

含银无机抗菌剂加入树脂中对口腔常见 细菌黏附影响的研究

李 罡^{1,2}, 陈治清², 吴兴惠³, 肖晓蓉², 李艳红¹, 朱 殊²

(1.昆明医学院 口腔医学院, 云南 昆明 610093;

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;

3.云南大学 材料科学与工程学院, 云南 昆明 610091)

[摘要] 目的 检测含银硅铝酸盐无机抗菌剂对口腔常见细菌的作用效果, 以及加入该抗菌剂的基托树脂表面的口腔常见细菌的黏附情况。方法 将一定量细菌、真菌接种到含有适当比例含银硅铝酸盐无机抗菌剂的培养基中, 检测该抗菌剂的抑菌情况; 应用体外菌斑模型观察含有抗菌剂的聚甲基丙烯酸酯基托树脂表面的微生物黏附状况。结果 含银无机抗菌剂在8%的质量分数内可以完全抑制口腔常见细菌的生长, 在质量分数为1.25%和2.50%的情况下能够有效地抑制牙龈卟啉单胞菌和白假丝酵母菌的生长; 但是在16 d的实验期内未能抑制细菌在材料表面的黏附。结论 含银硅铝酸盐无机抗菌剂对口腔常见细菌有良好的抑菌效果, 但是在聚甲基丙烯酸酯树脂材料中加入含银硅铝酸盐无机抗菌剂, 没有表现出抑制细菌黏附的能力。

[关键词] 抗菌剂; 银; 聚甲基丙烯酸树脂; 黏附

[中图分类号] R783.1 [文献标识码] A

Study of Adherence of Normal Oral Bacteria on Polymethyl Methacrylate Containing Silversupported Silicate Inorganic Antibacterial LI Gang^{1,2}, CHEN Zhi-qing², WU Xing-hui³, XIAO Xiao-rong², LI Yan-hong¹, ZHU Zhu². (1. Dept. of Stomatology, Kunming Medical College, Kunming 610093, China; 2. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. College of Material Science and Technology, Yunnan University, Kunming 610091, China)

[Abstract] Objective To study the oral normal bacteria adherence on polymethyl methacrylate(PMMA) containing silver-supported silicate inorganic antibacterial, and the growth inhibitory concentration of silver-supported silicate inorganic antibacterial to normal oral bacteria were also investigated. Methods A certain volume of normal oral bacteria was inoculated on the BHI plate containing different dilution of silver-supported silicate inorganic antibacterial, then the growth of the bacteria was investigated by light microscope and biochemical methods; the oral bacteria plaque model in vitro was used to evaluate the adherence of 4 species normal oral bacteria mixture on the surface of PMMA which containing silver-supported silicate inorganic antibacterial in the proportion of 5% or 10%. Results The growth of normal oral bacteria was inhibited effectively by silver-supported silicate inorganic antibacterial within the concentration of 8%, and the growth of *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans* were inhibited at concentration from 1.25% to 2.50%, but the PMMA containing silver-supported inorganic antibacterial could not prevent the adherence of bacteria within a period of 16 days. Conclusion Silver-supported silicate inorganic antibacterial has effectiveness on inhibiting the growth of normal oral bacteria, but could not prevent the adherence of oral normal bacteria mixture.

[Key words] antibacterial; silver; polymethyl methacrylate; adherence

口腔临床实践中修复体周边感染的发生率明显

高于没有人工装置的区域^[1]。感染导致治疗失败, 引起新的并发症, 严重地影响了临床治疗效果。多年来学者们进行了大量的研究, 但至今尚未找到一种疗效持久、副作用小、简便易行的治疗方法。全身应用有机抗生素是有效控制感染的方法。但针对

[收稿日期] 2007-02-06; [修回日期] 2007-03-05

[基金项目] 国家“十五”863资助项目(2002061006)

[作者简介] 李 罡(1972-), 男, 云南人, 讲师, 博士

[通讯作者] 陈治清, Tel: 028-85502407

修复体直接造成的感染,如继发龋、托牙性口炎等,采用有机抗生素存在抗菌谱、持效性、细菌耐药性、局部药效、副作用等固有的局限性,使其临床应用受到较大的限制。因此,一段时期以来,临床上广泛使用氯己定等局部抗菌剂作为控制口腔感染的措施。

长期使用氯己定含漱剂、凝胶会导致牙面着色、腮腺可逆性肿胀、毛舌等副反应,引起口腔菌群生态失调^[2]。一些学者尝试把氯己定直接添加到口腔修复材料中,以减少其副作用,但是药物的溶出使基体材料的物理结构受到破坏,使材料的机械性能明显降低、溶解性升高,而且药物释放的持久性不足^[3-5]。所以,研制非溶出型抗菌修复材料成为可行的思路。具有微溶特点的无机抗菌剂成为可能的应用对象,无机抗菌剂中以含银无机抗菌剂的抑菌效果最好,应用也最为广泛。

含银无机抗菌剂是将含有银离子的无机盐按一定的工艺条件烧结到陶瓷、硅酸盐颗粒的晶体结构中而得到的具有抗菌性能的材料。它们具有抗菌谱广、耐高温、在水中微溶等特点;对革兰阳性、革兰阴性细菌以及真菌均具有很强的抑菌作用^[6]。含银无机抗菌剂同时具有很好的生物安全性^[7],是目前口腔临床材料改进中,比较理想的抗菌材料。

由于口腔内微生物种类繁多,微生物之间、微生物和修复材料间存在复杂的相互作用,其对修复材料表面的黏附受到多种因素的影响。因此,要将含银无机抗菌剂应用于临床,除了考察它对单一细菌的抑菌能力外,还必须对多种微生物存在的条件下无机抗菌剂的作用特点进行研究。本实验选用广泛应用于临床修复的聚甲基丙烯酸甲酯作为实验对象,除了考察含银无机抗菌剂对常见口腔细菌的抑菌作用外,还应用体外菌斑模型考察在多种口腔常见细菌存在的条件下,含无机抗菌剂的树脂材料表面的细菌黏附情况。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

变形链球菌(ATCC 25175),黏性放线菌(ATCC 15987、ATCC 19246),血链球菌(ATCC 10556),干酪乳杆菌(ATCC 4546),牙龈卟啉单胞菌(ATCC 33277、ATCC 35406),白假丝酵母菌(ATCC 10231)(由口腔生物医学工程教育部重点实验室,四川大学提供),黏性放线菌变异株(ATCC 5951)(由上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔内科惠赠),未经鉴定的临床采集株(G短杆菌和G⁺球菌各1株),肠双歧杆菌(由北京304医院熊德兴惠赠)。

1.2 主要仪器及试剂

YK-A含银硅铝酸盐无机抗菌剂(均匀的白色粉末,颗粒粒径小于等于200目;由云南大学材料科学与工程学院提供),自凝聚甲基丙烯酸树脂(中国重庆东化齿科材料厂),沙堡罗培养基(中国杭州微生物试剂有限公司),UV-1601型分光光度计(日本岛津公司),0.22 μm 过滤器(Millex-GP公司,美国),S-450型扫描电镜(日本日立公司),不锈钢模具(自制),液压成型机(中国上海苗苗液压设备有限公司)。

1.3 实验菌株培养

复苏上述(除白假丝酵母菌)实验菌冻干株并接种于BHI血琼脂平板上,在37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧条件下(80% N_2 、10% H_2 、10% CO_2)培养48 h,涂片染色形态学检查为纯培养物后,再接种于BHI琼脂平板上厌氧培养48 h。白假丝酵母菌直接接种到BHI琼脂平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 需氧培养48 h。经形态学及生化实验鉴定为纯培养物后,备用。

1.4 培养基和菌液的制备

培养平板上的细菌用接种环接种到1 mL PBS缓冲液中,混匀后与麦氏比浊管进行肉眼比浊,调整浓度至 1×10^6 CFU/mL,备用。将固体BHI培养基加热融化后,取10 mL倒入培养平板,按质量分数为1.25%、2.50%、5.00%、6.00%、8.00%、10.00%的比例添加YK-A含银硅铝酸盐无机抗菌剂,振荡混匀,冷却后备用。将沙堡罗培养基按使用说明配制成液体培养基,按上述相同比例加入抗菌剂。

1.5 抑菌作用检测

取 1×10^6 CFU/mL浓度的菌液10 μL 分别接种到不含和含有不同浓度抗菌剂的培养平板上。厌氧孵育24 h,用接种环刮取培养基表面的培养物,涂片在光学显微镜下观察有无细菌生长。白假丝酵母菌接种入液体培养基中,调整浓度至 1×10^6 CFU/mL,在37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床上培养6 h,吸取培养液10 μL 涂片镜检。镜检无细菌则认为细菌生长被抑制。

1.6 含抗菌剂试片的制备

按质量分数,配制含5%、10%抗菌剂的树脂,到达面团期时将树脂填入不锈钢模具中,在液压机中加压60 N并放入55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中成型,1 h后取出脱模。将边缘多余树脂磨除,不做任何表面处理,135 $^{\circ}\text{C}$ 蒸汽压力消毒后备用。试片呈圆台型,厚度1 mm,上面直径5 mm,底面直径2.5 mm。所有试片均在同一模具中成型。不含抗菌剂的树脂试片为对照组,含抗菌剂的试片为实验组,并分为5%、10% 2组,每组制作8片,共24片。收集新鲜非刺激唾液40 mL经0.22 μm 孔径过滤器加压过滤2次除菌后,将

试片放入唾液中，在37℃恒温摇床上孵育24 h。

1.7 用牙菌斑体外模型观察细菌对树脂表面的黏附^[8]

将变形链球菌(ATCC 25175)、血链球菌(ATCC 10556)、干酪乳杆菌(ATCC 4546)、黏性放线菌(ATCC 15987)用接种环从BHI培养平板上取下后，分别接种入40 mL BHI液体培养基中，厌氧培养48 h，使细菌大量扩增。

将含菌BHI液体培养基3 000 r/min离心15 min，弃去培养液，细菌用生理盐水洗涤后，3 000 r/min离心15 min，弃去上清液，反复3次。加入生理盐水，制备菌悬液。用分光光度计调整菌悬液浓度，使所有菌悬液的OD值均为1。

每种细菌取调整好浓度的菌悬液1 mL，加入到5 mL的TS液体培养基中，将几种含菌培养液等量混合，制得含以上4种细菌的混合培养液。将每组试

片(共12片)按1 cm的间隔距离放入到制好的混合培养液，厌氧培养，每48 h更换1次混合培养液，更换前把试片从培养液中取出，用生理盐水洗涤5次，洗去表面松散附着的细菌，将试片重新放入新配制的混合培养液中，继续厌氧孵育。在第8天和第16天取试片，每组试片各取4片，用生理盐水洗涤5次，扫描电镜观察。

2 结果

2.1 细菌抑菌情况

在不含抗菌剂的培养基上所有细菌均生长良好，光镜下形态学检查均为无污染的培养细菌。在含有抗菌剂的培养基上，细菌生长状况见表1：“+”表示光镜下细菌生长正常，形态学鉴定为纯培养细菌；“-”表示涂片光镜检查未见细菌。

表 1 口腔常见细菌、真菌在含有银无机抗菌剂培养平板上的生长状况

Tab 1 The survival situation of common oral bacteria and fungus growing on culture plate containing silver-supported inorganic antibacterial

实验细菌(1×10 ⁶ CFU/mL)	抗菌剂质量分数(%)						
	0.00	1.25	2.50	5.00	6.00	8.00	10.00
变形链球菌 ATCC 25175	+	+	+	+	+	-	-
黏性放线菌变异株 ATCC 5951	+	-	-	-	-	-	-
黏性放线菌 ATCC 15987	+	+	+	-	-	-	-
黏性放线菌 ATCC 19246	+	+	+	+	-	-	-
血链球菌 ATCC 10556	+	+	+	+	-	-	-
干酪乳杆菌 ATCC 4546	+	+	+	+	+	-	-
牙龈卟啉单胞菌 ATCC 33277	+	-	-	-	-	-	-
牙髓卟啉单胞菌 ATCC 35406	+	-	-	-	-	-	-
白假丝酵母菌 ATCC 10231	+	+	-	-	-	-	-
肠双歧杆菌	+	+	-	-	-	-	-
G ⁻ 短杆菌(临床株)	+	+	+	+	-	-	-
G ⁺ 球菌(临床株)	+	+	+	+	-	-	-

2.2 细菌在树脂片表面的黏附情况

在第8天、第16天时，用扫描电镜观察聚甲基丙烯酸树脂试片，对照组、5%抗菌剂组、10%抗菌剂组表面均生长有杆菌和呈链状或散在排列的球菌，球菌的数量略多于杆菌的数量(图1~3)；在5%、10%抗菌剂组试片上，可见细菌聚集成簇，甚至可见菌斑样结构(图1右、图2左、图3)以及球菌聚集在杆菌周围呈麦穗样结构(图3左)。树脂试片的表面有波纹状起伏以及散在的小孔，其大小与细菌大小相似；在5%、10%抗菌剂组试片的表面可以看到树脂试片表面有圆钝的山丘状突起(图1右、图2左、图3)，在突起间的凹陷处细菌堆积成簇，低凹处的细菌聚集明显多于突起的顶端。

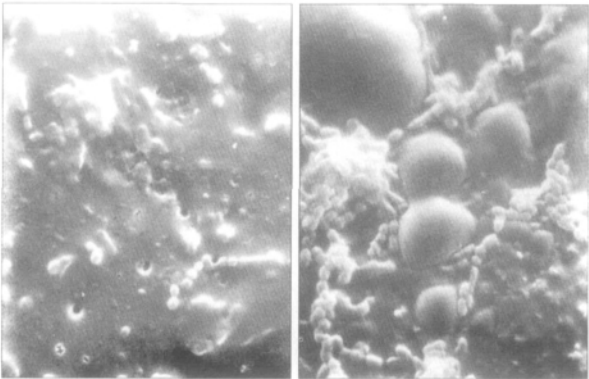


图 1 对照组(左)、5%抗菌剂组(右)第8天表面细菌 SEM × 5 000

Fig 1 Bacteria on the surface of control group (left) and group containing 5% antibacterial (right) on the 8th day SEM × 5 000

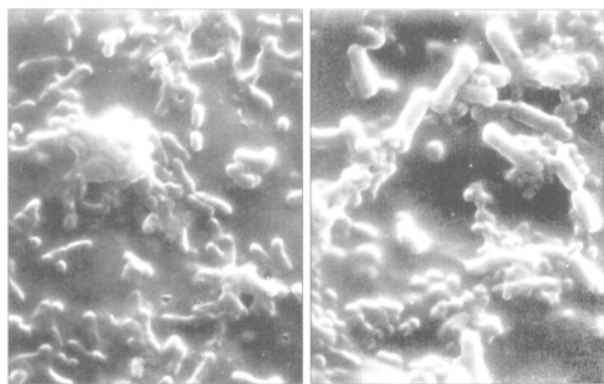


图2 10%抗菌剂组第8天(左)、对照组第16天(右)表面细菌
SEM $\times 5\,000$

Fig 2 Bacteria on the surface of group containing 10% antibacterial on the 8th day(left) and control group on the 16th day(right) SEM $\times 5\,000$

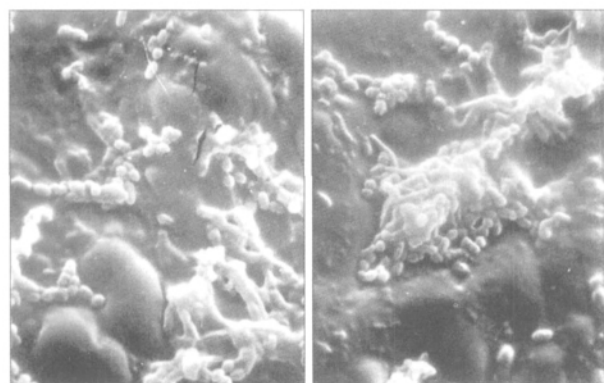


图3 5%抗菌剂组(左)、10%抗菌剂组(右)第16天表面细菌
SEM $\times 5\,000$

Fig 3 Bacteria on the surface of group containing 5% antibacterial (left) and containing 10% antibacterial (right) on the 16th day SEM $\times 5\,000$

3 讨论

修复体表面的细菌大量沉积常导致修复体周边感染性疾病的发生。继发龋是修复失败的主要原因, van Dijken^[1]对传统型、微填料型和混合填料型复合树脂进行了为期6年的临床观察, 结果复合树脂材料表面的菌斑沉积量最高, 有18.9%的复合树脂修复体边缘发生了继发龋, 同期银汞合金修复体边缘的继发龋发生率为8.6%, 而在未经充填的牙面上仅有3.1%观察到早期龋。真菌, 特别是白假丝酵母菌常与托牙性口炎的发生有关^[9]。Kuc等^[10]在对平均年龄63岁的加拿大社区老年人进行的调查中发现, 有近1/3的义齿戴用者发生托牙性口炎; 吸烟、义齿戴用和清洁习惯、口腔卫生措施等, 尤其是义齿表面的菌斑沉积, 与托牙性口炎的发生密切相关^[11]。如何降低修复材料表面的微生物附着是临床急需解决的问题。

本实验中所选用的细菌除肠双歧杆菌外, 均为口腔正常菌群中的细菌。实验结果显示, 含银硅钼酸盐无机抗菌剂在实验条件下对口腔常见的微生物均具有较强的抑制细菌生长的作用。其中, 在8%的质量分数下可以抑制变形链球菌的生长, 其余细菌的抑菌浓度均低于此数值。该结果提示, 可以考虑利用该类抗菌剂在不同质量分数的抑菌作用, 选择合适的质量分数, 在特定的使用部位抑制某些细菌生长, 而对其他细菌的生长不造成过大的影响; 而在口腔内已发生感染的情况下, 对失调的微生物状况进行调整, 使之趋于正常。本抗菌剂对白假丝酵母菌亦有较好的抑菌效果, 因此合理使用本抗菌剂, 对控制托牙性口炎的发生应是可行方法。

本实验采用多种细菌混合培养, 并使用微生物连续培养技术, 目的在于尽可能在体外模拟体内的细菌生长和相互作用情况, 探讨对单一细菌有效的无机抗菌剂能否在多种细菌存在的条件下仍然发挥有效的抗菌作用。目前的研究多集中于抗菌剂对单一细菌黏附的影响, 多种细菌由于对实验影响因素及实验方法的选择上存在困难, 故没有这方面的报道。本实验采用成熟的牙面人工菌斑实验模型, 从而避免了实验细菌种类选择的不确定性^[8]。

在实验方法中, 把细菌从试片上洗脱下来作平板计数是更为合理的方法。但是在实际操作中, 扫描电镜显示用漩涡振荡器洗涤试片并不能将试片上的细菌完全洗脱下来。在第8天时, 扫描电镜显示试片上黏附有较多的球菌, 但在用洗涤试片的液体做平板计数时, 发现平板上生长的几乎完全是干酪乳杆菌, 说明各种细菌在试片上的黏附力不同, 如何既不破坏细菌又完全地把细菌从试片上洗脱下来是个尚待研究的问题。Evans等^[12]在将变形链球菌从固体表面洗脱下来时使用了1 mol/L的NaOH(pH=14)浸泡试件, 并用超声波振荡。但变形链球菌、血链球菌、黏性放线菌在pH值为10.0的情况下, 1 h即可有98.0%被灭活^[13]。超声波振荡也会造成细菌崩解和假阴性培养结果, Wengrovitz等^[14]用超声波洗涤聚四氟乙烯膜表面黏附的表皮葡萄球菌, 其细菌获得率要高于用漩涡振荡的方法, 但该实验并没有对超声波在不同功率条件下的细菌获得率进行比较, 而且不同细菌可耐受的功率范围以及从不同材料表面将细菌洗脱下来所需的超声波强度和时间的关系并不清楚。因此, 虽然目前多用超声波振荡的方法来解离材料表面黏附的细菌, 但它并不能满足本实验的要求。因此, 本实验中试图通过单纯的漩涡振荡洗涤来达到目的, 但实验证明并不可行。

Imazato等^[15]将有机抗菌剂作为单体通过共聚合

反应添加到复合树脂中,此复合树脂在与浓度为 1×10^6 CFU/mL 变形链球菌悬液一同孵育 24 h 后,在其表面黏附的变形链球菌较对照组有所降低。而本实验在 16 d 的实验期内并未能抑制细菌对其表面的黏附。可能与下列因素有关:首先,细菌表面配体(如菌毛、肽聚糖、有黏附功能的荚膜、细胞外黏质、脂磷壁酸等)一旦遇到能与之结合的材料或吸附在材料表面上的蛋白层(获得性膜)中的受体上,则牢固地黏附在生物材料的表面^[16];黏附在材料表面的细菌不断繁殖,其合成的不溶性胞外多糖、细胞外黏质与吸附到材料表面的机体细胞外基质蛋白共同构成包绕生物材料表面的生物膜^[17]。Anwar 等^[18]、Khouri 等^[19]的研究表明,已形成生物膜的细菌的抗生素耐受性比同种游离细菌要高 50~5 000 倍。因此抗菌剂如不具备足够的抗菌效率,在生物膜形成前杀灭细菌,则其并不能真正阻止细菌在其表面的黏附。

其次,树脂材料中添加抗菌剂颗粒,导致材料的表面形貌发生改变:电镜下,5%抗菌剂组、10%抗菌剂组都可见表面有颗粒状突起。微生物与材料的最初接触受材料表面理化性质的影响,目前认为取决于以下 3 个因素:1)表面自由能,包括修复材料的表面自由能、细菌的表面自由能及悬浮介质的表面张力;2)修复材料的表面粗糙度;3)微生物与机体免疫系统的关系。有学者认为,其中表面自由能最重要,但更多的学者主张表面粗糙度对菌斑集聚及菌斑组成的影响要比表面自由能大,粗糙的表面有利于细菌的黏附^[20]。树脂材料在加入无机抗菌剂后形成了有利于细菌黏附的表面形态。

现在,细菌对材料表面的黏附机制仍不是很清楚,它受细菌、生物材料、环境、宿主等多个因素的影响,因此防止细菌对材料表面的黏附是复杂的过程。从本实验结果看,单纯在基体材料中加入抗菌剂并不一定能阻止细菌在材料表面的黏附。进一步的工作还必须对细菌和材料黏附的始动因子、影响因素进行更深入细致的研究。

【参考文献】

- [1] van Dijken JWV. A clinical evaluation of anterior conventional, microfiller, and hybrid composite resin fillings. A 6-year follow-up study[J]. *Acta Odontol Scand*, 1986, 44(6):357-367.
- [2] 曾光明. 口腔临床药理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:138-139.
ZENG Guang-ming. Clinical oral pharmacology[M]. Beijing: Renmin Health Publishing Company, 2000:138-139.
- [3] Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines[J]. *J Oral Rehabil*, 1983, 10(5):373-381.
- [4] Rebeiro J, Ericson D. In vitro antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements[J]. *Scand J Dent Res*, 1991, 99(6):533-540.
- [5] Takemura K, Sakamoto Y, Staninec M, et al. Antibacterial activity of Bis-GMA based composite resin and antibacterial effect of chlorhexidine incorporation[J]. *Jpn J Conserv Dent*, 1983, 26(4):540-547.
- [6] Kourai H, Manabe Y, Yamada Y. Mode of bacteriacidal action of zirconium phosphate ceramics containing silver ions in the crystal structure[J]. *J Antitact Anitfung Agents*, 1994, 22(10):595-601.
- [7] Olffs A, Grosse-Siestrup C, Bisson S, et al. Biocompatibility of silver-coated polyurethane catheters and silver-coated dacron material[J]. *Biomater*, 1994, 15(10):753-758.
- [8] 周学东, 岳松龄. 牙菌斑体外模型研究[J]. 华西口腔医学杂志, 1992, 10(4):257-259.
ZHOU Xue-dong, YUE Song-ling. Model of oral bacterial plaque in vitro[J]. *West China J Stomatol*, 1992, 10(4):257-259.
- [9] Olsen I. Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi[J]. *Acta Odontol Scand*, 1974, 32(5):329-333.
- [10] Kuc IM, Samaranayake LP, van Heyst EN. Oral health and microflora in an institutionalised elderly population in Canada[J]. *Int Dent J*, 1999, 49(1):33-40.
- [11] Celic R, Knezovic Zlataric D, Baucic I. Evaluation of denture stomatitis in Croatian adult population[J]. *Coli Antropol*, 2001, 25(1):317-326.
- [12] Evans RT, Baker PJ, Coburn RA, et al. Comparison of antiplaque agents using an in vitro assay reflecting oral conditions[J]. *J Dent Res*, 1977, 56(6):559-567.
- [13] Allan I, Newman H, Wilson M. Antibacterial activity of particulate bioglass against supra- and subgingival bacteria[J]. *Biomater*, 2001, 22(12):1683-1687.
- [14] Wengrovitz M, Spangler S, Martin LF. Sonication provides maximal recovery of staphylococcus epidermidis from slime-coated vascular prosthetics[J]. *Am Surg*, 1991, 57(3):161-164.
- [15] Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, et al. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite[J]. *J Dent Res*, 1994, 73(8):1437-1443.
- [16] Cristina AG. Biomaterials-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration[J]. *Science*, 1987, 237(4822):1585-1595.
- [17] Cristina AG, Costerton JW. Bacterial adherence and the glycocalyx and their role in musculoskeletal infection[J]. *Orthop Clin North Am*, 1984, 15(3):517-523.
- [18] Anwar H, van Biesen T, Dasgupta M, et al. Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989, 33(10):1824-1826.
- [19] Khouri AE, Lam K, Ellis B, et al. Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices[J]. *ASAIO J*, 1992, 38(3):174-178.
- [20] Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface free energy on supra- and subgingival plaque formation in man[J]. *J Clin Periodontol*, 1995, 22(1):1-9.

(本文编辑 汤亚玲)