文章编号: jim21-0158

DOI: 10.15541/jim202100158

微纳米生物活性玻璃诱导牙本质再矿化研究

王 刚^{1,2}, 刘 聪^{3,4}, 唐洁吟^{3,4}, 陈晓峰^{3,4}, 邹学农^{1,2}

(1. 中山大学附属第一医院 脊柱外科, 广州 510008; 2. 广东省骨科学重点实验室, 广州 510008; 3. 华南理工大学 材料科学与工程学院, 生物医学工程系, 广州 510641; 4. 国家人体组织功能重建工程技术研究中心, 广州 510006)

摘 要: 封闭牙本质小管能有效减轻牙齿过敏症。本研究以不同粒径的微纳米生物活性玻璃球 (MNBGs) 为分散质、海藻酸钠-磷酸盐缓冲溶液为分散液, 制备出用于牙本质脱敏治疗的 MNBGs 糊剂 (MNBGP), 通过在牙本质切片表面进行体外矿化并系统地评价了糊剂与牙本质的结合性能, 以及糊剂体外诱导牙本质再矿化、封闭牙本质小管的能力。研究表明, 不同粒径 MNBGs 制备的糊剂均能与牙本质界面紧密结合, 粒径较小的 MNBGs 在脱矿牙本质切片表面分布更加均匀。MNBGP 在人工唾液 (AS) 中能较好地诱导牙本质再矿化形成磷灰石 (HA) 以堵塞封闭牙本质小管, 脱矿牙本质切片表面形成的 HA 层随矿化时间延长而增厚, 矿化 28 d 时 HA 层的厚度可达到 5~10 μm 。MNBGs 的尺寸对其诱导牙本质再矿化的效果有促进作用, 当 MNBGs 尺寸与暴露的牙本质小管直径相近或略小时, 可以更好地填充、矿化封闭牙本质小管。因此, MNBGP 具有良好的治疗牙本质过敏的应用前景。

关 键 词: 牙本质过敏; 微纳米生物活性玻璃; 磷灰石

中图分类号: TQ174

文献标志码: A

Dentin Remineralization Induced by Micro-nano Bioactive Glass Spheres

WANG Gang^{1,2}, LIU Cong^{3,4}, TANG Jieyin^{3,4}, CHEN Xiaofeng^{3,4}, ZOU Xuenong^{1,2}

Department of Spine Surgery, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Orthopaedics and Traumatology, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Biomedical Engineering, School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China; 4. National Engineering Research Center for Tissue Restoration and Reconstruction, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Occlusion of dentine tubules may reduce or eliminate dentin hypersensitivity. In this research, micro-nano bioactive glass spheres (MNBGs) with different particle sizes and sodium alginate-phosphate buffer solution were used to prepare bioactive glass pastes (MNBGP) for dentin desensitization. Through mineralization on the surface of dentin samples *in vitro*, the bonding ability of different pastes with dentin, as well as the ability to induce dentin remineralization and occlude dentin tubules *in vitro*, was investigated. The results indicated that the MNBGP could be tightly combined with the dentin interface, and the MNBGs with smaller particle sizes were more uniformly distributed on the surface of the demineralized dentin slices. MNBGP could well mineralize in artificial saliva (AS) to form apatite (HA), induce dentin remineralization, and occlude dentin tubules, which resulted in thickness of HA layer, formed on the surface of demineralized dentin slices, increased with the prolonged mineralization time, and up to 5-10 μm after 28 d dentin remineralization. The size of bioactive glass microspheres had a certain impact on its ability to induce remineralization. When the particle size was equal to or slightly smaller than the diameter of the exposed dentin tubules, it could better mineralize and occlude the dentin tubules. All data indicate that MNBGP has potential application for dentin hypersensitivity treatment.

收稿日期: 2021-03-12; 收到修改稿日期: 2021-04-08

基金项目: 国家自然科学基金 (52003302, 51402108, 32071341)

National Natural Science Foundation of China (52003302, 51402108, 32071341)

作者简介: 王 刚 (1986-), 男, 博士。E-mail: wangg66@mail.sysu.edu.cn

WANG Gang (1986-), male, PhD. E-mail: wangg66@mail.sysu.edu.cn

通信作者: 陈晓峰, 教授。E-mail: chenxf@scut.edu.cn; 邹学农, 教授。E-mail: zouxuen@mail.sysu.edu.cn

CHEN Xiaofeng, professor. E-mail: chenxf@scut.edu.cn; ZOU Xuenong, professor. E-mail: zouxuen@mail.sysu.edu.cn

Key words: dentine hypersensitivity; micro-nano bioactive glass spheres; apatite

牙本质是牙齿的主体部分, 对牙齿发挥正常功能有着重要作用。日常生活中, 龋病、楔状缺损等牙体疾病甚至错误的刷牙方式都会使牙本质暴露在口腔环境中, 导致牙本质过敏, 影响牙齿的健康和功能^[1]。治疗牙本质过敏可通过封闭牙本质小管降低牙本质的渗透性, 或降低牙髓神经的兴奋性^[2-3]。目前, 常用的脱敏材料有氟化物、氯化锶、树脂类脱敏剂等^[4], 但这些材料主要与牙本质发生机械结合而不是化学结合。当暴露于酸性条件或刷牙时, 材料容易被从牙本质表面去除, 疗效并不持续。

生物活性玻璃具有良好的生物相容性和较高的生物活性, 在体液环境中能够通过矿化作用形成羟基磷灰石层, 能与骨组织形成化学键合, 因而被广泛应用于骨组织修复领域^[5-6]。随着生物活性玻璃应用研究的逐渐深入, 其在牙齿修复方面的应用逐渐受到关注^[7]。2004 年, 研究者首次将生物玻璃 45S5 (NovaMin) 添加到牙膏中, 用于治疗牙本质过敏。用含有 NovaMin 的牙膏刷牙后, 牙膏中的生物活性玻璃能够附着在牙本质表面形成羟基磷灰石层^[8-9]。NovaMin 还替代传统牙膏中的氧化铝作为摩擦剂, 可降低牙龈出血的发生率, 抑制牙面菌斑生长^[10]。除了在牙膏中应用, NovaMin 还可以作为抛光膏用于临床牙本质过敏的治疗和牙齿漂白治疗后脱矿牙釉质的再矿化^[11]。Wang 等^[12]比较添加了 NovaMin 的牙膏与两种其他类型的抗敏牙膏堵塞牙本质小管的能力, 发现含有 NovaMin 的牙膏具有更好的脱敏效果。Vollenweider 等^[13]比较了使用火焰喷雾合成的纳米级 45S5 与传统的微米级 45S5, 结合拉曼及 EDX 等分析发现, 45S5 能较好地诱导牙本质再矿化, 且纳米级 45S5 能更快释放 Ca 和 Si 离子, 其再矿化效果也更显著。Curtis 等^[14]进一步证明, 相对于熔融生物活性玻璃在牙本质表面形成磷灰石层, 溶胶-凝胶结合微波烧结技术制备的纳米生物活性玻璃能深入牙本质小管形成紧密连接的棒状磷灰石, 更好地封闭牙本质小管。但是上述溶胶-凝胶法制备的生物活性玻璃颗粒尺寸多在几十微米尺度, 且粒径分布范围较宽, 难以进入牙本质小管 (管径分布在 1~3 μm); 同时其玻璃实际化学组成与传统 45S5 有较大差异, 无法完全排除其组分对矿化效果的影响^[15]。此外, 相关牙本质再矿化研究中, 将生物活性玻璃粉体沉积在牙本质切片样品正面, 其作为脱敏材料的操作性及与牙本质初期界面结合效果有待进一步验证。

近年来, 通过溶胶-凝胶法与有机模板法结合制备得到的微纳米生物活性玻璃 (MNBG) 由于其小尺寸、单分散及微结构特性, 逐渐受到研究者关注, 与传统的生物活性玻璃相比, MNBG 形貌及结构尺寸等可控, 具有更高的比表面积和生物活性, 能更快地释放 Ca 离子及更快的矿化速度^[16-17], 这些特性对于封闭牙本质小管, 缓解牙本质过敏症具有显著促进作用。本研究以不同尺寸的微纳米生物活性玻璃球形粉体为原料, 制备出便于操作的生物活性玻璃糊剂作为牙本质过敏症脱敏材料 (MNBGP), 进一步对 MNBGP 与牙本质结合、诱导脱矿牙本质切片再矿化以封闭牙本质小管、形成修复性牙本质的能力进行了研究。

1 实验方法

1.1 微纳米生物活性玻璃制备

MNBGs (含 80%SiO₂、16%CaO 和 4%P₂O₅) 通过溶胶-凝胶结合模板法制备^[18]。在 40 °C、磁力搅拌条件下, 将模板剂十二胺 (DDA) 首先溶解于一定量去离子水 and 无水乙醇中; 然后将正硅酸四乙酯 (TEOS)、磷酸三乙酯 (TEP) 和四水硝酸钙 (CN) 溶液依次滴加到上述溶液中。3 h 后停止搅拌, 将所得溶液过夜陈化、洗涤、冷冻干燥, 最后 650 °C 烧结 3 h 得到 MNBG 颗粒。为了制备不同粒径的 MNBGs, 实验中通过 DDA 的用量、TOES 等前驱体的加入量 (表 1) 制备出不同粒径的 MNBGs, 分别简称为 MNBGs-1、MNBGs-2 和 MNBGs-3。

1.2 牙本质切片样品的制备

在广州医科大学附属口腔医院颌面外科收集了健康人体第三磨牙 80 颗, 牙齿的使用都通过广州医科大学附属口腔医院伦理委员会的伦理审查。将收集到的人体第三磨牙去除牙周软组织, 用生理盐水清洗干净, 之后浸泡在 0.1% 的麝香草酚溶液中, 保存于 4 °C 冰箱备用。用硬组织切割机沿牙齿轴向方向切除牙釉质层, 再切割出厚约 2 mm 的暴露出牙颈部牙本质的切片, 磨成 5 mm×5 mm 大小的牙本质切片样品, 超声清洗然后储存在 0.1% 的麝香草酚溶液中备用。由于牙本质的无机组分主要为碳酸羟基磷灰石 (HCA), 为了真实反映生物活性玻璃体外诱导牙本质矿化的能力, 将切割好的牙本质切片样品表面脱矿, 并用乙二胺四乙酸 (EDTA) 酸蚀去除无机矿物^[19]。

表 1 不同粒径 MNBGs 的理论、实际化学组成和反应物用量

Table 1 Theoretical and measured chemical composition, amounts of the reactants of MNBGs				
Sample	SiO ₂ : CaO: P ₂ O ₅ (Theoretical/ mol%)	SiO ₂ : CaO: P ₂ O ₅ (Measured /mol%)	DDA /g	TEOS /mL
MNBGs-1		87.637: 12.363: 0	3	8
MNBGs-2	80: 16: 4	86.289: 13.696: 0.015	6	16
MNBGs-3		89.071: 10.875: 0.054	6	24

1.3 生物活性玻璃矿化材料在脱钙牙本质切片样品上固定

将不同粒径的 MNBGs 粉体分散到一定浓度的海藻酸钠-磷酸盐缓冲溶液中, 浓度为 200 mg/mL, 搅拌并超声得到 MNBGs 均匀分散的生物活性玻璃糊剂 (MNBGP)。依据其粒径分别将制备的糊剂称为 MNBGP-1、MNBGP-2、MNBGP-3。

用医用酒精将脱矿牙本质切片样品擦净、灭菌、晾干, 然后取一定量 MNBGP 均匀涂抹于脱矿牙本质切片样品上, 空气中自然晾干约 30 min, 再用 1 mL 去离子水冲洗 3 次, 晾干。

1.4 脱矿牙本质切片在人工唾液中再矿化

用 Jean-Yves Ga^[20]提出的人工唾液 (AS) 配方, 将涂覆 MNBGP 的脱矿牙本质切片样品浸泡在装有 10 mL AS 溶液的聚乙烯管中, 置于 37 °C 恒温恒湿培养箱中; 并将没有涂覆任何材料的牙本质切片样品 (对照组) 作同样处理, 每个实验组设 3 个平行样。分别矿化 1、7、14、28 d 后, 将牙本质切片样品取出, 用去离子水冲洗, 烘干得到矿化后的牙本质切片样品, 通过对脱矿牙本质切片样品矿化后羟基磷灰石形成活性的检测, 表征不同 MNBGP 体外诱导牙本质再矿化的能力。

1.5 测试与表征

样品的表面形貌采用高分辨场发射扫描电子显微镜 (FE-SEM, Merlin, ZEISS) 进行观察, 同时结合 EDS 测定材料的化学组成。样品的形态结构采用透射电子显微镜 (TEM, JEM-2100HR, JEOL) 进行观察。采用软件对扫描电镜图片中至少 100 个生物活性玻璃颗粒进行测量, 确定其粒径分布和颗粒平均尺寸。生物活性玻璃球的物相组成通过射线衍射分析仪 (XRD, X'Pert³ Powder X, PANalytical) 测定。样品的表面化学结构采用傅里叶变换红外光谱仪 (FT-IR, Vector33, Bruker) 进行测定。

2 结果与讨论

2.1 MNBG 形貌和结构

通过调控催化剂 DDA 和 TEOS 等前驱体的加入量, 制备出不同粒径的微纳米生物活性玻璃球, 图 1 为不同粒径的微纳米生物活性玻璃球的 SEM 和 TEM 照片和粒径分布图。从图 1 (a1~c1) 中可以看出, 所制备的三种不同粒径的 MNBGs 均为规则的球形颗粒; 微球表面有小颗粒堆积形成的小凹凸, 略微粗糙。从 TEM 照片 (图 1a2~c2) 可以看出, 不同粒径的 MNBGs 分散性较好, 微球表面粗糙起伏不明显。从粒径分布图 (图 1 (a3-c3)) 中可以看出, 三种 MNBGs 的粒径分布范围都比较窄, 说明所制备的三种不同粒径的 MNBGs 尺寸较均匀; 平均粒径分别为 300、700 和 1100 nm。

进一步对制备的三种不同粒径的 MNBGs 物相组成和化学结构作 XRD 和 FT-IR 分析。图 2 即为三种不同粒径的 MNBGs 的 XRD 图谱和 FT-IR 光谱。从图 2 (a) 中可以看出, 三种不同粒径 MNBGs 的 XRD 图谱都非常相似, 只在 20° ~25° 出现一个弥散衍射峰, 是典型的非晶态硅酸盐材料的特征峰^[21], 说明改变微球尺寸对 MNBGs 的无定形结构并没有显著影响。从图 2(b) 中可以看出, 三种不同粒径的 MNBGs 具有较相似的 FT-IR 光谱图, 图中 475、800 和 1090 cm⁻¹ 处的红外吸收峰对应典型的 Si-O-Si 特征峰^[22], 三种不同粒径 MNBGs 的峰位都没有明显位移, 说明改变微球尺寸不会对 MNBGs 的化学结构产生明显的影响。

2.2 MNBGs 与脱矿牙本质切片样品的结合

图 3、表 2 分别为牙本质切片酸蚀前和酸蚀后的 SEM 照片和能谱分析结果。从图 3(a) 可以看出, 切割后经过磨平处理的牙本质切片样品的表面有少量切割留下的凹痕, 暴露出牙本质小管, 牙本

图 1 不同粒径的微纳米生物活性玻璃球的 SEM (a1~c1)、TEM (a2~c2)照片和粒径分布图(a3~c3)

Fig. 1 SEM (a1-c1), TEM(a2-c2) images and particle size distributions(a3-c3) of MNBGs with different particle diameters

(a) MNBGs-1; (b) MNBGs-2; (c) MNBGs-3

图 2 三种微纳米生物活性玻璃球的 XRD 图谱 (a) 和红外光谱 (b)

Fig. 2 XRD patterns (a) and FT-IR spectra (b) of MNBGs

质小管的直径在 1~2 μm ^[15], 略大于牙本质-牙釉质界面处的小管口径 (0.5~0.9 μm); EDS 能谱扫描结果证明牙本质表面含有大量钙、磷元素, Ca/P 为 1.45, 如表 2 所示, 接近羟基磷灰石的 Ca/P 理论值 (1.67)^[19, 23]。从图 3 (b) 可以看出, EDTA 酸蚀后, 牙本质切片表面变光滑, 牙本质小管口径轻微增大, 这是因为形成牙本质小管壁的管周牙本质矿化程度高, EDTA 酸蚀后只剩少量胶原纤维等有机物(如图 3 (b) 插图), 管壁变薄, 牙本质小管直径增大。EDS 能谱分析表明脱矿后的牙本质切片表面钙、磷元素的含量非常少, Ca/P 仅为 0.35, 远小于羟基磷灰石的 Ca/P 理论值, 说明 EDTA 酸蚀的方

法成功去除了牙本质切片表面的无机矿物。

表 2 牙本质切片表面 EDTA 酸蚀前后各元素含量及钙磷比

Table 2 Content of chemical elements and Ca/P on the surface of dentin before and after EDTA etching

Samples	C /mol%	O /mol%	Ca /mol%	P /mol%	Ca/P
Before etching	0	65.77	20.26	13.97	1.45
After etching	66.82	32.99	0.05	0.14	0.35

图 3 牙本质切片样品酸蚀前 (a)后 (b)的 SEM 照片(插图为牙本质小管放大照片)及生物活性玻璃糊剂实物照片(c)
Fig. 3 SEM images of the dentin surface before (a) and after (b) EDTA-etching with inset in (b) showing enlarged image of dentin tubules, and photo of bioactive glass paste (c)

制备的生物活性玻璃糊剂 (MNBGP) (图 3(c)) 具有良好的操作性。图 4 为用不同 MNBGP 处理过的脱矿牙本质切片样品的 SEM 照片。从图中可以看出, 由于海藻酸钠溶液具有一定的黏性作用, 微纳米生物活性玻璃球较好地粘附在脱矿牙本质切片表面。图 4 的照片显示, 粒径较小的 MNBGs 在脱矿牙本质切片表面分布较均匀 (图 4 (a)),

MNBGs 粒径越大, 粘聚成的团聚体间的空隙越多、越大, 在脱矿牙本质切片表面的分布越不均匀 (图 4 (c))。另外, 海藻酸钠含有羧基, 能够与 Ca^{2+} 发生离子交换, 形成交联网络^[24-25], 因此, 海藻酸钠能够与含有 Ca 的生物活性玻璃或羟基磷灰石结合良好, 有利于后期矿化层与牙体更紧密结合。

图 4 脱矿牙本质切片表面涂覆不同粒径 MNBGs 后的 SEM 照片

Fig. 4 SEM images of demineralized dentin samples with the coating of MNBGs-1(a), MNBGs-2(b) and MNBGs-3(c)

进一步对不同 MNBGP 处理前、后以及用去离子水冲洗后的脱矿牙本质切片样品全反射-红外光谱分析 (图 5)。从图中可以看出, 脱矿牙本质切片样品的 ATR-FTIR 光谱没有出现任何明显的吸收峰, 说明牙本质切片脱矿后, 表面的无机矿物被彻底除去; 与此相比, 涂覆不同粒径 MNBGs 的脱矿牙本质切片表面的 ATR-FTIR 光谱均出现了明显的特征吸收峰, 波数为 1090 cm^{-1} 处的红外吸收峰是典型的 Si-O-Si 非对称伸缩振动产生的, 波数为 800 cm^{-1} 处的吸收峰为 Si-O-Si 对称伸缩振动峰^[26]; 用去离子水冲洗后的脱矿牙本质切片表面的 ATR-

FT-IR 光谱仍然保留这些特征吸收峰并且没有发生明显的位移, 说明生物活性玻璃糊剂与脱矿牙本质切片具有良好的结合能力, MNBGs 成功粘附在脱矿牙本质切片上。图 5(b,c)中, 用去离子冲洗后的脱矿牙本质切片表面的特征说明生物活性玻璃糊剂与脱矿牙本质切片具有良好的结合能力, MNBGs 成功粘附在脱矿牙本质切片上。图 5(b,c)中, 用去离子冲洗后的脱矿牙本质切片表面的特征峰强度比去离子冲洗前小很多, 可能是因为去离子水冲洗脱矿牙本质切片会冲刷掉一部分 MNBGs, 使得特征峰强度变小。

图 5 脱矿牙本质切片表面涂覆不同粒径 MNBGs 前后以及用去离子水冲洗后的全反射-红外光谱

Fig. 5 ATR-FTIR spectra of demineralized dentin after coating with MNBGs and after washing with deionized water for MNBGs-1 (a), MNBGs-2 (b) and MNBGs-3 (c) treated groups

2.3 MNBGs 体外诱导牙本质再矿化

图 6 为未经材料处理和涂覆了不同 MNBG 的脱矿牙本质切片在人工唾液中矿化不同时间后表面的 SEM 照片。从图 6(a1~a4) 中可以看出, 没有材料处理的脱矿牙本质切片(对照组)在人工唾液中矿化后, 由于牙本质表面的无机矿物晶体已经被破坏除去, 无法吸附大量 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 形成 HA^[27], 其表面形貌没有明显变化, 牙本质小管全部呈开放状态, 说明脱矿后的牙本质切片在钙、磷含量较高的人工唾液中无法形成足够的羟基磷灰石堵塞封闭牙本质小管。从图 6(b1~d1) 中可以看出, MNBG 涂覆到脱矿牙本质切片表面后, 部分 MNBGs 颗粒直接填充到裸露的牙本质小管口内, 机械堵塞住牙本质小管, 隔绝外界刺激; 随着矿化时间的延长, MNBGs 与周围人工唾液进行离子交换, 溶液中 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 局部饱和, 在 MNBGs 表面和脱矿牙本质切片表面沉积形成 HA(图 6(b2~d2) 和图 6(b3~d3), 矿化到第 28 d 时, 脱矿牙本质切片表面完全覆盖了一层 HA 层(6(b4~d4))。这说明矿化初期, MNBGs 颗粒主要以物理填充方式将牙

本质小管与外界环境隔离, 从而保护牙本质及更深处的牙髓; 矿化一定时间后, MNBGs 通过化学作用(形成 HA 层)将牙本质与人工唾液彻底分隔开, 保护牙本质小管不受外界刺激。比较图 6 b、c 和 d 三个实验组照片, 发现不同粒径 MNBGs 封闭牙本质小管、诱导牙本质再矿化形成修复性牙本质层的能力: $\text{MNBGs-2} > \text{MNBGs-1} > \text{MNBGs-3}$, 这说明生物活性玻璃体外诱导牙本质再矿化的能力一方面受到玻璃粒径的影响, 只有玻璃颗粒大小与暴露的牙本质小管口径相匹配才能更好地进入而矿化封闭牙本质小管; 另一方面受生物活性玻璃自身矿化活性的影响, 矿化活性越高封闭牙本质小管的效果越好。

脱矿牙本质切片样品平行牙本质小管方向的断面 SEM 照片(图 7)显示, 对照组的脱矿牙本质切片的断面的小管内没有出现沉积物, 和人工唾液接触的断面边缘也没有形成矿化物, 说明脱矿牙本质切片在人工唾液中无法矿化实现牙本质小管的封闭。

图 6 未经材料处理 (a) 和涂覆 MNBGs-1 (b), MNBGs-2 (c), MNBGs-3 (d) 的脱矿牙本质切片在模拟唾液中浸泡 1 (a1, b1, c1, d1), 7 (a2, b2, c2, d2), 14 (a3, b3, c3, d3) 和 28 d (a4, b4, c4, d4) 后的表面 SEM 照片

Fig. 6 SEM images of the surface of demineralized dentin samples without treatment (a) and being treated with MNBGs-1 (b), MNBGs-2 (c), MNBGs-3 (d) after soaking in AS for 1 (a1, b1, c1, d1), 7 (a2, b2, c2, d2), 14 (a3, b3, c3, d3) and 28 d (a4, b4, c4, d4)

与对照组相比, 用 MNBGP 处理过的脱矿牙本质切片断面边缘的牙本质小管内有 MNBGs 颗粒, 通过小管内、外的 MNBGs 的矿化作用, 不仅对牙本质小管的堵塞更密实, 还在牙本质小管开口处覆盖一层 HA, 进一步封闭牙本质小管, 隔绝外部环境的刺激; 随着矿化时间的延长, 脱矿牙本质切片表面形成的 HA 层不断增厚, 从图 7(a4, b4, c4) 中可以看出, 矿化 28 d 时 HA 层的厚度达到 $5\sim 10\ \mu\text{m}$ ^[28]。

将矿化 28 d 后的脱矿牙本质切片样品表面做能谱扫描分析, 结果如图 8 所示。在人工唾液中矿化 28 d 后, 脱矿牙本质切片样品表面的钙、磷元素都增多, 涂覆 MNBGP 的脱矿牙本质切片样品表面的 Ca、P 含量明显高于对照组, 其中以粒径较小的 MNBGs-1 和 MNBGs-2 变化最为显著, 具体 Ca/P

表 3 脱矿牙本质切片表面钙、磷元素含量及钙磷比

Table 3 Molar percent of Ca and P and Ca/P on the surface of remineralized dentin

Sample	Ca /%	P /%	Ca/P
Control	2.49	1.82	1.37
MNBGs-1	16.64	11.69	1.42
MNBGs-2	18.37	12.97	1.42
MNBGs-3	6.16	6.12	1.01

参数如表 3 所示。根据 Ca、P 含量计算得到的也明显增大, 同样, MNBGs-1 和 MNBGs-2 的 Ca/P

最接近天然牙本质的 Ca/P, 说明涂覆 MNBGP 能够较好地诱导、促进牙本质的再矿化, 粒径较小的 MNBGs 矿化形成的磷灰石的晶体结构与天然牙本质的结构较相似。另外, 对照组的钙磷含量虽然较少, 但是其 Ca/P 比天然牙本质的 Ca/P 更接近, 说明在人工唾液中, 牙本质自身也可以较缓慢地发生再矿化, 形成少量 HA, 但是由于量过少无法完全堵塞牙本质小管、难以有效治疗牙本质过敏症。

在人工唾液矿化 28 d 后, 对脱矿牙本质切片表面新形成的矿物质进行 XRD 测试分析, 结果如图 9 所示。从图中可以看出, 与天然牙本质相比, 脱矿牙本质表面的 HA 特征衍射峰强度和数量都有所减少, 仅出现(002)、(211)、(112)和(202)几个微弱的晶面衍射峰。在人工唾液中矿化 28 d 后, 所有脱矿牙本质切片样品表面都出现多个 HA 特征衍射峰: 其中, 没有涂覆材料的脱矿牙本质切片矿化后表面的 HA 特征衍射峰较少, 只有(002)、(211)和(112)晶面的特征衍射峰, 且衍射峰的强度增幅较小; 涂覆不同粒径 MNBGs 矿化材料的脱矿牙本质切片表面则出现多个 HA 特征衍射峰: (002)、(211)、(112)、(300)、(202)、(310)、(222)、(213)和(004)晶面^[29], 衍射峰的强度增强, 而且各衍射峰的位置和强度比例与天然牙本质的 XRD 图谱接近, 说明涂覆 MNBGP 的牙本质切片表面矿化形成的 HA 层与天然牙本质相似。另外, 生物玻璃粒径较小的

图 7 未经材料处理(a)和涂覆 MNBGs-1(b), MNBGs-2(c), MNBGs-3(d)的脱矿牙本质切片在人工唾液中浸泡 1 (a1, b1, c1, d1), 7 (a2, b2, c2, d2), 14 (a3, b3, c3, d3)和 28 d(a4, b4, c4, d4)后的断面的 SEM 照片

Fig. 7 SEM images of the fracture edge of demineralized dentin samples without treatment (a) and being treated with MNBGs-1 (b), MNBGs-2 (c), MNBGs-3 (d) after soaking in AS for 1 (a1, b1, c1, d1), 7 (a2, b2, c2, d2), 14 (a3, b3, c3, d3) and 28 d (a4, b4, c4, d4)

MNBGs-1 和 MNBGs-2 两个实验组的衍射峰强度增幅较大,说明 MNBGs-1 和 MNBGs-2 诱导形成的 HA 较多,与 SEM 和 EDS 分析结果一致。与矿化前的牙本质相比,矿化后(对照组和实验组)

CaCO_3 的 (104)^[30]晶面特征衍射峰强度均增大,这是因为矿化过程中,人工唾液中局部 Ca^{2+} 浓度较高,形成少量 CaCO_3 晶体。

图 8 未经材料处理 (a)和涂覆 MNBGs-1 (b), MNBGs-2 (c), MNBGs-3 (d)的脱矿牙本质切片在人工唾液中浸泡 28 d 后表面的 EDS 能谱分析

Fig. 8 EDS spectra of the surface of demineralized dentin samples without treatment (a) and being treated with MNBGs-1(b), MNBGs-2(c), MNBGs-3(d) after soaking in AS for 28 d

图 9 天然牙本质、脱矿牙本质和在人工唾液中浸泡 28 d 后的脱矿牙本质切片样品表面的 XRD 图谱

Fig. 9 XRD patterns of the surface of intact dentin, demineralized dentin and the samples without treatment (control) and being treated with MNBGs-1, MNBGs-2 and MNBGs-3 after being soaked in AS for 28 d

3 结论

以不同粒径的微纳米生物活性玻璃微球为分散质、海藻酸钠-磷酸盐缓冲溶液为分散剂, 成功制备出便于操作的新型生物活性玻璃糊剂用于牙本质脱敏。不同粒径微纳米生物活性玻璃微球制备的糊剂均能与牙本质界面紧密结合, 粒径较小的微纳米生物活性玻璃微球在脱矿牙本质切片表面分布较均匀。微纳米生物活性玻璃微球制备的糊剂在人工唾液中能较好地诱导牙本质再矿化形成磷灰石以堵塞

封闭牙本质小管, 脱矿牙本质切片表面形成的磷灰石层随矿化时间延长而增厚, 矿化 28 d 时磷灰石层的厚度可达到 5~10 μm 。糊剂中生物活性玻璃微球的尺寸与暴露的牙本质小管直径相当或略小时可以更好地填充、矿化封闭牙本质小管。本研究证实微纳米生物活性玻璃微球材料将在牙本质脱敏方面具有较好潜在应用前景。

参考文献

- [1] HOLLAND G R, NARHI M N, ADDY M, *et al.* Guidelines for the design and conduct of clinical trials on dentine hypersensitivity. *Journal of Clinical Periodontology*, 1997, **24**(11): 808-813.
- [2] Addy M, West N X. The role of toothpaste in the aetiology and treatment of dentine hypersensitivity. *Monogr. Oral. Sci.*, 2013, **23**: 75-87.
- [3] Arnold W H, Prange M, Naumova E A. Effectiveness of various toothpastes on dentine tubule occlusion. *Journal of Dentistry*, 2015, **43**(4): 440-449.
- [4] Berkathullah M, Farook M S, Mahmoud O. The effectiveness of remineralizing agents on dentinal permeability. *BioMed Research International*, 2018, **2018**: 4072815.
- [5] Bains F, Hamzehlou S, Kargozar S. Bioactive glasses: where are we and where are we going? *Journal of Functional Biomaterials*, 2018, **9**(1): 25.
- [6] Jones J R. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, 2013, **9**(1): 4457-4486.
- [7] Skallefold H E, Rokaya D, Khurshid Z, *et al.* Bioactive glass applications in dentistry. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(23): 5960.
- [8] Litkowski L, Greenspan D C. A clinical study of the effect of calcium sodium phosphosilicate on dentin hypersensitivity--proof of principle. *J. Clin. Dent.*, 2010, **21**(3): 77-81.
- [9] Gendreau L, Barlow A P, Mason S C. Overview of the clinical evidence for the use of NovaMin in providing relief from the pain of dentin hypersensitivity. *J. Clin. Dent.*, 2011, **22**(3): 90-95.
- [10] Hoffman D A, Clark A E, Rody W J, *et al.* A prospective randomized clinical trial into the capacity of a toothpaste containing NovaMin to prevent white spot lesions and gingivitis during orthodontic treatment.

- Progress in Orthodontics*, 2015, **16(1)**: 25.
- [11] Farooq I, Majeed A, Alshwaimi E, *et al.* Efficacy of a novel fluoride containing bioactive glass based dentifrice in remineralizing artificially induced demineralization in human enamel. *Fluoride*, 2019, **52(3)**: 447-455.
- [12] Wang Z, Sa Y, Sauro S, *et al.* Effect of desensitising toothpastes on dentinal tubule occlusion: a dentine permeability measurement and SEM *in vitro* study. *Journal of Dentistry*, 2010, **38(5)**: 400-410.
- [13] Vollenweider M, Brunner T J, Knecht S, *et al.* Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. *Acta Biomater.*, 2007, **3(6)**: 936-943.
- [14] 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 Biomater.*, 2010, **6(9)**: 3740-3746.
- [15] Sheng X Y, Gong W Y, Hu Q, *et al.* Mineral formation on dentin induced by nano-bioactive glass. *Chinese Chemical Letters*, 2016, **27(9)**: 1509-1514.
- [16] Fernandes H R, Gaddam A, Rebelo A, *et al.* Bioactive glasses and glass-ceramics for healthcare applications in bone regeneration and tissue engineering. *Materials*, 2018, **11(12)**: 2530.
- [17] Zheng K, Boccaccini A R. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, **249**: 363-373.
- [18] Hu Q, Chen X, Zhao N, *et al.* Fabrication and characterization of dodecylamine derived monodispersed mesoporous bioactive glass sub-micron spheres. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2014, **69(1)**: 9-16.
- [19] Liang K, Gao Y, Li J, *et al.* Effective dentinal tubule occlusion induced by polyhydroxy-terminated PAMAM dendrimer *in vitro*. *RSC Advances*, 2014, **4(82)**: 43496-43503.
- [20] Gal J Y, Fovet Y, Adib-Yadzi M. About a synthetic saliva for *in vitro* studies. *Talanta*, 2001, **53(6)**: 1103-1115.
- [21] Schumacher M, Habibovic P, van Rijt S. Mesoporous bioactive glass composition effects on degradation and bioactivity. *Bioactive Materials*, 2021, **6(7)**: 1921-1931.
- [22] Zhang X, Zeng D, Li N, *et al.* Large-pore mesoporous Ca-Si-based bioceramics with high *in vitro* bioactivity and protein adsorption capability for bone tissue regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 2016, **4(22)**: 3916-3924.
- [23] Xu Z, Neoh K G, Kishen A. A biomimetic strategy to form calcium phosphate crystals on type I collagen substrate. *Materials Science and Engineering: C*, 2010, **30(6)**: 822-826.
- [24] Zhao F, Zhang W, Fu X, *et al.* Fabrication and characterization of bioactive glass/alginate composite scaffolds by a self-crosslinking processing for bone regeneration. *RSC Advances*, 2016, **6(94)**: 91201-91208.
- [25] Xu C, Wang X, Zhou J, *et al.* Bioactive tricalcium silicate/alginate composite bone cements with enhanced physicochemical properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2018, **106(1)**: 237-244.
- [26] Marelli B, Ghezzi C E, Barralet J E, *et al.* Three-dimensional mineralization of dense nanofibrillar collagen-bioglass hybrid scaffolds. *Biomacromolecules*, 2010, **11(6)**: 1470-1479.
- [27] Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J. Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials*, 2009, **30(4)**: 478-483.
- [28] Dai L L, Mei M L, Chu C H, *et al.* Remineralizing effect of a new strontium-doped bioactive glass and fluoride on demineralized enamel and dentine. *Journal of Dentistry*, 2021, **108**: 103633.
- [29] Wu Y, Tang L, Zhang Q, *et al.* A novel synthesis of monodispersed bioactive glass nanoparticles *via* ultrasonic-assisted surfactant-free microemulsion approach. *Materials Letters*, 2021, **285**: 129053.
- [30] Nirmala Devi M, Sanjiv Raj K, Subramanian V K. Synergistic effects of magnesium and EDTA on polymorphism and morphology of CaCO₃ and its influence on scale. *Journal of Crystal Growth*, 2021, **564**: 126108.