

Er:YAG激光-氟化钠联合法与亚甲基蓝-光动力疗法防龋效果及安全性的比较

张蕾 于旭红 姚丽萍
烟台市口腔医院, 烟台 264008

[摘要] 目的 比较Er:YAG激光-氟化钠联合法与亚甲基蓝-光动力疗法(MB-PDT)的防龋效果及安全性。方法 建立28只大鼠龋齿模型, 随机分成7组: 不同功率密度的光动力疗法(PDT)组、激光+氟化钠联合组、激光组、氟化钠组和0.9%生理盐水组。分光光度法检测变异链球菌生长抑制情况; 激光荧光诊断仪(LF)检测龋损脱矿程度; 组织病理观察牙髓及颊黏膜损伤状况。**结果** PDT组与激光+氟化钠联合组光密度值明显低于其他处理组($P<0.05$); 不同处理方法均可使LF值上升, 出现不同程度的脱矿; 组织病理学观察, $70\text{ mw}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的联合组和Er:YAG激光组存在牙髓及颊黏膜损伤。**结论** 相同参数下, 联合组与PDT均有良好的杀菌效果, 但PDT不良反应少、损伤小, 是一种高效且安全的防龋手段。

[关键词] 光动力疗法; Er:YAG激光; 氟化物; 组织病理

[中图分类号] R 781.05 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2020.06.005



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Comparison of the effect and safety of Er:YAG laser combined with fluoride and methylene blue-photodynamic therapy on caries prevention Zhang Lei, Yu Xuhong, Yao Liping. (Yantai Stomatological Hospital, Yantai 264008, China)

Supported by: Key Research and Development Plan (Health Projects) in Yantai City (2016WS055). Correspondence: Zhang Lei, E-mail: zhangleibaby1984@126.com.

[Abstract] **Objective** To compare the anti-caries effect and safety of Er:YAG laser combined with fluoride and methylene blue-photodynamic therapy (MB-PDT). **Methods** A total of 28 rat dental caries models were established and randomly divided into seven groups: photodynamic therapy (PDT) group, laser combined with fluoride group, laser group, sodium fluoride group, and 0.9% saline control group. Spectrophotometric optical density was used to reflect the growth of *Streptococcus mutans*. Laser-induced fluorescence diagnostic (LF) instrument was utilized to detect the demineralization degree of dental caries. Histopathological sections were employed to observe the damage of dental pulp and buccal mucosa. **Results** The optical density (OD) value of the PDT and combination groups was significantly lower than that of other treatment groups ($P<0.05$). An increase in LF value and demineralization occurred in varying degrees with different treatment methods. Histopathological observation showed that pulp and buccal mucosa injury was more obvious in the combination group of $70\text{ mw}\cdot\text{cm}^{-2}$ and Er:YAG laser group compared with other groups. **Conclusion** Under the same parameters, the combined group and PDT have good germicidal efficacy, but PDT has fewer adverse reactions and less damage. It is an effective and safe method for caries prevention.

[Key words] photodynamic therapy; Er:YAG laser; fluoride; histopathology

龋病是导致牙齿缺失的重要原因, 变异链球菌为其主要致龋菌。氟离子可通过抑制细菌生长, 促进病变组织再矿化, 影响微生物代谢活动等方面^[1],

达到龋齿预防的目的^[2], 至今仍是临床最常用的防龋方法之一。前期部分研究^[3]显示, 激光联合氟化物可有效提高防龋效果, 但摄入过量氟化物存在诸多不良影响的风险。而光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)因其自身的高效杀菌性和不耐药性, 在临床诊疗中得到普遍认可。为寻找更加高效、安全的龋病预防方法, 本实验选用Er:YAG激光-氟化钠联合法和亚甲基蓝-光动力疗法(methylene blue-

[收稿日期] 2019-12-31; **[修回日期]** 2020-08-28

[基金项目] 烟台市重点研发计划(卫生项目)(2016WS055)

[作者简介] 张蕾, 主治医师, 硕士, E-mail: zhangleibaby1984@126.com

[通信作者] 张蕾, 主治医师, 硕士, E-mail: zhangleibaby1984@126.com

photodynamic therapy, MB-PDT) 两种不同的防龋方法, 从杀菌率和安全性两方面进行比较。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

变异链球菌UA159国际标准菌株 (*Streptococcus mutans*, 首都医科大学口腔医学院研究所), 半导体激光器 (630 nm, Fotona公司, 斯洛文尼亚), 口腔激光治疗系统 (M021-3AF/3, Fotona公司, 斯洛文尼亚), 激光荧光诊断仪 (DIAGNO-dent, Kavo公司, 德国), Wistar大鼠 (北京大学医学部实验动物科学部)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立与分组 选用28只出生后21 d断奶的同窝别、同鼠龄的Wistar大鼠, 于22~24 d喂以含有广谱抗生素 (青霉素和链霉素) 的蒸馏水; 25~27 d在口腔内接种变异链球菌 (每次100 μL , 菌液浓度 $1 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$), 同时喂养致龋饲料Keyes2000#和菌液饮用水; 28 d随机抽检变异链球菌菌落数符合致龋要求 ($>10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$), 停止接种。29 d根据不同功率密度随机分成7组, 分别为35 $\text{mw} \cdot \text{cm}^{-2}$ MB-PDT组 (A组)、70 $\text{mw} \cdot \text{cm}^{-2}$ MB-PDT组 (B组)、35 $\text{mw} \cdot \text{cm}^{-2}$ Er:YAG激光+2%氟化钠组 (C组)、70 $\text{mw} \cdot \text{cm}^{-2}$ Er:YAG激光+2%氟化钠组 (D组)、70 $\text{mw} \cdot \text{cm}^{-2}$ Er:YAG激光组 (E组)、2%氟化钠组 (F组)、0.9%生理盐水组 (G组, 作为空白对照组), 每组4只大鼠, 每只取上下颌最后2颗磨牙共8颗, 每组样本32颗。

A、B组在大鼠磨牙咬合面涂布光敏剂亚甲基蓝 (methylene blue, MB) 孵育5 min后使用半导体激光照射; E组使用Er:YAG激光进行照射; F组在牙齿殆面贴放浸有2%氟化钠的定量滤纸4 min; C、D组则是Er:YAG激光照射完毕再使用定量滤纸进行氟处理。处理前用100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛麻醉 (0.003 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$) 各组大鼠, 每周按上述方法处理大鼠1次, 连续处理4周, 直至实验结束处死大鼠。

1.2.2 细菌浓度检测 用消毒棉拭子按同一方向分别擦拭各实验组大鼠咬合面一圈, 放入到5 mL的离心管里, 充分振荡混匀培养液 (3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1} \times 2 \text{ min}$), 取3 mL于分光光度计下测各组菌悬液在540 nm处光密度 (optical density, OD) 值。

1.2.3 激光荧光诊断仪 (laser-induced fluorescence diagnostic, LF) 处理 分组处理前, 检测各组样本初始LF值。实验结束, 将各组样本置于矿液中进行脱矿处理12 d后, 记录终末LF值。具体测量方法为:

将大鼠磨牙咬合面进行十字交叉式划分, 寻找4个测量点, 反复测定3次后取平均值作为该样本LF值。

1.2.4 牙髓组织病理观察 样本分组固定, 经过脱钙、包埋、切片、苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色、封固后, 运用光学显微镜观察牙髓组织, 依照Ardian等^[4]制定的标准进行评分, 具体如下。0: 牙髓组织无明显变化; 1: 部分血管扩张、充血, 成牙本质细胞层排列紊乱; 2: 成牙本质细胞层坏死; 3: 牙髓组织凝固性坏死。

1.2.5 颊黏膜组织病理观察 切取大鼠颊黏膜组织, 经过冲洗、固定、脱水、透明、包埋、切片、烘烤、HE染色后在光学显微镜下观察。

1.3 统计分析

采用SPSS 22.0软件对数据进行分析, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 对各组数据进行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差表示, LSD法进行两两之间的比较, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同处理方式对变异链球菌生长的影响

A~G组的OD值分别为0.25 \pm 0.02、0.15 \pm 0.01、0.28 \pm 0.02、0.17 \pm 0.01、0.35 \pm 0.02、0.33 \pm 0.01、0.63 \pm 0.03。与G组相比, A~F组的OD值均有显著下降, 说明细菌生长受到不同程度的抑制; 其中B、D组的OD值降低最显著, 即功率密度为70 $\text{mw} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时的抑菌效果最显著, 但2组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 LF的检测结果

各组LF的检测结果见表1。通过LF值反映, 各组均有不同程度的脱矿。其中G组LF增加值最大, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 虽然C、D组增加值最低, 但差异无明显统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 各组LF的检测结果

Tab 1 Examination results of LF in each group

$n=32$

组别	初始值	终末值	增加量
A组	3.56 \pm 0.67	13.47 \pm 3.16	9.91 \pm 2.46*
B组	3.85 \pm 0.56	13.36 \pm 3.75	9.51 \pm 2.77*
C组	3.71 \pm 0.73	11.18 \pm 4.91	7.47 \pm 2.79*
D组	3.88 \pm 0.66	11.19 \pm 3.21	7.31 \pm 1.96*
E组	3.76 \pm 0.62	12.25 \pm 4.02	8.49 \pm 1.88*
F组	3.73 \pm 0.58	15.51 \pm 4.19	11.78 \pm 2.21*
G组	3.79 \pm 0.61	24.19 \pm 4.31	20.42 \pm 3.12

注: *与G组相比差异有统计学意义, $P<0.05$ 。

2.3 牙髓组织病理观察结果

通过牙髓组织反应评分可见, C、D、E组的评

分与其他各组相比明显升高,且差异有统计学意义(表2)。各组牙髓的组织病理表现结果见图1。F组和G组牙髓组织反应为0级表现;A、B、C组偶见1级表现,毛细血管充血、扩张;D组牙髓反应有时可达到2级,局部渗出、细胞空泡变性,成牙本质细胞和成纤维细胞增生;E组毛细血管的扩张、充血深达牙髓深部,伴有炎细胞浸润。

2.4 颊黏膜组织病理观察结果

各组颊黏膜组织病理观察结果见图2。A、B、G组的大鼠颊黏膜组织病理观察基本正常;F组中颊黏膜仅可见炎症细胞浸润,其余未见明显变化;C、D组颊黏膜上皮层呈现不同程度的萎缩、变薄,其他未见显著改变;E组可见炎症细胞聚集,黏膜下

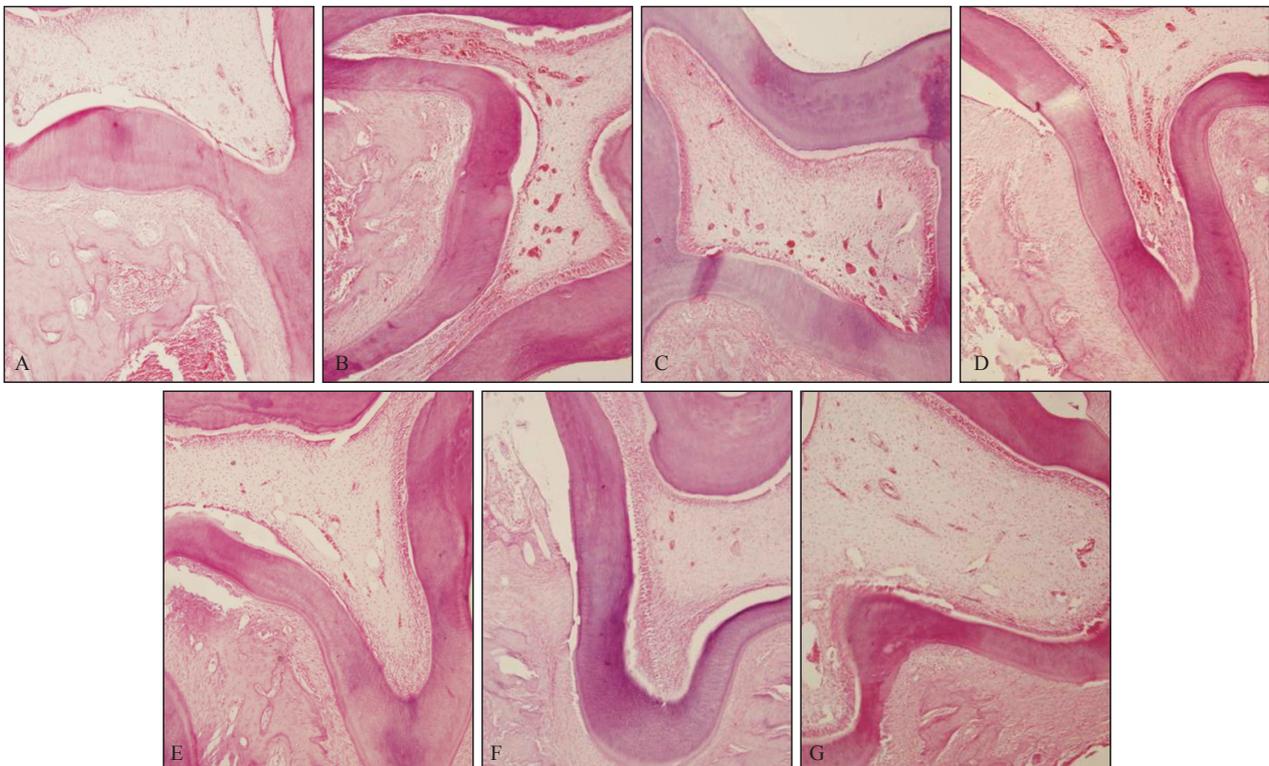
层血管减少,固有层有大范围粉红色物质沉积。

表 2 牙髓组织反应评分比较

Tab 2 Comparisons of pulp tissue response scores

组别	0分	1分	2分	3分
A组	32	0	0	0
B组	30	2	0	0
C组*	25	5	2	0
D组*	23	6	3	0
E组*	22	6	3	1
F组	32	0	0	0
G组	32	0	0	0

注: *与其他各组相比差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。



A~G: 分别为A~G组。

图 1 各组牙髓组织病理观察 HE × 100

Fig 1 Pathological observation of pulp tissue in each group HE × 100

3 讨论

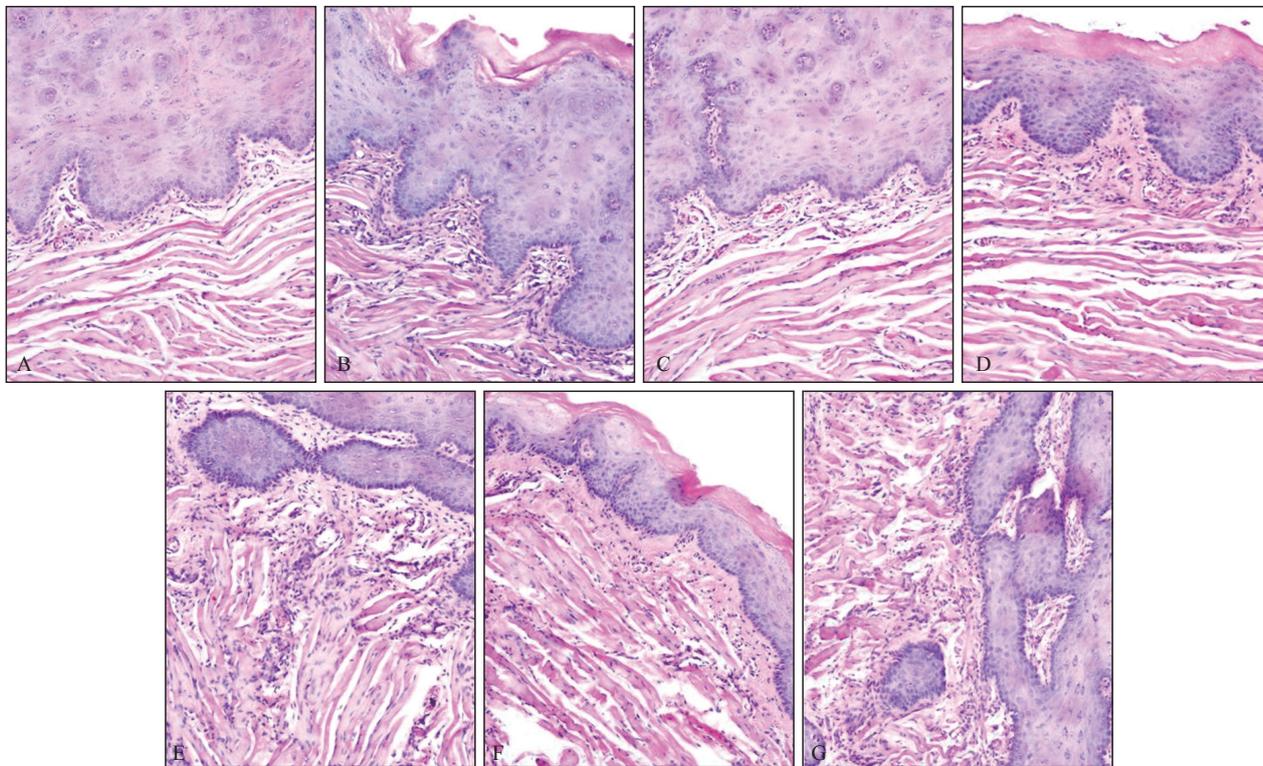
龋病是诸多全身疾病的重要诱因。目前的防龋研究工作主要从以下三方面开展:一是破坏致龋菌生物膜,降低致龋能力;二是减少脱矿,促进再矿化^[5];三是基因层面研究免疫防龋。本实验选择比较Er:YAG激光联合氟化物和PDT两种防龋措施,通过对变异链球菌生长、代谢的影响,对牙髓、牙周组织的损伤情况,为临床提供更为高效、安全防龋方法。

PDT利用光激发敏剂产生活性氧(active oxygen, ROS),选择性杀伤细胞和组织,从而治愈疾病。因其具有作用范围广、安全性能高、不易耐受等独特的优势,在口腔医学领域内得到越来越多的关注^[6],前期体外实验结果证明,PDT可显著抑制变异链球菌生长。本实验选择MB-PDT进行防龋动物实验,与体外实验相比,动物模型可更好地模拟体内环境,提高实验的准确性。

氟化物因其具有破坏细菌代谢,减少产酸^[7],提升抗酸能力^[8],促进再矿化等诸多优势,而成为目前临床应用最广的防龋材料^[9],其中氟化钠的安

全性和有效性已经美国食品药品监督管理局认证。虽然氟化物能在一定程度上预防龋病产生,但仍有不少研究^[10]显示,如过量摄入氟元素可导致氟牙症、氟中毒等不良影响。因此,有学者提出氟化物与激光联合应用,达到提升氟利用率,减少使用频次,从

而减少不良反应的目的。Er:YAG激光是口腔临床工作中常用的激光,具有精准、杀菌、刺激组织愈合生长的能力^[11]。因而本实验选用Er:YAG激光+2%氟化钠进行防龋研究。



A~G: 分别为A~G组。

图 2 颊黏膜组织病理观察 HE × 200

Fig 2 Histopathological observation of buccal mucosa HE × 200

本实验结果显示:与G组相比,其余各组变异链球菌的生长和代谢均受到不同程度的抑制,且B、D组的OD值降低最显著,证明两种防龋方法均有良好的杀菌作用。通过LF检查,C、D组的LF增加值最少,即脱矿最轻,表明Er:YAG激光对氟化钠可产生协同作用,其原理可能为:一是激光促进氟磷灰石形成^[2];二是促进局部氟库形成^[12];三是激光促进氟化物吸收,提升抗酸能力。

牙髓组织遭到外界激惹,可表现为轻微的血液充盈,及时去除刺激,炎症反应可迅速缓解,恢复正常状态^[13]。但当刺激较强烈或持续时间较长时,激光热量可导致牙髓血流减慢,形成血栓,甚至发生坏死。通过观察本实验中牙髓组织病理结果,A、B组无明显牙髓组织反应,PDT是一种冷光诱导的生物化学作用,调整适当的能量参数,不会对照射区组织产生热损伤;但C、D、E组均出现了不同程度变化,尤其是当功率密度增加到70 mw·cm⁻²时,牙髓免疫炎症反应剧烈,表现为深达牙髓深部的血管扩张、充血并伴有炎细胞浸润,对牙髓组织伤害性

较大。

通过颊黏膜的组织病理观察,PDT组未见明显变化,因携带正电荷的光敏剂,可穿透细胞膜迅速进入细胞深层,PDT对病变区进行选择杀伤,但不损伤正常组织;由于口腔黏膜在涂布氟化钠的过程中,会受到氟化钠的直接刺激引起损害^[14],但由于本实验使用的氟化钠浓度较低,且作用时间较短,因而除了部分炎症细胞浸润外,未见到其他明显的损伤。本研究使用波长为2 940 nm Er:YAG激光,与牙体组织的3 000 nm吸收峰值相近,可有效减少热损伤,但当Er:YAG激光功率达到一定剂量后,E组仍可见大量的炎症细胞,出现黏膜下层血管减少,固有层大范围粉红色物质沉积。

综上所述,虽然Er:YAG激光联合氟化钠疗法与PDT均有良好的杀菌效果,但PDT对于牙髓、牙周组织刺激较小,炎症反应较轻,应用安全,且不会发生氟化物中毒等不良反应,因此PDT在龋病预防中的优势较Er:YAG激光联合氟化钠疗法更显著。今后应严格掌握PDT的使用参数,更好将PDT应用

于临床龋病预防工作中。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Ten Cate JM. Fluorides in caries prevention and control: empiricism or science[J]. *Caries Res*, 2004, 38(3): 254-257.
- [2] Hoceini A, Khelil NK, Ben-Yelles I, et al. Caries-related factors and bacterial composition of supragingival plaques in caries free and caries active Algerian adults[J]. *Asian Pacif J Trop Biomed*, 2016, 6(8): 720-726.
- [3] Hossain M, Kimura Y, Nakamura Y, et al. A study on acquired acid resistance of enamel and dentin irradiated by Er,Cr:YSGG laser[J]. *J Clin Laser Med Surg*, 2001, 19(3): 159-163.
- [4] Ardian JC, Berniev JL, Sprague WG. Laser and dental pulp [J]. *J Am Dent Assoc*, 1971, 83(1): 113-117.
- [5] 高宇, 米磊, 刘怀勤, 等. 窝沟封闭术联合氟保护漆在龋齿患儿中的预防效果分析[J]. *广西医科大学学报*, 2016, 33(3): 440-442.
- Gao Y, Mi L, Liu HQ, et al. Analysis on the protective effect of the combination of fissure sealants and fluoride protector on children with dental caries[J]. *J Guangxi Med Univ*, 2016, 33(3): 440-442.
- [6] Cieplik F, Tabenski L, BuchaUa W, et al. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens[J]. *Front Microbiol*, 2014, 5: 405.
- [7] 姚红英, 隋文. 4种防龋方法在固定矫治中预防牙釉质脱矿的研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2017, 33(4): 526-530.
- Yao HY, Sui W. Clinical evaluation of the preventing effect of 4 anti-caries preparations on enamel decalcification in orthodontic treatment with fixed appliance[J]. *J Pract Stomatol*, 2017, 33(4): 526-530.
- [8] 郑旭, 符起亚, 王贻宁. 氟保护漆对酸蚀牙釉质显微硬度与脱矿作用的影响[J]. *广东医学*, 2015, 36(23): 3651-3653.
- Zheng X, Fu QY, Wang YN. Effect of fluoride protector on microhardness and demineralization of acid etched enamel [J]. *Guangdong Med J*, 2015, 36(23): 3651-3653.
- [9] 刘林花, 史运明, 李红梅, 等. 一种新型含稳定亚锡-氟化钠牙膏的菌斑渗透率和脂多糖中和效率的临床评价[J]. *实用口腔医学杂志*, 2017, 33(6): 758-763.
- Liu LH, Shi YM, Li HM, et al. Enhanced efficiency of stannous penetration and lipopolysaccharide neutralization by a novel stabilized stannous-containing sodium fluoride dentifrice[J]. *J Pract Stomatol*, 2017, 33(6): 758-763.
- [10] Lee HJ, Han DH. Exploring the determinants of secular decreases in dental caries among Korean children[J]. *Commun Dent Oral Epidemiol*, 2015, 43(4): 357-365.
- [11] 李圆红, 李忠成, 罗梦奇, 等. Nd:YAG激光对牙根面结构及变异链球菌黏附的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2016, 34(6): 579-583.
- Li YH, Li ZC, Luo MQ, et al. Effects of Nd: YAG laser irradiation on the root surfaces and adhesion of *Streptococcus mutans*[J]. *West China J Stomatol*, 2016, 34(6): 579-583.
- [12] 唐玉香, 武洁, 徐万田, 等. 酸蚀技术对乳牙玻璃离子窝沟封闭临床效果的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2018, 36(6): 646-649.
- Tang YX, Wu J, Xu WT, et al. Clinical efficacy of the glass ionomer cement used as pit and fissure sealant with and without acid etching in primary teeth[J]. *West China J Stomatol*, 2018, 36(6): 646-649.
- [13] 李春年. 半导体激光美白程序对牙髓组织中降钙素相关肽和5-羟色胺的影响及意义[J]. *口腔医学研究*, 2018, 34(5): 563-566.
- Li CN. Effect of semiconductor laser on CGRP and 5-HT of pulp tissue during whitening procedure[J]. *J Oral Sci Res*, 2018, 34(5): 563-566.
- [14] Prazmo EJ, Kwaśny M, Łapiński M, et al. Photodynamic therapy as a promising method used in the treatment of oral diseases[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2016, 25(4): 799-807.

(本文编辑 杜冰)