

[文章编号] 1000-1182(2008)03-0258-04

# 硬化牙本质粘接界面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超微结构。方法 选用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; 12颗新鲜拔除的无龋人上颌前磨牙为对照组, 制备人造楔状缺损。使用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)粘接系统处理牙面, 以罗丹明B异硫氰酸盐为荧光素, 使用CLSM观察粘接界面的混合层与树脂突的微观结构。结果 双因素方差分析表明粘接剂种类、牙本质类型对粘接界面树脂突长度、混合层厚度有显著影响( $P<0.05$ )。无论是正常牙本质还是硬化牙本质, 全酸蚀粘接剂(SB)产生的树脂突长度、混合层厚度均大于自酸蚀粘接剂(CB、XB), 并且其差异具有统计学意义( $P<0.05$ ); 而CB和XB间树脂突长度、混合层厚度相差不多, 二者间无统计学意义。结论 硬化牙本质相对于正常牙本质形成的混合层较薄或者没有, 树脂突短、少。全酸蚀粘接系统与自酸蚀粘接系统作用同类型的牙本质上, 自酸蚀比全酸蚀形成的混合层薄, 树脂突短。

[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

Observation on bonding interface of sclerotic dentin with 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 the bonding interface of sclerotic dentin after treated with total-etching system and self-etching system by confocal laser scanning microscope(CLSM). Methods A total of 12 maxillary bicuspids with non-caries, natural cervical sclerotic lesions were divided into three groups. The sclerotic dentin was bonded with Single Bond(SB, total-etching adhesive), Clearfil SE Bond(CB, two-step self-etching)and Xeno (XB, one-step self-etching)according to the manufacturer's instruction. Artificially prepared wedge-shaped lesions made in sound maxillary bicuspids and bonded with same adhesive were used as control. The primer component was labeled with Rhodamine B Isothiocyanate. Hybrid layer and resin tag of dentin bonding interface were observed by CLSM. Results Two-way ANVOA revealed significant influence of both the type of dentin and the bonding adhesive systems tested on resin tag and hybrid layer( $P<0.05$ ). Resin tag and hybrid layer in total-etching adhesive(SB) were longer and thicker than in self-etching adhesive(CB, XB) whatever in normal dentin or sclerotic dentin, while the resin tag and hybrid layer thickness were similar in two kind self-etching adhesive( $P<0.05$ ). Conclusion The resin tags were fewer and shorter and the hybrid layers were thinner in sclerotic dentin than in normal dentin. When bonding the same type dentin substrate, the resin tags were shorter and the hybrid layer thinner in used self-etching adhesive than total-etching.

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

牙本质粘接一直是口腔临床关注的焦点之一, 而牙颈部非龋性硬化牙本质(cervical sclerotic dentin, CSD)的粘接又是其中的一个难点。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结晶体, 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>。目前的粘接系统对硬化牙本质的粘接效果如何, 哪一种粘接系统更适合, 以往相关的报道很少, 并且观点存在分歧。本实验选用临床具有代表性的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)粘接系统处理牙面, 采用激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)从超微形态方面对牙颈部非龋性硬化牙本质粘接界面

[收稿日期] 2007-08-20; [修回日期] 2007-11-08

[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

进行观察, 并进行比较分析, 以期为临床选择和使用提供一定的帮助。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料和设备

SB、Filtek™ Supreme(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 离体牙的收集和试样的制备

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12颗(根据北卡罗来纳硬化牙本质视觉分级<sup>[3]</sup>均为3级以上), 离体牙保存在4℃下0.5%氯胺溶液中, 1个月内使用。将12颗因牙周病拔除的具有典型楔状缺损的上颌前磨牙作为实验组, 随机分成3组。另外12颗无龋上颌前磨牙作为对照组, 随机分为3组, 用高速钨钢钻针在健康前磨牙颊侧颈缘制备长×宽×深为3 mm×8 mm×2 mm的人造楔状缺损。将0.1%罗丹明B异硫氰酸盐作为荧光素经快速混均器振荡分别溶解于3种粘接系统, 贮存在圆锥形带盖的1 mL塑料试剂瓶。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带有荧光标记的粘接系统。将粘接后的样本牙用慢速砂片平行于牙长轴片切为宽约2 mm的试件, 沿与粘接界面垂直的方向用不同表面粒度的砂纸(400、800、1200号)由粗

到细依次打磨, 直至试件透光。将制备好的样本贮存于37℃生理盐水中待观察。

### 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。测量所用软件为Quantify/Prof软件。测量并记录在CLSM荧光模式下各类粘接剂在不同牙本质粘接界面下所产生的混合层厚度、树脂突长度。

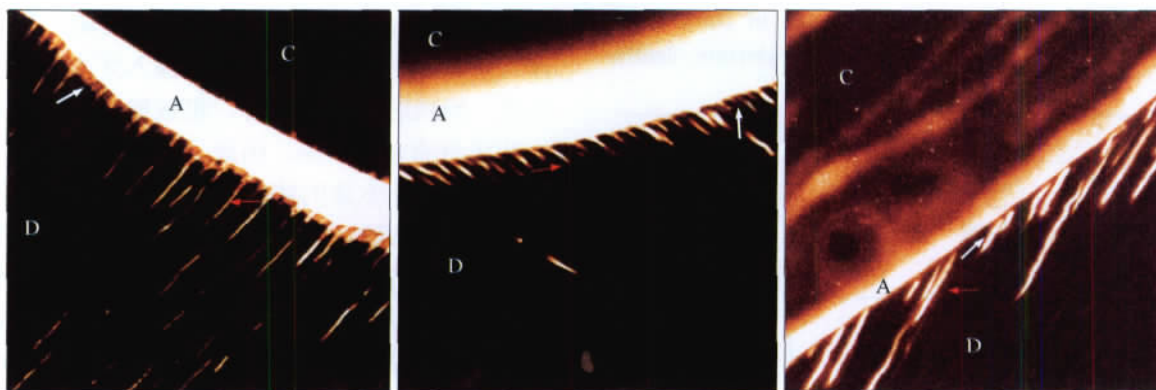
### 1.4 统计学分析

数据分析采用SPSS 11.5统计软件完成, 采用双因素方差分析评价牙本质类型和粘接剂种类对粘接界面微观形态参数的影响, 粘接剂种类的多重比较采用SNK法, t检验分析同种粘接剂在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

### 2.1 CLSM观察的微观形态结果

在正常牙本质的粘接界面上, 不同粘接剂均有良好的渗透, 没有发生粘接材料与粘接界面分离的情况, 可见混有荧光材料的粘接剂形成均匀的混合层, 并渗入牙本质小管, 形成树脂突, 树脂突多而密, 呈倒锥状(图1)。在硬化牙本质的粘接界面上, 混合层不均, 树脂突少而短或没有(图2)。



A: 粘接剂; C: 复合树脂; D: 牙本质; 白色箭头所指: 混合层; 红色箭头所指: 树脂突

图1 SB(左)、CB(中)、XB(右)与正常牙本质的粘接界面 CLSM ×400

Fig 1 CLSM image of normal dentin bonding interface with SB(left), CB(middle), XB(right) CLSM ×400

### 2.2 树脂突长度

正常牙本质和硬化牙本质应用3种粘接剂产生的树脂突长度具体情况见表1。双因素方差分析表明, 粘接剂的种类、牙本质类型对粘接界面的树脂突长度有显著影响( $P<0.05$ )。SNK法多重比较显示, 无论正常牙本质还是硬化牙本质, SB产生的树脂突长度均大于CB和XB, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。CB和XB之间无差异。t检验表明, 同种粘接系统作

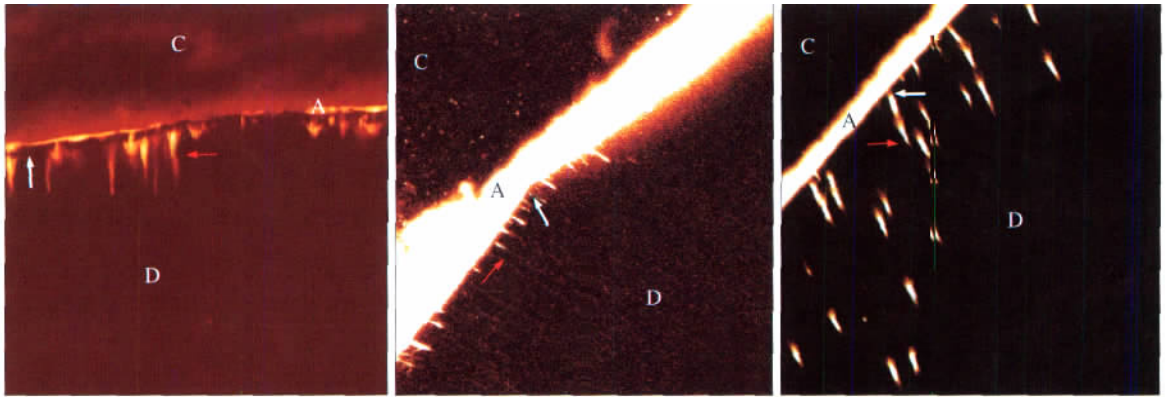
用在不同牙本质类型上, 无论是全酸蚀还是自酸蚀, 作用在正常牙本质上产生的树脂突长度均大于硬化牙本质, 其差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 2.3 混合层厚度

正常牙本质和硬化牙本质应用3种粘接剂所产生的混合层厚度的具体情况见表2。双因素方差分析表明, 粘接剂的种类、牙本质类型对粘接界面的混合层厚度有显著影响( $P<0.05$ )。SNK法多重比较

显示,无论正常牙本质还是硬化牙本质,SB产生的混合层厚度均大于CB和XB,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。CB和XB之间无差异。t检验表明,同种

粘接系统作用在不同牙本质类型上,无论是全酸蚀还是自酸蚀(除XB外,  $P=0.053$ )作用在正常牙本质上产生的混合层厚度均大于硬化牙本质( $P<0.05$ )。



A: 粘接剂; C: 复合树脂; D: 牙本质; 白色箭头所指: 混合层; 红色箭头所指: 树脂突  
图2 SB(左)、CB(中)、XB(右)与硬化牙本质的粘接界面 CLSM  $\times 400$

Fig 2 CLSM image of sclerotic dentin bonding interface with SB(left), CB(middle), XB(right) CLSM  $\times 400$

表1 正常牙本质和硬化牙本质应用3种粘接剂产生的树脂突长度  $\mu\text{m}$ ,  $\bar{x} \pm s$

Tab 1 The resin tag length of three kind adhesives to normal and sclerotic dentin ( $\mu\text{m}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

牙本质类型	树脂突长度		
	SB	CB	XB
正常牙本质	27.51 $\pm$ 1.84	22.73 $\pm$ 1.13	21.80 $\pm$ 6.29
硬化牙本质	19.30 $\pm$ 3.98	13.55 $\pm$ 4.89	11.97 $\pm$ 3.86

表2 正常牙本质和硬化牙本质应用3种粘接剂产生的混合层厚度  $\mu\text{m}$ ,  $\bar{x} \pm s$

Tab 2 The hybrid layer thickness of three kind adhesives to normal and sclerotic dentin ( $\mu\text{m}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

牙本质类型	混合层厚度		
	SB	CB	XB
正常牙本质	5.46 $\pm$ 1.49	2.69 $\pm$ 0.72	2.64 $\pm$ 0.79
硬化牙本质	3.00 $\pm$ 0.46	1.68 $\pm$ 0.14	1.79 $\pm$ 0.35

### 3 讨论

评价一种牙本质粘接系统性能优劣的首要指标是其粘接性能的好坏<sup>[4]</sup>。临床试验是评价牙本质粘接系统性能的有效方法,但需要时间较长,因此常采用体外实验测试比较各种粘接系统性能<sup>[5]</sup>。牙本质粘接的体外实验主要包括牙本质树脂粘接界面的微观形态观察、粘接强度测试以及渗漏性的观察。

扫描电镜或透射电镜等对牙本质粘接界面的微观形态观察时存在一些不足之处,如扫描电镜需要干燥试件,透射电镜观察前需将试件充分脱水 and 包埋,以上操作步骤都可能使混合层底部收缩,产生粘接界面裂隙<sup>[6]</sup>。这些因素均可能影响实验结果

CLSM是由显微镜系统、激光照射系统、检测系统、X-Y平台系统、Z轴马达和计算机处理系统结合在一起的高科技设备,应用于牙本质粘接界面的微观形态分析。它可利用共聚焦激光对样本进行无损伤“光学切片”,得到标本表面下若干微米的共聚焦图像光学横断面,并可通过计算机的三维重建功能,获得粘接界面的立体图像,可以在整体上直观显示粘接剂在粘接界面的渗透情况,还可以方便地对混合层的厚度、树脂突长度等进行测量,同时,CLSM是在100%湿润状态下观察标本,不需预先干燥,保持了样本的真实性<sup>[7]</sup>。

根据Nakabayashi等<sup>[8]</sup>的混合层理论,粘接树脂渗入胶原纤维网形成混合层和渗入牙本质小管的树脂突,形成超微机械嵌合,机械嵌合是牙本质粘接中粘接力的主要来源。因此,混合层和树脂突的质量直接关系到牙本质的粘接效果。CLSM观察显示,与正常牙本质相比,硬化牙本质形成的树脂突数量少,长度短,混合层较薄。Inoue等<sup>[9]</sup>同样观察到相似的结果。这可能是由于牙本质混合层的形成取决于两方面:牙本质表面的状况和渗透性与粘接剂的渗透性和表面特性<sup>[10]</sup>。一方面,与正常牙本质相比,硬化牙本质改变了其表面的渗透性。在硬化牙本质表面存在高矿化层,同时这种高矿化层出现在三维的胶原纤维网中,致使其表面缺乏足够游离的胶原纤维构成纤维网供树脂浸润形成混合层<sup>[11]</sup>。同时由于硬化牙本质的牙本质小管沉积了矿微晶,晶体完全堵塞在牙本质小管口<sup>[12-14]</sup>。酸蚀后的硬化牙本质在去除管周牙本质后,表面留下抗酸能力强的硬化晶柱从牙本质小管里突出,导致形成树脂突短、少或者没有<sup>[11,13,15]</sup>。另一方面,由于全酸蚀粘接剂与自酸蚀粘接剂的粘接机理不同,自酸蚀粘接系统是采



用弱酸或酸脂发挥酸性功能。自酸蚀粘接系统中酸性单体的酸性比全酸蚀粘接系统中酸蚀剂的酸性弱,同时粘接过程不去除玷污层,酸蚀跟树脂渗透同时进行,致使牙本质脱矿较浅,粘接剂的渗透较浅<sup>[16]</sup>。所以自酸蚀粘接系统形成的混合层薄,树脂突短小。同时也有学者发现全酸蚀与自酸蚀粘接系统在牙本质粘接中存在着不同的物质交换,而前者物质交换的程度超过后者,这也可以用来解释自酸蚀粘接系统形成的混合层薄<sup>[17]</sup>。由于粘接界面的复杂性,还需使用多种观察方法联合研究,同时应进一步结合力学实验,从宏观、微观不同的角度来综合研究分析。

### [参考文献]

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

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

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

[4] Tay FR, Pashley DH. Dental adhesives of the future[J]. J Adhes Dent, 2002, 4(2):91-103.

[5] Perdigao J. Dentine bonding as a function of dentin structure[J]. Dent Clin North Am, 2002, 46(2):277-301.

[6] 赵三军, 陈吉华, 吴玮, 等. 牙本质粘接界面纳米渗漏的激光扫描共聚焦显微镜观察[J]. 临床口腔医学杂志, 2005, 21(12):718-720.

ZHAO San-jun, CHEN Ji-hua, WU Wei, et al. Nanoleakage observation in resin-dentin interface bonded with three adhesives under confocal laser scanning microscope[J]. J Clin Stomatol, 2005, 21(12):718-720.

[7] 李潇, 施长溪, 赵信义, 等. 牙本质表面状态对粘接界面影响的激光扫描共聚焦显微镜研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2005, 21

(1):71-74.

LI Xiao, SHI Chang-xi, ZHAO Xin-yi, et al. Laser scanning confocal microscope study of wet bonding interface on different dentin bonding surfaces[J]. J Pract Stomatol, 2005, 21(1):71-74.

[8] Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates[J]. J Biomed Mater Res, 1982, 16(3):265-273.

[9] Inoue S, Vargas MA, Abe Y, et al. Microtensile bond strength of eleven contemporary adhesives to dentin[J]. J Adhes Dent, 2001, 3(3):237-245.

[10] Bitter K, Paris S, Martus P, et al. A confocal laser scanning microscope investigation of different dental adhesives bonded to root canal dentine[J]. Int Endod J, 2004, 37(12):840-848.

[11] Van Meerbeek B, Braem M, Lambrechts P, et al. Morphological characterization of the interface between resin and sclerotic dentine[J]. J Dent, 1994, 22(3):141-146.

[12] Porter AE, Nalla RK, Minor A, et al. A transmission electron microscopy study of mineralization in age-induced transparent dentin[J]. Biomaterials, 2005, 26(36):7650-7660.

[13] Kwong SM, Tay FR, Yip HK, et al. An ultrastructural study of the application of dentine adhesives to acid-conditioned sclerotic dentine[J]. J Dent, 2000, 28(7):515-528.

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

[15] Marshall GW Jr, Chang YJ, Saeki K, et al. Citric acid etching of cervical sclerotic dentin lesions: An AFM study[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 49(3):338-344.

[16] Pereira PN, Okuda M, Sano H, et al. Effect of intrinsic wetness and regional difference on dentin bond strength[J]. Dent Mater, 1999, 15(1):46-53.

[17] Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: Current status and future challenges[J]. Oper Dent, 2003, 28(3):215-235.

(本文编辑 王 晴)

(上接第257页)

传方式可能不同<sup>[6]</sup>。再者,基因的突变是否影响蛋白质的功能,其功能可能还受到环境、种族、性别、分子调控网络等的制约。这就是为何相同的基因突变会有不同的临床表现。目前的研究结果大多来自高加索白人,而且在海外对唇腭裂候选基因的研究中还发现大部分候选基因包括MSX1的基因多态性在不同国家的人群及相同国家不同人群间存在着差异。众所周知,NSCL/P患者的发病是多基因、多因素的综合结果,MSX1基因其他位点多态性的存在和其他候选基因多态性的相互作用与NSCL/P患者之间的关系尚有待进一步的探讨。

### [参考文献]

[1] Hewitt JE, Clark LN, Ivens A, et al. Structure and sequence of the human homeobox gene Hox7[J]. Genomics, 1991, 11(3):670-

678.

[2] Hu G, Lee H, Price SM, et al. MSX homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1[J]. Development, 2001, 128(12):2373-2384.

[3] Zhang Z, Song Y, Zhao X, et al. Rescue of cleft palate in MSX1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis[J]. Development, 2002, 129(17):4135-4146.

[4] Satokata I, Maas R. MSX1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development[J]. Nat Genet, 1994, 6(4):348-356.

[5] van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, et al. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans[J]. Nat Genet, 2000, 24(4):324-343.

[6] Werler MM, Lammer EJ, Rosenberg L, et al. Maternal cigarette smoking during pregnancy in relation to oral clefts[J]. Am J Epidemiol, 1990, 132(5):926-932.

(本文编辑 王 晴)