

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/26645963>

[The preparation of nano-hydroxyapatite and preliminary observation on its effects on the occlusion of dentinal tubule]

Article in *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese journal of stomatology* · June 2009

Source: PubMed

CITATIONS

8

5 authors, including:



Yue Sa

Wuhan University

26 PUBLICATIONS 364 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

READS

53



Tao Jiang

Wuhan University

80 PUBLICATIONS 1,162 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Effects of Hydrogen Peroxide on Dental enamel and Dentin [View project](#)



Surface Functionalization of Titanium [View project](#)

纳米羟基磷灰石的制备及其对牙本质小管封闭效果的初步观察

王浙君 撒悦 马霄 王贻宁 蒋滔

【摘要】 目的 通过合成纳米羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)以及体外实验观察其对牙本质小管的封闭效果,为纳米 HA 的临床应用提供依据。方法 采用磷酸氢二铵 $[(NH_4)_2HPO_4]$ 和硝酸钙 $[Ca(NO_3)_2]$ 合成纳米 HA,扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)、透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)、傅里叶变换红外光谱计(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)和 X 射线衍射仪(X-ray diffractometer, XRD)检测纳米 HA。选取 8 颗健康第三磨牙制备 24 片牙本质薄片,按随机数字表分为酪蛋白磷酸肽钙磷复合物(casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate, CPP-ACP)组、纳米 HA 组及空白对照组,每组 8 片;空白对照组不做处理, CPP-ACP 组和纳米 HA 组每天分别用 CPP-ACP 和纳米 HA 处理牙本质薄片 2 次,7 d 后 SEM 观察牙本质表面。结果 经 SEM、TEM、FTIR 和 XRD 检测,证实本项实验制备的 HA 为纳米 HA;SEM 观察纳米 HA 对牙本质小管的封闭效果明显高于 CPP-ACP 组和空白对照组。结论 在体外条件下,与 CPP-ACP 相比,纳米 HA 可更有效地封闭暴露的牙本质小管。

【关键词】 羟基磷灰石类; 牙本质敏感; 酪蛋白磷酸肽钙磷复合物

The preparation of nano-hydroxyapatite and preliminary observation on its effects on the occlusion of dentinal tubules WANG Zhe-jun, SA Yue, MA Xiao, WANG Yi-ning, JIANG Tao*. *Key Laboratory for Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, School of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China

Corresponding author: JIANG Tao, Email: jiangtao2006@whu.edu.cn, Tel: 0086-27-87686221

【Abstract】 Objective To synthesize nano-hydroxyapatite(nano-HA) and evaluate its effect on the occlusion of dentinal tubules *in vitro*, and therefore provide evidence for the clinical application. **Methods** $(NH_4)_2HPO_4$ and $Ca(NO_3)_2$ were used to form nano-HA, which was characterized by scanning electron microscopy(SEM), transmission electron microscopy(TEM), Fourier transform infrared spectrometer(FTIR) and X-ray diffractometer(XRD) respectively. Twenty-four dentin slabs were obtained from 8 healthy third molars and randomly divided into 3 groups, which were control group, casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate(CPP-ACP) group, and nano-HA group. After the CPP-ACP and nano-HA were topically applied to the slabs of two study groups twice a day for 7 days, the surface of slab dentin was observed using SEM. **Results** SEM, TEM, FTIR, and XRD tests showed that nano-HA was synthesized successfully. SEM observations revealed that the sealing of dentinal tubules of nano-HA group was extremely high when compared with those of control and CPP-ACP group. **Conclusions** In comparison with CPP-ACP, nano-HA could occlude dentinal tubules more effectively *in vitro*.

【Key words】 Hydroxyapatites; Dentin sensitivity; Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate

牙本质敏感(dentin hypersensitivity)是牙受到外界刺激,如温度、化学物质以及机械作用等所引起

的酸痛症状。已有研究表明,牙本质小管的开放是造成牙本质敏感的重要原因^[1-2]。因此,采用安全有效的生物材料封闭暴露的牙本质小管是控制牙本质敏感的重要方法。

羟基磷灰石[hydroxyapatite, HA, 分子式为 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$]是人体骨骼和牙齿的主要组成部分,人工合成的 HA 是公认的安全无毒的生物材料。纳米 HA 具有晶粒细化、尺寸小、比表面积大、

DOI:10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2009.05.012

基金项目:湖北省科技攻关计划项目(2007AA301B28)

作者单位:430079 武汉大学口腔医学院口腔生物医学工程教育部重点实验室(王浙君、撒悦、马霄、蒋滔),修复科(王贻宁)

通信作者:蒋滔, Email: jiangtao2006@whu.edu.cn, 电话:027-87686221

高表面能的特性^[3], 现已在生物植入材料领域显示了强大的应用前景^[4-5]。但目前将纳米 HA 应用于牙本质敏感治疗的报道较少。

酪蛋白磷酸肽钙磷复合体 (casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate, CPP-ACP) 能促进牙齿脱矿部位再矿化^[6]。无定形磷酸钙 (amorphous calcium phosphate, ACP) 在临床上已被证实具有快速减轻牙本质敏感的效果^[7]。因此, 本项研究通过制备纳米 HA, 并对纳米 HA 及 CPP-ACP 封闭牙本质小管的效果进行体外观察和评价, 以期对纳米 HA 的临床应用提供依据。

材料和方法

一、纳米 HA 的制备及分析

1. 纳米 HA 的制备: 按钙磷比 1.67 的配比采用磷酸氢二铵 $[(NH_4)_2HPO_4]$, 批号: F20050515, 国药集团化学试剂, 上海] 和硝酸钙 $[Ca(NO_3)_2]$, 批号: 20050414, 纵横兴工贸, 天津] 反应制备纳米 HA。配制 0.65 mol/L $(NH_4)_2HPO_4$ 和 1.08 mol/L $Ca(NO_3)_2$ 各 20 ml, 用氨水 $(NH_3 \cdot H_2O)$ 调节两溶液 pH > 10。调节磁力振荡器转速为 1000 r/min (离心半径 = 6.5 cm), 并保持温度为 90 °C。用移液管将 $(NH_4)_2HPO_4$ 缓慢加入 $Ca(NO_3)_2$ 中, 用 $NH_3 \cdot H_2O$ 维持 pH > 10, 5 h 后完成反应。

将以上配好的溶液用离心机离心, 速度 3500 r/min (离心半径 $r = 16.9$ cm), 离心 5 min 后弃上层清液, 再次加入蒸馏水充分混匀。重复上述操作 6 次。制得乳白色凝胶状的纳米 HA。置于 4 °C 的冰箱中保存。

2. 合成物的分析: 分别采用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM, Fei QUANTA-200 型, Eindhoven, 荷兰) 和透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM, JEM-100CXII 型, JEOL, 日本) 对合成的纳米 HA 进行形态学分析; 将 1 mg 合成物与 100 mg 溴化钾 (KBr) 混合后压制成片, 用傅里叶变换红外光谱计 (Fourier transform infrared spectrometer, FTIR, Nicolet, Madison, Wis, 美国) 对其进行红外光谱分析; 用 X 射线衍射仪 (X-ray diffractometer, XRD, D/MAX-RB, Rigaku, Miniflex, 日本) 对合成物的晶相进行分析。

二、牙本质薄片的制备

于武汉大学口腔医学院口腔颌面外科门诊收集的因正畸拔除的健康第三磨牙 8 颗 (拔牙时间在 1 个月以内, 患者知情同意)。充分清洁干净后保存

于 4 °C 0.5% 的麝香草酚溶液中。用慢速切割机 (Isomet, Buehler, Evanston, IL, U S A) 制备厚度为 2 mm 的牙本质薄片 8 片, 使用粒度为 500、1000、1500、2000 目的碳化硅水砂纸依次冲洗打磨至表面光亮平整。再用金刚石抛光剂 (1 μm) 和抛光布抛光, 去离子水中超声清洗 10 min, 备用。将 8 片牙本质薄片分别切成大小相似的 3 片 (半径约 4 mm 的扇形片), 按随机数字表随机分入 3 组, 每组 8 片。

三、样本的处理

1. 空白对照组: 不做任何处理, 放入新鲜人工唾液中浸泡。

2. CPP-ACP 组: 将 0.01 ml 的 CPP-ACP 糊剂 (GC, 日本) 涂抹于牙本质薄片的抛光面, 放置 3 min, 再放入新鲜人工唾液中浸泡。

3. 纳米 HA 组: 将 0.01 ml 的纳米 HA 糊剂涂抹于牙本质薄片的抛光面, 放置 3 min, 再放入新鲜人工唾液中浸泡。

每天上午 9 时和晚 21 时按上述各操作 1 次, 每个处理阶段后残余的试剂用脱脂棉球去除, 再次处理前需先用软毛刷在流动的去离子水中轻刷牙本质薄片表面 30 s。实验过程中所有牙本质薄片均保存于 37 °C 恒温箱中, 7 d 后观察牙本质小管的封闭情况^[8-9]。

四、SEM 观察

将牙本质薄片用导电胶黏附固定于样品台上, 真空喷金, 置入 SEM, 在放大 2000 倍及 30 000 倍条件下记录扫描结果。

结 果

一、纳米 HA 晶相分析

1. 电镜观察: TEM 和 SEM 结果见如图 1, 2。合成物的晶体大多为棒状, 短轴 20 ~ 30 nm, 长轴 50 ~ 100 nm, 另外还存在一些部分团聚的纳米粒子。

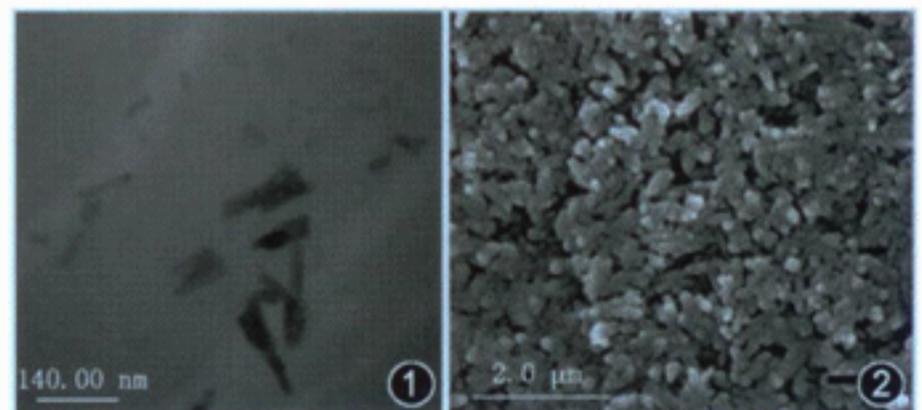


图 1 透射电子显微镜观察纳米 HA (×100 000) 图 2 扫描电子显微镜观察纳米 HA (×20 000)

2. 红外光谱分析: FTIR 分析显示, 564.1 (ν_4)、

603.4 (ν_4)、962.2 (ν_1)、1032.5 (ν_3) 和 1093.2 (ν_3) cm^{-1} 处出现 PO_4^{3-} 特征峰, 962.6、1032.5 和 1093.2 cm^{-1} 处的吸收峰与 P-O 键的伸缩振动吸收相关。而 564.1、603.4 cm^{-1} 处的吸收峰与 P-O 键的弯曲振动相关。OH⁻ 基团的伸缩振动和弯曲振动的特征谱线出现于 631.3 和 3568.9 cm^{-1} 处, 同时在 875.7 cm^{-1} 处出现 HPO_4^{2-} 振动峰, 在 1448.6 cm^{-1} 处出现 CO_3^{2-} 的峰。

3. XRD 分析: XRD 显示, 合成物的峰形尖锐清晰, 在衍射角 2θ 为 25.9°、31.8°、32.0°、32.2°、33.0° 处均出现明显衍射峰, 这些特征峰出现的位置与国际衍射数据中心 (International Centre for Diffraction Data, ICDD) 提供的 HA 衍射图的标准卡片 (Joint Committee on Powder Diffraction Standard, JCPDS) 对应一致。

二、牙本质小管封闭效果的 SEM 分析

1. 空白对照组: 低倍镜下可见空白对照组牙本质薄片表面暴露的牙本质小管, 视野清晰, 高倍镜下可见牙本质小管管壁表面光滑平整 (图 3, 4)。

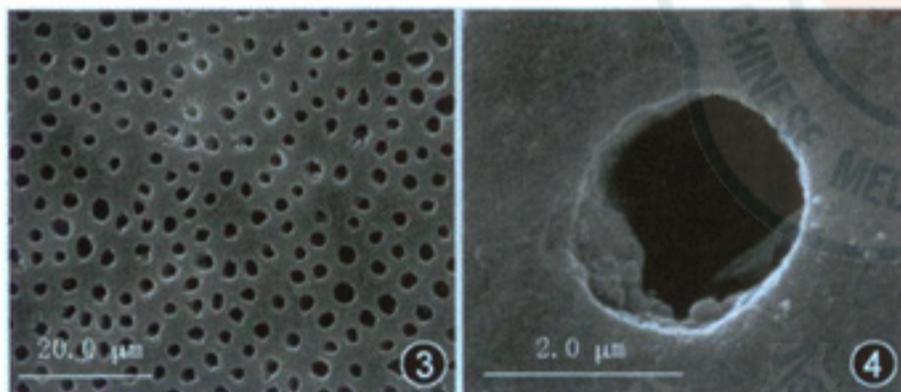


图 3 低倍镜下观察空白对照组牙本质小管的封闭效果 (SEM $\times 2000$) 图 4 高倍镜下观察空白对照组牙本质小管的封闭效果 (SEM $\times 30000$)

2. CPP-ACP 组: 低倍镜下可见 CPP-ACP 组牙本质小管的直径缩小, 部分小管被封闭 (图 5)。高倍镜下可见单个牙本质小管管壁有颗粒附着, 直径减小, 但未被完全堵塞 (图 6)。

3. 纳米 HA 组: 低倍镜下可见纳米 HA 组牙本质小管已被封闭得比较完全, 几乎没有暴露的牙本质小管 (图 7)。高倍镜下可见单个牙本质小管几乎被完全堵塞, 晶体沉积较好, 均匀细密 (图 8)。

讨 论

Brännström^[10] 的流体动力学说认为, 牙本质小管内的组织液与牙髓组织相通, 当牙本质表面受到各种刺激时, 小管液的运动可机械地搅动牙髓内容物, 进而间接地兴奋其中的游离神经末梢, 产生

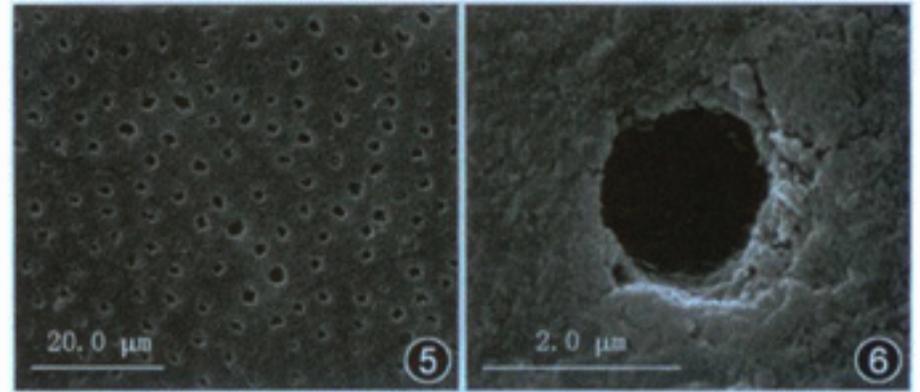


图 5 低倍镜下观察 CPP-ACP 组牙本质小管的封闭效果 (SEM $\times 2000$) 图 6 高倍镜下观察 CPP-ACP 组牙本质小管的封闭效果 (SEM $\times 30000$)

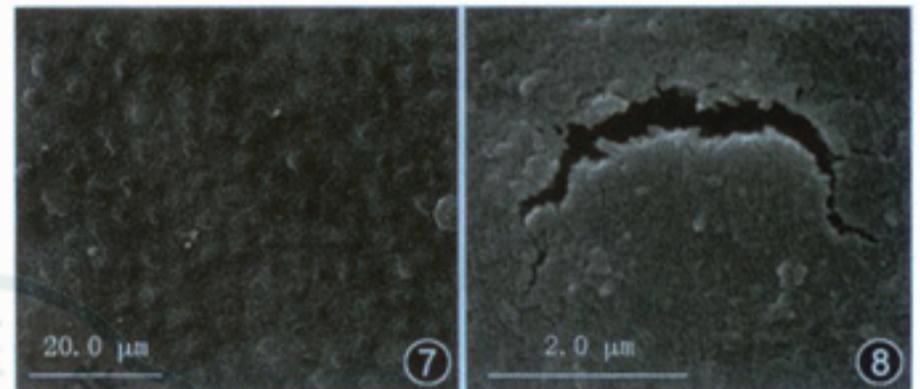


图 7 低倍镜下观察纳米 HA 组牙本质小管的封闭效果 (SEM $\times 2000$) 图 8 高倍镜下观察纳米 HA 组牙本质小管的封闭效果 (SEM $\times 30000$)

痛觉。已有研究证明, 通过牙本质的液体与小管直径的四次方成比例^[11], 因此, 牙本质小管直径的轻微减小即可引起小管内液体流动和敏感性的大大降低。

较多试剂诸如草酸盐和磷酸钙都已被证实能通过减小牙本质小管直径降低牙本质的敏感性^[12-13]。这些试剂均对牙本质小管的封闭有一定效果, 但产物并不稳定^[14]。已有研究首先将酸化的磷酸钙涂于牙齿表面, 然后再涂含氟的碱性溶液使之转化为 HA^[15]。虽然这种方法封闭效果较好, 但治疗步骤较繁琐, 合成 HA 的钙磷比和结晶度 (crystallinity) 较低, 与天然牙釉质相差较大, 并常混有 $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 等成分。另外, 该实验应用的氟化钠溶液浓度较高 (0.3 mol/L), 高浓度的氟离子易对机体产生生物毒性, 长期使用有害健康^[16]。

本项实验将人工合成的纳米 HA 直接应用于牙本质小管表面。为与 CPP-ACP 的处理时间保持一致, 本项实验中纳米 HA 的处理时间同样为 7 d, 每天 2 次。结果显示, 纳米 HA 封闭效果良好。这可能首先归因于纳米 HA 细化的纳米粒子, 相对于牙本质薄片牙本质小管的直径 (约 2 μm), 纳米尺寸的纳米 HA 足够细小, 较容易进入牙本质小管内。其次, 良好的封闭效果还得益于纳米 HA 与牙本质

表面具有较好的黏附力。纳米粒子由于尺寸小,表面能高,这使得位于其表面的原子占有相当大的比例。因而纳米 HA 表面原子数比例较大、配位数不足和较高的表面可使这些表面原子具有高的活性,较易与其他原子结合^[17]。在一项关于纳米 HA 对牙釉质保护的实验中,纳米 HA 也显示其与牙釉质间有较好的黏附力^[18]。纳米 HA 难溶于人工唾液的性质也是其有效封闭牙本质小管的因素之一。已有研究显示,与多种磷酸钙盐相比,HA 的吉布斯自由能 (Gibbs free energy) 的负值最大 (-5.17 KJ/mol),从而保证其在人工唾液中维持过饱和状态 (supersaturation) 的能力更强^[14]。

本项实验选用脱敏剂 CPP-ACP 作为对照,并观察其对牙本质小管的封闭效果。结果显示, CPP-ACP 具有较好的牙本质小管封闭作用。ACP 是生物矿化过程中大量存在的一种磷酸钙盐,临床研究显示 ACP 能有效减轻牙本质敏感症状^[7]。但与 ACP 有所不同, CPP-ACP 是酪蛋白磷酸肽 (CPP) 和 ACP 组成的复合体,其中 CPP 能与钙动态结合成具有生物活性的多肽,在中性和弱碱性环境中 CPP 可抑制沉淀的生成^[6]。最近的一项体外研究显示, CPP-ACP 可抑制牙本质脱矿,缩小牙本质小管直径^[9]。其可能的机制是 CPP-ACP 通过在牙表面维持高水平的钙、磷离子浓度促进牙本质再矿化^[6]。与 CPP-ACP 相比,纳米 HA 封闭牙本质的效果更明显。这可能是由于两者对牙本质小管的不同封闭机制,纳米 HA 直接进入牙本质小管对其进行封闭;而 CPP-ACP 通过诱导牙本质再矿化对牙本质小管进行封闭。

综上所述,在体外实验条件下, CPP-ACP 能缩小牙本质小管孔径,但纳米 HA 对牙本质小管的封闭效果更好。纳米 HA 可能是一种用于治疗牙本质敏感的有前景的生物材料,但若要在临床上使用,尚需进一步的体内外实验研究。

参 考 文 献

[1] Dababneh RH, Khouri AT, Addy M. Dentine hypersensitivity-an

enigma? A review of terminology, mechanisms, aetiology and management. *Br Dent J*, 1999, 187(11): 606-611.

- [2] 张成飞,林琼光,赵宝红,等. 激光促进氟保护漆对牙本质小管的封闭作用. *中华口腔医学杂志*, 2001, 36(2): 105-107.
- [3] Balasundaram G, Sato M, Webster TJ. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials*, 2006, 27(14): 2798-2805.
- [4] Wang X, Li Y, Wei J, et al. Development of biomimetic nano-hydroxyapatite/poly (hexamethylene adipamide) composites. *Biomaterials*, 2002, 23(24): 4787-4791.
- [5] Huang M, Feng J, Wang J, et al. Synthesis and characterization of nano-HA/PA66 composites. *J Mater Sci Mater Med*, 2003, 14(7): 655-660.
- [6] Rahiotis C, Vougiouklakis G. Effect of a CPP-ACP agent on the demineralization and remineralization of dentine in vitro. *J Dent*, 2007, 35(8): 695-698.
- [7] Geiger S, Matalon S, Blasbalg J, et al. The clinical effect of amorphous calcium phosphate (ACP) on root surface hypersensitivity. *Oper Dent*, 2003, 28(5): 496-500.
- [8] Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, et al. Effect of CPP-ACP paste on mechanical properties of bovine enamel as determined by an ultrasonic device. *J Dent*, 2006, 34(3): 230-236.
- [9] Oshiro M, Yamaguchi K, Takamizawa T, et al. Effect of CPP-ACP paste on tooth mineralization: an FE-SEM study. *J Oral Sci*, 2007, 49(2): 115-120.
- [10] Brännström M. Sensitivity of dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1966, 21(4): 517-526.
- [11] 王林,王小筠,徐佑兰. Gluma 脱敏剂治疗牙齿敏感症的疗效观察. *口腔医学纵横杂志*, 1998, 14(3): 167-168.
- [12] Gillam DG, Newman HN, Davies EH, et al. Clinical evaluation of ferric oxalate in relieving dentine hypersensitivity. *J Oral Rehabil*, 2004, 31(3): 245-250.
- [13] Suge T, Ishikawa K, Kawasaki A. Calcium phosphate precipitation method for the treatment of dentin hypersensitivity. *Am J Dent*, 2002, 15(4): 220-226.
- [14] Suge T, Ishikawa K, Kawasaki A, et al. Duration of dentinal tubule occlusion formed by calcium phosphate precipitation method: in vitro evaluation using synthetic saliva. *J Dent Res*, 1995, 74(10): 1709-1714.
- [15] Suge T, Ishikawa K, Kawasaki A, et al. Evaluation of post-treatment solutions for clinical use with the calcium phosphate precipitation method. *J Dent*, 1999, 27(7): 487-496.
- [16] Matsui H, Morimoto M, Horimoto K, et al. Some characteristics of fluoride-induced cell death in rat thymocytes: cytotoxicity of sodium fluoride. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21(6): 1113-1120.
- [17] 张立德. 纳米材料. 北京:化学工业出版社, 2000: 41.
- [18] Jiang T, Ma X, Wang Z, et al. Beneficial effects of hydroxyapatite on enamel subjected to 30% hydrogen peroxide. *J Dent*, 2008, 36(11): 907-914.

(收稿日期: 2008-11-10)

(本文编辑: 杨玉)