

α -磷酸三钙水解法修复牙釉质龋

马英, 李思维, 冯祖德

(厦门大学材料学院, 厦门 361005)

摘要: 采用 α -磷酸三钙(α -TCP)水解法在牙釉质表面制备羟基磷灰石(HA)涂层,并用 XRD、SEM、TEM、显微硬度仪和自制的牙刷磨耗试验机对涂层的结构和性能进行表征. 采用 L929 细胞对 α -TCP 水解液进行细胞毒性评价. 结果显示: α -TCP 在 37℃ 条件下水解 6h,即可在牙釉质表面得到厚度约 20 μ m 的 HA 涂层,此涂层与牙釉质表面结合紧密,涂层的硬度与正常牙釉质无明显的差异,并且具有良好的耐磨性. 该方法反应条件温和、简便、安全、有效,有望应用于龋病预防和早期釉质龋治疗.

关键词: α -磷酸三钙; 羟基磷灰石; 牙釉质龋; 涂层

中图分类号: R318; R783

文献标识码: A

Restoration of Tooth Enamel Caries by Hydrolysis of α -TCP

MA Ying, LI Si-Wei, FENG Zu-De

(College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A novel method was developed to grow hydroxyapatite (HA) coatings on the surface of enamel. The coatings were formed by hydrolysis of α -TCP for 6h at 37 $^{\circ}$ C. The detailed characterizations of the microstructure and mechanical properties of the coatings, and cytotoxicity of α -TCP hydrolysis solution were performed. SEM and TEM analysis show that the HA coatings, approximate 20 μ m in thickness grow perpendicularly to the enamel surface, contacting well to the surface of enamel. Vickers microhardness and wear-resistance tests indicate that there is no statistical significant difference of the hardness and wear-resistance between the coatings and healthy natural enamel. The grade of cytotoxicity of α -TCP hydrolysis solution is I grade, satisfying the relevant criterion on biomaterials. The study suggests that the hydrolysis of α -TCP is a promising method to effectively and conveniently restore and prevent early enamel caries.

Key words: α -TCP; HA; tooth enamel caries; coating

龋病是一种由口腔中多种因素复合作用导致的牙齿硬组织病,是口腔科的常见病和多发病^[1]. 据世界卫生组织(WHO)统计,龋病已列为影响人类健康的三大疾病之一^[2]. 牙齿的缺损严重影响到患者的生活质量^[3,4]. 现代医学倡导对疾病的早发现、早诊断和早治疗,龋病的预防和早期治疗也越来越受到关注. 在龋病形成的早期,牙釉质表面局部脱矿、溶解破坏,此时若给予积极的治疗将有效地阻止龋病的进一步发展. 龋病的传统治疗方法是在牙本质龋形成后,去除坏死的牙组织,制备合适形状的窝洞,再填充合金或复合树脂材料^[5,6]. 而对于表浅的釉质龋在制备窝洞时需去除正常的牙体组织,造成组织损伤. 近

年来国内外报道了几种无需备洞修复牙釉质龋的新方法. 主要有凝胶体系仿生矿化法,在牙釉质表面生成类牙釉质的含氟磷灰石涂层,但涂层的生长速度较慢(500nm \cdot d⁻¹),且操作比较复杂,尚不适合临床应用^[7];此外,用浆料涂覆法在牙釉质表面快速生成羟基磷灰石涂层^[8,9]和二水磷酸氢钙涂层^[10],也可以修复釉质龋,所使用的浆料 pH 值均小于 2,因此只能用于牙表面远离牙龈的部位,以免糊剂接触到牙龈或口腔粘膜引起局部的炎症反应.

本工作利用 α -TCP 的水解反应在牙釉质表面生长 HA 涂层修复早期的釉质龋. 涂层有较高的硬度和良好的耐磨性,且与牙釉质表面结合紧密,能够起到

保护天然牙釉质的作用。

1 实验过程

1.1 α -TCP 合成

$\text{CaHPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (分析纯) 和 CaCO_3 (分析纯) 按照 Ca/P 摩尔比 1.5 混合, 在高温炉中先以 $6.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率升温到 1000°C , 接着以 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率继续升温至 1300°C , 并保温 6h, 取出后在空气中急冷至室温, 球磨 (乙醇为介质), 烘干后制得 α -TCP 粉末。

1.2 牙齿试样的制备及表面预处理

取口腔科因正畸需要拔除的健康磨牙 (厦门口腔医院提供), 标本健康, 无龋坏, 用 0.1% 新洁尔灭浸泡过夜, 生理盐水 4°C 下保存。用低速刚玉锯片自牙釉质-牙骨质交界处截去牙根部, 用 80% 的 H_3PO_4 和 30% 的 H_2O_2 (体积比 1:4) 混合处理 30s, 用蒸馏水冲洗干净。

1.3 涂层的制备及溶液 pH 值测定

称取 0.3g 的 α -TCP 与 50mL 的蒸馏水混合于烧杯中, 将表面预处理过的样品放入烧杯底部, 于 37°C 的恒温水浴中反应 6h 后, 取出样品, 用蒸馏水冲洗干净, 自然干燥。分别测量反应前后溶液的 pH 值。

1.4 涂层的 XRD 分析

用薄膜 XRD 模式 (X'Pert pro, PANalytical, Holland) 对涂层的相结构进行分析, 阳极靶为 Cu 靶, 工作电压 40kV; 工作电流 30mA; 扫描速度 $10^\circ/\text{step}$; 步长 $0.016^\circ(2\theta)$; 扫描范围为 $20^\circ \sim 70^\circ(2\theta)$; 入射角为 0.2° 。

1.5 涂层表面及剖面的 SEM 分析

样品表面喷金 (SCD005, BAL-TEL, England) 30s, 用扫描电子显微镜 (XL-30, Philips-FEI, Holland) 观察涂层表面的微观形貌。

将试样用环氧树脂包覆固化, 用低速刚玉锯片沿牙釉质方向剖开。剖面先粗磨, 然后用粒径为 $0.25\mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 悬浮液抛光。试样经 37% 的 H_3PO_4 腐蚀 10s 后, 喷金 (SCD005, BAL-TEL, England) 30s, 用扫描电子显微镜 (LEO-1530, LEO, Germany) 对比观察酸蚀前后剖面的形貌。

1.6 TEM 分析

牙釉质涂层试样用环氧树脂包埋固化后, 沿牙釉质方向剖开, 机械研磨至试样厚度为 $400 \sim 500\mu\text{m}$ 。用冲片机将试样制成 $\phi 3\text{mm}$ 圆片, 再用金刚石研磨膏逐渐打磨至厚度小于 $80\mu\text{m}$, 用离子减薄仪 (PIPS 691, GATAN, America) 减薄, 透射电子显微镜 (F30, Philips-FEI, Holland) 观察涂层的显微结构。

1.7 涂层硬度的测量

用显微硬度测试仪 (Model HV-1000, Shanghai,

China) 测量涂层的硬度。测试前先将釉质表面磨平抛光后, 测量牙釉质表面的硬度。按照 1.3 节方法制备涂层, 再对比测量涂层的硬度, 测试时的负载均是 100g, 加载时间为 20s。

1.8 耐磨性的测试

将涂层试样固定在自制牙刷磨耗试验机上, 实验装置示意图见参考文献 [11] 所示。砝码负载 200g, 磨耗介质为 30% 牙膏水溶液, 频率为 4500 次/分, 每个样品被连续磨刷 75000 次。磨刷后用水冲洗干净, 用环氧树脂包埋, 固化。沿牙齿纵轴方向剖开, 剖面经机械磨平、抛光, 在扫描电子显微镜 (XL-30, Philips-FEI, Holland) 下观察涂层磨损程度。

1.9 α -TCP 材料的生物相容性

将 L929 细胞 (由厦门大学生物医学工程研究中心提供) 培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中, 在 37°C 、5% 的 CO_2 及饱和湿度下培养。实验设 PBS 溶液对照组、阳性对照组 (6.4g/L 苯酚溶液)、实验组为 1.3 节反应后经过滤除菌的水解液。将这三组溶液分别用 DMEM 培养基稀释为原浓度的 1/4、1/3、1/2 和 3/4。阴性对照为 DMEM 培养基, 空白对照组不加细胞只加培养基。将融合期的细胞用 0.25% 的胰酶消化为单细胞悬液, 按每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板中, 在 37°C 、5% 的 CO_2 下培养 24h。然后弃去原培养液, 分别加入各浓度的试验组溶液、PBS 对照组、阳性对照及阴性和空白对照, 每个浓度设 6 个平行孔。在 37°C 、5% 的 CO_2 下培养 24h 后, 每孔加入 5mg/mL 的 MTT 溶液 $20\mu\text{L}$ 。继续培养 4h 后, 弃原混合液, 每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) $100\mu\text{L}$, 振荡 20min。用酶标仪测定 490nm 下各孔光吸收值 (OD 值), 然后计算细胞相对增值率 (RGR):

$$\text{RGR} = \frac{\text{OD}_{\text{实验孔}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}}{\text{OD}_{\text{阴性对照}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 合成 α -TCP 的 XRD 分析

图 1 为 α -TCP 粉末的 XRD 图谱, 与 α -TCP 的标准谱图 (PDF #29-0359) 匹配良好。在 2θ 为 22.9° 、 30.7° 、 34.2° 出现较强的三条衍射峰, 分别与 α -TCP 的三条最强峰的晶面 (132)、(034) 和 (290) 相对应, 可知合成粉末的主要成分为 α -TCP。

2.2 反应前后溶液的 pH 值及涂层的 XRD 分析

口腔内部粘膜薄而柔软, 容易受到损伤 [12], 口腔内用药不能刺激性过强。反应前溶液的 pH 值为 8.62 ± 0.09 , 反应后的 pH 值为 7.00 ± 0.06 , 与正常口腔唾液的 pH 值 ($6.0 \sim 7.9$) [12] 接近, 在人体组织所能接受的范围, 不致引起口腔粘膜的局部炎症反应。

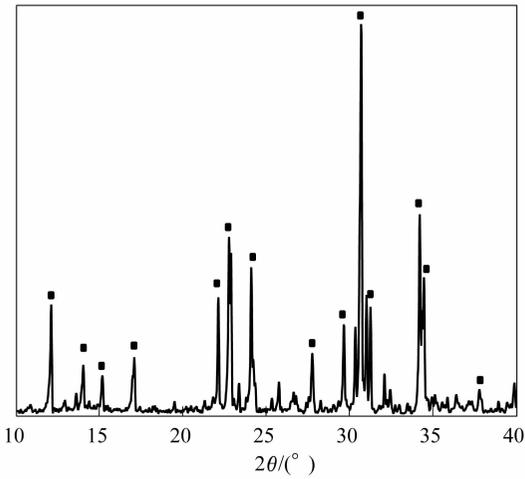


图1 α -TCP 粉末的 XRD 图谱
Fig.1 XRD pattern of α -TCP powder

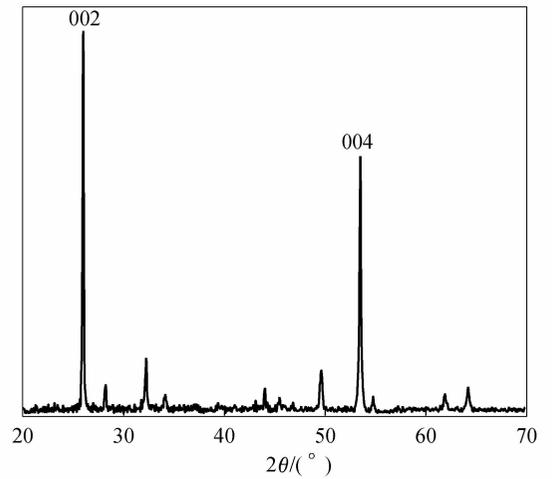


图2 涂层的 XRD 图谱
Fig.2 XRD pattern of the coating

图2为涂层的XRD图谱,主要成分为HA(PDF# 09-0432),在(002)、(004)晶面上衍射峰较强,在一定程度上表明涂层择优生长。

2.3 涂层表面及剖面的SEM分析

图3(a)为牙釉质的表面形貌,经轻微的酸蚀后牙釉质表面粗糙,呈钥匙孔状。图3(b)为涂层的表面形貌,表面较平坦,但有轻微的起伏。

在图3中,(c)、(d)为包埋试样的纵剖面 and 用37%的 H_3PO_4 轻微酸蚀的对照剖面,从图(c)中可以观察到涂层厚度约为 $20\mu m$,涂层与牙釉质间结合紧密,无明显的缝隙,但两者间的界限隐约可见。剖面经酸蚀后牙釉质处可以观察到牙釉质中的釉柱结构,而涂层则没有。这是因为涂层与牙釉质之间结构的差异所致。

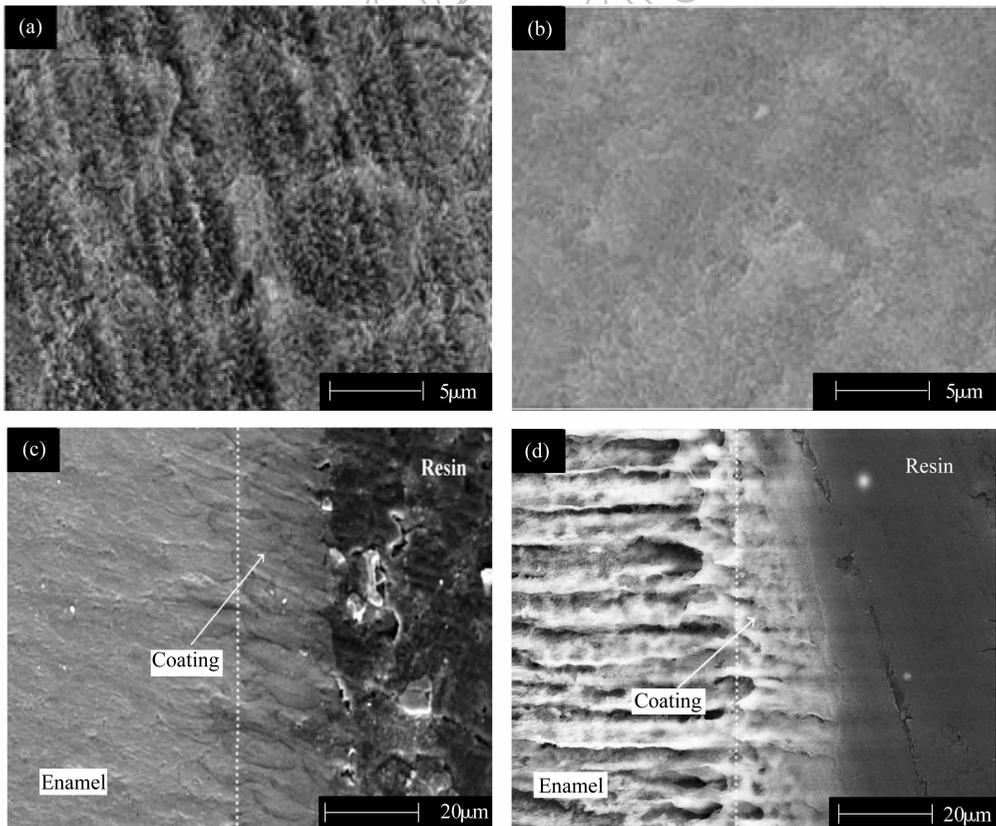


图3 样品的SEM照片
Fig.3 SEM images of samples
(a) Etched enamel surface; (b) Coating surface; (c) Longitudinal section and (d) Etched longitudinal section

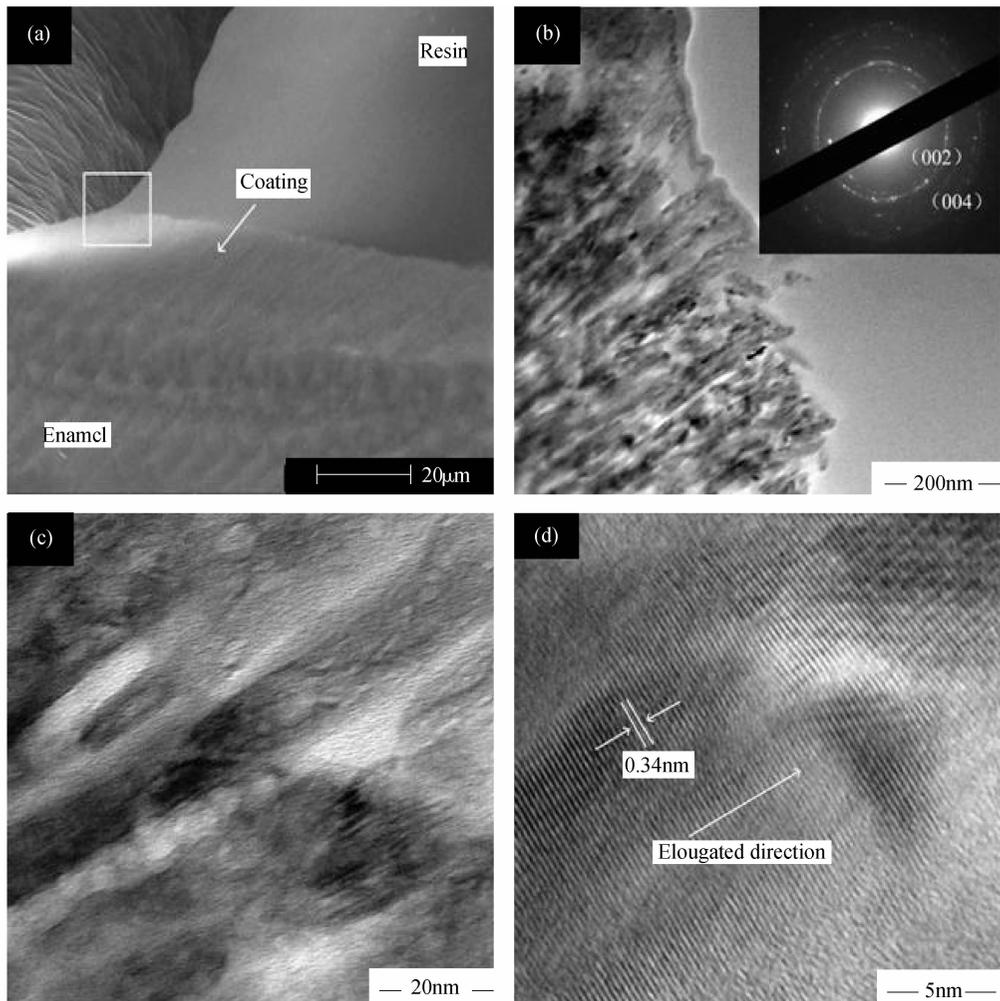


图4 涂层的显微结构(a)剖面的SEM照片;(b)TEM照片;(c)放大的TEM照片;(d)高分辨图像

Fig.4 (a)SEM; (b)TEM; (c) Magnified TEM; (d) HRTEM image of the coating

2.4 涂层剖面显微结构分析

图4为牙釉质和涂层的微观结构图,涂层与牙釉质结合紧密(图4(a)),晶体排列规则,方向大致垂直于表面(图4(b)),HA晶体呈长条状,宽约20nm(图4(c)),比牙釉质表面的晶体宽度30~90nm^[13]略小.衍射图谱中两条衍射环从内到外经标定分别为(002)、(004)晶面,其中(002)晶面的衍射环亮度较大,说明晶体在(002)晶面方向上择优生长,这与XRD分析得到的峰强结果也是一致的.经高分辨像(图4(d))标定可知,在晶体的生长方向上晶面间距为0.34nm,即(002)晶面(PDF#09-0432)与牙釉质中羟基磷灰石晶体的排列方向相同^[1,14],这也间接说明了此涂层是沿牙釉质中羟基磷灰石晶体外延生长.

2.5 涂层硬度分析

表1为牙釉质表面生长涂层前后的维氏硬度值,生长涂层前牙釉质表面的维氏硬度为330~350VHN,涂层的硬度为280~330VHN,用SPSS 13.0软件进行统计学分析(配对 t 检验),结果显示涂层与牙釉质表面的维氏显微硬度无显著差异($P \geq 0.1$).

表1 牙釉质表面及涂层的维氏硬度值
Table 1 Mean (SD) Vicker hardness (VHN)
of enamel and coating

Sample	Enamel VHN	Coating VHN	P value
Sample 1	347.06 ± 4.90	308.15 ± 28.60	0.50
Sample 2	330.90 ± 13.80	321.37 ± 5.61	0.13
Sample 3	330.38 ± 4.42	310.50 ± 18.62	0.92

2.6 涂层耐磨性分析

耐磨性测试模拟正常人刷牙4.5年^[15,16]后对于表面的磨损.图5为扫描电镜下观察耐磨试验后样品,从图中可以观察到涂层被磨损掉的厚度为3.65 μm 左右,约相当于涂层厚度的14.48%.与Onuma等的研究结果^[8]10%接近,表明涂层具有较好的耐磨性.

2.7 α -TCP 水解液生物相容性

图6为不同浓度的 α -TCP水解液对L929细胞的细胞毒性试验结果.从图中可以看出 α -TCP水解液的细胞毒性与PBS对照组接近,随着浓度的增高而降

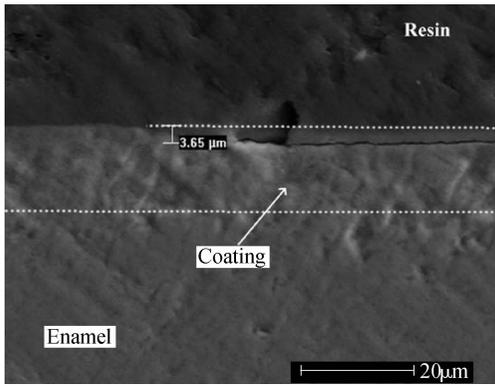


图5 耐磨样品的SEM照片

Fig. 5 SEM image of wear-resistance sample

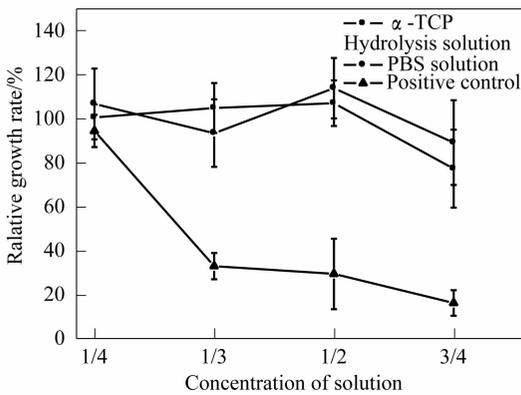


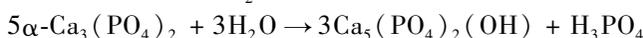
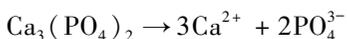
图6 不同浓度水解液的细胞毒性

Fig. 6 Cytotoxicity of hydrolysis solution with different concentration

低,但不同浓度下都有 $RGR > 75\%$ 。按照生物材料毒性评定分级方法($RGR \geq 100\%$ 为0级; $75\% \sim 99\%$ 为I级; $50\% \sim 74\%$ 为II级; $25\% \sim 49\%$ 为III级; $1\% \sim 24\%$ 为IV级; 0 为V级^[17])可知,水解液的细胞毒性均 \leq I级,达到生物材料的要求标准。而阳性对照在浓度达到原浓度的1/3时就表现出明显的细胞毒性。

2.8 涂层生长机理的探讨

利用 α -TCP水解法在牙釉质表面生长HA涂层修复牙釉质龋有两个关键步骤。一是牙釉质表面的酸处理,另一个是HA晶体在釉质晶体表面的成核与生长。龋损的表面通常覆盖着一层生物膜^[18],通过酸处理可将其去除,暴露釉质晶体,为HA晶体提供成核位点。HA晶体的成核和生长依赖于 α -TCP水解产生的 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 和 OH^- 离子。在 $37^\circ C$ 时 α -TCP和HA的 K_{sp} 分别为 3.16×10^{-26} 和 2.51×10^{-59} 。 α -TCP的溶解度远远大于HA, α -TCP颗粒表面的 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 离子不断溶出形成水化的 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 。当 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 和 OH^- 的离子浓度使HA的浓度积 $Q_c > K_{sp}$ 时,HA晶体开始析出,水化反应方程式为:



牙釉质的主要成分是羟基磷灰石,与将要形成的HA涂层之间的界面能较小,当釉质晶体周围的 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 和 OH^- 离子达到过饱和时,HA晶体易于在牙釉质表面生长。在HA晶体中(002)晶面的间距相对较大,具有较低的能量堆积,晶体易于沿着这个方向生长。所以 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 和 OH^- 离子随着溶液被引入到釉质表面能够成核并沿垂直于(002)晶面方向择优生长。

3 结论

利用 α -TCP的水解作用在经预处理的牙釉质表面生长HA涂层,在 $37^\circ C$ 下经6h在牙釉质表面得到厚约 $20\mu m$ 的HA涂层。HA涂层的晶体呈长条状,宽约 $20nm$,排列规则,方向垂直于表面,并沿着垂直于(002)晶面的方向择优生长。涂层能起到预防龋齿的作用,同时可以对釉质龋进行修复,而无须去除龋损周围健康的牙体组织。该方法所用的反应溶液pH值在 $6 \sim 8$ 范围内,接近正常口腔唾液的pH值,反应条件温和,简便易行,有望应用于龋病预防和早期釉质龋治疗以及牙齿美容。

参考文献:

- [1] 于世凤,高岩. 口腔组织学与病理学,第一版. 北京:北京大学医学出版社,2005.
- [2] 李刚. 现代口腔预防医学研究,第一版. 西安:陕西科技出版社,1996.
- [3] Mertz-Fairhurst E J, Richards E E, Williams J E, et al. *Am. J. Dent.*, 1992, **5**(1):5-10.
- [4] Tyas M J, Anusavice K J, Frencken J E, et al. *Int. Dent. J.*, 2000, **50**(1):1-12.
- [5] Kidd E A M, Joyston-Bechal S, Beighton D. *Caries. Res.*, 1993, **27**(5):402-408.
- [6] Raskin A, Michotte-Theall B, Vreven J, et al. *J. Dent.*, 1999, **27**(1):13-19.
- [7] Busch S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**(11):1428-1431.
- [8] Yamagishi K, Onmua K, Suzuki T, et al. *Nature*, 2005, **433**(24):819-819.
- [9] Onmua K, Yamagishi K, Oyane A. *J. Cryst. Growth*, 2005, **282**(1-2):199-207.
- [10] He L Z, Feng Z D. *Mater. Lett.*, 2007, **61**(18):3923-3926.
- [11] 何立志. 牙釉质表面原位修复涂层制备与表征. 厦门大学硕士学位论文,2007.
- [12] 马莉. 口腔解剖生理学,第一版. 北京:人民卫生出版社,2003.
- [13] Orams H J, Phakey P P, Rachinger W A, et al. *Nature*, 1974, **252**(5484):584-585.
- [14] Wang L J, Tang R K, Bonstein T, et al. *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**(2):999-1005.
- [15] Staffanour R S, Hembree J H, Rivers J A, et al. *J. Prosthet. Dent.*, 1985, **53**(3):309-310.
- [16] 唐立辉,陈萍,胡公诚. 医疗卫生装备, 2003, (10):54-54.
- [17] 徐钢梅,张彩霞,宁丽. 中华口腔医学杂志, 2001, **36**(3):189-192.
- [18] 樊明文,边专. 龋病学:疾病及其临床处理,第一版. 北京:人民卫生出版社,2006.