

[文章编号] 1000-1182(2015)06-0565-05

· 基础研究 ·

含长链烷基季铵盐纳米抗菌无机填料的 复合树脂对人牙菌斑生物膜的影响

吴峻岭¹ 张强² 孙睿男¹ 朱婷¹ 葛建华³ 周传健³

1.山东大学口腔医院口腔修复科; 山东省口腔组织再生重点实验室, 济南 250012;

2.济南市口腔医院口腔种植诊疗中心, 济南 250001;

3.山东大学材料科学与工程学院高分子材料研究所, 济南 250061

[摘要] **目的** 合成含长链烷基季铵盐纳米抗菌无机填料的复合树脂, 探讨其对人牙菌斑生物膜的影响。**方法** 制备含长链烷基季铵盐的纳米抗菌二氧化硅填料, 经表面偶联处理后, 分别以0%、5%、10%、15%及20%的质量分数添加到复合树脂中, 以0%组作为对照组, 用三点弯曲试验来检测其力学性能。建立人牙菌斑生物膜体外模型, 通过菌落计数、乳酸代谢分析及活/死细菌染色等手段来评价复合树脂对人牙菌斑生物膜的影响。**结果** 与对照组相比, 当复合树脂纳米抗菌无机填料的质量分数小于15%时, 其力学性能没有明显改变 ($P>0.05$); 当纳米抗菌无机填料的质量分数达到5%及以上时, 复合树脂对人牙菌斑生物膜的代谢产生明显的抑制作用, 显示出良好的抗菌性能 ($P<0.05$)。**结论** 当抗菌无机填料的质量分数达到5%时, 复合树脂具有较强的抗菌防龋功能。

[关键词] 季铵盐; 牙菌斑生物膜; 无机填料; 复合树脂; 抗菌性

[中图分类号] R 783.1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2015.06.003

Dental plaque microcosm biofilm behavior on a resin composite incorporated with nano-antibacterial inorganic filler containing long-chain alkyl quaternary ammonium salt Wu Junling¹, Zhang Qiang², Sun Ruinan¹, Zhu Ting¹, Ge Jianhua³, Zhou Chuanjian³. (1. Dept. of Prosthodontics, School of Stomatology, Shandong University; Shandong Provincial Key Laboratory of Oral Tissue Regeneration, Jinan 250012, China; 2. Oral Implantology Center, Jinan Stomatological Hospital, Jinan 250001, China; 3. Research Institute of Polymer Materials, School of Materials Science and Engineering, Shandong University, Jinan 250061, China)

[Abstract] **Objective** To develop a resin composite incorporated with nano-antibacterial inorganic filler containing long-chain alkyl quaternary ammonium salt, and to measure its effect on human dental plaque microcosm biofilm. **Methods** A novel nano-antibacterial inorganic filler containing long-chain alkyl quaternary ammonium salt was synthesized according to methods introduced in previous research. Samples of the novel nano-antibacterial inorganic fillers were modified by a coupling agent and then added into resin composite at 0%, 5%, 10%, 15% or 20% mass fractions; 0% composite was used as control. A flexural test was used to measure resin composite mechanical properties. Results showed that a dental plaque microcosm biofilm model with human saliva as inoculum was formed. Colony-forming unit (CFU) counts, lactic acid production, and live/dead assay of biofilm on the resin composite were calculated to test the effect of the resin composite on human dental plaque microcosm biofilm. **Results** The incorporation of nano-antibacterial inorganic fillers with as much as 15% concentration into the resin composite showed no adverse effect on the mechanical properties of the resin composite ($P>0.05$). Resin composite containing 5% or more nano-antibacterial inorganic fillers significantly inhibited the metabolic activity of dental plaque microcosm biofilm, suggesting its strong antibacterial potency ($P<0.05$). **Conclusion** This novel resin composite exhibited a strong antibacterial property upon the addition of up to 5% nano-antibacterial inorganic fillers, thereby

leading to effective caries inhibition in dental application.

[Key words] quaternary ammonium salt; dental plaque microcosm biofilm; inorganic filler; resin composite; antibacterial property

[收稿日期] 2015-03-15; **[修回日期]** 2015-07-12

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2014HM073)

[作者简介] 吴峻岭, 副主任医师, 博士, E-mail: doctorwujunling@163.com

[通信作者] 周传健, 教授, 博士, E-mail: zhouchuanjian@sdu.edu.cn

复合树脂应用广泛但其表面容易聚集微生物,易造成充填修复后患牙的继发龋。如何赋予复合树脂材料抗菌防龋性能是当前的研究热点^[1]。为此,本课题组在总结国内外相关研究的基础上,设计出通过共价键将碘代季铵盐类广谱抗菌化合物接枝到二氧化硅填料表面,再添加到口腔复合树脂中,从而赋予复合树脂持久的抗菌性能的方案。前期研究^[2]探讨了采用碘代短链烷基季铵盐修饰纳米二氧化硅颗粒的方法及其抗菌性能,而后又设计并制备了抗菌效果更佳的碘代长链烷基季铵盐修饰的纳米二氧化硅颗粒,经偶联处理后,很好地解决了纳米颗粒与树脂基质间表面与界面相互作用的问题,从而制备得到抗菌效果持久、结合牢固的非溶出性新型抗菌树脂^[3-4]。本课题组在前期工作的基础上,将这种新型纳米抗菌无机填料添加到口腔复合树脂中,制备出抗菌复合树脂,探讨其力学性能和对人牙菌斑生物膜微生态的影响,为其临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料及设备

M5型纳米二氧化硅(纯度99.99%,平均粒径20 nm,美国Cabot公司);二甲基十八烷基[3-(三甲氧基硅基)丙基]氯化铵(广州爱谱化工有限公司), γ -甲基丙烯酰氧丙基三甲氧基硅烷(γ -methacryloxy propyl trimethoxyl silane, γ -MPS)(成都晨邦化工有限公司),双酚-A-二甲基丙烯酸缩水甘油酯(bisphenol glycidyl dimethacrylate, Bis-GMA)、三乙二醇二甲基丙烯酸酯(triethylene glycol dimethacrylate, TEGDMA)、樟脑醌(camphorquinone, CQ)、4-二甲基氨基苯甲酸乙酯(ethyl 4-N,N-dimethylaminobenzoate, 4E)均为美国Sigma-Aldrich公司产品;经过偶联处理的商品化无机填料(主体成分是铝硅酸钡颗粒,平均粒径2 μ m,美国Dentsply公司)。TE2000-S型荧光显微镜(Nikon公司,日本);5500R型万能力学实验机(Cary公司,美国);SpectraMax M5型分光光度计(Molecular Devices公司,美国)。

1.2 含碘代长链烷基季铵盐的纳米抗菌无机填料的制备及其表面偶联化处理

具体制备方法及反应机制详见参考文献[3],简要过程如下:首先将二甲基十八烷基[3-(三甲氧基硅基)丙基]氯化铵与碘化钾按照浓度比1:1.1的比例反应,生成碘代长链烷基季铵盐-二甲基十八烷基[3-(三甲氧基硅基)丙基]碘化铵;而后将二甲基十八烷基[3-(三甲氧基硅基)丙基]碘化铵与纳米二氧化硅

按照1 mol:60 g的比例反应生成碘代季铵盐修饰的纳米二氧化硅颗粒;最后,偶联剂 γ -MPS与纳米抗菌填料按照质量比1:50的比例反应后,得到本实验所用的表面偶联化处理的碘代长链烷基季铵盐修饰的新型纳米抗菌无机填料。

1.3 新型纳米抗菌复合树脂的合成

树脂基质由Bis-GMA和稀释单体TEGDMA按照质量比1:1构成,其中含有质量分数0.2%的光敏剂CQ和0.8%的促进剂4E。无机填料由平均粒径2 μ m的常规无机填料和平均粒径20 nm的新型纳米抗菌无机填料组成。参照一般商品化复合树脂的组分,本研究的基本配方为质量分数30%树脂基质+70%无机填料。为探讨不同比例的新型纳米抗菌无机填料对复合树脂的影响,在保证30%树脂基质不变的前提下,按照总质量分数的0%、5%、10%、15%和20%的比例添加新型纳米抗菌无机填料,这样对应的常规无机填料占复合树脂总质量分数分别为70%、65%、60%、55%和50%,具体配方详见表1。在避光的条件下,将上述不同比例的各组分混合均匀,手工调拌,最终生成5组树脂(表1);其中0%作为对照组,其余4组作为实验组,分装后备用。

表 1 各组复合树脂的组分

Tab 1 Components of resin composite of all the groups

组别	各组分的质量分数		
	抗菌填料	常规填料	树脂基质
对照组	0	70	30
实验组1	5	65	30
实验组2	10	60	30
实验组3	15	55	30
实验组4	20	50	30

1.4 力学性能检测

采用三点弯曲法检测各组试件的力学性能^[5]。

1.4.1 三点弯曲试件的制备 取特制的内腔尺寸为2 mm×2 mm×25 mm的可分卸金属磨具,腔壁涂分离剂,充填上述复合树脂,充满后上下覆盖聚脂薄膜带,再覆盖玻璃片,压实,光引发使其充分固化,取出试件,用细砂纸轻轻打磨掉飞边,置于37℃蒸馏水浸泡24 h。每组制备10个试件,共5组。

1.4.2 弯曲强度及弹性模量的检测 将待测试件置于万能力学实验机加载平台上,加载直至树脂试件碎裂,加载条件为:跨距10 mm,加载速度1 mm·min⁻¹。试件的弯曲强度 δ (MPa)计算公式为^[5]: $\delta = 3FL / (2BH^2)$, 其中F为树脂试件破坏时的最大载荷(N), L为跨距(mm), B为试件宽度(mm), H为试件高度(mm);试件的弹性模量E (GPa)计

算公式为^[5]: $E = (F/D) [L^3 / (4BH^3)]$, 其中 $F(N)$ 为线弹性区载荷, $D(mm)$ 为线弹性区位移, L 为跨距(mm), B 为试件宽度(mm), H 为试件高度(mm)。

1.5 新型纳米抗菌复合树脂对人牙菌斑生物膜微生态环境的影响

1.5.1 人唾液标本的收集 本实验采用人唾液标本, 收集方法如下: 供者为健康成年人, 无龋病及牙周病病史, 3个月内未服用抗生素, 采集唾液前24 h内禁止刷牙, 采集前2 h禁止饮食, 共收集10名志愿者的唾液。将盛有每人唾液的无菌管放置于冰块中, 收集完毕后将所有志愿者的唾液混匀, 通过消毒的玻璃丝过滤, 加入体积分数30%的甘油, 混合后分装于多个2 mL无菌管中, 储存在-80 °C冰箱中, 用于培养人牙菌斑生物膜。

1.5.2 牙菌斑生物膜树脂试件的制作 取96孔板的上盖, 将复合树脂充满盖内的圆形凹槽, 上覆条状聚脂薄膜带, 轻轻压平, 光固化后小心分离, 生成厚度为0.5 mm、直径为8 mm的圆盘状树脂片, 每组6个试件, 环氧乙烷消毒后备用。

1.5.3 人牙菌斑生物膜的培养 本实验采用一种封闭式体外人牙菌斑生物膜培养模型^[6]。该模型是基于24孔板, 通过48 h的连续厌氧培养而获得成熟稳定的体外人牙菌斑生物膜。生物膜的培养液采用McBain培养液, 具体组分如下: 黏蛋白 $2.5 g \cdot L^{-1}$, 细菌蛋白胨 $2.0 g \cdot L^{-1}$, 胰蛋白胨 $2.0 g \cdot L^{-1}$, 酵母提取物 $1.0 g \cdot L^{-1}$, 氯化钠 $0.35 g \cdot L^{-1}$, 氯化钾 $0.2 g \cdot L^{-1}$, 氯化钙 $0.2 g \cdot L^{-1}$, 半胱氨酸盐 $0.1 g \cdot L^{-1}$, 高铁血红素 $0.001 g \cdot L^{-1}$, 维生素 $K_1 2 \times 10^{-4} g \cdot L^{-1}$; pH值为7.0。唾液与McBain培养液按体积比以1:50的比例均匀混合后作为人牙菌斑生物膜的接种原液。取24孔板, 每孔置入1.5 mL接种原液, 用无菌镊子向每孔中小心放入1个上述各组的复合树脂圆片状试件, 将孔板密封后放入37 °C、5%CO₂培养箱中培养8 h; 然后将试件转移至新的24孔板中, 每孔更换新的1.5 mL McBain培养基(不含唾液), 继续培养16 h, 之后继续将试件转移至新的24孔板, 更换新的1.5 mL McBain培养基(不含唾液)培养24 h, 最终得到培养48 h的人牙菌斑生物膜, 备用。整个培养过程始终保持复合树脂试件菌斑生物膜面朝上。

1.5.4 人牙菌斑生物膜菌落计数 小心取出附着生物膜(培养48 h)的复合树脂圆盘状试件, PBS轻轻漂洗, 去除表面浮游的杂质及细菌, 将每个树脂试件放入盛有2 mL半胱氨酸蛋白胨液(cysteine peptone water, CPW)的消毒玻璃小瓶中, 超声振荡5 min, 收集牙菌斑生物膜。将收集的牙菌斑生物膜溶液震

动混匀后, 梯度稀释接种。选取3种不同的菌落生长培养皿进行抗菌测定: 胰蛋白大豆血琼脂固体培养基(tryptic soy blood agar plate, TSB)进行全菌测定; 含质量分数15%蔗糖的轻型唾液链球菌琼脂固体培养基(mitis salivarius agar, MSA)进行总链球菌测定, 这是因为MSA含有结晶紫、亚碲酸钾和台盼蓝等选择性抑菌剂, 能抑制多数革兰阴性杆菌和除链球菌外的多数革兰阳性菌, 选择性促进链球菌生长; 用含 $0.2 U \cdot mL^{-1}$ 杆菌肽的MSA固体培养基选择性培养变异链球菌以进行变异链球菌测定。不同组别的培养皿在37 °C、5%CO₂培养箱中培养24 h, 进行菌落计数, 以菌落形成单位(colony-forming unit, CFU)表示。每组检测6个试件。

1.5.5 人牙菌斑生物膜乳酸代谢分析 将培养48 h的人牙菌斑生物膜的复合树脂片在PBS液中轻轻漂洗, 去除表面松散未附着的细菌, 然后将所有试件转移到新的24孔板中, 选取具有缓冲能力的蛋白胨缓冲液(buffered peptone water, BPW)作为培养介质(每孔1.5 mL)进行培养。由于BPW的超强缓冲作用, 可以使牙菌斑生物膜在自身产酸的情况下仍然保持稳定。将孔板密封后放入37 °C、5%CO₂培养箱中培养3 h, 收集培养介质BPW, 用乳酸脱氢酶法^[7]进行乳酸代谢分析。分析时调节分光光度仪吸收波长至340 nm, 利用分光光度法绘制标准乳酸浓度曲线; 再将不同组别的BPW进行分光光度值检测, 根据标准乳酸浓度曲线计算不同组别的乳酸浓度。

1.5.6 人牙菌斑生物膜细菌染色 将培养48 h的人牙菌斑生物膜复合树脂片在PBS溶液中轻轻漂洗, 去除表面松散未附着的细菌, 用活/死细菌荧光试剂盒(Molecular Probes公司, 美国)进行染色。在荧光显微镜下, 活细菌染色后会产生绿色荧光; 细胞膜受损的细菌会被含碘的试剂染色, 产生红色荧光; 同样, 接近或重叠的活/死细菌会显示出橙、黄色。

1.6 统计学分析

检测结果均成正态分布, 选用SPSS 19.0统计软件对结果进行单因素方差分析, SNK法进行两两比较, 检验水准设定为双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 力学性能测试结果

各组复合树脂试件力学性能测试结果见表2。新型纳米抗菌无机填料质量分数小于等于15%时, 各实验组之间三点弯曲强度及弹性模量与对照组没有明显差别($P>0.05$); 当抗菌无机填料质量分数为20%时, 复合树脂力学性能下降明显($P<0.05$)。

表 2 各组复合树脂的力学性能

Tab 2 Mechanical properties of resin composite of all the groups

组别	抗菌填料质量分数/%	弯曲强度/MPa	弹性模量/GPa
对照组	0	108.1	6.5
实验组1	5	113.9	6.4
实验组2	10	94.4	5.7
实验组3	15	98.9	6.0
实验组4	20	64.6	4.3

2.2 人牙菌斑生物膜微生态代谢测试结果

各组的菌落计数和乳酸代谢检测结果见表3。与对照组相比较,仅添加5%的抗菌无机填料就能使菌斑生物膜中的细菌数量呈数量级减少($P<0.05$),提示新型纳米抗菌复合树脂有较强的抗菌性。抗菌填料质量分数为5%及以上时,各实验组的乳酸产生量约为对照组的1%,表明新型纳米抗菌复合树脂可

显著减少人牙菌斑生物膜中的乳酸产($P<0.05$)。

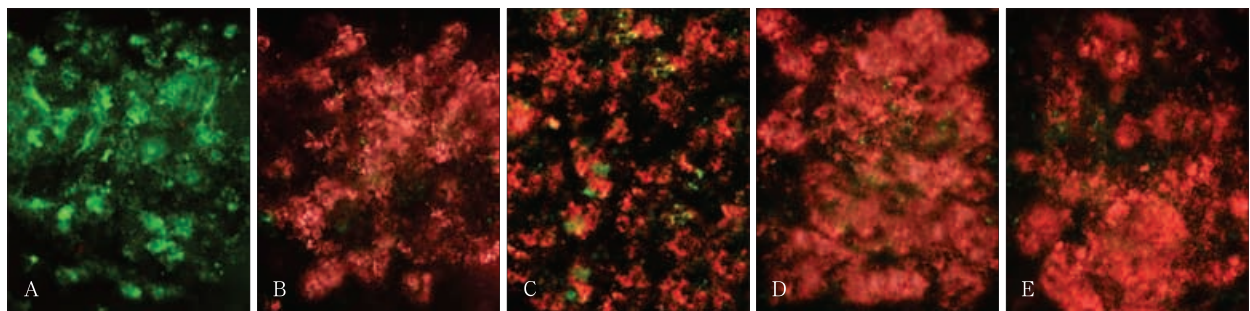
表 3 各组复合树脂的菌落计数和乳酸代谢检测结果

Tab 3 Colony-forming unit counts and lactic acid production of resin composite of all the groups

组别	菌落计数/CFU			乳酸量/ mmol·L ⁻¹
	全菌落	总链球菌	变异链球菌	
对照组	5.0×10^9	5.0×10^8	5.2×10^7	22.5
实验组1	5.8×10^6	5.6×10^5	5.5×10^3	0.24
实验组2	5.7×10^6	5.8×10^5	6.0×10^3	0.26
实验组3	5.6×10^6	5.6×10^5	5.7×10^3	0.23
实验组4	5.8×10^6	5.7×10^5	5.9×10^3	0.22

2.3 细菌染色结果

对照组及实验组代表性的人牙菌斑生物膜细菌染色如图1所示。对照组不具有抗菌性,表面覆盖大量活细菌,呈绿色荧光;各实验组因添加了具有较强抗菌性的无机填料,树脂试件表面的人牙菌斑生物膜主要为死细菌覆盖,呈红、橙或黄色荧光。



A: 对照组; B: 实验组1; C: 实验组2; D: 实验组3; E: 实验组4。

图 1 菌斑生物膜活/死细菌染色结果 荧光显微镜 $\times 100$

Fig 1 Representative live/dead images of biofilm on resin composite fluorescence microscope $\times 100$

3 讨论

牙菌斑生物膜是典型的细菌性生物膜,定植于牙表面及界面。当口腔微生态环境处于不平衡状态时,附着在牙面上的致病菌利用食物代谢产酸使牙齿脱矿进而引发龋坏,所以抑制有害细菌,维持口腔微生态平衡是预防龋病的主要措施^[8]。另外,牙菌斑生物膜除了容易附着在树脂类充填物的表面,还极易侵入树脂基质内部,并在复杂的口腔环境下诱发釉质龋、根面龋^[9]。如何赋予复合树脂类材料抗菌功能,抑制菌斑生物膜在其表面及内部的作用,有效减少继发龋是亟待解决的问题。将具有较强抗菌功能的季铵盐分子与甲基丙烯酸类单体相结合生成不同种类的季铵盐类抗菌单体,然后通过共聚合的方法将抗菌单体键合到树脂基质中去,通过接触式抗菌而持续发挥抗菌性能,是当前研究的热点之一^[10]。季铵盐分子结构上的N⁺极易与带有负电荷的

细菌细胞膜表面相结合,破坏细胞膜的完整性,阻断和干扰细胞质内的蛋白质及DNA等的合成,最终导致细菌死亡。此外,与小分子季铵盐相比,大分子季铵盐还有对细菌细胞膜的直接物理破坏作用^[11]。基于此,本课题组首次将含长链烷基大分子季铵盐接枝到纳米二氧化硅颗粒表面,形成新型纳米抗菌无机填料,并将其作为复合树脂的组分之一添加到树脂基体中,形成非溶出性树脂,从而达到接触式抗菌目的。本课题组前期研究表明,新型纳米抗菌颗粒不但在体外对变异链球菌显示出极强的抗菌作用^[2-3];在大鼠口腔内也显示出良好的抗菌效能^[4];此外,新型纳米抗菌无机填料在树脂基体中分布均匀,与树脂基体之间结合紧密,赋予复合树脂抗菌性能^[3]。

人牙菌斑生物膜模型可以分为单一菌种、特定混合菌和全菌模型^[12]。本实验采用的人牙菌斑全菌生物膜是从不同志愿者口腔环境中复制出的,很大程度上保持了口腔内菌斑生物膜的复杂性和异质性,

更加贴近实际情况,有利于评价材料的抗菌性能。在本研究中,与对照组相比,当实验组抗菌填料仅5%时,就能对人牙菌斑生物膜的代谢活性产生明显的抑制作用,菌落计数(全菌落、总链球菌及变异链球菌)下降了3~4个数量级,生物膜活/死细菌染色也显示抗菌树脂试件表面大部分被死亡细菌所覆盖,同时乳酸产生量也下降了近2个数量级,说明引入新型抗菌填料后,复合树脂可以对覆盖其表面的人牙菌斑生物膜的代谢活性产生明显抑制作用,显著降低致龋菌的数量以及乳酸产酸量,进而达到抗菌防龋的目的,与前期研究^[2-3]的结果一致。另外,新型抗菌复合树脂的另一大优点就是抗菌的时效性。为本研究对抗菌填料表面进行有效的偶联处理,充分保证了其与树脂基质之间牢固的结合力,而牢固镶嵌于树脂基质内的抗菌无机填料会持续发挥抗菌作用,有效克服传统机械添加抗菌剂而带来的抗菌远期效果下降的问题^[3]。

一般来说,向本体材料中引入改性材料不可避免地会影响本体材料的特性。作为经典的口腔充填材料,向复合树脂基质中加入抗菌无机填料应该以不改变其基本力学性能为前提。高分子复合材料的力学性能在很大程度上取决于无机粒子/有机基质界面的结合力,良好的结合力可以使载荷在两相之间有效传播而不破坏材料的基本力学性能^[13]。在本研究中,经过表面偶联处理的纳米抗菌无机填料与树脂基质有着良好的界面结合力,可以很好地实现与树脂基质的共混^[3],当纳米抗菌无机填料的质量分数从5%增加到15%时,与对照组相比,新型复合树脂的弯曲强度和弹性模量并没有明显的变化;而当纳米抗菌无机填料的质量分数达到20%时,复合树脂的力学性能下降明显,这可能是当抗菌填料含量过多时,在混合过程中树脂基质不能对其充分润湿和分散,使得具有高表面能的纳米填料出现团聚,进而影响了复合树脂的本体性能。对此还需要进一步的研究证实。

研发新型具有抗菌防龋功能的口腔复合树脂是口腔高分子材料研究的一个重要趋势。本研究将自行合成的新型纳米抗菌无机填料以不同的含量引入口腔复合树脂,并以体外人牙菌斑生物膜作为研究对象,探讨对其代谢活性的影响。在本实验条件下的研究结果表明,当抗菌无机填料的质量分数达到5%时,复合树脂具有较强的抗菌防龋功能,而加入小于15%的抗菌填料不会影响复合树脂的力学性能,为进一步临床应用奠定了基础。本文只进行了体外的研究,该复合树脂在体内对人牙菌斑生物膜的影响以及生物相容性等问题,尚待后续深入研究。

[参考文献]

- [1] Jandt KD, Sigusch BW. Future perspectives of resin-based dental materials[J]. Dent Mater, 2009, 25(8):1001-1006.
- [2] 吴峻岭, 金婵媛, 聂晓萌, 等. 新型纳米抗菌无机填料的合成及其抗菌性能的初步研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2012, 30(5):526-529, 534.
- [3] 吴峻岭, 周凯运, 朱婷, 等. 含长链烷基季铵盐的纳米抗菌无机填料的合成及其在牙科复合树脂中的应用研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2014, 32(5):513-518.
- [4] 朱婷, 周凯运, 吴峻岭. 新型纳米抗菌无机填料抗菌防龋作用的动物实验研究[J]. 口腔颌面修复学杂志, 2014, 15(2):70-74.
- [5] Zhou C, Weir MD, Zhang K, et al. Synthesis of new antibacterial quaternary ammonium monomer for incorporation into CaP nanocomposite[J]. Dent Mater, 2013, 29(8):859-870.
- [6] Melo MA, Wu J, Weir MD, et al. Novel antibacterial orthodontic cement containing quaternary ammonium monomer dimethylaminododecyl methacrylate[J]. J Dent, 2014, 42(9):1193-1201.
- [7] Cheng L, Weir MD, Zhang K, et al. Dental plaque microcosm biofilm behavior on calcium phosphate nanocomposite with quaternary ammonium[J]. Dent Mater, 2012, 28(8):853-862.
- [8] Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm[J]. Caries Res, 2004, 38(3):204-211.
- [9] Tanner J, Robinson C, Söderling E, et al. Early plaque formation on fibre-reinforced composites *in vivo*[J]. Clin Oral Investig, 2005, 9(3):154-160.
- [10] Imazato S, Ma S, Chen JH, et al. Therapeutic polymers for dental adhesives: loading resins with bio-active components[J]. Dent Mater, 2014, 30(1):97-104.
- [11] Murata H, Koepsel RR, Matyjaszewski K, et al. Permanent, non-leaching antibacterial surface—2: how high density cationic surfaces kill bacterial cells[J]. Biomaterials, 2007, 28(32):4870-4879.
- [12] McBain AJ, Sissons C, Ledger RG, et al. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm[J]. J Appl Microbiol, 2005, 98(3):624-634.
- [13] Fu S, Feng X, Lauke B, et al. Effects of particle size, particle/matrix interface adhesion and particle loading on mechanical properties of particulate-polymer composites[J]. Composites Part B: Eng, 2008, 39(6):933-961.

(本文编辑 吴爱华)