

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.51.007 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

陈建洪, 王萍, 彭萌, 唐倩, 文韵笙. 不同成分纳米银冲洗粪肠球菌离体根管感染的抗菌性能[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(51): 9533-9540.

不同成分纳米银冲洗粪肠球菌离体根管感染的抗菌性能*

陈建洪, 王萍, 彭萌, 唐倩, 文韵笙

文章亮点: ①实验选用牙髓治疗后疾病的主要致病菌粪肠球菌作为感染细菌。②延续前期实验的设计使用 2.5% 次氯酸钠作为对照, 研究含醋酸氯己定或三氯生纳米银冲洗剂的抗菌性能。③实验采用通过液相化学还原法获得的纳米银制剂, 其形状为球形, 直径为 5-20 nm。

关键词: 纳米银; 根管冲洗; 醋酸氯己定; 三氯生; 饥饿期粪肠球菌; 次氯酸钠; 平板计数法; 生物材料

摘要

背景: 牙髓根管治疗中有效的根管冲洗可明显减少根管系统内细菌及其产物, 改善治疗效果及预后。

目的: 分析含醋酸氯己定或三氯生纳米银根管冲洗剂对饥饿期粪肠球菌离体根管感染模型的抗菌效果。

方法: 将 45 颗牙体完整、发育正常的人单根管前磨牙随机分为 3 组, 建立饥饿期粪肠球菌离体根管感染模型, 对感染模型使用 Protaper 手动器械进行根管预备至 F3, 同时分别使用含醋酸氯己定纳米银根管冲洗剂、含三氯生纳米银根管冲洗剂及次氯酸钠进行根管冲洗, 采用菌落计数法计算根管预备冲洗前后感染根管内的菌落数。

结果与结论: 含醋酸氯己定或三氯生纳米银根管冲洗剂及次氯酸钠冲洗后根管内细菌数量均明显低于冲洗前 ($P < 0.01$)。含醋酸氯己定纳米银根管冲洗剂组与次氯酸钠冲洗组冲洗后的细菌数量低于含三氯生纳米银根管冲洗剂组 ($P < 0.05$)。前两组间差异无显著性意义。表明含醋酸氯己定纳米银根管冲洗剂较含三氯生纳米银根管冲洗剂具有更强的抗菌效果。

中山大学附属第三医院口腔科, 广东省广州市 510630

陈建洪, 男, 1959 年生, 广东省梅州市人, 汉族, 1983 年中山医科大学毕业, 副主任医师, 主要从事牙髓病学研究。
wangpww@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)51-09533-08

收稿日期: 2012-08-21
修回日期: 2012-09-26
(20120810002/GW W)

Antimicrobial efficacy of nano-silver endodontic irrigations for an *in vitro* model infected by *Enterococcus faecalis* in starvation

Chen Jian-hong, Wang Ping, Peng Meng, Tang Qian, Wen Yun-sheng

Abstract

BACKGROUND: Effective root canal irrigation in root canal treatment can significantly reduce bacteria and their products within the root canal system, improving the treatment effectiveness and prognosis.

OBJECTIVE: To evaluate the antimicrobial effects of two kinds of nano-silver endodontic irrigates containing chlorhexidine acetate or triclosan against *Enterococcus faecalis* in starvation in root canals.

METHODS: Totally 45 infected premolars models used in the experiment were divided into three groups randomly, all of which were prepared with Protaper hand instruments to F3, and were irrigated with irrigations containing chlorhexidine acetate, triclosan and NaClO. Microbial growth was analyzed by turbidity of the culture medium, and then colony-forming units were counted on the plates.

RESULTS AND CONCLUSION: There was a statistically significant difference in colony-forming units of *Enterococcus faecalis* before and after irrigation ($P < 0.01$). All of the three irrigations were antimicrobial. There was no significant difference in the antimicrobial effect between chlorhexidine acetate nano-silver and NaClO ($P > 0.05$). Chlorhexidine acetate nano-silver and NaClO showed a better antimicrobial effect than triclosan nano-silver, which was statistically significant ($P < 0.05$). These findings indicated that chlorhexidine acetate nano-silver, triclosan nano-silver and NaClO were antimicrobial, which could not eradicate *Enterococcus faecalis* in the root canals. Antimicrobial effects of chlorhexidine acetate nano-silver and NaClO were similar, which were better than triclosan nano-silver.

Chen JH, Wang P, Peng M, Tang Q, Wen YS. Antimicrobial efficacy of nano-silver endodontic irrigations for an *in vitro* model infected by *Enterococcus faecalis* in starvation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(51): 9533-9540.

Department of
Stomatology, the
Third Affiliated
Hospital of Sun
Yat-sen University,
Guangzhou
510630, Guangdong
Province, China

Chen Jian-hong,
Associate chief
physician,
Department of
Stomatology, the
Third Affiliated
Hospital of Sun
Yat-sen University,
Guangzhou
510630, Guangdong
Province, China
wangpww@126.com

Supported by: the
Natural Science
Foundation of
Guangdong Province,
No.91510089010000
74*

Received: 2012-08-21
Accepted: 2012-09-26

0 引言

牙髓治疗后疾病在临床中较常见,约30%经过根管充填的病例仍然存在牙髓治疗后感染^[1]。因粪肠球菌可进入饥饿及半饥饿的状态抵抗环境压力而成为牙髓治疗后疾病的主要致病菌。粪肠球菌具有较强的渗透能力,能够进入根管峡部、不规则区及牙本质小管内,在根管内多以生物膜的形式存在。针对牙髓治疗后疾病,目前主要采用根管再治疗的方法清除感染并封闭根管,能否彻底清除根管系统内粪肠球菌成为牙髓再治疗成功与否的关键。根管冲洗在机械化学根管预备过程中起到极为关键的作用,有效的冲洗可明显减少根管系统内细菌及其产物,从而改善根管再治疗效果。

纳米银作为抗菌剂已逐渐被广泛应用于医疗卫生行业,邱国英^[2]探讨了微波联合纳米银抗菌凝胶治疗宫颈糜烂的效果。研究选取作者所在医院妇科门诊2010年1月至2011年6月期间收治的186例宫颈糜烂的患者,随机分为对照组和治疗组,各93例。对照组采用药物治疗,治疗组在对照组的基础上再行微波治疗,比较两组的治疗效果。结果显示,治疗组总有效率、治愈率均高于对照组,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$);治疗组阴道排在7 d内停止率、阴道排液量、阴道出血量经量率显著高于对照组,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$)。表明微波联合纳米银抗菌凝胶治疗宫颈糜烂安全有效,值得临床推广。

李明春等^[3]探讨了纳米银溶液及纳米银凝胶的体外抗菌作用,为将纳米银开发成烧烫伤外用抗感染药提供依据。研究以磺胺嘧啶银为阳性对照,采用试管二倍稀释法考察纳米银溶液及纳米银凝胶对铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、变形杆菌、沙雷氏菌、不动杆菌、表皮葡萄球菌、肠球菌、肺炎克雷伯菌、白色念珠菌等10种病菌的最低抑菌浓度。结果显示,纳米银凝胶、纳米银溶液及磺胺嘧啶银对上述10种细菌的最低抑菌浓度分别为2.5-10.0, 4-32, 32-64 mg/L,纳米银溶液及其凝胶的抗菌效果明显优于磺胺嘧啶银。表明体外实验中纳米银溶液及其凝胶抗菌谱广、抗

菌作用强,为其用于治疗烧伤、烫伤等感染提供了一定试验依据。

庄沛林^[4]检测了纳米银溶液对粪肠球菌的有效作用浓度,探讨纳米银溶液干预粪肠球菌对牙本质的黏附从而抑制粪肠球菌生物膜形成的作用,研究纳米银溶液对牙本质表面粪肠球菌生物膜的杀菌作用并明确其有效作用时间,为探寻新型有效的根管消毒药物以提高根管治疗成功率提供实验依据。结果表明:①纳米银溶液对粪肠球菌有较强的抗菌作用,0.006%的纳米银溶液可抑制粪肠球菌生长,0.1%纳米银溶液可杀灭生物膜状态粪肠球菌。②0.1%纳米银溶液可有效减少粪肠球菌对牙本质的黏附且对牙本质表面形态无明显破坏,推测应用纳米银溶液冲洗根管可减少粪肠球菌对根管牙本质的黏附,抑制根管内粪肠球菌生物膜的形成。③0.1%纳米银溶液可在生物膜未完全解体的情况下杀灭牙本质表面粪肠球菌生物膜深层细菌,提示纳米银溶液对粪肠球菌生物膜有较强的渗透能力和杀菌作用,其杀菌作用随处理时间的延长而增强,至24 h可完全杀灭粪肠球菌,表明应用0.1%纳米银溶液作为根管消毒药物有望提高根管消毒效果,其作用时间以24 h以上为佳。

舒东^[5]将96例外科手术后患者随机分为对照组48例(常规切口敷料)和观察组48例(纳米银抗菌敷料),观察组以生理盐水清洗切口后使用纳米银抗菌敷料覆盖,对照组以碘伏消毒切口后使用常规无菌敷料覆盖,对比两组患者切口甲级愈合时间、感染情况、切口换药频率、切口细菌培养数量、1年后随访两组患者瘢痕发生率。结果表明纳米银抗菌敷料可以明显促进外科手术部位伤口甲级愈合时间,增加愈合程度,并减少切口感染及瘢痕化发生,值得临床广泛应用。

纳米银作为牙髓治疗冲洗药物具有良好的应用前景,本实验分析含醋酸氯己定或三氯生纳米银根管冲洗剂对饥饿期粪肠球菌离体根管感染模型的抗菌效果。

1 材料和方法

设计: 对比观察实验。

时间及地点: 于2010年8月至2011年6月在中山大学附属第三医院完成。

材料:

纳米银根管冲洗剂对饥饿期粪肠球菌离体根管感染模型作用实验的菌种、试剂及仪器:

菌种、试剂及仪器	来源
标准粪肠球菌菌株 (ATCC29212)	中山大学光华口腔研究所
脑心浸液培养基	广东环凯微生物科技有限公司
试剂 A, 试剂 B	华南理工大学材料科学与工程学院
2.5%次氯酸钠	天津天达净化材料精细化工厂
SG-403 生物安全柜	美国 The Baker Company
Bactron I 厌氧培养箱	美国 Shel Lab
MiniSpin 微型高速离心机	德国 Eppendorf

试剂A配方: 取1 g卡波姆940溶于60 mL去离子水中形成水溶液, 后加入醋酸氯己定1.5 g, 纳米银100 μg , 乙醇35 mL, 在均质化速度5 000 r/min下搅拌10 min 形成的无色透明液体。

试剂B配方: 取1 g卡波姆940溶于60 mL去离子水中形成水溶液, 然后加入三氯生0.5 g, 纳米银100 μg , 乙醇35 mL, 在均质化速度5 000 r/min下搅拌10 min 形成的无色透明液体。

离体牙: 选取因正畸治疗需要拔除的牙体完整、发育正常无变异的单根管前磨牙45颗为实验研究样本, 供者知情同意。牙根长度标准化: 截去牙冠, 保留12 mm牙根, 摘除牙髓, 疏通根管; 工作长度标准化: 自根尖退行1 mm, 工作长度WL= 11 mm, ProTaper冠下法根管预备至F3号锉即根尖段达到30号, 5.25%NaClO和17%EDTA交替冲洗后, 超声荡洗去除玷污层; 121 $^{\circ}\text{C}$ 高温高压灭菌20 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下生理盐水中保存; 随机选择2标本检测灭菌效果。

实验方法:

培养饥饿期粪肠球菌: 将粪肠球菌标准菌株(ATCC29212)梯度解冻至室温, 复苏; 将复苏菌液与新鲜BHI液体培养基1:200扩增, 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧(体积分数80% N_2 、10% H_2 、10% CO_2)培养24 h。挑取单个菌落进行生化鉴定, 确定为标准菌株后从培养基刮取菌株置于双蒸中, 紫外分光光度计调整菌落形成单位CFU至 1.0×10^8 扩增^[6]; 自扩增初始计, 分别于2, 4, 6, 8, 16, 24, 48, 72, 96 h取样100 μL 菌液按照10倍稀释法稀释后涂布于BHI-琼脂培养皿, 通过平板菌落计数法计算各个时间点菌落数, 绘制生长曲线确立饥饿期。

感染模型的建立: 将冻存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的粪肠球菌标准株ATCC29212解冻复苏后, 在BHI液体培养基中扩增; 厌氧(体积分数80% N_2 、10% H_2 、10% CO_2)培养, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h后, 挑取单个菌落, 取数个单菌落转至

BHI液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧增菌培养至饥饿期72 h, 调整菌悬液密度为麦氏比浊度5(1.5×10^9 CFU/mL); 在45个盛有无菌牙根的双蒸水Ep管中加入100 μL 麦氏比浊度为5的饥饿期粪肠球菌菌液, 放入孵育箱中培养24 h^[7]; 随机抽取3个样本, 于根管口取10 μL 菌液接种于BHI-琼脂培养皿, 厌氧培养24 h, 根据菌落形态用API20strep试剂盒行生化鉴定; 细菌学及生化鉴定样本中细菌为饥饿期的粪肠球菌无污染, 即刻进行下一步实验。

实验分组及根管冲洗: 将45个成功建模的标本随机分为3组, 每组15个标本。根管预备时每更换一次器械分别采用3种冲洗剂进行根管冲洗。使用5 mL注射器针管和1 mL侧向开口的注射器针头, 冲洗时将注射器针头沿根管侧壁滑入根管深部, 达工作长度后后退2 mm, 以无阻力、不嵌塞、回流通畅为准, 并不时上下、左右移动针头, 各组4 mL冲洗液匀速缓慢冲洗, 速度为4 mL/min。

根管预备中各组使用的根管冲洗剂:

组别	样本量	方法
A	15	样品A [#] , 即醋酸氯己定纳米银乙醇溶液
B	15	样品B [#] , 即三氯生纳米银乙醇溶液
C	15	2.5%次氯酸钠

感染模型的取样及细菌培养计数:

第1次取样(N1): 根管冲洗前用30[#]无菌纸尖按照工作长度插入根管中停留1 min, 吸取根管内液, 立即放入装有1 mL生理盐水的Eppendorf管中混匀, 分别接种于BHI血琼脂平皿上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 CO_2 孵育箱中培养, 48 h后计数菌落数记为N1。

第2次取样(N2): Protaper手动锉逐步后退法按照工作长度WL预备根管至F3号锉即根尖段达到30号, 每更换一次器械时分别以各组液进行根管冲洗。2 mL无菌生理盐水冲洗根管后立即用30[#]无菌纸尖按照根管长度插入根管中停留1 min, 吸取根管内液培养计数记为N2。

细菌菌落计数: 取Eppendorf管中液体0.5 mL, 于无菌BHI液体培养基中10倍系列稀释, 接种于盛有BHI固体培养基的平皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养48 h之后计数菌落形成单位CFU^[8]。

细菌复苏实验: 第2次取样后, 在根管内分别插入4根饱含BHI液体培养基的纸尖, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 CO_2 孵育箱中培养72 h后, 夹出纸尖放入BHI液体培养基中, 继续培养48 h, 肉眼见培养基变浑浊并根据菌落形态、革兰染色实验确定是否有其他微生物感染。

主要观察指标: 含醋酸氯己定或三氯生纳米银根管冲洗剂对饥饿期粪肠球菌离体根管感染模型的抗菌效果。

统计学分析: 细菌计数结果(CFU/mL)加1后做对数转换, 即 $\lg(\text{CFU}/\text{mL}+1)$ 。比较各组根管内粪肠球菌在根管预备冲洗前后菌落形成单位CFU下降情况。利用SPSS 18.0软件对数据采用t 检验进行统计学分析, 检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 绘制粪肠球菌生长曲线, 确立饥饿期 见图1, 表1。

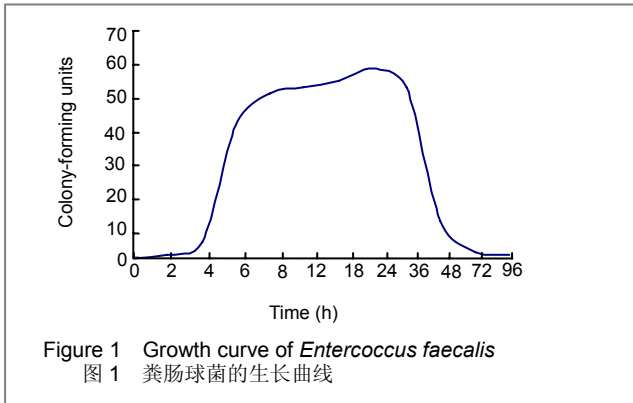


表1 粪肠球菌的生长曲线分期
Table 1 Growth curve staging of *Enterococcus faecalis*

Staging	Time (h)	Identification
Lag phase	0-2	No changes
Log phase	2-6	Increased significantly
Stationary phase	6-36	Maintaining a certain level
Death phase	36-72	Decreasing
Starvation phase	72-	Decreasing to a stable level

2.2 菌落培养计数结果 见图2, 表2。

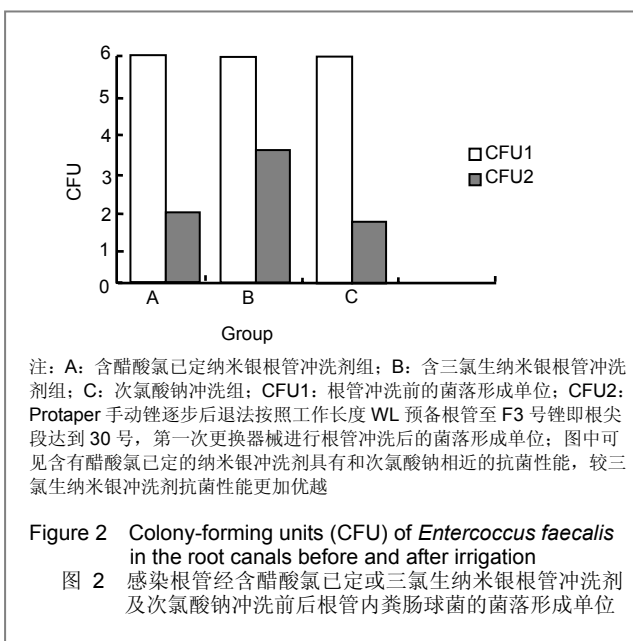


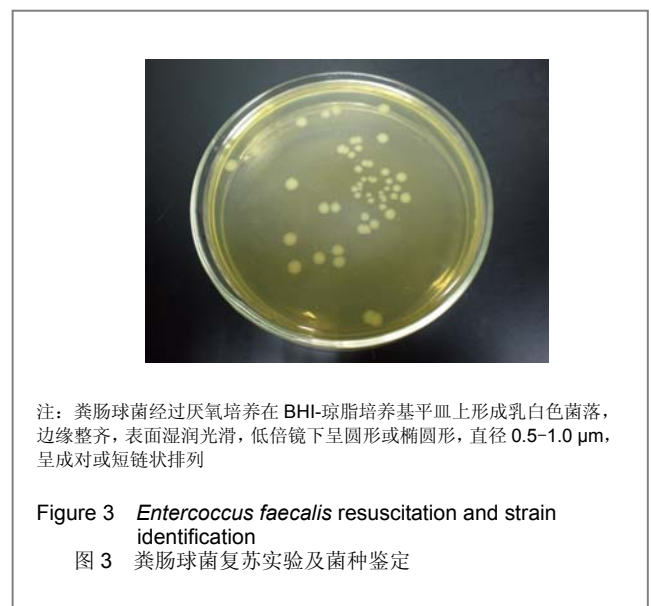
表2 感染根管经含醋酸氯己定或三氯生纳米银根管冲洗剂及次氯酸钠冲洗前后根管内粪肠球菌数量变化
Table 2 Colony-forming units (CFU) of *Enterococcus faecalis* in the root canals before and after irrigation [x±s, lg(CFU/mL+1)]

Group	n	Colony counting		ΔCFU(CFU1- CFU2)
		CFU1	CFU2	
A	15	5.31±0.57	1.65±0.25 ^{ab}	3.66±0.41
B	15	5.30±0.38	3.12±0.35 ^a	2.18±0.24
C	15	5.32±0.27	1.45±0.17 ^{ab}	3.87±0.15

注: A: 含醋酸氯己定纳米银根管冲洗剂组; B: 含三氯生纳米银根管冲洗剂组; C: 次氯酸钠冲洗组; CFU1: 根管冲洗前的菌落形成单位; CFU2: Protaper 手动锉逐步后退法按照工作长度 WL 预备根管至 F3 号锉即根尖段达到 30 号, 第一次更换器械进行根管冲洗后的菌落形成单位; 与 CFU1 比较, ^a $P < 0.01$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$; 表明含有醋酸氯己定的纳米银冲洗剂具有和次氯酸钠相近的抗菌性能, 较三氯生纳米银冲洗剂抗菌性能更加优越

3组冲洗前菌落形成单位CFU相近, 均为5.30左右, 无明显差异; 3组冲洗后菌落形成单位CFU均明显低于冲洗前($P < 0.01$); 含三氯生纳米银根管冲洗剂组冲洗后菌落形成单位CFU为3.12左右, 明显高于含醋酸氯己定纳米银根管冲洗剂组及次氯酸钠组菌落形成单位CFU。

2.3 粪肠球菌复苏实验及菌种鉴定 所取样本经过厌氧培养在BHI-琼脂培养基皿上形成乳白色菌落, 边缘整齐, 表面湿润光滑, 低倍镜下呈圆形或椭圆形, 直径 0.5 - 1.0 μm, 呈成对或短链状排列, 见图3。



注: 粪肠球菌经过厌氧培养在 BHI-琼脂培养基皿上形成乳白色菌落, 边缘整齐, 表面湿润光滑, 低倍镜下呈圆形或椭圆形, 直径 0.5-1.0 μm, 呈成对或短链状排列

3 讨论

由于根管系统的不规则复杂性及现有治疗方法的

局限性, 牙髓治疗后根管系统内残存的细菌是造成治疗失败的主要原因, 再治疗根管内粪肠球菌的存在与临床症状及体征密切相关^[9]。粪肠球菌作为牙髓治疗后疾病的根管系统内优势菌种, 其检出率高达22%–77%。粪肠球菌在极度缺乏营养的环境中可进入饥饿期、单独形成生物膜、渗透侵入牙本质小管深层, 其对常用根管消毒药物具有一定的耐受能力^[10]。郭惠杰等^[7]通过建立体外粪肠球菌感染根管模型, 观察根管内粪肠球菌的感染状态及其分布特征。研究选择因正畸减数拔除的健康前磨牙10例, 随机分为两组, 将其中5例高压灭菌后分别浸泡于含有1.5 mL无菌脑心浸液培养基和0.1 mL麦氏比浊度为5的粪肠球菌菌液的Eppendorf管中, 于CO₂孵育箱中培养21 d建成体外粪肠球菌根管感染模型, 其余5例则作为对照组; 将所有样本沿牙长轴近远中向劈为两半, 一半作组织学Brown&Brenn染色观察, 另一半置扫描电镜下观察粪肠球菌在根管内的感染状态。组织学结果显示, 在所有研究组样本中, 粪肠球菌均不同程度地侵入牙本质小管中, 测微尺测量深度可达330–1 000 μm。所有对照组样本的根管壁表面干净, 牙本质小管排列有序, 无细菌染色颗粒。扫描电镜结果显示, 在所有研究组样本的根尖1/3段, 粪肠球菌与无定形基质形成典型的生物膜结构, 而在根管的冠1/3和中1/3段, 粪肠球菌则成对或短链状排列在根管壁表面, 呈现浮游状态; 对照组的根管壁表面洁净, 牙本质小管和管间牙本质结构清晰可见, 未见细菌侵入。表明粪肠球菌可单独定植于根管内, 形成生物膜并侵入牙本质小管深部。此模型可用于体外评价各种机械预备和化学消毒药物对根管内感染的清除效果, 从而为临床选择治疗操作提供参考。Distel等^[11]通过扫描电镜发现体外置有氢氧化钙制剂的根管, 160 d后仍可发现粪肠球菌生物膜。

牙髓治疗后, 根管系统内粪肠球菌因缺乏营养物质大量死亡, 部分残余进入饥饿期, 细胞壁糖蛋白和DNA合成基本停滞。特定情况下根尖周组织液自根尖区通道渗入根管为粪肠球菌提供了营养, 细菌恢复活性、增殖进而导致病变。研究表明粪肠球菌在根管内多以稳定的生物膜形式存在, 其产生多聚糖覆盖于菌体表面, 形成一个微生态系统。生物膜为细菌提供了一个安全稳定的生存环境, 有助于抵抗外界环境压力, 从而增强了其对抗菌剂的抵抗力, 因此现有抗菌措施难以取得理想根管消毒效果^[10]。在缺乏营养的环境中, 饥饿状态下的粪肠球菌可生存4个月, 甚至更长。若饥饿初始时细菌的量较大, 细菌生存的时间将会更长。由此可见, 临床中虽然难以彻底灭菌, 在牙髓治疗过程中尽可能的清除细菌

对预后有着非常重要的意义^[6,10]。本实验选用粪肠球菌作为感染细菌, 是由于粪肠球菌被认为是牙髓治疗后疾病的主要致病菌, 因此建立饥饿期粪肠球菌根管感染模型旨在模拟牙髓治疗后疾病的机制, 实验结果具有一定的可参考性。

次氯酸钠因其具有较强的抗菌能力、组织溶解能力、良好的生物相容性等优势而成为目前临床上使用最广泛的冲洗剂长达70余年^[12]。程凡^[13]研究不同浓度次氯酸钠溶液在根管治疗中作用。实验选入80个研究对象, 随机分为4组: A、B、C和D组, 对每组行根管预处理后, 依次按1.0%、1.5%、2.0%和2.5%的次氯酸钠浓度冲洗, 冲洗时间为1 min。以疼痛作为安全性判断标准, 而以复诊率作为疗效的判断标准, 相对应的时间点依次是24 h和1年, 然后行统计学分析。结果显示在以疼痛分级为标准的基础上, 4个浓度组之间差异无显著性意义($P=0.651$); 而以复诊作为疗效观察时, 2.0%和2.5%浓度的次氯酸钠疗效优于1.0%和1.5%浓度的次氯酸钠疗效, 且差异有显著性意义($P=0.003$), 而且2.0%和2.5%浓度的次氯酸钠两组之间在治疗效果上差异无显著性意义($P=0.063$)。表明2.0%浓度的次氯酸钠溶液在根管治疗中具有很好的安全性和较好的疗效。杨秋菊等^[14]探讨了次氯酸钠作为根管冲洗剂的临床效果分析。实验选择100颗单根管慢性根尖周炎患牙, 随机分为药物治疗组50颗, 以NACLO和生理盐水做根管冲洗; 对照组50颗, 以H₂O₂和生理盐水做根管冲洗, 术后0.5, 1, 2年复查。结果显示, 药物治疗组效果明显优于对照组($P < 0.05$), 表明次氯酸钠是根管冲洗的理想药物。0.5%–6.0%次氯酸钠与17%EDTA的配合是最为经典的配伍。研究显示次氯酸钠对粪肠球菌生物膜具有极强的杀灭作用^[8]。李新军等^[15]检测中药茶多酚、MTAD、52.5 g/L次氯酸钠抑制根管壁粪肠球菌生物膜的能力, 并分析中药茶多酚作为根管冲洗液的可行性。实验采用微孔板滴定法检测茶多酚, MTAD和52.5 g/L次氯酸钠液对粪肠球菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度, 采用琼脂扩散实验检测3种抗菌剂对粪肠球菌的抑菌圈。通过建立粪肠球菌感染根管3周和6周的模型, 分别用茶多酚、MTAD和52.5 g/L次氯酸钠液对粪肠球菌感染后的根管进行处理, 然后对根管壁生物膜中的细菌生存情况进行定性定量分析, 比较这3种根管冲洗液抗粪肠球菌生物膜的能力。最小抑菌浓度、最小杀菌浓度和琼脂扩散实验结果显示: 3组冲洗剂对粪肠球菌均有抑制作用; 在粪肠球菌感染根管3周的生物膜中, MTAD和次氯酸钠液可以完全抑制粪肠球菌生物膜, 茶多酚处理后虽仍有粪

肠球菌生长, 但明显低于生理盐水处理组的细菌生存数, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。在粪肠球菌感染根管6周的生物膜中, 次氯酸钠液可以完全抑制细菌生长, 茶多酚和MTAD作用后仍有活菌生长, 但与生理盐水对照组相比, 细菌生存数均显示了8个log值的下降, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。研究表明52.5 g/L次氯酸钠液具有很强的抑制根管内粪肠球菌生物膜作用, 而茶多酚和MTAD也具有一定的抑制粪肠球菌生物膜的能力。林南雁等^[16]观察了0.5%次氯酸钠根管冲洗剂用于慢性根尖周炎患牙根管治疗的临床疗效。研究选择100例单根管慢性根尖周病患牙, 随机分为两组: 实验组50例, 用0.5%次氯酸钠做根管冲洗消毒; 对照组50例, 用3%过氧化氢做根管冲洗消毒; 观察术后6个月的临床及X射线片表现, 并分析对比两者的临床疗效。结果显示, 0.5%次氯酸钠根管冲洗组治疗有效率为56.5%明显高于3%过氧化氢根管冲洗组的44.4%($P < 0.05$), 表明0.5%次氯酸钠根管冲洗剂是较为有效的根管冲洗剂。

此外, 次氯酸钠对病原体有直接的杀灭作用, 并且能降低内毒素活性。有实验研究复方次氯酸钠消毒剂对医院口腔器械消毒的效果, 实验采用口腔器械模拟现场消毒试验方法对污染乙型肝炎表面抗原的灭活效果进行观察, 结果显示, 用含有效氯500 mg/L以上复方次氯酸钠消毒液浸泡作用10 min, 对污染到口腔器械表面的乙型肝炎表面抗原灭活率达到100%; 含有效氯1 000 mg/L的复方次氯酸钠消毒液连续浸泡常用口腔器械10 d未见明显腐蚀。结果表明复方次氯酸钠消毒剂对污染到口腔器械上的乙型肝炎表面抗原具有快速的灭活效果, 并且对器械基本无腐蚀。由于本实验旨在研究两种纳米银冲洗剂的抗菌性能, 因此延续前期实验的设计使用2.5%次氯酸钠作为对照, 并未研究其对玷污层的作用, 所以未加入EDTA, 后续研究可以探索两种纳米银冲洗剂对玷污层的作用。

纳米银原子排列为介于固体和分子之间的“介态”, 其尺寸介于原子簇和宏观微粒之间, 微粒比表面积非常大, 显示出明显的表面效应、小尺寸效应和宏观隧道效应。根据Yong-Laplace方程, 随着表面积的增加, 银的离解程度增加, 溶液中的银离子浓度递增, 从而提高其生物化学活性, 这种活性极强的纳米银微粒具备超强的抗菌能力^[9,17]。纳米银微小的体积使其具有极大的比表面积, 从而存在更多的活性银原子, 其抗菌基质与银离子相似, 但有效杀菌浓度却明显低于金属银或者其他形态的银制剂^[18]。纳米银的杀菌机制主要有损伤细菌DNA、中断细胞信号转导、活性氧自由基的氧化损伤、

菌体内内容物泄漏、脱氢酶失活^[19]。代小英等^[20]采用悬液定量杀灭实验证明纳米银水溶液可有效杀灭大肠杆菌和金黄色葡萄球菌及大肠杆菌噬菌体MS2, T4。

由于合成方法不同, 纳米银具有多种微观形态, 如球形、棒形、立方体、三角形、五角形等, 微粒直径均小于100 nm。Pal等^[21]研究了不同形状纳米银对大肠杆菌的抗菌性能。结果显示, 三角形纳米银在银含量为0.01 mg/L时表现出了明显的细菌抑制作用, 而圆形纳米银的细菌抑制最小浓度为0.125 mg/L, 杆状纳米银最小抑菌浓度介于0.5–1 mg/L之间。该研究结果表明, 纳米银的抗菌性能具有形状依赖性。应用原子分辨率的高角环形暗场显像技术对不同尺寸纳米银的抗菌性进行分析, 结果显示微粒直径小于5 nm的纳米银表现出了更好的抗菌性能, 表明纳米银的抗菌性能具有尺寸依赖性^[22]。本实验所用的纳米银制剂是通过液相化学还原法, 利用在分散剂聚乙烯醇400和聚乙烯醇2000水溶液的保护下, 硝酸银在葡萄糖溶液中还原得到的, 其形状为球形, 直径为5–20 nm, 前期研究中已表明其具有一定的抗菌性能^[15]。作者前期研究比较两种药物对饥饿期粪肠球菌24 h生物膜的作用效果^[23]。方法为: 培养饥饿期粪肠球菌24 h生物膜, 试液A、试液B以及对对照组2.5%次氯酸钠分别作用生物膜3, 9, 30 min, 活菌菌落计数法计算药物作用前后生物膜中活菌菌落数, 观察药物作用效果。结果显示, 试液A组在各作用时间点活菌菌落数差异均有显著性意义($P < 0.05$), 试液B组除了在3 min与30 min间活菌菌落数差异有显著性意义($P < 0.05$)外, 其余时间点差异无显著性意义($P > 0.05$), 2.5%次氯酸钠组在3 min与9 min间活菌菌落数差异有显著性意义($P < 0.05$), 9 min与30 min间活菌菌落数差异无显著性意义($P > 0.05$); 在同一时间点, 试液A组与2.5%次氯酸钠组活菌菌落数差异无显著性意义($P > 0.05$), 而与试液B组差异有显著性意义($P < 0.05$)。表明实验组及对照组药物都有一定的杀菌作用, 杀菌效果: 试液A与2.5%次氯酸钠效果相当, 均明显优于试液B, 但在作用时间内均不能完全杀灭生物膜中的粪肠球菌。

纳米银颗粒自身的粒径、形状、浓度和表面修饰物等均能影响纳米银和菌体的接触及侵入, 造成不同的杀伤作用。革兰阳性菌的细胞壁主要由肽聚糖构成, 线性的肽聚糖由小肽连接成相互交联的网状立体结构, 比阴性菌的厚(20–80 nm)且更致密, 纳米银不但难以锚定在其上面, 而且难以穿过细胞壁。庄沛林等^[24]利用MBECTMP&G Assay建立粪肠球菌感染模型, 以连续稀释法检测纳米银、载银纳米二氧化钛、掺氮纳米二氧

化钛的最小抑菌浓度MIC和最小生物膜清除浓度MBEC。纳米银对粪肠球菌的MIC和MBEC分别为62.5 mg/L和13.13 g/L。表明纳米银对粪肠球菌有较强抗菌作用,能清除粪肠球菌生物膜。本实验中纳米银冲洗剂表现出一定的抗菌性能,但未能彻底清除粪肠球菌,仍有残余,可能主要由于粪肠球菌为革兰阳性菌,表面携带正电荷的纳米银微粒对其表面黏附结合能力不足,所以难以得到彻底的杀菌效果。如果可以改善纳米银的表面结合黏附能力或者配伍使用强效抗革兰阳性菌的杀菌剂,理论上可以得到更好的杀菌效果。

醋酸氯己定由于其具有较强的抗菌性能及较低的毒性,近年来被发展成为新的根管冲洗材料。国内有研究比较不同冲洗液联合应用去除根管玷污层的效果,实验将40颗离体单根管牙截冠后随机分为5组,采用冠向下法进行根管预备,预备中分别以不同根管冲洗液进行根管冲洗。A组: 20 g/L醋酸氯己定(CHX)溶液; B组: 25 g/L次氯酸钠(NaOCl)溶液; C组: 20 g/LCHX溶液+乙二胺四乙酸(EDTA)凝胶; D组: 25 g/LNaOCl溶液+EDTA凝胶; E组(对照组): 蒸馏水。然后将牙体沿颊舌向纵劈,扫描电镜观察各组样本在根中1/3玷污层和牙本质碎屑的去除情况,统计学分析比较各组根管清洁的差异。结果显示, A、B、C和D组与E组比较差别有显著性意义($P < 0.05$), B、D组对玷污层的去除和牙本质小管开放程度与A、C组比较差别有显著性意义($P < 0.05$); 两两比较得出C组优于A组($P < 0.05$), B、D两组差别无显著性意义($P > 0.05$)。结果表明CHX、NaOCl单独或联合EDTA凝胶均可去除玷污层, NaOCl+EDTA凝胶组的冲洗效果最好,单独使用CHX清洁效果不佳,与EDTA凝胶配合使用去除玷污层的能力有提高。Schäfer等^[25]建立粪肠球菌体外根管感染模型,将醋酸氯己定、氢氧化钙凝胶分别导入根管内,根管预备后检测根管壁牙本质,醋酸氯己定组较氢氧化钙组具有更加优越的抗菌性能。醋酸氯己定是本实验样本A主要成分之一,结果显示含有醋酸氯己定的纳米银根管冲洗剂具有和2.5%次氯酸钠类似的抗菌能力。

Fine等^[26]通过临床试验证明三氯生可明显减少口腔中的微生物。细菌学检测证实口腔内厌氧菌群在刷牙后6h降低88%, 12 h后降低96%。本实验中,含有三氯生的样本B与含有醋酸氯己定的样本A均具有一定的抗菌能力,但样本A明显优于样本B。在其他材料与方法完全相同的前提下,样本A、B之间的主要差异由其中的抗菌成分醋酸氯己定和三氯生导致的,由此可见本实验中醋酸氯己定较三氯生具有更加优越的抗

菌性能。三氯生的理化特性决定其较难溶于水而易于溶解于碱性及有机溶剂,实验中样本B接触水溶液后见到少量白色絮状沉淀,所以冲洗时针对粪肠球菌的有效抗菌成分较理论值低,并且沉淀物进一步形成屏障阻止了活性结构域纳米银与粪肠球菌细胞接触,因此本实验B组抗菌效果不理想。后续研究中如有方法解决三氯生在水溶液中溶解性问题可能得到更加理想的抗菌效果。

实验证实含有醋酸氯己定的纳米银冲洗剂具有和次氯酸钠相近的抗菌性能,较三氯生纳米银冲洗剂抗菌性能更加优越,结果与前期研究两种纳米银冲洗剂对24 h饥饿期粪肠球菌生物膜作用的结果相符。

致谢: 感谢中山大学附属第三医院口腔科牙体牙髓科在实验中给予的支持。感谢中山大学光华口腔研究所对实验的支持。

4 参考文献

- [1] Friedman S. Management of post-treatment endodontic disease: a current concept of case selection. *Aust Endod J*. 2000;26(3):104-109.
- [2] Qiu GY. *Zhongguo Yiyao Zhinan*. 2012;10(12):498-499. 邱国英. 微波联合纳米银抗菌凝胶治疗宫颈糜烂的效果评价[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(12):498-499.
- [3] Li MC, Ma SD, Cao EH, et al. *Zhongguo Yaofang*. 2012;23(21):1947-1948. 李明春, 马守栋, 曹恩惠, 等. 纳米银溶液及其凝胶的体外抗菌作用研究[J]. *中国药房*, 2012, 23(21): 1947-1948.
- [4] Zhuang PL. *Zhongshan Daxue*. 2010. 庄沛林. 纳米银对粪肠球菌抗菌作用的实验研究[D]. 中山大学, 2010.
- [5] Shu D. *Yiyao Luntan Zazhi*. 2012;33(1): 78-79. 舒东. 手术切口应用纳米银抗菌敷料的意义及机理探讨[J]. *医药论坛杂志*, 2012, 33(1): 78-79.
- [6] Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(4):234-239.
- [7] Guo HJ, Yue L. *Beijing Daxue Xuebao*. 2009;41(6):699-701. 郭惠杰, 岳林. 粪肠球菌在根管内定植模式的体外研究[J]. *北京大学学报*, 2009, 41(6):699-701.
- [8] Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus Faecalis*. *J Endod*. 2010;36(8):1389-1393.
- [9] Richards RM. Antibacterial action of silver nitrate. *Microbios*. 1981;31(124):83-91.
- [10] Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JA, et al. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. *J Appl Oral Sci*. 2009;17(2):87-91.
- [11] Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*. 2002;28(10):689-693.
- [12] Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, et al. Comparative evaluation of endodontic irrigations against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*. 2006;32(6):527-531.

- [13] Cheng F.Zhongguo Shiyong Yiyao. 2012;7(18):157-158.
程凡. 不同浓度的次氯酸钠冲洗液在根管治疗中疗效的观察[J]. 中国实用医药, 2012, 7 (18): 157-158.
- [14] Yang QJ, Xie M. Zhongguo Yiyao Kexue. 2011; 1(16): 187.
杨秋菊, 解鸣. 次氯酸钠根管冲洗临床效果分析[J]. 中国医药科学, 2011, 1(16): 187.
- [15] Li XJ, Guo XL, Sun YM, et al. Yati Yasui Yazhoubingxue Zazhi. 2011; 21(11): 632-635.
李新军, 郭晓丽, 孙应明, 等. 茶多酚.MTAD和次氯酸钠液抑制粪肠球菌及其生物膜的作用比较[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2011, 21(11): 632-635.
- [16] Lin NY, Jin JQ. Zhongguo Linchuang Baojian Zazhi. 2011; 14(3): 232-234.
林南雁, 金建秋. 次氯酸钠根管冲洗的临床疗效观察[J]. 中国临床保健杂志, 2011, 14(3): 232-234.
- [17] Kaur P, Vadehra DV. Effect of certain chelating agents on the antibacterial action of silver nitrate. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1988; 32(3): 299-306.
- [18] Kong H, Jangq J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. Langmuir. 2008; 24(5): 2051-2056.
- [19] Wei H, Qu F, Xu HY, et al. Shipin Kexue. 2010; 31(17): 420-424.
魏华, 曲锋, 许恒毅, 等. 纳米银杀菌机理的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 420-424.
- [20] Dai XY, Xu X, Chen ZB, et al. Zhongguo Xiaoduxue Zazhi. 2008; 25(3): 242-244.
代小英, 许欣, 陈昭斌, 等. 纳米银水溶液对噬菌体和细菌杀灭效果的观察[J]. 中国消毒学杂志, 2008, 25(3): 242-244.
- [21] Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(6): 1712-1720.
- [22] Lok CN, Ho CM, Chen R, et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. J Proteome Res. 2006; 5(4): 916-924.
- [23] Chen JH, Li L, Wang P, et al. Linchuang Yixue Gongcheng. 2011; 18(11): 1694-1696.
陈建洪, 李玲, 王萍, 等. 两种药物对饥饿期粪肠球菌生物膜药敏作用的实验性研究[J]. 临床医学工程, 2011, 18(11): 1694-1696.
- [24] Zhuang PL, Gao Y, Ling JQ, et al. Yati Yasui Yazhoubingxue Zazhi. 2011; 21(12): 694-697.
庄沛林, 高燕, 凌均荣, 等. 三种无机纳米抗菌剂对粪肠球菌的抗菌作用[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2011, 21(12): 694-697.
- [25] Schäfer E, Bössmann K. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Two Calcium Hydroxide Formulations Against Enterococcus faecalis. 2005; 31(1): 53-56.
- [26] Fine DH, Furgang D, Markowitz K, et al. The antimicrobial effect of a triclosan/copolymer dentifrice on oral microorganisms in vivo. J Am Dent Assoc. 2006; 137(10): 1406-1413.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 广东省自然科学基金委员会项目 (9151008901000074)。

作者贡献: 陈建洪进行实验设计, 实验实施为彭萌、文韵笙, 实验评估为唐倩, 资料收集为王萍, 彭萌成文, 王萍审校, 陈建洪对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验涉及采集正畸减数离体牙, 供者对实验的工作知情理解。

文章概要:

文章要点: 含醋酸氯己定或三氯生纳米银根管冲洗剂及次氯酸钠均具有一定的抗菌性能。含醋酸氯己定纳米银根管冲洗剂与次氯酸钠抗菌性能相近。含醋酸氯己定纳米银根管冲洗剂较含三氯生纳米银根管冲洗剂具有更强的抗菌效果。

关键信息: 实验建立了饥饿期粪肠球菌离体根管感染模型, 并对两种新型的纳米根管冲洗剂的抗菌性能进行了检测。

研究的创新之处与不足: 将饥饿期的粪肠球菌导入离体牙根管, 建立了感染模型, 模拟了牙髓治疗后疾病的致病机制, 对临床具有一定的指导意义。纳米银根管冲洗剂作为新型的牙髓治疗药物具有良好的抗菌性, 可能成为未来牙髓治疗的重要材料。两种纳米银根管冲洗剂的生物相容性尚不明确, 仍需进一步的深入研究。三氯生的溶解度限制了其抗菌性, 后续将研究其溶解性。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。