

# 柠檬酸致牙釉质脱矿的扫描电镜研究

刘成霞<sup>1</sup>, 申晓青<sup>2</sup>, 徐平平<sup>1</sup>

- (1. 南方医科大学附属口腔医院, 广东省口腔医院, 广东 广州 510280;
2. 南方医科大学珠江医院口腔科, 广东 广州 510280)

**[摘要]目的:** 观察 10%柠檬酸酸蚀牙釉质不同时间的效果, 以获得研究早期釉质龋的可靠体外实验模型。**方法:** 选取 30 颗离体人恒前磨牙切割制成牙釉质块, 经 10%柠檬酸酸蚀, 扫描电镜观察牙釉质表面酸蚀不同时间(90 s, 120 s, 150 s) 后的形态学特征。**结果:** 牙釉质进行脱矿处理后, 釉质表面呈现酸蚀状外观。酸蚀时间为 90 s 时, 仅见小部分釉柱晶格脱矿溶解, 脱矿牙釉质的能力有限; 酸蚀 120 s, 与早期自然龋损近似, 呈蜂窝状; 酸蚀 150 s 时, 牙釉质表面呈酸蚀样破坏形貌, 属于过度酸蚀。**结论:** 柠檬酸具有较强的酸蚀作用, 其脱矿牙釉质的能力随着时间的延长而增强, 10%的柠檬酸酸蚀 120 s 可获得早期釉质龋模型。

**[关键词]** 柠檬酸; 早期釉质龋; 扫描电镜; 脱矿

## A SEM Study of Enamel Demineralization Produced by Citric Acid

LIU Chengxia<sup>1</sup>, SHEN Xiaoqing<sup>2</sup>, XU Pingping<sup>1</sup>

- (1. Affiliated Stomatological Hospital of Southern Medical University//Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou 510280, China;
2. Department of Stomatology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China)

**[Abstract] Objective** To observe the effect of different etching time of citric acid on enamel blocks to acquire a reliable in vitro model for the research of early enamel caries. **Methods** Thirty permanent human premolars were selected and made into enamel blocks. The morphology of enamel blocks surface etched by 10% citric acid with different times (90 s, 120 s, 150 s) was observed by scanning electron microscope. **Results** After demineralization, enamel surface had an obvious acid etching appearance. At the 90 s etching time, only a small part of enamel prism lattice was demineralized and dissolved, and the ability of demineralized enamel was limited. At the 120 s etching time, the morphology of enamel blocks surface was similar to nature early enamel lesions, like the honeycomb. At the 150 s etching time, the enamel surface had an acid corrosion damage morphology, and it belonged to excessive etching. **Conclusion** Citric acid has a strong etching effect, and the ability of demineralized enamel is enhanced with the extension of

<sup>1</sup>基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(2014A030313330)

作者简介: 刘成霞(1981 年生), 女; 研究方向: 口腔临床医学; E-mail: [chengxialiu@163.com](mailto:chengxialiu@163.com); 通讯作者: 徐平平; E-mail: [gdsqykyjk@163.com](mailto:gdsqykyjk@163.com)

time. The model of early enamel lesions can be obtained by 10% citric acid with 120 s.

**[Key words]** citric acid; early enamel caries; scanning electron microscope; demineralization

龋病是菌斑内致龋菌代谢碳水化合物产酸引起牙齿硬组织脱矿的结果,为研究龋病发生机制以及防治方法<sup>[1,2]</sup>。化学致龋法是人工龋模型中最为常用的方法,目前常用来脱矿的酸是乳酸和乙酸,脱矿的时间为3 d到1月不等,脱矿周期较长。因而有必要继续探索更高效的脱矿系统。近年来,多元羧酸柠檬酸(即枸橼酸),因其刺激性小及生物相容性好等特性而受到学者们的关注<sup>[3-5]</sup>。本实验首次采用柠檬酸酸蚀牙釉质,扫描电镜观察釉质表面脱矿后的形态学特征,以期获得高效、可靠的早期釉质龋模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 样本的制备

本实验经广东省口腔医院伦理委员会批准。在广东省口腔医院口腔颌面外科门诊收集16~26岁因正畸治疗新鲜拔除的人恒前磨牙,去除牙齿周围软组织,刷洗干净后4℃下保存于饱和麝香草酚溶液中。所有牙齿在肉眼下观察无龋坏,无白垩斑,无裂纹或其他缺损。使用松风车针冷水冷却下将牙冠切割制成釉质块,并在其表面中心开窗4 mm×4 mm大小,其余部位涂布2层抗酸指甲油,自凝树脂包埋<sup>[6-8]</sup>。

### 1.2 实验方法

柠檬酸溶液的配制方法:电子天平准确称取12.2 g  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 柠檬酸药品(分析纯)放入烧杯中,取100 mL双重蒸馏水倒入盛有柠檬酸的烧杯中,磁力搅拌器搅拌充分混匀,配置成质量分数为10%的实验用柠檬酸溶液。

制备牙釉质块30个,以10个样本为一组,随机分为3组。将每组牙釉质块分别置于100 mL 10%的柠檬酸溶液中,酸蚀时间分别为90 s、120 s、150 s,去除柠檬酸溶液,用大量去离子水冲洗3遍,再置于去离子水中超声波清洗10 min,连续3次。从各组随机抽取5个标本作为扫描电镜观察用。采用Quanta 400 FEG场发射扫描电子显微镜(SEM,美国FEI公司生产)观察正常釉质及其脱矿后形貌。将各标本按组编号,去离子水冲洗2 h后,置于干燥箱中温度为60℃下干燥12 h。干燥后,将标本按观察窗口面向上的方向固定在载物台上,粘台,表面喷金,真空下干燥,进行SEM观察(每个标本随机观察3个不同区域),用不同的放大倍数(×10 000、×30 000、×60 000)来拍摄电镜图像并存储<sup>[9]</sup>。

## 2 结果

SEM低倍镜下可见正常釉质比较平坦、光滑;高倍镜下可见釉柱排列比较紧密(见图1)。

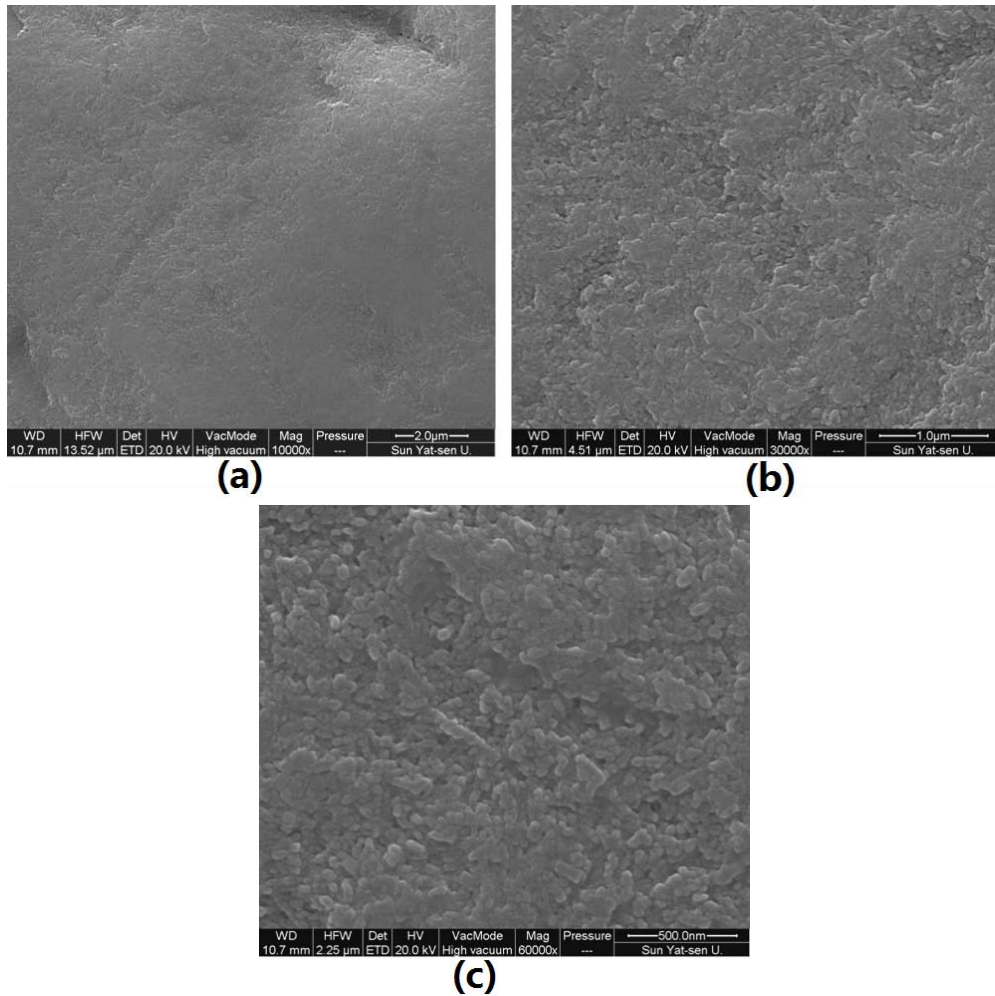


图 1 正常釉质的扫描电镜图像(a:  $\times 10\,000$ , b:  $\times 30\,000$ , c:  $\times 60\,000$ )

Fig. 1 SEM image of normal enamel (a:  $\times 10\,000$ , b:  $\times 30\,000$ , c:  $\times 60\,000$ )

对牙釉质块进行脱矿处理后，牙釉质表面呈现明显的酸蚀状外观，呈典型的蜂窝状、多孔隙的缺损，而且大部分表现为向心性脱矿。酸蚀时间为 90 s 时，釉质表面的孔状结构增多、加深且形态不规则，高倍镜下( $\times 30\,000$ )见孔状结构附近的釉质表面粗糙，仅见小部分釉柱晶格脱矿溶解，晶体暴露，呈棒状或不规则状，釉柱的柱间区增宽(见图 2)；继续酸蚀至 120 s (见图 3)，低倍镜下呈典型的鱼鳞状，头部先开始溶解脱矿，逐渐向尾部扩展，形成中央较浅的凹陷区域，边界清晰，每一个凹陷代表一条釉柱末端的破坏。高倍镜下( $\times 30\,000$ )，部分釉柱头因溶解而使釉柱头结构消失，残留部分尾部结构。 $\times 60\,000$  下可见与 Möller 等<sup>[10]</sup>观察到的自然龋的表面结构相似，周围不规则的多孔状结构增多，这些多孔状结构是拓宽的釉柱鞘和加深的 Tome's 突，近似于蜂窝状。酸蚀处理至 150 s 时(见图 4)，低倍镜下，牙釉质表面呈现明显的腐蚀状形貌。高倍镜下( $\times 60\,000$ )，晶体中央溶解造成晶体破坏、中心区穿孔，相邻晶体的穿孔溶解区相互融合，使晶体溶解区域不断扩大，形成大面积的晶体结构崩解。

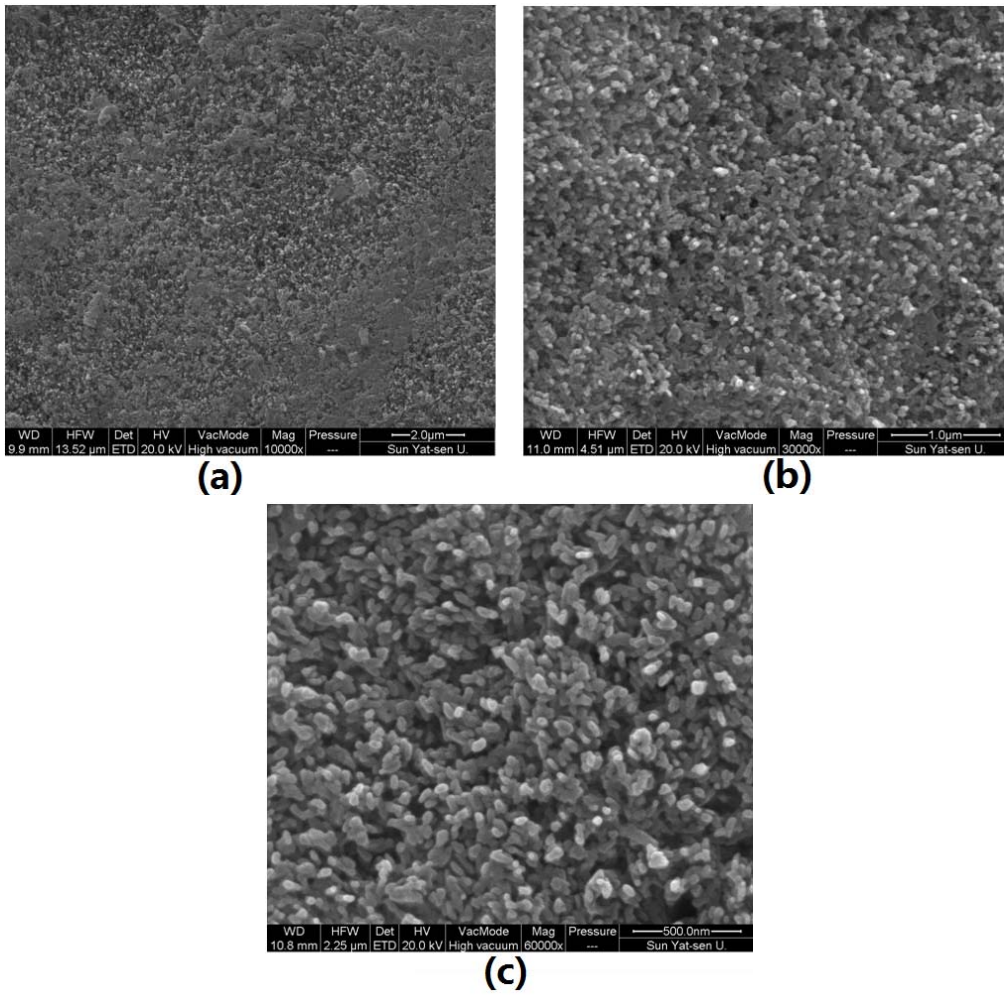
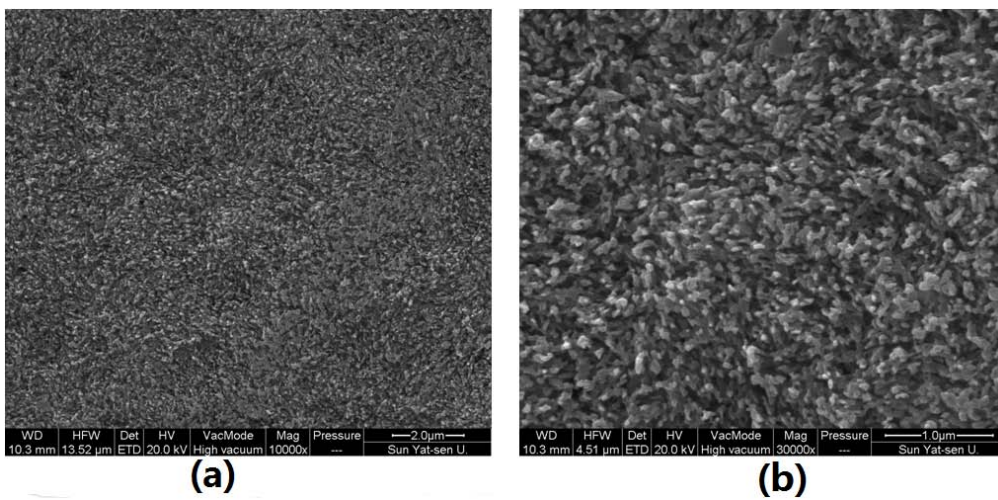
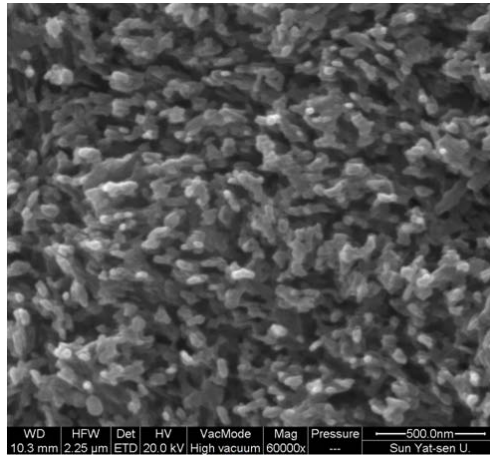


图 2 10% 柠檬酸酸蚀牙釉质 90 s 的扫描电镜图像(a:  $\times 10\,000$ , b:  $\times 30\,000$ , c:  $\times 60\,000$ )

Fig. 2 SEM image of enamel etched by 10% citric acid with 90 s

(a:  $\times 10\,000$ , b:  $\times 30\,000$ , c:  $\times 60\,000$ )



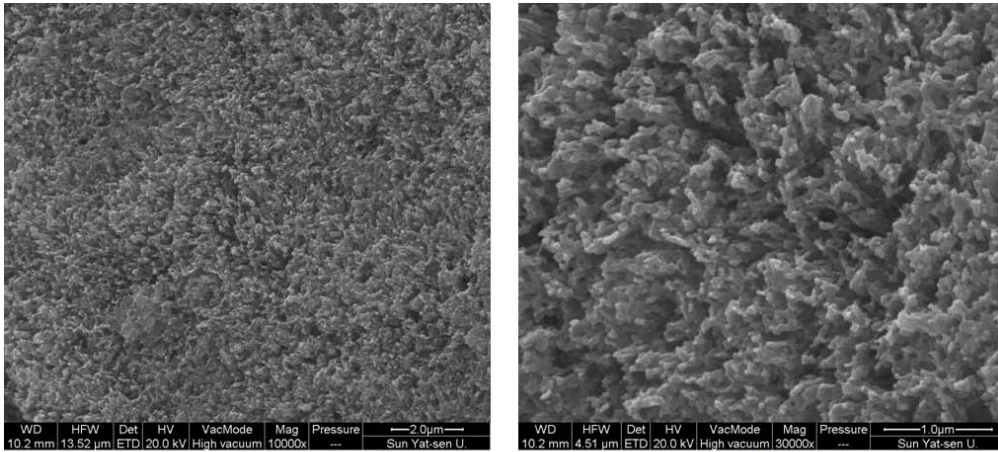


(c)

图3 10%柠檬酸酸蚀牙釉质120 s的扫描电镜图像(a: ×10 000, b: ×30 000, c: ×60 000)

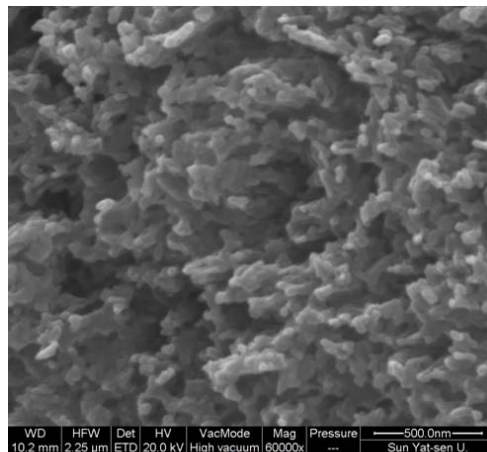
Fig. 3 SEM image of enamel etched by 10% citric acid with 120 s

(a: ×10 000, b: ×30 000, c: ×60 000)



(a)

(b)



(c)

图 4 10%柠檬酸酸蚀牙釉质 150 s 的扫描电镜图像(a: ×10 000, b: ×30 000, c: ×60 000)

Fig. 4 SEM image of enamel etched by 10% citric acid with 150 s

(a: ×10 000, b: ×30 000, c: ×60 000)

### 3 讨论

龋病一种常见病、多发病，广泛存在于世界各地，严重影响人类口腔及全身健康。世界卫生组织已将其与肿瘤和心血管疾病并列为人类三大重点防治疾病<sup>[11]</sup>。第三次全国口腔健康流行病学调查报告显示，全国 5 岁儿童乳牙患龋率为 66.0%，65~74 岁老年人患龋率高达 98.4%<sup>[12]</sup>。

口腔环境受多种因素影响，结构复杂多变。在龋病发生发展过程中，时间具有特殊的意义，自然形成早期龋一般需要 6~18 月的时间，而从初期龋发展到临床上可检查出的龋洞则需要 18~24 月的时间。Borsboom等<sup>[13]</sup>的研究指出脱矿是一个非连续过程，脱矿与再矿化可以同时发生，不断交替变化。这种损害特点使龋病学的研究无法直接在口内进行。为研究龋病发生机制以及防治方法，从 20 世纪 50 年代起人工龋实验便被广泛用于龋病学的研究。

口腔组织病理学研究表明，自然釉质龋的最重要病理变化是产生具有完整釉质表层的表层下脱矿<sup>[14]</sup>。事实上，人工龋不可能与自然龋相同，但是建立的人工龋模型与自然龋损在病理学上越相似，对模拟自然龋的形成过程就越逼真，对龋病学的研究就更有意义。目前，化学致龋法是建立人工釉质龋模型中最常用的方法，也是可控性最好的方法，其主要依据是通过酸不断从釉质表面渗透至深层，破坏HA晶格，进而溶解釉质组织。

脱矿系统常用的酸有乳酸和乙酸，且较多的应用于牛牙的脱矿研究，值得注意的是，在相同的脱矿处理条件下，牛牙的脱矿速度是人恒牙的两倍，而脱矿深度是人牙的 1.7 倍<sup>[15]</sup>。笔者前期的预实验采用该系统，脱矿一周仍未达到理想的结果，因此我们在积极的探索一种效率更高，更接近于自然龋的脱矿系统，以求制作符合体外脱矿实验要求的可靠早期釉质龋模型。

近年来，多元羧酸柠檬酸因其具有刺激性小、生物相容性好等特性而得到关注。元佩燕<sup>[5]</sup>采用不同浓度的枸橼酸溶液对牙本质样本进行不同时间的酸蚀，结果表明 10%枸橼酸溶液酸蚀牙本质样本 120 s是有效去除牙本质样本表面玷污层，暴露牙本质小管的最佳方法。笔者首次探索运用柠檬酸酸蚀牙釉质，SEM观察结果发现，随着时间的延长柠檬酸酸蚀的能力不断增强。酸蚀 90 s组脱矿能力有限，仍有大部分釉柱晶格没有脱矿溶解；酸蚀 120 s牙釉质表面呈现典型的蜂窝状结构；酸蚀 150 s组已造成过度酸蚀。柠檬酸脱矿牙釉质的主要机制：柠檬酸溶液与牙釉质中的羟基磷灰石接触时发生化学反应，柠檬酸以其终末羧基作为活性结合位点与羟基磷灰石的Ca<sup>2+</sup>结合形成柠檬酸钙，Yoshida等<sup>[16]</sup>的“吸附脱钙理论”认为羧酸盐在酸溶液中的溶解度决定羧酸对羟基磷灰石的吸附，并与羧酸盐的溶解度呈反比。

本研究首次探索运用 10%的柠檬酸酸蚀牙釉质块，扫描电镜放大不同的倍数下观察其

病理学损害特点近似于自然龋损, 得出 10% 的柠檬酸酸蚀牙釉质 120 s 可获得高效、可重复性好的体外早期釉质龋模型, 但还有待于用新的早期龋检测技术如共聚焦法、极化敏感性的光断层摄影法及光电子能谱法等来进一步验证。

### 参考文献:

- [1] 黄冠玮, 邹玲. 人工龋模型的建立方法[J]. 国际口腔医学杂志, 2010, 37(5): 537-540.
- [2] 楚金普. 中药防龋药效学实验方法的建立[D]. 四川大学博士论文, 2006.
- [3] Misra D N. Interaction of citric acid with hydroxyapatite: surface exchange of ions and precipitation of calcium citrate [J]. J Dent Res, 1996, 75(6):1418-1425.
- [4] Vega E D, Narda G E, Ferretti F H. Adsorption of citric acid from dilute aqueous solutions by hydroxyapatite [J]. J Colloid Interface Sci, 2003, 268(1): 37-42.
- [5] 元佩燕, 徐平平, 黄建生, 等. 枸橼酸酸蚀牙本质的最佳浓度和时间[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(16): 2959-2963.
- [6] 楚金普, 李继遥, 郝玉庆, 等. 中药五倍子、蜂房提取物对早期釉质龋再矿化作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2604-2606.
- [7] 楚金普, 郝玉庆, 李继遥, 等. 中药五倍子化学成分对早期龋再矿化作用的扫描电镜观察[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1306-1307.
- [8] 楚金普, 郝玉庆, 李继遥, 等. 露蜂房化学成分对早期龋再矿化作用的实验研究[J]. 江苏中医药, 2009, 41(8): 72-73.
- [9] 马伟群, 黄建生, 徐平平. 掺羟基磷灰石牙膏对早期龋的修复及吸附镉离子作用研究[J]. 日用化学工业, 2014, 44(5): 266-269.
- [10] Möller H, Schröder U. Early natural subsurface caries. A SEM study of the enamel surface before and after remineralization [J]. Caries Res, 1986, 20(2): 97-102.
- [11] 马腹婵. 2107 名学龄前期儿童龋病患病率调查[J]. 社区医学杂志, 2007, 5(9): 69.
- [12] 齐小秋. 第三次全国口腔健康流行病学调查报告[M]. 北京:人民卫生出版社,2008: 1-276.
- [13] Borsboom P C F, Vandermei H C, Arends J. Enamel lesion formation with and without 0.12 ppm F in solution [J]. Caries Res, 1985, 19: 396-403.
- [14] Fejerskov O, Kidd E A M. Dental caries [M]. Copenhagen: Blackwell Munksgaard, 2003: 80-83.

[15] Amaechi B T, Higham S M, Edgar W M. Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time [J]. *J Oral Rehabil*, 1999, 26(8): 624-630.

[16] Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, et al. Adhesion to and de-calcification of hydroxyapatite by carboxylic acids [J]. *J Dent Res*, 2001, 80(6): 1565-1569.