

感溫性水膠對蛋白質吸收和釋放行為之探討

The Study of protein Absorption and Release Behaviors of Thermally Sensitive Hydrogel

周瑞玲^{1*} Jui-Ling Chou
元培科技大學生物科技系

周澄興¹ Cheng-Hsing Chou
元培科技大學生物科技系

鄒國鳳² Kuo-Feng Chou
元培科技大學生物醫學工程系

楊均威¹ Jiun-Wei Yang
元培科技大學生物科技系

¹ Department of Biotechnology, Yuanpei University,

² Department of Biomedical Engineering, Yuanpei University

摘要：聚氮異丙基丙烯醯胺 (poly(N-isopropyl acrylamide), PNIPAAm)是已知具感溫性的高分子材料。當溫度高於其較低臨界溶解溫度(Lower Critical Solution Temperature, LCST)時，聚合物是厭水性而且不溶於水；反之，溫度低於其 LCST 時，聚合物會在水中呈現水合膨潤狀態。本研究利用添加不同比例的第二單體丙烯酸 (acrylic acid, AAc)與 NIPAAm 形成共聚物，來調整水膠的 LCST 更接近體溫。同時製造並純化紅色螢蛋白質 DsRed 重組蛋白質當追蹤劑，來偵測水膠對 DsRed 蛋白質的吸收與釋放行為。為確保 DsRed 蛋白質之螢光活性，不使用化學性固定劑而選擇物理性的包覆法，利用水膠低於其 LCST 時對蛋白質進行膨潤吸收，而將蛋白質分子包覆於水膠中，高於其 LCST 時水膠收縮而將蛋白質分子排出。實驗結果顯示，在磷酸緩衝溶液 (PBS, pH7.4)中，水膠的丙烯酸含量 0%增至 0.27%時，其 LCST 由 28°C 提昇到 40°C，同時對蛋白質吸附量也隨之升高，並且 LCST 接近於體表溫度之丙烯酸含量為 0.19%之水膠仍保有良好溫度感應性。以含 0.11%與 0.19% 丙烯酸之水膠進行蛋白質吸收和釋放實驗，將膠體浸泡在 25°C 之紅色螢光蛋白質 DsRed (0.075 mg/ml)溶液 24 小時後，轉置於 35°C 之緩衝液，在不同時間後照像分析膠體內殘留紅螢光蛋白質之影像強度。結果發現兩種膠體在 30 分鐘時即可釋放約為 80 至 90%之蛋白質量，顯示這些水膠在不喪失對溫度的敏感性的情況下，仍具良好包載和釋放蛋白質的能力。

關鍵字：感溫性、紅色螢蛋白質 DsRed、聚氮異丙基丙烯醯胺、較低臨界溶解溫度、丙烯酸

*Corresponding author



Abstract: Poly N-isopropylacrylamide (PNIPAAm) is a well-known temperature-sensitive polymer. When the temperature is higher than the lower critical solution temperature (LCST), the polymer becomes hydrophobic and insoluble. In contrast, as the temperature decreases below the LCST, the polymer is hydrated in water. In this study, we co-polymerized NIPAAm with weakly acidic acrylic monomers (acrylic acid, AAc) to modify the LCST of polymer towards the body temperature. As a tracer, the recombinant red fluorescent protein DsRed (*Discosoma* Red) was produced and purified to detect the release and absorbing behaviors of hydrogel. For maintaining DsRed chromophore, the hydrogels absorb DsRed protein when these polymers swell under the LCST, and release DsRed protein when these polymers shrink above the LCST without any chemical fixation procedure. The results demonstrated that the percentage of AAc in hydrogels were increased from 0 % to 0.27%, the LCSTs were increased from about 28 to 40°C in the phosphate buffer saline (PBS, pH7.4) and the absorbed amount of DsRed protein were also increased. Meanwhile the hydrogels containing 0.19% AAc, those LCST were near the human body temperature, still showed good thermo-sensitivity. After the hydrogels with 0.11 and 0.19% AAc were soaked in 0.075 mg/ml DsRed protein solution at 25°C for 24 hours, those gels were put in the buffer at 35°C for different time, and then were measured the DsRed protein remained in the gel by photographic analysis of the signal intensity, we found those hydrogels could release about 80 to 90% of DsRed protein within 30 minutes. These results show those hydrogel posse good protein-loading capacity without losing their thermosensitive properties.

Keywords: Temperature-sensitive; Red fluorescent protein DsRed; Poly N-isopropylacrylamide; LCST; Acrylic acid

1. 前言

藥物輸送系統是近幾年來正在迅速發展的領域，設計將藥物以特定的速率被輸送至預定位置或控制給藥次數，以達到醫療效果的改善和克服傳統藥劑的缺點。水膠是一類特殊的網狀聚合物，它可以吸收和保留大量的水，同時保持其三度結構的完整性(Hoffman, 2002; Hoare *et al.*, 2008; Peppas *et al.*, 2006)，並且因其可感應包括化學物質、溫度、pH、光、壓力、電場等的環境刺激而被稱為聰明水膠。其中，以感應溫度變化而產生相變（溶膠 - 凝膠轉變）的溫感應性水膠特別受到重視，因其有許多優點包括在聚合的過程中不需要有機溶劑、光激發活化並且不會放熱，增加了在活體使用的安全性，因此具有極大的生物醫學應用潛力。

在許多溫感應性聚合物中，PNIPAAm 聚合物及其共聚物是被研究相當深入的一類，特別是在水膠的結構與性質(Bae *et al.*, 1990; Feil *et al.*, 1992)、藥物傳導(Coughlan *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2006; Nakayama *et al.*, 2006)、細胞包埋(Na *et al.*, 2006)和組織工程(Shimizu *et al.*, 2001)等方面。PNIPAAm 聚合物在水溶液中的 LCST 為 32°C，在水溶液中會有從液態-混濁-凝膠之相變現象，即當水溶液溫度等於或低於其 LCST 時，其分子中的極性醯胺基與水分子之間會形成氫鍵而使聚合物溶解；但在等於或高於其 LCST 時，PNIPAAm 聚合物分子結構由螺旋狀轉變成球狀而呈現



出厭水性，故以膠態沉澱析出(Zareie *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001)。同時，PNIPAAm 的 LCST 會受到與其形成共聚物的單體性質調控：若共聚的單體為更疏水性會降低其 LCST；反之，親水性較強的單體則導致 LCST 升高(Feil *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1995)。除此之外，溶液的 pH 值和鹽類對 PNIPAAm 的 LCST 也有一定程度上的影響 (Pei *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004)。故利用添加各種單體形成共聚物或改變溶液的 pH 值和離子環境，已有許多相關的聚合物被應用於生物醫學、製藥領域，及在生物科技上。

本研究目的主要在探討 PNIPAAm 水膠對蛋白質分子的吸收與釋放行為。透過改變第二單體丙烯酸 (acrylic acid, AAc) 的添加比例來調控此感溫水膠的 LCST，並使用基因工程技術使大腸桿菌製造紅色螢光蛋白質 DsRed 並將其純化，而利用水膠之物理特性將蛋白質分子包覆於其中，以影像系統偵測水膠吸附與釋放蛋白質之量的變化。DsRed 螢光蛋白質原由圓盤擬珊瑚海葵 (corallimorpharian *Discosoma*) 分離出來，主要是由 230 個氨基酸所組成，分子量為 28 kDa，DsRed 的發光基團主要序列為 Gln-Tyr-Gly (Daniel *et al.*, 2001)，當受到適當波長的光線激發時，此系統的電子便會被激發而放射出螢光(Gross *et al.*, 2000)，故在此研究中被當作追蹤以偵測蛋白質量的變化。實驗結果顯示，在磷酸緩衝溶液(PBS, pH7.4)中，水膠的 AAc 含量增加時，其 LCST 提昇且對蛋白質吸附量也隨之升高，同時以傅立葉紅外光譜儀 (Fourier Transform Infrared Spectrum, FTIR) 進行化學鍵結變化分析，顯示 AAc 與 NIPAAm 分子已形成 P (NIPAAm-AAc) 共聚物，並且水膠仍保有良好溫度感應性。以含 0.11% 與 0.19% 之 AAc 的水膠進行蛋白質吸收和釋放實驗，結果發現兩種膠體在 30 分鐘時即可釋放約為 80 至 90% 之蛋白質量，表示這些水膠在不喪失對溫度的敏感性的情況下，仍具良好包載和釋放蛋白質的能力。故對於運用這種感溫性水膠來製造可包覆並傳導蛋白質功能分子(藥物)之生醫材料的可行性，此研究成果將提供評估之重要參考。

2. 材料與方法

2.1 材料:

氮異丙基丙烯醯胺(NIPAAm)，購自 TCT 公司；過硫酸銨(Ammonium persulfate, APS, 純度 95%)，購自 SHOWA 公司；亞甲基雙丙烯醯胺(N,N'-methylene bisacrylamide, NMBA)，購自 TCT 公司；四甲基二乙(Tetramethylethylenediamine, TEMED)，購自 TCT 公司；丙烯酸 (Aac)，購自 ACROS 公司；其他化學試藥皆購自 SIGMA。

2.2 感溫性水膠的製作

水膠的製作參照 Shingjiang *et al.* (2011) 的方法並加以修改如下：將 NIPAAm (5.6% W/V) 倒入去氣水中，當 NIPAAm 完全溶解後，加入 0.24% (W/V) 之 NMBA 倒入燒杯繼續攪拌至完全溶解後，接著加入所要配置不同百分比濃度的 Aac 量於燒杯中繼續攪拌，然後加入 0.1% (W/V) 之起始劑 APS 於燒杯中，等待完全溶解，最後加入 0.25% (W/V) 催化劑 TEMED 均勻混合後，迅速地利用微量吸管吸取 200 μ l 溶液注入圓形的模子裡。放置在室溫乾燥，乾燥時間大約需兩週的時間。水膠成型乾燥後，再利用 70% 的酒精清洗水膠去除表面的殘留物，清洗完後一樣放置於室溫等待乾燥。



2.3 感溫水膠之膨潤度和溫度可逆性試驗

製作含五種不同比例丙烯酸成分(0%、0.04%、0.11%、0.19%、0.27%)之水膠。乾燥後，利用水洗去除有毒物質，並用酒精沖洗，乾燥後將水膠浸泡在不同溫度(20~60°C)的生理緩衝溶液(PBS, pH 7.4)中，於浸泡 2、4、6、8、10、24 小時，測一次水膠重量變化。計算水膠重量變化數據製作膠體膨潤度圖表 [膨潤度算法：(末重-初重)/初重]。可逆性試驗則以含 0.19% 丙烯酸成分之水膠進行實驗，從 20~60°C 之溫度區間，每增加 10°C 進行一次膨潤度測量，反覆進行 3 次溫度循環。

2.4 聚合成份對聚氮異丙基丙烯醯胺化學鍵結影響之測量

兩種樣品以傅立葉紅外光譜儀 (Fourier Transform Infrared Spectrum, FTIR) 進行化學結構測定。採用全反射測試法，波數 400 cm^{-1} ~ 4000 cm^{-1} 。

2.5 紅螢光蛋白質(DsRed)之製造與純化

將 DsRed 螢光蛋白質基因架構在表現載體(pET43.1a, Novagen)上，接著轉形進入表達宿主菌大腸桿菌 BL21(DE3)，而後以抗生素安盤西林(Ampicillin, BioBasic)進行選殖成功轉形株，接著添加 1.0 mM 異丙基 β -D 硫代半乳糖苷(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG, BioBasic) 誘導劑，在溫度 20°C 處理 4 小時誘導重組蛋白質生成，然後離心分離菌塊，將菌塊以 PBS 清洗兩次後，在溶菌緩衝液[去氧核糖核酸分解酶 I(DNase I, 10 U, Sigma) 30 ul、核糖核酸分解酶(RNase, 10 mg/ml, Amersham Life Science) 300 ul、蛋白酶抑制劑(Protease Inhibitor, 20 x, Amresco) 80 ul、溶菌酶(Lysozyme, 10 mg/ml, Amresco) 1.6 ml/10ml 中以均質機進行破菌，而後在 4°C 中進行離心(8000 rpm、30 min)收集上清液並通過 0.45 μm 過濾器去除細小細菌碎片。最後以鎳離子親和層析管柱進行純化。

2.6 水膠對紅螢光蛋白質 DsRed 之吸附實驗

AAc 含量為 0.04% 水膠放置於 25°C 之不同濃度的紅螢光蛋白質濃度(0.019、0.025、0.038、0.075 和 0.15 mg/ml) 24 小時後，清洗膠體表面，再使用 365 nm 之紫外光照膠器成像，並利用 ImageJ 軟體分析影像強度，將實驗組之影像強度減去控制組之影像強度後，得濃度曲線。為測量水膠內 AAc 含量對蛋白質吸附量的影響，則以含不同比例 AAc 成分之水膠浸泡在 25°C 之紅螢光蛋白質液(0.075 mg/ml)24 小時後，利用 365 nm 之紫外光激發後照相，以 ImageJ 軟體分析強度，將實驗組之影像強度減去控制組之影像強度後製圖。

2.7 水膠對紅螢光蛋白質 DsRed 之釋放實驗

以 AAc 含量為 0.11 和 0.19% 之水膠浸泡在 25°C 之紅螢光蛋白質液(0.075 mg/ml)24 小時後，浸至 35°C 的生理緩衝溶液(PBS, pH 7.4)中進行釋放實驗，於 30、60、90、150 分後，將水膠取出置於恆溫(35°C)水槽上，利用 365 nm 之紫外光激發膠體殘留之紅螢光蛋白質，照相後利用 ImageJ 軟體分析影像強度，將實驗組之影像強度減去控制組之影像強度後製圖。



3. 結果

3.1 聚合成份對聚氮異丙基丙烯醯胺化學鍵結之影響

實驗中以 FTIR 光譜驗證丙烯酸與 PNIPAAm 產生共聚合，光譜量測結果如圖 1。加入 AAc 單體之樣品在 $2900\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ 出現明顯吸收峰，此位置由高分子主鏈 (CH_2) 之 C-H 鍵伸縮造成，顯示 AAc 單體與 NIPAAm 形成線性共聚合。同時，AAc 單體的加入使 3500 cm^{-1} 之吸收增強，顯示其-COOH 官能基對 NIPAAm 之 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{NH}$ 鍵產生吸引，並抵銷 PNIPAAm 本身內氫鍵的作用，此為 LCST 提高的原因之一。其他官能基如 $-\text{CH}_3$ 、C-N 訊號亦在 AAc 單體加入後明顯增強。

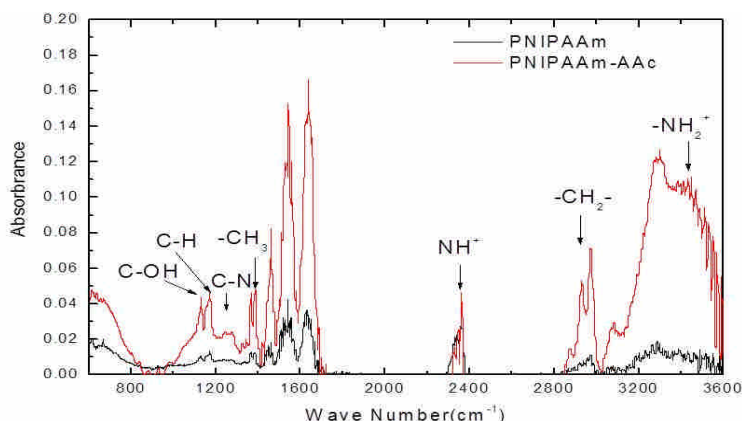


圖 1 PNIPAAm 和 P (NIPAAm-AAc) 共聚物之 FTIR 光譜圖

3.2 感溫性水膠之膨脹倍率測試

製作 AAc 含量為 0%、0.04%、0.11%、0.19%、0.27% 之水膠並測量其膨脹倍率。結果如圖 2(A)~(C) 所示，水膠浸泡在生理緩衝液中的時間越久其膨潤度越高，並且 AAc 含量不同之水膠浸泡在不同溫度的生理緩衝液中，水膠的膨潤度表現狀況亦不一樣；以浸泡 24 小時的結果來看，不含 AAc 之水膠在 25°C 、 35°C 和 45°C 的生理緩衝液其膨潤倍率各為 9.93、0.63 和 0.45 倍，而 AAc 含量為 0.04% 之水膠其膨潤倍率各為 13.47、1.21 和 0.67 倍，AAc 含量為 0.11% 之水膠各為 13.96、6.42 和 1.01 倍，AAc 含量為 0.19% 之水膠各為 15.55、9.82 和 3.37 倍，而 AAc 含量為 0.27% 之水膠其膨潤倍率則各為 19.09、13.63 和 7.81 倍；而將含不同 AAc 濃度之水膠膨潤倍率對溫度變化的結果推算其 LCST 整合如圖 2(D) 可得知，AAc 含量為 0%、0.04%、0.11%、0.19% 和 0.27% 之水膠的 LCST 各約為 27.9°C 、 31.2°C 、 33.5°C 、 36.4°C 及 40°C ，表示 AAc 含量越高之水膠的 LCST 也會跟著越高。



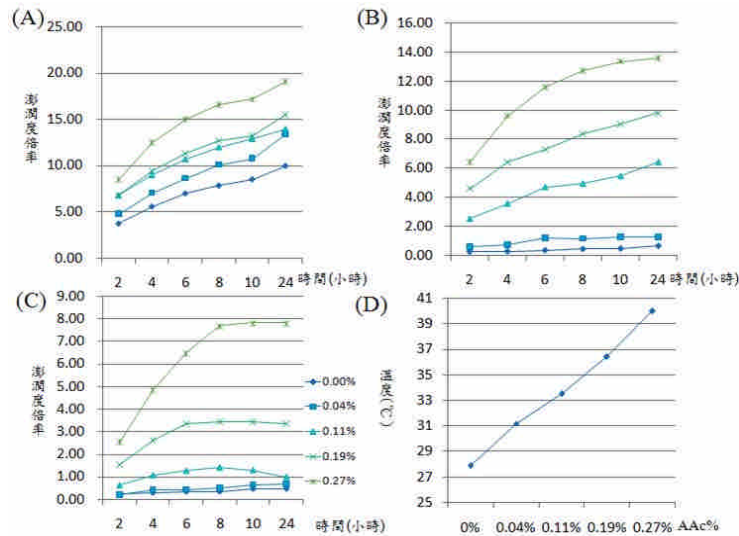


圖 2 AAc 的含量對水膠膨潤度的影響。圖(A)~(C)為水膠在不同溫度對膨潤度的變化圖：(A)25°C，(B)35°C，(C)45°C；圖(D)為 AAc 含量不同之水膠的 LCST 圖

3.3 感溫性水膠可逆性測試

由於 AAc 的存在會影響水膠對溫度變化的感應性，因此需要進行水膠對溫度變化的可逆性測試。以 AAc 含量為 0.19% 之水膠來測試其水膠的可逆性，測試的溫度有 20°C、30°C、40°C、50°C、60°C，每個溫度浸泡時間為 24 小時，共循環三次，實驗結果顯示 AAc 含量為 0.19% 之水膠仍能感受溫度變化，反覆表現出收縮及膨潤的變化(圖 3)。

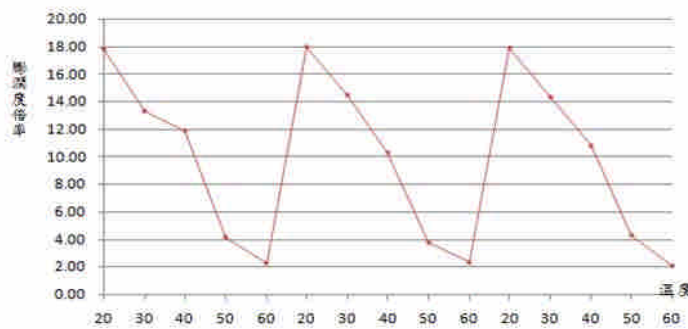


圖 3 水膠對溫度變化的敏感性測試。以含 AAc 含量為 0.19% 之膠體在 20°C ~ 60°C 溫度變化區間，每上升 10°C 進行膨潤度測量，反覆共進行 3 次溫度循環

3.4 感溫水膠對螢光蛋白質的吸附與釋放

我們成功地以基因工程方法生產並純化出紅螢光蛋白質純化液，以利水膠吸附與釋放蛋白質變化量之測量。為得知紅螢光蛋白質濃度是否與影像強度間具相關性，我們將含 0.04% AAc 之水膠浸泡在 25°C 不同濃度(0.019 至 0.15 mg/ml)之紅螢光蛋白質 24 小時後，在紫外光的照射下呈現出的影像，利用 ImageJ 影像分析軟體進行分析，結果如圖 4(A)和(B)所示，紅螢光蛋白質濃度越高，膠體影像越亮，並呈現出具有濃度相關性，同時從影像亦觀察到較外圍之水膠所吸附的紅螢光較多，



越到內圈中心的地方則吸收量就略減，此也符合物理之擴散效應。以上結果顯示，此測量分析模式可被利用來偵測水膠吸收紅色螢光蛋白質量的變化。然而，水膠內 AAc 含量是否也會影響其吸收紅色螢光蛋白質的量呢？將 AAc 不同含量(0%、0.04%、0.11%和 0.19%)之水膠，浸泡於 25°C 的紅色螢光蛋白質液(0.075 mg/ml) 24 小時後，分析影像強度結果如圖 4(C)，顯示 AAc 含量最高(0.19%)的水膠其所吸附的蛋白質量也最多，表示 AAc 含量越高之水膠其蛋白質吸附量也隨之升高。最後檢測水膠對其所吸附的紅色螢光蛋白質之釋放模式。以 LCST 溫度接近於體表溫度之水膠(AAc 含量為 0.11 和 0.19%)進行釋放實驗，結果如圖 5 所示，在 35°C 的 PBS 中，AAc 含量為 0.11% 和 0.19% 之水膠都在 30 分鐘時可釋放約 80 至 90% 之蛋白質量。

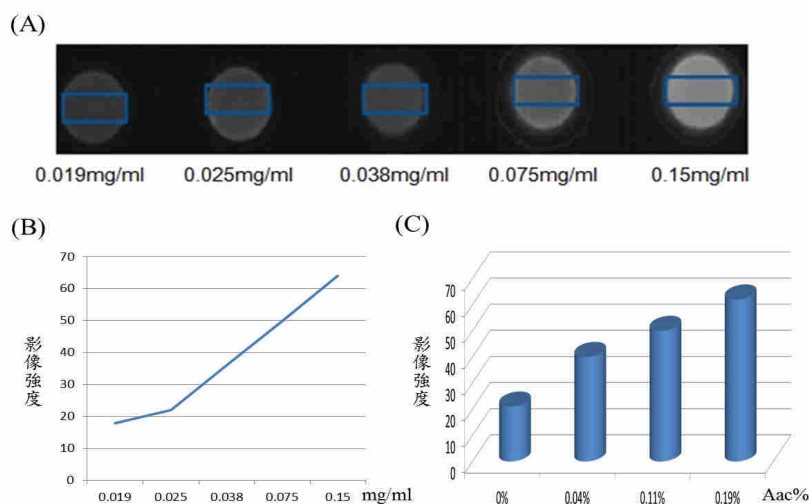


圖 4 水膠對紅螢光蛋白質 Ds-Red 之吸附實驗。圖(A)為水膠吸附螢光蛋白質後之螢光影像圖，圖(B)為含 0.11% AAc 之水膠吸附螢光蛋白質的濃度曲線圖，圖(C)為不同 AAc 含量水膠之蛋白質吸附量比較圖(圖 A 藍色框處為影像分析之區域)

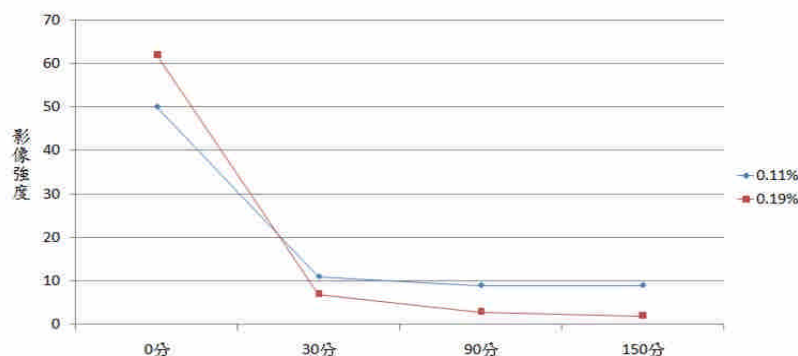


圖 5 水膠對紅螢光蛋白質 Ds-Red 之釋放實驗

4. 討論與結論

傳統的 PNIPAAm 之水膠因缺乏可與藥物結合並穩定藥物的官能基而使其應用性被限制，因此本實驗利用添加弱酸性的 AAc 單體(0-0.27%)來與其形成共聚體以增加可利用的官能基(圖 1)並調整



水膠的 LCST 接近體溫。結果一致於文獻報告(Feil *et al.*, 1993), AAc 含量越高的水膠, 其 LCST 值越高且在低溫時膨脹倍率越高(圖 2)。雖有研究指出即使添加極少量 AAc 單體亦會干擾的 NIPAAm 分子間鍵結鏈的連續性而使得異丙基之基團間累積的厭水性作用力變弱, 造成 P (NIPAAm-AAc) 共聚物對溫度的敏感性變差(Xu *et al.*, 2007)。但在本實驗結果卻顯示在生理緩衝溶液(PBS, pH 7.4)中, AAc 含量為 0.19% 之水膠仍能敏銳地感受溫度變化, 反覆表現出膠體收縮及膨潤狀態(圖 3); 並且 PNIPAAm 聚合物亦展現出 LCST 低於在水溶液中的現象, 這些都可能是緩衝溶液中鹽離子影響了水分子結構所造成的(Young *et al.*, 2006)。另外從水膠之蛋白質吸收與釋放實驗結果得知, 重組紅螢光蛋白質 DsRed 濃度越高, 在單位時間內水膠吸附量越多而影像亮度越高(圖 4), 呈現出具有濃度相關性, 同時重組紅螢光蛋白質 DsRed 可操作簡單且直接的追蹤水膠內蛋白質變化量, 很適合被當作水膠蛋白質藥物釋放模式的追蹤及分析工具。以含 0.11% 與 0.19% 丙烯酸之水膠進行蛋白質吸收和釋放實驗, 在 30 分鐘時即可釋放約為 80 至 90% 之蛋白質量, 顯示這些水膠在不喪失對溫度的敏感性的情況下, 仍具良好包載和釋放蛋白質的能力。

NIPAAm 均聚物和共聚物在生物醫學應用中具有很大的潛力。有研究指出將可反覆充填的大膠囊型人工胰腺, 懸浮在 P (NIPAAm-AAc) 聚合物溶液中, 當溶液溫度從 25°C 升高至體溫時, 人工胰腺可被凝膠有效的包覆且長時間釋放胰島素(Vernon *et al.*, 1996; Bae *et al.*, 1998; Vernon *et al.*, 1999; Gappa *et al.*, 2001; Chae *et al.*, 2001), 另外將關節軟骨包埋在 P (NIPAAm-AAc) 的水凝膠時其仍能保持形態(Ahn *et al.*, 2001), 同時, P (NIPAAm-AAc) 共聚物的水凝膠也被認為是一個有發展遠景的細胞和藥物遞送基質(Na *et al.*, 2006)。雖然如此, PNIPAAm 聚合物及其共聚物的臨床應用目前仍有局限性。因其不能被生物降解(Jeong *et al.*, 1997)且當與血液接觸時會活化血小板(Bromberg *et al.*, 1998), 更甚的是 PNIPAAm 聚合物在人體的代謝途徑並不清楚。所有上述提到的問題, 使其難以通過美國食品和藥物管理局批准在臨床使用。但是 PNIPAAm 聚合物及其共聚物具有溫度敏感性是極適合發展製造人工敷料的, 正如本研究結果所顯示, 只要透過加入具有高度親水單體如丙烯酸來提高水膠之相轉溫度至人體皮膚表面溫度 35-37°C, 就可簡單控制溫度變化來進行藥物吸收或釋放, 同時降低溫度至水膠之相轉溫度以下就可輕易地將其剝離傷口, 此使得在更換人工敷料時不會對傷口造成二次傷害(Chen *et al.*, 2003)。因此, 雖然目前將水膠應用於創傷敷料上, 於國、內外之研究都非常少見, 但卻是值得投入進一步研究發展的領域, 若能製造出符合理想敷料要求之產品, 將是燒燙傷病人的福音。

參考文獻

- [1] Ahn, Y., Mironov, V. and Gutowska, A., "Reversible Gelling Culture Media for in Vitro Cell Culture in Three-dimensional Matrices," US patent US 6103528, 2001.
- [2] Bae, Y., Okano, T. and Kim, S., "Temperature Dependence of Swelling of Crosslinked Poly (N, N'-alkyl substituted acrylamides) in Water," *J. Polym.Sci., Part B: Polym. Phys*, Vol. 28, No. 6, 1990, pp. 923-936.
- [3] Bae, Y., Vernon, B., Han, C. and Kim, S., "Extracellular Matrix for a Rechargeable Cell Delivery System," *J. Control. Release*, Vol. 53, No. 1-3, 1998, pp. 249-258.
- [4] Bromberg, L. E. and Ron, E. S., "Temperature-responsive Gels and Thermogelling Polymer



- Matrices for Protein and Peptide Delivery,” *Adv. Drug Deliver*, Vol. 31, No. 3, 1998, pp. 197-221.
- [5] Chae, S., Kim, S. and Bae, Y., “Bioactive Polymers for Biohybrid Artificial Pancreas,” *J. Control. Release*, Vol. 9, No. 6, 2001, pp. 473-484.
- [6] Chen, K. S., Tsai, J. C., Lin, F. H., Chen, T. M., Wu, T. H. and Chen, C. C., “The Study of PP Nonwoven Composite Combined with Thermo-sensitive Hydrogel and Immobilized Biodegradable Material onto Its Surface,” *Materials Science and Engineering*, Vol. 35, 2001, pp. 231-239.
- [7] Coughlan, D., Quilty, F. and Corrigan, O., “Effect of Drug Physicochemical Properties on Swelling/deswelling Kinetics and Pulsatile Drug Release from Thermoresponsive Poly (N-isopropylacrylamide) Hydrogels,” *J. Control. Release*, Vol. 98, No. 1, 2004, pp. 97-114.
- [8] Feil, H., Bae, Y., Feijen, J. and Kim, S., “Effect of Comonomer Hydrophilicity and Ionization on The Lower Critical Solution Temperature of N-isopropylacrylamide Copolymers,” *Macromolecules*, Vol. 26, No. 10, 1993, pp. 2496-2500.
- [9] Feil, H., Bae, Y., Feijen, J. and Kim, S., “Mutual Influence of PH and Temperature on the Swelling of Ionizable and Thermosensitive Hydrogels,” *Macromolecules*, Vol. 25, No. 20, 1992, pp. 5528-5530.
- [10] Galaev, I. and Mattiasson, B., “Smart' Polymers and What They Could Do in Biotechnology and Medicine,” *Trends Biotechnol*, Vol. 17, No. 8, 1999, pp. 335-340.
- [11] Gappa, H., Baudy, M., Koh, J., Kim, S. and Bae, Y., “The Effect of Zincrystallized Glucagon-like Peptide-1 on Insulin Secretion of Macroencap Sulated Pancreatic Islets,” *Tissue Eng*, Vol. 7, No. 1, 2001, pp. 35-44.
- [12] Hoare, T. and Kohane, D., “Hydrogels in Drug Delivery: Progress and Challenges,” *Polymer*, Vol. 49, No. 8, 2008, pp. 1993-2007.
- [13] Hoffman, A., “Hydrogels for Biomedical Applications,” *Adv. Drug Deliver*, Vol. 54, No. 1, 2002, pp. 3-12.
- [14] Jeong, B., Bae, Y. H., Lee, D. S. and Kim, S. W., “Biodegradable Block Copolymers as Injectable Drug-delivery Systems,” *Nature*, Vol. 338, No. 6645, 1997, pp. 860-862.
- [15] Jeong, B. and Gutowska, A., “Lessons from Nature: Stimuli-responsive Polymers and Their Biomedical Applications,” *Trends Biotechnol*, Vol. 20, No. 7, 2002, pp. 305-311.
- [16] Liu, X., Wang, L., Wang, L., Huang, J. and He, C., “The Effect of Salt and pH on The Phase-transition Behaviors of Temperature-sensitive Copolymers Based on N-isopropylacrylamide,” *Biomaterials*, Vol. 25, No. 25, 2004, pp. 5659-5666.
- [17] Liu, Y., Shao, Y. and Lü, J., “Preparation, Properties and Controlled Release Behaviors of pH-induced Thermosensitive Amphiphilic Gels,” *Biomaterials*, Vol. 27, No. 21, 2006, pp. 4016-4024.
- [18] Na, K., Park, J., Kim, S., Sun, B., Woo, D., Chung, H. and Park, K., “Delivery of Dexamethasone, Ascorbate, and Growth factor (TGF [beta]-3) in Thermoreversible Hydrogel Constructs Embedded with Rabbit Chondrocytes,” *Biomaterials*, Vol. 27, No. 35, 2006, pp. 5951-5957.



- [19] Nakayama, M., Okano, T., Miyazaki, T., Kohori, F., Sakai, K. and Yokoyama, M., “Molecular Design of Biodegradable Polymeric Micelles for Temperature Responsive Drug Release,” *J. Control. Release*, Vol. 115, No. 1, 2006, pp. 46-56.
- [20] Pei, Y., Chen, J., Yang, L., Shi, L., Tao, Q., Hui, B. and Li, J., “The Effect of PH on The LCST of Poly (N-isopropylacrylamide) and Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid),” *J. Biomat.Sci-Polym. E*, Vol. 15, No. 5, 2004, pp. 585-594.
- [21] Peppas, N., Hilt, J., Khademhosseini, A. and Langer, R., “Hydrogels in Biology and Medicine: from Molecular Principles to Bionanotechnology,” *Adv. Mater*, Vol. 18, No. 11, 2006, pp. 1345-1360.
- [22] Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A. and Okano, T., “Two-dimensional Manipulation of Cardiac Myocyte Sheets Utilizing Temperature-responsive Culture Dishes Augments the Pulsatile Amplitude,” *Tissue Eng*, Vol. 7, No. 2, 2001, pp. 141.
- [23] Vernon, B., Gutowska, A., Kim, S. and Bae, Y., “Thermally Reversible Polymer Gels for Biohybrid Artificial Pancreas,” *Macromol.Symp*, Vol. 109, No. 1, 1996, pp. 155-167.
- [24] Vernon, B., Kim, S. and Bae, Y., “Insulin Release from Islets of Langerhans Entrapped in a Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) Polymer Gel,” *J. Biomat.Sci-Polym. E*, Vol. 10, No. 2, 1999, pp. 183-198.
- [25] Xu, X. D., Zhang, X. Z., Cheng, S. X., Zhuo, R. X. and Kennedy, J. F., “A Strategy to Introduce the PH Sensitivity to Temperature Sensitive PNIPAAm Hydrogels without Weakening the Thermosensitivity,” *Carbohyd. Polym.* Vol. 68, No. 3, 2007, pp. 416-423.
- [26] Yin, X., Hoffman, A. and Stayton, P., “Poly (N-isopropylacrylamide-co-propylacrylic acid) Copolymers That Respond Sharply to Temperature and PH,” *Biomacromolecules*, Vol. 7, No. 5, 2006, pp. 1381-1385.
- [27] Young, K. J., Rajendra, R. B., Changwoo, J., Orlando, J. R., Igal, S. and Jan, G., “Salt-Induced Depression of Lower Critical Solution Temperature in a Surface-Grafted Neutral Thermoresponsive Polymer,” *Macromol. Rapid Commun.* Vol. 27, No. 9, 2006, pp. 697-701.
- [28] Yoshida, R., Sakai, K., Okano, T. and Sakurai, Y., “Modulating The Phase Transition Temperature and Thermosensitivity in N-isopropylacrylamide Copolymer Gels,” *J. Biomat.Sci-Polym. E*, Vol. 6, No. 6, 1995, pp. 585-598.
- [29] Zareie, H., Volga Bulmus, E., Gunning, A., Hoffman, A., Piskin, E. and Morris, V., “Investigation of a Stimuli-responsive Copolymer by Atomic Force Microscopy,” *Polymer*, Vol. 41, No. 18, 2000, pp. 6723-6727.
- [30] Zhang, X., Yang, Y., Chung, T. and Ma, K., “Preparation and Characterization of Fast Response Macroporous Poly (N-isopropylacrylamide) Hydrogels,” *Langmuir*, Vol. 17, No. 20, 2001, pp. 6094-6099.

