文章编号:1000-5404(2006)13-1409-04

论著

# 菌斑液对釉质脱矿和表面超微结构影响的体外研究

行勇军,刘鲁川,韩 旭 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所口腔科,重庆 400042)

**提 要:目的** 观察人工菌斑液不同矿物质饱和度($DS_{EN}$,$DS_{FA}$)对釉质表面下脱矿量的变化及其对表面超微结构的影响。**方法** 以去离子水作为空白对照组,而以不同$DS_{EN}$(0.1~0.5)组成的人工菌斑液为实验组,分别对6组釉质磨片连续脱矿96 h后,以激光共聚焦显微镜定量评价各组釉质块脱矿差异,以扫描电镜(×5 000)观察釉质表面超微结构的变化。**结果** 仅在$DS_{EN}$(0.1~0.3)组发生了典型的釉质表面下脱矿,并且随着$DS_{EN}$的升高,釉质脱矿量显著下降($P<0.01$),表层微孔数目减少;而$DS_{EN}$(0.4、0.5)组未见脱矿及微孔,表面为均质样再矿化层覆盖。**结论** 菌斑液不同矿物质饱和度对釉质表面结构变化有重要影响,并进而影响表面下脱矿进程。

**关键词:** 菌斑液;釉质脱矿;釉质表层;共聚焦
**中图法分类号:** R-33; R780.2; R781.1 **文献标识码:** A

# Relationship between enamel demineralization and ultrastructure of surface layer under driving forces of dental plaque fluid

XING Yong-jun, LIU Lu-chuan, HAN Xu (Department of Stomatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of driving forces similar to those found in dental plaque fluid on the enamel demineralization and ultrastructure of surface layer. **Methods** The sections of human enamel were exposed to lactic acid solutions with degree of saturation with respect to enamel [$DS_{EN}$(0.1-0.5)] and degree of saturation with respect to fluoroapatite [$DS_{FA}$(1.08-5.37)] for 96 h at 25 ℃, using the deionized water as control in the same conditions. Enamel demineralization was monitored using SEM and confocal laser scanning microscopy (CLSM). **Results** Only was enamel subsurface demineralization detected in solutions with $DS_{EN}$(0.1-0.3). Enamel mineral loss and micropores of surface layer decreased significantly with increasing $DS_{EN}$ and $DS_{FA}$ values. However, no mineral loss and micropores of surface layer was observed in sections of enamel exposed to solutions with $DS_{EN}$ values of 0.4 and 0.5, which were covered with homogeneous remineralization layer. **Conclusion** The demineralization driving forces similar to dental plaque fluid under different $DS_{EN}$ and $DS_{FA}$ have significant effects on the surface layer of enamel and the subsurface demineralization process.

**Key words:** plaque fluid; enamel demineralization; surface layer; confocal microscopy

早期龋病是以牙菌斑代谢产酸,继而导致牙体硬组织表层下脱矿为主要特征。目前体外研究已证实这一脱矿过程高度依赖菌斑液中相对于釉质的矿物质饱和度(degree of saturation with respect to enamel, $DS_{EN}$),其大小决定了釉质脱矿驱动力[1];而釉质脱矿是一个釉质表面控制的化学动力过程,其表面的超微结构的变化直接影响表面下脱矿进程,在正常口腔环境中,菌斑液相对于氟磷灰石的矿物质饱和度(degree of saturation with respect to fluoroapatite, $DS_{FA}$)与釉质表面层结构、特性等变化更为密切[2],但是,对菌斑液不同矿物质饱和度对釉质表面下脱矿和表面超微结构的改变的关系,目前未完全明了。因此,本实验体外模拟人工菌斑液,对以上两者之间的关系进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 釉质块的制备

将临床收集的无龋、无裂纹的磨牙以单面金刚砂盘分离冠根,取牙冠的长轴方向切割出厚度约2 mm的釉质片,以600~1 200 r/s无氟金刚砂纸逐级磨除釉质表层约500 μm,磨平,浮石粉抛光,并最终形成釉质块标本60块(3 mm×3 mm×1 mm)。去离子水超声清洗10 min后吹干;防酸指甲油在釉质块表面形成试验开窗区(2 mm×2 mm)。

作者简介:行勇军(1971-),男,陕西省西安市人,硕士,主治医师,主要从事龋病牙髓病学方面的研究。E-mail: xxyjj@21cn.com
通讯作者:刘鲁川,电话:(023)68757368
收稿日期:2005-01-19;修回日期:2005-06-15

### 1.2 脱矿液的预备

脱矿液组成及矿物质饱和度(DS)取值于以往报道的口腔原位菌斑液矿物质成分。预先配制 0.1 mol/L $CaCl_2$ 和 0.1 mol/L $KH_2PO_4$ 储备液,向内加入羟基磷灰石粉末(hydroxyapatite powder, 0.5 g/250 ml, Sigma),连续振荡 48 h 后聚碳酸脂膜(0.4 μm, HTTP02500, Milipore, USA)过滤以去除残余的氟。0.5 mol/L 乳酸和 $10^{-4}$ mol/L NaF 储备液使用前临时配制。取以上储备液按表 1 成分配制各组脱矿液,各组脱矿液中均含 3 mmol/L 叠氮钠作为抑菌剂(以上试剂均为分析纯)。脱矿液中的额定的 $DS_{EN}$ 及 $DS_{FA}$ 根据 Moreno[3] 公式及软件计算,分别表达为 $DS_{EN} = [(Ca)^5(OH)(PO)^3/K_{EN}]^{1/9}$ 和 $DS_{FA} = [(Ca)^5(F)(PO)^3/K_{FA}]^{1/9}$,括号内为各组成的离子活度积;$K_{EN} = 5.5 \times 10^{-55}$、$K_{FA} = 2.63 \times 10^{-60}$,取值于羟磷灰石(HA)和氟磷灰石(FA)的溶解积常数。试验体系中所有脱矿液相对于釉质、羟磷灰石(HA)和二水合磷酸钙(DCPD)的饱和度均为不饱和状态,而相对于氟磷灰石则为过饱和状态。

**表 1 各组脱矿溶液组成(mmol/L)**

| 组别 | Ca | P | F | Lactic | pH | $DS_{EN}$ | $DS_{FA}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3.0 | 6.5 | 0.005 | 85.0 | 4.60 | 0.10 | 1.08 |
| 2 | 5.8 | 13 | 0.005 | 60.0 | 4.60 | 0.20 | 2.16 |
| 3 | 9.5 | 18 | 0.005 | 51.0 | 4.60 | 0.30 | 3.23 |
| 4 | 14 | 22 | 0.005 | 44.8 | 4.60 | 0.40 | 4.31 |
| 5 | 17 | 35 | 0.005 | 45.6 | 4.60 | 0.50 | 5.37 |

### 1.3 脱矿处理

将釉质块随机分为 6 组(序号 0~5),其中 0 组为空白对照组,以去离子水处理,第 1~5 组为实验组,以不同 DS 脱矿液脱矿处理,将分组后釉质块开窗区向上,分别置于含 10 ml 去离子水或脱矿液的有盖小瓶中,25 ℃恒温连续作用 96 h 后取出(其中组 4、组 5 釉质未见脱矿,留部分未染色半切釉质块继续脱矿 3 个月),去离子水冲洗 30 s,吹干。

### 1.4 脱矿釉质块的观察

以低速金刚砂盘从釉质块开窗区中央剖开,分别对其脱矿深度和表面超微结构进行评价

1.4.1 脱矿量评价 以 0.1 mmol/L 罗丹明 B 荧光染料对切割后釉质块染色 1 h,勿冲洗,吹干,剖面向下,置激光共聚焦显微镜(LCS-SP2, Leica, Germany)下观察,扫描平面从剖面上 10~50 μm 处开始以避免表面玷污层的干扰。调节参数如下:power: 46%, slit:20 μm,激发波长:488 nm,发射波长:580 nm,物镜:4×10 实验前后均保持参数不变。使用以下 3 个指标评价代表釉质脱矿量的荧光染料渗透进入脱矿釉质孔隙量:脱矿釉质块缺损荧光面积(area of fluorescent lesion, A),总荧光量(total fluorescence, TF)(即所测面积内所有荧光像素总和),平均荧光量(average fluorescence, AF)。

1.4.2 釉质块表面超微结构观察 将剖开未染色的釉质块超声振荡清洗 15 min,25 ℃干燥 24 h 后置扫描电镜(AMRAY-1000B, USA)载物台上,真空一次性喷金,设置参数:20 kV,分别在×1 000, ×5 000 分辨率下观察。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计分析软件处理各组数据,单因素方差分析(Tukey HSD)检验各组间共焦参数差异。

## 2 结果

### 2.1 各组间釉质脱矿共焦参数比较

表 2 共焦指标显示,组 4、组 5 釉质同空白对照组一样在 96 h 的实验周期内都没有发生表面下脱矿现象,并且在延长脱矿至 3 个月后仍未见脱矿;而已脱矿的组 1~3($DS_{EN}$, 0.1~0.3)中,随着 $DS_{EN}$ 的升高,釉质脱矿面积(A, 45.7~18.5×$10^3$ $\mu m^2$, $P<0.01$)、脱矿区总的荧光强度都呈显著降低(TF, 25.9~9.2×$10^5$, $P<0.01$),而脱矿区平均荧光强度只有组 1 较组 3 有显著下降(AF, 122.4~102.1, $P<0.05$)。

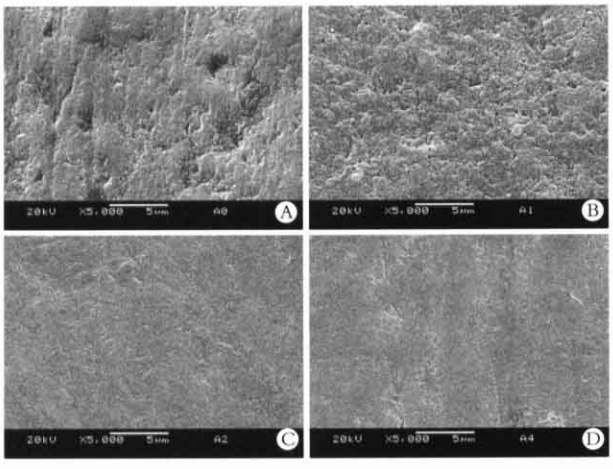
**表 2 共聚焦显微镜测量的不同矿物质饱和度脱矿液对釉质脱矿量变化($\bar{x} \pm s$)**

| 组别 | $n$ | A($\times 10^3$ $\mu m^2$) | TF($\times 10^5$) | AF |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 10 | $45.7 \pm 2.8^a$ | $25.9 \pm 5.2^a$ | $122.4 \pm 20.0^a$ |
| 2 | 10 | $30.8 \pm 3.4^{ab}$ | $17.1 \pm 3.1^{ab}$ | $120.9 \pm 27.9^a$ |
| 3 | 10 | $18.5 \pm 2.7^{ad}$ | $9.2 \pm 1.7^{ad}$ | $102.1 \pm 12.0^{ac}$ |
| 4 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 10 | 0 | 0 | 0 |

a: $P<0.01$,与对照组比较; b: $P<0.01$, c: $P<0.05$,与 1 组比较; d: $P<0.01$ 与 2 组比较

### 2.2 扫描电镜观察釉质表面超微结构变化

未脱矿釉质磨片表面出现了典型的"微孔网络"结构,即其上散布着 1~3 μm 大小不等的微孔,表层矿物质组织致密(图 1A);在已脱矿的组 1~3($DS_{EN}$, 0.1~0.3)中可见,组 1 釉质表层先前空白组的"微孔"结构明显,但孔径略有缩小(直径 > 1 μm),同时出现密集的 0.1~0.5 μm 大小微孔(图 1B),随着 $DS_{EN}$ 的升高,组 2、3 釉质表层这些直径在 0.1~0.5 μm 的微孔明显减少,组 2 釉质表层先前空白组较大的"微孔"结构消失(图 1C),而组 4、5 釉质表面则仅见均质样的再矿化层覆盖,未见微孔形成(图 1D)。




A: 空白对照组; B: 实验组 1 已脱釉质磨片; C: 实验组 2 已脱矿釉质磨片; D: 实验组 4 已脱釉质磨片

**图 1 各组釉质块脱矿 96 h 后表面超微结构变化** (SEM ×5 000)

## 3　讨论

早期釉质龋的形成是一个复杂的表面下脱矿与再矿化的化学动力过程。影响其表层下脱矿进程的诸多因素中，如菌斑液 $DS_{EN}$、pH、有机酸构成等，菌斑液 $DS_{EN}$作为影响釉质脱矿驱动力大小的主要指标，对釉质的脱矿起到了主要的作用[4]；而表层下脱矿是一个受釉质表面控制的过程。菌斑液 $DS_{EN}$以及和其密切相关的 $DS_{FA}$、$DS_{CaF2}$对釉质表面特征的影响及其和表面下脱矿的相互关系，目前少见文献报道，对此，我们进行了初步的探讨。

Margolis[1] 和 Gao 等[4] 对不同 $DS_{EN}$组成的脱矿液对釉质脱矿的体外研究已证实，釉质发生脱矿类似于早期龋的表面下脱矿，其速率随着 $DS_{EN}$的升高而显著下降。在本实验中，可以发现当随着 $DS_{EN}$从 0.1～0.3 升高时，釉质脱矿面积和脱矿区总荧光强度呈显著下降趋势（$P<0.01$），支持以往的研究结果。同时可以发现，人工菌斑液 $DS_{EN}$轻微的变化即可以显著影响釉质脱矿（组 1 釉质脱矿面积分别是组 2、3 的 1.5 倍和 2.5 倍）。本实验中脱矿液各组分虽然与以往研究的脱矿液体系不同，但更为接近口腔原位菌斑液成分，因此能够直观的反映口腔原位菌斑液在不同 $DS_{EN}$条件下的致龋性。

本实验中当 $DS_{EN}>0.4$ 时（组 4、5）釉质表面下均未出现脱矿，即使脱矿液中 pH 达到 4.6，脱矿延长至 3 个月，这一结果支持 Zhang[5] 的研究发现，他使用无氟的脱矿液（$DS_{EN}$，0.28～0.79，pH 5.0）对釉质脱矿发现当 $DS_{EN}>0.41$ 时釉质在长达 11 个月周期内都无脱矿发生。其可能的原因在于釉质主要由羟基磷灰石组成的生物磷灰石晶体，但其含有较多的 $HCO^{-3}$及其他杂质元素，而釉质的溶解积常数取值于化学纯的羟基磷灰石（$K_{EN}$），二者的溶解特性并不完全一致，而 Zhang[5] 和 Theuns 等[6] 均发现釉质表面的 $K_{EN}$取值应在 $10^{-58}$～$10^{-60}$之间，这表明表面釉质的溶解性远远小于化学纯的羟基磷灰石。

虽然目前已证实釉质表层由于矿化程度高，含较高的氟及其他抗龋微量元素，抗龋性较表层下矿物质高，但是这一现象并不能完全解释表层下脱矿现象。在本实验中，所有釉质块标本都被完全磨除表层，去除了釉质表面较高矿化层的影响，结果显示实验组所有釉质表面均形成了一层基本完整的表面层。这一现象的原因，Margolis 等[1,4] 认为，在釉质龋初期，表层釉质部分溶解并随之出现主要的表层下溶解过程，表层下溶解逸出的钙、磷等离子以及早期釉质表面矿物质的溶解均在表层局部形成了一个 $DS_{EN}$较釉质过饱和的动态平衡状态，而局部 $DS_{EN}$的过饱和造成了表层矿物质的再沉积，是表层形成的主要原因。

Featherstone 等[7] 认为酸在侵蚀釉质时使其表面晶体间隙所形成的“微孔网络”打开并始终处于开放状态，酸易于进入釉质并与表面下的矿物质离子沿此途径进行双向扩散，其后周学东等[8] 使用人工菌斑对釉质脱矿的表面超微结构研究中也发现这一现象。而在本实验中，在脱矿较为严重的组 1 发现原先的釉质“微孔”结构仍然存在，但是较为局限。表明早期釉质脱矿中存在着酸沿釉质晶体间隙侵蚀的现象。以上研究证明釉质表面的“微孔网络”是早期釉质龋表面下脱矿的主要途径。

有部分研究认为釉质在脱矿进程中存在其表面矿物质先溶解再沉积的改建过程[2]，在此进程中可能同时存在酸对表层“微孔”的侵蚀扩大以及表面矿物质的改建，在本实验中已脱矿组 1～3 均出现了空白对照组釉质磨片所没有的密集的微孔（0.1～0.5 μm），这些微孔是由疏松的再沉积矿物质所形成的，而非由酸作用釉质晶体间隙扩大所致，我们认为这些更小的微孔可能也是酸及表面下脱矿离子扩散的途径，并受脱矿液不同 $DS_{EN}$的影响：从电镜观察可以发现，随着 $DS_{EN}$的升高，表面层再沉积矿物质密度增大，彼此紧密嵌合的矿物质减少了这些由再沉积矿物质所形成的釉质微孔的数量和直径，此时釉质表面下脱矿速率显著降低。其原因可能在于，脱矿液体系中总的 $DS_{EN}$决定釉质表面层局部的 $DS_{EN}$大小，较高的 $DS_{EN}$脱矿液的釉质表面局部 $DS_{EN}$亦较高，再矿化作用较强，表面微孔的形成减少，这些减少的微孔使得酸和脱矿离子双向扩散减少，降低了釉质的脱矿速率。

正常菌斑液中氟含量处于极低的痕量水平（2～17 μmol/L），但是即使在此浓度下也可以大幅度增加釉质的再矿化作用，其作用主要与菌斑液及从釉质表面下脱矿逸出的钙、磷等形成难溶的氟磷灰石晶体，增加表面层的抗龋性[9]，在本实验脱矿液中，氟浓度取值于以往文献报道的菌斑液氟浓度，加之各组人工菌斑液的 $DS_{EN}$、$DS_{CaF2}$和 $DS_{DCPD}$均为不饱和状态，而仅有 $DS_{FA}$过饱和，可以推测，釉质表面改建、再沉积的矿物质可能是以氟磷灰石为主的矿物质，这些氟磷灰石增加了表面层的抗龋性。

虽然本实验初步探讨了菌斑液相对于各种矿物质相饱和度对其表层的形成和釉质脱矿之间的关系，但口腔内菌斑液组成远较体外复杂，其致龋性受诸如不同有机酸种类、蛋白质、菌斑基质矿物质含量等多种因素的影响，有待对口腔原位菌斑液的致龋性进行进一步的研究。

（致谢：哈佛牙科学院 Dr. Mgrlois 和北京大学口腔医学院高学军教授提供计算矿物质饱和度软件，特此感谢。）

## 参考文献：


[1] MARGOLIS H C, ZHANG Y P, LEE C Y, *et al*. Kinetics of enamel demineralization *in vitro*[J]. J Dent Res, 1999, 78(7): 1326-1335.

[2] MARGOLIS H C, MORENO E C, MURPHY B J. Effect of low levels of fluoride in solution on enamel demineralization *in vitro*[J]. J Dent Res, 1986, 65(1): 23-29.

[3] MORENO E C, MARGOLIS H C. Composition of human plaque fluid [J]. J Dent Res, 1988, 67(9): 1181-1189.

[4] GAO X J, ELLIOTT J C, ANDERSON P. Scanning and contact microradiographic study of the effect of degree of saturation on the rate of enamel demineralization[J]. J Dent Res, 1991, 70(10): 1332-1337.

[5] ZHANG Y P, KENT R L, Jr., MARGOLIS H C. Enamel demineralization under driving forces found in dental plaque fluid[J]. Eur J Oral Sci, 2000, 108(3): 207-213.

[6] THEUNS H M, DRIESSENS F C, VAN-DIJK J W, *et al*. Experimental evidence for a gradient in the solubility and in the rate of dissolution of human enamel[J]. Caries Res, 1986, 20(1): 24-31.

[7] FEATHERSTONE J D, HOLMEN L, THYLSTRUP A, *et al*. Chemical and histological changes during development of artificial caries[J]. Caries Res, 1985, 19(1): 1-10.

[8] 周学东，李继遥，谭 红. 早期龋表层结构的超微观察[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志，1997，7(3)：145-147.

[9] MARGOLIS H C, MORENO E C. Composition and cariogenic potential of dental plaque fluid[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1994, 5(1): 1-25.


（编辑 薛国文）

# 个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)13-1412-01

## 右乳腺癌术后并发乳糜漏1例

岳 鹏，贺青卿，姜 军 （第三军医大学西南医院乳腺疾病中心，重庆 400038）

患者，女，37岁，因“右乳房包块2年余”入院。查体：右侧乳头稍凹陷，右侧乳房外上象限扪及一约3 cm×3 cm大小包块，质硬，界限不清，表面不光滑，与皮肤粘连，活动度差，无压痛。包块穿刺活检病理：右乳癌。临床诊断右乳腺癌，遂于术前TE方案化疗1周期后在全麻下行右乳腺癌改良根治术+经肋间腔内乳淋巴结活检术。术后病理报告：右乳浸润性导管癌。术后患者无特殊不适，切口无渗血及渗液，腋窝引流管通畅，引流量逐渐减少。术后第7天查体发现胸壁负压周围皮肤有波动感，穿刺抽出乳白色液体20 ml，乳糜试验阳性。坐位右下肺野第7肋间叩诊浊音，超声见少量胸腔积液，胸腔穿刺抽出同性质液体12 ml。于原切口中部放置引流管至肋与下，负压吸引，切口周围加压包扎，引流量每日约100-150 ml。术后第58天查体发现胸壁引流管周围皮肤与胸壁均已牢固粘连，拔除引流管，于引流管出口下方第5肋间作一长约3 cm的横切口，向下分离见第6肋间约1 cm×1 cm大小范围内有乳糜渗出，予8字缝扎，生物蛋白胶喷涂，加压包扎。此后渗液逐渐减少，术后70 d左右完全消失。查体胸前壁皮肤与胸壁已牢固粘连，叩诊右下肺野清音，超声未见胸腔积液。

### 讨论

正常情况下，胸导管起自乳糜池，经主动脉裂孔进入胸腔，上行至第5胸椎高度向左侧斜行，沿脊柱左前方上行，收纳下肢、盆部、腹部、左上肢、左胸部和左头颈部的淋巴；右淋巴导管引流右上肢、右胸部和右头颈部的淋巴。中央乳糜池至胸导管的淋巴道中的淋巴因含乳糜微粒而呈乳白色，其他部位淋巴管道中的淋巴液则无色透明[1]。本例右乳腺癌术后出现乳糜漏及乳糜胸实属罕见，国外尚少见类似报道，国内亦仅见1例[2]。我们分析其原因可能与胸导管变异有关。杨晓华等[3]报道1例胸导管在第5胸椎高度继续沿右侧上行，最后注入右颈静脉角。徐小良等[4]报道1例胸导管主干于第4胸椎前缘下方分为左右两支，分别注入左右颈静脉角，且其末端接受右颈干、右锁骨下干及右支气管纵隔干，分析其右支胸导管形成系胚胎期右胸导管未退化的缘故。分析本病例，该患者胸导管变异可能性大，如作淋巴管造影可确诊。本例出现乳糜漏及乳糜胸后采用加压包扎及负压引流，但效果并不理想。综合文献报道，结合本例治疗经验，乳腺癌术后一旦出现胸前壁乳糜漏，可先行加压包扎，若短期观察治疗无效，应立即查找、缝扎漏点。如有条件，可行淋巴管造影，准确查找乳糜漏点并明确有无胸导管变异。

关键词：乳腺癌；乳糜漏

中图法分类号：R655.025 文献标识码：B

### 参考文献：


1 柏树令. 系统解剖学[M]. 第5版. 北京：人民卫生出版社，2001：261-266.

2 霍树德，刘发义. 乳腺癌根治术合并乳糜漏的诊治体会[J]. 河南肿瘤学杂志，1996，9(3)：218.

3 杨晓华，赵 严，金发昌. 胸导管变异1例[J]. 中国临床解剖学杂志，2000，18(4)：365.

4 徐小良，孙铺元. 分支状胸导管1例[J]. 中国临床解剖学杂志，1997，15(1)：73.


（编辑 栗 嘉）

作者简介：岳 鹏(1982-)，男，重庆合川市人，硕士研究生，主要从事乳腺癌复发方面的研究。电话：023-68765278.

收稿日期：2006-04-04；修回日期：2006-05-25