

壳聚糖和洗必泰对牙龈卟啉菌的协同抗菌作用

薛丹 许哲 孙江 冯延民 孙俊毅

【摘要】 目的 评估壳聚糖和洗必泰对牙龈卟啉菌的协同抗菌效果。方法 将壳聚糖、洗必泰与复合树脂粉混匀制成含有壳聚糖浓度为0%、0.4%、0.8%、1.6%、洗必泰浓度为0.02%、直径为6mm标准大小药敏块。将接种了牙龈卟啉菌的培养基分别放置不同浓度的药敏块,37℃厌氧培养72小时。结果 牙龈卟啉菌的培养基中,抑菌环直径的大小随着壳聚糖浓度的增加而扩大,并可看出载有洗必泰的壳聚糖药敏块的抑菌效果比单纯的壳聚糖的抑菌效果更好。结论 壳聚糖具有抗牙龈卟啉菌的作用,壳聚糖和洗必泰具有协同抗菌作用,联合应用比单独使用壳聚糖能取得更好的菌斑控制效果。

【关键词】 壳聚糖 洗必泰 抑菌 牙龈卟啉菌

Synergistic antimicrobial effect of chitosan and chlorhexidine on *Porphyromonas gingivalis* XUE Dan, XU Zhe, SUN Jiang, FENG Yanmin, SUN Junyi. Department of Periodontology, Stomatological Hospital, Medical School of Dalian Stomatological Hospital, Dalian 116023

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of synergistic antimicrobial effect of chitosan and chlorhexidine on periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis*. **Methods** Mixed chitosan, chlorhexidine and composite resin powder together producing drug blocks. The concentration of chitosan was 0%, 0.4%, 0.8%, 1.6%, and chlorhexidine concentration was 0.02%. The diameter of drug blocks was 6mm, using ultraviolet to sterilize the blocks. *Porphyromonas gingivalis* Inoculated susceptibility block medium were placed at different concentrations for 72 hours, 37 °C in anaerobic culture. **Results** The diameter of inhibition zone extended with increasing of the concentration of chitosan, and it can be seen that the effect of the chitosan block loaded chlorhexidine was better than the result of the pure chitosan block. **Conclusion** Chitosan has the antimicrobial effect on *Porphyromonas gingivalis*, The synergistic antimicrobial effect of the chitosan and chlorhexidine is satisfying.

【Key words】 Chitosan Chlorhexidine Antimicrobial effect *Porphyromonas gingivalis*

中图分类号:R780.2 文献标识码:A

壳聚糖是一种从甲壳类动物中提取出的多糖,是天然存在的甲壳素的脱乙酰产物。壳聚糖是自然界中少见的带正电的高分子化合物,具有生物可降解性和良好的生物相容性^[1,2],降解产物不在体内蓄积,无毒性及免疫原性。有关壳聚糖及其衍生物抑菌特性的报道最早见于1979年,Allan等发现壳聚糖有广谱抑菌性^[3]。1988年,日本学者具体报道了壳聚糖对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制作用^[4]。随后,人们开始认识到壳聚糖在抑菌方面的作用。

牙菌斑是牙周炎的始动因素,单纯应用抗菌因子控制菌斑,往往达不到理想效果^[5]。牙菌斑中的牙

龈卟啉单胞菌是一种非酵解糖的革兰氏阴性厌氧球杆菌,是研究广泛且证据充足的重要牙周致病菌之一。实验证实壳聚糖对牙龈卟啉菌的生长有抑制作用^[6]。同时洗必泰是一种有效的口腔抗菌剂,但其抗菌斑活性常因唾液或龈沟液中某些蛋白成分封闭双胍活性基团位点而减低^[7]。而壳聚糖还有生物粘附性和解吸附能力,可以作为药物载体^[8],有效的帮助药物缓释^[9]。有报道证明壳聚糖与抗生素在抑菌的过程中不仅有协同效应,而且壳聚糖本身可作为增强剂在抗生素药物制剂中发挥作用,有望解决抗生素耐药的难题^[10]。本实验通过体外抑菌试验对壳聚糖与洗必泰对牙菌斑中的优势菌牙龈卟啉菌的协同抗菌作用进行了评估,为临床应用提供理论依据。

资料和方法

1.试剂和设备 壳聚糖(吉林大学口腔医学院生化教研室),牙龈卟啉菌(*P.g*)标准菌株 ATCC53977

基金项目:国家自然科学基金-青年科学基金项目(81202729);陕西省自然科学基金(2012JM74012)

作者单位:116023 大连市口腔医院牙周科(薛丹、孙江) 西安交通大学口腔医院牙周科(许哲、孙俊毅) 吉林大学口腔医学院生化教研室(冯延民)

通讯作者 孙俊毅 E-mail:505554273@qq.com

(首都医科大学微生物教研室) 醋酸洗必泰(浙江生物制品公司), 胰蛋白胨、酵母提取物(OXOID LTD), 厌氧反应罐和产气袋(沈阳第五人民医院), CO₂ 孵箱(Qwere, 美国)。

2. TS 琼脂培养基的制备: 胰蛋白胨 1.5g, 大豆蛋白胨 0.5g, 琼脂 1.8g, 酵母提取物 0.5g, 盐酸半胱氨酸 0.4ml (10%) 加蒸馏水至 100ml, 水浴加热使之彻底溶解。调节 PH 值至 7.4, 高压灭菌 15 磅 20 分钟, 待冷却至 55℃, 加入 5% 的小牛血清, 立即铺板, 冷却即得 TS 琼脂培养基。

3. 不同浓度梯度的洗必泰壳聚糖药敏块的配制: 将壳聚糖、洗必泰与复合树脂粉混匀成含有壳聚糖浓度为 0%、0.4%、0.8%、1.6%, 洗必泰浓度为 0.02%, 直径为 6mm 标准大小复合树脂块, 紫外线消毒备用。

4. 洗必泰壳聚糖药敏块的体外抑菌实验: 冻干的牙龈卟啉菌(*P.g*) 用无菌生理盐水溶开, 无菌环挑取, 分区划线种植于培养基中。实验分成两组: 单纯壳聚糖组(壳聚糖浓度为 0.4%、0.8%、1.6%) 和壳聚糖洗必泰联合组(壳聚糖浓度为 0%、0.4%、0.8%、1.6%; 洗必泰浓度为 0.02%)。将不含药物的树脂块作为阴性对照。将接种了牙龈卟啉菌的培养基分别放置不同浓度的药敏块。厌氧环境中 37℃ 孵育 72 小时, 观察其抑菌效果。实验重复 3 次, 每个样本制作 2 个, 抑菌环取平均值。

5. 统计方法: 实验数据应用 SPSS 统计分析软件进行统计学处理, 实验结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)

表示。采用单因素方差分析(ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

结 果

放置不含药物的树脂块的培养基中的细菌生长良好, 见图 A。而放置药敏块的培养基中均出现了抑菌环。单纯壳聚糖在药敏块中浓度为 0.4%、0.8%、1.6% 时, 抑菌环大小分别为 $7.06 \pm 0.7\text{mm}$ 、 $12.95 \pm 0.76\text{mm}$ 、 $17.75 \pm 0.7\text{mm}$ (图 B、D、F), 壳聚糖浓度的越大, 抑菌环直径越大(图表 1)。单纯 0.02% 洗必泰组抑菌环为 $(4.98 \pm 0.56\text{mm})$ (图 H)。当洗必泰中加入 0.4%、0.8%、1.6% 的壳聚糖时, 抑菌环分别为 $9.8 \pm 0.78\text{mm}$ 、 $15 \pm 0.6\text{mm}$ 、 $20 \pm 0.56\text{mm}$, 均比相应浓度单纯壳聚糖抑菌环直径大($P < 0.05$) (图 C、E、G), 抑菌环直径也随着壳聚糖浓度的增加而增大($P < 0.05$)。而且均比单纯洗必泰的抑菌环直径大($P < 0.05$)。(图表 1)。

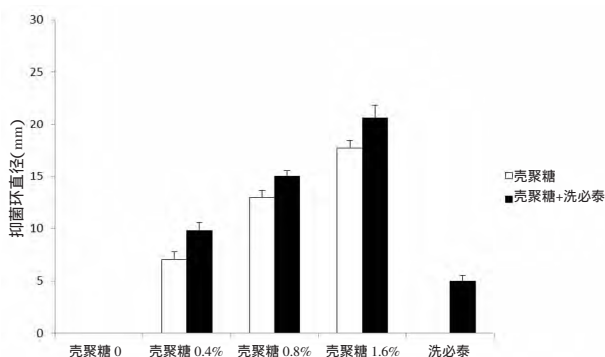


图 1 不同浓度单纯壳聚糖药敏块及不同浓度壳聚糖和洗必泰协同作用于牙龈卟啉菌的抑菌环直径的比较

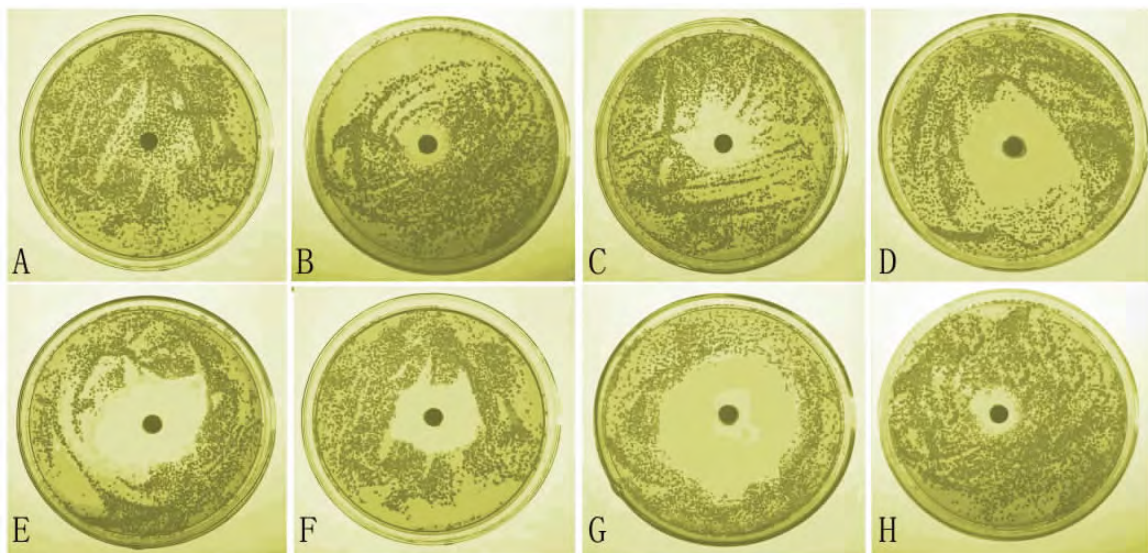


图 A 阴性对照, 不含药的树脂块对牙龈卟啉菌没有明显抑菌作用; 图 B 单纯壳聚糖浓度 0.4% 的抑菌效果; 图 C 0.4% 壳聚糖与洗必泰的协同抑菌效果; 图 D 单纯壳聚糖浓度 0.8% 的抑菌效果; 图 E 0.8% 壳聚糖与洗必泰的协同抑菌效果; 图 F 单纯壳聚糖浓度 1.6% 的抑菌效果; 图 G 1.6% 壳聚糖与洗必泰的协同抑菌效果; 图 H 单纯洗必泰的抑菌效果

讨 论

早在 1979 年就有学者发现壳聚糖具有广谱抗菌作用^[11],对具有代表性的口腔致病菌牙龈卟啉单胞菌(*porphyromonas gingivalis*, Pg)^[12]、伴放线放线杆菌(*actinobacillus actinomycetemcomitans*, Aa)和变形链球菌^[13](*streptococcus mutans*)也有较强的杀菌或抑菌活性。壳聚糖的聚合物的抑菌活性更显著,国外学者通过对乙酰壳聚糖复合物与磷酸银纳米粒子二者聚合对金黄色葡萄球菌的抑菌实验表明,此二者聚合有很强的抗菌效果^[14]。Kinci 等研究了壳聚糖对牙周主要致病菌之一的牙龈卟啉单胞菌(*porphyromonas gingivalis*, P.g)的抑制作用^[15]。研究发现 37%的 0~18 岁个体中均可检测到 *P.gingivalis*。壳聚糖不但能抑制牙周致病菌牙龈卟啉单胞菌的生长也可以调节牙龈成纤维细胞中的炎症反应^[16]。

据研究,壳聚糖的抑菌作用可能有两种机理,一种是壳聚糖通过正电荷的-NH₃⁺吸附带负电荷的细胞壁。使壳聚糖吸附在细胞膜表面形成一层高分子膜,改变了细胞膜的选择透过性,阻止营养物质向细胞内的运输致使细胞质流失,细胞质壁分离,从而起到抑菌杀菌作用;另外一种机理是壳聚糖通过渗入进细胞体内,吸附细胞体内带有阴离子的细胞质,并发生絮凝作用扰乱细胞正常的生理活动,从而杀灭细菌^[17,18]。低分子量的壳聚糖具有更优异的抗菌性能,低分子量壳聚糖会影响口腔变形链球菌细胞膜的完整性,它的方式是均匀的作用在变形链球菌的整个生物膜表面^[19]。同时低分子量脱乙酰壳聚糖和磷酸化的脱乙酰壳多糖会有效抑制口腔细菌对牙表面的粘附性。

目前为止,关于壳聚糖作为口腔局部用药的研究较多,目前在印度已经有人将壳聚糖制成草本牙膏作为一种新型口腔卫生产品进入为期四周的临床实验研究,取得较好的效果,实验证明其对大多数口腔病原体有良好的抗菌活性,菌斑指数和细菌指数均显著降低到 70.47%和 85.29%。证明壳聚糖作为口腔卫生产品的一种主要成分是很有前景的^[20]。Sano 等^[21]研究显示 0.5%磷酸化壳聚糖漱口液能明显降低菌斑附着。Uliano C^[22]等人将壳聚糖制成含有洗必泰的聚合膜,观察含洗必泰的壳聚糖薄膜作为一种抗菌药物缓释的载体的有效性。壳聚糖不仅可以发挥其自身的抗菌性而且可以作为一种赋形剂,有效帮助药物释放。研究结果表明,壳聚糖聚合

膜是一种很有前景的药物缓释载体,同时壳聚糖本身也有口腔抑菌功效。徐全臣等^[23]通过测量 Wistar 大鼠龈沟液药物浓度证明羧甲基壳聚糖作为奥硝唑的载体,能够使药物在牙周袋内较长时间维持有效浓度,并且羧甲基壳聚糖对变形链球菌有一定抑菌性。

洗必泰是一种广谱抗生素,达到预防和减少牙周病和龋病的目的。洗必泰和壳聚糖合并使用既可以发挥壳聚糖本身的抑菌及载体的作用又可以和洗必泰起到协同抑菌的作用^[24]。本实验在模拟人体生理 pH 值(7.2~7.6)的条件下,对具有代表性的口腔常见细菌牙龈卟啉单胞菌进行了抑菌实验。从实验结果可以看出,单纯壳聚糖药敏块对牙龈卟啉单胞菌有较好的抑制作用,随着壳聚糖的浓度增加,抑菌的效果随之提高。当壳聚糖与洗必泰联合应用时能取得更好的抑菌效果。证明壳聚糖不但发挥了自身的抑菌活性而且可以作为一种药物缓释载体帮助了药物的释放,起到了与药物协同抑菌的功效,但其临床应用价值需进一步研究证实。

参 考 文 献

- Lai RF, Zhao QT, Liu XN, et al. Study on osteogenic ability of chitosan/beta-tricalcium phosphate scaffold combined with human bone morphogenetic protein. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2010, 28(5):464-467.
- Pighinelli L, Kucharska M, Wisniewska-Wrona M, et al. Biodegradation study of microcrystalline chitosan and microcrystalline chitosan/ β -TCP complex composites. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(6): 7617-7628.
- 刘晓宇. 甲壳素-壳聚糖的抑菌性能研究进展. *精细与专用化学品*, 2003, (5): 12-14.
- Uehida Y. *Japan Food Chemistry*. 1988, 4(2): 22.
- Cobb CM, *Microbes. Inflammation, scaling and root planing, and the periodontal condition*. *J Dent Hyg*, 2008, 82(3): 4-9.
- Arancibia R, Maturana C, Silva D, et al. Effects of chitosan particles in periodontal pathogens and gingival fibroblasts. *Journal of Dental Research*, 2013, 92(8): 740-745.
- Spijkervet FK, Van Saene JJ, Van Saene HK. Chlorhexidine inactivation by saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1990, 69(4): 444-449.
- Schreiner HC, Sinatra K, Kpalian JB, et al. Tight-adherence genes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are required for virulence in a rat model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(12): 7295-7300.
- Claudia Juliano, Massimo Cossu, Paola Pigozzi, et al. Preparation, in vitro characterization and preliminary in vivo evaluation of

- buccal polymeric films containing chlorhexidine AAPS. Pharm Sci Tech , 2008 , 9(4) : 1153-1158.
- 10 San Tin I , Kishore R , Sakharkar I , et al. Activity of chitosan in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Biological Sciences 2009 , 5(2) : 153-160.
 - 11 Roller S , Covill N. The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads. J Food Prot , 2000 , 63(2) : 202-209.
 - 12 İkinci G , Senel S , Akincıbay H , et al. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. Int J Pharm , 2002 , 235(1-2) : 121-127.
 - 13 Choi BK , Kim KY , Yoo YJ , et al. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. Int J Antimicrob Agents , 2001 , 18(6) : 553-557.
 - 14 Chudobova D , Nejdil L , Gumulec J , et al. Complexes of silver () ions and silver phosphate nanoparticles with hyaluronic acid and/or chitosan as promising antimicrobial agents for vascular grafts. International Journal of Molecular Sciences , 2013 , 14(7) : 13592-13614.
 - 15 Hobdell MH , Oliveira ER , Bautista R , et al. Oral diseases and socio-economic status (SES). Br Dent J , 2003 , 194(2) : 91-96.
 - 16 Arancibia R , Maturana C , Silva D , et al. Effects of chitosan particles in periodontal pathogens and gingival fibroblasts. Journal of Dental Research , 2013 , 92(8) : 740-745.
 - 17 Roler S , Covill N. The antifungal property of chitosan in laboratory media and apple juice. Int J Food Microbiol , 1999 , 47(1-2) : 67-77.
 - 18 覃彩芹 , 杜予民. 过氧化氢醋酸体系降解壳聚糖及其产物的抗菌活性研究. 孝感学院学报 , 2001 , 21(6) : 9-12.
 - 19 Mara Di Giulio , Soraya Di Bartolomeo Emanuela Di Campi , et al. The Effect of a silver nanoparticle polysaccharide system on streptococcal and saliva-derived biofilms. International Journal of Molecular Sciences , 2013 , 14(7) : 13615-13625.
 - 20 Mohire NC , Yadav AV. Chitosan-based polyherbal toothpaste : as novel oral hygiene product. Indian J Dent Res , 2010 , 21(3) : 380-384.
 - 21 Sano H , SNbäk K , Matsukubo T , et al. Effect of rinsing with phosphorylated chitosan on four-day plaque regrowth. Bull Tokyo Dent Col , 2001 , 42(4) : 251-256.
 - 22 Claudia Juliano , Massimo Cossu , Paola Pigozzi , et al. Preparation , in vitro characterization and preliminary in vivo evaluation of buccal polymeric films containing chlorhexidine AAPS. Pharm Sci Tech , 2008 , 9(4) : 1153-1158.
 - 23 徐全臣 , 王国志 , 王令充 , 等. 奥硝唑缓释膜体外抑菌性及体内释放度的研究. 临床口腔医学杂志 , 2007 , 23 (10) : 601-603.
 - 24 贾洪诚 , 王璇 , 李晓光. 壳聚糖和氯己定协同抗菌斑作用的实验研究. 中华老年口腔医学杂志 , 2010 , 8(1) : 25-26.

(本文编辑 王好公) (收稿日期 2013-08-26)

(修回日期 2013-11-19)

《现代口腔医学杂志》编辑部关于对冒用我刊名义 进行非法征稿活动的郑重声明

近期发现网上有冒用我刊名义进行非法征稿活动的情况 , 我刊为此郑重声明如下 : 《现代口腔医学杂志》编辑部地址设在石家庄 , 我刊从未委托任何代理机构和个人开展组稿活动。 根据国家新闻出版总署的有关规定 , 一种期刊只能在其出版地设立一个编辑部 , 其他任何冒用本刊名义 , 或在网上以本刊名义进行征文及组稿等活动 , 均属非法行为 , 本刊将追究其法律责任。 请作者、读者认准本刊 , 谨防上当受骗 , 如发现违法者请及时向编辑部举报。 作者来稿 , 请直接邮寄至本刊编辑部 , 本刊目前暂不受理电子邮件投稿。

编辑部地址 : 石家庄市中山路 361 号 (河北医科大学院内) , 邮编 : 050017 , 联系电话 : 0311-86261245
邮箱 : xdkqyxzz@sohu.com

《现代口腔医学杂志》编辑部