

# 载锌/相转变溶菌酶中空介孔二氧化硅纳米粒子的制备及在牙本质小管封闭中的应用

杨庆祎<sup>1,2</sup>, 赵玉平<sup>1,2</sup>, 郑文茜<sup>2</sup>, 王 端<sup>1,2</sup>, 孙宏晨<sup>2</sup>, 周 鼎<sup>2</sup>, 徐晓薇<sup>1,2</sup>

(1. 吉林大学口腔医院牙周科, 2. 吉林省牙发育及颌骨重塑与再生重点实验室, 长春 130021)

**摘要** 开发了一种新型牙本质小管封闭材料, 其具有锌的抗菌性、相转变溶菌酶(PTL)的表面黏附性和中空介孔二氧化硅(HMSN)的可搭载药物特性. 首先, 利用硬模板法和选择性刻蚀法, 以硅酸四乙酯为硅源制备了HMSN; 通过HMSN表面负电荷的静电作用吸附 $Zn^{2+}$ , 制得 $Zn^{2+}@HMSN$ ; 随后, 使用PTL包覆 $Zn^{2+}@HMSN$ , 获得了具有抗菌性和黏附性的 $Zn^{2+}/PTL@HMSN$ 复合材料.  $Zn^{2+}/PTL@HMSN$ 不仅具有优异的生物相容性, 可严密封闭牙本质小管, 还具有良好的耐酸耐磨稳定性; 并且 $Zn^{2+}/PTL@HMSN$ 可有效抑制变异链球菌的黏附, 在治疗牙本质敏感方面具有良好的应用潜力.

**关键词** 中空介孔二氧化硅; 相转变溶菌酶; 牙本质敏感症; 牙本质小管; 抗菌性

中图分类号 O614; R781.2

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240249

## Preparation of Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles Carrying Zinc/PTL and Their Application in Dentinal Tubule Occlusion

YANG Qingyi<sup>1,2</sup>, ZHAO Yuping<sup>1,2</sup>, ZHENG Wenqian<sup>2</sup>, WANG Duan<sup>1,2</sup>,

SUN Hongchen<sup>2</sup>, ZHOU Ding<sup>2\*</sup>, XU Xiaowei<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Periodontology, 2. Jilin Provincial Key Laboratory of Tooth Development and Bone Remodeling, School and Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract** This study developed a novel dentinal tubule sealant material that combines the antibacterial properties of zinc, the surface adhesivity of phase-transitioned lysozyme (PTL), and the drug-loading capabilities of hollow mesoporous silica (HMSN). Initially, HMSN were synthesized using the hard templating method and selective etching, with tetraethyl orthosilicate as the silica source. The negatively charged surfaces of HMSN adsorbed  $Zn^{2+}$  ions through electrostatic attraction, forming  $Zn^{2+}@HMSN$ . Subsequently,  $Zn^{2+}@HMSN$  was encapsulated with PTL, resulting in  $Zn^{2+}/PTL@HMSN$  composite material which exhibited antibacterial activity and enhanced adhesion.  $Zn^{2+}/PTL@HMSN$  not only exhibited outstanding biocompatibility which could seal dentinal tubules effectively, but also demonstrated robust resistance to acid and wear.  $Zn^{2+}/PTL@HMSN$  significantly inhibited the adhesion of streptococcus mutans, underscoring its great potential for treating dentinal hypersensitivity.

**Keywords** Hollow mesoporous silica; Phase-transitioned lysozyme; Dentinal hypersensitivity; Dentinal tubule; Antibacterial property

收稿日期: 2024-05-22. 网络首发日期: 2024-07-15.

联系人简介: 周 鼎, 男, 博士, 教授, 主要从事口腔材料促骨再生方面的研究. E-mail: zhouding@jlu.edu.cn

徐晓薇, 女, 博士, 教授, 主要从事牙周组织疾病免疫调控与软硬组织再生方面的研究. E-mail: xiaoweixu@jlu.edu.cn

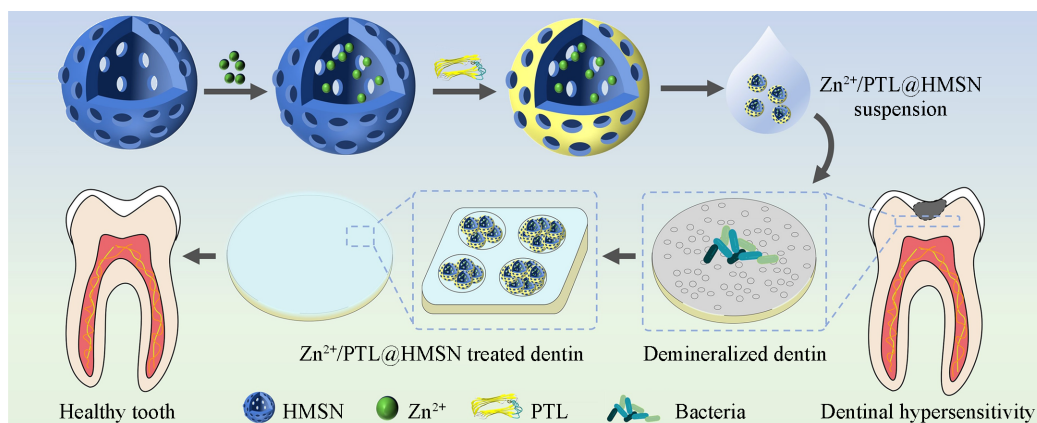
基金项目: 国家重点研发计划青年科学家项目(批准号: 2022YFA1105800)和国家自然科学基金(批准号: 62075215)资助.

Supported by the National Key Research and Development Program for Young Scientists, China(No.2022YFA1105800) and the National Natural Science Foundation of China(No.62075215).

牙本质敏感症是临床常见的口腔疾病,在18~35岁人群中的患病率约为42%<sup>[1]</sup>.其特征为由于龋病和酸蚀等导致牙本质暴露<sup>[2]</sup>,在受到外界温度、化学和机械等刺激时产生短暂且尖锐的疼痛.因此,封闭暴露的牙本质小管是治疗牙本质敏感的关键.基于流体动力学假说<sup>[3]</sup>,临床常见的治疗策略为堵塞开放的牙本质小管,以隔绝外界刺激,减少牙本质小管液流动<sup>[4,5]</sup>.传统治疗手段使用生物活性玻璃和羟基磷灰石颗粒为主要成分的脱敏剂以及激光处理等<sup>[6-8]</sup>,但上述方法主要是堵塞牙本质小管,忽视了其它潜在问题<sup>[9]</sup>.如,日常咀嚼会影响堵塞物的稳定性、胶原纤维持续脱矿会影响牙本质的机械性能、牙本质的低矿化水平使其与釉质相比更易受到致龋菌的攻击而形成龋齿<sup>[10,11]</sup>以及致龋菌产酸对封闭效果的耐久性产生威胁.因此,理想的牙本质小管封闭策略需重视堵塞物的长期稳定性和抑菌性.

锌是人体必须的微量元素<sup>[12]</sup>,在唾液、牙菌斑和牙体硬组织中广泛存在.因其具有预防牙菌斑和牙结石形成的作用而被广泛添加到漱口水和牙膏中<sup>[13,14]</sup>.氧化锌丁香酚、磷酸锌和聚羧酸锌均为临床常见抑菌材料<sup>[15]</sup>.Sánchez等<sup>[16]</sup>研究发现,锌纳米粒子对致龋菌及牙周病致病菌均具有杀伤作用以及抗生物膜形成能力.因为锌可通过破坏细菌细胞膜使功能酶失活、扰乱细菌代谢活动和诱导氧化应激等方式发挥抗菌作用<sup>[17,18]</sup>.Toledano-Osori等<sup>[19]</sup>研究发现,锌纳米粒子可通过诱导磷酸钙形成来严密封闭牙本质小管.为了提高治疗的稳定性,封闭材料最好同时具有耐酸性、耐磨性以及缓释能力.介孔二氧化硅纳米粒子具有高比表面积、有序的骨架结构和良好的化学稳定性,近年来作为药物递送纳米载体已在生物医学领域得到广泛应用<sup>[20,21]</sup>.基于其良好的机械性能和耐酸性,介孔二氧化硅在牙本质小管封闭中起到重要作用<sup>[7]</sup>.中空介孔二氧化硅(HMSN)因具有独特的介孔壳层和中空结构而成为近年来的研究热点<sup>[22]</sup>.HMSN比介孔二氧化硅具有更高的比表面积,能够装载更多的药物并起到缓慢释放的作用<sup>[23]</sup>.但为了获得长期封闭效果,需增加HMSN与牙本质的黏附性.材料设计与应用的进步依赖于材料表面工程策略的发展<sup>[24,25]</sup>.受到贻贝黏附特性的启发,聚多巴胺已成为材料表面修饰的研究热点.聚多巴胺涂层在诱导牙本质再矿化中具有促进作用<sup>[26]</sup>,但其反应速率较慢,无法满足牙本质敏感患者急需缓解疼痛的需求.相转变溶菌酶(PTL)在2 min内即可在各种基材表面形成一层致密的纳米膜<sup>[1]</sup>.PTL的表面黏附机制为溶菌酶分子中的二硫键在三(2-羧基乙基)膦酸盐的还原作用下打开,使溶菌酶 $\alpha$ 螺旋结构发生相变,形成 $\beta$ 片层结构,从而暴露出溶菌酶中的氨基、羟基和羧基等活性官能团<sup>[27]</sup>,为其黏附与修饰提供结合位点.同时,PTL薄膜在经历多种有机酸的刻蚀以及3M胶带的撕拉后仍可与基材表面紧密黏附,表现出良好的稳定性,因此,其在提高材料与牙本质之间黏附性方面具有应用潜力<sup>[24]</sup>.

本文结合锌的良好抗菌性、PTL的表面黏附性以及HMSN的可搭载药物特性,设计了一种具有堵塞稳定性及抗菌防龋功能的牙本质小管封闭材料.首先,通过硬模板法和选择性刻蚀法制备了HMSN.HMSN具有独特的中空及介孔结构,可有效搭载锌离子.随后,使用PTL涂层对负载锌后的HMSN进行包覆,以促进材料与牙本质的紧密结合,获得了 $Zn^{2+}/PTL@HMSN$ 复合材料.体外牙本质小管封闭实验及抗菌性能检测表明, $Zn^{2+}/PTL@HMSN$ 在治疗牙本质敏感方面具有应用潜力(Scheme 1).



Scheme 1 Synthesis process and schematic diagram of  $Zn^{2+}/PTL@HMSN$  for occluding dentinal tubules

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

硅酸四乙酯(纯度99.99%)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, 纯度99%)、氨水(优级纯)、碳酸钠(无水级)、三(2-羧基乙基)磷酸盐(纯度98%)、无水乙醇(分析纯)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES, 纯度99.5%)、硫磺素T(ThT)、盐酸(质量分数37%)、氢氧化钠(纯度96%)、磷酸(分析纯)、柠檬酸(无水级)和磷酸盐缓冲液(PBS)速溶颗粒, 阿拉丁生化科技股份有限公司; 溶菌酶(生物技术级)和 $ZnCl_2$ (纯度99%), 上海麦克林生化科技有限公司; 人工唾液(pH=7.2), 上海源叶生物科技有限公司; 小鼠成纤维细胞L929, 中国科学院细胞库; DMEM高糖培养基, 美国Sigma-Aldrich公司; 胎牛血清, 美国Clark Bioscience公司; 青霉素链霉素溶液, 美国Hyclone公司; CCK-8试剂盒, 美国Apexbio公司; 脑心浸出液(BHI)肉汤干粉(优级纯)和营养琼脂平皿, 青岛海博生物技术有限公司。

Regulus8100型扫描电子显微镜(SEM)、JEM-2100F型高分辨率透射电子显微镜(TEM)和Regulus8100型能量色散X射线能谱仪(EDS), 日本日立公司; 80V型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR), 德国Bruker公司; Zetasizer Pro型纳米粒度及Zeta电位分析仪, 英国Malvern Panalytical公司; FV3000型激光共聚焦显微镜(CLSM), 日本Olympus公司; TGA550型热失重分析仪(TGA), 美国Waters公司; RT-6100型酶标仪, 美国Rayto公司; ASAP 2020 PlusHD88型全自动多功能气体吸附仪, 美国麦克仪器公司; Agilent 725型电感耦合等离子体原子发射光谱仪(ICP-OES), 美国Thermo Scientific公司; TGL20型台式高速离心机, 长沙英泰仪器有限公司; LGJ-12A型冷冻干燥机, 北京四环起航科技有限公司; XM-300UVF型超声波清洗器, 小美超声仪器有限公司。

### 1.2 实验过程

**1.2.1 HMSN的合成** 分别量取10 mL去离子水和69.4 mL无水乙醇混合后, 加入1.6 mL氨水并搅拌。将2 mL硅酸四乙酯和2 mL无水乙醇超声溶解, 用注射泵以1 mL/min的速率将硅酸四乙酯溶液滴加至上述溶液中, 搅拌(1000 r/min)于室温反应1 h。将二氧化硅胶体溶液以10000 r/min的转速离心10 min, 除去上层清液, 用水和乙醇多次交替洗涤、离心, 得到 $SiO_2$ 纳米粒子模板, 冻干保存。称取50 mg上述 $SiO_2$ 纳米粒子, 加至10 mL去离子水中超声15 min, 使 $SiO_2$ 分散均匀。称取75 mg CTAB, 将其超声分散于含有15 mL去离子水、15 mL无水乙醇和0.275 mL氨水的混合溶液中, 加入上述 $SiO_2$ 悬浊液, 室温下搅拌30 min, 用注射泵加入0.125 mL硅酸四乙酯, 室温下搅拌6 h, 离心收集产物, 将其分散于10 mL去离子水中, 加入424 mg  $Na_2CO_3$ , 于50 °C搅拌反应2 h以选择性刻蚀 $SiO_2$ 纳米粒子模板, 离心收集产物, 用去离子水和无水乙醇交替洗涤, 得到具有中空结构的 $SiO_2$ 纳米粒子。将所得产物分散于含有70 mL乙醇与7 mL盐酸(质量分数37%)的溶液中, 于80 °C下回流反应12 h以完全去除CTAB。收集产物, 用去离子水和无水乙醇交替洗涤, 得到HMSN, 冻干保存。

**1.2.2  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN的制备** 称取30 mg HMSN, 超声分散于10 mL去离子水中, 调节pH为碱性后, 常温下搅拌, 加入90 mg  $ZnCl_2$ 粉末, 搅拌5 h, 离心分离产物, 依次用无水乙醇和去离子水洗涤, 得到 $Zn^{2+}$ @HMSN。称取119.2 mg HEPES, 溶解于50 mL去离子水中, 配制成浓度为10 mmol/L的HEPES缓冲液。量取10 mL HEPES缓冲液, 加入20 mg溶菌酶, 配制成2 mg/mL的溶菌酶溶液。量取10 mL HEPES缓冲液, 加入143.3 mg三(2-羧基乙基)磷酸盐, 配制成50 mmol/L的三(2-羧基乙基)磷酸盐溶液。将 $Zn^{2+}$ @HMSN超声分散于10 mL 50 mmol/L的三(2-羧基乙基)磷酸盐溶液中, 用5 mol/L NaOH溶液调节pH值至5.9, 以维持溶菌酶相变时体系稳定, 同时去除样品中的 $Zn(OH)_2$ , 加入10 mL 2 mg/mL溶菌酶溶液, 室温下搅拌培育30 min。离心分离, 以除去溶菌酶相变产物和未反应原料。将 $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN悬浮于去离子水中, 冻干保存。

**1.2.3  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN的表征** 通过SEM和TEM对 $SiO_2$ 和HMSN的形貌进行了表征; 通过红外光谱、zeta电势分析、TGA和 $N_2$ 吸附-脱附实验表征了HMSN的理化性质; 采用SEM, EDS, CLSM和ICP-OES测试对 $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN进行了表征。

1.2.4  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 的同源模建和分子动力学模拟 使用 Modeller 软件包进行同源模建, 从 RCSB 蛋白数据库(PDB)中检索了 PTL 的整个 FASTA 序列(PDB ID 为 133L), 选择肽 A 原纤维 1-42(PDB ID 为 2BEG)中的结构作为整体链模板<sup>[28]</sup>. 使用 Ramachandran 图对得到的同源模型进行了评价. 分子动力学模拟部分, 使用 Gromacs 在 AMBER99SB-ILDN 力场中对  $Zn^{2+}$  和 PTL 的负载过程进行模拟. 使用三点水模型(TIP3P)对体系进行溶剂化, 使用周期边界条件模拟无限系统. 在模拟过程中, 以 10 ps 为间隔保存模拟轨迹, 通过均方根偏差(RMSD)分析.

1.2.5 牙本质敏感模型的制备 按照吉林大学白求恩口腔医院伦理委员会要求(审批号: JDKQ2023110), 在获得患者知情同意后, 收集完整且无龋损的第三磨牙, 去除表面软组织及污物后, 在流动水冷却下使用慢速金刚砂切割机在釉牙本质界以下平行于牙面切割约 5 mm×5 mm×1 mm(长×宽×高)牙本质片, 用砂纸依次打磨表面. 将牙本质片置于质量分数为 35% 的  $H_3PO_4$  溶液中浸泡 2 min 以暴露牙本质小管, 用去离子水冲洗, 超声清洗 3 min.

1.2.6 牙本质小管封闭实验 将牙本质敏感模型分为空白对照组和  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 实验组. 将  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 以 15 mg/mL 超声分散于去离子水中, 将牙本质片置于上述分散液中, 10 min 后取出; 将牙本质片置于等体积去离子水中, 作为空白对照组. 待两组牙本质片干燥后, 浸泡于人工唾液中, 置于 37 °C 恒温箱中, 每 24 h 更换新鲜人工唾液, 共 7 d. 通过 SEM 观察牙本质小管封闭情况.

取  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 封闭后的牙本质片分别进行耐磨性及耐酸性实验. 用软毛牙刷将牙本质片机械拂刷 2 min(垂直于牙面施加约 150g 恒定作用力), 用于评价牙本质小管封闭后的耐磨性; 将牙本质片置于质量分数为 6% 的柠檬酸溶液浸泡 1 min, 用去离子水彻底冲洗, 通过 SEM 表征评价牙本质小管封闭后的耐酸能力.

1.2.7  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 的生物相容性分析 选用小鼠成纤维细胞 L929, 通过 CCK-8 检测评价了  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 的体外细胞毒性. 将空白对照组及  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 实验组牙本质片用紫外光照消毒 2 h, 分别放入无菌 12 孔板内. 将 L929 细胞重悬后, 以密度为  $1 \times 10^4$  cell/孔接种于 12 孔板中, 培养 24 h 后, 更换为含有质量分数为 10% CCK-8 溶液的新鲜培养基, 继续培养 2~4 h. 每孔吸取培养液 100  $\mu$ L, 置于 96 孔板内, 使用酶标仪测量其在 450 nm 下的吸光度(OD)值. 采用相同方法, 接种细胞密度分别改为  $5 \times 10^4$  和  $2 \times 10^4$  cell/孔, 均隔天换液并分别培养 3 和 7 d, 以相同方式测量 OD 值. 每组样品重复测量 3 次, 结果取平均值, 实验重复 3 次.

1.2.8  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 抑制变异链球菌黏附性能研究 选用变异链球菌作为待测菌株, 结合菌落形成单位(CFU)平板计数法评价了  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 抑制细菌黏附的性能. 将空白对照组及  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 实验组牙本质片置于 24 孔板中, 量取 1 mL  $10^7$  CFU/mL 菌液, 分别与不同组的牙本质片共培养 24 h, 用无菌 PBS 溶液缓慢冲洗牙本质片, 将其置于 2 mL PBS 溶液中, 使用涡旋混合器振荡 2 min, 将黏附的细菌充分洗脱. 采用逐级稀释法将菌液稀释  $10^4$  倍后, 量取 50  $\mu$ L 菌液置于 BHI 琼脂培养皿中, 用涂布棒涂布均匀, 孵育 48 h. 对每个样本中的 CFU 进行计数, 计算细菌存活率(%), 每组实验重复 3 次.

## 2 结果与讨论

### 2.1 $SiO_2$ 纳米粒子的制备与表征

实验中合成了  $SiO_2$  纳米粒子, 作为制备 HMSN 的固体核模板<sup>[29]</sup>.  $SiO_2$  纳米粒子的形成过程是 TEOS 的水解过程, 在氨水的催化作用下 TEOS 水解生成正硅酸, 随后正硅酸发生脱水聚合反应, 形成 Si—O—Si, 在浓度达到饱和时聚集形成  $SiO_2$  核. 随着反应的进行, 正硅酸分子在其表面不断聚集, 最终形成  $SiO_2$  纳米粒子. 对  $SiO_2$  纳米粒子形貌进行了表征, 由 SEM 照片[图 1(A)]可见,  $SiO_2$  纳米粒子分散性较好, 形态和尺寸均一. 由图 1(B)可见,  $SiO_2$  纳米粒子的粒径呈正态分布, 平均粒径约为 87.5 nm. TEM 照片[图 1(C)]显示,  $SiO_2$  纳米粒子呈均一实心球形. EDS 谱图[图 1(D)]表明, 样品中仅存在 Si 和 O 元素, 且 Si 和 O 原子数之比为 2:1. 上述结果表明, 制备的样品为实心球形  $SiO_2$  纳米

粒子.

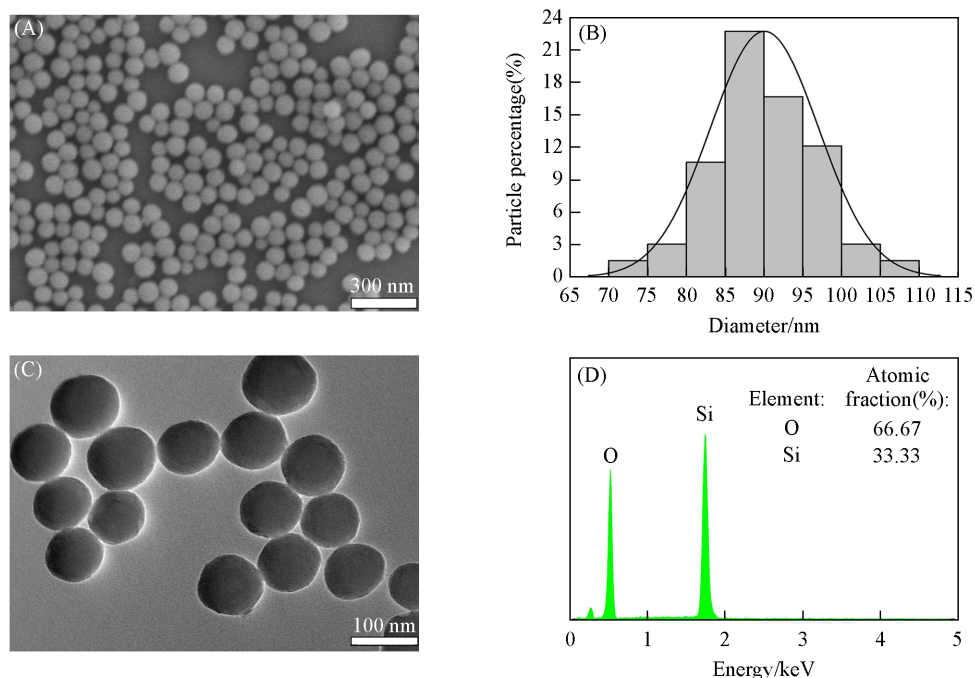


Fig. 1 SEM image(A), size distribution histogram(B), TEM image(C) and EDS spectrum(D) of  $\text{SiO}_2$  nanoparticles

## 2.2 HMSN 的制备与表征

在上述  $\text{SiO}_2$  纳米粒子表面制备出介孔壳层, 并使壳层与核之间存在结构差异以实现  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的选择性刻蚀. 二者结构的差异可通过阳离子表面活性剂 CTAB 辅助实现<sup>[30]</sup>. 与  $\text{SiO}_2$  核相比, CTAB 胶束所带的正电荷使壳层结构更致密和稳定<sup>[31]</sup>. 因此,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  先刻蚀内部的  $\text{SiO}_2$  核而不破坏外部壳层, 从而形成中空结构. 介孔结构通过酸醇萃取实现, 在酸醇萃取后 CTAB 被破坏, 其遗留空间形成了壳层中的介孔结构. 至此, HMSN 制备完成.

对产物形貌进行了表征, SEM 和 TEM 照片如图 2(A) 和 (B) 所示, HMSN 形态和尺寸均一, 具有完整的骨架结构. 同时, 中心部位衬度比四周低, 说明制备的  $\text{SiO}_2$  固体核被  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  刻蚀, 形成了中空结构, HMSN 由中空二氧化硅核及介孔壳层构成. 粒径测量结果[图 2(C)]表明, 其平均粒径约为 215 nm. 与图 1 中  $\text{SiO}_2$  相比, 图 2 样品在  $\text{SiO}_2$  的基础上制备了介孔壳层, 因此 HMSN 粒径增大. 为了进一步确认 HMSN 的化学结构, 使用 FTIR 对其进行了表征. 如图 2(D) 所示,  $3446\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰为硅羟基 ( $\text{Si-OH}$ ) 的伸缩振动峰, 表明样品表面由于羟基电离而带负电荷;  $1637\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰为吸附的水分子羟基的弯曲振动峰;  $1082$ ,  $801$  和  $460\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰分别为  $\text{Si-O-Si}$  的非对称收缩振动峰、对称伸缩振动峰和弯曲振动峰;  $950\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰为  $\text{Si-OH}$  的弯曲振动峰, 表明样品具有硅基骨架. Zeta 电势测试结果如图 2(E) 所示, HMSN 在水中的 Zeta 电势为  $-18.62\text{ mV}$ , 说明  $\text{Si-OH}$  在水中发生了去质子化, 形成负电势, 这有利于其通过静电作用搭载带正电荷的  $\text{Zn}^{2+}$ . 为了分析 HMSN 的热稳定性, 进行了 TGA 检测, 如图 2(F) 所示, 从室温加热至  $150\text{ }^\circ\text{C}$ , 样品质量保持稳定, 加热至  $800\text{ }^\circ\text{C}$  时, 样品质量损失 8.2%, 表明 HMSN 具有良好的热稳定性, 在口腔温度下可保持稳定. 为了研究样品中的孔道结构, 采用  $\text{N}_2$  吸附-脱附实验进行了表征. 如图 2(G) 所示, 该吸附-脱附曲线为典型的 IV 型等温线. 在低  $p/p_0$  区域, 曲线向上, 为单分子层吸附; 同时, 因存在介孔而发生了毛细管凝聚现象, 因此两条曲线不重合, 出现了明显的迟滞环, 进一步证明样品中存在介孔结构. 对其孔径尺寸进行了定量分析, 如图 2(H) 所示, 样品中孔径分布较窄, 尺寸为  $2.6\sim 2.8\text{ nm}$ . 介孔及中空结构增加了样品的比表面积, 有利于药物的负载及缓释.

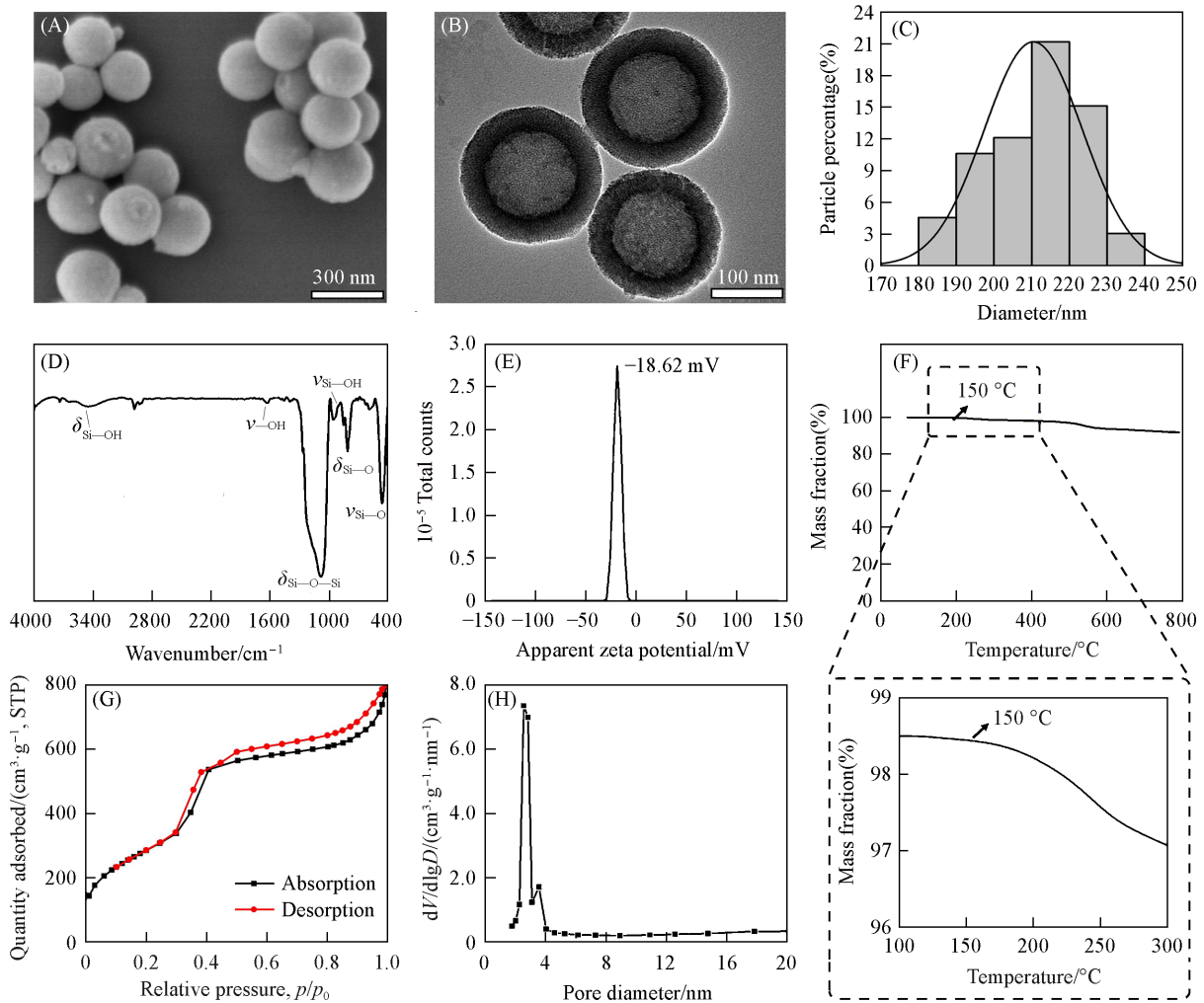


Fig. 2 SEM image(A), TEM image(B), size distribution histogram(C), FTIR spectrum(D), zeta potential(E), TGA curve(F),  $N_2$  adsorption-desorption isotherms(G) and pore diameter distribution(H) of HMSN

### 2.3 $Zn^{2+}/PTL@HMSN$ 的制备与表征

通过 zeta 电势测试已证明 HMSN 表面带负电荷, 可与带正电荷的  $Zn^{2+}$  通过静电作用结合. 负载  $Zn^{2+}$  后的样品形貌如图 3(A) 所示,  $Zn^{2+}@HMSN$  为纳米尺寸, 在负载  $Zn^{2+}$  的过程中, 溶液 pH 值调节至碱性, 在碱性环境下 HMSN 壳层被刻蚀, 因此其粒径减小, 但未影响 HMSN 的完整性. EDS 分析结果如图 3(B) 所示, 表明样品中含有 Si, O 和 Zn 元素. 此外, 负载  $Zn^{2+}$  后, 样品的 zeta 电势由  $-18.62$  mV [图 2(E)] 变为  $-15.30$  mV [图 3(C)], 说明  $Zn^{2+}$  的正电荷中和了部分 HMSN 的负电荷, 进一步证明  $Zn^{2+}$  已负载到 HMSN 中.

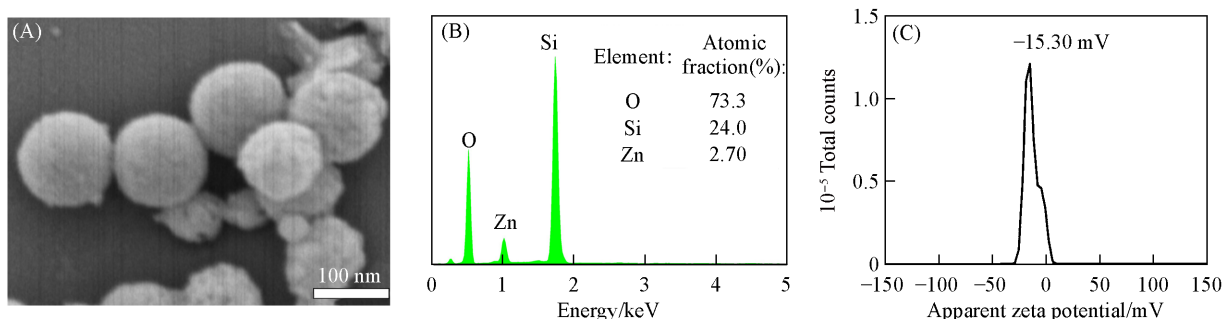


Fig. 3 SEM image(A), EDS spectrum(B) and zeta potential(C) of  $Zn^{2+}@HMSN$

将 PTL 薄膜包覆于  $\text{Zn}^{2+}$ @HMSN 表面, 制得的  $\text{Zn}^{2+}$ /PTL@HMSN 的形貌如图 4(A) 所示, 在包覆 PTL 后, 粒子仍具有较好的分散稳定性, 表明 PTL 的包覆过程未对粒子的分散性产生影响. 由图 4(B) 所示 EDS 结果可见, 样品中含有 C, O 和 N 元素, 表明 PTL 薄膜已包覆在  $\text{Zn}^{2+}$ @HMSN 表面. 为了进一步验证样品中是否含有 PTL, 采用 CLSM 表征了经 ThT 染色样品的荧光性质. PTL 的类淀粉样结构可与 ThT 结合, 在 CLSM 下呈绿色. 如图 4(C)~(E) 所示, 明场中样品位置与 CLSM 下荧光位置相同, 表明 PTL 薄膜已负载于样品表面. 为了确定样品中的  $\text{Zn}^{2+}$  含量, 利用 ICP-OES 检测了样品中  $\text{Zn}^{2+}$  的负载量. 将样品溶解后, 通过测量  $\text{Zn}^{2+}$  浓度计算得出  $\text{Zn}^{2+}$ /PTL@HMSN 负载  $\text{Zn}^{2+}$  的质量分数为 7.68%. 同时, 利用 ICP-OES 检测了不同时间点上层清液中的  $\text{Zn}^{2+}$  浓度, 计算得出  $\text{Zn}^{2+}$  释放量. 由图 S1 (见本文支持信息) 可见, 在 24, 48 和 72 h 时,  $\text{Zn}^{2+}$  呈持续释放状态, 在 72 h 时可释放载药量的 70.28%, 说明  $\text{Zn}^{2+}$ /PTL@HMSN 具有缓释性, 有利于牙本质小管的长效封闭.

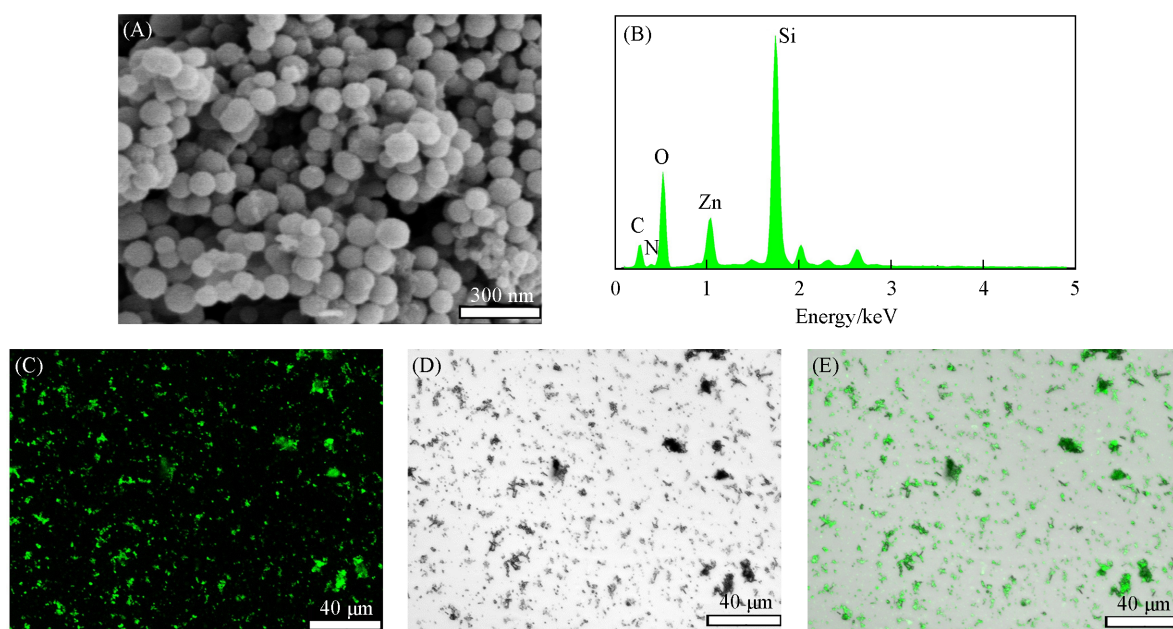


Fig. 4 SEM image(A), EDS spectrum(B), CLSM image(C), optical image(D) and merged image of optical and CLSM image(E) of  $\text{Zn}^{2+}$ /PTL@HMSN

为了深入研究  $\text{Zn}^{2+}$  和 PTL 的负载过程, 采用分子动力学模拟分析了  $\text{Zn}^{2+}$ /PTL@HMSN 复合纳米粒子的形成机制. 依据 TEM 和 BET 表征结果, 对 HMSN 的结构进行了建模 [图 5(A)]. 由前视图可见, 模型的上半部分为真空层, 用于后期加入水分子进行溶剂化. 为了更好地观察所建模型中的介孔结构, 将显示模式由 CPK 变为 Quicksurf, 并旋转正视图中的模型得到透视图. 可见, HMSN 表面存在介孔, 证明模拟结构建模成功. 使用 Gromacs 软件, 将模型上半部分的真空层溶剂化以模拟粒子在水中的状态. 建模完成后, 在溶剂层中添加  $\text{Zn}^{2+}$ , 以对  $\text{Zn}^{2+}$  在 HMSN 表面的吸附过程进行分子动力学模拟. 如图 5(C) 所示, 随着模拟的进行, 在静电作用下溶液中  $\text{Zn}^{2+}$  由散乱游离状态逐渐向 HMSN 方向移动, 最终, 在 HMSN 介孔内部和表面稳定 (动画 S1, 见本文支持信息). 对 10 ns 的模拟轨迹进行最小二乘拟合, 计算得出体系的 RMSD, 如图 5(D) 所示, RMSD 曲线在约 6 ns 后稳定, 表明 HMSN 通过静电作用可负载  $\text{Zn}^{2+}$ . 在负载  $\text{Zn}^{2+}$  的基础上, 对 PTL 的黏附过程进行了研究. 因为 PTL 的二硫键被还原剂打开, 使其从  $\alpha$  螺旋结构转变为  $\beta$  片层结构, 所以通过同源模型构造出具有  $\beta$  片层结构的 PTL 模型<sup>[28]</sup> [图 5(B)]. PTL 中 94.5% 的残基位于 Ramachandran 图的允许区域中 (图 S2, 见本文支持信息), 表明模型质量好. 将其置于已吸附  $\text{Zn}^{2+}$  的 HMSN 上面的水中, 进行 20 ns 的分子动力学模拟 (动画 S2, 见本文支持信息). 由图 5(E) 和 (F) 可见, 经 20 ns 模拟后, PTL 已黏附于  $\text{Zn}^{2+}$ @HMSN 表面, 其 RMSD 值在约 15 ns 后稳定, 因此, 20 ns 的状态为  $\text{Zn}^{2+}$ /PTL@HMSN 复合纳米粒子的稳定状态. 模拟结果与实验表征结果一

致, 进一步证明 HMSN 可负载  $Zn^{2+}$  和 PTL, 形成了复合纳米粒子, 为后续封闭牙本质小管奠定了基础.

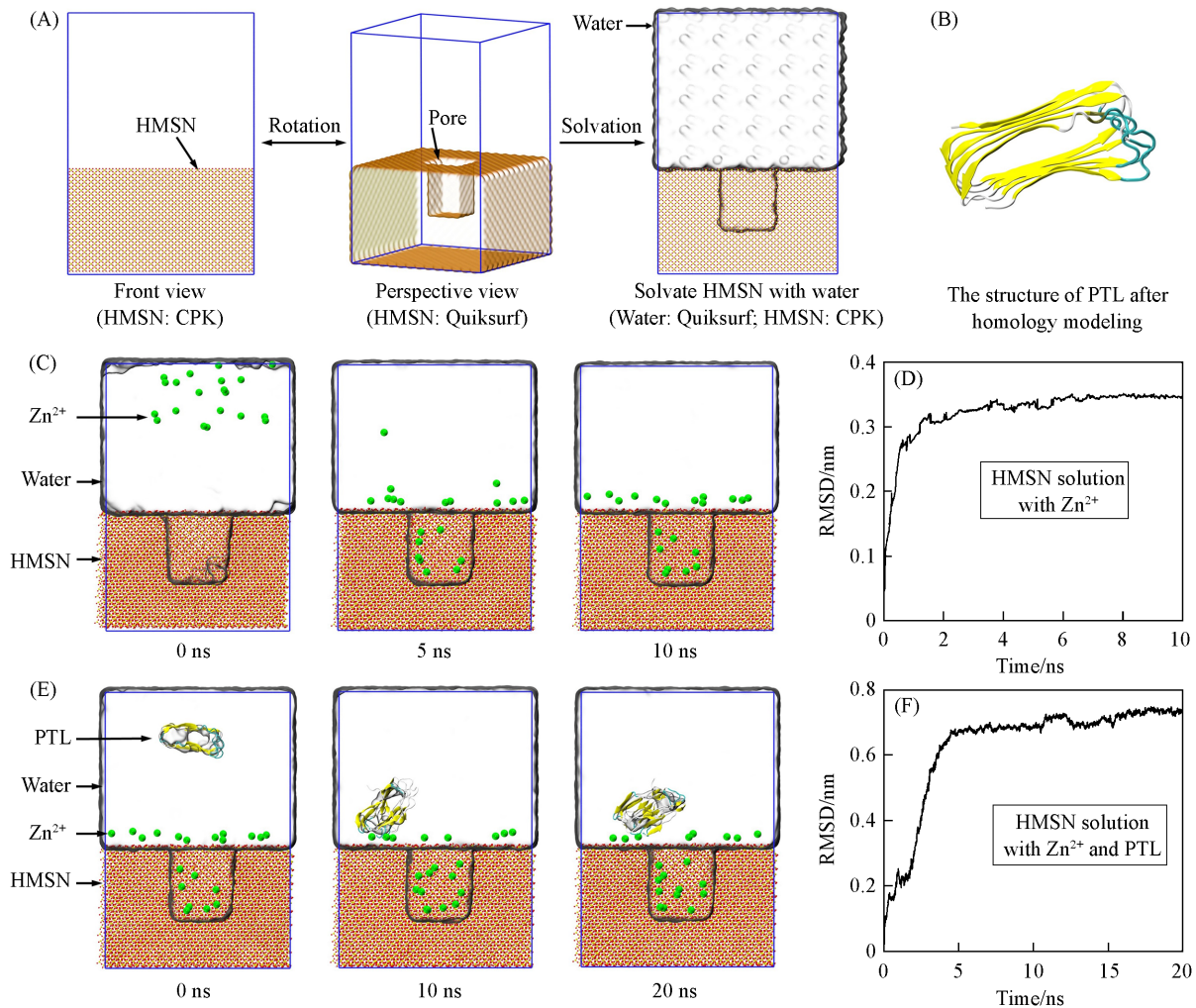


Fig. 5 Molecular dynamics simulation

(A) and (B) Molecular structure of the model; (C) the structures of  $Zn^{2+}$  absorbing on the HMSN complex, which are extracted from the molecular dynamics simulation trajectory at 0, 5, and 10 ns, respectively; (D) RMSD of  $Zn^{2+}$  in  $Zn^{2+}$ @HMSN complex against time; (E) the structures of PTL absorbing on the  $Zn^{2+}$ @HMSN complex, which are extracted from the molecular dynamics simulation trajectory at 0, 10, and 20 ns, respectively; (F) RMSD of PTL in  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN complex against time.

#### 2.4 $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 封闭牙本质小管实验

图 6(A) 和 (B) 分别为牙本质小管封闭后空白对照组和  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 实验组的 SEM 照片. 经质量分数为 35% 的  $H_3PO_4$  溶液处理后, 空白对照组显示牙本质小管均为敞开状态, 管径约为  $3\sim 4\ \mu m$ , 而  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 实验组的牙本质小管均保持紧密封闭状态.  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 封闭牙本质小管的原因如下: (1)  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 的粒径约为 130 nm, 分散性良好, 因此, 在脱敏过程中易渗透到牙本质小管中; (2)  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 中含有  $Zn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  的不断释放可促进牙本质小管中矿物的形成 (图 S1, 见本文支持信息), 研究表明, 锌可通过结晶沉淀促进牙本质小管闭塞<sup>[32]</sup>; (3) PTL 组装体中的溶菌酶分子含有活性官能团, 使其可通过配位键、氢键、静电作用和疏水作用等与各种材料表面相互作用<sup>[27]</sup>. 因此, 良好的封闭能力可能是  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 与牙本质间的紧密黏附所致.

评价脱敏材料对牙本质小管封闭能力的关键指标之一是耐磨性. 脱敏治疗后牙本质表面通常会形成一层矿物质层, 但这层矿物质层在日常刷牙或咀嚼硬物过程中易因机械摩擦而脱落<sup>[33]</sup>, 使牙本质小管口再次暴露<sup>[34]</sup>, 从而影响长期治疗效果. 如图 6(C) 所示, 经机械拂刷刺激后, 大部分小管口保持良好的封闭状态, 封堵材料与小管贴合紧密, 仅有少量碎屑残留在表面.  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 具有较好的耐

磨稳定性,其原因如下:(1) HMSN具有优异的机械性能,已广泛应用于提高材料机械强度;(2) 封闭材料与牙本质之间的紧密封闭以及  $Zn^{2+}$  的再矿化作用有利于提高材料的机械稳定性<sup>[35]</sup>; (3)  $Zn^{2+}$  对基质金属蛋白酶的活性具有抑制作用,在防止胶原基质降解和维持表面有机层方面发挥了重要作用<sup>[36]</sup>.

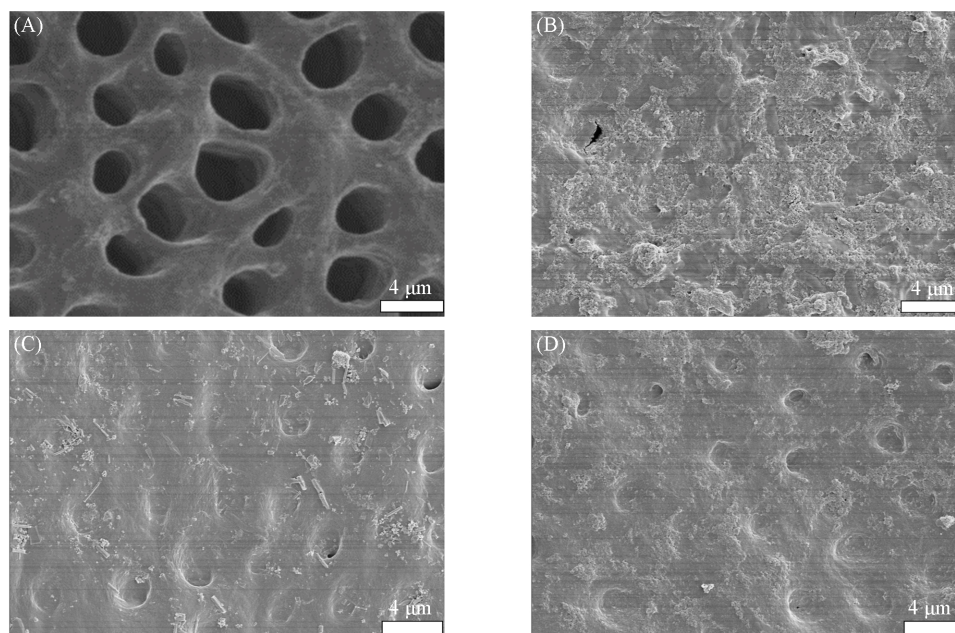


Fig. 6 SEM image of acid-etched dentin specimens treated without(A) or with(B)  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN and mechanical brushing subgroup(C) and citric acid subgroup(D)

耐酸稳定性是脱敏材料的另一个重要评价指标. 柠檬酸是日常饮食中最常见的酸性物质,基于此,采用质量分数为6%的柠檬酸溶液模拟口腔中的酸性饮食侵蚀<sup>[37]</sup>,以检验  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 的耐酸稳定性. 经过6%柠檬酸处理后的SEM照片如图6(D)所示,可见牙本质小管口保持紧密封闭状态.  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 具有耐酸稳定性的原因如下:(1) HMSN为酸性氧化物,对酸性物质具有抵抗性;(2) 尽管酸性环境会导致部分松散的沉积物溶解,但脱敏材料可在牙本质小管内不断释放  $Zn^{2+}$  以促进晶体的沉积及再矿化<sup>[32]</sup>; (3)  $Zn^{2+}$  能够抑制基质金属蛋白酶介导的牙本质中胶原纤维的降解<sup>[38]</sup>,胶原纤维在维持牙本质力学性能中具有重要作用<sup>[39-41]</sup>,在胶原分子中存在4个  $Zn^{2+}$  结合位点,与胶原酶切割位点处于相同位置,因此,  $Zn^{2+}$  的结合可保护基质金属蛋白酶在胶原中的敏感切割位点,在再矿化期间减少牙本质胶原蛋白的降解,阻止牙本质的破坏;(4)  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 与牙本质之间的牢固黏附能够抵御酸性溶液的侵蚀.

## 2.5 $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 的生物相容性分析

在评估生物材料用于人体组织的安全性方面,细胞毒性实验十分必要. 在体内应用之前,  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 应为无毒或毒性可忽略不计. 在细胞毒性实验中, L929 细胞使用最为广泛,其具有传代简便、生长繁殖迅速和培养条件简单等优势,同时, L929 为 ISO 推荐的牙科材料毒性检测细胞,故选择 L929 作为评价生物相容性的检测细胞. 检测结果如图7(A)所示,经  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 处理的牙本质片与 L929 细胞共培养 1, 3 和 7 d, 实验组与空白组组内的 OD 值均无统计学差异,说明  $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 具有良好的生物相容性.

## 2.6 $Zn^{2+}$ /PTL@HMSN 抑制变异链球菌黏附效果分析

龋病是最常见的口腔疾病之一,致龋菌的定植是引起龋病的关键因素,随着致龋菌代谢碳水化合物产酸,局部 pH 值降低会引起牙体硬组织脱矿<sup>[42]</sup>,继续发展可能引起牙髓炎症. 牙本质的矿化程度比牙釉质低,因此,龋损发生在牙本质后进展快<sup>[10]</sup>. 此外,在脱敏处理后,脱敏剂的稳定性和功能性会受到细菌代谢产物引起的低 pH 值微环境的影响,因此,具有抗菌性能的脱敏材料可有效防止龋病<sup>[43]</sup>,从

而提高脱敏治疗的长期效果. 在致龋菌中, 变异链球菌对龋病的发生发展作用重大<sup>[44]</sup>. 本文选择变异链球菌为抗菌检测菌, 通过CFU平板计数法表征了Zn<sup>2+</sup>/PTL@HMSN封闭牙本质小管后的抗菌效果. 基于锌对细菌的杀伤作用<sup>[18]</sup>, 由图7(B)~(D)可见, 经Zn<sup>2+</sup>/PTL@HMSN处理后的牙本质表面细菌的活性明显小于未经脱敏处理的牙本质表面, 表明Zn<sup>2+</sup>/PTL@HMSN的应用可有效抑制牙本质表面变异链球菌的早期黏附.

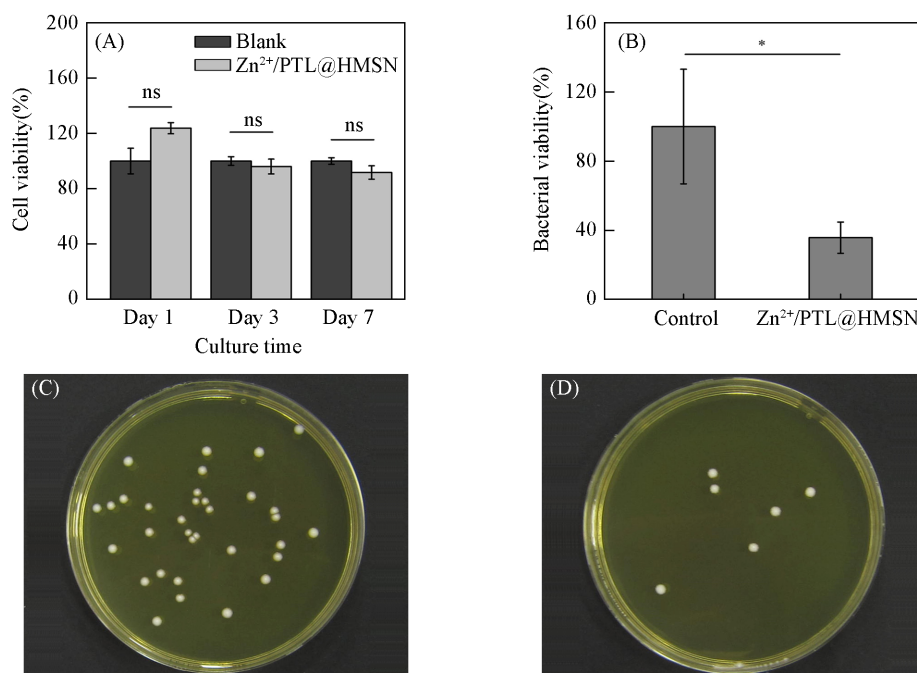


Fig. 7 CCK-8 assay of Zn<sup>2+</sup>/PTL@HMSN on L929(A), bacterial viability(B) and photographs of bacterial colonies formed on dentin treated without(C) or with (D) Zn<sup>2+</sup>/PTL@HMSN

### 3 结 论

从临床需求出发, 为实现脱敏剂在治疗牙本质敏感症中的长期稳定效果, 以具有高比表面积 of HMSN 为载体, 设计了一种牙本质小管封闭材料. 利用 HMSN 表面所带负电荷吸引 Zn<sup>2+</sup>, 从而赋予其抗菌性能, 使用 PTL 对 Zn<sup>2+</sup>@HMSN 进行包覆, 实现了材料和牙本质之间的紧密结合. 实验结果表明, Zn<sup>2+</sup>/PTL@HMSN 具有良好的生物相容性, 能够严密封闭牙本质小管. 在模拟口腔环境下的机械拂刷和酸性侵蚀处理后, 封闭效果仍保持良好, 表明材料具有良好的耐久性和稳定性, 为适应复杂的口腔环境奠定了基础. 同时, 抗菌实验结果表明, Zn<sup>2+</sup>/PTL@HMSN 具有抑制变异链球菌黏附的作用, 有助于预防龋齿的发生以及提高治疗效果. Zn<sup>2+</sup>/PTL@HMSN 是一种具有抗菌性及黏附特性的牙本质小管封闭材料, 为治疗牙本质敏感症提供了潜在解决方案.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/20240249>.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Li C., Lu D., Deng J., Zhang X., Yang P., *Adv. Mater.*, **2019**, *31*(46), 1903973
- [ 2 ] Li J., Zhao X., Xia Y., Qi X., Jiang C., Xiao Y., Jiang F., Jiang X., Yuan G., *Adv. Mater.*, **2024**, *36*(21), 2313419
- [ 3 ] Bernal L., Sotelo-Hitschfeld P., König C., Sinica V., Wyatt A., Winter Z., Hein A., Touska F., Reinhardt S., Tragl A., Kusuda R., Wartenberg P., Sclaroff A., Pfeifer J. D., Ectors F., Dahl A., Freichel M., Vlachova V., Brauchi S., Roza C., Boehm U., Clapham D. E., Lennerz J. K., Zimmermann K., *Sci. Adv.*, **2021**, *7*(13), eabf5567
- [ 4 ] Chen Z., Duan Y., Shan S., Sun K., Wang G., Shao C., Tang Z., Xu Z., Zhou Y., Chen Z., Tang R., Pan H., Xie Z., *Nanoscale*, **2022**, *14*(3), 642—652
- [ 5 ] Li B., Liu C., Fang Z. H., Cao Y., Zhou Z., Lu H., *Int. J. Nanomedicine*, **2021**, *16*, 31—45

- [ 6 ] Fernando D., Attik N., Pradelle-Plasse N., Jackson P., Grosgeat B., Colon P., *Mater. Sci. Eng. C*, **2017**, *76*, 1369—1377
- [ 7 ] Yu J., Yang H., Li K., Ren H., Lei J., Huang C., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, *9*(31), 25796—25807
- [ 8 ] Sgolastra F., Petrucci A., Severino M., Gatto R., Monaco A., *J. Dent. Res.*, **2013**, *92*(6), 492—499
- [ 9 ] Zhou Z., Li J., Wang Z., Zhang H., Wang Y., Shen D., Wu Z., Shen M., Pan H., Wang Q., Tang R., Hannig M., Fu B., *Adv. Health-care Mater.*, **2023**, *12*(19), 2370109
- [ 10 ] Takahashi N., Nyvad B., *Caries Res.*, **2016**, *50*(4), 422—431
- [ 11 ] Li Z., Ren Q., Han S., Ding L., Qin X., Hu D., He T., Tian T., Lu Z., Zhang L., *Regen. Biomater.*, **2022**, *9*, rbac059
- [ 12 ] Yusa K., Yamamoto O., Takano H., Fukuda M., Iino M., *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 29462
- [ 13 ] Uwitonze A. M., Ojeh N., Murererehe J., Atfi A., Razzaque M. S., *Nutrients*, **2020**, *12*(4), 949
- [ 14 ] Lynch R. J. M., *Int. Dent. J.*, **2011**, *61*(S3), 46—54
- [ 15 ] Huang M., Hill R. G., Rawlinson S. C. F., *Dent. Mater.*, **2017**, *33*(5), 543—552
- [ 16 ] Sánchez M. C., Toledano-Osorio M., Bueno J., Figuero E., Toledano M., Medina-Castillo A. L., Osorio R., Herrera D., Sanz M., *Dent. Mater.*, **2019**, *35*(1), 156—168
- [ 17 ] Chiang Y. C., Wang Y. C., Kung J. C., Shih C. J., *J. Dent.*, **2021**, *106*, 103563
- [ 18 ] Han D., Liu X., Wu S., *Chem. Soc. Rev.*, **2022**, *51*(16), 7138—7169
- [ 19 ] Toledano-Osorio M., Osorio E., Aguilera F. S., Medina-Castillo A. L., Toledano M., Osorio R., *Acta Biomater.*, **2018**, *72*, 371—380
- [ 20 ] Kankala R. K., Han Y. H., Na J., Lee C. H., Sun Z., Wang S. B., Kimura T., Ok Y. S., Yamauchi Y., Chen A. Z., Wu K. C. W., *Adv. Mater.*, **2020**, *32*(23), 1907035
- [ 21 ] Tang F., Li L., Chen D., *Adv. Mater.*, **2012**, *24*(12), 1504—1534
- [ 22 ] Li Y., Li N., Pan W., Yu Z., Yang L., Tang B., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, *9*(3), 2123—2129
- [ 23 ] Sun L., Lv H., Feng J., Gusebnikova O., Wang Y., Yamauchi Y., Liu B., *Adv. Mater.*, **2022**, *34*(31), 2201954
- [ 24 ] Liu R., Zhao J., Han Q., Hu X., Wang D., Zhang X., Yang P., *Adv. Mater.*, **2018**, *30*(38), 1802851
- [ 25 ] Wang Q., Zhang S., Zhang C., Wu C., Sun Z., *Mater. Technol.*, **2017**, *32*(11), 657—667
- [ 26 ] Zhou Y. Z., Cao Y., Liu W., Chu C. H., Li Q. L., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2012**, *4*(12), 6901—6910
- [ 27 ] Wang D., Deng J., Deng X., Fang C., Zhang X., Yang P., *Adv. Mater.*, **2020**, *32*(31), 2002080
- [ 28 ] Zazeri G., Povinelli A. P. R., Pavan N. M., Jones A. M., Ximenes V. F., *Molecules*, **2023**, *28*(19), 6891
- [ 29 ] Fang X., Chen C., Liu Z., Liu P., Zheng N., *Nanoscale*, **2011**, *3*(4), 1632—1639
- [ 30 ] Semeykina V., Zharov I., *J. Colloid Interface Sci.*, **2022**, *615*, 236—247
- [ 31 ] Chen Y., Chen H., Guo L., He Q., Chen F., Zhou J., Feng J., Shi J., *ACS Nano*, **2010**, *4*(1), 529—539
- [ 32 ] Osorio R., Osorio E., Cabello I., Toledano M., *Caries Res.*, **2014**, *48*(4), 276—290
- [ 33 ] Fan M., Zhou Z., Zhu W., Li M., Tu Y., Yu Z., Li J., Zhang M., Liang K., *Dent. Mater.*, **2024**, *40*(2), 254—266
- [ 34 ] Sehmi H., Olley R. C., *J. Dent.*, **2015**, *43*(12), 1442—1447
- [ 35 ] Wu L., Wang Q., Li Y., Yang M., Dong M., He X., Zheng S., Cao C. Y., Zhou Z., Zhao Y., Li Q. L., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, *13*(33), 39142—39156
- [ 36 ] Toledano M., Yamauti M., Ruiz-Requena M. E., Osorio R., *J. Dent.*, **2012**, *40*(9), 756—765
- [ 37 ] Wang Z., Ma X., Jiang T., Wang Y., Feng Y., Li R., *Am. J. Dent.*, **2015**, *28*(3), 128—132
- [ 38 ] Toledano M., Osorio R., Vallecillo-Rivas M., Osorio E., Lynch C. D., Aguilera F. S., Toledano R., Sauro S., *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **2021**, *114*, 104232
- [ 39 ] Zhao L., Sun J., Zhang C., Chen C., Chen Y., Zheng B., Pan H., Shao C., Jin B., Tang R., Gu X., *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **2021**, *115*, 104226
- [ 40 ] Song Q., Jiao K., Tonggu L., Wang L. G., Zhang S. L., Yang Y. D., Zhang L., Bian J. H., Hao D. X., Wang C. Y., Ma Y. X., Arola D. D., Breschi L., Chen J. H., Tay F. R., Niu L. N., *Sci. Adv.*, **2019**, *5*(3), eaav9075
- [ 41 ] Liu Y., Liu S., Luo D., Xue Z., Yang X., Gu L., Zhou Y., Wang T., *Adv. Mater.*, **2016**, *28*(39), 8740—8748
- [ 42 ] Tang Z., Chen Z., Wang D., Shan S., Jin W., Sun K., Pan H., Xie Z., Tang R., Shao C., *Adv. Funct. Mater.*, **2024**, *34*(21), 2306900
- [ 43 ] Zhou Z., Zhang L., Li J., Shi Y., Wu Z., Zheng H., Wang Z., Zhao W., Pan H., Wang Q., Jin X., Zhang X., Tang R., Fu B., *Nanoscale*, **2021**, *13*(2), 953—967
- [ 44 ] He J., Yang J., Li M., Li Y., Pang Y., Deng J., Zhang X., Liu W., *ACS Nano*, **2022**, *16*(2), 3119—3134

(Ed.: X, N, K)