

新型温敏微载体用于无损收获贴附型细胞的研究

东健洋¹ 任怀娟² 张凤丽² 伍越群² 陈彦田^{1*} 齐念民¹

(¹上海交通大学药学院, 上海 200240; ²上海瀚正生物技术有限公司, 上海 201203)

摘要 聚N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAAm)接枝的微载体由于表面同时含有疏水性的异丙基和亲水性的酰胺基而成为一种典型的温敏性微载体。但是微载体表面PNIPAAm接枝浓度会极大地影响贴附型细胞在微载体上的贴附能力和脱附能力,限制了它在相关领域的应用效果。该实验运用原子转移自由基聚合作用(atom transfer radical polymerization, ATRP)合成法将PNIPAAm接枝到表面氯甲基化的聚苯乙烯微球[chloromethylated poly (styrene), CMPS]表面,合成不同PNIPAAm接枝浓度的温敏微载体,研究其细胞贴附、脱附以及在转瓶悬浮培养中的细胞增殖能力。同时,运用电子扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)、原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)、X-射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)对温敏微球表面形貌进行表征。实验结果表明,当PNIPAAm添加浓度是200 mmol/L时,温敏微球表现出60%的细胞脱附率及50%的细胞贴附率,并且在转瓶悬浮培养中具有持续稳定的增殖能力。另外,SEM与AFM表征结果显示,温敏微载体表面粗糙度有明显地增加;XPS结果表明,温敏微球表面N元素有显著增加。这些结果证明了微载体上温敏材料NIPAAm的成功接枝。以上实验结果表明,这种新型温敏微载体具有良好的细胞贴附和脱附能力,将会是大规模培养贴附型细胞的良好材料。

关键词 聚N-异丙基丙烯酰胺; 温敏; 微载体; 原子转移自由基聚合作用

The Study of Noval Temperature-responsive Microcarriers for Non-invasive Harvest of Anchorage-dependent Cells

Dong Jianfeng¹, Ren Huaijuan², Zhang Fengli², Wu Yuequn², Chen Yantian^{1*}, Qi Nianmin¹

(¹School of Pharmacy Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; ²Chiacelltech Co.Ltd, Shanghai 201203, China)

Abstract Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) grafted microcarrier is a typical thermo-sensitive microcarrier due to the presence of hydrophilic amide chains and hydrophobic isopropyl chains in side-chains. However, the grafted amount of NIPAAm on cell culturing surface will greatly affect the adhering and detaching behavior of anchorage-dependent cells, which restricts its application. In our study, atom transfer radical polymerization (ATRP) method was used to graft different amounts of PNIPAAm onto the microcarrier surfaces. Then cell attaching, detaching and proliferation ability in stirred suspension culture were studied. The surface of thermo-microcarriers was characterized by SEM (scanning electron microscope), AFM (atomic force microscope) and XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) methods. The results revealed that when the feeding concentration was 200 mmol/L, the thermo-microcarriers showed the best cell detaching ability of about 60%, cell attaching ability of about 50% and steady proliferation ability in suspension culture. The results of SEM and AFM showed that thermo-microcarrier surfaces were much rougher than CMPS [chloromethylated poly (styrene)] microcarriers, and XPS results showed that the content of

收稿日期: 2014-11-21 接受日期: 2015-01-21

*通讯作者。Tel: 021-34204745, E-mail: ytchen@sjtu.edu.cn

Received: November 21, 2014 Accepted: January 21, 2015

*Corresponding author. Tel: +86-21-34204745, E-mail: ytchen@sjtu.edu.cn

网络出版时间: 2015-07-03 13:45

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150703.1345.001.html>

nitrogen on microcarrier surface was increased significantly, which proved the successful grafting of PNIPAAm onto the surface of microcarriers. The thermo-responsive microcarrier exhibiting thermo-dependent cell adhesion and detachment will be an attractive candidate for the large-scale culturing of anchorage-dependent cells.

Keywords PNIPAAm; temperature-responsive; microcarriers; atom transfer radical polymerization

聚N-异丙基丙烯酰胺[poly(N-isopropylacrylamide), PNIPAAm]^[1]由于其表面分子链上同时具有亲水性基团酰胺基(-CONH-)和疏水性的异丙基[-CH(CH₃)₂-], 使其在低于32 °C时在水溶性培养基中呈现亲水性, 可以在水溶液中进行溶胀; 当温度升到32 °C以上时, PNIPAAm变为疏水性, 并且它的形态从自然卷曲变为球状。这个温度称为PNIPAAm的最低临界溶解温度(lower critical solution temperature, LCST)^[2]。这种性能使其在酶的固定化^[3]、药物靶向定位及缓释^[4]以及细胞的温敏脱落^[5]中均有广阔的应用前景。

在目前的细胞培养收获中, 常用的方法是通过胰蛋白酶降解细胞间基质(extracellular matrix, ECM)^[6], 从而使得细胞与培养载体脱离, 收获单细胞悬液。但是, 胰蛋白酶在降解细胞外基质时, 会分解细胞外膜蛋白, 导致细胞活力的降低^[7]。细胞通过温敏方式收获时, 通过改变细胞生长表面的亲/疏水性, 使得细胞能无损地从生长表面脱落。这种方法不仅提高了收获细胞的质量, 同时在实际应用中有效地降低了人力和物力成本。Tamura等^[8]通过原子转移自由基聚合作用(atom transfer radical polymerization, ATRP)法化学合成了温敏微载体——表面氯甲基化的聚苯乙烯微球[chloromethylated poly(styrene), CMPS]-NIPAAm, 检测了细胞在温敏微载体上的贴附生长以及温敏脱附能力。另外, Çakmak等^[9]则运用ATRP合成法在葡聚糖微球表面接枝NIPAAm, 并对温敏微载体的表面形貌、NIPAAm接枝量以及温敏性进行了全面表征。但是, 按照ATRP法制备的温敏微载体CMPS-NIPAAm在细胞贴附能力上有一定的欠缺, 尤其在搅拌悬浮培养细胞中, 细胞贴附比较困难, 导致大量的细胞漂浮。

本实验中, 利用表面起始的原子转移自由基聚合作用(surface initiated atom transfer polymerization, SI-ATRP)^[10], 在CMPS表面接枝上PNIPAAm。通过选择不同的PNIPAAm合成浓度, 摸索出了最优的PNIPAAm浓度, 使得细胞在温敏微载体表面具有很好的温敏脱附能力, 还具有良好的贴附和增殖能力。

另外, 使用多聚赖氨酸(poly-lysine, PLL)处理微载体, 增加微载体表面细胞的贴附能力。非洲绿猴肾细胞(verda reno, VERO)在温敏微载体上具有良好的贴附生长以及温敏脱附能力。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

VERO细胞由上海泰因生物技术有限公司馈赠, 温敏微载体CMPS-NIPAAm由上海翰正生物技术有限公司馈赠。CMPS微载体和PLL(相对分子量70.000~150.000)由Sigma-Aldrich公司提供; 胎牛血清由Thermo Scientific公司提供; α -MEM培养基由Gibco公司提供; 青、链霉素和胰蛋白酶由Invitrogen公司提供; 琼脂糖原Agrose由MD-Bio公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 ATRP法合成温敏微载体 将IPAAm(4.87 g, 43 mmol/L)装入瓶口装有三通的圆底烧瓶中, 用86 mL脱水的丙醇溶解, 向烧瓶中通H₂以去除反应混合物中的O₂。将CuCl(158 mg, 1.6 mmol/L)、CuCl₂(22 mg, 160 μ mol/L)和Me₆TREN(405 mg, 1.76 mmol/L)相继加入到反应体系中, 溶液搅拌15 min以制备CuCl/CuCl₂/Me₆TREN催化复合物。将IPAAm单体和CMPS微球置于100 mL玻璃管中, 通过依次抽真空和通入N₂, 重复3次, 使其被N₂包围。单体IPAAm溶液和自由基起始物 α -氯-p-二甲苯加入到含有CMPS的玻璃管中, 将反应复合物在室温条件下摇床中震荡16 h。聚合后, 离心收集聚合物-CMPS, 然后在甲醇中超声处理。纯化过程重复3次以除去催化剂和未反应的单体。进一步的纯化是将微球在50 mmol/L EDTA溶液中震荡24 h, 以除去铜催化剂。之后, PIPAAm接枝的微球用超纯水清洗后抽滤收集。

1.2.2 电子扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)检测 实验中, 运用扫描电镜(FE-SEM)对微球表面形貌进行观测。先将干燥清洁的微载体固定在胶带上, 进行喷金以提高微球的导电性, 之后按照规范的操作观测。由于CMPS微球导电性相对温敏微载

体CMPS-NIPAAm差,因此进行了60 s的喷金操作,而对温敏微载体CMPS-NIPAAm进行了30 s喷金操作。

1.2.3 X-射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy) 实验中,使用X-射线光电子能谱(Axis UltraDLD)检测接枝前后微球表面C元素和N元素含量的变化。CMPS微球表面不含有N元素,因此微球表面N元素的增加可以证明NIPAAm的成功接枝,同时可以根据N元素含量的增加,计算出接枝上的NIPAAm密度。温敏微球表面NIPAAm含量根据以下公式计算:

$$M_p(\mu\text{g}/\text{cm}^2)=(N_p\%-N_0\%)/S(N_{p,\text{theor}}\%-N_0\%)\times 10^6$$

其中, N_p 和 N_0 分别代表接枝前后微球表面N元素含量, $N_{p,\text{theor}}$ 代表理论上PNIPAAm中N元素的含量, S 代表微球的比表面积(g/cm^2)。

1.2.4 原子力显微镜(atomic force microscope) 实验中使用AFM(MultiMode NanoScope)对微球表面形貌进行观测,得到微球表面形貌三维图像。将微球用95%乙醇作为分散剂,超声分散均匀后滴到1 cm×1 cm的干净盖玻片上,待乙醇挥发干后进行观测。通过原子力显微镜对微球表面的观测,可以得到微球表面的三维图像以及微球表面大致的粗糙度。

1.2.5 细胞贴附能力和温敏脱附能力检测 微载体的前处理:温敏微球用PBS浸泡3 h后,换上新鲜PBS,121 °C高温湿热灭菌30 min。将PLL浓缩液(1 mg/mL)稀释到0.1 mg/mL,将无菌的微球在稀释好的PLL中室温浸泡10 h,用无菌的PBS清洗2次,浸泡在含有10% FBS(Hyclone, USA)的 α -MEM(Gibco, USA)中,4 °C保存,备用。

细胞非贴附平板的制备:将琼脂糖原(Agrose, MD Bio)用PBS配置成1%的溶液,121 °C、30 min湿热灭菌,趁热铺板,在超净工作台中取12孔板(Corning, USA),每孔加入1 mL 1% Agrose液,冷却。

细胞实验方法:将VERO细胞以 $5\times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种到细胞非贴附孔板中,加入总面积为2 cm²的灭菌处理过的微载体,每孔定容到1 mL液体量。培养24 h后,将其中900 μL 的培养基换成新鲜培养基,重复3次,以除去未贴附的细胞。为了计算细胞量,吸取1 mL微球悬浊液, PBS清洗3次, 37 °C TrypLE消化15 min, 细胞计数板计数。细胞贴附率(%)=贴附细胞总数/接入细胞总数×100%。另外,设平行组,吸取1 mL长有VERO细胞的微球放在20 °C的温控箱中120 min, 细胞板计数。细胞脱附率(%)=温

敏消化的细胞数/贴附的细胞总数×100%。对不同NIPAAm浓度合成的温敏微球分别进行细胞实验,根据细胞的生长情况和温敏收获的细胞数来优化NIPAAm的浓度。同时,探索不同消化时间下温敏微球上细胞的贴附情况,分别在30, 60, 90, 120 min进行显微镜观察和细胞计数。以 $1\times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞密度接种VERO细胞到细胞非贴附12孔板中,接种24 h后用新鲜培养基清洗3次,去除未贴附的VERO细胞,继续培养48 h后,进行TrypLE法细胞计数。然后对各组进行20 °C降温消化,细胞计数。

1.2.6 悬浮搅拌培养中细胞增殖能力和温敏脱附能力检测 在超净工作台内,将总面积是200 cm²的微载体加入已经灭菌的转瓶(Wheaton, USA)中,加入10 mL培养基,以 $1.0\times 10^5/\text{cm}^2$ 的接种密度接种VERO细胞,调整培养基到35 mL。将转瓶在培养箱中静置24 h,使得细胞得以贴附。之后,小心吸去30 mL培养基,换成新鲜培养基,重复3次,除去没有贴附的细胞。调整培养体系到70 mL,同时调整磁力搅拌器转速到50 r/min,每天换35 mL的培养基。转瓶中细胞计数:吸取1 mL含有微球的培养基, PBS清洗3次, 37 °C TrypLE消化15 min, 细胞计数板计数。转瓶中细胞总数=检测细胞数×培养基总体积。同时,同样吸取1 mL含有微球的培养基,放入20 °C恒温箱中静置120 min, 细胞计数板计数。细胞脱附率(%)=温敏收获的细胞数/TrypLE法收获的细胞数×100%。

1.2.7 收获细胞质量分析 乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)是一种存在于细胞内的酶,主要在糖酵解过程中发挥作用。当细胞受到损伤时,LDH会释放到细胞外。因此,通过检测培养基中LDH浓度,可以得出细胞的受损程度,即进行细胞质量分析。实验中,分别使用TrypLE法和温敏法收获细胞悬液,1 000 r/min离心5 min收获上清。根据LDH试剂盒(微量酶标法)使用说明书进行操作,在波长450 nm下检测吸光度。

1.3 统计学分析

实验数据以mean±S.D.形式表示,显著性差异分析用GraphPad Prism 5进行。 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异非常显著, $P<0.001$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 温敏微载体的表面表征

2.1.1 扫描电镜观测 对微载体进行扫描电镜实

验表明, 在接枝了NIPAAm后, 微载体表面明显粗糙, 而对照组CMPS微球表面则是非常光滑(图1)。

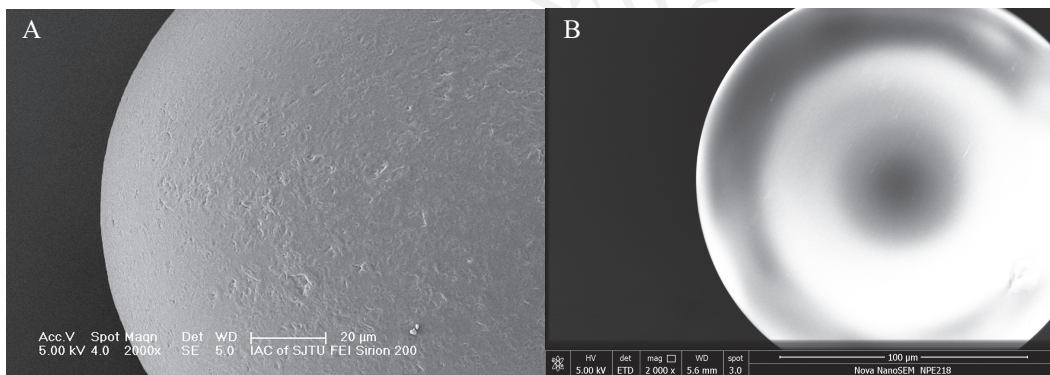
2.1.2 原子力显微镜检测 对微球进行原子力显微镜观测, 如图2所示, 相比于对照组CMPS微球, 温敏微球表面有更多的突起, 比较粗糙。粗糙度分析结果中, 温敏微球CMPS-NIPAAm表面平均粗糙度为9.948 nm, 普通CMPS表面平均粗糙度为5.582 nm。原子力显微镜实验表明, 接枝了NIPAAm后微球表面有比较均匀的凸起, 粗糙度也有一定的增加, 表明NIPAAm成功接枝。

2.1.3 X-射线光电子能谱 通过检测接枝前后微球表面C、N元素含量的变化, 285 eV(C)与397 eV(N)出现的新峰可以归属为PNIPAAm分子中氨基上的C=O与N-H, 这表明PNIPAAm分子已经成功地接枝到了CMPS微球表面。图3和表1显示接枝前后微球表面C、N元素含量。接枝了温敏材料后, 微球表面的

N元素含量有明显增加($P < 0.05$)。计算得到温敏微载体表面NIPAAm接枝密度是 $103.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

2.2 细胞在微载体上的贴附和脱附能力检测

根据ATRP合成方法, 分别投入不同浓度的NIPAAm单体(0, 125, 200, 250, 500, 750 mmol/L), 其他投入物相同, 制备不同NIPAAm接枝量的温敏微球CMPS-NIPAAm。为了研究各组温敏微载体细胞贴附和脱附能力, 实验中培养VERO细胞用于细胞实验。在6组不同NIPAAm接枝浓度的温敏微载体上, 细胞贴附率和脱附率检测结果如图4所示。随着NIPAAm投入浓度的增加, 细胞在微载体上的贴附率依次降低, 而细胞的脱附率是呈现先升高后降低的趋势, 在200 mmol/L浓度下温敏微载体细胞脱附能力达到最高。可能的原因如下: 随着NIPAAm浓度的升高, 微载体表面的温敏性逐渐增强。而温敏材料NIPAAm是在CMPS微球表面Cl原子位点上逐

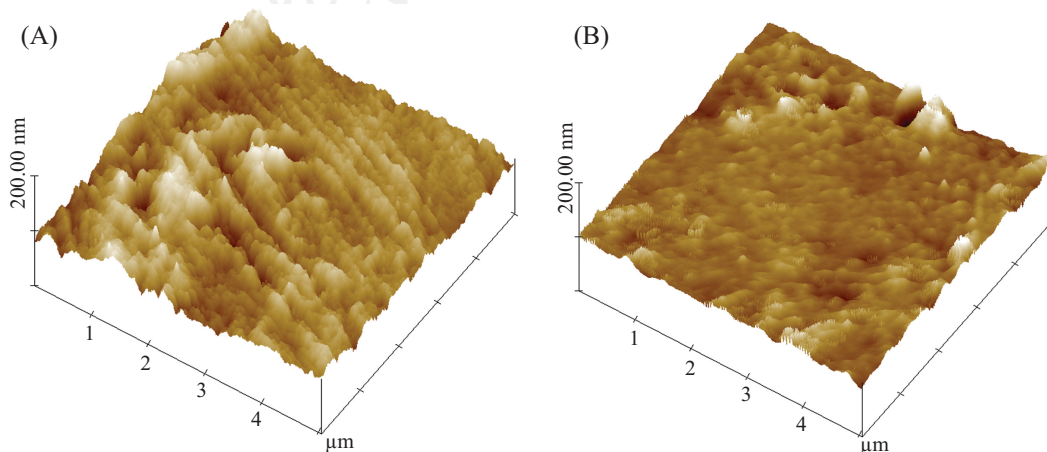


A: 温敏微载体; B: 对照组微载体。

A: thermo-responsive microcarriers; B: control microcarriers.

图1 微载体电镜图

Fig.1 SEM picture of microcarriers

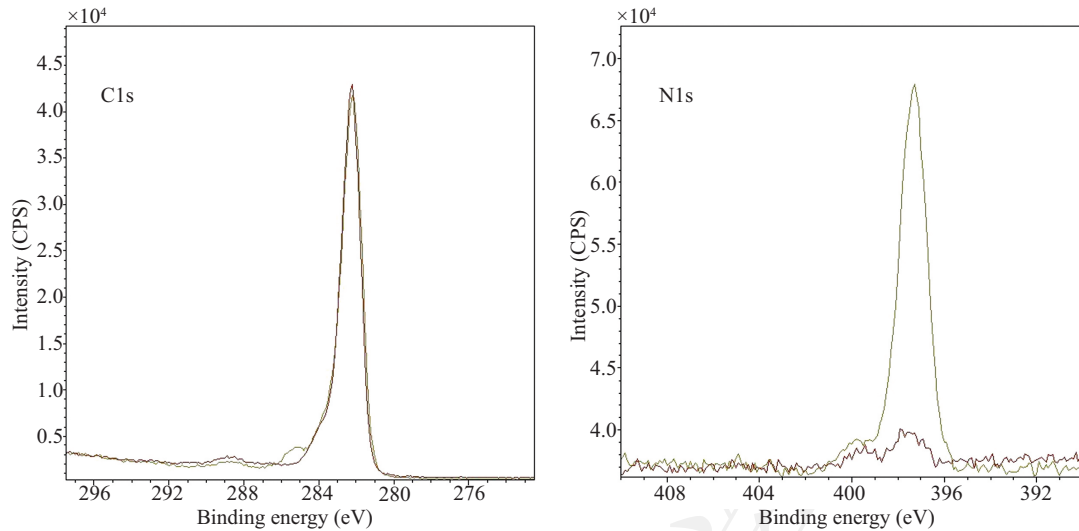


A: 温敏微载体; B: 对照组微载体。

A: thermo-responsive microcarriers; B: control microcarriers.

图2 微载体原子力显微镜图($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$)

Fig.2 AFM picture of microcarriers ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$)



C1s表示接枝前后微载体表面碳元素信号强度, N1s表示接枝前后微载体表面氮元素信号强度, 蓝线代表温敏微载体, 红线代表对照微载体。C1s represented the content of carbon, N1s represented the content of nitrogen, blue line represented thermo-responsive microcarriers, and red line represented control microcarriers.

图3 微载体X射线光电子能谱
Fig.3 XPS picture of microcarriers

表1 微载体接枝PNIPAAm前后表面碳、氮元素含量表
Table 1 The content of carbon and nitrogen content of microcarriers before and after the grafting of PNIPAAm

组别 Group	碳含量(%) Carbon content (%)	氮含量(%) Nitrogen content (%)
CMPS	99.32±0.22	0.68±0.04
CMPS-NIPAAm	95.81±0.30	4.19±0.06*

* $P < 0.05$, 与对照组(CMPS组)比较。

* $P < 0.05$ compared with control group (CMPS group).

个聚合, 最后呈现卷曲分子刷状。当NIPAAm浓度超过一定范围, NIPAAm分子刷之间会产生空间位阻, 阻碍NIPAAm在温度改变时构象的变化, 进而降低温敏微球的温敏脱附能力^[11-12]。Maeda等^[13]与Balamurugan等^[14]的研究也表明, 在NIPAAm浓度较低的情况下, 在温度从37 °C降低到20 °C的过程中, 由于表面的PNIPAAm分子刷是一种亲/疏水性敏感的高分子材料, 所以会出现明显的接触角的降低; 但是, 当NIPAAm接枝浓度过高时, 在LCST周围温敏表面接触角变化不显著, 导致细胞温敏脱附能力降低。

使用NIPAAm合成浓度为200 mmol/L的温敏微球, 研究不同温敏消化时间(0, 30, 60, 90, 120 min)下的细胞脱附能力。结果如图5所示, 在20 °C的低温环境下, CMPS上VERO细胞贴附率基本保持不变, CMPS微球不具备温敏消化能力; 而在温敏微球

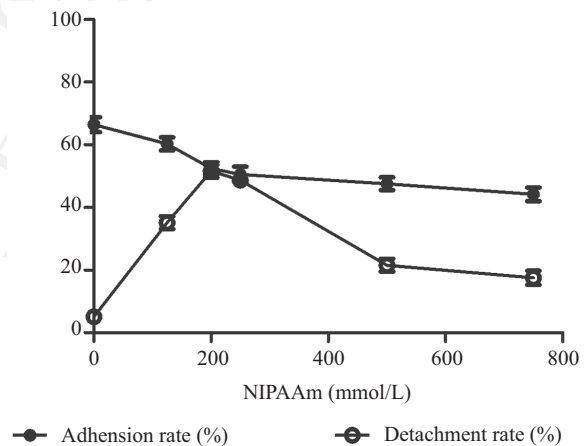


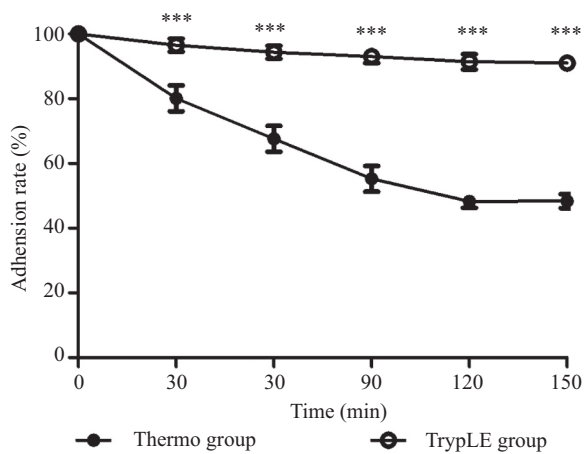
图4 不同NIPAAm单体浓度制备的温敏微球上细胞贴附和脱附能力

Fig.4 Cell adhesion and thermo-induced detachment ability of CMPS microcarriers grafted of different amount of NIPAAm

CMPS-NIPAAm上, VERO细胞的贴附率随着降温时间的增加而降低, 到120 min后基本保持不变。结果表明, 温敏微球CMPS-NIPAAm具有良好的细胞降温脱附能力, 而120 min降温时间能达到最大的细胞收获率。

2.3 细胞在微载体上的增殖能力检测

实验中运用转瓶进行VERO细胞在微载体上细胞增殖能力的检测。与此同时, 每24 h进行一次细胞温敏消化效率检测。如图6所示, 在转瓶搅拌培养实验中, VERO细胞在温敏微载体和CMPS微球上都

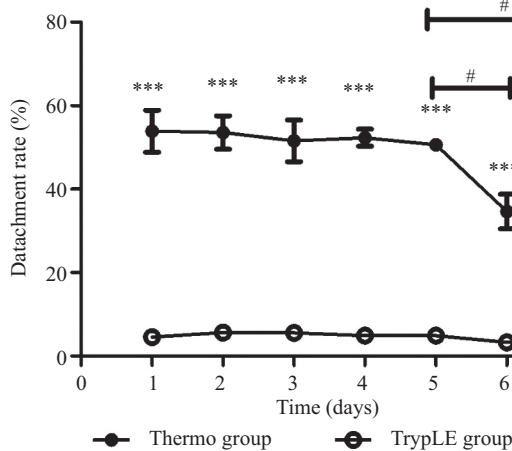


*** $P < 0.001$, 与胰酶消化组比较。

*** $P < 0.001$ compared with TrypLE group.

图5 温度从37°C降低到20°C不同降温消化时间下微载体表面细胞贴附率图

Fig.5 The time-course of cell attachment percentage from the surface of CMPS-NIPAAm after reducing temperature from 37 °C to 20 °C



*** $P < 0.001$, 与胰酶消化组比较。# $P < 0.05$ 。

*** $P < 0.001$ compared with TrypLE group. # $P < 0.05$ 。

图7 转瓶长时间培养中微载体上细胞温敏收获能力

Fig.7 Thermo-induced cell harvest of VERO in long-term stirred suspension culture

可以稳定持续地增长, 而且两者统计学上无明显差异($P > 0.05$)。另外, 如图7所示, 在长时间的细胞培养中, 温敏微载体基本能保持50%以上的细胞温敏脱附率, 但是在培养5 d后, 温敏微载体的细胞温敏脱附率有明显的降低($P < 0.05$)。可能的原因是, 随着增殖时间的增加, 微载体上细胞生长更加紧密, 细胞间相互作用增加, 同时, 细胞分泌的细胞外基质使得细胞与基质间作用力增强, 这两个因素限制了温

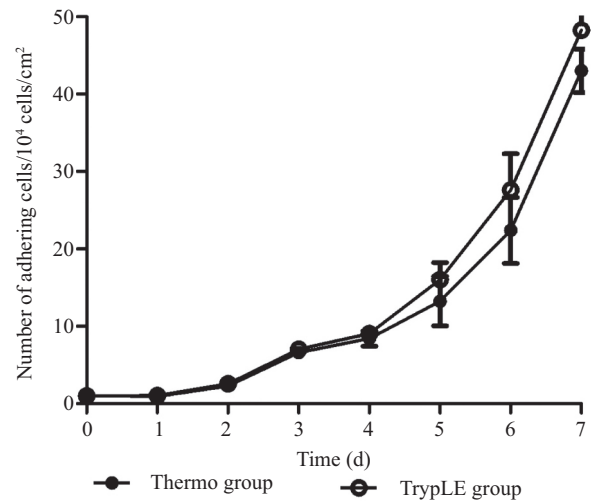
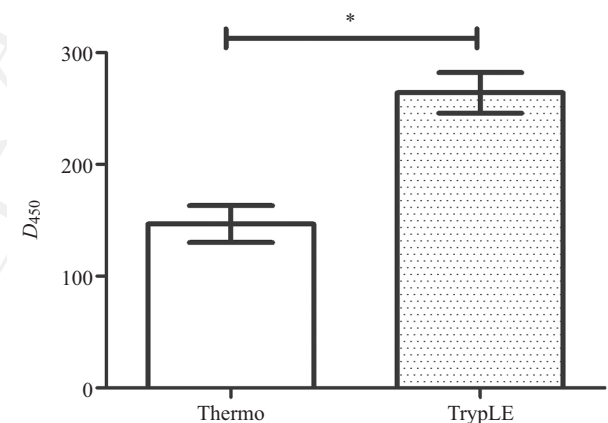


图6 转瓶头验中细胞在微载体上长期增殖能力

Fig.6 Large-scale culture of VERO in long-term stirred suspension culture



* $P < 0.05$ 。

图8 温敏脱落和TrypLE消化对细胞损伤的LDH检测

Fig.8 Cell damage LDH test of temperature-detachment and trypsinization

敏材料在LCST周围的形变能力, 进而降低了温敏微载体上细胞的温敏脱附率。

2.4 收获细胞质量检测

如图8所示, TrypLE消化收获的细胞组中, LDH活性是268 U/L, 而温敏收获的细胞组中, LDH活性是152 U/L, 两者具有显著性差异。这和理论推测的结果是一致的, 因为胰蛋白酶消化细胞通过降解细胞外基质切断细胞间联系, 从而达到使得细胞脱落并形成单细胞悬液的目的。这种方法会对细胞膜蛋白以及细胞本体有一定程度的伤害; 而温敏收获细胞则是通过降低温度改变细胞生长表面的亲疏水性, 使得细胞自然脱落, 不会对细胞造成伤害。

3 讨论

本实验中化学合成了一种新型的温敏微载体, 并使用PLL增加其表面细胞贴附能力, 用于在悬浮培养系统中大规模培养贴附细胞以及进行温敏无损伤脱附。

我们使用的这种方法具有以下的一些优势: (1) ATRP合成法一步完成, 方法简便, 反应容易控制; (2) CMPS微球球径均一, 相对于葡聚糖微球机械强度高, 既有利于溶剂DMSO的软化作用, 又能在搅拌下保持完整性; (3)通过将多聚赖氨酸贴附到聚苯乙烯微球表面, 增加了细胞在微载体上的贴附能力。

实验中, 通过控制微载体表面NIPAAm的接枝量以及在微载体表面吸附多聚赖氨酸的方式, 大大提高了细胞在微载体表面的贴附和增殖能力。另外, 在转瓶动态培养中, VERO细胞可以在温敏微球上持续稳定地生长, 在一周的细胞培养过程中, 温敏微球上的VERO细胞温敏脱附率基本保持稳定。但是, 随着培养时间的增加, 从第六天开始, 细胞脱附率明显降低。Tamura等^[15]的实验结果显示, 使用温敏微载体CMPS-NIPAAm转瓶长时间悬浮培养CHO细胞, 虽然细胞在温敏微载体上的温敏脱附率基本不变, 但是, 当微载体上细胞开始融合后, 微载体发生团聚, 同时收获细胞中单细胞的比例明显降低。因此, 温敏微载体悬浮扩增细胞中, 为了提高温敏脱附率和单细胞比例, 需要确定合适的细胞培养时间。

参考文献 (References)

- 1 刘晓华, 王晓工, 刘德山. 快速响应的温敏性聚(N-异丙基丙烯酰胺)水凝胶I. 以CaCO₃为成孔剂制备方法、表征及动力学研究. 高分子学报(Liu Xiaohua, Wang Xiaogong, Liu Deshan. Fast responsive thermosensitive poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels I. Synthesis, characterization and kinetic behavior. Acta Polymerica Sinica) 2002; 3: 354.
- 2 Price AK, Culbertson CT. Chemical analysis of single mammalian cells with microfluidics. Anal Chem 2007; 79(7): 2614-21.
- 3 Peniche H, Reyes-Ortega F, Aguilar MR, Rodríguez G, Abradelo C, García-Fernández L, *et al.* Heparin release from Thermosensitive hydrogels. J Controlled Release 1992; 22(2): 95.
- 4 黄月文, 罗宣干, 卓仁禧. 包埋在温度及pH值敏感水凝胶中的阿司匹林的控制释放研究. 高分子材料科学与工程(Huang Yuewen, Luo Xuangan, Zhou Renxi. Studies on the controlled release of aspirin in the temperature pH-sensitive hydrogels. Polymer Materials Science and Engineering) 1998; 14(6): 141.
- 5 Tamura A, Kobayashi J, Yamato M, Okano T. Temperature-responsive poly (Nisopropylacrylamide)-grafted microcarriers for large-scale non-invasive harvest of anchorage-dependent cells. Biomaterials 2012; 33(15): 3803-12.
- 6 Mizutani A, Nagase K, Kikuchi A, Kanazawa H, Akiyama Y, Kobayashi J, *et al.* Thermo-responsive polymer brush-grafted porous polystyrene beads for aqueous chromatography. J Chromatogr A 2010; 1217(4): 522-9.
- 7 Yamato M, Utsumi M, Kushida A, Konno C, Kikuchi A, Okano T. Thermoresponsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature. Tissue Eng 2001; 7(4): 473-80.
- 8 Tamura A, Kobayashi J, Yamato M, Okano T. Thermally responsive microcarriers with optimal poly (N-isopropylacrylamide) grafted density for facilitating cell adhesion/detachment in suspension culture. Acta Biomater 2012; 8(11): 3904-13.
- 9 Çakmak S, Çakmak AS, Gümüşderelioglu M. PNIPAAm-grafted thermoresponsive microcarriers: Surface-initiated ATRP synthesis and characterization. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2013; 33(5): 3033-40.
- 10 Nagase K, Kobayashi J, Kikuchi A, Akiyama Y, Kanazawa H, Okano T. Effects of graft densities and chain lengths on separation of bioactive compounds by nanolayered thermoresponsive polymer brush surfaces. Langmuir 2008; 24(2): 511-7.
- 11 Yim H, Kent MS, Mendez D, López GP, Satiya S, Seo Y. Effects of grafting density and molecular weight on the temperature-dependent conformational change of poly (N-isopropylacrylamide) grafted chains in water. Macromolecules 2006; 39(9): 3420-6.
- 12 Malham IB, Bureau L. Density effects on collapse, compression, and adhesion of Thermo-responsive polymer brushes. Langmuir 2010; 26(7): 4762-8.
- 13 Maeda Y, Higuchi T, Ikeda I. Change in hydration state during the coil-globule transition of aqueous solutions of poly (N-isopropylacrylamide) as evidenced by FTIR spectroscopy. Langmuir 2000; 16(19): 7503-9.
- 14 Balamurugan S, Mendez S, Balamurugan SS, O'Brien MJ, López GP. Thermal response of poly (N-isopropylacrylamide) brushes probed by surface plasmon resonance. Langmuir 2003; 19(7): 2545-9.
- 15 Tamura A, Kobayashi J, Yamato M, Okano T. Temperature-responsive poly (N-isopropylacrylamide)-grafted microcarriers for large-scale non-invasive harvest of anchorage-dependent cells. Biomaterials 2012; 33(15): 3803-12.