

# 聚多巴胺螯合钙离子对钛表面的修饰及修饰后的细胞相容性

谭帼馨<sup>1</sup>, 欧阳孔友<sup>1</sup>, 周 蕾<sup>2</sup>, 刘 燕<sup>1</sup>, 张 兰<sup>3</sup>, 宁成云<sup>2</sup>

(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. 西安交通大学 金属材料国家重点实验室, 西安 710049)

**摘 要:** 通过聚多巴胺自组装在钛表面构建钙离子螯合平台, 探讨聚多巴胺的酚羟基( $-C-OH$ )和醌基( $-C=O$ )螯合钙离子机理, 并研究其生物学性能。利用 X 射线光电子能谱分析聚多巴胺螯合钙离子化学基团的变化, 结果显示: 聚多巴胺螯合钙离子后,  $-C-OH$  峰面积从 73.8%降至 37.3%,  $-C=O$  从 26.2%升至 62.7%, 证明聚多巴胺的酚羟基与钙离子螯合过程中向醌基转化; 场发射扫描电镜、傅立叶红外光谱、X 射线衍射仪和透射电镜分析表明聚多巴胺和钙离子的协同作用促进羟基磷灰石(HA)前驱体成核, 诱导 HA 的形成; 采用小鼠成骨细胞(MC3T3-E1)粘附和活性实验进行细胞相容性评价, 结果表明钛表面通过聚多巴胺螯合低浓度的钙离子有利于成骨细胞粘附, 且具有良好的细胞相容性。

**关 键 词:** 聚多巴胺; 螯合机理; 钙离子; 生物活性; 细胞相容性

中图分类号: TB331 文献标识码: A

## Titanium Modification by Calcium Ion Chelated Polydopamine and Its Cytocompatibility

TAN Guo-Xin<sup>1</sup>, OUYANG Kong-You<sup>1</sup>, ZHOU Lei<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, ZHANG Lan<sup>3</sup>, NING Cheng-Yun<sup>2</sup>

(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. State Key Laboratory for Mechanical Behavior of Materials, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

**Abstract:** Calcium ions chelation platform was successfully obtained on a titanium surface by modification with polydopamine. The chelation mechanism of polydopamine with  $Ca^{2+}$  was studied. The *in vitro* bioactivity and cytocompatibility of  $Ca^{2+}$  chelation platform was assessed by incubation in simulated body fluids (SBF) and cultural osteoblast cells (MC3T3-E1), respectively. The results showed that the functional groups of polydopamine chelated  $Ca^{2+}$  were changed from phenolic hydroxyl to benzoquinone. The titanium surface modified by  $Ca^{2+}$ -chelated polydopamine could induce nucleation and growth of hydroxyapatite in SBF. Meanwhile, Cell attachment and viability assay demonstrated that low concentration of  $Ca^{2+}$  chelation possessed good cytocompatibility.

**Key words:** polydopamine; chelation mechanism; calcium ion; bioactivity; cytocompatibility

钙离子作为人体骨主要组成元素, 是维持细胞膜两侧生物电位平衡不可缺少的离子, 参与骨种植

收稿日期: 2015-02-11; 收到修改稿日期: 2015-04-09

基金项目: 国家 973 计划项目(2012CB619100); 国家自然科学基金(51372087); 广东省科技计划项目(2014A010105048); 广东省自然科学基金(2015A030313493); 西安交通大学金属材料强度国家重点实验室开放研究项目(20141607) National Basic Research Program of China(2012CB619100); National Natural Science Foundation of China (51372087); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province(2014A010105048); Natural Science Foundation of Guangdong Province(2015A030313493); Supported by State Key Laboratory for Mechanical Behavior of Materials(20141607)

作者简介: 谭帼馨(1971-), 女, 副教授. E-mail: tanguoxin@126.com

通讯作者: 宁成云, 教授. E-mail: imcyning@scut.edu.cn

体内植入后骨重建过程。细胞外钙离子可刺激成骨细胞粘附、增殖、分化和骨基质矿化等<sup>[1]</sup>。植入体表面引入钙离子作为骨修复材料已应用于骨植入领域。Fukuda 等<sup>[2]</sup>对钛基材在高温烧结碱热处理后,在其表面引入钙离子,证明其具有良好的生物活性和增强钛基材与兔胫骨的结合能力;Run 等<sup>[3]</sup>在钛基材表面直接离子注入钙离子,证实其具有良好的成骨活性。不过,上述植入体表面钙离子引入的制备工艺均比较复杂、条件苛刻、成本难以控制。

多巴胺是贻贝黏附蛋白中的黏附功能单元,在温和条件下牢固地粘附在基材表面,自组装成含有丰富酚羟基和胺基的聚多巴胺膜(Polydopamine, PDA),能够螯合不同的金属离子<sup>[4]</sup>,提高材料表面亲水性和生物相容性,已被广泛用于生物材料表面修饰<sup>[5]</sup>。Yun 等<sup>[6]</sup>利用多巴胺与羟基磷灰石(HA)在钛表面层层组装形成具有良好力学性能和生物相容性的涂层,Chen 等<sup>[7]</sup>通过离心管内聚多巴胺膜螯合钛离子( $\text{Ti}^{4+}$ )而选择性富集复杂生物体内的磷酸盐。但聚多巴胺是否可以螯合钙离子、且在钛基生物材料表面引入钙离子促进其细胞相容性和体内骨修复,尚未见相关报道。本研究利用多巴胺在钛表面自组装构建出仿生聚多巴胺膜层,并通过聚多巴胺的金属离子螯合作用将具有促成骨能力的钙离子引入钛表面,进一步研究了聚多巴胺的酚羟基和胺基螯合钙离子的机理、修饰后钛表面的矿化和细胞相容性。

## 1 实验方法

### 1.1 聚多巴胺修饰钛表面螯合钙离子

医用纯钛片(99.9%,宝鸡市启辰新材料科技有限公司)用  $\text{HNO}_3/\text{HF}$  混合溶液(0.29 mol/L  $\text{HNO}_3$  和 0.54 mol/L  $\text{HF}$ )37℃处理 5 min,浸入 60℃ piranha 溶液( $V_{\text{H}_2\text{SO}_4}:V_{\text{H}_2\text{O}_2}=7:3$ )反应 30 min,制备活性钛(Ti-OH),将其浸入到 pH=8.5,浓度为 2 g/L 盐酸多巴胺(98%,阿拉丁)溶液在 37℃搅拌反应 24 h,得到聚多巴胺修饰钛(Ti-PDA)<sup>[8]</sup>。Ti-PDA 分别浸入 0.1 和 0.5 mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液(Ti-PDA-0.1M  $\text{Ca}^{2+}$  和 Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$ )37℃浸泡 3 d。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,用 C1s 结合能(284.8 eV)为标准进行能量校正。

### 1.2 体外矿化实验

根据日本 Kokubo 等<sup>[9]</sup>方法配制模拟体液研究样品的体外矿化能力。采用扫描电镜(FE-SEM, Carl Zeiss Ultra 55, Germany)及其能谱分析(EDS)观察样

品表面矿化不同时间的微观形貌及计算 Ca/P 比;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 7 d 样品表面的官能团。采用 X 射线衍射仪(XRD, Bruker D8 advance, Germany)和透射电镜(TEM, JEM-2100HR JEOL, Japan)及其选区电子衍射(SAED)进一步分析 CaP 沉淀物的表面形貌和晶型结构。

### 1.3 细胞粘附与活力检测

将 Ti-OH、Ti-PDA、Ti-PDA-0.1M  $\text{Ca}^{2+}$  和 Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$  四组样品分别置于 48 孔培养板中,小鼠 MC3T3-E1 (ATCC CRL-2593)细胞悬液以  $5 \times 10^4$  cells/mL 浓度接种到 48 孔板中,置于 37℃、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱内培养 24 h 后,2.5%戊二醛固定,梯度乙醇脱水,  $\text{CO}_2$  临界点干燥喷金置于扫描电镜下观察。样品经过清洗后加入钙黄绿素(Calcein AM, 2  $\mu\text{g/mL}$ )和碘化丙啶(PI, 5  $\mu\text{g/mL}$ )混合溶液进行死活细胞荧光染色,置于倒置荧光显微镜(Olympus, IX71, Japan)观察材料表面细胞存活情况。

## 2 结果与讨论

### 2.1 钛表面聚多巴胺螯合钙离子及其机理分析

为了考察自组装在活性钛表面的聚多巴胺对钙离子的螯合作用,通过 X 射线光电子能谱研究其表面的酚羟基和酮基的作用机理。图 1 和表 1 是 Ti-OH、Ti-PDA、Ti-PDA-0.1M  $\text{Ca}^{2+}$  和 Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$  表面化学组成的 XPS 全谱图和各元素含量分析结果。由图 1(a, b)可见, Ti-PDA 在 400.1 eV 出现较强的 N1s 峰,而活性钛(Ti-OH)的 Ti2p 峰(458.8 eV)消失,计算 Ti-PDA 的 N/C 比为 0.121,与理论值 0.125 接近<sup>[6]</sup>,表明多巴胺成功自组装在活性钛表面。图 1(c, d)中

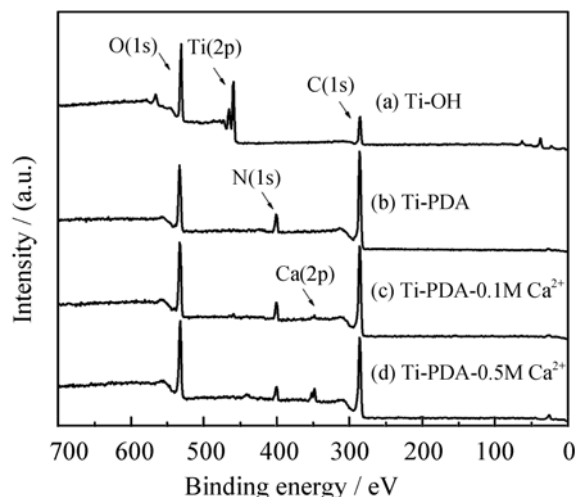


图 1 样品的 XPS 全谱图

Fig. 1 XPS full spectra of samples

表 1 样品表面 XPS 各元素含量分析结果

Table1 Chemical compositions of the surface layers of samples as analyzed by XPS

Samples	Element /at%					Ratio
	C	O	N	Ti	Ca	N/C
Ti-OH	37.43	44.95	0.86	16.76	-	0.023
Ti-PDA	68.56	22.89	8.30	0.25	-	0.121
Ti-PDA-0.1M Ca <sup>2+</sup>	65.19	26.37	7.34	0.51	0.50	0.113
Ti-PDA-0.5M Ca <sup>2+</sup>	62.71	28.33	6.40	-	2.56	0.102

Ti-PDA-0.1M Ca<sup>2+</sup>和 Ti-PDA- 0.5M Ca<sup>2+</sup>均出现结合能约为 350 eV 的 Ca2p 特征峰, 结合表 1 中各元素含量分析结果可知 0.1 和 0.5 mol/L 的 CaCl<sub>2</sub> 处理 Ti-PDA 的钙元素所占原子百分比分别为 0.5%和 2.56%, 且 N/C 比分别为 0.113 和 0.102。Saidin 等<sup>[10]</sup>证明聚多巴胺固定纳米银颗粒后(银元素含量为 0.2%), 仍富含自由的酚羟基与 SBF 中钙离子键合, 促进 HA 成核生长。由此推测, 钛表面聚多巴胺螯合钙离子后, 仍富含自由酚羟基活性基团。

图 2 是 Ti-OH、Ti-PDA 和 Ti-PDA 螯合不同浓度

钙离子的化学结构图(图 2(a))及 Ca2p、O1s 和 N1s 分峰拟合图(图 2(b~d))。在图 2(b)中, 0.1 和 0.5 mol/L 的 CaCl<sub>2</sub> 处理 Ti-PDA 出现两个 Ca2p 峰, 分别为 Ca2p<sub>1/2</sub> (351.0 eV)和 Ca2p<sub>3/2</sub> (347.5 eV), 说明聚多巴胺螯合钙离子不影响钙离子化学价态。图 2(c)显示, 多巴胺自组装前氧元素结合态主要为 Ti-OH 键(531.6 eV)和 TiO<sub>2</sub> 的 Ti-O 键(530.3 eV), 峰面积计算分别为 28.4%和 71.6%<sup>[8]</sup>, 自组装后(Ti-PDA), O 1s 分别出现酚羟基-C-OH(533.0 eV, 73.8%)和醌基-C=O(531.2 eV, 26.2%)<sup>[4]</sup>, 结合图 1(b)中 Ti-PDA 未

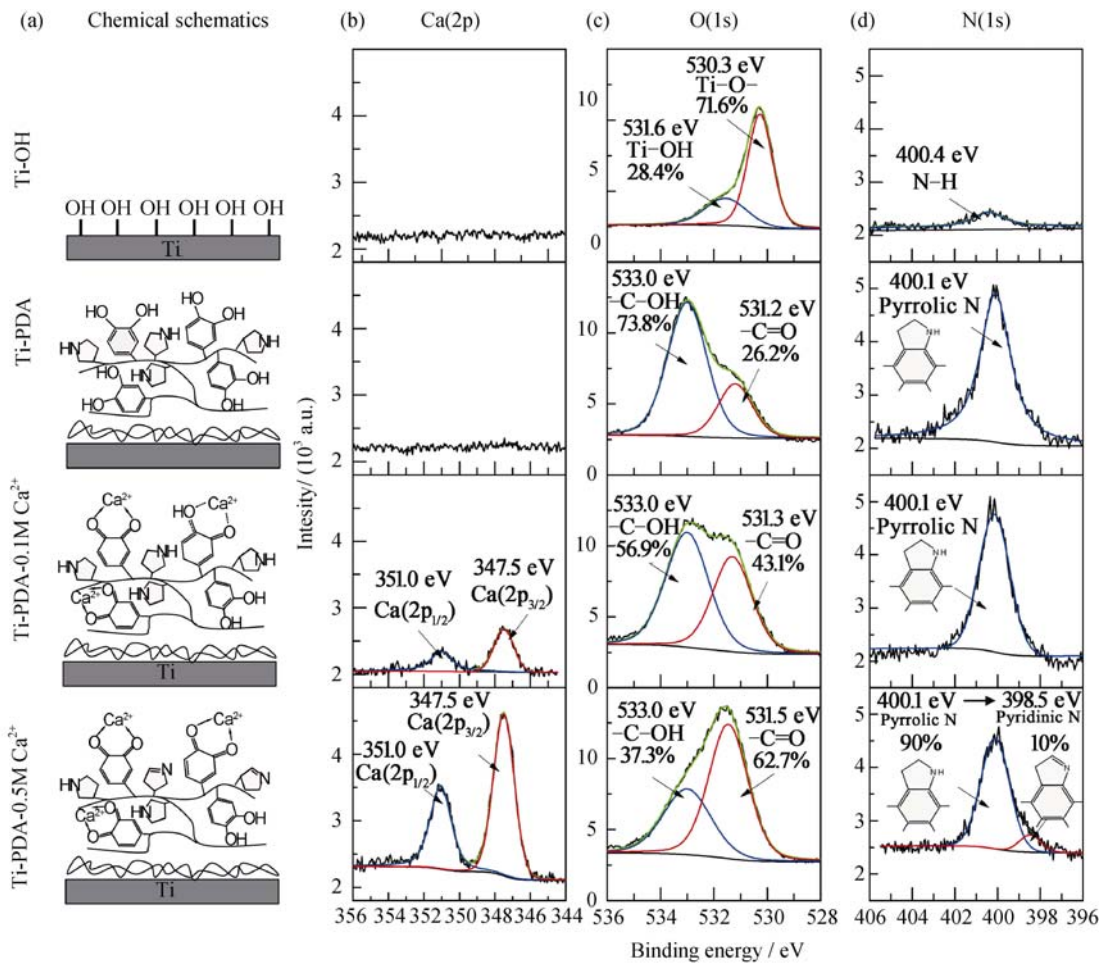


图 2 聚多巴胺钛表面螯合钙离子高分辨 XPS 分析

Fig. 2 Surface analysis by XPS showing that polydopamine binds to calcium ion, chelating Ca<sup>2+</sup> in CaCl<sub>2</sub> solution

出现 Ti2p 峰, 说明多巴胺在钛表面自组装形成致密的膜层。Ti-PDA-0.1M  $\text{Ca}^{2+}$  和 Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$  的 -C-OH 峰位置为 533.0 eV, 聚多巴胺的 -C-OH 峰面积从 73.8% 下降至 37.3%, 相应的 -C=O 峰发生峰位移分别为 0.1 eV 和 0.3 eV, -C=O 峰面积从 26.2% 上升至 62.7%, 表明聚多巴胺的酚羟基与  $\text{Ca}^{2+}$  螯合过程中向醌基转化<sup>[4]</sup>。由图 2(d) 的 N1s 可知, Ti-PDA 和 Ti-PDA-0.1M  $\text{Ca}^{2+}$  表面峰面积是 100% 的吡咯型氮(400.1 eV), Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$  表面出现峰面积为 10% 的吡啶型氮(398.5 eV), 聚多巴胺的吡咯型氮因氧化转变为稳定的吡啶型氮<sup>[11]</sup>。综上结果可推理出聚多巴胺螯合钙离子的机理(图 2(a)): Ti-PDA 以酚羟基 -C-OH 为主, 向醌基 -C=O 转变, 而 -C=O 因具有 p- $\pi$  共轭体系<sup>[4]</sup>, 有效地提供孤对电子与钙离子的 p 空轨道进行配位, 与钙离子配位键合达到化学稳定状态。Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$  由于聚多巴胺酚羟基 p- $\pi$  共轭作用, 促进吡咯型氮氧化成吡啶型氮, 有利于 -C-OH 向 -C=O 转变。为进一步探讨钛表面聚多巴胺螯合钙离子中钙离子作用, 分别进行矿化实验、细胞粘附和细胞活力实验。

## 2.2 体外矿化研究及其机理探讨

植入体表面需要具有诱导体内类骨磷灰石形成的能力, 促使其与缺损的活体骨形成稳定骨整合。钙离子引入钛基材表面具有良好的诱导 HA 形成的

能力<sup>[2]</sup>。图 3 是四组样品在矿化液中矿化不同时间的 SEM 照片(图 3(a~d))及其机理推导(图 3(e))。四组样品矿化 3 d(图 3(a<sub>2</sub>~d<sub>2</sub>)), Ti-OH 和 Ti-PDA 无明显沉淀物形成, Ti-PDA-0.1M  $\text{Ca}^{2+}$  和 Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$  表面均有直径约为 200 nm 的白色沉淀颗粒; 样品矿化 7 d(图 3(a<sub>3</sub>~d<sub>3</sub>)), Ti-OH 和 Ti-PDA 出现少量纳米沉淀物, Ti-PDA-0.1M  $\text{Ca}^{2+}$  和 Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$  表面生成直径约 0.8~1  $\mu\text{m}$  片状形貌沉淀物。通过 EDS 分析(图 3(d<sub>2</sub>~d<sub>3</sub>)), Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$  矿化 3d 和 7 d 表面沉积物 Ca/P 分别为 0.94 和 1.43, 接近 HA 前驱体无水磷酸氢钙(DCPA,  $\text{CaHPO}_4$ , Ca/P=1.00)和缺钙型 HA(CDHA, Ca/P=1.4~1.67)<sup>[12]</sup>。Jungki 等<sup>[13]</sup>研究发现聚多巴胺可形成间距为 0.347 nm 的层状结构, 有利于矿化过程钙离子渗入以形成 HA; Fu 等<sup>[14]</sup>证明钙离子嵌入具有层状结构的噬菌体束在矿化过程中形成区域超饱和状态, 促使 HA 成核生长。因此聚多巴胺层状结构的酚羟基 -C-OH 螯合不同浓度钙离子的 O 1s 峰面积仍含有 56.9% 和 37.3%(图 2c), 说明具有未转化的 -C-OH 可继续螯合矿化溶液中的钙离子; 同时, 表面钙离子促使材料表面形成界面区域的超饱和状态。在矿化过程中(图 3(e)), 聚多巴胺层状结构内酚羟基与钙离子诱导 SBF 的矿化具有协同效应, 促进材料表面 HA 前驱体 DCPA 成核, 逐渐生成 HA。

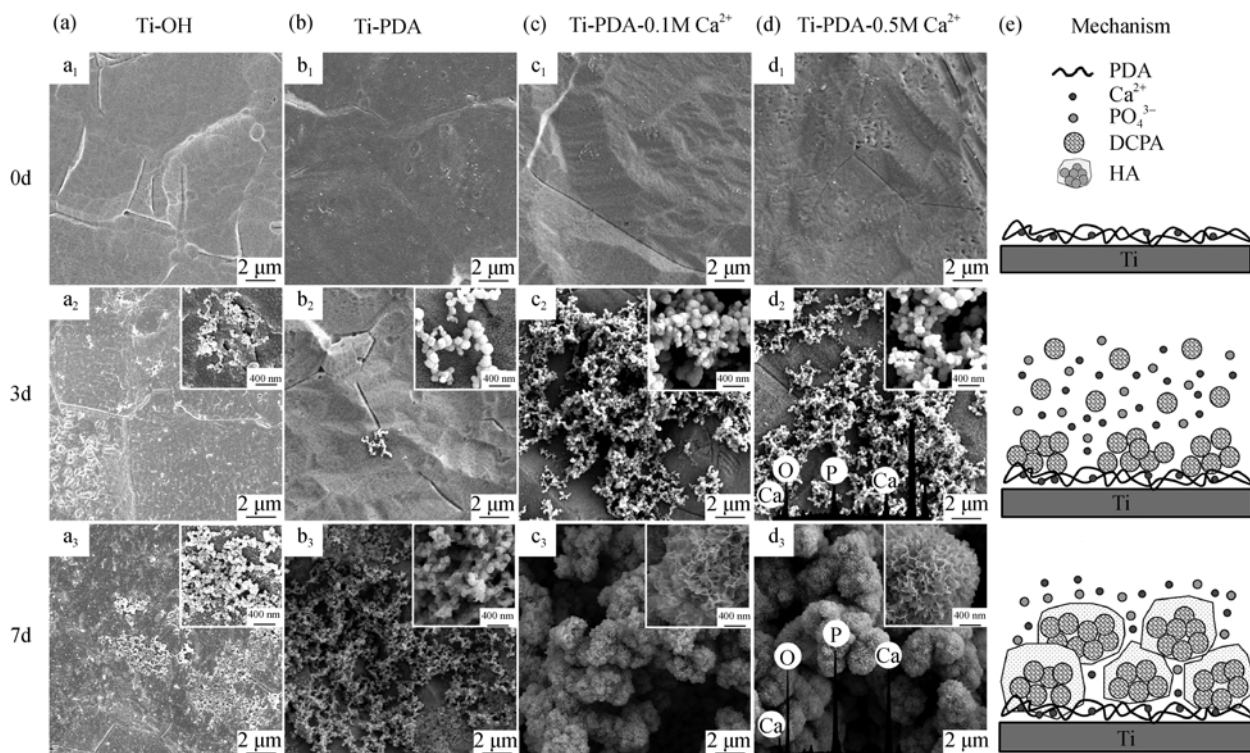


图 3 聚多巴胺钛表面螯合钙离子 37℃ 下浸泡于 SBF 中 0、3 和 7 d 时所形成的羟基磷灰石 SEM 照片及其形成机理示意图  
Fig. 3 FE-SEM images(a-d) and mineralization mechanism diagram (e) of hydroxyapatite formation on polydopamine surface pre-loaded with  $\text{Ca}^{2+}$  in SBF at 37℃ for 0, 3 and 7 d



图 4 为四组样品矿化 7 d 的红外图谱。图 4(a,b) 说明 Ti-OH 和 Ti-PDA 形成少量 CaP 沉淀物, 未出现  $\text{PO}_4^{3-}$  和  $\text{CO}_3^{2-}$  明显红外特征峰。图 4(c,d) Ti-PDA-0.1M  $\text{Ca}^{2+}$  和 Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$  的 CaP 沉淀物在  $3420\text{ cm}^{-1}$  和  $631\text{ cm}^{-1}$  附近出现 O-H 的特征吸收峰;  $569\text{ cm}^{-1}$  和  $604\text{ cm}^{-1}$  是  $\text{PO}_4^{3-}$  的 P-O 键弯曲振动特征峰及  $1032\text{ cm}^{-1}$  为  $\text{PO}_4^{3-}$  不对称伸缩振动峰, 且 PDA 螯合  $\text{Ca}^{2+}$  后在  $1032\text{ cm}^{-1}$  的  $\text{PO}_4^{3-}$  吸收峰尤为显著;  $877\text{ cm}^{-1}$  和  $1300\sim 1650\text{ cm}^{-1}$  为 CaP 沉淀物表面  $\text{CO}_3^{2-}$  的特征峰,  $\text{CO}_3^{2-}$  的特征峰的出现说明 CaP 沉淀物已向磷灰石转化<sup>[15]</sup>。为了进一步证明 HA 生长情况, 图 5(a~d) 为 Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$  矿化 7 d 的 CaP 沉淀物形貌和晶型结构分析。在图 5(a) 中, CaP 沉淀物片状形貌类似于自然骨中磷灰石形貌, HA 表面片状结构是由于碳酸根为主的无机离子形成<sup>[12]</sup>。由图 5(b) 的 XRD 可知,  $2\theta$  在  $25.3^\circ$ 、 $31.7^\circ$ 、 $32.3^\circ$  和  $32.8^\circ$  出现特征衍射峰分别为 (002)、(211)、(112) 和 (300) 晶面结构, 与 HA (PDF#09-0432) 相一致。通过 TEM 和 SAED (图 5(c,d)) 分析, HA 表面为纳米片状晶体并且具有明显的 (002) 晶面, 说明 HA 表面片状结构是由前驱体 DCPA 不断吸附模拟体液中的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$  和  $\text{CO}_3^{2-}$  等离子逐渐沿  $c$ -轴生长成纳米片状表面的 HA, 聚多巴胺和钙离子协同诱导 HA 前驱体的成核, 并不影响 HA 后期生长过程。

### 2.3 细胞相容性

细胞外钙离子可促进细胞粘附和改变细胞生长形貌<sup>[1]</sup>, 本研究分析了材料表面钙离子对成骨细胞粘附及其细胞活性的影响。图 6 为四组样品细胞粘附 24 h 细胞形貌的 SEM 和荧光染色照片, 由图 6(a) 所示, MC3T3-E1 成骨细胞在四组样品中培养 24 h

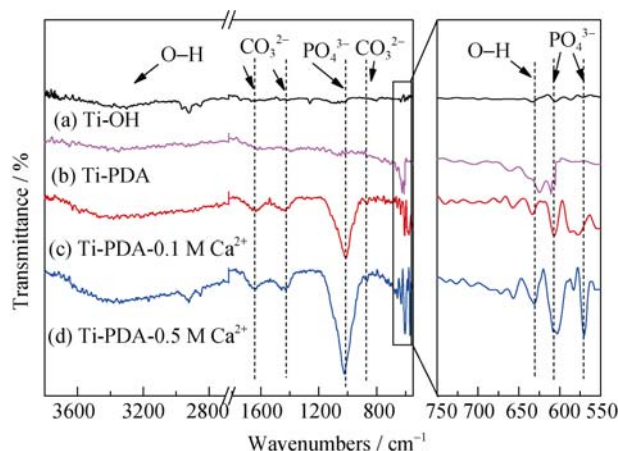


图 4 样品矿化 7 d 的 FT-IR 分析

Fig. 4 FT-IR of the mineralized hydroxyapatite at  $37^\circ\text{C}$  after 7 d being soaked in SBF

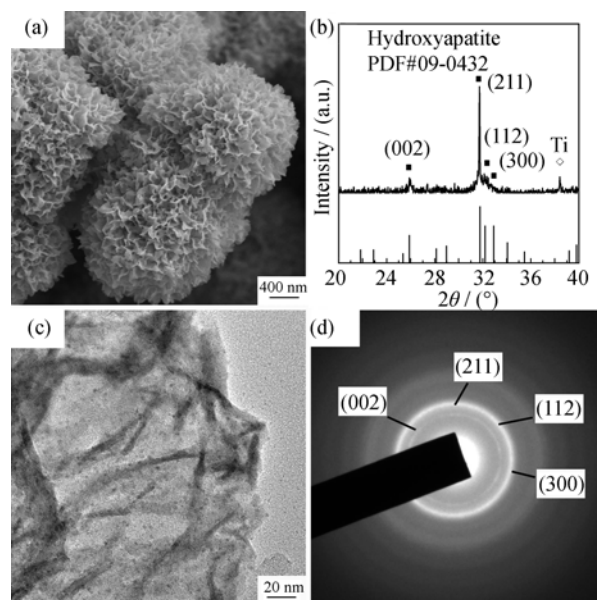


图 5 Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$  表面矿化 7 d 羟基磷灰石形貌和晶型结构分析

Fig. 5 Hydroxyapatite structural analysis of mineralization on Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$  after 7 d being soaked in SBF

(a) SEM, (b) XRD, (c) TEM and (d) SAED

呈现不规则多边形铺展, 表面钙离子对细胞的粘附形貌无明显影响。图 6(b) 中四组样品的活细胞 (绿色) 对比, Ti-PDA-0.1M  $\text{Ca}^{2+}$  出现相对密集的活细胞, 说明细胞培养早期可促进细胞在该表面粘附; 同时, Ti-OH、Ti-PDA 和 Ti-PDA-0.1M  $\text{Ca}^{2+}$  并未出现明显的死细胞 (红色), 而 Ti-PDA-0.5M  $\text{Ca}^{2+}$  死细胞增多, Image-Pro Plus 软件计算得出这四组样品细胞平均存活率分别为  $95.8 \pm 3.3\%$ 、 $96.3 \pm 1.6\%$ 、 $95.0 \pm 1.0\%$  和  $72.1 \pm 4.2\%$  ( $n=4$ ), 显示螯合高浓度钙离子组具有弱的细胞毒性。Julia 等<sup>[16]</sup> 认为细胞外基质的细胞粘附分子钙粘素通过细胞外钙离子保持细胞间相互粘附; 同时, Edward 等<sup>[17]</sup> 认为细胞外高浓度的钙离子抑制细胞的甲状旁腺素的合成和分泌, 影响细胞的生长。本实验结果表明, 钛表面通过聚多巴胺螯合低浓度的钙离子有利于成骨细胞粘附, 表面保持良好的细胞相容性。

### 3 结论

1) 采用聚多巴胺在钛表面构建钙离子螯合平台, 探讨聚多巴胺螯合钙离子的机理, 证实聚多巴胺酚羟基与钙离子螯合过程中向醌基转化。

2) 钛表面聚多巴胺和钙离子协同作用有效诱导类骨羟基磷灰石成核、生长; 且螯合低浓度钙离子有利于成骨细胞粘附并保持良好的细胞相容性。

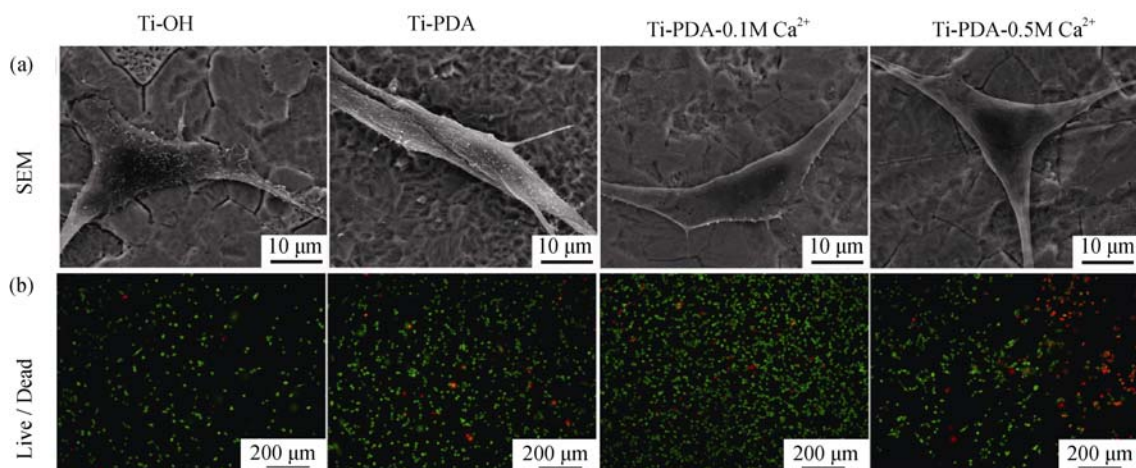


图 6 样品表面 MC3T3-E1 细胞在粘附 24 h 的(a)SEM 照片及其(b)细胞荧光染色图(绿为活细胞, 红为死细胞)

Fig. 6 (a) SEM images of cells morphology and (b) fluorescence images of live/dead staining of osteoblasts (MC3T3-E1) after culturing for 24 h (the live cells are in green and dead cells in red)

## 参考文献:

- [1] ANA M C, BARRADAS, HUGO A M, *et al.* A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*, 2012, **33**(11): 3205–3215.
- [2] FUKUDA A, TAKEMOTO M, SAITO T, *et al.* Bone bonding bioactivity of Ti metal and Ti-Zr-Nb-Ta alloys with Ca ions incorporated on their surfaces by simple chemical and heat treatments. *Acta Biomaterialia*, 2011, **7**: 1379–1386.
- [3] RUN H, YONG H, SHE M L. Enhanced osteoblast functions and bactericidal effect of Ca and Ag dual-ion implanted surface layers on nanograined titanium alloys. *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**(28): 4531–4543.
- [4] GUI S H, LING D S, MIN W, *et al.* Nanofibrous polydopamine complex membranes for adsorption of lanthanum (III) ions. *Chemical Engineering Journal*, 2014, **244**(1): 307–316.
- [5] YAN L L, KE L A, LE H L, *et al.* Polydopamine and its derivative materials synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields. *Chemical Reviews*, 2014, **114**(9): 5057–5115.
- [6] YUN T W, XIAO Q L, YI L, *et al.* Surface-adhesive layer-by-layer assembled hydroxyapatite for bioinspired functionalization of titanium surfaces. *RSC Advances*, 2014, **4**: 44427–44433.
- [7] CHEN Y S, CHUN H D, SHI E Z, *et al.* Polydopamine-coated eppendorf tubes for  $\text{Ti}^{4+}$  immobilization for selective enrichment of phosphopeptides. *Talanta*, 2014, **127**: 88–93.
- [8] TAN Y, TAN G X, NING C Y, *et al.* Bioinspired polydopamine functionalization of titanium surface for silver nanoparticles immobilization with antibacterial property. *Journal of Inorganic Materials*, 2014, **29**(12): 1320–1326.
- [9] KOKUKO T, TAKADAMA H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 2006, **27**(15): 2907–2915.
- [10] SAIDIN S, PASCALE C, MOHAMMED R A K, *et al.* Polydopamine as an intermediate layer for silver and hydroxyapatite immobilisation on metallic biomaterials surface. *Materials Science and Engineering C*, 2013, **33**(8): 4715–4724.
- [11] HAO L H, ZU Y H, XIAO M L, *et al.* Ultradispersed platinum nanoclusters on polydopamine-functionalized carbon nanotubes as an excellent catalyst for methanol oxidation reaction. *Applied Catalysis A: General*, 2015, **490**(1): 65–70.
- [12] JULIE C, KARIM B, NADINE N, *et al.* Characterization of Ca-phosphate biological materials by scanning transmission X-ray microscopy (STXM) at the Ca  $\text{L}_{2,3}$ , P  $\text{L}_{2,3}$  and C K-edges. *Acta Biomaterialia*, 2015, **12**(1): 260–269.
- [13] JUNGKI R, SOOK H K, MINAH L, *et al.* Bone-like peptide hydroxyapatite nanocomposites assembled with multi-level hierarchical structures. *Soft Matter*, 2011, **7**(16): 7201–7206.
- [14] FU K W, BIN R C, CHUAN B M, *et al.* Bacteriophage bundles with prealigned  $\text{Ca}^{2+}$  initiate the oriented nucleation and growth of hydroxyapatite. *Chemistry of Materials*, 2010, **22**(12): 3630–3636.
- [15] XIAO B, KARREN M, CHRISTOPHER M R, *et al.* Functionally graded hydroxyapatite coatings doped with antibacterial components. *Acta Biomaterialia*, 2010, **6**(6): 2264–2273.
- [16] JULIA B, OLIVER J H, BARRY H, *et al.* Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends in Cell Biology*, 2012, **22**(6): 299–310.
- [17] EDWARD M B. Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2013, **27**: 333–343.