

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.04.005

· 基础研究 ·

纳米羟基磷灰石对邻面去釉后再矿化的效果

胡蓓蓓, 白海, 贾婉萍, 梁永强

华北理工大学口腔医学院正畸科, 河北唐山(063000)

【摘要】 目的 探讨质量分数为10%的纳米羟基磷灰石悬浮液对邻面去釉后再矿化的效果,为临床使用纳米羟基磷灰石预防邻面去釉后牙釉质脱矿提供基础参考。**方法** 收集新鲜拔除的前磨牙40颗,邻面去釉并用砂条抛光处理后自牙冠冠状面切开,每颗牙齿制成两个标本,共80个,随机分成4组,分别为空白组、多乐氟组、护牙素组、10%纳米羟基磷灰石组。经体外pH循环30 d后,应用显微硬度仪对去釉面处理前后分别进行检测,扫描电镜观察并用X线能谱仪分析釉质表面元素。**结果** 实验后4组邻面去釉标本显微硬度值,空白组为 (128.18 ± 6.89) kg/mm²、多乐氟组为 (216.75 ± 9.87) kg/mm²、护牙素组为 (198.88 ± 4.76) kg/mm²、10%纳米羟基磷灰石组为 (218.44 ± 7.88) kg/mm²,4组间差异有统计学意义($F = 189.14, P < 0.001$);两两比较发现,多乐氟组和10%纳米羟基磷灰石组差异无统计学意义($P > 0.05$),而其余各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。钙磷比值空白组 (1.39 ± 0.08) 、多乐氟组 (1.70 ± 0.11) 、护牙素组 (1.54 ± 0.12) 、10%纳米羟基磷灰石组 (1.71 ± 0.14) 间差异有统计学意义($F = 10.539, P < 0.001$);两两比较发现,实验后多乐氟组与10%纳米羟基磷灰石组间差异无统计学意义($P > 0.05$),而其余各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 多乐氟、护牙素、10%纳米羟基磷灰石对去釉后的牙釉质再矿化均有良好的促进作用,10%纳米羟基磷灰石的再矿化作用与多乐氟相当。

【关键词】 纳米羟基磷灰石; 多乐氟; 护牙素; 邻面去釉; 脱矿; 再矿化; 显微硬度

【中图分类号】 R783 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)04-0231-05

【引用著录格式】 胡蓓蓓,白海,贾婉萍,等. 纳米羟基磷灰石对邻面去釉后再矿化的效果[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(4): 231-235.

Remineralization effect of nanohydroxyapatite on adjacent glazed surfaces HU Beibei, BAI Hai, JIA Wan-ping, LIANG Yongqiang. Department of Orthodontics, College of Stomatology, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China

Corresponding author: LIANG Yongqiang, Email: lych810@foxmail.com, Tel: 0086-315-3721560

【Abstract】 Objective To investigate the effect of a nanohydroxyapatite suspension with a 10% mass fraction on enamel demineralization after adjacent enamel removal and to provide a reference for the clinical use of nanohydroxyapatite to prevent enamel demineralization after adjacent enamel removal. **Methods** Forty fresh extracted premolars were incised from the coronal surface of the crown after glazing and polishing with sand strips. Each tooth was made into two specimens. Eighty teeth were randomly divided into four groups: a blank group, a dolefluoride group, a dental mousse group and a 10% nanohydroxyapatite group. After 30 days of pH cycling in vitro, a microhardness tester was used to detect the enamel surface elements before and after deglazing treatment. Scanning electron microscopy (SEM) and X-ray energy dispersive spectrometry (EDS) were used to analyze the enamel surface elements. **Results** After the experiment, the microhardness values of the adjacent glazed specimens of the four groups were (128.18 ± 6.89) kg/mm² in the blank group, (216.75 ± 9.87) kg/mm² in the dolefluoride group, (198.88 ± 4.76) kg/mm² in the dental care group and (218.44 ± 7.88) kg/mm² in the 10% nanohydroxyapatite group, which were significantly different ($F = 189.14, P < 0.001$). The LSD-t test showed that there was no significant difference between the dolefluoride group and the 10% nano-

【收稿日期】 2018-09-25 **【修回日期】** 2018-11-09

【基金项目】 河北省教育厅科技项目(ZD2015016)

【作者简介】 胡蓓蓓, 医师, 硕士, Email: hblghbb@126.com

【通信作者】 梁永强, 副教授, 博士, Email: lych810@foxmail.com, Tel: 0086-315-3721560

hydroxyapatite group ($P < 0.05$), but the differences between the other groups were statistically significant ($P > 0.05$). There were significant differences in the Ca/P ratio among the blank group (1.39 ± 0.08), the dolefluoride group (1.70 ± 0.11), the dental care group (1.54 ± 0.12) and the 10% nanohydroxyapatite group (1.71 ± 0.14) ($F = 10.539$, $P < 0.001$). There was no significant difference between the dolefluoride group and the nanohydroxyapatite group after the experiment ($P > 0.05$), but there were significant differences among the other groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Dolerofluoride, dental protector and 10% nanohydroxyapatite can promote remineralization of enamel after enamel removal. The remineralization induced by 10% nanohydroxyapatite is similar to that induced by dolerofluoride.

【Key words】 Nanohydroxyapatite; Dorafluoride; Dental Mousse; Adjacent Deglazing; Demineralization; Remineralization; Microhardness

邻面去釉(interproximal reduction, IPR)是一项对牙齿进行邻面磨制和再成形的临床操作,可以在正畸治疗过程中提供间隙并改善牙齿形态,从而达到矫治的目的^[1]。随着3D打印技术的迅速发展和人们对美观的要求越来越高,无托槽矫治技术快速普及,无托槽隐形矫治器逐渐受到国内外医生和患者们的关注,邻面去釉作为隐形矫治关键技术之一也被广泛关注。而邻面去釉后增加了牙齿患龋风险,不同的学者对IPR技术是否存在负面影响产生了争论,IPR技术是否会促进牙釉质脱矿,IPR后邻面处理以及再矿化制剂的选择都成为了争论的焦点^[2]。本实验通过体外防龋实验,旨在探讨纳米羟基磷灰石对邻面去釉后再矿化效果的影响,为临床提供参考。

1 材料和方法

1.1 研究对象

按照纳入标准收集新鲜正畸减数需要拔除的健康前磨牙40颗,患者及家属知情同意。纳入标准:牙齿形态正常,无肉眼可见的龋坏、缺损、色素沉着,无脱矿的白垩色,牙齿未经过任何治疗。去除牙根部肉芽组织,酒精反复擦拭,洗净后放入生理盐水中,定时换液,4℃保存。

1.2 实验材料与仪器

多乐氟(高露洁棕榄有限公司,德国),护牙素(GC株式会社,日本),粒径为20 nm的纳米羟基磷灰石粉末(北京高德威金属科技开发有限责任公司,中国)。人工唾液配方:0.4 g氯化钠、0.4 g氯化钾、0.795 g无水氯化钙、0.78 g硫化钠、0.005 g磷酸二氢钠和1 g尿素,用去离子水稀释至1 L, pH调至7.0。人工脱矿液配方:0.52 g硝酸钙,0.30 g磷酸二氢钾,3.00 g冰醋酸,用去离子水稀释至1 L, pH 4.5。HVST-1000ZA显微硬度仪(敏新检测仪器有限公司,中国),磁力搅拌器(JB50-SH,上海标本模

型厂,中国),电子游标卡尺(YB5001B,卡夫威尔有限公司,中国),硬组织切片机(E310CP, EXAKT, 德国),恒温水浴箱(常州智博仪器,中国),PH测定仪(HDGC-9533BT,北京华电仪器有限公司,中国),扫描电镜(S-4800型,日立公司,日本)。

1.3 研究方法

1.3.1 10%纳米羟基磷灰石制备 用100 mL去离子水溶解11.11 g粒径为20 nm的纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite, nHA)粉末,磁力搅拌器搅拌均匀后再超声震荡3次,将溶液pH调整7.0,即得到质量分数为10%的nHA悬浮液。

1.3.2 邻面去釉模型制备与分组 将标本牙牙根包埋于石膏中,完全暴露牙冠部分,并将石膏块固定于水平载物台上。电子游标卡尺调零测量并记录标本去釉前最凸点间的距离,对牙冠一侧邻面进行均匀的去釉处理,去釉厚度达0.2 mm时停止操作,抛光车针抛光使最终去釉厚度为0.3 mm,以同样的方法处理对侧。去釉完成的离体牙沿牙长轴方向切开,共80个标本,除邻面去釉以外的区域,周围用抗酸指甲油封闭。将80个标本随机分为4组,每组20个标本。空白组:去离子水中浸泡5 min,每日两次;多乐氟组:邻面去釉区域均匀涂布多乐氟,干燥5 min后形成黄膜,去离子水冲洗后备用,体外pH循环中仅使用一次;护牙素组:邻面去釉区均匀涂布护牙素,干燥后去离子水冲洗后,每日两次;10%纳米羟基磷灰石组:将标本放入nHA悬浮液中浸泡5 min,去离子水冲洗,每日两次。除了多乐氟组外,其余各组操作均持续30 d。

1.3.3 体外pH循环 37℃恒温水浴箱中,各组标本分别于8:00和18:00进行相应再矿化处理剂预处理,再于11:00~13:00置于人工脱矿液中2 h,其余时间均放置于人工唾液中,每次标本换液前均用去离子水冲洗,此为一个循环。从第二天体外pH循环开始,多乐氟组不予再矿化处理,操作同空

白组于8:00和18:00在去离子水中浸泡即可,按此过程循环30 d。再根据测量方法将各组分为2个小组,分别用于显微硬度测量、扫描电镜和能谱分析,每小组10个标本。

1.3.4 显微硬度测量 由同一名测量员使用HVST-1000ZA显微硬度仪对所有邻面去釉标本实验前后釉质表面硬度进行测量,力值为50 g,持续15 s,每个标本的核心区选3点进行测量,取平均值,将邻面去釉标本防龋实验前记为MH0,防龋实验后记为MH1。

1.3.5 扫描电镜观察及X射线能谱仪元素分析 用金钢砂轮在标本核心区制作成长3 mm,宽3 mm,高2 mm的试件,集中进行离子喷金处理,放入扫描电镜真空室内观察去釉表面形态,进行图像采集。用X射线能谱仪对釉质表面的元素进行分析,并计算其钙磷质量比值。

1.4 统计学分析

采用SPSS22.0进行数据分析,数据用均数±标准差表示。防龋实验前后均数比较采用配对样本t检验。多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 显微硬度测量

防龋实验后邻面去釉标本的显微硬度值见表1。防龋实验前各标本之间显微硬度值差异无统计学意义($P > 0.05$),实验后各标本之间的显微硬度值差异有统计学意义($P < 0.05$)。两两比较发现,多乐氟组和10%纳米羟基磷灰石组差异无统计学意义($P > 0.05$),考虑二者在防龋实验中产生

的再矿化效果相似,而其余各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),再矿化实验后10%纳米羟基磷灰石组硬度最大,多乐氟组次之,护牙素组硬度比上述两种偏小,而空白组的硬度最小。防龋实验前后各组的显微硬度值差异有统计学意义($P < 0.001$)。

表1 各组显微硬度测量值

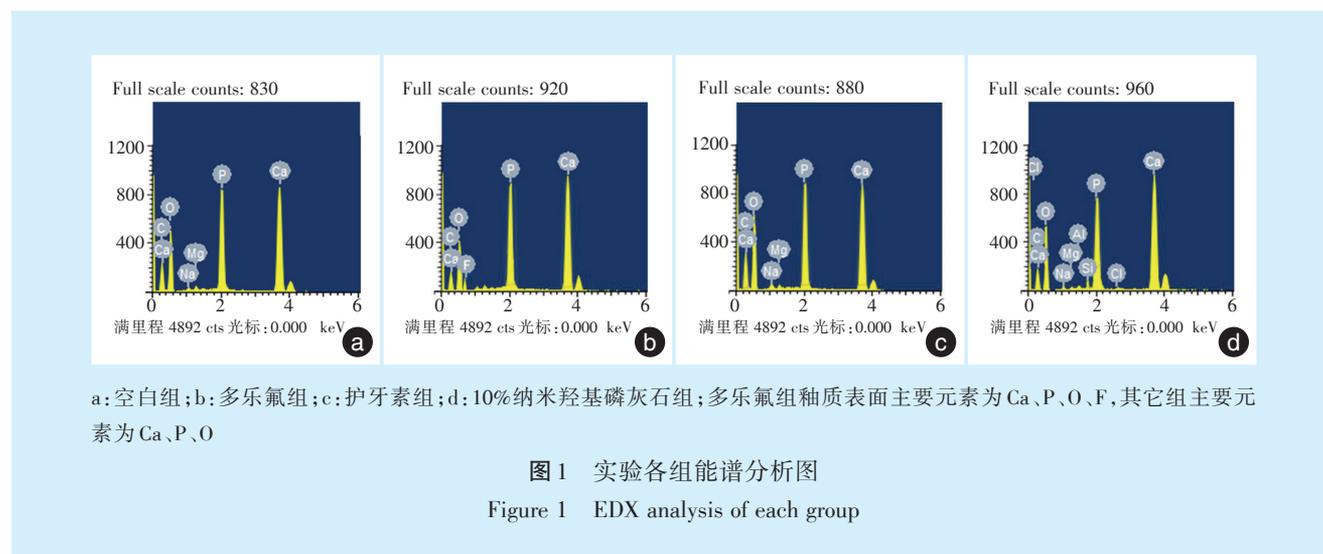
Table 1 The SMH values in each group $n = 10, \text{kg}/\text{mm}^2, \bar{x} \pm s$

组别	MH0	MH1	t值	P值
A	295.05 ± 7.04	128.18 ± 6.89	85.804	<0.001
B	297.23 ± 6.24	216.75 ± 9.87	18.736	<0.001
C	298.39 ± 8.69	198.88 ± 4.76	30.715	<0.001
D	296.18 ± 6.91	218.44 ± 7.88	19.676	<0.001
F值	0.23	189.14		
P值	0.874	<0.001		

注 A:空白组;B:多乐氟组;C:护牙素组;D:10%纳米羟基磷灰石组;MH0:防龋实验前;MH1:防龋实验后

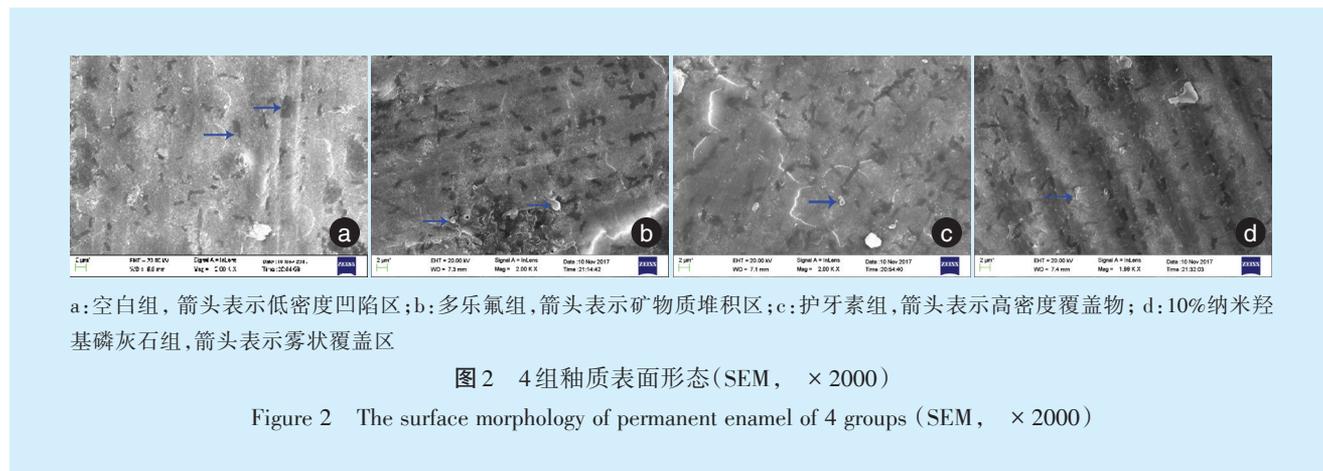
2.2 X射线能谱仪元素分析及扫描电镜结果

各组体外pH循环后,能谱仪分析显示(图1):空白组、护牙素组、10%纳米羟基磷灰石组的主要元素均含有Ca、P、O,多乐氟组的主要元素为Ca、P、O、F,分析计算可得空白组钙磷质量比为(1.39 ± 0.08),多乐氟组为(1.70 ± 0.11),护牙素组为(1.54 ± 0.12),10%纳米羟基磷灰石组为(1.71 ± 0.14),各组钙磷质量比差异有统计学意义($F = 10.539, P < 0.05$),两两比较显示,多乐氟组与10%纳米羟基磷灰石组钙磷比值差异无统计学意义($P > 0.05$),但均较空白组和护牙素组的钙磷质量比值高($P < 0.05$),其余各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。



通过扫描电镜可见,尽管去釉后严格抛光,空白组仍可看到留下了长短不一的划痕,粗糙不平的低密度凹陷。多乐氟组可见划痕变少变浅,在去釉表面出现白色颗粒物,形成层状和团块状的矿物质堆积区,考虑可能是氟羟基磷灰石结晶。

护牙素组可见去釉表面有少量高密度覆盖物,覆盖在釉质表面的空隙中,说明护牙素是可以渗入牙釉质表面的微孔中。10%纳米羟基磷灰石组可以明显看到划痕变少变浅,去釉表面比较平整,可见大量晶体呈雾状覆盖于釉质表面(图2)。



3 讨论

邻面去釉已成为正畸治疗常用技术,正畸医师运用邻面去釉技术多于口腔其他学科,但邻面去釉过程中会造成釉质表面粗糙,细菌更容易粘附,去釉后其釉质表层下方的釉柱难以耐受口腔环境中的有机酸,会使脱矿的风险大大升高^[3-4]。因此,对于邻面去釉的牙表面采取防龋再矿化处理是有必要的。氟制剂是防龋再矿化处理中最常用的方法之一,其防龋的机制主要表现在降低釉质的溶解度,影响牙齿表面矿化和再矿化的过程^[5-6]。日本GC护牙素其主要成分为酪蛋白磷酸肽-不定型磷酸钙(casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate, CPP-ACP),与氟化物联合使用优于单独使用,常用来预防正畸过程中形成的白垩色脱矿斑^[7]。辛海燕等^[8]认为CPP-ACP能促进牙釉质再矿化和抑制脱矿。所以本实验选择常用的多乐氟和护牙素两种常见的防龋制剂为阳性对照组。

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HAP)为六晶体系,由于其良好的生物相容性、无毒副作用、无免疫原性,运用领域广泛,常被作为骨修复,骨填充材料,但由于其制备工艺和强度低脆性大,限制了其在临床的应用^[9]。HAP不仅在骨组织修复广泛应用,它还是一种理想的重金属吸附材料,具有吸附能力强,稳定性高等优点^[10-11]。Zhang等^[12]通过共沉淀法制备了羟基磷灰石酵母复合物,其能最

大程度地吸附铅,改善由于生产厂家大量排放铅所造成的水污染。随着纳米技术的快速发展,纳米羟基磷灰石与普通的HAP具有相似的晶体构型,除了具有羟基磷灰石的所有优点之外,还具有更高的表面活性、机械性能,也更有利于诱导骨组织形成及具有更好的吸附性^[13-14]。有研究表明,纳米羟基磷灰石能渗透进入脱矿牙本质的胶原纤维网,颗粒沉积聚集替代原有再矿化环境^[15]。Vyavhare等^[16]通过扫描电子显微镜观察到纳米羟基磷灰石能沉淀于脱矿的釉质表面形成新的保护层。

学者们研究了多种再矿化方法比如复合氟纳米材料、生物活性材料等,纳米材料广泛应用于再矿化领域,但还未见相关文献报道nHA应用于邻面去釉后是否有良好的再矿化效果^[17]。Huang等^[18]调整nHA的浓度能改变其对釉质龋的再矿化能力,通过比较1%、5%、10%、15%(wt%)nHA对早期釉质龋的再矿化效果发现达到10%以后再矿化的程度不再发生变化,所以实验采用了浓度为10%的nHA悬浮液。李莉等^[19]通过扫描电镜和激光共聚焦扫描电镜观察到,20 nm的羟基磷灰石处理牙釉质后,仍可以观察到经典的鱼鳞结构,覆盖于釉质表面减少釉质脱矿。本实验扫描电镜观察结果可见到牙釉质表面脱矿后会留下很多大小不一的孔隙,多乐氟、护牙素、10%纳米羟基磷灰石组均可以形成大小不一的再矿化物质覆盖于釉质表

面减少脱矿孔隙,而10%纳米羟基磷灰石组形成的团雾状晶体更加均匀,考虑是纳米羟基磷灰石与釉柱的直径相似,能均匀且牢固地吸附在釉质表面填充脱矿造成的孔隙,减少釉质脱矿。Featherstone^[20]通过研究发现牙釉质矿物质含量与显微硬度值相关,显微硬度值能够反应牙釉质的脱矿及再矿化情况,硬度值的提高体现了牙釉质再矿化的程度。笔者通过显微硬度值来体现实验前后的再矿化效果,并通过X线能谱仪分析釉质表面钙磷的变化。结果显示,纳米羟基磷灰石处理后的釉质表面硬度与多乐氟组差异无统计学意义,钙磷质量比与多乐氟组的也相差不大,纳米羟基磷灰石的再矿化效果与现阶段常用的多乐氟的再矿化效果基本一致。护牙素组的显微硬度值和钙磷比值均低于10%纳米羟基磷灰石组和多乐氟组。对于nHA来说,其作为牙齿主要无机成分之一,比氟制剂更安全,可作为邻面去釉后再矿化制剂的较佳选择。

参考文献

- [1] Lapenaite E, Lopatiene K. Interproximal enamel reduction as a part of orthodontic treatment[J]. *Stomatologija*, 2014, 16(1): 19-24.
- [2] Barcoma E, Shroff B, Best AM, et al. Interproximal reduction of teeth:differences in perspective between orthodontists and dentists [J]. *Angle Orthod*, 2015, 85(5): 820-825.
- [3] Gupta P, Gupta N, Patel N, et al. Qualitative and quantitative evaluation of enamel after various post-stripping polishing methods:an in vitro study[J]. *Aust Orthod J*, 2012, 28(2): 240-244.
- [4] 徐娜. 正畸邻面去釉对牙釉质龋风险性影响的实验研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2010.
- [5] 吴娜, 周学东, 郝玉庆. 氟对脱矿和再矿化牙釉质表面的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2012, 30(5): 493-497.
- [6] Aoun A, Darwiche F. The fluoride debate:the Pros and Cons of fluoridation[J]. *Prev Nutr Food Sci*, 2018, 23(3): 171-180.
- [7] Shen P, Bagheri R, Walker GD, et al. Effect of Calcium phosphate addition to fluoride containing dental varnishes on enamel demineralization[J]. *Aust Dent J*, 2016, 61(3): 357-365.
- [8] 辛海燕. CPP-ACP对邻面去釉后釉质再矿化的体外研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2012.
- [9] Szczes A, Holysz L, Chibowski E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications[J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2017, 249: 321-330.
- [10] Dong L, Zhu Z, Qiu Y, et al. Advance in research of heavy metals removal by hydroxyapatite and its composite[J]. *Chemistry*, 2013, 76(5): 405-410.
- [11] Yin HB, Zhu JC. In situ remediation of metal contaminated lake sediment using naturally occurring, calcium - rich clay mineral - based low-cost amendment[J]. *Chem Engineering J*, 2016, 285(1): 112-120.
- [12] Zhang W, Wang FH, Wang PL, et al. Facile synthesis of hydroxyapatite/yeast biomass composites and their adsorption behaviors for lead (II)[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2016, 477: 181-190.
- [13] Antonova IN, Goncharov VD, Kipchuk AV, et al. Peculiarities of the morphological structureof the inorganic component of human dental enamel and dentin at nano-level[J]. *Morfologija*, 2014, 146(5): 52-56.
- [14] Masahiro N, Masahiro Y, Masato W, et al. Activation of Osteoblastic Function on titanium surface with titanium-doped hydroxyapatite nanoparticle coating: an in vitro study [J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2017, 32(4): 779-791.
- [15] Besinis A, van Noort R, Martin N. Infiltration of demineralized dentin with silica and hydroxyapatite nanoparticles[J]. *Dent Mater*, 2012, 28(9): 1012-1023.
- [16] 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.
- [17] Krishnan V, Bhatia A, Varma H. Development, characterization and comparison of two strontium doped nano hydroxyapatite molecules for enamel repair/regeneration[J]. *Dent Mater*, 2016, 32(5): 646-659.
- [18] Huang S, Gao S, Cheng L, et al. Remineralization potential of nano -hydroxyapatite on initial enamel lesions: an in vitro study[J]. *Caries Res*, 2011, 45(5): 460-468.
- [19] 李莉. 纳米磷酸钙和生物玻璃对牙釉质的仿生修复[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [20] Featherstone JF. Remineralization and root caries[J]. *Am J Dent*, 1994, 7(5): 271-274.

(编辑 罗燕鸿, 曾曙光)