

[文章编号] 1000-1182(2009)01-0016-04

# 硬化牙本质粘接界面纳米渗漏的 激光扫描共聚焦显微镜观察

于 旻 王 如

(大连医科大学附属第一医院 口腔科, 辽宁 大连 116011)

**[摘要]** 目的 使用激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)观察牙颈部硬化牙本质在全酸蚀和自酸蚀粘接系统形成粘接界面的纳米微渗漏情况。方法 选取12颗因牙周病拔除的具有典型楔状缺损的上颌前磨牙为实验组,随机分为3组;选取12颗新鲜拔除的无龋人上颌前磨牙为对照组,人工形成楔状缺损,随机分为3组。选用3种牙本质粘接系统,即Single Bond(SB)、Clearfil SE Bond(CB)、Xeno (XB),按照厂家说明分别应用于牙本质楔状缺损表面。自凝树脂封闭根尖,6组试样分别浸泡于0.1%罗丹明B异硫氰酸盐的50%乙醇溶液中24 h,慢速砂片切割后CLSM下进行观察。结果 粘接剂种类、牙本质类型对粘接界面的纳米渗漏长度有显著影响( $P<0.05$ )。无论正常牙本质还是硬化牙本质,SB产生的纳米渗漏长度均大于CB和XB,且差异有统计学意义( $P<0.05$ )。CB、XB之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。正常牙本质上SB产生的纳米渗漏长度与硬化牙本质上SB产生的纳米渗漏长度间差异无统计学意义( $P=0.148$ );而CB、XB作用于正常牙本质上产生的纳米渗漏长度均大于硬化牙本质,且差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 3种类型粘接系统均有纳米渗漏发生,硬化牙本质的粘接界面下纳米渗漏多发生在树脂与正常牙本质、硬化牙本质三者结合处的树脂与正常牙本质结合界面。

**[关键词]** 粘接; 硬化牙本质; 激光扫描共聚焦显微镜

**[中图分类号]** R783.1 **[文献标识码]** A

## Observing interfacial nanoleakage in sclerotic dentin bonding under confocal laser scanning microscope YU

Yang, WANG Ru. (Dept. of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe sclerotic dentin bonding interfacial nanoleakage used total-etching system and self-etching system by confocal laser scanning microscope(CLSM). **Methods** 12 maxillary bicuspids with non-caries, natural cervical sclerotic lesions were divided into three groups. Artificially prepared wedge-shaped lesions were made in 12 sound maxillary bicuspids and divided into three groups as controls. Three kinds of dentin bonding agents, Single Bond(SB), Clearfil SE Bond(CB) and Xeno (XB), were applied on the surface of the wedge-shaped lesion dentins according to the manufacturer's instruction. The apical foramens were occluded with self-curing resin. Six specimen groups were individually exposed to 0.1% rhodamine B isothiocyanate in 50% alcohol solutions for 24 h. Then the teeth were section using slow saw and observed the specimens under CLSM. **Results** Two-way ANOVA revealed significant influence of both type of the dentin substrate and the adhesive systems tested on the lengths of the dye-penetrated pathways, representing the amount of nanoleakage( $P<0.05$ ). The lengths of the dye-penetrated pathways were longer in SB than in CB and XB, whatever in normal dentin or sclerotic dentin( $P<0.05$ ). While the extension of nanoleakage were similar in CB and XB( $P>0.05$ ). There was no statistical significance in the amount of nanoleakage in normal dentin and sclerotic dentin using SB( $P=0.148$ ). In CB and XB, the amounts of nanoleakage in normal dentin were higher than in sclerotic dentin( $P<0.05$ ). **Conclusion** The nanoleakage phenomena of bonding interface were observed in three bonding adhesives. In sclerotic dentin bonding interfaces, these nanoleakage phenomenon were located among resin and normal dentin as well as sclerotic dentin.

**[Key words]** bonding; sclerotic dentin; confocal laser scanning microscope

[收稿日期] 2008-03-25; [修回日期] 2008-07-13

[作者简介] 于旻(1975-),女,辽宁人,主治医师,硕士

[通讯作者] 王如, Tel: 0411-83635963-3286

牙颈部非龋性缺损又称楔状缺损,由于缺损部位的牙本质小管大部分堵塞,牙本质小管中沉积了钙化盐晶体,其折光率与管间牙本质近似,表面

呈半透明状,因此又被称作硬化牙本质<sup>[1-2]</sup>。由于硬化牙本质结构的自身特点,其粘接性能受到学者们的关注。Sano等<sup>[3]</sup>研究发现在牙本质粘接界面的混合层与正常牙本质之间会出现微小的孔隙,直径通常小于50 nm,称为纳米渗漏,它能引起暴露的胶原纤维水解,破坏粘接效果。本实验选用3种粘接系统,即Single Bond(SB,全酸蚀单瓶系统)、Clearfil SE Bond(CB,自酸蚀底胶系统)、Xeno (XB,自酸蚀一步粘接系统),使用激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)对牙颈部非龋性硬化牙本质粘接界面的纳米渗漏进行观察,并进行比较分析,以期为临床提供一定的帮助。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料和设备

SB、Valux™ Plus(3M ESPE公司,美国),CB(Kuraray公司,日本),XB、光固化机(Dentsply公司,德国),罗丹明B异硫氰酸盐(Sigma公司,美国),CLSM(Leica公司,德国)。

### 1.2 离体牙的收集和试件的制备

收集新鲜拔除的无龋人上颌前磨牙12颗和因牙周病拔除的具有典型楔状缺损的上颌前磨牙(根据北卡罗来纳牙本质硬化分级<sup>[4]</sup>,硬化牙本质视觉分级均为3级以上)12颗,离体牙存在4℃下0.5%氯胺溶液中,1个月内使用。将12颗具有典型楔状缺损的上颌前磨牙作为实验组,随机分为3组。另外12颗无龋上颌前磨牙作为对照组,随机分为3组,用高速金刚砂车针在健康前磨牙颊侧颈缘制备长3 mm、宽3 mm、深2 mm的人造楔状缺损<sup>[5]</sup>。每组(包括实验组和对照组)分别按照产品说明书的要求和步骤使用一种粘接系统(SB、CB、XB)。粘接后的样本牙用自凝树脂封闭根尖部。6组样本分别浸泡于20℃、0.1%罗丹明B异硫氰酸盐的50%乙醇溶液中24 h,蒸馏水充分冲洗10 s,每颗牙平行于牙齿长轴颊舌向片切4~5个样本片,20℃蒸馏水中贮存24 h。

### 1.3 激光扫描共聚焦显微镜观察

观察前将样本固定在载玻片上,在100%的相对湿度下用CLSM观察。用于图像采集的显微物镜为Plan 2 Neofluar 20×物镜(数值孔径NA为0.7)或40×(NA为0.75)、100×(Plan 2 Apochroma, NA为1.4)油浸镜;目镜为10×。激发波长为543 nm,发射波长为590 nm。测量所用的软件为Quantify/Prof软件。观察纳米渗漏时需排除在CLSM低倍(10×物镜)反射模式下观察到微渗漏的粘接试件。测量并记录在CLSM荧光模式下各类粘接剂在不同的牙本质粘接界面下所产生的纳米渗漏的长度数值。各类牙本质粘接界

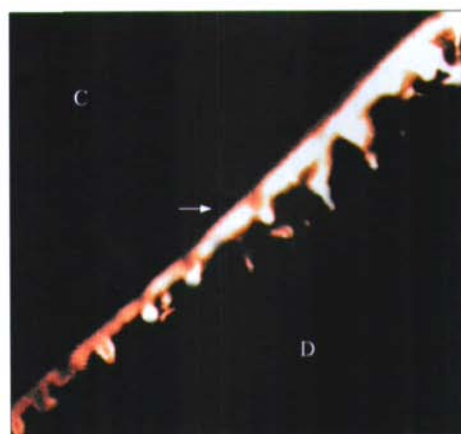
面下荧光剂的渗漏代表纳米渗漏,其荧光剂渗漏的长度代表牙本质粘接界面纳米渗漏的大小。

### 1.4 统计学分析

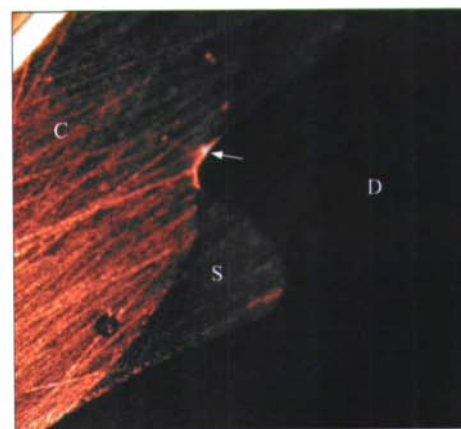
采用SPSS 11.5统计软件进行分析,用双因素方差分析(two-way ANOVA)评价牙本质类型和粘接剂种类对粘接界面纳米渗漏程度的影响,粘接剂类型的多重比较采用SNK法,t检验分析同种粘接剂不同牙本质类型的差异,统计学分析检验水平为0.05。

## 2 结果

3类粘接剂在不同的牙本质界面下均观察到纳米渗漏。高倍CLSM荧光模式下荧光剂呈不均匀的亮黄色条形带集中在混合层底部,并有部分荧光剂渗入牙本质小管(图1)。硬化牙本质的粘接界面下可观察到纳米渗漏多发生在树脂与正常牙本质、硬化牙本质三者结合处的树脂与正常牙本质结合界面(图2)。



C: 复合树脂; D: 牙本质; 箭头所指: 纳米渗漏  
图1 CLSM荧光模式下观察到的纳米渗漏 CLSM × 1000  
Fig 1 CLSM fluorescent mode image of nanoleakage CLSM × 1000



C: 复合树脂; S: 硬化牙本质; D: 牙本质; 箭头所指: 纳米渗漏  
图2 CLSM荧光模式下观察到的硬化牙本质的纳米渗漏 CLSM × 200  
Fig 2 CLSM fluorescent mode image of sclerotic dentin bonding interfacial nanoleakage CLSM × 200

2种牙本质应用3种粘接剂所产生的纳米渗漏长度见表1。方差分析表明,粘接剂的种类、牙本质类型对粘接界面的纳米渗漏长度有显著影响( $P < 0.05$ )。SNK法多重比较显示,无论正常牙本质还是硬化牙本质,SB产生的纳米渗漏长度均大于CB和XB,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。CB、XB之间差异无统计学意义(正常牙本质 $P = 0.190$ ,硬化牙本质 $P = 0.657$ )。 $t$ 检验表明,正常牙本质上SB产生的纳米渗漏长度与硬化牙本质上SB产生的纳米渗漏长度间差异无统计学意义( $P = 0.148$ );而CB、XB作用于正常牙本质上产生的纳米渗漏长度均大于硬化牙本质,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 2种牙本质应用3类粘接剂后产生的纳米渗漏长度( $\mu\text{m}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Nanoleakage lengths at the interface of two type dentin substrates bonded by three kinds of bonding agents( $\mu\text{m}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

牙本质类型	粘接剂种类			P值
	SB	CB	XB	
正常牙本质	141.02±22.22 <sup>1</sup>	103.89±19.89 <sup>2</sup>	116.26±17.36 <sup>2</sup>	<0.05
硬化牙本质	120.40±25.09 <sup>1</sup>	75.86±14.96 <sup>2</sup>	81.05±18.60 <sup>2</sup>	<0.05
P值	0.148	0.003	0.004	

注:SNK法多重比较结果用上标数字表示,每行中上标数字相同者差异无显著性

### 3 讨论

#### 3.1 牙本质粘接中微渗漏与纳米渗漏的区别

微渗漏是指在牙体组织和修复体边缘之间出现的微小的,往往肉眼无法察觉,口腔中的唾液、血液、大分子、细菌及其代谢产物等可以自由进出的微小通道。微渗漏可以引起修复体边缘着色、继发龋、牙髓刺激症状等,最终导致树脂充填失败<sup>[6]</sup>。引起边缘微渗漏的原因主要是树脂材料在修复固化后体积收缩<sup>[6]</sup>;其次是粘接修复材料与牙体组织的热膨胀系数不同,当口腔温度冷热变化明显时,可导致界面内应力产生<sup>[7]</sup>。

纳米渗漏是Sano等<sup>[3]</sup>研究发现牙本质被酸处理脱矿后暴露的胶原纤维网,如果不能被粘接树脂渗透充满形成混合层,在混合层与正常牙本质之间会出现微小的孔隙,直径通常小于50 nm,这些孔隙虽然不能被细菌通过,但是水分和细菌的代谢产物如酸、酶等可以进入,引起暴露的胶原纤维水解,破坏粘接效果,被称作纳米渗漏。纳米渗漏产生的原因,一方面是粘接树脂没有完全渗透进入脱矿牙本质,在混合层和正常牙本质之间就会出现非常微小的孔隙;另一方面有些学者提出自酸蚀粘接系统酸

蚀脱矿与渗透同时进行,却能观测到纳米渗漏,他们认为这是由于粘接剂自身的成分特点造成的,自酸蚀粘接剂中含有一定量的水,水的存在能够离子化酸性的单体,产生 $H^+$ ,使牙本质脱矿,但残留的水分很难去除彻底,这些水分存在树脂聚合的矩阵里,从而导致树脂不完全聚合和/或水凝胶的形成<sup>[8-9]</sup>。

#### 3.2 影响牙本质粘接界面纳米渗漏程度的因素

牙本质粘接界面纳米渗漏的程度取决于两个方面,分别为粘接系统和牙本质粘接基质。粘接系统方面:1)牙本质粘接系统中的溶剂影响树脂的渗透。牙本质粘接剂中溶剂的不同,影响粘接树脂的渗透性。本实验中所选的粘接系统都含有乙醇和水。有机溶剂的追水性能打开更多空间从而使更多的单体能沉淀到胶原纤维网内的纳米空隙<sup>[10]</sup>。另外,牙本质表面残留的水可能导致粘接树脂不完全聚合。残留的水分尤其是对乙醇基粘接剂系统影响较大,因为乙醇具有和水结合形成氢键的能力,从而影响树脂的聚合,增加纳米渗漏的产生<sup>[11]</sup>。2)粘接系统具有不同的pH值,脱矿能力不同。本实验中CB的pH为2.0,XB的pH为1.4,SB为37%的正磷酸,酸性最强,脱矿能力最强。因此,SB对牙本质的脱矿深度最深,CB最浅。对于亲水性单体脱矿深度越深则完全渗透就越困难<sup>[12-13]</sup>,产生树脂不完全渗透可能性就越大。3)粘接剂树脂渗透的方式不同。全酸蚀粘接系统包括独立的酸蚀、冲洗、渗透过程,而自酸蚀粘接系统不需要冲洗,酸蚀渗透同时发生,所以自酸蚀粘接系统相比全酸蚀粘接系统树脂完全渗透进入脱矿牙本质的可能性更大<sup>[5,14]</sup>。

在牙本质粘接基质方面,由于硬化牙本质独特的矿化的细菌基质、表面高矿化层结构<sup>[15]</sup>,使得自酸蚀温和的弱酸或酸脂发挥酸性功能,不能穿透高矿化层<sup>[16]</sup>。有研究表明尤其是高矿化层的厚度大于0.5  $\mu\text{m}$ ,自酸蚀剂作用更微弱。要结合使用磷酸酸蚀才能穿透高矿化层。所以硬化牙本质应用自酸蚀粘接系统粘接失败多发生在矿化的细菌基质和/或表面高矿化层<sup>[14]</sup>。这就可以解释自酸蚀粘接剂作用于硬化牙本质上产生的纳米渗漏长度均小于正常牙本质,而全酸蚀粘接剂作用在正常牙本质上产生的纳米渗漏长度与硬化牙本质产生的差异不大;硬化牙本质的粘接界面下可观察到纳米渗漏多发生在树脂与正常牙本质、硬化牙本质三者结合处的树脂与正常牙本质结合界面。

目前已有资料显示纳米渗漏的存在影响粘接修复效果的持久性<sup>[17]</sup>。这是由于水通过纳米渗漏通道渗入,使得混合层逐渐水解降解,导致粘接界面破坏,粘接力下降,最终使粘接失败<sup>[18]</sup>。

## 【参考文献】

[1] Levitch LC, Bader JD, Shugars DA, et al. Non-carious cervical lesions[J]. J Dent, 1994, 22(4) :195-207.

[2] Weber DF. Human dentine sclerosis : A microradiographic survey [J]. Arch Oral Biol, 1974, 19(2) :163-169.

[3] Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, et al. Nanoleakage : Leakage within the hybrid layer[J]. Oper Dent, 1995, 20(1) :18-25.

[4] Kusunoki M, Itoh K, Hisamitsu H, et al. The efficacy of dentine adhesive to sclerotic dentine[J]. J Dent, 2002, 30(2/3) 91-97.

[5] Dörfer CE, Staehle HJ, Wurst MW, et al. The nanoleakage phenomenon : Influence of different dentin bonding agents, thermocycling and etching time[J]. Eur J Oral Sci, 2000, 108(4) : 346-351.

[6] Versluis A, Tantbirojn D, Douglas WH. Do dental composites always shrink toward the light[J]. J Dent Res, 1998, 77(6) :1435-1445.

[7] Yap AU, Wong ML, Lim AC. The effect of polishing systems on microleakage of tooth-coloured restoratives. Part 2 : Composite and polyacid-modified composite resins[J]. J Oral Rehabil, 2000, 27(3) 205-210.

[8] Tay FR, King NM, Chan KM, et al. How can nanoleakage occur in self-etching adhesive systems that demineralize and infiltrate simultaneously[J]. J Adhes Dent, 2002, 4(4) 255-269.

[9] Hiraishi N, Nishiyama N, Ikemura K, et al. Water concentration in self-etching primers affects their aggressiveness and bonding efficacy to dentin[J]. J Dent Res, 2005, 84(7) 653-658.

[10] Nakajima M, Okuda M, Pereira PN, et al. Dimensional changes

and ultimate tensile strengths of wet decalcified dentin applied with one-bottle adhesives[J]. Dent Mater, 2002, 18(8) 603-608.

[11] De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin[J]. J Dent Res, 2003, 82(2) :136-140.

[12] Marshall GW Jr, Inai N, Wu-Magidi IC, et al. Dentin demineralization : Effects of dentin depth, pH and different acids[J]. Dent Mater, 1997, 13(6) 338-343.

[13] Paul SJ, Welter DA, Ghazi M, et al. Nanoleakage at the dentin adhesive interface vs microtensile bond strength[J]. Oper Dent, 1999, 24(3) :181-188.

[14] Kwong SM, Cheung GS, Kei LH, et al. Micro-tensile bond strengths to sclerotic dentin using a self-etching and a total-etching technique[J]. Dent Mater, 2002, 18(5) 359-369.

[15] Tay FR, Pashley DH. Resin bonding to cervical sclerotic dentin : A review[J]. J Dent, 2004, 32(3) :173-196.

[16] Tay FR, Kwong SM, Ithagarun A, et al. Bonding of a self-etching primer to non-carious cervical sclerotic dentin : Interfacial ultrastructure and microtensile bond strength evaluation[J]. J Adhes Dent, 2000, 2(1) 9-28.

[17] Pioch T, Staehle HJ, Duschner H, et al. Nanoleakage at the composite-dentin interface : A review[J]. Am J Dent, 2001, 14(4) 252-258.

[18] Okuda M, Pereira PN, Nakajima M, et al. Long-term durability of resin dentin interface : Nanoleakage vs. microtensile bond strength[J]. Oper Dent, 2002, 27(3) 289-296.

(本文编辑 王晴)

(上接第15页)

WU You-nong, YUE Bao-li, SHI Jun-nan. Morphology of the root canals of 1 769 permanent tooth[J]. J Pract Stomatol, 1995, 11(2) 98-101.

[5] 顾永春, 皮昕. 3 803个恒牙根管的解剖形态研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2003, 19(5) 276-278.

GU Yong-chun, PI Xin. Morphology of the root canals of 3 803 permanent tooth[J]. J Clin Stomatol, 2003, 19(5) 276-278.

[6] Venturi M, Prati C, Capelli G, et al. A preliminary analysis of the morphology of lateral canals after root canal filling using a tooth-clearing technique[J]. Int Endod J, 2003, 36(1) 54-63.

[7] 王青, 熊世江. 热牙胶注射根管充填封闭性的研究[J]. 中华口腔医学杂志, 1996, 31(3) :192.

WANG Qing, XIONG Shi-jiang. Experimental study on apical sealing ability by obturation techniques[J]. Chin J Stomatol, 1996, 31(3) :192.

[8] 张富华, 黄定明, 谭红, 等. 镍钛器械预备根管对根管充填根尖孔封闭性的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2006, 16(11) : 630-633.

ZHANG Fu-hua, HUANG Ding-ming, TAN Hong, et al. Effect of different root canal preparation instruments on the apical sealing ability in simulated resin root canals[J]. Chin J Conserv Dent, 2006, 16(11) 630-633.

[9] Ravanshad S, Ghoreeshi N. An *in vitro* study of coronal microleakage in endodontically-treated teeth restored with posts[J]. Aust Endod J, 2003, 29(3) :128-133.

[10] 顾申生, 梁景平. 根管充填后3种暂时充填材料的冠部封闭性能比较[J]. 口腔医学研究, 2005, 21(5) 492-494.

GU Shen-sheng, LIANG Jing-ping. A comparison of the coronal leakage in endodontically treated teeth filled with three temporary restorations *in vitro*[J]. J Oral Sci Res, 2005, 21(5) 492-494.

[11] 孙兰芬, 刘旭明, 唐新萍. 330枚透明牙标本制作的体会[J]. 临床与实验病理学杂志, 1992, 8(Supp1) 64-65.

SUN Lan-fen, LIU Xu-ming, TANG Xin-ping. 330 teeth were transparent production experience[J]. J Clin Exp Pathol, 1992, 8(Supp1) 64-65.

(本文编辑 王晴)