

[文章编号] 1000-1182(2009)02-0210-03

不同形貌氧化锌对复合树脂 抗变异链球菌活性的影响

牛丽娜¹ 陈吉华¹ 方明¹ 杨聚才¹ 肖玉鸿¹ 倪峰²

(1.第四军医大学口腔医院 修复科, 陕西 西安 710032; 2.解放军南京军区机关医院 口腔科, 江苏 南京 210016)

[摘要] 目的 研究3种不同形貌氧化锌(ZnO)对复合树脂抗菌性能的影响。方法 液体稀释法测试纳米级ZnO粉、四针状氧化锌晶须(T-ZnOw)和微米级ZnO粉对变异链球菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。然后按5%的比例分别将3种ZnO添加于化学固化型复合树脂粉剂中,用薄膜覆盖法测定老化处理前后树脂的抗菌率,并比较其差异。结果 纳米级ZnO粉、T-ZnOw和微米级ZnO粉的MIC分别为78.13、312.50、1 250.00 $\mu\text{g/mL}$; MBC分别为156.25、625.00、1 250.00 $\mu\text{g/mL}$ 。添加了纳米级ZnO粉、T-ZnOw和微米级ZnO粉的复合树脂老化处理前的抗菌率分别为(93.58 \pm 5.95)%、(89.42 \pm 4.11)%、(78.97 \pm 3.90)%;老化处理后的抗菌率分别为(89.01 \pm 7.91)%、(84.63 \pm 4.72)%、(72.27 \pm 3.89)%。结论 添加3种不同形貌的ZnO均能增强复合树脂的抗菌活性,其中纳米级ZnO的抗菌性最强,微米级ZnO最弱,而T-ZnOw在比表面积较小的情况下仍表现出较强的抗菌作用。

[关键词] 复合树脂; 四针状氧化锌晶须; 氧化锌; 变异链球菌

[中图分类号] R783.1 **[文献标识码]** A

Effects of three different zinc oxide incorporation on the antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of composite resin NIU Li-na¹, CHEN Ji-hua¹, FANG Ming¹, YANG Ju-cai¹, XIAO Yu-hong¹, NI Feng². (1. Dept. of Prosthodontics, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Dept. of Stomatology, PLA Organ Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of incorporating three different zinc oxide(ZnO) on the antibacterial activity of composite resin. **Methods** The minimal inhibitory concentration(MIC) and minimal bactericidal concentration(MBC) of nano-ZnO, tetrapod-like zinc oxide whiskers(T-ZnOw), micro-ZnO against *Streptococcus mutans* were examined by the broth dilution test. Then the three different ZnO were added to the powder of one kind of bicomponent self-cured composite resin at 5% respectively, and the antibacterial activities of the resin specimens were evaluated using the membrane covering method before and after 3-month accelerating aging. **Results** The MIC values of the three different ZnO against *Streptococcus mutans* were 78.13, 312.50 and 1 250.00 $\mu\text{g/mL}$ respectively and the MBC values were 156.25, 625.00, 1 250.00 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The antibacterial ratios of the resin specimens incorporating with 5% of the three different ZnO were (93.58 \pm 5.95)%, (89.42 \pm 4.11)% and (78.97 \pm 3.90)% respectively, while after 3-month accelerating aging those were (89.01 \pm 7.91)%, (84.63 \pm 4.72)% and (72.27 \pm 3.89)%. **Conclusion** The three different ZnO could improve the antibacterial activity of the composite resin. The nano-ZnO exhibit the strongest antibacterial activity, while the micro-ZnO weakest. The T-ZnOw presents comparatively strong antibacterial activity although with smaller specific surface area.

[Key words] composite resin; tetrapod-like zinc oxide whiskers; zinc oxide; *Streptococcus mutans*

复合树脂由于众多的优越性而在临床上得到广泛的应用,但是因其聚合收缩而引发的微渗漏及继发龋问题仍未能得到根本解决^[1]。学者们尝试将各种抗菌剂如季铵盐、洗必泰^[2]、载银抗菌剂^[3]等添加

到复合树脂中,取得了一定的抗菌效果,但还是存在如抗菌寿命短、变色、机械性能下降等问题。近期有报道指出氧化钙、氧化镁、氧化锌(zinc oxide, ZnO)具有较强的抗菌性,其中ZnO具有更多优点:在中性环境中无需光照即表现出显著的抗菌性,颜色和化学稳定性好,同时锌还是一种人体所必需的矿物元素^[4]。本实验拟将3种不同形貌的ZnO,即纳米级ZnO粉、四针状氧化锌晶须(tetrapod-like zinc

[收稿日期] 2008-08-12; [修回日期] 2008-11-17

[基金项目] 陕西省科技攻关基金资助项目(2008K11-02)

[作者简介] 牛丽娜(1983-),女,河南人,硕士

[通讯作者] 陈吉华, Tel: 029-84776329

oxide whiskers, T-ZnOw)、微米级ZnO粉添加到化学固化型复合树脂中,研究其对复合树脂抗菌性能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

T-ZnOw(成都交大晶宇科技有限公司),纳米级ZnO粉、微米级ZnO粉(陕西省师范大学化学与材料科学学院),化学固化型复合树脂(粉液型)由第四军医大学口腔材料实验室提供,变异链球菌ATCC 25175由第四军医大学口腔医院检验科提供,比表面积测试仪(北京精微高博科学技术有限公司),脑心浸出液(brain-heart infusion, BHI)(Sigma公司,美国),人工唾液(第四军医大学口腔医院药剂科),聚乙烯薄膜(Interscience公司,法国)。

1.2 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度的检测

将3种ZnO粉用无菌BHI液体培养基按二倍稀释法制成10个浓度梯度的抗菌剂应用液。将传代培养的变异链球菌ATCC 25175配制成 1.5×10^7 CFU/mL的菌悬液。每个试管中加入抗菌剂应用液1 mL、菌液100 μ L及无菌BHI液体培养基900 μ L后,置于37 $^{\circ}$ C培养箱中厌氧培养24~48 h。试管内液体清亮的抗菌剂最低浓度为该抗菌剂的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。接种环挑取清亮试管中的培养物,划线接种于BHI琼脂平板上,孵育48 h,无细菌生长的最低抗菌剂浓度为该抗菌剂的最小杀菌浓度(minimal bactericidal concentration, MBC)。重复3次,同时设阴性、阳性对照。阳性对照即不加实验药液,只加入等量的BHI培养液和稀释后的菌悬液;阴性对照即只加入等量的实验药液和BHI培养液而不加菌悬液。

1.3 树脂抗菌率的检测

1.3.1 样本的制备 按5%的添加比将3种不同形貌的ZnO分别加于复合树脂中作为实验组,未添加ZnO的复合树脂为空白对照组,聚乙烯薄膜为阳性对照组。按上述比例将抗菌剂添加到复合树脂的粉剂中,手工混匀后按7:3的粉液比进行调拌,充填于内径10 mm、厚2 mm的聚四氟乙烯模具中,覆盖聚乙烯薄膜,并用玻璃板加压。每组3个试件,均新鲜使用,并于实验前用70%乙醇溶液擦拭样品表面,1 min后用无菌水冲洗,无菌环境下干燥备用。将阳性对照组的聚乙烯薄膜制备成直径为10 mm的圆片,紫外光消毒2 h后备用。

1.3.2 样本的抗菌率检测 将样本置于无菌琼脂平板上,稍加压使样品嵌入琼脂中,并保持其上表面高于琼脂平面,以固定样品,防止其在实验过程

中移动。制备浓度约为 1×10^6 CFU/mL的菌悬液,分别取15 μ L滴加在样品表面(阳性对照组将菌液加于聚乙烯薄膜上),覆盖聚乙烯薄膜,铺平,使细菌均匀接触样品,同时防止菌液挥发^[5]。37 $^{\circ}$ C厌氧孵育24 h后用无菌生理盐水充分洗脱附于样本及覆盖膜表面的细菌。混匀洗脱液,倍比稀释后取100 μ L接种至BHI琼脂平板上,厌氧孵育24~48 h后行菌落计数。以平板上菌落数为30~300的平板为准进行活菌计数,并根据稀释倍数计算样品及对照组的回收菌数。以上实验重复3次,取平均值。将测定的菌落数按如下公式计算抗菌率: $r(\%) = (b - c) / b \times 100\%$ 。 r 为抗菌率(%); b 为空白对照样品平均回收菌数; c 为添加抗菌剂的树脂样品平均回收菌数。

1.3.3 抗菌长效性实验 实验分组同1.3.1,每组制备3个试样,消毒后浸泡于2 mL无菌人工唾液中。所有试样在37 $^{\circ}$ C恒温水浴箱内老化处理3个月,每3 d更换1次人工唾液。抗菌率的测试同1.3.2。本实验重复3次,实验结果与未经老化处理的试件相比较。

1.4 统计学分析

抗菌率及长效性实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5软件进行方差分析及组间SNK- q 检验。

2 结果

纳米级ZnO粉、T-ZnOw、微米级ZnO粉对变异链球菌的MIC分别为78.13、312.50、1 250.00 μ g/mL;MBC分别为156.25、625.00、1 250.00 μ g/mL。

抗菌率及长效性实验中,空白对照组和阳性对照组未表现出任何抗菌作用。添加了纳米级ZnO粉、T-ZnOw、微米级ZnO粉的样本老化前抗菌率为(93.58 \pm 5.95)%、(89.42 \pm 4.11)%、(78.97 \pm 3.90)%。添加了微米级ZnO粉的复合树脂抗菌率较低,与其他2组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。老化后3组复合树脂的抗菌率为(89.01 \pm 7.91)%、(84.63 \pm 4.72)%、(72.27 \pm 3.89)% ,与老化前的抗菌率相比,添加了微米级ZnO粉的复合树脂抗菌率下降明显($P < 0.05$)。

3 讨论

复合树脂因其自身理化性质的制约及聚合收缩而可能引起的微渗漏、继发龋等问题影响了复合树脂的临床修复效果。在尽量减小其聚合收缩的同时如何使复合树脂具有抗菌性成为解决这一问题的另一条途径。无机抗菌材料ZnO既克服了有机抗菌剂耐热性差、抗菌寿命短、易耐药等缺点,又避免了银系抗菌剂易变色的不足,同时还无需光照,是应用于口腔修复材料抗菌的理想选择。

ZnO的抗菌机制还不是很明了,有学者^[6-7]认为过氧化氢的产生是ZnO抗菌机制的主要因素,细菌的细胞膜对过氧化氢是可渗透的,从而引起细菌的某些损伤以抑制细菌的生长或杀死细菌。为了更有效地利用ZnO表面产生的过氧化氢来抗菌,发明了以活性炭为载体的纳米ZnO,同时还阐明ZnO的抗菌活性与其粒径大小、比表面积及结晶度有关^[6,8]。

本实验结果显示纳米级ZnO对变异链球菌的抗菌性最强,而微米级ZnO作用最弱,这可能与ZnO的粒径及比表面积有关。因为微米级ZnO粒径为0.3~0.5 μm,比表面积为7.02 m²/g;而纳米级ZnO的粒径为80~120 nm,比表面积达到了25.7 m²/g。随着ZnO粒径的减小,比表面积增大,单位体积的ZnO颗粒量增加,释放的过氧化氢浓度随之增高,表现出更好的抗菌作用^[8]。另外也有可能因为纳米ZnO具有较大的比表面积和较高的表面能,因而对细菌具有更强的吸附作用,从而表现出更好的抗菌效能。

T-ZnOw是一种新型材料,它具有一种空间正四面体构型,是迄今为止发现的唯一具有三维立体结构的晶须,并表现出多种独特功能和用途。其独有的外形、独特的功能及其在广谱抗菌的同时又能增强材料的特点使其成为目前的研究热点。本实验中使用的T-ZnOw针径为0.5~2.5 μm,针长为25~100 μm,比表面积为7.74 m²/g。虽然它与微米级ZnO的比表面积近似,但却表现出更强的抗菌作用,这可能与其独特的四针状结构有关。一方面T-ZnOw的针径及针长虽都是微米级,但其尖端相当部分在纳米量级,从而具有纳米材料所具备的特殊的表面效应和高活性;另一方面T-ZnOw因其独特的四针状结构,分散后可形成立体导电网络结构,为抗菌离子提供高效传输途径^[9]。

本研究结果表明,添加了纳米级ZnO和T-ZnOw的复合树脂均具有较强的抗菌作用;添加了微米级ZnO的复合树脂抗菌作用较差,与其他2组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。这虽然与所测的MIC、MBC结果相同,但是纳米ZnO组的抗菌率却并未达到预计水平,这可能与纳米材料较易团聚有关。因为表面处理过程可能会对ZnO抗菌性能产生影响,所以本实验中各组抗菌剂均未经表面处理。由于纳米ZnO颗粒表面能较高,在与有机材料混和时,易发生团聚,难以实现均匀分布,从而使其抗菌性的发挥受到影响。而T-ZnOw虽然比表面积较小,但T-ZnOw可在材料内部形成立体导电网络结构,晶须间互相联系,不仅试件表面晶须发挥抗菌作用更能动员试件内部晶须共同作用,从而大大提高了其抗菌效果,同时晶须尖端有纳米活性抗菌作用,并且

针尖部位不会产生团聚,是真正意义的可分散的纳米材料,从而有利于其抗菌活性的发挥^[9]。此外,T-ZnOw的四针状结构及高强度高模量性质,使其易在材料中获得均匀分布并对材料具有较强的增强增韧作用,未经偶联处理时,在少量添加的情况下应该不会对树脂的机械性能产生较大的影响,这也是纳米及微米ZnO所不具备的优点。有关添加3种ZnO对复合树脂机械性能的影响及表面处理过程对ZnO抗菌作用及复合材料机械性能的影响仍需进一步研究。

老化前后的抗菌率相比,添加了纳米级ZnO及T-ZnOw的样本均表现出较好的抗菌长效性,且二者与添加了微米级ZnO的样本间差异有统计学意义($P < 0.05$),这可能与微米ZnO比表面积较小,树脂基质对其包埋固定效果不好有关,也可能因为其粒径与复合树脂填料粒径(1~5 μm)不匹配,从而增大了填料的孔隙率及材料的不稳定性,导致了ZnO溶出增多,树脂抗菌效果下降明显。

添加3种不同形貌的ZnO均能增强复合树脂的抗菌活性。但有关添加纳米ZnO或T-ZnOw对树脂机械性能的影响还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems[J]. Dent Mater, 2003, 19(6): 449-457.
- [2] Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, et al. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite[J]. J Dent Res, 1994, 73(8): 1437-1443.
- [3] Yoshida K, Tanagawa M, Matsumoto S, et al. Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials[J]. Eur J Oral Sci, 1999, 107(4): 290-296.
- [4] Sawai J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders(ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay[J]. J Microbiol Methods, 2003, 54(2): 177-182.
- [5] Imazato S, Ebi N, Takahashi Y, et al. Antibacterial activity of bactericide-immobilized filler for resin-based restoratives[J]. Bio-materials, 2003, 24(20): 3605-3609.
- [6] Yamamoto O, Komatsu M, Sawai J, et al. Effect of lattice constant of zinc oxide on antibacterial characteristics[J]. J Mater Sci Mater Med, 2004, 15(8): 847-851.
- [7] Saito I, Matsugo S. Chemistry of active oxygen species[J]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1988, 33(16): 2665-2677.
- [8] Yamamoto O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide[J]. Int J Inorg Mater, 2001, 3(7): 643-646.
- [9] 楚珑晟, 周祚万, 段晓飞, 等. ZnOw/纳米复合抗菌剂的研制[J]. 材料导报, 2003, 17(6): 84-85.
CHU Long-sheng, ZHOU Zuo-wan, DUAN Xiao-fei, et al. A study of zinc oxide whisker/nano-ZnO composite antimicrobials[J]. Mater Rev, 2003, 17(6): 84-85.