

# Study on Preparation and Properties of PDA/ CPP Bilayer on Skull Repairing Titanium Mesh

Jiamin Zhang, Tao Wang\*, Chunbo Tang

College of Material Science and Technology, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing Jiangsu

Email: zjmmandy@163.com, \*taowang@nuaa.edu.cn

Received: Jan. 7<sup>th</sup>, 2017; accepted: Jan. 19<sup>th</sup>, 2017; published: Jan. 22<sup>nd</sup>, 2017

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

## Abstract

To obtain excellent hydrophilicity and superb biomineralization capability, polydopamine/casein phosphopeptides (PDA/ CPP) bilayer was prepared through a simple two-step immersion process. The adhering PDA interlayer linked the natural biomolecules, CPP, to the SLA titanium surface via covalent bonds. The bilayer was characterized by AFM, XPS and contact angle analyzer. FESEM and EDS were utilized for analyzing the effect of biomimetic mineralization. Our results indicated that PDA/ CPP was successfully coated on skull repairing titanium mesh through two-step immersion without any toxic element induced. The bilayer enhanced the hydrophilicity and the rate of biomineralization significantly.

## Keywords

Skull Repairing Titanium Mesh, Ploydopamine, Casein Phosphopeptides, Hydrophilicity, External Biomimetic Mineralization

# 颅骨修复钛网表面PDA/ CPP涂层的制备及性能研究

张嘉敏, 汪涛\*, 汤春波

\*通讯作者。

南京航空航天大学材料科学与技术学院, 江苏 南京  
Email: zjmmandy@163.com, taowang@nuaa.edu.cn

收稿日期: 2017年1月7日; 录用日期: 2017年1月19日; 发布日期: 2017年1月22日

## 摘要

本文意在探究一种简易高效的应用于颅骨修复钛网表面的生物化学改性方法。首先通过浸泡法在钛网表面沉积聚多巴胺薄膜层(PDA), 其次利用PDA的超强粘附性和二次修饰功能, 进一步接枝酪蛋白磷酸肽(CPP), 制备具有优良亲水性及优良生物矿化能力的复合涂层。利用XPS、AFM、接触角分析仪进行涂层表征; 浸泡模拟体液(SBF), 利用FESEM及EDS分析体外仿生矿化效果。结果显示, “两步浸泡法”成功将PDA与CPP依次修饰于颅骨修复钛网, 无毒性元素引入; 与未修饰表面相比, 具有PDA/CPP生物活性涂层的表面亲水性得到显著提高, 并且能够在1天之内诱导沉积均匀稳定的类骨羟基磷灰石(HA)。

## 关键词

颅骨修复钛网, 聚多巴胺, 酪蛋白磷酸肽, 亲水性, 体外仿生矿化

## 1. 引言

颅骨是脑组织重要的支撑和防护部位, 外力破坏、脑疾病手术以及先天性颅骨缺损是导致颅骨缺损的主要原因[1]。目前, 颅骨修复材料有钛网、硅橡胶板、骨水泥、高分子纤维增强材料等。其中, 数字化成形三维钛网具有比重轻、机械强度高、生物相容性和耐腐蚀性优良的特点, 同时又具有手术时间短, 使用钛钉数量少, 外观满意度高, 术后并发症少等优点, 是目前颅骨修补手术的首选材料[2]。

然而, 惰性的天然钛表面无法与骨组织产生强有力的化学骨结合, 颅骨修复钛网需要进行表面改性以缩短颅骨愈合周期, 加快早期骨整合, 获得更高的结合强度[3] [4]。喷砂、蚀刻等物理方法, 容易导致薄层曲面植入体变形; 等离子喷涂、电化学沉积等化学方法工艺复杂, 同时极易引入有毒杂质, 二者对颅骨修复钛网皆不具有适用性。生物化学方法适用性广、操作简单、绿色环保, 对结构复杂的植入体具有优越性。

受海洋贻贝蛋白粘附机理的启发, Lee 等[5]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, 通过简单地浸泡即可在玻璃、金属、陶瓷、有机物等几乎任何材料表面, 迅速形成具有超强黏附性的聚多巴胺(Polydopamine, PDA)薄膜。PDA 薄膜能够有效提高材料表面耐腐蚀性、生物相容性并能促进钙离子的沉积[6], 同时, 其氧化自聚合过程中形成的醌式结构与生物大分子的伯氨基发生席夫碱反应, 或者通过苯环上的碳与具有亲核特性的生物大分子发生迈克尔加成反应, 可将生物大分子固定在材料的表面, 进行功能性二次修饰[7] [8]。近年来, 利用 PDA 将 RGD 肽、肝素、酶、骨形态发生蛋白(BMP-2) [9] [10] [11]固定于植入体材料表面的生物化学改性研究逐年增加[12]。

酪蛋白磷酸肽(Casein phosphopeptides, CPP)是以牛乳酪蛋白为原料, 通过水解、分离、纯化而成的天然活性多肽, 能够有效促进人体对钙的吸收和利用, 被称为“矿质载体”, 是目前唯一一种促进钙吸收的活性肽[13]。CPP 由丝氨酸、谷氨酸和磷酸基构成, 磷酸基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, 增强成骨细胞的黏附与增殖[14]。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, 阻止矿物质的流失和抑制骨的再吸收[15] [16]。

本文在颅骨修复钛网表面沉积 PDA 薄膜, 并以 PDA 为平台, 进一步接枝 CPP, 形成 PDA/ CPP 生物活性涂层, 意在探究一种简易、环保、促进早期骨整合、适用于钛基复杂结构植入体的生物化学表面处理方法。

## 2. 实验

### 2.1. 材料及试剂

人字形颅骨修复钛网(TA2)购自深圳三和兴五金公司; 盐酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)购买自南京化学试剂有限公司; 盐酸多巴胺、2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)、N-羟基酰亚胺(NHS)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDS)购买自阿拉丁试剂有限公司; 酪蛋白磷酸肽购买自河南喜莱客化工产品有限公司。

### 2.2. 颅骨修复钛网表面 PDA 薄膜的沉积以及 CPP 的固定

将颅骨修复钛网切割成  $3\text{ cm} \times 3\text{ cm}$  的正方形薄片, 厚  $0.5\text{ mm}$ , 用砂纸逐层打磨, 用去离子水、丙酮、无水乙醇、去离子水依次超声清洗  $15\text{ min}$  并吹干, 获得清洁表面, 记为 Ti。将多巴胺溶于 Tris-HCl 缓冲溶液, 配制  $\text{pH} = 8.5$ , 浓度为  $2\text{ mg/ml}$  的多巴胺溶液。将清洗之后的样品在该溶液中浸泡  $24\text{ h}$ , 取出后用去离子水超声清洗  $5\text{ min}$  并吹干, 记为 Ti/PDA。将 MES、EDS、NHS 依次加入到去离子水中, 浓度分别为  $0.1\text{ mol/L}$ 、 $20\text{ mmol/L}$ 、 $50\text{ mmol/L}$ , 向该溶液中添加 CPP, 配制  $10\text{ g/L}$  的 CPP 溶液。将 Ti/PDA 试样在 CPP 溶液中浸泡  $16\text{ h}$ , 取出后用磷酸缓冲溶液(PBS,  $\text{pH} = 7.4$ )冲洗并吹干, 记为 Ti/PDA/ CPP。

### 2.3. 表面仿生矿化实验

将 Ti、Ti/PDA、Ti/PDA/ CPP 三组样品浸泡在模拟体液(1:1,  $\text{pH} = 7.4$ )中, 放置于温度为  $37.5^\circ\text{C}$  的恒温箱中,  $1\text{ 天}(1\text{ d})$ 取出样品进行表面分析测试。

### 2.4. 表征与测试

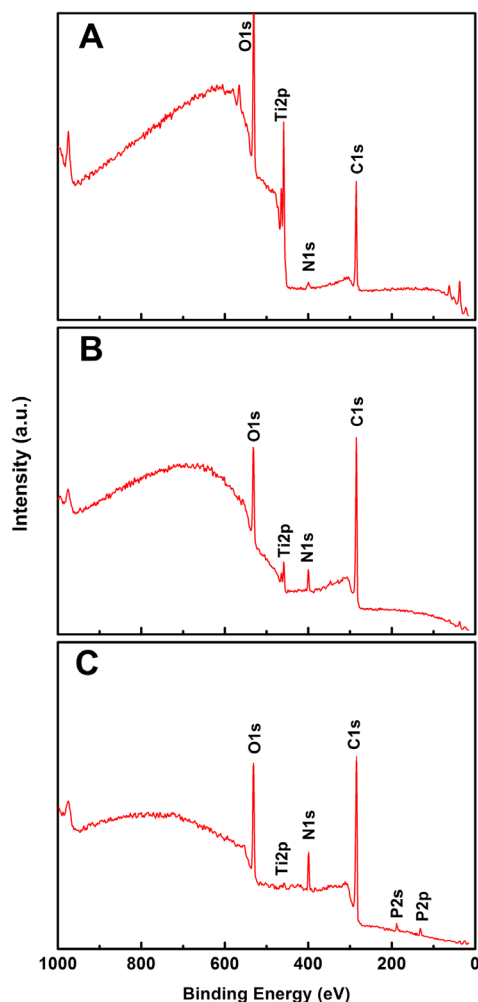
使用接触角测量仪(JC2000D7M)测量样品表面与蒸馏水的静态接触角; 使用 X 射线光电子能谱仪(XPS, PHI Quantera II, 日本)对样品表面元素进行分析; 使用原子力显微镜(AFM, CSPM5500, 本原纳米仪器有限公司)分析样品表面结构及粗糙度; 使用能谱仪(EDS)以及场发射扫描电镜(FESEM, LEO-1550, 德国)分析改性前后表面仿生矿化效果。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. XPS 成分分析

图 1, 图 2 分别是 Ti、Ti/PDA 以及 Ti/PDA/ CPP 三组试样表面的 XPS 全谱图以及 O1s 高分辨谱图。由图 1 可知, Ti 表面除 Ti2p ( $458.8\text{ eV}$ )峰外, 还存在 O1s ( $530.5\text{ eV}$ )峰、C1s ( $285\text{ eV}$ )峰以及强度很小的 N1s ( $400\text{ eV}$ )峰, 这归属于空气中吸附于样品表面的污染物; Ti/PDA 试样表面, Ti2p 峰强度急剧下降, N1s 峰强度增加, 这是由于多巴胺富含氨基官能团, 表明 Ti 表面完全被 PDA 覆盖; Ti/PDA/ CPP 试样表面, N1s 峰强度继续增加, 同时在结合能为  $189\text{ eV}$  以及  $131\text{ eV}$  处分别出现的 P1s 和 P2p 特征峰, 这是由于丝氨酸、谷氨酸富含氮元素, 而磷酸基富含磷元素, 表明 CPP 成功接枝在 Ti 表面。

由图 2 可知, 在 Ti 表面, 由于二氧化钛钝化层的存在, 结合能为  $530.6\text{ eV}$  的 Ti-O 特征峰所占比例最大, 而归属于表面有机污染物的 C-O ( $532.7\text{ eV}$ )和 C=O ( $321.7\text{ eV}$ )显然所占比例较小。Ti/PDA 表面 Ti-O 特征峰比例显著减小, 而 C-O 和 C=O 特征峰所占比例显著增大, 进一步说明含有醌基以及其他多巴胺衍



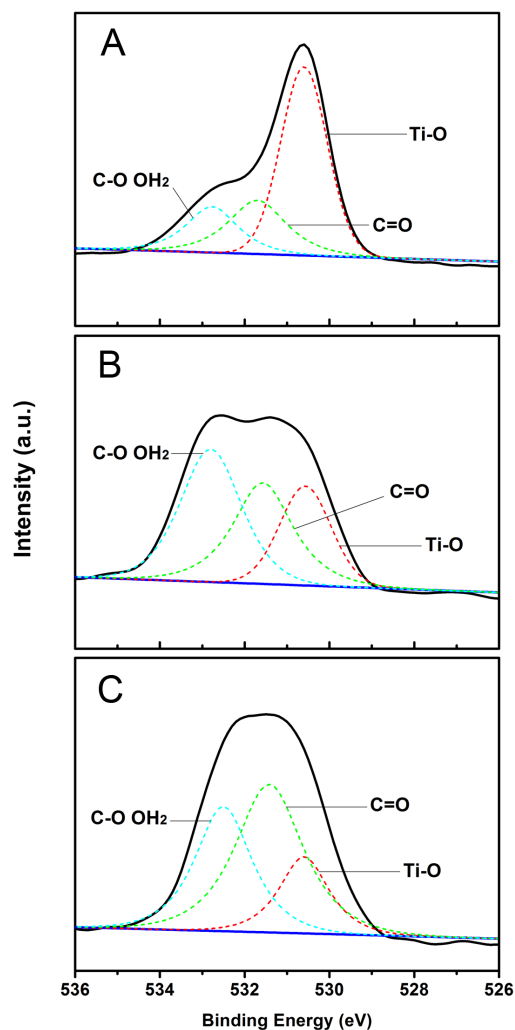
**Figure 1.** XPS wide scan spectrum of different surfaces (A) Ti, (B) Ti/PDA, (C) Ti/PDA/PPP

**图 1.** 不同试样表面 XPS 全谱图(A) Ti, (B) Ti/PDA, (C) Ti/PDA/PPP

生物的 PDA 薄膜层的存在。Ti/PDA/PPP 样品表面 Ti-O 特征峰强度继续减弱, C-O 和 C=O 的特征峰强度继续增强, 尤其是 C=O 特征峰, 这与上文所述 PPP 的接枝使得表面酰胺键的数量增加一致, 因而也进一步说明了样品表面被 PPP 生物活性涂层所覆盖。

### 3.2. AFM 形貌表征

随机选取试样表面  $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$  区域进行 AFM 分析, 利用扫描探针显微镜系统对样品断面的粗糙度变化进行分析, 如图 3 所示。Ti 表面由于砂纸的打磨, 存在细小尖锐的突起, ; 沉积 PDA 薄膜之后, 尖锐区域减少, 绝大部分区域棱角不明显, 形貌虽然有起伏但趋于柔和平整; 浸泡 PPP 溶液后突起完全被涂层覆盖, 在基底表面沿划痕形成上下起伏的形貌。从轮廓线可知, 由于样品基底皆因打磨存到平行的划痕, 因而三种表面的轮廓线都存在稳定的上下起伏, 峰顶和峰谷交错。未改性的 Ti 表层断面呈现不规则的锯齿状, 峰尖锐, 不平整, 最小二乘中线约为 72 nm; Ti/PDA 样品表层断面虽然红线数值并没有明显变化, 但是杂乱的锯齿状峰减少, 轮廓变得圆润, 说明表面确实被 PDA 薄膜层所覆盖, PDA 贴合于基底表面; Ti/PDA/PPP 表面断层轮廓线起伏大, 但是十分平缓圆润, 红线数字出现明显变大(约 240 nm), 可见表面粗糙度增加, 表面被与 Ti/PDA 表面相比更加厚重的涂层所覆盖。



**Figure 2.** High resolution XPS spectrum of O1s on different surfaces (A) Ti, (B) Ti/PDA, (C) Ti/PDA/ CPP  
**图 2.** 不同试样表面 O1s 高分辨 XPS 图谱 (A) Ti, (B) Ti/PDA, (C) Ti/PDA/ CPP

### 3.3. 亲水性分析

亲水性是医用材料生物相容性的一个重要指标。在水接触角实验中，每一种样品选取三个，每一个样品表面分别随机选取三点进行水接触角测试，对得到的同种表面的 9 个数据去掉最大值及最小值取平均数，最为该种表面的水接触角。图 4 是光滑纯钛表面改性前后水接触角测试分析图。如图所示，Ti 表面接触角有  $90.3^\circ$ ，修饰了 PDA 薄膜层之后，接触角降至  $53.8^\circ$ ，亲水性明显增强，这是由于 PDA 中富含亲水的酚羟基(-OH)和氨基(-NH<sub>2</sub>)基团。Ti/PDA/ CPP 样品的接触角相比于 Ti/PDA 表面又显著减小，原因在于 CPP 涂层中同样含有亲水性的氨基(-NH<sub>2</sub>)、羟基(-OH)、羧基(-COOH)等基团，与 PDA 相比亲水基团的种类更多，因而 PDA/ CPP 复合涂层亲水效果更加显著。

### 3.4. 体外仿生矿化性能分析

#### 3.4.1. 沉积物表征

浸泡 SBF 溶液 1 d 后，部分试样表面沉积了  $1 \mu\text{m}$  左右、白色、均匀的疏松球状颗粒，如图 5(A) 所示，与羟基磷灰石的形态一致[17]。对此白色沉积物进行 EDS 分析，如图 5(B)所示，表面沉积物中主

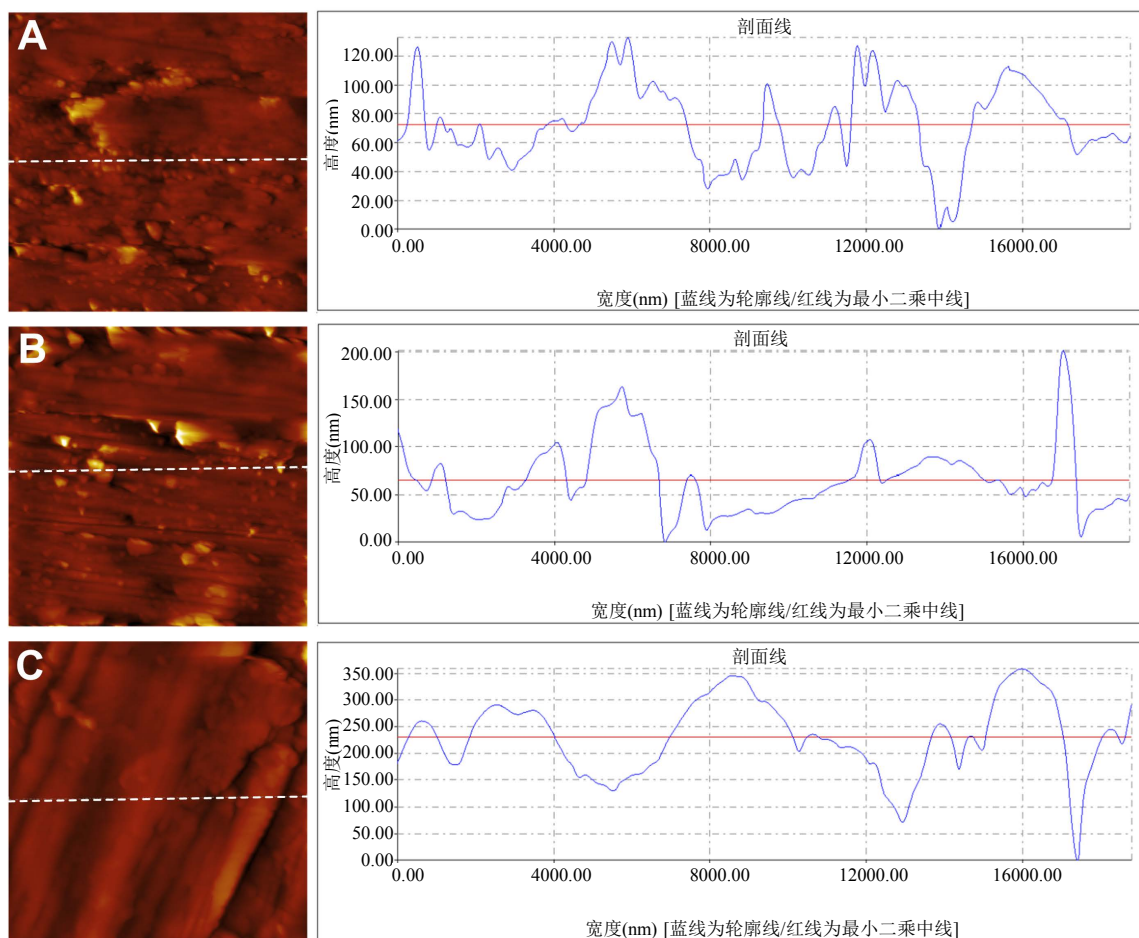


Figure 3. AFM photographs of specimens (A) Ti, (B) Ti/PDA, (C) Ti/PDA/CPP

图 3. 试样表面 AFM 分析图(A) Ti, (B) Ti/PDA, (C) Ti/PDA/CPP

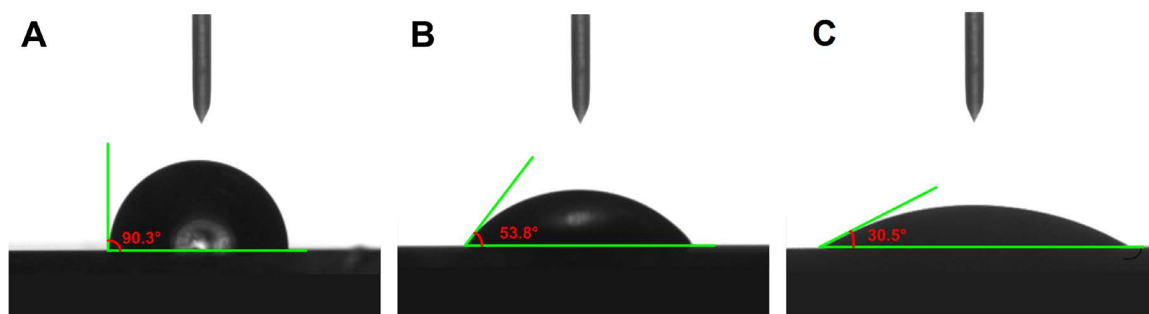


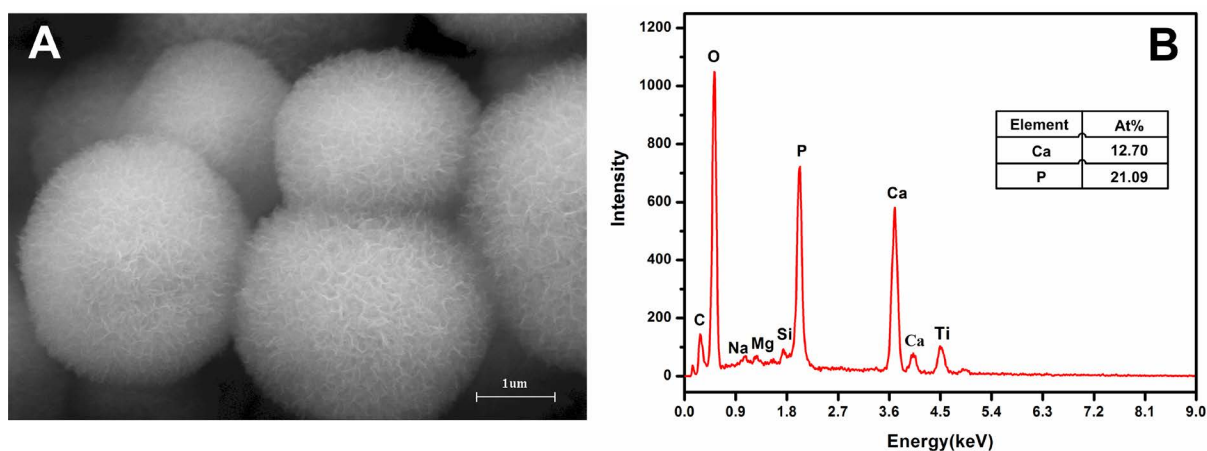
Figure 4. Contact angles with pure water of different surfaces (A) Ti, (B) Ti/PDA, (C) Ti/PDA/CPP

图 4. 不同表面水接触角测试示意图(A) Ti, (B) Ti/PDA, (C) Ti/PDA/CPP

要元素为 P、Ca、O，Ti 元素来自于 Ti 基底，极少量的 Na、Mg、Si 来自于模拟体液及实验过程中引入的杂质，钙磷原子百分比之比(Ca/P)为 1.66，与羟基磷灰石原子比 1.67 想接近，进一步证明表面沉积羟基磷灰石(HA)。

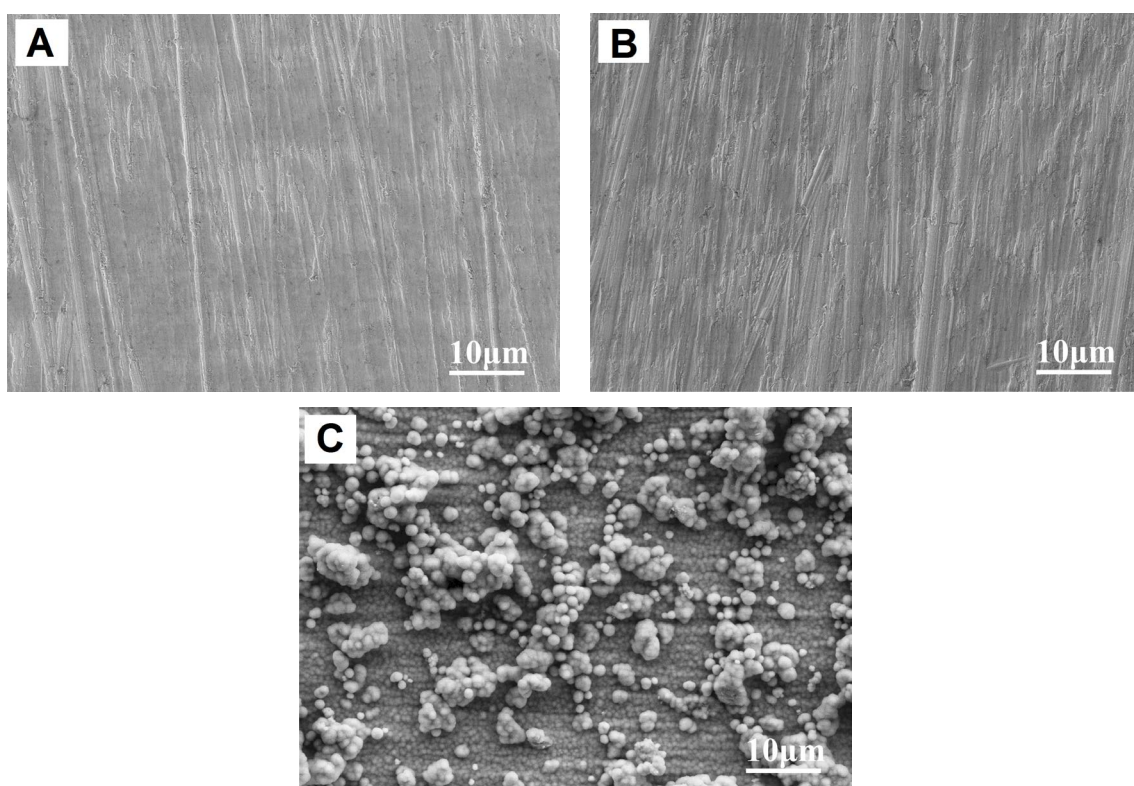
### 3.4.2. 矿化表面 FESEM 分析

材料表面能够诱导羟基磷灰石的沉积，是材料具有诱导骨生长能力的重要标志。图 6 分别是 3 组不



**Figure 5.** FESEM image and EDS spectra of the deposit on the specimens immersed in SBF

**图 5.** 浸泡 SBF 后试样表面沉积物高倍 FESEM 图以及 EDS 谱图



**Figure 6.** FESEM images of different samples immersed in SBF for 1 d (A) Ti, (B) Ti/PDA, (C) Ti/PDA/PPP

**图 6.** 体外仿生矿化 1 d 后各样品表面 FESEM 图(A) Ti, (B) Ti/PDA, (C) Ti/PDA/PPP

同处理方式的颅骨修复钛网浸泡 1 d 后, 表面羟基磷灰石沉积状况的 FESEM 图。未处理的钛网表面无任何变化; Ti/PDA 表面也无明显变化, 虽然 PDA 薄膜表面裸露的羟基基团能够螯合  $\text{Ca}^{2+}$ , 为 HA 提供形核位点, 促使 HA 的沉积[18], 但是 SBF 中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度低, 因而促进效果不明显; Ti/PDA/PPP 浸泡 SBF 溶液 1 d 后表面完全被大小均匀的球状 HA 覆盖, 局部区域球形颗粒逐层堆积, 向上蔓延生长, 形成三维多孔的 HA 支架, 并且无任何开裂痕迹。这是由于表面 PPP 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; 均匀分布于表面的磷酸丝氨酸起模板剂作用, 为 HA 提供密集形

核位点; 同时, PDA 中的酚羟基对  $\text{Ca}^{2+}$  同样具有螯合作用, 当 SBF 溶液渗透到 PDA 层, PDA 中残余的酚羟基也能够固定  $\text{Ca}^{2+}$ , 促进 HA 形核。HA 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。形核速度快, 晶核数量多, 并且覆盖样品表面的 HA 颗粒继续长大的同时又将为新一层的 HA 提供形核位点, 因而形成 HA 颗粒逐层堆叠的形貌。球状 HA 颗粒尺寸小, 较为独立, 内应力小, 因而 HA 层稳定, 不容易破裂。

#### 4. 结论

先后浸泡碱性多巴胺溶液及酪蛋白磷酸肽溶液, 能够有效地在颅骨修复钛网表面修饰 PDA/CPP 生物活性涂层, 并且无毒性元素引入; 该涂层可使钛网表面水接触角从  $90.3^\circ$  降低至  $30.5^\circ$ , 显著提高颅骨修复钛网表面的亲水性; 体外仿生矿化实验表明, 在 SBF 中, PDA/CPP 涂层能够在 1 天之内迅速诱导 HA 沉积, 均匀的球状 HA 堆叠生长, 形成有利于骨组织生长的三维多孔支架状, 促进早期骨整合; 同时, 该涂层能够增强 HA 与基底的结合力, 显著减少开裂与脱落, 增强界面稳定性。这种生物化学改性方法成本低, 操作简便, 绿色环保, 同时由于多巴胺在各种材料上的成膜性能, PDA/CPP 生物化学改性方法有望在其他植入材料表面应用, 具有重要的探索价值。

#### 基金项目

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

#### 参考文献 (References)

- [1] 王玮竹, 朱晏军, 闫玉华. 颅骨修复材料的研究进展[J]. 化工新型材料, 2014, 32(9): 21-23.
- [2] 齐欣, 沈干, 王增亮, 等. 数字化成型三维钛网在颅骨缺损修补手术中的应用[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2014, 13(3): 213-215.
- [3] 薛淼, 孙皎, 赵信义, 等. 口腔生物材料学[M]. 上海: 上海世界图书出版公司, 2006: 201-202.
- [4] Avila, G., Misch, K., Galindo-Moreno, P., et al. (2009) Implant Surface Treatment Using Biomimetic Agents. *Implant Dentistry*, **18**, 17-26. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e318192cb7d>
- [5] Lee, H., Dellatore, S.M., Miller, W.M., et al. (2007) Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science*, **318**, 426-430. <https://doi.org/10.1126/science.1147241>
- [6] 刘宗光, 屈树新, 翁杰. 聚多巴胺在生物材料表面改性中的应用[J]. 化学进展, 2015, 27(Z1): 212-219.
- [7] Zhao, H. and Waite, J.H. (2006) Linking Adhesive and Structural Protein in the Attachment plaque of *Mytilus californianus*. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 26150-26158. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604357200>
- [8] 徐又一, 蒋金泓, 朱利平, 等. 多巴胺的自聚-附着行为与膜表面功能化[J]. 膜科学与技术, 2011, 31(3): 32-38.
- [9] Chien, T. (2013) 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*, **5**, 6975-6983. <https://doi.org/10.1021/am401071f>
- [10] Nijhuis, A.W.G., et al. (2013) 1-Step versus 2-Step Immobilization of Alkaline Phosphatase and Bone Morphogenetic Protein-2 onto Implant Surfaces Using Polydopamines. *Tissue Engineering: Part C*, **19**, 610-629. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0313>
- [11] Li, J.C., Xie, B., Pan, C.J., et al. (2014) Facile Conjugation of Heparin onto Titanium Surface via Dopamine Inspired Coatings for Improving Blood Compatibility. *Journal of Wuhan University, Materials Science Edition*, **29**, 832-840. <https://doi.org/10.1007/s11595-013-1005-5>
- [12] 陶彩虹, 马阜生, 刘宝勇, 等. 基于聚多巴胺的表面改性方法研究现状[J]. 化学通报, 2015, 78(11): 983-990.
- [13] 孙延春. 酪蛋白磷酸肽研究进展[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(2): 53-55.
- [14] 王琳, 朴银忠, 王金清, 等. 壳聚糖-酪蛋白磷酸肽修饰钛合金表面的成骨细胞粘附与增值[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 5(21): 3811-3814.
- [15] Hansen, M., Sandstrom, B., Jensen, M., et al. (1997) Effect of Casein Phosphopeptides on Zinc and Calcium Absorp-



tion from Bread Meals. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **11**, 143-149.

[https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(97\)80041-7](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(97)80041-7)

- [16] Matsui, T., Yano, H., Awano, T., *et al.* (1994) The Influences of Casein Phosphopeptides on Metabolism of Ectopic Bone Induced by Decalcified Bone Matrix Implantation in Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **40**, 137-145. <https://doi.org/10.3177/jnsv.40.137>
- [17] Tadashi, K. and Hiroaki, T. (2006) How Useful Is SBF *in Vivo* Bone Bioactivity? *Biomaterials*, **27**, 2907-2915.
- [18] Ryu, J., Ku, S.H., Lee, H., *et al.* (2010) Mussel-Inspired Polydopamine Coating as a Universal Route to Hydroxyapatite Crystallization. *Advanced Functional Materials*, **20**, 2132-2139. <https://doi.org/10.1002/adfm.200902347>

**期刊投稿者将享受如下服务:**

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [ms@hanspub.org](mailto:ms@hanspub.org)