DOI:10.16016/j.1000-5404.201506015

酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙再矿化脱矿牙本质的效能

唐成芳[1,2],窦 祈[2,3],刘瑞瑞[2,4],沈丽娟[2],柴治国[2],方 明[2],陈吉华[2] (710021 西安,西安医学院口腔医学系[1];710032 西安,第四军医大学口腔医院修复科,军事口腔医学国家重点实验室,陕西省口腔医学重点实验室[2];266071 山东 青岛,济南军区青岛第一疗养院口腔科[3];710004 西安,西安交通大学口腔医院修复科[4])

[摘要] **目的** 研究酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙(casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate,CPP-ACP)体外再矿化脱矿牙本质的效能和机制。**方法** ①制备牙本质片 20 片,37% 磷酸脱矿 30s,随机数字表法分为 2 组,分别经人工体液(simulated body fluid,SBF)和 CPP-ACP 处理 15 d 之后进行显微硬度测定、表面形貌观察及 X 线衍射分析。②构建胶原纤维镍钛网,采用透射电镜观察 CPP-ACP 和 SBF 处理的重组胶原,并进行选区衍射分析。**结果** 处理 15 d 后 CPP-ACP 组和 SBF 组牙本质表面显微硬度分别为(47.92 ±4.25)和(42.72 ± 4.65)维氏硬度值,CPP-ACP 组显著高于 SBF 组($P<0.05$),且扫描电镜见 CPP-ACP 组牙本质表面较 SBF 组明显致密,有大量以羟基磷灰石为主的沉积物生成。透射电镜见 CPP-ACP 组重组胶原纤维上及周围分布有密集呈梭形的长 50 ~ 60 nm 的无定形磷酸钙。SBF 组仅见少量类圆形无定形磷酸钙。**结论** CPP-ACP 可促进离体脱矿牙本质再矿化,表面形成以羟基磷灰石为主的矿物质沉积,可用于根面龋和牙本质过敏的非手术治疗。

[关键词] 酪蛋白磷酸肽-磷酸钙;牙本质;再矿化;牙本质过敏;根面龋

[中图法分类号] R318.08;R783 [文献标志码] A

Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of demineralized dentine

Tang Chengfang[1,2], Dou Qi[2,3], Liu Ruirui[2,4], Shen Lijuan[2], Chai Zhiguo[2], Fang Ming[2], Chen Jihua[2] ([1]Faculty of Stomatology, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710021; [2]Shaanxi Provincial Key Laboratory of Stomatology, State Key Laboratory of Military Stomatology, Department of Prosthodontics, School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710032; [3]Department of Stomatology, Qingdao First Sanitarium of Jinan Military Command, Qingdao, Shandong Province, 266071; [4]Department of Prosthodontics, School of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi Province, 710004, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and mechanism of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on the remineralization of demineralized dentine, and provide reference for the prevention or non-invasive intervention of root caries and dentine hypersensitivity. **Methods** Twenty dentine specimens demineralized with 37% phosphoric acid gel for 30 s were randomly divided in 2 groups with a random digital table. Then the specimens were treated with simulated body fluid (SBF) and CPP-ACP, respectively, for 15 d. The dentine surfaces were subjected to microhardness measurement, micromorphological evaluation and X-ray diffraction analysis. Collagen fiber nickel-titanium meshes were constructed and treated with SBF and CPP-ACP for 1 d. Then, the meshes were subjected to micromorphological

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81130078,81000458);长江学者和创新团队发展计划(IRT13051);陕西省科学技术厅-社会发展科技攻关项目(2015SF242)

[通信作者] 方 明,电话:(029)84776128,E-mail:mfang2005@aliyun.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151127.0853.012.html(2015-11-27)

observation and selected area diffraction analysis by transmission electron microscopy. **Results** The Vickers hardness values of the dentine surfaces in the CPP-ACP group and SBF group were 47.92 ± 4.25 and 42.72 ± 4.65, respectively, and the microhardness in the CPP-ACP group was significantly higher than that in the SBF group after treatment for 15 d ($P<0.05$). The dentine surface in the CPP-ACP group was more compact than that in the SBF group, and many sediments were generated on the dentine surface and identified mainly as hydroxylapatite (HA). Lots of 50 ~ 60 nm fusiform ACP was distributed on the recombinant collagen fibers and the periphery in the CPP-ACP group, and only a few of round ACP was observed in the SBF group by transmission electron microscopy. **Conclusion** CPP-ACP can promote *in vitro* remineralization of demineralized dentine, and generate HA as main minerals on the dentine surface. So it can be used for the non-operative treatment of root caries and dentin hypersensitivity.

[**Key words**] casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate; dentine; remineralization; recombinant collagen fiber

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81130078, 81000458), the Program of Changjiang Scholars and Innovative Research Team Development Plan (IRT13051), the Tackling Project of Scientific and Technological Social Development from Science and Technology Department of Shaanxi Province (2015SF242). Corresponding author: Fang Ming, Tel: 86-29-84776128, E-mail: mfang2005@aliyun.com

颈部牙本质表层仅覆盖薄层釉质或牙骨质,在机械摩擦或/和细菌产酸脱矿的作用下,其内矿物质较牙釉质更易发生溶解,从而产生过敏或导致根面龋,临床治疗难度大,治疗效果不佳[1-3]。再矿化是目前非手术治疗根面龋或牙本质过敏的常用策略[2,4]。酪蛋白磷酸肽磷酸钙(casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate,CPP-ACP)是经典的再矿化活性物质,可释放生物利用度的钙盐和磷酸离子作为再矿化的物质基础,可抑制牙釉质/牙本质脱矿和促进其矿化[5-6]。本研究拟采用 CPP-ACP 处理脱矿牙本质和重组胶原,并与普通钙磷矿化液比较,通过微观形貌、表面硬度以及沉积物物像测定,评估其促进牙本质再矿化的功效及机制,为防治牙本质过敏或根面龋提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

CPP-ACP(ToothMousse,日本 GC 公司,日本);小牛表皮来源Ⅰ型胶原(Sigma,美国);碳纤维镍网(400 目,中科镜仪);N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,Amresco,美国);碳二亚胺盐酸盐(EDC,Amresco,美国);乙酸铀酰;慢速切割机(UNIPOL-830,科晶有限公司,沈阳),维式显微硬度计(HXD-1000TM,泰明光学仪器有限公司,上海);场发射扫描电镜(S-4800,Hitachi,日本);透射电镜(JEM-3010,日立电子,日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 配制再矿化液 (1) 9% CPP-ACP 乳剂配制:将 18 mL Tooth Mousse 与 2 mL 去离子蒸馏水(distilled deionized water,DDW)超声震荡混匀,配成含 9% CPP-ACP 的乳剂,4 ℃冰箱冷藏备用。(2)人工体液(simulated body fluid,SBF)配制[7-8]:将 2.5 mmol/L 氯化钙、1.0 mmol/L 磷酸氢二钾、3.0 mmol/L 氯化钾、136.8 mmol/L 氯化钠、1.0 mmol/L 叠氮钠、1.5 mmol/L 六水合氯化镁、4.2 mmol/L 碳酸氢钠、0.5 mmol/L 硫酸钠溶解至 DDW 中,调节 pH 值至 7.4 备用。

1.2.2 脱矿牙本质的表面处理及测试

1.2.2.1 样本制备 选用 10 颗完整无龋坏、新近拔除的第三磨牙,在流水降温下用慢速切割机从釉牙本质界处垂直于牙长轴切除咬合面牙釉质,截取 2.5 mm 厚度的冠中部牙本质片,并制备成 4 mm × 4 mm × 2.5 mm 的牙本质块,共 20 块,并将来源于同一颗牙的其中一个牙本质块用自凝塑料包埋、流水降温下依次用 600、1 200、1 500、2 000 目碳化硅砂纸以 120 r/min 的速度打磨牙本质面及试件底面至光滑平整,另一个牙本质块不包埋直接梯度打磨。

1.2.2.2 分组及处理 将包埋试件和未包埋的试件分别采用随机数字表法分到 A、B 两个实验组($n=5$)。各组试件用 37% 的磷酸凝胶酸蚀 30 s,流水冲洗 30 s 后,A 组试件放入 37 ℃的 5 mL SBF 中浸泡 15 d,B 组牙本质表面涂布 CPP-ACP 乳剂,放入含 1 mL SBF 内 37 ℃恒温 5 min,DDW 冲洗 1 min,3 次/d,其余时间放入 5 mL 37 ℃恒温的 SBF 中 15 d。各种液体每天换液 1 次。

1.2.2.3 显微硬度测定 分别在脱矿冲洗后即刻

和浸泡处理 15 d 后,用维氏显微硬度计对各组的 5 个包埋试样进行表面硬度测定,每个试件测量 5 个点,每点相距 100 μm,测定时 50 g 力,维持 15 s。

1.2.2.4　表面形貌观察　　浸泡处理 15 d 后,各组选出 3 个未包埋试件立即用 DDW 冲洗 5 min,室温下用 3% 戊二醛溶液与 0.1 mol/L PBS 缓冲液(1∶1,pH=7.2)固定 4 h,PBS 冲洗 3 次。梯度乙醇脱水,冷冻干燥,喷金,场发射扫描电镜观察各组牙本质表面胶原纤维结构及矿物质的沉积情况。

1.2.2.5　X 线衍射分析　　浸泡处理 15 d 后,各组选出 2 个未包埋牙本质试件采用 X 线衍射仪 CuKα 射线在 40 kV 电压、40 mA 电流下,以 0.02°的扫描步长进行 2θ 角度为 10°~70°范围的扫描各组试件[9];切取 4 个未脱矿牙本质块,其中 2 块采用 37% 的磷酸凝胶酸蚀 30 s,对以上 4 块牙本质片彻底冲洗,同上法进行衍射分析作为对照。

1.2.3　重组胶原的表面处理及测试

1.2.3.1　Ⅰ型胶原的重组构建　　Ⅰ型胶原冻干粉(小牛表皮来源)溶解于 pH 3.0 的 0.1 mol/L 乙酸溶液配制 0.15 mg/mL 的胶原溶液,4 ℃冷藏过夜。将含碳的透射电镜镍网浸泡在胶原溶液中,并置于 1% 氨水中和 4 h,然后放入 37 ℃恒温箱 3~5 d 形成凝胶。用 0.3 mol/L EDC(0.06 mol/L)NHS 交联 4 h 以稳定构建的胶原结构,去离子水清洗 3 次,干燥备用[10]。

1.2.3.2　分组及处理　　SBF 组:将 30 μL SBF 溶液分别滴加在玻璃板表面,含胶原的镍网漂浮其上,100% 增湿容器中孵育。CPP-ACP 组:将含胶原的镍网表面涂布 CPP-ACP 乳剂,放入含 1 mL SBF 内 37 ℃恒温 5 min,去离子水冲洗 3 次,3 次/d。其余时间该组镍网倒置漂浮于 30 μL SBF 中,100% 增湿容器内孵育。

1.2.3.3　透射电镜形貌观察　　各组孵育 24 h,取出镍网去离子水清洗 3 次,乙酸铀酰染色,干燥后透射电镜观察。

1.3　统计学分析

对各组的显微硬度采用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验,α=0.05。

2　结果

2.1　表面显微硬度(surface microhardness,SMH)

如表 1 所示,各处理组脱矿后即刻的 SMH 均无统计学差异($P>0.05$)。表面处理 15 d 后,各组 SMH 较脱矿后即刻均有显著增加($P<0.05$),CPP-ACP 组的 SMH 显著高于 SBF 组($P<0.05$)。

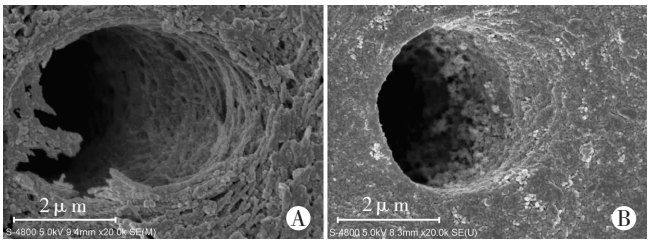
表 1　各组不同处理后牙本质表面硬度比较($n=5,\bar{x}\pm s$)

组别	脱矿后即刻	处理 15 d 后
SBF 组	39.08±4.30	42.72±4.65[a]
CPP-ACP 组	38.18±4.68	47.92±4.25

a:$P<0.05$,与 CPP-ACP 组比较

2.2　显微形貌观察

如图 1 所示,处理 15 d 后 SBF 组部分胶原基质塌陷,牙本质表面及牙本质小管管腔出现疏松的沉积物;CPP-ACP 组牙本质表面胶原无塌陷,表面有大量致密颗粒状沉积物,牙本质小管管腔内可观察到疏松簇状的沉积物。



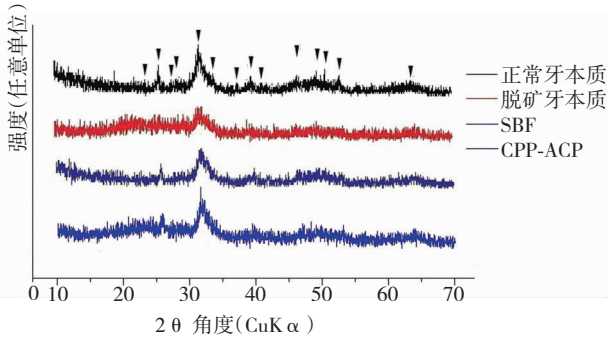
A:SBF 组;B:CPP-ACP 组

图 1　处理 15 d 后牙本质表面显微形貌

2.3　X 线衍射

正常牙本质及其余各组的 X 线衍射图谱如图 2 所示,根据粉末衍射标准联合委员会标准(JCPDS09-0432),正常牙本质表面的主要物相为羟基磷灰石(hydroxylapatite,HA),脱矿牙本质表面的 HA 衍射峰强度较正常牙本质明显减弱。

脱矿牙本质再矿化 15 d 后,各组生成物的主要物相是 HA,且在 2θ 为 25.87°和 31.77°附近的衍射峰均最明显,各组的相对峰强度与脱矿牙本质比较均有不同程度恢复,且 CPP-ACP 组处理 15 d 后在 2θ=31.77 处的相对峰强度较 SBF 组更高。

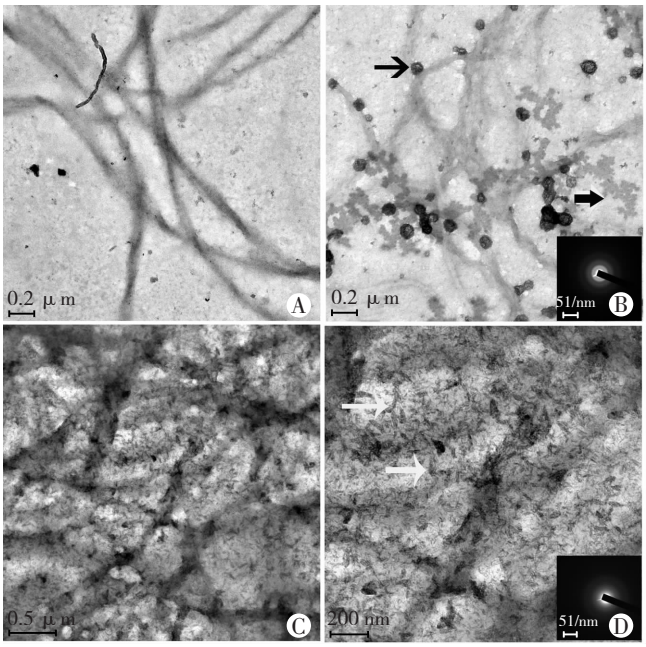


三角形代表 HA;SBF 及 CPP-ACP 组生成物的主要物相是 HA,且 CPP-ACP 组在 2θ =25.87° 和 31.77° 附近的衍射峰明显强于 SBF 组

图 2　处理 15 d 后各组 X 线衍射图形

2.4 透射电镜形貌观察

如图3所示,采用胶原粉成功构建了重组胶原纤维网,纤维轮廓清晰,可见周期性横纹(图A);SBF处理1 d后,胶原纤维轮廓模糊,胶原附近可见少量较小的类圆形磷酸钙颗粒(直径50~100 nm,细黑箭头所示),且部分区域有融合,胶原纤维间还有微小的无定形磷酸钙(粗黑箭头所示);CPP-ACP处理1 d后,胶原纤维轮廓较清,胶原纤维上及胶原纤维周可见大量密集分布的针状ACP晶体(长度50~60 nm,白色箭头所示),其衍射晶相为无定形。



A:重组胶原;B:SBF处理的重组胶原;C、D:经CPP-ACP处理的重组胶原;B、D右下角小黑图示衍射晶相均为无定形;粗黑箭头显示胶原纤维间的微小的无定形磷酸钙;细黑箭头示圆形磷酸钙相;白色箭头所示纳米级针状的无定形ACP晶体

图3 重组胶原及SBF/CPP-ACP处理1 d透射电镜观察

3 讨论

牙龈萎缩和根面牙本质暴露是根面龋和牙本质过敏好发的主要原因[11-12]。本实验通过牙本质表面显微硬度、表面形貌、沉积物衍射物相分析等方法,研究了富含CPP-ACP的Tooth Mousse再矿化脱矿牙本质的效能,并与SBF的处理效果进行比较。Tooth Mousse的主要功能成分是CPP-ACP,其可释放生物利用度的钙磷离子。此外,Tooth Mousse中还含有木糖醇和安息香酸盐类防腐剂,但该成分并不影响本实验的结果。

本实验结果表明:CPP-ACP较SBF能明显增强脱矿牙本质表面机械强度,促进表面生成HA为主的矿物沉积,促进再矿化。X线衍射结果进一步证实,脱矿牙本质表面的再矿化主要源于脱矿牙本质表面的残余HA晶体在Tooth Mousse和SBF中的钙、磷离子作用下发生的外延性生长。结果提示富含CPP-ACP的Tooth Mousse可用于根面龋和牙本质过敏的非手术治疗。这与Rahiotis等[6]采用傅里叶红外光谱分析方法的研究结果一致,CPP-ACP可促进牙本质再矿化。CPP-ACP再矿化牙体组织的机制与CPP-ACP的组成成分酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptide, CPP)和无定形磷酸钙(amorphous calcium phosphate,ACP)有关。CPP-ACP[5-6,13-14]是富含磷酸丝氨酸的生物活性肽CPP与ACP结合形成的纳米尺度的生物活性复合体,CPP可将ACP固定于牙齿表面及其上的唾液膜和牙菌斑,并维持再矿化需要的过饱和的钙磷离子浓度,形成再矿化所需的离子渗透梯度,并能始终保持有效浓度,从而发挥对牙釉质等牙体硬组织的再矿化作用。而SBF仅能模拟无外加再矿化物质的口腔唾液环境中的钙磷离子含量,尚不能达到钙磷离子的过饱和状态[7-8]。因而,CPP-ACP再矿化牙本质的效果显著优于SBF。

本实验重组胶原的透射电镜观察也证实了上述机制。在图3C及3D中,可见CPP-ACP处理的胶原纤维上及胶原纤维周可见大量密集分布的、长50~60 nm的针状/梭形无定形晶体(如白色箭头所示),推测该纳米级晶体正是非晶态的ACP,其维持了胶原纤维周围钙磷离子的过饱和状态;而SBF组仅见少量类圆形、直径50~60 nm的沉积颗粒(图3B)。可能正是由于SBF中有限的钙磷离子浓度,不能迅速渗透沉积矿化,脱矿区裸露胶原纤维缺乏保护,从而发生了一定程度的降解,最终导致本实验中扫描电镜下所见SBF组脱矿牙本质的部分胶原基质塌陷,沉积物疏松现象。

据本实验结果显示,CPP-ACP可促进离体脱矿牙本质再矿化,表面形成以羟基磷灰石为主的矿物质沉积,其作用与CPP-ACP能维持ACP的无定形态及病损局部钙磷离子过饱和态有关。本实验为CPP-ACP非手术治疗根面龋和牙本质过敏的临床疗效提供了一定的实验依据,然而其临床应用效果如何还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Tammaro S, Wennstrom J L, Bergenholtz G. Root-dentin sensitivity following non-surgical periodontal treatment[J]. J

Clin Periodontol, 2000, 27(9): 690 – 697.

[2] Wierichs R J, Meyer-Lueckel H. Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions[J]. J Dent Res, 2015, 94(2): 261-271. DOI:10.1177/0022034514557330

[3] West N, Seong J, Davies M. Dentine hypersensitivity[J]. Monogr Oral Sci, 2014, 25: 108 – 122. DOI:10.1159/000360749

[4] Gandolfi M G, Silvia F, H P D, *et al*. Calcium silicate coating derived from Portland cement as treatment for hypersensitive dentine[J]. J Dent, 2008, 36(8): 565 – 578. DOI:10.1016/j.jdent.2008.03.012

[5] Poggio C, Lombardini M, Vigorelli P, *et al*. Analysis of dentin/enamel remineralization by a CPP-ACP paste: AFM and SEM study[J]. Scanning, 2013, 35(6): 366 – 374. DOI:10.1002/sca.21077

[6] Rahiotis C, Vougiouklakis G. Effect of a CPP-ACP agent on the demineralization and remineralization of dentine *in vitro*[J]. J Dent, 2007, 35(8): 695 – 698. DOI:10.1016/j.jdent.2007.05.008

[7] Tang C F, Fang M, Liu R R, *et al*. The role of grape seed extract in the remineralization of demineralized dentine: micromorphological and physical analyses[J]. Arch Oral Biol, 2013, 58(12): 1769 – 1776. DOI:10.1016/j.archoralbio.2013.09.007

[8] Gu L S, Kim J, Kim Y K, *et al*. A chemical phosphorylation-inspired design for Type I collagen biomimetic remineralization[J]. Dent Mater, 2010, 26(11): 1077 – 1089. DOI:10.1016/j.dental.2010.07.008

[9] Suyama E, Tamura T, Ozawa T, *et al*. Remineralization and acid resistance of enamel lesions after chewing gum containing fluoride extracted from green tea[J]. Aust Dent J, 2011, 56(4): 394 – 400. DOI:10.1111/j.1834-7819.2011.01359.x

[10] Kim Y K, Gu L S, Bryan T E, *et al*. Mineralization of reconstituted collagen using polyvinylphosphonic acid/polyacrylic acid templating matrix protein analogues in the presence of calcium, phosphate and hydroxyl ions[J]. Biomaterials, 2010, 31(25): 6618 – 6627. DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.04.060

[11] Zambon J J, Kasprzak S A. The microbiology and histopathology of human root caries[J]. Am J Dent, 1995, 8(6): 323 – 328.

[12] Davari A, Ataei E, Assarzadeh H. Dentin hypersensitivity: etiology, diagnosis and treatment; a literature review[J]. J Dent (Shiraz), 2013, 14(3):136 – 145.

[13] 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. DOI:10.1074/jbc.M413504200

[14] Cochrane N J, Reynolds E C. Calcium phosphopeptides -- mechanisms of action and evidence for clinical efficacy[J]. Adv Dent Res, 2012, 24(2): 41 – 47. DOI:10.1177/0022034512454294

(**收稿**:2015-06-04;**修回**:2015-08-29)

(编辑 张 维)