

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.01.013

粪肠球菌牛牙感染根管模型的建立和电镜观察

黄晓晶, 郭晓霞, 王燕煌

(福建医科大学口腔医学院牙体牙髓教研室, 福州 350002)

【摘要】目的:建立体外粪肠球菌牛牙感染根管模型并观察建模过程中粪肠球菌在牙本质小管的定植模式。方法:收集新鲜拔除的牛恒切牙 36 颗(随机选 6 颗作为阴性对照组,余为实验组),经根管预备、高压灭菌后,根管内接种粪肠球菌厌氧培养,扫描电镜拍摄不同培养时段的图像,观察细菌侵入牙本质小管的数量和定植模式。实验组分别培养 1、2、3、4、8 周;对照组培养 8 周。结果:2 周时观察到粪肠球菌初始定植于牙本质小管内。随培养时间延长,细菌感染小管的数量增加,4 周时细菌重度浸润小管。8 周观察结果与 4 周差异无统计学意义。细菌在牙本质小管内呈间隔密集分布状态,即密集浸润小管其周围小管内较空虚,细菌仅少量定植或未定植;实验同时观察到细菌在管间牙本质定植,其定植时间与细菌在小管内定植的时间一致。结论:粪肠球菌可在牙本质小管和管间牙本质定植,厌氧培养 4 周可成功建立粪肠球菌牛牙感染根管模型。

【关键词】粪肠球菌;牙本质小管;感染根管;牛牙

【中国图书分类法分类号】R781.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-11-10

A model of *Enterococcus faecalis* in bovine dentinal tubules and SEM evaluation

HUANG Xiaojing, GUO Xiaoxia, WANG Yanhuang

(Department of Endodontics, School of Stomatology, Fujian Medical University)

【Abstract】Objective: To develop an in vitro model for bovine dentinal tubule infection of root canals and to investigate dentinal tubules invasion by *Enterococcus faecalis*. Methods: Thirty-six freshly extracted, mature bovine incisors were used in this study (six of them for the control at random, others for the test). Following biomechanical instrumentation and autoclaving, all the specimens were inoculated with *Enterococcus faecalis* suspension. To investigate the bacterial status in infected tubules, the images stack were obtained by scanning electron microscopy (SEM) in different time intervals, which were one, two, three, four, and eight weeks for the test and eight weeks for the control. Results: With the development of time, infected dentinal tubules increased. The initial time of dentinal tubules invaded by *Enterococcus faecalis* was two weeks, and the dense invasion time was four weeks, but there was no significant difference between four weeks and eight weeks. They were in interval distribution, with densely packed in some tubules whilst empty in the adjacent tubules. The bacteria also invaded orthodontine at the same time, and they were blocked. Conclusion: *Enterococcus faecalis* can penetrate into dentinal tubules and orthodontine, and it takes four weeks to establish this in vitro model under anaerobic condition.

【Key words】*Enterococcus faecalis*; dentinal tubule; infected root canal; incisor

粪肠球菌是引起根管治疗失败和顽固性根尖周炎的主要细菌^[1],这是由于常规治疗无法彻底清除根管内的粪肠球菌,残留的细菌多定植于牙本质小管,在根管充填后的苛刻环境中生存,当环境允许时,其从小管移到根管内,依赖自身及各种毒力因子形成再感染。长期以来,国内外学者多采用建立离体牙感染根管模型的方法,来研究粪肠球菌的生存机

制^[2]、评价根管治疗药物^[3-6]及充填材料^[7]等的疗效。该模型的体外培养条件有需氧培养和厌氧培养之分,一般认为需氧培养 3 周^[8]即建模成功,而厌氧培养建模成功的时间报道不一,在 3 周^[9]或 4 周^[10]时间。然而无论何种培养条件的模型均对细菌在牙本质小管的定植过程和定植状态报道较少。明确体外模型中粪肠球菌在牙本质小管内的定植模式有助于深入研究粪肠球菌的生存机制,以及正确评价机械化学消毒方法对其的抗菌效果。

有研究表明,牛牙的牙本质小管形态与人类牙齿相似^[10],

作者介绍:黄晓晶(1971-),女,主任医师,博士,

研究方向:牙体牙髓病病因和防治。

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(编号:2010J01159)。

具有可比性。故本研究拟采用牛恒切牙建立体外粪肠球菌感染根管模型,同时针对有学者认为粪肠球菌在牙本质小管内的定植呈时间依赖性的特点^[1],将厌氧培养和观察时间延长至 8 周,分析不同时段细菌感染牙本质小管的数量和模式,进而评价体外建立粪肠球菌牛牙感染根管模型的可行性,以及该模型的特点。

1 材料和方法

1.1 材料

粪肠球菌标准株(ATCC 33186,美国菌种保藏中心);脑心浸液粉(Brain-heart Infusion Broth,BHI,英国);全自动酶联免疫测定仪(Human,德国);扫描电镜(飞利浦,荷兰)。

1.2 方法

1.2.1 离体牙准备 选择新鲜拔除的健康牛恒切牙 36 颗,要求牙冠完整无隐裂、单根管、根尖孔发育完全等。去除牙根周围软组织、清洁、截冠统一长度至 20 mm、拔除牙髓,疏通根管,k 型锉预备至 80#,每更换大一号 k 型锉前应用 15% (质量分数)EDTA 溶液和 2.5% (体积分数)次氯酸钠溶液交替冲洗。预备好的牛牙置于生理盐水中 4℃冰箱备用。

1.2.2 实验分组 将已预备好的牛牙随机选 6 颗作为阴性对照组,其余 30 颗作为实验组用于建立体外粪肠球菌感染根管模型。每个样本均置于含 5 ml BHI 培养液中,高压灭菌(121℃、15 MPa、20 min),37℃厌氧培养(80%N₂、10%CO₂、10%H₂)24 h 后,培养液透明,说明灭菌效果可靠,则进行下一步的实验;若培养液浑浊,说明灭菌效果不可靠,则重新高压灭菌。

1.2.3 菌液制备 将-70℃保存的粪肠球菌标准株接种于 BHI 琼脂培养基上,37℃厌氧(80%N₂、10%CO₂、10%H₂)复苏培养 24 h,根据菌落形态、革兰染色镜检证实无杂菌污染后,挑选单个菌落于 BHI 液体培养基中培养 8 h 制备成菌悬液,并调节细菌浓度为 D(A₆₃₀)1.0。

1.2.4 建立感染根管模型 对照组:根管内不注入菌液,试管内加入 5 ml 无菌 BHI 培养液,隔日更换新鲜无菌 BHI 培养液。于实验结束时做扫描电镜观察。实验组:根管内注入菌液(菌液平齐根管口为准)后试管内加入 5 ml 无菌 BHI 培养液,隔日更换新鲜无菌 BHI 培养液。分别于培养 1、2、3、4、8 周随机选取 6 个标本扫描电镜观察。

1.2.5 扫描电镜标本的制备 高速金刚砂片水冷下将标本沿牙长轴颊舌向预备凹槽,槽深约 2 mm,用牙挺沿预备的凹槽轻撬将标本一分为二,随机选取一半经 2.5%戊二醛固定 24 h、酒精梯度脱水、干燥、离子溅射后置于扫描电镜下观察,照相并记录结果。

1.2.6 细菌浸润牙本质小管分级标准^[2] 参照 Love 细菌浸润牙本质小管分级标准,分析不同时段细菌在牙本质小管内的感染程度。

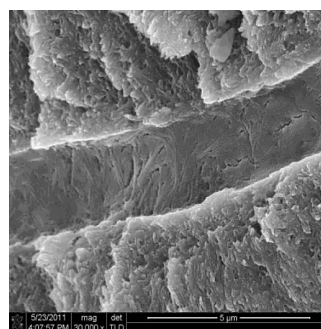
表 1 细菌浸润牙本质小管分级标准

分组	感染牙本质小管的数量	感染程度
0级	0 ↑	无
1级	1~20 ↑	轻度
2级	21~50 ↑	中度
3级	> 50 ↑	重度

2 结果

2.1 对照组结果

对照组见牙本质小管无玷污层覆盖,小管呈条状或有弯曲为缓坡状,管壁可见胶原纤维嵌入其中,彼此交织成网状,相邻小管近似平行排列,管间牙本质结构清晰(见图 1)。



牙本质小管呈条状,管壁的胶原纤维清晰可见

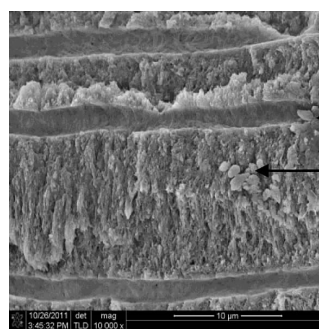
图 1 对照组扫描电镜图 (30 000 ×)

Fig.1 The control group SEM photo (30 000 ×)

2.2 实验组结果

2.2.1 培养 1 周结果 牙本质小管内未见粪肠球菌侵入,属 0 级。

2.2.2 培养 2 周结果 牙本质小管呈 1 级浸润状态,少数牙本质小管内见粪肠球菌侵入,亦见细菌在管间牙本质的分布。总体细菌数目少,呈圆形或椭圆形,分布稀疏(见图 2)。

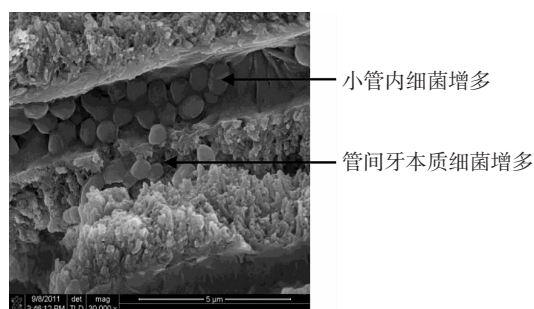


总体细菌数目少,分布稀疏

图 2 实验组 2 周扫描电镜图 (10 000 ×)

Fig.2 The test group 2 weeks SEM photo (10 000 ×)

2.2.3 培养 3 周结果 牙本质小管呈 2 级浸润状态,小管内及管间牙本质浸润的细菌增多(见图 3)。

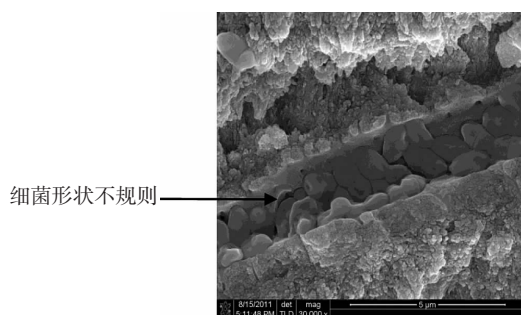


可见小管内及管间牙本质浸润的细菌增多

图 3 实验组 3 周扫描电镜图 (30 000 ×)

Fig.3 The test group 3 weeks SEM photo (30 000 ×)

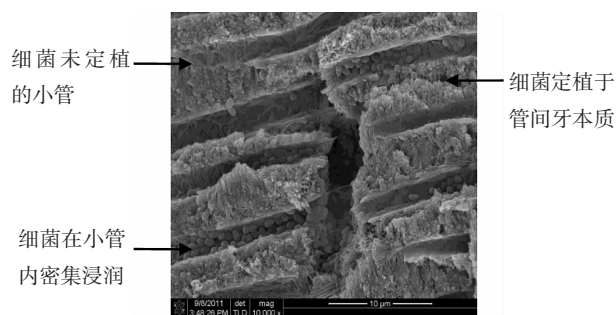
2.2.4 培养 4 周结果 牙本质小管呈 3 级浸润状态,小管内可见粪肠球菌密集浸润,细菌形状不规则(见图 4),呈圆形、多边形或扁形,紧密排列,侵入小管较深,且细菌定植密度与小管部位相关,冠 1/3 较根尖段密集。细菌密集浸润的牙本质小管呈间隔排列,即密集浸润小管其周围小管内较空虚,细菌仅少量定植或未定植(见图 5);仍见细菌定植于管间牙本质,其形状较规则,呈圆形或椭圆形,相互聚集成团。



可见细菌形状不规则

图 4 实验组 4 周扫描电镜图 (30 000 ×)

Fig.4 The test group 4 weeks SEM photo (30 000 ×)



细菌密集浸润的牙本质小管呈间隔排列

图 5 实验组 4 周扫描电镜图 (10 000 ×)

Fig.5 The test group 4 weeks SEM photo (10 000 ×)

2.2.5 培养 8 周结果 扫描电镜观察结果与培养 4 周时的结果相似。

3 讨论

离体牙感染根管模型是研究粪肠球菌感染的重要手段,目前国内常用其评价根管冲洗药物对粪肠球菌的抑菌效果^[5,6],而对粪肠球菌在牙本质小管内定植的研究目前仅见郭惠杰等^[12]的报道 1 篇,其仅观察培养 3 周后这一时点的细菌定植状态。同时,上述所有研究均采用人离体牙作为研究对象,存在标本采集困难、难以标化(供体的年龄、牙和根管发育等个体差异较大)等问题。与之相比,牛牙具有方便获得、易于标化、体积较大易于根管清理等优点,又由于其牙本质小管形态与人类牙齿相似,具有可比性,故本实验选用牛牙为研究对象,探讨用其构建感染根管模型的可行性,并观察不同时段细菌在牙本质小管内的定植模式。

以往研究采用的细菌培养方式有需氧和厌氧 2 种,本实验考虑到体内根管的实际情况更接近于厌氧环境,故采用厌氧培养方式,其结果显示:选取牛牙建立的粪肠球菌厌氧感染根管模型与以往研究中采用人离体牙所建的厌氧感染根管模型相比,建模成功时间^[9]和细菌在牙本质小管的定植模式^[13]相似,提示类似研究选用牛牙为实验对象具可行性和可比性。

本文沿用 Love 分级标准确定细菌浸润牙本质小管程度,结果显示:粪肠球菌初始定植于牛牙牙本质小管内的时间为 2 周。推测细菌的定植是通过其表面的粘附素粘附于牙本质胶原蛋白来完成,研究报道粪肠球菌表面的粘附素^[14]有:胶原结合蛋白(Ace)、肠球菌表面蛋白(Enterococcus surface protein, Esp),丝氨酸蛋白酶(Serine proteinase, Sp)等。Ace 通过识别宿主细胞外矩阵蛋白-胶原蛋白与之结合的部位介导粘附,并促进细菌间的聚集;大分子 Esp 在根管感染初期有利于粪肠球菌对牙本质胶原的粘附,小分子 Esp 在细菌定植完成后有利于粪肠球菌逃避宿主免疫系统的清除作用;Sp 主要通过暴露粪肠球菌表面的粘附部位和改变这些部位的粘附活性起间接作用。

本实验粪肠球菌重度浸润牙本质小管的时间为 4 周,这与谷苗等^[9]用人离体牙为研究对象观察到重度浸润牙本质小管的时间一致。然而也有学者报道出现重度浸润牙本质小管的时间为 3 周^[5,8],分析其时间不同的原因可能是标本处理和细菌培养环境存在差异:如标本保持根尖孔通畅相比用树脂封闭根尖孔的方式更利于培养液渗入根管内;另外,标本如去除了牙根外的牙骨质,细菌也更易于侵入牙本质小管内;再有就是细菌在有氧和营养丰富的培养环境也分别较其在厌氧和饥饿环境生长好。

实验将培养时间延长至 8 周后观察,相较于 4 周时的模型并未发现粪肠球菌感染牙本质小管的数量和深度有明显增加,推测由于 4 周时的模型已进入重度浸润期,此时小管内细菌数量多,牙本质小管狭小的空间内有限的养分已不能

满足其生长,细菌生长受抑制,故虽延长培养时间至 8 周但所观察到的细菌数量、浸润深度与 4 周时差异不大。

实验观察到粪肠球菌在牙本质小管内的定植模式呈冠 1/3 较根尖段密集,与国内学者郭惠杰等^[12]的结果一致。可能由于在离体牙培养状态,其近根管口营养多且冠 1/3 段的牙本质小管直径粗。而体内真实情况却相反,细菌在根尖段较密集^[15],这不仅是由于冠方的细菌易于被机械和化学消毒方法所清除,而且充填后的根管内可获得的养分极少,残存的细菌通过根尖孔汲取来源于牙槽骨和牙周韧带的血清作为自身的营养物质,故根尖段不仅易残存细菌且也利于细菌生存。

本实验注意到细菌密集浸润的牙本质小管其周围小管内较空虚,与国外学者 Chivatxaranukul^[13]的研究结果相似。考虑一方面构成牙本质小管壁的管周牙本质矿化程度可能存在不同,矿化程度低的牙本质小管更利于细菌定植,另一方面也可能是相邻牙本质小管内的细菌相互竞争养分所致。

本研究发现粪肠球菌还可在管间牙本质定植,这在以往研究中未见报道,然而其原因尚不明。有学者^[13]曾将人离体牙剖开浸于粪肠球菌菌液中,培养 2 h 后发现细菌大量定植于管间牙本质,而小管内较空虚,认为是由于管间牙本质胶原纤维较多,其矿化程度较管周牙本质和小管内壁低,因此更利用细菌定植,故大量细菌直接粘附于管间牙本质。然而本实验采用的是完整的根管模型,标本未经剖开,管间牙本质未直接暴露于菌液中。但在本研究中仍观察到粪肠球菌在管间牙本质的密集浸润,推断粪肠球菌在牙根完整时粘附、定植于管间牙本质的原因可能是,牙本质小管内的细菌可穿透管壁疏松的胶原纤维进入管间牙本质并选择性定植于此。由于管间牙本质是机械预备和化学药物消毒所难以到达的区域,推断此部位细菌可逃避常规根管预备和消毒方法的清除,在粪肠球菌根管再感染过程中扮演重要角色。根据以往的报道,牙本质小管内的细菌尚不能被彻底清除,而本研究观察到的细菌在管间牙本质的定植现象则更增加了临床治疗难度,因此探寻其原因,并寻找一种能有效杀灭粪肠球菌防止其再感染的消毒药物至关重要,而牛牙厌氧培养粪肠球菌感染根管模型是一种较好的研究手段。

参 考 文 献

[1] Sun H B, Deng J, Wang Y, et al. A molecular biology study on the microorganism within teeth with failed root canal therapy[J]. J Pract

Stomatol, 2010, 26(1):96-99.

[2] Love R M. Enterococcus faecalis—a mechanism for its role in endodontic failure[J]. Int Endod J, 2001, 34(5):399-405.

[3] Vezzani M S, Pietro R, Silva-Sousa Y T, et al. Disinfection of root canals using Er:YAG laser at different frequencies[J]. Photomed Laser Surg, 2006, 24(4):499-502.

[4] Johal S, Baumgartner J C, Marshall J G, et al. Comparison of the antimicrobial efficacy of 1.3% NaOCl/BioPure MTAD to 5.25% NaOCl/15% EDTA for root canal irrigation[J]. J Endod, 2007, 33(1):48-51.

[5] Liu Y, Li H, Huang H, et al. Antimicrobial efficacy of five endodontic irrigants using an in vitro model infected by enterococcus faecalis[J]. J Modern Stomatol, 2009, 23(3):242-244.

[6] Wang Q Q, Yao N, Zhao X Y, et al. Antimicrobial effect of photo-activated disinfection therapy vitro and in vivo studies[J]. International oral medical journal, 2010, 37(4):392-395.

[7] Saleh I M, Ruyter I E, Haapasalo M, et al. Survival of Enterococcus faecalis in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro[J]. Int Endod J, 2004, 37(3):193-198.

[8] Zapata R O, Bramante C M, Gasparoto T H, et al. Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of enterococcus faecalis in infected dentin[J]. J Endod, 2008, 34(10):1198-1201.

[9] Gu M, Chen X X, Lin Y, et al. In Vitro Antimicrobial efficacy of root canal lubricant and sodium hypochlorite[J]. Journal of Oral Science Research, 2009, 25(4):462-465.

[10] Siqueira J F, Uzeda M E, Fonseca M E F, et al. A Scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria[J]. J Endod, 1996, 22(6):308-310.

[11] Akpata E S, Blechman H. Bacterial Invasion of Pulpal Dentin Wall in vitro[J]. J Dent Res, 1982, 61(2):435-438.

[12] Guo H J, Yue L. Patterns of Enterococcus faecalis in infected root canals: A in vitro study[J]. Journal of Peking University (Health Sciences), 2009, 12(6):699-701.

[13] Chivatxaranukul P, Dashper S G, Messer H H, et al. Dentinal tubule invasion and adherence by Enterococcus faecalis[J]. Int Endod J, 2008, 4(1):873-882.

[14] Duggan J M, Sedgley C M. Biofilm formation of oral and endodontic Enterococcus faecalis[J]. J Endod, 2007, 33(7):815-818.

[15] Nair P N, Henry S, Cano V, et al. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2005, 99(2):231-252.

(责任编辑:冉明会)