

多巴胺辅助牙本质沉积羟基磷灰石研究

许金妹, 刘新玲, 高彦峰

(上海大学 材料科学与工程学院, 上海 200444)

摘要: 本研究报道了一种新颖的、模拟口腔环境的仿生修复牙齿的方法。利用具有良好生物相容性的多巴胺在牛牙牙本质表面自聚合形成聚多巴胺层(PDA)使牙本质表面功能化, 进而诱导羟基磷灰石从模拟唾液中向牙本质表面沉积。XPS、XRD、SEM 和 EDS 表征分析表明: 聚多巴胺层的涂覆有利于牙本质表面羟基磷灰石晶体的结晶生长, 可提高羟基磷灰石再矿化层与牙本质表面的结合力; 多巴胺溶液浓度为 2 mg/mL 时, 牙本质表面聚多巴胺层的沉积效果最佳。

关键词: 仿生材料; 多巴胺自聚合; 牙齿再矿化; 结晶生长

中图分类号: R314 **文献标识码:** A

Effect of Dopamine on Hydroxyapatite Deposition for Dental Restoration

XU Jin-Mei, LIU Xin-Ling, GAO Yan-Feng

(School of Materials Science and Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: A novel and biomimetic restoration method for teeth by soaking in a simulated oral environment was reported. A biocompatible polydopamine (PDA) layer was deposited on the surface of dentin *via* dopamine polymerization to functionalize the surface to induce deposition of hydroxyapatite crystals. The samples were characterized by means of XPS, XRD, SEM and EDS. Results show that the coating of polydopamine layer induces the growth of hydroxyl apatite crystal on dentin surface, and improve the binding force between the hydroxyl apatite layer and the dentin surface. The optimized concentration of dopamine solution is 2 mg/mL for the uniform deposition of PDA layer on the dentin surface.

Key words: biomimetic materials; polymerization of dopamine; mineralization of teeth; crystal growth

龋病是牙齿硬组织结构逐渐被破坏的一种慢性疾病^[1], 一直以来影响着人们的生活, 危害着人类的口腔健康。龋齿的发生从牙釉质的脱矿开始, 因此脱矿牙釉质的修复研究对于龋齿的预防和治疗具有重要意义^[2-4]。虽然现在的口腔材料本身对于修复龋洞或者牙齿缺损较为有效, 但是无法达到防止龋齿再次发生^[5]的目的。理想的口腔修复材料在组成、结构和性质等方面应该与牙齿组织相似, 所以与牙釉质组成类似的羟基磷灰石材料即为牙齿修复的理想材料^[6]。

目前, 关于这方面的研究主要集中在牙釉质的模型矿物——羟基磷灰石的合成、应用以及生物矿

化过程的模拟、机理等方面。Yamagishi 等^[7]开发了一种以氟磷酸钙为主的胶体, 可以在酸性母液的配合下直接用于牙釉质缺损的修复。Mansfield 等^[8]模拟生物矿化过程中蛋白质对无机矿物的组装行为, 获得了具有与牙釉质结构类似的自组装体。Clarkson 等^[9]利用水热方法合成了具有柱状结构的纳米羟基磷灰石晶体, 在合成过程中这些晶体进行自组装形成了具有类牙釉的组装结构。但是, 这些方法操作条件较为苛刻, 实用性差。

当牙釉质全部溶蚀后, 便会暴露牙本质, 引起牙齿过敏。因此, 在牙本质表面重新形成一层保护层

也是解决牙齿过敏的方法之一。本研究利用仿生矿化的方法来达到牙齿修复的目的, 主要包括两个方面: 第一是在受损牙本质表面实现多巴胺的氧化自聚合^[10-12], 构建牙本质再矿化的二级反应“桥梁”; 第二是通过聚多巴胺层的功能化作用, 在模拟唾液中沉积出羟基磷灰石以实现牙本质的再矿化。该方法不受基材尺寸、形状的限制, 而且聚多巴胺具有良好的生物相容性, 为仿生牙齿修复材料的研究及脱矿牙本质的自愈性修复提供了新的理论和技术基础。

1 实验方法

1.1 牙片表面聚多巴胺涂层的制备

实验选取新拔取的黄牛牙, 用 3% 次氯酸钠处理以去除菌斑, 并用磷酸盐缓冲液(135 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl、1.5 mmol/L KH_2PO_4 、8 mmol/L K_2HPO_4 , pH=7.2)漂洗。用低速 STX-202A 型金刚石线切割机将牙齿在有水冷却的情况下, 垂直于牙齿的纵轴将牙冠切成厚约 0.5~1 mm、直径约 8~10 mm 的平片。用 600~3000 目砂纸将牙片表面打磨光滑, 之后牙片样本依次用去污剂、丙酮、乙醇、去离子水超声清洗, 室温干燥, 放在聚乙烯管里备用。用 37% 磷酸酸蚀准备好的牛牙片 2 min, 再用足够的去离子水漂洗。选取其中一牙片作为空白对照组, 编号为 a 组, 剩余牙片无需干燥, 直接分别浸没于新鲜配制的 1、2、3 mg/mL 多巴胺(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)溶液(其 pH 由 10 mmol/L tris-HCl 缓冲液和 0.1 mol/L HCl 调至 8.5)中室温避光存放 24 h 后, 取出样品用去离子水超声清洗 10 min×3 次, 以去除没有结合的多巴胺, 室温干燥可得到涂覆有聚多巴

胺涂层的牙片, 分别编号为 b、c、d。

1.2 涂覆有聚多巴胺(PDA)涂层的牙体组织的再矿化

参照 Fan 等^[13]描述的操作步骤配制矿化液。将步骤 1.1 中处理后的涂覆有聚多巴胺涂层牙片(实验组 b、c、d)和空白牙片(对照组 a)分别放置在含 50 mL 矿化液的密封烧杯的底部^[14]。然后将烧杯放在 37°C 的恒温摇床上以 100 r/min 速度持续震荡。每天更换一次矿化液, 7 d 后取出样品, 用流动的去离子水漂洗, 再用 50%、70%、80%、90%、95%、100% 乙醇进行上行梯度脱水, 用每个浓度的乙醇脱水 2 次, 每次 10 min, 将脱水后的样本干燥后存于冰箱。

1.3 测试表征

采用型号为 ESCALAB 250Xi 的 X 射线光电子能谱仪测试牙本质表面聚多巴胺层涂覆状况; 利用 JSM-6700F 扫描电子显微镜(SEM)对牙本质表面聚多巴胺层以及再矿化层的表面形貌进行观察, 并通过 SEM 自带的 EDS 来表征所选区域内的元素含量; 采用 18KWD/MAX2500V+/PC 型 X 射线衍射仪测定牙本质表面矿化沉积物的 XRD 图谱, 测试条件为: $\text{CuK}\alpha$, 最大额定输出为 18 kW, 测试时的管压与管流分别为 40 kV、200 mA, 扫描速度为 8°/min, 扫描范围 $2\theta=20^\circ\sim60^\circ$ 。

2 结果与讨论

2.1 多巴胺在牙本质表面聚合沉积状况的 SEM 形貌分析

在扫描电镜下, 可以观察到这些天然牙本质典型的孔状结构(图 1(a), (b))。在对照组实验中, 当牙片

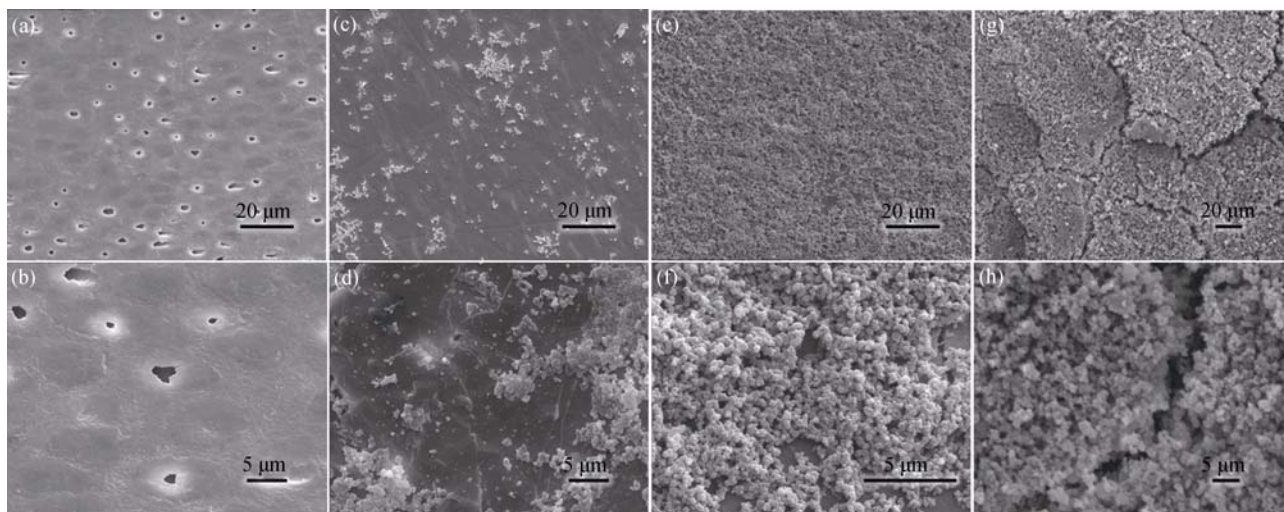


图 1 在不同浓度多巴胺溶液中处理后的牙本质表面 SEM 照片

Fig. 1 SEM images of the dentin surfaces after being soaked in dopamine solution at different concentrations, (a, b) 0 mg/mL; (c, d) 1 mg/mL; (e, f) 2 mg/mL; (g, h) 3 mg/mL

经低浓度多巴胺溶液处理后, 表面仅有少量聚多巴胺(PDA)颗粒且分布不均匀(如图 1(c), (d)); 当将牙片在 2 mg/mL 的多巴胺溶液中处理 24 h 并清洗、干燥以后, 可观察到牙本质表面完全被 PDA 颗粒覆盖(图 1(e), (f)), 且 PDA 层均匀致密; 当牙片经高浓度多巴胺溶液处理后, 牙本质表面沉积大量 PDA 颗粒, PDA 层较厚, 干燥之后 PDA 层出现裂纹, 局部出现脱落。上述结果说明: 2 mg/mL 多巴胺溶液对牙本质表面 PDA 层的形成最有效。

2.2 多巴胺在牙本质表面聚合沉积状况的 XPS 结果分析

对空白牙本质和沉积有聚多巴胺层的牙本质(dentin-PDA)的 XPS 全谱图谱分析结果如图 2 所示, 比较 dentin-PDA(经 2 mg/mL 多巴胺溶液处理后的样品)与空白牙本质的谱图, 可以发现: 在空白牙本质图谱中出现 P2p、P2s、Ca2s 峰, 而 dentin-PDA 谱图上这些峰极弱, 并且在 dentin-PDA 图谱中有与牙本质的图谱中相同的 Ca2p、O1s、OKLL 峰, 但峰强减弱, 这项结果说明所沉积的聚多巴胺层的厚度小于 XPS 测试仪器对于有机基质探测的深度(约为 7.5 nm)^[15]; 在 dentin-PDA 图中 C1s 峰明显高于空白牙本质, 这是由于沉积在牙本质表面的多巴胺层中含有 C=C 键、C-C 单键和 C-H 键等, 说明在空白牙本质表面有聚多巴胺的沉积^[16]。

在表 1 中所列的是由 XPS 测出的空白牙本质和多巴胺改性过后的牙本质表面的化学元素组成。多巴胺的分子理论 N/C 比值为 0.125。XPS 测试所得的空白牙本质表面元素的 N/C 比为 0.319, 而经过 enamel-PDA 表面的 N/C 元素比为 0.179, 介于空白的牙本质和多巴胺的理论值之间, 这也说明在空白牙本质表面成功沉积有聚多巴胺涂层。

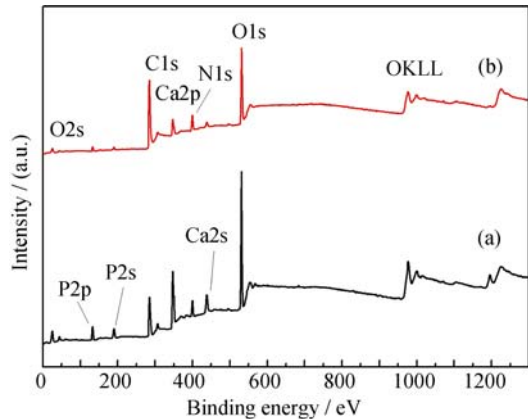


图 2 空白牙本质(a)和沉积有聚多巴胺层的牙本质(b)表面的 XPS 全谱图谱
Fig. 2 XPS wide scan spectra of 37% H₃PO₄-etched dental slices (a) and the polydopamine coated dentin surface (b)

表 1 空白牙本质、多巴胺和表面沉积有多巴胺牙本质的表面元素含量

	Dentin	Dopamine (theoretical value)	Dentin -PDA
C1s/ at%	7.2	8	11.75
N1s/ at%	2.3	1	2.1
N/C	0.319	0.125	0.179

2.3 多巴胺诱导羟基磷灰石在牙本质表面沉积

如图 3(c), 含聚多巴胺涂层的牙本质再矿化后样本的 XRD 图谱显示, 衍射峰(002)、(211)、(112)和(300)晶面都很好地对应对着 HAP 的特征峰。含聚多巴胺涂层的样本与酸蚀牙本质和无涂层的牙本质相比, c-轴(002)衍射峰强度比(211)或 a-轴(300)的明显增强, 这表明 HAP 沉积物是沿着 c-轴生长的。图 3(b)为无聚多巴胺涂层的牙本质上矿化沉积物样本的 XRD 图谱, 2θ 值为 32°左右没有劈裂的宽峰说明其表面沉积的羟基磷灰石样品的结晶性比较差; 对比图 3(b)与(c)可以看出, PDA 层有利于诱导牙本质表面沿着 c-轴生长出羟基磷灰石晶体。这得益于聚多巴胺涂层中的儿茶酚等基团与钙离子的结合, 使得钙离子在表面富集而促进 HAP 的矿化^[17], 同时还能调控 HAP 的结晶取向。

2.4 多巴胺溶液诱导羟基磷灰石在牙本质表面沉积的 SEM 形貌分析

图 4(a)、(c)及其对应放大图(b)、(d)分别为涂覆有 PDA 涂层和无涂层的牙本质样本浸于再矿化液 7 d

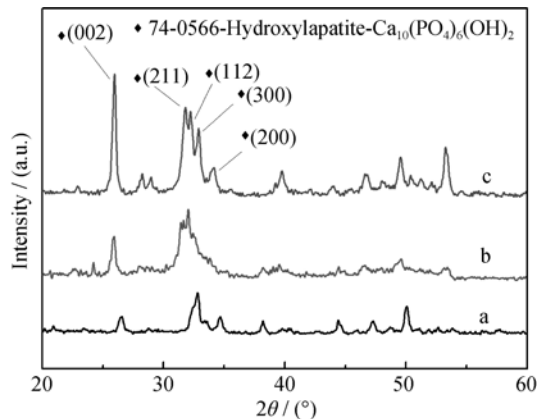


图 3 不同方式处理后的牙本质的 XRD 谱图: (a)空白牙本质; (b)无聚多巴胺涂层的牙本质再矿化; (c)含聚多巴胺涂层的牙本质再矿化
Fig. 3 XRD patterns of the sample surfaces of 37% H₃PO₄-etched dental slices (a) and precipitates on the dental surface without (b) or with (c) polydopamine coating after remineralization for 7 d

后表面 SEM 照片。从图中可以看出, 涂覆有 PDA 涂层的样本表面沉积物呈典型的天然鱼鳞结构, 沉积物均匀排列且垂直于牙釉质表面定向结晶生长(图 4(b)), 相互团簇形成“花朵”状且分布较均匀, 这是由于这些 HAP 颗粒在牙本质上是沿着釉柱的方向排列, 与牙本质本身的结构相似(图 4(a, b))^[18]; 无 PDA 涂层的样本表面沉积物呈短“绒毛”结构, 局部团聚成大颗粒散落在牙片表面, 这是由于矿化液中产生的针状 HAP 晶体随机沉积而形成(图 4(c, d))。与无聚多巴胺涂层的样本相比, 聚多巴胺涂层样本上的沉积晶体簇更趋于规则排列, 致密地聚集成大的晶体。表 2 为含 PDA 涂层的样本再矿化后和无 PDA 涂层的样本再矿化后表面微区 EDS 结果。可以看出: 含 PDA 涂层的样本各元素原子百分比与标准羟基磷灰石原子百分比接近, 而无 PDA 涂层的样本 Ca、P 元素含量高于标准羟基磷灰石, 这是由于其表面沉积了 Ca、P。

这些样本的断面 SEM 照片如图 5 所示, 对比原

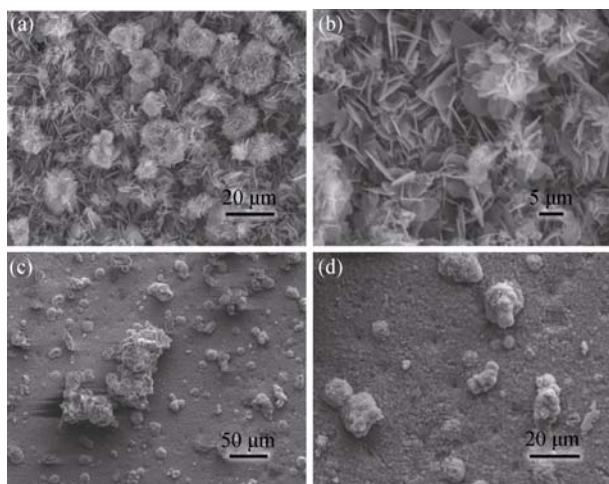


图 4 不同方式处理后的牙本质表面再矿化的 SEM 照片
Fig. 4 SEM images of HAP remineralization of the dentin surface coated with (a, b) or without (c, d) polydopamine after mineralization for 7 d

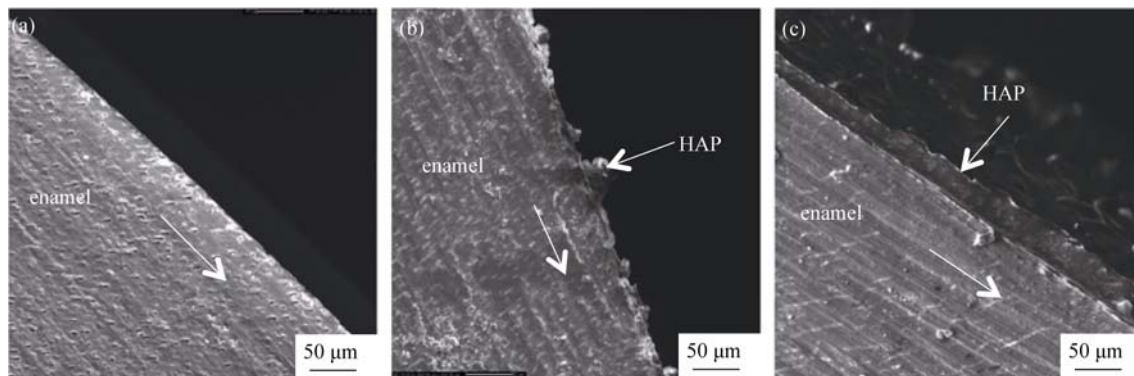


图 5 不同方式处理后的牙片断面 SEM 照片

Fig. 5 SEM images of the transverse sections of 37% H_3PO_4 -etched dental slices (a) and the precipitates on the enamel surface without (b) or with (c) polydopamine coating after remineralization for 7 d

表 2 羟基磷灰石、含和不含 PDA 涂层的牙本质表面再矿化物的元素原子百分比

Table 2 Elements atomic percentage of the surface of hydroxyapatite and precipitates on the dentin surface with or without polydopamine coating after remineralization for 7 days

Element	Surface with PDA	Surface without PDA	HAP
O/at%	69.10	52.88	62.50
P/at%	13.00	17.40	12.50
Ca/at%	17.90	23.81	20.83

始牙片(图 5(a)), 无 PDA 涂层的样品断面凹凸不平, 沉积物厚度较薄且参差不齐(图 5(b))。而涂覆有 PDA 涂层的样品断面上, 同质的晶体平行聚集在一起形成致密均匀的结晶层(如图 5(c)), 沉积物层与牙本质基底间的界面结合良好。所有沉积物厚度(约 30~40 μm)分布均一, 表明 HAP 晶体在 PDA 层上沉积速度几乎是相同的。

2.5 牙本质表面矿化沉积物结合力表征-超声处理后 SEM 形貌分析

超声处理的实验结果充分证明, 这些无 PDA 涂层样品表面的再矿化层与牙本质的结合非常弱。当沉积了 HAP 颗粒的牙本质在超声条件下处理 30 s 以后, 绝大多数吸附在牙本质上的 HAP 已经脱落, 只有极少数的 HAP 还残留在牙本质表面(如图 6(c, d))。这是因为, 无 PDA 涂层的样品表面沉积的 HAP 只是无序地散落在牙本质表面, 并没有在牙本质表面形成有序的组装结构, 所以与牙本质的结合力也非常弱。而涂覆有 PDA 涂层的样品表面生长的 HAP 保持了典型的天然鱼鳞结构, 这是由于在 PDA 层的诱导作用下 HAP 颗粒在牙本质上沿着釉柱的方向排列。而在天然的牙本质表面上, 这些颗粒是不存在的, 说明这些颗粒是再矿化处理后吸附在牙本质表面的人工合成的 HAP 颗粒, 并且这些颗粒与牙本质的吸附力较强, 在经过超声处理以后, HAP 脱落量较少(如图 6 (a),(b))。

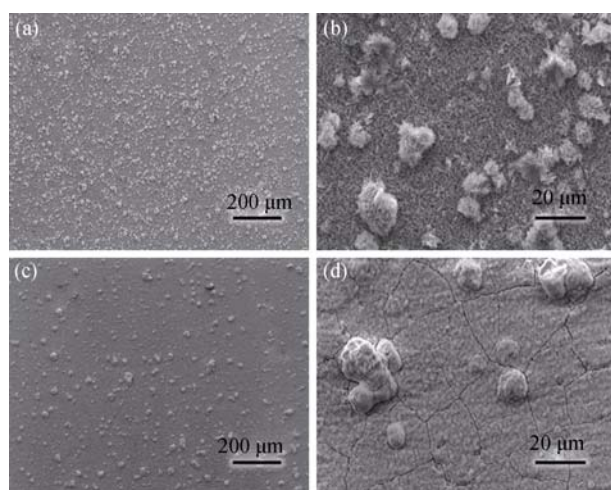


图 6 不同方式处理后的牙本质表面再矿化并超声后的 SEM 照片

Fig. 6 SEM images of dentin surface treated by ultrasonic wave which were remineralized with (a, b) or without (c, d) polydopamine coating after mineralization for 7 d

3 结论

利用多巴胺自聚合使牙本质表面功能化的实验中, 制备 PDA 层的最佳多巴胺溶液浓度为 2 mg/mL。PDA 层可诱导牙本质表面在亚稳定的钙磷溶液中沿着 *c*-轴生长出羟基磷灰石晶体, 与无 PDA 层的牙本质表面再矿化效果相比, 涂覆有 PDA 层的牙本质表面再矿化层均匀致密, 且与牙本质的结合力增强。该方法为具有良好生物相容性的牙齿修复提供了新思路。

参考文献:

- [1] FU HUA, YE TINGTING, LV PEILIAN, *et al.* Introduction of clinical preventive medicine. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 1998, **(12)**: 551–553.
- [2] LUO YING, CHENZHIQING, LIUZHAOHUI, *et al.* Effect of nano hydroxyapatite on demineralization of enamel. *Journal of Sichuan University*, 2002, **39(2)**: 286–289.
- [3] MORADIAN-OLDAK J. Self-assembly properties of recombinant engineered amelogenin proteins analyzed by dynamic light scattering and atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.*, 2000, **131(1)**: 27–37.
- [4] VEIS A. A window on biomineralization. *Science*, 2005, **307(5714)**: 1419–1420.
- [5] JONES F H. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surface Science Reports*, 2011, **42(3)**: 75–205.

- [6] GALLER K M, D'SOUZA R N, HARTGERINK J D. Biomaterials and their potential applications for dental tissue engineering. *J. Mater. Chem.*, 2010, **20(40)**: 8730–8746.
- [7] YAMAGISHI K, ONUMA K, SUZUKI T, *et al.* Materials chemistry: a synthetic enamel for rapid tooth repair. *Nature*, 2005, **433(7028)**: 819.
- [8] CHEN H, CLARKSON B H, SUN K, *et al.* Self-assembly of synthetic hydroxyapatite nanorods into an enamel prism-like structure. *Journal of Colloid & Interface Science*, 2005, **288(1)**: 97–103.
- [9] CHEN H F, TANG Z Y, LIU J, *et al.* Acellular synthesis of a human enamel-like microstructure. *Advanced Materials*, 2006, **18(14)**: 1846–1851.
- [10] HONG X, XUE S, HUI M, *et al.* The preparation and antibacterial effects of dopa-cotton/AgNPs. *Applied Surface Science*, 2011, **257(15)**: 6799–6803.
- [11] CUI J, WANG Y, POSTMA A, *et al.* Monodisperse polymer capsules: tailoring size, shell thickness, and hydrophobic cargo loading via emulsion templating. *Advanced Functional Materials*, 2010, **20(10)**: 1625–1631.
- [12] YU B, WANG D A, YE Q, *et al.* Robust polydopamine nano/microcapsules and their loading and release behavior. *Chemical Communications*, 2009, **44(44)**: 6789–6791.
- [13] YU F, CHEN S, CHEN Y, *et al.* Experimental and the oretical analysis of polymerization reaction process on the polydopamine membranes and its corrosion protection properties for 304 stainless steel. *Journal of Molecular Structure*, 2010, **982(1/2/3)**: 152–161.
- [14] ZHANG H, YANG J, LIANG K, *et al.* Effective dentin restorative material based on phosphate-terminated dendrimer as artificial protein. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2015, **128**: 304–314.
- [15] VORA R H, WANG W C, KANG E T, *et al.* Electroless plating of copper on fluorinated polyimide films modified by surface graft copolymerization with 1-vinylimidazole and 4-vinylpyridine. *Polymer Engineering and Science*, 2004, **44(2)**: 362–375.
- [16] WU D, ZHANG T, WANG W C, *et al.* Reflective and conductive surface-silvered polyimide films prepared by surface graft copolymerization and electroless plating. *Polymers for Advanced Technologies*, 2007, **19(5)**: 335–341.
- [17] LIAO Y, CAO B, WANG W C, *et al.* A facile method for preparing highly conductive and reflective surface- silvered polyimide films. *Applied Surface Science*, 2009, **255(19)**: 8207–8212.
- [18] BERNSMANN F, FRISCH B, RINGWALD C, *et al.* Protein adsorption on dopamine-melanin films: role of electrostatic interactions inferred from zeta-potential measurements versus chemisorption. *Journal of Colloid & Interface Science*, 2010, **344(1)**: 54–60.