

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.29.020

根管-根尖周复合体体外模型的建立*

王 容,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 建立根管-根尖周组织复合体体外模型,以此探索感染根管形成根尖周炎及根尖生物膜的可能机制。方法 将因正畸减数拔除的健康单根前磨牙密封于盛有 LB 固体培养基的无菌小瓶内,使牙根的根尖 1/3 置于培养基中,制备成根管-根尖周复合体体外模型 25 个。建模后 1 d 抽取 5 个模型通过 PCR 技术检测根尖周组织有无细菌。将余下的 20 个模型分为对照组($n=10$)及实验组($n=10$),实验组作开髓处理,对照组不做任何处理,自然放置于空气中,经 21 d 检测根管内和根尖周有无细菌,及终点显色法检测根尖周内毒素浓度。结果 第 21 天,实验组根管内检测到细菌,对照组根管内未检测到细菌,而所有模型根尖周均检测到细菌;对照组根尖周内毒素含量平均为 (8.913 ± 0.614) EU/mL,实验组为 (10.525 ± 0.981) EU/mL,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 通过上述方法成功建立根管-根尖周复合体体外模型。未对根管做处理时,感染根管内的细菌不会到达根尖周,而感染根管内的细菌首先是通过分泌的内毒素等致病因子到达根尖周引起根尖周炎。

关键词:牙髓腔;根尖周炎;细菌;内毒素类

中图分类号:R780.2

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)29-3907-03

Establishment of an in-vitro root canal-apical complex model*

Wang Rong, Zhong Xiaobo[△](Department of Endodontics, Stomatology Hospital Affiliated to Chongqing Medical University/
Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147, China)

Abstract: Objective To establish an in-vitro root canal-apical complex model for studying the mechanisms of the infected root canal to apical periodontitis and periapical biofilm. Methods Single rooted premolar extracted for orthodontic, was sealed in sterile vial containing LB solid medium, and the culture medium covered apical thirds. Totally 25 root canal-apical complex models were prepared. Five models were randomly selected for the bacteria detection in periapical by PCR at 1st day. The remained 20 models were randomly subjected to a control group($n=10$) and experimental group($n=10$). Extracted teeth were opened in experimental group and control group with no treatment. All models were exposed in air. At 21st day, bacteria were detected through PCR in root canal and apical; endotoxin content in apical was assayed by chromogenic end-point limulus test. Results In apical, bacteria was not found in all groups, but not for the experimental group. The mean endotoxin content was (8.913 ± 0.614) EU/mL in control group and (10.525 ± 0.981) EU/mL in experimental group. The endotoxin content was increased significantly in experimental group, when compared with control group($P<0.01$). Conclusion Root canal-apical complex was established in vitro through this method. Bacteria was not easy to reach the apical when the infected root canal was not disturbed. Bacteria in the infected root canal caused apical periodontitis through the secretion of virulence factors such as endotoxin.

Key words: dental pulp cavity; infected root canal; bacteria; endotoxin

细菌是根尖周炎的主要致病因素^[1]。有学者认为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,而是其毒力因子穿出根尖孔导致的根尖周炎^[2]。但也有学者持相反观点,认为在环境因素的诱导下,根管生物膜中部分浮游菌可穿过根尖孔和牙本质小管侵入根尖周组织导致根尖周炎^[3]。那么在未治疗的情况下,感染根管导致根尖周炎是细菌进入根尖周组织并分泌毒力因子导致的,还是仅根管内细菌的毒力因子进入根尖周引起的,目前尚无定论。根尖周组织取材主要依靠根尖外科手术和拔除患牙,但是能通过上述两种方法取材的病例有限,建立根管-根尖周复合体的体外模型方便了取材,有助于该方面的研究。从病理学的角度看,在牙周健康的情况下,根尖周炎的致病因子通常来源于感染根管,因此,根管根尖周可看作一个有机的复合体。本实验建立了根管-根尖周复合体体外模型,用培养基模拟根尖周组织并确保

无牙周途径来源的感染,在未考虑机体免疫机制的条件下,对上述问题进行研究,以期初步探索根尖周炎发生的机制途径,指导临床治疗。

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),分光光度计(瑞典安玛西亚公司),K 锉、流动树脂(美国 DENTSPLY 公司),终点显色法基质鲎试剂盒(厦门鲎试剂实验厂有限公司),细菌 DNA 提取试剂盒(北京 Bio-Teke), $2\times$ Master Mix(大连 Takara 公司),16S DNA 通用引物为上游:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3';下游:5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3',片段长度约为 1 500 bp,由上海生工生物工程公司合成。用于内毒素检测的所有玻璃器皿预先用自来水、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洗液中浸

* 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:王容(1986-),在读硕士,主要从事牙体牙髓病学方面的研究。

[△] 通讯作者, E-mail: zhongxb3151@sina.com。

泡过夜,用自来水反复冲洗干净,再用新鲜蒸馏水反复冲洗干净(至少 20 遍),烘干后置于专用铝制饭盒内,250 °C 干烤 1 h,去除热源,冷却备用。不耐高温的器材清洗后烘干,然后在 30% H₂O₂ 溶液中浸泡 4 h,无热原水冲洗干净,60 °C 烘干备用。

1.2 方法

1.2.1 离体牙的收集

选取本院因正畸减数拔除的单根前磨牙,年龄 14~25 岁,根尖孔已发育完全,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。用刮匙和超声洁治器去除牙根表面软组织和牙石,在 100 mL/L 甲醛溶液中室温保存备用。

1.2.2 根管-根尖周组织复合模型的建立

根据离体牙颈部的直径在青霉素小瓶的橡皮塞中心挖孔,将离体牙套入瓶塞中,接口处用光固化的流动树脂封闭,连同青霉素小瓶经高温高压消毒灭菌。随机抽取经过高温高压灭菌的两个固定有牙根的青霉素瓶塞和青霉素小瓶放置于盛有无菌 LB 液体培养基的试管中,37 °C 孵箱中培养 48 h。48 h 后,培养基保持透明,证明灭菌效果可靠,进行下一步实验,若培养基出现浑浊,说明灭菌效果不可靠,重新进行灭菌。在超净工作台中,向青霉素小瓶内注入无菌 LB 固体培养基,使之刚好达根尖 1/3,将固定有牙根的青霉素瓶塞用无菌封口胶与瓶体紧密连接。牙根-橡皮塞界面处涂布两层指甲油。将连接好的模型自然放置于空气中。

1.2.3 实验分组

按照上述方法制作模型 25 个,于建模后 1 d 抽取 5 个模型检测根尖周组织有无细菌。若检测到细菌则说明模型制备不成功,重新制作模型;若未检测到细菌,则将余下的 20 个模型分为对照组及实验组,实验组($n=10$)做开髓处理,对照组($n=10$)不做任何处理,自然放置于空气中,在 21 d 检测实验组及对照组根尖周、根管内有无细菌,根尖周内毒素含量。

1.2.4 样本采集

根尖周取样:在超净工作台中,取下固定有离体牙的青霉素瓶塞,向琼脂中注入 0.5 mL 的无菌蒸馏水,反复轻轻吹打混匀,1 min 后,收集 0.1 mL 于无热源的试管内,无菌封口膜封口,置 -20 °C 冰箱保存待检,用于检测内毒素;收集 0.4 mL 于 1.5 mL 的 EP 管中,用于检测细菌。**根管内取样:**将上一步骤中取下的离体牙牙冠用 2% 碘酊消毒,75% 乙醇脱碘,然后吹干,对照组的离体牙由于未开髓,因此在超净工作台中使用无菌慢机球钻开髓。实验组及对照组离体牙采用无菌 K 锉疏通根管,向根管内注入 30 μ L 无菌蒸馏水,将无菌纸尖置根尖 1/3,1 min 后取出,置于盛有无菌蒸馏水的 EP 管内,用于检测细菌。

1.2.5 样本细菌检测

DNA 提取,严格按照细菌 DNA 提取试剂盒说明书提取样本中细菌 DNA。PCR 扩增,扩增体系(50 μ L):2 \times Master Mix 25 μ L,上游引物(20 μ M)1 μ L,下游引物(20 μ M)1 μ L,模板 DNA 2 μ L,ddH₂O 21 μ L。扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 90 s,30 个循环;最后 72 °C 10 min,4 °C 恒温保存。以空气中细菌的培养液提取的细菌 DNA 为 PCR 阳性对照,双蒸水代替模板为空白对照。电泳:PCR 扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶检测。

1.2.6 样本内毒素含量测定

样本室温下解冻后,稀释 10 倍,震荡混匀。按照终点显色法基质萤光试剂盒说明书测定内毒素。

1.3 统计学处理

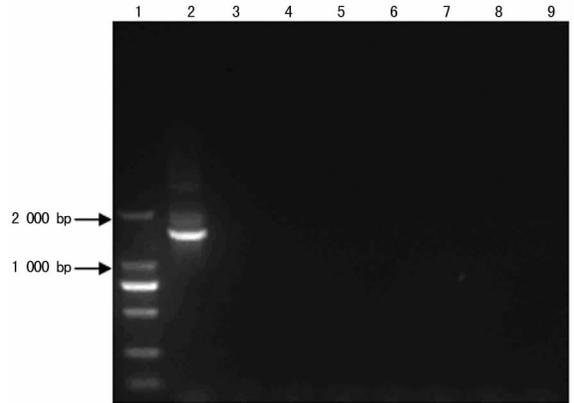
采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差

异有统计学意义。

2 结果

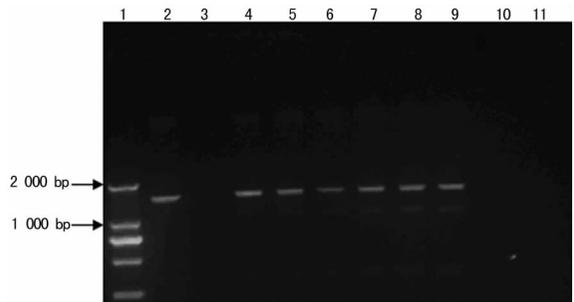
2.1 细菌检测

以提取出的细菌总 DNA(在阳性对照组及实验组根管内样本中,某些样本可见少量白色絮状沉淀)为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶检测。建模后 1 d 抽取的 5 个模型以及在 21 d 对照组、实验组根尖区样本均未扩增出 16S rDNA 通用引物片段,见图 1。在 21 d 实验组根管内样本扩增出 16S rDNA 通用引物片段,长度约为 1 500 bp,与目的片段大小一致,对照组根管内样本未扩增出 16S rDNA 通用引物片段,见图 2。



1:DNA 分子标记物;2:阳性对照;3:空白对照;4、5:建模后 1 d;6、7:实验组;8、9:对照组。

图 1 部分根尖区样本 PCR 扩增产物电泳图



1:DNA 分子标记物;2:阳性对照;3:空白对照;4~9:实验组;10、11:对照组。

图 2 部分根管内样本 PCR 扩增产物电泳图

2.2 内毒素含量测定

在 21 d,对照组根尖周组织内毒素含量平均值(8.913 \pm 0.614)EU/mL,实验组根尖周组织内毒素含量平均值(10.525 \pm 0.981)EU/mL,经统计学分析两组间差异有统计学意义($t = -5.127, P < 0.01$)。

3 讨论

难治性根尖周炎和根管治疗后疾病常导致患牙的拔除,同时是引起医疗纠纷的最大隐患,是牙体牙髓科医生倍感棘手的难题。研究表明根尖生物膜是慢性持续性感染的根源,与临床上难治性根尖周炎和根管治疗后疾病存在着密切关系^[3]。在牙周健康的情况下,根尖生物膜来源于感染根管已达成共识^[4],但对于感染根管形成根尖周炎和根尖生物膜机制的研究甚少,尚无定论。根尖周标本的采集方法主要依靠拔除患牙和根尖外科手术,取材较困难,能收集的病例样本有限,而且口腔是一个充满细菌的环境,取样时标本易被污染,建立体外模型方便了根尖周标本的采集且降低了取样时标本被污染的概率,有助于感染根管形成根尖周炎及根尖生物膜各方面的研究。

目前,大量的学者成功建立了感染根管体外模型^[5-8]。

Robert 等^[9] 2005 年建立了一种根尖周药物扩散模型,作者采用吸液管模拟根管,用琼脂模拟根尖周组织,观察根管内用药向根尖周扩散的情况,但该模型不能模拟感染根管的情况,而用于研究根尖生物膜的体外模型尚未见报道。

从病理学的角度可以把根管与根尖周看作一个整体即根管-根尖周复合体,即:在牙周健康的情况下,根尖周病原刺激物主要来源于根管,而根管一旦受到感染,几乎不可避免的会导致根尖周的炎症。基于此本实验建立了根管-根尖周复合体体外模型,采用 PCR 技术检测建模后 1 d 及 21 d 根尖周有无细菌,结果均未检测到细菌,说明本模型能确保无牙周途径来源的感染,细菌只能通过根管系统进入根尖周,证明了本模型的可靠性。

本模型使用含有 1.25% 琼脂的固体培养基具有和人体根尖周组织相似的密度,为病原微生物提供足够的营养;选择流动树脂以及具有柔软性、可塑性、自动密封性的 Parafilm 封口膜作为封闭材料,易于操作且密封效果佳,确保无牙周途径来源的感染。应用 PCR 直接检测细菌 16S rDNA 来鉴别细菌,简便、快速、敏感性高,能检测到 10^2 个以下的细菌^[10]。经过高温高压灭菌后的培养基、青霉素小瓶瓶壁、牙根表面虽然会残留死亡的细菌菌体,但是高温高压灭菌可使细菌核酸降解^[11],所以对后续实验无影响。Khabbaz 等^[12] 认为长期存留在感染根管深层牙本质小管及根尖周组织内的内毒素是根尖周炎症反复发作、根管治疗失败的一个重要原因,因此本实验选择内毒素作为一个检测指标。采用的终点显色法能定量分析内毒素,灵敏度高。培养基、青霉素小瓶、离体牙没有经过过去热源处理,所以对对照组检测含有一定量的内毒素。

利用此模型对感染根管形成根尖周炎的机制进行了初步探索。结果显示本模型能模拟髓腔封闭时,细菌不能进入根管;髓腔暴露后,细菌能进入根管产生内毒素感染根管。进一步,在开髓后 21 d,感染根管内的细菌未到达根尖周,与 Wang 等^[13]、Int Endod 等^[2] 的研究结果相一致,但其产生的内毒素可到达根尖周。内毒素是革兰阴性菌的主要毒力因子,是公认的炎症启动因子,可导致组织溶解和骨质吸收,在根尖周炎发生发展中具有重要地位^[14]。有研究显示内毒素具有很强的渗透性,容易通过根管系统进入尖周组织^[15],且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^[16]。因此即使细菌没有进入根尖周,感染根管同样可以导致根尖周组织病变的发生发展。

综上所述,通过本实验方法建立的根管-根尖周复合体体外模型较简单,价格低廉,且有一定的有效性及实用性,有助于研究感染根管形成根尖周炎及根尖生物膜的机制。仅开髓不对根管做处理时,感染根管内的细菌不会到达根尖周,而感染根管内的细菌首先是通过分泌的内毒素等致病因子到达根尖周引起根尖周组织病变。但是在未对感染根管做任何处理且根尖周组织无任何免疫抵抗力时,感染根管内的细菌不易到达根尖周组织,其原因目前尚不清楚,可能的机制是根管内细菌以生物膜形式存在,在未受干扰的情况下保持稳定状态,较少游离细菌,因而不容易穿出根尖孔。

参考文献:

[1] 樊明文. 牙体牙髓病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:160-161.

- [2] Int Endod J, 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] 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.
- [4] 尹仕海, 谭舒, 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, 2009, 24(6):615-618.
- [5] Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro[J]. Int Endod J, 2000, 33(1):28-36.
- [6] Pan J, Sun K, Liang Y, et al. Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with enterococcus faecalis biofilms in vitro [J]. J Endod, 2013, 39(1):105-110.
- [7] 庄沛林, 高燕, 凌均荣, 等. 纳米银对牙本质表面粪肠球菌生物膜的杀菌作用[J]. 中华口腔医学研究杂志, 2011, 5(5):6-10.
- [8] 刘桂香, 王青, 窦慧芹. 超声冲洗对感染根管内毒素的灭活及清除作用[J]. 华西口腔医学杂志, 2010, 28(2):158-161.
- [9] Robert GH, Liewehr FR, Buxton TB, et al. Apical diffusion of calcium hydroxide in an in vitro model [J]. J Endod, 2005, 31(1):57-60.
- [10] Vezzulli L, Pezzati E, Huete-Stauffer C, et al. 16SrDNA pyrosequencing of the mediterranean gorgonian paramuricea clavata reveals a link among alterations in bacterial holobiont members, anthropogenic influence and disease outbreaks [J]. PloS One, 2013, 8(6):e67745.
- [11] 冯树异, 程松高, 吴光照. 医学微生物学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999:59-60.
- [12] Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2001, 91(5):587-593.
- [13] 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.
- [14] 胡涛, 谭红, 徐玉栋. 急、慢性根尖周炎患牙根管内内毒素水平的分析测定[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(1):52-53.
- [15] de Oliveira LD, Carvalho CA, Valera MC, et al. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules [J]. Braz Oral Res, 2005, 19(1):5-10.
- [16] Mohammadi Z. Endotoxin in endodontic infections: a review [J]. J Calif Dent Assoc, 2011, 39(3):152-155, 158-161.

(收稿日期:2014-06-08 修回日期:2014-07-21)