

# 四氧化三铁纳米粒子表面接枝聚 *L*-谷氨酸苄酯 多孔微载体的构建和性能

徐盛华, 夏鹏飞, 张坤奎, 高 龙, 尹静波  
(上海大学材料科学与工程学院高分子材料系, 上海 200444)

**摘要** 在氨基化改性的四氧化三铁( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )纳米粒子表面引发 *N*-羧酸酐 *L*-谷氨酸苄酯(BLG-NCA)开环聚合, 制得四氧化三铁/聚 *L*-谷氨酸苄酯(PBLG)复合材料( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG). 改变单体和引发剂比例可以调控  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 的接枝率, 采用热失重分析(TGA)测得实际接枝率分别为 66.36%, 79.66%和 89.52%. 通过双乳液挥发法制备磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体, 其中接枝率为 89.52%的微载体密度为 1.034 g/mL, 孔隙率为 92.57%, 粒径为 200~300  $\mu\text{m}$ , 孔径为 40~50  $\mu\text{m}$ , 保水率为 370%~400%. 同时  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 微载体具有超顺磁性, 在外加磁场作用下可排布成任意形状, 对治疗复杂结构的骨缺损具有显著优势. 因此  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体在骨组织工程领域具有潜在应用价值.

**关键词** 四氧化三铁; 聚 *L*-谷氨酸苄酯; 多孔微载体; 磁性能; 骨组织工程

**中图分类号** O636 **文献标志码** A

多孔微载体通常指尺度在 100~400  $\mu\text{m}$ , 孔径为 10~50  $\mu\text{m}$  的微小球形支架, 在组织工程领域具有为细胞生长提供更大比表面积, 获得足够数量的细胞, 维持细胞分化表型及便于调节、监控细胞培养环境等<sup>[1-4]</sup>优势. 同时, 微载体具有可注射性, 能通过微创手术到达缺损部位对骨缺损进行修复, 减小外科手术带来的创伤, 同时在修复小面积与不规则骨缺损方面也具有独特的优势<sup>[5]</sup>.

$\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子是生物医学领域常用的磁性纳米材料<sup>[6,7]</sup>, 不仅具有量子尺寸效应、表面效应、小尺寸效应及宏观量子隧道效应, 而且具有特殊的磁性能<sup>[8]</sup>, 在磁场的作用下,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  不仅具有促进成骨细胞增殖、抑制破骨细胞、增加骨密度、促进骨骼生长及改善骨微观结构<sup>[9]</sup>的能力, 而且具有促进有序骨组织生成的优势<sup>[10,11]</sup>, 是一种极具潜力的成骨诱导活性材料. 目前, 磁性纳米粒子与多孔微载体材料相结合用于骨修复鲜有报道. 聚 *L*-谷氨酸苄酯(PBLG)是一类人工合成的生物可降解聚多肽材料, 可在体内降解为 *L*-谷氨酸单体<sup>[12]</sup>, 能被人体吸收代谢, 具有良好生物相容性, 无免疫原性及无毒副作用等优势<sup>[13,14]</sup>. 我们课题组<sup>[15]</sup>构建的 PBLG 多孔微载体获得了良好的软骨再生效果. 为了构建具有良好生物相容性, 同时又具有成骨诱导活性的多孔微载体, 本文首先合成了  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子表面接枝 PBLG 复合材料, 并通过双乳液挥发法制备磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体, 并对多孔微载体的磁性能、微观形貌和生物学性能进行评价.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

参照文献<sup>[16]</sup>方法制备 *N*-羧酸酐 *L*-谷氨酸苄酯(BLG-NCA); 二氯甲烷、1,4-二氧六环、无水乙醇、聚乙烯醇(PVA)、七水合硫酸亚铁( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、硫酸铁 $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3]$ 和 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APS), 分析纯, 阿拉丁试剂有限公司.

Multimode 8 型原子力显微镜(AFM), 美国 Bruker 公司; Zetasizer Nano ZS90 型动态激光光散射

收稿日期: 2016-10-08. 网络出版日期: 2017-05-25.

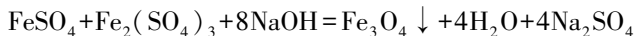
基金项目: 上海市科委基础研究重点项目(批准号: 15JC1490400)和国家自然科学基金(批准号: 51373094)资助.

联系人简介: 尹静波, 女, 博士, 教授, 主要从事生物医用和生态环境高分子材料研究. E-mail: jbyin@oa.shu.edu.cn

(DLS)仪,英国 Malvern 公司; 18 kW D/MAX2500V+/PC 型 X 射线衍射(XRD)仪,日本理学电机株式会社; Q500 型差示量热扫描(DSC)仪,美国 TA 公司; Q500 型热重分析(TGA)仪,美国 TA 公司; FTIR-380型傅里叶变换红外光谱(FTIR)仪,美国热电科技仪器有限公司; HITACHI SU-1500 型钨灯丝扫描电子显微镜(SEM),日本 Hitachi 公司; Lakeshore7407 型振动样品磁强计,美国 Trend 公司; LSM710 型激光共聚焦显微镜(LSM),德国 Olympus 公司.

## 1.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒子的制备

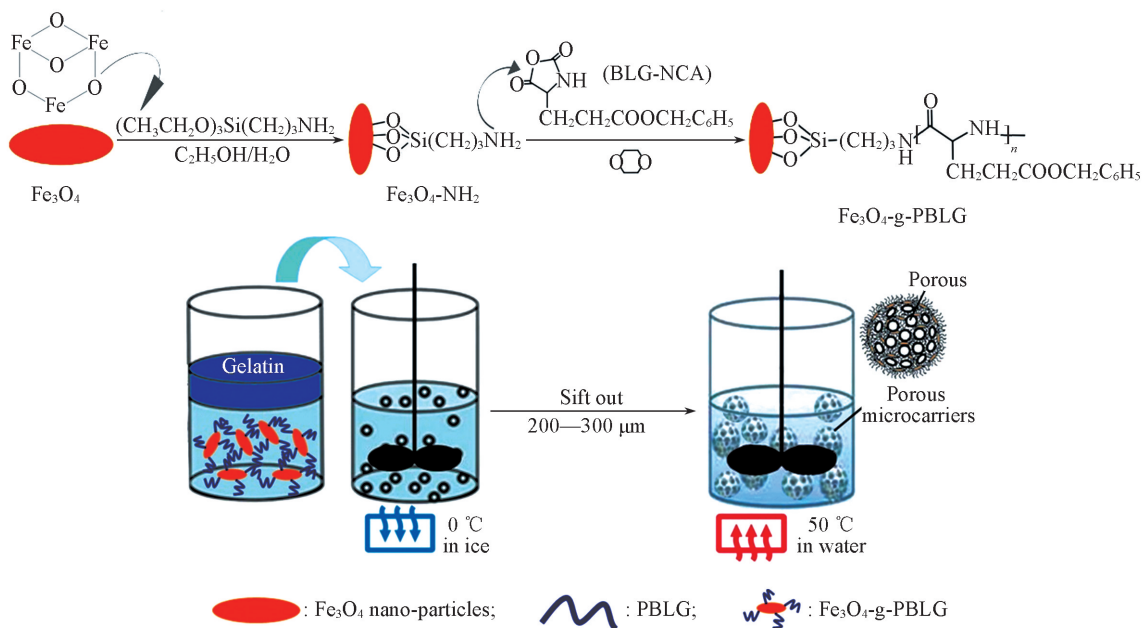
通过共沉淀法<sup>[17]</sup>制备  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子,反应方程如下:



将 5 g  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  和 3.614 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  加入到装有 60 mL 蒸馏水的烧瓶中,在氮气氛围下搅拌溶解,加热至 95 °C,缓慢滴加 40 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液,反应 3 h 后静置,待其沉降后用倾析法倒去上层清液,再用蒸馏水重复洗涤 3 次,最后冷冻干燥,即得  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子.

## 1.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 复合材料制备

由于  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子中氧原子在蒸馏水中有着很强的电负性,能吸引水中的氢离子形成类似氢氧根的基团<sup>[17]</sup>,与 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APS)进行偶联反应,制得表面氨基化的四氧化三铁纳米粒子( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ ),以氨基的孤对电子进攻 BLG-NCA 开环聚合后在  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子表面聚合生成 PBLG,其反应原理及示意图如 Scheme 1 所示<sup>[18]</sup>.



Scheme 1 Fabrication of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG composites and its porous microcarriers<sup>[18]</sup>

将 0.442 g APS 加入到 200 mL 水和乙醇 [ $V(\text{水}) : V(\text{乙醇}) = 1 : 5$ ] 的混合溶剂中,室温下搅拌 30 min 后,加入 2 g  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子,其中 APS 与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子的摩尔比为 1:1;在室温下搅拌 3 h,调节 pH 值为 9~10,继续反应 3 h;用水和乙醇混合溶剂洗涤 2~3 次,弃去上层清液;冷冻干燥得到  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  纳米粒子.以  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  为引发剂引发 BLG-NCA 开环聚合,制得  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 复合材料.

将不同量  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ , 5.0 g BLG-NCA<sup>[16]</sup> 和 125 mL 无水 1,4-二氧六环加入到干燥的烧瓶中,在真空条件下,超声分散 30 min,室温下搅拌反应 3 d,待反应体系成黑色稠状液体;将反应液倒入无水乙醇中沉降;抽滤,并用无水乙醇洗涤数次,干燥,即得  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 复合材料.当  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  的用量分别为 1.67, 1.11, 0.56 g 时,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 复合材料的理论接枝率分别为 70%, 80% 和 90%.

## 1.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体制备

采用明胶作为致孔剂制备  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体.将明胶溶液加入到 0.1 g (20 mL) 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 二氯甲烷溶液中,在 25 °C 下用高剪切乳化机乳化 3 min,形成初乳(W/O);在磁力搅拌下,将初

乳加入到 150 mL 0.1% (质量分数) PVA 水溶液中, 恒速搅拌 30 min, 再转移到 0 °C 冰水浴中, 200~400 r/min 机械搅拌至二氯甲烷完全挥发; 50 °C 恒温水浴锅中浸泡 7 h 除去明胶, 再经蒸馏水洗涤 3~5 次, 通过标准筛得到粒径范围在 0.2~0.3 mm 的样品, 冷冻干燥, 制得 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 多孔微载体。

### 1.5 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 多孔微载体物理性质

参照文献[19]方法称取一定质量的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 多孔微载体(干重  $m_1$ ) (接枝率为 70%, 80%, 90%), 其中每个样品测试 5 个平行样, 将其置于无水乙醇中使其恰好充盈, 读出体积  $V$ , 称量湿态下质量( $m_2$ ), 根据  $\rho = m_2 / [V - (m_2 - m_1) / \rho_{\text{ethanol}}]$  计算微载体密度  $\rho$ 。

参照文献[20]方法称取一定质量的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 多孔微载体, 置于真空干燥箱中, 干燥至恒重( $m_d$ ), 干燥样品用蒸馏水浸润 24 h, 直至微载体孔隙被蒸馏水充满且无气泡逸出, 取出用滤纸吸除微载体表面的水分, 称重( $m_w$ )。保水率根据公式 Water retentivity (%) =  $[(m_w - m_d) / m_d] \times 100\%$  计算。

参照文献[21]方法, 通过无水乙醇液体置换法测定 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 多孔微载体的孔隙率。取一定量的干态 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 多孔微载体, 放入一定体积( $V_1$ ) 的乙醇中, 测出样品与乙醇体积为  $V_2$ , 取出 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 多孔微载体后乙醇体积变为  $V_3$ 。孔隙率(Pore retentivity) 根据公式 Pore retentivity (%) =  $[(V_1 - V_3) / (V_2 - V_3)] \times 100\%$  计算。

### 1.6 磁性质测定

将 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒子和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 多孔微载体(接枝率 90%) 分别放在夹具上, 在 37 °C 下通过振动样品磁强计进行磁性能测试。

### 1.7 微载体内脂肪干细胞的接种

脂肪干细胞体外培养完成后, 吸净培养皿中培养液, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 加入 2 mL 0.25% 胰蛋白酶消化液, 于 37 °C 培养箱中静置 2 min 后, 于 1500 r/min 下离心 5 min 以收集消化下来的细胞, 加入 1 mL 无血清的细胞培养液和 5  $\mu$ L DiO 染料对细胞膜进行标记, 洗去多余染料, 并加入少量细胞培养液, 调整细胞密度为  $5 \times 10^6$  Cell/mL, 待用。

接种前, 用 75% 医用乙醇对 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 多孔微载体进行消毒后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 待用。

将脂肪干细胞悬液与 1 mL Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 多孔微载体混合, 以 75 r/min 转速振摇培养, 再加入 7 mL 培养液并转移至 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 及 100% 饱和湿度培养箱内培养, 每隔 48 h 更换培养液。

将接种 7 d 的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 多孔微载体除去培养液, 用 PBS 洗涤 3 次后, 用多聚甲醛固定 20 min, 在激发波长为 543 nm, 发射波长为 560 nm 条件下, 通过激光共聚焦显微镜观察细胞生长情况。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 复合材料

2.1.1 微观形貌 用 AFM 观察 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒子及 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 复合材料的微观形貌(图 1)。由图 1(A) 可见, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒子的微观形貌呈椭圆状, 与于文广等<sup>[22]</sup> 研究相符, 同时纯无机粒子存在易团聚的现象。由图 1(B) 和(C) 可见, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG 复合材料呈核壳状无机/有机杂化结构, 5.5 nm 高度

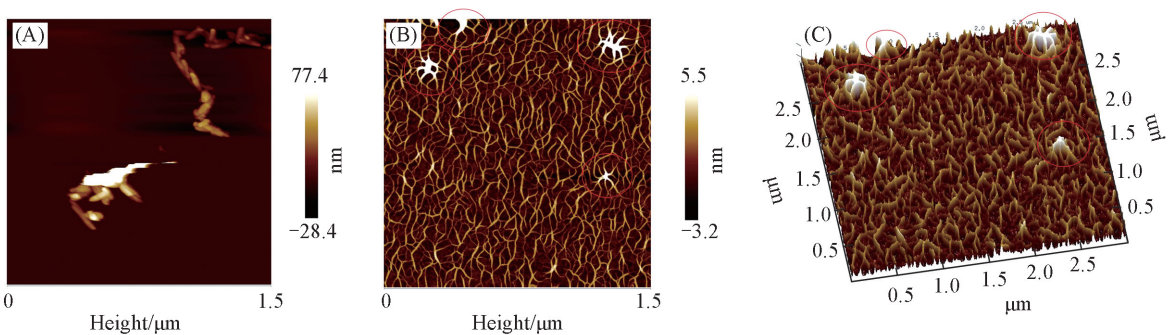


Fig.1 AFM images of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nano-particles(A), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG composite material(B) and 3D structure of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG composite material(C)

处为  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子核, 周围须状为接枝的 PBLG 高分子链, 与传统的无机材料相比,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 复合材料具有良好的分散性. 图 2 给出  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子及  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 复合材料的粒径分布图. 可见纯  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子平均粒径为 94.62 nm, 而  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 复合材料的平均粒径为 150.92 nm, 是较为理想的生物医用纳米材料<sup>[23]</sup>.

2.1.2  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 复合材料的结构表征 图 3 给出  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , PBLG 和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 的 FTIR 和

XRD 谱图. 在图 3 谱线 *a* 上, 在  $580\text{ cm}^{-1}$  处出现  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的特征吸收峰; 在图 3 谱线 *b*~*d* 上,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 吸收曲线中不仅有  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的特征峰, 而且在  $1735\text{ cm}^{-1}$  处出现了 PBLG 侧基上羧基酯键的特征峰, 以及  $1652\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 I 带,  $\alpha$ -螺旋)、 $1546\text{ cm}^{-1}$  (酰胺 II 带)、 $3290\text{ cm}^{-1}$  (N—H) 和  $3050\text{ cm}^{-1}$  (Csp<sup>2</sup>-H, 苯环) 处的特征峰, 证实 PBLG 高分子链已接枝在纳米  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  表面. 以纯 PBLG 作参考, 其图谱与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 复合材料的特征峰相符, 并且随着单体浓度的增加, PBLG 含量增加,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $580\text{ cm}^{-1}$ ) 的特征峰明显减弱, 酰胺 I 带 ( $1652\text{ cm}^{-1}$ ,  $\alpha$ -螺旋) 的特征峰略有增强, 进一步证实了材料的合成. 由图 3 (B) 可见, (220), (311), (400), (440), (422) 和 (511) 的吸收峰表明了  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  晶体的属性. 表面引发开环聚合仅发生在  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子的表面, 而未改变  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  固有的晶体结构;  $2\theta$  为  $15^\circ\sim 25^\circ$  处的宽弥散峰归属于聚合物 PBLG. 由于 PBLG 含量的增加及相应的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  含量减少, PBLG 的弥散峰逐渐增强, 而  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的特征峰被削弱.

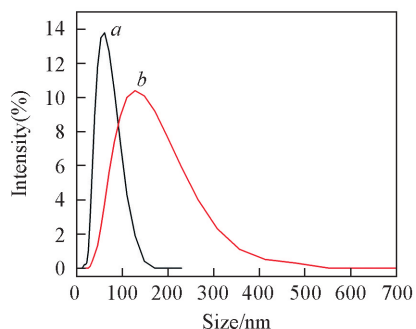


Fig.2 Diameter of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nano-particles (*a*) and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG composite material (*b*)

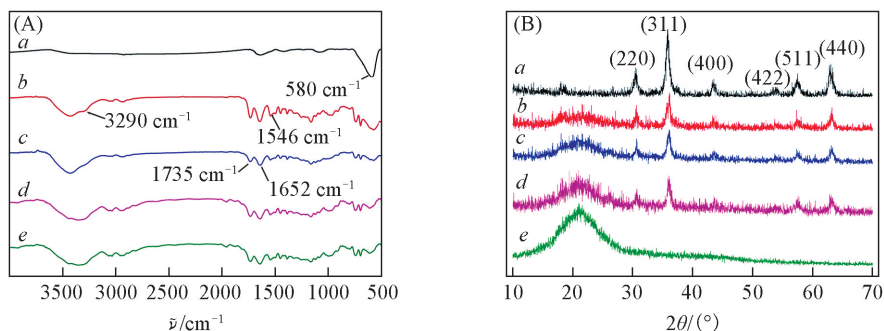


Fig.3 FTIR spectra (A) and XRD patterns (B) of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nano-particles (*a*),  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG composite with grafting ratio of 70% (*b*), 80% (*c*) and 90% (*d*) and PBLG (*e*)

2.1.3  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 复合材料接枝率测定 为了更直观表征  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 复合材料的接枝率, 通过 TGA 对不同接枝率的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 复合材料进行热重分析, 结果可通过其在  $200\sim 700\text{ }^\circ\text{C}$  之间的失重率来衡量, 这一区域内的失重主要来源于高分子. 因不同聚合物含量的杂化粒子水分及溶剂的含量并不相同, 这种计算方法有利于消除个体差异, 优于单一样本的计算方法, 并被人们采用<sup>[24]</sup>. 由图 4 (A)

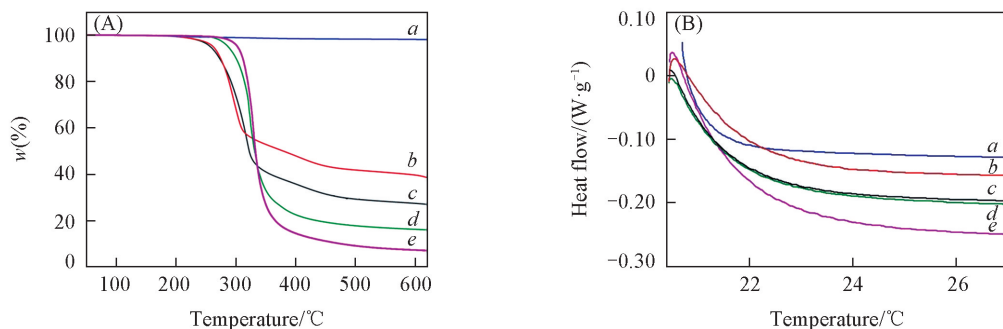


Fig.4 TGA (A) and DSC (B) curves of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nano-particles (*a*),  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG composite with grafting ratios of 70% (*b*), 80% (*c*) and 90% (*d*) and PBLG (*e*)

可知, 表面引发 NCA 聚合法能使壳层的 PBLG 含量呈梯度增长, 并达到较高接枝率. 根据图 4(A) 计算可知, 实际接枝率分别为 66.36%, 79.66%, 89.52%, 接近理论接枝率 70%, 80%, 90%, 这一结果表明  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  表面引发的 BLG-NCA 开环聚合属于活性聚合<sup>[25,26]</sup>. 由图 4(B) 可知, 理论接枝率为 70%, 80%, 90% 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-g-PBLG}$  复合材料及 PBLG 的玻璃化转变温度分别为 17.24, 19.46, 20.70 和 23.11 °C, 随着接枝率的增加而增加. 因此, 在 0 °C 冰浴中,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-g-PBLG}$  复合材料为玻璃态, 在液体表面张力的作用下, 随着溶剂的挥发, 则能形成较为规整的球状结构.

## 2.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-g-PBLG}$ 多孔微载体的微观形貌

由图 5 可见, 70%, 80% 和 90% 接枝率的  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-g-PBLG}$  多孔微载体的孔径分别为 25~30, 30~40 和 40~50  $\mu\text{m}$ , 可见 90% 接枝率的微载体孔径最大, 其贯通性更好, 有利于营养液及细胞代谢产物的进出. Kim 等<sup>[20]</sup> 制备了孔径为 20  $\mu\text{m}$  聚乳酸羟基丙交酯多孔微载体, 细胞在培养 7 d 后进入到  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-g-PBLG}$  多孔微载体内部. 对于大多数细胞, 孔径大于 20  $\mu\text{m}$  比较合适<sup>[27]</sup>, 但研究发现, 孔径为细胞直径 1~5 倍更有利于细胞生长<sup>[28]</sup>, 即孔径为 40~60  $\mu\text{m}$ <sup>[29]</sup>. 因此, 90% 接枝率的  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-g-PBLG}$  多孔微载体被用于细胞培养.

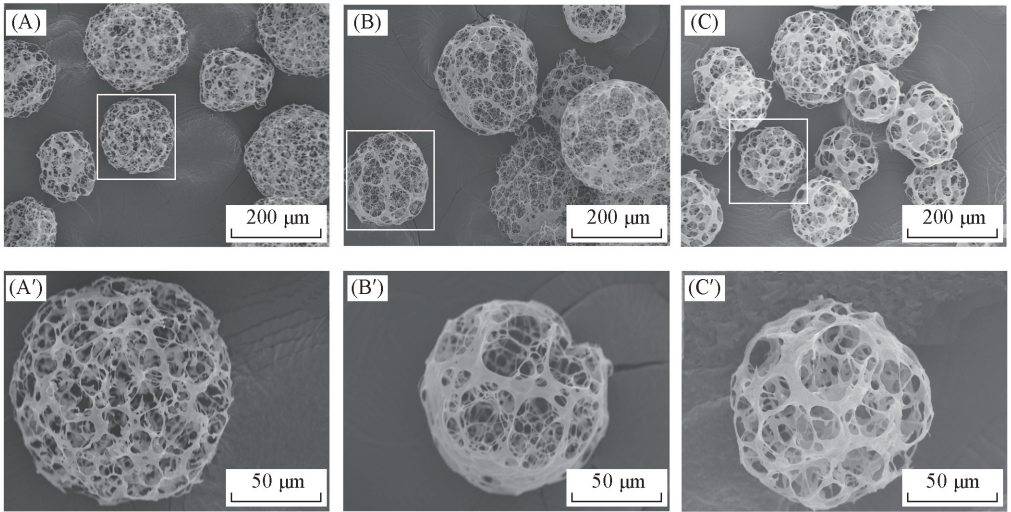


Fig.5 SEM images of  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-g-PBLG}$  porous miccarriers with grafting ratios of 70%(A, A'), 80%(B, B') and 90%(C, C')

## 2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-g-PBLG}$ 多孔微载体的物理性质

由图 6 可见, 理论接枝率 70%, 80% 和 90% 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-g-PBLG}$  多孔微载体的孔隙率分别为 86.32%, 89.46% 和 92.57%. 随着接枝率提高, 微载体的孔隙率增大. 高孔隙率及贯通性有利于细胞的增殖, 也可为营养物质及新陈代谢提供通道. 根据文献[30]报道, 为了满足细胞悬浮培养的要求, 需要微载体具有一定的强度及较好的弹性, 特别是密度要比水的密度略大, 最适宜的微载体密度为 1.03~1.06

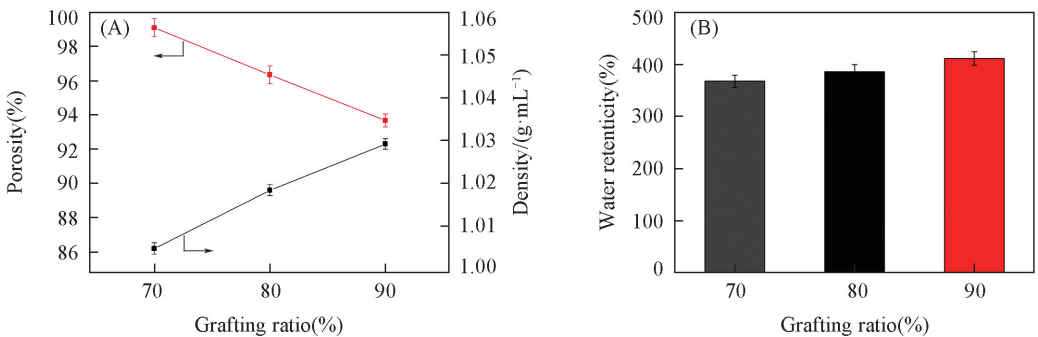


Fig.6 Porosity and density (A) and water retenticity (B) of  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-g-PBLG}$  porous microcarriers with different grafting ratios

g/mL. 这样在较小的搅拌速度下微载体能漂浮起来, 从而减少剪切力, 在停止搅拌后, 微载体能较快沉降, 密度过大的微载体需要较大剪切力, 不利于细胞黏附. 通常不同工艺条件制备的 PBLG 的密度略有差异, 一般约为 0.9970 g/mL, 但  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的密度较大. 虽然 PBLG 接枝在  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子表面, 结构相对疏松, 但是由于无机粒子的存在, 密度还是相对较大. 70%, 80% 和 90% 接枝率的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 微载体密度分别为 1.056, 1.045 和 1.034 g/mL. 显然, 接枝率越低, 微载体的密度越大, 在悬浮培养的过程中需要较大的离心力. 因此从密度方面考虑, 接枝率为 90% 的微载体最适宜细胞培养, 80% 接枝率的微载体也符合细胞培养的要求.

本文制备的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体具有一定的含水量和悬浮密度, 与文献[32]报道的聚合物微载体相比, 具有较好的保水率, 这为其作为支架高密度高活性培养细胞提供了一定的理论和实验依据. 保水率是指微载体湿态时所能容纳液体的质量, 微载体的孔隙越多, 比表面积越大, 越有利于液体的保留. 因此, 通过保水率可以了解微载体的比表面积的信息. 由图 6 可见, 原料接枝率越高, 保水率数值也越高, 说明微载体的比表面积随着接枝率的提高而增大. 比表面积大, 则能为细胞黏附和生长提供更大空间, 对于保水率测试结果而言, 接枝率越高, 微载体越适合细胞负载与生长.

## 2.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体的磁性能

通过对不同接枝率的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体微观形貌、密度、孔隙率及保水率的表征发现, 90% 接枝率的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体具有最大、最贯通的孔结构, 并且具有适中的密度及较大的保水率, 相比于 70%, 80% 接枝率的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体更适宜细胞的生长, 故本文着重对 90% 接枝率的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体进行生物学性能表征及磁性能研究. 图 7 给出  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体室温磁滞回线. 可见  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子的饱和磁化强度为 75.02 A/m,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体饱和磁强度为 16.4 A/m, 同时具有超顺磁性, 当增大外加磁场时, 磁化强度迅速变大, 当增大到一定程度后, 磁化强度增长速率逐渐放慢到达饱和; 当外加磁场开始下降时, 磁化强度也随之下降; 外加磁场接近零时, 磁化强度也趋于零, 在外加磁场磁化时, 磁化曲线表现出可逆性, 与现有无机/有机复合磁性骨修复材料相比, 有着明显的优势<sup>[33]</sup>.

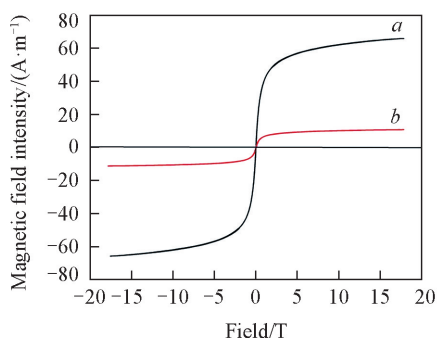


Fig.7 Hysteresis regression line of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles(a) and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG porous microcarriers with grafting ratio of 90%(b)

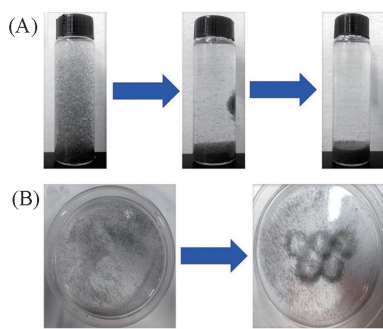


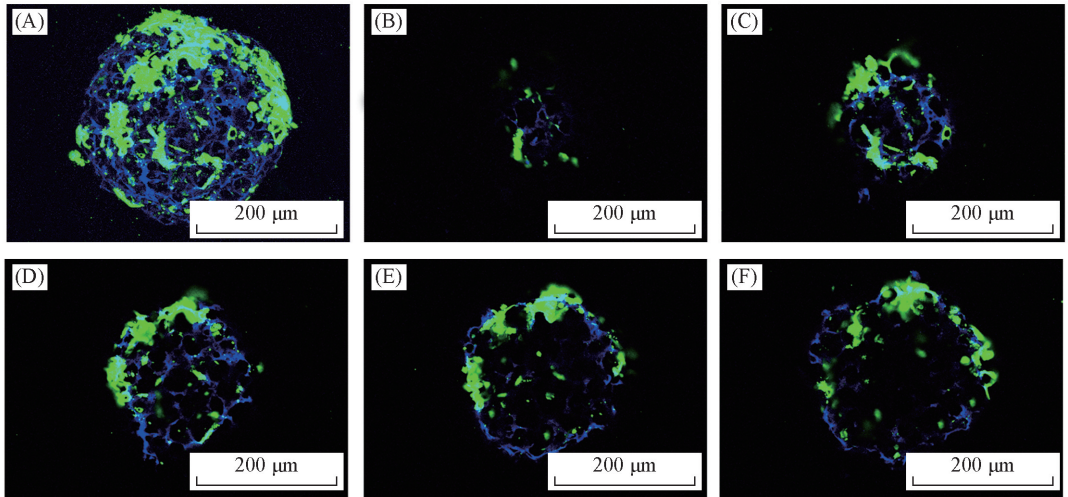
Fig.8 Arrayed behavior of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG porous microcarriers with grafting ratio of 90% under different kinds of magnetic field

由图 8 可见,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体在磁场的作用下有序排列成相应图案. 在烧杯壁上给予一个竖直方向的磁场时, 微载体呈竖直状排列, 撤去磁场后, 立即沉降下来[图 8(A)]; 当给予微载体一个“奥运五环”图形的磁场, 微载体则排列成“奥运五环”的形状[图 8(B)], 这一特性对治疗具有复杂结构的骨骼创伤具有重要的意义. 在临床复杂的创伤过程中, 面对结构较为复杂的骨缺损, 可以通过外界磁场, 调整微载体的分布情况, 使其充分填补创口, 以达到更好的修复效果.

## 2.5 细胞在 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体上的黏附

图 9(A) 为  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体体外培养脂肪干细胞 7 d 后激光共聚焦显微镜拍摄的 3D 合成图像, 图 9(B~F) 分别为该细胞微载体的不同层面的扫描图. 由图 8(A) 可知, 在体外接种 7 d 后,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 微载体表面黏附了大量细胞. 说明细胞生长情况良好. 由图 9(B~F) 可见, 脂肪干细胞

能够向  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体内部迁移. 以上结果表明,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体具有良好细胞相容性, 其孔径能满足细胞向微载体内部迁移, 有利于保持细胞活性, 实现组织再生<sup>[33]</sup>.



**Fig.9 Confocal laser scanning microscopy images of cell adhesion in  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG porous microcarriers with grafting ratio of 90%**

(A) 3D image. Scanning depths in each microcarrier; (B) 1/10 diameter in depth; (C) 2/10 diameter in depth; (D) 3/10 diameter in depth; (E) 4/10 diameter in depth; (F) 5/10 diameter in depth.

### 3 结 论

通过表面接枝技术制备  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 复合材料, 调整单体和引发剂的比例实现  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子表面 PBLG 接枝率的可控. 通过双乳液挥发法制备了  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g-PBLG 多孔微载体, 其中, 接枝率为 90% 时, 粒径为 200~300  $\mu\text{m}$ , 孔径为 40~50  $\mu\text{m}$ , 孔隙率达 92.57%, 不仅具有良好的贯通性, 还具有较高的保水率, 适合细胞的生长. 磁性微载体具有超顺磁性, 可以通过外加磁场进行任意形状排列, 对于治疗复杂形状的创口, 具有很大的优势. 将脂肪干细胞接种于多孔微载体后, 细胞能够进入微载体内部, 具有良好的细胞黏附性及生物相容性, 在骨组织工程修复领域有着广阔的应用前景.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Thissen H., Chang K. Y., Tebb T. A., *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **2006**, 77A, 590—598
- [ 2 ] Hong Y., Gao C. Y., Xie Y., *Biomaterials*, **2005**, 26, 6305—6313
- [ 3 ] Kim H. W., Gu H. J., Lee H. H., *Tissue Eng.*, **2007**, 13, 965—973
- [ 4 ] Melero J. M., Dowling M. A., Smith M., *Biomaterials*, **2006**, 27, 2970—2979
- [ 5 ] Fang J. J., Zhang Y., Yan S. F., *Acta Biomaterialia*, **2014**, 10, 276—288
- [ 6 ] Chun S. W., Chi S. H., Fang C. H., *J. Magn. Magn. Mater.*, **2012**, 324, 3918—3923
- [ 7 ] Qian G., Chen F. H., Zhang J. L., *J. Magn. Magn. Mater.*, **2009**, 321, 1052—1057
- [ 8 ] Mandeep S., Pavel U., Vadym P., *J. Magn. Magn. Mater.*, **2013**, 339, 106—113
- [ 9 ] Noriyuki N., Masahisa I., Yuzo I., *Pathophysiology*, **2000**, 7, 107—114
- [ 10 ] Teresa R., Ugo D. A., Antonio G., *Procedia Engineering*, **2013**, 59, 233—239
- [ 11 ] Panseri S., Russo A., Sartori M., *Bone*, **2013**, 56, 432—439
- [ 12 ] Rypacek F., *Polym. Degrad. Stabil.*, **1998**, 59, 345—351
- [ 13 ] Peter M., Amidon G. L., Yang V. C., *Int. J. Pharm.*, **1999**, 178, 183—192
- [ 14 ] Cao B., Yan S. F., Cui L., *Macromol. Biosci.*, **2011**, 11, 970—977
- [ 15 ] Fang J. J., Yong Q., Zhang Y., *J. Mater. Chem. B*, **2015**, 3, 1020—1031
- [ 16 ] Yao Y., Li W., Wang S., *Macromol. Rapid Commun.*, **2006**, 27, 2019—2025
- [ 17 ] Ding M., Zeng H. X., *J. Inorganic. Mater.*, **1998**, 8, 619—624
- [ 18 ] Zhang K. X., He S. M., Yan S. F., *J. Mater. Chem. B*, **2016**, 4, 2628—2645

- [19] Ghasemi M. L., Semnani D., Morshed M. A., *J. Appl. Polym. Sci.*, **2007**, *14*, 2536—2548
- [20] Kim T. K., Yoon J. J., Lee D. S., *Biomaterials*, **2006**, *27*, 152—159
- [21] Zhao F., Yin Y., Lu W. W., *Biomaterials*, **2002**, *23*, 3227—3234
- [22] Yu W. G., Zhang T. L., Zhang J. G., *Progress in Chemistry*, **2007**, *6*, 884—892
- [23] Zhang L. S., Xin H., Yu R. C., *Acta Biomaterialia*, **2009**, *5*, 338—345
- [24] Cantu E. S., Selcuk S. T., Qiu J., *Langmuir*, **2010**, *26*, 15604—15613
- [25] Kricheldorf H. R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 5752—5784
- [26] Hadjichristidis N., Iatrou H., Pitsikalis M., *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 5528—5578
- [27] Berry C. C., Campbell G., Spadicino A., *Biomaterials*, **2004**, *25*, 5781—5788
- [28] Sutherland R. M., *Science*, **1988**, *240*, 177—184
- [29] Huang C. C., Wei H. J., Yeh Y. C., *Biomaterials*, **2012**, *33*, 4069—4077
- [30] Wu C., Pan J., Bao Z., *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **2007**, *18*, 2211—2214
- [31] Sundararajan V., Madihally., Howard W., *Biomaterials*, **1999**, *20*, 1133—1142
- [32] Fang Q., Lin J. W., Zhan Y. H., *Environment Science*, **2014**, *8*, 2992—3001
- [33] Malda J., Carmelita G., *Trends Biotechnol.*, **2006**, *24*, 299—304

## Fabrication and Performance for Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Surface Grafted Poly( $\gamma$ -benzyl-*L*-glutamate) Porous Microcarriers<sup>†</sup>

XU Shenghua, XIA Pengfei, ZHANG Kunxi, GAO Long, YIN Jingbo\*

(Department of Polymer Materials, School of Materials Science and Engineering, Shanghai University, Shanghai 201800, China)

**Abstract** Ferroferric oxide/poly( $\gamma$ -benzyl-*L*-glutamate) (PBLG) composite materials (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG) was synthesized by initiating  $\gamma$ -benzyl-*L*-glutamate-*N*-carboxyanhydride (BLG-NCA) polymerization on the surface of amino-functionalized ferroferric oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG composites was confirmed by Fourier transform infrared and X-ray diffraction. Thermogravimetric (TGA) study showed that the grafting ratios of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG were 66.36%, 79.66%, and 89.52%, and grafting ratio of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG composite could be controlled. The Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG with grafting ratio of 89.52% was used to fabricate magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG porous microcarriers. The porous microcarriers possessed suitable density (1.034 g/mL), porosity (92.57%), particle size (200—300  $\mu$ m), pore size (40—50  $\mu$ m) and water retention (370%—400%). Meanwhile, microcarriers exhibited superparamagnetism. Under the action of magnetic fields, the microcarriers can be arranged into any shape, showing significant advantages for the treatment of complex structure of the bone defects. These results showed that Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-PBLG porous microcarriers might be applied in bone tissue engineering.

**Keywords** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>; Poly( $\gamma$ -benzyl-*L*-glutamate) (PBLG); Porous microcarrier; Magnetic property; Bone tissue engineering

(Ed.: W, Z)

<sup>†</sup> Supported by the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, China (No.15JC1490400) and the National Natural Science Foundation of China (No.51373094).