

临床研究

DOI: 10.11699/cyxb20130733

波特兰水门汀对 3 种微生物的体外生长抑制实验研究

王 燕¹, 林居红¹, 张红梅¹, 刘明方²

(1. 重庆医科大学附属口腔医院儿童牙病中心及口腔预防科、口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147;

2. 重庆医科大学实验教学中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:比较波特兰水门汀(portland cement, PC)、无机三氧化物聚合物(mineral trioxide aggregate, MTA)、玻璃离子水门汀(glass ionomer cement, GIC)对 3 种微生物的体外生长抑制能力。**方法:**采用琼脂扩散法检测 3 种材料对 3 种微生物的体外生长抑菌效果。将含有 1.5×10^8 CFU/ml 活菌的白色念珠菌、大肠杆菌、变形链球菌菌悬液分别接种于不同的琼脂平板, 将新鲜调拌的直径 5 mm、厚度 1 mm 的材料片等间距放入琼脂平板内, 37 °C 恒温培养 24~48 h 后, 测量材料周围的抑菌环直径大小, 根据抑菌环直径大小评价 3 种材料的体外细菌生长抑制能力。**结果:**研究发现 3 种材料对变形链球菌均无抑菌环产生; GIC 对 3 种微生物均无抑菌环产生; PC 及 MTA 对白色念珠菌均有抑菌效果, 且 PC 产生的抑菌环直径大于 MTA, 差异具有统计学意义 ($P=0.0029$); PC 及 MTA 对大肠杆菌均有抑菌效果。**结论:**PC 对白色念珠菌及大肠杆菌有一定抑制生长能力, 可考虑进一步深入研究, 为其临床应用提供理论支持。

【关键词】波特兰水门汀; 无机三氧化物聚合物; 玻璃离子水门汀; 抑菌

【中国图书分类法分类号】R781.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-04

Antimicrobial effects of portland cement against three different microorganisms: an in vitro study

WANG Yan¹, LIN Juhong¹, ZHANG Hongmei¹, LIU Mingfang²

(1. Department of Children's Dental Center and Dental Prevention, the Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing Research Center for Oral Diseases and Biomedical Science;

2. Experimental Teaching Center, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To evaluate the antimicrobial activity of portland cement(PC), mineral trioxide aggregate(MTA) and glass ionomer cement(GIC) against three microorganisms: *candida albicans*, *escherichia coli*, *streptococcus mutans* through the Agar diffusion method. **Methods:** The sealers under study were handled according to the manufacturer's instruction. All sealers were handled with diameter of 5 mm and thickness of 1 mm then placed in the wells which contains 1.5×10^8 CFU/mL microorganisms suspension of *candida albicans*, *escherichia coli* and *streptococcus mutans*, respectively immediately after being mixed. After the sealers set, the agar plates were incubated at 37 °C for 24~48 h to allow the microorganisms to grow and reagents to diffuse through the culture medium. After incubation, diameter of inhibition zones was measured. **Results:** No antimicrobial activity of all the three materials was observed on *streptococcus mutans*. No inhibition zone of GIC was observed on the three microorganisms. Diameter of inhibition zone of PC on *candida albicans* was bigger than that of MTA with significant difference between two groups ($P=0.0029$). **Conclusions:** PC could effectively inhibit the growth of *candida albicans* and *escherichia coli*, therefore PC is considered to have certain antifungal and antibacterial properties.

【Key words】portland cement; mineral trioxide aggregate; glass ionomer cement; antimicrobial effect

各种原因导致牙髓坏死后, 有效的牙髓治疗方法是使用一定的器械清理和预备成形根管, 并且使用化学性药物冲洗以清理根管, 从而清除或减少根管内微生物及其代谢产物。然而, 仍可能有一部分

细菌存在于高度复杂、变异的根管解剖系统中, 这些细菌中的任意一种都可能引起再感染, 继而导致牙髓治疗失败。同时, 慢性牙髓坏死时, 根尖骨质的破坏可能会带来源于牙周组织的细菌感染, 并且这些细菌能够抵御宿主的防御功能, 导致化学药物冲洗无效。大多数牙髓感染存在混合性、多细菌的感染情况, 并且绝对厌氧菌及兼性厌氧菌占优势^[1], 另外有报道显示部分需氧菌也有一定优势, 还有一些是常规牙髓治疗很难控制的真菌感染^[2]。

作者简介: 王 燕, Email: 107086328@qq.com,

研究方向: 儿童口腔医学及预防口腔医学。

通信作者: 张红梅, Email: zhm5025@yahoo.com.cn。

基金项目: 重庆市卫生局 2011 年医学科技计划资助项目(编号: 2011-2-190)。

感染控制后需行根管充填治疗,而对于根尖破坏严重或根尖孔闭合不全的患者,在根管充填之前需使用一些牙科水门汀进行根尖部充填,即常用的根尖倒充填术及根尖屏障术。玻璃离子水门汀(glass ionomer cement, GIC)是无机三氧化物聚合物(mineral trioxide aggregate, MTA)问世之前常用的根尖部充填材料,因此学者们普遍认为用于根尖部充填材料的首选要点是需要有抑菌性,具有清除根管内未被机械、化学药物清除微生物的能力^[3]。研究表明,根管治疗后引起治疗失败的主要微生物是^[4]:白色念珠菌、大肠杆菌、链球菌属等。本实验选用白色念珠菌、大肠杆菌、变形链球菌作为研究对象,初步评价波特兰水门汀(portland cement, PC)、MTA、GIC 的抑菌性能。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

PC(山东威尔斯国际贸易公司),MTA(ProRoot MTA, Dentsply, USA),GIC(3M ESPE, Germany)。材料调拌均按照厂家使用说明,MTA 以粉剂及液剂 3:1 调拌;PC 按照粉剂及液剂 2.5:1 调拌;GIC 以粉剂及液剂 2:1 调拌;使用模具制备成直径 5 mm,厚 1 mm 的圆盘状。

1.2 实验菌株的选择及菌悬液配置方法

1.2.1 实验菌株 选择白色念珠菌(ATCC 10231)、大肠杆菌(ATCC 25922)和变形链球菌(ATCC 25175)为研究对象。

1.2.2 细菌的培养及菌悬液配置方法 将冻干保存的菌种白色念珠菌、大肠杆菌采用分区划线的方法将细菌接种于水解酪蛋白琼脂培养基(Muller-Hinton, M-H)上复苏,37 °C 恒温培养 24 h,移取大小形态一致的菌落进行生化鉴定,显微镜下进行形态观察,连续传代 2 次后,选取大小形态一致的菌落溶于无菌 PBS 缓冲液中,采用麦氏比浊法制备菌悬液 1.5×10^8 CFU/ml 备用。

将冻干保存的菌种变形链球菌采用分区划线的方法将细菌接种于牛心脑浸液琼脂培养基(brain heart infusion, BHI)上复苏,37 °C 微需氧活化培养 48 h,移取大小形态一致的菌落进行生化鉴定,显微镜下进行形态观察,连续传代 2 次后,选取大小形态一致的菌落溶于无菌 PBS 缓冲液中,采用麦氏比浊法制备细菌悬液 1.5×10^8 CFU/ml 备用。

1.3 培养基的配置方法

1.3.1 M-H 琼脂培养基成分及比例 配置方法参照肖晓蓉^[5],略有修改。牛肉浸出物 1 000 ml;水解酪蛋白 17.5 g;可溶性淀粉 1.5 g;琼脂 17 g。将上述各成份混合,静置 10 min 并充分混合,加热使之充分溶解,待冷却后调 pH 值至 7.4~7.6,分装后高压灭菌(116~118 °C, 20 min),供白色念珠菌及大肠杆菌培养用。

1.3.2 BHI 琼脂培养基配制及成分 配置方法参照肖晓蓉^[5],略有修改。牛心浸出液 250 ml;牛脑浸出液 200 ml;胰蛋白胨 10 g;酵母提取物(粉)50 g;葡萄糖 2 g;盐酸半胱氨酸溶液 4 ml;VPI 盐液 50 ml;刃天青(0.1%)50 ml;蒸馏水加至 1 000 ml。按上述成分及含量配制成 1 000 ml 的 BHI 基础培养基,混合,加热使之充分溶解,待冷却后调 pH 值至 7.4~7.6,分装为每锥形瓶 100 ml 后高压(116~118 °C)灭菌 20 min,供变形链球菌培养用。

1.4 实验方法

抑菌实验采用琼脂扩散法。将材料按照厂家说明调拌,制备成直径 5 mm、厚 1 mm 的材料片,将新鲜调拌并制备成片的材料迅速铺在涂有 1.5×10^8 CFU/ml 细菌悬液的琼脂培养基上,其中白色念珠菌、大肠杆菌使用 M-H 琼脂培养基,37 °C 培养 24 h;变形链球菌使用 BHI 琼脂培养基,37 °C 微需氧活化培养 48 h。实验重复 6 次。

1.5 统计学分析

采用 SAS 9.1 统计软件对数据进行分析,对多组计量资料的比较采用方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 法。检验水准 $\alpha=0.05$,Bonferroni 法调整后检验水准 $\alpha'=0.05/3=0.0167$ 。

2 结果

3 种材料对变形链球菌均未见抑菌环产生,提示 3 种材料对变形链球菌均无抑菌效果($P=1.000$)。GIC 对 3 种微生物均无抑菌环产生,提示 GIC 对 3 种微生物均无抑菌效果($P=1.000$)。PC 对白色念珠菌产生的抑菌环直径(20.38 ± 1.16) mm,而 MTA 对白色念珠菌产生的抑菌环直径(16.01 ± 1.13) mm,两者差异具有统计学意义(Bonferroni $t=6.03, P=0.0029$),提示 PC 及 MTA 对白色念珠菌均有抑菌作用,且 PC 的抑菌效果优于 MTA。PC 对大肠杆菌的抑菌环直径(14.25 ± 1.23) mm,而 MTA 对大肠杆菌抑菌环直径(12.38 ± 1.03) mm,两者差异无统计学意义(Bonferroni $t=3.01, P=0.0720$),提示 PC 及 MTA 对大肠杆菌均有抑菌作用,但抑菌效果相当。结果见表 1、图 1~3。

表 1 3 种材料对 3 种细菌抑菌环直径的大小 (mm, $n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Diameter of inhibition zone on three test materials against the test microorganisms (mm, $n=6, \bar{x} \pm s$)

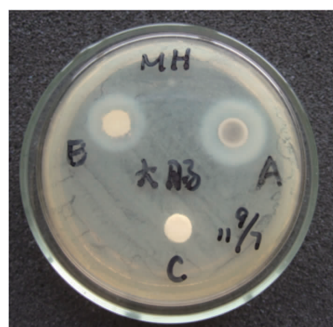
	白色念珠菌	大肠杆菌	变形链球菌	F 值	P 值
PC	20.38 ± 1.16^{abd}	14.25 ± 1.23^{ac}	0.00 ± 0.00	474.33	<0.000 1
MTA	16.01 ± 1.13^{ad}	12.38 ± 1.03^{ac}	0.00 ± 0.00	312.71	<0.000 1
GIC	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00		1.000 0
F 值	504.37	258.59			
P 值	<0.000 1	<0.000 1	1.000 0		

注:a,与 GIC 组的比较,差异有统计学意义($P<0.0167$);b,与 MTA 组的比较,差异有统计学意义($P<0.0167$);c,与变形链球菌组的比较,差异有统计学意义($P<0.0167$);d,与大肠杆菌组的比较,差异有统计学意义($P<0.0167$)



A. PC; B. MTA; C. GIC

图 1 3 种材料对白色念珠菌的体外抑菌环

Fig.1 Inhibition zones against *candida albicans* with three test materials

A. PC; B. MTA; C. GIC

图 2 3 种材料对大肠杆菌的体外抑菌环

Fig.2 Inhibition zones against *escherichia coli* with three test materials

A. PC; B. MTA; C. GIC

图 3 3 种材料对变形链球菌的体外抑菌环

Fig.3 Inhibition zones against *streptococcus mutans* with three test materials

3 讨 论

MTA 是 1993 年由 Lee 等^[6]首先发现并应用于牙髓治疗的一种材料,该材料在后来的临床应用过程中逐步用于根管侧穿和底穿修补术、盖髓术、根尖诱导成形术、根尖屏障术或根管充填及倒充填材料。MTA 能够有效封闭根管系统与其周围组织的交

通支,并且还具有无毒、无致癌作用、无遗传毒性、与周围组织相容性好、不溶解于组织液、结构稳定、方便操作、X 线阻射的特点^[7],因此学者们普遍认为 MTA 是一种理想的材料,并且将其作为标准对新材料进行相关性能评估。

价格是影响一种新材料推广应用的主要因素^[8]。虽然 MTA 有以上诸多优点,但是作为一种昂贵的牙科用材料,无法被更多牙病患者接受。MTA 由细腻的亲水颗粒组成,主要成分是硅酸三钙、硅酸二钙、铝酸三钙、铝酸四钙、氧化铋^[9],氧化铋是使其具有 X 线阻射性的成分,MTA 的 X 线阻射性明显高于牙胶尖和牙本质,在 X 线片上容易与周围组织区分。近年来关于 MTA 相似材料的研究较为广泛,其中 PC 是国外学者们研究的热点。PC 原是一种建筑材料,研究显示 MTA 中含有 75% 的 PC^[5],PC 与 MTA 的主要化学成分相似,仅少了显影用的氧化铋;早在 10 年前 PC 即在实验研究中被用作根尖倒充填材料,研究显示 PC 用于直接盖髓术时可在短期内促进牙髓再矿化,且二者在促进再矿化过程中有同样的作用机制^[9]。目前业界 PC 价格明显低于 MTA,且国内关于 PC 相关性能的报道较少,本课题组旨在探讨 PC 应用于口腔临床操作并替代 MTA 的可行性。

微生物的存在对牙髓病、根尖周病以及牙髓病治疗失败的发展和预后起着重要的作用。牙髓治疗的失败或意外状况如侧方穿孔的发生,可由外科或非外科的治疗方法处理而取得成功,治疗效果依赖于成功的控制微生物和感染物质带来的感染,以及有效的根尖封闭,另外穿孔所在部位对组织再感染也有一定影响。现存的任何材料均无法提供完好的根尖封闭,学者们希望材料不仅可以有良好的封闭效果,还能够提供一定的抑菌性能,以阻止根尖部残存微生物的生长。研究表明,根管治疗后引起治疗失败的主要微生物是^[14]:白色念珠菌、大肠杆菌、链球菌属等。白色念珠菌是一种能在不同生物表面形成生物膜的真菌,并且在根管内初次感染及再感染中占主要优势^[10-11]。大肠杆菌是一种可能从根管内再次复活的细菌,并且在抑菌性实验中它常被作为标准菌株^[12-13]。变形链球菌在最初牙髓损伤和后续牙髓病理表现中也有着重要的影响作用^[14]。

大多数微生物在偏中性的 pH 值范围内可生长良好,在酸性或碱性环境中,微生物生长繁殖均会受到不同程度的影响。本实验中,PC 对于白色念珠菌、大肠杆菌的抑菌环均比 MTA 直径大,此实验结果与国外学者先前的研究结果相似^[15-16]。PC 作为与

MTA 主要化学成分相似的材料,两者的主要成分为钙盐,钙盐在水合过程中生成氢氧化钙,可营造一个较高的 pH 值环境,这可能与 2 种材料显示出的抑菌性有关联。有研究报道^[3]MTA 水合后 pH 值约为 10.2,并且在 3 h 内升至 12.5,这个较高的 pH 值可维持 24 h 左右。另外,PC 在 MH 琼脂基质上的扩散能力可能比 MTA 强。因此本研究推测,作为根尖部充填材料抑制根管内微生物生长方面,PC 优于 MTA。

本实验采用琼脂扩散法评价 PC、MTA、GIC 3 种材料的抑菌性能。琼脂扩散法是体外抑菌性实验最常用的实验方法,该方法可更好地模拟根管系统内材料的抑菌活性^[3,17]。使用琼脂扩散法,就相当于把材料充填于根管内,继而直接比较材料对根管内微生物的抑菌活性,实验结果可间接反映材料在该介质中的抑菌性。琼脂扩散法的实验结果高度依赖于材料在该介质中的扩散能力,然而不同的琼脂培养基和微生物的选择、对照和标准的微生物接种密度、培养条件、抑菌环直径的定点测量都可能影响琼脂扩散实验的结果。而对于变形链球菌,PC、MTA 均未见抑菌环产生,此实验结果与 Mohammad 等的实验结果^[18]有不同。Mohammad 等^[18]研究发现 PC 和 MTA 对变形链球菌均有抑菌作用,并且抑菌环大于白色念珠菌和大肠杆菌。根据本实验培养基选择结果:变形链球菌在 M-H 琼脂平板上不生长,而在 BHI 平板上生长良好;因此推测 PC、MTA 在 BHI 琼脂培养基上的扩散能力小于在 M-H 琼脂培养基上的扩散能力,从而导致了实验结果的差异。

本实验研究结果认为,PC 可有效抑制白色念珠菌和大肠杆菌增殖的能力,考虑 PC 有一定的抑制微生物生长的能力,可为 PC 的临床应用提供一定的理论支持。本课题组已完成 PC 封闭性的体外实验研究^[19],并将进一步探讨 PC 对更多根管内微生物体外生长抑制方面的研究以及其他相关生物学活性的进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Siqueira J F Jr, Roca I N. The microbiota of acute apical abscesses[J]. *J Dent Res*, 2009, 88(1): 61–65.
- [2] Gomes B P, Endo M S, Martinho F C. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections[J]. *J Endod*, 2012, 38(8): 1082–1086.
- [3] Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part I: chemical, physical, and antibacterial properties[J]. *J Endod*, 2010, 36(1): 16–27.
- [4] Vieira A R, Siqueira J F Jr, Ricucci D, et al. Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report[J]. *J Endod*, 2012, 38(2): 250–254.
- [5] 肖晓蓉. 口腔微生物学[M]. 成都: 四川大学华西口腔医学院出版社, 2002: 405–421.
- [6] Xiao X R. Oral microorganisms[M]. Chengdu: Huaxi Stomatology of Sichuan University press, 2002: 405–421.
- [7] Lee S J, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations[J]. *J Endod*, 1993, 19(11): 541–544.
- [8] Ribeiro D A. Do endodontic compounds induce genetic damage? a comprehensive review[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2008, 105(2): 251–256.
- [9] Oliveira M G, Xavier C B, Demarco F F, et al. Comparative chemical study of MTA and Portland cements[J]. *Braz Dent J*, 2007, 18(1): 3–7.
- [10] Saidon J, He J, Zhu Q, et al. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2003, 95: 483–489.
- [11] Siqueira J F, Sen B H. Fungi in endodontic infections[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2004, 97: 632–641.
- [12] 王 萍, 季 平, 唐 明, 等. 根管治疗失败病例根管内微生物分析[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(10): 1083–1086.
- [13] Wang P, Ji P, Tang M, et al. The study on the microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2007, 32(10): 1083–1086.
- [14] Basrani B, Santos J M, Pascon E, et al. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2003, 96(5): 618–624.
- [15] Heling I, Chandler N P. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules[J]. *Int Endod J*, 1998, 31(1): 8–14.
- [16] Hahn C L, Best A M, Tew J G. Cytokine induction by streptococcus mutans and pulpal pathogenesis[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(12): 6785–6789.
- [17] Tanomaru-Filho M, Tanomaru J M, Barros D B, et al. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement[J]. *J Oral Sci*, 2007, 49(1): 41–45.
- [18] Asgary S, Kamrani F A. Antibacterial effects of five different root canal sealing materials[J]. *Journal of Oral Science*, 2008, 50(4): 469–474.
- [19] McHugh C P, Zhang P, Michalek S, et al. pH required to kill *enterococcus faecalis* in vitro[J]. *J Endod*, 2004, 30(4): 218–219.
- [20] Mohammad H Z, Maryam J, Mahboubé N, et al. Comparative evaluation of antimicrobial activity of three cements: new endodontic cement (NEC), mineral trioxide aggregate (MTA) and Portland[J]. *Journal of Oral Science*, 2009, 51(3): 437–442.
- [21] 王 燕, 林居红, 罗 俊, 等. Portland Cement 用于根尖屏障材料的封闭性研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(3): 223–225.
- [22] Wang Y, Lin J H, Luo J, et al. Sealing ability of Portland cement as apical barrier: an in vitro study[J]. *J Third Mil Med Univ*, 2012, 34(3): 223–225.

(责任编辑: 冉明会)