译文

酸与螯合剂根面处理对血凝块稳定性的影响

Influence of root-surface conditioning with acid and chelating agents on clot stabilization

Fábio Fenato Manzolli Leite; José Eduardo Cezar Sampaio; Daniela Leal Zandim; Andréa Abi Rached Dantas; Elza Regina Manzolli Leite; Amauri Antiquera Leite

原载 Quintessence Int 2010;41:341-349(英文)

吕 达 译 徐 莉 审

摘 要

目的:比较经化学处理后血液成分在根面附着与成熟过程的异同。**材料和方法**:在临床获取人牙牙根(n=150)并进行手工刮治。将牙根分5组,每组30个,分别用以下溶液进行处理:(1)生理盐水冲洗(对照组);(2)24%EDTA凝胶;(3)25%枸橼酸溶液;(4)四环素溶液(50mg/ml);(5)30%枸橼酸钠溶液。化学处理后,每组取15个样本并加1滴血液,用扫描电镜分析,剩余的15个样本在扫描电镜下观察胶原纤维暴露并分析表面形态。显微照片上根据血液成分的附着得分进行分析。用Kruskal-Wallis和Dunn多重比较法检验。**结果**:对照组根面无血液成分。结果最佳的为经枸橼酸处理组,根面密集纤维网上有血液附着。EDTA组有中度的纤维网形成。相比较下,四环素组纤维网稀少,只见少量细胞。枸橼酸钠组未见血液成分。枸橼酸组与对照组之间差异显著($P<0.1$)。对照组与EDTA、四环素、枸橼酸钠组差异无显著性($P>0.5$)。**结论**:该实验条件下,枸橼酸可将血凝块稳定在根面上,为结缔组织生长创造条件。

关键词 血凝块;纤维蛋白;牙周病;牙周治疗;扫描电镜;玷污层;牙根

根面刮治和平整术可消除物理及化学刺激因素,例如牙菌斑、牙石和毒素。这些因素均可导致牙周组织破坏。经器械处理后的根面上可形成玷污层,其内可能残存污染的矿化组织和微生物。

牙根表面的生物处理是一种可选择的治疗方法。它的含义是使用酸剂或螯合剂去除玷污层,暴露根面的胶原纤维。牙本质或牙骨质的胶原纤维可使纤维蛋白网稳定。无论是否经过根面处理,来自根面的胶原纤维结合至血凝块的纤维蛋白上,阻止上皮向下生长,所构建的支架结构有利于细胞生长和成熟的胶原纤维的附着。若无稳定的胶原纤维网,无论牙根是否经过治疗,缺损都会被上皮化。所以,有的研究团队认为可以采用不同的药物对牙根进行生物处理,使牙根表面暴露更多的胶原纤维,促进血凝块与牙根的结合。

临床随机对照实验表明,采用翻瓣术后,进行根面平整和根面处理,所获得的临床指标(如探诊出血、探诊深度、临床附着)并没有明显改善。某些研

译者 北京大学口腔医学院牙周科
北京海淀区中关村南大街22号 100081

究中，即使处理组的临床附着水平有所增加，但差异无显著性。然而，所有的对照实验至少忽视了以下几点，即不能准确地如文献中推荐的那样，在理想时机和浓度上恰当地选用处理剂；没有分析术后数周瓣的移动所造成的血凝块破裂；没选用恰当的方法限制处理区域，避免周围存活的组织过度地接触酸剂或螯合剂；只追踪几个月，不到几年。

鉴于文献中对此方面的争议，以及体内外对照实验的缺乏，本体外研究旨于评价几种根面处理剂是如何影响血凝块吸附和附着在根面上的。这些处理剂包括枸橼酸、乙二胺四乙酸（EDTA）、四环素和枸橼酸钠，均采用文献所推荐的浓度、时间和处理方法。以期对未来的临床研究提供参考。无效假设为不同的根面处理剂均可以改善纤维蛋白网的稳定性。

方法和材料

本实验得到圣保罗州大学（UNESP）Arara-quara牙学院伦理委员会支持。本实验采用的75颗拔除人牙，均为牙周病患牙，釉牙骨质界（CEJ）下均无龋无充填体。其中42颗为单根牙，33颗为多根牙，均来自非吸烟患者。这些拔除的牙均有至少10mm的附着丧失，治疗后探诊深度仍有7mm，探诊出血。拔除后，用蒸馏水洗净，贮藏于37℃含磷酸盐缓冲系的生理盐水中（PBS，pH=7.4）。

用高速圆柱状钻针配合足量冷却水，在牙根近远中面各制作两条平行的沟，第一条在釉牙骨质界，第二条在第一条的根方3mm。两沟间用5/6号Gracey刮治器刮治和平整，形成玷污层。均由同一名操作者完成，龈聆方向刮50下，去除污染的牙骨质，暴露牙本质。

沿第一条沟把牙根横断，冠根分离。所有的牙根即刻沿长轴颊舌向切开，再于第二条沟的根方沿近远中向横断，这样每颗牙均可切出两个牙本质块，大小约3mm × 3mm。这两个牙本质块分别为牙齿的近中面和远中面。共计150个样本。同一颗牙的两个样本存放于同一个PBS瓶中，并做标记。

用EXCEL（微软office 2003）软件将样本随机分成5个组，每组15瓶30个样本。一个样本用于测定胶原纤维暴露，另一个样本用于评估纤维蛋白网的附着。各组处理如下：(1) 生理盐水10ml冲洗（对照）；(2) 用软刷刷24%EDTA凝胶（PrefGel，Biora）；(3) pH=1.5的枸橼酸溶液棉球涂擦；(4) 50mg/ml的盐酸四环素液棉球涂擦；(5) 软刷刷30%枸橼酸盐溶液。用药时间为3min，每30s更换一次溶液。

用血液组织预备根面

每个瓶的两个样本取其一接触末梢全血。进行根面处理后，立即在根面外表面涂布来自一名健康男性的末梢全血，每组的15个样本均重复此操作步骤。然后置于37℃湿润的空间20min，使血液在样本外表面凝固。再在Petri培养皿上用PBS液冲洗样本3次，每次5min。冲洗时，样本放置于低速旋转的震动平台上。

冲洗后，样本固定于1%福尔马林PBS液中15min，再用PBS液冲洗3次（每次5min）后，置于含0.02mol甘氨酸的PBS液中温浴10min，冲洗。再固定于2.5%的戊二醛PBS液中30min，冲洗。放在25%、50%、75%、95%和3次更换的100%乙醇中逐级脱水，二氧化碳临界点干燥仪（Baltec CPD 030，Baltec）内烘干。再于室温下干燥。放置于有胶体石墨铝台上，用特定的仪器（Baltec SCD 050，Baltec）喷涂金钯，室温下干贮3d。

不加血的人牙根样本预备

每组的另外15个样本不接触血液。这些样本室温下用25%、50%、75%、95%和3次更换的100%乙醇逐级脱水，然后浸没于1∶1的乙醇和六甲基二硅胺烷（HMDS，Sigma，Sigma-Aldrich）溶液中30min，纯的六甲基二硅胺烷（HMDS）液10min，依上文所述方法干燥，喷涂，干贮。

扫描电镜检查

每个样本均经1 000倍放大后获得有代表性的显微照片。使用的扫描电镜在20kV下工作。获得显微照片后，根据以下标准对血液成分附着（BCA）状况进行评分，并分析处理后的样本形态。

0- 无纤维网和血细胞

1- 少量纤维网和（或）有血细胞

2- 中等量纤维网和中等量血细胞

3- 密纤维网并包裹着血细胞

操作员事先接受训练，与其他两位操作员进行校准(Kendall $P<0.01$)。采用单盲法，把接触了血液样本的显微照片给操作员阅读，每次测量间隔7d。3次阅读分数的总数作为最终评分。

对于经化学处理，接触了HMDS的样本，其评价牙根生物改良（RB）的分级系统为：

1- 牙骨质和（或）牙本质有胶原纤维暴露

2- 牙骨质和（或）牙本质没有胶原纤维暴露

3- 玷污层

数据统计

5个组独立评分。Kruskal-Wallis非参数检验（$P<0.05$）比较各组值。如果组间差异显著，则用Dunn多元比较法。为了明确胶原纤维暴露与BCA的量之间的关系，RB指数采用二分法分为有或无胶原纤维（1=1；2和3=2），再用卡方检验。采用GraphPad Prism 4.0软件进行分析。

结果

电镜分析

第1组（对照组）：显微照片所示8个样本BCA分值为0（图1），6个为1，1个为2（表1）。无滴加血的样本图片示所有的RB值均为3，根面粗糙不规则，无牙本质小管暴露，手工刮治所致的沟纹和玷污层均可见。

第2组：显微照片所示8个样本BCA分值为2（图2），3个为1，4个为0（表1）。大多照片示第2组有中度的血细胞附着，但离散值大（表1）。无滴加血的样本之中，11个表面光滑，无胶原显露，无玷污层。4个胶原显露，RB值为1（表2）。

第3组：7个样本的BCA值为3（图3），5个为2，显示密集或中等量的纤维蛋白网，包裹血细胞。2个样本表现出少量的纤维蛋白网，BCA值为1。1

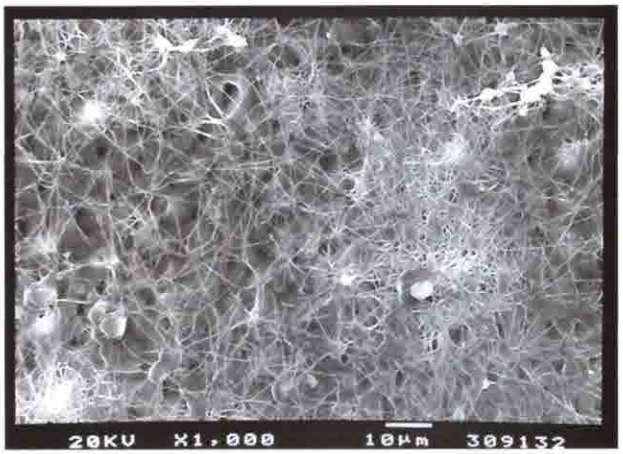


图2 第2组（EDTA组／滴加血组）根面上纤维蛋白网内有中等量的血细胞，分值为2（横线长为10 μm；放大1 000倍）

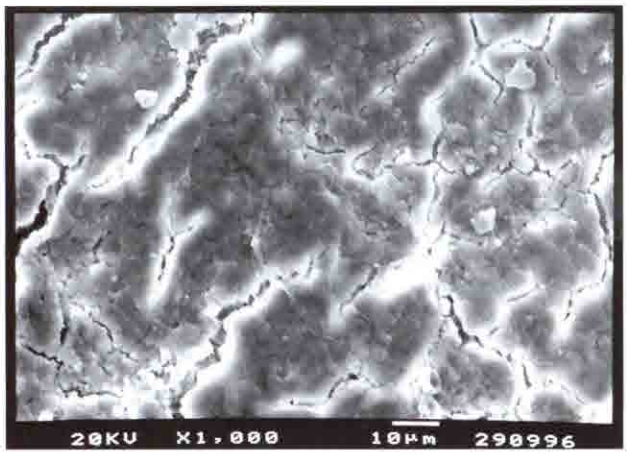


图1 第1组（对照组／滴加血组）根面上无血液成分，分值为0（横线长为10 μm；放大1 000倍）

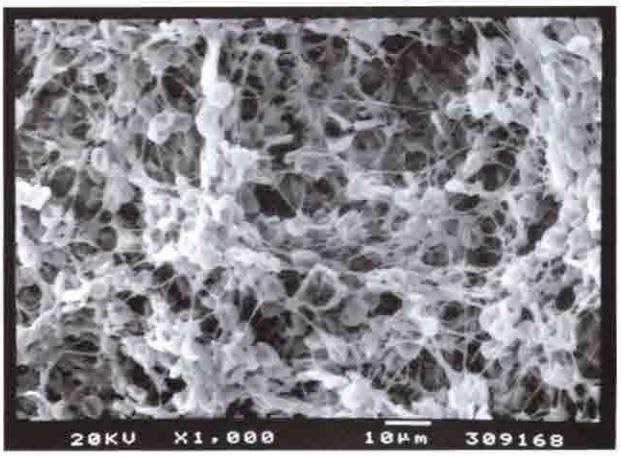


图3 第3组（枸橼酸组／滴加血组）根面上纤维蛋白网内有致密的血细胞，分值为3（横线长为10 μm；放大1 000倍）

表1 各组血液成分附着分数（BCA）的频数（n）和百分比（%）（n=15）

分值	G1	G2	G3	G4	G5
0	8(53.33)	4(26.66)	1(6.66)	4(26.66)	8(53.33)
1	6(40.00)	3(20.00)	2(13.33)	9(60.00)	5(33.33)
2	1(6.66)	8(53.33)	5(33.33)	2(13.33)	2(13.33)
3	0(0.00)	0(0.00)	7(46.66)	0(0.00)	0(0.00)

个样本BCA值为0。无滴加血的样本中，9个样本根面平滑，玷污层已被去除，胶原纤维暴露在整个平面上（BCA为1）。余6个样本无玷污层，但胶原未暴露（表2）。

第4组：9个样本的BCA值为1（图4）。4个样本未显示任何纤维蛋白网和血细胞，评分为0。2个样本有中等量纤维蛋白网附着于表面，评分为2（表1）。无滴加血样本的照片示，根面均平滑无玷污层，也不见胶原，RB分值为2（表2）。

第5组：8个样本的BCA值为0（图5），占大多数。5个见少量纤维蛋白网和包裹的血细胞，评分为1。2个见中等量纤维蛋白网，评分为2。无滴加血样本的照片均显示根面光洁无玷污层，RB值为2，但有些盐晶体联接于根面（表2）。

表2 各组牙根生物改良分值（RB）的频数（n）和百分比（%）（n=15）

分值	G1	G2	G3	G4	G5
1	0(0.00)	4(26.66)	9(60.00)	0(0.00)	0(0.00)
2	0(0.00)	11(73.33)	6(40.00)	15(100.00)	15(100.00)
3	15(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)

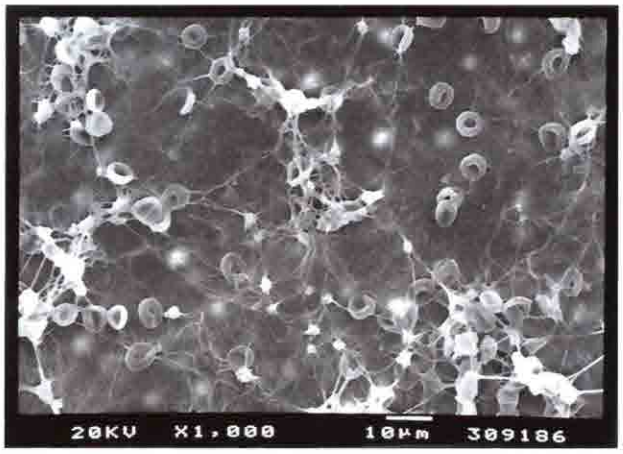


图4 第4组（四环素组／滴加血组）根面上纤维蛋白网内有少量血细胞，分值为1（横线长为10 μm；放大1 000倍）

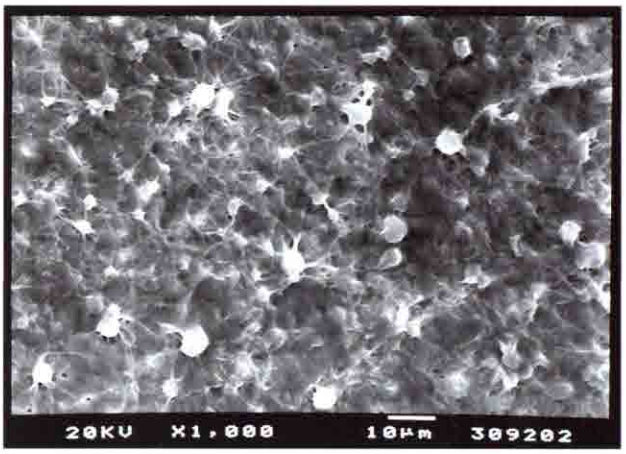


图5 第5组（枸橼酸钠组／滴加血组）根面上无血液成分，分值为0（横线长为10 μm；放大1 000倍）

数据分析

各组的值为独立变量，使用Kruskal-Wallis非参数检验，显示BCA的组间差异显著，$P<0.01$，值为26.1000。使用Dunn检验对滴加血的组的数据排名，显示1组与3组（$P<0.01$），3组与4组（$P<0.05$），3组与5组（$P<0.05$）均有显著差异。尽管第2组大多样本的BCA值为2，有更多的细胞和胶原附着（表1），但是与4组或5组之间无显著差异（$P>0.05$）。卡方检验显示胶原暴露与血液成分附着二者之间有正相关（卡方值=18.6100；$P<0.038$）。

讨论

使结缔组织附着至以往有牙周病的根面，是牙周治疗的目标之一。血凝块形成时连接于根面，血成分再与纤维凝块附着并积累，是初步愈合过程。一些研究表明，该过程是龈瓣与根面修复过程中的一个关键因素。现多数学者认为，牙周再生治疗和其维护过程中能使纤维块附着于根面上，是牙周治疗成功的关键。

胶原暴露后，血凝块更易形成，体现在凝聚过程中，如刺激胶原蛋白网的形成，诱导血小板附着、聚集和细胞浆中的颗粒释放，最后使血块成形和成熟。

起初发生蛋白质层沉积，随后是血小板脱失颗粒激发的纤维蛋白网形成和稳定。纤维蛋白网可以激活血小板，使之释放生长和转化因子，如纤维蛋白原、纤维结合素、血小板源性生长因子（PDGF）、转化生长因子-2（TGF-2）和成纤维细胞生长因子-2（FGF-2），这些因子刺激结缔组织基质形成和成纤维细胞成熟。相关研究还有待深入下去。

大多体内研究指出，在牙周再生治疗中使用枸橼酸、四环素和EDTA处理根面，临床结果并不一致。这也许与不正确应用上述药物有关，包括浓度、方法、用法和时间。本实验依据已发表的最佳实验结果来应用这些药物。

卡方检验显示，胶原网暴露后，可使纤维蛋白网稳定，血细胞附着于根面。本实验显示第3组枸橼酸处理后可形成最有序的纤维蛋白网和细胞的包裹（表3），可能与胶原纤维暴露有关，因为本组的暴露程度最高（表2）。体外实验表明，枸橼酸的脱矿能力可能会促使人牙周膜细胞附着于根面。

20世纪80年代，有临床医师联合使用盐酸四环素，牙周预后并不理想。由于四环素的低pH值，可螯合钙去除玷污层的特性、根吸附性好、转运至牙周组织较少，四环素被证实可使牙根面脱矿。根面刮治和使用四环素不做刮治之间临床效果相似的报告可以查找到，但是这些作者并没有联合使用两种办法。另外，一些研究表明四环素抑制胶原酶产生，从而抑制骨吸收。在本研究中，四环素（第4组）并不能让纤维蛋白凝块稳定于根面上（表3）。

EDTA抑制血液成分的吸附和附着，可能是因为从根面上去除凝胶较困难（表1，第2组）。此外，EDTA在中性环境下是钙的螯合剂，它可去除含钙组织中的钙离子，这些钙离子是凝血系列反应的关键离子，这样EDTA将阻碍血凝。本文用枸橼酸钠取代了EDTA，进行测试。枸橼酸钠也是钙的螯合剂，但比EDTA更具生物相容性。枸橼酸钠曾用于保存食物，中和酸性物。因为它有3个自由羟基，可作用于根面，所以它在去除玷污层上更有效果。但是，显露胶原的作用并不佳，仍需更多的研究。

以往有研究显示，仅进行根面平整，如同对照组的处置，凝块形成可以启动，但却遭中断。本研究也观察到此事实（表3）。最合理的解释则为玷污层存在，使凝块脱离根面。长期来看，它导致上皮向下生长至手术区域。根面可以提供破碎的纤维，但不能稳定纤维蛋白凝块，是对细胞附着来说不稳定的区域。用EDTA和枸橼酸进行根面处理，有效地暴露胶原纤维和蛋白多糖，这一点得到了证实。二者是促使成纤维细胞附着的合适药物。

另一研究也显示，本实验所采用的四环素的浓度，对暴露管周和管内胶原纤维来说是理想的浓度。控制好条件的动物模型中使用螯合剂和酸剂，显示受累的根面经刮治和脱矿后，附着的是新的结缔组织，而不是上皮组织。大多情况下，仅经刮治（对照组）和经根面处理二者之间未见差异，但若没有玷污层而有胶原暴露，附着于根面的组织的质量要更好。

临床上几乎都认为根面处理本身并不能产生很好的再生效果，但是不管怎样，术区总比单纯刮治的要干净。单纯刮治后会有小的凹陷，微生物在其内繁殖。器械刮治仍然是去除牙石和菌斑的最好的方法，但是根面处理可以进一步保证形成平滑的表面，这是器械不能做到的。

再者，大多研究的追踪时间不过一年。要取得人类的组织学样本，来评估组织的质量和是否有上皮或结缔组织附着修复是很困难的。所以应进行长期的追踪观察，看组织质量和根面平滑度是否不同，牙周病的再出现率是否也不同。生物改良法是否使根

表3 各组血液成分附着分数（BCA）的RANK值和中位数（n=15）

组	中位数	RANK*	P
G1	0	26.1000	1与3的$P<0.01$†
G2	2	42.8000	–
G3	2	59.3667	3与4的$P<0.05$† 3与5的$P<0.05$†
G4	1	34.2000	–
G5	0	27.5333	–

* Rank值（Kruskal-Wallis检验；$P<0.05$）

† 组间统计学差异显著（Dunn检验；$P<0.05$）

面覆盖术获得益处，特别对于长期暴露于口腔环境和菌斑中多年的根面来说，这也可以进行评估。因为这种手术涉及凝血块和组织稳定性，经根面处理后效果更佳，本实验及其他实验均有所证实。我们需要进一步设计随机对照临床试验，研究合适的浓度，方法和给药方式，研究用药时间，避免药物接触活组织造成的坏死，还要研究缝合方式，以稳定牙周组织，避免瓣移动和血凝块在几周内脱落和破裂。

本研究中，所有的药物均可清洁根面，消除碎屑，使表面更光滑，胶原纤维可接触到血块上。所以，不同程度讲，这些药物影响了根上部表面血凝块的稳定性。将来做体内实验都可在根面处理的浓度、时间、各种药的给药方法等方面参考本文。

结论

基于本研究的方法和局限性，认为无效假设是可接受的，因为枸橼酸溶液相比对照组能显著地增加血液成分（即纤维蛋白网和细胞）附着于根面上。另外，所用的药物均可去除玷污层，相比对照组，效果显著。但并非所有药物均可有效地清洁根面、去除玷污层、暴露胶原。

隆重推出口腔种植的“金标准”丛书——“国际口腔种植学会(ITI)口腔种植临床指南”

中国医学科学院 北京协和医院口腔种植中心主任 宿玉成（教授）译

第一卷：《美学区种植治疗 - 单颗牙缺失的种植修复》

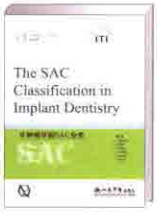
在所有的口腔种植文献中，本书是惟一的一部以临床证据为依据，全面论述美学区单颗牙缺失种植的临床专著。本书提出并详细论述了美学区种植的治疗原则，十二项风险因素与控制原则，标准的种植外科与种植修复的临床操作程序，引导骨再生以及骨和软组织增量的原则与技术，种植美学并发症的病因及处理等重要方面。本书以819幅图片，16个表格，19个完整病例，全面展现了美学区单颗牙种植的临床过程，设计原则，治疗程序，操作技术和完美的治疗效果，并发症处理，是口腔医学和牙种植学的经典之作。

第二卷：《牙种植学的负荷方案 - 牙列缺损患者的种植修复》

在所有的口腔种植文献中，本书是惟一的一部以临床证据为依据，全面论述种植体负荷方案的临床专著，尤其注重于牙列缺损病例的种植负荷方案。本书提出并详细论述了种植体负荷方案的分类与原则（即刻修复／负荷，早期修复／负荷，常规负荷，延期负荷），适应证与并发症，风险因素与控制原则等重要方面。本书以452幅图片，10个表格，16个完整病例，全面展现了牙列缺损患者牙种植的临床过程，负荷方案，修复程序，操作技术和完美的治疗效果，是口腔医学和牙种植学的经典之作。

第三卷：《拔牙位点种植 - 各种方案》

在所有的口腔种植文献中，本书是惟一的一部以临床证据为依据，全面论述种植体植入时机的临床专著。本书提出并详细论述了拔牙窝愈合过程的最新研究进展，牙槽窝愈合后的牙槽嵴变化，种植体植入时机的分类与原则（即刻种植，Ⅰ型种植，早期种植，Ⅱ型和Ⅲ型种植，延期种植，Ⅳ型种植），优缺点，种植体周围骨缺损间隙的愈合方式和增量技术，各种种植时机的风险因素与控制原则，各种种植方案的种植外科与种植修复的临床操作程序，美学并发症的病因及处理等重要方面。本书以543幅图片，20个表格，21个完整病例，全面展现了各种种植方案的临床过程，治疗程序，操作技术和完美的治疗效果，并发症处理，是口腔医学和牙种植学的经典之作。



《牙种植学的SAC分类》

在所有的口腔种植文献中，本书是惟一的一部以临床证据为依据，全面论述种植治疗风险因素，困难程度的临床专著。本书提出并详细论述了不同种植治疗程序和各类临床病例的SAC分类与原则（简单，复杂，高度复杂），影响SAC分类的各种因素（决定因素，常规，美学，外科及修复修正因素）和具体病例的分类，各种治疗程序的风险与难度。本书以252幅图片，54个表格，20个相关病例，全面展现了各种临床病例和治疗程序的风险程度，治疗难度和困难程度，并发症（美学，生物，机械并发症），病例类型，外科程序，修复程序，技工室程序之间错综复杂的相互关系，使种植医生获得处理各种临床病例的能力，是口腔医学和牙种植学的经典之作。

定价：320元（第一卷），280元（第二卷），300元（第三卷），260元（SAC分类）

购书方式：北京市复兴路22号，甲3号，人民军医出版社国际口腔医学出版中心，杨淮（编辑），邮编：100842，

E-mail：pumcp@126.com，电话：13521457428，010-51927300转8027

本书由于印量少（仅印刷1000套），且不在书店销售，因此欲购从速。