论著

文章编号:1000-5404(2013)02-0138-04

酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙对酸蚀牙釉质显微硬度的影响

喻明玲,林居红,胡 赟 (401147 重庆,重庆医科大学附属口腔医院儿童牙病中心及口腔预防科,重庆市口腔疾病与生物医学研究中心)

[摘要] **目的** 用显微硬度测量法研究酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙(casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate,CPP-ACP)对碳酸饮料酸蚀后的牙釉质的再矿化作用。**方法** 收集临床拔除的第三磨牙共15颗,制成牙釉质样本30个,完全随机分为:去离子水组(阴性对照组)、CPP-ACP组(实验组)、氟保护漆组(阳性对照组),每组10个样本。各组样本分别用可口可乐酸蚀,7次/d,每次2 min,8 h内完成,共7 d,然后分别进行再矿化处理。去离子水组置于去离子水中,不做其他处理;CPP-ACP组和氟保护漆组分别用CPP-ACP和氟保护漆处理。分别在酸蚀前、酸蚀后和再矿化后用维氏显微硬度计测定釉质表面硬度并进行扫描电镜观察。**结果** 经可口可乐酸蚀后的牙釉质表面硬度值较酸蚀前有明显下降($P<0.05$);经再矿化处理后,CPP-ACP组和氟保护漆组牙釉质表面硬度值与去离子水组相比均有统计学差异($P<0.05$);CPP-ACP组和氟保护漆组之间的差异有统计学意义($P<0.05$)。扫描电镜观察结果显示:CPP-ACP组和氟保护漆组经过再矿化处理后,脱矿釉质表面有矿物质沉积。**结论** CPP-ACP能促进钙盐沉积于脱矿釉质表面而提高酸蚀牙釉质的显微硬度,显著促进酸蚀釉质再矿化。

[关键词] 牙酸蚀症;酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙;显微硬度;再矿化

[中图法分类号] R781.1;R916;R988.2 [文献标志码] A

Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on microhardness of erosived enamel

Yu Mingling, Lin Juhong, Hu Yun (Department of Children's Dental Center and Dental Prevention, Chongqing Research Center for Oral Diseases and Biomedical Science, Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 401147, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the remineralization potential of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on the surface microhardness of human enamel eroded by a carbonated soft drink. **Methods** Fifteen third molars were collected at clinic and were processed into 30 enamel slabs. The enamel slabs were randomly divided into 3 groups ($n=10$): deionized water group, CPP-ACP group, and fluoride vanish group. Each specimen was first immersed in a Coca-Cola drink for 2 min, 7 times a day for 7 d. Then the specimens were subjected to 3 different remineralization protocols, deionized water, CPP-ACP and fluoride vanish. Vickers microhardness (SMH) measurements were obtained at baseline, after the Coca-Cola drink erosion, and after remineralization stage. The enamel specimens were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). **Results** Enamel hardness was significantly decreased after immersion in a Coca-Cola drink ($P<0.05$). The SMH of the enamel slab treated with CPP-ACP and fluoride vanish was significantly increased compared with that of the negative control ($P<0.05$), and there was significant difference between the 2 former groups ($P<0.05$). SEM demonstrated that there were lots of minerals deposited on the surface of enamel of CPP-ACP and fluoride vanish groups. **Conclusion** CPP-ACP promotes minerals to deposit on the demineralized enamel surface to increase the SMH of the eroded human enamel, showing the remineralization potential.

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研计划项目(2012-2-126)

[通信作者] 林居红,电话:(023)88860090,E-mail: juhonglin@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121106.1905.019.html(2012-11-06)

[**Key words**] dental erosion; casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate; surface microhardness; remineralization

Supported by the Project of Medical Science and Technology Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-2-126). Corresponding author: Lin Juhong, Tel: 86-23-88860090, E-mail: juhonglin@ sina.com

牙酸蚀症(dental erosion)是指无细菌参与的情况下,由接触牙面的酸或其螯合物的化学侵蚀作用而引起的牙体硬组织的慢性、病理性的表面浅层丧失[1]。近年来,随着酸性饮料消费的增加,在儿童及青少年,饮用酸性饮料成为造成牙酸蚀症的主要危险因素,其发病率为11.6% ~66.9%[2]。早期及时、有效地使用再矿化制剂可使脱矿釉质再矿化而预防软化牙釉质的持续丧失,有利于保持牙面的完整性。氟化物作为再矿化制剂长期应用于临床,但其使用安全性一直存在争议。近年来,酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙(casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate, CPP-ACP)受到广泛关注。CPP-ACP含有高浓度的具有生物活性的钙、磷离子,无毒副作用,并且有报道指出它有抑制脱矿、促进再矿化的作用。本研究通过体外实验比较CPP-ACP和氟保护漆作用于饮料酸蚀牙釉质前后显微硬度的变化,评价CPP-ACP对酸蚀牙釉质的作用。

1 材料与方法

1.1 材料及设备

CPP-ACP(Tooth Mousse,日本GC公司),氟保护漆(牙科学柯伯脂含氟涂膜C型,北京鑫源恒信医疗器械有限公司,含NaF 5 000 ppm),可口可乐(重庆可口可乐饮料有限公司),人工唾液(人工唾液配方采用ISO/TR10271:1993标准),HVS-1000型数显显微硬度计(上海联尔试验设备有限公司)。JSM-6460LV型扫描电镜(日本电子公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 样本的制备及酸蚀处理 收集牙冠完整,因阻生拔除的下颌第三磨牙,体视镜下选择釉质表面无龋坏、无脱矿、无隐裂、无氟斑及釉质缺损的牙共15颗,清洁牙面,沿牙长轴近远中向切开制备样本30个。所有样本包埋于环氧树脂中,釉质表面暴露,分别制成高10 mm、直径25 mm大小的圆柱体标本,用碳硅砂纸将釉质表面由粗至细打磨(粒度为800、1 000、1 200、1 500、2 000目),使之呈镜面状。在磨平釉面处留出4 mm×4 mm的正方形开窗区,其余部分用抗酸指甲油涂抹封闭。将30个釉质样本完全随机分为3组($n=10$):去离子水组、CPP-ACP组和氟保护漆组。饮料选用市售瓶装碳酸饮料可口可乐(pH=2.42)。3组样本分别浸泡于100 mL饮料中,每次2 min,7次/d,于8 h内完成,共7 d,间断期置于37 ℃人工唾液中。每次浸泡更换新鲜可口可乐,人工唾液每24小时更换1次。7 d后,将可口可乐酸蚀过的3组样本用去离子水冲洗,吸干表面水分,放于去离子水中备用。

1.2.2 再矿化实验 去离子水组:去离子水处理,2次/d,每次3 min,共7 d;CPP-ACP组:按照产品使用说明,用小毛刷蘸日本GC Tooth Mousse均匀涂布于开窗处釉质表面,静置3 min,然后去离子水冲洗,2次/d,共7 d;氟保护漆组:按照厂商推荐使用方法,小毛刷蘸氟保护漆均匀涂布于开窗处釉质表面,静置3 min,去离子水冲洗,1次/d,共1 d。间断期置于37 ℃人工唾液中,每24小时更换1次人工唾液。

1.2.3 釉质表面显微硬度测量 分别在酸蚀前、酸蚀后、再矿化实验后测量牙釉质表面显微硬度(surface microhardness, SMH),使用HVS-1000型维氏数字显微硬度计,200 g负荷,加载10 s。每个釉质块测量3个点,取其平均值。

1.2.4 扫描电镜观察 各组样本分别在酸蚀前、酸蚀后、再矿化后随机选取2个样本从正中剖开,一半用于显微硬度测试,一半置于电镜固定液中用于扫描电镜观察。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 统计学分析

所得数据使用SPSS 10.0统计软件进行分析。运用自身配对t检验对各组实验前后表面显微硬度值进行比较,使用单因素方差分析对3组样本实验前后的显微硬度值进行分析,使用SNK法进行两两比较,检验水准$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 表面显微硬度测试结果

酸蚀前3组间牙釉质SMH差异无统计学意义($P>0.05$);经过7 d可口可乐处理后,3组釉质SMH均较酸蚀前明显降低($P<0.05$),但酸蚀后3组间牙釉质SMH差异无统计学意义($P>0.05$)。与阴性对照组(去离子水组)相比,经CPP-ACP和氟保护漆分别处理后的CPP-ACP组和氟保护漆组的牙釉质SMH均比酸蚀后的显著上升($P<0.05$),同时CPP-ACP组和氟保护漆组间的SMH差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

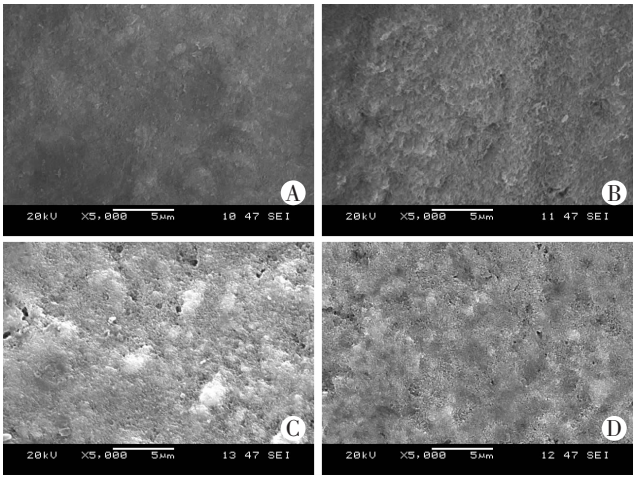
表1 3组牙釉质酸蚀前、酸蚀后及再矿化后表面显微硬度值比较(HV, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	酸蚀前	酸蚀后	再矿化后
去离子水组	348.7±10.9	268.2±13.4	276.1±14.5
CPP-ACP组	349.9±18.7	271.0±18.7	339.1±19.1^{ab}
氟保护漆组	346.1±14.6	270.0±16.3	321.4±17.4^{a}

a:$P<0.05$,与去离子水组比较;b:$P<0.05$,与氟保护漆组比较

2.2 离体牙表面扫描电镜观察结果

正常釉质表面光滑、致密平坦,未见凹陷缺损(图1A)。釉质经可口可乐酸蚀后,表面形态不规则,组织结构疏松,脱矿明显,形成无数微小间隙,呈凸凹不平的粗糙面(图1B)。CPP-ACP处理后,有散在凹陷性缺损,但表面有大量分布不均匀、致密的矿物质颗粒沉积,矿化物颗粒大小不一,结构无序,有的聚集成簇(图1C)。氟保护漆处理后,低亮度、斑片样薄膜覆盖于釉质表面,之间有点隙样和灶样缺损(图1D)。



A:正常釉质;B:可乐酸蚀后釉质;C:可乐酸蚀后经CPP-ACP处理后釉质;D:可乐酸蚀后经氟保护漆处理后釉质

图1 扫描电镜观察牙釉质样本在不同条件下的表面超微结构(×5 000)

3 讨论

研究[3]证实,许多酸性饮料的pH值为2.2~4.9,而牙釉质脱矿的临界pH值为5.0~5.5,酸性饮料能造成牙体硬组织脱矿、牙釉质软化以及牙体硬组织表面浅层丧失。近年来,国内外流行病学调查研究表明:酸蚀症在人群中普遍存在,且发病率呈上升趋势。陈亚刚等[4]对徐州市5岁和12岁儿童酸蚀症患病情况调查发现,5岁儿童牙齿酸蚀症的患病率为10.91%,12岁儿童牙齿酸蚀症的患病率为22.14%,酸性饮料是造成牙酸蚀症的主要危险因素。酸蚀症在开始阶段无自觉症状,随后会出现牙本质过敏症状,严重者出现牙髓暴露甚至牙折,而且酸蚀症和龋病及磨损也密切相关,因而早期的干预和防治非常有必要。

牙体硬组织在酸的作用下,其中的矿物质发生溶解,钙和磷酸盐等无机离子脱出即为脱矿[5]。众多研究表明,牙酸蚀症的发生过程就是牙釉质的脱矿过程。本实验采用可口可乐作为脱矿剂建立牙酸蚀症模型。有研究者通过体内及体外实验证实,牙釉质经过可乐酸蚀后会脱矿而导致表面显微硬度下降[6-7]。实验采用间断可乐浸泡法,间断期样本浸泡于人工唾液中,置于37 ℃水浴恒温箱,以模拟正常的口腔环境及饮用饮料的生活状态。7 d后测试3组可乐酸蚀后牙釉质表面显微硬度,结果显示各组釉质SMH较酸蚀前有明显降低($P<0.05$);而扫描电镜下观察发现经可口可乐酸蚀后,釉质表面形态不规则,组织结构疏松,脱矿明显,形成无数微小间隙呈凹凸不平的粗糙面。由此可见可口可乐对牙釉质的损害是肯定的。唾液中的钙、磷及其他矿物离子不断沉积在正常或部分脱矿的釉质上,并形成羟基磷灰石的过程为再矿化[8]。在牙酸蚀症早期,通过再矿化治疗可阻止牙釉质矿物质的持续丧失,预防龋病和磨损的发生,因此针对牙面酸蚀脱矿的早期再矿化治疗有着积极的意义。

氟化物在传统的再矿化药物中占了主导地位。牙面局部用氟后,在牙釉质或牙本质表面形成氟磷灰石或氟化钙,从而促进了再矿化过程。有研究指出,低浓度的氟化物的再矿化作用并不明显[9]。但是,局部高浓度氟化物的长期应用可能导致耐氟菌株的选择性生长[10],且耐腐菌株的致龋力高于亲代野生菌[11];而且,高浓度氟化物使用的安全性问题存在争议,因而寻求一种安全有效的再矿化制剂很有必要。酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptides,CPP)是以牛乳酪蛋白为原料,通过生物技术制得的具有生物活性的多肽,有很强的促钙吸收活性,它黏附在无定形磷酸钙(amorphous calcium phosphate,ACP)的表面形成毫微簇酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙复合体(casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate,CPP-ACP),抑制其进一步的成长而结晶成核,维持了钙磷离子在溶液中的稳定性,成为具有生物活性的钙、磷离子的储库[12]。CPP-ACP通过黏附在牙面上释放出具有生物活性的钙磷离子,维持了一个对于牙釉质面钙磷离子的过饱和状态,有抑制牙釉质脱矿并促进再矿化的作用[13-14]。Tantbirojn等[6]通过体外酸蚀实验以及Ranjitkar等[15]通过体外酸蚀-磨损实验均证实了CPP-ACP对脱矿釉质的再矿化作用。

本实验采用表面显微硬度测试法研究CPP-ACP对酸蚀釉质的作用。因为釉质的矿物质含量与硬度之间存在线性关系,显微硬度测试可以反映牙釉质的一个脱矿和再矿化的情况[16]。研究发现,CPP-ACP和氟保护漆均能使可乐酸蚀后的牙釉质表面显微硬度增加,且CPP-ACP组的表面显微硬度值高于氟保护漆组($P<0.05$),这与其他学者的研究结果[17]相似。有研

究指出,离体牙釉质表面显微硬度的增加和表面钙盐沉积有关,而本实验扫描电镜结果也证实了这一说法。经CPP-ACP处理后,可见釉质表面有大量分布不均匀、致密的矿物质颗粒沉积。因此,经CPP-ACP处理后的酸蚀牙釉质SMH的增加应是釉质表面矿物质沉积的结果。对于氟保护漆组和CPP-ACP组实验结果的差异可能和两种制剂的使用方法有关,根据产品说明,CPP-ACP可以每天使用2次,而氟保护漆推荐每半年使用1次。氟保护漆含有高浓度氟离子(5 000 ppm),因其使用安全性问题,所以氟保护漆仅限于专业人员定期使用,而不能作为一般的口腔护理产品让大众日常使用,在一定程度上限制了其用于牙酸蚀症预防的应用。有学者推测,CPP-ACP在口内情况下使用的效果会更好,因为获得性膜的存在能使CPP-ACP更好地结合在牙面上成为钙磷储库[18],从而更好地起到抑制脱矿和促进再矿化的作用。

CPP-ACP作为一种以钙磷为基础的制剂,无毒副作用。本实验研究显示了CPP-ACP可以显著提高酸蚀牙釉质的显微硬度,是一种有效的再矿化制剂。这为脱矿釉质的再矿化治疗提供了新方向,也为饮用酸性饮料造成的牙酸蚀症的早期防治提供一种新思路,但其确切作用机制及有效实际应用仍待进一步研究。

参考文献:

[1] Lazarchik D A, Frazier K B. Dental erosion and acid reflux disease: an overview[J]. Gen Dent, 2009, 57(2): 151-156.

[2] Wang P, Lin H C, Chen J H, *et al*. The prevalence of dental erosion and associated risk factors in 12-13-year-old school children in Southern China[J]. BMC Public Health, 2010(10): 478.

[3] Devlin H, Bassiouny M A, Boston D. Hardness of enamel exposed to Coca-Cola and artificial saliva[J]. J Oral Rehabil, 2006, 33(1): 26-30.

[4] 陈亚刚, 李雪, 胡德渝, 等. 徐州市5岁和12岁儿童酸蚀症调查研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2009, 27(5): 565-567.

[5] 行勇军, 刘鲁川, 韩旭. 菌斑液对釉质脱矿和表面超微结构影响的体外研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(13): 1409-1412.

[6] Tantbirojn D, Huang A, Ericson M D, *et al*. Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP-ACP paste[J]. J Dent, 2008, 36(1): 74-79.

[7] Srinivasan N, Kavitha M, Loganathan S C. Comparison of the remineralization potential of CPP-ACP and CPP-ACP with 900 ppm fluoride on eroded human enamel: An in situ study[J]. Arch Oral Biol, 2010, 55(7): 541-544.

[8] Yamazaki H, Margolis H C. Enhanced enamel remineralization under acidic conditions *in vitro*[J]. J Dent Res, 2008, 87(6): 569-574.

[9] Austin R S, Rodriguez J M, Dunne S, *et al*. The effect of increasing sodium fluoride concentrations on erosion and attrition of enamel and dentine *in vitro*[J]. J Dent, 2010, 38(10): 782-787.

[10] van-Loveren C, Hoogenkamp M A, Deng D M, *et al*. Effects of different kinds of fluorides on enolase and ATPase activity of a fluoride-sensitive and fluoride-resistant Streptococcus mutans strain[J]. Caries Res, 2008, 42(6): 429-434.

[11] 盛江筠, 刘正. 变形链球菌耐氟菌株的诱导及产酸性的实验研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2000, 35(2): 95-98.

[12] Cross K J, Huq N L, Palamara J E, *et al*. Physicochemical characterization of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes[J]. J Biol Chem, 2005, 280(15): 15362-15369.

[13] Poggio C, Lombardini M, Dagna A, *et al*. Protective effect on enamel demineralization of a CPP-ACP paste: an AFM *in vitro* study[J]. J Dent, 2009, 37(12): 949-954.

[14] Hamba H, Nikaido T, Inoue G, *et al*. Effects of CPP-ACP with sodium fluoride on inhibition of bovine enamel demineralization: a quantitative assessment using micro-computed tomography[J]. J Dent, 2011, 39(6): 405-413.

[15] Ranjitkar S, Kaidonis J A, Richards L C, *et al*. The effect of CPP-ACP on enamel wear under severe erosive conditions[J]. Arch Oral Biol, 2009, 54(6): 527-532.

[16] Ivanoff C S, Hottel T L, Garcia-Godoy F. Microhardness recovery of demineralized enamel after treatment with fluoride gel or CPP-ACP paste applied topically or with dielectrophoresis[J]. Am J Dent, 2012, 25(2): 109-113.

[17] Rirattanapong P, Vongsavan K, Tepvichaisillapakul M. Effect of five different dental products on surface hardness of enamel exposed to chlorinated water *in vitro*[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2011, 42(5): 1293-1298.

[18] Reynolds E C, Cai F, Shen P, *et al*. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum[J]. J Dent Res, 2003, 82(3): 206-211.

(**收稿**:2012-09-07;**修回**:2012-09-29)

(编辑 张 维)