

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.13.018

文章编号: 1005-8982(2016)13-0092-04

Nd:YAG 激光对天然牙根管内大肠杆菌 杀菌效果的体外实验*

邢莉¹, 黄茜¹, 潘英瑜¹, 张廉辉¹, 吴多荣², 文小俊¹

(中南大学湘雅医学院附属海口医院 1.口腔医学中心牙体牙髓病科,
2.检验科,海南 海口 570208)

摘要:目的 建立大肠杆菌离体天然牙根管感染模型,评价脉冲 Nd:YAG 激光对感染根管内大肠杆菌的杀菌效果。**方法** 将感染 3 周的 30 颗离体前牙随机分为 5 组,每组 6 颗牙齿。A 组 1.5 W 激光照射 1 次,作用 30 s;B 组 2.1 W 激光照射 1 次,作用 30 s;C 组 2.1 W 激光重复照射 3 次,每次 30 s,间隔 15 s;D 组 2.5%次氯酸钠 NaOCl 冲洗后 2.1 W 激光重复照射 3 次,每次 30 s;对照组单纯用 2.5%NaOCl 冲洗。每组标本在照射、冲洗前后根管内即刻取样行细菌培养,48 h 后计数菌落数(CFU/ml),比较根管内大肠杆菌的杀灭效果。**结果** Nd:YAG 激光和 2.5% NaOCl 照射、冲洗后根管内细菌量均显著下降。各组根管内细菌减少量比较差异有统计学意义。A 组与 B 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),分别与 C 组、D 组、对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);C 组与 D 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);D 组与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Nd:YAG 激光和 2.5% NaOCl 对根管内大肠杆菌具有杀菌作用,两者联合使用杀菌作用更强。

关键词: Nd:YAG 激光;大肠杆菌;次氯酸钠;菌落计数

中图分类号: R781.05

文献标识码: B

In vitro experiment of antibacterial effect of Nd: YAG laser on *Escherichia coli* within tooth root canals*

Li Xing¹, Xi Huang¹, Ying-yu Pan¹, Gen-hui Zhang¹, Duo-rong Wu², Xiao-jun Wen¹
(1. Endodontic Department of Stomatology Center, 2. Department of Laboratory Medicine, the
Affiliated Haikou Hospital, Xiangya Medical School, Central South University,
Haikou, Hainan 570208, China)

Abstract: Objective To evaluate the antibacterial effectiveness of Nd: YAG laser for *Escherichia coli* in infectious tooth root canals *in vitro*. **Methods** Thirty anterior teeth inoculated with *Escherichia coli* for 3 weeks were randomly divided into 5 groups with 6 teeth in each group. In the experiment group A 1.5 W laser dose was applied to root canals for 30 s. In the group B 2.1 W laser dose was applied for 30 s. In the group C 2.1 W laser dose applied for 3 times, 30 s for each irradiation time with an interval of 15 s. In the group D after the teeth were washed by 2.5% sodium hypochlorite, 2.1 W laser was applied for 3 times, 30 s each time. In the control group E the teeth were only washed by 2.5% sodium hypochlorite. Microbiological samples were collected from root canals for bacterial culture immediately before and after irradiation or irrigation, and the colony-forming units (CFU) were counted after 48 h to compare the effect of killing *Escherichia coli* in root canals. **Results** The bacteria in root canals significantly decreased after irradiation and/or irrigation, the differences were significant in each group. Pairwise comparison of the reduction of bacteria in root canals of each group was used. There was no statistical difference between the groups A and B ($P>0.05$),

收稿日期:2015-10-26

* 基金项目:海口市重点科技计划项目(No.2009-049-4)

but both group A and group B had significant differences from the groups C, D and E respectively ($P < 0.05$). The group C had significant difference from the group D ($P < 0.05$), but had no significant difference from the control group ($P > 0.05$). The group D had significant difference from the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Both Nd: YAG laser and 2.5% sodium hypochlorite have antibacterial effects on *Escherichia coli* within root canals, and their combination is more effective.

Keywords: Nd:YAG laser; *Escherichia coli*; sodium hypochlorite; colony counting

混合细菌感染是牙髓病和根尖周病的主要病因,从炎症牙髓、感染根管到根尖周病变,根管内细菌种类增多,毒力也不断增强。在根管内细菌主要以生物膜的形式存在,能抵抗宿主的免疫反应及药物的作用,具有更强的致病性^[1-3]。目前,主要通过机械预备清除和药物冲洗、消毒控制根管内感染,而采用脉冲 Nd:YAG 激光进行根管内消毒杀菌的文献报道及临床应用较少。本实验建立大肠杆菌根管感染模型,采用不同剂量和作用时间的脉冲 Nd:YAG 激光进行根管消毒,评价其杀菌效果,为临床更好地控制根管内感染,提高根管治疗成功率提供快速而有效的方法。

1 资料与方法

1.1 主要材料和仪器

ATCC25922 大肠杆菌标准菌株购自中国微生物菌种保藏中心,中国蓝琼脂培养基购自北京陆桥技术有限公司,HSM-III 型脉冲 Nd:YAG 激光治疗仪购自四川航天制导公司,HH.W21.600 型恒温水浴培养箱购自浙江余姚市东方电工仪器厂。

1.2 离体牙准备

选择因牙周病拔除的上颌中切牙 34 颗,单根管、根尖孔发育完全,未做过牙髓治疗,牙根无裂痕。去除牙根周围的牙结石,截除牙冠保留牙根,标准化长度为 15 mm,根管预备后复合树脂封闭根尖孔。

1.3 建立大肠杆菌根管感染模型

将制备好的牙齿打包高温高压灭菌,随机选取 2 标本取样检测无细菌生长后确定根管内已灭菌彻底。解冻复苏大肠杆菌标准菌株,接种于中国蓝琼脂培养基培养 24 h 增菌。在生物安全柜内,用营养肉汤调取 McFarland 为 $2(6.0 \times 10^8 \text{ CFU/ml})$ 的菌液,接种于无菌根管内,每根管注入菌液 $40 \mu\text{l}$ 。37℃ 恒温水浴培养箱中培养,隔日根管内更换新鲜菌液。感染 20 d 时随机抽取 1 标本菌液转种于中国蓝琼脂培养基,37℃ 细菌恒温培养箱中培养,24 h 后根据培养基上长出的菌落形态和革兰染色特征,用细菌鉴定仪进行生化鉴定确定无杂菌污染,再将感染 3 周(21 d)^[4]

的标本纳入进一步实验。随机抽取 2 标本行扫描电镜,观察大肠杆菌感染根管的情况。

1.4 实验分组

经电镜观察、细菌学检查、生化鉴定确定根管内已被纯培养的大肠杆菌感染而无杂菌污染,按随机数字表法将 30 颗上颌中切牙标本分为 A、B、C、D 及对照组,每组 6 个标本。

1.5 感染模型的细菌培养计数

第 1 次取样:无菌纸尖吸干各组标本根管内的培养液,注入无菌生理盐水。40 号无菌纸尖插入根管中停留 1 min,吸取根管内液,立即放入装有 1 ml 无菌生理盐水的试管中,混匀,10 倍系列稀释,分别取 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 稀释度标本 $50 \mu\text{l}$ 接种于中国蓝琼脂培养基,37℃ 细菌恒温培养箱中培养 48 h 后计数菌落数(CFU/ml)。

1.6 Nd:YAG 激光照射、次氯酸钠 NaOCl 冲洗感染模型后的细菌计数

第 2 次取样:A、B 组用 Nd:YAG 激光照射 1 次,时间 30 s,剂量分别为 1.5 和 2.1 W;C 组 2.1 W 激光重复照射 3 次,每次 30 s,间隔 15 s。激光照射时选择直径为 0.3 mm 光纤头插入感染根管距根尖孔 2 mm 处,以上下垂直方向、接触式沿根管壁四周均匀照射。D 组先用 5 ml 2.5% NaOCl 冲洗,在 2 min 内完成,再用 2.1 W 激光重复照射 3 次,每次 30 s。对照组只用 5 ml 2.5% NaOCl 冲洗,在 2 min 内完成。无菌纸尖吸干根管,即刻往各组标本根管内注入无菌生理盐水,用纸尖吸取根管内液,放入装有 1 ml 生理盐水的试管中,混匀,10 倍系列稀释,取稀释标本 $50 \mu\text{l}$ 分别接种于中国蓝琼脂培养基,培养 48 h 后计数菌落数。

1.7 细菌复苏实验

第 2 次取样完成后在所有标本根管内注入营养肉汤培养 72 h,无菌纸尖吸取根管内液,置于中国蓝琼脂培养基培养是否有细菌生长。

1.8 扫描电镜标本观察

将 2 标本置于 2.5% 戊二醛磷酸盐缓冲液中 4℃ 固定保存 4 h。高速金刚砂车针沿标本牙根长轴制备

2 条纵形深沟,劈开牙根暴露根管内牙本质壁。乙醇梯度脱水,二氧化碳 CO₂ 临界点干燥,离子溅射仪喷金,扫描电镜观察根管内大肠杆菌感染情况。

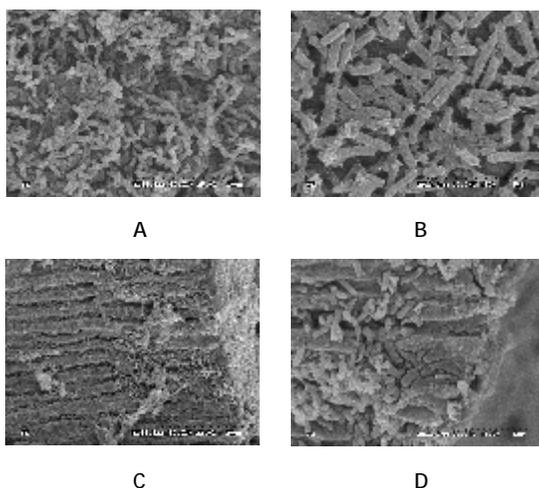
1.9 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,将细菌计数结果(CFU/ml)加 1 后做对数转换,即 $\lg(\text{CFU/ml}+1)$, 方差分析和多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扫描电镜观察

感染 3 周后, 根管腔内可观察到互相结合的大肠杆菌细菌微集落, 细菌间出现丝状纤维连接, 形成成熟、稳定的生物膜(见附图 A、B), 细菌入侵牙本质小管深处(见附图 C、图 D)。



A: 根管腔内细菌($\times 5.0 \text{ K}$); B: 根管腔内细菌($\times 10.0 \text{ K}$); C: 牙本质小管内细菌($\times 2.0 \text{ K}$); D: 牙本质小管内细菌($\times 6.0 \text{ K}$)

附图 3 周后大肠杆菌感染根管情况

2.2 菌落计数

经重复测量设计的方差分析可知, 照射或冲洗前后各组根管内细菌减少量比较, 差异有统计学意义 ($F=25.716, P=0.000$)。照射或冲洗前后各组根管内细菌减少量两两比较, A 组与 B 组比较差异无统计学意义 ($P=0.680$), A 组与 C 组、D 组、对照组比较, 差异有统计学意义 ($P=0.000$); C 组与 D 组比较, 差异有统计学意义 ($P=0.002$), C 组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P=0.519$); D 组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P=0.011$)。照射、冲洗前后即刻菌落计数及菌落计数差值见附表。

2.3 细菌复苏实验

经 72 h 复苏后, 所有标本都显示根管内无杂菌

附表 5 组根管照射或冲洗前后根管内细菌量的变化

($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	菌落计数		照射或冲洗前后菌落计数差值
	根管照射或冲洗前	根管照射或冲洗后	
A 组	9.16 ± 0.09	7.10 ± 0.36	2.06 ± 0.41 ¹⁾²⁾
B 组	9.13 ± 0.15	6.72 ± 0.25	2.42 ± 0.19 ³⁾
C 组	9.05 ± 0.14	2.78 ± 2.25	6.27 ± 2.16 ⁴⁾⁵⁾
D 组	9.16 ± 0.11	0.00 ± 0.00	9.16 ± 0.11 ⁶⁾
对照组	9.08 ± 0.17	2.26 ± 2.49	6.82 ± 2.45

注: 1) 与 B 组比较, $P=0.680$; 2) 与 C、D、对照组比较, $P=0.000$; 3) 与 C、D、E 组比较, $P=0.000$; 4) 与 D 组比较, $P=0.002$; 5) 与对照组比较, $P=0.519$; 6) 与对照组比较, $P=0.011$

污染, 检测见有大肠杆菌再生长。

3 讨论

扫描电镜观察感染 3 周的标本可见单一的大肠杆菌菌种在离体牙根管内形成生物膜, 并不同程度入侵牙本质小管深处。生物膜状态存在的细菌较游离悬浮状态更不易被机械和化学预备清除, 在根管内长期存在导致持续感染^[9]。而牙本质小管的直径为 1 ~ 4 μm , 直径大多 < 1 μm 的细菌可轻易入侵并隐匿其中, 躲避各种清除, 在条件允许时再次进入根管腔引起感染, 故有效地清除根管内细菌是提高根管治疗成功率和降低再感染几率的重要手段。

通过机械预备可以去除根管内的坏死牙髓组织、大部分细菌和根管内壁的感染物, 但对侵入牙本质小管深处、侧支根管、根管峡部和交通支等细微结构内的细菌及其产生的毒素, 器械难以达到及清除^[6]。同时, 为达到控制感染的目的, 过度的机械切割将降低根管牙本质壁强度, 提高牙根折裂的几率^[7]。药物冲洗只对接触、渗透到的区域有杀菌效应, 其表面张力限制在根管系统狭窄部位扩散和清理, 抗菌效果与药物浓度、药物使用量相关^[8]。目前, 应用较多的根管消毒药物氢氧化钙制剂具有良好的杀菌性, 但氢氧化钙消毒作用有赖于与牙本质的直接接触, 能与根管壁紧密贴合是其发挥功效的首要条件^[9]。而根管系统解剖结构复杂, 药物无法充盈整个根管系统从而影响其充分的杀菌效能。

脉冲 Nd: YAG 激光是波长为 1 064 nm 的近红外激光, 穿透力强, 定位准确, 与生物体作用可产生多种效应, 其产生的光热效应、光化效应等能迅速杀灭细菌, 灭活其代谢产物, 改变或破坏微生物大分子原有结构致其死亡^[10]。其可弯曲的光纤输出末端, 能够

插入根管至根尖孔区,操作方便,在根管治疗尤其是根管消毒中具有优势^[1],近年来受到关注。

本实验采用脉冲 Nd:YAG 激光照射或 NaOCl 冲洗大肠杆菌根管感染模型,菌落计数结果显示各组根管内细菌量明显减少。A 组与 B 组的菌落计数差值比较,差异无统计学意义,而 C 组采用 2.1 W 激光重复照射 3 次后,菌落计数差值明显增大,与 A 组、B 组比较差异有统计学意义,表明激光重复照射比单次照射可取得更好的杀菌效果。提示临床使用激光进行根管消毒时,为达到更好的杀菌效应而又避免激光光热效应对牙根周围组织的热损伤,可在照射剂量安全值范围内,采用一定间隔期的重复照射,减少每次照射的持续时间。

C 组与对照组比较差异无统计学意义,但两种方法结合使用即 D 组杀菌效果明显优于单纯激光照射或消毒冲洗,为 5 组中效果最好。考虑与 NaOCl 对浸润到的根管腔内的细菌具有较强的杀菌能力,而激光能去除根管内碎屑和玷污层^[12],具有一定的消毒深度,对牙本质小管深处及根管交通支等细微结构内的细菌杀菌力更强有关^[13-14],两者联合使用可互为补偿,相互增效,从而达到更好的抗菌效果。对临床难治性牙髓感染性疾病,采取 NaOCl 冲洗结合激光照射能产生协同抗菌效应,是提高临床疗效的较佳消毒方式。

在激光照射或 NaOCl 冲洗后所有标本根管内加入营养肉汤培养 72 h,取样检测均有细菌生长。提示无论是激光还是 NaOCl 均不能完全杀灭根管内细菌,使根管处于灭菌状态。激光杀菌作为传统根管消毒方式的补充,利用其优势,与机械预备、药物冲洗消毒等方法联合使用,破坏根管内细菌生物膜结构,控制主根管、牙本质小管、管间交通支等部位的细菌,使根管系统内细菌数量降至最小,达到尽可能彻底清创的效果,从而保证感染根管治疗的远期疗效,降低再感染的几率。

参 考 文 献:

- [1] 雷蕾,韦曦,刘红艳. 感染根管致病菌及其控制方法的研究进展[J]. 中华口腔医学研究杂志: 电子版, 2011, 5(6): 647-651.
- [2] 郑颖,樊立洁,谷志远. 根管生物膜的研究进展[J]. 实用口腔医学杂志, 2010, 26(2): 252-254.
- [3] JHAJHARIA K, PAROLIA A, SHETTY K V, et al. Biofilm in endodontics: a review[J]. J Int Soc Prev Community Dent, 2015, 5(1): 1-12.
- [4] MOHAMMED A S, ENRICO D, CHRISTOPHER V H, et al. Enhanced removal of enterococcus faecalis biofilms in the root canal using sodium hypochlorite plus photon-induced photoacoustic streaming: an in vitro study[J]. Photomed Laser Surg, 2014, 32(5): 260-266.
- [5] 樊明文. 牙体牙髓病学[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 264.
- [6] 黄定明,周学东. 感染根管的治疗难点和对策[J]. 华西口腔医学杂志, 2011, 29(3): 225-228.
- [7] SANGOI B M, MORAES R D A, ROSA R A D, et al. Vertical root fractures and dentin defects: effects of root canal preparation, filling, and mechanical cycling[J]. J Endod, 2012, 38(8): 1135-1139.
- [8] 张荣德,董瑞红,段彦盛,等. 根管冲洗液对粪肠球菌作用的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2012, 39(4): 516-518.
- [9] 钟素兰,尹仕海. 对氢氧化钙根管消毒作用的再认识[J]. 国际口腔医学杂志, 2009, 36(3): 307-309.
- [10] 黎远皋,王霄,谢克贤,等. Nd:YAG 激光辅助根管内消毒的灭菌效果评价[J]. 北京大学学报(医学版), 2014, 46(5): 821-823.
- [11] NARASIMHA R K, RAMA S. Bacterial efficacy of Ca (OH)₂ against E.faecalis compared with three dental lasers on root canal dentin-an invitro study[J]. J Clin Diagn Res, 2014, 8(11): 135-137.
- [12] PRASHANT P M, NAGESHWAR R. Cleaning and shaping the root canal with an Nd: YAG laser beam: a comparative study[J]. J Conserv Dent, 2010, 13(2): 84-88.
- [13] BERGMANS L, MOISIADIS P, TEUGHELIS W, et al. Bactericidal effect of Nd:YAG laser irradiation on some endodontic pathogens ex vivo[J]. Int Endod J, 2006, 39: 547-557.
- [14] MOHAMMAD A, NASSIMEH S. Disinfection of contaminated canals by different laser wavelengths, while performing root canal therapy[J]. J Lasers Med Sci, 2013, 4(1): 8-16.

(申海菊 编辑)