

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.35.015
文章编号: 1005-8982 (2018) 35-0074-04

氧化锆陶瓷托槽对变形链球菌附着的影响

李文艳¹, 李晨军², 羊书勇², 何勇²

(1. 西南医科大学口腔医学院, 四川 泸州 646000; 2. 成都军区总医院附属口腔医院, 四川 成都 610021)

摘要: **目的** 评估氧化锆陶瓷托槽对变形链球菌附着性的影响。**方法** 将两种托槽模拟口内环境在含有唾液的脑心浸出液肉汤培养基中培养 72 h 后, 利用实时荧光定量聚合酶链式反应的 TaqMan 探针法定量分析样本中变形链球菌和总细菌的数量, 计算出变形链球菌的构成比。最后对两种托槽样本的细菌构成比进行对比分析。**结果** 两种托槽表面的变形链球菌构成比比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 两种托槽表面的变形链球菌数目和总细菌数目比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 氧化锆陶瓷托槽的变形链球菌及总细菌的附着水平与氧化铝陶瓷托槽无明显差异, 可供临床进一步研究。

关键词: 细菌; 正畸托架; 牙瓷料; 聚合酶链反应

中图分类号: R783.5

文献标识码: A

Study on adhesion of *Streptococcus mutans* to zirconia ceramic brackets

Wen-yan Li¹, Chen-jun Li², Shu-yong Yang², Yong He²

(1. College of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Hospital of Stomatology, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu, Sichuan 610021, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the impact of zirconia ceramic brackets on the adhesion of *Streptococcus mutans*. **Methods** In the experiment, 18 brackets were collected, including 9 zirconia ceramic brackets in the observation group and 9 alumina ceramic brackets in the control group. After the brackets in both groups were cultured in the brain heart infusion broth with saliva for 72 hours, TaqMan probe method of qRT-PCR was applied to analyze the amount of *Streptococcus mutans* and total bacteria, thus the composition ratio of *Streptococcus mutans* was calculated. A comparative study in the composition ratio of bacteria was carried out between the two groups. **Results** There was no statistical difference in composition ratio of *Streptococcus mutans* to total bacteria between the two groups ($P > 0.05$), either in the amount of *Streptococcus mutans* or total bacteria adhered to the brackets between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusions** The adhesion of *Streptococcus mutans* and total bacteria to zirconia ceramic brackets is of no obvious difference from that to alumina ceramic brackets, which needs further clinical research.

Keywords: dental porcelain; orthodontic brackets; bacteria; real-time polymerase chain reaction

随着人们对正畸治疗过程中的美观要求越来越高, 氧化锆陶瓷托槽再次成为研究的热点。但是, 氧化锆陶瓷托槽尚未在临床广泛使用, 关于它对细菌附着能力的影响尚未见系统的研究报道。由于变形链球

菌是牙齿的主要致龋菌。因此, 本实验采用实时荧光定量聚合酶链式反应技术, 对比氧化锆陶瓷托槽和氧化铝陶瓷托槽表面附着的变形链球菌构成比例, 评价氧化锆陶瓷托槽对变形链球菌附着能力的影响, 以供

收稿日期: 2018-06-17

[通信作者] 何勇, E-mail: 35492624@qq.com

临床参考。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

氧化锆陶瓷托槽(上海晶璠新材料科技有限责任公司)、氧化铝单晶陶瓷托槽(美国 3M 公司)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒(Solarbio, Cat#D1600, 北京索莱宝科技有限公司)、微生物培养箱(Precision, 美国热电公司)、普通 PCR 仪(CFX96, 美国百乐公司)、荧光定量 PCR 仪(CFX96, 美国百乐公司)、AceQ qPCR Probe Master MIX(500rxn, 南京诺唯赞生物科技有限公司)。

1.2 托槽表面的细菌培养

1.2.1 唾液的收集 MCBAIN^[1] 研究认为,唾液是体外培养菌斑生物膜的理想来源。因此笔者采集 30 名健康正畸青少年的唾液 15 ml,将采集的唾液与脑心浸出液肉汤(brain heart infusion, BHI)培养基配置成 1% 的菌悬液作为生物膜培养基。唾液采集方法为:嘱患者用清水漱口后,将舌尖抬高靠于硬腭处,头微低,使唾液在口底汇集,缓慢流入放在下嘴唇处的无菌 EP 管内,用干冰低温运送到实验室中, -20℃ 保存,保存时间 <1 周。

1.2.2 托槽生物膜的培养 实验分为氧化锆陶瓷托槽和氧化铝陶瓷托槽,各 9 枚。在 24 孔板的每个孔放入 2 ml 菌悬液和 1 个托槽。每个 24 孔板中任取 1 个孔设置为阴性对照组,为不含托槽和唾液的 BHI 液体培养基。将以上培养物放入 37℃ 的微生物培养箱中培养,分别于 8、16 及 24 h 后换 1 次培养基。具体方法为:用镊子取出托槽,取 1 ml 无菌 BHI 培养液漂洗托槽,冲去托槽表面的游离细菌,每个托槽漂洗 3 次,然后将托槽放入新配制的菌悬液中。以上操作连续传代培养 72 h,完成托槽表面的细菌培养。

1.3 实时荧光定量 PCR 反应

1.3.1 提取细菌基因组 DNA 将培养后的托槽取出,并用 BHI 液体培养基漂洗 3 次后置于干净的 EP 管内,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作。-20℃ 冻存备用。

1.3.2 设计并合成引物 由四川擎科新业生物技术有限公司合成引物,变异链球菌引物序列如下,正向引物:CCGGTGACGGCAAGCTAA,反向引物:TCATGGAGGCGAGTTGCA,探针:5' FAM-CTCTGAAAGCCGATCTCAGTTCGGATTG-TAMRA-3',产物大小 70 bp^[2];通用菌引物序列如下,正向引

物:GCTAGTAATCGTGGATCAGAATG,反向引物:TGTGACGGGCGGTGTGTA,探针:5' FAM-CACGGTGAATACGTTCCCGGGC-TAMRA-3',产物大小 69 bp^[3]。其中,通用菌引物用于计数样本中的细菌总数。

1.3.3 制备标准品 通过化学合成方法合成变异链球菌和大肠埃希菌的 16S rRNA 目的基因片段并分别装载目的基因至 pUC19 载体,酶切位点为 SmaI。变异链球菌的目的基因选自 NCTC 10449 细菌(GenBank: AJ243965.1),通用菌的目的基因选自 NBRC 102203 (Sequence ID: NR_114042.1),成功装载至 pUC19 载体的目的基因经测序与 GenBank 中相应细菌基因序列比对,结果显示插入相应载体序列与基因库相应序列信息完全一致,表明载体构建正确。将正确构建的载体摇扩大培养,大提质粒并定量保存至 -20℃ 冰箱备用。质粒浓度通过微量比色仪得知。

1.3.4 荧光定量 PCR 反应 先行普通 PCR 反应,然后 5% 的琼脂糖凝胶电泳实验,检测引物和探针的特异性良好(见图 1)。将变异链球菌标准品按 10 倍梯度稀释成 5 个浓度,用于制作标准曲线。荧光定量 PCR 反应使用 AceQ qPCR Probe Master MIX(500rxn, 南京诺唯赞生物科技有限公司)。所有的样本检测均重复 3 次,取平均值。反应在 CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪(CFX96, 美国 Bio-Rad 公司)上进行,使用 Bio-Rad CFX Manager 软件对数据进行分析处理。反应条件设置如下:50.0℃ 预变性 10 min, 95.0℃ 变性 10 min, 循环反应 40 次后 95.0℃ 变性 10 s, 55.0℃ 退火 30 s, 信号采集。最后形成以 Ct 值为纵坐标,起始模板量的对数值为横坐标绘制的标准曲线,两种托槽的细菌浓度通过标准曲线可以得知(见图 2)。然后按照公式:细菌数量(copies) = 浓度(ng/μl) × 10⁻⁹ / (序列长度 × 649),换算成细菌拷贝数。变异链球菌的构成比 = 变异链球菌(copies) / 总细菌(copies)。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计学软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 引物特异性

随机选取氧化锆陶瓷托槽和氧化铝陶瓷托槽的 DNA 样本各 2 个,并选取变异链球菌和通用菌的重组质

粒各 4 个,经普通 PCR 反应后,用琼脂糖凝胶电泳试验鉴定,结果示扩增产物长度均 <100 bp,与预期结果一致。说明引物特异性良好,重组质粒合成正确。见图 1。

2.2 变形链球菌和通用菌的标准曲线

Nano-drop 紫外分光光度计检测变形链球菌质粒

浓度为 $120 \text{ ng}/\mu\text{l}$,通用菌为 $197.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$,标准品经 5 个梯度稀释后,荧光定量 PCR 扩增,获得 1 条以起始模板拷贝数 (X) 为横坐标,以 CT 值 (Y) 为纵坐标的标准曲线,相关系数 R^2 分别为 0.964 和 0.996,扩增效率 >80%。见图 2。

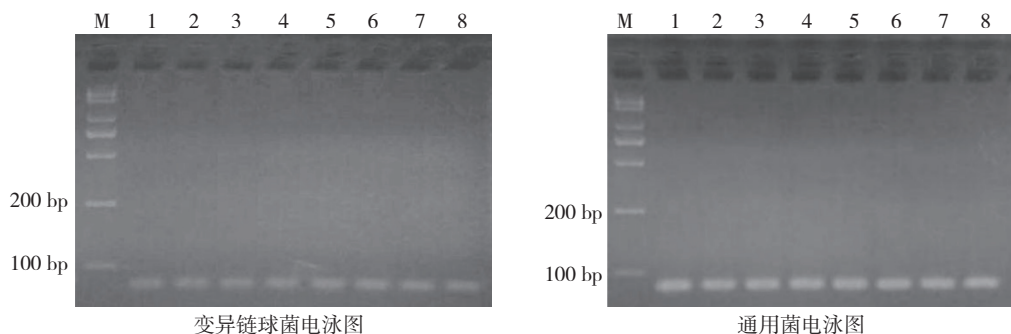


图 1 琼脂糖凝胶电泳成像图

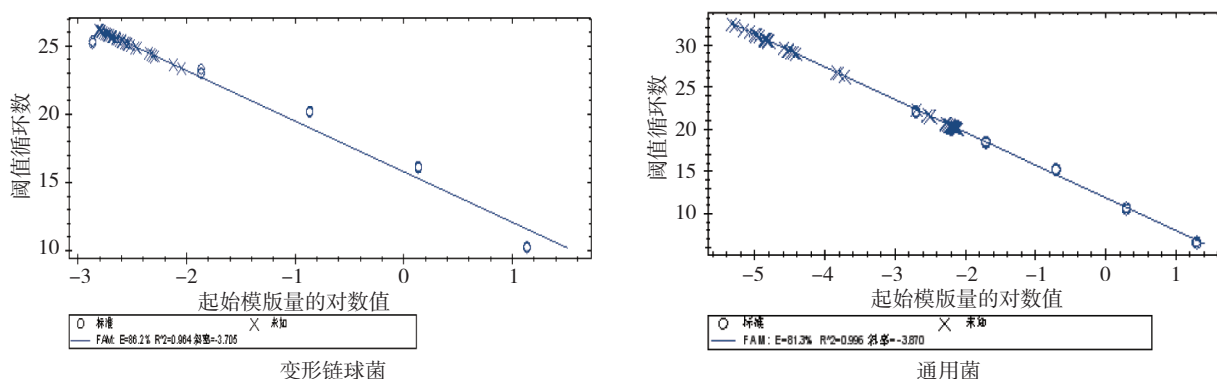


图 2 标准曲线

2.3 两种托槽表面的附着细菌比较

氧化铝陶瓷托槽表面的变形链球菌构成为 $(73.03 \pm 39.74)\%$,氧化铝陶瓷托槽为 $(51.76 \pm 34.52)\%$,经 t 检验,差异无统计学意义 ($t=1.212$, $P=0.243$),氧化铝陶瓷托槽表面的变形链球菌数和总细菌数分别为 $(4.31 \pm 2.44) \times 10^9$ 和 $(7.26 \pm 3.35) \times 10^9$ 个,氧化铝陶瓷托槽分别为 $(2.62 \pm 4.76) \times 10^9$ 和 $(7.32 \pm 4.07) \times 10^9$ 个,两组比较,差异无统计学意义 ($t=2.045$ 和 0.037 , $P=0.073$ 和 0.971)。

3 讨论

随着生活水平的提高,人们对牙齿矫正过程中的美观性提出了更高的要求。目前正畸临床工作中最常使用的美观托槽主要是氧化铝陶瓷托槽,但有文献

表明,氧化铝陶瓷托槽具有机械性能差、易折裂、椅旁操作时间长及易脱落等缺点^[4]。而氧化铝陶瓷的化学性质稳定、美观及生物相容性好,抗弯强度为 $900 \sim 1200 \text{ MPa}$,断裂韧性为 $9 \sim 10 \text{ MPa} \cdot \text{m}^{1/2}$,是氧化铝陶瓷的 $2 \sim 3$ 倍^[5]。氧化铝陶瓷托槽早在 1994 年就被研发出来,但是由于加工工艺等科学技术限制,没有在临床中被推广使用,随着科学技术的发展,它再次成为正畸研究的热点^[5]。粘接强度和对细菌附着能力的影响,是评价正畸托槽良好性质的基本条件,在对细菌附着能力影响的方面,尚未见相关的研究报告。因此,本实验将两种美观托槽做对比,研究氧化铝陶瓷托槽是否更利于保持牙面卫生。

在粘接强度方面,笔者前期采用万能材料试验机检测氧化铝陶瓷托槽、氧化铝陶瓷托槽和金属托槽在离体前磨牙上的抗剪切粘接强度,结果显示,两种陶

瓷托槽组与牙面的抗剪切粘接强度无明显差异,但两者较金属托槽组的粘接强度高,它们的粘接强度均在临床适用范围之内。另外,在实验过程中,有 3 枚氧化铝陶瓷托槽发生折裂,而氧化锆陶瓷托槽无折裂情况发生,可见氧化锆陶瓷托槽的抗折强度可能较氧化铝陶瓷托槽高,利于临床使用。

应用 TaqMan 探针技术的实时荧光定量 PCR 反应中,只有能够与探针碱基互补且发生杂交反应的 PCR 扩增才能正常产生荧光信号,较实时荧光定量 PCR 更加准确。石晶等^[6]应用此方法检测了正畸病人口腔变异链球菌的变化。BAKA 等^[7]应用此方法检测牙冠表面包括变形链球菌在内的 4 种细菌。本实验采用此方法检测氧化锆陶瓷托槽对变形链球菌的影响。

变形链球菌是口内牙齿白斑形成的主要致病菌,可达其他细菌数量的 2 倍^[7]。固定矫治器可影响口腔变形链球菌的数目^[8]。有研究表明,自锁托槽与普通金属托槽和普通金属托槽与塑料托槽比较,它们对变形链球菌的附着性均无差异^[7,9]。在评估牙面白斑的形成方面由于研究变形链球菌在总菌中所占比例比单独研究变形链球菌更有意义,所以实验检测了变形链球菌在总菌中的构成比^[10]。结果显示,两种陶瓷托槽对变形链球菌的附着性比较无差异,这可能就是因为它们均为惰性材料,其理化性质均稳定^[11]。可见,两种美观托槽在对变形链球菌附着能力影响的效果方面无差异。

综上所述,氧化锆陶瓷托槽对变形链球菌的影响与氧化铝陶瓷托槽比较无差异,可供临床进一步研究。

参 考 文 献:

[1] MCBAIN A J. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview[J].

Adv Appl Microbiol, 2009, 69: 99-132.

- [2] BAKA Z M, BASCIFTCI F A, ARSLAN U. Effects of 2 bracket and ligation types on plaque retention: a quantitative microbiologic analysis with real-time polymerase chain reaction[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2013, 144(2): 260-267.
- [3] YOSHIDA A, SUZUKI N, NAKANO Y, et al. Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(9): 4438-4441.
- [4] NISHIO C, MENDES A M, ALMEIDA M A, et al. Evaluation of esthetic brackets' resistance to torsional forces from the archwire[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2009, 135(1): 42-48.
- [5] OZKURT Z, KAZAZOGLU E. Clinical success of zirconia in dental applications[J]. J Prosthodont, 2010, 19(1): 64-68.
- [6] 石晶, 闫征斌, 侯景秋, 等. 无托槽隐形矫治与传统固定矫治对牙周变异链球菌和牙龈卟啉单胞菌的影响 [J]. 国际口腔医学杂志, 2016(02): 151-154.
- [7] BAKA Z M, BASCIFTCI F A, ARSLAN U. Effects of 2 bracket and ligation types on plaque retention: a quantitative microbiologic analysis with real-time polymerase chain reaction[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2013, 144(2): 260-267.
- [8] 郝春波, 谢奇, 陈小滨, 等. 金属网底托槽正畸矫治器治疗 6 个月内口腔菌群的变化 [J]. 中国组织工程研究, 2014(39): 6287-6291.
- [9] JURELA A, REPIC D, PEJDA S, et al. The effect of two different bracket types on the salivary levels of *S mutans* and *S sobrinus* in the early phase of orthodontic treatment[J]. Angle Orthod, 2013, 83(1): 140-145.
- [10] CHOI E J, LEE S H, KIM Y J. Quantitative real-time polymerase chain reaction for *streptococcus mutans* and *streptococcus sobrinus* in dental plaque samples and its association with early childhood caries[J]. Int J Paediatr Dent, 2009, 19(2): 141-147.
- [11] 韩月红, 成之远, 王明德. 氧化锆陶瓷与镍铬合金口腔材料的细菌黏附性对比 [J]. 中国组织工程研究, 2016(08): 1089-1094.

(李科 编辑)