

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2017.05.003

· 基础研究 ·

不同粒径和形貌的羟基磷灰石对牙本质小管的堵塞作用及耐磨性研究

杨剑珍¹, 申晓青², 刘成霞¹, 徐平平¹

1. 南方医科大学口腔医院(广东省口腔医院)牙体牙髓病科, 广东 广州(510280); 2. 南方医科大学珠江医院口腔科, 广东 广州(510280)

【摘要】 目的 从定性和定量两方面研究不同粒径和形貌的羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)对牙本质小管的堵塞作用及其耐磨性。**方法** 选择人前磨牙 40 颗, 以高速手机制取牙本质片并抛光, 酸蚀后随机均分为 4 组: 20 nm HA 组; 30 nm HA 组; 12 μm HA 组; 空白对照组(不使用任何实验品)。各组分别用对应的材料刷洗牙本质片表面 7 d。将牙本质片一分为二, 一半扫描电镜观察; 另一半进行刷牙磨损实验后扫描电镜观察, 应用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件计算牙本质小管堵塞率。**结果** 扫描电镜下见牙本质小管被颗粒状物堵塞, 堵塞率达 82%~96%, 平均堵塞率为 30 nm HA 组(短棒状) > 20 nm HA 组(针状) > 12 μm HA 组(球形)。牙刷磨损实验后, 扫描电镜下见牙本质表面沉积层光滑致密, 仍有 63% 以上的小管被封闭。**结论** 30 nm 短棒状 HA、20 nm 针状 HA 及 12 μm 球形 HA 对牙本质小管均具有良好的堵塞作用及耐磨性。

【关键词】 羟基磷灰石; 牙本质过敏症; 牙本质小管; 纳米; 脱矿

【中图分类号】 R781.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)05-0288-06

【引用著录格式】 杨剑珍, 申晓青, 刘成霞, 等. 不同粒径和形貌的羟基磷灰石对牙本质小管的堵塞作用及耐磨性研究[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25 (5): 288-293.

The blocking effect and abrasion resistance of hydroxyapatite with different particle sizes and morphologies for dentinal tubules YANG Jian-zhen¹, SHEN Xiao-qing², LIU Cheng-xia¹, XU Ping-ping¹. 1. Department of Endodontics, Stomatological Hospital of Southern Medical University (Guangdong Provincial Stomatological Hospital), Guangzhou 510280, China; 2. Department of Stomatology, Zhujiang Hospital Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

Corresponding author: XU Ping-ping, Email: gdsqykjk@163.com, Tel: 0086-20-84477056

【Abstract】 Objective To study the blocking effect and abrasion resistance of hydroxyapatite (HA) with different particle sizes and morphologies on dentinal tubules from the qualitative and quantitative aspects. **Methods** Dentin discs were etched and divided into 4 groups randomly: 20 nm HA group; 30 nm HA group; 12 μm HA group; control group (without any experimental treatment). Each group was brushed with correspondent materials for 7 days. Then, the dentin disk was divided into two parts, the one was detected by the scanning electron microscopy (SEM); the other was observed by SEM after toothbrush abrasion test. The Image-Pro Plus 6.0 image analysis software was used to calculate the plugging rate of dentinal tubules. **Results** SEM showed that the blockage is granular, the plugging rate of the dentinal tubules were about 82% to 96%. 30 nm HA group (short rod) range the first in the average plugging rate, followed by the 20 nm HA group (needles) and 12 μm HA group (spherical). After mechanical brushing for 7 days, SEM images showed that deposited layer in each group was smooth and compact, and more than 63% of the tubules still had been blocked. **Conclusion** HA with different particle sizes and morphologies had good plugging effect and abrasion resistance on dentine tubules. The blocking effect of HA was affected not only by particle size but also by the morphology.

【Key words】 Hydroxyapatite; Dentine hypersensitivity; Dentine tubules; Nano; Demineralization

【收稿日期】 2016-05-03; **【修回日期】** 2016-10-15

【基金项目】 广东省自然科学基金(2014A030313330); 广州市科技计划项目(201707010199)

【作者简介】 杨剑珍, 主治医师, 硕士, Email: yangjzh2010@163.com

【通讯作者】 徐平平, 教授, 博士, Email: gdsqykjk@163.com

牙本质过敏症是许多常见牙体硬组织疾病的共有症状,主要是指牙本质暴露部分受到刷牙或咬硬物等机械刺激以及温度或酸甜等食物刺激后,所产生的一种尖锐、短暂的酸软、疼痛感觉。2008年我国成年人牙本质过敏症患病率为40.7%^[1],在牙周病患者中的患病率更高达60%~98%^[2],且患病人数呈逐渐上升趋势。临床上治疗牙本质过敏的方法很多,如脱敏药物、牙膏和漱口水、激光、电凝、冷冻脱敏等。各种脱敏治疗效果因人而异,且仅5%左右的人会选择到医院寻求帮助^[1]。因此,能够在家方便使用的脱敏牙膏便得到了牙本质过敏症患者人群的青睐。脱敏牙膏中,主要的功效成分一般基于两种基本原理:一是降低牙本质小管的通透性,主要有Pro-Argin技术(主要成份为精氨酸、碳酸钙和氟化钠)、Novamin技术、氟化钠等,二是降低神经兴奋性,主要为含钾制剂。其中,临床上最常用的是含氟制剂。有研究表明,含氟涂膜只能封闭小管口而无法渗入牙本质小管内,经刷牙后封闭的牙本质小管重新开放,仅在小管周边部位残留少量封闭物^[2]。因此,一种能良好封闭牙本质小管的药物是学者们寻找的目标。近年来,关于羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)用于牙本质过敏症治疗的研究很多。羟基磷灰石是人体骨和牙齿的主要无机成份,安全无毒,且表现出良好的自然封闭牙本质小管、抗牙本质过敏的潜能,已成为脱敏活性成份的研究热点。研究证实HA间存在着同质吸附作用,HA微粒子具有明显的封闭暴露牙本质小管的作用^[3-6],并发现纳米羟基磷灰石(nano hydroxyapatite, n-HA)对牙本质小管的封闭效果更好^[7]。另外,Earl等^[8-10]研究发现短棒状的n-HA粒子较长针状的n-HA粒子具有更好的封闭牙本质小管的作用。但国内外对不同粒径、形貌的HA及其掺入牙膏后封闭牙本质小管的作用研究较少。因此,本研究通过扫描电镜进行检测分析,比较不同粒径和形貌的HA对牙本质小管的堵塞效果,进一步验证HA的抗过敏作用,同时,观察机械刷洗及HA自身溶解性对此堵塞作用的影响,为HA抗敏功效的临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要器材及试剂

电动牙刷(Oral B, P&G公司,美国), Quanta 400 FEG场发射扫描电子显微镜(飞利浦公司,荷

兰), Tecnai G2 F30场发射透射电子显微镜(FEI公司,美国), HA(20 nm、30 nm、12 μm)(北京高德威金属科技开发有限责任公司)。

人工唾液的配制:0.4 g NaCl、0.4 g KCl、0.1 g NaH_2PO_4 、0.005 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1 g Urea、0.795 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1 000 mL去离子水。溶液的pH值用0.01% HCl、0.05% NaOH调整至6.8(37 $^{\circ}\text{C}$)。

1.2 牙本质片的制作及脱矿处理

于广东省口腔医院口腔颌面外科门诊收集因正畸治疗而需要新鲜拔除的前磨牙(年龄16~26岁)40颗(拔牙时间在1个月以内,患者知情同意),要求牙冠完整无裂纹、无龋坏、未进行过任何治疗,充分清洗干净后储存于中性10%甲醛溶液中备用。

使用高速手机制取约1.5 mm厚的冠部牙本质片,抛光成厚度约为1 mm的牙本质片,形成均一、平整、光滑的表面,去离子水超声波清洗3次,每次10 min,干燥备用。

将已制作完成的牙本质置入10%枸橼酸蚀2 min,大量去离子水冲洗后超声波清洗10 min,连续3次,得到牙本质小管开放的牙本质片(图1)。

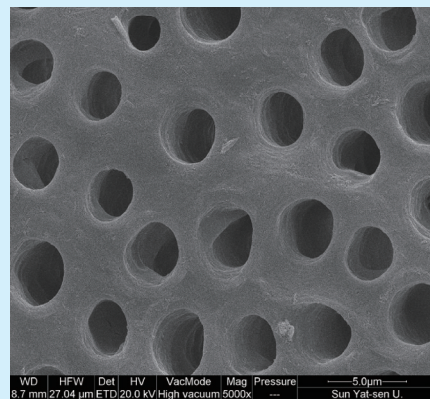


图1 经10%柠檬酸酸蚀2 min后的牙本质片扫描电镜图像 $\times 5\,000$

Figure 1 10% citric acid etching dentin disk for 2 minutes SEM $\times 5\,000$

1.3 样品的表征

采用Quanta 400 FEG场发射扫描电子显微镜和Tecnai G2 F30场发射透射电子显微镜检测HA粉末的形貌、粒度及颗粒的分散性。

1.4 实验处理

随机将40个牙本质片均分为4组:空白对照组(不使用任何实验样品),20 nm HA组,30 nm HA组,12 μm HA组。

将牙本质片固定于载玻片上,每个牙本质片上放置对应的实验样品0.2 g,均匀涂布于整个牙本质片表面,蒸馏水润湿牙本质片,电动牙刷(7 600转/min,顺逆时针约60°转动)用100 g的力刷洗2 min,静置2 min,牙本质片置于去离子水下轻轻冲洗30 s以去除表面的实验样品。空白对照组的牙本质片仅用电动牙刷蘸蒸馏水刷洗。所有牙本质片处理后分别保存于10 mL新鲜人工唾液中,并存放于37℃恒温水浴箱中。连续刷洗7 d,每天2次。

每组牙本质片,随机抽取8个,将牙本质片对半分,一半用蒸馏水刷洗30 s并流水冲洗30 s后,牙本质片干燥后经戊二醛固定,喷金,扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)放大3 000倍及5 000倍下观察牙本质小管的封闭情况,每个样本随机选择3个不同区域进行观察。

每组对半分开的另外8个牙本质片不用实验品,而用电动牙刷蘸蒸馏水继续刷洗7 d(方法同上),每天2次,每次2 min。实验结束后牙本质片干燥后经戊二醛固定,喷金,SEM放大3 000倍及5 000倍下观察,每个样本随机选择3个不同区域进行观察。

1.5 图像分析

将SEM图片导入Image-Pro Plus 6.0图像分析

软件中,分析横断面SEM图片中完整位于图片内的牙本质小管数量(N),校正软件标尺,定义灰度值等,软件自动分辨牙本质小管边界并标记,根据标尺自动计算出小管开放区域的总面积(S);以空白对照组开放牙本质小管的平均直径为基线(D),计算各实验处理组牙本质片中牙本质小管的堵塞率(plugging rate, PR):

$$PR = \left(1 - \frac{4S}{\pi D^2 \times N} \right) \times 100\%$$

1.6 统计学分析

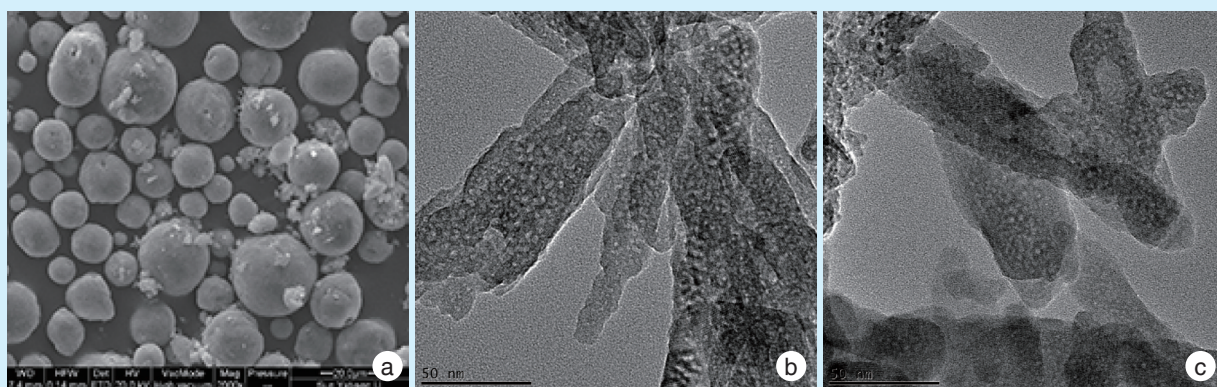
使用SPSS16.0软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用完全随机设计下的方差分析(方差不齐时用Welch法),多重比较采用LSD法(方差不齐时用Dunnett's T3)。P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 样品的表征

SEM观察HA粉末的形貌特征,未经处理的n-HA粉末互相叠加在一起,无法观察形貌,而12 μm HA粉末的颗粒大小不一,颗粒间界限清晰,呈球形。

为了解决n-HA粉末的团聚问题,实验前将其进行超声分散处理。n-HA粉未经超声分散后透射电镜下其形貌清晰可见,分散性较好,20 nm HA的形貌为针状,30 nm HA为短棒状,粒径均在纳米尺寸范围内(图2)。



a: 12 μm HA, 扫描电镜, $\times 4\,000$; b: 20 nm HA, 透射电镜; c: 30 nm HA, 透射电镜。

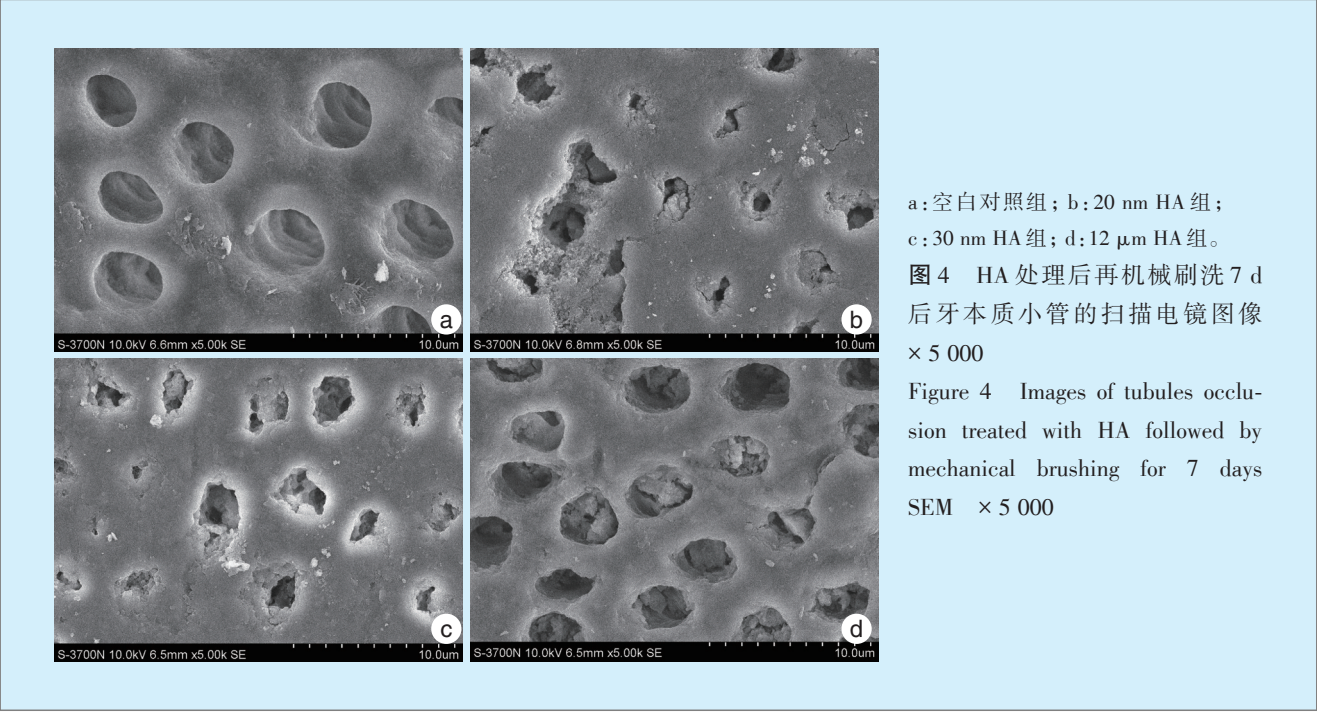
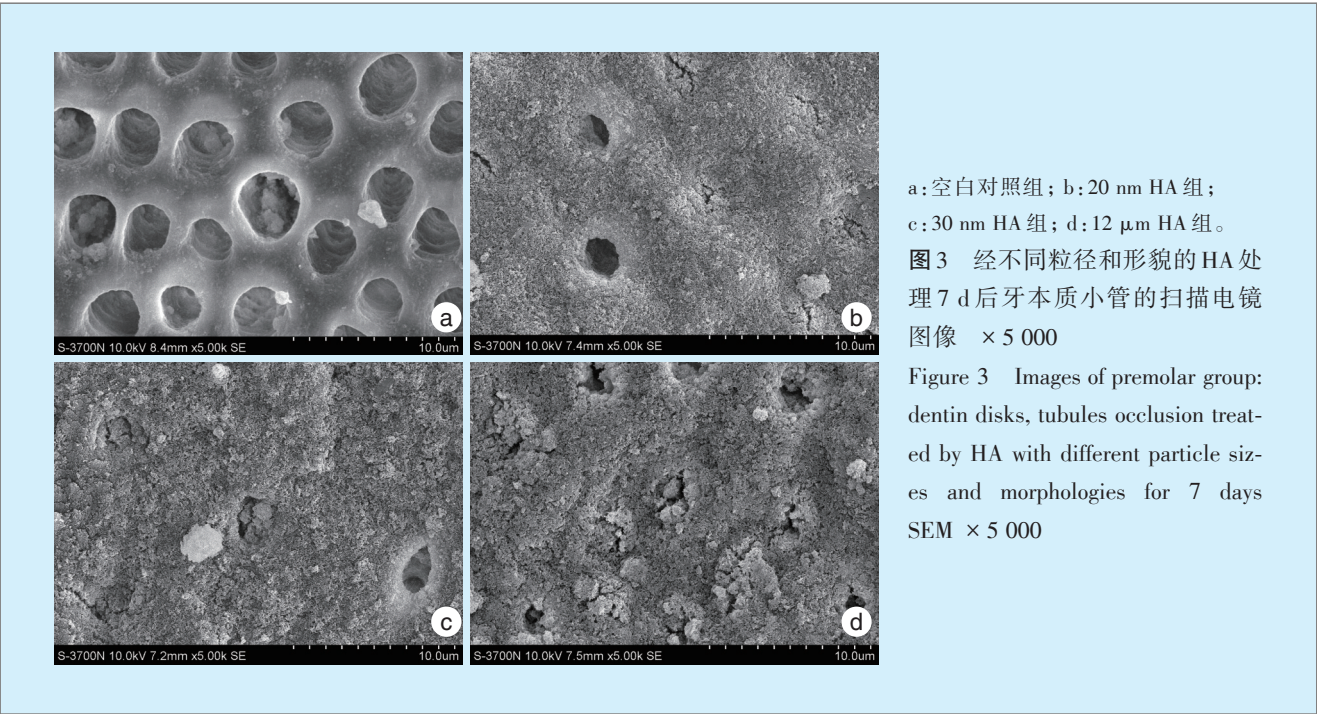
图2 不同粒径和形貌的HA粉末的电镜图像

Figure 2 Micrograph of HA powders with different particle sizes and morphologies

2.2 扫描电镜结果

2.2.1 不同粒径和形貌的HA对牙本质小管的堵塞效果 如图3所示,空白对照组中牙本质小管内基本无堵塞物质存在,仅小管边缘及管间见部分小颗粒状沉淀物。HA组中大部分牙本质小管被材料堵塞,管径明显变小,管间见细小颗粒物形成的沉积层,表面有散在的较大颗粒物或块状物,n-HA组(20 nm HA组和30 nm HA组)堵塞物细腻,12 μm HA组的堵塞物为较大颗粒状。

2.2.2 不同粒径和形貌的HA对牙本质小管的持续堵塞结果 如图4所示,经过牙刷机械刷洗7 d后,空白对照组中牙本质小管空虚,未见明显堵塞物,管间及管边缘少许杂质;n-HA组的牙本质小管开放数目及面积增加,堵塞物不再为附着疏松的颗粒物或块状物,而是均质、连续、密实的沉积层;12 μm HA组的牙本质小管内被团块状物堵塞,空隙较大,渗入小管内部,可见清晰边界,较疏松,管间沉淀物密实。



2.3 牙本质小管堵塞率结果的统计学分析

不同粒径和形貌的HA处理牙本质7 d后小管堵塞率的比较结果见表1, HA组的平均堵塞率30 nm HA组 > 20 nm HA组 > 12 μm HA组。不同

粒径组别之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。经蒸馏水继续刷洗7 d后, HA组的平均堵塞率20 nm HA组 > 12 μm HA组 > 30 nm HA组($P > 0.05$)。

表1 HA刷洗7 d及继续机械刷洗7 d牙本质小管堵塞率的检测情况

Table 1 Plugging rate of the dentin tubules treated by HA with different particle sizes and morphologies for 7 d and followed by mechanical brushing with distilled water for 7 d $\bar{x} \pm s, n = 24$

处理时间	20 nm HA组	30 nm HA组	12 μm HA组	F值	P值
7 d	0.93 $\pm$ 0.07	0.96 $\pm$ 0.09	0.92 $\pm$ 0.10	0.321 ¹⁾	0.810
14 d	0.79 $\pm$ 0.09	0.68 $\pm$ 0.06	0.69 $\pm$ 0.11	2.385 ¹⁾	0.114

注 14 d: HA刷洗7 d及继续机械刷洗7 d; ¹⁾为welch结果; HA: 羟基磷灰石。

3 讨论

3.1 敏感牙本质模型

临床上各种原因导致的牙本质过敏症状极其常见, 现有的治疗效果差异较大, 而敏感牙本质模型是客观评价脱敏材料对牙本质过敏症治疗效果的重要手段之一。本实验用10%柠檬酸^[11]酸蚀去除玷污层并模拟牙本质小管开放, 建立重复性良好的牙本质敏感研究模型, 从而客观准确地评价不同粒径和形貌的HA封闭敏感牙本质的效果。

3.2 不同粒径和形貌的HA对牙本质小管的堵塞效果

氟化钠是临床上治疗牙本质过敏症的常用药物, 其机制为氟离子与牙本质中的钙离子产生氟化钙晶体, 封闭牙本质小管, 达到治疗牙本质过敏症的目的^[8]。但氟化钠的远期脱敏效果不佳, 因为咀嚼及口腔内复杂的环境会使尚未来得及沉积的氟磷灰石溶解^[12]。因此, 研究开发性能更优的抗敏感活性成分是脱敏治疗领域的研究热点。

目前, 国内外的大量研究表明, HA及其牙膏具有良好的封闭牙本质小管作用^[3,6,12]。本课题组前期研究也发现掺HA牙膏具有良好的堵塞牙本质小管作用^[13]。

本实验研究纯HA封闭牙本质小管的作用, 结果发现, 不同粒径和形貌的HA对开放牙本质小管具有很好的封闭作用, 堵塞率高达82%~96%, 远远高于空白对照组。扫描电镜下可见牙本质表面有大量矿物质覆盖形成的表面沉积层, 与王浙君等^[10]的观察一致。在口腔环境中, HA尤其是高活性的n-HA可提供 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 促进表面再矿化, 同时, n-HA具有较强的缓冲能力, 可通过中和酸碱度

来预防脱矿, 其次n-HA晶体可以进入并沉积在牙本质小管内, 堵塞牙本质小管^[14-15]。同时, n-HA还可依靠同质相吸附作用沉积于牙本质小管内及表面^[3,16]。

本研究中, 统计学数据表明n-HA的堵塞率高于12 μm HA, n-HA组在SEM下可见牙本质表面形成的沉积物细腻, 而12 μm HA组的堵塞物为较大的团块。HA组的平均堵塞率为30 nm HA组(短棒状) > 20 nm HA组(针状) > 12 μm HA组(球形), 30 nm短棒状HA组堵塞效果最佳, 而不是预期中的20 nm针状HA, 说明HA对牙本质小管的堵塞作用也与其形貌有一定的关系^[17]。

本实验中, 牙刷机械刷洗7 d后, 各组的堵塞材料均有不同程度的丢失, 但堵塞率还是高达63%~84%; SEM下见牙本质表面的沉积层密实, 牙本质小管管径明显变小, 小管内可见材料渗入, 说明HA能抵抗牙刷的磨耗作用以及人工唾液的冲洗和溶解作用, 是一种优异的抗敏材料, 与其他学者的研究结果一致^[3,6-7,18]。

牙刷磨耗实验后, 20 nm HA组的堵塞率最高, 说明20 nm HA的耐磨性最好。笔者推测可能是因为20 nm针状HA的粒径最小, 表面活性最大, 颗粒相互间的作用力大, 导致颗粒间结合得更紧密, 即便在牙刷的摩擦作用下脱落的机会仍最小。

30 nm短棒状HA的耐磨性欠佳, 笔者推测可能是短棒状外形的HA更易发生团聚, 形成较大颗粒, 从而丧失纳米材料的优势。

本实验未设立氟化钠对照组, 因此, 进一步研究将设立氟化钠对照组, 并使用牙本质渗透性测定、能谱仪检测钙、磷元素等更多客观指标来评价HA封闭牙本质小管的效果。

本研究通过建立牙本质敏感模型,采用扫描电镜观察并分析不同粒径和形貌的HA对牙本质小管的堵塞作用和耐磨效果,发现HA具有良好的堵塞牙本质小管作用以及持续堵塞效果,堵塞效果以30 nm短棒状HA最佳,而持续堵塞效果以20 nm针状HA最佳;HA的形貌与粒径均会影响其对牙本质小管的堵塞效果。

参考文献

- [1] Parolia A, Kundabala M, Mohan M. Management of dentinal hypersensitivity: a review[J]. J Calif Dent Assoc, 2011, 39(3): 167-179.
- [2] Cummins D. Recent advances in dentin hypersensitivity: clinically proven treatments for instant and lasting sensitivity relief[J]. Am J Dent, 2010, 23(Spec): 3A-13A.
- [3] 刘洪良. 牙本质保护膜防治活髓基牙牙本质过敏的观察[J]. 广东牙病防治, 2015, 23(4): 207-209.
- [4] 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.
- [5] 毕良佳, 李虹, 刘来发, 等. 羟基磷灰石同质间吸附效果及对牙本质小管封闭效果的研究[J]. 口腔医学研究, 2006, 22(5): 501-503.
- [6] Besinis A, Van Noort R, Martin N. The use of acetone to enhance the infiltration of HA nanoparticles into a demineralized dentin collagen matrix[J]. Dent Mater, 2016, 32(3): 385-393.
- [7] 张鹏, 管红雨, 钟小君. 钛种植体羟基磷灰石和神经生长因子复合涂层的制备及缓释性能研究[J]. 广东牙病防治, 2014, 22(5): 238-240.
- [8] Earl JS, Wood DJ, Milne SJ. Dentine infiltration a cure for sensitive teeth[J]. Am Ceram Soc Bull, 2006, 85(7): 22-25.
- [9] Besinis A, De Peralta T, Handy RD. Inhibition of biofilm formation and antibacterial properties of a silver nano-coating on human dentine[J]. Nanotoxicology, 2014, 8(7): 745-754.
- [10] 王浙君, 撒悦, 马霄, 等. 纳米羟基磷灰石的制备及其对牙本质小管封闭效果的初步观察[J]. 中华口腔医学杂志, 2009, 44(5): 297-300.
- [11] Yuan PY, Shen XQ, Liu J. Effects of dentifrice containing hydroxyapatite on dentinal tubule occlusion and aqueous hexavalent chromium cations sorption: a preliminary study[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e45283.
- [12] Besinis A, De Peralta T, Tredwin CJ, et al. Review of nanomaterials in dentistry: interactions with the oral microenvironment, clinical applications, hazards, and benefits[J]. ACS Nano, 2015, 9(3): 2255-2289.
- [13] Itota T, Torii Y, Nakabo S, et al. Effect of fluoride-releasing adhesive system on decalcified dentin[J]. J Oral Rehabil, 2003, 30(2): 178-183.
- [14] Singal P, Gupta R, Pandit N. 2% sodium fluoride-iontophoresis compared to a commercially available desensitizing agent[J]. J Periodontol, 2005, 76(3): 351-357.
- [15] Browning WD, Cho SD, Deschepper EJ. Effect of a nano-hydroxyapatite paste on bleaching-related tooth sensitivity[J]. J Esthet Restor Dent, 2012, 24(4): 268-276.
- [16] Wang R, Wang Q, Wang X, et al. Enhancement of nano-hydroxyapatite bonding to dentin through a collagen/calcium dual-affinitive peptide for dentinal tubule occlusion[J]. J Biomater Appl, 2014, 29(2): 268-277.
- [17] 杨越雄. 羟基磷灰石牙膏的研究[J]. 华中理工大学学报, 2000, 28(1): 89-92.
- [18] Souza BM, Comar LP, Vertuan M, et al. Effect of an experimental paste with hydroxyapatite nanoparticles and fluoride on dental demineralisation and remineralisation in situ[J]. Caries Res, 2015, 49(5): 499-507.
- [19] Besinis A, Van Noort R, Martin N. Remineralization potential of fully demineralized dentin infiltrated with silica and hydroxyapatite nanoparticles[J]. Dent Mater, 2014, 30(3): 249-262.
- [20] Earl JS, Wood DJ, Milne SJ. Nanoparticles for dentine tubule infiltration: an in vitro study[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2009, 9(11): 6668-6674.
- [21] Vyavhare S, Sharma DS, Kulkarni VK. Effect of three different pastes on remineralization of initial enamel lesion: an in vitro study[J]. J Clin Pediatr Dent, 2015, 39(2): 149-160.

(编辑 张琳, 陈林)