



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108164656 A

(43)申请公布日 2018.06.15

(21)申请号 201810084954.3

C12N 5/00(2006.01)

(22)申请日 2018.01.29

C12N 5/09(2010.01)

(71)申请人 中国石油大学(华东)

地址 266580 山东省青岛市经济技术开发区  
区长江西路66号中国石油大学(华东)

(72)发明人 夏永清 吴寒 唐大超 王生杰

(74)专利代理机构 青岛清泰联信知识产权代理  
有限公司 37256

代理人 高洋

(51) Int. Cl.

C08F 283/06(2006.01)

C08F 220/54(2006.01)

C08F 220/58(2006.01)

C08F 2/44(2006.01)

C08K 3/04(2006.01)

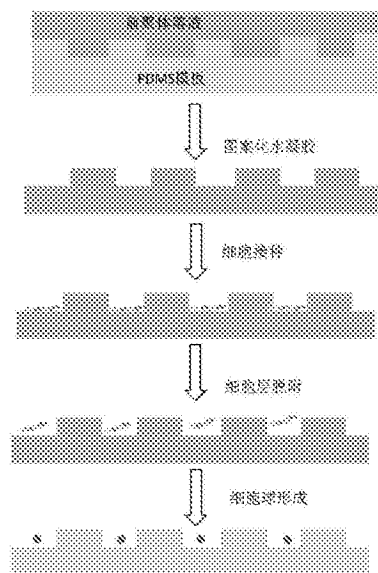
权利要求书1页 说明书7页 附图6页

## (54)发明名称

一种水凝胶及其制备方法和应用

## (57)摘要

本发明涉及一种水凝胶及其制备方法和应用,其中水凝胶为图案化温敏性水凝胶,包括以下质量份数的原料组分:10~50份的N-异丙基丙烯酰胺类单体、0.01~0.2份的氧化石墨烯和5~30份的交联剂。所述的水凝胶用于细胞培养,收集细胞层,进一步可用于构建三维肿瘤模型。本发明提供的水凝胶合理配伍各原料组分,具有优异的温敏性能,通过合理配伍的氧化石墨烯浓度,使水凝胶在细胞培养温度下,呈现疏水性,促进细胞在其表面黏附增殖;在室温条件下,水凝胶由疏水转变为亲水,能够在短时间内收集到脱附的细胞层,利用得到的细胞层进一步培养成具有三维结构的细胞球,既可以用于肿瘤模型研究,也可作为筛选抗肿瘤药物的细胞模型。



1. 一种水凝胶,其特征在于:包括以下质量份数的原料组分:10~50份的N-异丙基丙烯酰胺类单体、0.01~0.2份的氧化石墨烯和5~30份的交联剂。

2. 根据权利要求1所述的水凝胶,其特征在于:所述交联剂为聚乙二醇类交联剂。

3. 根据权利要求1所述的水凝胶,其特征在于:还包括以下质量份数的原料组分:0.1~10份的引发剂和0.5~5份的催化剂;

所述N-异丙基丙烯酰胺类单体为N-异丙基丙烯酰胺、2-羟基异丙基丙烯酰胺或N,N-二乙基丙烯酰胺;

所述交联剂为聚乙二醇双丙烯酸酯或聚乙二醇双甲基丙烯酸酯;

所述引发剂为过硫酸铵或过硫酸钾;

所述催化剂为亚硫酸钠或N,N,N',N'-四甲基乙二胺。

4. 一种权利要求1~3任一项所述的水凝胶的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:取N-异丙基丙烯酰胺类单体、氧化石墨烯和交联剂,与去离子水相混合,经低温超声分散,得到聚合物预聚体溶液,所述聚合物预聚体溶液中的所述N-异丙基丙烯酰胺类单体质量浓度为10~50%、所述氧化石墨烯的质量浓度为0.01~0.2%、所述交联剂的质量浓度为5~30%;将所述聚合物预聚体溶液放入模具中,经室温聚合得到图案化的水凝胶。

5. 根据权利要求4所述的水凝胶的制备方法,其特征在于:所述聚合物预聚体溶液中还添加有引发剂,所述聚合物预聚体溶液中的引发剂的质量浓度为0.1~10%,经低温超声分散后加入催化剂,所述聚合物预聚体溶液中的催化剂的质量浓度为0.5~5%,经低温超声混合后得到溶液放入模具中,经室温聚合得到图案化的水凝胶,经去离子水浸泡后灭菌保存。

6. 一种权利要求1~3任一项所述的水凝胶在培养细胞中的应用。

7. 根据权利要求6所述的水凝胶在培养细胞中的应用,其特征在于:取一种或多种贴壁细胞接种于水凝胶表面,经细胞培养在图案化的水凝胶内培养成层,得到细胞层。

8. 根据权利要求7所述的水凝胶在培养细胞中的应用,其特征在于:将所述细胞层经降温脱附后转移至琼脂铺底的细胞板中培养,得到单种或多种细胞共培养的细胞球。

9. 一种权利要求1~3任一项所述的水凝胶在制备三维肿瘤模型的应用。

10. 根据权利要求9所述的水凝胶在制备三维肿瘤模型的应用,其特征在于:取肿瘤细胞和其他贴壁细胞均接种于水凝胶表面,经细胞培养在图案化的水凝胶内培养成层,得到细胞层,将所述细胞层经降温脱附后转移至琼脂铺底的细胞板中培养,得到肿瘤细胞和其他贴壁细胞共培养的细胞球。

## 一种水凝胶及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于细胞培养技术领域,尤其涉及一种水凝胶及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 人类组织器官的功能的损害及丧失,都可以导致疾病和死亡。美国有资料显示,每年都有超过百万的人患有组织器官功能损害或丧失的疾病。我国是全世界人口最多的国家,同时也是患有组织器官功能损害或丧失疾病最多的国家。

[0003] 理想的组织工程是将机体正常组织细胞吸附在支架上进行体外培养,而这种支架可以被机体吸收,当达到一定程度,把细胞-支架植入机体病变部位,随着支架被机体慢慢吸收,上面的细胞也就慢慢形成了相应的组织,从而达到修复的目的。然而,支架材料还存在很多问题需要探索 and 解决。细胞片层技术是应用细胞片层进行组织重建,比如将片层直接植入受区位点,或通过异型和同型细胞片层的叠加,构建细胞片层后植入受区位点通过细胞层技术已经在体外构建出了心肌组织,角膜组织,膀胱上皮组织,软骨组织等。与传统组织工程方法相比,这些应用细胞层技术构建的三维组织更接近于人体正常组织。

[0004] 常规的细胞培养是以TCPS培养板为载体的,培养后用胰酶使细胞外基质降解,从而使培养细胞脱附,但是胰酶会损坏细胞外基质,破坏细胞间连接,影响细胞的生物活性。利用聚N-异丙基丙烯酰胺(pNIPAm)在水溶液中的温度响应性可以获得完整无损伤细胞片:pNIPAm在细胞培养温度下呈疏水性,适合细胞贴附增殖;当温度降低到低临界溶液温度以下时,pNIPAm发生疏水-亲水转变,细胞自动从其表面分离,从而获得完整的细胞层。

[0005] 目前,细胞层收集的主要方法是将N-异丙基丙烯酰胺通过电子辐射、等离子体处理或紫外照射等手段将其线性聚合物固定在基底上。但基底接枝线性pNIPAm的方法对pNIPAm的厚度有严格要求,太低,黏附的细胞降温不能脱附;太高,细胞不能黏附。为了得到适宜的pNIPAm厚度,通常需要特殊的仪器或复杂的化学聚合手段,这在主流生物实验室中难以实现。

[0006] 水凝胶是一种含水但不溶于水的聚合物,相对于接枝线性聚合物,水凝胶的制备方法简单易行。但细胞在pNIPAm水凝胶表面的黏附能并不理想,为了改善细胞在pNIPAm水凝胶表面的黏附增殖性能,锂藻土、壳聚糖、明胶、多壁碳纳米管等材料用于改性pNIPAm水凝胶,但制备的凝胶柔韧性差、响应速率慢。

### 发明内容

[0007] 本发明针对上述的技术问题,提出一种水凝胶及其制备方法和应用。

[0008] 为了达到上述目的,本发明采用的技术方案为:

[0009] 一种水凝胶,包括以下质量份数的原料组分:10~50份的N-异丙基丙烯酰胺类单体、0.01~0.2份的氧化石墨烯和5~30份的交联剂。

[0010] 作为优选:所述交联剂为聚乙二醇类交联剂。

[0011] 作为优选:还包括以下质量份数的原料组分:0.1~10份的引发剂和0.5~5份的催

化剂。

[0012] 作为优选:所述N-异丙基丙烯酰胺类单体为N-异丙基丙烯酰胺、2-羟基异丙基丙烯酰胺或N,N-二乙基丙烯酰胺;

[0013] 所述交联剂为聚乙二醇双丙烯酸酯或聚乙二醇双甲基丙烯酸酯;

[0014] 所述引发剂为过硫酸铵或过硫酸钾;

[0015] 所述催化剂为亚硫酸钠或N,N,N',N'-四甲基乙二胺。

[0016] 作为优选:所述的水凝胶为图案化的水凝胶。

[0017] 一种上述水凝胶的制备方法,包括以下步骤:取N-异丙基丙烯酰胺类单体、氧化石墨烯和交联剂,与去离子水相混合,经低温超声分散,得到聚合物预聚体溶液,所述聚合物预聚体溶液中的所述N-异丙基丙烯酰胺类单体质量浓度为10~50%、所述氧化石墨烯的质量浓度为0.01~0.2%、所述交联剂的质量浓度为5~30%;将所述聚合物预聚体溶液放入模具中,经室温聚合得到图案化的水凝胶。

[0018] 作为优选:所述聚合物预聚体溶液中还添加有引发剂,所述聚合物预聚体溶液中的引发剂的质量浓度为0.1~10%,经低温超声分散后加入催化剂,所述聚合物预聚体溶液中的催化剂的质量浓度为0.5~5%,经低温超声混合后得到溶液放入模具中,经室温聚合得到图案化的水凝胶,经去离子水浸泡后灭菌保存。

[0019] 一种上述水凝胶在培养细胞中的应用。

[0020] 作为优选:取一种或多种贴壁细胞接种于水凝胶表面,经细胞培养在图案化的水凝胶内培养成层,得到细胞层。

[0021] 作为优选:将所述细胞层经降温脱附出后转移至琼脂铺底的细胞板中培养,得到单种或多种细胞共培养的细胞球。

[0022] 一种上述的水凝胶在制备三维肿瘤模型的应用。

[0023] 作为优选:取肿瘤细胞和其他贴壁细胞均接种于水凝胶表面,经细胞培养在图案化的水凝胶内培养成层,得到细胞层,将所述细胞层经降温脱附出后转移至琼脂铺底的细胞板中培养,得到肿瘤细胞和其他贴壁细胞共培养的细胞球。

[0024] 与现有技术相比,本发明的优点和积极效果在于:

[0025] 1、本发明提供的水凝胶合理配伍各原料组分,通过合理配伍的氧化石墨烯,细胞能够黏附并增殖。且制备的水凝胶交联密度均匀;最重要的是具有优异的温敏性能和生物相容性,其相变温度在35℃。在细胞培养温度下,呈现疏水性,在室温时,水凝胶呈现亲水性,其表面的细胞或细胞层基于温度的变化可以带着其表面的细胞外基质脱附。

[0026] 2、本发明的水凝胶细胞层技术应用于构建体外三维肿瘤模型,通过模拟三维细胞网络、细胞与基质、细胞与细胞之间的相互作用,使体外三维培养的细胞具有人类肿瘤组织中相应的病理生理学特征,功能上更接近细胞在体内肿瘤微环境内的表达,结构将会更接近人体天然肿瘤组织,从而弥补目前体外三维培养技术构建肿瘤模型的不足。

## 附图说明

[0027] 图1为本发明实施例所提供的水凝胶用于培养细胞的流程图;

[0028] 图2为本发明实施例非洲绿猴肾成纤维细胞接种于水凝胶表面培养成细胞层的显微镜图;

- [0029] 图3为本发明实施例图2所示细胞层脱附后的显微镜图；
- [0030] 图4为本发明实施例图3所示脱附的细胞层再培养后的显微镜图；
- [0031] 图5为本发明实施例人宫颈癌细胞接种于水凝胶表面培养成细胞层的显微镜图；
- [0032] 图6为本发明实施例图5所示细胞层脱附后的显微镜图；
- [0033] 图7为本发明实施例图5所示脱附的细胞层再培养后的显微镜图；
- [0034] 图8为本发明实施例10中纤维细胞-肿瘤细胞共培养的细胞球的电镜图；
- [0035] 图9为本发明实施例中非洲绿猴肾成纤维细胞在不同含量氧化石墨烯的水凝胶表面增值数量柱状图；
- [0036] 图10为本发明实施例中人宫颈癌细胞在不同含量氧化石墨烯的水凝胶表面增值数量柱状图；

### 具体实施方式

[0037] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0038] 本发明实施例提供了一种水凝胶,包括以下质量份数的原料组分:10~50份的N-异丙基丙烯酰胺类单体、0.01~0.2份的氧化石墨烯和5~30份的交联剂。

[0039] 氧化石墨烯(GO)是石墨烯的一种含氧衍生物,它是由石墨粉经化学氧化及超声剥离后的产物,其基本单元是有机材料中最为稳定的碳六元环结构。氧化石墨烯不仅具有优异的机械性能、表面活性和润湿性能,而且能被聚合物或小分子插层后剥离,在改善材料的电学、力学、热学等综合性能方面起着至关重要的作用。通过将N-异丙基丙烯酰胺类单体和氧化石墨烯相配伍,改善细胞在聚N-异丙基丙烯酰胺水凝胶表面的黏附增殖性能,同时在交联剂的交联作用下,在细胞培养温度条件,水凝胶对肿瘤细胞、成纤维细胞都具有优异的黏附增殖性能,在室温下,可以收集到完整的细胞层。

[0040] 在一可选实施例中:所述交联剂为聚乙二醇类交联剂。

[0041] 其中针对本发明的水凝胶,用N,N'-亚甲基双丙烯酰胺作为交联剂制备聚N-异丙基丙烯酰胺水凝胶的力学性能和光学性能并不理想,为了改善聚N-异丙基丙烯酰胺水凝胶表面的力学性能,优选聚乙二醇类交联剂,提高聚N-异丙基丙烯酰胺水凝胶力学强度和透光性。

[0042] 在一可选实施例中:还包括以下质量份数的原料组分:0.1~10份的引发剂和0.5~5份的催化剂。

[0043] 在一优选实施例中:所述N-异丙基丙烯酰胺类单体为N-异丙基丙烯酰胺、2-羟基异丙基丙烯酰胺或N,N-二乙基丙烯酰胺;

[0044] 所述交联剂为聚乙二醇双丙烯酸酯或聚乙二醇双甲基丙烯酸酯;

[0045] 所述引发剂为过硫酸铵或过硫酸钾;

[0046] 所述催化剂为亚硫酸钠或N,N,N',N'-四甲基乙二胺。

[0047] 在一优选实施例中:所述的水凝胶为图案化的水凝胶。

[0048] 筛选上述的N-异丙基丙烯酰胺类单体,使获取到的水凝胶在水溶液中具有温度响

应性;同时配伍氧化石墨烯使水凝胶具有优异的生物相容性;另外筛选交联剂为聚乙二醇双丙烯酸酯或聚乙二醇双甲基丙烯酸酯,其作为一种大分子交联剂,交联密度均匀,使水凝胶具有良好的柔韧性能。由于N-异丙基丙烯酰胺类单体的温度响应性,该水凝胶在细胞培养温度下,呈现疏水性;基于配伍的氧化石墨烯,细胞能够黏附增殖;在室温时,水凝胶呈现亲水性,其表面的细胞或细胞层可以带着其表面的细胞外基质脱附。

[0049] 本发明实施例还提供一种上述水凝胶的制备方法,包括以下步骤:取N-异丙基丙烯酰胺类单体、氧化石墨烯和交联剂,与去离子水相混合,经低温超声分散,得到聚合物预聚体溶液,所述聚合物预聚体溶液中的所述N-异丙基丙烯酰胺类单体质量浓度为10~50%、所述氧化石墨烯的质量浓度为0.01~0.2%、所述交联剂的质量浓度为5~30%;将所述聚合物预聚体溶液放入模具中,经室温聚合得到图案化的水凝胶。

[0050] 通过制备图案化的水凝胶,细胞可以在图案内培养成相同面积的细胞层,进而脱附培养成具有相同大小的细胞球,可用于作为抗肿瘤药物筛选的肿瘤球模型。

[0051] 在一可选实施例中:所述聚合物预聚体溶液中还添加有引发剂,所述聚合物预聚体溶液中的引发剂的质量浓度为0.1~10%,经低温超声分散后加入催化剂,所述聚合物预聚体溶液中的催化剂的质量浓度为0.5~5%,经低温超声混合后得到溶液放入模具中,经室温聚合得到图案化的水凝胶,经去离子水浸泡后灭菌保存。

[0052] 本实施例还提供一种上述水凝胶在培养细胞中的应用。

[0053] 在一可选实施例中:如图1所示,取一种或多种贴壁细胞接种于水凝胶表面,经细胞培养在图案化的水凝胶内培养成层,得到细胞层。

[0054] 在一可选实施例中:将所述细胞层经降温脱附出后转移至琼脂铺底的细胞板中培养,得到单种或多种细胞共培养的细胞球。

[0055] 本实施例还提供一种上述的水凝胶在制备三维肿瘤模型的应用。

[0056] 本实施例还提供:如图1所示,取肿瘤细胞和其他贴壁细胞均接种于水凝胶表面,经细胞培养在图案化的水凝胶内培养成层,得到细胞层,将所述细胞层经降温脱附出后转移至琼脂铺底的细胞板中培养,得到肿瘤细胞和其他贴壁细胞共培养的细胞球。

[0057] 已知现有的人体外肿瘤模型主要是利用二维细胞培养体系和动物模型,这两种方法均存在一些难以克服的问题。二维细胞培养体系的缺陷表现为:不能反映细胞与细胞之间、细胞与基质之间的相互作用,细胞所表现的生物学特性与体内细胞存在着较大差异。动物模型虽能使肿瘤处于更接近人体的天然组织环境中,但其培养过程耗时长,花费昂贵,而且个体差异会导致评价困难。细胞体外三维培养结合了细胞二维培养和动物模型的优点,能够在体外模拟肿瘤细胞的体内生长环境。通过模拟三维细胞网络、细胞与基质、细胞与细胞之间的相互作用,体外三维培养的细胞具有人类肿瘤组织中相应的病理生理学特征,功能上更接近细胞在体内肿瘤微环境内的表达。与动物模型相比,细胞体外三维培养更容易进行大规模操作。目前体外三维肿瘤模型还处于初期探索阶段,主要分无支架肿瘤模型和有支架肿瘤模型两种,但都还存在诸多问题需要解决:例如多细胞肿瘤球是制备无支架三维肿瘤模型的主要方法,该模型操作简单,但是能自发性聚集成球的细胞种类有限,并不适用于所有类型细胞。有支架肿瘤模型是将肿瘤细胞种植在具有三维孔隙结构的支架内,通过物理扩散或细胞自发迁移的方法得到三维肿瘤模型。天然大分子材料(如琼脂、胶原、Matrigel胶)和人工高分子材料(如PEG、单壁碳纳米管)都被用于肿瘤细胞的三维共培养。

天然大分子具有与细胞外基质 (ECM) 相似的优点,但其重现性差,降解速度不易控制。人工高分子材料虽然避免了上述缺陷,但缺乏细胞识别信号,不具备生物活性。而采用本发明的水凝胶用于构建体外三维肿瘤模型,通过模拟三维细胞网络、细胞与基质、细胞与细胞之间的相互作用,使体外三维培养的细胞具有人类肿瘤组织中相应的病理生理学特征,功能上更接近细胞在体内肿瘤微环境内的表达,结构将会更接近人体天然肿瘤组织,从而弥补目前体外三维培养技术构建肿瘤模型的不足。

[0058] 为了更清楚详细地介绍本发明实施例所提供的一种水凝胶及其制备方法和应用,下面将结合具体实施例进行描述。

[0059] 实施例1:一种水凝胶,包括以下质量份数的原料组分:10份的N-异丙基丙烯酰胺类单体、0.2份的氧化石墨烯和5份的交联剂。

[0060] 实施例2:一种水凝胶,包括以下质量份数的原料组分:15份的N-异丙基丙烯酰胺、0.1份的氧化石墨烯、18份的聚乙二醇双丙烯酸酯。

[0061] 一种上述水凝胶的制备方法,包括以下步骤:按照上述的质量份数取N-异丙基丙烯酰胺、氧化石墨烯和聚乙二醇双丙烯酸酯,与去离子水相混合,经低温超声分散,得到聚合物预聚体溶液,所述聚合物预聚体溶液中的所述N-异丙基丙烯酰胺质量浓度为15%、所述氧化石墨烯的质量浓度为0.1%、所述聚乙二醇双丙烯酸酯的质量浓度为18%;将所述聚合物预聚体溶液放入模具中,经室温聚合得到图案化的水凝胶。

[0062] 实施例3:一种水凝胶,包括以下质量份数的原料组分:50份的2-羟基异丙基丙烯酰胺、0.01份的氧化石墨烯、30份的聚乙二醇双甲基丙烯酸酯、0.1份的过硫酸钾和5份的N,N',N'-四甲基乙二胺。

[0063] 一种上述水凝胶的制备方法,包括以下步骤:按照上述的质量份数取2-羟基异丙基丙烯酰胺、氧化石墨烯和聚乙二醇双甲基丙烯酸酯,与去离子水相混合,经低温超声分散,得到聚合物预聚体溶液;所述聚合物预聚体溶液中的所述2-羟基异丙基丙烯酰胺质量浓度为50%、所述氧化石墨烯的质量浓度为0.01%、所述聚乙二醇双甲基丙烯酸酯的质量浓度为30%;继续向所述聚合物预聚体溶液中加入过硫酸钾,所述聚合物预聚体溶液中的过硫酸钾的质量浓度为0.1%,经低温超声分散后加入N,N',N'-四甲基乙二胺,所述聚合物预聚体溶液中的N,N',N'-四甲基乙二胺的质量浓度为5%,经低温超声混合后得到溶液放入模具中,经室温聚合得到图案化的水凝胶,经去离子水浸泡后灭菌保存。

[0064] 实施例4:一种水凝胶,包括以下质量份数的原料组分:40份的N,N-二乙基丙烯酰胺、0.05份的氧化石墨烯、25份的聚乙二醇双丙烯酸酯、10份的过硫酸铵和0.5份的亚硫酸钠。

[0065] 一种上述水凝胶的制备方法,包括以下步骤:按照上述的质量份数取N,N-二乙基丙烯酰胺、氧化石墨烯和聚乙二醇双丙烯酸酯,与去离子水相混合,经低温超声分散,得到聚合物预聚体溶液;所述聚合物预聚体溶液中的所述N,N-二乙基丙烯酰胺质量浓度为40%、所述氧化石墨烯的质量浓度为0.05%、所述聚乙二醇双丙烯酸酯的质量浓度为25%;继续向所述聚合物预聚体溶液中加入过硫酸铵,所述聚合物预聚体溶液中的过硫酸铵的质量浓度为10%,经低温超声分散后加入亚硫酸钠,所述聚合物预聚体溶液中的亚硫酸钠的质量浓度为0.5%,经低温超声混合后得到溶液放入PDMS模板中,经室温聚合得到图案化的水凝胶,经去离子水浸泡后灭菌保存。

[0066] 实施例5:取0.5g异丙基丙烯酰胺、0.008g过硫酸铵、80uL聚乙二醇二甲基丙烯酸酯依次加入到5mL含有氧化石墨烯的分散液中,其中含有氧化石墨烯的分散液为市售购买,且经加入去离子水稀释后得到的,所述分散液中氧化石墨烯的浓度为0.4mg/mL,超声分散10min,直至完全分散形成均匀分散液。将上述混合液用冰水冷却后,加入60uL N,N,N',N'-四甲基乙二胺混匀后,将混合液立即倒入模具中,于30℃下静置24小时,即得到所述的图案化温敏性水凝胶。然后将得到的水凝胶浸泡于去离子水中置换1周后,于乙醇中浸泡过夜,再用无菌PBS置换,用于细胞培养。

[0067] 实施例6:将0.8g 2-羟基异丙基丙烯酰胺、0.008g过硫酸铵、100uL聚乙二醇二甲基丙烯酸酯依次加入到5mL含有氧化石墨烯的分散液中,所述分散液中氧化石墨烯的浓度为0.8mg/mL,其中含有氧化石墨烯的分散液为市售购买,且经加入去离子水稀释后得到的,超声分散10min,直至完全分散形成均匀分散液。将上述混合液用冰水冷却,加入60uL N,N,N',N'-四甲基乙二胺混匀后,将混合液立即倒入模具中,于室温下静置24小时,得到所述的生物相容性温敏性水凝胶。然后将得到的水凝胶浸泡于去离子水中置换1周后,于乙醇中浸泡过夜,再用无菌PBS置换,用于细胞培养。

[0068] 实施例7:取实施例5得到的水凝胶,将非洲绿猴肾成纤维细胞(COS7)能够在水凝胶表面迅速铺展增殖,第3天增殖速度最快,数量远高于TCPS板中细胞数量。当温度降低至室温时,可以获得COS7细胞层,该细胞层可以在新的基底上继续生长。将获取的细胞层经降温脱附出转移至琼脂铺底的细胞板中培养,使COS7细胞层团聚,最终得到COS7细胞球。具体如图2、图3和图4所示。

[0069] 实施例8:取实施例5得到的水凝胶,将人宫颈癌细胞(HeLa)在水凝胶图案化表面迅速铺展增殖,第3天增殖速度最快,数量最多。当温度降低至室温时,可以获得HeLa细胞层,将该细胞层转移至琼脂铺底的细胞培养板中,2-4天可以成球,9天后细胞球仍保持活性。具体如图5、图6和图7所示。

[0070] 实施例9:取实施例6得到的水凝胶,将人宫颈癌细胞(HeLa)细胞在水凝胶表面迅速铺展增殖,第3天增殖速度最快,数量最多。当温度降低至室温时,可以获得HeLa细胞层,该细胞层可以在新的基底上继续生长。

[0071] 实施例10:取实施例6得到的水凝胶,将纤维细胞(COS7)和乳腺癌细胞(MBA-MD-231)同时接种水凝胶表面,轻摇后于细胞培养条件下培养成层,降温脱附,得到共培养的细胞片层。将细胞片层转移至琼脂铺底的细胞培养板中,于细胞培养条件下培养2~4天成球,得到成纤维细胞-肿瘤细胞共培养的细胞球,具体如图8所示的电镜照片,为本实施例所制备的细胞球,且经观察该细胞球9天后仍有活力,在细胞板中可继续生长。

[0072] 试验例1:

[0073] 对照组:取非洲绿猴肾成纤维细胞(COS7)接种于TCPS板中,进行细胞培养,并分别于1d、3d和5d后通过MTT实验检测活细胞数量。

[0074] 空白对照组:取0.5g异丙基丙烯酰胺、0.008g过硫酸铵、80uL聚乙二醇二甲基丙烯酸酯加入到去离子水中,超声分散10min,直至完全分散形成均一溶液。将上述混合溶液用冰水冷却后,分别加入60uL N,N,N',N'-四甲基乙二胺混匀,将混合液立即倒入模具中,于30℃下静置24小时,得到所述的图案化温敏性水凝胶。然后将得到的水凝胶浸泡于去离子水中置换1周后,于乙醇中浸泡过夜,再用无菌PBS置换后,取非洲绿猴肾成纤维细胞(COS7)接



种于水凝胶表面,且在水凝胶表面迅速铺展增殖,进行细胞培养,并分别于1d、3d和5d后通过MTT检测其吸光度。

[0075] 实验组:取0.5g异丙基丙烯酰胺、0.008g过硫酸铵、80uL聚乙二醇二甲基丙烯酸酯分别依次加入到5mL氧化石墨烯浓度为0.4mg/mL的分散液中,超声分散10min,直至完全分散形成均匀分散液。将上述混合液用冰水冷却后,加入60uL N,N,N',N'-四甲基乙二胺混匀,将混合液立即倒入PDMS模板中,于30℃下静置24小时,得到所述的图案化温敏性水凝胶。然后将得到的水凝胶浸泡于去离子水中置换1周后,于乙醇中浸泡过夜,再用无菌PBS置换后,取非洲绿猴肾成纤维细胞(COS7)接种于水凝胶表面,且在水凝胶表面迅速铺展增殖,进行细胞培养,并分别于1d、3d和5d后通过MTT检测其吸光度。

[0076] 其中对照组、空白对照组和实验组分别于相同间隔时间做MTT实验,检测吸光度,来确定水凝胶表面的细胞量。

[0077] 试验结果:如图9所示,其中非洲绿猴肾成纤维细胞在第3天增殖速度最快,且添加配伍有氧化石墨烯的水凝胶所培养的细胞数量远高于TCPS板中培养的细胞数量。

[0078] 试验例2:

[0079] 对照组:取人宫颈癌细胞(HeLa)接种于TCPS板中,进行细胞培养,并分别于1d、3d和5d后检测其吸光度。

[0080] 空白对照组:取0.5g异丙基丙烯酰胺、0.008g过硫酸铵、80uL聚乙二醇二甲基丙烯酸酯加入到去离子水中,超声分散10min,直至完全分散形成均一溶液。将上述混合溶液用冰水冷却后,分别加入60uL N,N,N',N'-四甲基乙二胺混匀,将混合液立即倒入PDMS模板中,于30℃下静置24小时,得到所述的图案化温敏性水凝胶。然后将得到的水凝胶浸泡于去离子水中置换1周后,于乙醇中浸泡过夜,再用无菌PBS置换后,取人宫颈癌细胞(HeLa)接种于水凝胶表面,且在水凝胶表面迅速铺展增殖,进行细胞培养,并分别于1d、3d和5d后检测其吸光度。

[0081] 实验组:取0.5g异丙基丙烯酰胺、0.008g过硫酸铵、80uL聚乙二醇二甲基丙烯酸酯分别依次加入到5mL氧化石墨烯浓度为1.2mg/mL的分散液中,超声分散10min,直至完全分散形成均匀分散液。将上述混合溶液用冰水冷却后,加入60uL N,N,N',N'-四甲基乙二胺混匀,将混合液立即倒入PDMS模板中,于30℃下静置24小时,得到所述的图案化温敏性水凝胶。然后将得到的水凝胶浸泡于去离子水中置换1周后,于乙醇中浸泡过夜,再用无菌PBS置换后,取人宫颈癌细胞(HeLa)接种于水凝胶表面,且在水凝胶表面迅速铺展增殖,进行细胞培养,并分别于1d、3d和5d后检测其吸光度。

[0082] 其中对照组、空白对照组和实验组分别于相同间隔时间检测吸光度,来确定水凝胶表面的细胞量。

[0083] 试验结果:如图10所示,其中非洲绿猴肾成纤维细胞在第3天增殖速度最快,且添加配伍有氧化石墨烯的水凝胶所培养的细胞数量远高于在纯N-异丙基丙烯酰胺水凝胶表面培养的细胞数量。氧化石墨烯的加入能够显著提高细胞在聚N-异丙基丙烯酰胺的水凝胶表面的增殖能力。

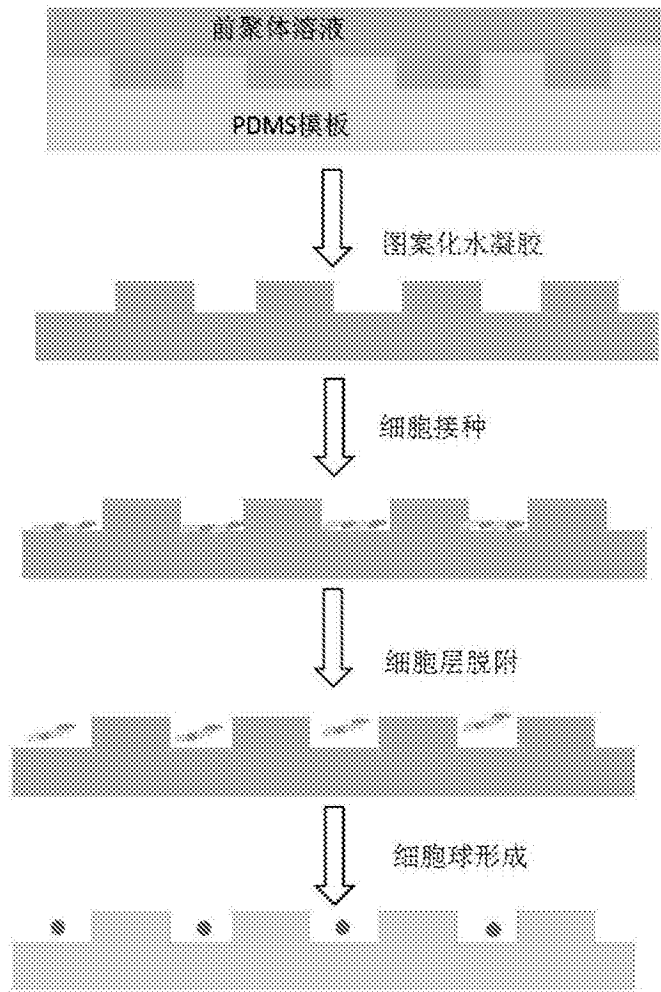


图1



图2

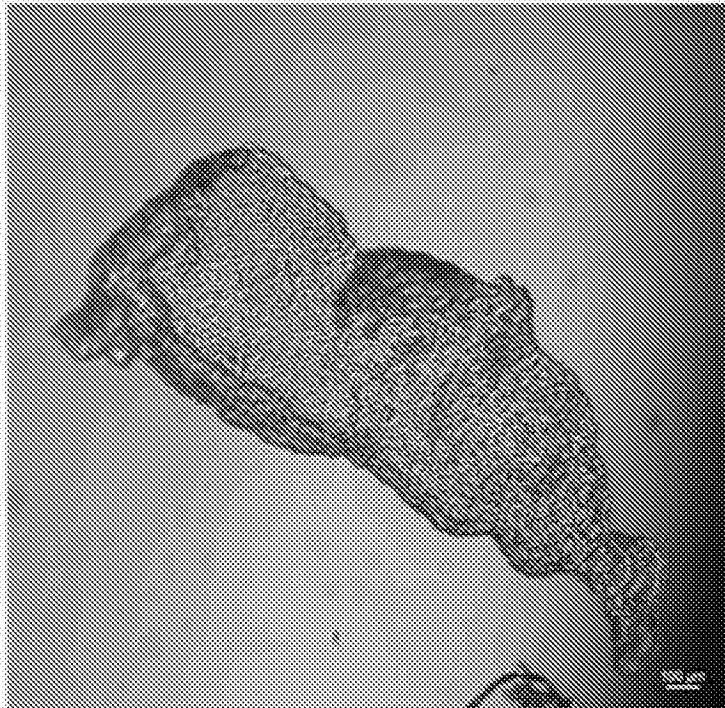


图3

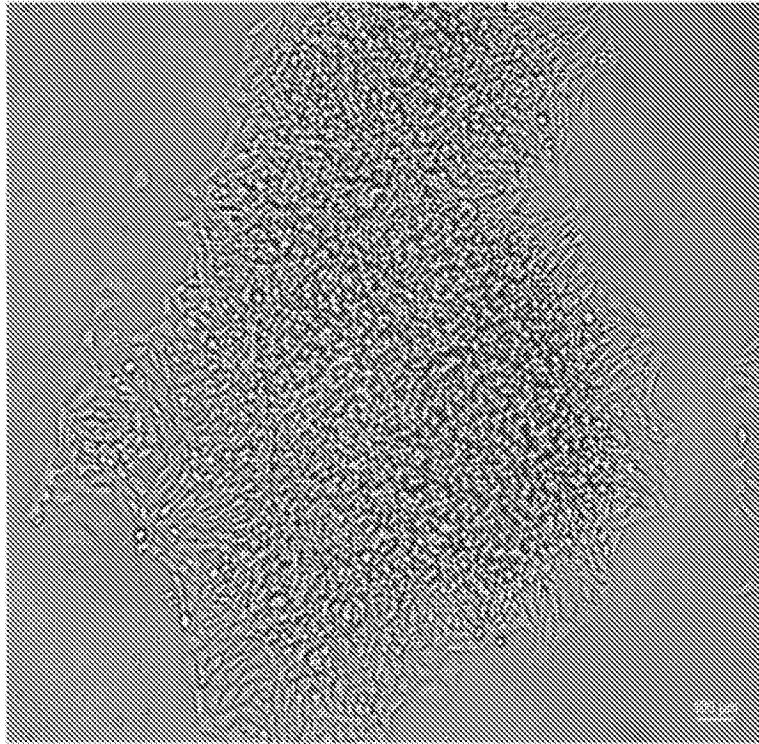


图4

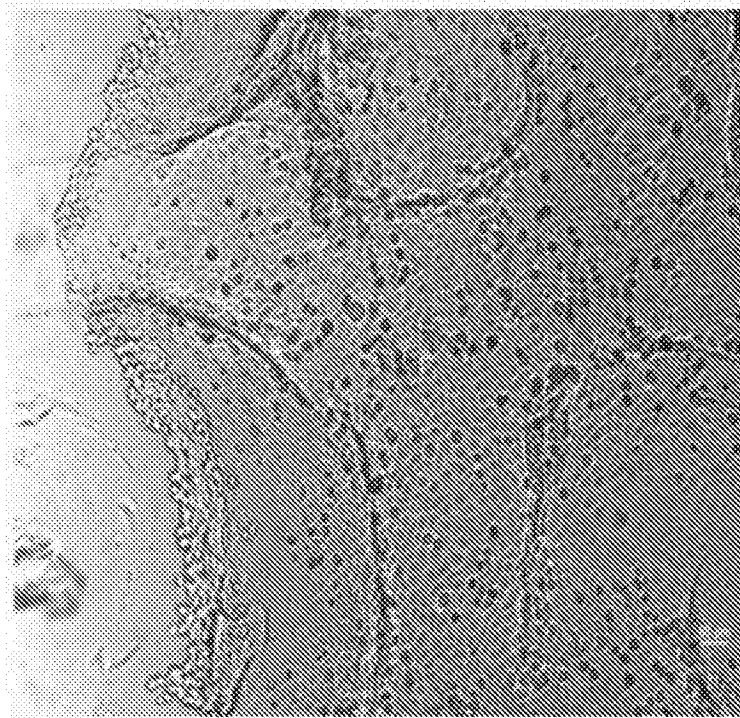


图5

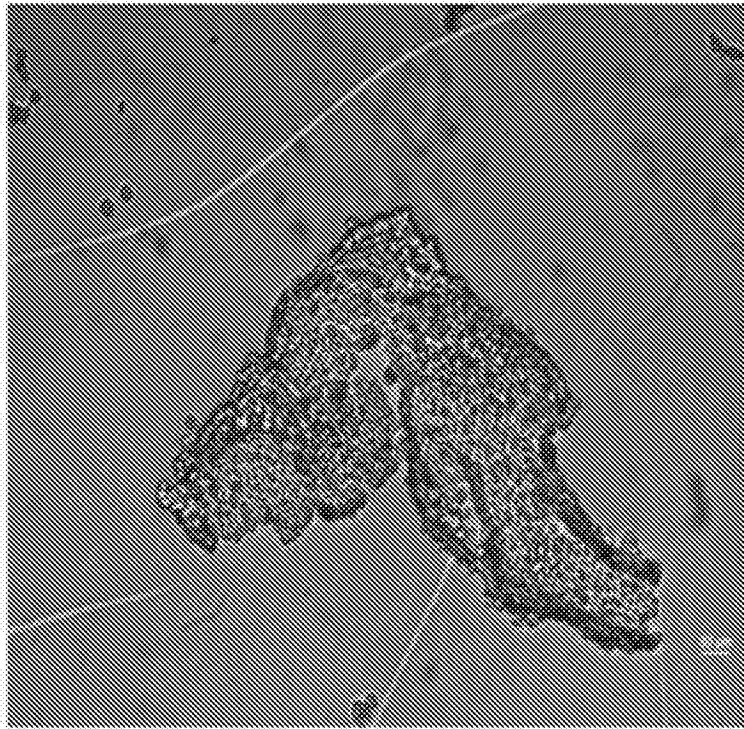


图6

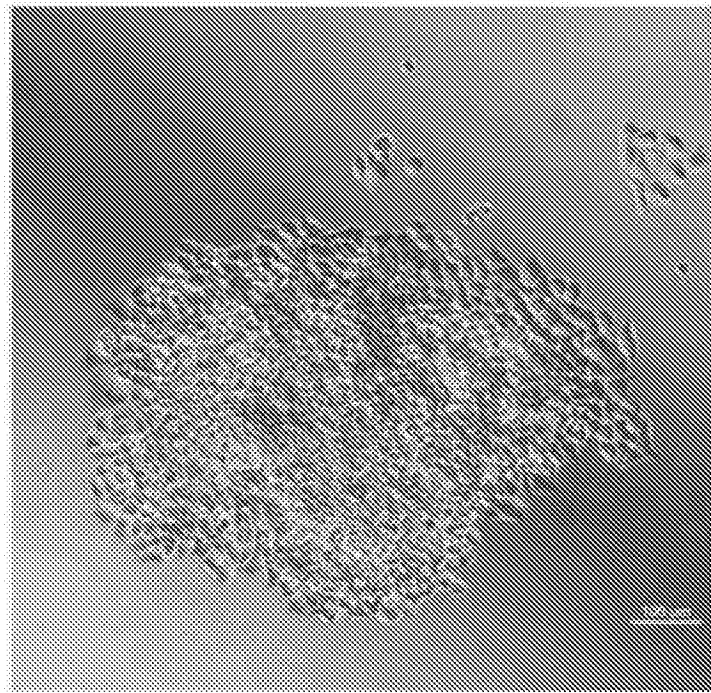


图7

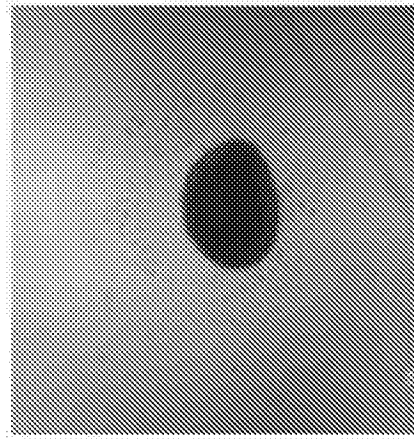


图8

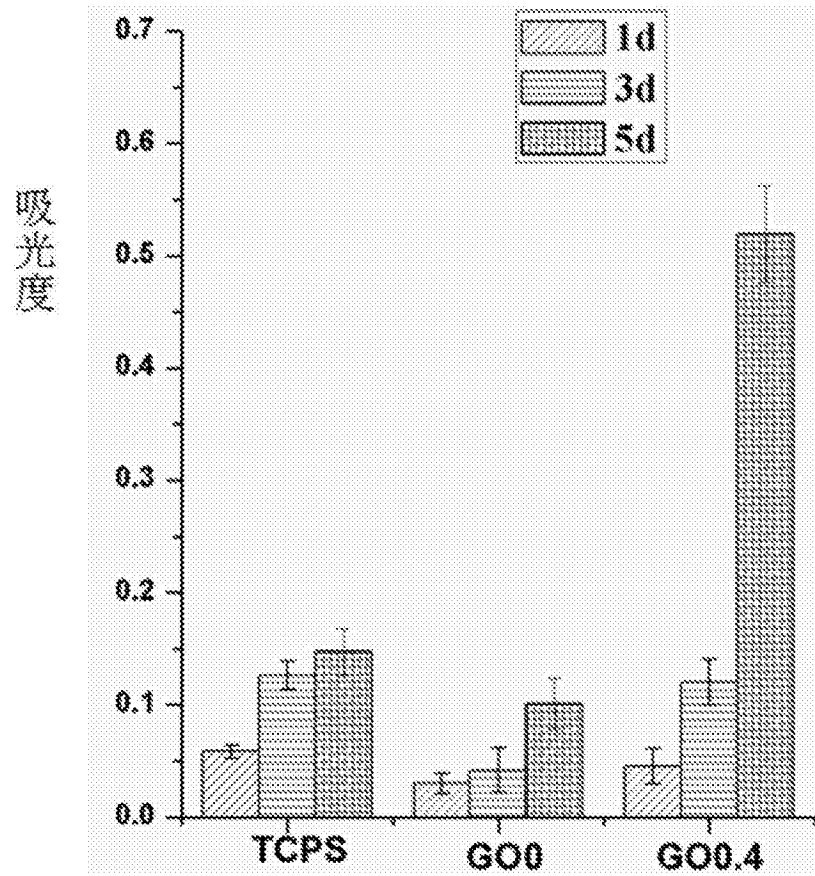


图9

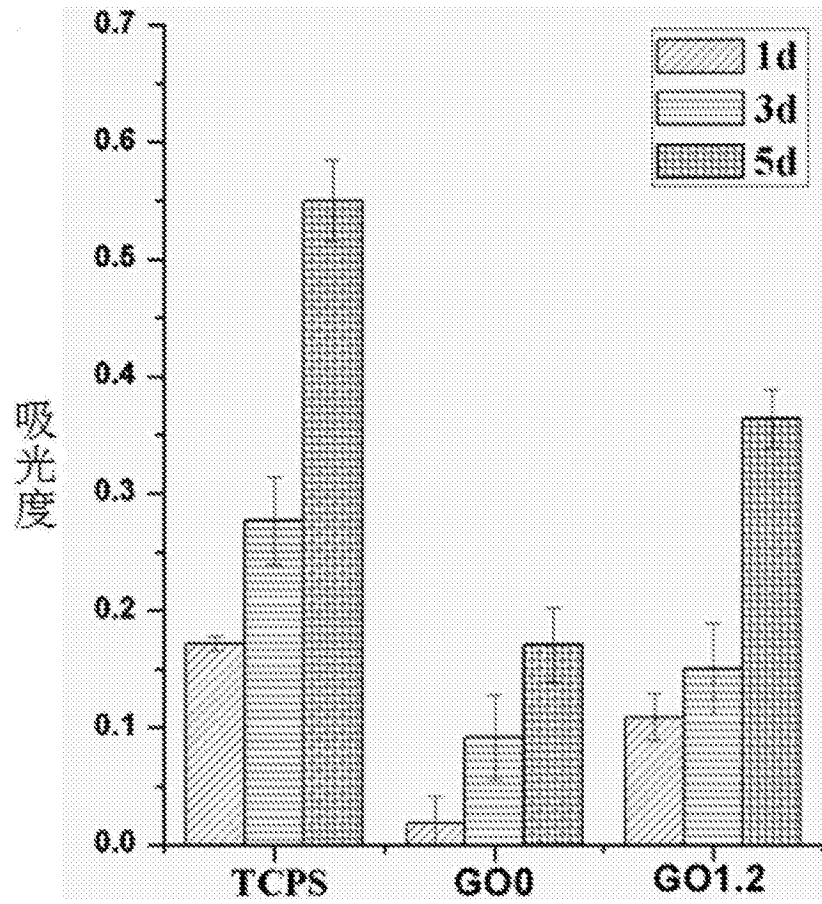


图10