

文章编号: 1005-8982(2015)36-0016-05

·论著·

## 三维形貌测量激光显微镜下对早期釉质龋的 纳米结构分析\*

许立侠<sup>1</sup>, 郭红延<sup>2</sup>, 郭红梅<sup>2</sup>, 孙丽梅<sup>1</sup>, 徐红梅<sup>2</sup>

(1. 辽宁医学院武警总医院研究生培养基地, 北京 100039; 2. 武警总医院 口腔科, 北京 100039)

**摘要:**目的 本研究通过三维形貌测量激光显微镜观察早期釉质龋的纳米结构变化, 为龋病的预防及临床治疗提供理论依据。**方法** 收集 20 颗因正畸拔除的新鲜前磨牙, 随机分为 2 组, 实验组(A 组)与正常对照组(B 组), A 组暴露于人工脱矿液中 4 d 制备早期龋模型后, 两组均制备纵断与横断面样品, 在三维显微镜下进行光学、激光彩色及 3D 图像观察。**结果** 光学图像可见 A 组表层完整, 表层下白垩色, B 组无此分层; 激光彩色图像观察到 A 组表层釉柱晶体排列紧密, 釉柱间质正常, 釉柱鞘清晰连续, 表层下晶体溶解, 排列混乱, 釉柱间质增宽, 釉柱鞘不连续, B 组结构正常; 3D 图像更清晰显示了 A、B 两组的微结构形貌。**结论** 三维显微镜能够更清晰的显示早期釉质龋的表层及表层下的微晶结构, 表层的相对完整性与再矿化有关, 表层下以微晶体脱矿为主, 是脱矿与再矿化连续动力学过程。

**关键词:** 早期龋变; 三维形貌; 纳米结构

中图分类号: R781.1

文献标识码: A

## Three-dimensional and laser characterization of incipient *in vitro* carious lesions in human dental enamel\*

Li-xia XU<sup>1</sup>, Hong-yan GUO<sup>2</sup>, Hong-mei GUO<sup>2</sup>, Li-mei SUN<sup>1</sup>, Hong-mei XU<sup>2</sup>

(1. Graduate Education Base, General Hospital of Armed Police Force, Liaoning Medical University, Beijing 100039, P.R. China; 2. Department of Stomatology, General Hospital of Armed Police Force, Beijing 100039, P.R. China)

**Abstract:** [Objective] To examine the nanostructure of incipient *in vitro* carious lesions in dental enamel using three-dimensional topography and laser microscope. [Methods] Twenty fresh premolar teeth in orthodontic pulling were collected and randomly divided into experimental group (group A) and normal control group (group B). In the group A incipient carious lesions were obtained on the buccal side by exposure to artificial demineralization liquid for 4 days. The teeth in the two groups were then cut in longitudinal section and cross section. The sections were then examined using the three-dimensional and laser morphology. [Results] The group A showed little evidence of lesion growth on surface or demineralization under the surface in the optical imagery. But under laser microscope, the group A showed that surface enamel rod crystals were aligned closely, enamel rod sheath was clear and continuous; the crystals of subsurface dissolved disorderly, the interval of enamel rod broadened, enamel rod sheath was fuzzy and discrete. However, the group B did not have this performance in the laser color images. 3D images more clearly showed the microstructure characteristics of the two groups. [Conclusions] Three-dimensional topography laser stereo microscope can accurately show morphology and structure of surface and subsurface of incipient carious lesions. The integrity of the surface is related to remineralization, and the subsurface mainly undergoes demineralization of micro-crystals.

收稿日期: 2015-08-06

\* 基金项目: 武警总医院院内资助项目 (No: WZ201024)

[通信作者] 徐红梅, Tel: 010-57976698; E-mail: h\_m\_xu@163.com

· 16 ·

The pathological changes of the two layers are through a coupling diffusion process.

Key words: caries enamel; nanomechanical structure; three-dimensional topography

龋病是牙齿硬组织的一种慢性感染性疾病,其病变是一种非细胞反应性病变,基本变化是脱矿与再矿化,并以脱矿为主<sup>[1]</sup>。牙釉质是牙体组织中矿化程度最高的结构,大部分龋损都从釉质开始,因此对釉质龋的结构特性的研究对于龋病的防治尤为重要。以往对于早期龋变结构的观察是通过透射、扫描电镜<sup>[2]</sup>,而这些方法存在一些缺陷,观察前对样品脱水及真空处理会导致其结构的改变,且仅能以黑白色进行观察,不能够真实反映样品的结构。而三维形貌测量激光显微镜作为微纳米科学研究的重要工具之一,已经广泛应用于生命科学的研究,近年来,在口腔生物材料的研究领域也获得了国内外学者的青睐<sup>[3-4]</sup>。本文运用三维形貌激光立体显微镜对早期龋病及正常牙齿釉质进行扫描成像,分别从整体、釉柱横断面及纵断面进行对比分析,为牙釉质的结构研究提供直观的表象,为龋齿的预防及临床研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Hank's 平衡盐溶液<sup>[5]</sup>: HBSS: 400 mg/L 氯化钾 (KCl), 60 mg/L 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 8 000 mg/L 氯化钠 (NaCl), 1 000 mg/L 葡萄糖, 90 mg/L 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) $\cdot$ 7H<sub>2</sub>O, 350 mg/L 碳酸氢钠 ( $\text{NaHCO}_3$ ), 140 mg/L 氯化钙 ( $\text{CaCl}_2$ ), 100 mg/L 硫酸镁 ( $\text{MgSO}_4$ ) $\cdot$ 7H<sub>2</sub>O 和 100 mg/L 氯化镁 ( $\text{MgCl}_2$ ) $\cdot$ 6H<sub>2</sub>O; 人工脱矿液<sup>[6]</sup>: 1.5 mmol 氯化钙 ( $\text{CaCl}_2$ ), 0.2 mmol 磷酸氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 50 mmol 乙酸, 0.02% 的三氯化钠 ( $\text{NaN}_3$ ), 在氢氧化钠 (NaOH) 的调解下 pH=4.5; 三维形貌立体激光显微镜 (VK-X100/X200, Keyence, 日本)

### 1.2 标本的收集与选择

收集因正畸治疗而新鲜拔除的双尖牙, 从中选取牙冠外形和颜色正常, 釉质发育完好、无龋病的 20 颗, 去离子水下超声去除表面软组织、色渍及牙石并冲洗干净后, 置于 4℃ 冰箱 HBSS 中保存备用。

### 1.3 牙齿标本的分组与处理

将 20 颗离体牙随机分为两组, A 组: 实验组 (早期龋病组); B 组: 对照组 (正常釉质组)。将 A 组牙体颊侧表面开窗 4 mm × 4 mm, 其余部位涂布两层

抗酸指甲油, 在人工脱矿液于 37℃ 恒温下放置 4 d 后, 从人工脱矿液中取出, 去离子水冲洗 5 min, 以去净残留的脱矿液; B 组不经特殊处理, 作为正常对照组与龋病组进行对比。

### 1.4 各组釉柱纵断面的三维显微镜观察

将脱矿后的 A 组随机抽取 5 颗, 通过开窗病变区用硬组织切片机将牙体组织沿牙体长轴, 从颊舌向方向沿中线纵切成两部分, 暴露出釉柱纵断面; 同样, B 组中随机抽取 5 颗, 同 A 组切割方式一样, 暴露出釉柱纵断面, 然后用环氧自凝树脂包埋各组牙齿并标记, 抛光机及 600#、800#、1000#、1200#、2000# 碳化硅砂在流水下依次磨平、抛光后, 超声下清洗 5 min, 在三维形貌测量立体激光显微镜下进行观察比较。

### 1.5 各组釉柱横断面的显微镜观察

将脱矿后 A 组中剩余的 5 颗牙齿, 用硬组织切片机垂直于釉柱长轴, 从近远中方向沿中线横切成两部分, 暴露出釉柱横断面; 同样, 将 B 组中剩余的 5 颗牙齿, 横切暴露出釉柱横断面, 环氧自凝树脂包埋各组牙齿并标记, 各组牙齿进行打磨、抛光, 具体步骤同纵断面处理方式。

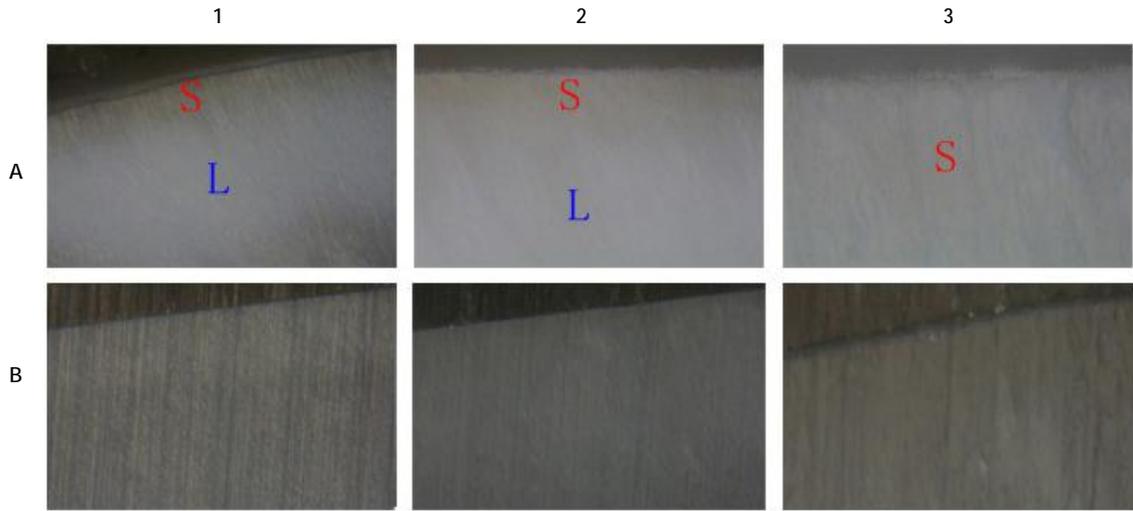
## 2 结果

### 2.1 整体结构的三维形貌显微镜观察

在光学显微镜下观察到, A 组在 400 及 1 000 倍下可见一条较模糊的表层带以及白垩色的表层下病损体部, 而 B 组无此两层结构, 且整体结构完整 (见图 1)。在激光彩色图中可见, A 组在 400 倍下可见一条清晰较完整的表层带区域以及表层下脱矿的现象, 在 1 000 倍下表层下生长线和釉柱横纹清晰可见, 在 3 000 倍下可见表层釉柱晶体排列紧密, 釉柱间隙及釉柱鞘清晰连续, 与 B 组相比, 差异不大 (见图 2)。

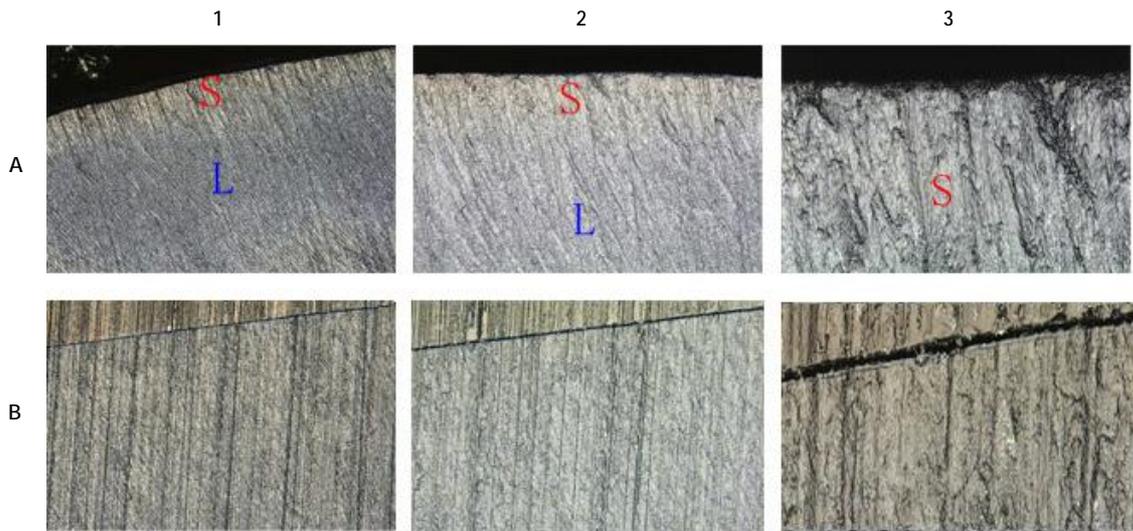
### 2.2 两组釉柱横断面的三维形貌显微镜观察

激光彩色图像中, A 组牙釉质表层下脱矿, 釉柱头部直径变大, 尾部排列不均匀, 排列无序 (见图 3A1), 且釉柱间质增宽, 釉柱鞘不连续, 晶体间可见大小不等的空隙 (见图 3A2)。而 B 组牙釉质中鱼鳞状釉柱清晰可见, 头部较大, 尾部细长, 排列均匀, 紧



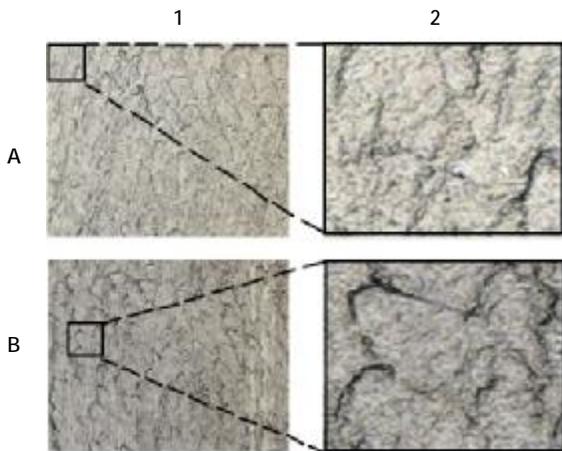
1: × 400; 2: × 1 000; 3: × 3 000; S: 龋损表层; L: 病损体部

图 1 两组整体结构的光学镜下观察图



1: × 400; 2: × 1 000; 3: × 3 000; S: 龋损表层; L: 病损体部

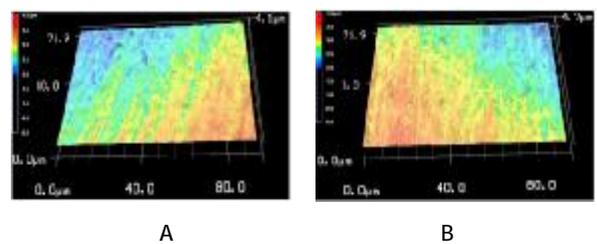
图 2 两组整体结构的激光彩色形貌图



A: 早期龋病组; B: 正常组; 1: × 3 000; 2: 局部放大

图 3 釉柱病损体部横断面的形貌观察图

密有序(见图 3B1), 釉柱的直径约  $5\mu\text{m}$ , 与大多报道<sup>[7]</sup>平均直径为  $4\sim 6\mu\text{m}$  一致, 釉柱鞘连续清晰可见(见图 3B2)。在 3D 形貌图像中清晰立体的显示早期龋及正常组牙釉质的三维结构(见图 4)。

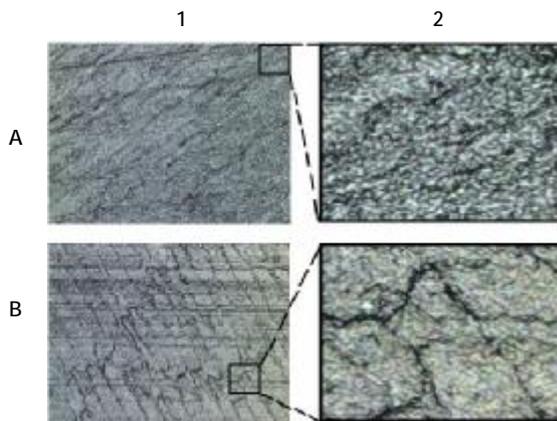


A: 早期龋病组; B: 正常组

图 4 釉柱病损体部横断面的 3D 观察图

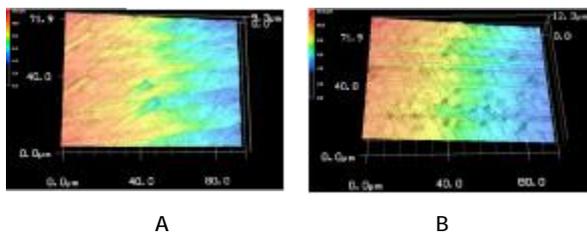
### 2.3 两组釉柱纵断面的三维形貌显微镜观察

激光彩色图像可见 A 组牙釉质表层下脱矿晶体大小不均匀,排列杂乱无序,釉柱间质增宽,釉柱鞘也呈断续排列,晶体间可见大小不等的空隙(见图 5A)。B 组牙釉质颗粒大小均匀,颗粒间排列方向一致,紧密有序,形成长条索状结构的釉柱,釉柱鞘连续清晰可见(见图 5B)。两组对应的 3D 形貌图(见图 6),能更清晰立体的显示早期龋及正常牙釉质的三维结构。



A: 早期龋病组; B: 正常组; 1:  $\times 3000$ ; 2: 局部放大

图 5 釉柱病损体部纵断面的形貌观察图



A: 早期龋病组; B: 正常组

图 6 釉柱病损体部纵断面的 3D 观察图

## 3 讨论

三维形貌测量激光显微镜是一种集显微镜、SEM、粗糙度于一身的非接触式表面形貌仪,以微纳米尺度对样品三维表面形貌进行测量,测量精度可达到  $0.001 \mu\text{m}$ 。其成像原理采用“激光光源”和“白色光源”2 路光源方式。通过这 2 个光源获得构建彩色全焦点图像、激光全焦点图像、高低图像所必要的色彩、光量、高度的信息。首先通过短波长激光检测反射光量和高度。从激光显微系统的激光光源发出的光线经由 XY 扫描光学系统、接物透镜聚光至对象物体上。聚光后的点光源通过 XY 扫描光学系统在观察视野内进行面扫描。在观察视野内分割成

$1024 \times 768$  像素运行扫描,并由受光组件检测各像素的反射光。将接物透镜在 Z 轴方向上驱动,反复运行面扫描,获得各像素的各 Z 轴位置处的反射光量。并将反射光量最高的 Z 轴位置设为焦点,检测高度信息和反射光量。这样便可以获得整体对焦的光量全焦图像和高低图像信息。其次,使用彩色 CCD 摄像机检测白光光源的发射光。CCD 摄像机在每个像素的基础上,使用激光束获取焦点位置的颜色信息。因此三维形貌测量激光显微镜可以完成 SEM 无法实现的真彩观察。赵晓一等<sup>[9]</sup>曾用 3D 激光扫描显微系统清晰地观察到渗透树脂深入到病损牙体的深入层。

牙釉质由羟基磷灰石晶体有序排列形成,早期釉质龋又称“白斑”病损<sup>[9]</sup>,组织病理学上分为 4 层:表层、病损体部、暗层及透明层,但在人工龋模型中仅能观察到表层及病损体部<sup>[10]</sup>。而病损体部脱矿最为明显,是研究龋病脱矿机制的良好模型。两组整体结构中,A 组在光学显微镜下仅能观察到一条模糊的表层带和白垩色的病损体部,微结构难以辨识;但在激光彩色图中不仅可以观察到较清晰完整表层及表层下脱矿的现象,而且还可观察到表层晶体的有序排列,釉柱间质和釉柱鞘的清晰连续。B 组结构完整,未出现此分层。证实早期龋损是脱矿和再矿化连续的动力学过程<sup>[11-13]</sup>,所形成的龋损仍具有相对完整的表层结构,同时也意味着,此时将人工龋浸入再矿化液中,可以终止龋病的发展,使其再矿化恢复到正常釉质组织。

在横断面中,激光彩色图像观察到 A 组可见整体釉柱头部直径变大,釉柱间质增宽,靠近柱间区的釉柱晶体体积较大,边缘圆钝,此处晶体破坏程度较釉柱中心区轻。在釉柱中心部的多数晶粒出现中心溶解,相邻的晶粒中心穿孔可彼此融合形成大的孔隙,釉柱鞘连续性中断;而 B 组无此现象。赵玮等<sup>[14]</sup>应用透射电镜在早期龋年轻后牙的牙釉质中观察到了同样的现象,但仅以黑白二维进行观察,结构不是十分清楚。而本实验中激光彩色和 3D 图进一步立体形象的显示表层及表层下釉柱晶体的三维彩色病理变化,认为釉柱间区显示对龋溶解较强的抵抗力<sup>[15]</sup>。有研究表明<sup>[16]</sup>,早期龋变首先是碳酸根和镁离子的溶出,该元素主要分布在釉质的羟基磷灰石晶体的中央和周缘,易受到菌斑下酸的侵袭首先发生溶解。

在纵断面中,激光彩色图像观察到 A 组牙釉质表层下脱矿晶体大小不均匀,排列杂乱无序,釉柱间

质增宽,釉柱鞘也呈断续排列,此处晶体表现为大小不等的六角形或不规则形的白亮点散布于柱间区,晶体间可见大小不等的空隙。有学者<sup>[7]</sup>应用偏光显微镜和扫描电子显微镜观察早期牙釉质龋和人工龋损害的破坏途径中得出酸对釉质的损害首先发生在釉柱鞘,其次是釉柱心和釉柱间质的结论。在激光彩色图和 3D 图中通过和 B 组相比较进一步直观形象的展示了这一点。

综上所述,本研究更清晰地观察到早期龋病的表层及表层下脱矿的三维形貌,通过和正常牙釉质微结构比较进一步证实早期龋表层的完整性与再矿化有关、釉柱周边对龋溶解具有较强的抵抗力、晶体中心优先溶解。为下一步研究早期龋病的再矿化形态学研究奠定理论基础,同时对防治龋病具有重要的临床指导意义。

#### 参 考 文 献:

- [1] TANAKA R, SHIBATA Y, MANABE A, et al. Mineralization potential of polarized dental enamel[J]. Plos, 2009, 4(6): e5986.
- [2] BRESCHI L, GOBBI P, MAZZOTTI G, et al. Field emission in-lens SEM study of enamel and dentin[J]. Biomed Mater Res, 1999, 46(3): 315-323.
- [3] SATO M, SUZUKI K, UEKI Y, et al. Microelastic mapping of living endothelial cells exposed to shear stress in relation to three-dimensional distribution of actin filaments[J]. Acta Biomater, 2007, 3(3): 311-319.
- [4] LEW MD, LEE SF, PTACIN JL, et al. Three-dimensional superresolution colocalization of intracellular protein superstructures and the cell surface in live *caulobacter crescentus*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(46): e1102-e1110.
- [5] HABELITZ S, MARSHALL GW JR, BALOOCH M, et al. Nanoindentation and storage of teeth[J]. Biomech, 2002, 35(7): 995-998.
- [6] POOSTI M, AHRARI F, MOOSAVI H, et al. The effect of fractional CO<sub>2</sub> laser irradiation on remineralization of enamel white spot lesions[J]. Lasers Med Sci, 2014, 29(4): 1349-1355.
- [7] 于世凤,高岩.口腔组织学和病理学[M].北京大学医学出版社,2005.
- [8] 赵晓一,高晓军.渗透树脂治疗对人工釉质龋表面微硬度影响的研究[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2014,24(8):455-458.
- [9] 樊明文.龋病学[M].贵州:科技出版社,1993:148.
- [10] MAGALHAES AC, MORON BM, COMAR LP, et al. Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels[J]. Caries Res, 2009, 43(6): 474-483.
- [11] DICKINSON ME, WOLF KV, MANN AB, et al. Nanomechanical and chemical characterization of incipient in vitro carious lesions in human dental enamel[J]. Archives of Oral Biology, 2007, 52(2): 753-760.
- [12] 岳松玲.脱矿与再矿化 - 病变的主线龋病学研究百年回顾与展望之七[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2008,18(1):1-8.
- [13] 赵今,李新高,林静,等.天然药物没食子对早期釉质龋再矿化作用的研究[J].实用口腔医学杂志,2011,27(4):469-473.
- [14] 赵玮,凌均柴,汪说之,等.早期釉质龋病变体部的透射电镜观察[J].中山大学学报,2003,24(4):352-354.
- [15] XUE J, LI W, SWAIN MV, et al. In vitro demineralization of human enamel natural and abraded surfaces: a micromechanical and sem investigation[J]. Dent, 2009, 37(4): 264-272.
- [16] POPESCU DP, SOWA MG, HEWKO MD, et al. Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images[J]. Biomed Opt, 2008, 13(5): 53-54.
- [17] 岳松玲,刘天佳.早期牙釉质龋的破坏途径与方式[J].华西口腔医学杂志,1983,1(1):7-10.

(张蕾 编辑)