P-PAMAM 介导不同钙磷比再矿化液诱导牙釉质再矿化的实验研究

孙思怡[1,2],沙　颖[1,2],秦梓一[1,2],江　飞[2,3],徐　海[1,2],张光东[1,2]

[摘要]　**目的**　本研究旨在探究不同钙磷比例的再矿化液对磷酸化聚酰胺胺(phosphorylated polyamidoamine,P-PAMAM)树状大分子诱导形成的再矿化层特性的影响,以期获得适当的 P-PAMAM 质量浓度与再矿化液钙磷比,为构建口内再矿化体系提供思路。**方法**　体外磷酸化修饰 PAMAM,用衰减全反射傅里叶变换红外光谱和核磁共振氢谱对修饰结果进行确证,通过对 P-PAMAM 吸附羟基磷灰石(hydroxyapatite,HAP)的能力及其生物安全性进行分析筛选 P-PAMAM 质量浓度并制备脱矿人牙釉质样本。以再矿化条件为 2∶1+P-P、1.67∶1+P-P、1.67∶1、1∶1+P-P、0.5∶1+P-P 进行分组,体外矿化脱矿人牙釉质样本 24 h、1 周、3 周后,用扫描电子显微镜分析牙釉质表面形态,用显微维氏硬度分析再矿化层硬度,结合 X 射线衍射分析再矿化层晶体结构。**结果**　再矿化液钙磷比为 1.67∶1 时,在 4 mg/mL P-PAMAM 介导下,1 周后脱矿牙釉质可形成致密平整的再矿化层,其晶体结构与天然 HAP 晶体类似,3 周后牙釉质表面显微维氏硬度显著高于其余各实验组(P<0.000 1),恢复至健康牙釉质水平。缺乏 P-PAMAM 介导的再矿化层虽有一定厚度,但大量无序化生长的晶体使其表面形貌和显微维氏硬度存在缺陷。高钙磷比(2∶1)环境下,P-PAMAM 诱导形成的再矿化层在 3 周后趋于无序化,限制牙釉质表面形貌和力学性能的恢复。低钙磷比(1∶1、0.5∶1)限制了 P-PAMAM 的诱导作用,再矿化层形成不良,再矿化晶体中碳羟基磷灰石和无定形磷酸钙含量升高。**结论**　P-PAMAM 介导的再矿化在矿化液中钙磷比为 1.67∶1 时能达到良好的诱导脱矿牙釉质再矿化作用,升高或降低钙磷比均可能降低其疗效。

[关键词]　磷酸化聚酰胺胺树状大分子;人牙釉质;再矿化;羟基磷灰石
[中图分类号]　R781.2　　[文献标识码]　A　　[文章编号]　1003-9872(2026)09-0663-08
[doi]　10.13591/j.cnki.kqyx.2026.09.004

Experimental study on enamel remineralization induced by remineralization solutions with different calcium-to-phosphate ratios mediated by P-PAMAM

SUN Siyi, *SHA Ying*, *QIN Ziyi*, *JIANG Fei*, *XU Hai*, *ZHANG Guangdong*. (*Department of Emergency and General Dentistry*, *The Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University*, *Nanjing 210029*, *China*)

Abstract: **Objective**　To investigate the effects of remineralization solutions with different calcium-to-phosphate ratios on the properties of the remineralized layer induced by phosphorylated polyamidoamine (P-PAMAM) dendrimers, to determine appropriate P-PAMAM mass concentrations and calcium-to-phosphate ratio, and to provide insights for the construction of an intraoral remineralization system. **Methods**　Phosphoryl groups were used to modify PAMAM *in vitro*. The modification results were confirmed by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy and proton nuclear magnetic resonance. The mass concentration was screened by analyzing the ability of P-PAMAM to absorb hydroxyapatite (HAP) and its biocompatibility. Demineralized human enamel samples were prepared. The samples were divided into groups with remineralization conditions of 2∶1+P-P, 1.67∶1+P-P, 1.67∶1, 1∶1+P-P, and 0.5∶1+P-P. After 24 hours, 1 week, and 3 weeks of *in vitro* mineralization, the surface morphology was analyzed by scanning electron microscopy, the hardness of the remineralization layer was analyzed by micro Vickers hardness tester, and the crystal structure of the remineralization layer was analyzed by X-ray diffraction. **Results**　Under a calcium-to-phosphate ratio of 1.67∶1 and the mediation of 4 mg/mL P-PAMAM, a dense and smooth remineralized layer formed on the demineralized enamel surface after 1 week, with a crystal structure similar to that of natural HAP. After 3 weeks, the surface micro Vickers hardness of the enamel was significantly higher than that of the other groups (P<0.000 1), and the enamel surface hardness could be restored to the level of healthy enamel. Although the remineralized layer formed in the absence of P-PAMAM reached a certain thickness, the disordered growth of numerous crystals resulted in defects in surface morphology and micro Vickers hardness. Under a high calcium-to-phosphate ratio (2∶1), the remineralization layer induced by P-PAMAM tended to be disordered in the later stage, which limited the recovery of the surface morphology and mechanical properties of the enamel. A low calcium-to-phosphate ratio (1∶1, 0.5∶1)

基金项目:江苏省科教能力提升工程——江苏省研究型医院(YJXYYJSDW4),江苏省医学创新中心(CXZX202227);南京市卫生科技发展专项资金(YKK24293)
作者单位:1 南京医科大学附属口腔医院急诊、综合诊疗科,江苏南京(210029);2 南京医科大学口腔医学院,江苏南京(210029);3 南京医科大学附属口腔医院口腔种植科,江苏南京(210029)
通信作者:张光东　E-mail:egd_zhang@ njmu.edu.cn

limited the induction effect of P-PAMAM, resulting in poor formation of the remineralization layer and an increase in the content of carbonated hydroxyapatite and amorphous calcium phosphate in the remineralization crystals. **Conclusion** P-PAMAM-mediated remineralization achieves optimal efficacy when the calcium-to-phosphate ratio in the mineralization solution is 1.67∶1. Increasing or decreasing the ratio may reduce its effectiveness.

Key words: phosphorylated polyamidoamine dendrimers; human tooth enamel; remineralization; hydroxyapatite

Stomatology, 2026, 46(9): 663-670

牙釉质是人体最坚硬的组织,其中羟基磷灰石($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, hydroxyapatite, HAP)占牙釉质含量的 94%~96%[1]。牙釉质脱矿是龋病发生的初始阶段,常见于正畸固定矫治、酸甜饮食习惯、口腔卫生维护不佳等,其本质是 HAP 在酸性环境下的溶解[2-3]。在脱矿未形成实质性缺损前,如果应用相应手段改变牙釉质表面晶体结构,或诱导牙釉质表层形成新的再矿化层[4],可在一定程度上延缓牙釉质脱矿的进程,延后牙釉质缺损的出现。在目前的临床应用中,除传统的氟化钠(NaF)、氟化亚锡(SnF_2)制剂等,酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙、釉原蛋白仿生肽等也已作为再矿化治疗药物投入使用。有研究表明,磷酸化聚酰胺胺(phosphorylated polyamidoamine, P-PAMAM)树状大分子在诱导牙釉质再矿化过程中具有良好的作用[5]。聚酰胺胺(polyamidoamine, PAMAM)树状大分子因其具有空腔结构和大量的末端活性基团[6],并且具有与天然釉原蛋白相似的自组装行为[7],能够模拟釉原蛋白的作用,在脱矿牙釉质处作为矿化结晶模板,诱导与天然牙釉质晶体的结构、方向类似的 HAP 晶体生长。磷酸基团能依靠与钙离子的亲和力将 PAMAM 锚定在裸露的脱矿牙釉质晶体表面,并从环境中吸引游离钙离子参与矿化,由 PAMAM 分子作为矿化模板调控晶体生长[8]。

先前的研究中,再矿化体系的钙磷离子物质的量浓度比(以下简称为钙磷比)常沿用接近天然唾液的 1.67∶1,然而,再矿化环境中的钙磷比如何调控树状大分子诱导的再矿化鲜有研究。研究表明,对不同钙磷饱和度及氟浓度环境下釉原蛋白体外诱导生成的再矿化层进行表面能谱分析,并非所有再矿化晶体都能得到与 HAP 晶体相同或接近的钙磷比例,再矿化层可能由磷酸八钙、磷酸三钙(TCP)等晶体组成[9]。促使 P-PAMAM 发挥最大化的诱导矿化作用需要适宜的矿化环境支持,因此,探究合适的矿化液钙磷比至关重要。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

G3.0 PAMAM(威海晨源,中国);亚磷酸、37%浓盐酸、40%甲醛、25%氢氧化铵、氢氧化钠(国药沪试,中国);高糖 DMEM 培养基、青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶(Gibco,美国);胎牛血清(Sincell,美国);磷酸盐缓冲液(Hyclone,美国);纳米 HAP(阿拉丁,中国);CCK-8 试剂盒(DOJINDO,日本);次氯酸钠(中鼎,中国);抗酸指甲油(OPI,美国);37%磷酸酸蚀剂(Heraeus Kulzer,德国);人工唾液(飞净,中国);磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、无水氯化钙($CaCl_2$)(麦克林,中国)。

电子天平(Mettler Toledo,瑞士);磁力搅拌器、37 ℃恒温摇床(国华仪器,中国);冷冻干燥机(Christ,德国);红外光谱仪、600 MHz 核磁共振谱仪、X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)仪(Bruker,德国);超纯水机(ELGA,英国);超净工作台(Baker,美国);细胞培养箱(Heraeus,德国);恒温台式多用离心机、自动细胞计数仪(Thermo,美国);酶标仪(BioTek,美国);pH 计(Mettler Toledo,瑞士);超声波振荡仪(方奥,中国);体视显微镜(Nikon,日本);扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)(TESCAN,捷克);显微维氏硬度计(众研,中国)。

1.2 P-PAMAM 的合成和确证

混合 1 mL 500 mg/mL 的 G3.0 PAMAM 树状大分子水溶液、500 mg 亚磷酸、5.8 mL 去离子水。在混合物中加入 2.5 mL 37%浓盐酸,加热至 40 ℃保持 30 min。滴加 710 μL 40%甲醛溶液,缓慢搅拌,反应温度 40 ℃,保持 2 h。缓慢滴入 25%氢氧化铵中和混合物。将反应物转移至透析袋(1 000 Da)中,用双蒸水透析 48 h,过程中磁力搅拌器持续搅拌,每 12 h 更换双蒸水,以去除未反应单体。最后通过冻干得到 P-PAMAM 固体冻干粉[10]。

吸取 PAMAM 水溶液和冻干前的液体 P-PAMAM 各 20 μL 进行衰减全反射傅里叶变换红外光谱术(attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR)分析,设置分辨率为 4 cm^{-1},扫描次数 32 次,光谱范围为 4 000~400 cm^{-1}。吸取 PAMAM 水溶液和冻干前的液体

P-PAMAM各 0.5 mL 进行核磁共振氢谱(proton nuclear magnetic resonance,^{1}H-NMR)分析,以 0.5 mL 氘代试剂 D_2O 充分溶解样品后转移至洁净的核磁管中,在 600 MHz 核磁共振谱仪下,设置扫描次数为 32 次,信号衰减时间为 5 s。结合 ATR-FTIR 和 ^{1}H-NMR结果对 P-PAMAM 的结构进行确证。

1.3　脱矿牙釉质模型的建立

取健康的人第三磨牙(均来源于南京医科大学附属口腔医院颌面外科因正畸或预防性拔除而丢弃的、临床治疗完成后无其他用途的废弃样本),拔除后用手术刀刀片去除牙齿上的有机污染物。3%次氯酸钠浸泡去除附着细菌,PBS 冲洗。分离牙根,切割牙釉质并制备成 3 mm×3 mm×1 mm 的样品。为了建立脱矿牙釉质模型,使用 200、400、600、800、1 000、2 000 目砂纸抛光牙釉质样品工作面,其他表面用抗酸指甲油涂覆。超声处理 30 min,37%磷酸酸蚀剂脱矿 30 s,PBS 洗涤 4 次,超声处理 5 min。将得到的脱矿牙釉质样品保存在去离子水中。

1.4　P-PAMAM 浓度选定

1.4.1　HAP 吸附实验

去离子水溶解 P-PAMAM 冻干粉,制备 0.5、1、2、4、6、8 mg/mL P-PAMAM 水溶液。测定不同质量浓度 P-PAMAM 于 281 nm 波长处的光密度(optical density,OD)值。将 100 mg HAP 加入 1 mL 不同质量浓度的 P-PAMAM 水溶液中。37 ℃搅拌 24 h,10 000 r/min 离心 3 min。取上清液,测定其在 281 nm 处 OD 值进行分析。通过吸附前后溶液 OD 值(281 nm)的差值来计算不同质量浓度的 P-PAMAM 水溶液对 HAP 的吸附能力。每组进行 3 次生物学重复。

1.4.2　细胞毒性实验

小鼠成纤维细胞 L929(葵赛,中国)以每孔 1×10^4个的细胞量接种于 96 孔板中,每孔加入 100 μL 基础培养基(含 10%的热灭活胎牛血清、1%青霉素-链霉素溶液的高糖 DMEM 培养基),在 37 ℃、5% CO_2条件下培养 24 h。使用基础培养基配制不同质量浓度的 P-PAMAM 溶液(0、0.5、1、2、4、6 mg/mL),随后将 96 孔板中的培养液更换为 100 μL 新鲜配制的 P-PAMAM 溶液。孵育 24、72 h 后,吸除培养液,每孔加入 100 μL 混合后的 CCK-8 工作液(含 10 μL CCK-8 与 90 μL 基础培养基)避光孵育 2 h 后,用酶标仪测定每孔 CCK-8 工作液在 450 nm 波长的 OD 值以评估细胞活性(5 个复孔,取平均值),重复 3 次。

L929 细胞在不同质量浓度的 P-PAMAM 中培养 24、72 h 的细胞存活率计算公式为:

$$细胞存活率(\%)=\frac{OD_{实验组}-OD_{空白组}}{OD_{对照组}-OD_{空白组}}\times100。$$

其中,对照组为 0 mg/mL P-PAMAM 溶液组,空白组为无细胞对照组。

1.5　体外再矿化

$CaCl_2$、KH_2PO_4 分别以 2∶1、1.67∶1、1∶1、0.5∶1 的钙磷比,在室温下如表 1 所示以人工唾液为溶剂配制再矿化液,用 4 g/L NaOH 溶液调整 pH 至 7.0。脱矿牙釉质样品由 50 μL 4 mg/mL 的 P-PAMAM 水溶液包被,室温静置 60 min 自然干燥。将样品浸入再矿化液中,37 ℃水浴。每 24 h 更换为新鲜配制的再矿化液。

根据脱矿牙釉质样品的再矿化条件,将本研究中涉及的样品进行分组:①2∶1+P-P 组使用 4 mg/mL P-PAMAM 和钙磷比 2∶1 的再矿化液对脱矿牙釉质样本进行再矿化;②1.67∶1+P-P 组使用 4 mg/mL P-PAMAM 和钙磷比 1.67∶1 的再矿化液对脱矿牙釉质样本进行再矿化;③1.67∶1 组直接使用钙磷比 1.67∶1 的再矿化液处理脱矿牙釉质样本;④1∶1+P-P 组使用 4 mg/mL P-PAMAM 和钙磷比 1∶1 的再矿化液处理脱矿牙釉质样本;⑤0.5∶1+P-P 组使用 4 mg/mL P-PAMAM 和钙磷比 0.5∶1 的再矿化液处理脱矿牙釉质样本。

表 1　不同钙磷比的再矿化液的配制(每 50 mL)

Tab.1　Formulation of remineralization solutions with different calcium-to-phosphate ratios (per 50 mL)

钙磷比	$CaCl_2$	KH_2PO_4
2∶1	18.55 mg	11.35 mg
1.67∶1	15.55 mg	11.35 mg
1∶1	9.23 mg	11.35 mg
0.5∶1	4.65 mg	11.35 mg

1.6　再矿化表征分析

牙釉质样品分别在再矿化液中处理 24 h、1 周、3 周后从再矿化液中取出,用去离子水反复冲洗 5 次。表面溅射 Au 涂层后,用 SEM 观察矿化后的牙釉质表面并进行结构分析。牙釉质样本矿化 3 周后,用显微维氏硬度计以 0.490 3 N 的载荷保持 10 s,每组 3 个样本,每个样本随机选取 3 个测试点取其平均值,避开釉面裂隙、气泡及杂质区域,且相邻两压痕中心间距大于压痕对角线长度 3 倍,记录显微维氏硬度。对矿化 3 周后的样本进行 XRD 分析,使用广角衍射测试模式,扫描速率 2°/min,扫描角度范围 20°~60°。

1.7　统计学分析

数据以均数±标准差表示。采用 GraphPad

Prism 8.3 进行统计分析,数据进行正态性检验和方差齐性检验。多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较采用 Dunnett 检验或 Tukey HSD 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 P-PAMAM 的化学结构特征

2.1.1 ATR-FTIR 光谱

用 ATR-FTIR 对 PAMAM 及 P-PAMAM 进行分析,结果如图 1 所示,未修饰的 PAMAM 的红外光谱在波数 1 626 cm^{-1}和 1 563 cm^{-1}附近呈现酰胺Ⅰ带和酰胺Ⅱ带的特征吸收峰。磷酸化修饰后,P-PAMAM 出现了两个新的吸收峰,其中 1 075 cm^{-1}附近的吸收峰代表磷酸根 P—O 反对称伸缩运动,978 cm^{-1}附近的吸收峰代表磷酸根 P—O 对称伸缩运动[11],表明亚磷酸基团接枝成功。

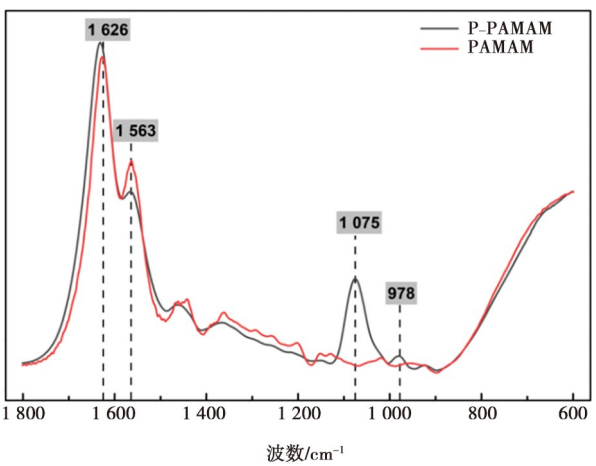


图 1 PAMAM 和 P-PAMAM 的 ATR-FTIR 光谱

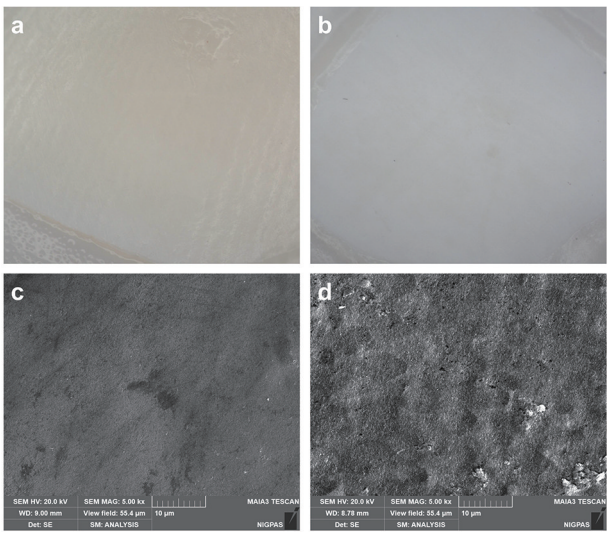
Fig.1 ATR-FTIR spectrum of PAMAM and P-PAMAM

2.1.2 ^{1}H-NMR 分析

^{1}H-NMR 分析结果显示,PAMAM 在化学位移(δ)= 2.33~3.63 的特征峰对应 PAMAM 骨架上的亚甲基(—N—CH_2—CH_2—)质子,主要分为两类:与叔氮或酰胺相邻的质子,位于 δ = 2.40~2.70 附近;与羟基或氨基相邻的质子,位于 δ = 3.10~3.60 附近[12]。磷酸基团有强烈的吸电子诱导效应,会通过氧或氮原子使相邻的亚甲基质子的电子云密度降低[11]。磷酸化修饰后,P-PAMAM 在 δ = 4.20~4.53 出现新的特征峰,提示磷酸酯或磷酸酰胺的形成。

2.2 脱矿牙釉质模型的表面特征

脱矿前的牙釉质在体视显微镜下表面光洁,呈现健康的淡黄色半透明光泽,脱矿后,牙釉质表面失去光泽,呈现白垩色云雾状粗糙表面(图 2a、b)。SEM 下,未脱矿的牙釉质表层致密光滑,脱矿后表面粗糙,可见釉柱轮廓(图 2c、d)。



a:脱矿前,体视显微镜下观(×30);b:脱矿后,体视显微镜下观(×30);c:脱矿前,SEM 镜下观(×5 000);d:脱矿后,SEM 镜下观(×5 000)。

图 2 牙釉质脱矿前后的体视显微镜与 SEM 下视野

Fig.2 Stereomicroscope and SEM views of enamel before and after demineralization

2.3 P-PAMAM 质量浓度的选定

2.3.1 HAP 吸附实验

随着 P-PAMAM 水溶液质量浓度的增高,P-PAMAM 对 HAP 的吸附能力呈现上升趋势。P-PAMAM 水溶液质量浓度大于 4 mg/mL 以后,OD 值差值逐渐趋于平稳,提示此时 P-PAMAM 对 HAP 的吸附能力趋于饱和(图 3)。

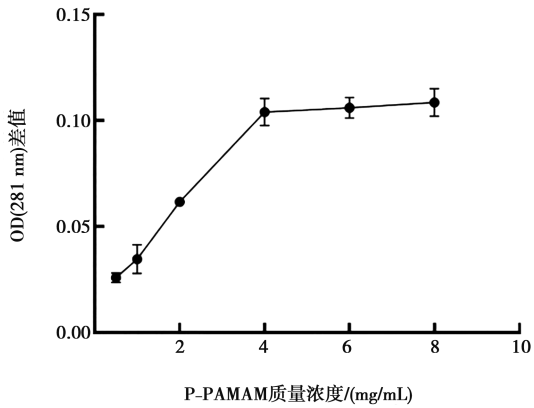


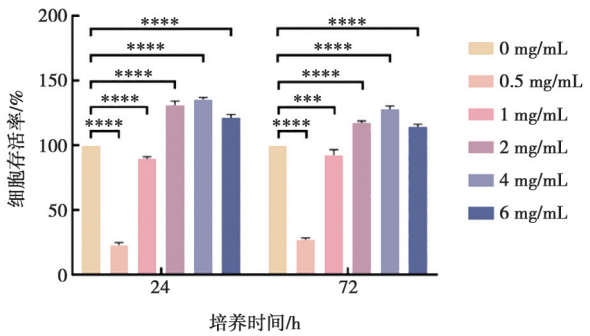
图 3 P-PAMAM 对 HAP 的吸附能力

Fig.3 Adsorption capacity of P-PAMAM for HAP

2.3.2 细胞毒性实验

L929 细胞在不同质量浓度的 P-PAMAM 中培养 24 h、72 h 后,各实验组细胞存活率与对照组(0 mg/mL P-PAMAM 组)相比,存在显著差异。其中,0.5 mg/mL 组的 24 h、72 h 细胞存活率与对照组相比均显著降低(24 h:F = 2 216,P<0.000 1;72 h:F =

1 286，P<0.000 1），1 mg/mL 组细胞存活率较对照组降低，在细胞培养 24 h 与对照组有显著差异（P<0.000 1），且该差异在 72 h 时仍具有统计学意义（P<0.001）。2、4、6 mg/mL 组的细胞存活率较对照组均显著升高（P<0.000 1）（图 4）。结果表明，2、4、6 mg/mL 的 P-PAMAM 在细胞培养 72 h 内无明显细胞毒性。结合 HAP 吸附实验的结果，本研究选定 4 mg/mL 为后续再矿化实验的 P-PAMAM 质量浓度，此质量浓度可兼顾钙磷离子的高效利用和良好的生物相容性。



与对照组（0 mg/mL 组）相比，***：P<0.001；****：P<0.000 1。

图 4　L929 细胞在不同质量浓度的 P-PAMAM 中培养 24、72 h 的细胞存活率

Fig.4　Cell survival rate of L929 cells cultured with different mass concentrations of P-PAMAM for 24 h and 72 h

2.4　再矿化表征分析

2.4.1　SEM

使用 SEM 技术对再矿化液处理后的牙釉质样本表面形貌进行表征。结果显示，处理 24 h 的 2∶1+P-P 组牙釉质样品表面形成再矿化物，处理 1 周，样品表面可形成较致密的再矿化表层，3 周后再矿化层晶体形成趋向无序化（图 5a1～a3）。1.67∶1+P-P 组中，24 h 牙釉质样品表面即可沉积较厚的再矿化层，1 周后再矿化层表面致密且光滑平整，3 周后再矿化层晶体亦有无序化趋势（图 5b1～b3）。1∶1+P-P 组中，牙釉质样品表面形成的矿化层松散，表面较为粗糙（图 5 d1～ d3）。而 0.5∶1+P-P 组牙釉质样品即使再矿化 3 周，表面所形成的再矿化层也相对较薄，仍可辨认出釉柱形态（图 5e3）。综上所述，当再矿化液的钙磷比为 1.67∶1 时，在 P-PAMAM 介导下，脱矿的牙釉质能获得较好的矿化效果。

在再矿化液钙磷比为 1.67∶1 的情况下，与 1.67∶1+P-P 组相比，1.67∶1 组缺乏 P-PAMAM 介导，牙釉质表面的晶体沉积在 24 h 呈现无序化排列（图 5c1）。随着时间推移，与釉柱相比，釉间质的再矿化更为明显，3 周后牙釉质表面呈现无序的晶体排列（图 5c3）。

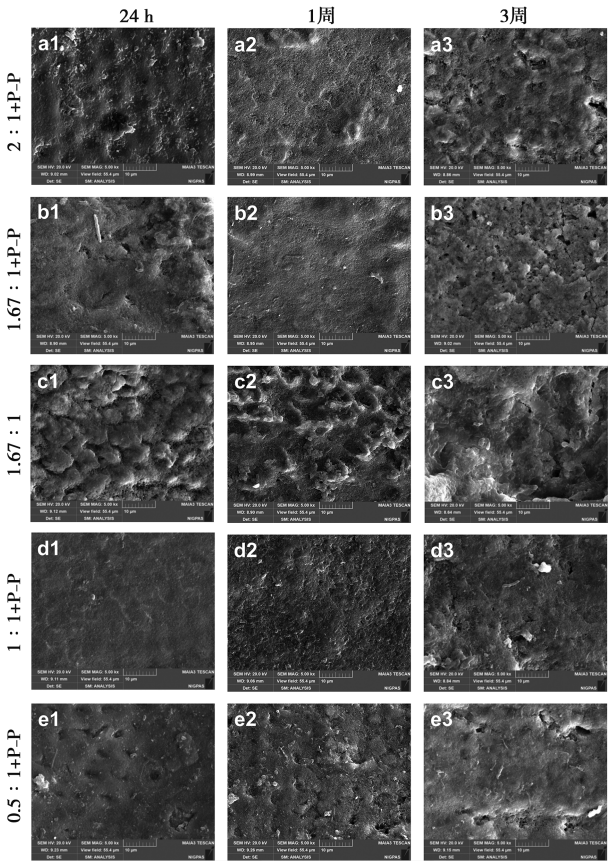


图 5　再矿化 24 h、1 周、3 周后的 SEM 镜下观（　×5 000）

Fig.5　SEM images of samples remineralized for 24 h, 1 week, and 3 weeks（　×5 000）

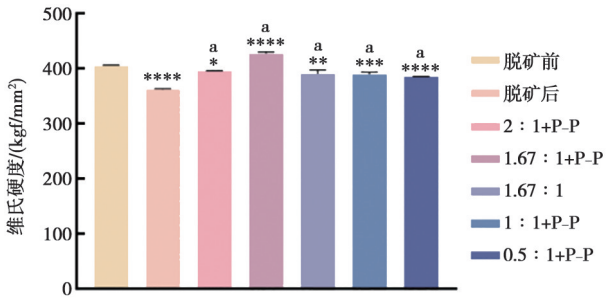
2.4.2　显微维氏硬度测试

显微维氏硬度测试结果表明，脱矿后，牙釉质的表面硬度显著降低（F=115.9，P<0.000 1）。再矿化 3 周后，各组均能形成硬度较脱矿后牙釉质高的再矿化层（P<0.000 1）。其中，当再矿化液的钙磷比为 1.67∶1 时（1.67∶1+P-P 组），牙釉质在 P-PAMAM 诱导下，能形成维氏硬度显著高于脱矿前牙釉质的再矿化层（P<0.000 1），缺乏 P-PAMAM 诱导（1.67∶1 组）或钙磷比为 2∶1（2∶1+P-P 组）、1∶1（1∶1+P-P 组）和 0.5∶1（0.5∶1+P-P 组）时，再矿化 3 周后所形成的再矿化层显微维氏硬度虽对比脱矿后牙釉质有显著改善，但均未能恢复至脱矿前健康牙釉质水平（P<0.05）（图 6）。

2.4.3　XRD 分析

如图 7 所示，脱矿前牙釉质表面的 HAP 的 XRD 图谱在衍射角度 25.2°附近出现（002）特征峰，在衍射角度 32.1°附近出现（211）晶面特征峰。脱矿后的牙釉质样本（002）特征峰较脱矿前的牙釉质样本降低。经过 3 周的再矿化，各组再矿化样本的表层晶体特征衍射峰基本符合（002）与（211）晶面

的特征。2∶1+P-P 组和 1.67∶1+P-P 组的(002)特征峰与脱矿前强度相当,提示生成了与天然牙釉质具有类似取向的 HAP 晶体。缺乏 P-PAMAM 诱导的 1.67∶1 组,虽然(002)峰强度较高,但吸收峰出现了右移,提示晶格发生收缩,再矿化层形成的晶体可能被离子半径更小的离子置换。1∶1+P-P 组(002)特征峰值稍左移,提示晶格扩张,可能形成了含碳酸根的磷灰石。0.5∶1+P-P 组(002)峰强度明显减弱,表明再矿化不足,牙釉质表面结晶度低。



与脱矿前组相比,*:P<0.05;**:P<0.01;***:P<0.001;****:P<0.000 1。与脱矿后组相比,a:P<0.000 1。

图 6　再矿化 3 周后牙釉质表面的显微维氏硬度值

Fig.6　Micro Vickers hardness of enamel after 3-week-remineralization

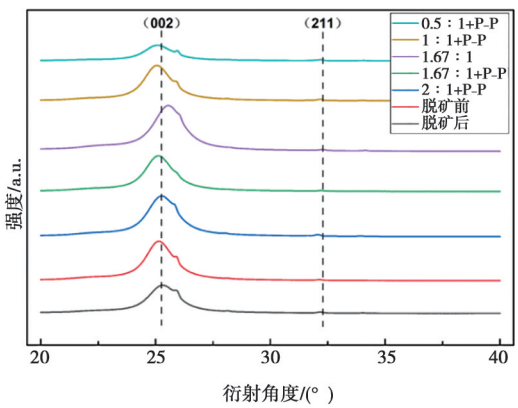


图 7　再矿化层的 XRD 分析

Fig.7　XRD analysis of the remineralized layer

3　讨　论

传统氟化物如 NaF、SnF_2、含氟牙膏等,通过氟离子置换 HAP 中的羟基形成更具耐酸性的氟磷灰石[13],并促进唾液中游离的钙磷离子在牙釉质脱矿表面再沉积,实现病变的早期修复[14]。同时,氟化物能通过抑制糖酵解和增加细菌细胞膜通透性的方式抑制细菌的代谢和产酸[15]。但氟化物在应用时可能面临氟过量摄入的风险,并可能使菌斑内的微生物产生氟耐受性[16-18]。钙磷复合物如酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙、含氟酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙、TCP 等可以作为“钙离子库”,在牙菌斑中维持钙离子过饱和状态,并促进钙离子向脱矿病灶深层扩散,对正畸后牙面脱矿的治疗有显著效果[19]。然而目前对钙磷复合物诱导牙釉质再矿化的研究多数为体外研究,其远期疗效尚有待探讨,且酪蛋白磷酸肽相关复合物对乳蛋白过敏人群禁用。

PAMAM 因其可以模拟釉原蛋白、唾液蛋白等天然分子的功能,近年来在牙釉质再矿化领域也得到了广泛研究。体内外研究表明,PAMAM 对脱矿牙釉质表面有显著的促再矿化作用,能增加牙釉质显微硬度,改善表面形态,可用于治疗牙面白垩斑和牙釉质脱矿[20]。此外,PAMAM 与其他生物大分子联用也取得了一定进展,使其从单纯的矿化模板向载药、抗菌等方向发展。Gao 等[21]将仿唾液蛋白 PAMAM(SN15-PAMAM)与含纳米无定形磷酸钙的粘接剂联合应用,在人工唾液及脱矿液循环中观察到,联合应用在 28 d 时能显著提高牙釉质表面及 25 μm 深度横截面的显微硬度。Liu 等[22]设计了表面接枝抗菌肽,内部包载表没食子儿茶素没食子酸酯的 PAMAM-G4@EG(PGE)颗粒用于牙本质龋的综合干预,实验结果表明 PGE 干预下变形链球菌的杀菌率达到 99.75%,在含胶原酶的人工唾液中,PGE 处理使牙本质硬度值恢复至正常值的 89.88%。

现有研究显示,不同再矿化剂诱导生成的再矿化层钙磷比差异有统计学意义[23]。这一方面说明不同矿化条件下形成的再矿化物的钙磷比各异,另一方面也提示,通过调控再矿化液的钙磷比,可能实现对再矿化产物的定向调控。因此,本研究中设置 4 个不同梯度的钙磷比,分别为 2∶1、1.67∶1、1∶1 和 0.5∶1,以探究钙磷比对于 P-PAMAM 体外诱导牙釉质再矿化疗效的影响。其中,1.67∶1 为 HAP 的化学计量比[24],是再矿化研究的经典对照值,用以模拟理想情况下的矿化条件。2∶1 为高钙组,其钙磷比接近磷酸四钙[25],旨在探究在钙离子相对过量的情况下是否形成富钙磷酸盐。1∶1 为等物质的量组,接近磷酸八钙的钙磷比[26],用于探究是否形成钙磷再矿化前驱体相。0.5∶1 为高磷组,用于观察 P-PAMAM 在钙离子浓度相对缺乏的环境下的再矿化诱导能力。该浓度梯度从高钙到高磷,涵盖了 HAP 的理论值及其上下边界,用以探讨钙磷比对 P-PAMAM 介导的体外诱导再矿化效果的影响。

研究表明,在矿化环境中钙磷比为 1.67∶1 时,P-PAMAM 树状大分子能在较早期就诱导磷灰石晶体规律生长,1 周内即可形成较致密光滑的再矿化层,3 周后亦可延缓晶体无序化生长的出现,XRD 分析提示再矿化层具有与天然牙釉质类似的高取向性

有序结构,且诱导生成的再矿化层能将牙釉质表面硬度恢复到健康牙釉质水平。

在钙离子浓度偏高或偏低的环境中,再矿化层的表面形貌与显微维氏硬度均未达到理想水平。2∶1+P-P 组虽能在 3 周后恢复(002)特征峰强度,但其 SEM 图像显示表面平整度不及 1.67∶1+P-P 组,且无序结构出现更早。这表明过高的钙磷比(2∶1)可能在矿化后期造成局部离子饱和度过大,超出 P-PAMAM 的取向引导能力,从而在再矿化后期形成多晶聚集体,晶体排列趋于无序。这也解释了为何该组 XRD 特征峰强度回升,但显微维氏硬度恢复程度却不如 1.67∶1+P-P 组。

在再矿化液钙磷比为 1.67∶1 但未加入 P-PAMAM 的 1.67∶1 组中,XRD 分析结果显示,其(002)特征峰强度虽有所增强,提示有矿物沉积,但峰位明显右移。依据布拉格定律,右移意味着晶面间距减小,晶格收缩[27]。结合 SEM 图像可见,该组从 24 h 起就出现明显无序生长,说明缺乏 P-PAMAM 作为模板时,离子虽能自发沉积,但过程更依赖随机成核,新生晶体难以匹配基底 HAP 的晶格方向,最终形成取向杂乱的多晶聚集体。尽管矿化层具备一定厚度,但 XRD 所揭示的晶格畸变与 SEM 图像中展示的早期无序结构表明其内部存在大量晶体缺陷和取向杂乱的晶界。这些缺陷在受力时易产生应力集中,制约了硬度的进一步上升。由此可见,P-PAMAM 不仅可富集钙磷离子,更关键的是提供了生物识别界面,使新生晶体与天然 HAP 的晶格有序匹配,从而形成结构规整的再矿化层。

当钙磷比降至 1∶1 和 0.5∶1 时,即便有 P-PAMAM 参与,再矿化效果亦显著减弱。SEM 图像显示这两组矿化层较薄,修复效果欠佳。XRD 结果显示,1∶1+P-P 组(002)峰位轻微左移且强度偏低,0.5∶1+P-P 组峰强则明显下降。峰位左移暗示晶面间距增大,晶格扩张,在磷灰石体系中常由碳酸根取代磷酸根或羟基引起[28]。研究指出,碳酸根进入晶格将改变晶格参数并降低结晶度[29]。在低钙磷比条件下,碳酸根更易取代磷酸根进入晶格,导致 P-PAMAM 引导形成的少量再矿化产物中含有更多碳羟基磷灰石,其结晶度较低,与基底 HAP 的晶格匹配性也较差[30],因而难以实现较厚的外延生长层。0.5∶1+P-P 组衍射峰极弱,说明钙离子浓度过低难以支持晶体有序生长,矿化层可能以无定形磷酸钙或稀疏纳米颗粒形式存在[31],与 SEM 中观察到的薄层形貌一致。低钙磷比导致的结晶度差与矿化层薄,直接造成了表面硬度的下降。

综上所述,尽管 PAMAM 及其衍生物在诱导牙釉质再矿化方面显示出初步潜力,但要实现其临床转化,还需进行更多体内外实验以探究最佳作用条件与调控机制。期待未来更高质量的体内实验与临床试验,推动 PAMAM 在牙釉质脱矿的临床治疗中发挥作用。

[参　考　文　献]

[1] Sofan E, Sofan A, Palaia G, *et al*. Classification review of dental adhesive systems: From the Ⅳ generation to the universal type [J]. Ann Stomatol (Roma), 2017, 8(1): 1-17.

[2] 王楠楠,贺红,花放. 正畸相关釉质脱矿危险因素的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志,2024,51(1): 91-98.

[3] Harper RA, Shelton RM, James JD, *et al*. Acid-induced demineralisation of human enamel as a function of time and pH observed using X-ray and polarised light imaging[J]. Acta Biomater, 2021, 120: 240-248.

[4] 蔺孝慧,杨梦源,李春年. 仿生再矿化治疗在牙釉质早期脱矿的作用及机制[J]. 中国组织工程研究,2025,29(4): 856-865.

[5] Chen M, Yang JJ, Li JY, *et al*. Modulated regeneration of acid-etched human tooth enamel by a functionalized dendrimer that is an analog of amelogenin[J]. Acta Biomater, 2014, 10(10): 4437-4446.

[6] Chen L, Yuan H, Tang B, *et al*. Biomimetic remineralization of human enamel in the presence of polyamidoamine dendrimers *in vitro*[J]. Caries Res, 2015, 49(3): 282-290.

[7] Yang JJ, Cao SQ, Li JH, *et al*. Staged self-assembly of PAMAM dendrimers into macroscopic aggregates with a microribbon structure similar to that of amelogenin[J]. Soft Matter, 2013, 9(31): 7553-7559.

[8] Wiedemann-Bidlack FB, Kwak SY, Beniash E, *et al*. Effects of phosphorylation on the self-assembly of native full-length porcine amelogenin and its regulation of calcium phosphate formation *in vitro*[J]. J Struct Biol, 2011, 173(2): 250-260.

[9] Fan YW, Nelson JR, Alvarez JR, *et al*. Amelogenin-assisted *ex vivo* remineralization of human enamel: Effects of supersaturation degree and fluoride concentration[J]. Acta Biomater, 2011, 7(5): 2293-2302.

[10] Liu J, Gao Y, Zhu XD, *et al*. Phosphorylated PAMAM dendrimers: An analog of dentin non-collagenous proteins, enhancing the osteo/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells[J]. Clin Oral Investig, 2022, 26(2): 1737-1751.

[11] Qin HJ, Long JD, Zhou J, *et al*. Use of phosphorylated PAMAM and carboxyled PAMAM to induce dentin biomimetic remineralization and dentinal tubule occlusion[J]. Dent Mater J, 2021, 40(3): 800-807.

[12] Yang K, Weng L, Cheng YY, *et al*. Host-guest chemistry of dendrimer-drug complexes. 6. Fully acetylated dendrimers as biocompatible drug vehicles using dexamethasone 21-phosphate as a model drug[J]. J Phys Chem B, 2011, 115(10): 2185-2195.

[13] Chang JK, Tavakol M, Besnard C, *et al*. Biomimetic enamel-like

crystals: A versatile platform for unraveling the basic mechanisms of demineralization and remineralization[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2025, 17(36): 50505-50518.

[14] Farooq I, Bugshan A. The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: A narrative review[J]. F1000Res, 2020, 9: 171.

[15] Xu GY, Yin IX, Zhao IS, *et al*. Antibacterial and demineralisation-inhibiting properties of silver complex fluoride on dentine caries: An *in vitro* study[J]. J Dent, 2026, 167: 106528.

[16] Banerjee A, Kang CY, An MJ, *et al*. Fluoride export is required for the competitive fitness of pathogenic microorganisms in dental biofilm models[J]. mBio, 2024, 15(5): e0018424.

[17] Zhang QX, Guan LX, Guo J, *et al*. Application of fluoride disturbs plaque microecology and promotes remineralization of enamel initial caries[J]. J Oral Microbiol, 2022, 14(1): 2105022.

[18] Khalaf ME, Karched M, Al Shawaf N, *et al*. *In vitro* investigation of the impact of contemporary restorative materials on cariogenic bacteria counts and gene expression[J]. J Dent, 2023, 133: 104486.

[19] Haerian A, Yasaei S, Rafiei E, *et al*. *In vitro* efficacy of tricalcium phosphate and casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate fluoride for remineralization of enamel white spot lesions[J]. Front Dent, 2024, 21: 33.

[20] Sanka SM, Ramar K. Examining the effectiveness of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers for enamel lesion remineralization: A systematic review[J]. Cureus, 2024, 16(7): e64490.

[21] Gao Y, Liang KN, Weir MD, *et al*. Enamel remineralization *via* poly(amido amine) and adhesive resin containing calcium phosphate nanoparticles[J]. J Dent, 2020, 92: 103262.

[22] Liu MX, Li JH, Wang ZY, *et al*. Multifunctional PAMAM nanopaticles with sequential antimicrobial-remineralization therapy for dentin caries management[J]. J Mater Chem B, 2025, 13(38): 12085-12100.

[23] Raj R. Comparative evaluation of remineralizing potential of four enamel remineralising agents using SEM-EDX: An *in-vitro* study[J]. J Oral Biol Craniofac Res, 2025, 15(1): 183-187.

[24] 王婧婵,李艳萍,何丽娜,等. 不同再矿化处理对漂白后釉质表面形貌及钙磷比的影响[J]. 口腔医学,2022,42(12): 1057-1062.

[25] Burguera EF, Guitian F, Chow LC. Effect of the calcium to phosphate ratio of tetracalcium phosphate on the properties of calcium phosphate bone cement[J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 85(3): 674-683.

[26] Cheng PT. Formation of octacalcium phosphate and subsequent transformation to hydroxyapatite at low supersaturation: A model for cartilage calcification[J]. Calcif Tissue Int, 1987, 40(6): 339-343.

[27] Irudayaraj AR, Yadav CK, Modak B, *et al*. Theoretical and experimental studies of aliovalent effects in color tuning and biocompatibility of Eu^{3+}-doped $SrZrO_3$ perovskite[J]. ACS Appl Bio Mater, 2026, 9(5): 2505-2520.

[28] 朱庆霞,江伟辉,王洪达,等. 沉淀法制备氟羟基磷灰石的影响因素[J]. 无机材料学报,2011,25(12): 1335-1340.

[29] Liu P, Li ZQ, Yuan L, *et al*. Pourbaix-guided mineralization and site-selective photoluminescence properties of rare earth substituted B-type carbonated hydroxyapatite nanocrystals[J]. Molecules, 2021, 26(3): 540.

[30] Dornelas J, Dornelas G, Tude EMO, *et al*. *In vitro* evaluation of cellular interactions with nanostructured spheres of alginate and zinc-substituted carbonated hydroxyapatite[J]. Materials, 2024, 17(16): 4092.

[31] Ghajeri F, Leifer K, Larsson A, *et al*. The influence of residuals combining temperature and reaction time on calcium phosphate transformation in a precipitation process[J]. J Funct Biomater, 2022, 13(1): 9.

(收稿日期:2026-03-17)

(本文编辑:陈梦琦)