

## 生物活性玻璃对乳牙牙本质龋再矿化的体外研究

周 淑, 刘子晗, 郑 红\*

(南京医科大学附属南京儿童医院口腔科, 江苏 南京 210008)

**[摘要]** 目的:通过体外实验比较生物活性玻璃和含氟牙膏对脱矿牙本质的再矿化效果。方法:制备 33 个离体牙的牙本质盘,随机分为 3 组,每组 11 个,分别用生物活性玻璃、1.1 g/L 含氟牙膏及去离子水再矿化 8 d。然后用激光共聚焦显微镜对牙本质盘进行观察和荧光定量分析,扫描电镜(SEM)观察牙本质小管封闭情况。结果:生物活性玻璃组及含氟牙膏组的荧光面积(A)、总荧光强度(TF)、平均荧光强度(AF)低于空白对照组,生物活性玻璃组低于含氟牙膏组,SEM 观察可见含氟牙膏组部分牙本质小管被封闭,管径减小,生物活性玻璃组的牙本质小管基本被封闭,小管口凸起,空白对照组牙本质小管基本开放,周界清晰。结论:生物活性玻璃及 1.1 g/L 含氟牙膏均可使脱矿牙本质再矿化,生物活性玻璃的再矿化效果优于 1.1 g/L 含氟牙膏。

**[关键词]** 牙本质;生物活性玻璃;再矿化;含氟牙膏

**[中图分类号]** R781.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)01-0107-03

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160123

近年来随着饮食结构的变化,牙本质龋有日益增多的趋势。而患儿常因年龄偏小,配合能力差,不能得到早期控制或充填治疗,有一部分患儿快速发展成牙髓炎或根尖周炎,影响乳牙患儿进食、恒牙更替及身体的正常生长发育<sup>[1]</sup>。目前常用的乳牙龋病治疗药物主要为氟化物和硝酸银类,前者需要多次复诊,后者容易使牙齿变黑影响美观,因此寻找一种简单方便且有效的药物来控制乳牙牙本质龋已经十分迫切,本实验就是在体外模拟临床条件下,用激光共聚焦显微镜和扫描电镜比较生物活性玻璃和含氟牙膏对牙本质龋再矿化的疗效差异。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

罗丹明 B(分析纯,南京国药集团化学试剂有限公司),无水醋酸、CaCl<sub>2</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、KOH(分析纯,上海久亿化学试剂有限公司),HEPES(Amresco,美国);生物活性玻璃粉体(奥敏清,北京大清生物技术有限公司);高露洁牙膏(含氟浓度 1.1 g/L,广州高露洁公司);低速切割机(Isomet Low Speed Saw, Buehler 公司,美国);激光扫描共聚焦显微镜(Carl Zeiss LSM710, Carl Zeiss 公司,德国);扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)(LEO 1530VP, LEO 公司,德国)。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 牙本质盘的制备

选择 2 个月内在南京医科大学附属南京儿童医院口腔科的 10~12 周岁患儿因乳牙滞留而拔除的第二乳磨牙,在体视显微镜下挑选冠部无龋无裂纹 33 颗,均获得患者知情同意。清洗后,于釉牙骨质界上 1 mm,垂直牙体长轴切割成(1.00 ± 0.01) mm 厚的牙片,牙片表面依次用 200、600、1 000 目碳化硅砂纸磨除表面玷污层并使其光滑平整,超声清洗后置于去离子水中备用<sup>[2]</sup>。

##### 1.2.2 液体配制

脱矿液:50 mmol/L 醋酸、2.2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、2.2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,以 KOH 调节 pH 到 4.4。酸性缓冲液:50 mmol/L 醋酸、0.25 mmol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、1.5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,以 KOH 调节 pH 到 4.6。中性缓冲液:20 mmol/L HEPES、2.25 mmol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、1.5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 为 7.0。牙膏处理液:生物活性玻璃、1.1 g/L 含氟牙膏分别与去离子水按 1:3 的比例以摇床混合均匀成混悬液。

##### 1.2.3 样本分组及处理

将 33 个样本按随机数字法随机分为 3 组,分别为:生物活性玻璃处理组、含氟牙膏处理组和空白对照组,每组 11 个样本。所有样本放入脱矿液中,置 37℃水浴箱 96 h,形成人工脱矿模型,去离子水洗净样本表面。生物活性玻璃处理组及含氟牙膏处理组,以棉棒蘸取牙膏处理液均匀涂擦样本表面 5

**[基金项目]** 江苏省卫生厅预防医学科研项目(Y2013003)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: 13913900770@163.com

min, 去离子水洗净表面, 依次放入酸性缓冲液中处理 30 min、中性缓冲液中处理 10 min; 空白对照组以去离子水冲洗样本 5 min, 依次放入酸性缓冲液中处理 30 min、中性缓冲液中处理 10 min。每天重复循环 6 次, 共 8 d。样本置于中性缓冲液中过夜, 每天循环均使用新鲜配制的试剂<sup>[3-4]</sup>。

#### 1.2.4 样本观察分析

样本处理结束后, 每组随机抽取 1 个样本于扫描电镜下观察各组本质表面形态。其余样本用低速切割机颊舌向切取 300  $\mu\text{m}$  厚的薄片, 以 0.1 mmol/L 罗丹明 B 荧光染料染色 1 h, 摇床脱色 1 h, 清洗、吹干、封片, 置激光扫描共聚焦显微镜下观察。荧光染料可渗入具有疏松孔隙的脱矿本质区域。脱矿越严重, 孔隙越多, 荧光染料渗入的也越多, 荧光面积越大, 荧光强度也越高<sup>[5]</sup>。图像分析评价参数为本质块

荧光量面积 (area of the fluorescent lesion, A), 单位  $\mu\text{m}^2$ ; 总荧光量 (total fluorescence, TF) 即所测区域所有像素的总荧光量; 病损的平均荧光量 (average fluorescent of the lesion, AF) 即所测区域所有像素的平均荧光量<sup>[6]</sup>。

#### 1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件包, 使用单因素方差分析及 SNK 检验对观察结果进行统计分析,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 激光共聚焦显微镜观察及数据分析

以荧光染料渗入本质的多少定量分析处理前后的再矿化效果, 从图片可以看出玻璃离子组的荧光带最窄, 强度也最弱, 提示该组再矿化效果最好 (图 1)。

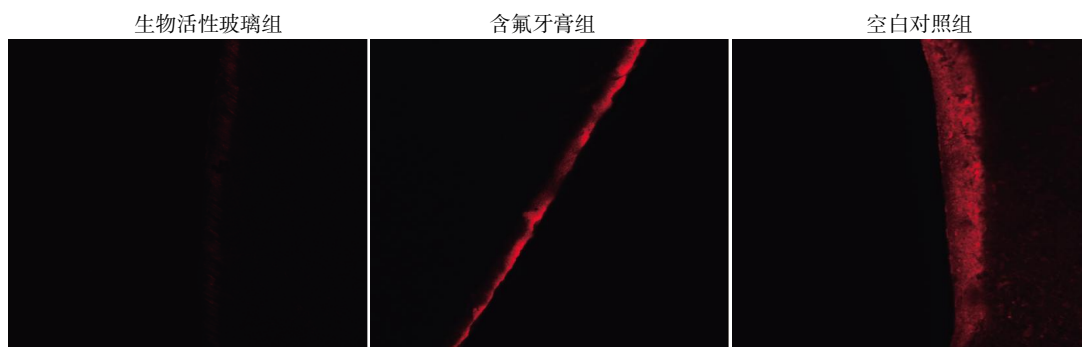


图 1 3 组样本处理后的激光共聚焦显微镜观察结果 ( $\times 10$ )

再矿化前后的 A、TF、AF 比较, 生物活性玻璃组及含氟牙膏组均低于空白对照组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ , 表 1), 表明生物活性玻璃和 1.1 g/L 含氟牙膏对脱矿釉质均有再矿化作用。组间比较发现, 与含氟牙膏处理组相比, 生物活性玻璃处理组 A、TF 和 AF 更低 (表 1)。

表 1 3 组样本处理后的荧光染色情况

	( $\bar{x} \pm s, n=10$ )		
	A ( $\times 10^4$ )	TF ( $\times 10^6$ )	AF
生物活性玻璃组	3.74 $\pm$ 0.10**	0.76 $\pm$ 0.11**	20.56 $\pm$ 1.61**
含氟牙膏组	4.36 $\pm$ 0.12*	1.19 $\pm$ 0.13*	27.02 $\pm$ 1.76*
空白对照组	4.94 $\pm$ 0.15	1.91 $\pm$ 0.17	38.61 $\pm$ 2.12

与空白对照组比较, \* $P < 0.001$ ; 与含氟牙膏组比较, \*\* $P < 0.001$ 。

### 2.2 扫描电镜观察本质表面形态

生物活性玻璃组绝大部分牙本质小管口完全堵塞, 小管口凸起, 直径约为 1  $\mu\text{m}$ , 含氟牙膏组的一部分牙本质小管被堵塞, 管径变小, 约为 1~2  $\mu\text{m}$ , 空白组的牙本质小管完全开放, 呈圆形或椭圆形, 管径为 2~3  $\mu\text{m}$  (图 2)。

## 3 讨论

生物活性玻璃是一类能对机体组织进行修复、替代与再生, 具有能使组织和材料之间形成键合作用的材料, 在 1969 年由 Hench 发现, 其主要成分为  $\text{SiO}_2$ 、 $\text{Na}_2\text{O}$ 、 $\text{CaO}$  和  $\text{P}_2\text{O}_5$  等组成的硅酸盐玻璃, 具有良好的生物相容性和生物安全性<sup>[7]</sup>。Meret Vollenweider 等学者研究表明生物活性玻璃能促使牙本质表面再矿化, 可作为再矿化修复材料。生物活性玻璃接触到水或者唾液时, 释放出钙和磷酸盐离子这些构成羟磷灰石矿物质的基本元素。形成生物硅是一种完全结晶的生物活性玻璃陶瓷 ( $\text{P}_2\text{O}_5$ - $\text{Na}_2\text{O}$ - $\text{CaO}$ - $\text{SiO}_2$ ), 其覆盖在暴露的牙本质表面, 重塑坚固的一层, 使脱矿的牙本质再矿化<sup>[8]</sup>。SEM 观察发现使用生物活性玻璃处理, 沉积物能封闭开放的牙本质小管。生物硅形成的羟磷灰石的矿物质保护层堵住牙本质小管, 防止液体流动来刺激神经引起牙齿对冷、热、酸、甜的敏感。生物活性玻璃为纳米级, 由于其晶粒直径的减小, 界面增大, 表面自由能和结合

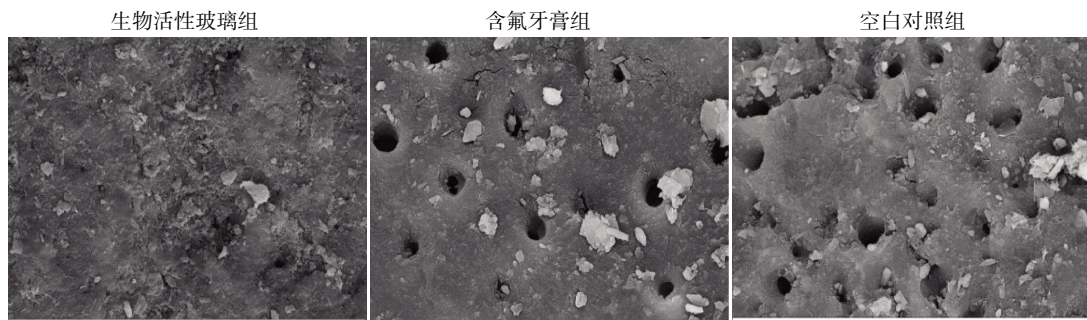


图2 牙本质表面形态扫描电镜图像( $\times 3000$ )

能也增高,而具有更好的理化活性。SEM 纵剖面中,生物活性玻璃组大部分牙本质小管被填满,含氟牙膏组有一半的牙本质小管被填满,而空白组中牙本质小管呈空虚状态。

口腔环境中的牙体硬组织不断进行着脱矿和再矿化。牙齿的健康依赖这种平衡,当脱矿大于再矿化,并持续一段时间就会产生龋损。因此寻求一种能简单准确早期检测龋损的方法十分必要。激光共聚焦显微镜分析是利用激光共聚焦显微成像原理发展而成的新技术,具有灵敏度高,可观察空间结构的特点。其扫描样本表面后,可获所测区域的荧光水平,经过数字影像技术分析牙齿的矿物质含量,从而得出样本脱矿和再矿化的程度。脱矿的牙本质表面比较粗糙,具有较多孔隙。脱矿牙本质发生再矿化后,其表面孔隙减小,荧光染料不易进入牙体,使荧光染色条带的面积和荧光强度减小,由此通过激光共聚焦显微镜可观察到牙体发生再矿化的情况<sup>[9]</sup>。本实验中生物活性玻璃组和氟化牙膏组均使荧光强度、荧光面积及总荧光强度较空白组有所下降,表明生物活性玻璃和氟化牙膏均能促进脱矿牙本质再矿化,生物玻璃组的再矿化效果要显著于含氟牙膏组。

氟离子可与牙釉质表面的晶体发生置换反应,生成氟磷灰石和氟化钙。这种晶体对酸有较强的抵抗力,抑制牙本质的酸溶解而防止更多的牙本质小管开放并能促进再矿化。另外,氟离子能减少牙本质小管的直径,从而减少液压传导。本实验中 SEM 观察,含氟牙膏组,牙本质小管数目减少,管径变细,证实了文献的报道<sup>[10]</sup>。

本实验通过扫描电镜和激光共聚焦显微镜观察,发现生物活性玻璃及含氟牙膏均能使脱矿牙本质再矿化,生物活性玻璃的再矿化效果优于含氟牙膏,提示生物活性玻璃可以用于儿童牙本质龋的防

治,其作用机制和疗效的长期稳定性尚待进一步实验研究。

#### [参考文献]

- [1] Utaka S, Nakashima S, Sadr A, et al. Cariotester, a new device for assessment of dentin lesion remineralization *in vitro* [J]. *Dent Mater J*, 2013, 32(2): 241-247
- [2] 申思敏,陈新梅,王盼盼,等. 六氟硅酸铵溶液封闭牙本质小管的扫描电镜观察[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2013, 23(7): 424-427, 467
- [3] Tian L, Peng C, Shi Y, et al. Effect of mesoporous silica nanoparticles on dentinal tubule occlusion: an *in vitro* using SEM and image analysis [J]. *Dent Mater J*, 2014, 33(1): 125-132
- [4] Tirapelli C, Panzeri H, Soares RG, et al. A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity [J]. *Braz Oral Res*, 2010, 24(4): 381-387
- [5] 张玉森, 李宁毅. 激光扫描共聚焦显微镜在牙体病学中的应用现状 [J]. *上海口腔医学*, 2007, 16(2): 219-224
- [6] Berger SB, Pavan S, Dos Santos PH, et al. Effect of bleaching on sound enamel and with early artificial caries lesions using confocal laser microscopy [J]. *Braz Dent J*, 2012, 23(2): 110-115
- [7] 杨清岭, 陈思杰, 王尹, 等. 硅酸三钙封闭牙本质小管的作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(38): 6740-6746
- [8] 蔡晨星, 朱玲, 闫智奇, 等. 奥威尔牙齿脱敏剂对早期牙本质龋再矿化及抑制脱矿作用体外研究 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2010, 26(3): 349-352
- [9] 赵思铭, 张清, 高学军. 极固宁对牙本质小管封闭作用的扫描电镜研究 [J]. *现代口腔医学杂志*, 2013, 27(4): 214-217
- [10] Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, et al. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes [J]. *J Dent*, 2001, 39(6): 430-437

[收稿日期] 2015-09-06