

四氧化三铁纳米粒子表面改性及生物相容性评价

孙文聪¹, 郝港桐¹, 陈俊英^{1*}, 翁亚军¹, 武迪蒙²

¹西南交通大学材料先进技术教育部重点实验室, 四川 成都

²成都德信安创新医疗技术有限公司, 四川 成都

Email: *chenjy@263.net

收稿日期: 2021年4月24日; 录用日期: 2021年5月17日; 发布日期: 2021年5月24日

摘要

Fe₃O₄纳米粒子(Fe₃O₄-NP)在生物医学领域发挥着越来越重要的作用。由于纳米粒子的独特性质, 基于生物功能化的Fe₃O₄-NP表面改性是研究热点之一。因此, 本文提出了一种新型的Fe₃O₄-NP表面改性的方法, 将DGEA多肽与Fe₃O₄-NP结合, 得到了具有良好生物相容性的改性Fe₃O₄-NP。傅里叶变换红外光谱、水合粒径等检测结果共同证明了DGEA多肽表面改性Fe₃O₄-NP的成功制备。体外血小板粘附实验与细胞学实验证实了其良好的生物相容性。该改性Fe₃O₄纳米粒子为Fe₃O₄纳米粒子的生物应用提供了一个良好的平台。

关键词

Fe₃O₄纳米粒子, 表面改性, DGEA多肽, 生物相容性

Surface Modification and Biocompatibility Evaluation of Fe₃O₄ Nanoparticles

Wencong Sun¹, Gangtong Hao¹, Junying Chen^{1*}, Yajun Wen¹, Dimeng Wu²

¹Key Laboratory of Advanced Materials Technology, Southwest Jiaotong University, Chengdu Sichuan

²Chengdu Daxan Innovative Medical Tech. Co. Ltd., Chengdu Sichuan

Email: *chenjy@263.net

*通讯作者。

文章引用: 孙文聪, 郝港桐, 陈俊英, 翁亚军, 武迪蒙. 四氧化三铁纳米粒子表面改性及生物相容性评价[J]. 材料科学, 2021, 11(5): 601-610. DOI: 10.12677/ms.2021.115070

Abstract

Fe₃O₄ nanoparticles (Fe₃O₄-NP) are playing an increasingly important role in biomedical field. Because of the unique properties of nanoparticles, the surface modification of Fe₃O₄-NP based on biological functionalization is one of the research hotspots. Therefore, a new surface modification method of Fe₃O₄-NP was proposed in this paper. The modified Fe₃O₄-NP with good biocompatibility was obtained by combining DGEA polypeptide. FTIR, and hydrated particle size results proved the successful preparation of Fe₃O₄-NP modified by DGEA polypeptide. *In vitro* platelet adhesion activation test and cytological test confirmed its good biocompatibility. It provides a good platform for the biological application of Fe₃O₄ nanoparticles.

Keywords

Fe₃O₄ Nanoparticles, Surface Modification, DGEA Polypeptide, Biocompatibility

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

Fe₃O₄ 纳米粒子可应用于生物医学和治疗, 例如成像[1]、细胞特异性靶向[2]和药物递送[3]等, 这是由于 Fe₃O₄ 纳米粒子具有的磁性[4]。更重要的是, Fe₃O₄ 纳米粒子的表面可以用具有良好生物相容性的分子进行修饰[5] [6], 为后续 Fe₃O₄ 纳米粒子在药物输送系统、医疗诊断等生物医学应用提供了一个良好的平台。因此, Fe₃O₄-NP 的表面改性是至关重要的。

为了改善 Fe₃O₄-NP 的性能, 一些化合物被用于修饰 Fe₃O₄-NP, 比如硅烷偶联剂。硅烷偶联剂是一种有机化合物, 化学结构通式可以表示为 RSiX₃ [7]。Fe₃O₄-NP 与不同的硅烷偶联剂反应可使 Fe₃O₄-NP 表面带不同的活性基团[8], 如羰基、羧基和环氧基等。这些基团的存在, 使其既能够通过化学键进行表面改性, 又可以用 π - π 堆积、离子键和氢键等非共价键作用进行表面改性。Fe₃O₄-NP 表面带有-OH [9], 因此, 利用 γ -缩水甘油醚丙基三甲氧基硅烷(KH560)对 Fe₃O₄-NP 进行表面修饰, 使得 Fe₃O₄-NP 表面带有环氧基。环氧基是一种化学性质相对活泼的基团, 其可与氨基、羧基等基团发生反应。

目前, 抗体[10]、蛋白质[11]、DNA [12]、酶[13]等都被用来作为 Fe₃O₄-NP 表面改性的材料, 以改善其生物相容性。但研究表明, 纳米颗粒与大分子结合时, 不可避免地会影响其空间结构[14]。肽作为生物小分子, 具有更加简单的结构。DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala)来源于 I 型胶原, 其可以作为胶原受体的拮抗剂。胶原蛋白是细胞外基质中最具血栓形成性的成分, 它与血小板表面膜受体之间直接相互作用, 在这个过程中, 两种糖蛋白是至关重要的: 粘附受体整合素 $\alpha_2\beta_1$ 和 GPVI, 它们负责这一过程的信号转导。研究表明, DGEA 肽对整合素 $\alpha_2\beta_1$ 具有特异性, 可以拮抗胶原蛋白介导血小板粘附并诱导血小板活化和聚集的过程[15]。

因此, 本文将生物小分子多肽 DGEA 用于 Fe₃O₄-NP 的表面改性, 通过各种材料学对其进行了表征, 并研究了 DGEA 多肽改性 Fe₃O₄-NP 的生物相容性。

2. 实验部分

2.1. 实验材料及设备

Fe₃O₄ 纳米颗粒, AR, Aladdin; KH560, AR, Aladdin; DGEA 多肽, 1 g, 吉尔生化(上海)有限公司; 甲苯胺蓝(TBO), 纯度 99%, 成都市科隆化学品有限公司; 无水乙醇, AR, 成都市科伦化工试剂厂。

恒温水浴锅(S212, 郑州长城科工贸有限公司); 恒速搅拌机(W-0 不升降, 上海申顺生物科技有限公司); 傅立叶反射红外光谱仪(NICOLET 5700, 美国 Thermo 公司); 激光粒度仪(ZetasizerZS90, Malvern), 酶标仪(Epoch12, biotech USA)。

2.2. DGEA 多肽改性 Fe₃O₄ 纳米颗粒的制备

(1) KH560 修饰 Fe₃O₄-NP 的制备(Fe₃O₄-EG): 将 2 g Fe₃O₄ 纳米颗粒置于 50 ml 两口烧瓶内, 加入 30 ml 无水乙醇和 5 ml KH560, 在机械搅拌下, 水浴 60℃ 反应 5 h, 将产物磁性吸附, 分别用无水乙醇洗涤产物数次, 真空干燥得产品 Fe₃O₄-EG。

(2) DGEA 多肽改性 Fe₃O₄-NP 的制备(Fe₃O₄-DGEA): 称取 Fe₃O₄-EG 纳米颗粒 20 mg 和 18.8 mg DGEA 多肽于 50 ml 两口烧瓶内, 超声分散于 30 ml 无水乙醇, 加入 NaOH 调节体系的 pH 为碱性, 在机械搅拌下, 水浴 80℃ 反应 5 h, 将产物磁性吸附, 分别用无水乙醇洗涤产物数次, 真空干燥得产品 Fe₃O₄-DGEA。

2.3. 改性 Fe₃O₄-NP 材料学表征

(1) Fe₃O₄-DGEA 的水合粒径测定。任何悬浮于液体的颗粒都会不停的做布朗运动, 其运动强度与颗粒本身的大小, 性质有关。本文采用 ZetasizerZS90 激光粒度仪表征 Fe₃O₄-DGEA 的水合粒径。

(2) Fe₃O₄-DGEA 结构表征。通过红外光谱分析(FTIR)可以表征材料的结构。本文采用 NICOLET5700 FTIR 表征 DGEA 多肽改性 Fe₃O₄-NP 前后的结构变化。

(3) Fe₃O₄-DGEA 表面官能团-COOH 定量表征。甲苯胺蓝(TBO)是常用的碱性染料之一[16]。在碱性溶液中, 其阳离子可与带负电荷的基团或阴离子结合, 在酸性溶液中解脱, 发挥染色作用, 使得水溶液呈现蓝色, 在 530 nm 处有明显吸光度变化。这一反应迅速且准确, 因此, 该方法可定量检测 Fe₃O₄-DGEA 表面-COOH 的含量。标准曲线制作: 配制 pH = 11 浓度为 2.12 mmol/L 的 TBO 溶液, 使用移液枪吸取 20 μL、30 μL、40 μL、50 μL、60 μL, 加入 pH = 11 NaOH 溶液使其总体积为 2000 μL, 在 530 nm 处测量吸光度值。Fe₃O₄-DGEA 表面-COOH 测定: 称量一定质量的 Fe₃O₄-DGEA, 加入 1000 μL 2.12 mmol/L 的 TBO 溶液, 室温下静置 6 h, 使 Fe₃O₄-DGEA 表面充分吸附 TBO, 待反应结束后, 使用 pH = 11 NaOH 溶液漂洗 6 次, 最后加入 pH = 3 的 HCl 溶液, 在 530 nm 处测量吸光度值。

2.4. 改性 Fe₃O₄-NP 生物相容性评价

(1) 血小板的粘附与激活实验。取新鲜的抗凝人血, 在离心机中以 1500 r/min 的速度离心 15 min, 离心结束后, 取上层富板浆(platelet rich plasma, PRP)备用; 将 200 μg Fe₃O₄-DGEA 放入 24 孔板中, 通过磁性分离的方式除去液体; 在孔板中加入 300 μL PRP, 使 Fe₃O₄-DGEA 浸没, 所有样品在 37℃ 孵箱中孵育 30 min; 计时完毕后, 使用 NaCl 清洗三次, 用浓度为 2.5% 的戊二醛固定 24 小时; 将固定好的样品再次使用 NaCl 清洗三次, 在避光条件下使用罗丹明对其进行染色 15 min。再次用 NaCl 清洗三次, 使用荧光显微镜对其进行观察。

(2) 平滑肌细胞静态培养。从新生儿脐带中分离平滑肌细胞(Smooth muscle cell, SMCs), 5% CO₂ 和 37℃ 条件下传代培养。在 24 孔板中分别加入细胞悬液和 Fe₃O₄-DGEA, 使得 SMCs 接种浓度为 2 × 10⁴ cells/cm², Fe₃O₄-DGEA 的浓度为 50 μg/mL, 培养 1 天和 3 天后用 CCK-8 检测细胞活性, 使用戊二醛将

样品固定，罗丹明染色，每个样品设 3 个平行样。

(3) 内皮细胞静态培养。从新生儿脐带中分离内皮细胞(Endothelial cells, ECs)，5% CO₂ 和 37℃条件下传代培养。在 24 孔板中分别加入细胞悬液和 Fe₃O₄-DGEA，使得 ECs 接种浓度为 1 × 10⁴ cells/cm²，Fe₃O₄-DGEA 的浓度为 50 μg/mL，培养 1 天和 3 天后用 CCK-8 检测细胞活性，使用戊二醛将样品固定，罗丹明染色，每个样品设 3 个平行样。

(4) 内皮细胞迁移实验。细胞划痕实验常常用来分析细胞迁移能力和损伤组织的修复能力，当细胞长到融合的单层细胞状态时，在融合的单层细胞上人为制造一个空白区域，称为“划痕”，划痕边缘的细胞会逐渐进入空白区域使“划痕”愈合[17]。将 ECs 接种于 24 孔板中，使其接种密度为 5 × 10⁴ cells/cm²，培养，待细胞长满后，使用 200 μL 枪头在样品上垂直轻轻划过，使得划过的地方细胞被擦掉，在光镜下拍照取值；将制备好的 Fe₃O₄-DGEA 在紫外的条件下，灭菌 30 min，计时结束后，用培养基对 Fe₃O₄-DGEA 溶解，使其溶度为 50 μg/mL；向 24 孔板中加入 1 mL 样品溶液，将样品放回细胞培养箱培养 24 h，计时结束后，在光镜下拍照取值。

2.5. 统计学分析

本文中，使用单因素方差分析方法(ANOVA)进行统计，样品设置 3 个平行样，结果均以平均值±标准差的方式展示。*P < 0.05 被认为是统计学上的显著差异。

3. 结果与讨论

3.1. 改性 Fe₃O₄-NP 水合粒径表征结果

由图 1 可得，Fe₃O₄-NP、Fe₃O₄-EG 和 Fe₃O₄-DGEA 样品的水合粒径分别为 683.8, 592.4 和 517.2 nm。Fe₃O₄-NP 样品水合粒径较大，这是由于 Fe₃O₄-NP 颗粒直径存在磁性，在水中容易聚集。Fe₃O₄-NP 表面引入 KH560 后，Fe₃O₄-NP 在水中的分散性有所提高，因此水合粒径下降。Fe₃O₄-EG 样品引入 DGEA 肽后，使得 Fe₃O₄-NP 的水合粒径大幅度下降，说明接枝了 DGEA 肽的 Fe₃O₄-NP 的分散性有所提高。

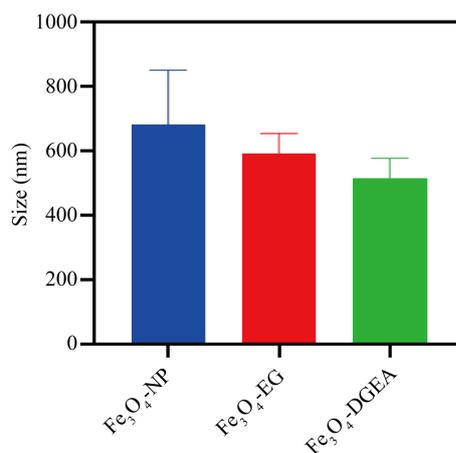


Figure 1. Results of hydration particle size of different samples (mean ± SD, N = 3)

图 1. 不同样品水合粒径检测结果(mean ± SD, N = 3)

3.2. 改性 Fe₃O₄-NP 的 FTIR 结果

图 2 为样品表面结构变化的红外光谱。Fe₃O₄-NP 样品 588 cm⁻¹ 出现了 Fe-O 特征吸收峰，这是 Fe₃O₄-NP

的典型特征峰。1632 cm^{-1} 和 3432 cm^{-1} 处的分别出现了 C=O 和 -OH 伸缩振动峰, 这表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NP}$ 表面既存在 -OH, 又存在 C=O 结构, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NP}$ 表面存在 -OH, 表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NP}$ 与硅烷偶联剂 KH560 成功发生反应。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-EG}$ 样品在 1110 cm^{-1} 处出现的 Si-O 特征吸收峰, 说明此反应成功将 KH560 引入 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NP}$ 表面。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DGEA}$ 样品 1540 cm^{-1} 出现了 N-H 的弯曲振动峰, 1403 cm^{-1} 处出现了 C-N 伸缩振动峰, 这是环氧基开环生成 -OH 和与氨基结合之后生成的 C-N 键。以上结果表明在 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NP}$ 表面成功引入 DGEA 肽。

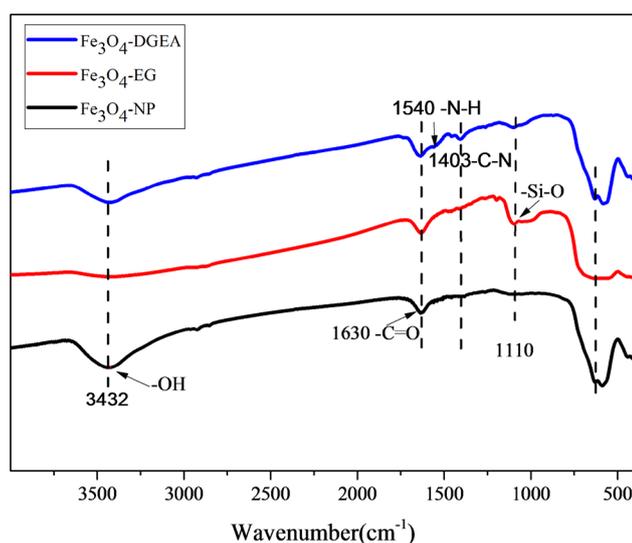


Figure 2. FTIR spectra of different samples
图 2. 不同样品的 FTIR 表征结果

3.3. 改性 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NP}$ 表面-COOH 定量表征结果

图 3(a)为不同浓度梯度下甲苯胺蓝的标准曲线。拟合方程为:

$$Y = 3.406 X + 0.013 \quad (1)$$

其中 Y 代表的是 530 nm 处吸光度值, X 代表的是 TBO 浓度, 拟合度 $R^2 = 0.936$ 。

通过测定 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DGEA}$ 样品的吸光度值, 代入公式(1)中, 得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DGEA}$ 表面-COOH 含量, 由公式(1)可得, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DGEA}$ 表面-COOH 含量为 $(4.50 \pm 0.65) \times 10^{-5}$ mol/L。从测定结果看, 进一步证明 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NP}$ 表面成功引入 DGEA。

3.4. 血小板粘附与激活实验

如果血管有任何损伤, 血小板会立刻响应, 血小板粘附、聚集是血小板活化的标记, 通过血小板的黏附实验从而对 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DGEA}$ 样品的血液相容性进行初步评估, 实验结果如图所示。从图 4 可知, 空白对照样及 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NP}$ 样品血小板数量明显多于 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DGEA}$ 样品, 并且出现了大量聚集, 聚集的血小板会释放出内部物质促进血小板激活, 血小板激活后, 会呈铺展形态。而 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DGEA}$ 样品中, 粘附的血小板数量与空白对照样相比显著下降, 基本无呈现铺展形态的血小板。

3.5. 平滑肌细胞培养实验结果

将 SMCs 与各样品共培养, 检测样品对 SMCs 的影响, 细胞培养 1 天和 3 天的荧光染色图如图 5(a)

所示。图 5(a)中,各样品与 SMCs 共培养后,SMCs 都出现了典型的长梭形,观察发现,各组样品中,SMCs 的细胞骨架都出现了一定程度破坏,其中,Fe₃O₄-NP 样品最为明显,但是,在 Fe₃O₄-NP 表面引入多肽以后,其细胞相容性大大增加,SMCs 细胞骨架的破坏程度下降。图 5(b)中,不同样品对 SMCs 活性产生了不同的影响,通过对比 Fe₃O₄-NP 样品与空白对照组,可以发现,培养 SMCs 1 天和 3 天后,Fe₃O₄-NP 样品 SMCs 的细胞活性比空白对照样下降,这是因为 Fe₃O₄-NP 本身具有一定的毒性。Fe₃O₄-DGEA 样品的细胞活性与 Fe₃O₄-NP 样品相比较小,说明 Fe₃O₄-DGEA 样品可以抑制 SMCs 的增殖。

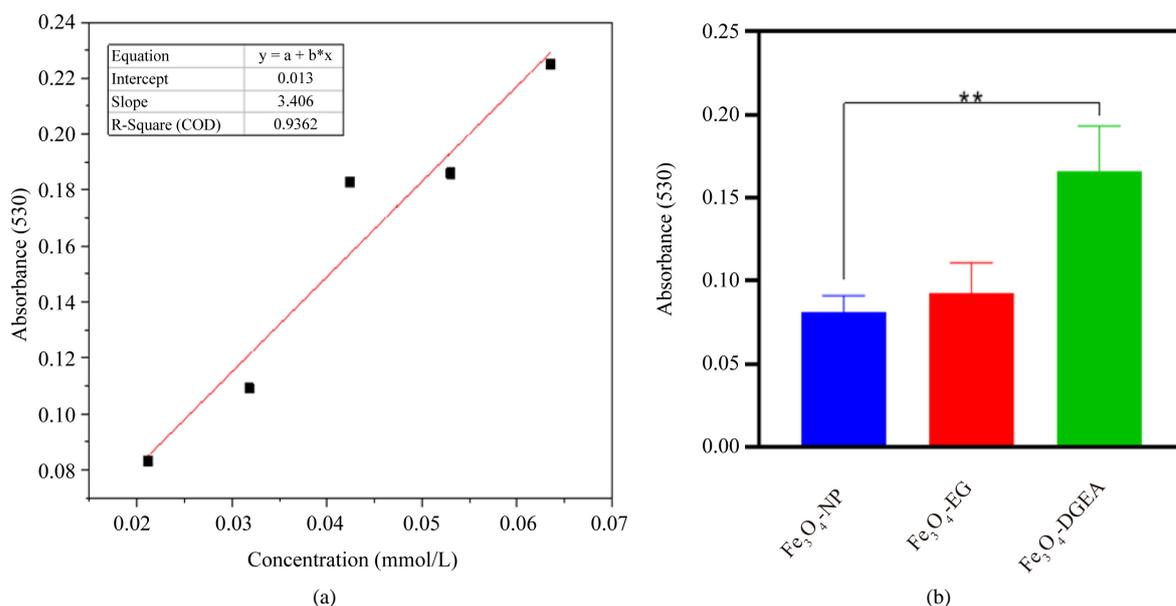


Figure 3. (a) Standard curve of TBO determination; (b) Determination of surface COOH of Fe₃O₄-DGEA sample (0.001 < *P < 0.01, mean ± SD, N = 3)

图 3. (a) TBO 测定的标准曲线; (b) Fe₃O₄-DGEA 样品表面-COOH 测定结果(0.001 < *P < 0.01, mean ± SD, N = 3)

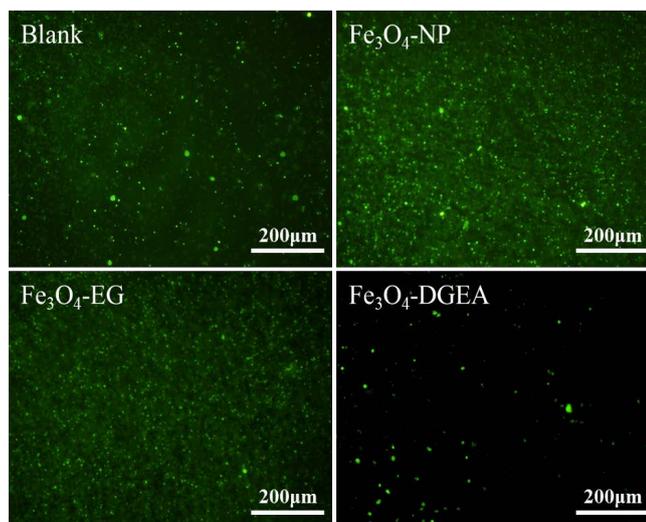


Figure 4. Fluorescence staining results of platelet adhesion on different samples Morphology platelet adhesion on different surfaces of samples

图 4. 不同样品表面血小板粘附的荧光染色结果

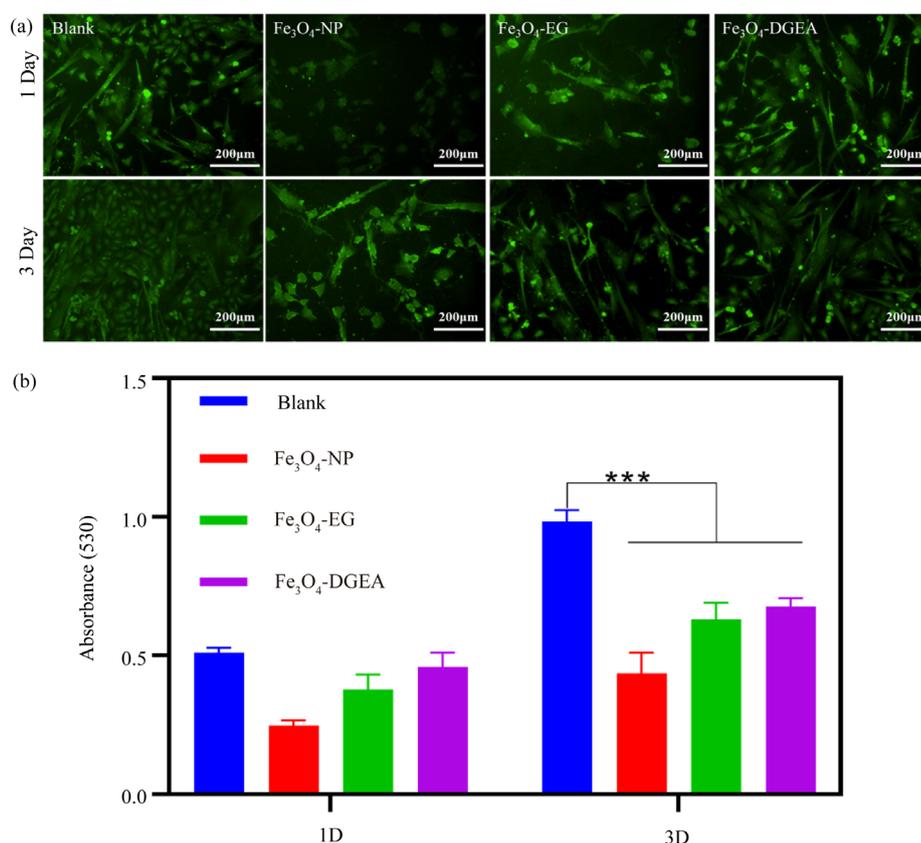


Figure 5. (a) Immunofluorescence staining of SMCs on different samples; (b) CCK-8 results of SMCs on different samples ($0.01 < *P < 0.05$, mean \pm SD, N = 3)

图 5. (a) 不同样品平滑肌细胞免疫荧光图片; (b) 不同样品平滑肌细胞 CCK-8 结果 (** $*P < 0.001$, mean \pm SD, N = 3)

3.6. 内皮细胞培养实验结果

图 6(a)中, 各样品与 ECs 共培养后, ECs 都出现了明显的铺路石状, 观察发现, 各组样品中, 内皮细胞的细胞骨架都出现了一定程度破坏, 其中, Fe₃O₄-NP 样品最为明显, 但是, 在 Fe₃O₄-NP 表面引入多肽以后, 其细胞相容性大大增加, ECs 细胞骨架的破坏程度下降。各组样品与 ECs 培养 1 天和 3 天后, ECs CCK-8 检测结果如图 6(b)所示。图 6(b)中, 不同样品对内皮细胞活性产生了不同的影响。通过对比 Fe₃O₄-NP 样与空白对照样, 可以发现, 培养 ECs 1 天和 3 天后, Fe₃O₄-NP 样品 ECs 的活性明显下降, 这是因为 Fe₃O₄-NP 本身具有一定的毒性。而 Fe₃O₄-DGEA 样品的细胞活性明显增加。

3.7. 内皮细胞迁移实验结果

内皮细胞在划痕模型下的迁移距离对于受损组织的修复起着至关重要的作用, 其结果是 ECs 的粘附、迁移以及增殖等细胞基本生理活动的综合表现。当划痕实验构建成功以后, 立刻在倒置相差显微镜下, 记录此时划痕的宽度, 记为 0 h, 继续培养 24 h 后, 再次记录划痕的宽度, 记为 24 h。各样品在划痕模型下培养 24 h 前后的划痕结果如图 7(a)所示。图 7(b)中, 经过 24 h 的培养, Fe₃O₄-NP 样品 ECs 迁移距离小于空白对照样, 这说明 Fe₃O₄-NP 本身具有一定的毒性, 不能为 ECs 的迁移提供较好的诱导环境, 细胞创伤愈合能力下降, 因此 ECs 迁移的距离下降。Fe₃O₄-DGEA 样品 ECs 迁移的距离远远大于空白对照样 ECs 迁移的距离, 产生此结果的可能原因是 DGEA 肽的引入, 使得 Fe₃O₄-NP 的毒性大大降低。

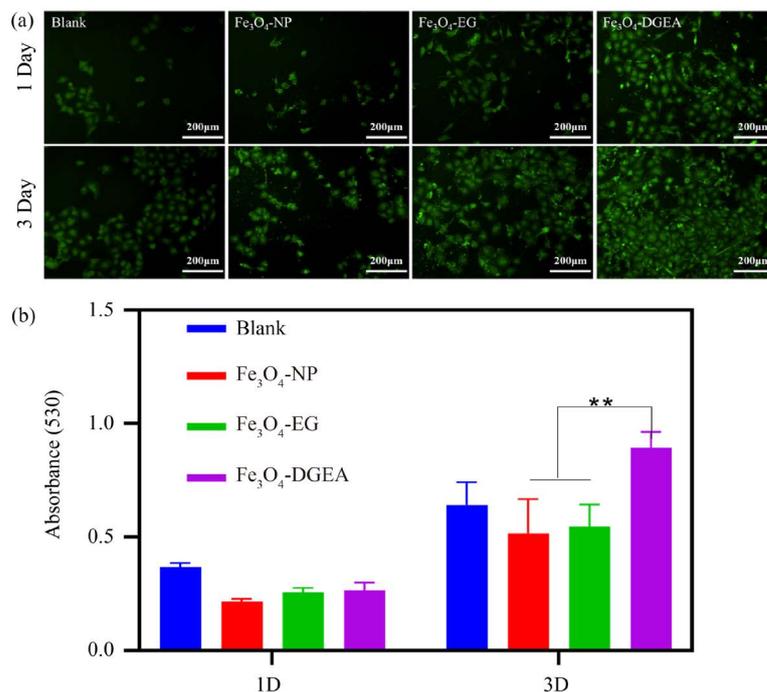


Figure 6. (a) Immunofluorescence staining of ECs on different samples; (b) CCK-8 results of ECs on different samples ($0.01 < *P < 0.05$, mean \pm SD, N = 3)

图 6. (a) 不同样品内皮细胞免疫荧光图片; (b) 不同样品内皮细胞 CCK-8 结果($0.01 < *P < 0.05$, mean \pm SD, N = 3)

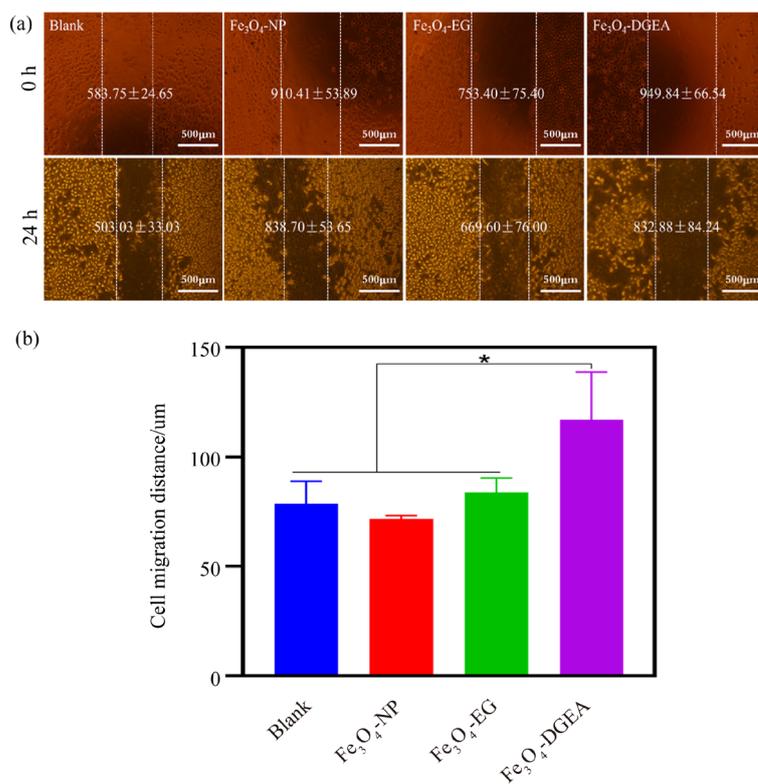


Figure 7. Each sample (a) migration diagram of ECs before and after 24 h scratch; (b) statistical diagram of migration results of ECs before and after 24 h scratch ($0.01 < *P < 0.05$, mean \pm SD, N = 3)

图 7. 各样品 ECs 划痕(a) 24 h 前后迁移图; (b) 24 h 前后 Es 迁移结果统计图($0.01 < *P < 0.05$, mean \pm SD, N = 3)

Fe_3O_4 -NP 具有广泛的应用, 研究也发现, Fe_3O_4 -NP 对生物具有毒性效应。作为介于氨基酸和蛋白质之间的一种中间产物, 多肽具有良好的生物相容性, 将多肽用于 Fe_3O_4 -NP 的表面改性, 可以提高其生物相容性。同时, 由于 DGEA 多肽的功能, DGEA 多肽改性 Fe_3O_4 -NP 具有抑制血小板粘附与激活的能力。

4. 结论

本文通过固-液反应, 将 DGEA 多肽与 KH560 修饰的 Fe_3O_4 -NP 共价结合, 对 Fe_3O_4 -NP 表面进行改性, 该结构为 Fe_3O_4 纳米粒子的生物应用提供了一个良好的平台。

1、水合粒径检测结果表明, 在 Fe_3O_4 -NP 表面固定 DGEA 多肽增加了 Fe_3O_4 -NP 在水中的分散性。

2、FTIR 结果表明, DGEA 多肽结构中的氨基与 KH560 结构中的环氧基在碱性条件下发生反应, 使得改性后的 Fe_3O_4 -NP 为羧基化的表面。

3、血小板黏附结果表明 Fe_3O_4 -DGEA 不会导致血小板激活程度增加, 细胞培养结果表明, Fe_3O_4 -DGEA 对内皮细胞和平滑肌细胞无明显的细胞毒性作用, 同时, 可以促进损伤内皮细胞的迁移, 具有一定的生物相容性。

综上所述, DGEA 多肽改性 Fe_3O_4 -NP 不仅提供了有效的表面改性方法, 同时也为 Fe_3O_4 -NP 表面生物修饰的进一步应用开辟了新的途径。

基金项目

国家自然科学基金(31870955), 国家重点研发计划(2020YFC11077303)。

参考文献

- [1] Zhang, L., Tong, S., Zhang, Q., *et al.* (2020) Lipid-Encapsulated Fe_3O_4 Nanoparticles for Multimodal Magnetic Resonance/Fluorescence Imaging. *ACS Applied Nano Materials*, **3**, 6785-6797. <https://doi.org/10.1021/acsnm.0c01193>
- [2] Wang, X., Xiong, T., Cui, M., *et al.* (2020) Targeted Self-Activating Au- Fe_3O_4 Composite Nanocatalyst for Enhanced Precise Hepatocellular Carcinoma Therapy via Dual Nanozyme-Catalyzed Cascade Reactions. *Applied Materials Today*, **21**, Article ID: 100827. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100827>
- [3] Tao, C., Chen, T., Liu, H., *et al.* (2020) Design of Biocompatible Fe_3O_4 @ MPDA Mesoporous Core-Shell Nanospheres for Drug Delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, **293**, Article ID: 109823. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2019.109823>
- [4] Wei, Y., Han, B., Hu, X., *et al.* (2012) Synthesis of Fe_3O_4 Nanoparticles and Their Magnetic Properties. *Procedia Engineering*, **27**, 632-637. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.12.498>
- [5] Silva, V.A.J., Andrade, P.L., Silva, M.P.C., *et al.* (2013) Synthesis and Characterization of Fe_3O_4 Nanoparticles Coated with Fucan Polysaccharides. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **343**, 138-143. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2013.04.062>
- [6] Xie, J., Xu, C., Kohler, N., *et al.* (2007) Controlled PEGylation of Monodisperse Fe_3O_4 Nanoparticles for Reduced Non-Specific Uptake by Macrophage Cells. *Advanced Materials*, **19**, 3163-3166. <https://doi.org/10.1002/adma.200701975>
- [7] Owen, M.J. and Williams, D.E. (1991) Surface Modification by Fluoroalkyl-Functional Silanes. *Journal of Adhesion Science and Technology*, **5**, 307-320. <https://doi.org/10.1163/156856191X00378>
- [8] Boustani, K., Shayesteh, S.F., Salouti, M., *et al.* (2017) Synthesis, Characterisation and Potential Biomedical Applications of Magnetic Core-Shell Structures: Carbon-, Dextran-, SiO_2 - and ZnO-Coated Fe_3O_4 Nanoparticles. *IET Nanobiotechnology*, **12**, 78-86. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2017.0044>
- [9] Li, Y., Zhu, H., Gu, H., *et al.* (2013) Strong Transparent Magnetic Nanopaper Prepared by Immobilization of Fe_3O_4 Nanoparticles in a Nanofibrillated Cellulose Network. *Journal of Materials Chemistry A*, **1**, 15278-15283. <https://doi.org/10.1039/c3ta12591b>
- [10] Srinivasan, S.Y., Gajbiye, V. and Bodas, D. (2020) Development of Nano-Immunesensor with Magnetic Separation and Electrical Detection of *Escherichia coli* Using Antibody Conjugated Fe_3O_4 @ Ppy. *Nanotechnology*, **32**, Article ID: 085603. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/abc8b1>

-
- [11] Santos, M.G., de Carvalho, D.T., Caminiti, L.B., *et al.* (2021) Use of Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles Coated with Bovine Serum Albumin for the Separation of Lysozyme from Chicken Egg White. *Food Chemistry*, **353**, Article ID: 129442. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129442>
- [12] Shen, F., Zhang, C., Cai, Z., *et al.* (2020) Carbon Nanocage/Fe₃O₄/DNA-Based Magnetically Targeted Intracellular Imaging of Telomerase via Catalyzed Hairpin Assembly and Photodynamic-Photothermal Combination Therapy of Tumor Cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **12**, 53624-53633. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c13925>
- [13] Abdulaal, W.H., Almulaiky, Y.Q. and El-Shishtawy, R.M. (2020) Encapsulation of HRP Enzyme onto a Magnetic Fe₃O₄ Np-PMMA Film via Casting with Sustainable Biocatalytic Activity. *Catalysts*, **10**, 181. <https://doi.org/10.3390/catal10020181>
- [14] 吴金梅. 疏水性连续变化金纳米系列的制备以及与蛋白质相互作用的初步研究[D]: [硕士学位论文]. 济南: 山东大学, 2013.
- [15] Rozalski, M., Bonclerand, M.A., Watala, C., *et al.* (2003) Inhibition of Collagen-Induced Platelet Reactivity by DGEA Peptide. *Acta Biochimica Polonica*, **50**, 1119-1128. https://doi.org/10.18388/abp.2003_3636
- [16] Volpi, N. and Maccari, F. (2002) Detection of Submicrogram Quantities of Glycosaminoglycans on Agarose Gels by Sequential Staining with Toluidine Blue and Stains-All. *Electrophoresis*, **23**, 4060-4066. <https://doi.org/10.1002/elps.200290021>
- [17] 马旭. 他克莫司与 PDGF-BB 抑制血管损伤后再狭窄研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海交通大学, 2017.