

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.05.011

· 综述 ·

牙体组织粘接界面观察分析方法的研究进展

马超群¹, 刘猛¹, 仇琚², 廖紫璇¹, 周唯¹, 陈吉华¹

1. 口腔疾病国家临床医学研究中心 军事口腔医学国家重点实验室 陕西省口腔医学重点实验室 第四军医大学口腔医院修复科, 陕西 西安(710032); 2. 口腔疾病国家临床医学研究中心 军事口腔医学国家重点实验室 陕西省口腔医学重点实验室 第四军医大学口腔医院牙体牙髓病科, 陕西 西安(710032)

【摘要】 目前牙科粘接技术及材料以其优良的性能,已被广泛应用于口腔治疗的各个领域。为提高粘接效果,各种新型粘接技术及材料被不断研发。而粘接界面的观察分析是评估粘接效果最重要的实验室检测手段之一。本文通过对相关文献进行收集整理,筛选出目前最常用的6种牙体组织粘接界面观察方法,包括扫描电子显微镜、透射电子显微镜、激光共聚焦显微镜、拉曼光谱、光学相干层析成像、原子力显微镜。分析其特点可发现:扫描电子显微镜及透射电子显微镜多用于界面细微结构的观察;激光共聚焦显微镜、光学相干层析成像多用于微渗漏、外源性荧光、自发荧光等特征性图像信息的获取;而拉曼光谱及原子力显微镜则能对粘接界面的化学组成及机械性能进行分析。

【关键词】 牙体组织; 牙科粘接; 粘接界面; 扫描电子显微镜; 透射电子显微镜; 激光共聚焦显微镜; 拉曼光谱; 光学相干层析成像; 原子力显微镜; 观察分析

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2021)05-0356-05



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【引用著录格式】 马超群,刘猛,仇琚,等.牙体组织粘接界面观察分析方法的研究进展[J].口腔疾病防治,2020,29(5):356-360. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2021.05.011.

Research progress on the methods of observation and analysis of dental bonding interfaces MA Chaoqun¹, LIU Meng¹, QIU Jun², LIAO Zixuan¹, ZHOU Wei¹, CHEN Jihua¹. 1. National Clinical Research Center for Oral Diseases & State Key Laboratory of Military Stomatology & Shaanxi Key Laboratory of Oral Diseases & Department of Prosthodontics, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. National Clinical Research Center for Oral Diseases & State Key Laboratory of Military Stomatology & Shaanxi Key Laboratory of Oral Diseases & Department of Operative Dentistry and Endodontics, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Road, Xi'an 710032, China.

Corresponding author: ZHOU Wei, Email: zw861231@163.com, Tel: 86-29-84776128; CHEN Jihua, Email: jhchen@fmmu.edu.cn, Tel: 86-29-84776329

【Abstract】 Dental bonding technology and materials have been used widely in dentistry because of their excellent properties. The development of novel bonding technology and materials is constantly being performed to improve the effect of dental bonding restorations. Observation and analysis of the dental bonding interface is one of the most important methods for laboratory evaluation of bonding efficiency. This paper aims to review the methods of observation and analysis of dental bonding interfaces to provide a reference for the selection of evaluation methods in dental bonding research. The features of 6 methods, including scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), confocal laser scanning microscopy (CLSM), Raman spectroscopy (RS), optical coherence tomography (OCT) and atomic force microscopy (AFM), were described and summarized. Among these methods, SEM and TEM are used most

【收稿日期】 2020-06-12; **【修回日期】** 2020-09-12

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81720108011, 81801009); 中华口腔医学会青年临床科研基金项目(CSA-B2018-04, CSA-B2018-02); 陕西省自然科学基金基础研究计划一般项目(2019JQ-705); 教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT13051)

【作者简介】 马超群, 本科, Email: 2604342007@qq.com

【通信作者】 周唯, 主治医师, 博士, Email: zw861231@163.com, Tel: 86-29-84776128; 陈吉华, 教授, 博士, Email: jhchen@fmmu.edu.cn, Tel: 86-29-84776329

often in the analysis of fine structures; CLSM and OCT are used for the acquisition of characteristic image signals, such as microleakage and exogenous and endogenous fluorescence; and RS and AFM can test chemical composition and mechanical properties.

【Key words】 dental tissues; dental bonding; bonding interface; scanning electron micrographs; transmission electron microscope; confocal laser scanning microscopy; raman spectroscopy; optical coherence tomography; atomic force microscope; observation and analysis

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

J Prev Treat Stomatol Dis, 2021, 29(5): 356-360.

This study was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No. 81720108011, 81801009); CSA Clinical Research Fund (No. CSA-B2018-04, CSA-B2018-02); Natural Science Basic Research Plan in Shaanxi Province of China (No. 2019JQ-705); Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT13051)

随着口腔粘接修复技术的发展,牙科粘接技术与材料已被广泛应用于牙科治疗的各个领域。粘接效果的评价包括临床观察和实验室检测两部分,实验室检测中对粘接修复材料与牙体硬组织结合界面的观察分析是评价粘接效果的重要手段。根据研究目的不同,学者们开发出了多种用于粘接界面形貌性能观察分析的方法。牙体组织粘接界面的观察分析主要借助于各种显微镜。而在具体的检测中,显微镜的功能又不仅限于一般的形貌观察,还可以对物质的成分结构生物活性等进行检测,甚至有些显微镜成像原理即为物质成分差异。根据对相关文献的收集与整理,将目前最常用的粘接界面观察分析的方法按照显微镜类型进行了分类叙述,其中也包括基于显微镜观察的其他分析方法,如下。

1 扫描电子显微镜 (scanning electron micrographs, SEM)

SEM是一种通过收集电子束与试样表面作用产生的信号生成图像以达到对试样表面形貌呈现的方法。电子束可使试样5~10 nm厚度的表层电离逸出大量二次电子。试样某部位二次电子的产额与试样表面的凹凸形貌以及成像的亮度正相关^[1]。所以普通模式下的SEM图像特点为凸出的地方亮度高而凹陷的地方亮度低^[2]。入射电子也有一部分会被试样50~100 nm厚度的表层反射成背散射电子。试样某部位背散射电子的产额与该部位元素的原子序数高度成正相关。所以背散射模式下的SEM图像特点为元素原子序数高的区域亮度高,而原子序数低的区域亮度低^[3]。这种模式适用于粘接界面纳米渗漏的观察,因为可以显示银

离子的位置^[4-5]。然而背散射模式下的SEM成像分辨率要低于普通模式。

SEM观察样本的制作分为两步。第一,粘接试件制作,按照需求制备相应的粘接样本,并通过切割或其他方法形成适当的形态;第二,电镜样本制作,根据需求样本可经过或不经过固定、脱矿、脱胶原、超声清洗、表面抛光、梯度脱水等处理,最后进行喷金。SEM观察深度较浅,其样本制作对表面处理要求较高,但样本表面经过切割会产生玷污层从而影响观察。对于切割产生观察面的样本就需要去除玷污层,可以采用高度抛光或表面酸蚀的方法,或者根据需要仅保留部分结构,如用磷酸盐及次氯酸去除全部牙体组织而仅保留树脂结构^[6-7]。抗酸碱层则可能需要更为负责的样本表面处理^[8]。

SEM界面形态景深、视野大,立体效果好,能够比较清晰地反映牙本质胶原纤维和树脂的位置关系。此外还可利用SEM相配套的X线能谱仪(X-ray energy dispersive analysis, EDS)对界面结构的元素组成进行深入分析;但表面处理可能难以保证界面结构完全不受损伤。此外,在真空干燥环境中观察会引发材料及组织收缩,产生裂缝影响观察效果。针对干燥的问题也可用环境扫描电镜(environmental scanning electron microscope, ESEM)进行观察,但ESEM分辨率不及SEM,使用仍具有一定局限性^[9]。

2 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM)

TEM是一种通过收集电子束透过试样后的电子信息,生成图像以达到试样微观结构与成分分

析的方法。TEM观察试样通常为80~100 nm的超薄切片^[10]。TEM较SEM有更高分辨率,可观察到试样内部的超微结构,在粘接界面观察中常应用于牙本质和混合层中胶原和矿物质或粘接树脂之间的结构关系和界面纳米渗漏的分析。

TEM观察样本粘控制样较SEM复杂,需进行脱矿处理,并经过多重固定,梯度脱水,包埋,染色和超薄切片等步骤。TEM观察深入物质内部,可显示界面的超微结构,将树脂、胶原、矿物质的二维结构关系显示较为清晰^[9]。但与SEM相比,TEM无法反映界面的立体结构,且由于是超薄切片,样本制作的精细程度会对观察效果产生明显影响。

3 激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)

CLSM是一种在荧光显微镜成像基础上加装了激光扫描装置,利用计算机进行图象处理,使用紫外或可见光激发荧光探针得到物质内部微细结构的方法。其所得图像是标本的光学横断面,克服了普通显微镜图像模糊的缺点^[11]。

存在于粘接界面的能被探测到的荧光信号分为两类。一类是外源性荧光,即荧光染料及荧光反应所形成的荧光信号;另一类是内源性荧光,即自发荧光。外源性荧光根据观察目的不同有多种形式:①染料标记界面结构,即在粘控制样过程中将荧光染料与粘接材料混合形成荧光标记的粘接材料,观察时荧光可显示粘接剂的位置,通过荧光信号反映粘接界面的形貌^[12];②染料渗透,即将粘接样本浸入荧光染料溶液中,染料会进入封闭性差的界面渗漏位置,实现对界面完整性的评估^[13];③荧光反应,当发生特异性反应时,原本淬灭状态的荧光剂被激活来探测目标物质在粘接界面的分布情况。如粘接界面原位酶谱检测,即将淬灭状态的荧光标记明胶溶液滴加在粘接试件上进行孵育,明胶酶活性增强时淬灭状态的荧光标记明胶被水解产生荧光信号,从而对粘接界面胶原破坏情况进行研究^[14]。此外,还可利用死/活菌荧光染色试剂,对粘接界面内及下方牙体组织中细菌进行染色,观察致龋菌对粘接界面的破坏情况^[15]。

内源性荧光则是粘接界面各物质结构在CLSM激发光源的照射下所产生的荧光信号。据相关研究,健康及脱矿牙本质、粘接剂、复合树脂、粘接剂混合层等都能发出不同强度的自发荧光信号,从而用于对界面不同结构的区分,可对粘接界

面的破坏程度、早期龋等进行观测^[16-17]。

CLSM样本制备简便,水不影响CLSM扫描,可对正常湿度的试样观察,能保持样本的原始状态。CLSM还可对样本表面下一定深度的地方进行扫描,通过计算机重建获得三维图像。但外源性荧光可能会因为制样过程产生一定的误差,如染料的外溢或混合不均匀。内源性荧光能够在一定程度上避免外源性染色所产生的误差,但是作为一种新的观察方法还有待研究。

4 拉曼光谱(Raman spectroscopy, RS)

RS作为一种分子振动谱线,其观察原理为拉曼散射和拉曼位移。不同化学键或基团特有的分子振动能产生特异性拉曼位移。在拉曼光谱的结果图中,X轴代表拉曼位移,对应化学基团;Y轴代表峰强度,和基团浓度呈正比。不同材料有特征性的拉曼光谱,可用于定性反映物质的组分和结构信息^[18]。

常规粘接界面观察样本因切割会产生玷污层而影响RS的定性分析。此时可通过高度抛光或酸蚀剂去除玷污层以增加拉曼分析的准确性。清除表面玷污层后便可直接进行观察,无需干燥。当检测靠近交界处的牙本质,若观测到树脂成分特征峰和牙体组织特征峰同时出现,证明树脂已经渗入牙本质小管。此外,若以特征峰为峰强热度值,可显示不同结构成分在粘接界面的分布^[19]。虽然RS不是一种严格意义上的定量检测手段,但可通过与正常牙本质及树脂的谱图进行对比,分析粘接剂对牙本质表面改造程度^[3]。

相比于SEM和TEM,RS可通过分析化学成分变化精确反映界面结构,并可实现对粘接界面的多点连续监测,获得较为准确的界面结构成分变化情况^[20-21]。

5 光学相干层析成像(optical coherence tomography, OCT)

OCT通过光源的低相干光干涉原理和图像处理技术的融合,分析组织对光源产生的背向散射光和另一束光源产生的干涉光得到样品在不同深度的结构信息^[22]。

在牙科领域,OCT被首先用于对龋坏组织的观察,龋坏脱矿部位的信号强度灰度较周围正常牙本质高^[23]。近年来,OCT对粘接界面的观察主要集中于对界面微渗漏的分析。用于填充缺陷的介

质和材料主体之间的光学对比度,会导致反向散射信号的可检测变化。作为缺陷区域,微渗漏的光学散射强度与其他部分有明显差异,在OCT图像中,界面微渗漏表现为明显的灰度增强区域。此外界面或其他位置出现如气泡等较大缺陷,OCT图像中则表现为灰度减小的信号中断区域^[24]。

OCT成像具有非接触性、无损伤性、成像速度快等优点,观测不受水分影响。由于不需要切割,样本可反复使用,从而最大限度消除粘接耐久性检测中由样本误差带来的干扰。但由于组织自身导致的光学衰减,大多数组织中的OCT成像深度在2~3 mm。OCT的分辨率较低,难以对粘接界面的细微结构进行观察。

6 原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)

AFM通过探针与物体表面结构发生力学作用,重现物体表面细微结构。其纳米级探针和微米级悬臂是成像的关键^[25],在测量时须注意对样本表面机械性能进行预估以选择适合的探针,对机械性能差异较大的不同结构进行连续检测时,也须及时更换探针以获得准确的测量结果,同时也避免仪器的损伤。其工作模式有接触、非接触和轻敲模式,牙本质粘接界面的结构分析常用轻敲模式。样品制作时只需按照说明进行。观测面必须平整,因为AFM只能处理表面一定高度变化,否则会产生低质量图像甚至损坏探针。尽量保证抛光等制备技术的质量,从而可获取最大分辨率^[26]。

AFM的轻敲模式可清晰地观测到树脂层、混合层、牙本质层、牙本质小管以及树脂突等结构^[27]。除观测形貌外,AFM还可通过对表面形貌进行三维分析,实现对牙本质小管直径、深度以及表面粗糙度的测量^[28]。这种直接测量得到的表面粗糙度可用于酸对牙釉质的侵蚀程度和粘接剂附着力的分析^[26, 29]。此外,AFM与纳米硬度计联合使用可用于样本表面纳米机械性能的检测,表面不同部位的力学性能差异以硬度值表示,分辨率可达纳米级^[30]。AFM在牙齿硬组织表面结构形貌及性能分析中具有广泛应用。在粘接界面观测上,可尽量保存牙齿原貌,排除人为因素干扰,也不会受到样品表面水膜和残留的黏性粘接剂的影响,其多种模式也可适应不同环境。

7 小结

以上6种为目前评估粘接界面质量的最常用

方法。SEM在界面形貌观察中最为常用;对于超微结构的观察,如牙本质胶原、牙釉质釉柱晶体的观察,则必须使用SEM或TEM这种高分辨率的显微镜;CLSM常借助外源性染色对粘接材料在牙体组织中的分布及形态进行观察;纳米渗漏检测中SEM与TEM均使用较多;微渗漏可用CLSM荧光染料渗透法进行检测;OCT在微渗漏检测中也有着良好的应用前景;对于界面结构成分的分析,可通过SEM中的EDS进行元素检测,也可使用RS对特征化学键和基团进行分析;粘接界面的物理特性,如机械性能、表面粗糙度则可通过AFM及相应设备进行检测。

【Author contributions】 Ma CQ, Liu M wrote the article. Qiu J, Liao ZX collected the data. Zhou W, Chen JH revised the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Falsafi SR, Rostamabadi H, Assadpour E, et al. Morphology and microstructural analysis of bioactive-loaded micro/nanocarriers via microscopy techniques: CLSM/SEM/TEM/AFM[J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2020, 280: 102166. doi: 10.1016/j.cis.2020.102166.
- [2] Xing Q. Information or resolution: which is required from an SEM to study bulk inorganic materials?[J]. *Scanning*, 2016, 38(6): 864-879. doi: 10.1002/sca.21336.
- [3] Hass V, Cardenas A, Siqueira F, et al. Bonding performance of Universal adhesive systems applied in Etch-and-Rinse and Self-Etch strategies on natural dentin caries[J]. *Oper Dent*, 2019, 44(5): 510-520. doi: 10.2341/17-252-L.
- [4] Yang H, Guo J, Guo J, et al. Nanoleakage evaluation at adhesive-dentin interfaces by different observation methods[J]. *Dent Mater J*, 2015, 34(5): 654-662. doi: 10.4012/dmj.2015-051.
- [5] Yu F, Luo ML, Xu RC, et al. Evaluation of a collagen-reactive monomer with advanced bonding durability[J]. *J dent Res*, 2020, 99(7): 813-819. doi: 10.1177/0022034520913540.
- [6] Frassetto A, Breschi L, Turco G, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability--a literature review[J]. *Dent Mater*, 2016, 32(2): e41-e53. doi: 10.1016/j.dental.2015.11.007.
- [7] Xu R, Yu F, Huang L, et al. Isocyanate-terminated urethane-based dental adhesive bridges dentinal matrix collagen with adhesive resin[J]. *Acta Biomater*, 2019, 83(83): 140-152. doi: 10.1016/j.actbio.2018.11.007.
- [8] Li N, Nikaido T, Alireza S, et al. Phosphoric acid-etching promotes bond strength and formation of acid-base resistant zone on enamel[J]. *Oper Dent*, 2013, 38(1): 82-90. doi: 10.2341/11-422-L.
- [9] Mattarozzi M, Manfredi E, Lorenzi A, et al. Comparison of environmental scanning electron microscopy in low vacuum or wet mode for the investigation of cell biomaterial interactions[J]. *Acta Biomed*, 2016, 87(1): 16-21.
- [10] Elbaum M. Quantitative cryo-scanning transmission electron mi-

- croscopy of biological materials[J]. *Adv Mater*, 2018, 30(41): e1706681. doi: 10.1002/adma.201706681.
- [11] Pioch T, Stotz S, Staehle HJ, et al. Applications of confocal laser scanning microscopy to dental bonding[J]. *Adv Dent Res*, 1997, 11(4): 453-461. doi: 10.1177/08959374970110041201.
- [12] Moda MD, Fagundes TC, Briso A, et al. Analysis of the bond interface between self-adhesive resin cement to eroded dentin in vitro [J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0208024. doi: 10.1371/journal.pone.0208024.
- [13] Lin HP, Lin J, Li J, et al. *In vitro* remineralization of hybrid layers using biomimetic analogs[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2016, 17(11): 864-873. doi: 10.1631/jzus.B1600151.
- [14] Guo JM, Makvandi P, Wei CC, et al. Polymer conjugation optimizes EDTA as a calcium-chelating agent that exclusively removes extrafibrillar minerals from mineralized collagen[J]. *Acta Biomater*, 2019, 90(90): 424-440. doi: 10.1016/j.actbio.2019.04.011.
- [15] 周唯. 提高粘接剂吹拂气体压力对牙本质混合层抗龋性能影响的研究[D]. 第四军医大学, 2016.
Zhou W. Study on the effect of adhesive blowing gas pressure on the anti-caries performance of dentin mixed layer [D]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2016.
- [16] Zhou W, Niu LN, Hu L, et al. Caries-resistant bonding layer in dentin[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32740. doi: 10.1038/srep32740.
- [17] Zhou W, Niu LN, Huang L, et al. Improved secondary caries resistance via augmented pressure displacement of antibacterial adhesive[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22269. doi: 10.1038/srep22269.
- [18] Wachsmann-Hogiu S, Weeks T, Huser T. Chemical analysis *in vivo* and *in vitro* by Raman spectroscopy--from single cells to humans[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20(1): 63-73. doi: 10.1016/j.copbio.2009.02.006.
- [19] Lu S, Zhao SJ, Gao Y, et al. Proteoglycans affect monomer infiltration in the etch-and-rinse bonding technique[J]. *Dent Mater*, 2014, 30(11): e289-e299. doi: 10.1016/j.dental.2014.05.015.
- [20] Siqueira FSF, Armas-Vega A, Izquierdo-Bucheli A, et al. Does the conditioning mode and duration of Universal adhesives affect the bonding effectiveness to fluorotic enamel?[J]. *J Adhes Dent*, 2019, 21(6): 525-536. doi: 10.3290/j.jad.a43695.
- [21] Ubaldini ALM, Benetti AR, Sato F, et al. Challenges in luting fibre posts: adhesion to the post and to the dentine[J]. *Dent Mater*, 2018, 34(7): 1054-1062. doi: 10.1016/j.dental.2018.04.001.
- [22] Schneider H, Steigerwald-Otremba AS, Häfer M, et al. Is optical coherence tomography a potential tool to evaluate marginal adaptation of class III/IV composite restorations *in vivo*?[J]. *Oper Dent*, 2019, 44(3): 242-253. doi: 10.2341/17-192-C.
- [23] Machoy M, Seeliger J, Szyszka-Sommerfeld L, et al. The use of optical coherence tomography in dental diagnostics: a state-of-the-art review[J]. *J Healthc Eng*, 2017: 7560645. doi: 10.1155/2017/7560645.
- [24] Turkistani A, Almutairi M, Banakhar N, et al. Optical evaluation of enamel microleakage with One-Step Self-Etch adhesives[J]. *Photomed Laser Surg*, 2018, 36(11): 589-594. doi: 10.1089/pho.2018.4441.
- [25] Mandelis A. Review of scientific instruments new products[J]. *Rev Sci Instrum*, 2019, 90(4): 049501. doi: 10.1063/1.5097598.
- [26] Yoshida Y, Van Meerbeek B, Snauwaert J, et al. A novel approach to AFM characterization of adhesive tooth-biomaterial interfaces [J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 47(1): 85-90. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(199910)47:1<85:aid-jbm12>3.0.co;2-h.
- [27] Lucas PW, Wagner M, Al-Fadhalah K, et al. Dental abrasion as a cutting process[J]. *Interface Focus*, 2016, 6(3): 20160008. doi: 10.1098/rsfs.2016.0008.
- [28] Yu F, Xu RC, Huang L, et al. Isocyanate-terminated urethane-based methacrylate for in situ collagen scaffold modification[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 112: 110902. doi: 10.1016/j.msec.2020.110902.
- [29] Habib M, Chew HP. Methods of assessment of early dentine erosion: a review[J]. *J Pak Med Assoc*, 2019, 69(10): 1509-1513.
- [30] Mai S, Wei CC, Gu LS, et al. Extrafibrillar collagen demineralization-based chelate-and-rinse technique bridges the gap between wet and dry dentin bonding[J]. *Acta Biomater*, 2017, 57(57): 435-448. doi: 10.1016/j.actbio.2017.05.017.

(编辑 罗燕鸿)



官网



公众号