

微图案化温度响应性细胞培养板的制备^{*}

Preparation of Temperature-Sensitive TCPS With Micropatterned Surface

天津工业大学天津市改性功能纤维重点实验室,材料科学与工程学院 杨森坤 杨宁 毕思信 陈莉
天津工业大学环境与化学工程学院 贺晓凌 刘婧

[摘要] 基底的拓扑形貌是影响细胞行为的重要因素之一,细胞可以通过“接触诱导”感应基底材料的微图案作出响应。近年来细胞片层工程的发展,也加大了人们对温度响应性物质聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAAm)的研究。本研究将微图案化技术与温敏材料相结合,通过模板法制得表面具有微图案的聚苯乙烯(PS)膜,然后采用紫外光引发接枝方法,将PNIPAAm接枝到其表面。分别采用衰减全反射傅里叶变换红外光谱(ATR-FTIR)法、场发射扫描电子显微镜(FESEM)、原子力显微镜(AFM)、接触角(CA)对膜表面的化学成分、形貌以及温度响应性进行了研究。结果表明,模板法可以简单且完整的得到微纳米级微图案,PNIPAAm成功接枝到材料表面,从接触角测试可以反映出微图案化材料表面有着明显的温度响应性,这为进一步研究微图案化表面对细胞行为的影响以及细胞的降温自动脱附奠定坚实的材料基础。

关键词: 微图案表面 聚(N-异丙基丙烯酰胺) 温度响应性

[ABSTRACT] The topology morphology of the substrate materials is one of the most important factors to affect cell behaviors. Cells could sense and respond to the micropattern of the substrates with “contact guidance”. In recent years, with the development of cell sheet engineering, the thermoresponsive polymer, poly(N-isopropylacrylamide)(PNIPAAm) was paid attention as well. Combining surface microfabrication with thermoresponsive materials, micropatterned polystyrene(PS) membranes were prepared by template method and PNIPAAm was grafted onto the micropatterned membranes by UV photo-grafting technique. The chemical composition, topography structure and thermosensibility of micropatterned surfaces were characterized by attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy(ATR-FTIR), field emis-

sion scanning electron microscope(FESEM), atomic force microscope(AFM), contact angle(CA), respectively. The results showed that the nano-micro micropatterns could be obtained easily and perfectly by template method and PNIPAAm has been grafted onto materials surface. Significant thermosensibility could be observed by CA measurement. These would lay the material foundation to further study the effects of micropatterned surface on cell behaviors and to lower temperature for cell detachment.

Keywords: Micropatterned Surface poly(N-isopropylacrylamide) Temperature sensitive

关于拓扑表面形貌对细胞行为的影响已有很多学者研究,甚至可以追溯到一个世纪以前^[1]。近年来,随着表面拓扑结构制造技术的发展以及生物医学领域对体外培养细胞的不断需求,有关拓扑形貌对细胞行为影响的研究已经逐渐形成一个重要的基础性研究课题。在细胞培养实验中,针对传统酶解法的不足,人们开始使用具有温度响应性的材料实现细胞的无损化自动脱落,从而避免了使用胰蛋白酶对细胞表面一些关键细胞表面蛋白,如离子通道、生长因子受体和细胞粘连蛋白的破坏^[2],并且在细胞片层工程^[3]概念提出以后,PNIPAAm更加引起了再生医学领域的重视。

聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAAm)是N-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm)的聚合物,具有温度响应的性质^[4],因其有着接近体温的低临界溶解温度(LCST)而被广泛用于细胞培养的研究。本文首先通过模板法制得具有拓扑形貌的聚苯乙烯(PS)表面,再通过紫外光引发接枝的方法将温度响应性物质PNIPAAm接枝于表面,便于进一步研究微图案化温敏表面对细胞行为的影响。

1 试验部分

1.1 试剂与仪器

聚苯乙烯细胞培养板(TCPS),美国Corning公司; N-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm),分析纯,日本东京化成

^{*} 国家自然科学基金(批准号:50973084)和天津市应用基础及前沿技术计划项目(批准号:09JJCZDJ23100)资助。

工业株式会社; 葱醌-2-磺酸钠(AQS), 分析纯, 天津市希恩思生化科技有限公司; 光掩模板, 由中国科学院微电子研究所定制; 紫外线高压汞灯($\lambda=365\text{nm}$, 1000w), 上海沪陈灯具制造有限公司; Vector22型傅里叶红外光谱仪, 德国Brucker公司; JYS-180型接触角测定仪, 北京金盛鑫检测仪器有限公司; S-4800型场发射扫描电镜, 日本Hitachi公司; CSPM5500扫描探针显微镜, 北京本源纳米仪器有限公司。

1.2 微图案化温敏膜制备

光掩模板微图案形貌及尺寸为凹状形貌(直径 $5\mu\text{m}$, 间隔 $10\mu\text{m}$, 深 120nm)。配制一定浓度的PS铸膜液, 取适量铸膜液在模板表面刮膜, 待PS膜干燥后, 用蒸馏水与乙醇彻底清洗膜表面, 干燥后备用。

在本实验中参照文献[5]中所述配制用于紫外光引发接枝的反应溶液, 将上述处理好的PS样品首先用紫外氧化处理表面约 30min , 然后将表面氧化的PS样品置于反应溶液中, 鼓泡通入 N_2 10min 后密封。用高压汞灯($\lambda=365\text{nm}$, 1000w)辐照 30min , 辐照距离为 30cm 。接枝完毕后, 以蒸馏水和无水乙醇清洗表面, 以便除去未反应的小分子物质和生成的均聚物等, 室温真空干燥, 制得微图案化温敏膜。

1.3 材料表面性质的表征

用衰减全反射傅里叶变换红外光谱(ATR-FTIR)研究材料表面化学成分, 采用静态接触角(CA)表征材料表面的温敏性质, 以及使用场发射扫描电子显微镜(FESEM)、原子力显微镜(AFM)对材料表面形貌进行观察。

2 结果与讨论

2.1 衰减全反射傅里叶变换红外光谱(ATR-FTIR)

图1为NIPAAm单体的红外光谱图, C=O键的伸缩振动特征峰在 1657cm^{-1} 附近, 1550cm^{-1} 附近主要为N-H键和C-N键的弯曲振动特征峰, C-N-H键的特征峰在 1248cm^{-1} 处, 其中单体中C=C键的特征峰为 1620cm^{-1} 。可以看出在图2中, C=C键的特征峰消失, 表明NIPAAm中双键已参与反应, 形成聚合物PNIPAAm。

图2(a)为接枝处理之前的PS的红外光谱图, 在 693.15cm^{-1} 和 750.09cm^{-1} 处的强峰是单取代苯环上氢的C-H面外变形振动特征峰, 苯环的骨架振动谱带在 $1600\sim 1585\text{cm}^{-1}$ 范围, $1944\sim 1673\text{cm}^{-1}$ 主要是苯环上C-H弯曲振动的倍频和复合频。图2(b)为接枝反应之后的红外光谱图, 温敏化样品(PNIPAAm-grafted PS)与TCPS谱图对比, 分别在 1652cm^{-1} 和 1540cm^{-1} 处出现了明显的酰胺I带和酰胺II带特征峰, 表明PNIPAAm已经成功接枝于PS表面。

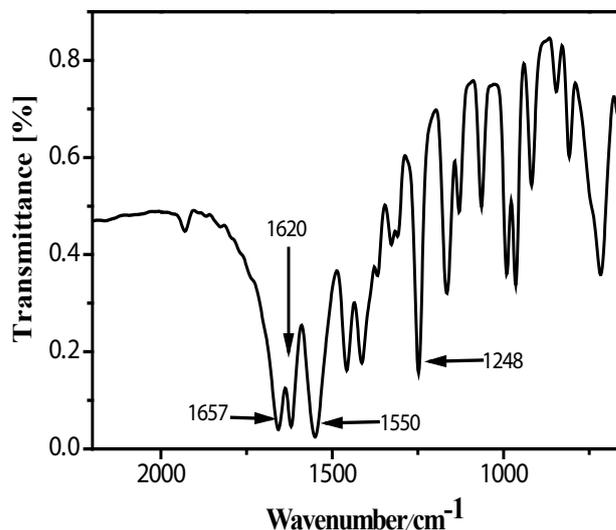


图1 N-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm)单体的红外谱图
Fig.1 ATR-FTIR spectrum of NIPAAm monomer

2.2 材料表面形貌观察

图3为微图案化PS表面的形貌。图3(a)是PS表面接枝PNIPAAm之前FESEM图像, 表面平整, 有着清晰的阵列式柱状图案。说明本实验中采用的模板法可以尽可能完整地使相对应形貌进行复制, 得到形貌较好的微图案化PS表面。拓扑形貌在经过接枝PNIPAAm之后, 图3(b)表面会由于接枝PNIPAAm层的生成变的粗糙, 粗糙度提高, 但原有拓扑形貌仍可以很好的保留, PNIPAAm层并没有将原有形貌覆盖, 从而很好的得到温敏化的微图案PS膜表面, 以便更深入地研究微图案化温敏表面对细胞行为的影响。

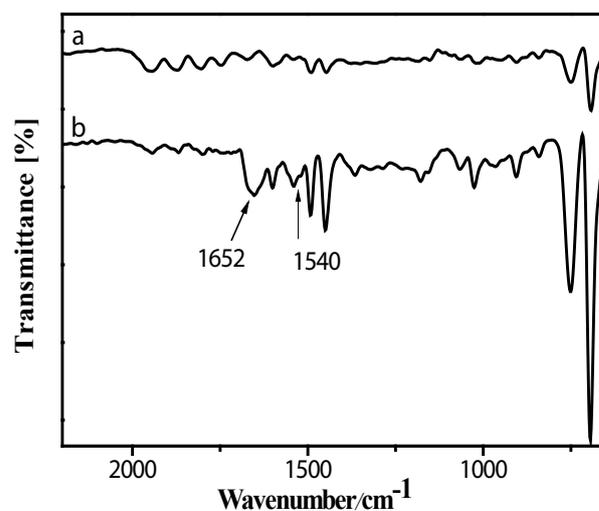


图2 细胞培养板和温敏化样品的红外谱图
Fig.2 ATR-FTIR spectra of TCPS(a) and PNIPAAm-grafted PS(b)

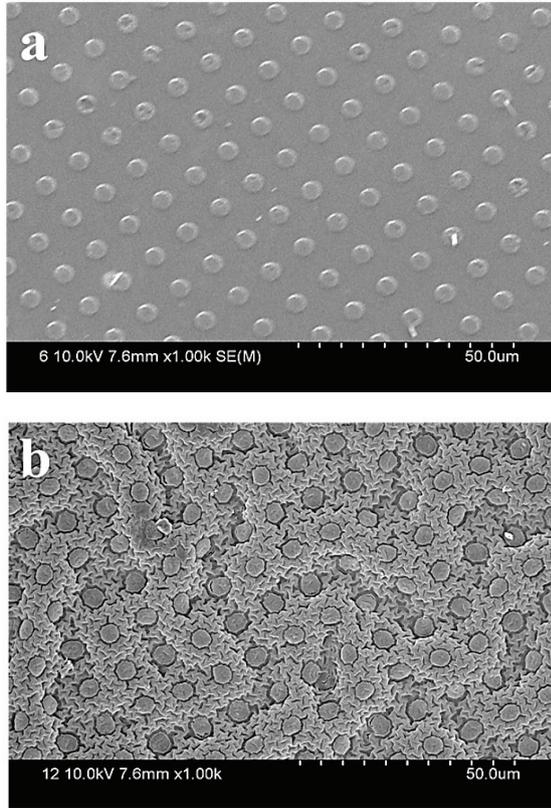


图3 未经修饰的微图案化PS与温敏化PS的表面形貌
Fig.3 The surface topography of micropatterned virgin PS (a) and PNIPAAm-grafted PS(b)

2.3 AFM 分析

在场发射扫描电子显微镜 (FESEM) 观察表面形貌的基础上,采用原子力显微镜(AFM)对材料表面形貌进行更进一步的研究。图 5 为 PS 表面接枝 PNIPAAm 前后的三维 AFM 图片,每张图片右下角为相对应表面的二维图像。图 5 (a)是接枝之前材料表面的形貌,可以看出此时材料表面比较平整,柱状图案明显清晰,平均粗糙度(Ra)为 24.1nm。图 5(b)是接枝之后的表面形貌,可以看出在接枝 PNIPAAm 之后,表面变得凹凸不平,Ra 值增大到了 164nm。至于该实验条件下产生的表面粗糙度的变化对细胞行为有何影响,还需进一步的研究。

通过测定样品表面在温敏修饰前后,分别在 4℃和 40℃时的接触角,研究材料表面的温度响应性。实验中未经修饰的 TCPS 表面作为对照组,从测试结果看出,对于未经修饰的 TCPS 表面而言,4℃时接触角为 $66.3 \pm 0.8^\circ$,40℃时接触角为 $67.1 \pm 1.2^\circ$,随温度的变化,接触角并没有表现出明显的变化,表面不具有温度响应性。对于接枝 PNIPAAm 后样品(PNIPAAm-grafted PS),在 4℃时接触角为 $39.8 \pm 0.6^\circ$ 。在 40℃时,样品

表面接触角是 $97.5 \pm 0.6^\circ$ 。可以看出接触角有着明显的变化,随着温度的升高,材料表面的疏水性增强,表面能增大,这是由于 PNIPAAm 在材料表面接枝以后,在低于其低临界溶解温度(LCST)时 PNIPAAm 分子链处于伸展的形态,酰胺键会与外界的水分子形成氢键,从而表现为亲水性。当温度升高,高于 LCST 时,PNIPAAm 分子链处于蜷缩状态,各分子链之间的酰胺键会彼此形成氢键,而不是与外界的水分子形成氢键,从而表现为疏水性。接触角实验结果表明,微图案化温敏表面已成功制备,可以进一步用于细胞实验,实现细胞的降温自动脱附。

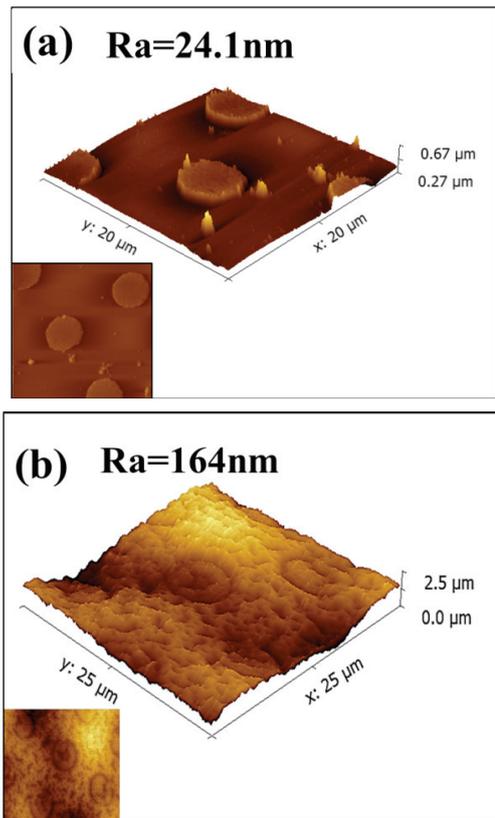


图4 未经修饰的PS与温敏化PS表面原子力显微镜图像
Fig.4 AFM images of virgin PS (a) and PNIPAAm-grafted PS(b)

2.4 材料表面温度响应性的分析

表1 不同样品在不同温度下的润湿性

	4℃	40℃	Δ CA
对照组	$66.3 \pm 0.8^\circ$	$67.1 \pm 1.2^\circ$	0.8°
温敏化样品	$39.8 \pm 0.6^\circ$	$97.5 \pm 0.6^\circ$	57.7°

3 结论

通过模板法制备出微图案化的聚苯乙烯表面,并且

采用紫外光引发接枝的方法,成功的将温敏聚合物聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAAm)接枝到了微图案化的PS表面,得到微图案化的温度响应表面,有望应用于细胞实验及细胞片层工程中,进一步研究对细胞行为的影响。

参 考 文 献

- [1] Harrison R G. On the stereotropism of embryonic Cells[J]. Science, 1911, 34(870): 279-281.
- [2] Yamato M, Utsumi M, Kushida A, et al. Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature[J]. Tissue Engineering, 2001, 7(4): 473-480.
- [3] Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering[J]. Materials Today, 2004, 7(5): 42-47.
- [4] Heskins M, Guillet J E. Solution properties of poly(N-isopropylacrylamide)[J]. Journal of Macromolecular Science: Part A-Chemistry, 1968, 2(8): 1441-1455.
- [5] Curti P S, de Moura M R, Radovanovic E, et al. Surface modification of polystyrene and poly(ethylene terephthalate) by grafting poly(N-isopropylacrylamide)[J]. Journal of Materials Science: Material in Medicine, 2002, 13(12): 1175-1180.
- [6] Guan Y Q, Li Z B, Wang X, et al. Synthesis of a kind of temperature-responsive cell culture surface for corneal sheet[J]. Journal of Materials Science and Technology, 2010, 26(12): 1119-1126.