研究论文

DOI: 10.15541/jim20230464

小粒径 Fe_3O_4-DMSA-PEI 磁性纳米颗粒的制备及其基因负载能力研究

蔡和庆[1], 韩 璐[1], 杨松松[1], 薛新玉[1], 张 扣[1], 孙志成[1], 刘儒平[1], 胡 堃[1], 危 岩[2]

(1. 北京印刷学院 印刷与包装工程学院, 北京 102600; 2. 清华大学 生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084)

摘 要: 四氧化三铁(Fe_3O_4)磁性纳米颗粒因其制备简单, 在外加磁场作用下具有靶向性，并且表面易接枝等特性, 可作为被动靶向载体应用于基因治疗领域。本研究采用溶剂热法制备纳米颗粒, 并调控堆积生长时间, 制得粒径在 4~9 nm 范围内可控的油相 Fe_3O_4 纳米颗粒; 使用内消旋-2,3-二巯基丁二酸(DMSA)二次取代其表面的油酸分子, 使其具备良好的水相分散性; 通过酰胺化反应在其表面接枝支链型聚乙烯亚胺(PEI), 最终得到 Fe_3O_4-DMSA-PEI 磁性纳米颗粒。研究发现, Fe_3O_4-DMSA-PEI 磁性纳米颗粒的表面 Zeta 电位高达(52.50±1.94) mV, 具有一定的超顺磁性(14.48 emu/g, 1 emu/g=1 $A\cdot m^2/kg$)。磁性纳米颗粒与质粒 DNA 的质量比为 15 : 1 时可完全阻滞 DNA 在凝胶上的电泳, 装载量高达 6.67%。本研究制备的 Fe_3O_4-DMSA-PEI 磁性纳米颗粒具有一定的基因负载能力, 有望作为基因载体应用于基因转染领域。

关 键 词: 四氧化三铁; 磁性纳米颗粒; 基因载体; 表面改性

中图分类号: TB383　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1000-324X(2024)05-0517-08

Fe_3O_4-DMSA-PEI Magnetic Nanoparticles with Small Particle Size: Preparation and Gene Loading

CAI Heqing[1], HAN Lu[1], YANG Songsong[1], XUE Xinyu[1], ZHANG Kou[1], SUN Zhicheng[1], LIU Ruping[1], HU Kun[1], WEI Yan[2]

(1. School of Printing and Packaging Engineering, Beijing Institute of Graphic Communication, Beijing 102600, China; 2. Key Laboratory of Organophosphorus Chemistry and Chemical Biology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Ferroferric oxide (Fe_3O_4) magnetic nanoparticles are widely used as passive targeting carriers in gene therapy, due to their simple preparation, targeting under external magnetic field and easy surface grafting. This study synthesized oil phase Fe_3O_4 nanoparticles with controllable particle sizes in the range from 4 to 9 nm by regulating the accumulation growth time in the solvothermal method. Then, meso-2, 3-dimercaptosuccinic (DMSA) was employed to double exchange oleic acid molecules on its surface to provide good water dispersibility. Finally,

---

收稿日期: 2023-10-09; **收到修改稿日期:** 2023-12-07; **网络出版日期:** 2023-12-25

基金项目: 国家自然科学基金(61971049, 62211530446, 22278037); 北京印刷学院科研创新团队项目(Ea202205); 北京市高等教育学会 2023 年立项重点课题(ZD202312)
National Natural Science Foundation of China (61971049, 62211530446, 22278037); Scientific Research Innovation Project from Beijing Institute of Graphic Communication (Ea202205); The 2023 Key Project from Beijing Association of Higher Education (ZD202312)

作者简介: 蔡和庆(1997–), 男, 硕士研究生. E-mail: 724040386@qq.com
CAI Heqing (1997–), male, Master candidate. E-mail: 724040386@qq.com

通信作者: 韩 璐, 副教授. E-mail: hanlu@iccas.ac.cn; 危 岩, 教授. E-mail: weiyen@tsinghua.edu.cn
HAN Lu, associate professor. E-mail: hanlu@iccas.ac.cn; WEI Yan, professor. E-mail: weiyen@tsinghua.edu.cn

Fe_3O_4-DMSA-PEI magnetic nanoparticles were obtained by grafting branched polyethylenimine (PEI) onto Fe_3O_4-DMSA surface through amidization reaction. The results demonstrate that the Fe_3O_4-DMSA-PEI magnetic nanoparticles have a surface Zeta potential of (52.50 ± 1.94) mV, remaining a certain degree of superparamagnetism (14.48 emu/g, 1 emu/g=1 $A \cdot m^2/kg$). When the mass ratio of Fe_3O_4-DMSA-PEI magnetic nanoparticles to plasmid DNA is 15 : 1, it can completely block DNA and its loading capacity is as high as 6.67%. The Fe_3O_4-DMSA-PEI magnetic nanoparticles prepared in this study have a certain gene delivery ability and are expected to be used as gene carriers in the field of gene transfection.

Key words: ferroferric oxide; magnetic nanoparticle; gene carrier; surface modification

基因治疗通过将特定的基因药物递送到细胞或靶向部位来纠正或修改遗传信息，是一种极具前景的治疗癌症、免疫系统疾病的方法[1]。基因载体作为递送基因的工具，其安全性和高效性对基因治疗的成功至关重要[2]。常见的纳米基因载体，如金纳米颗粒[3]、二氧化硅纳米颗粒[4]、磷酸钙纳米颗粒[5]和纳米聚合物分子[6]等，依赖细胞自身的摄取和递送机制将基因送达目标细胞或组织[7]，难以精确控制基因的释放位置与释放速率，转染效率也较低。与之相比，磁性纳米颗粒(Magnetic Nanoparticles, MNP)基因载体独特的磁响应性使其能够在特定的恒磁场中聚集和定位，在特定的交变磁场中产生热效应[8]。因此，在体外磁场的诱导下，磁性纳米颗粒基因载体能够实现药物的定向输送和可控释放[9]。目前，磁转染已被证明能够有效提升基因递送效率[10]。并且通过结构设计，磁性纳米颗粒基因载体可用于各种分子层特异性功能化[11]，有效通过机体内的生物屏障系统[12]，还可与磁共振成像和热疗作用结合，实现诊疗双重作用[13]，大幅提升基因治疗效果。

在众多磁性纳米颗粒中，四氧化三铁(Fe_3O_4)以其制备简单等特点得到了广泛应用。目前，制备Fe_3O_4纳米颗粒的方法较多[14-19]，其中溶剂热法将磁性纳米颗粒的成核和生长分为两个独立的阶段，可得到小粒径且尺寸均一的单分散颗粒。小粒径的Fe_3O_4纳米颗粒基因载体具有大比表面积、良好的细胞渗透性和稳定的血液相容性，可实现更高的载荷量和基因递送效率，且不易在循环系统中聚集、沉积或被降解，确保基因载体能够稳定地随血液到达目标部位[20]。此外，为了将基因药物递送至目标细胞中，通常对其进行表面改性使其具备良好的基因负载能力与生物相容性。研究人员常通过化学键合法在磁性纳米材料表面接枝改性材料[21]，或者在磁性纳米材料表面直接包裹一层或多层有机或无机材料，如表面活性分子[22]、聚合物[23]、有机体物质[24]或二氧化硅等[15]，但这些改性方法或改性材料的适用范围有限。

聚乙烯亚胺(PEI)是一种具有广阔适用范围的阳离子聚合物，能够通过静电相互作用与基因形成多聚体，并利用其质子海绵效应保护基因免受酶的降解，显示出强pH缓冲能力与高基因转染效率[25]。

基于此，本研究通过溶剂热法制备了尺寸可控的超小粒径油相Fe_3O_4纳米颗粒，通过交换其表面的油酸分子和酰胺化反应，将PEI接枝到纳米颗粒表面，研究了磁性纳米材料对质粒DNA的担载与运输性能，验证了其基因负载能力。

1 实验方法

1.1 实验试剂

氯化铁•六水合物($FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 98%)、油酸(OA, 90%)、1-十八烯(90%)、三乙胺(99%)、内消旋-2,3-二巯基丁二酸(DMSA, 98%)购买于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司；油酸钠(NaOA, 97%)购买于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司；无水乙醇(C_2H_6O, 99.7%)、正己烷(C_6H_{14}, 95%)、甲苯(C_7H_8, 99.5%)、三氯甲烷($CHCl_3$, 99%)购买于北京化工厂；氮气(N_2, 99.99%)购买于华宁辰气体有限公司；二甲基亚砜(DMSO, ACS级)购买于美国AMRESCO公司；聚乙烯亚胺(PEI, MW1800, 99%)、聚乙烯亚胺(PEI, MW10000, 99%)购买于阿法埃莎(天津)化学有限公司；1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC•HCl, 98.5%)、*N*-羟基硫代琥珀酰亚胺钠盐(sulfo-NHS, 98.5%)购买于阿拉丁试剂(上海)有限公司。

1.2 Fe_3O_4-DMSA-PEI磁性纳米颗粒的制备

1.2.1 Fe_3O_4-OA的制备

将3.6 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$和12.2 g NaOA溶于93 mL混合溶剂(超纯水 : 无水乙醇 : 正己烷= 20 mL : 27 mL : 46 mL), 70 ℃搅拌4 h，收集上层有机相并用超纯水清洗，35 ℃旋转蒸发以去除残留正己烷，

60 ℃真空干燥 12 h, 收集得到红棕色蜡状油酸铁(Fe-OA); 将 3.6 g 油酸铁和 0.64 mL 油酸溶于 20 g 1-十八烯, N_2 氛围中缓慢加热到 240 ℃保温 35 min, 随后以 4 ℃/min 的速率升温至 320 ℃并分别保温 30、35 和 40 min, 冷却至室温后, 用 150 mL 无水乙醇沉降产物, 再用甲苯和正己烷的混合溶剂反复清洗, 离心收集沉淀物, 60 ℃真空干燥 12 h, 制备得到三种不同保温时间的 Fe_3O_4 纳米颗粒, 分别标记为 MNP-1、MNP-2 和 MNP-3。

1.2.2　Fe_3O_4-OA 的 DMSA 表面改性

将 100 mg MNP-3 分散在 10 mL 三氯甲烷和 50 μL 三乙胺中, 加入 10 mL 含有 50 mg DMSA 的 DMSO, 60 ℃搅拌 12 h, 离心收集沉淀物并用无水乙醇清洗; 将上述产物分散在 100 mL 无水乙醇和 50 μL 三乙胺中, 加入 10 mL 含有 50 mg DMSA 的 DMSO, 60 ℃搅拌 12 h, 离心收集沉淀物并用无水乙醇清洗, 最终得到 Fe_3O_4-DMSA, 并将其分散在 5 mL 超纯水中保存。

1.2.3　Fe_3O_4-DMSA 的 PEI 接枝

将 25 mg EDC•HCl 和 57 mg sulfo-NHS 加入到 1 mL Fe_3O_4-DMSA 中, 将 2 种支链型 PEI(分子量分别为 1800 和 10000)各 1 g 分别分散在 2 mL 超纯水中, 常温下搅拌混合 48 h, 离心收集沉淀物并用超纯水清洗, 分别得到接枝 2 种 PEI 的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒 [Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800) 和 Fe_3O_4-DMSA-PEI(10000)]。

图 1 为 Fe_3O_4 纳米颗粒表面嫁接 PEI 的路线图。研究采用溶剂热法制备得到油酸包覆的 Fe_3O_4 纳米颗粒, 其粒径超小、形貌均一、单分散性好, 然而, 表面亲油限制了其在生物体系中的应用, 需进行表面改性, 使其从亲油性转变为亲水性。据文献[27]报道, DMSA 可取代 Fe_3O_4 纳米颗粒表面的 OA 分子, 实现其水溶性。交换反应中, 弱碱性三乙胺作为催化剂发挥了重要作用, 它可取代 DMSA 上羧基的氢, 形成能够与长链油酸分子发生交换的羧酸盐($-COO^-$), 从而形成水相 Fe_3O_4 纳米颗粒。最后, EDC • HCl 是羧基的活化剂和水溶性肽偶联剂, sulfo-NHS 则是形成稳定活泼酯中间体的多肽缩合剂。通过酰胺化反应, DMSA 上的羧基和 PEI 上的氨基发生脱水缩合, 从而成功地在 Fe_3O_4 纳米颗粒表面接枝 PEI[28]。

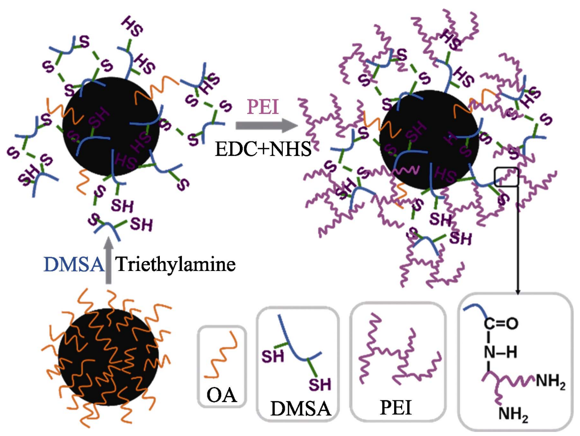

图 1　Fe_3O_4 纳米颗粒表面嫁接 PEI 的路线图

Fig. 1　Route map of PEI grafting on the surface of Fe_3O_4 nanoparticles

1.3　Fe_3O_4-DMSA-PEI 磁性纳米颗粒的表征

1.3.1　形貌表征

使用 Zeta 电位及激光粒度仪(Zetasizer Nano Analyzer, ZNA, 型号 ZEN3690, 英国马尔文公司)表征制备的磁性纳米颗粒的粒径分布; 使用透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope, TEM, 型号 F20, 荷兰 FEI 公司)在 200 kV 的加速电压下表征制备的磁性纳米颗粒的微观形貌; 使用 X 射线衍射光谱仪(X-ray Diffraction, XRD, 型号 D/max-2200PC, 德国布鲁克公司)对样品进行物相分析。

1.3.2　结构表征

使用傅里叶变换红外光谱仪(Fourier Transform Infrared Spectrometer, FT-IR, 型号 FTIR-8400, 日本岛津公司)和拉曼光谱仪(Raman Spectrometer, RS, 型号 Xplora- BX51, 日本堀场公司)表征制备的磁性纳米颗粒的结构, 其中拉曼光谱仪的测试条件为光斑 1 μm、波长 532 nm。

1.4　Fe_3O_4-DMSA-PEI 磁性纳米颗粒的性能测试

1.4.1　稳定性测试

取 1 mg 不同粒径的 Fe_3O_4-OA(MNP-1, MNP-2 和 MNP-3), 分别分散在 20 mL 正己烷中; 取 1 mg Fe_3O_4-DMSA 、 Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800) 和 Fe_3O_4-DMSA-PEI(10000), 分别分散在 20 mL 超纯水中。向 10 mm 的荧光熔融比色皿中加入 1.5 mL Fe_3O_4-OA、Fe_3O_4-DMSA、Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)和 Fe_3O_4-DMSA-PEI(10000)的分散液, 使用 Zeta 电位及激光粒度仪测定其表面电位。

1.4.2　磁性测试

使用物理性质测量系统(Physical Property Measurement System, PPMS, 型号 PPMS-9, 美国量子设计公司)测试制备的纳米颗粒的磁性。变温磁化率曲线测试条件: 零场冷却(Zero-Field- Cooled, ZFC)温度 10 K, 场冷却(Field-Cooled, FC)温度 300 K,

外磁场强度 100 Oe(1 Oe=79.6 A/m)。磁滞回线测试条件：外磁场强度–3000~3000 Oe，恒定温度 310 K。

1.4.3 基因负载能力测试

将 Fe_3O_4-DMSA-PEI 磁性纳米颗粒和质粒 DNA 分别以质量比 0.1 : 1、0.5 : 1、1 : 1、2 : 1、5 : 1、10 : 1 和 15 : 1 的比例混合，分别在 1%的琼脂糖凝胶上进行电泳，恒定电压 120 V, 30 min 后在紫外光下观察凝胶电泳成像仪上的 DNA 条带。用质粒 DNA 的质量除以质粒 DNA 与基因载体的质量和，计算其装载量，以评估基因载体的负载能力[26]。

2 结果与讨论

2.1 形貌和结构

由 TEM 照片(图 2)可以看出，溶剂热法制备的 Fe_3O_4 纳米颗粒均呈现规整的球形形貌且未出现团聚现象，粒径较小，其平均粒径分别为 4.6、6.3 和 8.1 nm，表明改变反应时间可调控 Fe_3O_4 纳米颗粒的粒径[29]。这是由于溶剂热法反应分为相对低温(240 ℃)的原位成核阶段和相对高温(320 ℃)的纳米颗粒堆积生长阶段。本实验延长了纳米颗粒的堆积生长时间，时间越长，则得到的 Fe_3O_4 纳米颗粒粒径越大。值得注意的是，高温反应时间过长可能会导致纳米粒子形貌发生改变，所以高温反应时间也不宜过长。

从图 3(a)动态光散射(DLS)结果可以看出，MNP-1、MNP-2 和 MNP-3 的水合粒径分别为(252.0±2.6)、(284.0±2.4)和(297.0±2.8) nm，表明随着高温反应时间延长，制备的 Fe_3O_4 纳米颗粒水合粒径也逐渐增大。该值明显大于 TEM 的测试值，是包覆在 Fe_3O_4

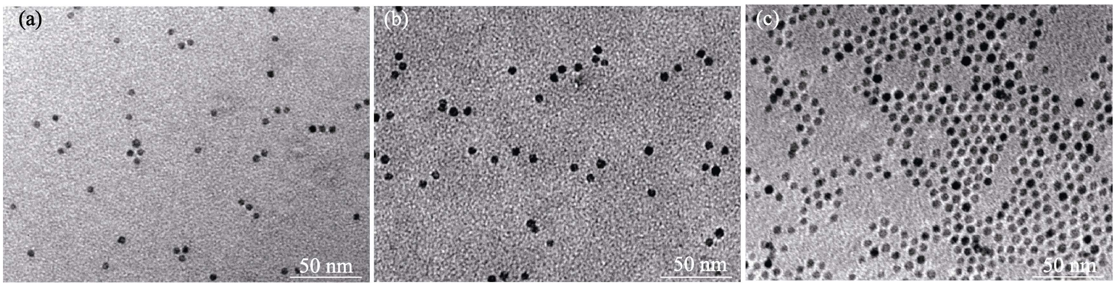

图 2 Fe_3O_4-OA 的 TEM 照片

Fig. 2 TEM images of Fe_3O_4-OA

(a) MNP-1; (b) MNP-2; (c) MNP-3

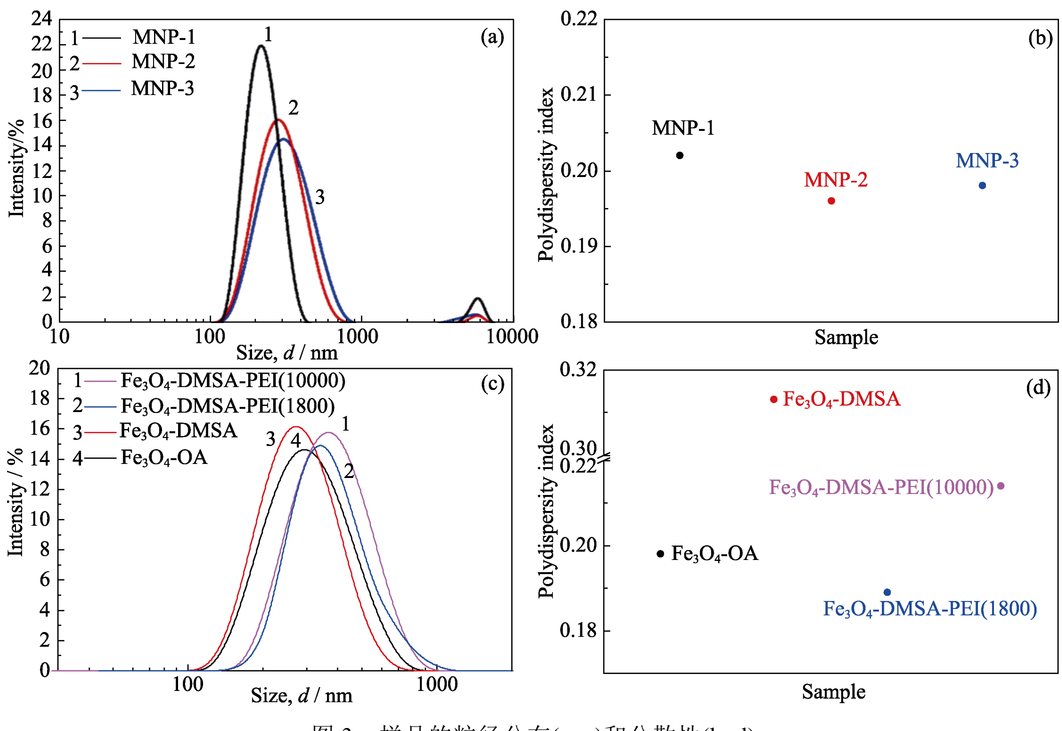

图 3 样品的粒径分布(a, c)和分散性(b, d)

Fig. 3 Particle size distributions (a, c) and polydispersity indexs (b, d) of samples

(a, b) Fe_3O_4-OA (MNP-1, MNP-2 and MNP-3); (c, d) Fe_3O_4-OA, Fe_3O_4-DMSA and Fe_3O_4-DMSA-PEI

Colorful figures are available on website

纳米颗粒表面的 OA 分子在溶剂中充分伸展，并在干燥状态下收缩的结果。MNP-1、MNP-2 和 MNP-3 的多分散指数分别为 0.202、0.196 和 0.198(图 3(b))，表明制备的 Fe_3O_4 纳米颗粒在正己烷中具有较好的分散性。由图 3(c)可以看出，制备的 Fe_3O_4-DMSA-PEI(10000)、Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)、Fe_3O_4-OA、Fe_3O_4-DMSA 的粒径逐渐减小，这是由于 Fe_3O_4-DMSA 的制备过程中，Fe_3O_4-OA 表面上的 OA 分子被分子量更小的 DMSA 大量交换下来，而 Fe_3O_4-DMSA-PEI 则引入了分子量更大的 PEI。多分散指数越小，分散性越好。由图 3(d)可以看出，与 Fe_3O_4-OA 在正己烷中的多分散指数(0.198)相比，Fe_3O_4-DMSA 在水中的多分散指数较大，而且 Fe_3O_4-DMSA-PEI 的多分散指数随 PEI 分子量的增大而增大。这是由于 Fe_3O_4-DMSA 的表面残留了少量未被交换下来的 OA 分子，降低了它的水溶性；而 Fe_3O_4-DMSA-PEI 则由于表面接枝了 PEI，增强了材料的亲水性。此外，与分子量为 1800 的 PEI 相比，分子量为 10000 的 PEI 占位过大、空间位阻更高，使其相对难以进行酰胺化反应，PEI 的接枝量较少，因此 Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)在水中的多分散指数低于 Fe_3O_4-DMSA-PEI(10000)。

Fe_3O_4 纳米颗粒表面修饰不同分子后的 FT-IR 谱图(图 4)显示，Fe_3O_4-OA 在 1715 和 1433 cm^{-1} 处存在 C=O 特征峰，以及在 1630 和 1519 cm^{-1} 处存在 C=C 和 COO^-特征峰，证实了 Fe_3O_4 纳米颗粒表面包裹的是 OA 分子。在 Fe_3O_4-DMSA 的 FT-IR 谱图中，1711 cm^{-1} 处出现了微弱的 C=O 特征峰，1670 和 1580 cm^{-1} 处出现了 COO^-对称和不对称伸缩振动的特征峰，表明 Fe_3O_4 纳米颗粒表面的 OA 分子被 DMSA 分子所交换；而 2922 和 2854 cm^{-1} 处的–CH_2 特征峰相对减弱，表明其表面仍残留极少量 OA 分子。在 Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)和 Fe_3O_4-DMSA-PEI(10000)的 FT-IR 谱图中，1650 cm^{-1} 处的特征峰代表仲酰胺的酰胺 I 带，1540、1330 和 1300 cm^{-1} 处的特征峰代表了 δ_{NH} 和 ν_{C-N} 之间偶合形成的酰胺 II 带和酰胺III带，表明 PEI 通过酰胺化反应已成功接枝在 Fe_3O_4 纳米颗粒表面。

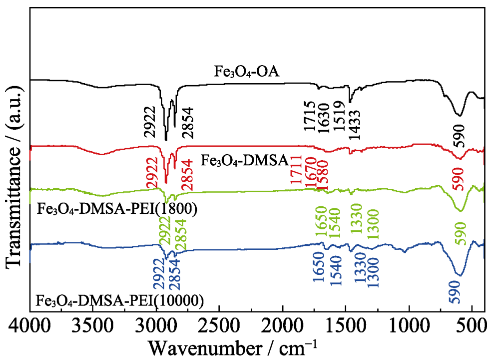

图 4　Fe_3O_4-OA, Fe_3O_4-DMSA 和 Fe_3O_4-DMSA-PEI 的 FT-IR 图谱

Fig. 4　FT-IR spectra of Fe_3O_4-OA, Fe_3O_4-DMSA and Fe_3O_4-DMSA-PEI

FT-IR 结果没有显示 Fe_3O_4-DMSA 上的硫醇基团，可能是由于硫醇发生氧化生成了二硫键。本研究采用拉曼光谱表征二硫化物是否存在。由图 5 可知，Fe_3O_4-OA 在 300~800 cm^{-1} 范围内没有出现明显的特征峰，而 Fe_3O_4-DMSA 在 508 cm^{-1} 处出现了二硫化物的强吸收特征峰，表明 DMSA 成功取代了 Fe_3O_4-OA 表面上的 OA。此外，DMSA 分子间二硫键相互交联，可引入更多 DMSA 到 Fe_3O_4 纳米颗粒表面，有助于提高 Fe_3O_4-DMSA 和 Fe_3O_4-DMSA-PEI 的亲水性和稳定性。

图 6 为样品的 XRD 分析结果，从图中可以看出，本研究制备的 PEI 修饰的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒出现了多个晶体结构峰，对应的衍射角(2θ)与国际粉末联合会提供的 Fe_3O_4 标准 PDF 卡片对应。这表明表面修饰的 PEI 分子没有改变 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的晶体结构，Fe_3O_4-DMSA-PEI 较好地保持了 Fe_3O_4 纳米颗粒的晶型。

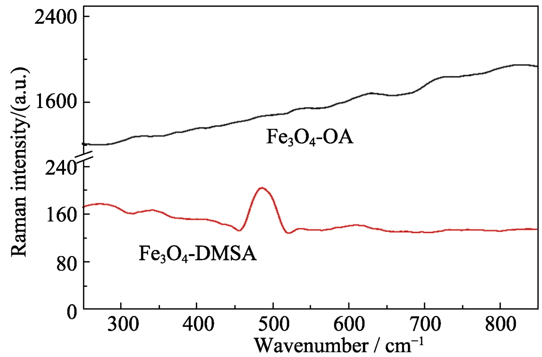

图 5　Fe_3O_4-OA 和 Fe_3O_4-DMSA 的拉曼图谱

Fig. 5　Raman spectra of Fe_3O_4-OA and Fe_3O_4-DMSA

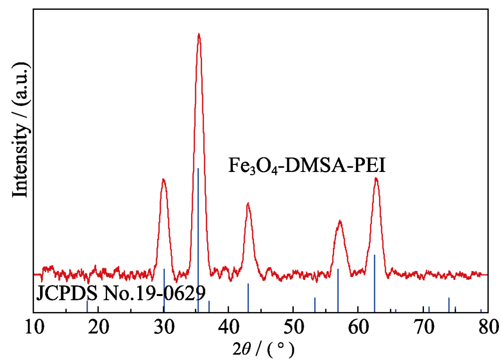

图 6　Fe_3O_4-DMSA-PEI 的 XRD 图谱

Fig. 6　XRD pattern of Fe_3O_4-DMSA-PEI

2.2 Fe_3O_4-DMSA-PEI 磁性纳米颗粒的性能研究

Zeta 电位是表征材料在分散相中界面电性能的重要参数[30]。图 7 结果显示, Fe_3O_4-OA 的 Zeta 电位呈负值, 这是由于纳米颗粒表面的 OA 在正己烷中解离出酸性基团(COOH→COO^- + H^+), 但其电负性较低, 表明其稳定性较差; Fe_3O_4-DMSA 在水相介质中呈现出更高的负电位, 这是由于其表面 DMSA 引入了更多的羧基; Fe_3O_4-DMSA-PEI 的 Zeta 电位呈正电性, 这是由于其表面 PEI 分子带有大量的氨基(–NH_2), 进一步证明 PEI 成功接枝到水相 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒表面。此外, 从图 7 中可看出, Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)的电位明显高于+40 mV, 而 Fe_3O_4-DMSA-PEI(10000)的电位在+30 ~ +40 mV 之间, 这是由于 Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)表面接枝了更多的 PEI 分子, 从而具有更高的电位和更优异的基因负载能力。这是因为基因与载体之间的静电相互作用强度与其表面电荷密度成正比, 更高的电位使其能够在同等条件下更多、更紧密地负载基因[31]。此外, 基因载体/基因复合物表面的净正电荷也能促进与带负电荷的生物细胞磷脂膜的相互作用和巨噬细胞的吞噬作用, 从而增加基因载体/基因复合物的吸收, 提高递送效率[32]。

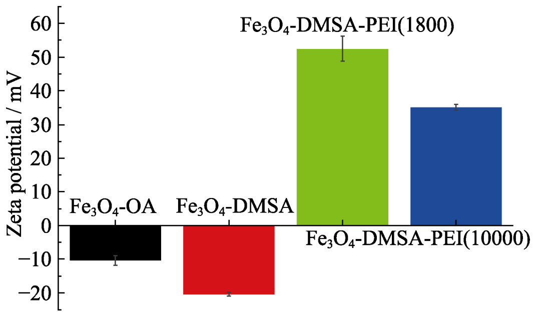

图 7 Fe_3O_4-OA, Fe_3O_4-DMSA 和 Fe_3O_4-DMSA-PEI 的 Zeta 电位图

Fig. 7 Zeta potential histogram of Fe_3O_4-OA, Fe_3O_4-DMSA and Fe_3O_4-DMSA-PEI

变温磁感应曲线是 ZFC-FC 磁化强度随温度的变化曲线。其中 FC 曲线是温度远高于居里温度时, 在恒定外磁场下, 逐渐降温至最低温度(10 K)时的直流磁化强度变化曲线; 而 ZFC 曲线是在零磁场下, 降至最低温后再施加恒定磁场, 随后升温测得的磁化强度变化曲线。此外, ZFC 曲线的拐点代表样品的超顺磁性和铁磁性相互转变温度, 即超顺磁阻截温度, 记为 T_B(Blocking Temperature)。高于 T_B, 样品表现为超顺磁性, 低于 T_B 则表现为铁磁性[33]。由图 8 可以看出, Fe_3O_4-OA、Fe_3O_4-DMSA 和 Fe_3O_4-DMSA-PEI 的 FC 和 ZFC 曲线呈现相同的变化趋势: FC 曲线均随温度升高而逐渐下降, ZFC 曲线则随温度升高而先升后降, 在 T_B 处出现了拐点。温度高于 T_B, ZFC 和 FC 曲线重合, 这是由于此时系统处于热力学平衡状态, 磁化强度变化可逆; 温度

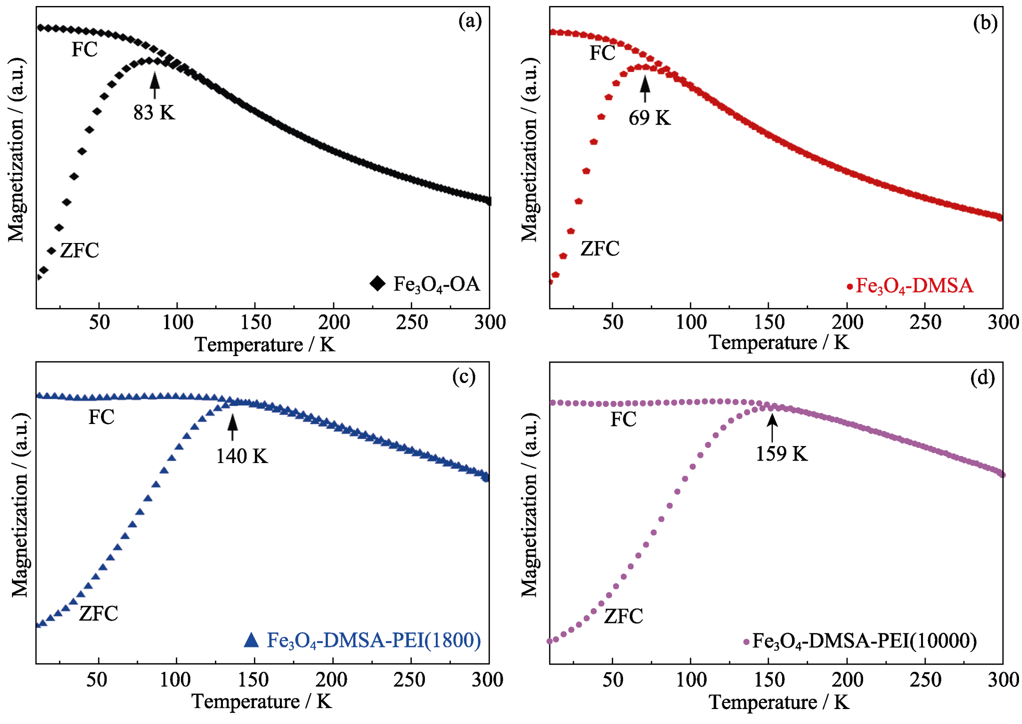

图 8 (a)Fe_3O_4-OA, (b)Fe_3O_4-DMSA 和(c, d)Fe_3O_4-DMSA-PEI 的变温磁感应曲线

Fig. 8 Variable temperature magnetic induction curves of (a) Fe_3O_4-OA, (b) Fe_3O_4-DMSA and (c, d) Fe_3O_4-DMSA-PEI

低于 T_B, ZFC 和 FC 曲线相错，则是由于测量时间小于磁性纳米颗粒磁矩的弛豫时间，致使磁化强度不可逆。由图 8 还可以看出，Fe_3O_4-OA、Fe_3O_4-DMSA、Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)和 Fe_3O_4-DMSA-PEI(10000)的 T_B 各不相同，分别为 83、69、140 和 159 K，呈现出先减小后增大的趋势，这是由于 T_B 高低与材料粒径有关[34]，二者呈正相关。考虑到 Fe_3O_4-DMSA-PEI 可作为药物载体实现靶向性给药，本研究测试了 Fe_3O_4-OA、Fe_3O_4-DMSA 和 Fe_3O_4-DMSA-PEI 在体温(310 K)下的宏观磁性。磁滞回线是由两条不同的磁化曲线构成的一个闭合回路。如图 9 所示，Fe_3O_4-OA、Fe_3O_4-DMSA 和 Fe_3O_4-DMSA-PEI 的两条磁化曲线完全重合，表明该纳米材料具有超顺磁性，即磁性原子或粒子之间没有相互作用，不出现磁滞现象[35]。此外，图 9 中 Fe_3O_4-OA、Fe_3O_4-DMSA、Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)和 Fe_3O_4-DMSA-PEI(10000)的饱和磁化强度不同，分别为 27.27、35.67、14.48 和 11.77 emu/g(1 emu/g= 1 $A{\cdot}m^2/kg$)，呈现出先增大后减小的趋势，这是由于 Fe_3O_4 纳米颗粒表面修饰的不同分子作为磁死层降低了其饱和磁化强度，磁死层越厚，饱和磁化强度也越低[36]，粒径与饱和磁化强度显示出负相关。

为验证制备的 Fe_3O_4-DMSA-PEI 是否可负载基因 DNA，实现基因递送，本研究选取 PEI 接枝效率高且稳定性好、磁性强的 Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)进行凝胶阻滞实验。从图 10 结果看出，当

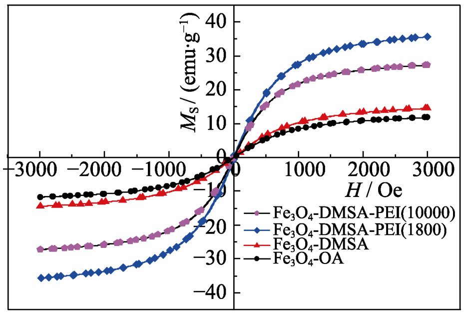

图9　Fe_3O_4-OA, Fe_3O_4-DMSA 和 Fe_3O_4-DMSA-PEI 的磁滞回线
Fig. 9　Hysteresis loops of Fe_3O_4-OA, Fe_3O_4-DMSA and Fe_3O_4-DMSA-PEI
1 emu/g=1 $A{\cdot}m^2/kg$; 1 Oe=79.6 A/m

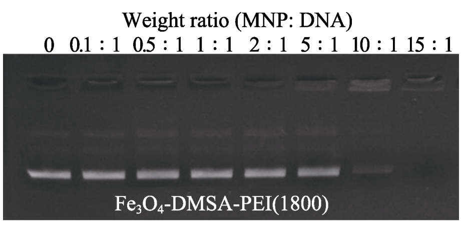

图 10　Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)阻滞质粒 DNA 的凝胶电泳照片
Fig. 10　Gel electrophoresis image of Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800) blocking plasmid DNA

Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)与质粒 DNA 的质量比为 5 : 1 时，在紫外灯照射下能观察到凝胶上清晰的 DNA 条带，表明凝胶未能有效地包裹质粒 DNA；当 Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)与质粒 DNA 的质量比增加至 15 : 1 时，未见明显的条带，呈现出 100%阻滞效应，说明质粒 DNA 被完全包裹，其装载量为 6.67%，显示出良好的基因负载能力。

3　结论

本研究采用溶剂热法制备了超小粒径的油相 Fe_3O_4 纳米颗粒，通过改变纳米颗粒的生长堆积时间，实现了 Fe_3O_4-OA 的粒径在 4~9 nm 范围内可控；使用 DMSA 交换 Fe_3O_4-OA 表面的 OA 分子，获得了良好的水相分散性；通过酰胺化反应，将不同分子量的 PEI 接枝到 Fe_3O_4-DMSA 表面，最终制得具有基因递送能力的磁响应性基因载体 Fe_3O_4-DMSA-PEI。研究结果显示，接枝小分子量 PEI 的 Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)具有更好的亲水性，其表面 Zeta 电位高达(52.50±1.94) mV，且具有一定的超顺磁性(14.48 emu/g)。凝胶阻滞实验结果显示 Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)能够有效负载质粒 DNA，当 Fe_3O_4-DMSA-PEI(1800)与质粒 DNA 的质量比为 15 : 1 时可完全阻滞 DNA 在凝胶上的电泳，装载量高达 6.67%，表明本研究制备的 Fe_3O_4-DMSA-PEI 磁性纳米颗粒具有一定的基因负载能力，有望作为基因载体应用于基因转染领域。

参考文献:

[1] HAMIMED S, JABBERI M, CHATTI A. Nanotechnology in drug and gene delivery. *Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2022, **395(7):** 769.

[2] ZU H, GAO D. Non-viral vectors in gene therapy: recent development, challenges, and prospects. *The AAPS Journal*, 2021, **23(4):** 78.

[3] SINGH P, MIJAKOVIC I. Advances in gold nanoparticle technology as a tool for diagnostics and treatment of cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2021, **21(7):** 627.

[4] LI H, WU X, YANG B, *et al*. Evaluation of biomimetically synthesized mesoporous silica nanoparticles as drug carriers: structure, wettability, degradation, biocompatibility and brain distribution. *Materials Science and Engineering: C*, 2019, **94:** 453.

[5] LEVINGSTONE T J, HERBAJ S, REDMOND J, *et al*. Calcium phosphate nanoparticles-based systems for RNAi delivery: applications in bone tissue regeneration. *Nanomaterials*, 2020, **10(1):** 146.

[6] THOMAS T J, TAJMIR-RIAHI H A, PILLAI C K S. Biodegradable polymers for gene delivery. *Molecules*, 2019, **24(20):** 3744.

[7] REN S, WANG M, WANG C, *et al*. Application of non-viral vectors in drug delivery and gene therapy. *Polymers*, 2021, **13(19):** 3307.

[8] ALI A, SHAH T, ULLAH R, *et al*. Review on recent progress in magnetic nanoparticles: synthesis, characterization, and diverse

applications. *Frontiers in Chemistry*, 2021, **9:** 629054.

[9] ANDERSON S D, GWENIN V V, GWENIN C. Magnetic functionalized nanoparticles for biomedical, drug delivery and imaging applications. *Nanoscale Research Letters*, 2019, **14:** 188.

[10] BI Q, SONG X, HU A, *et al.* Magnetofection: magic magnetic nanoparticles for efficient gene delivery. *Chinese Chemical Letters*, 2020, **31(12):** 3041.

[11] MAI B T, CONTEH J S, GAVILÁN H, *et al.* Clickable polymer ligand-functionalized iron oxide nanocubes: a promising nanoplatform for 'Local Hot Spots' magnetically triggered drug release. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, **14(43):** 48476.

[12] SENTURK F, CAKMAK S, KOCUM I C, *et al.* Effects of radiofrequency exposure on *in vitro* blood-brain barrier permeability in the presence of magnetic nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, **597:** 91.

[13] SHEN B, MA Y, YU S, *et al.* Smart multifunctional magnetic nanoparticle-based drug delivery system for cancer thermo-chemotherapy and intracellular imaging. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, **8(37):** 24502.

[14] RADOŃ A, ŁUKOWIEC D, KREMZER M, *et al*. Electrical conduction mechanism and dielectric properties of spherical shaped Fe_3O_4 nanoparticles synthesized by co-precipitation method. *Materials*, 2018, **11(5):** 735.

[15] ASAB G, ZEREFFA E A, SEGHNE T A. Synthesis of silica-coated Fe_3O_4 nanoparticles by microemulsion method: characterization and evaluation of antimicrobial activity. *International Journal of Biomaterials*, 2020, **2020:** 4783612.

[16] LEMINE O M, OMRI K, ZHANG B, *et al.* Sol-gel synthesis of 8 nm magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles and their magnetic properties. *Superlattices and Microstructures*, 2012, **52(4):** 793.

[17] PATSULA V, KOSINOVÁ L, LOVRIĆ M, *et al*. Superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles: synthesis by thermal decomposition of iron (III) glucuronate and application in magnetic resonance imaging. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, **8(11):** 7238.

[18] ELMAHAISHI M F, AZIS R S, ISMAIL I, *et al*. Structural, electromagnetic and microwave properties of magnetite extracted from mill scale waste *via* conventional ball milling and mechanical alloying techniques. *Materials*, 2021, **14(22):** 7075.

[19] RAFIENIA M, BIGHAM A, HASSANZADEH-TABRIZI S A. Solvothermal synthesis of magnetic spinel ferrites. *Journal of Medical Signals and Sensors*, 2018, **8(2):** 108.

[20] CHOULY C, POULIQUEN D, LUCET I, *et al.* Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *Journal of Microencapsulation*, 1996, **13(3):** 245.

[21] QIU X, WANG Y, XUE Y, *et al*. Laccase immobilized on magnetic nanoparticles modified by amino-functionalized ionic liquid *via* dialdehyde starch for phenolic compounds biodegradation. *Chemical Engineering Journal*, 2020, **391:** 123564.

[22] WULANDARI I O, SULISTYARTI H, SAFITRI A, *et al*. Development of synthesis method of magnetic nanoparticles modified by oleic acid and chitosan as a candidate for drug delivery agent. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2019, **9(7):** 1.

[23] VASIĆ K, KNEZ Ž, KONSTANTINOVA E A, *et al*. Structural and magnetic characteristics of carboxymethyl dextran coated magnetic nanoparticles: from characterization to immobilization application. *Reactive and Functional Polymers*, 2020, **148:** 104481.

[24] KOO C, HONG H, IM P W, *et al*. Magnetic and near-infrared derived heating characteristics of dimercaptosuccinic acid coated uniform Fe@Fe_3O_4 core-shell nanoparticles. *Nano Convergence*, 2020, **7(1):** 1.

[25] PENG S, WANG Q Y, XIAO X, *et al.* Redox-responsive polyethyleneimine-coated magnetic iron oxide nanoparticles for controllable gene delivery and magnetic resonance imaging. *Polymer International*, 2020, **69(2):** 206.

[26] REKER D, RYBAKOVA Y, KIRTANE A R, *et al.* Computationally guided high-throughput design of self-assembling drug nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 2021, **16(6):** 725.

[27] ÇITOĞLU S, COSKUN Ö D, TUNG L D, *et al*. DMSA-coated cubic iron oxide nanoparticles as potential therapeutic agents. *Nanomedicine*, 2021, **16(11):** 925.

[28] FENG X, XUE Y, GONCA S, *et al*. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles for enhanced tumor penetration. *Journal of Materials Chemistry B*, 2023, **11(15):** 3422.

[29] NI X, ZHANG J, ZHAO L, *et al*. Study of the solvothermal method time variation effects on magnetic iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4) features. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 2022, **169:** 110855.

[30] DEMBEK M, BOCIAN S, BUSZEWSKI B. Solvent influence on zeta potential of stationary phase—mobile phase interface. *Molecules*, 2022, **27(3):** 968.

[31] REN Y, JIANG X, PAN D, *et al.* Charge density and molecular weight of polyphosphoramidate gene carrier are key parameters influencing its DNA compaction ability and transfection efficiency. *Biomacromolecules*, 2010, **11(12):** 3432.

[32] KIM D Y, KWON J S, LEE J H, *et al.* Effects of the surface charge of stem cell membranes and DNA/polyethyleneimine nanocomplexes on gene transfection efficiency. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2015, **11(3):** 522.

[33] ALMESSIERE M A, SLIMANI Y, GÜNGÜNES H, *et al*. Magnetic attributes of $NiFe_2O_4$ nanoparticles: influence of dysprosium ions (Dy^{3+}) substitution. *Nanomaterials*, 2019, **9(6):** 820.

[34] ARSALANI S, GUIDELLI E J, SILVEIRA M A, *et al*. Magnetic Fe_3O_4 nanoparticles coated by natural rubber latex as MRI contrast agent. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2019, **475:** 458.

[35] DEVI E C, SINGH S D. Tracing the magnetization curves: a review on their importance, strategy, and outcomes. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, 2021, **34:** 15.

[36] PIMPHA N, CHALEAWLERT-UMPON S, SUNINTABOON P. Core/shell polymethyl methacrylate/polyethyleneimine particles incorporating large amounts of iron oxide nanoparticles prepared by emulsifier-free emulsion polymerization. *Polymer*, 2012, **53(10):** 2015.