

牙体充填材料表面粗糙度对常见口腔链球菌黏附力的影响

SPM-015

摘要：龋病是在以细菌为主的多因素作用下，牙体硬组织发生慢性破坏的疾病。菌斑生物膜是继发龋的始动因素，细菌对牙齿和充填材料表面的黏附是菌斑生物膜形成的关键，而充填材料表面的粗糙度对细菌黏附的影响最大。本实验采用原子力显微镜（AFM）观察不同粗糙度的复合树脂和玻璃离子水门汀表面的微观形貌，并原位测量细菌对材料表面的黏附力。通过分析细菌对充填材料表面黏附的微观力学机制，为临床牙体充填材料表面形貌的处理和材料的选择提供理论依据，对减少口腔细菌的黏附和预防继发龋具有指导意义。

关键词：原子力显微镜 黏附力 充填材料 表面粗糙度 口腔链球菌属

龋病是在以细菌为主的多因素作用下，牙体硬组织发生慢性进行性破坏的疾病。龋病经充填治疗后，细菌在牙体和充填材料交界处滞留，易引起微渗漏，发生继发龋，是导致龋病治疗失败的主要原因之一。菌斑生物膜是继发龋的始动因素，细菌对牙齿和充填材料表面的黏附是菌斑生物膜形成的关键步骤。材料表面的物理特性，如粗糙度、表面电荷和疏水性等均能影响细菌的定植和黏附，其中粗糙度对细菌黏附的影响最大。近年来，人们对菌斑生物膜形成的研究较多，但对细菌在填充材料表面黏附的初始阶段及其黏附机制研究较少。原子力显微（atomic force microscope, AFM）因具有原子级的分辨率已被广泛用于测量材料表面的原子级形貌，通过力-距离曲线分析能够直接定量获得细菌与材料表面之间及微生物之间的相互作用力，灵敏度高，可重复性好，是一种

理想的探测细菌与生物材料之间基本相互作用力的方法。目前 AFM 已用于口腔细菌黏附力的研究，但利用 AFM 定量研究致龋菌对充填材料表面黏附的力学机制还较少。

本实验采用扫描探针显微镜观察不同粗糙度的复合树脂和玻璃离子水门汀（glass ionomer cement, GIC）表面的微观形貌；并选取与龋坏密切相关的先锋菌（血链球菌、缓症链球菌）和致龋菌（变异链球菌、表兄链球菌）各两种，通过黏附缓冲液模拟口腔内环境，利用 AFM 原位测量细菌对材料表面的黏附力，考察细菌在两种材料表面黏附力的差异，比较先锋菌和致龋菌对不同材料表面黏附力的大小。通过分析细菌对充填材料表面黏附的微观力学机制，为临床牙体充填材料表面形貌的处理和材料的选择提供理论依据，对减少口腔细菌的黏附和预防继发龋提供指导。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津扫描探针显微镜 SPM-9600



图 1 岛津扫描探针显微镜 SPM-9600

1.2 分析条件

功能模式：相位模式、接触模式

扫描速度：1 Hz

探针型号：CSC37/tipless/Cr-Au

扫描器：30 μm x 30 μm x 5 μm

■ 结果与讨论

2.1 样品的制备与形貌的表征

首先采用模具将 Z250 型光固化复合树脂和富士 IX 型玻璃离子水门汀 (GIC) 制备成直径 1 cm、厚 2 mm 的圆片形样品，调磨使其上下平行，随机分为 4 组，每组 3 个样品。然后在抛光机上依次用 250、1000、2000、3000 目耐水砂纸将样品进行梯度打磨，最终形成表面粗糙度为 300、200、100 和 10 nm 的表面。打磨结束后，用去离子水冲洗样品表面 30 s，超声清洗 10 min，自然干燥。使用岛津 SPM-9600 对两组材料的表面进行形貌表征和粗糙度测量，其结果如图 2 和表 1 所示。由图 2 可知，两种材料在粗糙度为 10 和 100 nm 时，样本表面较平滑，有轻微的划痕和小的裂缝；粗糙度为 200 和 300 nm 时，样品表面的划痕和裂缝明显，甚至有孔洞样结构。由表 1 可知，样品表面的粗糙度 Ra 值与粗糙度分级相符。

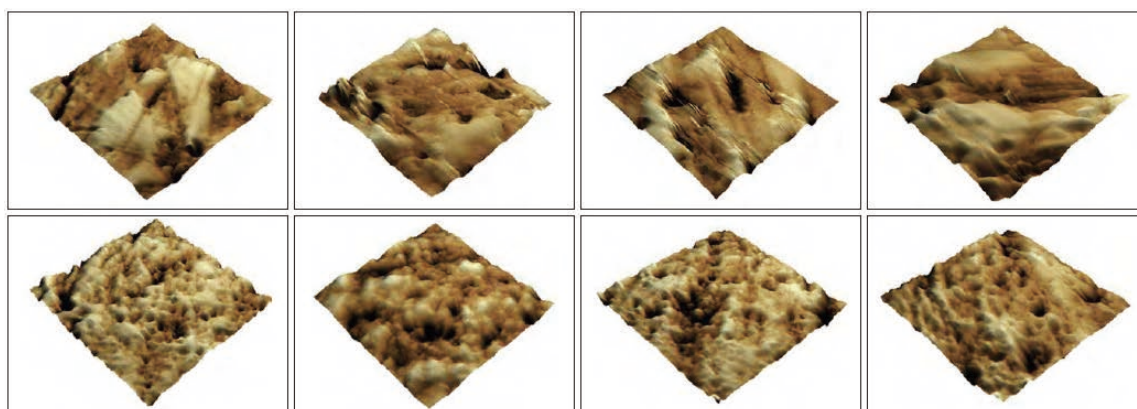


图 2 GIC 和复合树脂的 AFM 形貌图

上：GIC；下：复合树脂；从左至右粗糙度分别为 10、100、200、300 nm

表 1 不同表面粗糙度的复合树脂和 GIC 的 Ra 值

组别	表面粗糙度分级 /nm			
	10	100	200	300
GIC	11.19±1.43	97.74±3.98	201.46±4.78	301.94±12.32
复合树脂	11.69±1.71	104.36±4.79	197.53±6.40	299.38±11.72

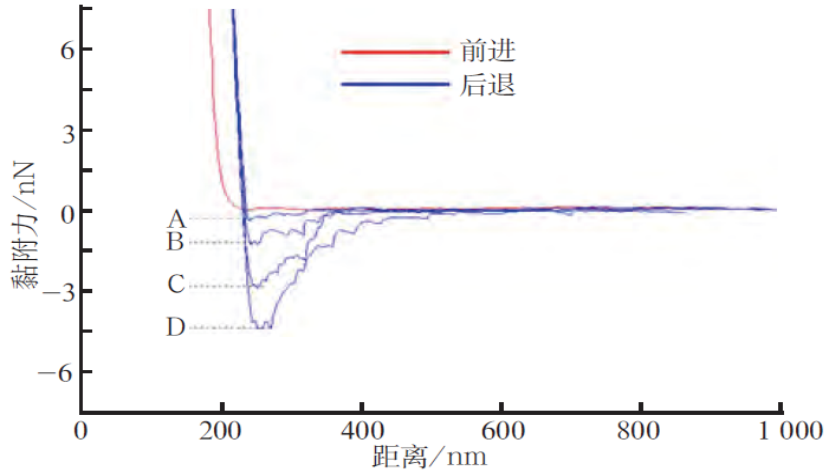
2.2 细菌的培养及 AFM 探针的处理

将血链球菌 ATCC10556、缓症链球菌 ATCC700610、变异链球菌 ATCC25175 以及表兄链球菌 ATCC33478 分别加入 10 mL 脑心浸液肉汤培养基中，在 37 °C 下兼性厌氧环境 (70% N₂+20% CO₂+10% H₂) 中，增菌培养 12 h，离心 (1500 g, 15 min) 后收集细菌沉淀团块，用 PBS 洗 2 次以去除残余培养基，最后加入 1 mL PBS 重悬，以利于增加细菌与探针的静电作用。在冰水浴中以 8 W 功率超声振荡 3 次，每次 10 s，利用超声分散细菌团块并断裂链状结构，形成细菌悬液。

测试前需要对所用的 AFM 探针进行处理。选用型号为 CSC37/tipless/Cr-Au 的无尖探针，在光学显微镜下检查探针表面是否有碎屑等杂质，合格后在紫外线下消毒 5 min，将探针固定在自制显微操作仪上，将探针的悬臂梁尖端 2/3 没入 0.01% 聚左旋赖氨酸中 3 min，使得探针表面带正电荷，取出自然干燥 2 min，然后浸入新制备的细菌悬液中 5 min，将细菌固定在悬臂梁上，随后立即进行测试。

2.3 细菌对不同材料表面黏附力的测量

将制备好的细菌探针加载于 AFM 的探针架上，并将待测样品用防水胶带固定于液体池底部，在黏附缓冲液中对测试样品的表面随机选取 3 个位点，每次测量 100 次，非同日培养的细菌重复 2 次。根据扫描电子显微镜 (SEM) 图片及曲线抖动情况判断细菌脱落程度，收集所有的有效数据。图 3 为血链球菌在树脂表面的力 - 距离曲线。从细菌的后退曲线 (图 3 蓝线所示) 可明显看出 4 种不同的表面粗糙度对该菌的力 - 距离曲线的影响。



A: 10 nm; B: 100 nm; C: 200 nm; D: 300 nm。

图 3 血链球菌在不同粗糙度树脂表面的力—距离曲线

细菌黏附力的定量分析结果见图 4，统计结果表明，4 种细菌对充填材料表面的黏附力均表现出相似的趋势，随着表面粗糙度的增加，细菌在材料表面的黏附力均有增加。在树脂表面，血链球菌的黏附力由 1.051 nN 增加到 4.295 nN，变异链球菌由 0.336 nN 增加到 4.026 nN；在 GIC 表面，变异链球菌的黏附力由 0.578 nN 增加到 2.876 nN。就同种材料而言，先锋菌的黏附力略大于致龋菌，在 200、300 nm 两种粗糙度下，先锋菌和致龋菌的黏附力差异明显，在 10、100 nm 时差异较小。对比两种材料表面的细菌黏附力，在 200、300 nm 时，4 种细菌在树脂表面的黏附力大于 GIC，粗糙度较小时黏附力的差异较小或无明显差异。另外，除缓症链球菌在两种材料表面和表兄链球菌在树脂表面的黏附力与材料表面粗糙度相关性无统计学意义之外，其余细菌的黏附力与材料表面粗糙度都有明显的线性关系，图 5 为表兄链球菌黏附力与 GIC 表面粗糙度的线性相关关系图。

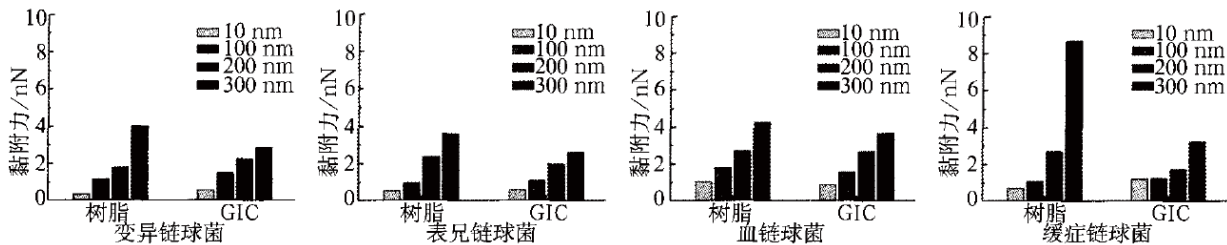


图 4 4 种细菌在不同粗糙度复合树脂和 GIC 表面的黏附力

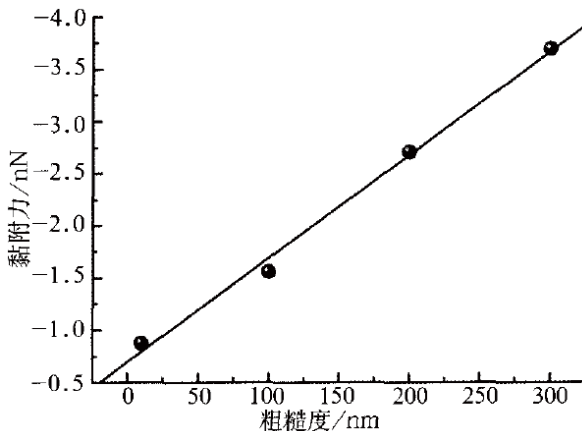


图5 表兄链球菌黏附力与 GIC 表面粗糙度呈线性相关

■ 结论

AFM 因具有原子级的分辨率已被广泛用于测量材料表面的原子级形貌，通过力 - 距离曲线分析能够直接定量获得细菌与材料表面之间及微生物之间的相互作用力，是一种理想的探测细菌与生物材料之间基本相互作用力的方法。本工作采用岛津 SPM-9600 对材料表面的粗糙度以及细菌对材料表面的黏附力进行测量，其测试方法简单、灵敏度高及可重复性好，能很好的应对粘附力大的测试体系。测试结果表明，4 种细菌对复合树脂和 GIC 表面的黏附力均与粗糙度呈正相关；口腔细菌对树脂的黏附力略大于 GIC，在粗糙度较大的时候差异较明显。因此，为了减少细菌对临床充填体的黏附，应对材料表面尽可能地抛光；GIC 的抗菌性能优于树脂，可用于指导牙体充填材料的改性。该研究可为临床牙体充填材料表面形貌的处理和材料的选择提供理论依据，为减少口腔细菌的黏附和预防继发龋提供指导。

以上内容来源于以下文章

1. 郑赛男, 蒋丽, 张雷, 郝丽英, 叶露, 李伟. 牙体充填材料表面粗糙度对常见口腔链球菌黏附力的影响; 华西口腔医学杂志; 2016 年第 34 卷第 5 期

岛津应用云

