文章编号:1000-5404(2012)03-0277-02

经验交流

不同根管消毒制剂对根管内毒素影响的体外评价

肖茂德[1,2],黄雅静[3],王勤花[3],李月恒[3],黄 锐[3],周 智[3] (400080 重庆,重庆市九龙坡区第三人民医院口腔科[1];400080 重庆,重庆市九龙坡区第一中医院口腔科[2];401147 重庆,重庆医科大学口腔医学院牙体牙髓科[3])

[关键词] 氢氧化钙;内毒素;根管消毒;洗必泰凝胶;鲎实验;动态浊度法

[中图法分类号] R781.04 [文献标志码] B

研究已证明微小浓度的内毒素即可对根尖周组织产生明显的损害并导致根尖周的骨破坏[1]。对感染根管中的内毒素的有效降解和清除是影响根管治疗成功的关键。本研究拟探讨不同消毒制剂对根管内毒素的降解作用,探寻适宜的临床应用形式。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与设备

氢氧化钙(上海二医张江生物材料有限公司),生理盐水(四川科伦药业股份有限公司),脑心浸液培养基(BHI,Biomerieux Sa 公司),动态比浊法鲎试剂(最低检测限值:0.03 EU/ml,规格:1.25 ml/支,批号:0703030,湛江安度斯生物有限公司),细菌内毒素工作标准品(规格:160EU/Amp 150601-200964,中国药品生物制品检定所),细菌内毒素检查用水(BET 水,规格:5 ml/Amp,批号 0909280,0912020,规格:50 ml/瓶,湛江安度斯生物有限公司),2% 洗必泰凝胶(CHX,Ultradent 公司),多粘菌素 B 硫酸盐(polymyxin B, Sigma 公司)使用无热原蒸馏水配制成 10 000 U/ml 的原液,备用。

15-40 号 H 锉、镍钛根管预备器械 protaper Sx-F3(Dentsply 公司),BET-32M 型细菌内毒素测定仪(天津市天大天发科技有限公司),微量移液器(250 μl,上海求精生化试剂仪器有限公司),体视显微镜(重庆光电仪器有限公司),SK-2 型旋涡混合器(江苏中大仪器厂),无热原吸头(规格 250 μl,1 000 μl)、无热原空安瓶(规格:5 ml,批号:0910210)均为湛江安度斯生物有限公司。

1.2 实验样本选择、预备

选择因正畸原因拔除的新鲜单根管下颌第一前磨牙进行实验。剔除牙根不完整、牙根表面存在细小裂纹、牙根未发育完全,根尖孔未完全形成或敞开、牙体有龋坏或充填体及曾行牙髓病治疗的牙齿。牙齿预备:将离体牙浸泡于 0.525% NaClO 溶液 24 h,去除牙根表面软垢、牙石及残余软组织后置生理盐水中保存备用。常规开髓揭顶、拔髓,采用镍钛根管器械 Protaper 预备至 F3,预备中 5.25% NaClO 溶液与 17% EDTA 溶液反复交替冲洗;流水冷却下使用高速金刚砂车针在自釉牙骨质界处将离体牙截去牙冠,在距截冠处 15 mm 去除根尖,留取约 15 mm 长的圆柱状牙根,以达到预备后根管的相对一致。

将制备后的根管在体视显微镜下剔除牙根表面有裂纹者,筛选共 90 颗根管分别编号,将所有样本高温高压消毒后(121 ℃, 20 min),无菌操作台上使用 2 层环氧树脂黏结剂对样本除颈部开口处外的外表面进行封闭,根据随机数字表依序将制备后根管分入各组(表 1),每个实验组 15 颗,无菌操作台上使用树脂将牙根固定于 96 孔板上。

表 1 离体牙分组情况及所作处理(n = 15)

组别	根管所作处理
生理盐水-氢氧化钙组	氢氧化钙-生理盐水(1∶1,质量比)
多粘菌素 B	多粘菌素 B
2% 洗必泰凝胶组	2% 洗必泰凝胶
2% 洗必泰-氢氧化钙	氢氧化钙-2% 洗必泰凝胶(1∶1,质量比)
阳性对照组	添加内毒素,无根管封药
阴性对照组	不加内毒素,无根管封药

1.3 样本消毒

实验中使用的所有玻璃器皿均预先用自来水、纯化水反复冲洗干净,烘干后置于新鲜配制的硫酸重铬酸钾溶液中浸泡过夜;自来水反复冲洗后使用新鲜蒸馏水反复冲洗干净至少 20 遍,烘干,置于专用铝制饭盒内,250 ℃干烤 1 h,去除热原,冷却备用。不耐高温的器材(微量进样器等)均清洗干净,烘干后在体积分数 30% 过氧化氢溶液中浸泡 4 h,无热原水冲洗干净,60 ℃ 烘干备用。全部样本及实验中使用的材料均使用^{60}Co 伽马射线消毒并降解可能存在的 LPS。

1.4 实验步骤

1.4.1 细菌内毒素标准曲线的制备 将细菌内毒素工作标准品使用细菌内毒素检查用水倍比稀释,使其最终浓度分别为 40、8、1.6、0.32、0.064、0.0128 EU/ml 稀释系列,各取 0.1 ml 分别加入预先加有鲎试剂 0.1 ml 的反应管内,混合均匀,立即置细菌内毒素测定仪内进行自动检测,其中每个浓度重复 3 次。结果进行线性回归分析,以反应到达实验所设定的光密度值(0.1)所用平均反应时间的对数(lgT)为纵坐标,细菌内毒素浓度的对数(lgC)为横坐标,计算回归方程并制作标准曲线。

内毒素浓度在 40 ~ 0.0128 EU/ml 之间时,其与反应时间之间具线性关系,内毒素标准曲线的曲线方程:lgT = 3.070 2 − 0.293 2 lgC,反应时间与内毒素浓度之间的相关系数 r 为 0.993 5。

1.4.2 内毒素降解实验 细菌内毒素检查用水将细菌内毒素国家标准品稀释成 10 EU/ml 作为检测样品的浓度,取 5 组(阳性对照组、洗必泰组、氢氧化钙糊剂组、多粘菌素 B 组、洗必泰氢氧化钙糊剂组)共 75 个模拟根管,分别注入 10 EU/ml 标

[基金项目] 重庆市卫生局科研课题(20080488)

[通信作者] 周 智,E-mail:zhouzhi_050918@hotmail.com

准内毒素溶液各 100 μl,阴性对照组不添加内毒素,仅注入内毒素检测专用无热原水 100 μl,使用 parafilm 膜严密封闭,以防止实验期间模拟根管内药物脱水,37 ℃恒温,相对饱和湿度环境下孵化 24 h。

去除封闭膜 parafilm,使用一次性无菌注射器将各组试剂分别输送至各组离体牙根管内至根管填满与根管上缘水平为准。阳性对照组 15 颗根管使用标准内毒素溶液、阴性对照组 15 颗根管使用细菌内毒素检查用水为对照;parafilm 膜封口,37 ℃ 恒温,相对饱和湿度环境下孵化 7 d。消毒 7 d 后去除 parafilm 膜,使用 5 ml 无热原水冲洗去除根管内封药,分别以无热原试管收集各根管冲洗液,漩涡混合器混匀后各取冲洗液 0.1 ml 加入鲎试剂0.1 ml,混匀,置细菌内毒素测定仪内进行动态检测,每个实验组重复 3 次;根据内毒素标准曲线得出样本中内毒素的浓度。

1.5 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件进行单因素方差分析。检验水准为双侧 $\alpha = 0.05$。组间比较采用单因素方差分析和 Tukey post hoc 检验。

2 结果

添加至各组根管样本中的内毒素初始浓度为10 EU/ml。经过 7d 处理后,阴性对照组未检测出内毒素,其余各组内毒素浓度自低到高依次为 2% 洗必泰-氢氧化钙组(0.646 ± 0.185)、生理盐水-氢氧化钙组(0.683 ± 0.136)、多粘菌素 B (1.837 ± 0.233)、2% 洗必泰凝胶组(2.725 ± 0.614)、阳性对照组(8.972 ± 1.046)。经单因素方差分析及 Tukey post hoc 检验分析,4 个实验组内毒素浓度较阳性对照组均显著减少($P < 0.01$)。4 个实验组组间也有统计学差异($P < 0.01$)。

3 讨论

根管治疗术是目前治疗牙髓及根尖周炎的有效方法,对牙髓坏死及根尖周病变进行有效的根管清理、消毒是根管治疗的基础。根管经过机械预备后,虽然大部分感染物质将被清除,但仍可含有较高具有病理意义的内毒素水平[2]。因此根管治疗不应仅限于对致病细菌的消除,同时还应包括对细菌毒性产物如内毒素等的降解和失活。选择对细菌内毒素有降解作用的适宜的根管治疗药物对完善根管治疗和提高疗效有重要意义。

强碱性药物氢氧化钙已被证明具有良好的抗菌性和扩散性,在临床中已有广泛应用[3]。Tanomaru 等[2]应用犬牙根管模型进行实验,结果表明单纯冲洗并不能失活内毒素,而氢氧化钙则能有效失活其中内毒素。Buck 等[4]发现将氢氧化钙与洗必泰、乙醇及次氯酸钠等药物调制成碱性制剂时,也可失活 LPS。根据 de-Oliveira 等[5]研究,内毒素可以在 24 h 内从根管内扩散到达牙根外表面。因此本研究实验前将内毒素标准品接种至根管并孵化 24 h;并以临床中常规的根管封药时间 7 d 作为研究时限。

本实验中各组根管样本中内毒素初始浓度统一设置为 10 EU/ml。经过 7 d 处理后,阴性对照组未检测出内毒素,阳性对照组中检测出的内毒素值略有下降为 8.972 EU/ml,可能是由于根管系统解剖结构的复杂性和变异性;而内毒素因相对分子质量小,极易在根管系统中扩散并渗透至牙本质小管末端,常规器械预备及注射器冲洗很难将其从复杂的根管系统中清除干净。而本实验中冲洗过程时间相对较短,并没能完全将其洗脱出来所致。Oliveira 等[6]研究证实氢氧化钙糊剂及多粘菌素 B 均能降低根管内毒素水平,但多粘菌素 B 作为根管冲洗剂和根管封药应用于临床时效果有差异,且经过若干时间可能失去降解内毒素的活性。Maekawa 等[7]认为多粘菌素 B 并不能完全清除根管内毒素;或许改变剂型将有助于改善多粘菌素 B 的根管消毒效果。洗必泰具有良好的抗菌性能,可有效抑制包括粪肠球菌在内的多种根管细菌;洗必泰作为阳离子表面活性剂,虽具降解内毒素的作用,但效果似乎远不如氢氧化钙制剂。本研究中也观察到单独应用洗必泰凝胶仅使根管内毒素水平部分降低。而 2% 洗必泰凝胶与氢氧化钙联合应用可以产生更好的抑菌和降解内毒素的作用,结果与 Valera 等[8]研究具相似性。

综上所述,不同根管消毒制剂处理后的内毒素浓度均有显著下降,其中以 2% 洗必泰凝胶-氢氧化钙处理后的内毒素水平最低。提示联合应用 2% 洗必泰凝胶-氢氧化钙糊剂能有效降解根管内毒素,并获得良好的根管消毒效果。

参考文献:

[1] Mohammadi Z. Endotoxin in endodontic infections: a review[J]. J Calif Dent Assoc, 2011, 39 (3): 152 – 155, 158 – 161.

[2] Tanomaru J M, Leonardo M R, Tanomaru-Filho M, *et al*. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS[J]. Int Endod J, 2003, 36(11): 733 – 739.

[3] Mohammadi Z, Dummer P M. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology[J]. Int Endod J, 2011, 44(8): 697 – 730.

[4] Buck R A, Cai J, Eleazer P D, *et al*. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide[J]. J Endod, 2001, 27 (5): 325 – 327.

[5] de-Oliveira L D, Carvalho C A, Valera M C, *et al*. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules[J]. Braz Oral Res, 2005, 19(1): 5 – 10.

[6] Oliveira L D, Leao M V, Carvalho C A, *et al*. *In vitro* effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals[J]. J Dent, 2005, 33(2): 107 – 114.

[7] Maekawa L E, Valera M C, Oliveira L D, *et al*. *In vitro* evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on Escherichia coli and its endotoxin in root canals[J]. J Appl Oral Sci, 2011, 19(2): 106 – 112.

[8] Valera M C, da-Rosa J A, Maekawa L E, *et al*. Action of propolis and medications against Escherichia coli and endotoxin in root canals[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010, 110(4): e70 – e74.

(**收稿**:2011-08-29;**修回**:2011-10-20)

(编辑 张 维)