

自然唾液中介孔生物活性玻璃诱导牙釉质仿生再矿化研究

董志红¹, 聂志萍¹, 周长春²

(1. 成都大学 机械工程学院, 成都 610106; 2. 四川大学 国家生物医学工程研究中心, 成都 610064)

摘 要: 将介孔生物活性玻璃用于修复酸蚀的牙釉质, 样品经模拟刷牙后, 浸泡在自然唾液中。通过 X 射线衍射(XRD)、扫描电镜(SEM)、聚焦离子束(FIB)切割后透射电镜(TEM)观察、X 射线能谱分析(EDX)、选区电子衍射(SAED)分析, 及纳米压痕力学测试等表征显示, 经过介孔生物活性玻璃处理后的牙釉质, 在唾液中浸泡 6 h, 牙釉质表面形成棒状类骨磷灰石; 浸泡 24 h, 表面形成均匀矿化层, 厚度约为 100 nm, 且和牙釉质基体结合紧密, 钙磷比接近牙釉质基体。矿化层在 300 μ N 作用下, 出现划痕爆破值, 其显微力学性能为(3.37 \pm 0.62) GPa, 弹性模量为(60.48 \pm 4.56) GPa, 均达到未酸蚀牙釉质的 75%。实验结果表明, 介孔生物活性玻璃可较快地诱导矿化, 有望用于酸蚀牙釉质修复及早期龋齿的预防。

关 键 词: 牙釉质; 介孔生物活性玻璃; 再矿化

中图分类号: TQ174 文献标识码: A

Bionic Remineralization of Acidic Etched Enamel Induced by Using Mesoporous Bioactive Glass in Natural Oral Saliva

DONG Zhi-Hong¹, NIE Zhi-Ping¹, ZHOU Chang-Chun²

(1. School of Industrial Manufacturing, Chengdu University, Chengdu 610106, China; 2. National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Acidic etched enamel was treated with mesoporous bioactive glass (M58S) to induce enamel remineralization in natural oral saliva. By simulated brushing teeth, the M58S was adhered on the enamel surface. Then the samples were rinsed by water and immersed in natural oral saliva for different periods. Characterized by XRD, SEM, FIB-TEM, EDX, SAED, and nanoindentation, the samples showed that a new mineralized phase appeared on the surface of the treated samples after soaking for 6 h. After soaking for 24 h, a compact and homogeneous mineralized layer at the thickness of about 100 nm formed with similar structure to apatite, and ratio of calcium to phosphate which was close to the enamel's. Under pressure of 300 μ N, mineralized layer showed a scratch limited value with microhardness at (3.37 \pm 0.62) GPa and elastic modulus at (60.48 \pm 4.56) GPa, both close to 75% value of original enamel. These results indicate that mesoporous bioactive glass can rapidly repair etched enamel and prevent teeth from caries. Therefore, the mesoporous bioactive glass may be used as bionic remineralization materials.

Key words: enamel; mesoporous bioactive glass; remineralization

牙釉质是人体硬组织中最硬的部分, 它没有神经和血管, 受损后不能再生^[1]。其主要成分是磷灰石晶体及少量磷酸盐晶体, 含量高达 95%~97%, 另有

2%~4%的结合水及 1%的有机物^[2]。当牙齿长期接触酸性食物时, 如水果及碳酸饮料等, 将导致牙釉质表面脱钙、矿物质流失, 从而引起釉面损伤, 轻者

出现牙周炎、牙龈萎缩, 重者则出现牙小管暴露, 牙齿过敏, 引起患者产生酸痛感, 同时也容易遭受细菌侵蚀, 产生龋齿^[3-4]。因此, 脱矿牙齿需要及时作矿化处理, 以保持釉面坚硬、光洁, 保持牙齿健康。

钙硅基生物材料是一类较好的硬组织修复材料, 不但具有好的生物活性和生物相容性, 还可随着新组织的生长而降解^[5]。在牙齿修复中, 纳-微米生物活性玻璃用于根管填充, 形成的类骨磷灰石可堵塞暴露的牙小管, 阻止因牙小管暴露而产生的龋齿^[6-7]。常江等^[8-10]曾用硅酸三钙修复脱矿牙釉质, 模拟口腔微环境可在釉面形成仿生矿化层, 其晶体结构类似于牙釉质, 表明钙-硅基材料对牙齿的仿生矿化具有较好的修复效果。但是, 这些研究均局限于纳-微米的实心材料, 难以进一步提高牙齿再矿化速度。和普通钙-硅基材料相比, 介孔生物玻璃具有有序的介孔孔道, 较高的比表面积, 在体外模拟环境中诱导矿化能力、降解性均优于常规的生物活性玻璃。近年来介孔生物玻璃被认为是较好的硬组织修复材料^[11-13]。因此, 为了缩短牙釉质再矿化时间, 提高釉面的修复效果, 本研究探索采用介孔生物活性玻璃修复脱矿的牙釉质。

另外, 体外研究釉面修复材料的常规方法是将样品浸泡于模拟人工唾液, 其配制的主要成分是无机离子 K、Na、Ca、Cl 等, 而口腔唾液中除了含有这些无机成分外, 还有少量的有机成分, 如唾液蛋白和溶酶菌等^[14], 这些有机成分在矿化过程中扮演着重要作用^[15]。研究发现生物矿化过程中, 唾液蛋白质对矿化有明显影响, 在很大程度上决定了矿化层的结构和矿化量^[16]。因而采用模拟人工唾液法体外表征并不能完全反应材料在口腔内釉面修复的真实过程。因此, 本研究选择在自然唾液中浸泡以评价酸蚀牙齿的矿化速度和釉面修复质量。

1 实验方法

1.1 牙齿样品的制备

收集临床上因正畸而拔下的成人恒牙, 去掉软组织, 截去牙根, 去除牙髓, 置于 30%乙醇溶液中, 4℃下贮存。实验时, 牙齿在切割机上切成 4 mm×4 mm 大小的薄片, 用水冷砂纸打磨、抛光, 然后用研磨膏进一步抛光, 获得光滑的牙釉质表面。为了去除表面残留的碎屑, 用酒精超声清洗 3 min, 然后用去离子水冲洗, 室温下晾干备用。

1.2 材料的制备

介孔生物活性玻璃粉采用溶胶-凝胶法制备^[17]: 将 P123 表面活性剂溶解到 500 mL 去离子水中, 搅拌至溶液澄清, 然后用盐酸调节溶液的 pH 到 1 以下, 依次加入正硅酸乙酯(TEOS)、磷酸三乙酯 (TEP) 和硝酸钙, 在 60℃下搅拌 48 h, 移至 100℃烘箱下放置 12 h, 将烘干的粉体放在坩埚中, 烧结炉 600℃下煅烧 6 h, 升温速度为 1℃/min, 除去表面活性剂 P123、残余的有机物, 获得介孔 58 生物活性玻璃 (Mesoporous bioactive glass, M58S)。

将制备好的牙齿样品放在 pH 为 3.8 的柠檬酸溶液中处理 1 min, 将介孔生物活性玻璃粉用水调配成粘稠状, 用牙刷轻轻蘸取少量, 模拟刷牙 3 min, 然后用水冲洗, 将样品放在收集来的自然唾液中浸泡, 试样瓶放在 36.5℃的恒温水浴振荡箱中震荡, 经不同时间后观察其结果。样品每 6 h 换液一次。

自然唾液的收集: 收集同一个人的唾液, 经离心获得澄清的上清液。然后将离心得到的上清液用 γ 射线灭菌 24 h, 放入 4℃冰箱备用。

1.3 性能测试

采用 X 射线衍射仪(D/Max 2550V, Rigaku Japan)对材料进行小角物相分析, 对样品仿生矿化前后的成分进行分析。通过扫描电镜(SEM, JSM-6700F, JEOL, Tokyo, Japan)观察材料在牙釉质表面的粘附、浸泡前后的牙釉质表面形貌、矿化层的微观结构及矿化层和基体的结合情况。在透射电镜(TEM, JEM-2010F, JEOL, Japan)下观察介孔生物玻璃的结构、仿生矿化层和基体的结合以及测量矿化层的厚度。观察前通过聚焦离子束(FIB Quanta 200 3D FIB, FEI, Netherlands)将样品作离子剪薄, 制备成厚度为 100 nm 的样品以确保电子透过^[18], 其制备过程如图 1 所示。通过 X 射线能谱分析(EDX)及选区电子衍射(SAED)分析其矿化层和基体的成分及结构。用纳米压痕仪(Hysitron, Minneapolis, MN)测试其矿化层和基体的结合状况及力学性能, 每个样品上随机测试 10 个点, 相关软件计算其微硬度及弹性模量, 取平均值, 并作统计学偏差分析。

2 结果与讨论

2.1 M58S 结构分析

制备的介孔生物活性玻璃 M58S 煅烧后小角 XRD 衍射图谱及 TEM 照片如图 2 所示。在(100)方向的特征衍射峰与文献报道的介孔生物活性玻璃 XRD 图谱一致^[19], 表明成功合成介孔生物活性

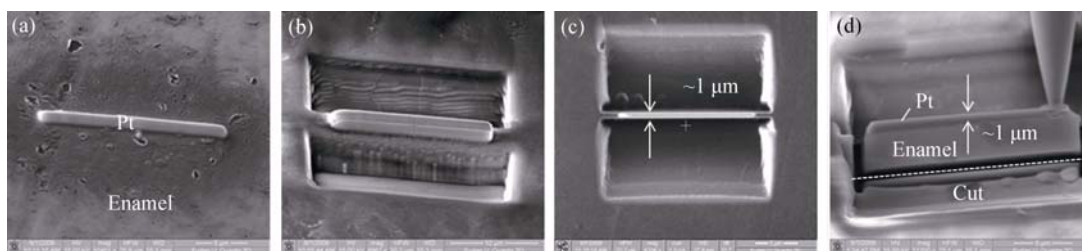


图 1 制备 FIB-TEM 过程中二次电子图像照片

Fig. 1 Secondary electron images of sample in the preparing process by FIB-TEM

(a) Platinum protected layer deposited on the enamel surface with the total thickness of about 1 μm ; (b) Being dug between the protection layers; (c) Being cut a thin slice with thickness of about 1 μm ; (d) The already prepared sample

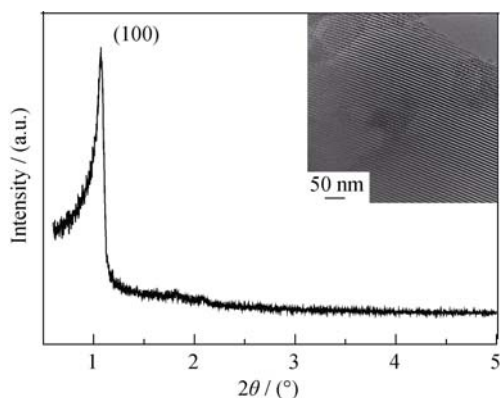


图 2 M58S 的小角 XRD 图谱及 TEM 照片

Fig. 2 Small angle XRD pattern and TEM image of M58S

玻璃, 且 TEM 观察显示孔道有序。

2.2 XRD 矿化分析

牙釉质样品在处理前后表面成分如图 3 所示。和 JCPDS 卡片比对, 正常的牙釉质结构主要是羟基磷灰石, 经过酸蚀后, 表面的矿物质流失, 主要的特征峰减弱甚至消失(图 3(a))。而经过 M58S 处理, 浸泡在口腔唾液中 24 h 后, 表面形成的矿化层结构得到恢复, 并具有相似的羟基磷灰石结构

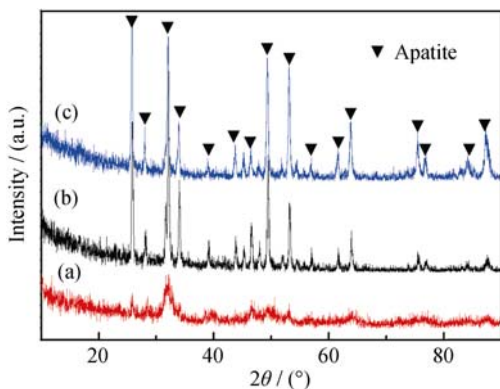


图 3 酸蚀的牙釉质(a)、牙釉质原样(b)及 M58S 处理后浸泡在口腔唾液中 24 h(c)样品的 XRD 图谱

Fig. 3 XRD patterns of etched enamel (a) original enamel (b) and M58S treated and soaked in natural human saliva for 24 h (c)

(图 3(c)), 且结晶良好, 和牙釉质成分接近(图 3(b))。说明 M58S 具有良好的生物活性, 能诱导类骨磷灰石生成, 形成类似牙釉质结构的仿生矿化层。

2.3 SEM 观察

牙釉质表面经过抛光处理, 表面会有轻微划痕(图 4(a))。遇酸后, 牙釉柱周围脱矿, 致密的牙釉质表面变得结构疏松(图 4(b)), 经自然唾液浸泡 24 h 后, 表面结构变致密(图 4(b₁))。这可能是唾液中微量元素如钙、磷和唾液蛋白渗入晶格空间所致。而酸蚀的样品经过 M58S 处理后, 微观下看到牙釉质表面粘附着一定量的 M58S(图 4(a₁)), 经自然唾液处理 6 h, 表面有晶粒生成(图 4(c))。高倍下观察, 晶粒嵌入疏松结构的基体中, 呈短棒状, 成簇聚集(图 4(c₁)), 但不均匀, 这与粘附 M58S 粒子分布有关; 随着 M58S 溶解, 硅离子释放, 在釉面形成均匀富硅层, 为钙离子提供了形核位点。当钙离子在溶液达到过饱和后开始沉积, 先形成无定型磷酸钙^[20], 随着浸泡时间的延长(24 h), 表面均匀地形成一层矿化层(图 4(d)), 且晶粒由短棒状变成蠕虫状, 随着 M58S 的溶解及高的表面活性, 加速了磷灰石的生成、硅离子的溶出, 导致晶粒变细小, 呈无序堆积状生长(图 4(d₁))。这种短棒状磷灰石的结构, 与在单纯的无机离子中(如 SBF)浸泡呈片状结构不同^[21], 更加有利于牙釉质力学性能的提高。它的形成与很多因素有关, 除了材料的物理化学特性外, 溶液的浓度、pH 值等均会有所影响; 同时, 自然唾液的粘稠度以及唾液中有有机成分(如唾液蛋白等)均会在磷灰石的形核过程中起一定的调控作用^[22-23]。

2.4 FIB-TEM 及 EDX 分析

为了观察牙釉质基体和矿化层的结合状况, 自然唾液中浸泡处理 24 h 的牙釉质样品经 FIB 制样后, 在透射电镜(TEM)下观察其基体和矿化层的结合状况及矿化层的厚度, 从图中可看出(图 5), 牙釉质表面形成了厚约 150~200 nm 的矿化层, 和牙釉质基体结合良好, 无缝隙出现。同时, 两个观察区的化学

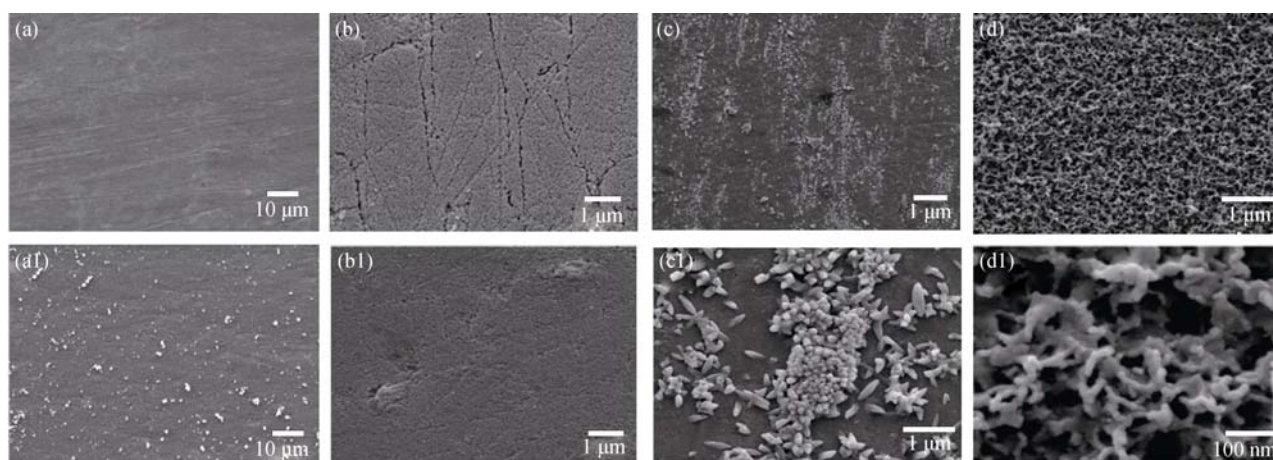


图 4 牙釉质表面 SEM 照片

Fig. 4 SEM images of enamel surface

(a) Original enamel; (a₁) Etched enamel with adhered M58S; (b) Etched enamel; (b₁) Etched enamel without M58S soaked in natural oral saliva for 24 h; (c, d) Etched enamel with adhered M58S soaked in natural oral saliva for 6 h and 24 h, respectively; (c₁, d₁) Magnified images of (c) and (d), respectively

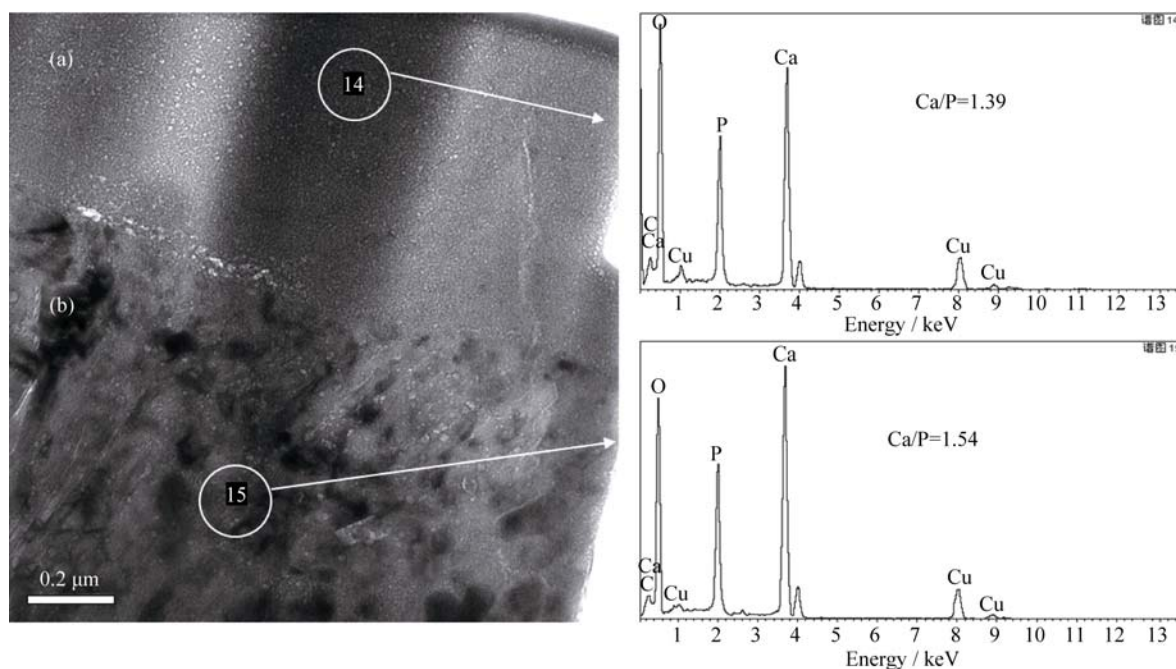


图 5 FIB 制备的样品在 TEM 下的矿化层(a)、牙釉质基体(b)及相应的 Ca/P 比

Fig. 5 TEM image of samples by FIB (a) mineralized layer, (b) enamel matrix, and corresponded Ca/P ratio by EDX

组分也类似, 在较短时间内矿化层的钙磷比(1.39)接近于牙釉质钙磷比(1.54)。

为了进一步观察矿化层和牙釉质基体的两个选区晶格结构, 从高倍透射电镜(HRTEM)及电子衍射光斑(SAED)可看出(图 6), 在(100)晶面, 牙釉质基体的晶格尺寸是 (0.82 ± 0.01) nm, 而矿化层的晶格参数是 (0.80 ± 0.01) nm, 接近于牙釉质中纳米羟基磷灰石的晶格参数。电子衍射光斑表现为多晶结构, 矿化层的晶体结构(图 6(a))与牙釉质基体很接近(图

6(b))。可见 M58S 在自然唾液中诱导形成了类似釉质的晶体结构。这一仿生矿化是个复杂的矿化过程, 除了过饱和溶液、pH 值、离子的动态平衡外, 唾液中的成分, 包括无机离子和唾液蛋白及酶等对牙齿的再矿化起着至关重要的作用, 当牙齿接触过量的酸性物质导致牙齿矿物质流失甚至形成早期龋齿时, 唾液中的过饱和状态被打破, 再矿化作用较缓慢。而本实验结果证实, 该过程可被 M58S 处理所逆转。

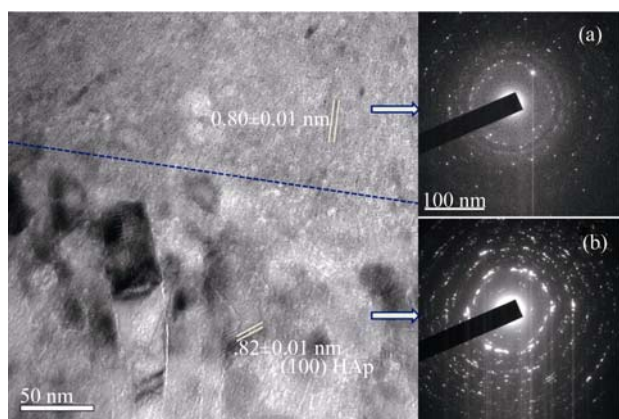


图 6 用 FIB 制备的牙齿样品的 HRTEM 照片及选区电子衍射光斑(SAED).

Fig.6 HRTEM image of teeth sample by FIB preparation and selected area electron diffraction (SAED)

(a) Mineralized layer of M58S treated for 24 h in natural oral saliva. (b) Enamel matrix.

研究证明唾液对软化釉面有明显的再矿化作用^[24-25],当唾液在过饱和状态下,唾液中的钙、磷离子与釉质中钙、磷间存在着动态平衡,在热动力学作用下,可以控制牙齿的脱矿再矿化过程。本研究采用的 M58S,钙离子的释放,提高了牙釉质表面的钙离子浓度;硅离子可在牙釉质表面形成富硅层,为钙磷的沉积提供形核位点^[26]。晶体在生长的过程中,相互交错叠加,同时,唾液蛋白在静电力的作用下,吸附在成核纳米羟基磷灰石的晶格间,使得矿化层致密,提高了矿化层和基体的结合力,防止酸的渗入,减少龋齿的发生,对脱矿的牙釉质起到较好的修复作用^[27]。唾液蛋白在保持口腔健康中扮演着重要的角色,如富组蛋白有较好的抗菌活性,可抑制细菌滋生,减少酸性物质的生成^[28];酸性脯氨酸蛋白和富组氨酸蛋白都与羟基磷灰石有较好的亲和性,可以吸附在釉质表面,和钙离子键合,抑制矿物质的流失,同时这种蛋白在过饱和溶液下也可抑制磷酸钙的沉积,防止牙结石形成^[29],有益于羟基磷灰石生成而起到修复作用。

2.5 力学性能分析

牙齿的重要功能是持续咀嚼,因此牙齿的力学性能至关重要。仿生矿化层的力学强度决定了修复后的牙齿是否能发挥其正常的咀嚼功能。纳米划痕及压痕技术广泛应用于牙齿纳米及微米尺度的力学性能评估^[30]。这种微尺寸的力学性能评估,可准确、灵敏地检测极小范围内牙齿再矿化的力学性能,优于传统的显微硬度测试^[31]。图 7 是纳米划痕实验数值,随着划痕力的增加,划痕逐渐加深。在 300 μN 力的作用下,矿化层出现爆破值,如图 7(a)箭头所

示。在该力作用下(即 300 μN)进行纳米压痕力学性能测试,结果如表 1 所示。经过 M58S 处理后,矿化层的显微硬度和弹性模量分别为 (3.37 ± 0.62) GPa 和 (60.48 ± 4.56) GPa,均约达到未酸蚀牙釉质的 75%。

纳米压痕的形貌通过原子力显微镜进行观察(图 8)。正常的牙釉质晶体,釉柱互相平行与釉质表面垂直且相互重叠,是人体中最硬的组织^[32]。其压痕形貌正常,成规则的三角形(图 8(a))。而酸蚀的牙釉质,表面结构疏松,粗糙度增加,表面高度不一的坡度使原子力显微镜下的探针表面光度仪无法正常测量^[33]。经过介孔生物玻璃 M58S 处理后(图 8(b)),表面变的光洁,晶粒细小,但形成的晶体呈无序排列,且钙磷比牙釉质基体低,所显示的压痕形貌较原牙釉质压痕深。

3 结论

酸蚀的牙釉质经过介孔生物活性玻璃 M58S 处理,6 h 即可形成矿化相,24 h 后,即能形成和基体结合良好的矿化层,且和基体结合致密,形成的矿化相结构和牙釉质接近,力学性能较好。M58S 良好的

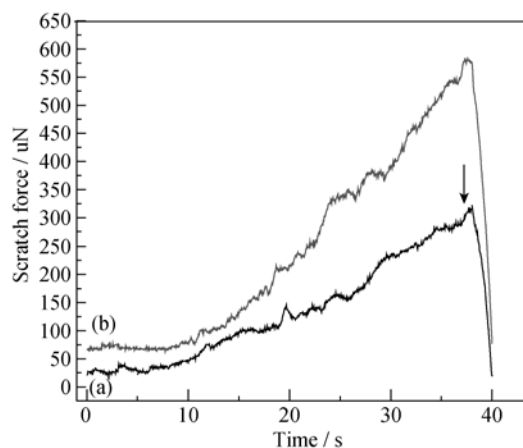


图 7 样品的纳米划痕实验

Fig. 7 Scratch test by nanoindentation machine

(a) M58S treated enamel samples soaked in natural oral saliva for 24 h; (b) Enamel original samples

表 1 通过纳米压痕仪测试样品的力学强度

Table1 Mechanical properties detected by nanoindentation

Samples	Hardness value (mean \pm s.d.) / GPa	Elastic modulus (mean \pm s.d.) / GPa
Original	4.21 \pm 0.32	80.30 \pm 5.20
24 h treated	3.37 \pm 0.62*	60.48 \pm 4.56*

* represents significant difference ($p < 0.05$) between the original and the treated samples.

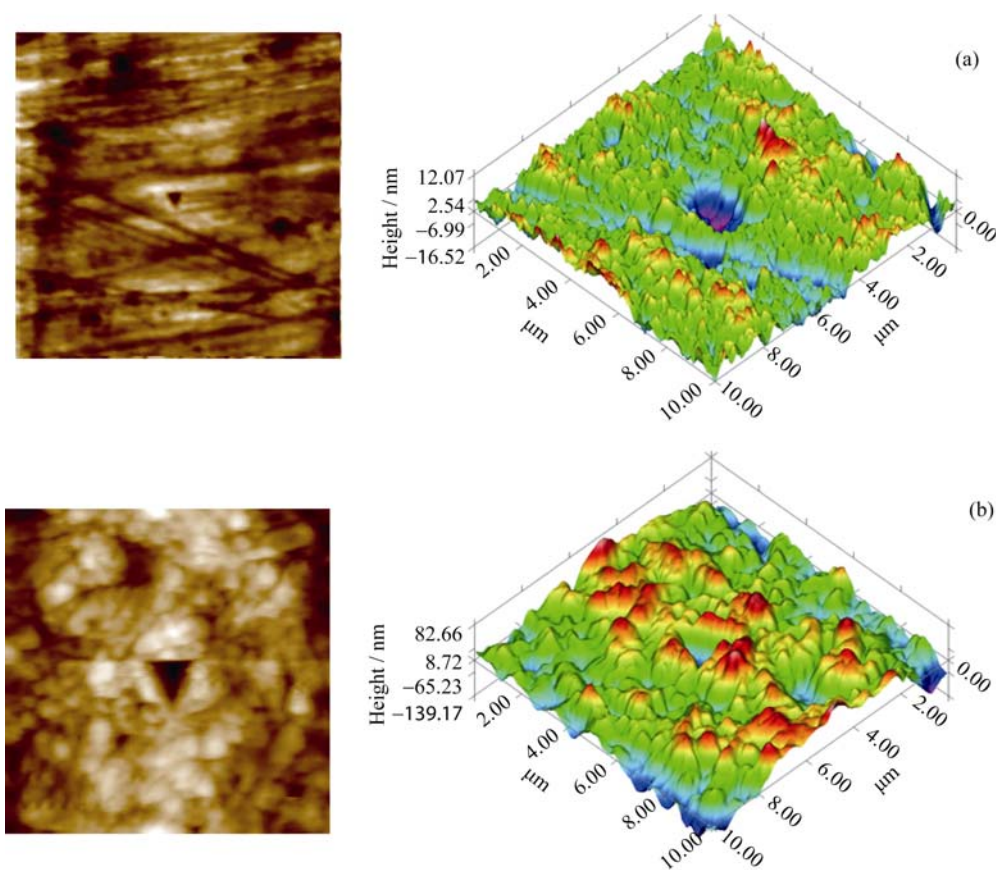


图 8 样品的纳米压痕形貌

Fig. 8 Nanoindentation images of (a) enamel original sample and (b) M58S treated enamel sample soaked in natural oral saliva for 24 h

生物活性和自然唾液中复杂的成分, 加速了矿物成核和晶体生长, 有望成为快速修复脱矿牙齿的优选材料。

参考文献:

- [1] JONES H. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surf. Sci. Rep.*, 2001, **42**: 75–205.
- [2] CAO Y, MEI M L, LI L, *et al.* Agarose hydrogel biomimetic mineralization model for the regeneration of enamel prismlike tissue. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**(1): 410–420.
- [3] ROBERT H S, AMID I I, NIGEL B P. Dental caries. *Lancet*, 2007, **369**: 51–59.
- [4] KATRIN B. Editor. Clinical Presentation and Physiological Mechanisms of Dentine Hypersensitivity. *Dentine Hypersensitivity*, 2015: 21–32.
- [5] XU S F, LIN K L, WANG Z, *et al.* Reconstruction of calvarial defect of rabbits using porous calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials*, 2008, **29**: 2588–2596.
- [6] CURTIS A R, WEST N X, SU B. Synthesis of nanobioglass and formation of apatite rods to occlude exposed dentine tubules and eliminate hypersensitivity. *Acta Biomaterialia*, 2010, **6**: 3740–3746.
- [7] VOLLENWEIDER M, BRUNNER T J, KNECHT S, *et al.* Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. *Acta Biomaterialia*, 2007, **3**: 936–943.
- [8] WANG Y Y, LI X K, CHANG J, *et al.* Effect of tricalcium silicate (Ca_3SiO_5) bioactive material on reducing enamel demineralization: An in vitro pH-cycling study. *J. Dent.*, 2012, **40**(12): 1119–1126.
- [9] DONG Z H, CHANG J, DENG Y, *et al.* In vitro remineralization of acid-etched human enamel with Ca_3SiO_5 . *Appl. Surf. Sci.*, 2010, **256**: 2388–2391.
- [10] DONG Z H, CHANG J, JOINER A, *et al.* Tricalcium silicate induces enamel remineralization in human saliva. *J. Dent. Sci.*, 2013, **8**: 440–443.
- [11] WU C T, FAN W, ZHU Y F, *et al.* Multifunctional magnetic mesoporous bioactive glass scaffolds with a hierarchical pore structure. *Acta Biomater.*, 2011, **7**: 3563–3572.
- [12] XIA W, CHANG J. Preparation, *in vitro* bioactivity and drug release property of well-ordered mesoporous 58S bioactive glass. *J. Non-Cryst. Solids*, 2008, **354**(12/13): 1338–1341.
- [13] ZHU Y F, WU C T, YOGAMBHA R, *et al.* Preparation, characterization and *in vitro* bioactivity of mesoporous bioactive glasses

- (MBGs) scaffolds for bone tissue engineering. *Micropor. Mesopor. Mat.*, 2008, **112**: 494–503.
- [14] SUE P H, RUSSELL T W. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent.*, 2001, **85**(2): 162–169.
- [15] ARNDT G, SUSANNE B, KARIN S, *et al.* Biomimetic mineralization: effects on human enamel *in vivo*. *Adv. Eng. Mater.*, 2010, **12**(9): B571–B576.
- [16] DOWD F J. Saliva and dental caries. *Dent. Clin. North Am.*, 1999, **43**(4): 579–597.
- [17] FENG X X, CHANG J. Synthesis of a well-ordered mesoporous 58s bioactive glass by a simple method. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, 2011, **8**(3): 547–552.
- [18] KAWAHARA S, YAMAMOTO Y, FUJII S, *et al.* FIB-SEM and TEMT observation of highly elastic rubbery material with nano-matrix structure. *Macromolecules*, 2008, **41**(12): 4510–4513.
- [19] ZHOU YAN-LING, FENG XIN-XING, ZHAI WAN-YIN, *et al.* Study on the loading and releasing behavior of epirubicin hydrochloride from mesoporous bioactive glasses (MBGs). *Journal of Inorganic Materials*, 2011, **26**(1): 68–72.
- [20] PHILIPS N G, ANDY Y H L, ISABEL I B, *et al.* Biomimetic apatite mineralization mechanisms of mesoporous bioactive glasses as probed by multinuclear ^{31}P , ^{29}Si , ^{23}Na and ^{13}C solid-state NMR. *J. Phys. Chem. C.*, 2010, **114**: 19345–19356.
- [21] SHI Q H, WANG J F, ZHANG J P, *et al.* Rapid-setting, mesoporous, bioactive glass cements that induce accelerated *in vitro* apatite formation. *Adv. Mater.*, 2006, **18**: 1038–1042.
- [22] HUANG XIAO-HUI, YAN XIAO-XIA, HAN LU YI, *et al.* Influence of the dosage of mesoporous bioactive glass in simulated body fluid on the *in vitro* bioactivity evaluation. *Acta Chimica Sinica*, 2006, **64**(9): 851–857.
- [23] MORENO E C, VARUGHESE K, HAY D I. Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. *Calcif. Tissue Int.*, 1979, **28**: 7–16.
- [24] AMAECHI B T, HIGHAM S M. *In vitro* remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. *J. Dent.*, 2001, **29**: 371–376.
- [25] EVERETT E T. Fluoride's effects on the formation of teeth and bones and the influence of genetics. *J. Dent. Res.*, 2011, **90**(5): 552–560.
- [26] LI X L, WANG J F, JOINER A, *et al.* The remineralisation of enamel: a review of the literature. *J. Dent.*, 2014, **42**S(1): S12–S20.
- [27] TOHDA H, TAKUMA S, TANAKA N. Intracrystalline structure of enamel crystals affected by caries. *J. Dent. Res.*, 1987, **66**: 1647–1653.
- [28] JENSEN J L, XU T, LAMKIN M S, *et al.* Physiological regulation of the secretion of histatins and statherins in human parotid saliva. *J. Dent. Res.*, 1994, **73**(12): 1811–1817.
- [29] MARK S L, FRANK G O. Structural features of salivary function. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1993, **4**(3/4): 251–259.
- [30] GE J, CUI F Z, WANG X M, *et al.* Property variation in the prism and organic sheath within enamel by nanoindentation. *Biomaterials*, 2005, **26**: 3333–3339.
- [31] FINKE M, HUGHES J A, PARKER D M. Mechanical properties of *in situ* demineralized human enamel measured by AFM indentation. *Surf. Sci.*, 2001, **491**(3): 456–467.
- [32] FINCHAM A G, MORADIAN-OLDAK J, SIMMER J P. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J. Struct. Biol.*, 1999, **126**(3): 270–299.
- [33] VITKOV L, KASTNER M, KIENBERGER F, *et al.* Correlations between AFM and SEM imaging of acid-etched tooth enamel. *Ultrastruct. Pathol.*, 2008, **32**(1): 1–4.