

45S5 生物活性玻璃仿生矿化酸蚀的牙釉质的研究^①

董志红^{②*} 周长春^{**} 聂志萍^{*}

(^{*} 成都大学材料系 成都 610106)

(^{**} 四川大学国家生物医学工程研究中心 成都 610064)

摘要 采用 45S5 生物活性玻璃对酸蚀的牙釉质进行了仿生矿化处理, 旨在诱导牙釉质在模拟人工唾液环境中的再矿化; 利用激光粒度分析仪、X-射线衍射仪(XRD)、扫描电子显微镜(SEM)、透射电子显微镜(TEM)、原子力显微镜(AFM)及纳米压痕(nanoindentation)技术对矿化层及牙釉质基体进行了对比研究。结果表明:一定粒径尺寸范围内(1~10 μm)的 45S5 生物玻璃可粘附在牙釉质表面, 在模拟口腔唾液环境中浸泡 7 天后, 可形成一层矿化层, 结构类似于牙釉质的类骨磷灰石, 厚约 0.8~1.2 μm, 且力学性能和表面粗糙度都优于酸蚀的牙釉质。45S5 作为诱导矿化的仿生材料, 可保护牙齿及预防龋齿发生。

关键词 牙釉质, 45S5 生物活性玻璃, 再矿化

0 引言

牙齿是人体中主要的硬组织器官之一, 其成分主要是含氟、氯的纳米羟基磷灰石, 最外面的一层牙釉质是人体中最硬的组织, 含无机成分达到 96 wt% 以上。牙釉质中的纳米羟基磷灰石呈束状排列, 彼此重叠, 但是彼此之间的排列并非完全致密, 当受到酸性等物质(如酸性食物、碳酸饮料等)的侵蚀时, 会导致牙釉质表面的矿物质软化、脱落, 严重时会导致龋齿。随着生物材料的发展, 人们将会不仅仅局限于传统的牙齿修复, 可利用生物材料在早期进行牙齿的保护, 以大大减少龋齿的患病率。生物材料的发展可为牙齿的修复与保护提供新的方向。1971 年 Hench 教授首次发现一定浓度的生物玻璃能和骨形成键合并促进骨组织再生^[1], 后来的研究又发现一定浓度的硅酸盐生物玻璃能促进骨髓基质干细胞的分化^[2]。这类生物活性材料的一个重要特性是在模拟体液环境以及体内, 能够诱导矿化和沉积类骨磷灰石。有研究发现生物玻璃能够在牙本质表

面诱导矿化^[3], 但是否生物玻璃能够在牙釉质表面诱导矿化, 以及矿化能力如何, 还未见报道。本研究使用 45S5 生物玻璃, 模拟刷牙的形式对酸蚀的牙釉质进行诱导仿生矿化处理, 观察矿化层的结构、相组织、力学特性及表面粗糙性, 进行牙釉质基体对比, 探讨在模拟口腔微环境中实施牙釉质的再矿化, 为进一步开展 45S5 在牙齿修复中的应用研究提供理论依据。

1 实验过程

1.1 样品的制备

45S5 生物玻璃粉体采用熔融法制备^[4], 其质量组成为 SiO₂(44.8), CaO(26.5), Na₂O(23.4), P₂O₅(5.3)。材料过 300 目筛后, 测试其粒径尺寸分布。

收集临幊上因正畸而拔掉的成人恒牙, 用切割机去除根部, 牙冠超声清洗, 纵向切割成 3 mm × 3 mm × 2 mm 大小的牙釉质样品, 将釉面在不同粒度(800, 1200, 2000)的金刚砂纸上, 滴加水进行抛光,

^① 国家自然科学基金(No. 81201475)资助项目。

^② 女, 1978 年生, 博士, 副教授; 研究方向: 生物医用材料; 联系人, E-mail: girlluyao@163.com
(收稿日期: 2014-10-21)

约去除表面层约 $150\mu\text{m}$, 最后用 0.4μ 抛光膏在抛光布上进行抛光, 将处理好的样品放在乙醇溶液中, 超声波下清洗 3min, 去除表面的油脂和残渣, 最后再用清水冲洗, 烘干, 备用。

配置柠檬酸溶液, pH 值为 4.2, 将处理好的牙釉质样品放在 10ml 柠檬酸溶液中浸泡 1min 取出; 取 45S5 玻璃粉体, 用去离子水(固/液比 = 1: 1.5 ml/g)搅拌成浆料, 将酸蚀的牙齿样品, 放在玻板上, 用牙刷粘取浆料, 以模拟刷牙的方式, 在牙釉质表面刷 3min, 然后用去离子水冲洗。将其处理的样品分成两部分, 取 3 个样品测试其 45S5 生物玻璃粉

体粘附在牙釉质表面的粒径尺寸。具体操作: 将其样品放在 10ml 去离子水溶液中超声 10min, 移除表面的粒子, 通过光阻法激光液体颗粒计数器 (AIAC9703) 计算其在表面的粘附量及粒径分布尺寸, 取 3 个样品的平均值, 其余样品分别浸泡在盛有模拟口腔唾液(simulated oral fluid, SOF)的聚乙烯小瓶中, 样品的表面积和液体的体积比是 $1\text{cm}^2/\text{ml}$ ^[5], 然后将小瓶放在 36.5°C 恒温震荡水浴中, 每天换液。模拟口腔唾液的组成如表 1 所示, 使用 KOH 调节 pH 为 7.2, 在使用期间, 无沉淀生成^[6]。

表 1 人工唾液配方(单位:mM)

试剂	KCl	MgCl ₂ · 6H ₂ O	CaCl ₂ · 2H ₂ O	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	NaF
浓度	8.38	0.29	1.13	4.62	2.40	0.022

1.2 样品的表征

45S5 生物玻璃粉体的粒径分布采用激光粒度分析仪 (MS2000, Malvern, England); 粒子在牙釉质表面的粘附量及其粒径尺寸分布采用光阻法激光液体颗粒计数器 (HIAC 9703) 进行计算; 样品经过 7 天模拟口腔唾液浸泡后, 通过扫描电镜 (SEM, JSM-6700F, JEOL, Tokyo, Japan) 观察浸泡前后的牙釉质表面形貌, 同时观察样品横断面, 观察矿化层的厚度。采用超声震荡的形式获得矿化层, 用铜网收集, 在透射电镜 (TEM, JEM-2100F, JEOL, Japan) 下观察矿化层和牙釉质基体的微观结构。表面力学强度通过纳米压痕仪 (Hysitron, Minneapolis, MN) 测试, 最大载荷是 $1000\mu\text{N}$, 卸载率为 $200\mu\text{N}/\text{s}$, 每个样品上随机测试 10 个点, 用相关软件计算其微硬度 (Hv) 及弹性模量 (Er), 取平均值, 最后数据进行统计学偏差分析 ($p < 0.05$)。表面的粗糙度 (Ra) 通过原子力显微镜 (AFM-Digital Instruments-NanoScope III, Santa Barbara, CA, USA) 进行测试, 测试区域为 $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, 每个样品取 3 个平行样, 算取平均值 \pm 偏差 (S. D.), 最后进行统计学评估。

2 结果

2.1 粒径的分布及粘附量

图 1 为 45S5 生物活性玻璃经过 300 目筛子过筛后, 激光粒度仪测试其粒径尺寸分布。可以看出粒径尺寸分布范围很广, 主要集中在 $30 \sim 50\mu\text{m}$ 之间, 在 $1 \sim 10\mu\text{m}$ 之间也有少量分布。进一步测试其牙釉质表面粘附量, 结果如图 2 所示, 粘附在牙釉质

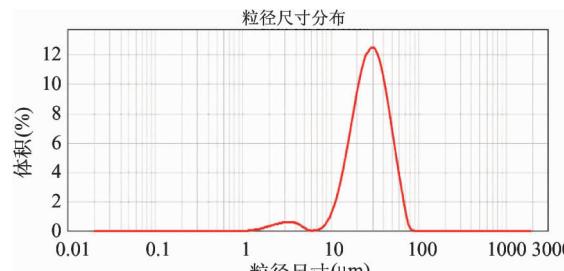


图 1 45S5 生物玻璃过 300 目筛后粒子尺寸的分布

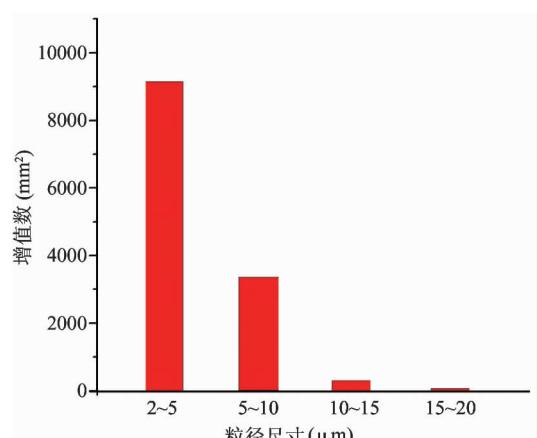


图 2 45S5 生物玻璃在牙釉质表面粘附量及粒径尺寸分布

表面的粒径尺寸主要分布在 $2 \sim 10 \mu\text{m}$ 之间,且 $2 \sim 5 \mu\text{m}$ 较 $5 \sim 10 \mu\text{m}$ 的量较多。

2.2 矿化后的成分分析及表面结构

通过 XRD 测试其牙釉质表面的主要成分及结构如图 3 所示。和 JCPDS 卡片(PDF09-0432)比对,正常的牙釉质结构主要是无机的羟基磷灰石(图 3(a)),当样品经过酸处理后,表面的矿物质流失,主要的特征峰如(210)、(211)、(222)、(213)减弱,有的甚至消失如(202)、(304)(图 3(b))。而经过 45S5 生物玻璃处理后,浸泡在模拟口腔唾液中 7 天,表面形成的矿化层结构又恢复到类似的羟基磷灰石结构,且在(201)晶面发生了择优生长。扫描电镜(SEM)图片显示(如图 4),牙釉质经过表面抛

光后,表面有轻微划痕,经过模拟唾液浸泡后,形成了蠕虫状的类骨磷灰石结构。说明 45S5 生物玻璃具有良好的生物活性,能诱导类骨磷灰石生成,修复酸蚀的牙釉质。

进一步观察仿生矿化后矿化层的微观结构的结果如图 5 所示。图 5(a)是 SEM 高倍照片,可看到形成矿化层的厚度在 $0.8 \sim 1.2 \mu\text{m}$ 之间。在透射电镜(TEM)下观察,矿化层的晶粒大小不均一(图 5(b)),在高倍下,可观察到晶格结构,且结晶性很高。在(211)晶面上,晶格间距是 $(2.7 \pm 0.01) \text{ \AA}$ (图 5(b₁)),接近于羟基磷灰石的晶间距(2.81 \AA)。牙釉质基体在 TEM 下观察,可看到若干条平行线(即生长线),在这些生长线上,是矿化较少的部分,也是易受酸蚀的部分(图 5(c))。高倍下,可见到釉柱晶体结构,呈六方棱柱体状,平均厚度约为 40 nm (图 5(c₁))。

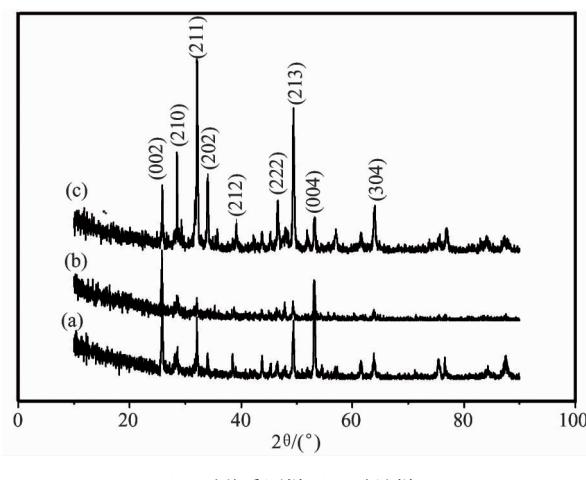


图 3 牙釉质经过不同处理后的 XRD 图谱
(a) 牙釉质原样; (b) 酸蚀样;
(c) 经过模拟口腔唾液浸泡 7 天后样品

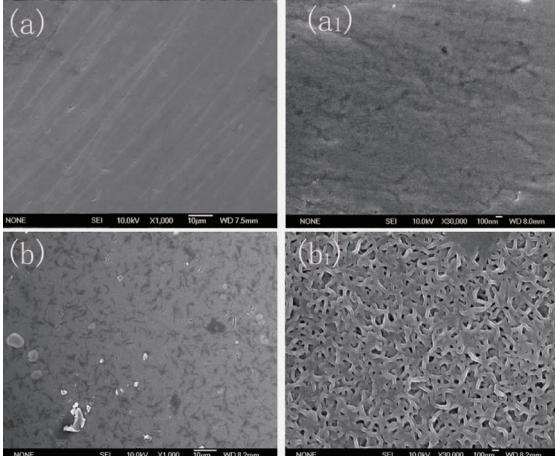
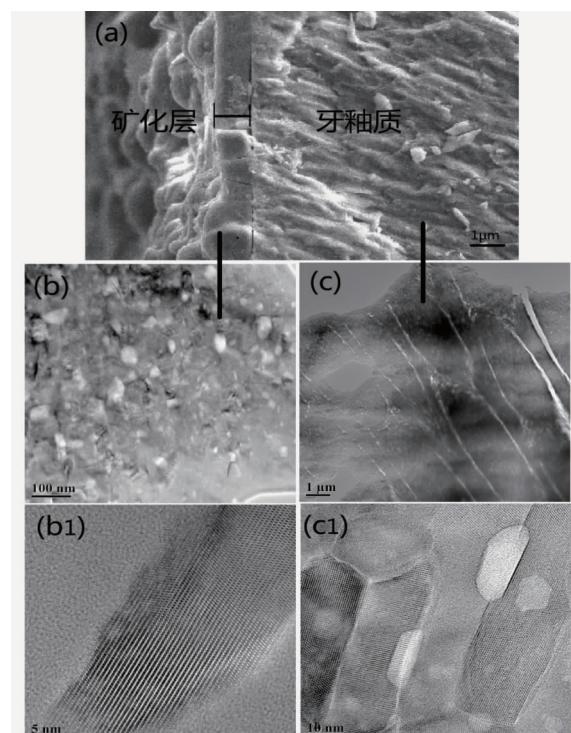


图 4 牙釉质样品经过模拟口腔唾液浸泡前
(a) (a1) 和浸泡 7 天后(b) (b1) 的 SEM 图



(a) SEM 的纵面图;(b) 和 (b₁) 矿化层的 TEM 图;
(c) 和 (c₁) 牙釉质基体的 TEM 图

图 5 牙釉质基体和矿化层的微观结构

2.3 纳米力学性能

不同牙釉质样品的纳米力学性能结果如表 2 所示。经过 45S5 矿化后的酸蚀牙釉质样品,无论是微

硬度(H_v)还是弹性模量(E_r)，力学强度得到了提高。

表 2 不同牙釉质样品表面力学性能的纳米压痕仪测试结果

样品	H_v (GPa, s. d.)	E_r (GPa, s. d.)
原样	4.27 ± 0.47	83.40 ± 7.1
酸蚀样	$4.03 \pm 0.35 *$	$78.40 \pm 5.42 *$
矿化样	$5.37 \pm 0.92 *$	$108.88 \pm 3.58 *$

* 代表样品和原样比较, 表现为显著性差异($p < 0.05$)

2.4 矿化层的表面光洁度

牙釉质样品的表面粗糙度如表 3 所示。经过抛光处理后, 牙釉质表面粗糙度(R_a)是 58.38nm , 酸蚀处理后, 随着矿物质的流失, 表面的粗糙度有所提高。经过 45S5 矿化处理后形成的矿化层, 表面粗糙度低于抛光的牙釉质原样。

表 3 不同牙釉质样品表面粗糙度(R_a)的 AFM 测试结果(单位: nm)

样品名称	原样	酸蚀样	矿化样
粗糙度	58.38 ± 3.7	$88.65 \pm 3.6 *$	53.16 ± 3.4

* 代表样品和原样比较, 表现为显著性差异($p < 0.05$)

3 讨论

材料的粒径筛选是仿生矿化的重要前提之一。大的粒径会使粘附效果较差, 而太小的粒径又会影响矿化效果。经过筛选和优化, $2 \sim 5\text{ }\mu\text{m}$ 的 45S5 生物活性玻璃在模拟口腔唾液微环境中诱导牙釉质表面仿生矿化较好, 在一周的时间内表面就形成一层矿化层, 成分和牙釉质的接近, 且力学性能及光洁度都优于酸蚀的牙釉质表面。尽管形成的矿化层晶粒大小不一, 这与牙釉质表面的晶型、脱矿程度和晶格取向有关^[7]。牙齿的柱状晶生长时在生长线位置极易被酸蚀, 导致脱矿, 表现出钮扣状结构。本实验的仿生矿化, 牙釉质表面形成大小不一的晶粒, 在一定程度上能增强牙釉质的物理机械性能, 减小表面面积, 不易受到酸的溶解。

牙齿最重要的功能就是持久咀嚼, 因此, 牙齿的

力学性能是非常重要的。纳米压痕技术已广泛应用于牙齿纳米及微米尺度力学性能的研究, 获得若干微区力学性质分布^[8]。由于牙釉质的结构是很复杂的, 结构凸凹不平, 尽管 Jeng 等人证实牙釉质的力学强度和减少的弹性模量分别是(5.29 ± 0.13) GPa 和(86.12 ± 1.01) GPa^[9], 但是牙釉质不同, 位置的力学性能也不同, 实验证明, 对于磨牙来说, 从牙尖到牙釉质和牙本质连接处, 力学强度和减少的弹性模量呈递减趋势, 力学强度分别为 $6 \sim 3\text{GPa}$, 弹性模量为 $70 \sim 115\text{GPa}$ ^[10]。因此, 对于复杂的牙釉质结构, 本实验选择抛光的牙釉质作为对照样进行力学性能测试, 结果表明抛光的牙釉质力学性能比自然的牙釉质力学性能低, 可能是由于牙釉质表面的釉柱被移除所致。通过比较, 经过 45S5 矿化的牙釉质, 力学强度得到了提高, 这在保持牙齿持久咀嚼功能方面起着重要的作用。同时, 光滑的牙釉质表面可减少细菌的粘附和牙菌斑的生成, 利于口腔的清洁^[11]。口腔中有唾液蛋白参与牙釉质的修复及矿化, 唾液蛋白会影响着矿化层的结构, 因此, 下一步将探讨唾液蛋白对仿生矿化层的影响。

4 结论

45S5 生物活性玻璃粉体的粒径在微米级, 经过 300 目筛后, 粉末用水调配成浆料, 粘附在牙釉质表面。粘附的粒径的尺寸集中在 $1 \sim 10\text{ }\mu\text{m}$, 其中 $2 \sim 5\text{ }\mu\text{m}$ 的颗粒更易于粘附在牙釉质表面。经过处理的样品浸泡在模拟口腔唾液 7 天后, 表面形成一层致密的矿化层, 结构类似于羟基磷灰石结构, 且表面的力学强度比抛光的牙釉质表面的力学强度高, 矿化层表面较光洁。本研究证明 45S5 生物活性玻璃有利于酸蚀牙釉质的再矿化, 为牙齿的修复与保护奠定了理论基础。

参考文献

- [1] Hench L L, Splinter R J, Allen W C, et al. Bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1971, 5: 117-141
- [2] Bosetti M, Cannas M. The effect of bioactive glasses on

- bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials*, 2005, 26: 3873-3879
- [3] 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 Biomaterialia*, 2010, 6: 3740-3746
- [4] Lefebvre L, Chevalier J, Gremillard L, et al. Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments. *Acta Materialia*, 2007, 55: 3305-3313
- [5] Zhong J P, Greenspan D C. A microstructural examination of apatite induced by Bioglass® in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2002, 13: 321-326
- [6] Amaechi B T, Higham S M. In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. *Journal of Dentistry*, 2001, 29: 371-376
- [7] 李红, 李兰英, 薛博等. 极性分子基团诱导的牙釉质原位仿生矿化研究. 中国生物医学工程学报, 2011, 30(2):316-320
- [8] Ge J, Cui F Z, Wang X M, et al. Property variation in the prism and organic sheath within enamel by nanoindentation. *Biomaterials*, 2005, 26: 3333-3339
- [9] Jeng Y R, Lin T T, Wong T Y, et al. Nano-mechanical properties of Fluoride-treated Enamel surfaces. *Journal of dental Research*, 2008, 87: 381-385
- [10] Cuy J L, Mann A B, Livi K J, et al. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Archives Oral Biology*, 2002, 47: 281-291
- [11] Quirynen M. The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results of in vitro and in vivo experiments. *Journal of Dentistry*, 1994, 22: S13-16

Study of bionic mineralization of acidic enamel with 45S5 bioactive glass

Dong Zhihong*, Zhou Changchun**, Nie Zhiping*

(* Department of Materials, Chengdu University, Chengdu 610106)

(** National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract

Acidic etched enamel was treated with the 45S5 bioactive glass to induce the enamel's mineralization in the simulated oral fluid (SOF). The comparative analysis of the samples of mineralized layer and base enamel was conducted by using the techniques of laser particle size analyzer, X-ray diffractometry (XRD), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM) and nanoindentation. The results indicated that a range size of 45S5 particles (1~10 μm) were adhered onto the acidic etched enamel surface, and when soaked in the SOF for 7 days, a mineralized layer was formed. The layer's structure was similar to apatite, and its thickness was about 0.8~1.2 μm, and its mechanical properties and surface roughness were superior to that of etched enamel. The 45S5 bioactive glass can be used as a bionic mineralization material to protect teeth from dental caries.

Key words: enamel, 45S5 bioactive glass, remineralization