

[文章编号] 1006-7248(2007)05-0530-04

生物型纳米根管封闭剂的制作与性能研究

陈作良¹, 危薇¹, 冯祖德², 刘学勍¹, 陈晓玲¹, 黄文霞¹

(1.福建医科大学口腔教学医院·厦门市口腔医院, 福建 厦门 361003;

2.厦门大学 纳米科技中心, 福建 厦门 361005)

[摘要] 目的: 以磷酸钙骨水泥为原料制备一种生物型纳米根管封闭剂, 并对其理化性质、显影效果及对感染根管优势菌的体外抑菌能力进行研究。方法: 根据 ISO 6876:2001(E)口腔生物材料标准, 测定其流动性、凝固时间和晶粒大小, 测定不同显影剂比例的材料显影效果。采用 NCCLS 推荐的厌氧菌药物敏感试验, 用琼脂稀释法研究其对内氏放线菌、厌氧消化链球菌、牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌和具核梭杆菌的体外抑菌效果。应用染色渗漏法测定 20 颗离体牙的封闭效果, 并与氧化锌丁香油糊剂进行比较。采用 SPSS12.0 软件包对数据进行 t 检验。结果: 调和后的新型纳米根管封闭剂固化后的终产物为羟基磷灰石, 晶粒大小为 279nm, 具有较好的流动性, 可操作时间大于 30min, 凝固时间为(1.0±0.5)h(可调控)。其显影效果良好。MIC 0.156-0.312。试验组染色渗漏深度显著小于氧化锌丁香油糊剂组(P<0.01)。结论: 制备的材料符合新型纳米根管封闭剂的要求。

[关键词] 根管封闭剂; 磷酸钙骨水泥; 流动性; 凝固时间; 抗菌性; 微渗漏

[中图分类号] R781.05

[文献标识码] A

The development and in vitro experiment study of a bio-type root canal filling sealer using calcium phosphate cement CHEN Zuo-liang¹, WEI Wei¹, FENG Zhu-de², LIU Xue-qing¹, CHEN Xiao-ling¹, HUANG Wen-xia¹. (1. Stomatological Hospital of Xiamen, Department of Stomatology, Fujian Medical University, Xiamen 361003; 2. Center of Nano-Technology, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China)

[Abstract] PURPOSE: The purpose of this study is to develop a novel root canal filling sealers based on calcium phosphate cement (CPC), and to evaluate its physical-chemical properties and in vitro antibacterial activity on the predominant bacteria infecting root canal. METHODS: The fluidity and the setting time of the sealer were tested according to ISO 6876:2001 (E) standards. The crystal size of the final product was determined. Its opacification with different composition were measured. The in vitro antibacterial property of the sealer was tested according to the Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobes recommended by National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). The involved bacteria included *Actinomyces naeslundii* (A. naeslundii), *Peptostreptococcus anaerobius* (P anaerobius), *Porphyromonas gingivalis* (P. gingivalis), *Porphyromonas endodontalis* (P. endodontalis) and *Fusobacterium nucleatum* (F nucleatum). Twenty single-rooted human extracted teeth were selected to evaluate the sealing ability using dye microleakage technology. Dye penetration was measured and the results were statistically analyzed using SPSS12.0 software package. RESULTS: The new root canal filling sealer was primarily composed of hydroxyapatite in 279nm after setting. Its liquidity was suitable, the operating time was over 30 minutes, and the controlled setting time was (1.0±0.5) hours. The opacification was acceptable. MIC 0.156-0.312. The dye penetration was significant different between two filling types (P<0.01). CONCLUSIONS: The new root canal filling sealer is an ideal root canal filling sealer. Supported by Science and Technology Development Fund from the Science and Technology Bureau of Xiamen City (Grant No.2002-60-5).

[Key words] Root canal filling sealer; Calcium phosphate cement; Liquidity; Setting time; Antimicrobial activity; Dye microleakage

Shanghai J Stomatol, 2007, 16(5): 530-533.

[收稿日期] 2007-07-13; [修回日期] 2007-08-25

[基金项目] 厦门科技局资助厦门科技发展课题(2002-60-5)

[作者简介] 陈作良(1955-), 男, 硕士, 主任医师、教授, 硕士生导师

[通讯作者] 陈作良, Tel: 13600910252, E-mail: weiw1223@126.com

©2007 年版权归《上海口腔医学》编辑部所有

根管充填是根管治疗的最后一步, 严密的根管充填是根管治疗成功的前提, 牙胶尖结合根管封闭糊剂共同充填根管是目前临床上常用的根管充填方法^[1]。理想的根管充填材料需要同时满足根管封闭性能好, 流动性能佳, 能固化, 生物相容性好, 有抗菌消炎作用, 不引起过敏反应, 不使牙体变色等要求^[1], 但目前尚无一种纳米生物型根管封闭剂符合上述所有要求。本研究采用磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC)制作纳米根管封闭剂, 并对该材料是否符合纳米根管封闭剂的性能要求, 能否作为纳米级根管封闭剂等进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 试验材料

CPC 根管封闭剂的组成:由 CPC 粉末(厦门大学纳米研究中心研制)和液剂(Na_2HPO_4 溶液、甘油)调和而成, 添加适量的显影剂。

1.2 试验方法

1.2.1 CPC 根管封闭剂固化后的晶体和固化产物的组分测定 将反应完毕的 CPC 根管封闭剂浸入 100%的无水乙醇中, 使固化反应停止。再放入 50 的烘箱内干燥, 研磨, 行 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD)扫描。实验参数设置为电压: 40kV; 电流: 30mA; 步长: 10s/步; 每步角度: 0.016 ($^\circ$); 扫描范围: 10 $^\circ$ -60 ($^\circ$)。

1.2.2 阻射实验 在实验牙的根管中分别充填含 5%、10%和 20%显影剂的 CPC 根管封闭剂, 采用平行投照法拍摄 X 线片 (Trophy, 70kV, 30mA), 观察糊剂的阻射效果。

1.2.3 CPC 根管封闭剂的流动性和凝固时间 将 CPC 根管封闭剂按规定粉液比人工调拌均匀后, 放入固定直径模具内, 分开模具后, 在材料表面置一玻璃板, 加压 0.7 kg 的重物, 放置 3 min, 卡尺测量直径。同时测量记录 5 个样本值。采用吉尔摩(Gilmore)双针法^[2]测定 CPC 根管封闭剂的凝固时间。

1.2.4 CPC 根管封闭剂的抗菌、抑菌实验 采用美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 推荐的厌氧菌药物敏感试验的琼脂稀释法, 测定实验药物和对照药物的抗菌活性, 以最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 表示, 具体实验操作在四川大学华西口腔医学院重点实验室完成。

1.2.4.1 实验分组 试验组: CPC 根管封闭剂分为

粉、液 2 组, 按 1:8(w/v)调和至糊状。对照组: 国产根充糊剂以麝香草酚散甲醛甲酚溶液复合制剂 (上海二医张江生物材料有限公司)。对照组: 进口根充糊剂: 碧兰根管糊剂 (法国碧兰公司)。

1.2.4.2 含药琼脂平皿的配制 选用由英国 OXID 提供的含有 VitK1 和 Hemin 的 BHI 液体和 BHI 琼脂平皿作为实验培养基。将试验组和对照组均配置成以下系列浓度: 10、5、2.5、1.25、0.625、0.31 和 0.156mg/ml。

1.2.4.3 实验菌液的准备 在 BHI-S 血琼脂表面接种实验菌株, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 厌氧培养箱内 (80% N_2 , 10% CO_2 , 10% H_2) 培养 48h。取 48h 纯培养物, 接种 BHI-S 肉汤后, 放置于 37 $^\circ\text{C}$ 厌氧培养箱内 (80% N_2 , 10% CO_2 , 10% H_2) 培养 48h, 校正实验菌液的浓度 0.5 个 McFarland 单位 (1.8×10^8 CFU/ml)。

1.2.4.4 MIC 的测定 用 10 μl 微量加样器分别取 5 μl 的实验菌液 (1.8×10^8 CFU/ml) 点种于含药琼脂平皿表面, 并放置于厌氧培养箱内 (80% N_2 , 10% CO_2 , 10% H_2), 培养 48h 后读取 MIC 结果。

1.2.5 CPC 根管封闭剂的封闭性试验 选择 20 颗因牙周病和正畸需要拔除的单根管前牙, 经检查牙根完整、无龋、无裂纹, 根尖孔发育完全。在离体牙颌面或舌面开髓、拔髓, 测长后随机分为 2 组, 将 CPC 根管封闭剂和氧化锌丁香油糊剂分别充分导入, 待 24h 完全固化后, 距根尖孔上方 2mm 处根面均匀涂 2 层指甲油后, 浸入 2% 亚甲蓝溶液中, 采用牙体纵切法观测微渗漏终点。

1.3 统计学处理

采用 SPSS12.0 软件包对数据进行两样本比较的 t 检验。

2 结果

2.1 晶体尺寸

图 1 显示不同显影剂含量的 CPC 根管封闭剂的固化产物 X 射线衍射图谱 (XRD)。其中, 空白组 (Blank) 为不含显影剂的 CPC 根管封闭剂完全固化后的 XRD 衍射图, 空白组主要固化产物为羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HA), 而在分别含有 5%、10%、20%和 40%显影剂的试验组中, 其主要产物除羟基磷灰石外, 还可见显影剂晶体。使用谢乐公式估计晶

$$\text{粒尺寸: } D_{\text{hkl}} = \frac{K}{(\Delta 2\theta) \cdot \cos \theta}$$

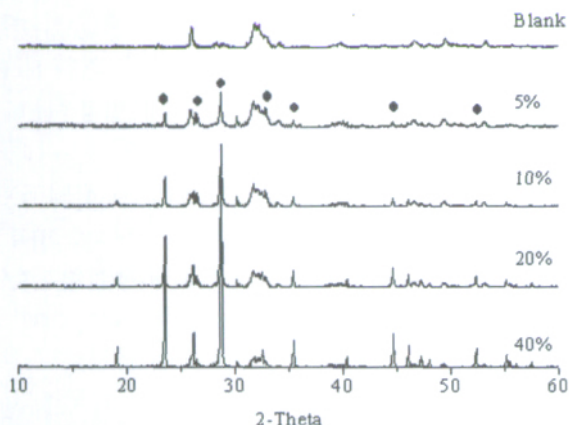


图 1. 不同显影剂含量的磷酸钙糊剂的固化产物 XRD 值 (图中●表示显影剂所对应的衍射峰)
Figure 1. XRD of calcium phosphate sealers with different contents of contrast (● means diffraction maximum of photographic developer)

其中, D_{hkl} 是垂直于 (hkl) 面方向的晶粒尺寸; $hkld = 0.15406\text{nm}$ 为 X 射线的特征波长; θ 为布拉格角; $\Delta 2\theta$ 是由于晶粒细化引起的宽化, 取衍射峰 (hkl) 的半高宽 (单位为 rad); $\Delta 2\theta_0$ 为仪器本身引起的宽化, 取常数 0.09; $K=0.89$ 。在 XRD 分析软件上取得的半高宽的值, 代入上式, 计算得到固化产物的晶体尺寸为 279nm。

2.2 阻射试验

不同显影剂含量的 CPC 根管封闭剂的 X 线阻射效果见图 2。含有 5% 显影剂的 CPC 根管封闭剂充填后, 基本上见不到糊剂的形状。含 10% 显影剂的 CPC 根管封闭剂具有一定的显影效果, 但是边缘处不清晰。含 20% 显影剂的 CPC 根管封闭剂边缘锐利, 显影效果明显 (图 2)。

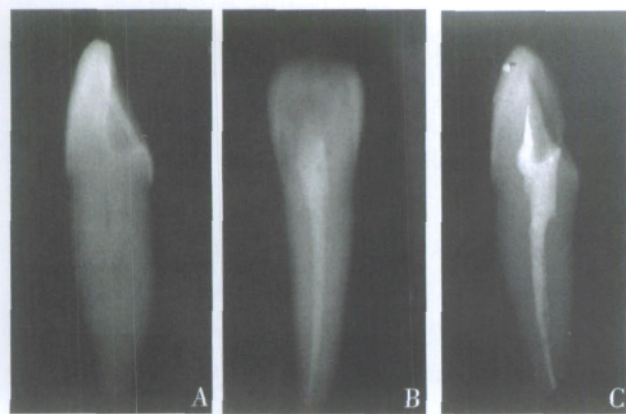


图 2. 显影剂含量不同的磷酸钙糊剂填入牙后的 X 线阻射效果。A. 5% 显影剂, B. 10% 显影剂, C. 20% 显影剂
Figure 2. Calcium phosphate sealers with different contents of contrast were shown in X-ray film. A. 5%, B. 10%, C. 20%

2.3 CPC 根管封闭剂流动性、可操作时间与凝结时间

CPC 根管封闭剂在流动性测试试验中得到所有的圆盘直径 (mean diameter) 均大于 20mm, 糊剂初凝时间大于 30min, 糊剂的最终凝结时间为 $(1.0 \pm 0.5)\text{h}$ (可调控) (表 1)。

表 1. 磷酸钙糊剂在流动性试验中所形成的圆盘直径 (mm)
Table 1. Diameter disk of calcium phosphate sealers in fluidity test (mm)

	样本编号				
	1	2	3	4	5
最小直径	24	24	24	24	24
最大直径	25	25	24	25	25
平均直径	24.5	24.5	24	24.5	24.5

2.4 MIC 的测定

CPC 根管封闭剂对感染根管内优势菌的体外抑菌效果与临床常用的根充糊剂相比无显著差异 (表 2)。

表 2. 3 种根管封闭剂的 MIC 测定结果 (mg/ml)
Table 2. Results of MIC of three root canal filling sealers (mg/ml)

细菌名称	菌株号	CPC 组	TA+FC 组	碧兰组
内氏放线菌	ATCC12102	0.312	0.156	0.156
	S31	0.625	0.156	0.156
	ATCC35406	0.156	0.156	0.156
厌氧消化链球菌	ATCC33277	0.156	0.156	0.156
	S45	0.312	0.156	0.156
	S46	0.156	0.156	0.156
牙龈卟啉单胞菌	ATCC27337	0.156	0.156	0.156
具核梭杆菌	ATCC10953	0.156	0.156	0.156
	S26	0.156	0.156	0.156

2.5 封闭性检测

亚甲蓝在 CPC 根管封闭剂中的渗入深度为 $(0.87 \pm 0.17)\text{mm}$, 在氧化锌糊剂中的渗入深度为 $(2.03 \pm 0.61)\text{mm}$, t 检验结果为 $P < 0.01$ 。

3 讨论

羟基磷灰石作为根管封闭剂的研究已有报道, 但 HA 呈颗粒状, 彼此间缺乏黏结力, 即使使用赋形剂, 颗粒间的间隙仍然存在, 凝固性差, 封闭性能降低。磷酸钙骨水泥由固相的磷酸钙盐 (磷酸三钙、磷酸四钙等) 在液相 (稀酸、蒸馏水、血清) 中发生水化凝固反应, 是一种新型的自固化非陶瓷羟基磷灰石材料, 已有报道用于髓室底、牙周组织、颌骨缺损的修复以及盖髓剂和根充材料, 本研究的主要成分也是磷酸钙骨水泥 (CPC)。实验结果显示, 固化产物的晶体尺寸为 279nm, 达到了纳米级材料要求的水平。而纳米级材料拥有改进材料 X 线阻射性、降低聚合应力、增强复合强度等优点, 逐渐受到广泛关

注。Condon 和 Ferracane^[3]采用非粘接性纳米填料、粘接性纳米填料和无被膜填料来降低聚合应力, 发现纳米填料添加到杂化型复合树脂内, 可以有效降低聚合应力(降低 31%); 在一定的体积含量水平(10%), 非粘接性纳米填料具有更好的降低应力作用, 而只含纳米填料的复合树脂亦具有相同的效果。

本研究显示, 含 20%显影剂的糊剂边缘清晰锐利, 显影效果好。考虑到牙会因骨骼以及其他减弱显影效果的组织的影响, 需选用显影剂含量 20%以上的磷酸钙根管封闭剂。与其他显影剂相比, 本材料所含显影剂具有诸多优点: 对组织无刺激, 减少创口的渗出、促进肉芽组织生长, 加速创口愈合。此外, 该显影剂对肠杆菌科细菌、不动杆菌属、假单胞菌属具有良好的抑菌作用^[4,5]。有研究显示, 该显影剂与四环素相比, 对需氧菌作用强, 体外抑菌活性试验显示对金葡菌、肺炎球菌、溶血性链球菌的抑菌活性高于四环素, 同时对厌氧球菌、真杆菌和产气荚膜杆菌也有良好的抑菌作用^[6]。

根管封闭剂的流动性、可操作时间与凝结时间将直接影响糊剂的操作与最后的封闭效果。英国标准 BS 6934 (1988)使用 Gilmore 针来测试根管充填糊剂的凝结时间, 建议糊剂在 37 °C、100%湿度环境下的凝结时间不要超过 72h^[7]。本研究得到的圆盘直径大于 20mm, 达到了根管充填糊剂的流动性要求。糊剂的可操作时间大于 30min, 凝固时间为(1.0 ±0.5)h, 能满足临床操作的需要。

本研究显示, 新型纳米 CPC 根管封闭剂对感染根管内常见的几种细菌有明显的抗菌作用, MIC 为 0.156 ~0.312, 说明抗菌性能良好。与同类产品比较, 其抑菌效果与口腔临床常用的国内外产品相同。

有文献报道, 亚甲蓝在氧化锌糊剂充填的根管中的渗入深度为(1.85 ±0.87)mm^[8], 在 Vitapex 糊剂充填的根管中的渗入深度为(2.6 ±0.8)mm^[9], 在 AHplus 充填的根管中的渗入深度为(2.79 ±1.36)mm^[10]。本研

究中, 亚甲蓝在 CPC 根管封闭剂中的渗入深度为(0.87 ±0.17)mm, 小于其他糊剂的渗入深度, 说明 CPC 根管封闭剂具有良好的封闭性能, 达到了作为良好根管充填材料的要求, 但相关的对照实验还需要进一步完善。

总之, 本研究制备的新型纳米根管封闭剂为符合纳米级, 显影性、流动性、可操作时间与凝结时间适合临床操作, 并具有较好的抗菌作用, 达到了根管封闭剂的要求, 它可作为一种新型生物型纳米级根管充填材料使用, 并具有较大的开发研究价值。

[参考文献]

- [1] Ingle J, Bakland L. Endodontics [M]. 5th edition, Philadelphia: Lea & Febiger, 2002.
- [2] Driessens FCM, Boltong MG, Bermudez O, et al. Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study [J]. J Mater Sci: Mater in Med, 1993, 4(5): 503- 508.
- [3] Condon JR, Ferracane JL. Reduced polymerization stress through non-bonded nanofiller particles [J]. Biomaterials, 2002, 23:3807- 3815.
- [4] Kovace BJ, Apreco RM, Kettering JD, et al. Efficacy of various disinfectants in killing a resistant strain of Pseudomonas aeruginosa by comparing zones of inhibition: implications for endoscopic equipment reprocessing [J]. Am J Gastroenterol, 1998, 93(11):2057- 2059.
- [5] Kopelman D, Klein Y, Zaretsky A, et al. Cryochemostasis of uncontrolled hemorrhage from liver injury [J]. Cryobiology, 2000, 40(3):210- 217.
- [6] 詹力军, 高毅, 赵子琳, 等. 碘仿在体内及体外的抑菌作用[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(11):1207- 1210.
- [7] McMichen FR, Pearson G, Rahbaran S, et al. A comparative study of selected physical properties of five root-canal sealers [J]. Int Endod J, 2003, 36(9):629- 635.
- [8] 张春宝, 马轩祥, 宋应亮, 等. 5 种根管封闭材料应用于根骨内种植体的根尖封闭性研究 [J]. 实用口腔医学杂志, 1997, 13(3): 181- 183.
- [9] 杨萍, 耿发云, 彭勇, 等. Vitapex 根充糊剂的封闭性研究[J]. 口腔医学, 2004, 24(1): 40- 41.
- [10] 张惠珍, 章婵, 何宗来, 等. 2 种根管充填方法的根尖封闭性比较[J]. 上海口腔医学, 2004, 13(5):447- 449.