

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 5/00

C12N 5/08 A61K 35/12

A61K 7/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00809165. X

[43] 公开日 2002 年 7 月 3 日

[11] 公开号 CN 1357039A

[22] 申请日 2000. 6. 23 [21] 申请号 00809165. X

[30] 优先权

[32] 1999. 6. 23 [33] GB [31] 9914616. 9

[86] 国际申请 PCT/GB00/02297 2000. 6. 23

[87] 国际公布 WO00/78928 英 2000. 12. 28

[85] 进入国家阶段日期 2001. 12. 19

[71] 申请人 塞尔特兰股份有限公司

地址 英国谢菲尔德

[72] 发明人 罗伯特·肖特 大卫·哈多

希拉·麦克尼尔

[74] 专利代理机构 北京三幸商标专利事务所

代理人 刘激扬

权利要求书 4 页 说明书 26 页 附图页数 4 页

[54] 发明名称 可脱离的表面

[57] 摘要

本发明涉及一种细胞培养表面,细胞附着于所述细胞培养表面,并且增生,而且所述细胞培养表面使所述的附着细胞可以从所述表面脱离以用于各种治疗性和美容性组织工程/外科手术。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

## 权 利 要 求 书

---

1. 一种细胞培养表面，至少一个细胞可以可释地附着于这种细胞培养表面，其特征在于，所述表面有高度酸官能团。

2. 如权利要求 1 所述的细胞培养表面，其特征在于，所述表面提供一种基底，至少一个细胞可以在其上生长和增生。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的细胞培养表面，其特征在于，所述表面便于所述的细胞以非分化的状态生长和增生。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的细胞培养表面，其特征在于，所述的表面便于所述的细胞以分化的状态生长和增生。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的细胞培养表面，其特征在于，所述的表面不对附着于其上的细胞诱发免疫反应。

6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的细胞培养表面，其特征在于，所述的表面对患者有很微小的毒性。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的细胞培养表面，其特征在于，所述的表面适用于使用哺乳动物源的细胞。

8. 如权利要求 7 所述的细胞培养表面，其特征在于，所述哺乳动物细胞是人类的。

9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的细胞培养表面，其特征在于，所述的表面适用于使用以下的任何细胞类型：角质细胞；软骨细胞；成骨细胞；内皮细胞；尿道上皮细胞；表皮细胞。

10. 如权利要求 9 所述的细胞培养表面，其特征在于，所述细胞类型是角质细胞。

11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的细胞培养表面，其特征在于，所述的表面酸官能团由羧酸提供。

12. 一种细胞培养表面，它通过羧酸的等离子聚合得到。

13.如权利要求 1-12 中任一项所述的细胞培养表面, 其特征在于, 所述的表面的酸官能团是 5-20%之间表面酸官能团。

14.如权利要求 1-12 中任一项所述的细胞培养表面, 其特征在于, 所述的表面酸官能团大于 20%。

15.如权利要求 1-14 中任一项所述的细胞培养表面, 其特征在于, 所述酸官能团由丙酸提供。

16.如权利要求 1-14 中任一项所述的细胞培养表面, 其特征在于, 所述的酸官能团由丙烯酸提供。

17.如权利要求 1-16 中任一项所述的细胞培养表面, 其特征在于, 所述的表面由用一种含酸单体的等离子体共聚物覆以基底提供。

18.如权利要求 17 所述的细胞培养表面, 其特征在于, 所述的共聚物是丙烯酸和一种碳氢化合物的混合物。

19.如权利要求 18 所述的细胞培养表面, 所述碳氢化合物是 1, 7-辛二烯。

20.如权利要求 18 或 19 所述的细胞培养表面, 其特征在于, 在馈送气体中丙烯酸以 50%-100%提供而 1, 7-辛二烯以 0-50%提供。

21.一种用于组织工程的载体, 含有根据权利要求 1-20 中任一项所述的细胞培养表面。

22.如权利要求 21 所述的载体, 其特征在于, 所述的载体是一种治疗性的载体, 并含有权利要求 1-20 中任一项所述的细胞培养表面, 选择的细胞附着于该培养表面上, 其中, 所述的治疗性载体适于施用于或者说植入于需要治疗性组织工程的患者。

23.如权利要求 22 所述的治疗性载体, 其特征在于, 所述的治疗性载体含有间质材料, 所述细胞用于外科植入手术。

24.如权利要求 22 或 23 所述的治疗性载体，其特征在于，所述的载体适用于以下的任何细胞类型：角质细胞、软骨细胞、成骨细胞、内皮细胞、尿道上皮细胞、表皮细胞。

25.一种美容载体，含有一种权利要求 1-20 中任一项所述的细胞培养表面。

26.一种制备如权利要求 1-20 中任一项所述的细胞培养表面的方法，包括：

(i)提供一种酸。

(ii)产生所述酸的等离子体；以及

(iii)用所述的等离子体涂覆适当的基底以提供一种留着高度酸官能团的表面聚合物。

27.如权利要求 27 所述的方法，其特征在于，所述的酸是丙烯酸或丙酸。

28.一种制备如权利要求 1-20 所述的细胞培养表面的方法，包括：

(i)在馈送气体中混合选择比例的含酸单体和一种碳氢化合物；

(ii)产生所述的混合物的等离子体；和

(iii)用所述的等离子体涂覆适当的基底以提供一种留着高度酸官能团的表面聚合物/共聚物。

29.如权利要求 26-28 中任一项所述的方法，其特征在于，所述等离子体在连续波的条件下用一种 0-50W 的等离子体功率和 0-20sccm 的流速产生。

30.如权利要求 26-28 中任一项所述的方法，其特征在于，所述等离子体用脉冲波条件产生。

31.如权利要求 28-30 中任一项所述的方法，其特征在于，所述酸是丙烯酸并且所述的碳氢化合物是 1, 7-辛二烯。

32.如权利要求 31 所述的方法，其特征在于，所述的等离子体在馈送气体中含有 50—100%的丙烯酸和 0—50%的 1, 7-辛二烯。

33.如权利要求 31 所述的方法，其特征在于，所述的等离子体含有以下比例的丙烯酸和 1, 7-辛二烯：

| 丙烯酸 % | 1, 7-辛二烯 % |
|-------|------------|
| 50    | 50         |
| 60    | 40         |
| 70    | 30         |
| 80    | 20         |
| 90    | 10         |
| 100   | 0          |

34.如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，所述的等离子体含有以下比例的酸和碳氢化合物：

| 酸 % | 碳氢化合物 % |
|-----|---------|
| 50  | 50      |
| 60  | 40      |
| 70  | 30      |
| 80  | 20      |
| 90  | 10      |
| 100 | 0       |

# 说明书

---

## 可脱离的表面

本发明涉及一种表面，在所述表面上，细胞优选哺乳动物细胞附着并且增生，而且该表面使所述附着的细胞能够从该表面脱离，所述细胞可以用于各种治疗性和美容性的组织工程/外科手术。

组织工程是一种同许多临床和美容手术领域相关的一种新生学科。更加具体地，组织工程涉及置换和/或恢复和/或修复受损的和/或罹病的组织，以把该组织和/或器官恢复到一种功能状态。举例说，但不是以限定的方式，组织工程可以用在对修复由于挫伤，或烧伤，或由于静脉或糖尿病溃疡组织衰退而不愈合的结果产生的创伤提供皮移植片上。另外，组织工程还实行于：置换诸如因关节炎之类的退行性病变受累关节；置换因种种环境因素(如吸烟、饮食)和/或先天性心脏病受损的冠状动脉，包括置换动脉瓣膜/心脏瓣膜；器官移植；修复胃溃疡；置换如骨质疏松之类病患的骨组织、置换神经肌肉疾病受累或外伤受损的神经和肌肉及置换膀胱的材料以治疗泌尿疾病。

可惜，离体培养细胞/组织只代表组织工程面临的部分问题。在许多实例中，培养基中的细胞生长并非主要的障碍。把细胞/组织，经一种适当的载体(举例说，但不是以限定的方式，培养着物、假体、植入物、三维间质支架、细胞外间质蛋白涂层的敷料、绷带、石膏)转移，使所述细胞/组织加入到受治疗的患者体内，代表一种深远的，更加棘手的问题。适于转移置换组织的载体要用于组织工程就必须满足某些要求。例如转移

载体可供选择地具有以下特性：

- (i)它们提供一个细胞可以牢固地附着于其上的表面；
- (ii)它们让附着的细胞能够不受附着表面的妨碍而生长和分裂；
- (iii)在适用时，它们提供一种不影响附着的细胞的分化(或者未分化)状态的附着表面；
- (iv)它们把细胞保持在无菌的且免疫学上静息的状态；
- (v)它们以对患者的毒性微小；
- (vi)它们不传播细菌或者病毒性疾病；及
- (vii)它们提供一种使附着的细胞可以容易地脱离然后因此侵入需要置换、恢复或者说修复的组织位置中的表面。

已经识别出了数种表面，其提供使细胞可以在其上附着、在培养物中生长和增生的基底，并且表达上述特性的细胞类型的卓越的例子是一种角质细胞。

用于支持细胞的附着和增生及生长的优选基底是胶原 I，但其它的也已被研究(1)，例如在胶原-糖胺聚糖(C-GAG)基底上接种或者说沉积的，然后移植到烧伤处以形成培养的代用皮肤(CSS)的角质细胞，在 14-28 天之后发育成永久性的皮肤组织(2)。角质细胞也能够离体地在合成的亲水聚合物支架上生长(3)。已经有人把角质细胞移植到聚(羟乙基异丁烯酯)支架上，并且这些细胞展示了改进了的创面愈合，与非重建的表皮和正常人类皮肤的细胞角质型式无区别(4)。先前的研究展示含羧酸等离子体共聚物是如何在 7 天的时间内支持角质细胞的附着和增生的(5)。

人们还研究了细胞外间质蛋白质对人类角质细胞的附着、增生及转移到皮肤创面模型的影响(6)。发现单凝胶、胶原 I 和

胶原 IV 促进初始附着；而 RGD、玻璃粘连蛋白、纤维结合蛋白和受过辐照的 3T3 成纤维细胞不促进。还发现细胞的增生受到单凝胶、胶原 I、胶原 IV 和受过辐照的 3T3 成纤维细胞的积极影响(但是程度上低于初始附着受到的)。在后述的基底上增生的角质细胞保持转移到一种简单的离体创面模型上的能力。

在确定的表面上培养细胞还极少对分化的细胞提出挑战。例如一般用于研究分化的细胞类型的成纤维细胞在培养中保持了很大的多效性并且相对地容易培养。相反，角质细胞一般地会在活体内经历程序性的分化从基底表皮层(在此它们与附着在下皮层的基膜接触)向上部的皮层移动。在较后的层中它们丢失其胞核并且经历终末分化。一旦通过一定的分化点后它们就不能够迁移和增生了，并且主要地起皮肤的屏障作用。

培养中的角质细胞在多数培养条件下经历最终末分化并且对过早分化产生的不利条件作出反应。因此，挑战在于建立一种表面，理想地，该表面本身不促进分化，并且该表面可以通过理想地与适当的培养基结合来保持细胞，诸如角质细胞，于一种增生的表现型，在此种表现型中它们能够附着并且接着转移到一种离体的创面模型上。

在考虑组织工程和创伤修复时，可以有几个不同的方法供使用。当前研究的产品和治疗一般地分为三个类型：表皮置换、皮置换和代用皮肤。

表皮置换包含单层培养的角质细胞，或者用载体培养的角质细胞，并且一般地涉及离体生长融合的培养自体(患者自身的)表皮细胞。尽管可以得到非自体的模式作为“离架”方案，但是没有迹象表明非自体的细胞能够相容，虽然它们可以起生物绷带的作用。由于这些原因，非自体的产品(Epicel™ 和 Actigel™)

已经得到了混合的临床成就。另一种进行研究的產品, Laserskin, 采用透明质酸作角质细胞发放系统, 但是在领域内的一般技术人员使用时, 把该载体用一层辐射过的 3T3 成纤维细胞预处理以促进角质细胞增生。其他人在研究膜载体用于在角质细胞形成完整的层前进行转移。

皮置换含有一种支持结构, 或者说植入间质, 用于浸润、贴附、增生和通过成纤维细胞(在有些情况下通过内皮细胞)产生新闻质。Integra™ 使用牛皮胶原 I 与软骨素(chondroitin)-6-硫酸盐在硅氧烷底片上交联的皮成分。还考虑一种用成纤维细胞和表皮细胞接种的变种。这种合成的间质在 3/4 周后降解并且在使用裂隙厚度网孔皮移植片之前促进新皮生成。Alloderm™ 是一种冷冻干燥的、人类去表皮皮肤, 含有供体成纤维细胞(来自筛选的皮肤库供体)。Xenoderm™ 是类似的, 使用一种猪的皮, 它让间质能够结合到创面中, 显示较低的免疫抗原性, 并且能够使主细胞再生。其它人还在开发着胶原基聚合物作为支架, 或者说合成间质, 用于发放角质细胞和成纤维细胞, 在非接种地植入实验创伤中时它们已经显示支持细胞向内生长。

当前认为最有前景的产品, Dermagraft™ 采用一种用同种异体成纤维细胞接种的 PGA/PLA 间质。在 4 周后可以看到植入的间质吸收, 及细胞沉积的胶原 I-III-VI、弹性蛋白、纤维结合蛋白和核心蛋白聚糖。非接种的模式不支持移植。这种产品的优点是, 如果用角质细胞接种它可以阻滞伤口收缩, 并且这种非胶原的间质克服与免疫抗原性/BSE 转移相关联的问题。

代用皮肤结合了皮置换和表皮置换两者。Appligraft™ 结合了用同种异体成纤维细胞接种的胶原 I 凝胶和一种同种异体角

质细胞的融合片。尽管同种异体角质细胞和成纤维细胞在皮肤损伤中的长期存活性还有疑问，有可能有活力的同种异体细胞可以发放能够加速修复过程的生物介质(例如生长因子)。

领域内的一般技术人员会理解，提供愈创系统(而不是那些使用从患者组织，即自体组织得到的材料)的以上方案，存在有从供体源向受治疗的患者传播感染媒介的可能性。另外异种移植还需要一般公众接受为在组织工程中使用人类组织的替代。

与创伤前处理，间质支架(用于细胞生长)的选择和使用同种异体细胞的相关的几个问题还有待完全解决，但毫无疑问用组织工程方法进行创伤修复与现有的治疗会展现很大的治疗性优势。从以上的讨论可以看出，角质细胞为研究组织工程中使用的组织提供了一种卓越的模型系统。但是组织工程面对主导问题是提供一种可以满足培养和向患者转移细胞/组织的理想载体的所有的要求的基底。

细胞培养皿和生物植入物或者说载体一般地用让细胞附着、生长和增生的聚合物制造，或者涂覆让细胞附着、生长和增生的聚合物。往往，如果所述基底/载体要用于植入培养的细胞/组织的工具，那么与之结合使用的植入的间质就应当是可生物降解的(请参见国际第 WO/9012603 号公开)。而且，对基底进行处理以促进细胞的附着和增生是领域内公知的。例如国际第 WO89/02457 号和第 WO90/02145 号公开了便于细胞附着的表面化学改性。国际第 WO89/02457 号公开涉及聚四氟乙烯(Teflon<sup>TM</sup>)及其它碳氟聚合物的化学改性，以及它们在内皮细胞培养中的应用。国际第 WO90/02145 号公开说明了一种中性化的全氟-3,6-二噁-4-甲基-7-辛烯磺酰氟化物的共聚物和单体四氟乙烯用于为各种细胞/组织培养中用的基底进行覆层。

美国第 US4919659 号专利说明使用等离子可聚合气体(例如丙酮、甲醇、环氧乙烷)涂覆细胞附着生长的表面。涂覆过的表面显示提高了纤维结合蛋白(一种细胞粘接多肽)的结合力从而便于细胞附着在处理过的表面上。这样处理过的表面可用在为生物植入物提供器材和提供细胞培养皿等方面。典型地,诸如聚酯、聚四氟乙烯或者聚氨酯之类的材料涂覆以等离子聚合化气体然后与纤维结合蛋白接触。纤维结合蛋白吸收的表面与对照表面比较显示提高了大鼠 3T3 细胞的附着性。

等离子体是电离的,一般地用电场激发。它们是含有离子、电子、中子(自由基、亚稳的、基态的和激发态的种类)和电磁辐射的高度活泼的化学环境。在减压情况下可以达到一种电子的温度与离子和中子的温度大不相同的状态。这种等离子体称为“冷”或者“非均态”的等离子体。在这种环境中已经表明有许多挥发性有机化合物(净的,或者带有其它气体,例如氩)聚合(H.K.Yasuda, Plasma polymerisation, Academic Press, London, 1985)在与该等离子体接触的双表面上和排放下游的表面上。所述的有机化合物常常称为“单体”。沉积物常常称为“等离子体聚合物”。这种形式的聚合的优点包括:超薄的无孔膜沉积;等离子体聚合物可以沉积在范围宽广的基底上;过程没有溶剂,而等离子体聚合物没有污染。

我们探讨了等离子体聚合物沉积涂覆适当的基底以用于细胞/组织培养(5、7、8)。可以用挥发性有机化合物的等离子体(在  $10^{-2}$  毫巴的减压下,并且理想地  $< 100^{\circ}\text{C}$ )得到薄的聚合物膜。在等离子体沉积中,一般地有起始化合物或者说电离气体的广泛裂解并且产生的大范围的官能团残片不利地加入到沉积中去。我们指出通过运用低等离子体输入功率(低等离子体功率/单体流速比)可以制造具有高官能团留着率的膜。这样的低功率/速

率比的一个例子是 2W/2.0sccm。然而，可以采用其它的相对低的并且为领域内的一般技术人员所公知的比率。

已经显示出对于丙烯酸(9)、丙烯酸与一种碳氢化合物的共聚物(例如 1, 7-辛二烯)使得能够一定程度上控制表面上生成的等离子共聚物(PCP)(7)中的官能团浓度。PCP 可以直接地沉积在多数的表面上，不论几何形状如何，使它们对于处理诸如线网和纤维的表面及细胞培养用塑料皿是理想的。这会明显地使它们对于临床应用有用处，在此细胞可以被生长在 PCP 涂覆的二维或者三维支架上，然后应用于创面或者组织修复/恢复部位。

我们曾把人类角质细胞培养在用等离子体聚合物/共聚物涂覆的表面上。使用低功率/单体流速比产生了一种等离子体聚合物/共聚物，其中，来自等离子体气体沉积到等离子体聚合物/共聚体的，含酸单体(在此例中是丙烯酸)的酸官能团在很大程度上保持完好(留着的)。这些沉积确实含有其它的官能团(例如由后等离子氧化产生的羟基)，但是被表述有“高度酸官能团”，反映从等离子体气体进行到等离子体聚合物膜的高度酸留着率性。“高度酸官能团”并不指等离子聚合物/共聚物中的酸官能团的量(浓度/密度)，等离子聚合物/共聚物中的酸官能团的量取决于含酸单体/碳氢化合物的共聚合化比率。

在这些表面上培养的角质细胞不仅附着、以非分化的状态生长和增生，而且还从表面上脱离转移到创面模型上。以此方式促进角质细胞转移的基底显示在愈创领域中有很大的前景。我们把这些有利的特性归功于为我们的处理过表面的高度酸官能团，和在便于细胞脱离的所述的附着表面的特性。

本文中谈到的高度酸官能团，要包括那些具有 5—20% 的

表面酸官能团并且更加优选地超过 20% 的表面酸官能团的量的表面。这里的百分比指在此类环境中的碳原子的数。例如 20% 的酸官能团意味在等离子体聚合物中的每一百个碳原子中 20 个在酸型环境中。

根据本发明的第一方面提供有至少一种细胞培养表面，至少一个细胞可以可释地附着在所述的细胞培养表面上并且所述的细胞培养表面是高度酸官能团的。

在此说高度酸官能团是指含有在 5% 至 20% 之间或者大于 20% 表面酸官能团的表面。

领域内的一般技术人员会清楚，在附着表面上的酸官能团导致提高细胞的附着性(5、7、10、12)。我们发现，以低等离子体功率/单体流量比率的细胞培养表面的等离子体聚合使得在涂覆以该聚合物的表面上有高的酸官能团留着率。在用 100% 的丙烯酸处理的细胞培养表面上培养的细胞显示出提高了从处理过的表面上脱离的能力，从而促进去表皮皮肤(DED)的角质细胞浸润。从 100% 丙烯酸产生的等离子聚合物可能不含有对于细胞附着理想的酸官能团百分比。然而，丙烯酸与碳氢化合物，举例说，但是不以限制的方式，1，7-辛二烯的等离子体共聚合化使得能够有一定程度的控制沉积过程，并且能够提供一种角质细胞可能附着、增生和从之脱离的表面。典型地，在单体流中用超过 50% 的丙烯酸处理过的细胞培养表面产生酸官能团在 5% - 21% 之间的等离子聚合物表面，这取决于使用的酸的浓度。例如用 100% 的丙烯酸处理过的细胞培养表面产生酸官能团约 21% 的等离子聚合物表面。

在本发明的一种优选实施例中，所述的表面提供一种基底，至少一个细胞可以在其上生长和增生。优选地，所述表面

便利于所述的细胞以非分化的状态生长和增生。可选地，取决于组织类型，所述的表面便利于所述的细胞以分化的状态生长和增生。

在本发明的另一个优选实施例中所述的表面不对附着于其上的细胞诱发免疫反应，从而把它们输入到患者体内时不激发免疫反应。

在本发明的又一个优选实施例中所述的表面对患者有微小的毒性并因此把附着于其上的细胞输入到患者体内时不诱发不良的反应。

在本发明的又一个优选实施例中，所述的表面适用于采用哺乳动物源的细胞，并且更加优选地人类源的细胞。

在本发明的再一个优选实施例中所述的表面适用于使用以下的细胞类型：角质细胞；软骨细胞；成骨细胞；内皮细胞。理想地所述细胞是角质细胞。

在本发明的另一个优选实施例中所述的表面酸官能团由羧酸官能团提供。

在本发明的又一个优选实施例中所述的表面的酸官能团至少是 5% 且更通常在 5-20% 之间表面酸官能团。更理想地，还有所述的表面酸官能团大于 20%。理想地，所述酸官能团由丙烯酸提供。可选地所述的酸官能团由丙酸提供。

在本发明的另一个优选实施例中所述的表面典型地由用一种含酸单体的等离子体共聚物除覆的基底提供。举例说，但是不是以限制的方式，丙烯酸和一种碳氢化合物，举例说，但是不是以限制的方式，1, 7-辛二烯。理想地，在馈送气体中，所述的丙烯酸以 50% - 100% 提供而 1, 7-辛二烯以 0 - 50% 提供。

领域内的一般技术人员会清楚，本发明的细胞培养表面在

此可以用于在施用，举例说，但是不是以限制的方式，急性和/或慢性和/或轻度和/或严重的皮肤创伤(包括静脉和糖尿病溃疡)之前；和/或软骨修复；和/或骨修复；和/或肌肉修复；和/或神经修复/和可结缔组织修复和/或血管修复；和/或尿道修复之前，细胞可以生长在涂覆了的基底上的临床应用方面。本发明还通过提供所述的表面作为组织工程载体的整体部分来提供任何上述的细胞培养表面。

根据本发明的第二方面提供有一种用于组织工程的载体，其中，所述的载体与一种细胞表面集成，或者施加于一种细胞培养表面上，至少一个细胞可以可逆地附着于这种细胞培养表面上，其特征在于，所述表面是高度酸官能团的。

载体定义为在根据本发明可以用于组织工程中的表面上培养细胞的结构。举例说，但是不是以限制的方式，一种假体、一种植入物、间质、敷料、细胞培养盘、线网、绷带、石膏、可生物降解的间质和聚合物膜。

在本发明的一个优选实施例中提供有一种治疗载体，所述的治疗载体含有一种根据本发明的附着有选择出的细胞的表面，其中所述的治疗载体适用于施加和/或植入进需要治疗组织工程的患者。

在本发明的另一个优选实施例中，提供有一种含有间质材料(举例说，但是不以限制的方式，一种合成或者自然发生的并且要么是长持续性的，要么是可生物降解的的间质材料)的治疗载体，含有一种根据本发明的表面，细胞附着于所述表面上，用于外科植入手术。

在本发明的又一个优选实施例中，所述的载体适用于以下的任何细胞类型：角质细胞、软骨细胞、成骨细胞、内皮细胞、

尿道上皮细胞(urothelial)、表皮细胞。

在本发明的又一个优选实施例中，所述的治疗性载体包含角质细胞。

根据本发明的第三方面，提供一种美容载体，它含有一种根据本发明实施例的任何方面的细胞培养表面，以用于美容组织工程。

在根据本发明的第四方面，提供一种制备根据本发明的任何前述方面或者实施的表面的方法，含有：

(i)在一馈送气体中混合选择比例的含酸单体和一种碳氢化合物；

(ii)产生所述的混合物的等离子体；以及

(iii)用所述的等离子体涂覆适当的基底以提供一种留着率高度酸官能团的表面聚合物/共聚物。

领域内的一般技术人员会清楚，产生等离子体可以使用低的也可以使用高的功率并且不论是连续的波还是脉冲的等离子体。

优选地，所述等离子体功率用一种 0-50W 功率和流速为 0-20sccm 的等离子体产生，一般地是在连续波的条件。然而，也可在用脉冲波的情况下在等离子体功率和流速中做相应的校正，如领域内的一般技术人员所知。

在本发明的一个优选方法中所述的酸是丙烯酸并且所述的碳氢化合物是一种双烯并且特别是一种双不饱和的烯，例如 1, 7-辛二烯。

在本发明的另一个方法中所述的等离子体在馈送气体中含有 50-100% 不饱和酸，例如丙烯酸和 0-50% 己烷或者二烯，(例如 1, 7-辛二烯)。

在本发明的另一个优选实施例，在馈送气体中，所述等离子体含有以下比例的酸(例如丙烯酸)和己烷或者二烯(例如 1, 7-辛二烯):

| 酸<br>(例如丙烯酸)% | 烯<br>(例如 1, 7-辛二烯%) |
|---------------|---------------------|
| 50            | 50                  |
| 60            | 40                  |
| 70            | 30                  |
| 80            | 20                  |
| 90            | 10                  |
| 100           | 0                   |

现在参照以下的表和图，仅通过举例说明本发明的一个实施例。

表 1 示出由丙烯酸和 1, 7-辛二烯形成的 PCP 的 XPS 结果汇总；

表 2 示出由丙酸制备的 PPs 的 XPS 的结果汇总；

表 3 示出由脉冲的丙烯酸制备的 PPs 的 XPS 结果汇总；

表 4 示出由高功率丙烯酸制备的 PPs 的 XPS 结果汇总；

表 5 示出在接触 4 天后各种表面对 DED 的粘着性；

图 1 示出角质细胞附着在各种表面上；

图 2 示出角质细胞附着在高功率丙烯酸、脉冲的丙烯酸和丙酸表面上；

图 3 是角质细胞转移后在 DED 上留着率的测量；

图 4(a)示出与 DED 接触 4 天后由于角质细胞从胶原 I、载体和碳氢化合物表面转移到 DED 上造成的染色；

图 4(b)示出与 DED 接触 4 天后由于角质细胞从含酸的表面转移到 DED 上造成的染色；

图 5 示出与 DED 接触 4 天后由于角质细胞从脉冲的丙烯酸表面转移到 DED 上造成的染色；

图 6 示出与 DED 接触 4 天后由于角质细胞从丙酸表面转移到 DED 上造成的染色；

图 7 示出与 DED 接触 4 天后由于角质细胞从高功率的丙烯酸表面转移到 DED 上造成的染色。

## 材料和方法

### 等离子体共聚合

丙烯酸和 1, 7-辛二酸及丙酸从 Aldrich Chemical Co.(英国)得到。所述单体在几个冷冻-泵吸/解冻循环之后原封不动地使用。聚合在一个圆柱形的反应器容器中(直径 8 厘米, 长度 50 厘米)进行, 由两级旋转泵抽真空。等离子体由一个射频信号(13.56MHz)发生器和一个电感耦连到所述反应器容器上的放大器维持。反应器中的基础压力是  $3 \times 10^{-3}$  毫巴。

丙烯酸和 1, 7-辛二烯在 2W 的等离子体功率和 2.0sccm 的总流速下共聚合。等离子体共聚合物沉积在一种载体聚羟基丁酸(Goodfellow, Cambridge, UK)和干净的铝箔上(用于 XPS 分析)。共聚合时的压力典型地是  $4.0 \times 10^{-2}$  毫巴。另一个用于沉积丙酸的聚合用同样的条件进行。另外丙烯酸用脉冲等离子条件进行沉积。等离子功率为 50W, 使用 5 个毫秒的等离子占和 40 毫秒的等离子空的占空周期。单体流速是 2.0sccm。最后, 丙烯酸在连续波高功率的条件下沉积。所用的功率是 7.5W, 同时流速为 2.0sccm。

对于所有的共聚合, 都使用了 20 分钟的沉积时间。在等

离子关闭后让单体混合物继续流动 20 分钟。这样做是为使由于暴露于实验室环境吸取的大气中的氧最少。

#### X 射线光电子能谱法

XP 光谱由采用 Mg K  $\alpha$  X 射线的 VG CLAM2 型光电子分光计得到。对于每个样品，分别使用通过 50 和 20 电子伏特的分析器获取测量扫描光谱(0-1100 电子伏特)和窄带光谱。使用 Spectra6.0 软件(R.Unwin Software, Cheshire)获得光谱。随后的处理用 Scienta 数据处理软件(Scienta Instruments, Uppsala, Sweden)进行。分光计用 Au 4f 7/2 峰位置在 84.00 电子伏特标定，并且在 C 1s 与 F 1s 之间的光谱在 PTFE 样品中于 397.2 电子伏特测量，这与 Beamson 和 Briggs 报导的 397.19 电子伏特测量值很好的吻合。

#### 细胞培养

从皮/表皮结合处分离正常成年人角质细胞(从乳房复位成形术和腹壁成形术得到)，方法依以前所述(14)。细胞在完全格林氏培养基中培养，此种培养基包括霍乱毒素(0.1 毫微摩尔)、氢化可的松(0.4 微克/毫升)、EGF(10 毫微克/毫升)、腺嘌呤( $1.8 \times 10^{-4}$  摩尔)、三碘-1-甲状腺原氨酸( $2 \times 10^{-7}$  摩尔)、胰岛素(5 毫克/毫升)、转铁蛋白(5 微克/毫升)、谷氨酸( $2 \times 10^{-3}$  摩尔)、两性霉素 B(0.625 微克/毫升)、青霉素(1000 免疫单位/毫升)、链霉素(1000 微克/毫升)及 100%的胎牛血清。在 37°C，5%的二氧化碳环境中培养细胞。用台盼蓝染色和标准血球计数器进行总细胞计数和可存活细胞计数。

细胞培养试验只用新鲜分离的细胞。通过在层流室中过夜风干溶于 0.1 摩尔乙酸(200 微克/毫升)中的胶原 I(32 微克/平方厘米)制备胶原涂覆的载体的样品。细胞以  $12.0 \times 10^6$  个细胞/毫

升的密度接种在三份组表面上，用直径 10 毫米的不锈钢环保持样品在 6 穴组织培养盘中扁平。培养 24 小时后，用 MTT-ESTA 检测测定每三份的一个样品上的角质细胞附着(15)。这估计了可成活细胞数，这种测定以前提示了人类角质细胞数(16)中的平行增长(16)。细胞在 PBS 中使用 0.5 毫克/毫升的 MTT 培育 40 分钟。用酸化异丙醇洗提染色。光密度测量是在 540 纳米进行的，使用已减除的 630 纳米蛋白参考波长做参考。

每三份中的余下的两个样品去与 DED 和添加的格林氏培养基接触使该表面处于空/液介面上。该 DED/表面创面模型在 37°C 下置于培养箱中 4 天，4 天后把表面从 DED 分开并用如上所述 MTT 测定评估表面向 DED 转移的程度。DED 的 MTT 要求把 DED 在染色洗提前用 MTT 培育 120 分钟。

## 结果

### XPS 特性

用丙烯酸和 1, 7-辛二烯准备 PCP 的 XP 检测扫描光谱只揭示在沉积中有碳和氧。O/C 比示于表 1 中。随着馈送的单体中丙烯酸的摩尔数加大 O/C 比增加。对于各种含氧官能团进行了 PCP 的 C 1s 核能级谱峰拟合。首先为加样进行了光谱校正，把碳氢化合物信号设定到 285 电子伏特，然后拟合了以下官能团：在 +1.5 电子伏特移位的醇/醚(C-OH/R)；在 +3.0 电子伏特移位的羰基(C=O)；在 +4.0 电子伏特移位的羧酸/酯(COOH/R)；而在 +0.7 电子伏特移位的结合在羧酸盐(C-COOH/R)上的一个  $\beta$ -位碳。所述峰拟合结果及一种样品的峰拟合( $F_{aa}/F_{tot}=1$ )示于表 1。在该峰拟合中 FWHM 组份峰保持相同并且在 1.4-1.6 电子伏特范围。该组份峰的高斯峰与洛伦兹峰的比(G/L)也保持恒定并且在 0.8-0.9 的范围。尽管 XPS 不能区分羧酸和酯官能团，等离子体聚合化丙烯酸的掠射角红外线分

光测量显示, 在本研究中所用的低功率下, 在 XP 光谱中的羧基峰可以归为羧酸而不是酯(10)。在 PCP 中出现的其它碳-氧官能团(除了羧酸之外)包括羰基和醇/醚。这是由于等离子体中单体破裂造成的。在沉积物与从等离子体容器壁上吸收的水分之间的反应(在聚合时)及大气中的氧气与水之间的反应(在聚合后)也对此起了作用。C-OH/R 峰被认为主要是羟基。在一个以前的研究中我们更加详细地检验了丙烯酸/1, 7-辛二烯的 PCP 中含氧官能团的同一性(用馈送单体中不同摩尔数丙烯酸进行比较)(11)。基于此研究, 我们认为, 在 PCP 表面上, 羧酸官能团对角质细胞起作用, 而不是 C-OH。后者应当以高浓度出现(25%)以促进细胞附着(8)。

从(i)丙酸的连续波沉积, (ii)脉冲丙烯酸及(iii)高功率丙烯酸测定的 XP 光谱也只揭示在沉积中的碳和氧, 并且用以上对丙烯酸定出的同样标准拟合。对丙酸, 脉冲丙烯酸及高功率丙烯酸的曲线拟合结果分别示于表 2、表 3 和表 4 中。基于我实验室对脉冲等离子体的研究, 可以期望脉冲等离子体中的低占空比会产生更高的羧基留着率(21)。由比较表 1 和表 4 可见增加等离子体功率导致 -50% 的羧基官能团留着率下降, 及相应的醇/醚及羰基官能团的增加。

表 1 由丙烯酸和 1, 7-辛二烯制备 PCP 的 XPS 结果汇总

% C 1s 核能级中的官能团

| $F_{aa}/F_{tot}$ | O/C 比 | C-C, C-H | C-OR | C=O  | COOH/R |
|------------------|-------|----------|------|------|--------|
| 0                | 0.04  | 95.8     | 4.7  | --   | --     |
| 0.25             | 0.11  | 88.4     | 5.7  | 1.0  | 2.6    |
| 0.5              | 0.16  | 87.1     | 1.4  | 1.2  | 5.4    |
| 1.0              | 0.51  | 50.4     | 6.4  | 1.0  | 21.1   |
| 载体               | 0.47  | 52.2     | 1.2  | 16.0 | 16.0   |

一个  $\beta$ -移位碳以与在峰拟合上附加的羧酸盐连结等幅度地方式结合在羧酸盐(在从碳氢化合物 + 0.7 电子伏特移位处的(C - COOH/R))上。

表 2 由丙酸制备的 PPs 的 XPS 的结果汇总

% C 1s 核能级中的官能团

| $F_{aa}/F_{tot}$ | O/C 比 | C-C, C-H | C-OR | C=O | COOH/R |
|------------------|-------|----------|------|-----|--------|
| 1.0              | 0.58  | 52.0     | 8.5  | 3.8 | 18.0   |

一个  $\beta$ -移位碳以与在峰拟合上附加的羧酸盐连结等幅度地方式结合在羧酸盐(在从碳氢化合物 + 0.7 电子伏特移位处的(C - COOH/R))上。

表 3 由脉冲的丙烯酸制备的 PPs 的 XPS 结果汇总

% C 1s 核能级中的官能团

| $F_{aa}/F_{tot}$ | O/C 比 | C-C, C-H | C-OR | C=O | COOH/R |
|------------------|-------|----------|------|-----|--------|
| 1.0              | 0.51  | 53.9     | 8.3  | 1.2 | 18.3   |

一个  $\beta$ -移位碳以与在峰拟合上附加的羧酸盐连结等幅度地方式结合在羧酸盐(在从碳氢化合物 + 0.7 电子伏特移位处的(C - COOH/R))上。

表 4 由高功率丙烯酸制备的 PPs 的 XPS 结果汇总

% C 1s 核能级中的官能团

| $F_{aa}/F_{tot}$ | O/C 比 | C-C, C-H | C-OR | C=O | COOH/R |
|------------------|-------|----------|------|-----|--------|
| 1.0              | 0.47  | 54.2     | 14.5 | 8.6 | 11.4   |

一个  $\beta$ -移位碳以与在峰拟合上附加的羧酸盐连结等幅度地方式结合在羧酸盐(在从碳氢化合物 + 0.7 电子伏特移位处的(C - COOH/R))上。

#### 细胞在表面上的附着

对于所有的表面，在分离角质细胞之后用计数器进行了细胞计数，示出 97% 细胞成活率( $2.5 \times 10^7$  总细胞)。24 小时后用 MTT 测定检查这些表面。

#### (i) 丙烯酸/1, 7-辛二烯:

结果示于图 1。数据显示单体流中用 50% 和 100% 丙烯酸制备的含酸表面性能稍好于胶原 I。在流中用 25% 的酸制造的表面与 TCPS 可相比较，但是角质细胞在碳氢化合物表面上附着不佳。

#### (ii) 丙酸、高功率丙烯酸、脉冲丙烯酸:

结果示于图 2。细胞虽然附着于所有的表面，但是，胶原 I 显示附着程度较高。细胞附着的程度不是接着从表面向 DED 转移的程度的预报因子，但是注意到用不同单体前体和/或等离子体产生的表面的确支持角质细胞的附着是重要的。细胞附着显然是随后的转移成功的前提。

#### 向 DED 转移细胞

表 5 汇总了从 DED 分离载体聚合物表面的结果。胶原 I 表面和在气体流中用 100% 制备的表面对 DED 粘着良好，表示角质细胞几乎都从表面转移到 DED 上。在单体流中用低量酸制备的表面粘着较差，而载体和碳氢化合物表面易于从 DED 剥离，表示细胞转移程度较低。

表 5 在接触 4 天后各种表面对 DED 的粘着性

|          |                 |
|----------|-----------------|
| 胶原 I     | 粘着良好            |
| 碳氢化合物    | 易于剥离—不粘着        |
| 载体       | 易于剥离—不粘着        |
| 25% 丙烯酸  | 粘着              |
| 50% 丙烯酸  | 粘着，但是不足 25% 的表面 |
| 100% 丙烯酸 | 粘着良好            |

在表面和 DED 并置 4 天后把两者分开，而图 2 中示出在表面上进行 MTT 测定的结果，图 3 中示出在 DED 上进行 MTT 测定的结果。与在转移到 DED 上的相比较所有例中保留在表面上的细胞的光密度极低。对向 DED 的转移进行检验时，在胶原 I 上生长的细胞显示最高的值，约大于仅用载体时所见的 4 倍。生长在用 25% 酸处理的表面上的细胞的转移与仅用载体时所见可相比较。生长在用 50% 和 100% 酸处理的表面上的细胞却显示显著多地转移到 DED 上。生长在碳氢化合物处理的表面上的细胞显示很少向 DED 转移。

角质细胞从丙烯酸/1, 7-辛二烯 PP 向 DED 转移的照像证据示于图 4(a) 和图 4(b)。碳氢化合物(1, 7-辛二烯)和载体(biopol)表面未染色，而胶原 I 和含酸表面却因为在 DED 上的角质细胞显示染为紫色。图 5 示出由于细胞从脉冲的丙烯酸 PP 转移造成的染色。图 6 示出用丙酸 PP 的同样结果。而图 7 示出由于

细胞从高功率的丙烯酸 PP(沉积于无纺纤维上)转移造成的 DED 染色。

### 讨论

本研究的目的是扩大本实验室的原有工作, 这些研究揭示使用 PCP 表面用于角质细胞附着和增生, 但是对向 DED 的转移无助。角质细胞对这些研究提出了特殊的挑战, 因为它们在许多基底上经历不可逆的终末分化。从而细胞失去了迁移或形成群体的能力, 而这些能力特性却是在从支持表面向创面转移角质细胞以达到表皮再生所需要的。

因此本发明的目的是检验在什么范围内促进附着的表面会促进细胞向一个简单的离体创口模型转移。

人类角质细胞在含有各种浓度羧酸官能团的 PCP 表面上可成功地培养, 在附着的细胞数上, 与一种优选的角质细胞培养基胶原 I 上的细胞表现可相比较。

使用碳氢化合物等离子聚合物作阴性对照是重要的, 因为早先的一项研究怀疑过 TCPS 做对照的适宜性(17)。这样的顾虑是由于在制造过程中对 TCPS 的表面处理引起的, 这种表面处理视表面氧化程度不同可以使 TCPS 对水溶液不稳定。还不清楚不同批次的 TCPS 是否接收确切相同量的表面氧化, 也不清楚此种表面氧化是否易于受老化的影响。

尽管细胞附着对官能团浓度的依从性还有待研究, 先前已经表明角质细胞在有 2-3% 低量酸官能团的表面上加强附着(11)。然而, 在本研究中显示在含 21% 酸的表面上附着也并不

低。应当提醒的是酸 PCP 还含有其它的 O—C 官能团，主要是 C—OH。即使如此，我们以前的研究显示酸 PCP 在融合程度及细胞数方面与胶原 I 可相比较(由 DNA 测定)。

在含水的媒介中，酸 PCP 可以水合，如我将于另文所述(18)。试验显示酸 PCP 的稳定性取决于单体流中丙烯酸的浓度。高浓度的酸(>60%总流量)导致欠稳定的表面。此要求使得把低浓度的酸表面(<5%)的发展被打上对促进附着及续后的增生“理想”的标签。然而谈及从酸表面上转移，很可能要用不同的标准。尽管低浓度酸官能团赋予表面稳定性，角质细胞可能因良好地附着于其上而妨碍了转移。在个评估是从转移实验的结果得出的，实验中馈送单体中 25%的酸流量(在 PCP 表面上 2.6%的羧酸)显示对 DED 最低的转移。相反馈送单体中 100%的酸流量(在 PCP 表面上 >20%的羧酸)细胞转移显著地高。这些表面的性能仅被胶原 I 胜出。以 50%酸的馈送单体流量，转移介于高酸和低酸官能团表面之间，正如所料。这些结果指出促进附着和增生的理想表面可能不是产生最大程度的从 PCP 向 DED 转移的表面。从碳氢化合物 PP 的低量转移证实这样一种表面不能够支持增生状态的角质细胞。尽管，细胞转移对官能团浓度的依从性还需要充分地探讨，用高量酸官能团时角质细胞表现出加强了从表面转移。因此可以清楚在促进增生的表面(低酸官能团)和促进转移的表面(高酸官能团)之间存在一种折衷。

在含血清的培养基中，已经表明细胞受一种蛋白质的吸附

层的作用，而不是直接受培养基本身作用(19)，这种介导蛋白层吸附(几乎是)自发的。细胞对受研究的培养基的响应提示要么是蛋白膜的成分有变化，要么是这些蛋白在吸附后的活性有变化，或者两者兼有。实验表明一些粘性蛋白支持细胞附着，例如纤维结合蛋白和玻璃粘连蛋白。Tidwell 等(12)表述了在用有不同末端的链烷硫醇盐(alkanethiolates)化学药品在 SAM 上形成的蛋白层与各自支持不同层次的牛动脉内皮细胞附着的蛋白层之间的区别。尽管细胞附着和扩散是细胞增生的重要条件，但是它们并不是排他性的条件。血清也是一种生长因子的来源并且已经表明对于低级哺乳动物细胞是必须的。实验提示把生长因子吸收到细胞外间质材料中在其活性化中起重要的作用(20)。

结果表明可以从大范围的起始单体中提供羧酸官能团。丙烯酸是不饱和类有机酸中的一种，而丙酸是饱和有机酸。因此，只要单体可充分地挥发以流经等离子室，可料想任何有机酸都应当适于用作制造能够显示角质细胞附着及续后向 DED 转移的 PP 表面。而且结果表明一个宽范围的等离子条件能够制备促进所需要的细胞附着和转移的表面。我们表明，在连续波的条件下，高和低功率的方式都可以成功地制备所需特性的 PP。另外，把等离子体进行脉冲提供另一种在表面上沉积酸官能团的途径。另一个考虑是一个范围的载体表面可以用于等离子沉积。在此研究中一种可生物降解的载体(biopol)，和一种不可以生物降解的载体(聚丙烯，Delnet,由 AET Specialty Nets 供应)，

表明它们均可以涂覆以促进角质细胞向 DED 转移的 PP。数据提示, 尽管载体膜可在其特性上有别(例如溶解性, 吸收性), PP 沉积在影响细胞性能的载体上是首要的(尽管诸如结构/孔径之类的形态影响可能意味着 PP 覆层不是均匀的“扁平”表面, 照样在载体轮廓上发生沉积。因此当 PP 覆层的载体用于 DED 时, 细胞在不会与 DED 发生接触处附着就位)。人们设想, 任何转移现象的外科应用都会要求一种膜样的载体而不是网样的载体, 以保证细胞在 PP 表面上的最大附着, 而不是在载体材料的覆层的轮廓之内。

基于以上的讨论, 很明显酸 PCP 在支持角质细胞附着和转移上的成功是多因素的。然而, 我们的结果提示角质细胞的附着和转移特别地由羧酸官能团促进。这最可能是通过从血清形成的介导蛋白层的控制起作用。

含高浓度酸官能团(典型地羧基)的 PCP 表面与碳氢化合物相比较更促进角质细胞的附着和向 DED 的转移。在含到 20% 酸官能团的表面上的初始附着与培养 24 小时后细胞在胶原 I 基底上的表面附着可相比较。

对于含高浓度的羧酸官能团表面细胞从 PCP 向 DED 的转移是最多的, 尽管在低酸官能团浓度的表面也观察到了转移。用从饱和和不饱和有机酸沉积的 PP 都达到细胞转移。在连续波的条件下, 低和高功率法都能够产生促进细胞转移的 PP。脉冲等离子体也提供了一种制造促转移 PP 表面的途径。

## 参考文献

1、H.O.伦内坎普夫, V.基西希和 J.F.汉斯伯勒, “培养皮肤置换进展中的当今概念”, 外科研究期刊, 62(2), 288-295(1996)。

2、M.D.哈里格, G.D.沃伦, D.G.格林哈尔希, R.J.卡根和 S.T.博伊斯, “用于全层烧伤的由培养细胞和生物聚合物组合植皮重生的皮肤的色素沉着与组织学”, 移植, 59(5), 702-707(1995)。

3、K.斯梅塔纳, J.瓦齐克和 B.德沃夏科娃, “细胞与聚合物的相互作用”, 大分子论文集, 109, 145-153(1996)。

4、B.德沃夏科娃, K.斯梅塔纳, R.柯尼戈娃, H.辛格罗娃, J.瓦齐克, M.耶林科娃, Z.卡保科娃和 M.扎赫拉德尼克, “创口的聚羟乙基异丁烯酯支架上的人类角质细胞的培养与移植—临床研究”, 生物材料, 19(1-3), 141-146(1998)。

5、D.B.哈多, R.M.弗朗斯, R.D.肖特, S.麦克尼尔, R.A.道森, G.J.莱格特和 E.库珀, “丙烯酸/1,7-辛二烯等离子体共聚物与自组合单分子层上人类角质细胞的增生与生长的比较”, 生物医学材料研究期刊, 47, 379-387(1999)。

6、R.A.道森, N.J.戈贝尔德汗, E.弗雷德兰德和 S.麦克尼尔, “细胞外间质蛋白对人类角质细胞的附着、增生以及向皮肤创口模型转移的影响”, 烧伤, 22, 93-100(1996)。

7、E.库珀, R.维格斯, D.A.赫特, L.帕克, G.J.莱格特和 T.L.帕克, “纤维结合蛋白在由金表面上硫代烷基吸附形成的自组合单分子层上的附着率”, 材料化学期刊, 7(3), 435-441(1997); 7b、C.D.贝恩, E.B.特劳顿, Y-T.陶, J.埃瓦尔, G.M.怀特赛德斯和 R.G.努佐, 美国化学协会期刊, 111, 321, (1989)。

8、R.M.弗朗斯, R.D.肖特, E.杜瓦尔, R.A.道森和 S.麦克尼尔, “烯丙醇/1,7-辛二烯的等离子体聚合反应: 人类角质细胞的表面特性及附着”, 材料化学, 10(4), 1176-1183(1998)。

9、C.A.斯科奇福德, E.库珀, G.J.莱格特和 S.唐斯, “人类成骨细胞类的细胞在金上链烷硫醇自组合单分子层上的生长, 表面化学作用”, 生物医学材料研究期刊, 41, 431-442(1998)。

10、L.奥图尔, A.J.贝克和 R.D.肖特, “丙烯酸和丙酸的等离子体聚合物的特性”, 大分子, 29(15), 5172-5177(1996)。

11、R.M.弗朗斯, R.D.肖特, R.A.道森和 S.麦克尼尔, “人类角质细胞在丙烯酸/1,7-辛二烯与烯丙胺/1,7-辛二烯的等离子体共聚物上的附着”, 材料化学期刊, 8(1), 37-42(1998)。

12、C.D.蒂德韦尔, S.I.厄特尔, B.D.拉特纳, B.J.塔拉谢维奇, S.阿特和 D.L.阿利亚拉, “金上链烷硫醇盐终末分化的自组合单分子层上的内皮细胞生长和蛋白质吸附”, 朗缪尔, 13(13), 3404-3413(1997)。

13、G.比姆森和 D.布里格斯编著的《有机聚合物的高分辨率 XPS: Scienta ESCA300 手册》, 约翰·威利及子孙出版社, 奇切斯特, 1992。

14、N.J.戈贝尔德汗, M.埃奇库姆, E.弗雷德兰德和 S.麦克尼尔, “在培养的人类角质细胞内, 细胞外间质蛋白对细胞内的钙和环状 AMP 信号系统产生诱导变化”, 烧伤, 23(2), 122-130(1997)。

15、P.A.埃雷, M.E.亚特曼, S.J.奥尔特和 N.J.马歇尔, J. Mol. Endocrinol., 1,1(1988)。

16、S.麦克尼尔, R.A.道森和 G.克罗克, 不列颠皮肤病学杂志, 128, 143(1993)。

17、R.M.弗朗斯和 R.D.肖特,“由一种氩气等离子体转移至聚苯乙烯、低密度聚乙烯、聚丙烯和聚对苯二酸乙烯酯的表面化学的能量产生的聚合物效应的等离子体处理”,化学协会期刊,法拉第学报, 93(17), 3173-3178(1998)。

18、R.M.弗朗斯, C.J.罗伯茨, S.J.滕德勒, P.M.威廉姆斯, R.D.肖特和 R.道,“丙烯酸/1,7-辛二烯等离子体共聚物:制备中应用表面等离子体共振的水合和蛋白质吸附的研究”。

19、H.J.格里赛尔, R.C.沙特利耶, T.R.根格巴赫, G.约翰逊和 J.G.斯蒂尔,“人类细胞在胺及氨基团的等离子体聚合物假定角色上的生长”,生物材料科学期刊, 聚合物版, 5(6), 531-554(1994)。

20、T.N.怀特, M.G.金塞拉和 E.E.夸恩斯特伦,“蛋白多糖在细胞粘合迁移及增生中的角色”,细胞生物学年报评论, 8, 365-393(1992)。

21、D.B.哈多, A.J.贝克, J.D.惠特尔, R.M.弗朗斯和 R.D.肖特,“丙烯酸等离子体的等离子体相质谱研究”,已提交至疫苗科学期刊, 2000 年 4 月。

# 说明书附图

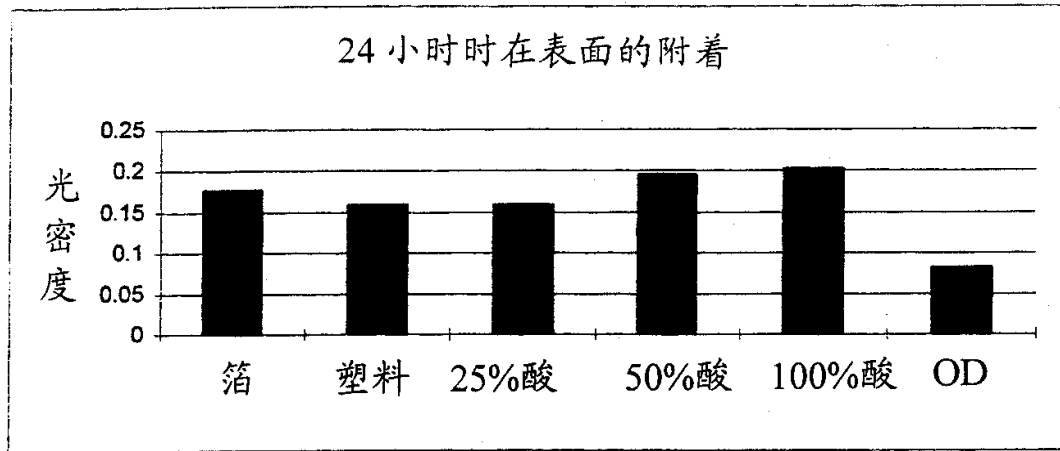


图 1

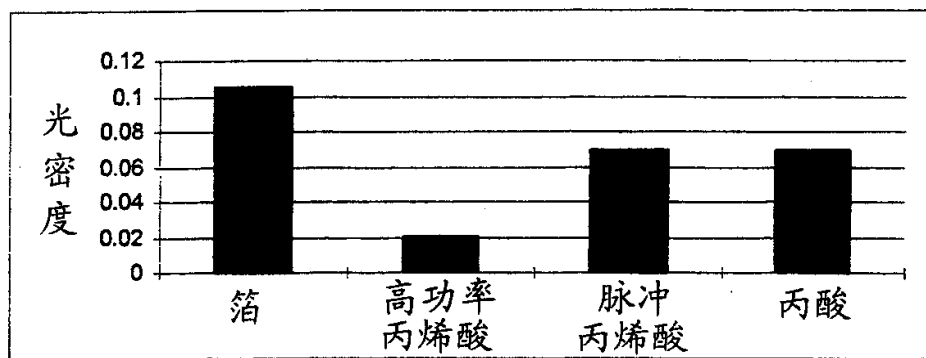


图 2

## 角质细胞向 DED 转移

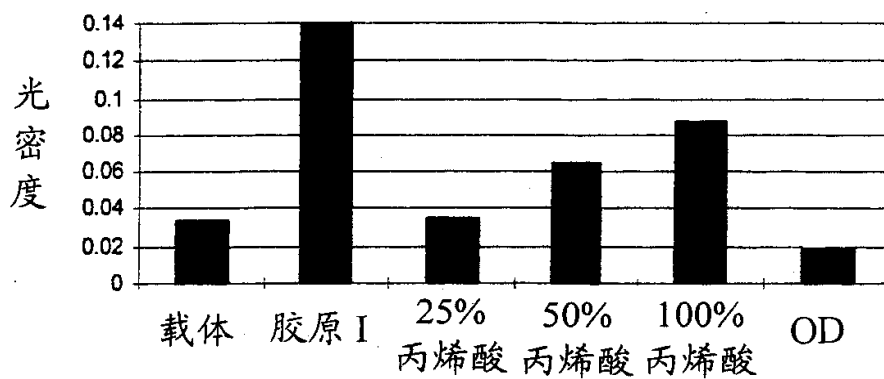


图 3



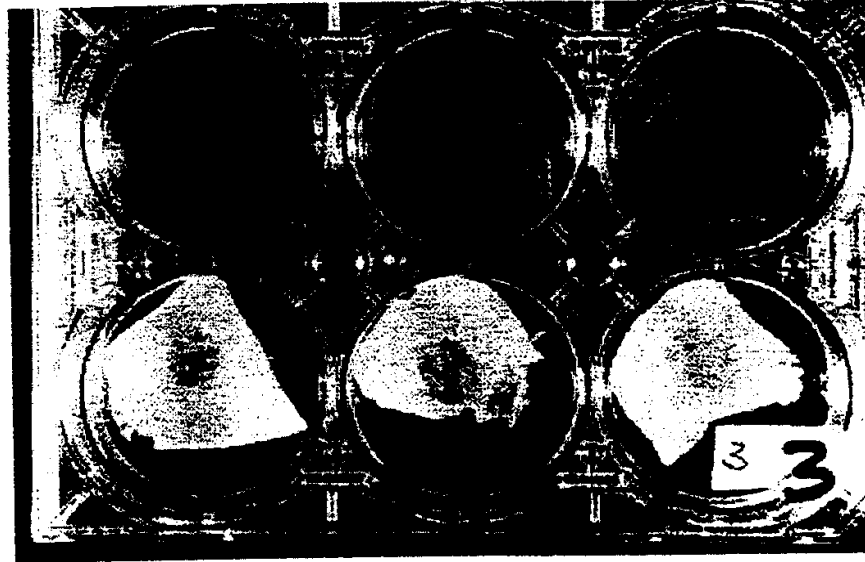
与 DED 接触 4 天后由于角质细胞从胶原 I (顶部左方)、百朴载体(中央)及碳氢化合物(右方)表面转移到 DED 上造成的染色。

图 4(a)



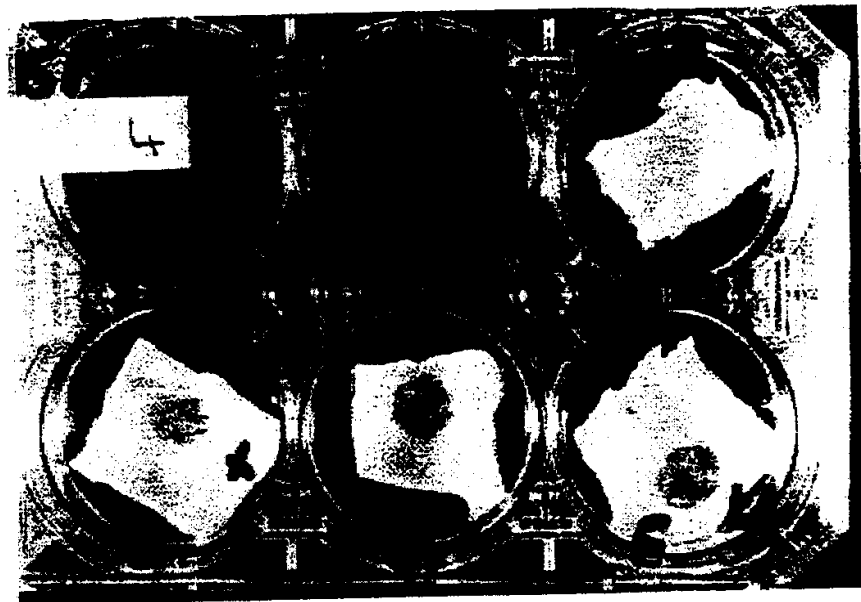
与 DED 接触 4 天后由于角质细胞从含酸的表面转移到 DED 上造成的染色：气体流中 100% 的酸(左方)、气体流中 50% 的酸(中央)及气体流中 25% 的酸(右方)。

图 4(b)



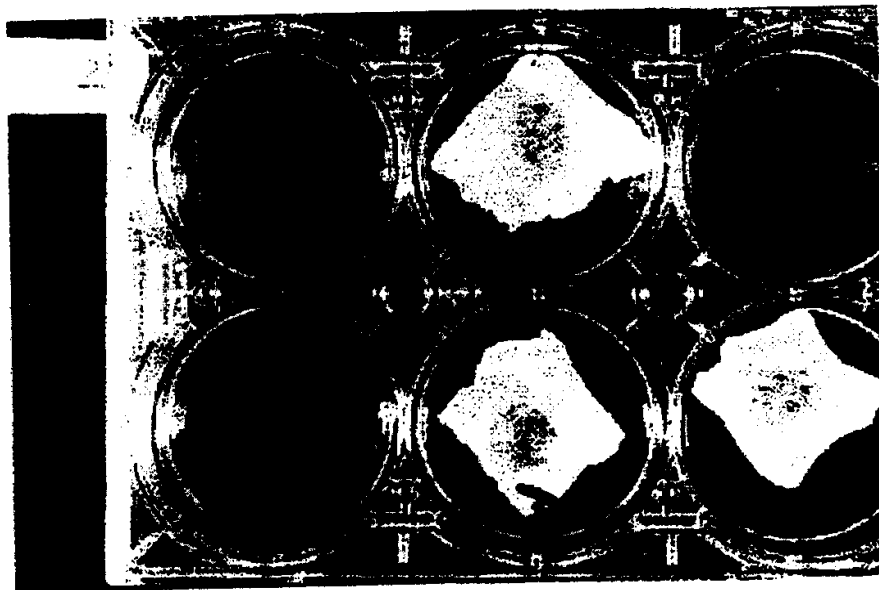
与 DED 接触 4 天后由于角质细胞从脉冲丙烯酸表面转移到 DED 上造成的染色(底部一行)。顶部一行显示了与 DED 分离后的载体表面, 几乎没有残留的细胞附着。

图 5



与 DED 接触 4 天后由于角质细胞从丙烯酸表面转移到 DED 上造成的染色(底部一行)。顶部右方的样品显示了没有与表面接触的对照组 DED

图 6



与 DED 接触 4 天后由于角质细胞从高功率丙烯酸表面转移到 DED 上造成的染色(中央及底部左方)。左方及顶部右方的样品显示了与 DED 分离后的涂覆酸的载体表面, 大部分的细胞已转移到 DED 上。

图 7