

## 牙齿酸蚀症实验模型的研究进展

郑海燕 于皓\*

(福建医科大学附属口腔医院修复科,福建省高校口腔医学重点实验室 福建 福州 350002)

**[摘要]** 牙齿酸蚀症的患病率逐年上升,为深入探讨其发病相关因素、治疗及其预防措施,牙齿酸蚀症实验模型的建立已引起国内外学者的广泛重视。目前牙齿酸蚀症的实验模型主要有 3 类:体内实验模型、原位实验模型和离体实验模型。3 种实验模型各有优缺点,本文就牙齿酸蚀症实验模型种类以及影响实验模型设计的相关因素做一综述。

**[关键词]** 牙齿酸蚀症 实验模型 实验设计 酸蚀方案

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2018)04—0347—03

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.04.002

**An Update of Dental Erosion Model.** ZHENG Hai-yan, YU Hao\*. Department of Prosthodontics, School and Hospital of Stomatology, Fujian Medical University; Key Laboratory of Stomatology (FJMU), Fujian Province University, Fuzhou 350002, China.

**[Abstract]** The prevalence of dental erosion has been increasing steadily over the past decades. The relevant risk factors, treatment, and preventive strategy of dental erosion have therefore attracted attentions from the dental researchers and practitioners. Currently, the experimental models of dental erosion, including *in vivo*, *in situ*, and *in vitro* protocols, have been introduced with their own advantages and disadvantages. The aim of this article was to review the three types of dental erosion models and the factors involved in designing the relative experiment.

**[Key words]** Dental erosion Experimental model Study design Erosive protocol

牙齿酸蚀症(dental erosion)是指在无细菌参与的情况下,牙面受到酸或其螯合物的化学侵蚀作用而引起的一种病理、慢性的牙体硬组织表面浅层丧失<sup>[1]</sup>。近年来其患病率逐年上升,2014 年世界平均患病率已达到 30.4%<sup>[2]</sup>。

目前牙齿酸蚀症的研究模型主要分为 3 类:体内(*in vivo*)实验模型:以志愿者的天然牙作为酸蚀对象,实验完全在志愿者口腔内进行;原位(*in situ*)实验模型:待酸蚀的离体牙试样暴露于志愿者口腔环境中,为尽可能降低对志愿者天然牙可能造成的酸蚀损害,酸蚀过程多数在体外进行。如果选择在体内进行酸蚀还可进一步研究口腔环境(如温度、唾液等)对酸蚀过程的影响;离体(*in vitro*)实验模型:以离体牙试样作为酸蚀对象,且酸蚀过程完全在体外进行。

从理论上来说,体内实验模型是 3 种实验模型中最具参考价值的,但因存在诸多问题而未得到广泛运用。如伦理学问题、难以准确测试被酸蚀牙齿的理化性能变化<sup>[3]</sup>、口内情况复杂为实验结果分析带来困难等。目前研究人员偏向设计离体实验以及原位实验来进行牙齿酸蚀症的相关研究。离体实验较明显的优点是:相对于原位实验不需要大量的志愿者参与,可以避免参与者依从性的问题;实验花费少;可以严格控制实验变量等。现阶段已有大量的离体实验模型应用于牙齿酸蚀症的研究中,其最大的局限在于研究条件过于理想化,未考虑到口腔环境对酸蚀过程的影响;如获得性生物膜、唾液的保护作用以及牙刷的洗刷、天然牙的磨耗等。原位实验模型的突出优点在于还原了口腔环境;缺点在于仍存在志愿者的依从性问题及伦理学问题等。体内实验及原位实验模型需要同时考虑的生物因素包括:不同个体间的生物因素:如唾液情况、不同个体的再矿化潜能以及牙齿的固有性质等;口腔环境中的生理运动:如咀嚼、牙齿的磨耗、舌的运动等;行为习惯的影响:饮食习惯、口腔卫生习惯等。

因涉及伦理学问题,体内实验模型应用较少,故本文将重点对离体以及原位实验模型的特点及设计需要考虑的因素做一综述。

### 1 离体、原位实验模型设计考虑因素

1.1 实验对象 实验对象主要为人牙或者牛牙。随着人们

**基金项目** 国家自然科学基金(编号:81200824)

教育部留学回国人员科研启动基金(编号:2013B020)

福建医科大学 2015 年度国家级大学生创新训练项目(编号:201510392040)

福建省科技创新联合基金(编号:2016Y9022)

**作者简介** 郑海燕(1993~),女,福建莆田人,硕士在读,主要从事口腔修复学的相关研究,现于浙江大学医学院附属口腔医院学习。

\* 通讯作者 于皓, E-mail: haoyu-cn@hotmail.com

口腔保健意识的提高,获取人牙难度增加,更多学者选择牛牙来进行实验。牛牙和人牙本身存在许多差异<sup>[4]</sup>,这些差异可能对实验结论产生影响。有研究证实牛牙发生酸蚀以及脱矿的速度均较人牙快<sup>[5]</sup>。Rios等<sup>[6]</sup>发现,人牙的表面硬度高出牛牙约10%,牛牙釉质含有更多孔隙,且所含矿物质成分较少。在酸蚀实验中人牙相比于牛牙表现出更多的表面显微硬度改变。综合考虑,建议在牙齿酸蚀研究中使用人牙作为实验对象。值得注意的是,人牙也存在个体差异。为了使差异降到最低,多数研究使用人第三磨牙<sup>[7]</sup>,尤其是未萌出的第三磨牙。另外,来自不同牙面的试样是否存在差异目前尚存在争议,有离体实验证实人牙舌(腭)面比唇(颊)面更易被酸蚀<sup>[8]</sup>。但也有研究发现,来自第三磨牙不同牙面试样的被酸蚀深度不具有显著性差异<sup>[9]</sup>。

## 1.2 实验设计

1.2.1 实验变量 离体模型中,影响实验的主要变量包括酸蚀过程中搅拌的方式、速率、实验的温度、酸蚀方案以及试样是否与唾液接触等。不同的搅拌方式或者速率主要通过改变溶质扩散至各层的浓度来影响酸蚀。现有研究多采用磁力搅拌器进行搅拌,但搅拌速度标准尚未统一。温度的控制可通过使用冰箱或水浴实现<sup>[10]</sup>。当其他因素不变时,温度越高,酸蚀越明显<sup>[10]</sup>。但也有学者研究发现当柠檬酸加热超过70℃后冷却,造成的酸蚀程度反而较小,可能的原因是其中酸性物质已经降解或者变性<sup>[8]</sup>。离体实验结果与其实验变量密切相关,但由于缺乏统一的控制标准,结果常缺乏可比性。影响原位实验的变量除了酸蚀过程中实验的温度(通常为37℃或室温)、酸蚀过程是否接触唾液、酸蚀方案外,通常还涉及是否采取预防措施以保护志愿者天然牙、是否存在摩擦模拟等。

1.2.2 酸蚀方案 酸蚀方案包括实验周期、致酸蚀源、酸蚀方式、酸蚀频率以及酸蚀时间等。由于酸蚀方案的变量较多且缺乏统一的标准,因此在不同实验研究结果可比性不佳。

致酸蚀源的主要变量有pH值;酸浓度(包括缓冲容量及未解离酸浓度);所含钙、磷、氟化物等的浓度;饱和度;所含酸蚀抑制剂的量等,其中pH值是最主要的影响因素。此外,还需考虑酸蚀溶液的物理性质如湿度、粘度等<sup>[11]</sup>。

在离体实验中,酸蚀方式根据酸蚀时间分为两类:1)原位酸蚀(*in situ* erosion),即实验过程中试样一次性长时间接触致酸蚀源;2)循环酸蚀(erosion cycling/ pH cycling),即周期性的短间接接触致酸蚀源,此方法可用于需要引入唾液作为保护变量的实验。也可根据实验环境分为两类:1)实验试样与致酸蚀源、唾液在烧杯中发生反应;2)利用脱矿一再矿化循环模型,使致酸蚀源接触实验试样表面的同时,迅速与产生的唾液相混合,模拟口内唾液的缓冲作用<sup>[12]</sup>,该模型在一定程度上模拟了口内环境,结果更具有参考价值<sup>[13]</sup>。还有一部分离体实验建立了酸蚀-磨耗循环模型(erosion-abrasion cycling)模拟刷牙带来的磨损<sup>[14]</sup>。

原位实验中,酸蚀方案根据酸蚀方式主要分为两种:1)直接口内酸蚀(*intraoral* erosion),指酸蚀时试样位于志愿者

口内,能较真实地还原实际酸蚀过程如唾液的流动,结果较为准确,但考虑到伦理学问题,为了避免志愿者的易感受受到损害,现有研究较少采用该法;2)间接口内酸蚀(*ex vivo* erosion),指酸蚀过程发生在体外,即采取口外酸蚀的方法,其酸蚀流程较为规范,不会受到志愿者个体差异的影响,所以其结果变化范围更小。

以下内容总结了2010~2016年发表在国内外期刊上的关于牙齿酸蚀症研究部分论文所提及的酸蚀方案。

1.2.2.1 离体实验 大多数离体实验的周期为5~10 d,个别长达20 d<sup>[15]</sup>。若研究目标为牙齿酸蚀症早期病变情况,则酸蚀时间不建议超过10 min<sup>[16]</sup>。致酸蚀源多选择柠檬酸(pH≈3)<sup>[17]</sup>,根据不同研究目的,也可选择橙汁、可口可乐和西柚汁等市售酸性饮料。致酸蚀源的量及酸蚀次数视具体情况而定。酸蚀方法最好采用脱矿/再矿化循环酸蚀模型,酸蚀频率多为2~6次/日<sup>[18]</sup>,酸蚀时间一般为5 min。若选择原位酸蚀,酸蚀频率较低,可为1次/日,每次5 min<sup>[19,20]</sup>,也有研究一次酸蚀60 min<sup>[21]</sup>。有研究结果表明,离体实验中每天在不同的时间酸蚀4次(持续15 d)与一次性进行等次数的酸蚀实验所造成的酸蚀深度比较差异无统计学意义<sup>[8]</sup>。

1.2.2.2 原位实验 原位实验多分阶段进行,每个阶段持续5~7 d<sup>[22,23]</sup>,每天酸蚀次数4~6次<sup>[22,24]</sup>,每次酸蚀时间为5~10 min,总周期一般10~24 d<sup>[25]</sup>。致酸蚀源多选择柠檬酸,用量一般小于1200 mL/d。酸蚀方法多选择间接口内酸蚀,部分研究选择损害较小的含漱法<sup>[26]</sup>。

1.3 口内载具 原位实验中,学者们根据不同的实验目的和口腔内环境的特点设计不同的口内载具。目前主要有两种:间断性佩戴于口腔中的可摘式载具及持续性固定在口腔中的固定载具。原位实验中可以制作保护性牙托保护志愿者的牙齿免受酸蚀,或者将试样放置于牙托上,在牙托上开窗让试样接触酸性物质。

1.3.1 可摘式载具 可摘式载具是指周期性佩戴于志愿者口内的装置,需要在实验人员监督下进行摘戴,其可放在志愿者的上颌或者下颌。有研究结果显示,大部分酸蚀实验选择将载具放在上颌,鲜有放在下颌的情况<sup>[7]</sup>,主要是为了减少志愿者舌舐对试样的影响。使用此种装置需要考虑志愿者的依从性以及摘戴过程可能发生的试样丢失问题。

1.3.2 固定载具 为了解决可摘式载具存在的志愿者依从性问题,研究人员设计出将试样固定在志愿者牙齿的模型:利用定制改装的正畸托槽将釉质块固定在志愿者磨牙颊面<sup>[27]</sup>。根据Sung等<sup>[7]</sup>的调查,在酸蚀的原位实验研究中,固定装置的使用较少。不同的口内装置,试样在口内的位置也不相同。常见的位置有:腭中缝或其附近、牙列唇颊部以及舌下。在上腭区域,可以使用金属丝将试样捆绑固定<sup>[28]</sup>。

1.4 伦理问题 为了保护受试者的天然牙,建议在原位实验研究前应确定实验方案中每种致酸蚀源的安全范围。例如,有研究在实验中设置20 μm的安全范围<sup>[8]</sup>,即在实验过程中若试样表面损害深度超过20 μm及以上的志愿者必须

退出实验。实验周期过长可能会造成志愿者不良反应,比如胃刺激,因此若研究时间持续数月甚至更长,建议酸蚀过程采用含漱法。

## 2 总结

综合来看,体内实验可行性低而离体实验无法完全模拟口内环境,原位实验是研究牙齿酸蚀症较好的一种方式。如能结合现有的牙齿酸蚀模型,设计出理想的原位实验模型,既保护志愿者天然牙,又能模拟自然状态下的牙齿酸蚀情况,将提高相关研究的准确性且简化实验操作步骤。

## 参考文献

- [1] Lussi A, Jaeggi T. Erosion—diagnosis and risk factors [J]. Clin Oral Investig, 2008, 12(Suppl 1) : S5—S13.
- [2] Salas MM, Nascimento GG, Huysmans MC, et al. Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta—regression analysis [J]. J Dent, 2015, 43(1) : 42—50
- [3] Huysmans MC, Chew HP, Ellwood RP. Clinical studies of dental erosion and erosive wear [J]. Caries Res, 2011, 45(Suppl 1) : 60—68
- [4] Turssi CP, Messias DF, Corona SM, et al. Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model [J]. Braz Dent J, 2010, 21(4) : 332—336
- [5] Tschoppe P, Wolf O, Eichhorn M, et al. Design of a randomized controlled double—blind crossover clinical trial to assess the effects of saliva substitutes on bovine enamel and dentin in situ [J]. BMC Oral Health, 2011, 11 : 13
- [6] Rios D, Honório HM, Magalhães AC, et al. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/*ex vivo* study [J]. Caries Res, 2006, 40(3) : 218—223
- [7] Sung YH, Kim HY, Son HH, et al. How to design in situ studies: an evaluation of experimental protocols [J]. Restor Dent Endod, 2014, 39(3) : 164—171
- [8] West NX, Davies M, Amaechi BT. *in vitro* and in situ erosion models for evaluating tooth substance loss [J]. Caries Res, 2011, 45(Suppl 1) : 43—52
- [9] 袁牧,张清,高学军. 可口可乐对牙釉质早期脱矿后表面显微硬度的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 2016, 51(6) : 357—361
- [10] Barbour ME, Finke M, Parker DM, et al. The relationship between enamel softening and erosion caused by soft drinks at a range of temperatures [J]. J Dent, 2006, 34(3) : 207—213
- [11] Barbour ME, Lussi A, Shellis RP. Screening and prediction of erosive potential [J]. Caries Res, 2011, 45(Suppl 1) : 24—32
- [12] Wiegand A, Bichsel D, Magalhães AC, et al. Effect of sodium, amine and stannous fluoride at the same concentration and different pH on *in vitro* erosion [J]. J Dent, 2009, 37(8) : 591—595
- [13] Young A, Tenuta LM. Initial erosion models [J]. Caries Res, 2011, 45(Suppl 1) : S33—S42
- [14] Hara AT, González—Cabezas C, Creeth J, et al. The effect of human saliva substitutes in an erosion—abrasion cycling model [J]. Eur J Oral Sci, 2008, 116(6) : 552—556
- [15] Wegehaupt FJ, Attin T. The role of fluoride and casein phosphopeptide/amorphous calcium phosphate in the prevention of erosive/abrasive wear in an *in vitro* model using hydrochloric acid [J]. Caries Res, 2010, 44(4) : 358—363
- [16] Hara AT, Zero DT. Analysis of the erosive potential of calcium—containing acidic beverages [J]. Eur J Oral Sci, 2008, 116(1) : 60—65
- [17] Beyer M, Reichert J, Sigusch BW, et al. Morphology and structure of polymer layers protecting dental enamel against erosion [J]. Dent Mater, 2012, 28(10) : 1089—1097
- [18] Yu H, Attin T, Wiegand A, et al. Effects of various fluoride solutions on enamel erosion *in vitro* [J]. Caries Res, 2010, 44(4) : 390—401
- [19] Gracia LH, Brown A, Rees GD, et al. Studies on a novel combination polymer system: *in vitro* erosion prevention and promotion of fluoride uptake in human enamel [J]. J Dent, 2010, 38(Suppl 3) : S4—S11
- [20] Jager DH, Vissink A, Timmer CJ, et al. Reduction of erosion by protein—containing toothpastes [J]. Caries Res, 2013, 47(2) : 135—140
- [21] 高峰,李滢. 柠檬酸对牙本质酸蚀作用的体外研究[J]. 现代口腔医学杂志, 2015, 29(3) : 144—148
- [22] Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of tin—containing solutions on erosive mineral loss in enamel and dentine in situ [J]. Clin Oral Investig, 2011, 15(3) : 361—367
- [23] Ganss C, Neutard L, von Hinckeldey J, et al. Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized in situ trial on erosion [J]. J Dent Res, 2010, 89(11) : 1214—1218
- [24] Kato MT, Leite AL, Hannas AR, et al. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ [J]. J Dent Res, 2010, 89(5) : 468—472
- [25] Wiegand A, Hiestand B, Sener B, et al. Effect of TiF<sub>4</sub>, ZrF<sub>4</sub>, HfF<sub>4</sub> and AmF on erosion and erosion/abrasion of enamel and dentin in situ [J]. Arch Oral Biol, 2010, 55(3) : 223—228
- [26] Scaramucci T, Sobral MA, Eckert GJ, et al. In situ evaluation of the erosive potential of orange juice modified by food additives [J]. Caries Res, 2012, 46(1) : 55—61
- [27] Amaechi BT, Karthikeyan R, Mensinkai PK, et al. Remineralization of eroded enamel by a NaF rinse containing a novel calcium phosphate agent in an in situ model: a pilot study [J]. Clin Cosmet Investig Dent, 2010, 2 : 93—100
- [28] Maggio B, Guibert RG, Mason SC, et al. Evaluation of mouthrinse and dentifrice regimens in an in situ erosion remineralisation model [J]. J Dent, 2010, 38(Suppl 3) : S37—S44