

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.09.003

· 基础研究 ·

Nisin 改性通用型树脂粘接剂的抗菌性能研究

谭易, 麦穗, 刘佳, 古丽莎

中山大学附属口腔医院牙体牙髓病科·光华口腔医学院·广东省口腔医学重点实验室, 广东 广州(510055)

【摘要】 目的 检测不同浓度乳酸链球菌素(Nisin)改性通用型树脂粘接剂(简称粘接剂)对变异链球菌的抑菌作用。方法 室温避光条件下,将Nisin加入粘接剂中,震荡混匀,配置Nisin浓度为0.01 g/mL(0.01 g/mL组)、0.02 g/mL(0.02 g/mL组)、0.03 g/mL(0.03 g/mL组)、0.04 g/mL(0.04 g/mL组)、0.05 g/mL(0.05 g/mL组)的粘接剂溶液,以不添加Nisin的粘接剂作为对照组,进行微拉伸实验,评估Nisin对粘接剂粘接强度的影响。筛选出与对照组粘接强度无差异的改性粘接剂为实验组,进一步进行:①琼脂扩散实验,检测固化粘接剂中Nisin的释出,其中以不添加Nisin的粘接剂为阴性对照组,以0.01 g/mL Nisin水溶液为阳性对照组;②直接接触抑菌实验,检测粘接剂对变异链球菌的直接接触抑菌能力;③生物膜活性分析,以激光共聚焦扫描显微镜观察各组变异链球菌生物膜菌量、厚度及胞外多糖产量情况,通过以上指标评价改性粘接剂对变异链球菌生物膜结构、活性和产胞外多糖能力的影响。结果 微拉伸实验筛选出0.01 g/mL组、0.02 g/mL组和0.03 g/mL组进行之后的琼脂扩散实验、直接接触抑菌实验、生物膜活性分析。琼脂扩散实验0.01 g/mL组、0.02 g/mL组、0.03 g/mL组未见明显抑菌环;直接接触抑菌实验0.01 g/mL组、0.02 g/mL组、0.03 g/mL组Nisin改性粘接剂可明显抑制样本表面变异链球菌增殖;共聚焦显微镜扫描结果显示,0.01 g/mL组、0.02 g/mL组、0.03 g/mL组变异链球菌生物膜中细菌数量减少、厚度降低、胞外多糖活菌比例降低。结论 Nisin浓度为0.01 g/mL、0.02 g/mL、0.03 g/mL的改性通用型粘接剂能抑制变异链球菌粘附及生长,具备减少树脂牙本质粘接界面继发龋发生的潜能。

【关键词】 乳酸链球菌素; 变异链球菌; 生物膜; 胞外多糖; 树脂粘接剂

【中图分类号】 R781.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)09-0557-07

【引用著录格式】 谭易, 麦穗, 刘佳, 等. Nisin改性通用型树脂粘接剂的抗菌性能研究[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(9): 557-563.

Antibacterial activity of the nisin-containing single-bond universal adhesive TAN Yi, MAI Sui, LIU Jia, GU Lisha. Guanghua School of Stomatology, Hospital of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangzhou 510055, China

Corresponding author: GU Lisha, Email: gulisha@mail.sysu.edu.cn, Tel: 0086-20-84403983

【Abstract】 Objective To investigate the antibacterial activity to *Streptococcus mutans* of a nisin-containing single-bond universal adhesive. **Methods** Nisin was mixed into the bonding agent to produce concentrations ranging from 0.01 g/mL to 0.05 g/mL for the experiments, and adhesive without nisin was used as the control. Dentin-resin specimens were prepared for the microtensile strength test to evaluate changes in the bonding strength. The proper concentrations were selected for more tests. ① An agar diffusion test was applied with filter paper to detect the release of nisin, and adhesive without nisin was used as the negative control, 0.01 g/mL Nisin aqueous solution was used as the positive control. ② Solidification; resin adhesive specimens were prepared for the assessment of direct contact inhibition activity. ③ Confocal laser scanning microscopy was used to examine the effect of the adhesive on the biological film activity and the ability of *Streptococcus mutans* to produce extracellular polysaccharides. **Results** Nisin did not

【收稿日期】 2018-04-15; **【修回日期】** 2018-05-03

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81200776);广州市科技计划珠江新星专项项目(2014J2200099)

【作者简介】 谭易, 医师, 硕士, Email: 347385894@qq.com

【通信作者】 古丽莎, 副教授, 博士, Email: gulisha@mail.sysu.edu.cn

significantly reduce the bond strength of the modified adhesive at 0.01-0.03 g/mL ($P < 0.05$); these concentrations were selected for the subsequent antibiosis experiment. Rings could not be observed in the agar diffusion test, except for in the group of adhesive modified with 0.01-0.03 g/mL nisin. Resin adhesive with 0.01-0.03 g/mL nisin could significantly inhibit the proliferation of *Streptococcus mutans* on the surface of the specimens. The confocal laser scanning microscopy results indicate that only the adhesive resin modified with nisin could reduce the bacteria in the biofilm and the production of extracellular polysaccharides. **Conclusion** Single-bond universal adhesive with 0.01-0.03 g/mL nisin can inhibit the growth of *Streptococcus mutans* and its biofilms on the bonding interface, as well as decrease the production of extracellular polysaccharides, and thus has the potential to decrease the occurrence of secondary caries.

【Key words】 Nisin; *Streptococcus mutans*; Biofilm; Extracellular polysaccharides; Resin adhesive

继发龋是导致龋病充填治疗失败的主要原因之一。研究表明,约50%的树脂充填体在修复10年内形成继发龋^[1]。树脂充填后,由于聚合收缩,在牙体和树脂之间产生张力和剪切力,破坏二者的相互连接,在粘接界面形成微小的通道,即微裂隙。口腔环境中的细菌、唾液等成分能通过裂隙进入树脂牙本质粘接面,变异链球菌等致龋菌在裂隙中生长繁殖^[2-3],在粘接面发挥酯酶活性,降解破坏粘接面,影响混合层的结构完整性,从而导致微裂隙变大,最终产生继发龋^[4]。研究证实,在自酸蚀粘接系统中加入抗菌物质,可以改善树脂材料的抗菌性能^[5-10]。抗菌肽是具有广谱高效杀菌活性的活性多肽,对细菌有很强的杀菌作用,且对某些耐药性病原菌也具有杀灭作用。乳酸链球菌素(Nisin)是由乳酸链球菌产生的一种小分子抗菌肽,具有高效的抑菌性能。研究表明Nisin可抑制口腔致龋菌生长,抑制戈登链球菌、变异链球菌、血链球菌3种混合菌生物膜的形成,并且与人类口腔上皮细胞相容性高,不具有细胞毒性^[11]。Nisin生物安全性高、不易导致口腔菌群失调和产生耐药性等优点使其在口腔领域具有良好的应用潜能^[12]。本研究拟在Single Bond Universal粘接剂中添加不同浓度Nisin,评估改性粘接剂的抗菌能力,以期降低充填后继发龋的发生率,为抗菌粘接剂的临床转化研究提供实验依据。

1 资料和方法

1.1 主要器材

通用型树脂粘接剂(Single Bond Universal, Z250)(3M ESPE,美国);人离体牙(浸泡于1%氯胺-T中,1个月以内使用);EliparTM S10 LED光固化灯(3M ESPE,美国);慢性线性切割机 ACCUTOM-50(Struers,丹麦);微拉伸仪 T-6102K(Bisco,美

国);LSM710激光共聚焦扫描显微镜(Carl Zeiss,德国);ZEN 2010 Light Edition Software(Carl Zeiss,德国);生物安全柜(Baker,美国);超净工作台(Thermo,美国)。

1.2 主要试剂

1.2.1 BHI固体培养基 称取1.5 g琼脂粉和3.7 g BHI培养基粉,置于100 mL容量瓶中,灭菌后待其自然冷却至50 ℃时,每培养皿倒入约16 mL制作BHI平板,待其完全凝固后密封并倒置于4 ℃冰箱保存待用。

1.2.2 BHIS液体培养基 称取10 g蔗糖溶于100 mL的无菌三蒸水中,一次性过滤膜进行滤过除菌,配制成10%蔗糖溶液,4 ℃冰箱储存备用。称取3.7 g BHI培养基粉剂,置于100 mL容量瓶,加入90 mL无菌三蒸水,震荡溶解,121 ℃高压灭菌20 min,待其自然冷却至50~60 ℃时,加入10 mL的10%蔗糖溶液,充分混匀,待其自然冷却后置于4 ℃冰箱待用。

1.2.3 Nisin改性通用型树脂粘接剂(简称粘接剂)的配制 分别称取10、20、30、40、50 mg Nisin粉剂于2 mL的灭菌EP管中,避光环境下加入1 mL Single Bond Universal粘接剂,震荡混匀,配制成含0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 g/mL Nisin的实验性粘接剂,避光保存备用。

1.3 微拉伸粘接强度测试

收集20~40岁患者因阻生拔除的无龋第三磨牙,浸泡于1%氯胺溶液中,4 ℃冰箱储存(拔牙后1个月内使用)。用慢速切割机在流水降温条件下,去除咬合面釉质层。将36颗离体牙样本随机均分到6组,5个实验组分别采用含0.01 g/mL(0.01 g/mL组)、0.02 g/mL(0.02 g/mL组)、0.03 g/mL(0.03 g/mL组)、0.04 g/mL(0.04 g/mL组)、0.05 g/mL(0.05 g/mL组)Nisin的实验性粘接剂进行湿粘接处理,对照组为不含Nisin的粘接剂。牙本质表面用

各组粘接剂均匀涂抹 20 s, 轻吹 5 s, 固化后分层堆积 4 mm 厚的 Z250 树脂。将各组粘接试件浸泡在 37 °C 的 PBS 中, 水浴 24 h 后用慢速切割机顺牙齿长轴, 垂直于粘接界面, 按 0.9 mm × 0.9 mm × 8.0 mm 规格制备成条状试件。每组均选取 30 个试件用于测试微拉伸强度。

测量并记录粘接面的横截面积, 将粘接试件用胶水固定于万能测试仪测试台上, 以 0.5 mm/min 的加载速度进行测试, 直至试件沿粘接界面断裂时记录即刻载荷, 计算: 微拉伸强度(MPa) = 断裂载荷(N)/试件横截面积(mm²)。根据微拉伸实验结果, 筛选不影响微拉伸强度的实验组进行后续抗菌实验。

1.4 菌液复苏与分离纯化

将冻存的变异链球菌 UA159 室温下解冻, 划线接种于 BHI 固体培养基表面, 在厌氧环境(85% N₂、5%CO₂、10%H₂)中, 37 °C 恒温培养 24 h 后, 灭菌牙签挑取典型的单克隆菌落接种于 BHI 培养液中, 厌氧条件下, 37 °C 恒温培养 18 h, 将菌液稀释至 10⁶ CFU/mL 浓度备用。

1.5 琼脂扩散实验

根据微拉伸结果, 筛选 0.01 g/mL 组、0.02 g/mL 组、0.03 g/mL 组进行琼脂扩散实验, 不含 Nisin 的粘接剂为阴性对照组, 0.01 g/mL Nisin 水溶液为阳性对照组。取 100 μL 的变异链球菌菌液加入 10 mL 软琼脂中, 震荡摇匀, 倒入固体 BHI 培养基表面均匀平铺, 常温冷却 1 h。选取直径 6 mm 的滤纸片于粘接剂中完全润湿后取出平铺, 固化。将各样本完全贴合固体培养基表面, 于厌氧环境中, 37 °C 恒温培养 24 h 后, 游标卡尺十字交叉法测量抑菌圈直径后取平均值。

1.6 直接接触抑菌实验

0.01 g/mL 组、0.02 g/mL 组、0.03 g/mL 组、对照组取粘接剂各 30 μL 光固化于 96 孔板底部, 每组 3 个样本, 紫外线消毒 20 min。每孔加入含变异链球菌浓度为 10⁶ CFU/mL BHI 液 20 μL, 于厌氧环境中, 37 °C 恒温培养 24 h 后加入 180 μL BHI 溶液, 超声震荡使粘附于孔板底部的细菌脱落, 梯度稀释后接种于 BHI 平板, 厌氧环境中, 37 °C 恒温条件培养 24 h 后进行菌落计数。

1.7 生物膜活性分析

制取直径为 1.5 cm, 厚度为 1 mm 的树脂薄片, 0.01 g/mL 组、0.02 g/mL 组、0.03 g/mL 组、对照组分别吸取 10 μL 粘接剂均匀涂抹于树脂薄片的光

滑表面并固化。夹取样本至灭菌 PBS 溶液中浸泡 2 h。紫外灯照射 20 min。

1.7.1 生物膜死活菌染色 各组样本置于 12 孔板, 使粘接面朝上, 并于各孔加入 1.5 mL BHIS 和 15 μL 的细菌悬浮液。置于厌氧环境中, 37 °C 恒温培养 24 h, 将样本小心移至新的 12 孔板, PBS 轻轻漂洗去除未粘附细菌。避光条件下每孔加入 100 μL 死活菌染液, 孵育 15 min, PBS 漂洗除去多余染料。将样本转移至共聚焦皿。激光共聚焦扫描显微镜观测变异链球菌生物膜。

1.7.2 胞外多糖(extracellular polysaccharides, EPS)染色 各样本置于 12 孔板, 粘接面朝上, 各孔分别加入 900 μL BHIS 和 100 μL 菌液, 再避光条件下加入 Alexa Fluor 647 染料, 并于避光厌氧环境中, 37 °C 恒温培养 24 h。PBS 洗去游离细菌, 各孔加入 100 μL SYTO9 染料, 避光染色 15 min, 生理盐水洗去多余染料, 室温风干, 将样本转移至共聚焦皿, 激光共聚焦扫描显微镜观察样本。设置层厚 3 μm 进行断层扫描, ZEN 2010 Light Edition Software 软件进行生物膜三维重建(重建后活菌染色)。应用软件分析两种荧光的强度得出胞外多糖活菌比例结果。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行 ANOVA 单因素方差分析和 LSD 多组间两两比较, 检验水平为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

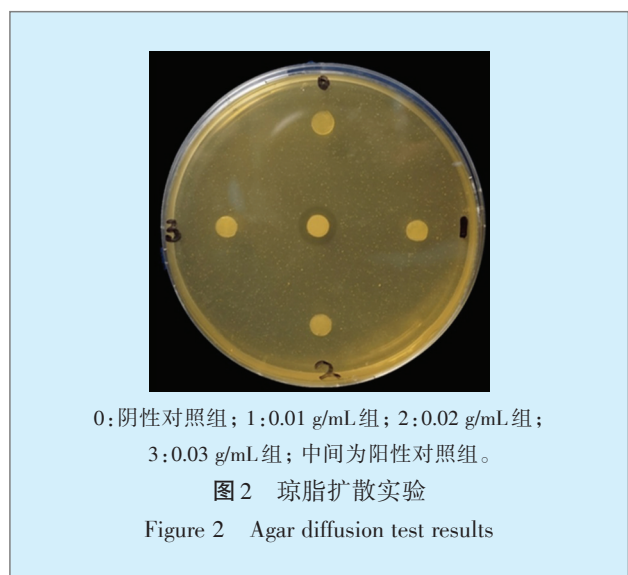
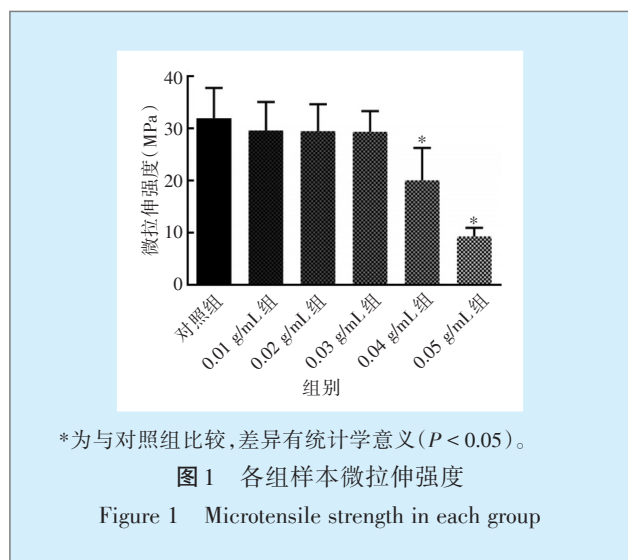
2.1 Nisin 改性粘接剂的树脂牙本质粘接强度

6 组微拉伸强度的总体差异具有统计学意义($F = 37.007, P < 0.001$)。0.01 g/mL 组、0.02 g/mL 组和 0.03 g/mL 组试件微拉伸强度与对照组相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 组间差异亦无统计学意义($P > 0.05$), 即添加 0.01 g/mL、0.02 g/mL 和 0.03 g/mL Nisin 对粘接剂的粘接强度无明显影响(图 1)。0.04 g/mL 组及 0.05 g/mL 组试件微拉伸强度较对照组显著降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。据此, 拟筛选 0.01 g/mL、0.02 g/mL 和 0.03 g/mL Nisin 浓度组进行抗菌实验。

2.2 Nisin 改性粘接剂对浮游态变异链球菌的抑菌作用

2.2.1 琼脂扩散实验 实验结果显示, 阳性对照组周围可见一圈清晰的抑菌环, 0.01 g/mL、0.02 g/mL 和 0.03 g/mL 组与阴性对照组均未见明显抑菌环出

现(图2)。



2.2.2 直接接触抑菌实验 实验组(0.01 g/mL组、0.02 g/mL组、0.03 g/mL组)粘接面24 h变异链球菌菌落数均显著少于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),各实验组间差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

表1 粘接面24 h变异链球菌数
Table 1 Colony counts on the adhesive surface after 24 hours

组别(g/mL)	菌落数(CFU/mL)
对照组	$(2.37 \pm 2.74) \times 10^6$
0.01 g/mL组	$(5.63 \pm 2.67) \times 10^4$ ¹⁾
0.02 g/mL组	$(5.13 \pm 3.12) \times 10^4$ ¹⁾
0.03 g/mL组	$(5.83 \pm 1.10) \times 10^4$ ¹⁾

注 1)为与对照组相比,差异具有统计学意义。

2.3 Nisin改性粘接剂对变异链球菌生物膜活性的影响

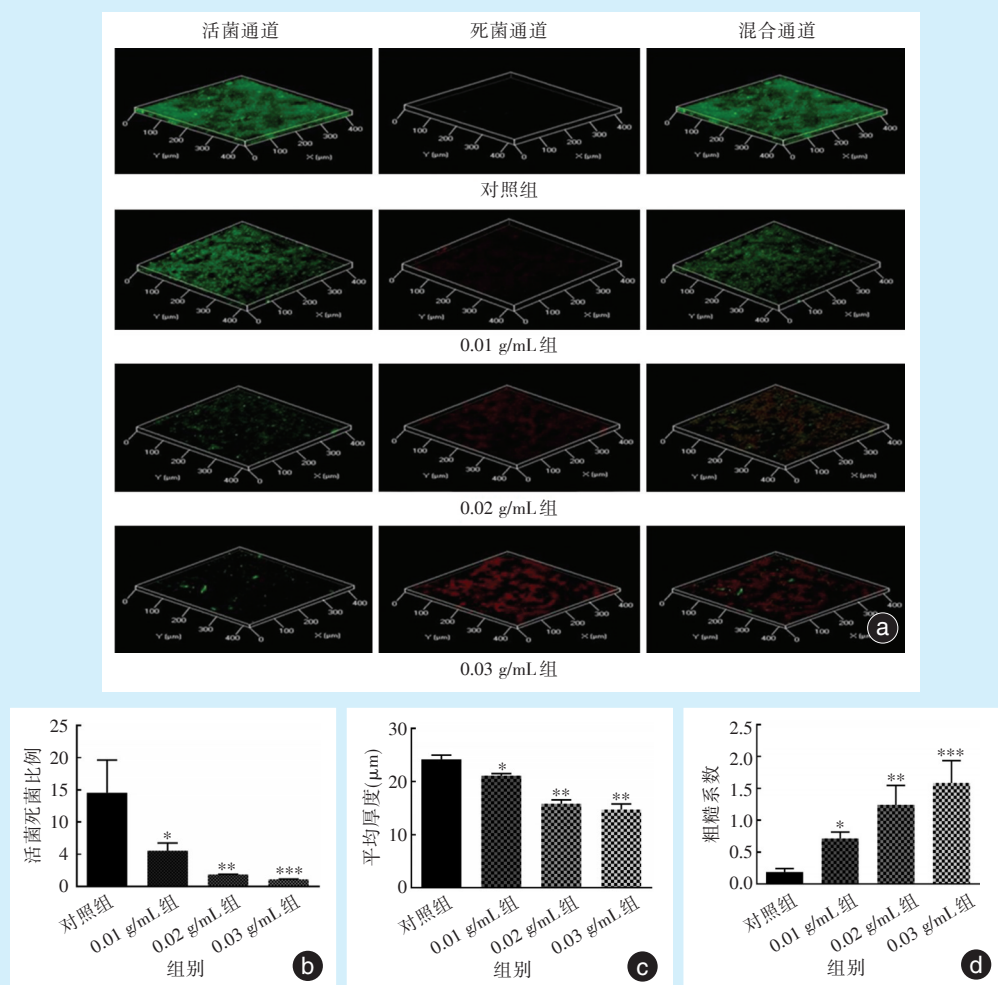
2.3.1 死活菌染色 随着粘接剂所含Nisin浓度的增加,24 h后树脂片表面存活的变异链球菌数量递减,死菌数量增多(图3)。Comstat软件定量分析生物膜,方差分析显示各组死活菌比例($F = 11.038$, $P = 0.021$)、生物膜厚度($F = 65.549$, $P = 0.001$)、粗糙系数($F = 13.177$, $P = 0.015$)的总体差异均具有统计学意义。均值分析结果表明活菌死菌比例随Nisin浓度升高而降低,生物膜平均厚度降低(0.02 g/mL组、0.03 g/mL组低于0.01 g/mL组),粗糙系数随Nisin浓度升高而升高(图3)。

2.3.2 胞外多糖染色 随着Nisin浓度增加,24 h后粘接剂表面存活的细菌数量减少,同时胞外多糖含量呈现递减趋势(图4),进一步定量分析,各组活菌总量($F = 34.009$, $P = 0.003$)、胞外多糖($F = 630.882$, $P < 0.001$)、胞外多糖活菌比例($F = 9.178$, $P = 0.029$)的总体差异均具有统计学意义。进一步分析显示Nisin浓度越高,胞外多糖活菌比例越低,差异具有统计学意义(图4)。

3 讨论

目前,树脂充填仍是临床上龋病治疗的常用处理方法。Moura等^[13]发现,相对于银汞合金和玻璃离子,复合树脂充填体表面更容易形成菌斑。树脂聚合收缩的特性不可避免地使树脂牙本质粘接界面形成微小裂隙。致龋菌沿着微小裂隙渗入并代谢产酸及蛋白酶,导致混合层胶原酶解和树脂水解析出,粘接界面破坏继而形成继发龋损。因此,抑制粘接界面致龋菌活性是减少继发龋产生的重要方法。为了延长修复体临床使用寿命、减少继发龋发生,在粘接剂中添加季铵盐、纳米银离子及抗菌肽等抗菌物质是目前一大研究方向。

继1955年Bunocore^[14]将酸蚀技术用于牙釉质粘接后,1982年Nakabayashi等^[15]提出了混合层概念,并初步建立了牙本质酸蚀粘接理论。随着牙本质粘接技术不断发展,第七代粘接剂集酸蚀、偶联、粘合等诸多功能为一体,被称为“all-in-one”粘接剂。然而,由于其自酸蚀能力较弱,存在釉质粘接力不足等缺点。近年,以Single Bond Universal(3M ESPE,美国)为代表的通用型粘接剂相继问世,并已经广泛应用于全酸蚀、选择性酸蚀和自酸蚀技术,适用于大多数病例,有助于减少充填后牙本质敏感^[16]。这类通用型粘接剂是在传统牙本质

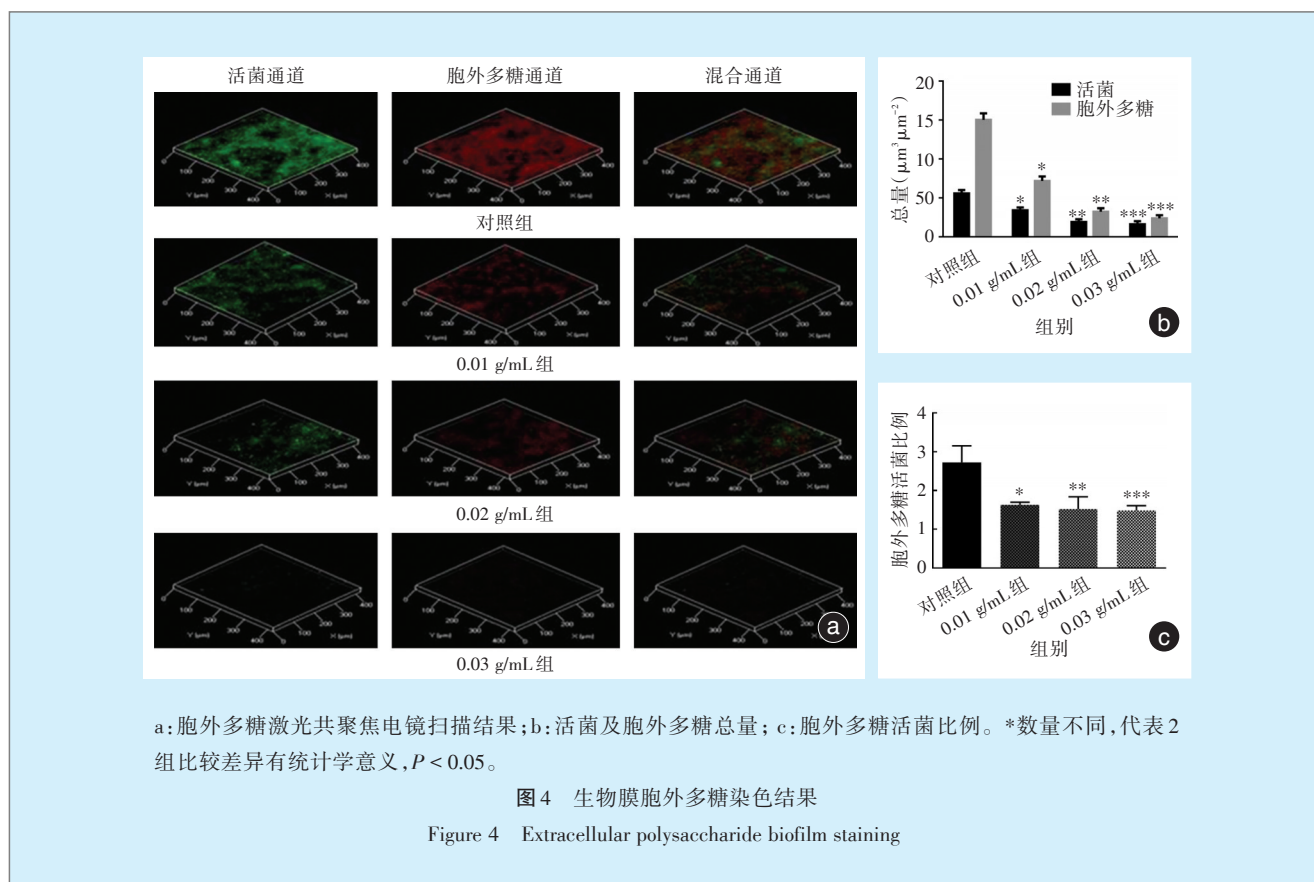


a: 死活菌染色激光共聚焦电镜扫描结果; b: 活菌死菌比例; c: 生物膜平均厚度; d: 生物膜粗糙系数。*数量不同,代表2组比较差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

图3 生物膜死活菌染色结果
Figure 3 Dead/live biofilm staining

粘接剂基础上加入了功能单体 10-甲基丙烯酰氧癸基二羟基磷酸酯 (methacryloyloxy-decyl dihydrogen phosphate, MDP)。MDP 不仅能使牙齿表面结构部分脱矿,同时能与剩余的羟基磷灰石形成难溶性钙盐吸附于表面,交联胶原纤维使之与粘接剂牢固结合,提高粘接效果。此外,MDP 长碳链能增加粘接剂树脂疏水性,减少树脂水解析出。目前关于通用型树脂粘接剂自身的抗菌性能尚无文献报导。Nisin 是乳酸链球菌分泌产生的一种小分子线性多肽,尤其对革兰阳性菌具有显著抗菌效果。口腔中大多数致龋菌均为革兰阳性菌(如血链球菌、变异链球菌、放线菌等),研究表明 Nisin 对血链球菌、变异链球菌、放线菌等 9 种口腔致龋菌

具有高效的抗菌性能^[11-12]。Nisin 的溶解性与稳定性均与 pH 相关,pH 值越低,Nisin 的溶解性和稳定性越高^[17]。常用通用型粘接剂 pH 集中于 2.0 ~ 3.2,酸性环境能提高 Nisin 在粘接界面的溶解吸附能力,致龋菌产酸形成的低 pH 环境也能提高 Nisin 的活性。这些特性表明 Nisin 是一种较为理想的粘接剂添加物。本实验采用一步自酸蚀处理牙本质表面玷污层,对离体牙进行树脂粘接^[18-19]。通过检测微拉伸强度的变化,评估 Nisin 对粘接剂粘接强度的影响。结果表明含 0.01 g/mL、0.02 g/mL、0.03 g/mL Nisin 的实验组粘接剂微拉伸强度与对照组的差异无统计学意义,据此筛选 0.01 g/mL、0.02 g/mL 和 0.03 g/mL 组进行抗菌性能检测。



a: 胞外多糖激光共聚焦电镜扫描结果; b: 活菌及胞外多糖总量; c: 胞外多糖活菌比例。*数量不同,代表2组比较差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

图4 生物膜胞外多糖染色结果
Figure 4 Extracellular polysaccharide biofilm staining

粘接修复是一个长期的过程,理想的粘接体需能长期抑制致龋菌的致龋作用,保护树脂牙本质粘接界面的完整性。琼脂扩散实验检测 Nisin 在固化粘接剂中的释出能力,结果显示实验组与阴性对照组均不能在琼脂表面形成明显抑菌环,表明 Nisin 在固化粘接剂中不会或仅有极微量的释出,提示 Nisin 能长期存在于粘接界面,但其对致龋菌的抑制作用需要进一步验证。

龋病发生发展与口腔菌斑生物膜的形成具有密切关系。首先是获得性膜的形,随后细菌附着。最初附着于牙面的细菌主要为血链球菌,随后是变异链球菌。变异链球菌是龋病的主要致病菌,在初期定植粘附过程中起重要作用,促进了生物膜形成和发展^[20-21]。因此抑制变异链球菌的早期附着和生物膜活性对减少继发龋发生具有重要意义。Segev-Zarko 等^[22]发现最小抑菌浓度的抗菌肽可能通过覆盖到细菌和生物材料表面来抑制生物膜的形成,对于完整的生物膜,则通过杀死或解离生物膜上的细菌促使生物膜分解。直接接触抑菌实验结果显示实验组粘接面 24 h 变异链球菌数显著少于对照组 ($P < 0.05$),而各实验组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。提示 0.01 g/mL、

0.02 g/mL 和 0.03 g/mL 浓度 Nisin 改性 Single Bond Universal 粘接剂对游离态的变异链球菌具有直接接触抑制作用。

生物膜是形成龋病的基本条件,但由于基质的屏障作用,导致部分抗菌剂难以对膜内部细菌发挥抑制作用。本实验通过激光共聚焦扫描显微镜观察荧光染色的生物膜,评估改性粘接剂对变异链球菌生物膜的抑制作用。结果显示,对照组样本表面呈现大范围绿色荧光,表明生物膜中有大量活菌存在,实验组表面的绿色荧光密度低于对照组, Nisin 浓度越高,样本表面存活的变异链球菌数量越少,死菌数量越多,活菌死菌比例越低,生物膜量中总菌量亦降低,提示粘接剂中的 Nisin 对材料表面的变异链球菌具有杀灭作用,对变异链球菌单菌种生物膜的增长也具有抑制能力,抑制能力与粘接剂中 Nisin 浓度正相关。这可能是由于粘接面的抗菌肽阻碍了细菌在材料表面的粘附过程,抑制生物膜的形成和生长,并杀灭生物膜中的细菌,导致生物膜的崩解等多方面的作用。生物膜胞外多糖染色激光共聚焦扫描显微镜观察结果显示,对照组样本表面同时有大量绿色和红色荧光,即有大量活菌和胞外多糖存在。实验组样

本表面绿色和红色荧光少于对照组,并且 Nisin 浓度越高,样本表面的存活细菌数量越少,胞外多糖活菌比例越低。表明粘接剂中 Nisin 能抑制样本表面生物膜中变异链球菌合成胞外多糖的能力,从而达到抑制变异链球菌早期粘附的目的。

牙本质酸蚀会激活基质金属蛋白酶和组织蛋白酶,导致胶原纤维降解。因此抑制蛋白酶活性,能减缓混合层老化,提高树脂粘接耐久性。Chowdhury 等^[23]研究发现阳离子抗菌剂能与蛋白酶上带负电荷的羧基结合,从而抑制蛋白酶活性。而 Nisin 的两亲性结构同样具有结合负电羧基的能力,提示 Nisin 可能具有抑制金属蛋白酶的能力,因此 Nisin 对金属蛋白酶的作用是下一步研究不可或缺的内容。

综上所述,Single Bond Universal 粘接剂中添加 0.01 g/mL、0.02 g/mL、0.03 g/mL Nisin 可在不影响其粘接强度的情况下抑制变异链球菌的附着并发挥长效的抗菌作用,具有减少继发龋发生的潜能。

参考文献

- [1] Demarco FF, Correa MB, Cenci MS, et al. Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials[J]. *Dental Mater*, 2012, 28(1): 87-101.
- [2] Totiam P, González-Cabezas C, Fontana MR, et al. A new *in vitro* model to study the relationship of gap size and secondary caries[J]. *Caries Res*, 2007, 41(6): 467-473.
- [3] Hollanders ACC, Kuper NK, Opdam NJM, et al. Preventive dentistry 5. Secondary caries[J]. *Ned Tijdschr Tandheelkd*, 2017, 124(5): 257-263.
- [4] Bourbia M, Ma D, Cvitkovich DG, et al. Cariogenic bacteria degrade dental resin composites and adhesives[J]. *J Dent Res*, 2013, 92(11): 989-994.
- [5] Imazato S, Ma S, Chen JH, et al. Therapeutic polymers for dental adhesives: loading resins with bio-active components[J]. *Dent Mater*, 2014, 30(1): 97-104.
- [6] Dutra-Correa M, Leite AABV, de Cara SPHM, et al. Antibacterial effects and cytotoxicity of an adhesive containing low concentration of silver nanoparticles[J]. *J Dent*, 2018, pii: S0300-5712(18)30206-9. doi: 10.1016/j.jdent. 2018.07.010.
- [7] Yue S, Wu J, Zhang Q, et al. Novel dental adhesive resin with crack self-healing, antimicrobial and remineralization properties [J]. *J Dent*, 2018, 75: 48-57.
- [8] Lukomska-Szymanska M, Zarzycka B, Grzegorzczak J, et al. Antibacterial properties of calcium fluoride-based composite materials: *in vitro* study[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 1048320.
- [9] Wang X, Zhang N, Wang B, et al. Novel self-etching and antibacterial orthodontic adhesive containing dimethylaminohexadecyl methacrylate to inhibit enamel demineralization[J]. *Dent Mater J*, 2018, 37(4): 555-561.
- [10] Ge Y, Wang S, Zhou X, et al. The use of quaternary ammonium to combat dental caries[J]. *Materials (Basel)*, 2015, 8(6): 3532-3549.
- [11] Teixeira Barbosa AA, Mantovani HC, Jain S. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential in the preservation of fruit products[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2017, 37(7): 852-864.
- [12] Shin JM, Ateia I, Paulus JR, et al. Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells[J]. *Front Microbiol*. 2015, 6: 617.
- [13] Moura JS, Lima EM, Paes Leme AF, et al. Effect of luting cement on dental biofilm composition and secondary caries around metallic restorations in situ[J]. *Oper Dent*, 2004, 29(5): 509-514.
- [14] Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces[J]. *J Dent Res*, 1955, 34(6): 849-853.
- [15] Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates[J]. *J Biomed Mater Res*, 1982, 16(3): 265-273.
- [16] Hanabusa M, Mine A, Kuboki T, et al. Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine[J]. *J Dent*, 2012, 40(6): 475-484.
- [17] Rayman MK, Aris B, Hurst A. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 41(2): 375-380.
- [18] Pashley DH, Tay FR, Breschi L, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives[J]. *Dent Mater*, 2011, 27(1): 1-16.
- [19] Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, et al. State of the art of self-etch adhesives[J]. *Dent Mater*, 2011, 27(1): 17-28.
- [20] Zhou Y, Millhouse E, Shaw T, et al. Evaluating *Streptococcus mutans* strain dependent characteristics in a polymicrobial biofilm community[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1498.
- [21] Silva TSO, Freitas AR, Pinheiro MLL, et al. Oral biofilm formation on different materials for dental implants[J]. *J Vis Exp*, 2018, (136). doi: 10.3791/57756.
- [22] Segev-Zarko L, Saar-Dover R, Brumfeld V, et al. Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides[J]. *Biochem J*, 2015, 468(2): 259-270.
- [23] Chowdhury A, Nandy SK, Sarkar J, et al. Inhibition of pro-/active MMP-2 by green tea catechins and prediction of their interaction by molecular docking studies[J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 427(1/2): 111-122.

(编辑 张琳,曾雄群)