可填压复合树脂表面抗菌性能：I

Surface antibacterial properties of packable resin composites：Par I
Sholomo Matalon，Hagay Slutzky，Ervin I. Weiss
原载 Quintessence Int 2004；35：189~193(英文).

刘颖熠 译　王嘉德 校

摘要　**目的**　用直接接触法(DCT)和琼脂扩散法(ADT)来检验可填压复合树脂的抗菌性能。

材料和方法　取 6 种树脂 (SureFil，Alert，P-60，Synergy Compact，Pyramid 和 Solitair)各 4 个样本固化在 96 孔板的小孔侧壁上。每个样本表面滴加含有 1×10^6 活变形链球菌的混悬液 10μL，37℃保持 1 小时。每个孔中加入新配置的培养液后，将 96 孔板放入可用作培养箱的调温分光光度计内。每 30 分钟记录一次光密度，连续 16 小时监测细菌生长情况。ADT 的方法是将样本放入预先在培养基上打好的小孔内，培养 72 小时后测量抑菌环的宽度。

结果　两种试验中所有材料样本都没有抑制变链菌生长。DCT 试验中有三种材料加速了变链菌的生长。在磷酸缓冲液中放置 7~30 天后复合树脂的抑菌性与对照组没有差别。

结论　可填压复合树脂料没有抗菌性。而新鲜聚合的复合树脂有助于细菌生长。

患者和医师对牙色充填材料的需求在增加。现在，后牙树脂的使用更为频繁，而树脂充填体欠佳的边缘适应性仍然是充填失败的主要原因。继发龋仍然是直接法后牙树脂充填的主要临床问题。近来，可填压树脂被用于牙科修复。由于继发龋主要是变链菌相关疾病，因此评估可填压复合树脂与变链菌的相关关系就很重要了，这包括树脂对细菌粘附性、细菌活性和生物膜的形成的影响等内容。

评价充填材料抗菌性的体外研究方法很多。虽然琼脂扩散法(ADT)有很多不足，但它是以往多数研究中的标准方法。ADT 方法的局限性表现在其是定性研究方法、仅能检测可溶性物质、无法区分抑菌作用和杀菌作用、很难进行大量样本间的比较和不易控制过多变量等方面。Weiss 等提出了直接接触法(DCT)，无论材料可溶性如何，都能够定量检测微生物与材料直接接触后的反应。

本研究采用 DCT 和 ADT 两种方法检测了六种可填压树脂在聚合即刻和聚合成熟后的抗菌性。

材料和方法

受试材料

6 种可填压后牙树脂：Alert(Jeneric-Pentron)、Filtek P-

译者　北京大学口腔医学院
北京海淀区中关村南大街 22 号　100081

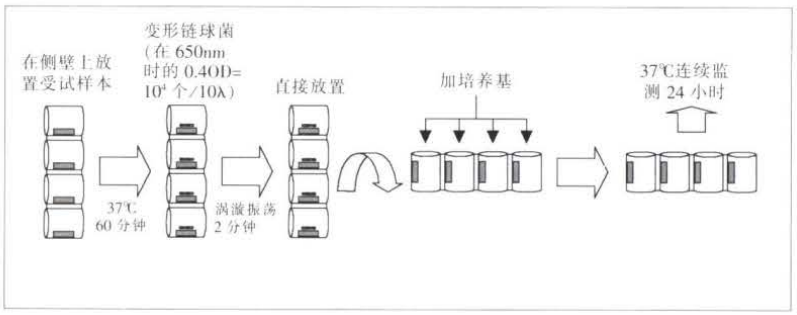

图1 96孔板直接接触法(DCT)示意图。每种材料做4份样本。细菌直接涂布于样本上1小时后加入培养基。涡漩震荡2分钟后放入可调温酶标仪，每30分钟监测一次细菌生长情况，连续观察24小时

60（3M ESPE）、Pyramid（Bisco）、Solitair（Heraeus-Kulzer）、SureFil（Dentsply/Caulk）和Synergy Compact（Coltene/Whaledent）。每种树脂的处理和聚合都按照厂家说明书严格进行。

受试微生物和培养条件

变形链球菌是龋齿的主要致病菌，因而广泛用于充填材料抗菌性研究。本研究采用从临床分离得到的天然耐杆菌肽的2735M变链菌。将冰冻保存的菌种放入含有8μg/mL杆菌肽的脑心浸出液（BHI）肉汤(Dilco Laboratories）中37℃厌氧培养48小时后用于以下实验。

试验设计

检测受试树脂固化后30分钟内、7天、30天时的抗菌性能。树脂固化后保存在磷酸盐缓冲液(PBS)内，缓冲液每48小时更换一次。

DCT法参见Weiss等人的描述，测量96孔板的浊度来反应细菌生长情况。利用可调温分光光度计(THERMOmax，Molecular Device）在37℃条件下每30分钟测量每个孔650nm时的光密度记录细菌生长的动态变化。

实验方法：竖直放置平底96孔板(Nunclon，Nunc)使其底面与地面垂直。在4个孔的侧壁上放置等量的被试材料(图1)。用小号扁平的器械将材料铺成薄层后固化灯(VIP Curing Light，Bisco)光照固化。避免材料流到孔底面干扰光束通过而导致读数错误。

96孔板保持竖直放置，取10μL细菌悬液($10^6/M^2$；血细胞计数器计数)放在被测材料表面(图1)。将96孔板在37℃孵育1小时直至液体成分彻底挥发以保证所有细菌与材料表面直接接触。平放96孔板，在每个孔内加入200μl含杆菌肽的BHI肉汤，轻轻涡漩震荡2分钟(100rpm)(图1)。4个侧壁未覆盖测试材料的孔作为阳性对照，相应侧壁直接涂布细菌悬液，其余操作同被试材料孔。阴性对照的4个孔内侧壁上放置被试材料，但不接种细菌，而直接加入BHI培养基。将96孔板放入酶标仪内，37℃孵育测量每孔内650nm的光密度，持续16小时。每次读数前自动混匀孔内悬液。

标准曲线制备。在3个孔侧壁上涂布10μl细菌悬液($10^6/M^2$)，处理同阳性对照组，然后加入250μl培养基轻轻涡漩震荡2分钟。各取50μl转入下一行已有200μl培养基的3个孔内。依次重复6次这种5倍稀释过程。整个实验中每块96孔板都有自己的对照和标准曲线。

ADT的培养基为清唾琼脂平皿（变链菌选择性培养基）。每块平皿上用Dragalsky波棒均匀涂布200μl新鲜培养的变形链球菌(光密度：OD_{650}-0.5)。打6个直径4mm深度2mm的小孔，填满被试材料后立刻根据说明书要求用光固化灯固化。培育72小时后观察抑菌环。

统计分析

阴性对照值作为基线值，每个孔内数值减去基线值后绘制生长曲线。分析每个孔内的生长曲线，对线性上升部分做线性回归，方程表示为：y=ax+b。线性部分的R2值在0.96至0.99间。方程包含两个系数：斜率表示细菌生长速率；常数与0时刻细菌数目有关。对这两个系数进行了方差分析和Tukey多项比较。

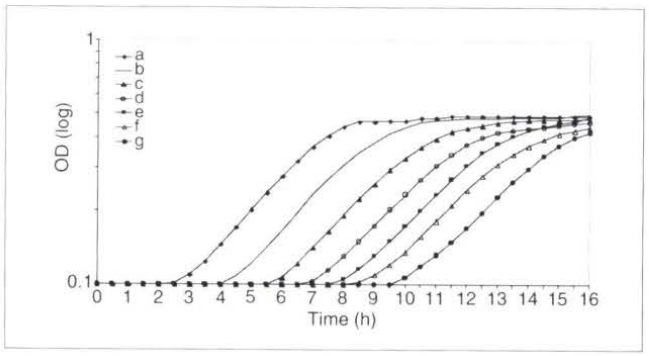

图 2 根据光密度变化观察细菌生长情况。曲线上每个点均是同一时刻 3 个样本测得的光密度(OD)平均值。5 倍系列稀释后不同的起始细菌浓度($a=1\times10^{-6}$, $b=0.2\times10^{-6}$, $c=0.4\times10^{-7}$, $d=0.8\times10^{-8}$, $e=0.16\times10^{-8}$, $f=0.32\times10^{-9}$, $g=0.64\times10^{-10}$)对细菌生长速率(斜率)或某一静止时刻的细菌密度没有影响

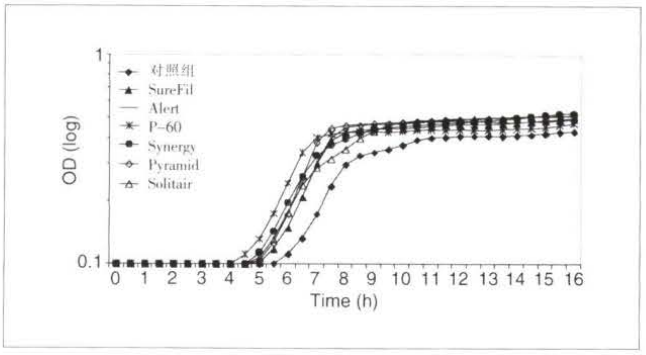

图 3 新鲜固化树脂样本(固化后 1 小时)表面细菌生长情况。通过光密度变化来反映细菌生长趋势。曲线上每点代表同一观测时刻 4 个样本的光密度(OD)均值

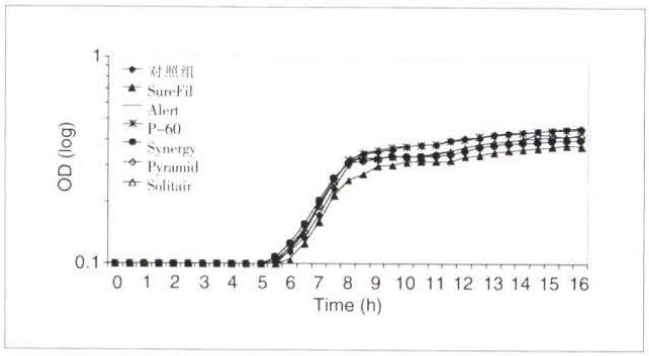

图 4 固化 7 天树脂样本表面细菌生长情况。通过光密度变化来反映细菌生长趋势。曲线上每点代表同一观测时刻 4 个样本的光密度(OD)均值

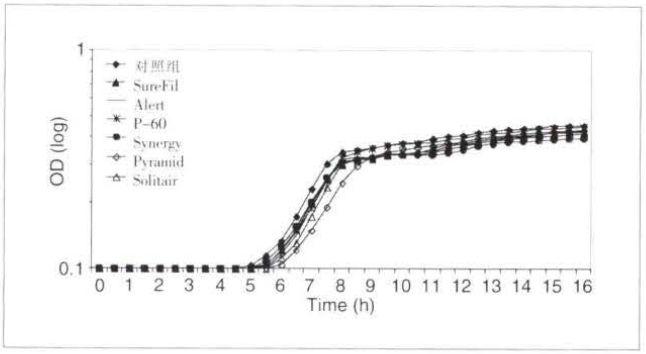

图 5 固化 30 天树脂样本表面细菌生长情况。通过光密度变化来反映细菌生长趋势。曲线上每点代表同一观测时刻 4 个样本的光密度(OD)均值

结果

ADT 实验对每种材料都做了 4 个样本，任何样本周围都没有观察到抑菌环。

96 孔板内的细菌生长情况根据标准曲线来定量和评价可重复性(图 2)。生长曲线上的每个点都是同一时刻三个孔读数的均值。零时刻系列稀释形成的活菌读数下降趋势只与线性方程的常数有关，对细菌生长速率（方程斜率）和每个检测时刻的细菌密度均没有影响。标准曲线用来确定细菌的相对数目，由此 DCT 法能够以细菌生长速率或活菌数目的变化来反应树脂与细菌间相互关系。

图 3 为所有新鲜聚合树脂样本实验的生长曲线。曲线上每一点表示该时刻 4 个样本的平均 OD 值。在本实验条件下，实验组细菌生长速率比对照组高(表 1)，达到平台期的时间也早于对照组(图 3)。实验组细菌数目是对照组的大约 4-6 倍，因而实验组达到平台期的时间早于对照组。所有实验中，每个测量点的标准差在 0.02~0.08OD。阴性对照组中没有观察到细菌生长。

单因素方差分析发现不同材料表面细菌生长速率差异有显著性(P=0.001)。新鲜聚合的 6 种材料在零时刻均不影响细菌生长；Alert、Solitaie 和 Filtek P-60 表面细菌生长速率较快。在 PBS 中放置 7 天和 30 天后所有材料表面细菌生长速率相当，材料间差异和材料与对照组间差异均没有统计学意义(图 4 和表 1)。

讨论

本实验评估了 6 种可填压树脂与临床分离所得变形链球菌直接接触后对细菌生长的影响。ADT 法和 DCT 法都显示 6 种材料均没有抗菌性。通过与对照组比较生

表 1 DCT 法可填压树脂表面细菌生长曲线直线部分斜率*

材料	新鲜样本	7 天样本	30 天样本
Filltek P-60	0.0947±0.0014	2.73±0.58	1.53±0.40
Solitair	0.0853±0.0064	2.79±0.50	1.67±0.28
Alert	0.0850±0.0058	2.31±0.37	1.58±0.52
Synergy Compact	0.0783±0.0062	1.86±0.20	1.26±0.56
SureFil	0.0758±0.0062	2.41±0.47	1.14±0.94
Pyramid	0.0795±0.0026	2.51±0.30	1.44±0.43
Control	0.0722±0.0032	2.84±0.54	1.73±0.22

单因素方差分析：新鲜样本间 $P=0.011$；7 天样本间 $P=0.98$；30 天样本间 $P=0.75$。

*竖线表示与对照组有显著差异的数值，多项比较采用 Tukey 法

长曲线的斜率和达到平台期的时间可以观察到一个有趣的现象：细菌在聚合刚刚完成的新鲜树脂表面生长速率加快。这一现象在每种材料的 4 个样本中有很好的一致性。还不能确定新鲜样本的这种表面特性是否反映了临床实际或仅存在于体外试验。在 PBS 中放置已固化 30 天的树脂表面既无抗菌性也不促进细菌生长。

本研究结果支持充填材料能促进细菌生长的文献发现。如果能在临床上验证这一结果，那么厂商就须对复合树脂材料的抗菌特性进行更严格的描述。

很多文献对微细填料树脂和混合填料树脂的抗菌特性进行了研究，如 Tetric（Vivadent），Z-100（3M）和 Scalp-it（Jeneric/Pentron）。尽管树脂材料的某些组分存在抗菌性，但在材料聚合后并没有观察到树脂的抗菌性。本研究显示可填压树脂也缺乏这一特性。

多数研究牙科充填材料抗菌性的实验采用半定量方法。ADT 和最小抑制浓度试验仅能对材料的液体成分进行分析。ADT 法对接种细菌的密度标准化、培养基构成、琼脂粘度、琼脂平皿保存条件、平皿大小、每块平皿的细菌接种数目、材料与平皿的充分接触以及培养时间和温度均有要求。生存时间法（survival time）、肉汤稀释法、改良洞形法、生长曲线法（growth curves）等方法的提出都是为了弥补 ADT 的局限性。尽管如此，这些方法仍然只能对材料中的液体成分或可溶解成分进行分析。而在 DCT 法中细菌悬液被涂布在材料表面，其中的液体挥发后细菌就可与材料直接接触。悬液浓度比能形成单层细胞的浓度低 3 倍，这样才能保证细菌在材料表面不发生堆积，获得与被试材料的完全接触。本研究的结果肯定了以往对 DCT 法的观察结果：DCT 法的准确性不受起始接种菌具体数目的影响。采用该定量方法可对固态、不溶性材料进行研究，这对口腔充填材料尤其重要。DCT 法还可对多种材料进行对比研究，评估它们对细菌生长速率的作用。这是其他方法难以企及的。

包括树脂在内的最新银汞合金替代材料有着长足的进步。复合树脂在前牙充填中的应用也早以获得成功，但同类材料在后牙的应用却因为操作技术要求较高、材料聚合收缩、边缘密合性欠佳、材料的磨损丧失、聚合应力的产生和各种单体的释放等问题的存在并未在任何条件下都能成为“治疗选择”。由于上述问题会导致微渗漏、牙齿敏感和继发龋等问题，未来的复合树脂充填材料也应该提高抗菌性能。

致谢

感谢 Alpha Omega 研究基金和 Lefcoe 口腔生物研究基金对本研究的部分资金支持。感谢 Yardena Mazor 女士的技术协助。