

[文章编号] 1000-1182(2008)03-0301-05

护牙素在正畸治疗中对减少牙齿脱矿及促进再矿化的功效研究

付洪, 梁芮, 肖悦, 张晓洁

(深圳市第二人民医院 口腔科, 广东 深圳 518035)

[摘要] 目的 评价Tooth Mousse护牙素对减少离体牛牙粘接托槽周围的釉质脱矿及促进再矿化的功效。方法 将60颗粘接托槽的离体牛牙随机分成实验组、阳性对照组和阴性对照组, 分别在牙面上涂擦Tooth Mousse护牙素、Duraphat氟保护漆和蒸馏水。将3组样本轮流放置入人工致龋液和人工唾液中浸泡, 然后使用偏光显微镜、扫描电镜、电子探针检测。结果 偏光显微镜下观察, 实验组釉质表面完整, 主要表现为以脱矿为主的正性双折射区明显减少; 扫描电镜观察实验组釉质表面有大量的矿物质沉积, 填补釉质表面局限性的小凹陷; 电子探针检测结果显示, 实验组釉质表面钙、磷含量明显高于阴性对照组($P<0.05$), 与阳性对照组之间无统计学差异($P>0.05$)。结论 Tooth Mousse护牙素在体外实验模型中能使牛釉质在人工致龋环境中减少脱矿和促进再矿化。

[关键词] 正畸治疗; 酪蛋白磷酸多肽; 无定形磷酸钙; 釉质; 脱矿; 再矿化

[中图分类号] R783.5 **[文献标识码]** A

Efficacy of Tooth Mousse in reducing enamel demineralization and promoting remineralization FU Hong, LIANG Rui, XIAO Yue, ZHANG Xiao-jie. (Dept. of Stomatology, The Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518035, China)

[Abstract] Objective To evaluate the efficacy of Tooth Mousse in reducing enamel demineralization lesions adjacent to bonded orthodontic brackets and promoting remineralization in vitro. Methods 60 bovine teeth with bonded orthodontic brackets were randomly divided into three groups, negative control group, positive control group and experimental group, applied separately with distilled water, Duraphat fluoride varnish, Tooth Mousse. 3 groups were dipped into an artificial caries solution and an artificial saliva solution, cycling between them. All samples were detected by polarized light microscope, scanning electron microscope and electron probe micro-analysis. Results Polarized light microscope showed that the enamel surface of the experimental group were completed, the areas of positive birefringence were decreased obviously. Scanning electron microscope showed that a large number of deposits were found on the dental enamel surface of the experimental group, filled in the small local concave of enamel surface. Compared with the control group, electron probe micro-analysis showed that calcium and phosphate concentration of enamel surface was higher in experimental group than in negative control group($P<0.05$), there was no significant differences between experimental group and positive control group($P>0.05$). Conclusion Tooth Mousse can reduce enamel demineralization and promoting remineralization in vitro.

[Key words] orthodontic treatment; casein phosphopeptide; amorphous calcium phosphate; enamel; demineralization; remineralization

用固定矫治器进行正畸治疗时, 由于矫治器粘接时间较长, 牙面不易清洁, 托槽周围釉质极易发生脱矿, 形成白垩色斑点, 进而发展成为早期釉质龋。统计表明, 正畸患者釉质脱矿的发病率约为

50%^[1]。近年来研究发现釉质表层的溶解(脱矿)和再建(再矿化)是一个持续的过程。当脱矿占优势时, 早期的龋损发展为龋洞, 如及时采取再矿化措施则可阻止龋损的进展, 避免龋齿发生^[2]。初期的再矿化可以通过唾液或脱矿釉质中释放的矿物质离子的沉积自然发生, 也可以从人工合成的含有钙磷的矿化液中获得矿物质离子促使其发生, 使早期龋达到不同程度的“治愈”——再矿化^[3]。

[收稿日期] 2007-06-11; [修回日期] 2007-11-12

[作者简介] 付洪(1976-), 女, 江西人, 主治医师, 学士

[通讯作者] 梁芮, Tel: 0755-21693399

氟对抑制脱矿和促进再矿化具有重要作用,但其可能导致氟斑牙、氟骨症等,使氟化物的应用受到一定限制。20世纪90年代研究发现,在小鼠的龋模型中牛奶、奶酪、奶制品等具有抗龋作用,这种作用主要与其中含有的磷酸钙和某种磷蛋白成分有关,通过酪蛋白磷酸多肽稳定的磷酸钙来发挥作用^[4]。Tooth Mousse护牙素是一种具有生物活性的钙离子和磷酸盐离子的乳状牙科护理材料,主要有效成分是酪蛋白磷酸多肽和无定形磷酸钙(complex of casein phosphopeptide and amorphous calcium phosphate, CPP-ACP)。本实验拟观察Tooth Mousse护牙素在模拟口腔环境中对离体牛牙托槽周围釉质脱矿与再矿化的影响,对其减少釉质脱矿及促进釉质再矿化作用进行评价。

1 材料和方法

1.1 实验材料和仪器

1.1.1 实验材料 Tooth Mousse护牙素(GC公司,日本); Duraphat氟保护漆(主要成分为氟化钠, Colgate公司,美国); 康齿宁抛光膏(丹东康宁药业有限公司); 复合树脂粘接剂(GC公司,日本); 口腔正畸直丝弓托槽(杭州奥杰医疗器材有限公司)。

人工唾液配方: 20 mmol/L NaHCO₃, 3 mmol/L NaH₂PO₄, 1 mmol/L CaCl₂, pH值为7^[5]。人工致龋液配方: 2.2 mmol/L Ca²⁺, 2.2 mmol/L PO₄³⁻, 50 mmol/L C₂H₄O₂, pH值为4.4^[5]。

1.1.2 实验仪器 E400POL型偏光显微镜(Nikon公司,日本); JXA-8800R型电子探针(日本电子株式会社); JSM-5910LV型扫描电镜(JEOL公司,日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 离体牙制备 收集60颗从牛下颌骨拔除的切牙,立即放入0.1%麝香草酚溶液中储存,然后放置在0.12%氯己定溶液中消毒,再用15号刀片刮去牙面残余的牙石、牙槽骨以及软组织,然后用低速转动手机和抛光膏抛光牛牙的釉质表面,最后用蒸馏水漂洗,干燥。

1.2.2 粘接正畸托槽 在60颗离体牙上黏附一透明胶带,颊面中心剪出一个正畸托槽底部尺寸大小的窗口,对窗口部分的釉质进行35%磷酸凝胶酸蚀30 s,然后用蒸馏水漂洗,压缩空气彻底吹干,按照化学固化复合树脂釉质粘接剂的操作方法进行粘接,将金属正畸托槽粘接到离体牙的颊面窗口内,托槽周围的多余树脂用口腔刮器刮除,20 min后去除牙面上的胶带。

1.2.3 分组 将60颗离体牙随机分为实验组、阳性

对照组和阴性对照组,每组20颗。用HB铅笔沿着托槽底部边缘标记出一个宽约2 mm的方框,然后在方框外牙面上涂上完整的一层抗酸剂,以不同的颜色标记3个实验组。根据分组在方框内分别涂擦不同试剂,其中,实验组涂擦Tooth Mousse护牙素,每天涂擦1次;阳性对照组涂擦Duraphat氟保护漆,每15 d涂擦1次;阴性对照组涂擦蒸馏水,每天涂擦1次。

1.2.4 牙体处理 离体牙涂擦试剂后,干燥5 min,然后将3组离体牙分别放入预先配置的3个人工唾液烧杯中,取出后放置于人工致龋液烧杯,去离子水漂洗,软毛刷刷刷牙面5 s,再重新放入人工唾液中。24 h内将3组样本轮流放置入人工致龋液和人工唾液中,放入人工唾液和人工致龋液的时间模拟三餐进食时间,软毛刷刷刷牙面模拟刷牙时对牙面造成的正常磨损。实验进行60 d,所有溶液储存在37℃恒温箱内,每天更换1次。第60天将牙齿从溶液中取出,用丙酮去除指甲油,去离子水漂洗,去除托槽,使用喷水切割装置(0.2 mm切割厚度)将牙体沿颊舌向正中切开,一半牙体置入4%甲醛溶液中保存用于偏光显微镜、电子探针观察,一半牙体置入电镜固定液中固定用于扫描电镜观察。

1.3 检测

1.3.1 偏光显微镜检查 将标本包埋于透明的甲基丙烯酸树脂中,沿颊舌向将标本磨至100 μm,在正交偏光下观察牙体的釉质损害,分析脱矿现象。

1.3.2 扫描电镜检查 将标本从固定液中取出,室温下干燥,逐一固定于扫描电镜载物台上,在真空中喷金,扫描电镜下观察标本釉质表面孔隙及釉柱的改变情况。

1.3.3 电子探针检查 在偏光显微镜下将需分析测试的区域标记出来,采用电子探针对本标本进行定点微区全谱扫描定性、定量分析,每个样品测试3个点,喷碳,检测釉质表面钙、磷含量。

1.4 统计学分析

采用SPSS 12.0统计软件进行分析,对3组标本电子探针测得的钙、磷含量进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 肉眼观察

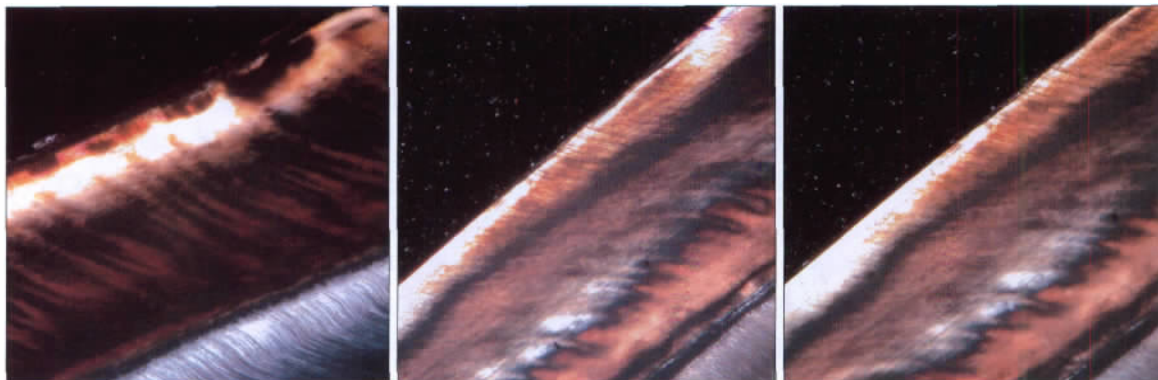
3组标本中,阴性对照组中大多数釉质表面呈现白垩色,表面无光泽,有的还出现明显的黄褐色龋样损害;阳性对照组及实验组中均可见少数釉质表面有白垩色改变,大部分釉质表面色泽正常。

2.2 偏光显微镜检查

阴性对照组:镜下可见釉质层表面的损害脱矿

区，表面多处脱矿，形成不规则的浅表缺损，釉质层黑色区域明显，表现为以脱矿为主的正性双折射区增加(图1左)。阳性对照组：镜下可见釉质层较完整，表面轻度脱钙，釉质层黑色区域减少，主要

表现为以脱矿为主的正性双折射区减少(图1中)。实验组：镜下可见釉质表面完整，釉质层黑色区域减少，主要表现为以脱矿为主的正性双折射区明显减少(图1右)。



左：阴性对照组；中：阳性对照组；右：实验组

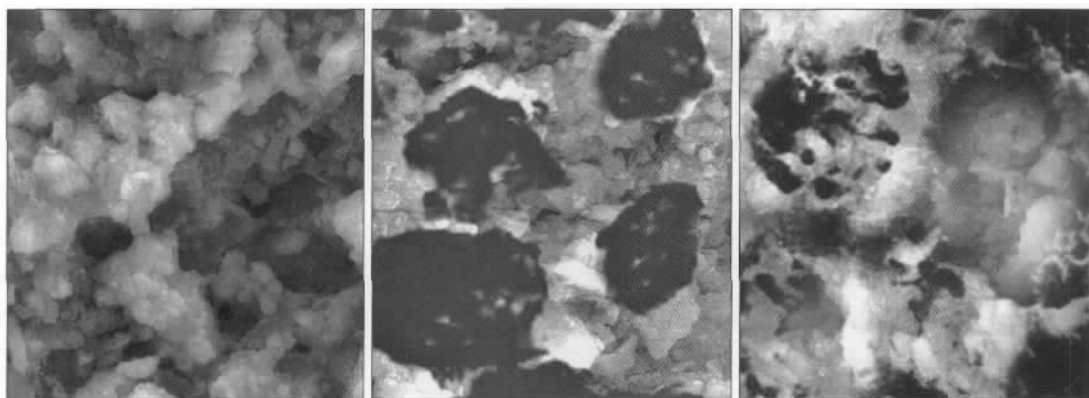
图1 3组标本牙体的釉质损害 偏光显微镜 ×200

Fig 1 Enamel lesions of three groups polarized light microscope ×200

2.3 扫描电镜检查

阴性对照组：釉质表面有明显的龋蚀孔隙，釉柱呈蜂窝状改变，每一凹陷代表一条牙釉柱末端破坏(图2左)。阳性对照组：釉质表面没有明显的龋

蚀孔隙，釉柱排列较规则，可见不规则的小球状矿物质沉积(图2中)。实验组：釉质表面没有明显的龋蚀孔隙，釉柱排列较规则，大量的矿物质沉积于釉质表面，填补釉质表面局限性的小凹陷(图2右)。



左：阴性对照组；中：阳性对照组；右：实验组

图2 3组标本牙体的釉质损害 扫描电镜 ×5000

Fig 2 Enamel lesions of three groups scanning electron microscope ×5000

2.4 电子探针检查

3组样本钙、磷的含量及其两两比较结果见表1、2。从表1、2可见，实验组、阳性对照组的钙、磷含量明显高于阴性对照组($P < 0.05$)，实验组、阳性对照组两组之间的钙、磷含量无统计学差异($P > 0.05$)。

表1 3组样本钙、磷的含量 $\bar{x} \pm s$

Tab 1 Calcium and phosphate concentration of three groups $\bar{x} \pm s$

分组	Ca(Wt%)	Ca(Am%)	P(Wt%)	P(Am%)
实验组	38.37 ± 1.85	22.80 ± 1.59	19.84 ± 0.82	15.25 ± 0.93
阳性对照组	37.26 ± 2.31	21.91 ± 1.85	19.57 ± 0.70	14.94 ± 0.84
阴性对照组	35.30 ± 1.71	20.38 ± 1.24	18.82 ± 0.40	14.02 ± 0.49

注：Wt%：质量百分比；Am%：原子百分比

表2 3组样本钙、磷含量两两比较的P值

Tab 2 P value of calcium and phosphate concentration among three groups

组间比较	Ca (Wt%)	Ca (Am%)	P (Wt%)	P (Am%)
实验组与阳性对照组	0.241	0.248	0.599	0.619
阳性对照组与阴性对照组	0.008	0.010	0.002	0.001
实验组与阴性对照组	0.000	0.000	0.000	0.000

注：Wt%：质量百分比；Am%：原子百分比

3 讨论

3.1 固定正畸治疗中釉质脱钙的形成

牙颌畸形是口腔常见的疾病之一，正畸治疗能最大程度地改善牙颌畸形患者的功能和外观。然而

在正畸治疗中,固定矫治器的使用使口腔内的生态环境发生改变,使得变异链球菌的数目明显增高,同时,固定矫治器的使用加速了菌斑堆积和pH值下降,这些因素促使釉质在固定正畸治疗中容易出现脱矿。釉质的主要成分为含有磷酸钙的羟磷灰石晶体,菌斑下的致龋菌在代谢过程中造成局部微环境的pH值下降, H^+ 进入牙齿硬组织,导致羟磷灰石晶体溶解破坏,无机钙、磷移出,临床上表现为白垩色(即釉质脱矿)^[1]。

3.2 氟化物使用中存在的问题

氟离子可以竞争性地结合钙桥,阻碍菌斑形成,降低釉质溶解度和促进釉质再矿化,故氟化物也被应用于固定矫治预防釉质脱矿。其常用的方法主要是局部应用,包括含氟牙膏、含氟漱口水、氟化粘接材料、氟凝胶、氟泡沫和含氟涂料等。研究已经证实氟化物能有效地预防龋病。然而,氟对人体的健康效应与剂量摄取有关,适当剂量可维持机体生理作用的需要,当摄入过量后,会导致急、慢性氟中毒,甚至死亡。部分氟化物如氟化氢银、氟化亚锡在局部使用时,会刺激牙龈和使牙面变色。同时氟化物的使用还会导致变异链球菌耐药菌株的产生,而变异链球菌是固定正畸中引起釉质脱矿的主要细菌。

3.3 酪蛋白磷酸多肽和无定形磷酸钙的作用机制

酪蛋白磷酸多肽是动物奶酪中的一种生物多肽,为一种色氨酸片段,其中富含ser(p)-ser(p)-ser(p)-ser(p)-glu-glu一簇,因其结构内的磷酸化丝氨酸残基的高负电荷性,使其极易和钙、磷盐结合形成胶体状的酪蛋白磷酸多肽钙磷复合体,起到磷酸钙储存库的作用,在菌斑中形成对游离磷酸钙的缓冲体,缓冲唾液pH值,以此抑制釉质脱矿,并促进再矿化。酪蛋白磷酸多肽具有黏附在牙面和菌斑上的能力,并且至少维持3h以上^[6-7]。无定形磷酸钙是指从牛奶中提取的具有生物活性的钙离子和磷酸盐离子,能被牙面吸收。

CPP-ACP的抑菌作用主要有以下4个方面。1)抑制表兄链球菌和变异链球菌在获得性膜上的黏附:细菌以钙离子作为钙桥附着于获得性膜上或通过钙桥细菌间相互黏附, CPP-ACP对获得性膜和细菌细胞膜上的钙桥黏着位点均具有竞争性,其竞争力约为自由钙离子的2倍。但CPP-ACP只有单端附着点,这就使得细菌难于通过钙桥黏附至获得性膜上,细菌难于聚集。2)间接抑菌、杀菌作用: CPP-ACP通过维持菌斑内高游离钙离子浓度,使致龋菌细胞一直处于高钙环境中,细胞膜上的钙泵难以应付高负荷的钙转运,胞内钙含量将逐渐升高,直至影响细

菌细胞内代谢过程,从而产生间接抑菌、杀菌作用。3)缓冲菌斑酸性环境并抑制釉质脱矿: pH降低时,菌斑内CPP-ACP极易分解出自由的钙离子和磷酸盐,一方面磷酸盐通过与氢离子结合形成磷酸氢盐或磷酸二氢盐缓冲掉部分菌斑酸,另一方面,因自由钙离子的释放,提高了釉质表面菌斑液中釉质的饱和度,继续维持菌斑液中釉质的过饱和状态,从而起到抑制釉质脱矿的作用。4)增加釉质龋损再矿化速率:大量结合到菌斑上的CPP-ACP,使得菌斑成为一个含有丰富钙、磷离子的储库。对于钙、磷离子浓度,使用过CPP-ACP的菌斑是未使用者的5倍。这样牙齿龋损表面和菌斑间就形成一个较大的钙磷离子浓度梯度差,有效促进了龋损处钙、磷的沉积^[8]。

随着对CPP-ACP抗龋作用的关注,国外学者Eichmiller^[9]发现在暴露的牙本质上应用ACP,可使牙本质小管再矿化,减少敏感性。Reynolds等^[10]在CPP溶液中加入适量钙、磷,配置出不同浓度的CPP-ACP溶液,并涂布于食用致龋食物的小鼠磨牙上,发现涂布CPP-ACP溶液后的磨牙,无论是平滑面龋还是窝沟龋的发生率均明显降低。国内学者也对CPP-ACP进行了大量的研究,赵琼芝等^[7]研究发现,酪蛋白磷酸多肽是牛奶酪蛋白中的一种色氨酸片段, CPP-ACP加氟形成酪蛋白磷酸肽钙氟磷复合体,其对人工釉质表层下缺损也有明显的再矿化作用。余艳崧等^[4]研究发现,含CPP的再矿化液浸泡人工龋标本,扫描电镜下可见大量矿物质在釉质面沉积,填补釉柱间质的病损与局限性的小凹陷,认为这与其有利于获得性膜形成以及CPP中过饱和的磷酸钙有关。李梅等^[11]对含酪蛋白磷酸多肽牙膏研究发现,在pH相等、钙离子及磷酸根离子浓度一致条件下, CPP浓度越大,再矿化能力越强。

3.4 固定正畸治疗中Tooth Mousse护牙素对牙齿脱矿及再矿化的影响

Tooth Mousse护牙素是一种具有生物活性的钙离子和磷酸盐离子的乳状牙科护理材料,其主要有效成分是酪蛋白磷酸多肽和无定形磷酸钙。本实验在模拟口腔环境下进行Tooth Mousse护牙素对离体牛牙托槽周围釉质脱矿与再矿化影响的研究,以对Tooth Mousse护牙素能否用于正畸治疗中减少釉质脱矿及促进釉质再矿化进行评价。

本实验中将60颗粘接托槽的离体牛牙循环放置在脱矿(致龋液)和再矿化(人工唾液)的环境中,以模拟口腔环境。在一个正常的口腔环境里,进食后会有一个时段的高致龋环境,当口腔内的pH值达到酸性时,釉质就会出现脱矿;但是,当停止进餐

后,牙体更多的时间暴露在唾液中,随后就会出现再矿化。本实验结果发现,涂擦Tooth Mousse护牙素的离体牙只有少数釉质表面有白垩色改变,大部分釉质表面色泽正常。偏光显微镜下,釉质表面完整,脱矿区明显减少;扫描电镜下,釉柱完整,其间可见大量矿物质沉积;电子探针分析,钙、磷含量显著高于阴性对照组,而与阳性对照组无显著差异。本研究结果表明,在人工致龋环境中,Tooth Mousse护牙素能显著减少釉质脱矿,并有效促进其再矿化。作为一种生物制剂,Tooth Mousse护牙素在临床应用中具有良好的前景,随着进一步的深入研究,将能很好地运用于临床正畸防龋治疗中。

[参考文献]

[1] 卢红飞,艾虹.固定正畸治疗引起牙釉质脱矿的直接原因及其影响因素和预防方法[J].国外医学口腔医学分册,2004,31(增刊):167-169.
LU Hong-fei, AI Hong. The directly reason and influential factors and preventing method of enamel demineralization in orthodontic treatment with fixed appliances[J]. Foreign Medical Sciences (Stomatology), 2004, 31(suppl):167-169.

[2] Anusavice KJ. Efficacy of nonsurgical management of the initial caries lesion[J]. J Dent Educ, 1997, 61(3):895-905.

[3] 吴红崑,周学东,谭红,等.微量元素矿化液促进釉质龋再矿化层形成机理的研究[J].华西口腔医学杂志,2000,18(4):219-221,225.
WU Hong-kun, ZHOU Xue-dong, TAN Hong, et al. A study of the mechanism of effects of solution containing trace elements on remineralization layer formation of enamel carious lesions[J]. West China J Stomatol, 2000, 18(4):219-221, 225.

[4] 余艳松,伍虹,陈伟良,等.酪蛋白磷酸多肽对牙釉质龋再矿化作用的初步研究[J].实用医学杂志,2002,18(10):1054-1055.
YU Yan-song, WU Hong, CHEN Wei-liang, et al. Primary study

in the remineralization of dental enamel lesions by casein phosphopeptide[J]. J Pract Med, 2002, 18(10):1054-1055.

[5] Demito CF, Vivaldi-Rodrigues G, Ramos AL. The efficacy of a fluoride varnish in reducing enamel demineralization adjacent to orthodontic brackets: An in vitro study[J]. Orthod Craniofac Res, 2004, 7(4):205-210.

[6] 漆明,王强,阮梅生,等.淀粉酶与致龋细菌的相关性研究[J].口腔医学,2002,22(2):67-69.
QI Ming, WANG Qiang, RUAN Mei-sheng, et al. A study on the relationship between α -amylase and cariogenic bacteria[J]. Stomatology, 2002, 22(2):67-69.

[7] 赵琼芝,蔡璠.酪蛋白磷酸多肽钙氟磷复合体对牙釉质缺损再矿化的实验研究[J].中华口腔医学杂志,2001,36(6):421-423.
ZHAO Qiong-zhi, CAI Fan. The remineralization of enamel lesions by casein phosphopeptide-amorphous calcium fluoride phosphate in vitro[J]. Chin J Stomatol, 2001, 36(6):421-423.

[8] 魏华,石四箴.酪蛋白磷酸多肽联合钙磷的抗龋作用[J].复旦大学学报(医学版),2003,30(3):297-298.
WEI Hua, SHI Si-zhen. The anticariogenic efficacy of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate[J]. Fudan Univ J Med Sci, 2003, 30(3):297-298.

[9] Eichmiller FC. Promising new dental materials on the horizon[J]. Compend Contin Educ Dent, 1997, 18(3):254-260.

[10] Reynolds EC, Cain CJ, Webber FL. Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat [J]. J Dent Res, 1995, 74(6):1272-1279.

[11] 李梅,章锦才,许曼波,等.酪蛋白磷酸多肽牙膏抑制釉质脱矿和促进釉质再矿化的实验研究[J].口腔医学,2004,24(4):199-201.
LI Mei, ZHANG Jin-cai, XU Man-bo, et al. Effects of tooth paste with casein phosphopeptide on demineralization and remineralization of dental enamel[J]. Stomatology, 2004, 24(4):199-201.

(本文编辑 李彩)

第8届中国西部口腔医学学术会议

第8届中国西部口腔医学学术会议将于2008年9月6至9日在四川省成都市召开。此次会议由中国西部口腔医学协作组主办、四川大学华西口腔医学院承办,同期还将举办第8届中国西部国际口腔设备与材料展览会、中日齿科保存国际研讨会、FICD新院士授予仪式以及学术会、国家继续教育项目学习班。会议将邀请全国著名的口腔医学专家全面讲授口腔医学领域中各科临床实用新技术和新进展,代表们可就口腔临床技术、管理、经营等各方面的问题进行交流和探讨。

具体参会要求请与第8届中国西部口腔医学学术会议筹委会联系。筹委会通信地址:四川省成都市人民南路三段十四号,四川大学华西口腔医院科研科;联系人:陈凯、胡涛;邮政编码:610041;联系电话:028-85502415;E-mail:hxkqky@163.com.

第8届中国西部口腔医学学术会议筹委会