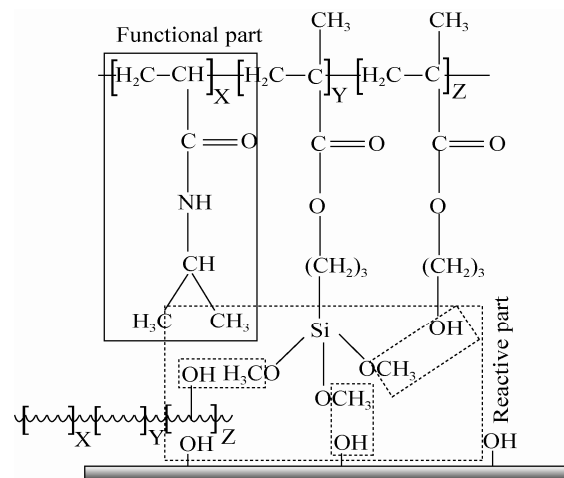


图 1 P(NIPAAm-co-HPM-co-TMSPM)共聚物分子结构的功能基团(实线)和反应基团(虚线)^[14]
Fig. 1 Functional part (Solid line) and reactive part (Dashed line) within the molecular structure of P(NIPAAm-co-HPM-co-TMSPM) copolymer^[14].

(实线标注),用以实现细胞在其上的有效粘附和降温脱附,所以选取 90% 的摩尔比例。TMSPM 作为硅烷交联剂,在共聚物合成过程相对稳定,但在高热或辐照条件下可创建共聚物与含有羟基基团的链接, TMSPM 的添加量一般为 5%。HPM 组分可为共聚物分子链间的键合提供羟基。硅氧烷键和羟基作为共聚物中的反应基团(虚线标注),在共聚物膜形成过程中, TMSPM 既可与基底的羟基发生脱甲醇反应,又可与自身或其他分子链的羟基产生键合,从而实现共聚物与共聚物之间,共聚物与基底之间的同时链接。此外,亲水性 HPM 的添加利于共聚物膜在降温过程的快速水合,从而加速细胞的脱附速率,但过多添加 HPM,培养表面过强的亲水性则不利于细胞粘附,所以选用适宜的添加量 5%,即完成共聚物与共聚物之间,共聚物与基底之间的同时链接即可。综上, NIPAAm、

TMSPM 和 HPM 的摩尔比为 18 : 1 : 1。后续结果表明采用此比例制备的 P(NIPAAm-co-HPM-co-TMSPM) 共聚物膜具有良好的温敏性、稳定性、可控性及快速响应性等, 且可用于贴壁细胞的培养与收获。

1.4 控制聚合物厚度/密度

尽管经由等离子体处理获得的 PNIPAAm 表面, 细胞附着不受其聚合物厚度/密度的制约, 但采用电子束或紫外线照射、原子转移自由基聚合以及可逆加成-断裂链转移聚合等方式制取的 PNIPAAm 基底, 其聚合物厚度/密度则会影响细胞的粘附和脱附。Li 等^[15]制备具有厚度梯度的 PNIPAAm 膜层, 结果表明具有 20–45 nm 厚度的温敏性膜适宜 HepG2 细胞在 37 °C 粘附和 24 °C 脱附。Takahashi 等^[16]采用调节链转移剂二硫代酯的浓度和可逆加成-断裂链转移聚合技术调控 PNIPAAm 接枝链的分子量和密度, 他们指出接枝链的长度和密度显著影响细胞的粘附和脱附行为, 并且应用上述技术可为不同细胞筛选合适的温敏性平面。Nash 等^[17]采用旋转涂覆和紫外照射的方式制备 PNIPAAm 凝胶涂层, 结果显示 3T3 细胞只在厚度小于 30 nm 的涂层粘附和增殖, 且细胞片层可在降温 10 min 后完全脱附。我们的实验结果同样证实不同种类细胞对 P(NIPAAm-co-HPM-co-TMSPM) 共聚物膜具有各异的选择性, 并根据同时满足促进细胞粘附和减少细胞脱附时间的原则, 可为不同种类细胞选择适宜的温敏性培养基底。

综上, 由于制备方法、组成成分的差异, 适宜不同细胞的 PNIPAAm 基底的聚合物厚度/密度 (T/D) 有所不同, 但均呈下述规律, 如图 2 所示。当 T/D 较小时, 细胞能够粘附和生

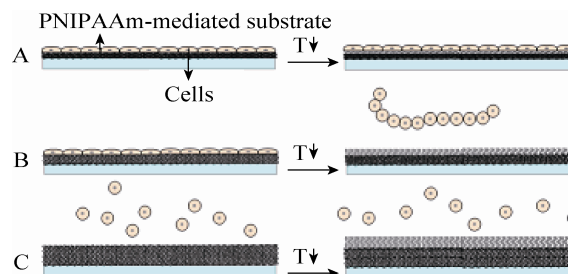


图 2 降温前后细胞在不同厚度和表面润湿性的温敏性基底的粘附和脱附情况

Fig. 2 Cell attachment and detachment before or after cooling treatment when seeded on thermoresponsive substrates with different film thickness and surface wettability.

长于 PNIPAAm 基底, 但其表面润湿性和溶胀性能随降温变化的幅度较小, 不足以提供足够的驱动力使细胞脱附; 当 T/D 增至一定范围, 此温敏性表面在生理条件下适合细胞粘附和增殖, 而经过降温处理其性质改变的程度足以使细胞与表面脱离, 可通过后续细胞鉴定实验筛选出适宜的培养介质; 当 T/D 继续增加, 温敏性表面由于较强的水合作用而不再支持细胞粘附, 细胞由于失去粘附位点而悬浮于培养基, 最终凋亡甚至死亡。

1.5 提供适宜外力

降温处理时, 为减少直接置于低温环境培养基自然冷却时间且避免细胞再次粘附, 通常采用低温无血清培养基作为冷却介质。冷鲜培养基的人工注入可为细胞脱附的启动提供外在驱动力, 使 PNIPAAm 基底边缘区域迅速变厚且更具亲水性, 细胞与基底之间的平衡瞬间破坏。处于边缘的细胞变圆随即脱附, 为培养基持续进入细胞-基底界面提供有效空间, 从而导致细胞连续脱附。除手动提供驱动力外, 自动化供

力方式具备可控性、重复性、再现性等优点,更为可取。Tang 等^[18]在具有平行通道的 PNIPAAm 接枝培养板上键合聚二甲基硅氧烷薄片从而构建封闭的细胞培养空间,以保证各组细胞处于相同培养环境,而当降温细胞脱离时又可提供不同的剪切力,结果证实外力的介入有助于细胞的快速脱附。

综上,目前促进细胞有效粘附和快速脱附的方法仍以温敏性表面物理性质的改造为主,而关于化学性质的改造以及两种性质的结合仍待于深入研究。并且通过现有研究内容,难以确定影响细胞行为各种参数的重要程度以及彼此之间的最佳组合。

2 温敏性 PNIPAAm 三维介质

PNIPAAm 及其衍生物介导的温敏性二维培养平面的研究已初具成效,但仍存在难以模拟细胞天然生长状态、材料制备和细胞培养耗时繁琐,细胞产量微小等局限性,而三维培养模式既可保留体内微环境的物质结构基础,又能体现细胞培养的直观性及可控性,同时便于将体外细胞培养体系与组织器官及整体研究有机结合。因此,研究人员逐步尝试将 PNIPAAm 引入微载体、支架或凝胶等体系从而形成温敏性三维介质,用于贴壁细胞的大规模扩增和非酶解收获以及组织器官的修复或重构等。我们在 PNIPAAm 合成过程引入 HPM 和 TMSPM,可实现 P(NIPAAm-co-HPM-co-TMSPM) 共聚物与任何形状和尺寸的含羟基材质的耦合,如果将该温敏性共聚物膜制备于微载体或中空纤维膜上,再结合生物反应器技术,则有望形成新的体外大规模扩增细胞的培养体系,这亦是

下一阶段的研究重点。

2.1 PNIPAAm 微载体

采用温敏性微载体或支架培养细胞是目前模拟体内空间微环境的最佳方案,如图 3 所示。这种模式有利于细胞间信号传导和细胞因子相互作用,从而保持细胞原始生理特征,并且由于增加细胞生长面积以及引入温敏性 PNIPAAm 可在短时间、小空间内实现大规模扩增和非酶解收获细胞的目标。

Yang 等^[19]将 PNIPAAm 接枝于 Cytodex-3(R) 微载体,并结合生物反应器考查大规模扩增 Vero 细胞的可行性,结果表明 Vero 细胞可在此温敏性微载体上粘附、铺展和生长,同时降温处理后细胞可发生自发脱附,从而有效避免酶解损失同时实现扩增细胞的目标。Tamura 等^[20]通过原子转移自由基聚合的方式将 PNIPAAm 接枝于氯甲基化聚苯乙烯微球表面,结果表明在 37 °C, CHO-K1 细胞可附着于温敏性微球,而当温度降至 20 °C,细胞可发生自发脱附,并且细胞脱附率随 PNIPAAm 接枝量的增加以及微球直径的增大而增加。Park 等^[21]借助超支化聚硅氧烷将 PNIPAAm 固定于二氧化硅微球表

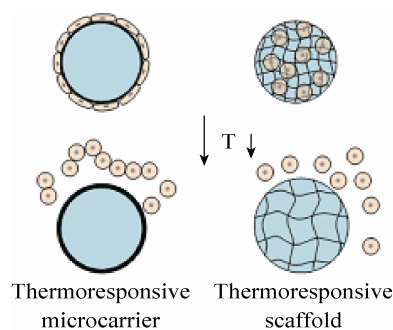


图 3 用于细胞培养和收获的温敏性微载体和支架
Fig. 3 Thermoresponsive microcarrier and scaffold for cell culture and recovery.

面,并阐明具有高分子量 PNIPAAm 的温敏性微球可用于控制细胞的粘附和脱附。Cetinkaya 等^[22]指出尽管胎牛软骨细胞在自制 PHEMA-PNIPAAm 微球上的粘附效率和增殖能力略低于在商品化 Cytodex-1 和 Biosilon 微载体的培养结果,但通过降温处理从温敏性微球分离的细胞依然具有正常增殖活性。Wu 等^[23]构建了乳糖基化 PNIPAAm-PEG 微球, HepG2 细胞在此温敏性微球内成球生长并展现较高的肝脏分泌水平,降温后微球液化可轻易获取肝细胞球状体。

2.2 PNIPAAm 支架

采用微球模板、低温冷冻和静电纺丝等方式可制备具有特定构造和温敏特性的 PNIPAAm 支架。Galperin 等^[24]结合紫外照射和微球模板等方式将 PNIPAAm、2-亚甲基-1,3-二氧杂环庚烷和聚己内酯甲基丙烯酸二酯合成为可降解、孔径均一且可调控的温敏性支架。结果证实具有 (55 ± 5) μm 孔径的支架适合 NIH3T3 细胞的接种且保证细胞在 37 °C 时无法脱出,同时细胞在支架内展现良好的信号传递和铺展状态。Peniche 等^[25]在低温条件下采用自由基聚合的方式制备附载壳聚糖和贝米肝素纳米颗粒的 PNIPAAm 大孔支架。这种冷冻支架对人成纤维细胞无毒,且可控制肝素的释放。Tiwari 等^[26]采用耦合化学和静电纺丝的方式构建以 PNIPAAm-碳纳米管-聚苯胺为主体的无纺布纤维组构支架,与商品化 Matrigel 相比, L929 细胞在该组构支架上展现极好的增殖能力和活性,温度降至 LCST 以下时细胞可自发脱附。

2.3 PNIPAAm 凝胶

PNIPAAm 均聚物和共聚物凝胶具备如下优

点:允许细胞外基质重构且使细胞锚定在材料内部,可根据生理环境调整自身形状,适合传递和输送营养物质和代谢产物,可通过调整其组成来控制凝胶的相转变点等。将细胞包埋于 PNIPAAm 介导的凝胶内,结果证实温敏性凝胶具有良好的生物相容性,细胞可在其内部粘附和铺展,培养一定时期仍呈较高的生长活性,并保持较强的生理功能。Lu 等^[27]将 MIN6 细胞包埋于 PNIPAAm-聚乙二醇-PNIPAAm 微凝胶内,结果表明此温敏性水凝胶具有良好的生物相容性,5 d 后 MIN6 细胞在微凝胶内部呈现较高的生长活性并形成小型团聚物且保持较强的胰岛素分泌能力。Gan 等^[28]采用自由基沉淀聚合法制备 PNIPAAm-甲基丙烯酸羟乙酯微凝胶,具有互联多孔结构,且其孔径随脱水收缩作用的增强而逐渐变小,结果显示 HepG2 细胞在脱水收缩作用较低的低微凝胶内,展现较强的增殖和成球生长能力,但在收缩作用较高的微凝胶内其生长受到抑制。Sa-Lima 等^[29]考察了 PNIPAAm-甲基纤维素水凝胶作为软骨细胞微囊化三维介质的可行性,结果表明微囊化的 ATDC5 细胞依然保持较高的活性和增殖能力。Chen 等^[30]将透明质酸、壳聚糖和 PNIPAAm 合成可注射性温敏性水凝胶,同时嵌入双相磷酸钙陶瓷颗粒,用于工程仿生骨的构建。

综上,就生长区域而言,细胞分别生长在 PNIPAAm 微载体的表面和支架或凝胶的内部;就最终目的而言,凝胶主要用于组织工程,通常不涉及细胞收获问题,添加 PNIPAAm 的原因主要是利用其随温度改变的体积相变化进而将种子细胞随凝胶共同注入活体的受损部位,用于组织或器官的修复或重构;而应用微载体和

支架则以体外大规模扩增细胞为目标, 添加 PNIPAAm 的目的主要是利用其随温度改变的表面润湿性和整体厚度变化从而进行细胞的无侵害性收获。

3 温敏性 PNIPAAm 培养平台的应用

根据 PNIPAAm 平台的类型和后续操作方案的不同, 可将细胞培养结果分为下述 4 种情况:

1) 将贴壁型细胞接种于 PNIPAAm 二维或三维表面, 如果接种密度较低或培养时间较短, 尽管细胞不断分泌细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM), 但无法完全融合, 所以降温处理并轻微吹打后, 细胞展现单独分散状态, 但伴随膜蛋白和粘附蛋白共同脱附^[5,7,31], 如图 4A 所示。这一方面利于细胞再次接种的快速定位, 另一方面由于对细胞膜的有效保护从而利于细胞原始特性的维持。

2) 将贴壁型细胞接种于 PNIPAAm 二维或三维表面, 如果接种密度较高或培养时间较长, 除大量分泌 ECM 外, 细胞的增殖和通讯可使细

胞间形成连接蛋白, 从而生成融合的细胞片层, 经由降温处理, 细胞会以完整片层形式从培养表面脱离, 即细胞膜蛋白、粘附蛋白和连接蛋白均被完好的保留并随细胞共同脱附^[5,7,31], 如图 4B 所示。但存在例外, 如果在 PNIPAAm 中引入过多阳离子型物质, 那么在降温过程细胞与温敏性材料之间的静电引力便会大于引起细胞自身脱附的骨架张力, 因此细胞片层不能完全从材料表面剥离, 反而在细胞骨架张力的作用下使细胞连接受到破坏^[13]。

3) 将细胞包埋于 PNIPAAm 支架或凝胶内部, 随培养时间延长, 细胞在孔道中相继完成粘附、铺展、生长和增殖等系列生理活动, 但同一孔道容纳细胞数量有限。降温处理使孔道尺寸扩大或主体解离, 促使细胞释放, 经轻微吹打, 细胞可呈离散状态^[24]。

4) 将细胞包埋于 PNIPAAm 支架或凝胶内部, 主要针对组织工程背景进行研究, 重点考查细胞在材料内部的增殖分化及组织形成能力^[27-30], 通常不涉及将细胞从支架或凝胶中取出的过程。

综上, 方案 1) 和 3) 可获取单独分散细胞, 利于细胞继续接种或性能检测, 且避免酶解损伤从而有效维持细胞的原始特征, 所以其最终目的是大规模扩增细胞。特别对于培养敏感细胞或需要维持高水平的细胞活力抑或控制细胞的分化程度, 此培养方案尤为适用, 如干细胞等。研究表明, 作为智能型培养基底, PNIPAAm 表面在 37 °C 时可支持干细胞的粘附、铺展、迁移、生长、增殖和分化, 且经过降温收获后的干细胞仍具有较强的增殖能力和多向分化潜能及较高活性和较完整的免疫表型, 可为生物医药领域提供品质优良种子细胞^[32-35]。

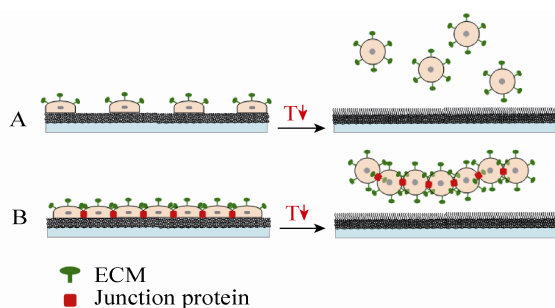


图 4 降温前后分散细胞和细胞片层在温敏性表面的粘附和脱附情况

Fig. 4 Attachment and detachment of scattered cells and cell sheet from thermosensitive surfaces before and after lowering temperature.

如上所述, 方案 4) 主要应用于组织工程领域。由于方案 2) 可形成完整的富含多种关键蛋白的细胞片层, 因此衍生出新的组织工程方向——细胞片层工程 (Cell sheet engineering)^[36-38]。降温收获的细胞片层可用于组织构建, 即将细胞片层进行逐层叠加, 其中单层细胞片层可用于皮肤和角膜的重构, 相同的细胞片层叠加可用于心脏的重构, 图案化的细胞片层叠加可用于肝和肾组织的重构, 而形状化的细胞片层可用于血管、肾小管等组织的重构^[39]。

因此, 需要根据最终应用来选择适宜的温敏性 PNIPAAm 培养平台, 从而实现大规模扩增具有原始特征的重要细胞或达到组织器官修复和重构的目标。

4 结论与展望

以温敏性材料 PNIPAAm 为培养介质, 以与之匹配的降温脱附法作为收获方式的细胞培养和回收体系持续受到广泛关注。研究人员一直致力于新型 PNIPAAm 培养平台的研发以及多种细胞类型的尝试。但可通过以下途径加以改进: 1) 开发简单经济的制备工艺, 便于 PNIPAAm 在细胞体外培养领域的推广和应用; 2) 引入无毒无害的功能原/辅料, 增强 PNIPAAm 介质的快速响应性、反复使用性和生物相容性; 3) 探讨影响细胞行为各种参数的重要程度及彼此之间的最佳组合, 促进细胞有效粘附和快速脱附。4) 将温敏性材料与动态培养模式相结合, 实现细胞的大规模扩增和组织重构的目标。

REFERENCES

[1] Yamada N, Okano T, Sakai H, et al. Thermo-

responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Macromol Rapid Commun*, 1990, 11(11): 571-576.

- [2] Yang L, Pan F, Zhao XB, et al. Thermoresponsive copolymer nanofilms for controlling cell adhesion, growth, and detachment. *Langmuir*, 2010, 26(22): 17304-17314.
- [3] Yang L, Cheng F, Liu TQ, et al. Comparison of mesenchymal stem cells harvested from poly(N-isopropylacrylamide) copolymer film and by trypsinization. *Biomed Mater*, 2012, 7(3): 035003.
- [4] Akiyama Y, Kikuchi A, Yamato M, et al. Accelerated cell-sheet recovery from a surface successively grafted with polyacrylamide and poly(N-isopropylacrylamide). *Acta Biomater*, 2014, 10(8): 3398-3408.
- [5] Kwon OH, Kikuchi A, Yamato M, et al. Rapid cell sheet detachment from poly(N-isopropylacrylamide)-grafted porous cell culture membranes. *J Biomed Mater Res*, 2000, 50(1): 82-89.
- [6] Oh HH, Ko YG, Uyama H, et al. Fabrication and characterization of thermoresponsive polystyrene nanofibrous mats for cultured cell recovery. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 480694.
- [7] Ebara M, Yamato M, Hirose M, et al. Copolymerization of 2-carboxyisopropylacrylamide with N-isopropylacrylamide accelerates cell detachment from grafted surfaces by reducing temperature. *Biomacromolecules*, 2003, 4(2): 344-349.
- [8] Liu D, Wang T, Liu XX, et al. Accelerated cell sheet detachment by copolymerizing hydrophilic PEG side chains into PNIPAm nanocomposite hydrogels. *Biomed Mater*, 2012, 7(5): 055008.
- [9] Kim SJ, Kim WI, Yamato M, et al. Successive grafting of PHEMA and PIPAAm onto cell culture surface enables rapid cell sheet recovery. *Tissue Eng Regen Med*, 2013, 10(3): 139-145.
- [10] Wang JY, Chen L, Zhao YP, et al. Cell adhesion

- and accelerated detachment on the surface of temperature-sensitive chitosan and poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. *J Mater Sci Mater Med*, 2009, 20(2): 583–590.
- [11] Ohya S, Kidoaki S, Matsuda T. Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin hydrogel surfaces: interrelationship between microscopic structure and mechanical property of surface regions and cell adhesiveness. *Biomaterials*, 2005, 26(16): 3105–3111.
- [12] Kong B, Choi JS, Jeon S, et al. The control of cell adhesion and detachment on thin films of thermoresponsive poly[(N-isopropylacrylamide)-r-((3-(methacryloylamino) propyl)-dimethyl (3-sulfopropyl) ammonium hydroxide)]. *Biomaterials*, 2009, 30(29): 5514–5522.
- [13] Liu D, Wang T, Liu XX, et al. Cell Proliferation and cell sheet detachment from the positively and negatively charged nanocomposite hydrogels. *Biopolymers*, 2014, 101(1): 58–65.
- [14] Yang L. Preparation of novel temperature-responsive film and stem cell culture and recovery on it [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2012 (in Chinese).
杨磊. 新型温敏膜的构建及其培养收获干细胞的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2012.
- [15] Li LH, Zhu Y, Li B, et al. Fabrication of thermoresponsive polymer gradients for study of cell adhesion and detachment. *Langmuir*, 2008, 24(23): 13632–13639.
- [16] Takahashi H, Nakayama M, Yamato M, et al. Controlled chain length and graft density of thermoresponsive polymer brushes for optimizing cell sheet harvest. *Biomacromolecules*, 2010, 11(8): 1991–1999.
- [17] Nash ME, Carroll WM, Foley PJ, et al. Ultra-thin spin coated crosslinkable hydrogels for use in cell sheet recovery-synthesis, characterisation to application. *Soft Matter*, 2012, 8(14): 3889–3899.
- [18] Tang ZL, Akiyama Y, Itoga K, et al. Shear stress-dependent cell detachment from temperature-responsive cell culture surfaces in a microfluidic device. *Biomaterials*, 2012, 33(30): 7405–7411.
- [19] Yang HS, Seo JH, Kim BS. Serial propagation of cells on thermo-sensitive microcarrier. *Tissue Eng Regen Med*, 2009, 6(13): 1262–1267.
- [20] Tamura A, Kobayashi J, Yamato M, et al. Temperature-responsive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted microcarriers for large-scale non-invasive harvest of anchorage-dependent cells. *Biomaterials*, 2012, 33(15): 3803–3812.
- [21] Park BR, Nabae Y, Surapati M, et al. Poly(N-isopropylacrylamide)-modified silica beads with hyperbranched polysiloxysilane for three-dimensional cell cultivation. *Polym J*, 2013, 45(2): 210–215.
- [22] Cetinkaya G, Kahraman AS, Gumusderelioglu M, et al. Derivation, characterization and expansion of fetal chondrocytes on different microcarriers. *Cytotechnology*, 2011, 63(6): 633–643.
- [23] Wu Y, Zhao Z, Guan Y, et al. Galactosylated reversible hydrogels as scaffold for HepG2 spheroid generation. *Acta Biomater*, 2014, 10(5): 1965–1974.
- [24] Galperin A, Long TJ, Ratner BD. Degradable, thermo-sensitive poly(N-isopropyl acrylamide)-based scaffolds with controlled porosity for tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 2010, 11(10): 2583–2592.
- [25] Peniche H, Reyes-Ortega F, Aguilar MR, et al. Thermosensitive macroporous cryogels functionalized with bioactive chitosan/bemiparin nanoparticles. *Macromol Biosci*, 2013, 13(11): 1556–1567.
- [26] Tiwari A, Sharma Y, Hattori S, et al. Influence of Poly(N-isopropylacrylamide)-CNT-Polyaniline three-dimensional electrospun microfabric

- scaffolds on cell growth and viability. *Biopolymers*, 2013, 99(5): 334–341.
- [27] Lu HF, Targonsky ED, Wheeler MB, et al. Thermally induced gelable polymer networks for living cell encapsulation. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 96(1): 146–155.
- [28] Gan TT, Guan Y, Zhang YJ. Thermogelable PNIPAM microgel dispersion as 3D cell scaffold: effect of syneresis. *J Mater Chem*, 2010, 20(28): 5937–5944.
- [29] Sa-Lima H, Tuzlakoglu K, Mano JF, et al. Thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide)-g-methylcellulose hydrogel as a three-dimensional extracellular matrix for cartilage-engineered applications. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 98A(4): 596–603.
- [30] Chen JP, Tsai MJ, Liao HT. Incorporation of biphasic calcium phosphate microparticles in injectable thermoresponsive hydrogel modulates bone cell proliferation and differentiation. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 110(10): 120–129.
- [31] Cole MA, Voelcker NH, Thissen H, et al. Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein-surface and cell-surface interactions. *Biomaterials*, 2009, 30(9): 1827–1850.
- [32] Shi DY, Ma D, Dong FQ, et al. Proliferation and multi-differentiation potentials of human mesenchymal stem cells on thermo-responsive PDMS surfaces grafted with PNIPAAm. *Biosci Rep*, 2010, 30(3): 149–158.
- [33] Yang HS, Jeon O, Bhang SH, et al. Suspension culture of mammalian cells using thermosensitive microcarrier that allows cell detachment without proteolytic enzyme treatment. *Cell Transplant*, 2010, 19(9): 1123–1132.
- [34] Shen ZY, Bi JX, Shi BY, et al. Exploring thermal reversible hydrogels for stem cell expansion in three-dimensions. *Soft Matter*, 2012, 8(27): 7250–7257.
- [35] Nash ME, Fan XL, Carroll WM, et al. Thermoresponsive Substrates used for the expansion of human mesenchymal stem cells and the preservation of immunophenotype. *Stem Cell Rev Rep*, 2013, 9(2): 148–157.
- [36] Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, et al. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*, 2003, 24(13): 2309–2316.
- [37] Isenberg BC, Tsuda Y, Williams C, et al. A thermoresponsive, microtextured substrate for cell sheet engineering with defined structural organization. *Biomaterials*, 2008, 29(17): 2565–2572.
- [38] Chen YS, Tsou PC, Lo JM, et al. Poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with interpenetrating multiwalled carbon nanotubes for cell sheet engineering. *Biomaterials*, 2013, 34(30): 7328–7334.
- [39] Elloumi-Hannachi I, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering: a unique nanotechnology for scaffold-free tissue reconstruction with clinical applications in regenerative medicine. *J Intern Med*, 2010, 267(1): 54–70.

(本文责编 郝丽芳)