

利用激光共聚焦扫描显微镜观察根管外细菌的分布和活性

唐志娟,王娟*

(南京医科大学口腔医学研究所,南京医科大学附属口腔医院牙体牙髓科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**利用激光共聚焦扫描显微镜观察慢性根尖周炎患牙根尖区根管外细菌的分布范围和活性。**方法:**临床采集 10 例需拔除的伴有慢性根尖周炎的单根牙(实验组)和 5 例因正畸需要拔除的健康单根牙(对照组)。所有样本首先经 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] 死活菌染色试剂盒染色,各样本包埋后由根尖向冠方切取 5 张 1 mm 厚的切片。每张切片上随机选择 3 个视野,用激光共聚焦扫描显微镜观察每张切片上根管外细菌的分布情况和细菌的活性。**结果:**对照组中,牙骨质有较弱的荧光信号,通过设定观察条件,以对照组切片上无荧光信号为基线进行观察。实验组 10 例样本中,8 例样本的根尖区切片的牙根外表面可观察到由显示绿色荧光信号的活菌和显示红色荧光信号的死菌共同构成的根管外生物膜。根管外细菌主要分布于距根尖 2~3 mm 范围内的根面牙骨质上。在 68% 的被观察视野中,活菌的绿色荧光的强度强于死菌的红色荧光。**结论:**根管外生物膜由活菌和死菌共同构成,分布于部分慢性根尖周炎患牙的根尖区牙骨质外表面上。

[关键词] 根管外生物膜;激光共聚焦扫描显微镜;细菌活性

[中图分类号] R781.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)02-249-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150227

Observation of extraradicular bacterial localization and viability by confocal laser scanning microscopy

Tang Zhijuan, Wang Juan*

(*Institute of Stomatology, Department of Endodontics and Operative, School of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029, China*)

[Abstract] **Objective:**To verify the existence of extraradicular biofilm of teeth with radiographically visible chronic periapical lesion and to observe the distribution and viability of extraradicular bacteria using confocal laser scanning microscopy (CLSM). **Methods:**Ten single-rooted teeth with periapical radiolucent areas were collected. Five single-rooted teeth extracted for orthodontic reasons were selected as controls. All of the roots were embedded in methylmethacrylate after staining with LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kits. Then, five evenly distributed transverse sections (1 mm thick) were cut from the apex to the corona. Finally, the sections were examined by CLSM. **Results:**There were weak auto-fluorescence signals in the control group. After adjusting the viewing conditions to obtain a baseline, at which no fluorescence was detectable in the control group specimens, 8 of the 10 disease group teeth showed positive fluorescence signals on the external root surfaces. The distribution of extraradicular bacteria was extensive within a 2~3 mm range from the root tip to the corona. On 68% of optical views, the intensity of green fluorescence signals was stronger than that of red fluorescence signals. **Conclusion:**There were live and dead extraradicular bacteria on the external root surfaces of teeth with chronic periapical periodontitis.

[Key words] extraradicular biofilm; confocal laser scanning microscopy; bacterial viability

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(02):249-253]

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81300868);江苏省高校自然科学基金项目(13KJB320008);江苏高校优势学科建设工程资助项目(2014-37)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: candy1249@126.com

根尖周炎是牙体牙髓科临床诊疗过程中的常见病和多发病,多由因龋坏、外伤和医源性因素造成的牙髓坏死发展而来,伴有的临床症状包括牙齿剧烈的疼痛和颌面部肿胀,也是造成成年人失牙的主要原因之一^[1-2]。以往的流行病学研究表明,根尖周炎的根管治疗成功率明显低于死髓牙和活髓牙^[3]。有研究人员提出根尖周炎根管治疗失败率较高的原因是在根尖损伤区的根管外组织中存在有微生物,常规保守的根管治疗难以涉及到这些微生物滞留的部位,难以控制这些部位的感染,从而造成局部的长期慢性炎症,导致根管治疗的失败^[4]。已有相关研究利用扫描电子显微镜观察了根尖周炎患牙根尖区根管外微生物的定植情况,在根管外区域观察到了球菌、杆菌和丝状菌,并观察到了这些细菌形成的生物膜结构^[5-6]。但并未见对根管外微生物的分布范围和活性进行研究的报导。进一步证实根尖区根管外微生物的存在,并对其分布范围和活性进行检测,对于探讨持续性根尖周感染的发病机制和改进根管治疗策略有重要意义。

Invitrogen 公司的 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] 试剂盒是用于区分死菌和活菌的市场化成熟产品。已被广泛应用于环境、食品卫生和牙科研究。该试剂盒中的 SYTO[®] 9 能够渗透到活菌完整的细胞壁,而 PI 可以穿透死菌不完整的胞壁与核酸结合而淬灭 SYTO[®] 9 的荧光信号。从而使死菌显红色,而活菌显绿色。激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)是一种激光扫描、计算机自动化分析与显微镜技术相结合的医学图像分析仪器^[7]。2011年,Parmar 就利用 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] 试剂盒和 CLSM 观察了粪肠球菌体外感染模型中粪肠球菌在牙本质小管中的分布范围和活性^[8]。

据此,本研究将死活菌检测试剂盒和激光共聚焦扫描显微镜联合应用来观察慢性根尖周炎患牙根管外细菌在根尖区牙根外表面的分布范围和活性。

1 材料和方法

1.1 材料

在严格遵循无菌操作的条件下,从南京医科大学附属口腔医院口腔外科获得拔除的伴有慢性根尖周炎的单根牙 10 例(实验组),分别标记为 P1~P10,所采集的样本牙齿经 X 线检查伴有直径<1 cm 的根尖周暗影,未行根管治疗,临床检查没有明显

的牙龈炎症,各位点的牙周探诊深度不超过 3 mm,不伴有瘘管。阴性对照选择因正畸需要拔除的健康单根牙 5 例(对照组),要有完整的牙冠,X 线片上无明显异常(包括牙周膜、硬骨板和牙槽骨)。口腔检查及临床标本的采集都得到患者的知情同意,并获得本院伦理委员会的批准。离体牙样本被迅速转移至超净工作台中,用 0.9% 的灭菌生理盐水充分洗涤牙齿表面的血污。在滴加无菌生理盐水的条件下,用金刚砂轮片(911H Hyperflex disc, Brasseler, Savannah, GA)去除釉牙骨质界冠方牙体组织。

1.2 方法

1.2.1 染色

用灭菌生理盐水稀释染色液, SYTO[®] 9 和 PI (LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kits, Invitrogen 公司, 美国)的最终稀释浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 60 $\mu\text{mol/L}$ 。将实验组和对照组样本置入 5 ml EP 管中,加入染色液,并轻柔摇晃 EP 管 30 s,暗处放置 30 min。再将样本移入装有灭菌盐水的 EP 管中充分洗涤 3 次,暗处晾干。

1.2.2 包埋和切片

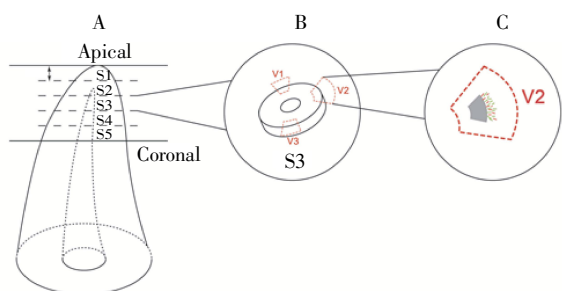
包埋方法参照 Aziz^[9]的方法进行。图 1 为切片和 CLSM 观察方法的示意图。将牙齿冠向下包埋于 5 ml EP 管中,倒入调拌好的流动性的甲基丙烯酸甲酯(Orthocryl[®] acrylics; Dentaaurum GmbH, Ispringen 公司, 德国),使包埋液面略超过根尖,在管壁上标记根尖的位置,将包埋块置于冷水中避光聚合。用硬组织切片机(LEICA SP1600, 德国)按与牙长轴垂直的方向从根尖向冠方切片,每个样本切取 5 张切片,即切取根尖 5 mm 范围内的组织,每片厚 1 mm,分别标记为 S1~S5。切片过程中用铝箔纸包裹切片机罩以避光。

1.2.3 CLSM 观察

切片在共聚焦扫描显微镜下进行观察(Leica TCS SP2, 德国),激发光源为 488 nm, 505~550 nm 光栅处观察 SYTO[®] 9 的绿色荧光, 650 nm 光栅处观察 PI 的红色荧光。每张切片随机选取 3 个视野进行观察,分别标记为 V1~V3,记录每个视野的绿色荧光强度(Fg)和红色荧光强度(Fr)。

1.2.4 图像分析

计算每个样本 5 张切片中能观察到荧光信号的切片数,了解细菌在根管外自根尖向冠方分布的范围。利用 Leica Confocal Software 软件,计算和比较每个视野的绿色荧光强度(Fg)和红色荧光强度(Fr)。



牙根从根尖向冠方按与牙长轴垂直的方向切取 5 片(A), 每片厚 1 mm(B)。每张切片随机选择 3 个视野进行观察(C)。

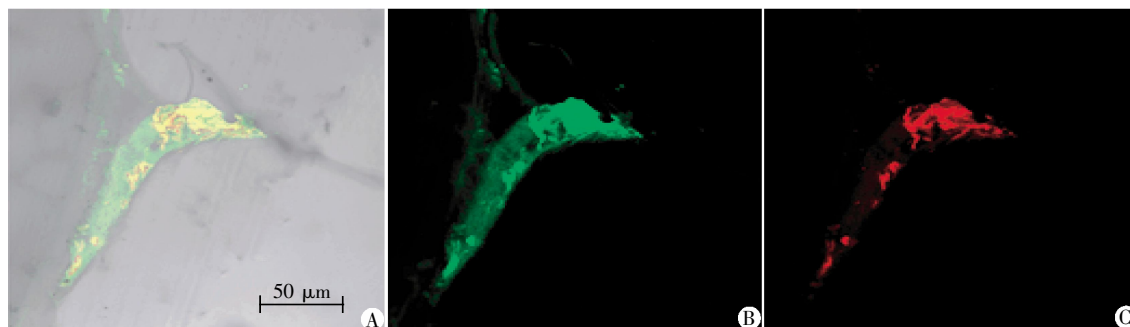
图 1 牙根切片和激光共聚焦扫描显微镜观察的示意图

Figure 1 Schematic illustrating the sectioning of roots and confocal laser scanning microscopy (CLSM) visualization of extraradicular bacteria

2 结果

2.1 根尖区根管外细菌的定植

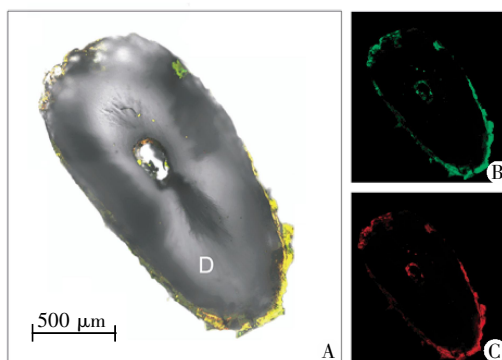
对照组中, 牙骨质有较弱的荧光信号, 通过设定观察条件, 以对照组切片上无荧光信号为基线进行观察。实验组 10 例样本中, 8 例样本的根尖区切片的牙根外表面可观察到有细菌染色阳性的绿色(活菌)和红色(死菌)荧光信号。图 2 为 P1 样本切片 S1, 即距根尖 1 mm 处的切片。A 图为红色荧光、绿色荧光和牙体组织重叠的影像, 可见根尖呈椭圆形, 中央可见椭圆形根尖孔, 在椭圆形根面周围可见红色、绿色和黄色信号, 黄色信号为红色荧光和绿色荧光重叠的结果。B 图为单纯绿色荧光的影像。C 图为单纯红色荧光的影像。说明在根尖区牙根外表面有细菌的定植, 并同时存在有活菌和死菌。细菌整体呈膜性结构紧密附着于根面, 厚度不均。在根管内侧壁上也可见少量的荧光信号。图 3 为 P5 样本切片 S2, 可见在根面一凹陷处有较强烈的荧光信号, 说明细菌在这一根面凹陷区滞留较多, 并且



A: 可见根尖一凹陷区内有较多的染色细菌; B: 活菌染色呈现的绿色荧光; C: 相同部位死菌染色呈现的红色荧光, 此处绿色荧光的面积和强度明显大于红色荧光; D: 牙本质。

图 3 P5 样本 S2 切片上根尖凹陷区的死活菌染色 CLSM 扫描图($\times 200$)

Figure 3 Confocal laser scanning microscopy images of the section which had a concave on root surface (P5-S2) ($\times 200$)



A: 可见根尖组织周围有红色荧光和绿色荧光重叠形成的黄色影像($\times 100$); B: 活菌染色呈现的绿色荧光; C: 相同部位死菌染色形成的红色荧光; D: 牙本质。

图 2 P1 样本距根尖 1 mm 切片(S1)的激光共聚焦扫描显微镜观察结果

Figure 2 Confocal laser scanning microscopy images of the section which was 1 mm distance to root tip (P1-S1)

绿色荧光的强度和范围大于红色荧光。

2.2 根尖区根管外细菌的分布范围

8 例阳性样本中, 所有样本的 S1 切片都可见荧光阳性信号, 所有样本的 S4 和 S5 切片均未见荧光阳性信号, 而部分样本的 S2 和 S3 切片可见荧光阳性信号, 即每个样本能观察到荧光阳性信号的切片数不一致。其中, 5 例阳性样本的细菌分布于由根尖至距根尖 3 mm 范围内的牙根外表面上; 2 例分布于由根尖至距根尖 2 mm 范围内的牙根外表面上; 1 例分布于由根尖至距根尖 2 mm 范围内的牙根外表面上。

2.3 根尖区根管外细菌的活性

附着在根尖区牙根外表面上的根管外生物膜中可以同时观察到绿色的活菌和红色的死菌。在 68% 的被观察视野中, 活菌的绿色荧光的强度强于死菌的红色荧光。

3 讨论

流行病学调查表明,慢性根尖周炎患牙的根管治疗成功率较不伴根尖周病损的患牙低,有10%~20%的失败率,以致形成持续性的根尖周感染^[10-11]。有些根管治疗失败的病例也可因根管治疗过程中的操作性失误造成,如根管侧穿、台阶形成、器械分离、遗漏根管和解剖异常(包括根尖分歧、根管峡和其他形态异常等)^[12]。但是临床上有些根管治疗完善的病例,仍然会有持续的或进行性扩大的根尖周暗影,并伴有咬合痛等主观不适症状。有学者提出,根管治疗失败的原因可能是因为在根管系统以外存在微生物的定植和感染,这些微生物形成生物膜结构,甚至形成牙结石,从而形成持续性的感染^[13]。细菌的存在是持续性根尖周炎发生的相关致病因素,已有一些研究表明大部分的根管治疗失败是因为在根管系统内和/或根尖孔外存在微生物的感染^[14]。2005年,Noguchi等^[15]用改良Brown and Brenn细菌染色这种组织学方法观察了5例难治性根尖周炎患牙。发现2例牙齿的根尖区域的根面上存在有30~40 μm厚的根管外生物膜。2007年,Leonardo等^[16]利用扫描电子显微镜观察了10例拔除的伴有根尖暗影患牙的根尖区外表面,有微生物定植和聚集于所有样本的根尖区根面上。这些细菌都由细胞外基质所包绕,主要为球菌和杆菌,并形成生物膜样结构。扫描电子显微镜是原位观察菌斑生物膜的理想手段。它能够很好地呈现细菌的形态特征,但是不能提供有关细菌活性方面的信息。然而,对原位状态下细菌活性的认识,对于阐明持续性炎症的致病机制具有一定的意义。活菌能够分泌多种细菌毒素,如外毒素、内毒素和各种酶成分。这些毒性物质可以直接对宿主组织造成损伤。而死菌则可能是通过其细胞壁等抗原成分诱导宿主的继发性免疫炎症反应来致病^[17]。因此,对于根管外细菌的存在及其活性状态的研究有利于进一步了解根尖周感染的致病机制。

本研究中,10例实验组样本中有8例样本的根尖区牙根外表面检测到细菌染色的荧光阳性信号。这些由死菌和活菌共同构成的细菌群落在根尖区根面上形成生物膜状结构(图2)。这一结果再次证明了根管外细菌生物膜的存在。本课题组在前期研究中利用扫描电子显微镜和Brown and Brenn细菌染色相结合的方法,也在部分慢性根尖周炎组样本的根尖区观察到了根管外生物膜,患牙根尖区几乎没有胶原纤维的覆盖,牙骨质暴露和吸收,牙骨质

吸收陷窝中可以观察到有大量细菌的聚集,周围包裹有无定形细胞外基质样物质^[18]。本研究发现根管外细菌主要分布于距根尖2~3 mm范围内。但是8例样本之间在细菌的分布范围上是有差异的。有1例只在距根尖1 mm范围内可见荧光阳性信号。也许正是是否存在根管外细菌和根管外细菌分布范围的差异导致慢性根尖周炎根管治疗效果的不一。在不伴有根管外感染时,根管治疗中常规的机械制备和药物作用可以很好地清除根管内的感染,即可达到良好的治疗效果。如果根管外细菌分布靠近根尖孔区域,根管内封药也较容易对这些细菌产生作用。也就是说,如果根管外细菌定植的部位越远离根尖孔,它就越有可能逃避治疗的作用。这也可以解释为什么一部分的慢性根尖周炎经过根管治疗可以痊愈,而另一些的治疗是失败的。

要想通过非根管外科保守治疗的方法彻底清除已经存在的根管外生物膜显然是很困难的。目前,根尖切除术是治疗持续性根尖周炎的主要方法^[19]。本研究中对于根管外细菌分布范围的数据提示在根尖切除术中,切除根尖组织的范围最好要达到2~3 mm,以便彻底的清除根管外细菌。本研究还发现在一些根面凹陷区域有细菌的大量定植(如图3中P5样本的S2切片)。这可能是根面上的这些凹陷可以给细菌的生长提供更好的营养和更适合的生存环境。值得注意的是,在根管外科手术中应注意清理根面上的这些凹陷和沟纹。除了进行根尖切除,还应该尽量彻底地刮治暴露的根面,并尝试应用一些药物来清除根尖切除后余留牙根根面上的细菌。

本研究证实了根管外细菌的存在,并评估了它们的分布范围和活性。在牙科治疗过程中,需要开发能够诊断和治疗根管外生物膜的新方法,以控制这些导致慢性持续性感染,但是又很难用常规方法去除的根管外细菌。

致谢:感谢上海交通大学医学院附属第九人民医院梁景平教授对本研究提供的技术支持和帮助。

[参考文献]

- [1] 樊明文. 牙体牙髓病学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,2012:227-228
- [2] 柏秀梅. 氢氧化钙在慢性根尖周炎治疗中的临床疗效[J]. 口腔医学,2012,32(4):249
- [3] Setzer FC, Boyer KR, Jeppson JR, et al. Long-term prognosis of endodontically treated teeth: a retrospective analysis of preoperative factors in molars [J]. J Endod, 2011, 37

- (1):21-25
- [4] Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures [J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2004, 15(6):348-381
- [5] Siqueira JJ, 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
- [6] Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, et al. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth [J]. *J Endod*, 2002, 28(12):815-818
- [7] 陈灵, 何孔文, 沈洁. 激光共聚焦扫描显微镜在龋病学研究中的应用进展[J]. *口腔生物医学*, 2013, 4(3):151-153
- [8] Parmar D, Hauman CH, Leichter JW, et al. Bacterial localization and viability assessment in human ex vivo dentinal tubules by fluorescence confocal laser scanning microscopy [J]. *Int Endod J*, 2011, 44(7):644-651
- [9] Aziz A, Parmar D, McNaughton A, et al. Bacterial viability determination in a dentinal tubule infection model by confocal laser scanning microscopy [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 666:141-150
- [10] Sunde PT, Olsen I, Debelian G J, et al. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy [J]. *J Endod*, 2002, 28(4):304-310
- [11] 方溢云, 林正梅. 一次性和多次性根管治疗应用于根尖周炎的临床评价[J]. *口腔医学*, 2009, 29(7):372-374
- [12] Lin LM, Rosenberg PA, Lin J. Do procedural errors cause endodontic treatment failure [J]. *J Am Dent Assoc*, 2005, 136(2):187-193, 231
- [13] Cheng-Mei Yang, Yao-Dung Hsieh, Shue-Fen Yang. Refractory apical periodontitis associated with a calculus-like deposit at the root apex [J]. *J Dent Sci*, 2010, 5(2):109-113
- [14] 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
- [15] Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, et al. Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(12):8738-8743
- [16] Leonardo MR, Rossi MA, Bonifacio KC, et al. Scanning electron microscopy of the apical structure of human teeth [J]. *Ultrastruct Pathol*, 2007, 31(4):321-325
- [17] Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis [J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2000, 15(3):139-150
- [18] Wang J, Chen W, Jiang Y, et al. Imaging of extraradicular biofilm using combined scanning electron microscopy and stereomicroscopy [J]. *Microsc Res Tech*, 2013, 76(9):979-983
- [19] Su L, Gao Y, Yu C, et al. Surgical endodontic treatment of refractory periapical periodontitis with extraradicular biofilm [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2010, 110(1):e40-e44

[收稿日期] 2014-04-23

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》编辑部
荣获第四届江苏省科技期刊“金马奖”优秀团队奖!