

网络出版时间: 2021-8-20 15:41 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210819.1122.005.html>

Er,Cr:YSGG 激光清除 SLA 钛表面牙龈卟啉单胞菌生物膜

余金兰 夏荣 刘春 徐基亮 孙磊

摘要 目的 探究应用不同功率 Er,Cr:YSGG 激光清除喷砂酸蚀(SLA)钛表面牙龈卟啉单胞菌生物膜的效果。方法

在 SLA 试件表面制备牙龈卟啉单胞菌生物膜,并随机分为 3 组,NL 组:不处理;L1 组:0.75 W 的 Er,Cr:YSGG 激光处理;L2 组:1.5 W 的 Er,Cr:YSGG 激光处理。利用扫描电子显微镜观察各组试件表面细菌生物膜情况,同时应用活/死细菌染色和结晶紫染色法来检测各组试件表面细菌情况。结果 扫描电镜和活/死细菌染色在 L1、L2 组几乎观察不到细菌的存在,但扫描电子显微镜下 L1 组试件表面仍覆盖大量细菌生物膜。结晶紫染色法的结果显示 L1、L2 组与 NL 组 OD 值差异有统计学意义,但 L1、L2 之间差异无统计学意义。结论 1.5 W、30 Hz 的 Er,Cr:YSGG 激光可以安全有效地清除 SLA 钛表面牙龈卟啉单胞菌生物膜。

关键词 Er,Cr:YSGG 激光;喷砂酸蚀;牙龈卟啉单胞菌;扫描电子显微镜;种植体周围炎

中图分类号 R 781.42; R 782.12; R 378.84; R 378.99

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1531-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.005

种植体周围炎是一种发生在种植体周围的炎症性疾病,表现为种植体周围软组织炎症和骨丧失,是种植失败的常见原因之一,发病率约为 22%^[1-2]。研究^[3]表明,慢性牙周炎病史、吸烟等虽可以增加种植体周围炎的发病风险,但与牙周病类似,菌斑生物膜依旧是其始动因子。因此,治疗种植体周围炎的首要目标是彻底有效地清除种植体表面污染,暴露微结构。近些年,激光已被用于治疗种植体周围炎,它们能消融种植体表面的菌斑、牙石,还可以清除细菌毒素、脂多糖;局部使用不会引起全身反应;减少术中出血、疼痛和术后肿胀^[4-5]。但激光的治疗效果受功率、频率等多种因素影响^[6-7]。该研究旨在探究应用不同功率 Er,Cr:YSGG 激光清除喷砂酸蚀(sandblasted, large-grit, acid-etched, SLA)钛表面牙龈卟啉单胞菌生物膜的效果。

1 材料与方法

1.1 实验设备和试剂 Er,Cr:YSGG 水激光口腔治疗仪(美国 Biolase 公司);商业纯钛(TA1)(东莞

2021-07-07 接收

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2018YFB0407204)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院口腔科,合肥 230601

作者简介:余金兰,女,硕士研究生;

夏荣,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:xiarongqh@aliyun.com

the serum and pancreatic tissue of male C57BL/6 mice. **Methods** Male C57BL/6 mice were randomly divided into four groups. Mice were treated with clozapine 5, 10 and 20 mg/kg or an equal volume of saline by gavage. Mice blood was collected to examine the levels of amylase and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) after 14 days of consecutive gavage. Then the pancreases of the mice were dissected. Western blot was used to detect the expression of amylase, IL-1 β , IL-6 and TNF- α protein in pancreatic tissue. Fluorescence quantitative PCR method was used to detect the expression of amylase, IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA in pancreatic tissue. **Results** Compared with the control group, serum amylase levels significantly increased in the 10 and 20 mg/kg clozapine groups ($P < 0.01$ and $P < 0.001$). Compared with the control group, serum IL-1 β level of the three clozapine groups increased in a dose-dependent manner ($P < 0.01$, $P < 0.001$). Compared with the control group, serum IL-6 level decreased in the clozapine 5 mg/kg group ($P < 0.05$). Clozapine dose-dependently increased the expression of amylase, IL-1 β , IL-6 and TNF- α protein and mRNA in pancreatic tissues of mice, and the differences were statistically significant compared with the normal saline group ($P < 0.01$). **Conclusion** Clozapine reliably increased the levels of serum amylase and IL-1 β . Clozapine also increased the expression of amylase and pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α in pancreatic tissue, which may be one of the pathogenesis of clozapine-induced hyperamylasemia and even pancreatitis.

Key words clozapine; amylase; proinflammatory cytokines; IL-1 β ; IL-6; TNF- α

冠跃金属材料有限公司); GeminiSEM500 扫描电子显微镜、LSM880 激光扫描共聚焦显微镜(德国卡尔·蔡司公司); 麦氏比浊仪(上海梅里埃诊断产品有限公司); Invitrogen L-7012 活/死菌细菌活力试剂盒、多功能微孔板酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司); 牙龈卟啉单胞菌(北京百欧博伟生物技术有限公司); 人工唾液、脑心浸液培养基(brain heart infusion, BHI) (上海索莱宝生物科技有限公司); 结晶紫溶液、抗荧光淬灭剂(上海碧云天生物技术有限公司); 维生素 K1 注射液(上海信然原装生物试剂)。

1.2 试件制备 纯钛试件(直径 10 mm × 1 mm) 经 75% 乙醇溶液清洗后进行 SLA 处理。Al₂O₃ 砂粒(120 μm) 在 0.45 MPa 气压下垂直喷射轰击试件 30 s, 距离为 5 cm。随后浸入 18% 盐酸和 48% 硫酸以 1 : 1 (v/v) 的混合酸溶液中, 60 °C 水浴加热 30 min, 双蒸水超声振荡 15 min。制备成功的 SLA 钛试件储存于 0.9% 氯化钠溶液中, 使用前环氧乙烷消毒灭菌。

1.3 牙龈卟啉单胞菌生物膜制备 冻存的牙龈卟啉单胞菌菌株于 BHI 血琼脂培养基上复苏, 37 °C 厌氧环境(80% N₂、10% CO₂、10% H₂) 培养 72 h。挑取血琼脂培养基上单菌落于 BHI 血清培养基中制备成 6 × 10⁸ CFU/ml 的菌悬液。将试件置于 24 孔培养板内, 受试面朝上, 加入 500 μl 0.22 μm 滤膜过滤后的人工唾液, 静置过夜以形成人工获得性膜。获得性膜形成后各孔内分别加入 1 ml 上述菌悬液, 37 °C 厌氧培养 72 h。

1.4 激光处理与分组 Er, Cr: YSGG 激光处理: 采用 Er, Cr: YSGG 激光器(波长 2 780 nm, 功率 0.75 W 或 1.5 W, 频率 30 Hz, 脉冲时间 140 μs, 空气压力 40%, 水压力 40%), 选用 MZ6 工作尖(直径 600 μm), 离试件表面 2 mm, 垂直于试件表面照射, 单次照射时间 30 s。采用系统抽样将所有试件随机分为 3 组, 每组 11 枚。NL 组: 不做任何处理; L1 组: 0.75 W 的 Er, Cr: YSGG 激光处理; L2 组: 1.5 W 的 Er, Cr: YSGG 激光处理。

1.5 扫描电子显微镜观察 每组随机抽取 3 枚试件, PBS 冲洗去除试件表面黏附不牢的细菌。2.5% 戊二醛固定 1 h, PBS 清洗后, 50%、70%、80%、90%、100% 乙醇溶液梯度脱水, 干燥, 喷金, 扫描电子显微镜下观察各组 SLA 试件表面牙龈卟啉单胞菌生物膜情况。

1.6 活/死细菌染色 利用 L-7012 活/死菌细菌活力试剂盒鉴别 SLA 试件表面活/死细菌。将 SY-

TO9、PI、蒸馏水按 1.5 μl : 1.5 μl : 1 ml 的比例配制成荧光染液, 避光备用。每组随机抽取 3 枚试件, PBS 冲洗去除试件表面黏附松散的细菌, 吸取 200 μl 上述荧光染液滴于试件表面, 于室温、黑暗条件下孵育 15 min, PBS 轻洗。黑暗环境中, 在试件表面滴一滴抗荧光淬灭剂, 4 °C 避光存放并立即镜检。将试件倒置在载波片上, 激光扫描共聚焦显微镜(×40) 下观察。

1.7 结晶紫染色法检测试件表面的细菌数量 激光处理后, 各组随机选取 5 枚试件。2.5% 戊二醛固定 30 min, 弃去固定液, PBS 轻洗, 烤箱 37 °C 干燥, 加入 1 ml 1% 结晶紫溶液, 振摇 20 min, 然后用 PBS 将游离染料彻底清洗干净, 加入 1 ml 33% 醋酸溶液, 充分震荡, 酶标仪测量波长 590 nm 处的吸光度(optical density, OD) 值。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件分析数据, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析(ANOVA) 利用 SNK 检验进行两两之间的比较。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扫描电子显微镜观察 干净 SLA 钛表面形态不规则, 可见大小不一的微米级凹陷, 边缘较锐利(图 1A)。各组试件表面牙龈卟啉单胞菌生物膜的扫描电子显微镜图如图 1B ~ 1D。NL 组: 获得性膜形成, 覆盖粗糙表面, 其上大量细菌定植繁衍; L1 组: 牙龈卟啉单胞菌生物膜表层被清除, 试件表面仍覆盖大量获得性膜和少量细菌; L2 组: 试件表面结构暴露, 暴露区域的形态结构与干净 SLA 钛表面无区别, 未观察到熔化、融合等结构改变。

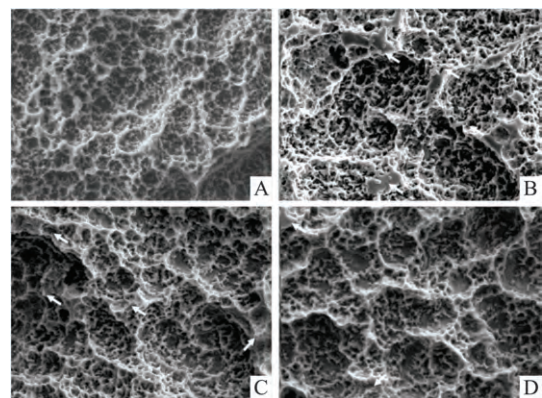


图 1 试件表面牙龈卟啉单胞菌生物膜的扫描电子显微镜图 ×2 500
A: 干净 SLA 钛表面; B: NL 组; C: L1 组; D: L2 组

2.2 活/死细菌染色结果 NL组: 试件表面含有大量的绿色荧光(活菌)和部分红色荧光(死菌),经激光处理后,荧光成分明显减少; L1组: 少量绿色荧光(活菌)散在分布; L2组: 可见零星绿色荧光(活菌)。见图2。

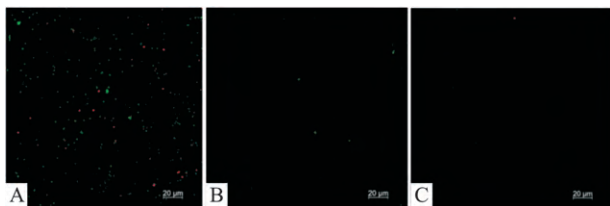


图2 试件表面活/死细菌染色的激光扫描共聚焦显微镜图 ×40
A: NL组; B: L1组; C: L2组; 红色: 死菌; 绿色: 活菌

2.3 试件表面的细菌数量 采用单因素方差分析比较3组之间的差异, NL组 OD值最大, 而经激光处理后, L1组、L2组 OD值减少, 与NL组差异有统计学意义($F=2.588.12, P<0.001$)。虽然L2组的OD值小于L1组, 但两组之间差异无统计学意义(图3)。

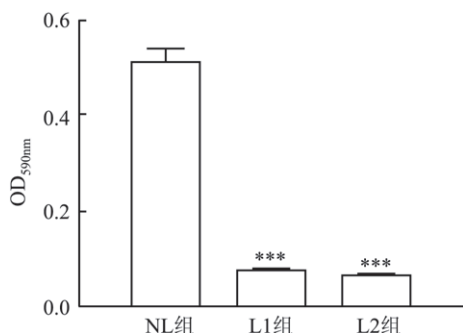


图3 结晶紫染色法检测各组试件表面的细菌数量与NL组比较: *** $P<0.001$

3 讨论

种植体周围炎作为常见的种植并发症之一, 可以引起种植体周围组织炎症, 骨组织吸收, 进而引起种植体松动、脱落。近年来, 激光应用于种植体周围炎的治疗, 它们可以杀灭种植体表面存在的微生物, 消融菌斑、牙石, 还可以粗化种植体表面以便于再次发生骨结合。Er, Cr: YSGG激光的吸收系数与水及羟基磷灰石的吸收峰值相匹配, 可释放波长2780 nm的高速动能水分子以完成组织的切割及消融^[8]。在种植体周围炎的治疗过程中, 菌斑、牙石中的羟基磷灰石和水被吸收, 从而完成种植体表面去污; 而当其作用于软组织时, 能达到很好的切割和止血效果, 降低水肿的发生, 避免切割后创面结痂,

降低感染的可能性, 同时还可以加快组织愈合^[9-10]。

Ercan et al^[11-12]用扫描电子显微镜定性评估经不同参数 Er, Cr: YSGG激光照射后不同种植体表面的形貌变化, 发现不同参数会不同程度地影响种植体表面, 而不同种植体表面经同一参数激光照射后影响程度亦不相同, 说明频率、功率、照射时间、照射距离以及种植体表面类型等都会影响激光对种植体的作用。因此, 在治疗过程中频率、功率、照射时间、照射距离以及种植体表面类型等参数都应慎重考虑。有研究^[13]表明当 Er, Cr: YSGG激光的能量密度小于等于50 mJ/pulse(20 Hz), SLA微结构表面未观察到改变; 但能量密度为60 mJ/pulse时, 可观察到颜色变化。该实验所使用的激光参数(0.75 W或1.5 W)亦未在试件表面造成融化、融合等结构改变。

实验利用活/死细菌染色和结晶紫染色法检测各组表面细菌情况, 两者具有相同趋势: 经0.75 W或1.5 W的 Er, Cr: YSGG激光处理后, 活/死细菌染色后在激光扫描共聚焦显微镜下几乎看不到细菌的存在。结晶紫染色法的结果显示0.75 W或1.5 W的 Er, Cr: YSGG激光组之间差异无统计学意义。然而在扫描电子显微镜下, 0.75 W的 Er, Cr: YSGG激光组试件表面仍有大量获得性膜覆盖, 遮挡其原有形貌, 1.5 W的 Er, Cr: YSGG激光组试件表面几乎观察不到生物膜的存在。这种结果的产生可能是由于实验制备的牙龈卟啉单胞菌生物膜, 细菌黏附定植于获得性膜表面, 激光处理时, 激光束和水/气首先作用于细菌, 因此在试件表面几乎观察不到细菌的存在, 而0.75 W的 Er, Cr: YSGG激光组由于设置的功率较小或作用时间较短, 不能完全清除试件表面上的获得性膜。Schwarz et al^[14]的实验结果显示 Er, Cr: YSGG激光具有功率、时间依赖的清除菌斑生物膜的能力, 随着设置功率的增加, 残余菌斑面积显著减小, 但当激光功率设为2 W或2.5 W时, 会影响表层化学组成, 从而降低表面细胞活力。Strev-er et al^[15]的研究表明1.0~1.5 W Er, Cr: YSGG激光可以清除种植体表面95%以上的牙龈卟啉单胞菌并且不破坏其表面结构。本实验结果也显示1.5 W的 Er, Cr: YSGG激光可以有效清除SLA钛表面牙龈卟啉单胞菌生物膜。

然而本实验存在一定的局限性, 所制备的牙龈卟啉单胞菌生物膜并不能完全模拟种植体周围炎时种植体表面的情况。由于独特的能量分布和激光传

输系统的固有差异,不同制造商生产的 Er,Cr: YSGG 激光设备的最佳能量输出会有所不同。临床使用过程中应更好地了解不同激光设备的特性差异,使用最佳激光参数安全有效地进行种植体周围炎的治疗。

参考文献

- [1] Derks J, Tomasi C. Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology [J]. *J Clin Periodontol*, 2015, 42 Suppl 16: S158 - 71.
- [2] Romanos G E, Javed F, Delgado-Ruiz R A, et al. Peri-implant diseases: a review of treatment interventions [J]. *Dental Clin North Am*, 2015, 59(1): 157 - 78.
- [3] Schwarz F, Derks J, Monje A, et al. Peri-implantitis [J]. *J Clin Periodontol*, 2018, 45 Suppl 20: S246 - 66.
- [4] Natto Z S, Aladmawy M, Levi Jr P A, et al. Comparison of the efficacy of different types of lasers for the treatment of peri-implantitis: a systematic review [J]. *Int J Oral Maxillofac implants*, 2015, 30(2): 338 - 45.
- [5] Gholami G A, Karamlou M, Fekrazad R, et al. Comparison of the effects of Er,Cr: YSGG laser and super-saturated citric acid on the debridement of contaminated implant surfaces [J]. *J Lasers Med Sci*, 2018, 9(4): 254 - 60.
- [6] Rafiee K, Naffakh-Moosavy H, Tamjid E. The effect of laser frequency on roughness, microstructure, cell viability and attachment of Ti6Al4V alloy [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 109: 110637.
- [7] 贾永娜,姜丹丹,缙小蕊,等. 不同能量 Er: YAG 激光治疗早期种植体周围炎的临床研究 [J]. *应用激光*, 2020, 40(3): 564 - 9.
- [8] 冀章章,徐秀敏,章润贞,等. Er,Cr: YSGG 激光治疗慢性牙周炎的临床疗效评价 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(5): 669 - 72.
- [9] 刘芮,夏荣,肖楠楠,等. Er,Cr: YSGG 激光处理技术对楔状缺损粘结面的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(10): 1646 - 50.
- [10] Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, et al. Periodontal and peri-implant wound healing following laser therapy [J]. *Periodontol* 2000, 2015, 68(1): 217 - 69.
- [11] Ercan E, Arin T, Kara L, et al. Effects of Er,Cr: YSGG laser irradiation on the surface characteristics of titanium discs: an *in vitro* study [J]. *Lasers Med Sci*, 2014, 29(3): 875 - 80.
- [12] Ercan E, Candirli C, Arin T, et al. The effect of Er,Cr: YSGG laser irradiation on titanium discs with microtextured surface morphology [J]. *Lasers Med Sci*, 2015, 30(1): 11 - 5.
- [13] Takagi T, Aoki A, Ichinose S, et al. Effective removal of calcified deposits on microstructured titanium fixture surfaces of dental implants with erbium lasers [J]. *J Periodontol*, 2018, 89(6): 680 - 90.
- [14] Schwarz F, Nuesry E, Bieling K, et al. Influence of an erbium, chromium-doped yttrium, scandium, gallium, and garnet (Er,Cr: YSGG) laser on the reestablishment of the biocompatibility of contaminated titanium implant surfaces [J]. *J Periodontol*, 2006, 77(11): 1820 - 7.
- [15] Strever J M, Lee J, Ealick W, et al. Erbium, chromium: yttrium-scandium-gallium-garnet laser effectively ablates single-species biofilms on titanium disks without detectable surface damage [J]. *J Periodontol*, 2017, 88(5): 484 - 92.

Er,Cr: YSGG laser removal of *Porphyromonas gingivalis* biofilm on SLA surface

Yu Jinlan, Xia Rong, Liu Chun, et al

(Dept of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the effect of using Er,Cr: YSGG laser with different power to remove the *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) biofilm on sandblasted, large-grit, acid-etched (SLA) surface. **Methods** *P. gingivalis* biofilm was prepared on SLA surface and randomly divided into three groups. NL: no treatment; L1: 0.75 W Er,Cr: YSGG laser treatment; L2: 1.5 W Er,Cr: YSGG laser treatment. Scanning electron microscope (SEM) was used to observe the bacterial biofilm on SLA surface, and live/dead bacterial staining and crystal violet staining methods were used to detect the bacteria in each group. **Results** Under SEM and live/dead bacterial staining, almost no bacteria was observed in the L1 and L2 groups, but L1 group was still covered with a large amount of acquired pellicle. The results of crystal violet staining showed that L1 and L2 groups were statistically different from NL group, but the difference between the two groups was not statistically significant. **Conclusion** 1.5 W, 30 Hz Er,Cr: YSGG laser can safely and effectively remove the *P. gingivalis* biofilm on the SLA surface.

Key words Er,Cr: YSGG laser; sandblasted, large-grit, acid-etched; *Porphyromonas gingivalis*; scanning electron microscope; peri-implantitis