

## 不同根面处理方法对重度牙周炎患牙根面的影响

姜丹丹,徐艳\*,王晓茜\*

南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室,南京医科大学附属口腔医院牙周科,江苏 南京 210029

**[摘要]** **目的:**比较4种根面处理方法对重度牙周炎患牙根面结构、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)和牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament cells, hPDLs)根面黏附、增殖的影响。**方法:**将因重度牙周炎拔除的100颗离体牙龈下刮治和根面平整(scaling and root planning, SRP)后制成根片,随机分为SRP组、派丽奥组、EDTA组和Nd:YAG组,进行相应处理。扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)和原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)观察根面形态和粗糙度。将*P. gingivalis*和hPDLs分别接种于各组根片表面,Cell Counting Kit-8(CCK-8)法测定根面*P. gingivalis*和hPDLs的吸光度值。**结果:**SEM显示SRP组表面玷污层较多,其余3组均去除玷污层;AFM显示派丽奥组根面粗糙度最小,Nd:YAG组最粗糙;*P. gingivalis*接种于根面4h和1d时,派丽奥组和Nd:YAG组黏附量最少;hPDLs接种于根面后,派丽奥组和Nd:YAG组增殖最明显。**结论:**刮治结合派丽奥、刮治结合Nd:YAG激光处理利于hPDLs根面黏附和增殖,明显减少*P. gingivalis*在根面的早期定植。

**[关键词]** 牙周炎;牙龈卟啉单胞菌;牙周膜成纤维细胞

**[中图分类号]** R781.4

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)08-1131-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20180822

## The influence of different treatments on the root surface of teeth with severe periodontitis

Jiang Dandan, Xu Yan\*, Wang Xiaoqian\*

Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, Department of Periodontology, the Affiliated Hospital of Stomatology, NMU, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aimed to evaluate the treatment of four different methods on root surfaces of teeth affected by severe periodontal disease, adhesion and proliferation of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) and human periodontal ligament cells (hPDLs) on root surfaces. **Methods:** Severe periodontal affected teeth ( $n=100$ ) were extracted and treated with scaling and root planning (SRP), and root slices were prepared. These slices were randomly divided into four groups: SRP group, Perioline group, EDTA group and Nd:YAG group. Scanning electron microscopy (SEM) and atom force microscope (AFM) were used to determine the morphology and the roughness of the root slices. The proliferation of *P. gingivalis* and hPDLs was evaluated by cell count kit-8 (CCK-8). **Results:** The obvious smear layer was observed in SRP group, whereas it was almost removed in other three groups. The roughness of the root surface of Perioline group was the lowest while the Nd:YAG group was the highest. After 4 hours and 1 day, the amount of *P. gingivalis* adhered to the root surfaces of Perioline group and Nd:YAG group was significantly less than that to other groups. The attachment of hPDLs to the root surfaces showed a time dependent manner, and the number of attached cells was higher in Perioline group and Nd:YAG group. **Conclusion:** SRP combined with Perioline or Nd:YAG laser is more conducive to the attachment and proliferation of hPDLs, and decrease the adhesion of *P. gingivalis* at the early stage.

**[Key words]** Periodontitis; *Porphyromonas gingivalis*; human periodontal ligament cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(08): 1131-1135]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81771074, 81470749);江苏省高校自然科学研究重大项目(16KJA320001);江苏省高层次卫生人才“六个一工程”(LGY2016048);江苏省高校优势学科建设工程资助项目(2014-37)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: yanxu@njmiu.edu.cn; xiaoqian0103@hotmail.com

牙周炎是导致成人失牙的主要口腔疾病之一,是重要的口腔公共卫生问题。龈下菌斑是牙周致病菌赖以生存的微生态环境,与牙周炎关系密切。牙周炎治疗中最核心的部分就是菌斑控制。目前临床上最基础的龈下菌斑控制方法是机械处理,包括超声或手工龈下刮治和根面平整(scaling and root planning, SRP)<sup>[1]</sup>,但单纯SRP常无法彻底清除感染物质,根面常形成玷污层<sup>[2]</sup>。研究表明,SRP辅助化学或激光处理<sup>[3-4]</sup>,能有效去除玷污层,提高疗效。

化学处理剂能有效去除根面玷污层、暴露胶原纤维,增加血细胞和纤维蛋白对牙根表面的黏附<sup>[2]</sup>,促进牙周愈合早期的血凝块稳定。化学方法处理根面的相关研究较为深入,有较多实验证实SRP辅助化学处理剂能促进根面牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament cells, hPDLs)的黏附和增殖<sup>[5]</sup>。此外,激光作为一种新型治疗手段,具有操作简单、高效杀菌、缓解牙本质敏感、刺激组织再生等优势<sup>[6]</sup>,被越来越多的牙周医生所青睐。目前国内尚未有机械、化学与激光处理对牙周炎患牙根面影响差异的相关研究。本实验通过比较单纯SRP、SRP+派丽奥、SRP+EDTA、SRP+Nd:YAG激光处理后的牙根表面结构、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)和hPDLs根面黏附、增殖的差异,探讨机械、化学、激光3种牙周治疗方式对牙根生物学性能的影响,为牙周炎临床治疗方法选择提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

舒镭适水雾激光牙科治疗机(成都航天世都公司);15% EDTA凝胶(RC-Prep公司,美国);盐酸米诺环素软膏(派丽奥公司,日本);CCK-8细胞增殖-毒性检测试剂盒(cell count kit-8,上海Dojindo公司);WGZ-2XJ细菌浊度仪(上海昕瑞公司);微孔板分光光度计(Spectramax\*190, MD公司,美国);扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM, S-3400N, Hitachi公司,日本);原子力显微镜(Atomic Force Microscope, AFM, Multimode8, 布鲁克公司,美国)等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 离体牙收集

收集2017年8—10月于南京医科大学附属口腔医院牙周科因重度牙周炎新鲜拔除的前磨牙或磨牙(非第3磨牙)。纳入标准:①牙周探诊深度>6 mm,

附着丧失 $\geq 5$  mm, X线片示牙槽骨吸收>2/3根长;②无吸烟史。排除标准:①患有全身系统性疾病;②近6个月内有抗菌药物服用史;③近6个月内有龈下刮治和根面平整史;④根面有龋坏及充填物。根据上述纳入与排除标准从临床收集因重度牙周炎而拔除的患牙100颗,均获患者知情同意。所有牙拔出后用裂钻沿牙周膜附着处做标记,釉牙骨质界至标记处为实验区。患牙用无菌PBS冲洗,-20℃保存备用。

#### 1.2.2 根片制备、分组及根面处理

用龈下超声工作尖、Gracey刮治器以每个根面2 min的标准时间对所有牙齿根面进行SRP,要求SRP后的根面无残留软组织及牙石,根面平整光滑(肉眼观察)。实验区内用金刚砂车针在水冷却下制备4 mm×4 mm×1 mm大小的牙骨质根片,近远中面各制备1个根片。将200个根片随机分成4组,每组50片。其中SRP组不作其他处理(单纯刮治),作为对照;派丽奥组将派丽奥软膏(每克含有20 mg盐酸二甲胺四环素)涂布根片表面后静置5 min;EDTA组用15% EDTA凝胶(15% 乙二胺四乙酸凝胶)处理根面5 min,处理方法为小棉球涂擦根面,每30 s更换1次棉球;Nd:YAG组根面用2 W、20 Hz、100 mJ能量的Nd:YAG激光处理根面45 s,光纤与根面轻触角度为30°,以清扫的方式移动照射整个根片表面,水/气采用2/8档,使用的光纤头直径为600 μm。处理后根片用PBS冲洗浸泡3次,每次5 min,-20℃保存。以上处理均由同一操作者完成。

#### 1.2.3 根面形态和粗糙度

样本处理结束后,每组随机取1个样本,SEM观察根面形态。此外每组随机选1个样本,每个根片随机选择2个点,使用AFM观察其三维表面形貌,并进行表面粗糙度(Ra值)检测。

#### 1.2.4 细菌黏附和增殖实验

细菌培养及菌液制备:将*P. gingivalis*冻干菌株ATCC33277(由南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室提供),接种于BHI血琼脂平板,37℃厌氧条件下复苏、分离纯化、传代,得到较稳定的单个菌落,16s rDNA基因测序鉴定为纯培养物后,挑取一环菌株接种于BHI液体培养基中,37℃厌氧静置培养18 h(细菌理论对数生长期),获得增菌液。用McFarland标准的麦氏比浊管校正增菌液的浓度,获得浓度为 $1.0 \times 10^8$  CFU/mL的*P. gingivalis*悬液。

细菌的接种附着和CCK-8法检测根面黏附的细菌数量:取已经制备好的根片,每组各8片,干燥、

高温高压消毒。将根片表面朝上置于24孔板底部(每组各2片),共4个24孔板。加入备用菌液,每孔100  $\mu\text{L}$ ,再加入BHI液体培养基900  $\mu\text{L}$ 。将细菌培养板置于37  $^{\circ}\text{C}$ 厌氧箱中培养4 h、1 d、2 d、3 d后,弃去培养基,PBS洗涤3次,用小镊子小心夹出根片放入另一块干净的24孔板中,而后每孔加入500  $\mu\text{L}$  10%的CCK-8溶液(BHI液体培养基稀释),厌氧箱内孵育1 h后,每孔吸取100  $\mu\text{L}$ 液体加入96孔板,测定570 nm波长处的吸光度值,重复3次。

### 1.2.5 hPDLcs黏附和增殖实验

hPDLcs培养:选取16~20岁因正畸治疗需要而拔除的健康志愿者无龋、牙周健康的前磨牙,均知情同意。刮取新鲜牙根根中1/3的牙周膜组织,用组织块消化法进行原代培养,每3 d换液,待细胞铺满瓶底80%后用胰蛋白酶消化传代。取对数生长的第4代hPDLcs,DMEM重悬并调节细胞密度为 $6 \times 10^4$ 个/mL。

hPDLcs接种附着和CCK-8法检测根面黏附的hPDLc数量:根片处理同上。取上述hPDLcs悬液,每孔1 mL加入预先放置根片的24孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 条件下进行培养,连续培养6 h、1 d、3 d、5 d后,弃去培养基并用PBS洗涤3遍,用小镊子小心夹出根片放入另一块干净的24孔板中,每孔中各加入500  $\mu\text{L}$  10%的CCK-8溶液(MEM Alpha basic稀释),细胞培养箱孵育2 h后,每孔吸取100  $\mu\text{L}$ 液体加入96孔板,测定490 nm波长处的吸光度值,重复3次。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件包进行数据分析。单因素方差分析及Scheffe检验进行组间多重比较,配对 $t$ 检验比较各实验组不同培养时间点吸光度值变化。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

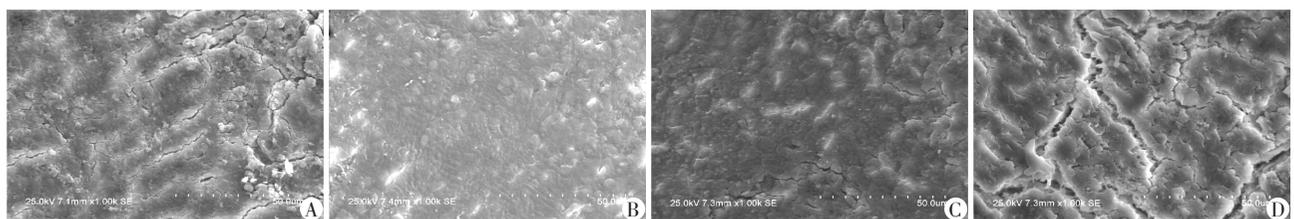
### 2.1 不同处理组牙根面的形态和粗糙度

SEM观察如图1所示,SRP组根面有明显玷污层,可见碎屑;派丽奥组、EDTA组根面光滑平整,少量碎屑,几乎无玷污层;Nd:YAG组根面可见明显裂纹和熔融,但熔融处较为平整,无玷污层。

各组根片表面AFM三维立体图见图2,粗糙度Ra(nm)见表1。派丽奥组最光滑,Nd:YAG最粗糙(表1)。

### 2.2 CCK-8法检测根面黏附、增殖的牙龈卟啉单胞菌数量

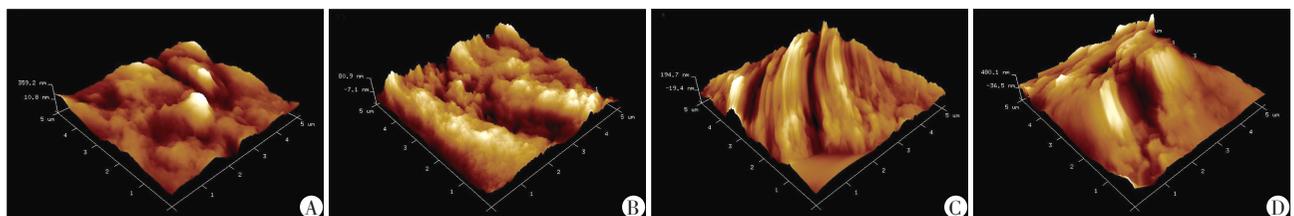
各实验组在每个培养期根面黏附的细菌数见表2。单因素方差分析显示,培养4 h和1 d时派丽奥组和Nd:YAG组根面黏附的细菌量最少,两组间无统计学差异,但其余各实验组间有统计学差异( $P < 0.05$ );培养2 d时派丽奥组和Nd:YAG组分别与SRP组有统计学差异( $P < 0.05$ );培养3 d时各实验组间未见统计学差异。采用配对 $t$ 检验分析各时间点各组*P. gingivalis*时间增殖效应,发现培养1 d与4 h相比,SRP组和EDTA组的细菌增殖有统计学差异( $P < 0.05$ );培养2 d与1 d相比、培养3 d与2 d相



A:SRP组;B:派丽奥组;C:EDTA组;D:Nd:YAG组。

图1 不同处理组根面形态SEM( $\times 1\ 000$ )

Figure 1 SEM images of root surfaces morphology in four groups( $\times 1\ 000$ )



A:SRP组;B:派丽奥组;C:EDTA组;D:Nd:YAG组。

图2 不同处理组根片粗糙度的AFM图

Figure 2 AFM images of the root surfaces roughness in four groups

表1 不同处理组根片的粗糙度

Table 1 The root surfaces roughness in four groups

分组	Ra(nm)
SRP组	65.55 ± 2.61
派丽奥组	24.65 ± 3.32 <sup>a</sup>
EDTA组	44.75 ± 1.77
Nd:YAG组	94.15 ± 9.97 <sup>abc</sup>

$F=58.67, P=0.001$ 。与SRP组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与派丽奥组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与EDTA组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

比,派丽奥组、EDTA组和Nd:YAG组细菌增殖有统计学差异( $P<0.05$ )。

### 2.3 CCK-8法检测不同根面处理对hPDLcs增殖的影响

hPDLcs在4种方法处理的根片上培养6 h、1 d、3 d、5 d后,各组细胞数量均随培养时间增加而逐渐增加。单因素方差分析显示,hPDLcs在4种不同方法处理的根面培养6 h、1 d、5 d后,派丽奥组、EDTA组、Nd:YAG组分别与SRP组有统计学差异( $P<0.05$ );培养3 d时除派丽奥组和EDTA组之间无统计学差异,其他各组间有统计学差异( $P<0.05$ )。采

用配对 $t$ 检验分析不同处理组hPDLc时间增殖效应,培养1 d与6 h相比,4组均有统计学差异( $P<0.05$ );培养3 d与1 d相比,除派丽奥组,其他3组均有统计学差异( $P<0.05$ );SRP组和Nd:YAG组培养5 d与3 d相比,细胞增殖没有统计学差异(表3)。

### 3 讨论

牙周炎患牙根面附着的龈下菌斑会产生大量内毒素,导致牙骨质矿物质密度及化学组成等一系列改变和牙周附着丧失。目前牙周炎治疗主要通过机械、化学和激光治疗等方法去除病变根面的感染物质,形成光滑清洁的根面,重新获得具有良好生物相容性的根面,以促进牙周新附着的形成。本实验首次将SRP、派丽奥、EDTA、Nd:YAG激光这4种常见牙周处理方式同时纳入对比,比较这4种方法对于重度牙周炎患牙根面结构的影响,并进一步研究对牙周致病菌及牙周膜细胞在根面的黏附及增殖影响。龈下超声工作尖或Gracey刮治器进行SRP是最基础的根面处理方式,但清除效率较低,术者易疲劳,根分叉处器械难达到,处理后的根面易

表2 不同处理组根面牙龈卟啉单胞菌黏附量的吸光度值

Table 2 OD values of *Porphyromonas gingivalis* adhesion among the four groups [ $\times 10^{-2}, (\bar{x} \pm s)$ ]

组别	4 h	1 d	2 d	3 d	配对 $t$ 检验		
					1 d vs. 4 h	2 d vs. 1 d	3 d vs. 2 d
					$P$ 值	$P$ 值	$P$ 值
SRP组	2.87 ± 0.21	3.94 ± 0.14	5.00 ± 0.47	5.43 ± 0.42	0.033	0.101	0.160
派丽奥组	0.86 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.79 ± 0.41 <sup>a</sup>	5.32 ± 0.34	0.093	0.006	0.038
EDTA组	1.86 ± 0.08 <sup>ab</sup>	2.36 ± 0.21 <sup>ab</sup>	4.14 ± 0.40	5.21 ± 0.10	0.040	0.037	0.026
Nd:YAG组	0.96 ± 0.03 <sup>ac</sup>	1.09 ± 0.07 <sup>ac</sup>	3.83 ± 0.31 <sup>a</sup>	5.17 ± 0.26	0.044	0.006	0.026
$F$ 值	210.324	310.127	8.041	0.437			
$P$ 值	<0.001	<0.001	0.001	0.732			

与SRP组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与派丽奥组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与EDTA组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

表3 不同处理组根面牙周膜成纤维细胞黏附量的吸光度值

Table 3 OD values of hPDLcs adhesion among the four groups [ $\times 10^{-2}, (\bar{x} \pm s)$ ]

组别	6 h	1 d	3 d	5 d	配对 $t$ 检验		
					1 d vs. 6 h	3 d vs. 1 d	5 d vs. 3 d
					$P$ 值	$P$ 值	$P$ 值
SRP组	22.54 ± 1.55	36.53 ± 3.16	49.72 ± 3.60	61.84 ± 2.79	0.033	0.001	0.071
派丽奥组	37.87 ± 1.22 <sup>a</sup>	55.33 ± 4.47 <sup>a</sup>	70.15 ± 2.19 <sup>a</sup>	108.56 ± 5.31 <sup>a</sup>	0.012	0.060	0.006
EDTA组	33.94 ± 1.99 <sup>a</sup>	51.08 ± 2.47 <sup>a</sup>	61.41 ± 1.24 <sup>a</sup>	93.90 ± 1.84 <sup>a</sup>	0.005	0.016	0.003
Nd:YAG组	37.20 ± 1.50 <sup>a</sup>	54.21 ± 7.52 <sup>a</sup>	87.00 ± 4.70 <sup>abc</sup>	105.21 ± 8.30 <sup>a</sup>	0.046	0.043	0.099
$F$ 值	59.829	8.185	61.771	50.296			
$P$ 值	<0.001	0.008	<0.001	<0.001			

与SRP组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与派丽奥组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与EDTA组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

形成玷污层和划痕<sup>[2]</sup>。本研究中也发现,单纯SRP处理后的根面碎屑、玷污层明显。SRP治疗后辅助化学处理剂,可以有效去除根面的玷污层,获得良好的生物相容性<sup>[2-3]</sup>。本研究中派丽奥和15%EDTA凝胶处理后的根面能明显去除玷污层,根面光滑。Nd:YAG激光操作方便,能到达SRP难以到达的部位,低重频产生热能效应,能杀灭多种龈下菌群和其他微生物,气化病变组织,去除玷污层等;但是激光也会导致根面熔融、裂纹、炭化和再结晶等改变,使根面粗糙度增加。本研究扫描电镜也得出了相似结果,Nd:YAG激光处理过的根面未见玷污层,但是有明显的裂纹和熔融。本研究中AFM的结果和SEM一致,派丽奥组根面最光滑,Nd:YAG组最粗糙。Nd:YAG组根面粗糙度明显增加,可能与激光气化病变牙骨质和光纤在根面各个部分的停留时间有所差异有关<sup>[7]</sup>。

*P. gingivalis*是牙周主要致病菌之一,其毒力因子及与牙龈上皮细胞的相互作用在牙周组织破坏过程中发挥着重要作用<sup>[8]</sup>。本研究首次探讨根面处理对*P. gingivalis*定植、增殖的影响,对控制牙周炎症、减少牙周组织破坏有着重要意义。Leknes<sup>[9]</sup>研究表明根面的粗糙程度影响细菌的再定植,但目前根面粗糙度与细菌定植量定量关系尚不明确。本实验中*P. gingivalis*培养4h后,派丽奥组和Nd:YAG组黏附量最少,EDTA组次之,SRP组最多。结果未发现根面粗糙度与*P. gingivalis*早期定植存在相关性,这可能因为各组根面粗糙度均低于0.2 μm。Chen等<sup>[10]</sup>的研究表明当材料表面粗糙度低于0.2 μm时,细菌黏附量不受材料表面粗糙度的影响。派丽奥组和Nd:YAG组*P. gingivalis*早期黏附量少,可能与派丽奥的缓释、抑菌作用和激光的综合效应有关。随着培养时间的延长,培养3d时4组间细菌吸光度值未见统计学差异。这种化学处理剂和激光抑制*P. gingivalis*根面黏附的生物学效应随时间延长而消失的现象可能与菌斑生物膜成熟有关。

许多实验表明,派丽奥、EDTA、Nd:YAG激光处理有利于hPDLs的黏附和增殖<sup>[2,6]</sup>。本研究也得出了相似结果。4组根片hPDLs吸光度值随着培养时间增加而增加,其中派丽奥组和Nd:YAG组增殖最明显,EDTA组次之,SRP组最少。

本研究结果显示,SRP后辅助Nd:YAG激光、派

丽奥和15%EDTA凝胶都能有效清除根面玷污层,减少*P. gingivalis*的早期再定植,并促进hPDLs的根面附着,但派丽奥和Nd:YAG激光的效果更加明显。同时值得注意的是化学处理剂的浓度、时间、处理方法,激光的种类、参数等都会影响临床疗效。还需后续进一步完善设计,为临床治疗选择提供依据。

#### [参考文献]

- [1] Dilsiz A, Sevinc S. Trauma from instrumentation after non-surgical periodontal treatment with ultrasonic scalers and Nd: YAG laser [J]. Acta Odontol Scand, 2015, 73 (2) : 144-149
- [2] Silva AC, Moura CC, Ferreira JA, et al. Biological effects of a root conditioning treatment on periodontally affected teeth-an in vitro analysis [J]. Braz Dent J, 2016, 27(2) : 160-168
- [3] Chahal GS, Chhina K, Chhabra V, et al. Effect of citric acid, tetracycline, and doxycycline on instrumented periodontally involved root surfaces: A SEM study [J]. J Indian Soc Periodontol, 2014, 18(1):32-37
- [4] Roncati M, Gariffo A. Systematic review of the adjunctive use of diode and Nd: YAG lasers for nonsurgical periodontal instrumentation [J]. Photomed Laser Surg, 2014, 32 (4):186-197
- [5] Belal MH, Watanabe H, Ichinose S, et al. Effect of PDGF-BB combined with EDTA gel on adhesion and proliferation to the root surface [J]. Odontology, 2012, 100 (2) : 206-214
- [6] Negi S, Krishnamurthy M, Ganji KK, et al. Modulatory effects by neodymium-doped yttrium aluminum garnet laser on fibroblast attachment to single rooted tooth surfaces following ultrasonic scaling and root planning: An in vitro study [J]. J Indian Soc Periodontol, 2015, 19(1):25-31
- [7] 王 萌,叶 菁,李 晶,等.不同牙周治疗手段对根面结构及牙周膜细胞生长的影响[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2014,24(4):208-212
- [8] 赵 戩.牙龈卟啉单胞菌对慢性牙周炎致病作用研究进展[J].中国实用口腔科杂志,2015,8(9):567-571
- [9] Leknes KN, Lie T, Wikesjo UM, et al. Influence of tooth instrumentation roughness on subgingival microbial colonization [J]. J Periodontol, 1994, 65(4):303-308
- [10] Chen CJ, Ding SJ, Chen CC. Effects of surface conditions of titanium dental implants on bacterial adhesion [J]. Photomed Laser Surg, 2016, 34(9):379-388

[收稿日期] 2018-02-13