

聚多巴胺修饰钛表面纳米载银及其抗菌和细胞相容性

谭 英¹, 谭帼馨¹, 宁成云², 容锡沧³, 张 余³, 周 蕾¹

(1. 广东工业大学 轻工化工学院, 广州 510006; 2. 华南理工大学 材料科学与工程学院, 广州 510641; 3. 广州军区总医院 骨科医院, 广州 510010)

摘 要: 通过多巴胺自聚合在钛表面构建了仿生聚多巴胺(PDA)膜层, 有利于类骨羟基磷灰石在钛表面的沉积, 体现了良好的生物活性。利用聚多巴胺的螯合效应及还原性, 将纳米银颗粒载入聚多巴胺修饰钛表面; 利用场发射扫描电镜(FE-SEM)、X 射线光电子能谱(XPS)、显微激光拉曼光谱(Raman)和石墨炉原子吸收光谱(GF-AA5)对聚多巴胺/纳米银修饰钛表面的银粒径、含量及离子释放进行表征。采用杀菌率和表面细菌粘附对聚多巴胺/纳米银修饰钛表面的体外抗菌性能进行检测, 研究结果表明: 纳米银对金黄色葡萄球菌具有较强的杀菌能力, 且 MC3T3-E1 细胞早期粘附和增殖结果证实本研究得到的聚多巴胺/纳米银修饰钛表面具有良好的体外细胞相容性。

关 键 词: 钛; 聚多巴胺; 纳米银颗粒; 抗菌性能; 细胞相容性

中图分类号: TB331 文献标识码: A

Bioinspired Polydopamine Functionalization of Titanium Surface for Silver Nanoparticles Immobilization with Antibacterial Property

TAN Ying¹, Tan Guo-Xin¹, NING Cheng-Yun², RONG Xi-Cang³, ZHANG Yu³, ZHOU Lei¹

(1. School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. College of Materials Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China; 3. Department of Orthopedics, General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

Abstract: A bioinspired polydopamine (PDA) layer was deposited on titanium surface by simply dipping the substrate into an alkaline dopamine solution. The *in vitro* bioactivity of the polydopamine coated titanium was assessed by incubation in simulated body fluids (SBF). The results showed that surface-anchored catecholamine moieties in polydopamine enriched the interface with calcium ions, facilitating the deposition of hydroxyapatite. Silver nanoparticles (AgNPs) were metallised on the PDA-grafted titanium surface in mild aqueous environments. About 14% silver release as Ag⁺ ions were found after 5 d when the surfaces were exposed to deionized water. The AgNPs showed an efficient microbicidal activity against *Staphylococcus Aureus* bacterial strains, while not significantly affecting osteoblast cells (MC3T3-E1) viability.

Key words: titanium; polydopamine; silver nanoparticles; antibacterial property; cytocompatibility

钛及其合金作为骨齿科硬组织替换材料, 植入体内后的细菌感染是其植入失败的主要原因之一。纳米银因其极大的比表面积, 较强的渗透性等特点

成为抗菌材料的研究热点。然而, 鉴于纳米银潜在的细胞毒性, 提高纳米银修饰钛表面的细胞相容性和成骨活性具有重要意义。类生物组织膜的构建可

收稿日期: 2014-03-31; 收到修改稿日期: 2014-05-06

基金项目: 国家 973 计划项目(2012CB619100); 国家自然科学基金(51372087, 81271957)

National Key Basic Research Program of China (2012CB619100); National Natural Science Foundation of China (51372087, 81271957)

作者简介: 谭 英(1988-), 女, 硕士研究生. E-mail: tanying223@163.com

通讯作者: 谭帼馨, 副教授. E-mail: tanguoxin@126.com

以使材料避免免疫排斥反应和巨噬细胞的攻击, 提高材料的生物相容性, 此外, 表面的活性识别位点可供细胞和分子产生特异性响应^[1]。Qu 等^[2]通过溶胶-凝胶法在钛表面制得含纳米银的类羟基磷灰石涂层, Giglio 等^[3]通过电聚合将水凝胶仿生涂层引入钛表面, 然后浸入到纳米银的悬浮液中得到纳米银/水凝胶复合涂层, 两者结果均证明复合涂层具有较高的抗菌率的同时具有良好的生物活性。目前, 仿贻贝粘连蛋白的聚多巴胺(PDA)因其具有极强的粘附性, 能够在各种基质上自聚成膜^[4], 提高材料表面亲水性和生物相容性^[5]等特点而广泛用于生物材料表面修饰。Xu 等^[6]还证实聚多巴胺能够显著增强活性陶瓷的生物活性, 有利于成骨细胞的增殖、分化和基因表达。此外, 聚多巴胺具有一定的还原性, 能够实现材料表面的无电金属化, 如 Ball 等^[7]将聚多巴胺改性后的聚苯乙烯培养皿浸入硝酸银溶液中, 表面得到纳米银层, 证实其具有良好的抗菌性能。本研究利用多巴胺自聚合在钛表面构建出仿生聚多巴胺层, 测试了聚多巴胺层的体外生物活性; 利用聚多巴胺的金属离子络合作用和还原能力, 在钛表面制备出聚多巴胺/纳米银复合膜层, 并对其进行体外抗菌性能和细胞相容性研究, 旨在得到兼具良好生物活性和抗菌性能的钛基植入材料。

1 实验方法

1.1 钛表面聚多巴胺仿生修饰及体外生物活性

医用纯钛片用 HNO_3/HF 溶液预处理后浸入 60℃ piranha 溶液($V_{\text{H}_2\text{SO}_4} : V_{\text{H}_2\text{O}_2} = 7:3$)中反应 30 min(将制得的钛样品命名为 pTi), 后将其浸入到 pH 为 8.5, 浓度为 2 g/L 的盐酸多巴胺溶液中振荡反应 24 h, 用去离子水超声 10 min, 烘干, 得到聚多巴胺修饰钛(Ti-PDA), 以 HNO_3/HF 酸处理钛(Ti)为实验对照。为了检验聚多巴胺修饰钛样品的体外生物活性, 采用日本 Kukob 等^[8]的配方配制模拟体液, 37℃条件下将聚多巴胺修饰前后的钛样品恒温振荡矿化 5 d, 每天换液, 干燥备用。

1.2 聚多巴胺修饰钛表面纳米载银

将实验 1.1 中制得的 Ti-PDA 样品浸入到 20 mmol/L 的硝酸银溶液中反应 1 h, 后用去离子水反复清洗, 氮气吹干, 得到聚多巴胺/纳米银修饰钛样品(Ti-PDA-Ag)。为了检验纳米银修饰钛表面银离子的释放, 将 1 cm^2 大小的 Ti-PDA-Ag 样品浸入到去离子水中, 37℃恒温振荡一定时间(6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、5 d)后, 更换去离子水, 通过石墨炉原子吸收光谱仪

(Z-5000, Hitachi, Japan)测定更换液中的 Ag^+ 浓度, 平行 3 次测量。

1.3 样品表征

采用荷兰 FEI 公司 Nova NanoSEM430 扫描电镜观察样品表面的微观形貌; 通过德国 Zeiss 公司的 DIGIDROP 型接触角测定仪测试样品表面亲水性, 测量温度为 25℃, 平行测量 5 次; 采用德国 Bruker 公司 Vector33 型傅里叶变换衰减全反射红外光谱仪分析矿化后样品表面的沉积物, 分辨率为 4 cm^{-1} ; 采用美国 Thermo 公司 ESCALAB 250 型光电子能谱仪分析样品表面化学组成, 以单色 $\text{AlK}\alpha$ 射线(15 kV, 150 W, $h\nu=1486.6$ eV)进行测定, 用 C1s 结合能(284.8 eV)为标准进行能量校正; 样品表面的拉曼光谱通过法国 HJY 公司的 LabRAM Aramis 型显微激光拉曼光谱仪($\lambda=532$ nm)进行分析。

1.4 体外抗菌性能

以金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)为试验株检验钛表面的抗菌性能, 操作如下: 将 $\phi 1$ cm 的钛样品置于 48 孔培养皿中, 用无菌移液管移取 1 mL 金黄色葡萄球菌悬液(10^6 CFU/mL)于样品表面, 在 37℃生化培养箱中共培养 24 h 后, 利用倒平板法计算菌落总数, 以 Ti 为对照组, 杀菌率($R\%$)按下式进行计算:

$$R\% = \frac{\text{对照组平均菌落数} - \text{实验组平均菌落数}}{\text{对照组平均菌落数}} \times 100\% \quad (1)$$

样品表面细菌粘附实验操作如下: 按照上述步骤将共培养 6 h 的样品浸泡到无菌 PBS 溶液(pH=7.4)中洗去未粘附的细菌, 戊二醛固定, PBS 清洗后用梯度浓度的乙醇脱水, CO_2 临界点干燥后喷金置于扫描电镜(Nova NanoSEM430, FEI, Netherlands)下观察。

1.5 体外细胞相容性

将 Ti、pTi、Ti-PDA 和 Ti-PDA-Ag 四组样品分别置于 48 孔培养板中, 移取 500 μL 小鼠 MC3T3-E1(ATCC CRL-2593)细胞悬液以 2×10^4 cells/mL 浓度接种到 48 孔板中, 置于 37℃、5% CO_2 细胞培养箱内培养 12 h, 按照实验 1.4 中方法固定、脱水、干燥, 置于电镜下观察材料表面细胞的粘附。

四组样品按照上述步骤培养 1 d、3 d、5 d 和 7 d 后, 吸弃旧培养基, PBS 清洗后每孔加入 300 μL 新鲜培养基和 30 μL 溴化-3-(4, 5-二甲基噻唑基-2)-2, 5-二苯基四唑(MTT)溶液, 孵育 3 h 后轻轻敲打混匀, 用酶标仪(Multiskan FC, Thermo Scientific, America)在 490 nm 波长下测定 OD 值, 以样品 Ti 作为对照

样。采用 SPSS15.0 统计学软件对四组样品的吸光度值进行处理。

2 结果与讨论

2.1 钛表面聚多巴胺仿生修饰及体外生物活性

研究表明,羟基化表面因其可以与聚多巴胺中的邻苯二酚基团发生脱水形成双齿类配位体^[9],增强聚多巴胺在表面的粘附。本研究通过 piranha 溶液处理酸洗钛表面,一方面活化钛表面使其富含羟基,另一方面使钛表面纳米结构化,增强聚多巴胺层的结合力。图 1 是聚多巴胺接枝前后钛表面的微观形貌和水的接触角对比分析。 HNO_3/HF 酸处理后钛表面为亚微米台阶形貌,台阶边缘高度约为 $0.2\sim 1\ \mu\text{m}$,表面均匀分布 HF 刻蚀形成的纳米突起;piranha 氧化处理后(图 1(b)),材料表面形成以纳米针结构为特征的不规则网络形貌;多巴胺发生自聚合后,在纳米网结构的钛表面构建出均匀颗粒状的仿生 PDA 膜层。Zhang 等^[10]已证实多巴胺在碱性条件下先经过一系列复杂的环化、氧化作用和分子内重排反应,形成聚多巴胺的纳米颗粒,溶液中的聚多巴胺纳米颗粒吸附在材料表

面,形成聚多巴胺单分子层。由此可以推断,Ti-PDA 表面的纳米颗粒为聚多巴胺。固体材料表面的亲水性与其表面形貌和成分密切相关,由图 1(d)可知,piranha 溶液处理后,钛表面的水接触角由未处理样的 $(97.5^\circ \pm 3.0^\circ)$ 减小到 $(13.3^\circ \pm 4.4^\circ)$,这是因为 piranha 氧化液可在钛表面形成一层富含 Ti-OH 基团的非晶态 TiO_2 ,导致亲水性和表面自由能显著增加;聚多巴胺修饰后,钛表面水接触角为 $(66.9^\circ \pm 2.9^\circ)$,一方面证实了聚多巴胺因含有大量的酚羟基和含氮基团而具有亲水性,另一方面水接触角的变化间接证实聚多巴胺层均匀覆盖在纳米结构化钛表面。

目前多巴胺自聚合形成的聚多巴胺薄膜的精细结构尚不清楚,但普遍认为其分子末端含丰富的酚羟基和醌基,能够在矿化液环境中吸附 Ca^{2+} 形成不可逆的有机金属络合物^[11],其进一步吸附溶液中的 PO_4^{3-} ,使羟基磷灰石牢固沉积在聚多巴胺薄膜表面,体现良好的生物活性。Ryu 等^[12]利用超声和剥离实验证实,聚多巴胺仿生沉积的羟基磷灰石涂层具有较强的结合力。图 2 是酸处理钛、纳米结构化钛及聚多巴胺自组装钛表面矿化 5d 后的电镜照片和红外结果。由图可知,相较 Ti, pTi 和 Ti-PDA

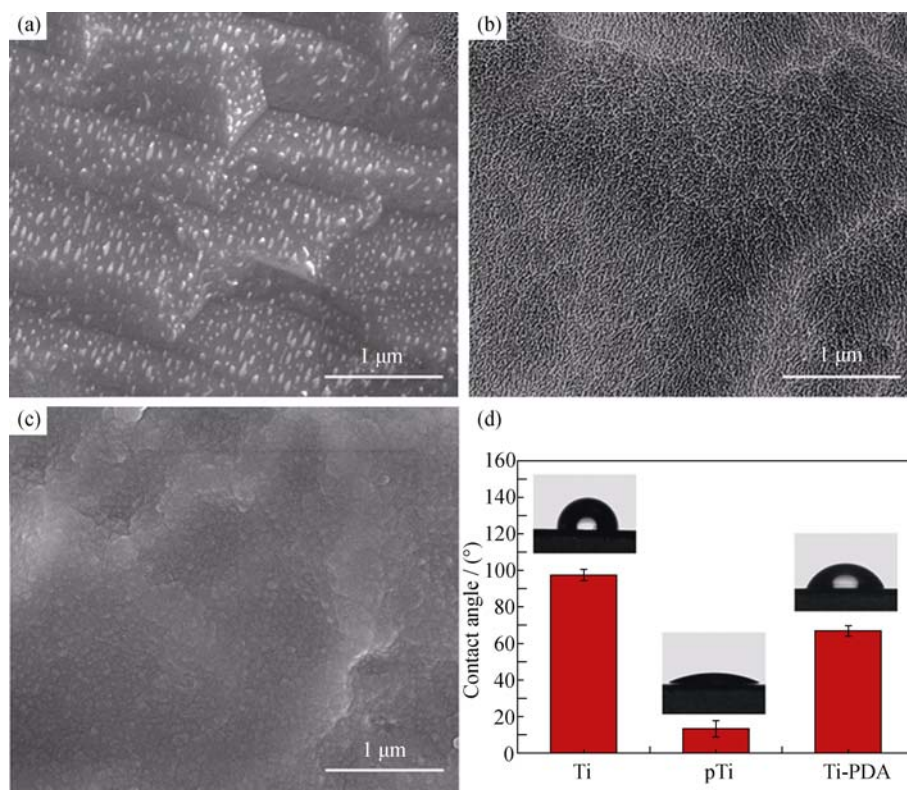


图 1 酸处理钛(a)、纳米结构化钛(b)和聚多巴胺修饰钛(c)表面的扫描电镜照片及水的接触角(d)
Fig. 1 SEM images (a-c) and water contact angle (d) of Ti (a), pTi (b) and Ti-PDA(c)

表面均有白色沉淀物沉积, 且 pTi 表面为不规则的絮状团聚物, 没有特定形貌, Ca/P 为 1.1, 可能为磷灰石的初期形核物; Ti-PDA 样品表面的沉积物呈半球状, 且表面为片状形貌, 为典型的类骨磷灰石形貌, Ca/P 为 1.4, 接近人体骨中的比值。

图 2(d) 为 pTi 和 Ti-PDA 样品矿化 5 d 后的红外图谱。其中 574 cm^{-1} 和 602 cm^{-1} 附近是 PO_4^{3-} 的 P-O 键的弯曲振动引起的吸收峰^[12]; 1032 cm^{-1} 附近的吸收谱归属于 PO_4^{3-} ; 626 cm^{-1} 、 1620 cm^{-1} 和 3350 cm^{-1} 附近的吸收峰是 OH 的特征谱带, 这些特征谱带进一步证实了矿化后得到的产物为羟基磷灰石(HA), 且 1032 cm^{-1} 附近的吸收峰较宽, 没有分裂为多个峰, 说明沉积的是无定型 HA^[13]。从红外图谱中还可以看出产物中基本不含其他杂质离子, 但是在 873 cm^{-1} 和 $1400\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 出现 CO_3^{2-} 特征谱带, 且 $1400\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 分裂成两个吸收峰, 它区别于碳酸盐的单峰, 是 CO_3^{2-} 进入磷灰石结构的重要标志, 说明本研究矿化形成的 HA 中的部分 PO_4^{3-} 被 CO_3^{2-} 取代^[14]。已有研究证实, 自然骨中磷灰石呈针状纳米晶体结构, 含以碳酸根为主的无机离子^[15], 因此仿自然骨的含碳酸根的羟基磷灰石的沉积体现了聚多巴胺修饰钛表面良好的成骨活性。

2.2 聚多巴胺修饰钛表面纳米载银

纳米银含量、形状及尺寸等对材料的抗菌性能有着重要的影响, Castanon 等^[16]证明, 较小粒径的纳米银具有更强的杀菌能力, 其原因是小粒径的纳米银比表面积更大, 更容易穿透细菌的细胞壁。图 3(a) 为 Ti-PDA-Ag 表面的 SEM 照片及利用 Image J 图像软件统计的该表面纳米银颗粒的粒径结果。研究表明, 纳米银呈球形颗粒状, 尺寸均匀, 平均粒径为 $(16.4 \pm 2.6)\text{ nm}$ 。图 3(b) 的 XPS 显示, XPS 宽谱中 400 eV 左右出现一个较强的 N 1s 峰, 归属于 PDA, XPS 定量结果计算其表面 O/C 比值为 0.32, 与 PDA 结构理论值 0.25 较为接近, 说明 PDA 成功自聚合在纳米结构化钛表面。结合能约为 370 eV 处有两个很强的 Ag 3d 峰, 分别对应 $\text{Ag}^0 3d_{5/2}$ (368.0 eV) 和 $\text{Ag}^0 3d_{3/2}$ (374.0 eV)^[17], 说明纳米银沉积在 Ti-PDA 表面, 且以银单质形式存在, 证明聚多巴胺层具有一定的还原性。XPS 定量结果显示银元素所占的原子百分比含量为 0.37%, 说明钛表面仍富含大量的酚羟基和醌基等活性基团, 且 Saidin 等^[18]证实, 聚多巴胺固定纳米银颗粒之后(银元素所占原子百分比为 0.2%), 仍能较好地诱导羟基磷灰石在其表面沉积, 因此可以推测, 本研究得到聚多巴

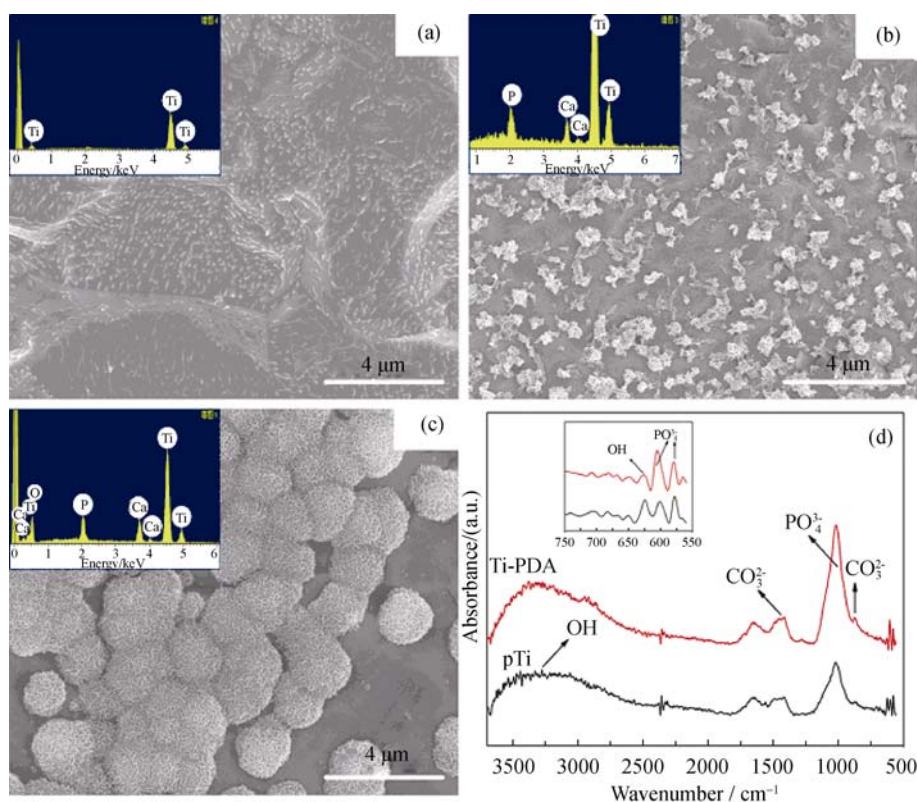


图 2 钛样品在模拟体液中矿化 5 d 后的电镜照片、能谱和红外图谱

Fig. 2 SEM images, EDS spectra (a-c) and FTIR spectra (d) of Ti (a), pTi (b) and Ti-PDA (c) after 5 d in simulated body fluid

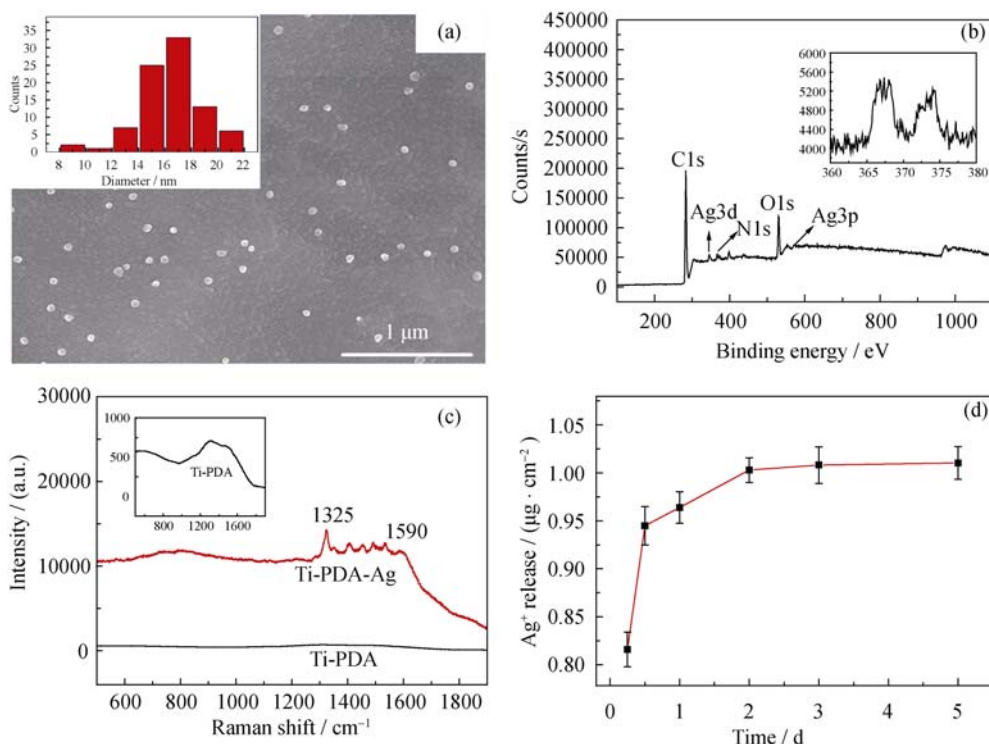


图 3 聚多巴胺修饰钛表面纳米载银 SEM(a)、XPS(b)、Raman(c)及银离子溶出(d)
Fig. 3 SEM (a), XPS (b), Raman spectrum (c) and release of Ag^+ (d) of Ti-PDA-Ag

胺/纳米银复合膜层将具有较好的生物活性。

纳米银颗粒具有表面增强拉曼散射(SERS)特性,且纳米银粒子的大小、形状等材料表面 SERS 影响显著^[19]。由拉曼光谱(图 3(c))可知,聚多巴胺修饰钛表面在 $1300\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 出现一个宽峰,峰强较弱,来源于聚多巴胺结构中苯环的伸缩振动(1325 cm^{-1})和变形振动(1590 cm^{-1})^[20]。Ti-PDA-Ag 表面 $1300\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 范围内出现较多精细强峰,且峰强度为 Ti-PDA 样品峰强度的 10 倍以上,说明纳米银负载在 Ti-PDA 样品表面。聚多巴胺辅助还原得到的纳米银与聚多巴胺中的酚羟基和醌基等存在较强的金属螯合作用,具有较强结合力^[21],因此本研究不考虑银离子释放过程中纳米银的脱落。图 3(d)为 Ti-PDA-Ag 样品 Ag^+ 累积释放量与浸泡时间的关系图,结果表明,释放初期(2d),银离子释放显著,后趋于稳定;由原子吸收光谱测定出 Ti-PDA-Ag 样品在 13%的 HNO_3 溶液浸泡 16 h 后,其表面的总载银量为 $(7.1\pm 0.9)\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$,说明释放 5 d 后溶出的银约占总载银量质量分数的 14%,可以预见,纳米银修饰的钛表面具有持久的抗菌性能。

2.3 体外抗菌性能

已有研究表明,聚多巴胺结构中存在的苯酚类物质能够抑制有害细菌的繁殖与生长^[22],但其抗菌作用远远达不到常规的抗菌要求。图 4 为不同样品

的杀菌率结果照片,研究结果表明,纳米结构化和聚多巴胺修饰钛表面对金黄色葡萄球菌没有明显的抗菌作用,由公式(1)计算得到的杀菌率分别为 2.4%和 12.3%;聚多巴胺/纳米银修饰钛表面具有较强的杀菌作用,抑菌率达到 99.9%。目前普遍认为纳米银之所以具有抗菌作用一方面是因为其释放银离

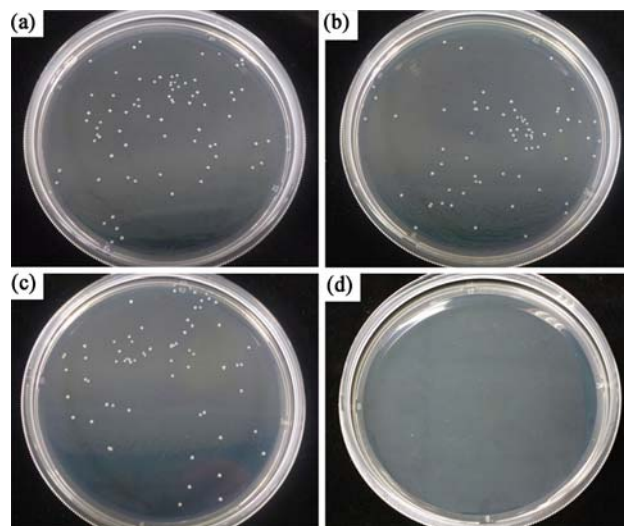


图 4 Ti(a)、pTi(b)、Ti-PDA(c)和 Ti-PDA-Ag(d)样品对金黄色葡萄球菌的抑菌能力照片

Fig. 4 Typical photographs of re-cultivated *Staphylococcus Aureus* colonies on agar

Ti (a), pTi (b), Ti-PDA (c) and Ti-PDA-Ag (d)

子, 其抗菌机理与银离子类似; 另一方面纳米粒子本身能够引起细胞膜的完整性或渗透屏障的破坏, 导致胞内物质流失, 从而杀灭细菌^[23]。纳米银具有长效抗菌作用则源于其释放的银离子在杀灭细菌后, 可以从死亡的细菌体中游离出来, 再与其他菌群接触, 周而复始进行杀菌过程。

细菌在种植体表面的粘附是种植体周围炎发生发展的起始, 破坏细菌在种植体表面的粘附可以有效地减少细菌在种植体表面的聚集, 从而增加种植体的成功率。电镜结果(图 5)显示, Ti、pTi 和 Ti-PDA 样品表面粘附的细菌数量无明显差异, 三者样品表面部分细菌聚集成团, 容易形成生物膜, 细菌在生物膜的保护下, 使抗菌剂难以很好地发挥作用^[24]。Ti-PDA-Ag 表面细菌粘附数量大大减少, 分布较散, 且部分细菌的细胞发生破裂, 说明纳米银修饰表面具有良好的杀菌和抗细菌粘附作用。

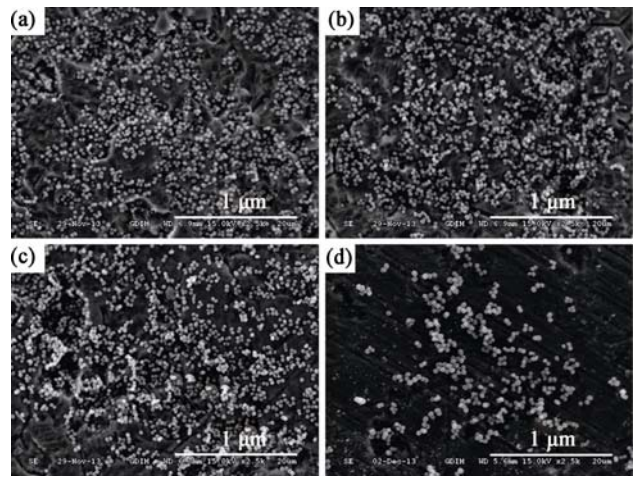


图 5 样品表面金黄色葡萄球菌在 Ti(a)、pTi(b)、Ti-PDA(c) 和 Ti-PDA-Ag(d)上粘附的 SEM 照片
Fig. 5 SEM images of the Ti (a), pTi (b), Ti-PDA (c) and Ti-PDA-Ag (d) surfaces after incubation with *Staphylococcus Aureus* for 6 h

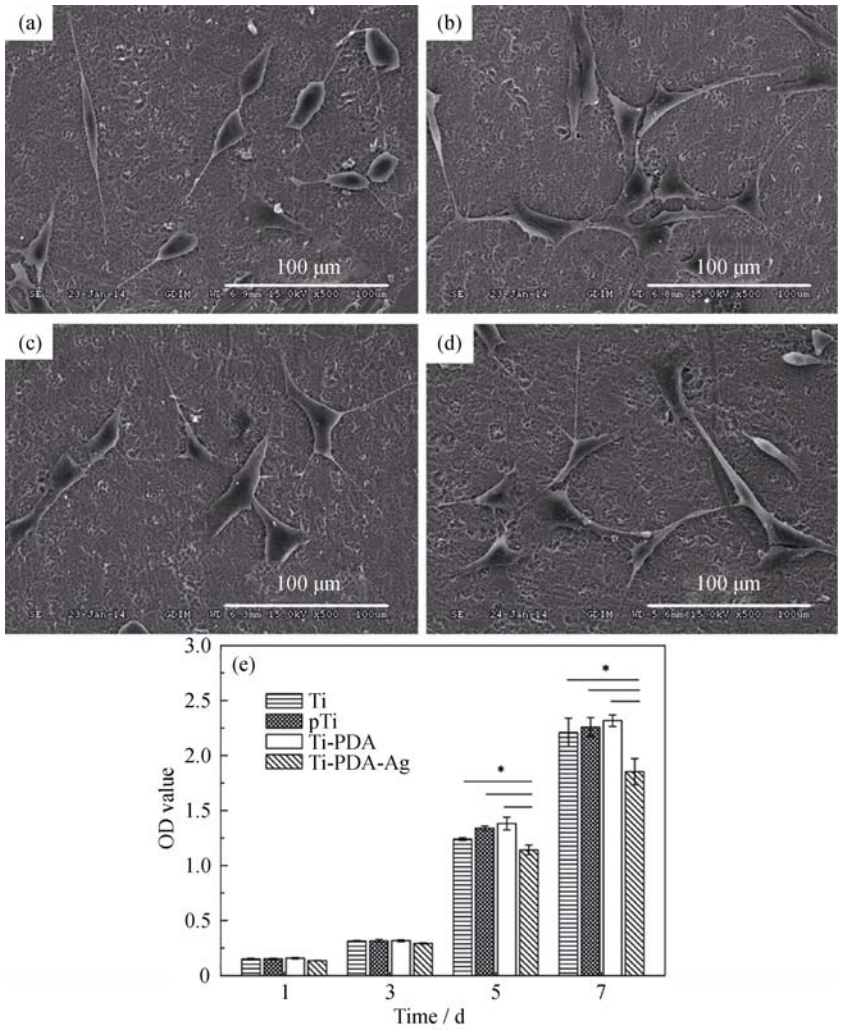


图 6 样品表面 MC3T3-E1 细胞在 Ti(a)、pTi(b)、Ti-PDA(c)、Ti-PDA-Ag(d)上粘附的 SEM 照片及 MTT 检测结果(e)
Fig. 6 SEM images showing the morphology of MC3T3-E1 cells after 12 h of culture on Ti (a), pTi(b), Ti-PDA (c), Ti-PDA -Ag (d) and MC3T3-E1 proliferation measured using MTT after incubation for 1, 3, 5 and 7 d ($n=5, p<0.05$) (e) *represents significant difference

2.4 体外细胞相容性

生物材料植入体内后将与组织和细胞直接接触,因此必须具备良好的生物相容性。图 6 为钛表面 MC3T3-E1 细胞的早期粘附和增殖情况。图 6(a)显示,对照样 Ti 表面 MC3T3-E1 细胞呈椭球状和长梭形,并有少量伪足伸展;而 pTi、Ti-PDA 和 Ti-PDA-Ag 表面细胞呈不规则多边形铺展,细胞伸出较多伪足,且细胞之间通过伪足相互交联,证实钛表面纳米结构和聚多巴胺仿生膜层有利于细胞的早期粘附。MTT 结果(图 6(e))表明,细胞在材料上培养 1 d 和 3 d,各组细胞数量无显著性差异;培养至第 5 d 和 7 d, Ti、pTi 和 Ti-PDA 之间的细胞数量无明显差异,而 Ti-PDA-Ag 显示出对 MC3T3-E1 细胞增殖有一定的抑制作用,但增殖率仍大于 80%,符合生物材料医用标准,说明材料均具有良好的体外细胞相容性。

3 结论

1) 聚多巴胺功能化钛表面通过聚多巴胺与钙离子的螯合作用促进类骨羟基磷灰石沉积,提高了钛表面的生物活性。

2) 通过聚多巴胺的还原能力成功将纳米银颗粒负载至钛表面,聚多巴胺/纳米银修饰钛表面对金黄色葡萄球菌具有较强的杀菌能力,同时体现出较好的细胞相容性。

参考文献:

- [1] MEYERS S R, GRINSTAFF M W. Biocompatible and bioactive surface modifications for prolonged *in vivo* efficacy. *Chemical Reviews*, 2012, **112**(3): 1615–1632.
- [2] QU J, LU X, LI D, *et al.* Silver/hydroxyapatite composite coatings on porous titanium surfaces by Sol-Gel method. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2011, **97B**(1): 40–48.
- [3] GIGLIO E D, CAFAGNA D, COMETA S, *et al.* An innovative, easily fabricated, silver nanoparticle-based titanium implant coating: development and analytical characterization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, **405**(2/3): 805–816.
- [4] LEE H, DELLATORE S M, MILLER W M, *et al.* Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science*, 2007, **318**(5849): 426–430.
- [5] LYNGE M E, WESTEN R, POSTMA A, *et al.* Polydopamine—a nature-inspired polymer coating for biomedical science. *Nanoscale*, 2011, **3**: 4916–4928.
- [6] XU M, ZHANG Y, ZHAI D, *et al.* Mussel-inspired bioactive ceramics with improved bioactivity, cell proliferation, differentiation and bone-related gene expression of MC3T3 cells. *Biomaterials Science*, 2013, **1**: 933–941.
- [7] BALL V, NGUYEN I, HAUPT M, *et al.* The reduction of Ag⁺ in metallic silver on pseudomelanin films allows for antibacterial activity but does not imply unpaired electrons. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, **364**(2): 359–365.
- [8] KOKUBO T, TAKADAMA H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials*, 2006, **27**(15): 2907–2915.
- [9] YE Q, ZHOU F, LIU W. Bioinspired catecholic chemistry for surface modification. *Chemical Society Reviews*, 2011, **40**: 4244–4258.
- [10] ZHANG R, BRAEKEN L, LUIS P, *et al.* Novel binding procedure of TiO₂ nanoparticles to thin film composite membranes via self-polymerized polydopamine. *Journal of Membrane Science*, 2013, **437**(15): 179–188.
- [11] LIU H, XI P, XIE G, *et al.* Simultaneous reduction and surface functionalization of graphene oxide for hydroxyapatite mineralization. *Journal of Physical Chemistry C*, 2012, **116**(5): 3334–3341.
- [12] RYU J, KU S H, LEE H, *et al.* Mussel-inspired polydopamine coating as a universal route to hydroxyapatite crystallization. *Advanced Functional Materials*, 2010, **20**(13): 2132–2139.
- [13] ZHOU W Y, WANG M, CHEUNG W L, *et al.* Synthesis of carbonated hydroxyapatite nanospheres through nanoemulsion. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2008, **19**(1): 103–110.
- [14] ANTONAKOS A, LIAROKAPIS E, LEVENTOURI T. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials*, 2007, **28**(19): 3043–3054.
- [15] SINHA A, INGLE A, MUNIM K R, *et al.* Development of calcium phosphate based bioceramics. *Bulletin of Materials Science*, 2001, **24**(6): 653–657.
- [16] MARTINEZ-CASTANON G A, NINO-MARTINEZ N, MARTINEZ-GUTIERREZ F, *et al.* Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 2008, **10**(8): 1343–1348.
- [17] LIU H, ZHONG J, LIANG X, *et al.* L-cysteine-assisted synthesis of AgInS₂ microspheres. *Journal of Inorganic Materials*, 2011, **26**(11): 1–6.
- [18] SAIDIN S, CHEVALLIER P, KADIR M R A, *et al.* Polydopamine as an intermediate layer for silver and hydroxyapatite immobilization on metallic biomaterials surface. *Materials Science and Engineering C*, 2013, **33**(8): 4715–4724.
- [19] SENEY C S, GUTZMAN B M, GODDARD R H. Correlation of size and surface-enhanced Raman scattering activity of optical and spectroscopic properties for silver nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 2009, **113**(1): 74–80.
- [20] WANG F, HAN R, LIU G, *et al.* Construction of polydopamine/silver nanoparticles multilayer film for hydrogen peroxide detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2013, **706**: 102–107.
- [21] WANG W, CHENG W, TIAN M, *et al.* Preparation of PET/Ag hybrid fibers via a biomimetic surface functionalization method. *Electrochimica Acta*, 2012, **79**(30): 37–45.
- [22] IQBAL Z, LAI E P C, AVIS T J. Antimicrobial effect of polydopamine coating on *Escherichia coli*. *Journal of Materials Chemistry*, 2012, **22**: 21608–21612.
- [23] PRABHU S, POULOSE E K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2012, **2**: 32.
- [24] HOIBY N, BJAMSHOLT T, GIVSKOV M, *et al.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, **35**(4): 322–332.