

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2017.10.004

· 基础研究 ·

# 表没食子儿茶素没食子酸酯对乳牙早期釉质龋的再矿化作用

朱丽德孜·托列别克<sup>1</sup>, 梁秋娟<sup>2</sup>, 周晶<sup>1</sup>, 吴佩玲<sup>1</sup>

1. 新疆医科大学第二附属医院口腔科, 新疆 乌鲁木齐 (830063); 2. 新疆医科大学第五附属医院口腔科, 新疆 乌鲁木齐 (830011)

**【摘要】** 目的 通过体外实验研究, 观察天然药物表没食子儿茶素没食子酸酯对乳牙早期釉质龋的再矿化作用。方法 将门诊因乳牙滞留拔除的上颌乳中切牙 30 颗按照随机数字表分为 3 组, 实验组(表没食子儿茶素没食子酸酯组)、阳性对照组(NaF 组)和空白对照组(人工唾液组), 每组 10 颗, 进行体外实验。采用显微硬度计测定标本脱矿前后和 pH 循环后的硬度值, 扫描电镜观察乳牙釉质块再矿化后表面形态结构的改变。结果 pH 循环后 3 组乳牙釉质块表面显微硬度组间两两比较差异均具有统计学意义( $F = 1\ 199.975$ ,  $P < 0.05$ ), 阳性对照组和实验组较空白对照组乳牙釉质龋的表面显微硬度高( $q = 41.986$ ,  $P < 0.05$  vs 实验组;  $q = 68.174$ ,  $P < 0.05$  vs 阳性对照组), 但表没食子儿茶素没食子酸酯再矿化效果较 NaF 低( $q = 26.188$ ,  $P < 0.05$ )。扫描电镜的结果显示, 实验组和阳性对照组在乳牙釉质表面均有大量沉积物存在, 空白对照组的乳牙釉质表面呈蜂窝状, 凹凸不平, 沉积物较少。结论 表没食子儿茶素没食子酸酯在体外实验的研究中, 具有促进乳牙早期人工釉质龋再矿化的作用。

**【关键词】** 表没食子儿茶素没食子酸酯; 乳牙釉质龋; 再矿化; 显微硬度; 扫描电镜

**【中图分类号】** R781.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)10-0633-05

**【引用著录格式】** 朱丽德孜·托列别克, 梁秋娟, 周晶, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对乳牙早期釉质龋的再矿化作用[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25(10): 633-637.

## Study on application of natural medicine epigallocatechin gallate for primary enamel caries remineralization

ZHULIDEZI Tuoliebieke<sup>1</sup>, LIANG Qiujuan<sup>2</sup>, ZHOU Jing<sup>1</sup>, WU Peiling<sup>1</sup>. 1. Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, China; 2. Department of Stomatology, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Corresponding author: WU Peiling, Email: wuplkq@sina.com, Tel: 0086-991-4609086

**【Abstract】 Objective** This *in vitro* study aimed to investigate the remineralization effect of the natural medicine epigallocatechin gallate on artificial enamel caries in primary human teeth. **Methods** We divided 30 sound primary upper anterior teeth into 3 groups according to a random number table, including experimental group (epigallocatechin gallate group), positive control group (NaF group) and blank control group (artificial saliva group), with 10 teeth in each group. After test *in vitro*, Micro Hardness Tester was applied to measure hardness of samples before and after demineralization. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the result of primary enamel surface remineralization.

**Results** A significant increase in enamel surface microhardness between the three groups after remineralization ( $F = 1\ 199.975$ ,  $P < 0.05$ ). The difference between 2 groups was compared with each other among 3 groups. Statistical signifi-

**【收稿日期】** 2017-04-25; **【修回日期】** 2017-05-15

**【基金项目】** 新疆医科大学创新基金项目(XJC201348)

**【作者简介】** 朱丽德孜·托列别克, 主治医师, 硕士, Email: zldz1@126.com

**【通信作者】** 吴佩玲, 主任医师, 硕士, Email: wuplkq@sina.com

cance was found (*vs* experimental group  $q = 41.986$ ,  $P < 0.05$ ; *vs* positive control group  $q = 68.174$ ,  $P < 0.05$ ), suggesting that both positive control group and experimental group could promote the remineralization of primary enamel, and the effect of epigallocatechin gallate was weaker than NaF ( $q = 26.188$ ,  $P < 0.05$ ). The results from SEM indicated that there was large amount of sediment on the surface of primary enamel surface of incisors in the experimental group and positive control group, while primary enamel surface of incisors in the blank control group was honeycomb and uneven, with less sediment. **Conclusion** Based on this *in vitro* study, epigallocatechin gallate can promote the remineralization of demineralized enamel of primary teeth, indicating its potential use as a natural remineralization medicine.

**【Key words】** Epigallocatechin Gallate; Primary enamel caries; Remineralization; Microhardness; Scanning electron microscopy

乳牙龋病是学龄前儿童中常见的慢性疾病<sup>[1]</sup>。由于乳牙的解剖形态、组织结构、矿化程度及其所处环境等因素,乳牙患龋率高、发病早、龋齿多发、范围广、发展速度快,对儿童口腔局部和全身机体都有不良影响<sup>[2-3]</sup>。目前乳牙龋病的预防多为氟化物(氟化泡沫、氟化凝胶、氟保护漆等),但是由于低龄儿童吞咽控制功能尚不完善,使用氟化物时存在误吞误咽导致过量摄氟的危险<sup>[4]</sup>,需要寻找更为安全的防龋制剂。近年来,天然药物由于其取材广泛、价廉、副作用小等优点在口腔医学中的防龋研究日益受到重视,绿茶提取物表没食子儿茶素没食子酸酯就是其中的代表。虽然已有研究证实表没食子儿茶素没食子酸酯对致龋菌有抑制作用,又能影响牙齿硬组织矿化<sup>[5-6]</sup>,但是这些研究主要集中在牛切牙和人恒牙,对人类乳牙的研究较少见。因此,本研究拟通过体外实验表面结构,观察绿茶提取物表没食子儿茶素没食子酸酯对乳牙早期釉质龋再矿化处理后,乳牙釉质表面显微硬度和扫描电镜下表面结构的变化,初步探讨表没食子儿茶素没食子酸酯对乳牙早期龋损的再矿化作用,期望能为乳牙龋病的预防提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要实验仪器及试剂

1.1.1 实验仪器 显微硬度计(上海第二光学仪器厂 MH-5),恒温箱(上海三腾仪器有限公司),电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),实验室 pH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),电子显微镜(JEOL JSM-6390LV 日本电气株式会社),高速手机(NEC 日本电气株式会社)。

1.1.2 实验试剂 ①表没食子儿茶素没食子酸酯

(成都曼斯特生物科技有限公司),实验中以表没食子儿茶素没食子酸酯为溶质,人工唾液为溶剂,制备成 2 mg/mL 的表没食子儿茶素没食子酸酯溶液。②1 mg/mL NaF 溶液。③人工致龋液(乳酸脱矿系统:0.1% mol/L 乳酸,40 g/L 羧甲基纤维素,25 mg/L 制霉菌素,pH = 4.0)。④再矿化溶液:含 1.5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ 、0.9 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、130 mmol/L  $\text{KCl}$ 、1 mmol/L  $\text{NaN}_3$ 、20 mmol/L HEPES, pH 7.0。⑤人工唾液:将 0.4 g  $\text{NaCl}$ 、0.4 g  $\text{KCl}$ 、0.795 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.78 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.005 g  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1 g 尿素,以去离子水(蒸馏水)稀释至 1 000 mL, pH = 6.8。

### 1.2 方法

1.2.1 标本的选择 取门诊因乳牙滞留拔除的上颌乳中切牙作为实验标本。要求牙齿形态正常,釉质发育良好,釉质无裂纹、龋损及白垩斑。将新鲜拔除的上颌乳中切牙在 0.1% 的新洁尔灭中浸泡 24 h,然后用超声洁牙机彻底清洗牙体表面,在喷水冷却的状态下高速金刚砂车针去根留冠,置于 4 °C 去离子水中保存。

1.2.2 标本的制备 根据离体乳牙牙冠的大小,制作方形模具,用自凝塑料将牙冠舌侧包埋于模具内,充分暴露唇面,并使较为平坦的唇面切 1/3 处与模具底面平行,并略高于自凝塑料平面。待自凝塑料凝固后,唇面釉质用碳化硅砂纸(600 目)在流水下打磨至光滑镜面,超声清洗,自然干燥,釉质块唇面切 1/3 中间平坦处作 2 mm × 2 mm 的釉质开窗区,开窗区以外区域用双层抗酸指甲油覆盖。开窗区沿牙体长轴一分为二,两侧开窗区以外区域涂不同颜色指甲油。一侧区域用于扫描电镜观察,另一侧区域用于检测釉质表面显微硬度。

1.2.3 基线测定 使用 MH-5 显微硬度计垂直载荷 15 g,持续 15 s,形成压痕,测定釉质块基线表面

显微硬度(surface microhardness, SMH)。将标本置于测试平台上,在开窗区一侧区域中央垂直测3个点,每个点相距100 μm,将3次的平均读数作为此釉质块的SMH(SMH1)。选择硬度值范围为273.6~292.7 kg/mm<sup>2</sup>釉质块30个。

1.2.4 实验分组 将30个牙釉质块按照随机数字表分为3组,实验组(表没食子儿茶素没食子酸酯组)、阳性对照组(NaF组)及空白对照组(人工唾液组),每组10个标本。

1.2.5 人工龋的制备 将釉质块放置于盛有人工致龋液的试剂瓶中37℃恒温水浴浸泡96h,人工致龋液每日更换1次。脱矿完成后,牙釉质块用大量蒸馏水洗去表面人工致龋液的残留,在基线测量点一侧,平行测3个点,检测SMH值(SMH2)。每组随机选出1个标本,用电子显微镜观察牙釉质块上早期牙釉质龋的形成。

1.2.6 再矿化实验 将3组表面形成早期龋的牙釉质块用蒸馏水反复清洗,然后进行体外pH循环实验,共循环10d,每天的循环包括:人工致龋液处理2h(12:00~14:00);实验制剂(实验组、阳性对照组及空白对照组的实验溶液分别为2mg/mL表没食子儿茶素没食子酸酯溶液、1mg/mL NaF溶液、人工唾液)处理4次(时间点为10:00、11:00、15:00与16:00),每次处理1min;其余时间标本浸泡于再矿化溶液中。每次处理后,去离子水冲洗5s。第10天将牙釉质块从溶液中取出,用丙酮去除指甲油,蒸馏水反复冲洗,在基线测量点另一侧平行测3个点,检测各组SMH值(SMH3),电子显微镜下观察釉质再矿化情况。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件处理数据,3组样本显微硬度均值比较采用单因素方差分析,组间进一步两两样本间比较,采用SNK-*q*检验,各组样本脱矿处理前后的比较选用配对*t*检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 显微硬度的测量结果

脱矿处理前后各组牙釉质表面的显微硬度差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1,说明牙釉质龋的制备有效;pH循环处理后,3组乳牙牙釉质再矿化程度不同,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表2;pH循环后釉质表面显微硬度SMH在空白对照组与实验组和阳性对照组之间差异具

有统计学意义( $q = 41.986, P < 0.05$  vs 实验组; $q = 68.174, P < 0.05$  vs 阳性对照组),这表明表没食子儿茶素没食子酸酯和NaF均能促进乳牙釉质龋的再矿化;实验组与阳性对照组之间差异具有统计学意义( $q = 26.188, P < 0.05$ ),表明虽然表没食子儿茶素没食子酸酯能促进乳牙釉质龋的再矿化,但再矿化效果低于NaF。

表1 3组脱矿前后的显微硬度值比较

Table 1 The SMH of enamel before and after demineralization in 3 groups  $\bar{x} \pm s, n = 10, \text{kg/mm}^2$

组别	SMH1	SMH2	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
实验组	282.6 ± 2.7	152.4 ± 2.4	94.779	< 0.05
阳性对照组	283.2 ± 1.8	150.7 ± 1.7	182.411	< 0.05
空白对照组	281.9 ± 3.1	151.5 ± 2.3	91.983	< 0.05
<i>F</i> 值	0.631	1.557		
<i>P</i> 值	0.540	0.229		

注 SMH1:基线显微硬度,SMH2:脱矿后显微硬度

表2 3组pH循环后显微硬度值比较

Table 2 The SMH of enamel after pH cycling in 3 groups  $\bar{x} \pm s, n = 10, \text{kg/mm}^2$

组别	SMH3
实验组	201.2 ± 2.8 <sup>1)</sup>
阳性对照组	228.4 ± 4.6 <sup>1)2)</sup>
空白对照组	157.6 ± 1.7
<i>F</i> 值	1 199.975
<i>P</i> 值	< 0.05

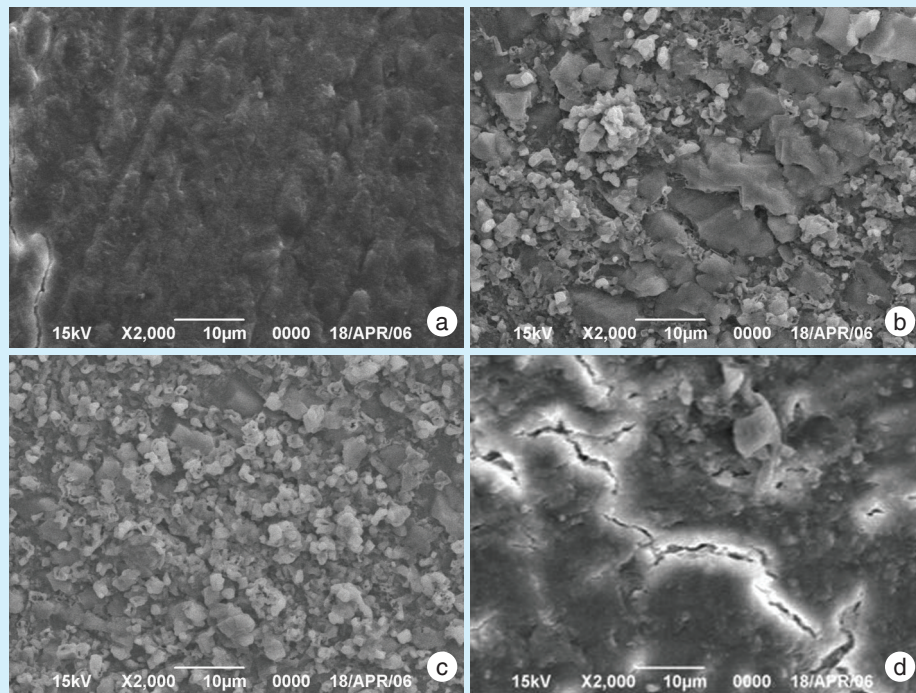
注 SMH3:pH循环后显微硬度,1): $P < 0.05$  vs 空白对照组;2): $P < 0.05$  vs 实验组。

### 2.2 扫描电镜的结果观察

经脱矿后形成的人工龋模型可见乳牙釉质表层釉柱紊乱,釉质呈蜂窝状中心性脱矿,釉间质溶解呈多孔性组织改变(图1a);再矿化处理后,实验组釉质表面形成较为均匀、形状不规则的结晶颗粒,直径约3~7 μm,微孔较少(图1b);阳性对照组釉质表面有明显的致密均匀球状结晶颗粒附着,直径约2~4 μm,几乎无空隙存在(图1c);空白对照组釉质表面极少量的沉淀区域,由稀疏的点状或针状晶体组成,微孔较多(图1d)。

## 3 讨论

龋病是牙对牙菌斑及其代谢产物的反应。人牙龋损的形成不是一个简单的持续性脱矿过程而是脱矿与再矿化的连续性动力学反应<sup>[7]</sup>。牙齿在正常的口腔环境下是不会发生溶解或脱矿的。然



a: 脱矿后的乳牙釉质; b: 再矿化后实验组; c: 再矿化后阳性对照组; d: 再矿化后空白对照组。

图1 离体乳牙釉质表面结构观察扫描电镜(×2000)

Figure 1 SEM pictures of enamel surfaces (×2000)

而在存在足够量的牙菌斑时,致龋菌糖代谢产生大量有机酸,在酸的作用下,牙中的钙和磷酸盐等无机离子脱出,发生了脱矿,只要有新产生的酸存在,则脱矿过程一直进行,龋洞形成。当口腔环境中的钙、磷离子浓度处于过饱和状态时,则容易形成结晶,结晶在釉质脱矿面沉积,即发生了再矿化<sup>[8]</sup>。乳牙釉质与恒牙相比,厚度较薄,为后者厚度的1/2左右;乳牙釉质中有机成分比例大,表面硬度弱于恒牙;乳牙釉质矿化度较恒牙低,羟基磷灰石结晶较恒牙小,遇酸更易脱矿<sup>[9-11]</sup>。因此,阻止脱矿、促进脱矿牙体再矿化是防止乳牙釉质龋发生的重要环节。天然中草药茶多酚、橙皮甙、五倍子等是目前研究较热的非氟促再矿化制剂,其再矿化作用已有研究报道<sup>[12-14]</sup>。

表没食子儿茶素没食子酸酯是儿茶素含量最高最为重要的一种组分,属于天然多元酚类化合物,有学者研究得出其主要化学成分鞣质及其有效提取物可以有效抑制变形链球菌的生长,进而防止龋病的发生<sup>[15]</sup>。口腔链球菌的产酸速度较其他细菌快,因而认为链球菌与龋病关系密切,其中变形链球菌不仅产酸力强、产酸迅速,且耐酸性较

其他口腔链球菌强,因此以变形链球菌的致龋能力最强<sup>[16-17]</sup>。鞣质在变形链球菌与牙面附着的初期阶段抑制变形链球菌与获得性膜上的唾液糖蛋白的微弱吸附而抑制菌斑的成熟,减弱变形链球菌致龋的重要毒力因子<sup>[18-19]</sup>。变形链球菌对牙面有很高的亲和力,鞣质通过结合到变形链球菌胞壁的蛋白上,形成复合物,从而降低变形链球菌的疏水性,使变形链球菌对牙面的粘附能力明显下降<sup>[20-21]</sup>。也有学者认为可能是鞣质与唾液中离子形式的钙、磷发生反应形成络合物,通过釉质表面渗透进龋损内部,导致钙、磷离子再次沉积,发生再矿化<sup>[22]</sup>。

本实验牙釉质表面显微硬度的测量结果发现,表没食子儿茶素没食子酸酯具有明显的再矿化作用,即能提高脱矿后乳牙釉质表面显微硬度,但与NaF相比,矿化作用较NaF弱。再矿化实验中,扫描电镜观察乳牙釉质,阳性对照组与实验组牙釉质表面均有大量沉积物附着,空白对照组釉质表面沉积物很少,此结果进一步从形态学上证明了表没食子儿茶素没食子酸酯在促进乳牙釉质再矿化方面的作用。

本研究表明,表没食子儿茶素没食子酸酯作为一种天然药物应用于乳牙早期釉质龋,能够促进早期乳牙釉质龋的再矿化,改善乳牙釉质龋的硬度,效果虽然没有临床上长期普遍应用的NaF效果好,但由于其毒副作用小、取材广泛、价格低廉,为今后在乳牙釉质龋治疗方面提供了另一种方法,值得深入研究。

#### 参考文献

- [1] 葛立宏. 儿童口腔医学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 116.
- [2] Seow WK. Environmental, maternal, and child factors which contribute to early childhood caries: a unifying conceptual model[J]. Int J Paediatr Dent, 2012, 22(3): 157-168.
- [3] Edelstein BL, Hirsch G, Frosh M, et al. Reducing early childhood caries in a Medicaid population: a systems model analysis[J]. J Am Dent Assoc, 2015, 146(4): 224-232.
- [4] 王国英, 冯希平. 学龄前儿童使用含氟牙膏安全性的研究进展[J]. 广东牙病防治, 2009, 17(2): 93-94.
- [5] 徐晓南, 方谦, 彭伟, 等. 绿茶浸提液对釉质再矿化作用的体外研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2015, 25(10): 602-605.
- [6] 杨华甫, 田富明, 梁迎东, 等. 普洱茶水浸液对脱矿牙釉质再矿化的扫描电镜观察[J]. 大理大学学报, 2016, 1(12): 50-52.
- [7] 樊明文, 周学东. 牙体牙髓病学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 46-47.
- [8] 张震康, 俞光岩. 实用口腔科学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 7-21.
- [9] Coutinho T, Da Rocha Costa C. An in vivo comparison of radiographic and clinical examination with separation for assessment of approximal caries in primary teeth[J]. European Journal of Paediatric Dentistry, 2014, 15(4): 371-374.
- [10] Wang LJ, Tang R, Bonstein T, et al. Enamel demineralization in primary and permanent teeth[J]. J Dent Res, 2006, 85(4): 359-363.
- [11] Scheffel DL, Huck C, Soares DG, et al. Uninfiltrated collagen in hybrid layers produced after reduced acid-etching time on primary and permanent dentin[J]. J Contemp Dent Pract, 2016, 17(10): 861-866.
- [12] 王丽梅, 易多宗, 杨发成, 等. 三种天然药物对脱矿牛切牙釉质显微硬度的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2013, 23(9): 551-553.
- [13] 王丹杨, 汪鹏, 马新扬, 等. 橙皮甙对根方牙本质耐脱矿作用的研究[J]. 山西医科大学学报, 2015, 46(9): 888-892.
- [14] 阙克华, 郭斌, 王博, 等. 中药五倍子对不同根面龋损提取非胶原蛋白后再矿化的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2012, 43(3): 358-361.
- [15] Hu JQ, Du XJ, Huang C, et al. Antibacterial and physical properties of EGCG-containing glass ionomer cements[J]. J Dent, 2013, 41(10): 927-934.
- [16] Morin MP, Grenier D. Regulation of matrix metalloproteinase secretion by green tea catechins in a three-dimensional co-culture model of macrophages and gingival fibroblasts[J]. Arch Oral Biol, 2017, 75(5): 89-99.
- [17] 王翰章. 中华口腔科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 433.
- [18] Silveira C, Oliveira F, Dos Santos ML, et al. Anacardic acid from Brazilian cashew nut trees reduces dentine erosion[J]. Caries Res, 2014, 48(6): 549-556.
- [19] 孙一喆, 李玉滨, 王清萱, 等. 儿茶素对致龋变异链球菌的抗菌效应研究[J]. 潍坊医学院学报, 2016, 38(4): 266-269.
- [20] Jose P, Sanjeev K, Sekar M. Effect of green and white tea pretreatment on remineralization of demineralized dentin by CPP-ACFP-An invitro microhardness analysis[J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(4): ZC85-ZC89.
- [21] 陈鲲, 阮金云, 易多宗, 等. 五倍子与没食子提取物对人工脱矿釉质再矿化的研究[J]. 大理学院学报(综合版), 2012, 11(9): 22-24.
- [22] 徐帅. 表没食子儿茶素没食子酸酯保护脱矿牙本质基质的相关作用研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2014.

(编辑 罗燕鸿, 曾雄群)