

# SLA 表面 PDA/CPP 复合涂层的制备及其性能研究

张嘉敏<sup>1</sup>, 汪 涛<sup>1</sup>, 汤春波<sup>2</sup>, 汪乔那<sup>2</sup>, 钱海梅<sup>1</sup>, 缪润杰<sup>1</sup>

(1. 南京航空航天大学 材料科学与技术学院, 南京 211106; 2. 江苏省口腔医院, 南京 210029)

**摘 要:** 在大颗粒喷砂酸蚀(SLA)工艺形成的三维多级嵌套孔洞结构纯钛表面, 利用聚多巴胺(PDA)的超强粘附性和二次修饰功能, 接枝生物大分子酪蛋白磷酸肽(CPP), 制备 PDA/CPP 复合涂层。采用 FESEM、EDS、XPS、水接触角分析仪、体外仿生矿化测试以及人骨髓间充质干细胞(hBMSCs)实验对样品表面进行表征分析和性能测试。结果表明, 两步浸泡法成功在 SLA 表面制得 PDA/CPP 复合涂层。该涂层在保留 SLA 多孔形貌的同时, 使水接触角从 47.7°减小到 25.5°, 明显提高了 SLA 表面亲水性; 在模拟体液浸泡 1 d 后的修饰表面即沉积了致密羟基磷灰石(HA), 说明 PDA/CPP 显著加快了 SLA 表面生物矿化的速度。同时, SLA/PDA/CPP 表面细胞粘附、增殖以及矿化活性都得到了明显改善。

**关 键 词:** 聚多巴胺; 酪蛋白磷酸肽; 喷砂酸蚀; 纯钛; 生物活化

中图分类号: TQ178 文献标识码: A

## Preparation and Property of PDA/CPP Bilayer on SLA Surfaces

ZHANG Jia-Min<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>1</sup>, TANG Chun-Bo<sup>2</sup>, WANG Qiao-Na<sup>2</sup>, QIAN Hai-Mei<sup>1</sup>, MIAO Run-Jie<sup>1</sup>

(1. College of Materials Science and Technology, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 211106, China;  
2. Stomatological Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210029, China)

**Abstract:** A polydopamine/casein phosphopeptides (PDA/CPP) bilayer was prepared on the pure titanium surface with macro and micro pits formed by sandblasting with large-grit and acid-etching (SLA). The PDA interlayer with extraordinary adhesion and the capability of second functional modification, linked CPP, the natural biomolecules, to the SLA titanium surface *via* covalent bonds. This two-step immersion modification process was simple and feasible. Field emission scanning electronic microscope (FESEM), energy dispersive spectroscopy (EDS) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) were utilized to analyze microtopography and elementary composition of PDA/CPP bilayer. Contact angle analysis, biomimetic mineralization examinations and human bone marrow stem cells (hBMSCs) experiments *in vitro* were conducted to verify the biocompatibility of the modified surfaces. The results showed that the PDA/CPP bilayer was successfully grafted onto the SLA substrates through the two-step immersion method. The bilayer decreased the contact angle of SLA with pure water from 47.7° to 25.5°, showing the improved hydrophilicity obviously. Compact hydroxyapatite (HA) layer was formed after SLA/PDA/CPP immersed in simulated body fluid (SBF) for 1 d, demonstrating that the bilayer accelerated the rate of biomineralization significantly. Besides, the PDA/CPP bilayer efficiently enhanced the cell attachment, cell proliferation and cell mineralization.

收稿日期: 2017-01-24; 收到修改稿日期: 2017-03-15

基金项目: 中央高校基本科研业务费(NP2012303); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

Fundamental Research Funds for the Central Universities (NP2012303); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

作者简介: 张嘉敏(1992-), 女, 硕士研究生. E-mail: zjmmandy@163.com

通讯作者: 汪 涛, 教授. E-mail: taowang@nuaa.edu.cn

**Key words:** polydopamine; casein phosphopeptides; SLA; pure titanium; bio-activation

钛及其合金具有良好的生物相容性及力学性能, 是应用广泛的人体硬组织替代材料<sup>[1]</sup>。未经活化的钛表面生物活性低, 与骨组织间只是简单的机械互锁, 无法形成骨整合, 导致愈合周期长, 也增大了手术失败率<sup>[2]</sup>。大颗粒喷砂酸蚀(Sandblasted, Large-grit, Acid-etched, SLA)是钛基牙种植体最常用的表面处理办法, 形成的三维多级嵌套孔洞结构有效增加了种植体表面粗糙度, 获得了良好的亲水性表面, 增强了植入体与机体的机械锁合<sup>[3-4]</sup>。但是, 这种方法仍然是被动模仿人骨表面微观形貌, 不能主动诱导类骨羟基磷灰石的沉积或是直接改善表面细胞活性。

生物化学表面改性将蛋白质、酶、多肽及细胞生长因子等生物大分子固定于植入体表面, 诱导特异性生物反应, 抑制非特异性生物反应<sup>[5]</sup>。Lee 等<sup>[6]</sup>研究发现, 含有儿茶酚官能团和赖氨酸端氨基官能团的多巴胺(Dopamine)在碱性条件下, 可在玻璃、金属、陶瓷、有机物等材料表面形成具有超强粘附性的聚多巴胺(Polydopamine, PDA)薄膜。PDA 可将生物大分子固定在材料表面, 进行功能性二次修饰<sup>[7-8]</sup>。近年来, 很多研究利用 PDA 将 RGD 肽<sup>[9]</sup>、肝素、酶<sup>[10]</sup>、骨形态发生蛋白(BMP-2)<sup>[11]</sup>、细胞生长因子<sup>[12]</sup>等固定于植入体材料表面进行生物化学改性研究。

酪蛋白磷酸肽(Casein phosphopeptides, CPP)被称为“矿质载体”, 是目前唯一一种促进钙吸收的活性肽<sup>[13]</sup>。CPP 中的磷酸丝氨酸能够与钙离子结合成可溶性复合物, 提高局部钙含量, 促进羟基磷灰石的沉积<sup>[14]</sup>, 增强成骨细胞的粘附与增殖<sup>[15]</sup>。此外, CPP 还可减弱破骨细胞的作用, 使得成骨细胞在骨代谢中起主导作用, 阻止矿物质的流失并抑制骨的再吸收<sup>[16]</sup>。

本工作在 SLA 三维多级嵌套孔洞结构表面, 通过两步浸泡法制备 PDA/CPP 复合活性涂层, 目的在于用生物化学表面改性方法进一步修饰具有高比表面积的 SLA 表面, 增加植入体表面骨整合主动性, 提升生物活化效果。

## 1 实验方法

### 1.1 样品的制备与材料学表征

对圆片状纯钛(TA2)基底打磨清洗后, 使用二氯化钛沙砾喷砂至表面呈均匀深灰色, 清洗吹干; 用混酸(8%盐酸, 32%硫酸)60℃恒温腐蚀 45 min, 清洗吹干, 该样品记为 SLA。将多巴胺盐酸盐溶于

Tris-HCl 缓冲溶液中, 配制 pH=8.5, 浓度为 2 mg/mL 的多巴胺溶液; 将 CPP 溶于含有 0.1 mol/L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)、20 mmol/L N-羟基酰亚胺(EDS)、50 mmol/L 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDS)的溶液中, 配制浓度为 10 g/L 的 CPP 溶液。SLA 样品先有多巴胺溶液中浸泡 24 h, 然后在 CPP 溶液中浸泡 16 h, 取出后用 PBS 缓冲溶液(pH=7.4)冲洗并吹干, 所得样品记为 SLA/PDA/CPP。

采用场发射扫描电子显微镜(FESEM, LEO1550, 德国)观察样品表面形貌; 采用 X 射线光电子能谱仪(XPS, PHI Quantera II, 日本)分析样品表面成分组成; 采用接触角测量仪(JC2000D7M)测量样品表面与蒸馏水的静态接触角。

### 1.2 体外仿生矿化实验

将样品浸泡于模拟体液(Simulated body fluid, SBF)<sup>[17]</sup>(1:1, pH=7.4, 37.5℃)中, 每 48 h 更换模拟体液, 浸泡 1、3、5、7 d 分别取出一个样品。采用 FESEM 及能谱仪(EDS)分析表面仿生矿化情况。

### 1.3 生物细胞实验

#### 1.3.1 细胞粘附

设置空白组(无细胞无钛片)、对照组(有细胞无钛片)、SLA 及 SLA/PDA/CPP 四个组, 每组六个副孔, 置于 48 孔板底, 以  $3 \times 10^4$  个/孔接种 P4 代 hBMSCs, 接种面积为 8 mm×8 mm, 在 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 浓度以及 100%湿度下进行培养。培养 1、2、6 和 24 h 四个时间点分别用 PBS 轻洗孔底未贴壁的细胞, 更换完全培养基 500 μL; 24 h 之后更换培养体系为 200 μL, 避光加入 20 μL CCK-8 试剂, 孵育 4 h; 震荡均匀, 从每孔中吸取 150 μL 转移至 96 孔板, 在 450 nm 下用酶标仪分别测定吸光度, 读取并记录 OD 值, 计算粘附率。

#### 1.3.2 细胞增殖

同 1.3.1 培养 hBMSCs, 在 3、5 和 7 d 三个时间点更换培养体系为 200 μL, 避光加入 20 μL CCK-8 试剂, 在孵箱中孵育 4 h; 震荡均匀, 从每孔中吸取 150 μL 转移至 96 孔板; 用酶标仪在 450 nm 下分别测定吸光度, 读取并记录 OD 值, 计算细胞增殖率。

#### 1.3.3 细胞矿化

同 1.3.1 培养 hBMSCs 3~5 d, 接种面积为 2 cm×2 cm; 吸弃培养液, PBS 漂洗 3 遍; 每孔中加入 100 μL 0.25%的 Triton X-100, 再加入 200 μL 碱性磷酸酶(ALP), 37℃孵育 1 h; 在 410 nm 波长下使用酶标仪测取 OD 值, 计算 ALP 浓度。

采用单因素方差分析的检验方法对文中所有数据进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 表面形貌

喷砂酸蚀得到的 SLA 三维多级嵌套孔洞结构表面形貌如图1(a)所示, 孔洞结构类似蜂窝状, 直径十几到几十微米的大孔洞嵌套着直径几微米的小孔洞结构, 小孔洞内部还存在一些纳米级凹凸结构。改性后的 SLA/PDA/CPP 表面肉眼可见颜色变为深棕色, 微观形貌如图1(b)所示, 具有一定厚度的涂层紧贴基底表面, 尖锐的孔洞边界变得柔和, 微纳复合的孔洞结构仍然存在, 但是表面孔洞明显变少, 深度变浅。

### 2.2 表面成分

图2(A)和(B)是改性前后 SLA 表面 XPS 全谱图。

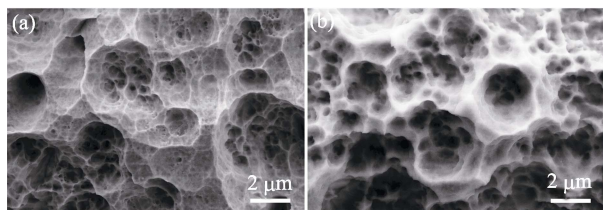


图 1 改性前后 SLA 表面 FESEM 照片

Fig. 1 FESEM images of SLA surfaces before and after PDA/CPP modification

(a) SLA; (b) SLA/PDA/CPP

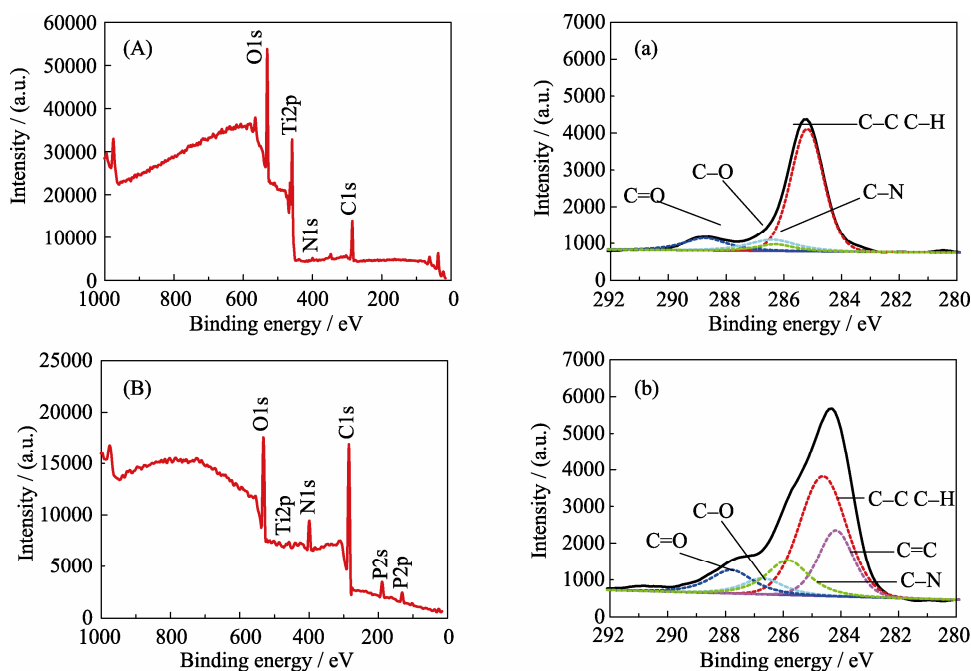


图 2 改性前后 SLA 表面 XPS 全谱图及 C1s 高分辨率图谱

Fig. 2 XPS wide scan spectra (A, B) and high resolution spectra of C1s (a, b) of SLA surfaces before (A, a) and after (B, b) PDA/CPP modification

改性后的表面 Ti2p 基本消失, 可见基底表面  $\text{TiO}_2$  层被覆盖; N1s 特征峰显著增强, 其归属于 PDA 及 CPP 中的氨基和酰胺键; 同时出现了 P2s 和 P2p 特征峰, 它们归属于 CPP 中的磷酸基团。

图2(a)和(b)是改性前后 SLA 表面 C1s 高分辨率图谱。SLA/PDA/CPP 表面出现了 C=C, 这归属于 PDA 中存在的大量苯环; 同时, C-N 及 C=O 所占面积比明显增加, 它们归属于 PDA 中的氨基及其聚合过程中残留的醌基, 以及 CPP 中包含的大量肽键(酰胺键)。

综上可知, 先后浸泡碱性多巴胺溶液及 CPP 溶液, 在 SLA 表面成功制得了 PDA/CPP 复合涂层。

### 2.3 亲水性

由接触角测量仪测得 SLA 及 SLA/PDA/CPP 表面平均水接触角分别为  $47.7^\circ$  及  $25.5^\circ$ 。SLA 表面原本粗糙度及表面能较高, 亲水性良好; PDA 为 SLA 表面引入了酚羟基以及氨基亲水基团, CPP 也含有大量羟基、羧基、氨基等亲水基团, 使得 SLA 表面接触角降低  $22.2^\circ$ , 亲水性进一步改善。

### 2.4 仿生矿化性能

浸泡 SBF 溶液后, 试样表面沉积了白色疏松球状颗粒, 与羟基磷灰石的形态一致。对此白色沉积物进行 EDS 分析可知, 表面沉积物中主要含有 P、Ca 和 O 元素, 钙磷原子比(Ca/P)为 1.67, 与羟基磷灰石原子比 1.67 一致, 证明表面沉积的是羟基磷灰石(HA)。

如图 3 所示, 在 SBF 溶液浸泡 1 d 之后, SLA 表面形貌未发生明显改变, 直到浸泡 7 d 后的 SLA 表面才被平整的 HA 层完全覆盖, 并且存在严重开裂。SLA/PDA/CPP 样品表面浸泡 SBF 溶液 1 d 之后即生长出大量的球状 HA, 细小的 HA 颗粒紧贴基底孔洞内壁以及孔洞边界生长, 基底的三维多孔形貌保存良好; 浸泡 3、5 及 7 d 后, 表面 HA 颗粒尺寸逐渐变大, 没有产生明显裂纹。可见, SLA/PDA/CPP 表面 HA 形核及长大的速度快, 数量多, HA 层与基底结合紧密且稳定, 说明 PDA/CPP 复合涂层能够显著改善基底表面生物矿化性能。这是由于亲水的多孔钛表面能够迅速被 SBF 浸润, 表面 CPP 涂层中的磷酸丝氨酸能够与  $\text{Ca}^{2+}$  形成可溶性复合物, 增加试样周围游离  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度; 均匀分布于多孔钛表面的磷酸丝氨酸起模板剂作用, 为 HA 提供密集的形核位点; HA 中的  $\text{Ca}^{2+}$  与基底表面 PDA/CPP 复合涂层之间的共价结合同时增加了界面结合强度。球状 HA 颗粒尺寸小, 较为独立, 内应力小, 因此 HA 层稳定, 不容易破裂。

## 2.5 细胞粘附

如图 4 所示, SLA 表面在 1、2、6、24 h 四个时

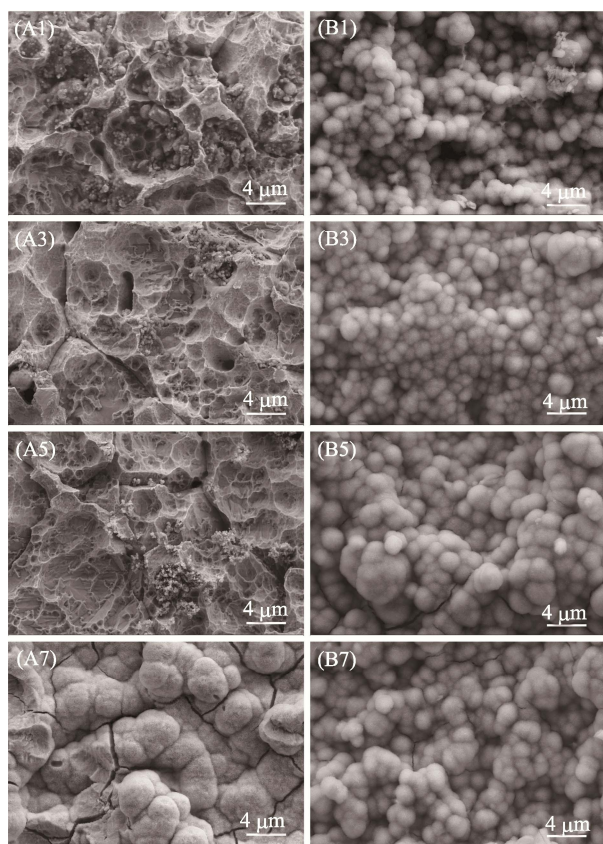


图 3 SLA(A)和 SLA/PDA/CPP(B)在 SBF 溶液分别浸泡 1、3、5、7 d 后表面的 FESEM 照片  
Fig. 3 FESEM images of SLA (A) and SLA/PDA/CPP (B) immersed in SBF solution for 1, 3, 5 and 7 d

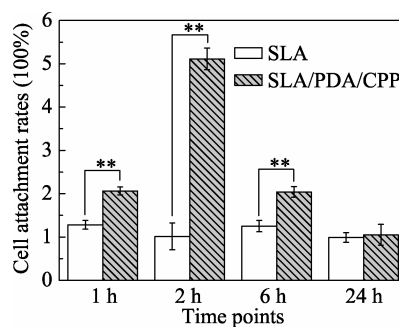


图 4 改性前后 SLA 表面细胞粘附率测试结果, \*\*表示两组数据之间存在显著统计学差异( $p<0.01$ )

Fig. 4 Cell Attachment rates on SLA surfaces before and after PDA/CPP modification, with \*\* indicating a highly statistically significant difference ( $p<0.01$ )

间点的细胞粘附率基本稳定在 1.00 左右; SLA/PDA/CPP 表面 2 h 的细胞粘附率高达 5.11, 1 h 与 6 h 的细胞粘附率都超过 2.00, 与同时时间点的 SLA 表面细胞粘附率之间存在显著统计学差异( $p<0.01$ ); 24 h 的细胞粘附率略高于 SLA 表面, 二者不存在统计学差异。结果表明, SLA/PDA/CPP 表面早期细胞粘附率整体高于 SLA 表面, PDA/CPP 复合涂层能够促进 SLA 表面早期细胞粘附, 原因在于: (1) PDA/CPP 涂层并未改变 SLA 钛基底的多孔形貌, 其有利于细胞伪足的攀附; (2) CPP 是不同氨基酸组成的生物活性短肽, 易于与细胞表面的整合素结合<sup>[18-20]</sup>; (3) CPP 表面的氨基、羧基等官能团与细胞表面有机物质发生反应, 促进伪足的形成, 从而有利于细胞粘附。

## 2.6 细胞增殖

如图 5 所示, 在三个时间点, PDA/CPP 改性后的 SLA 表面细胞增殖率都大于改性前的 SLA 表面, 并且每组数据之间都存在显著统计学差异( $p<0.01$ )。随着细胞孵育时间的延长, SLA 及 SLA/PDA/CPP 表面的细胞增殖率都逐渐增加, SLA 表面 5 d 的细胞增殖率相比于 3 d 增加了 0.18, 7 d 的细胞增殖率相比

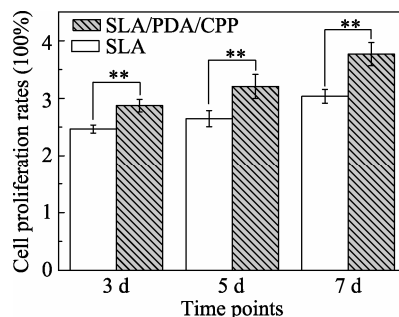


图 5 改性前后 SLA 表面细胞增殖率测试结果, \*\*表示两组数据之间存在显著统计学差异( $p<0.01$ )

Fig. 5 Cell proliferation on SLA surfaces before and after PDA/CPP modification, with \*\* indicating a highly statistically significant difference ( $p<0.01$ )



于 5 d 增加了 0.39; 而 SLA/PDA/PPP 表面 5 d 的细胞增殖率相比于 3 d 增加了 0.33, 7 d 的细胞增殖率相比于 5 d 增加了 0.57。可见 PDA/PPP 复合涂层不仅能够提高表面细胞增殖率, 而且能够加快细胞增殖的速率。这是因为 PPP 中的磷酸丝氨酸与  $\text{Ca}^{2+}$  可形成可溶性复合物, 使得试样表面  $\text{Ca}^{2+}$  富集<sup>[15]</sup>, 高钙状态能够协同为细胞迁移产生动力的肌动蛋白丝, 促进细胞的迁移, 从而改善细胞增殖活性<sup>[21]</sup>。

## 2.7 早期 ALP 活性分析

碱性磷酸酶(ALP)是成熟成骨细胞的标志性酶, ALP 的活性可以反映成骨细胞分化过程的早期矿化程度。改性前后 SLA 表面 ALP 活性检测数据显示, SLA/PDA/PPP 表面 ALP 浓度大于 SLA 表面, 两组数据之间存在显著统计学差异( $p < 0.01$ ), 说明 PDA/PPP 对细胞矿化同样有促进作用。这主要是由于高钙浓度是成骨细胞形成的重要条件<sup>[22]</sup>, PPP 中磷酸丝氨酸促进生理环境中  $\text{Ca}^{2+}$  在试样表面的富集, 促进 hBMSCs 向成骨细胞分化, 因而改善了细胞矿化活性。

## 3 结论

通过两步浸泡法, 在 SLA 表面成功制备了 PDA/PPP 复合涂层, 同时保留了 SLA 原有的三维多级嵌套孔洞结构。该涂层使 SLA 表面水接触角从 47.7°降低至 25.5°, 有效提高了表面亲水性; 将诱导羟基磷灰石层形成的时间由 7 d 缩短至 1 d, 显著加快了表面生物矿化的速度; 生成的 HA 层致密且无裂痕, 可见 PDA/PPP 复合涂层促进了类骨羟基磷灰石与基底界面的结合。同时, 生物细胞实验显示, PDA/PPP 能够有效提高细胞早期粘附率、增殖率以及矿化活性。该工艺简易有效, 将生物化学改性方法结合于物理化学改性之上, 效果显著。

## 参考文献:

- [1] FU YAN-QAN, SONG YUE-QING, *et al.* Research and application of typical aerospace titanium alloys. *Chinese Journal of Rare Metals*, 2006, **30(6)**: 850–855.
- [2] PONSONNET L, REYBIER K, JAFFREZIC N, *et al.* Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behavior. *Materials Science and Engineering: C*, 2003, **23(4)**: 551–560.
- [3] DONG FEI, DING ZHONG-JUAN, NIU TAO. Effects of  $\text{TiO}_2$  blasted and acid-etched titanium surfaces on oxide-film and osteoblast. *West China Journal of Stomatology*, 2008, **26(1)**: 10–14.
- [4] LI DE-HUA, LIU BAO-LIN, SONG YING-LIANG, *et al.* Improvement of osseointegration titanium dental implants by a modified sandblasted surface. *West China Journal of Stomatology*, 2003, **38(4)**: 254–256.
- [5] LIU SHI-MIN, ZHOU YU. Study on development and tendency of bioactive coatings on titanium alloys surface. *Journal of Materials Engineering*, 2009(7): 88–92.
- [6] LEE H, DELLATORE S M, MILLER W M, *et al.* Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science*, 2007, **318**: 426–430.
- [7] WANG XUE-GUI, LAN HUA-LIN, WANG YI, *et al.* The mechanism of adhesion and film forming and their applied research progress of mussel adhesion proteins *Journal of Functional Materials*, 2014(14): 14013–14020.
- [8] KU S H, RYU J, HONG S K, *et al.* General functionalization route for cell adhesion on non-wetting surfaces. *Biomaterials*, 2010, **31(9)**: 2535.
- [9] CHIEN C Y, LIU T Y, KUO W H, *et al.* Dopamine-assisted immobilization of hydroxyapatite nanoparticles and RGD peptides to improve the osteoconductivity of titanium. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013, **101(3)**: 740–747.
- [10] NIJHUIS, BEUKEN, BOERMAN, *et al.* 1-step versus 2-step immobilization of alkaline phosphatase and bone morphogenetic protein-2 onto implant surfaces using polydopamines. *Tissue Engineering: Part C*, 2013, **19(8)**: 610–629.
- [11] CHIEN TSAI. Poly (dopamine)-assisted immobilization of Arg-Gly-Asp peptides, hydroxyapatite, and bone morphogenetic protein-2 on titanium to improve the osteogenesis of bone marrow stem cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2013, **5(15)**: 6975–6983.
- [12] POH C K, SHI Z L, LIM T Y, *et al.* The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells *in vitro*. *Biomaterials*, 2010, **31(7)**: 1578–1585.
- [13] ZHANG MIN-ZHEN, LI MING-XIN, WANG GUO-FU, *et al.* Evaluation of the biomineralization of PEC film graft CPP on medical titanium alloy. *Materials Review*, 2014, **28(6)**: 55–58.
- [14] FAN Z, WANG J, WANG Z, *et al.* Casein phosphopeptide-biofunctionalized graphene biocomposite for hydroxyapatite biomimetic mineralization. *Journal of Physical Chemistry C*, 2013, **117(20)**: 10375–10382.
- [15] DONIDA BM, MRAK E, GRAVAGHI C, *et al.* Casein phosphopeptides promote calcium uptake and modulate the differentiation pathway in human primary osteoblast-like cells. *Peptides*, 2009, **30(12)**: 2233–2241.
- [16] WANG LIN, PIAO YIN-ZHONG, WANG JIN-QING, *et al.* Adhesion and proliferation of osteoblasts on the surface of titanium alloy modified by chitosan-casein phosphopeptides. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2011, **5(21)**: 3811–3814.
- [17] TADASHI K, HIROAKI T. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity. *Biomaterials*, 2006, **27(15)**: 2907–2915.
- [18] YANG DA-ZHI, HAO JIE, ZHENG QI-XIN. Surface modification of biomaterials with polypeptides. *International Journal of Biomedical Engineering*, 2004, **27(2)**: 65–68.
- [19] ANSELME K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 2000, **21(7)**: 667–681.
- [20] ARNAOUT M A, GOODMAN S L, XIONG J P. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Current Opinion in Cell Biology*, 2002, **14(5)**: 641–651.
- [21] WANG HAI-JIE, TAN YU-ZHEN. The distribution of actin and the level of  $\text{Ca}^{2+}$  in the activated macrophages. *Acta Anatomica Sinica*, 2001, **32(3)**: 251–254.
- [22] KNABE C, GILDENHAAR R, BERGER G, *et al.* Morphological evaluation of osteoblasts cultured on different calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 1997, **18(20)**: 1339–1347.