

次氯酸钠溶液对不同时期粪肠球菌生物膜的药物治疗作用

王珊珊¹, 董明², 王丽娜¹, 牛卫东¹(¹大连医科大学口腔医学院, 辽宁省大连市 116000; ²大连医科大学中山学院, 辽宁省大连市 116000)

文章亮点:

与以往研究不同, 本实验在体外建立对数期、稳定期、饥饿期粪肠球菌生物膜模型, 以共聚焦显微镜为观察手段, 用不同浓度次氯酸钠溶液对其作用, 探索饥饿期粪肠球菌生物膜的耐药性。发现在相同药物浓度、相同作用时间内, 饥饿期粪肠球菌生物膜较对数期、稳定期粪肠球菌生物膜对次氯酸钠溶液更具耐药性; 在相同作用时间内, 5.25%次氯酸钠溶液对饥饿期粪肠球菌生物膜的杀菌效果最佳。

关键词:

生物材料; 口腔生物材料; 次氯酸钠溶液; 粪肠球菌; 生物膜; 饥饿期; 国家自然科学基金

主题词:

次氯酸钠; 肠球菌; 粪; 生物膜

基金资助:

国家自然科学基金项目(81171538)

摘要

背景: 有研究指出粪肠球菌能在营养物质缺乏、抗菌药存在的恶劣环境中生存, 形成再感染而影响根管再治疗效果。也有实验表明次氯酸钠溶液作为根管冲洗液对残留的粪肠球菌具有很强的清除作用。

目的: 建立不同时期粪肠球菌生物膜, 研究不同浓度次氯酸钠溶液对其的作用效果。

方法: 建立对数期、稳定期、饥饿期粪肠球菌生物膜模型, 以 1%, 2.5%, 5.25%次氯酸钠溶液分别作用于各时期粪肠球菌生物膜表面 30 s、5 min、10 min, 同时用激光共聚焦显微镜观察用药后生物膜情况。

结果与结论: 在相同浓度次氯酸钠溶液作用下, 饥饿期粪肠球菌生物膜中的活菌降低量低于稳定期与对数期粪肠球菌生物膜中的活菌降低量($P < 0.05$); 在 1%次氯酸钠溶液作用下, 稳定期与对数期粪肠球菌生物膜中的活菌降低量差异有显著性意义($P < 0.05$); 在 2.5%, 5.25%次氯酸钠溶液作用下, 稳定期与对数期粪肠球菌生物膜中的活菌降低量差异无显著性意义($P > 0.05$)。在同一时期生物膜模型下, 5.25%次氯酸钠溶液作用下的活菌降低量高于 2.5%、1%次氯酸钠溶液作用下的活菌降低量($P < 0.05$); 2.5%次氯酸钠溶液作用下的活菌降低量高于 1%次氯酸钠溶液作用下的活菌降低量, 但仅在药物作用 30 s 时差异有显著性意义($P < 0.05$)。结果表明, 在相同药物浓度、相同作用时间内, 饥饿期粪肠球菌生物膜较对数期、稳定期粪肠球菌生物膜对次氯酸钠溶液更具耐药性; 在相同作用时间内, 5.25%次氯酸钠溶液对饥饿期粪肠球菌生物膜的杀菌效果最佳。

王珊珊, 董明, 王丽娜, 牛卫东. 次氯酸钠溶液对不同时期粪肠球菌生物膜的药物治疗作用[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(52):8509-8514.

Antibacterial effect of sodium hypochlorite on *in vitro* biofilm formation of *Enterococcus faecalis* in different phases

Wang Shan-shan¹, Dong Ming², Wang Li-na¹, Niu Wei-dong¹(¹College of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China; ²Zhongshan College of Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have reported *Enterococcus faecalis* can exist in environment which is lack of nutrients and antimicrobials to cause re-infection of the root canal. Sodium hypochlorite solution is shown to have strong scavenging action as a root canal flushing fluid to eliminate residual *Enterococcus faecalis*.

OBJECTIVE: To explore the antibacterial effect of sodium hypochlorite on *in vitro* biofilm formation of *Enterococcus faecalis* in different phases

METHODS: Biofilm models of *Enterococcus faecalis* were established at exponential phase, stationary phase and starvation phase, and then the biofilms were exposed to various concentrations of sodium hypochlorite solutions (1.0%, 2.5%, 5.25%). The contact time was 30 seconds, 5 minutes and 10 minutes. The direct optical observation of *Enterococcus faecalis* was conducted under confocal laser scanning microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: In the same concentration of sodium hypochlorite solutions, the biofilms of starved cells were more resistant to sodium hypochlorite than those formed in the exponential phase and stationary phase ($P < 0.05$). When the concentration of sodium hypochlorite was 1%, the reduction of viable cells showed significant difference between the exponential phase and stationary phase ($P < 0.05$). When the concentration of sodium hypochlorite was 2.5% and 5.25%, the reduction of viable cells in the exponential phase and stationary phase had no statistical difference ($P > 0.05$). For the biofilms at the same phase, 5.25% sodium

王珊珊, 女, 1985年生, 吉林省长春市人, 汉族, 大连医科大学口腔医学院毕业, 硕士。

通讯作者, 牛卫东, 博士, 大连医科大学口腔医学院, 辽宁省大连市 116000

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.52.026
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)52-08509-06

稿件接受:2014-11-16

Wang Shan-shan, Master, College of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Corresponding author: Niu Wei-dong, M.D., College of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Accepted: 2014-11-16

hypochlorite reduced more viable cells than 2.5% and 1% sodium hypochlorite ($P < 0.05$), and 2.5% sodium hypochlorite also could reduce more viable cells than 1% sodium hypochlorite, but it only exhibited a significant difference when the contact time was 30 seconds ($P < 0.05$). These results show that under the same concentration and same contact time, the *Enterococcus faecalis* biofilms at the starvation phase are more resistant to sodium hypochlorite than those at the exponential phase and stationary phase. Under the same contact time, 5.25% sodium hypochlorite exhibits the best antibacterial effect on the *Enterococcus faecalis* biofilms at the starvation phase.

Subject headings: sodium hypochlorite; *Enterococcus faecalis*; biofilms

Funding: the National Natural Science Foundation of China. No. 81171538

Wang SS, Dong M, Wang LN, Niu WD. Antibacterial Effect of sodium hypochlorite on in vitro biofilm formation of *Enterococcus faecalis* in different phases. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(52):8509-8514.

0 引言 Introduction

根管内残留细菌为根管治疗失败的主要原因^[1]。通过PCR检测法,在对临床上再治疗根管的研究中发现,粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*)的检出率达39.26%^[2],而在根充完善仍有持续根尖损害的根管中,该细菌的感染率为24%–77%^[3]。粪肠球菌往往是以细菌生物膜的形式存在于患牙根管中,细菌附着于物体表面,由细菌胞体及其分泌的胞外多糖等基质组成^[4],作为细菌感染机制的主要存在形式,生物膜状态下的细菌对巨噬细胞和抗生素的耐受水平较游离状态提高 10^3 倍以上^[5]。粪肠球菌顽固的耐药性和适应新环境的能力,能够帮助粪肠球菌在根管治疗后恶劣条件的患牙中存活^[6-7],故生物膜的形成是细菌对环境耐受水平和致病性的重要表现,是细菌的一种适应性反应机制,这使得临床医生往往难以通过传统的机械方法、化学方法将其彻底清除,是根管治疗后仍存在持续性感染及根管治疗失败的重要原因^[8-10]。

次氯酸钠作为一种有机溶剂,能够有效溶解有活力或无活力的牙髓组织及根管表面的玷污层,干扰细胞新陈代谢,导致细菌死亡^[11-12]。提高浓度和延长作用时间,可以提高次氯酸钠的组织溶解性^[13],研究证实2.5%次氯酸钠溶液溶解牙髓的时间明显短于1%次氯酸钠溶液^[14]。次氯酸钠的氯化作用和强氧化作用是其发挥抗菌作用的基础。

与此同时,作为一种高效快速的广谱抗菌剂,不同浓度的次氯酸钠溶液能有效抑制金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌及白色念珠菌等细菌的生长^[15]。有学者采用5.25%次氯酸钠单独或辅以根管预备冲洗根管后即刻取样,未检测到粪肠球菌,但在根管中加入脑心浸液培养基培养3 d发现粪肠球菌生长^[16]。这可能是由于次氯酸钠的表面张力,限制了其在根管系统狭窄部位特别是牙本质小管的扩散和清理能力。白色念珠菌作为感染根管的检出菌,在根尖周疾病的形成中同样发挥着重要作用。有研究表明,次氯酸钠能够抑制白假丝酵母菌的生长,1%, 2.5%和5.25%次氯酸钠均能抑制白色念珠菌生长,但使用以上3种浓度次氯酸钠后仍然能在根管中检测到白色念珠菌的代谢活性^[17]。Sen等^[18]发现5%次氯酸钠具有较好抑制真菌的能力,但降到2.5%时其抗真菌效果显著下降。然而作为临床上传统的冲洗剂,大量的体外研究表明次氯酸钠能够有效抑

制并杀灭粪肠球菌^[19-21]。李慧等^[22]以不同pH值次氯酸钠作用于粪肠球菌,发现pH值为6的次氯酸钠溶液其对粪肠球菌的抑制效果最佳。李新军等^[23]在试验中发现5.25%次氯酸钠溶液具有很强抑制根管内粪肠球菌生物膜的作用。Liu等^[24]通过扫描电镜观察发现,饥饿期粪肠球菌生物膜可以有效帮助其抵御次氯酸钠溶液的药物作用,随着药物作用时间的延长,杀菌效果更好,但仍然没能完全杀死生物膜表面的细菌。

Isabelle等^[25]在研究中发现,粪肠球菌的生长可分为3个生理阶段:对数期、稳定期、饥饿期,饥饿期细菌可以长时间保持活性,并且在营养缺乏的饥饿环境下,可以在牙本质小管中存活并形成生物膜^[26]。因此,本实验的目的是研究不同浓度次氯酸钠溶液对对数期、稳定期、饥饿期粪肠球菌生物膜的药物作用,探索饥饿期这一特殊状态下粪肠球菌生物膜的药物敏感性,为临床根管治疗时彻底清除根管内感染提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 对比观察实验。

时间及地点: 于2010年6月至2011年2月在大连医科大学口腔医学院完成。

材料: 粪肠球菌标准株ATCC29212(广东省微生物菌种保藏中心),由四川大学华西口腔医学院重点实验室微生物室馈赠。

实验材料及耗材: 麦氏比浊管(温州市泰康生物科技有限公司); 24孔、96孔组织培养板(Corning Incorporated, 美国); 胰蛋白胍大豆肉汤培养液(Tryptic Soy Broth, TSB)(北京陆桥技术有限责任公司); 按说明配置,将30 g TSB溶于1 L蒸馏水中,高压灭菌(121 °C 20 min),4 °C保存备用; MTT溶液(GIBCO公司, 美国): 称取MTT 0.05 g,溶于100 mL无菌PBS中,用0.22 μm滤膜过滤,4 °C冰箱避光保存,2周内用完; 二甲基亚砷(GIBCO公司, 美国); 荧光染色剂L-7012 LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit(美国Molecular Probes公司)。

实验设备: 高速低温离心机(Thermo, 美国); 数字可调微量移液器(大龙医疗设备上海有限公司); Multiskan MK3全自动酶标仪(北京平利洋医疗设备有限公司); 激光

共聚焦显微镜(Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM)(NiKou Ti-C1, 日本)。

实验方法:

标准株活化及菌液的制备: 将标准株50 μL 涂布在BA琼脂培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h, 挑取菌落于BA琼脂培养基上分离、纯化, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养24 h, 选取单克隆菌落于5 mL TSB中37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养18 h后, 收集菌液5 000 r/min离心5 min, PBS洗菌2次, 洗后的细菌重新加入PBS中, 调整菌密度至0.5麦氏比浊标准。实验中测得10–24 h为粪肠球菌孵育生长的稳定期, 细菌密度活性最佳, 因此选取在此时间内的18 h作为菌液配置用菌。

粪肠球菌生长曲线的测定: 将制备好的菌液500 μL 加入50 mL TSB中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 分别在不同时间后收集菌液1 mL, 5 000 r/min离心5 min, 弃上清, 1 mL PBS吹打至液体混匀, 取100 μL 含有粪肠球菌的PBS于96孔板中, 同时加入20 μL MTT/孔, 每组3个平行孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h后加入100 μL /孔二甲基亚砷, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min后, 492 nm酶标仪下读数。

不同时期粪肠球菌生物膜模型建立及次氯酸钠溶液对不同时期粪肠球菌生物膜的药物作用: 将粪肠球菌置于TSB培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养10, 48 h后, 5 000 r/min离心5 min, 收集菌液, 消毒备用。以0 h新鲜配制的TSB液体培养液、10 h和48 h回收的TSB液体培养液分别作为对数期、稳定期、饥饿期生物膜模型的培养液。收集对数期、稳定期、饥饿期菌液, 调整菌密度至0.5麦氏比浊标准。将菌液与培养液按1:1比例加入24孔板内, 每组3个平行孔。置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养, 24 h更换1次培养液, 连续培养48 h, 肉眼可见板底有灰白色膜形成。

PBS轻柔冲洗孔板2次, 以去除悬浮的未黏附细菌, 随后以1%, 2.5%, 5.25%次氯酸钠溶液分别作用于各时期粪肠球菌生物膜表面30 s、5 min、10 min, 0.6%硫代硫酸钠溶液终止药物作用, 半胱氨酸蛋白胨溶液作用生物膜表面1 min。生物膜样本通过刮除和大力吹打获得, 将生物膜样本10倍连续稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养48 h后, 测定每平方米培养板上活菌数, 以对数值表示($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$), 比较用药前后生物膜的活菌数, 检测其用药后活菌降低量。将上述用药后样本以2%戊二醛溶液固定10 min, PBS漂洗3次, 1 min/次, 生物膜表面滴加100 μL 荧光染料, 暗室温下孵育15 min, PBS冲洗3次, 2 min/次, 以去掉多余染液, 随后进行CLSM观察, 以上操作均在暗室内进行。

主要观察指标: 不同时期粪肠球菌生物膜用药后的膜性结构; 不同时期粪肠球菌生物膜用药后其表面残留活菌量的密度。

统计学分析: 活菌降低量用多因素方差分析法进行统计分析。以SPSS 11.5统计软件进行数据处理, 计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 总体均数之间比较采用多因素方差分析(ANOVA); 然后采用LSD法和S-N-K法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异

有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 粪肠球菌生长曲线图 图1所示: 0–8 h, 细菌大量繁殖快速增长, 为对数期; 8–24 h, 细菌活性达到高水平后并保持相对稳定状态, 为稳定期; 48 h后, 细菌开始大量死亡, 细菌活性降低, 但并没有完全死亡, 而是在缺乏营养的环境中保持相应活性, 为饥饿期。

2.2 次氯酸钠溶液对不同时期粪肠球菌生物膜的药物结果 统计分析表明, 各时期粪肠球菌生物膜在次氯酸钠溶液用药实验中, 数据符合正态分布, 相同作用时间内不同生理时期粪肠球菌生物膜对不同浓度次氯酸钠药物敏感性差异有显著性意义($P < 0.05$)。

药物作用30 s(表1): ①组间比较: 在1%次氯酸钠作用下, 对数期与稳定期活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 对数期、稳定期与饥饿期活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 在2.5%次氯酸钠作用下, 对数期与稳定期活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 对数期、稳定期与饥饿期活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 在5.25%次氯酸钠作用下, 对数期与稳定期活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 对数期、稳定期与饥饿期活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。②组内比较: 对数期组中, 1%与2.5%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 1%、2.5%与5.25%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。稳定期组中, 1%与2.5%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 1%、2.5%与5.25%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。饥饿期组中, 1%与2.5%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 1%、2.5%与5.25%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

药物作用5 min(表2): ①组间比较: 在1%次氯酸钠作用下, 对数期与稳定期活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 对数期、稳定期与饥饿期活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 在2.5%次氯酸钠作用下, 对数期与稳定期活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 对数期、稳定期与饥饿期活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 在5.25%次氯酸钠作用下, 对数期与稳定期活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 对数期、稳定期与饥饿期活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。②组内比较: 对数期组中, 1%与2.5%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 1%、2.5%与5.25%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。稳定期组中, 1%与2.5%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 1%、2.5%与5.25%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异有显著性

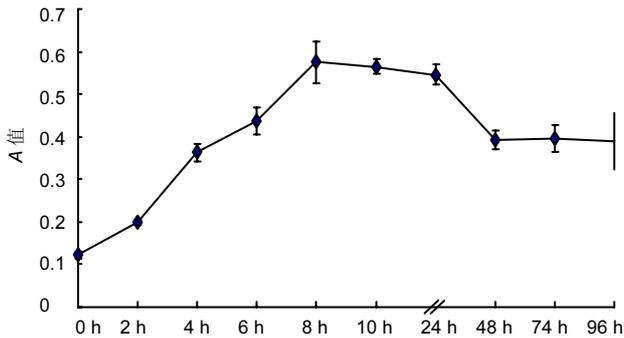


图1 粪肠球菌生长曲线

Figure 1 The grown curve of *Enterococcus faecalis*

表2 次氯酸钠溶液作用于各时期粪肠球菌生物膜 5 min 后的活菌降低量比较

Table 2 Effect of different concentrations of sodium hypochlorite on viable cell reduction in *Enterococcus faecalis* biofilms at different phases when the contact time was 5 minutes

次氯酸钠浓度	对数期	稳定期	饥饿期
1%	3.77±0.21 ^{ab}	3.84±0.46 ^{ab}	3.38±0.25 ^b
2.5%	3.95±0.28 ^{ab}	4.03±0.22 ^{ab}	3.49±0.28 ^b
5.25%	4.33±0.23 ^a	4.16±0.15 ^a	3.65±0.31

表注: 与饥饿期粪肠球菌生物膜比较, ^a $P < 0.05$; 与 5.25%次氯酸钠比较, ^b $P < 0.05$ 。

表1 不同浓度次氯酸钠溶液作用于各时期粪肠球菌生物膜 30 s 后的活菌降低量比较

Table 1 Effect of different concentrations of sodium hypochlorite on viable cell reduction in *Enterococcus faecalis* biofilms at different phases when the contact time was 30 seconds

次氯酸钠浓度	对数期	稳定期	饥饿期
1%	3.24±0.36 ^{ab}	3.49±0.18 ^{ab}	2.76±0.38 ^b
2.5%	3.80±0.27 ^{ab}	3.75±0.18 ^{ab}	3.12±0.38 ^b
5.25%	4.14±0.19 ^a	4.20±0.28 ^a	3.31±0.36

表注: 与饥饿期粪肠球菌生物膜比较, ^a $P < 0.05$; 与 5.25%次氯酸钠比较, ^b $P < 0.05$ 。

表3 次氯酸钠溶液作用于各时期粪肠球菌生物膜 10 min 后的活菌降低量比较

Table 3 Effect of different concentrations of sodium hypochlorite on viable cell reduction in *Enterococcus faecalis* biofilms at different phases when the contact time was 10 minutes

次氯酸钠浓度	对数期	稳定期	饥饿期
1%	4.10±0.33 ^{ab}	4.03±0.13 ^{ab}	3.66±0.36 ^b
2.5%	4.27±0.53 ^{ab}	4.17±0.17 ^{ab}	3.76±0.30 ^b
5.25%	4.52±0.31 ^a	4.39±0.88 ^{ab}	3.97±0.21

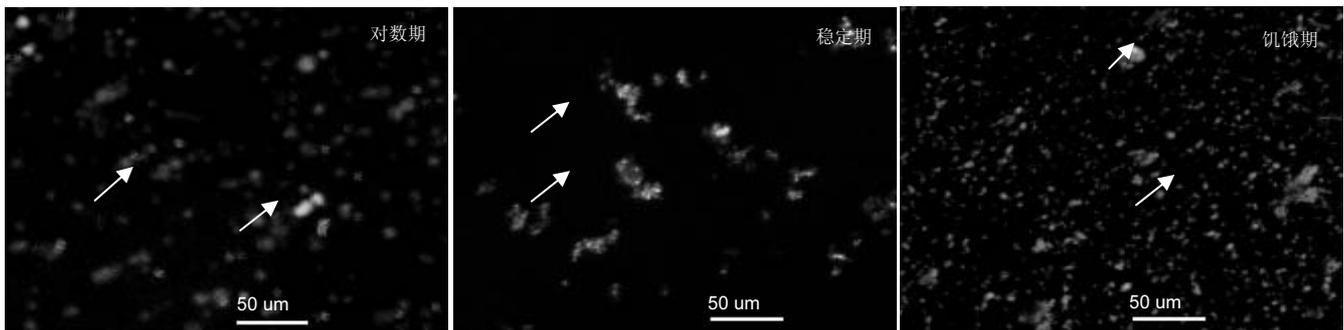
表注: 与饥饿期粪肠球菌生物膜比较, ^a $P < 0.05$; 与 5.25%次氯酸钠比较, ^b $P < 0.05$ 。

图2 不同时期粪肠球菌生物膜经 5.25%次氯酸钠作用后 10 min 后的激光共聚焦显微镜观察 (×200, 543 nm/488 nm)

Figure 2 Confocal microscope observation of *Enterococcus faecalis* biofilms at different phase after 10-minute treatment with 5.25% sodium hypochlorite (×200, 543 nm/488 nm)

图注: 各时期粪肠球菌生物膜表面死亡细菌严重脱膜、解离, 但仍可见部分残存的细菌团块未被完全杀死, 松散的黏附在玻片上(箭头所示), 饥饿期残留活细菌量密度明显较其他两个时期多, 密集。

意义($P < 0.05$)。饥饿期组中, 1%与2.5%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 1%、2.5%与5.25%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

药物作用10 min(表3): ①组间比较: 在1%次氯酸钠作用下, 对数期与稳定期活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 对数期、稳定期与饥饿期活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 在2.5%次氯酸钠作用下, 对数期与稳定期活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 对数期、稳定期与饥饿期活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$); 在5.25%次氯酸钠作用下, 对数期与稳定期活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 对数期、稳定期与饥饿期活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

②组内比较: 对数期组中, 1%与2.5%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 1%、2.5%与5.25%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。稳定期组中, 1%与2.5%次氯酸钠作用下的活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 1%、2.5%与5.25%次氯酸钠药物作用下的活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。饥饿期组中, 1%与2.5%次氯酸钠药物作用下活菌降低量比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 1%、2.5%与5.25%次氯酸钠药物作用下活菌降低量比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.3 不同时期粪肠球菌生物膜药物作用效果观察 药物作用30 s、5 min、10 min后, 3个不同时期粪肠球菌生物膜结构破坏, 失去原有生物膜棉絮状结构特点, 松脱、解

离, 失去生物膜保护后的细菌大量死亡, 但各时期生物膜中仍有细菌存活。在药物实验过程中的数据分析结果中也同样得以证明, 因此选取最大浓度(5.25%次氯酸钠)作用10 min后的生物膜样本进行观察。激光共聚焦显微镜下观察生物膜中的细菌绿色为活细菌, 红色为死细菌, 桔黄色和橙色一般认为是由死菌和活菌重叠造成的。**图1**显示, 次氯酸钠溶液作用10 min后, 发现各时期粪肠球菌生物膜表面死亡细菌严重脱膜、解离, 但仍可见部分残存的细菌团块未被完全杀死, 松散的黏附在玻片上(箭头所示), 饥饿期残留活细菌量密度明显较其他两个时期多, 密集。

3 讨论 Discussion

饥饿期是微生物在体内的常见状态, 根管治疗后根管内残存的药物及营养缺乏等环境, 使根管内残留细菌难以达到对数生长期, 长期以饥饿状态或存活不可培养状态存在。因此, 有学者推论, 根管治疗后再感染多由残存的饥饿期或存活不可培养状态细菌引起^[27]。到目前为止, 虽然粪肠球菌的感染机制尚未完全清楚, 但有研究指出粪肠球菌能在营养物质缺乏、抗菌药存在的恶劣环境中生存, 形成再感染而影响根管再治疗的效果^[28-29]。Giard等^[30-31]在实验中发现, 与对数期细胞相比, 碳水化合物缺乏引起的饥饿, 能诱导粪肠球菌对致死剂量的热、乙醇、过氧化氢、酸及次氯酸钠的耐受性明显增加。研究表明, 粪肠球菌生命力顽强, 可耐受氢氧化钙所致的碱性环境^[32-33], 碱性环境能提高饥饿期粪肠球菌细胞表面的疏水性, 促进细菌对牙本质的初期黏附^[34]。

本实验从粪肠球菌生长曲线中可以看到: 0-8 h培养液中营养物质充足, 保证了其生长所需的营养成分, 细菌活性直线上升呈对数期; 细菌依靠培养液中的营养供应在8-24 h达到巅峰, 细菌活力最强并维持恒定呈稳定期; 然而, 在培养液中营养物质消耗殆尽后, 为保证细菌活性, 粪肠球菌在短时间内大量死亡降低其代谢率, 在缺乏营养供应的条件下, 使细菌活性保持在一个稳定水平上而长时间存活。

菌落计数法, 多年来一直是首选的分析方法, 并被认为是分析细菌活性的金标准。然而目前检测生物膜中细菌活性的常用方法有培养法和荧光染色法, 该技术已被广泛应用。CLSM 是近年发展起来的用于组织形态学研究的一项新技术, 可在不破坏生物膜完整结构及其成分之间关系的前提下, 直接、完整、实时地研究菌斑生物膜的结构^[35]。根据其染色不同, 在荧光显微镜下或共聚焦下分辨活菌量, 更适合于分析生物膜特性, 增强了结果的客观性和准确性。有学者对变异链球菌生物膜的共聚焦观察发现, 生物膜具有一定厚度和三维立体空间结构, 其结果形态具有多样性、不均质和开放性的特点^[36], 而在用药过程中发现其具有很强的耐药性, 有存活的细菌黏附在玻片表面^[37]。

与以往研究不同, 本实验在体外建立对数期、稳定期、饥饿期粪肠球菌生物膜模型, 以共聚焦显微镜为观察手段, 用不同浓度次氯酸钠溶液对其作用, 探索饥饿期粪肠球菌

生物膜的药物敏感性。许多实验表明次氯酸钠溶液作为根管冲洗液时, 残留的粪肠球菌显著降低, 这表明粪肠球菌对次氯酸钠很敏感。本实验中次氯酸钠溶液作用后, 各时期粪肠球菌生物膜中的活菌降低量低于稳定期, 也低于对数期。各时期粪肠球菌生物膜在药物作用30 s时, 1%、2.5%次氯酸钠溶液间具有统计学意义, 而在药物作用5, 10 min时, 两者间无统计学意义, 这可能是由于2.5%次氯酸钠溶液在短时间能够很好地利用浓度优势杀灭生物膜表层黏附的细菌。然而, 由于生物膜稳定的三维结构而成为抗菌药物穿透被膜的屏障, 使得长时间作用下的次氯酸钠溶液难以渗透生物膜杀灭深层细菌。在饥饿期的比较中发现, 5.25%次氯酸钠对饥饿期粪肠球菌生物膜作用10 min的杀菌效果最佳, 但并不能完全杀死生物膜内的细菌, 表现出对次氯酸钠溶液的耐受性, 这可能是由于饥饿期粪肠球菌生物膜在营养缺乏的环境中生存, 处于极低的代谢状态, 细菌生长速度较其他两个时期更为缓慢, 类似于静止细菌, 从而降低了饥饿期粪肠球菌生物膜对抗菌剂的敏感性。从共聚焦图片中可以看到, 实验中粪肠球菌生物膜在抗菌剂作用后未能将生物膜中的细菌全部杀死, 生物膜中细菌密度迅速减小, 生物膜变得很薄, 对整体结构造成了严重破坏, 用药后饥饿期粪肠球菌生物膜细菌密度比其他两个时期要高。这一结果与之前学者利用菌落计数法所测结果相同, 饥饿期粪肠球菌生物膜药物敏感性低, 对次氯酸钠表现出了极强的耐药性^[24]。

Vianna等^[15]研究证实0.5%、1.0%、2.5%、4.0%及5.25%的次氯酸钠对粪肠球菌都有效, 但是达到相同抑菌效果所需的时间不同。有学者观察分别用0.5%、1%、2.5%、5.25%浓度的次氯酸钠消毒液对牙胶尖浸泡消毒, 进行细菌培养, 检验消毒效果发现, 5.25%浓度浸泡1 min细菌培养均呈阴性, 其他浓度下均要10 min, 再次提示次氯酸钠的抗菌性与其浓度密切相关。目前临床中次氯酸钠的常用浓度为0.5%-5.25%, 因此在临床根管消毒中, 针对饥饿期粪肠球菌生物膜, 在做好防护工作条件下, 应该增大药物浓度, 以达到良好消毒作用。相信随着对根管内粪肠球菌感染机制和耐药性的深入探索, 可使粪肠球菌感染得到良好控制, 从根本上解决问题, 提高根管治疗成功率。

致谢: 感谢大连医科大学口腔医院各位同仁的帮助。

作者贡献: 实验设计为第一作者, 实施为全部作者, 实验收集及整理为第二作者, 评估为第四作者, 资料收集、成文为第一作者, 第四作者(通讯作者)审校并对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 次氯酸钠-作为一种有机溶剂, 能够有效溶解有活力或无活力的牙髓组织及根管表面的玷污层, 干扰细胞新陈代谢, 导致细菌死亡。提高浓度和延长作用时间, 可以提高次氯酸钠的组织溶解性, 研究证实2.5%次氯酸钠溶液溶解牙髓的时间明显短于1%次氯酸钠溶液。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001;34(1):1-10.
- [2] Niu WD, Wang LN, Dong M. Relationship of Biofilm Formation and gelE Gene Expression in *Enterococcus faecalis* Recovered from Root Canals in Patients Requiring Endodontic Retreatment. *J Endod.* 2011;37(5):631-636.
- [3] 李海燕, 徐学良. 粪肠球菌感染牙根管的研究新进展[J]. 广东牙病防治, 2008, 16(z1):661-663.
- [4] 郑建博, 王丽娜, 宋其义等. 再治疗根管粪肠球菌生物膜形成与临床表现相关性分析[J]. 华西口腔医学杂志, 2012, 30(1):65-72.
- [5] Sundqvist G, Figdor D, Persson S, et al. Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(1):86-93.
- [6] Hancock HH, Sigurdsson AD, Trope MB, et al. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(5):579-586.
- [7] Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002;28(10):689-693.
- [8] Molander A, Reit C, Dahlé NG, et al. Microbiological status of root - filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998;31(1):1-7.
- [9] Hancock HH, Sigurdsson AD, Trope MB, et al. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(5):579-586.
- [10] Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod.* 2006;102(2):247-253.
- [11] Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue Dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod.* 2004;30(11):785-787.
- [12] Okino LA, Siqueira EL, Santos M, et al. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J.* 2004;37(1):38-41.
- [13] 喻学洲, 周永庆, 郭利民. 四种浓度次氯酸钠溶液溶解牙髓的实验研究[J]. 现代口腔医学杂志, 2009, 23(5):489-490.
- [14] Irala LE, Grazziotin-Soares R, Salles AA, et al. Dissolution of bovine pulp tissue in solutions consisting of varying NaOCl concentrations and combined with EDTA. *Braz Oral Res.* 2010;24(3):271-276.
- [15] Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(1):79-84.
- [16] 冯朝华, 高学军, 沈嵩. 次氯酸钠对根管内粪肠球菌杀菌效果的体外研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2007, 42(6):355-337.
- [17] 于雅琼, 仇丽鸿. 次氯酸钠用于根管冲洗研究进展[J]. 中国实用口腔科杂志, 2012, 5(8):504-508.
- [18] Sen BH, Akdeniz BG, Denizci AA. The effect of ethylenediaminetetraacetic acid on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;90(5):651-655.
- [19] Dunavant TR, Regan JD. Comparative Evaluation of Endo-dontic Irrigants against *Enterococcus Faecalis* Biofilms. *J Endod.* 2006;32(6):527-531.
- [20] Berber VB, Gomes BP, Sena NT, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J.* 2006;39(1):10-17.
- [21] 张敬之, 史春, 黄林, 等. 次氯酸钠溶液冲洗根管对粪肠球菌的作用研究[J]. 大连医科大学学报, 2008, 30(6):508-509.
- [22] 李慧, 刘漪, 张行炜, 等. 不同pH值次氯酸钠对粪肠球菌抗菌效果的体外研究[J]. 口腔医学研究, 2010, 26(3):323-325.
- [23] 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]. 牙体牙髓牙周学杂志, 2011, 21(11):632-635.
- [24] Liu HY, Wei X, Ling J, et al. Biofilm Formation Capability of *Enterococcus faecalis* Cells in Starvation Phase and Its Susceptibility to Sodium Hypochlorite. *J Endod.* 2010; 36(4):36:630-635.
- [25] Isabelle P. The Susceptibility of Starved, Stationary Phase, and Growing Cells of *Enterococcus faecalis* to Endodontic Medicaments. *J Endod.* 2005;31(5):380-386.
- [26] George S, Kishen A, Song KP. The Role of Environmental Changes on Monospecies Biofilm Formation on Root Canal Wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2005;31(12):867-872.
- [27] Kishen A, George S, Kumar R, et al. *Enterococcus faecalis*-mediated biomaterialized biofilm formation on root canal. *J Biomed Mater Res A.* 2006;77(2):406-415.
- [28] 张静兰. 根管充填后粪肠球菌再感染的研究[J]. 国外医学: 口腔医学分册, 2006, 33(3):177-179.
- [29] 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.
- [30] Giard JC, Hartks A, Flahaut S, et al. Starvation-induced multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH222. *Curr Microbiol.* 1996;32(5):264-271.
- [31] Laplace JM, Thuault M, Hartke A, et al. Sodium hypochlorite stress in *Enterococcus faecalis*: influence of antecedent growth conditions and induced proteins. *Curr Microbiol.* 1997;34(5):284-289.
- [32] Mafu AA, Plumety C, Deschenes L, et al. Adhesion of pathogenic bacteria to food contact surfaces: influence of pH of culture. *Int J Microbiol.* 2011;2011:972494.
- [33] Miñana M, Carnes D, Walker WA III, et al. pH changes at the surface of root dentin after intracanal dressing with calcium oxide and calcium hydroxide. *J Endod.* 2001; 27(1):43-5.
- [34] 卢婷, 徐琼. 碱性环境对饥饿期粪肠球菌疏水性的影响[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(5):681-684.
- [35] Pamp SJ, Sternberg C, Tolker-Nielsen T. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry A.* 2009;75(2):90-103.
- [36] 唐子圣, 朱敏, 刘正. 变异链球菌生物膜结果观察[J]. 中华微生物学和免疫学, 2004, 24(2):103-106.
- [37] 唐子圣, 朱敏, 刘正. 变异链球菌生物膜对抗菌剂敏感性的研究[J]. 中华口腔医学, 2006, 42(5):266-268.