

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.21.009

根管预备对粪肠球菌感染根管形成细菌渗漏的影响*

赵洁,曹祥莉,钟晓波[△]

(重庆医科大学附属口腔医院牙体牙髓科/口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室 401147)

[摘要] **目的** 建立粪肠球菌感染根管,以探讨离体条件下根管预备对细菌渗漏的影响。**方法** 将粪肠球菌接种于离体牙所制作的带模拟根尖周组织的根管内,建立 320 个体外模型(对照组 70 个,实验组 250),分别进行上 1/3,上 2/3,全长及超长等不同长度的根管预备,于 1、7、21、35、49、63 d 进行 PCR、SEM 检测及细菌培养。**结果** 超长组 1 d 检测到细菌,全长组 7 d 检测到细菌,其余组所有检测时间点均未检测到细菌。**结论** 本离体实验显示,对于粪肠球菌感染根管,在根管及根管下段未受干扰的情况下,细菌不会轻易穿出根尖孔,当根管下段受到干扰后,细菌会穿出根尖孔造成细菌渗漏。

[关键词] 体外模型;根尖周炎;粪肠球菌;细菌渗漏**[中图分类号]** R781.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)21-2907-03

The in vitro study of the bacterial leakage from infected root canal and the effect of the root canal preparation*

Zhao Jie, Cao Xiangli, Zhong Xiaobo[△]

(Department of Endodontics, the Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University/

Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147, China)

[Abstract] **Objective** To establish a root canal-apical complex model in vitro which were infected by enterococcus faecalis, so as to have a preliminary discussion on the effect of preparation to the formation of bacterial leakage. **Methods** Vaccinate the enterococcus faecalis into the model which were established in vitro. Set up 310 models, and make them randomly subjected to control group ($n=70$) and experimental group ($n=250$). The experimental group is separately divided into four groups through different root canal length to take a root canal preparation (interference). The work length were the crown 1/3, the crown 2/3, the full-length and the overhead. Then detect them by the means of PCR, SEM and germiculture on the day 1, 7, 21, 35, 49 and 63 after the interference. **Results** On the 1 d E. f could be detected in the group which was preparing beyond the apical; on the 7 d it could be detected in the group D which was preparing with full-length. It was not detected on the rest of the test group of all testing time points. **Conclusion** For the infected root canal by E. f, when the apical third of root canals were disturbed, bacteria could leakage out the root apical. And it is easier than when the root canal was not disturbed. In this experiment, root canal preparation could stimulate the formation of bacterial leakage.

[Key words] in vitro model; periapical periodontitis; enterococcus faecalis; bacterial leakage

运用常规根管治疗方法后仍迁延不愈的慢性根尖周炎(难治性根尖周炎)或根管治疗后病变未愈合或出现新的根尖周病变(根管治疗后疾病)是牙体牙髓科医生倍感棘手的难题。研究发现,约 35% 的根管治疗后出现根管治疗后疾病,有根管治疗后疾病的患牙再次根管治疗的成功率为 40%~85%。其主要因为来源于感染根管的细菌形成了根尖生物膜^[1],因此,防止细菌穿出根尖孔形成细菌渗漏是预防根尖生物膜的主要途径之一,从而减少根管治疗后疾病的发生。有学者认为,感染根管内的细菌以生物膜的形式存在,在未接受治疗时,细菌不易穿出根尖孔,根管治疗打破了根管内生物膜的平衡,扩增的浮游细菌增加了细菌穿出根尖孔的机会,或治疗本身直接推出根尖孔的细菌,在躲避了机体免疫机制后形成了根尖生物膜,从而形成难治性根尖周炎和根管治疗后疾病^[2-3]。本课题小组的前期研究显示,对于暴露在空气中所形成的感染根管,根管下段以下的预备对细菌渗漏的形成有促进作用。本文进一步研究根管预备对难治性根尖周炎的优势细菌^[4-5]——粪肠球菌形成细菌渗漏的影响,为临床预防根尖生物膜的形成提供参考。

1 材料与方

1.1 材料与仪器 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司),电泳仪(北

京市六一仪器厂),凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司),K 锉、流动树脂(美国 DENTSPLY 公司),细菌 DNA 提取试剂盒(Tiagen 公司),2×Master Mix(大连 Takara 公司),引物(上海生物工程公司),粪肠球菌(ATCC 29212)。

1.2 方法

1.2.1 离体牙纳入标准 选取患者因正畸减数拔除的单根前磨牙,年龄 14~25 岁,根尖孔发育完全,无龋坏、根尖周炎及牙周疾病,无根裂、根折或牙根吸收等明显的牙体组织缺陷。用刮匙去除牙根表面软组织和牙石,利用游标卡尺测量牙体长度:颊尖顶端至解剖根尖孔长度的基础上减去 1 mm。在 100 mL/L 甲醛溶液中室温保存备用。

1.2.2 粪肠球菌感染根管-根尖周组织复合体外模型的建立 按照王容等^[6]所建立的方法制作模型 20 个,抽取 10 个作为实验组进行开髓后接种粪肠球菌,于建模后 21 d 通过 16SrRNA 通用引物 PCR 法及粪肠球菌特异 16SrRNA 引物检测根尖周组织及根管内细菌。若对照组根尖周检测到细菌则说明模型制备不成功,重新制作模型;若对照组根尖周未检测到细菌,而实验组根管内也只检测到粪肠球菌则说明建模成功。

1.2.3 根管预备对粪肠球菌感染根管-根尖周生物膜形成的

* 基金项目:重庆市卫生局医学科研重点项目(2012-1-053)。 作者简介:赵洁(1990—),硕士,主要从事牙体牙髓病学的研究。 △ 通讯

表 1 用于本研究的预期 PCR 引物, 扩增子的大小和热循环参数

靶细菌	引物序列(5'-3')	大小(bp)	扩增循环
通用引物 16SrDNA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	1 505	94 °C 5 min (94 °C 15 s, 54 °C 15 s, 72 °C 45 s, 30 次循环) 72 °C 10 min; 4 °C
	ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT		
粪肠球菌 16SrDNA	CCG AGT GCT TGC ACT CA TTG G	112	95 °C 2 min (95 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 40 次循环) 72 °C 2 min; 4 °C
	CTC TTA TGC CAT GCG GCA TAA AC		

影响 同样方法建立模型 310 个, 分为对照组(A 组 $n=70$)、实验组($n=240$)。实验组做开髓处理后接种粪肠球菌, 对照组不做任何处理。全部置于三气培养箱(含 5% O₂, 85% N₂, 10% CO₂; 温度 37 °C)中, 于 21 d 随机抽取 10 个对照组模型通过 16SrRNA 通用引物 PCR 法检测根尖周组织细菌, 确定建模成功后, 对实验组通过相应干扰进行分组, 髓腔干扰组即 B 组($n=60$)、根管上 2/3 受干扰组即 C 组($n=60$)、全长受干扰组即 D 组($n=60$)及超长干扰组即 E 组($n=60$)。之后放入三气培养箱(含 5% O₂, 85% N₂, 10% CO₂; 温度 37 °C)中。5 组分别于干扰后 1、7、21、35、49、63 d 进行 PCR 检测(期间每 2 天用灭菌针管通过开髓孔滴入新鲜灭菌液态 BHI 培养基)。根据结果利用 SEM 进行 Ef 根尖生物膜观察并对根尖周细菌进行细菌培养。

1.2.4 样本采集及检测 样本采集: 在超净工作台中, 取下固定有离体牙的青霉素瓶塞, 之后收集根尖周 BHI 固态培养基于装有 1 mL 双蒸水的 1.5 mL 灭菌离心管中, 震荡 30 s 后吸取 100 μL 洗脱液作细菌培养, 其余洗脱液置 -20 °C 冰箱保存待检。样本检测: 样本室温下解冻后, 提取 DNA, 严格按照细菌 DNA 提取试剂盒说明书提取样本中细菌 DNA。电泳: PCR 扩增体系见表 1, 扩增产物用 2.0% 的琼脂糖凝胶检测。

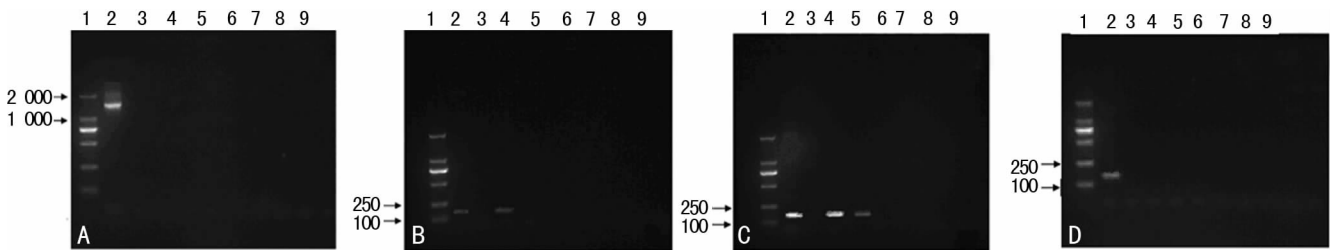
细菌培养方法: 在超净工作台中, 利用灭菌接种环沾取样

本根尖周区域可见白色菌膜的琼脂培养基, 之后用三段分区划线法将细菌接种于预先灭菌的 BHI 琼脂培养皿中, 注意每一段均需灭菌接种环。之后放置培养皿于三气培养箱(含 5% O₂, 85% N₂, 10% CO₂; 温度 37 °C)中。

2 结 果

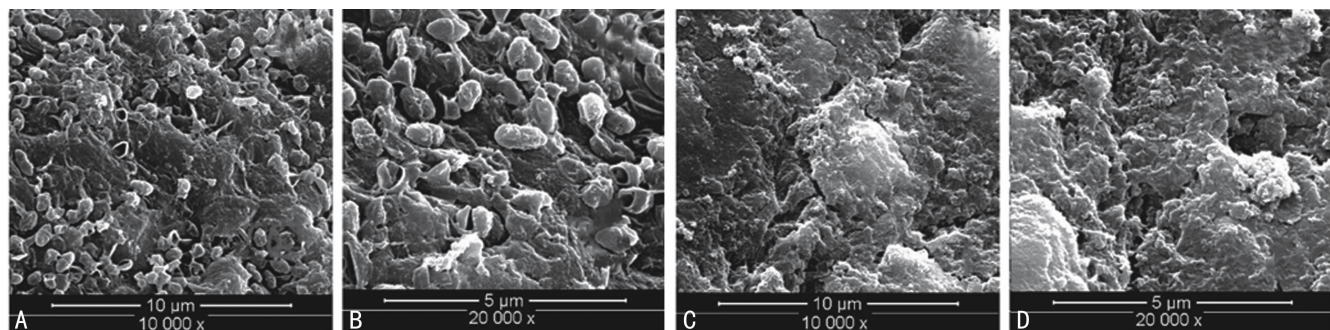
2.1 细菌检测 将提取出的根尖周细菌总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 2.0% 的琼脂糖凝胶检测。建模后接种粪肠球菌, 21 d 时 A、B、C、D、E 5 组根尖区样本均未扩增出 16SrDNA 通用引物片段, 见图 1a。根管预备干扰后 1 d, E 组根尖区样本扩增出粪肠球菌 16SrDNA 特异性引物片段, 其余各组均未检测到, 见图 1b。根管预备干扰后 7 d, D 组根尖区样本亦扩增出粪肠球菌 16SrDNA 特异性引物片段, A 组、B 组及 C 组仍未检测到, 见图 1c。根管预备干扰后 21、35、49、63 d, A、B、C 组均未检测到, 见图 1d。图 1 中阳性对照组、双蒸水空白对照组为 PCR 特有的对照组。

2.2 根尖周生物膜电镜扫描结果 对根尖区扩增出粪肠球菌 16SrDNA 特异性引物片段的样本进行扫描电镜观察。结果显示, D 组中根尖区粪肠球菌呈团状附着于根壁, 菌体被无定性基质包裹形成生物膜结构。A 组则明显无任何细菌附着。见图 2。



A、B、C: 1 为标记物; 2 为阳性对照组; 3 为双蒸水空白对照组; 4 为 E 组; 5 为 D 组; 6 为 C 组; 7 为 B 组; 8 为 A 组。D: 1 为标记物; 2 为阳性对照组; 3 为双蒸水空白对照组; 4~5 为 C 组; 6~7 为 B 组; 8~9 为 A 组。

图 1 根尖区样本 PCR 扩增产物电泳图

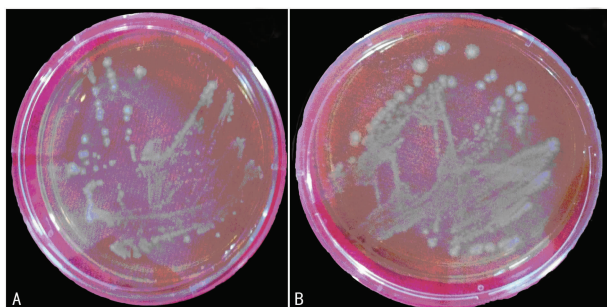


A、D 组根尖周扫描可见粪肠球菌($\times 10\ 000$); B、D 组粪肠球菌被无定性基质包裹形成生物膜结构($\times 20\ 000$); C: A 组根尖周扫描电镜结果未见细菌侵入($\times 10\ 000$); D: A 组根尖周扫描电镜结果未见细菌侵入($\times 20\ 000$)

图 2 根尖区样本电镜扫描图片

2.3 细菌培养 对检测到细菌的 D、E 组进行根尖周细菌培 养, 两组各 10 个样本, 结果显示, 均为粪肠球菌活菌且无杂菌,

见图 3。



A: D 组 7 d 根尖周细菌培养均为粪肠球菌, 无杂菌且为活菌; B: E 组 7 d 根尖周细菌培养均为粪肠球菌, 无杂菌且为活菌。

图 3 细菌培养结果

3 讨论

研究显示, 难治性根尖周炎及根管治疗后疾病的原因主要是根尖生物膜的形成^[7-8]。而对于牙周健康的患牙, 根尖生物膜的细菌则来源于感染根管^[9-10]。有学者通过研究拔除的患牙发现, 未经治疗的慢性根尖周炎患牙, 在根尖周不易检出根尖生物膜的存在, 而经过治疗的患牙, 反而容易检出根尖生物膜^[11-12], 提示根管治疗本身, 因打破了根管内细菌生物膜的平衡, 增加了细菌穿出根尖孔导致细菌渗漏的可能。

本实验将粪肠球菌接种于体外模型中的离体牙根管中, 待形成感染根管(21 d)后对其进行根管预备干扰^[13]。同时应用 PCR 具有特异性及敏感性的粪肠球菌引物检测其 16SrDNA 来鉴别, 快速, 灵敏度高^[14]。但因 PCR 并不能说明细菌的活性, 因此在实验最后进行细菌培养, 从而验证根尖周粪肠球菌生物膜为活菌, 进一步证明实验的可行性及准确性。

在根管预备前检测 A、B、C、D、E 组根尖周均未检测粪肠球菌; 预备后 1 d 时, E 组根尖周即检测到粪肠球菌; 7 d 时, D 组检测到粪肠球菌, 而 A、B、C 组根尖周在所有检查时间点均未检测到粪肠球菌。推测原因, 超长预备, 器械穿出了根尖孔, 可将细菌直接推出根尖孔; 全长预备, 临近根尖孔的生物膜受到干扰, 增加的浮游细菌容易穿出根尖孔; 而根管上 2/3 预备, 增加的游离细菌距离根尖孔有距离, 不易穿出根尖孔, 因而在根尖周未发现细菌。

对于机体, 有免疫机制的存在, 即使细菌穿出了根尖孔, 并不意味着它就能存活、生长繁殖并形成生物膜^[15]。机体免疫机制对细菌渗漏的影响, 是今后进一步研究的课题。

本实验结果提示, 在不考虑免疫机制的情况下, 超出根尖孔的预备和根管下段的预备对细菌渗漏甚至细菌生物膜的形成有促进作用, 为根管治疗后疾病及难治性根尖周炎埋下隐患。因此对于可能存在免疫缺陷者感染根管, 在实际临床操作中, 可先行根管上 2/3 预备并封药消毒, 以减少细菌量及其活性。再行根管全长预备并避免器械超出根尖孔。或可一定程度上预防细菌穿出根尖孔造成细菌渗漏, 从而减少难治性根尖周炎及根管治疗后疾病的发生。

参考文献

[1] 郑颖, 樊立洁, 谷志远. 根管生物膜的研究进展[J]. 实用

口腔医学, 2010, 26(2): 252-254.

- [2] Siqueira JF Jr, Lopes HP. Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study[J]. *Int Endod J*, 2001, 34(3): 216-220.
- [3] Iu A N, Plakunov VK. Biofilm—"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms? [J]. *Mikrobiologiya*, 2007, 76(2): 149-163.
- [4] Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, et al. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications[J]. *J Endod*, 2005, 31(1): 30-36.
- [5] Wang QQ, Zhang CF, Chu CH, et al. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis[J]. *Int J Oral Sci*, 2012, 4(1): 19-23.
- [6] 王容, 钟晓波. 根管——根尖周复合体外模型的建立[J]. *重庆医学*, 2014, 43(29): 3907-3909.
- [7] Chen MY, Chen KL, Chen CA, et al. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures[J]. *Int Endod J*, 2012, 45(3): 294-305.
- [8] Wang J, Jiang Y, Chen W, et al. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis[J]. *J Endod*, 2012, 38(7): 954-959.
- [9] Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, et al. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis[J]. *J Endod*, 2002, 28(10): 679-683.
- [10] 尹仕海, 谭静, 汪莉, 等. 慢性根尖周炎患牙根尖生物膜的细菌学研究[J]. *口腔医学研究*, 2008, 24(6): 615-618.
- [11] 郭惠杰, 王嘉德. 慢性根尖周炎患牙根尖外表面的细菌生物膜[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2009, 21(4): 571-574.
- [12] 谢方方, 陈文霞, 何克新. 根管治疗失败感染根管中微生物定植模式研究[J]. *现代口腔医学*, 2007, 21(5): 538-539.
- [13] 郭慧杰, 岳林. 粪肠球菌在根管内定植模式的体外研究[J]. *北京大学学报*, 2009, 41(6): 699-701.
- [14] Moreau MM, Eades SC, Reinemeyer CR, et al. Illumina sequencing of the V4 hypervariable region 16S rRNA gene reveals extensive changes in bacterial communities in the cecum following carbohydrate oral infusion and development of early-stage acute laminitis in the horse[J]. *Vet Microbiol*, 2014, 168(2/3/4): 436-441.
- [15] 樊明文. 牙体牙髓病学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 181-183.

(收稿日期: 2015-02-08 修回日期: 2015-03-05)