

[文章编号 1000-1182(2005)06-0522-02]

# 纳米复合材料 nHA-PA66 对感染根管细菌的体外抑菌作用

叶 玲<sup>1</sup>, 苏 勤<sup>1</sup>, 周学东<sup>1</sup>, 肖晓蓉<sup>2</sup>

(1. 四川大学华西口腔医院 牙体牙髓病科; 2. 口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的 研究纳米复合材料 nHA-PA66 对感染根管优势菌的体外抑菌效果。方法 采用琼脂扩散法研究 nHA-PA66 对牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌和中间普氏菌的抑菌效果, 以所形成的抑菌环直径为评价指标。结果 nHA-PA66 粉剂对牙龈卟啉单胞菌和中间普氏菌有较好的抑菌效果, 聚合后膜片抑菌效果较粉剂差, 两者对具核梭杆菌无抑菌作用。结论 nHA-PA66 对感染根管细菌的抑菌效果不够理想, 用作根充材料还需辅以抗菌性能好的其他物质。

**[关键词]** 抗菌性; nHA-PA66; 优势菌; 感染根管

**[中图分类号]** R 780.2 **[文献标识码]** A

**Antibacterial Effect of nHA-PA66 in vitro** YE Ling<sup>1</sup>, SU Qin<sup>1</sup>, ZHOU Xue-dong<sup>1</sup>, XIAO Xiao-rong<sup>2</sup>. (1. Dept. of Conservative Dentistry, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the antibacterial activity of nHA-PA66 on the predominant bacteria of infected root canal in vitro. **Methods** Agar diffusion method was the testing method. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Fusobacteria nucleatum* (*F. nucleatum*) and *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) were the tested bacteria. The powder and polymerized film of nHA-PA66 were the test materials while the CCQ and filter paper as the control. **Results** nHA-PA66 s powder showed good antibacterial effect on the *P. gingivalis* and *P. intermedia*, its film was weaker. Both of them had no effect on *F. nucleatum*. **Conclusion** nHA-PA66 s antibacterial effect was not ideal, for better clinical results, some additives can be included.

**[Key words]** antibacterial activity; nHA-PA66; predominant bacterial; infected root canal

根管治疗是目前治疗牙髓炎和根尖周病最有效的方法之一,其治疗的质量直接影响患牙的功能及保持。由于根管系统的复杂性使根管即便经过有效的机械预备及根管内封药也不能达到完全的无菌状态。目前认为根管治疗失败的微生物因素主要有两点:根管预备及消毒不彻底,根管内隐蔽部位及牙本质小管中有残余的细菌;根管充填后冠方或根方微渗漏渗入的细菌<sup>1,2</sup>。具有抗菌作用的根充材料能减轻第一种来源的感染,对第二种来源的感染也有对抗作用,因此除生物相容性及生物活性外,良好的抗菌性是理想的根充材料应具有的性能之一<sup>3</sup>。由四川大学纳米材料研究中心承担国家“863”项目研制的纳米复合材料 nHA-PA66,由纳米羟磷灰石和聚酰胺 66 组成,该材料具有与人牙、骨相似的晶体结构和力学性能<sup>4</sup>。前期研究证明其具有良好的生物相容性和生

物活性,并具有用于根管充填的基本理化性能,此外还具有骨传导性和诱导活性<sup>5</sup>。本实验将此纳米材料引入牙髓治疗领域,希望开发出能更好满足根管治疗要求的充填材料,开拓其用于牙髓治疗的新前景。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验细菌

牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) ATCC 33277、具核梭杆菌 (*Fusobacteria nucleatum*, *F. nucleatum*) ATCC 25586、中间普氏菌 (*Prevotella intermedia*, *P. intermedia*) ATCC 25611 均由口腔生物医学工程教育部重点实验室微生物室提供。经镜检和生化鉴定为纯培养,传代后使用。

### 1.2 主要试剂及仪器

nHA-PA66 由四川大学纳米生物材料研究中心提供,分为粉、液两组分,使用时按 1:1.5 调和至糊状。根管充填糊剂 CCQ(四川晨光化工研究所),其粉剂由氢氧化钙、氧化锌等组成;液剂为愈创木酚甲醛树脂,使用时按粉液比 2:1 调和至糊状。BHI 培养基及其

[收稿日期 2005-06-12; 修回日期 2005-10-16]

[基金项目] 四川省科委科技攻关资助项目 (02SC022-001)

[作者简介] 叶 玲 (1975-), 女, 重庆人, 讲师, 博士

[通讯作者] 苏 勤, Tel: 028-85501439

他试剂为国产分析纯,光学显微镜(Olympus公司,日本),超净工作台(江苏净化设备厂)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 nHA-PA66膜片的制备 将nHA-PA66按比例调和后,在特定的容器里压制成0.5 mm厚的膜片,待其聚合完成固化后,用直径为5 mm的打孔器制成相同大小的圆片,消毒后备用。

1.3.2 抑菌实验 按麦氏比浊法将 *P. gingivalis*、*F. nucleatum*和 *P. intermedius* 分别制备成含量为  $9 \times 10^6$  CFU/ml 的菌悬液,接种于新鲜的 BHI 培养基上。用消毒后的打孔器(直径为5 mm)在培养基上打孔,将CCQ、nHA-PA66粉剂与蒸馏水按说明调成糊状,分别以消毒后的接种环放入孔内,每种材料复做7孔。此外,在已接种细菌未打孔的培养基上,放置预制的nHA-PA66膜片,每种细菌复做7例,以浸有蒸馏水的同样大小的滤纸片为对照。

将培养皿置厌氧箱内, $N_2$   $H_2$   $CO_2$  为80 10 10条件下,37℃培养72 h,观察细菌生长情况,以游标卡尺测量抑菌环大小,抑菌范围的直径减去孔直径或膜片直径(5 mm)为抑菌环的直径,根据抑菌环的大小判断材料的抑菌效能。

### 1.4 统计分析

实验数据进行单因素方差分析和多个样本均数之间的多重比较。

## 2 结果

*P. gingivalis* 和 *P. intermedius* 对 nHA-PA66 膜片的反应相似,膜片周围出现抑菌环,前者为  $(4.3 \pm 1.2)$  mm,后者为  $(3.6 \pm 1.4)$  mm,说明聚合一段时间后的材料本身对这两种细菌有一定程度的抑菌作用,但小于 nHA-PA66 粉剂组和 CCQ 组 ( $P < 0.05$ )。 *P. gingivalis* 和 *P. intermedius* 在 nHA-PA66 粉剂组的抑菌环直径分别为  $(84.6 \pm 0.8)$  mm 和  $(84.7 \pm 1.5)$  mm,在 CCQ 组的抑菌环直径分别为  $(84.2 \pm 1.4)$  mm 和  $(83.5 \pm 1.2)$  mm。 *F. nucleatum* 在 nHA-PA66 粉剂和膜片中均未出现抑菌环,在 CCQ 组的抑菌环直径为  $(9.8 \pm 0.6)$  mm,说明 nHA-PA66 本身具有较强的抑制 *P. gingivalis* 和 *P. intermedius* 生长的能力,其聚合后的膜片对这两种细菌的抑制作用减弱;但对 *F. nucleatum* 的生长无抑制作用,而 CCQ 对 3 种细菌均有较强的杀灭作用。

## 3 讨论

根充材料的抗菌性是影响根管充填质量的重要因素,现代根管预备技术及根管消毒药物对根管系统的清理能力有限,尚不足以达到根管系统内完全无菌

的状态,应用具有抗菌性的根充材料无疑可提高根管治疗的成功率<sup>6</sup>。

感染根管内 90 % 以上为专性厌氧菌,本实验选用常见的感染根管优势菌 *P. gingivalis*、*F. nucleatum* 和 *P. intermedius* 作为实验菌株<sup>7</sup>,初步研究 nHA-PA66 的体外抗菌性。本实验采用经典的药物敏感实验方法琼脂扩散法对材料进行初筛,直接观察与材料直接接触的细菌的生长情况。虽然其结果受到实验材料分子大小、细菌与材料接触程度等因素的影响,其结果的判读也不够精确,但作为筛选性实验简捷方便,仍具有可行性<sup>8</sup>。

因为 nHA-PA66 由纳米羟磷灰石与聚酰胺 66 复合而成,其液剂部分含有乙醇<sup>4</sup>,而后者对培养基有非特异性的溶解作用,会影响对抑菌环的判读,所以本实验部分琼脂扩散法采用 nHA-PA66 粉剂与蒸馏水混合,用于检测 nHA-PA66 粉剂部分的体外抑菌作用。新鲜混合的 nHA-PA66 粉剂可与周围的细菌直接接触,且材料中的溶出部分可通过经培养基的扩散而发生作用。本实验结果显示平皿上 *P. gingivalis* 和 *P. intermedius* 几乎没有生长,说明 nHA-PA66 粉剂对二者具有较好的抗菌能力;而 *F. nucleatum* 生长未受影响,说明 nHA-PA66 粉剂本身对其无抑制作用。本实验的另一部分是利用聚合完全完成的 nHA-PA66 膜片作为实验对象,观察材料聚合完成后的抑菌性能,结果表明 nHA-PA66 膜片对 *P. gingivalis* 和 *P. intermedius* 有一定的抑制能力,但弱于 nHA-PA66 粉剂 ( $P < 0.05$ ),对 *F. nucleatum* 无作用。nHA-PA66 的抗菌性可能与其成分中的某些物质或降解反应有关,但具体机制尚待进一步研究确认。聚合后的材料膜片由于 nHA-PA66 粉剂与液剂发生相互作用,其抗菌性反而减弱,则可能与材料组分在聚合过程中的变化有关,还需要进一步的研究。不同材料组分及形式对不同细菌具有不同的抑制能力,这可能与不同细菌对抗菌物质的敏感性、细菌生长的要求不同相关。CCQ 是一类含有氢氧化钙、氧化锌、愈创木酚甲醛树脂的根管充填材料,它的抗菌性来源于其中的氢氧化钙和酚醛树脂,氢氧化钙的抗菌性是由于其具有强碱性<sup>9</sup>,酚醛也具有抑菌性,因此它表现出较强的抑菌力,且由于氢氧化钙的存在在孔隙周围出现了轻微的溶血环。

本实验结果显示 nHA-PA66 对 *P. gingivalis* 和 *P. intermedius* 有较好的抗菌性,而对 *F. nucleatum* 无抑制作用。由于本实验中聚合 24h 后的材料膜片的抑菌性减弱,表明该材料在聚合初期具有较理想的抗菌性,但随着聚合的完成逐渐减弱,这在根管充填中

(下转第 533 页)

- (Chen FM. Development of carriers and sustained release system of growth factors J . Foreign Medical Science Stomatology , 2005 ,32 (1) :44-46. )
- 3 ] Holland TA , Tessmar JK , Tabata Y , et al . Transforming growth factor-beta1 release from oligo (poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels in conditions that model the cartilage wound healing environment J . J Control Release , 2004 ,94 (1) :101-114.
- 4 ] 陈发明,吴织芬,金 岩,等.重组人骨形态发生蛋白-2 缓释微球对成骨细胞的作用 J . 中华实验外科杂志,2005 ,22 (2) :151-153.  
(Chen FM, Wu ZF, Jin Y, et al. Effect of recombinant human morphogenic protein-2 sustained release microspheres on the proliferation and differentiation of osteoblasts J . Chin J Exp Surg , 2005 ,22 (2) :151-153. )
- 5 ] 束 蓉,刘 正,葛琳华,等.猪釉基质蛋白对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖分化的影响 J . 华西口腔医学杂志,2003 ,18 (4) :226-228.  
(Shu R, Liu Z, Ge LH. Influence of porcine enamel matrix protein on MC3T3-E1 osteoblast proliferation and differentiation J . West China J Stomatology , 2003 ,18 (4) :226-228. )
- 6 ] 陈发明,吴织芬,金 岩,等.载 rhBMP<sub>2</sub> 凝胶微球控释系统的设计与合成 J . 实用口腔医学杂志,2005 ,21 (2) :174-177.  
(Chen FM, Wu ZF, Jin Y, et al. Development of a hydrogel microsphere delivery system for rhBMP<sub>2</sub> J . J Pract Stomatol , 2005 ,21 (2) :174-177. )
- 7 ] 董广英,吴织芬,王勤涛,等.胰岛素和转化生长因子- 对人牙周膜细胞碱性磷酸酶活性和总蛋白含量的影响 J . 华西口腔医学杂志,2001 ,19 (3) :146-148.  
(Dong GY, Wu ZF, Wang QT, et al. Effects of insulin and transforming growth factor- on alkaline phosphatase activity and total protein content in human periodontal ligament cells J . West China J Stomatology ,2001 ,19 (3) :146-148. )
- 8 ] Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, et al. Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering: Effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane J . Tissue Eng ,2003 ,9 (2) :153-162.
- 9 ] Park IK, Seo SJ , Akashi M. Controlled release of epidermal growth factor (EGF) from EGF-loaded polymeric nanoparticles composed of polystyrene as core and poly (methacrylic acid) as corona *in vitro* J . Arch Pharm Res ,2003 ,26 (3) :649-652.
- 10 ] Aukunuru JV , Ayalaomayajula SP , Kompella UB. Nanoparticle formulation enhances the delivery and activity of a vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human retinal pigment epithelial cells J . J Pharm Pharmacol ,2003 ,55 (9) :1199-1206.
- 11 ] Franssen O , Vandervennet L , Roders P , et al. Degradable dextran hydrogels: Controlled release of a model protein from cylinders and microspheres J . J Control Release , 1999 ,60 (2) :211-221.
- (本文编辑 汤亚玲)

(上接第 523 页)

可以起到冲击性的抗菌效果,而且由于纳米材料中纳米粒子的特性<sup>10</sup>,它还可被用作根充材料基质,复合以具抗菌力的物质如碘仿等,在保持类似首剂效应的同时获得更持久的抗菌性,从而减少因细菌感染导致的根管治疗失败率。但其他抗菌物质的加入会不会对材料的其他性能造成影响,则需要相关的研究。

#### [参考文献]

- 1 ] Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failures: Why well-treated teeth can fail J . Int Endod J ,2001 ,34 (1) :1-10.
- 2 ] Ray HA , Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of root filling and coronal restoration J . Int Endod J ,1995 ,28 (1) :12-18.
- 3 ] Ørstavik D , Pitt Ford TR. Essential endodontology M . Oxford : Blackwell Science , 1998 :42-67.
- 4 ] 严永刚,李玉宝,汪建新,等.聚酰胺 66/羟基磷灰石复合材料的制备和性能研究 J . 塑料工业,2000 ,28 (3) :38-40.  
(Yan YG, Li YB, Wang JX, et al. Study on preparation and properties of Polyamide 66/ nano-apatite composite J . China Plastics Industry , 2000 ,28 (3) :38-40. )
- 5 ] 王学江,李玉宝.羟基磷灰石纳米针晶与聚酰胺仿生复合生物材料研究 J . 高技术通讯,2001 ,11 (5) :1-5.  
(Wang XJ, Li YB. Study on bionic composite of nano- HA needle-like crystals and polyamide J . High Technology Letters , 2001 ,11 (5) :1-5. )
- 6 ] Kaplan AE , Picca M , Gonzalez MI , et al. Antimicrobial effect of six endodontic sealers :An *in vitro* evaluation J . Endod Dent Traumatol ,1999 ,15 (1) :42-45.
- 7 ] Lai CC , Huang FM , Chan Y , et al. Antibacterial effects of resinous retrograde root filling material J . J Endod ,2003 ,29 (2) :118-120.
- 8 ] Leonardo MR ,de Silva LA ,Tanomaru Filho M , et al. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics J . J Endod ,2000 ,26 (7) :391-394.
- 9 ] Estrela C , Sydney GB , Bammann LL , et al. Mechanism of action of calcium and hydroxylions of calcium hydroxide on tissue and bacteria J . Braz Dent J ,1995 ,6 (2) :85-90.
- 10 ] Kikuchi M , Itoh S , Ichinose S , et al. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized *in vitro* and its biological reaction *in vivo* J . Biomaterials , 2001 ,22 (13) :1705-1711.
- (本文编辑 王 晴)