

论 著

(基础研究)

自酸蚀树脂粘接剂合成纳米银对唾液生物膜抗菌性的初步研究

杨玉琼, 孟翔峰

【摘要】 目的 运用原位法合成纳米银对自酸蚀树脂粘接剂进行抗菌改性。 **方法** 将 2-乙基己酸银添加到甲基丙烯酸叔丁基氨基乙酯中,震荡混匀后制成 8% 质量分数的银源溶液,再将其分别以 0%、0.1%、0.2% 质量分数银(Ag)添加到两步法自酸蚀树脂粘接剂 Clearfil SE Bond(CSB)的粘接剂部分及一步法自酸蚀树脂粘接剂 Clearfil SE One(CSO)中,光照固化后制得圆盘状试件。以透明聚酯薄膜为空白对照组;以 0% Ag CSB、0% Ag CSO 为对照组;以 0.1% Ag CSB、0.1% Ag CSO、0.2% Ag CSB、0.2% Ag CSO 为含银实验组。采用透射电镜观察粘接剂中生成纳米银的形貌、粒径及分散情况;采用菌落计数及活/死菌染色来评价其对唾液生物膜的抗菌性能。 **结果** 透射电镜结果显示实验组试件中有分散均匀的纳米银颗粒生成,0.1% Ag CSB 组、0.2% Ag CSB 组、0.1% Ag CSO 组、0.2% Ag CSO 组的纳米银平均粒径分别为 $(10.82 \pm 3.66) \text{ nm}$ 、 $(8.84 \pm 3.21) \text{ nm}$ 、 $(21.38 \pm 5.39) \text{ nm}$ 、 $(17.77 \pm 4.72) \text{ nm}$ 。菌落计数换算成的抗菌率结果显示,0% Ag CSO 组的抗菌率 $[(32.12 \pm 10.55) \ %]$ 显著高于 0% Ag CSB 组 $[(14.66 \pm 5.63) \ %]$ ($P < 0.05$),但显著低于 CSB 和 CSO 的 0.1% Ag 组 $[(56.71 \pm 7.89) \ %]$ 、 $[(63.52 \pm 5.91) \ %]$ 和 0.2% Ag 组 $[(77.30 \pm 4.45) \ %]$ 、 $[(83.75 \pm 8.59) \ %]$ 的抗菌率 ($P < 0.05$);CSB 和 CSO 的 0.2% Ag 组的抗菌率显著高于它们各自的 0.1% Ag 组 ($P < 0.05$);在 0.1% Ag 或 0.2% Ag 浓度下,CSB 和 CSO 组间的抗菌率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。活/死菌染色结果显示对照组表面有大量活菌覆盖,而实验组表面有大量死菌覆盖。 **结论** 在自酸蚀树脂粘接剂中能够原位合成纳米银,并对唾液生物膜具备一定的抗菌性。

【关键词】 纳米银;自酸蚀树脂粘接剂;生物膜;抗菌性**【中图分类号】** R78**【文献标志码】** A**【文章编号】** 1672-271X(2020)04-0346-05**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2020.04.003

Antibacterial activity of self-etching adhesive resins containing silver nanoparticles synthesized in situ on human plaque microcosm biofilms

YANG Yu-qiong, MENG Xiang-feng

(Department of Prosthodontics, Nanjing Stomatological Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective To incorporate silver nanoparticles into two different types of self-etching adhesive resins with a technique of *in situ* synthesized silver nanoparticles, and evaluate the antibacterial activity of the new dental adhesive resins. **Methods** The silver 2-ethylhexanoate was dissolved into 2- (tert-butylamino) ethyl methacrylate to form a silver amine solution with a mass fraction of 8%. The silver amine solution was added to the two-step self-etching adhesive resin Clearfil SE Bond (CSB) and one-step self-etching adhesive resin Clearfil SE One (CSO), respectively. After curing by light, resin disks with silver mass fractions of 0%, 0.1%

and 0.2% were obtained. The transparent polyester film was used as the blank control group. 0% Ag CSB and 0% Ag CSO were used as the control group. 0.1% Ag CSB, 0.1% Ag CSO, 0.2% Ag CSB and 0.2% Ag CSO were used as the silver-containing experimental group. The morphology and particle size

基金项目:国家自然科学基金(81470781);江苏省卫生健康委科研项目(LGY2018003)

作者单位:210008 南京,南京大学医学院附属口腔医院(南京市口腔医院)修复科(杨玉琼、孟翔峰)

通信作者:孟翔峰, E-mail: mengsoar@nju.edu.cn

distribution of nano-silver was observed by transmission electron microscope (TEM). The antibacterial activity of adhesive resins against biofilms were evaluated by Colony-forming unit (CFU) counts and live/dead bacteria staining. **Results** TEM results showed that the silver-containing specimens after solidification had uniform dispersion of nano-silver particles. The average particle diameters of silver nanoparticles in the 0.1% Ag CSB group, 0.2% Ag CSB group, 0.1% Ag CSO group, and 0.2% Ag CSO group were (10.82 ± 3.66) nm, (8.84 ± 3.21) nm, (21.38 ± 5.39) nm, (17.77 ± 4.72) nm, respectively. The antibacterial rate converted from CFU counts was displayed as follows: The antibacterial rate of 0% Ag CSO Group $[(32.12 \pm 10.55)\%]$ was significantly higher than that of 0% Ag CSB Group $[(14.66 \pm 5.63)\%]$ ($P < 0.05$), but significantly lower than that of 0.1% Ag Group $[(56.71 \pm 7.89)\%, (63.52 \pm 5.91)\%]$ and 0.2% Ag Group $[(77.30 \pm 4.45)\%, (83.75 \pm 8.59)\%]$ ($P < 0.05$). The antibacterial rate of 0.2% Ag group of CSB and CSO was significantly higher than that of their respective 0.1% Ag group ($P < 0.05$). For the concentration of 0.1% Ag or 0.2% Ag, there was no significant difference between the CSB and CSO groups ($P > 0.05$). Live/dead bacteria staining results showed that the surface of control group was covered with a large number of live bacteria, while the experimental groups were covered with a large number of dead bacteria. **Conclusion** The application of *in situ* synthesized silver nanoparticles to self-etching adhesive resins could obtain antibacterial activity against biofilms in saliva.

[Key words] silver nanoparticles; self-etching adhesive resin; antibacterial activity; biofilms

0 引 言

牙本质树脂粘接界面在口腔环境的长期作用下,容易出现老化及微渗漏^[1],同时树脂材料粗糙的表面也易聚集菌斑生物膜,从而导致继发龋的发生^[2-3]。因此对树脂粘接剂进行抗菌改性是提高修复体寿命的一个可行方法。纳米银的抗菌效果被大量文献所证实^[4-5]。而纳米银原位合成法能够解决纳米银在树脂材料中的分散问题,该方法利用单体聚合反应产生的自由基来还原银离子生成纳米银^[6-8]。我们的前期研究将纳米银原位合成法引入到树脂粘接剂中,发现合成的纳米银能够对标变异链球菌产生良好的抗菌效果^[9]。而纳米银原位合成法面对具有更高酸性的一步法自酸蚀树脂粘接剂以及菌落结构更复杂的唾液生物膜,其方法的可靠性及有效性需要进一步的研究来证实。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料 2-乙基己酸银 (LotA1918077, 百灵威公司, 美国); 甲基丙烯酸叔丁基氨基乙酯 (Tertbutylaminoethyl methacrylate, TBAEMA) (LotB-CBF8391V, 西格玛奥德里奇公司, 美国); Clearfil SE Bond (可乐丽公司, 日本); Clearfil SE One (可乐丽公司, 日本); 活/死细菌染色试剂盒 (赛默飞公司, 美国)。

1.1.2 实验设备 电子分析天平 (FA2004, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司, 中国); 超声清洗器 (KQ-

250DE, 昆山舒美有限公司, 中国); 光固化灯 (Bluephase C8, 义获嘉伟瓦登特公司, 列支敦士登); 透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM) (Tecnai G2 Spirit BIOTWIN, FEI 公司, 美国); 超净台 (SW-CJ-1D 型, 苏州净化有限公司, 中国); 激光共聚焦显微镜 (NikonA1, 尼康公司, 日本); 生化培养箱 (SPX-80 型, 上海博泰实验设备有限公司, 中国)。

1.2 粘接剂试件的制备及分组 称取 0.08 g 2-乙基己酸银盐, 将其添加到 0.92 g TBAEMA 中, 充分震荡混匀后形成 8% 质量分数的银源溶液^[10], 再将其以 0%、0.1%、0.2% 质量分数添加到两步法自酸蚀树脂粘接剂 Clearfil SE Bond (CSB) 的第 2 步粘接剂 (bond) 部分及一步法自酸蚀树脂粘接剂 Clearfil SE One (CSO) 中。使用慢速切割机切取内径 6 mm、厚 1 mm 的有机玻璃模具。将有机玻璃模具置于透明聚酯薄膜上, 而后滴入树脂粘接剂使其充满模具, 覆盖透明聚酯薄膜后用盖玻片将气泡挤出并压实, 用 1000 mW/cm² 光固化灯正反面各光照 20 s, 待试件完全固化后轻轻取出。用打孔器制作内径 6 mm、厚 1 mm 的透明聚酯薄膜作为空白对照组。每组制作 12 个试件, 于无菌水中浸泡 1 周后取出, 超声清洁 15 min 后置于 37 °C 干燥箱烘干, 环氧乙烷消毒后备用。

所有实验分组为: 空白对照组: 透明聚酯薄膜; 对照组 (0% Ag CSB, 0% Ag CSO); 含银实验组 (0.1% Ag CSB, 0.1% Ag CSO, 0.2% Ag CSB, 0.2% Ag CSO)。采用透射电子显微镜对含银实验组进行

形貌观察及粒径分析,采用菌落计数及活/死菌染色来评价所有组别的抗菌效能。

1.3 纳米银形貌及粒径分布情况测定 从 6 组树脂粘接剂中每组任意选取 3 个试件,用超薄切割机将树脂包埋后的试件切成 70 nm 厚度的薄片,将薄片置于铜网上,并在透射电子显微镜下观察纳米银的形貌及其在树脂粘接剂中的分散情况。从每组树脂粘接剂的镜下观察图像中随机截取 10 张 TEM 图像,使用 Nano measurer 1.2 图像处理软件测量图中固定面积下的任意 100 个纳米银颗粒粒径,并采用 Origin 9.0 数据分析软件(Origin Lab 公司,美国)进行纳米银粒径分析。

1.4 含纳米银树脂粘接剂对唾液生物膜的抗菌性检测

1.4.1 人唾液标本的采集 本实验共纳入 20 名健康成年志愿者,纳入标准为:18~25 岁健康成年人,无糖尿病、传染病等系统性病史,近 3 个月内未服用抗生素,口腔检查明确无龋病及牙周病病史,无错颌畸形。排除标准为:有过口腔疾病治疗史或系统性疾病治疗史或对本实验干预措施不愿合作者。

采集唾液前要求志愿者从前 1 天早晨 8:00 开始不刷牙不漱口,至第 2 天早晨 8:00 于实验室统一采集唾液,采集唾液前 2 h 内禁止饮食。每人分别领取 1 支 15 mL 无菌离心管,在无菌环境下采集 1 mL 唾液后迅速盖上管盖,防止外源性细菌污染。共收集得到 20 mL 唾液。将收集得到的所有志愿者的唾液在无菌操作台中倒入 50 mL 无菌管中,用无菌玻璃棒混合均匀,经消过毒的滤网过滤后与甘油按照体积比 7:3 混合,混合后分装于 2 mL 无菌离心管中,存储于-80 ℃冰箱中备用。

1.4.2 唾液生物膜的培养 唾液生物膜接种原液由 1 mL 人唾液标本与 50 mL McBain 培养液^[5]混匀配制而成,按 1.5 mL/孔加入到 24 孔板中。每组随机选取 9 个试件,由无菌镊子夹取,放入孔板中,每孔放入 1 个试件。将 24 孔板密封后于 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 8 h 后,保持菌斑生物膜面向上将试件逐个取出,移至新的 24 孔板中,每孔加入 1.5 mL 新鲜 McBain 培养液,37 ℃、5% CO₂ 条件下继续培养 16 h 后,与前一步骤相同,将试件移至新的 24 孔板中,每孔加入 1.5 mL 新鲜 McBain 培养基中继续培养 24 h,最终取出表面附有菌斑生物膜的试件进行菌落计数及活/死菌染色实验。

1.4.3 菌斑生物膜菌落计数 每组取 6 个试件分别放入 24 孔板中,用 1 mL PBS 轻轻冲洗以去除试件表面松散的细菌,将试件转移至盛有 1 mL PBS 的无菌离心管中,超声振荡 5 min,收集牙菌斑生物膜,并将其震动混匀,梯度稀释后涂布于胰蛋白大豆血琼脂固体培养基(TSB)上,37 ℃下培养 24 h 后进行菌落计数(CFU),将菌落计数结果换算为抗菌率。抗菌率计算公式为:

$$\text{抗菌率} = (N_0 - N) / N_0 \times 100\%$$

N_0 :空白对照组平均 CFU 值; N :各组不同银源浓度粘接剂的平均 CFU 值。

1.4.4 菌斑生物膜细菌染色 每组取 3 个试件分别放入 24 孔板中,1 mL PBS 轻轻冲洗试件表面后将试件移至新的 24 孔板,用 1 mL 活/死菌试剂于暗室中着色 15 min 后置于激光共聚焦显微镜下观察。在荧光显微镜下,细胞膜完整的活菌染色后呈绿色荧光;细胞膜受损的死菌染色后呈红色荧光;活/死菌接近或重叠的部分会显示出橙/黄色荧光。

1.5 统计学分析 选用 SPSS 19.0 统计学软件对同一种树脂粘接剂(CSB/CSO)的不同含银浓度(0% Ag、0.1% Ag、0.2% Ag)组表面抗菌率进行单因素方差分析,并选用 Student-Newman-Keuls(SNK)法进行两两比较;对相同含银浓度(0% Ag/0.1% Ag/0.2% Ag)下不同树脂粘接剂(CSB、CSO)组表面抗菌率采用独立样本 t 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 纳米银形貌观察及粒径分析 6 组树脂粘接剂试件的透射电镜图显示,对照组可见微米级填料呈团簇状分散于树脂基质中,而实验组中除了团簇状的微米级填料外,还均匀分散着纳米级的黑色纳米银颗粒,且随着银源浓度的增高,纳米银颗粒的分布更为密集。见图 1。实验组中纳米银颗粒生成的粒径分布图见图 2,经过软件分析计算,0.1% Ag CSB 组、0.2% Ag CSB 组、0.1% Ag CSO 组、0.2% Ag CSO 组的纳米银平均粒径分别为 (10.82 ± 3.66) nm、 (8.84 ± 3.21) nm、 (21.38 ± 5.39) nm、 (17.77 ± 4.72) nm。

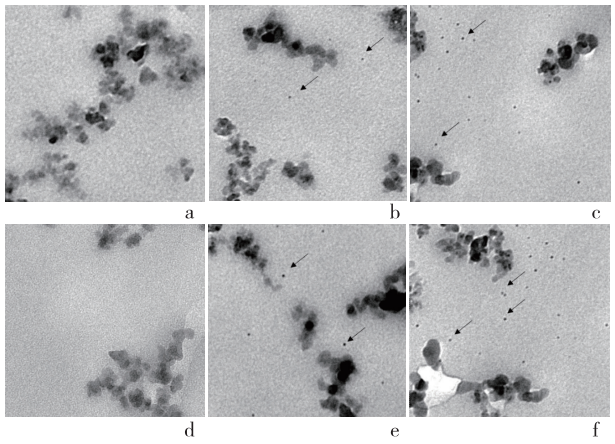
2.2 唾液生物膜全菌落计数结果 0% Ag CSO 组的抗菌率显著高于 0% Ag CSB 组($P < 0.05$),但显著低于 CSB 和 CSO 的 0.1% Ag 和 0.2% Ag 组的抗菌率($P < 0.05$);CSB 和 CSO 的 0.2% Ag 组的抗菌率

显著高于它们各自的 0.1% Ag 组 ($P<0.05$); 在 0.1% Ag 或 0.2% Ag 浓度下, CSB 和 CSO 组间的抗菌率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组唾液生物膜的全菌落计数及抗菌率结果比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	全菌落计数 ($\times 10^8$ CFU/mL)	抗菌率 (%)
空白对照组	6.62 \pm 0.85	—
0% Ag CSB 组	5.65 \pm 0.37	14.66 \pm 5.63*
0.1% Ag CSB 组	2.86 \pm 0.52	56.71 \pm 7.89*
0.2% Ag CSB 组	1.50 \pm 0.29	77.30 \pm 4.45*#
0% Ag CSO 组	4.49 \pm 0.70	32.12 \pm 10.55
0.1% Ag CSO 组	2.41 \pm 0.39	63.52 \pm 5.91*
0.2% Ag CSO 组	1.08 \pm 0.57	83.75 \pm 8.59* Δ

与 0% Ag CSO 组比较, * $P<0.05$; 与 0.1% Ag CSB 组比较, # $P<0.05$; 与 0.1% Ag CSO 组较, $\Delta P<0.05$



a-c 分别为: 0%、0.1%、0.2% Ag CSB 组; d-f 分别为: 0%、0.1%、0.2% Ag CSO 组
图中箭头所指为纳米银颗粒

图 1 各组树脂粘接剂试件的透射电镜图 ($\times 100\ 000$)

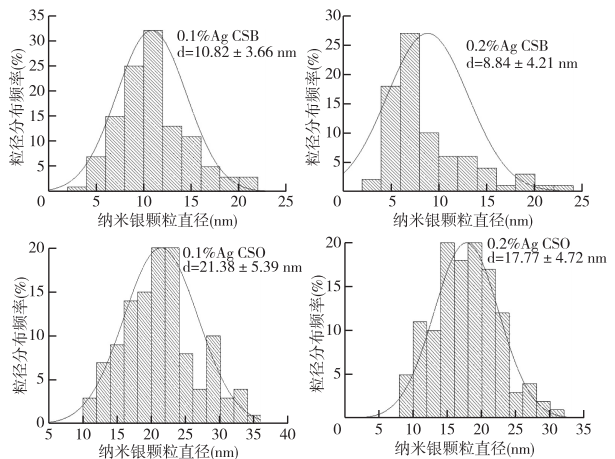
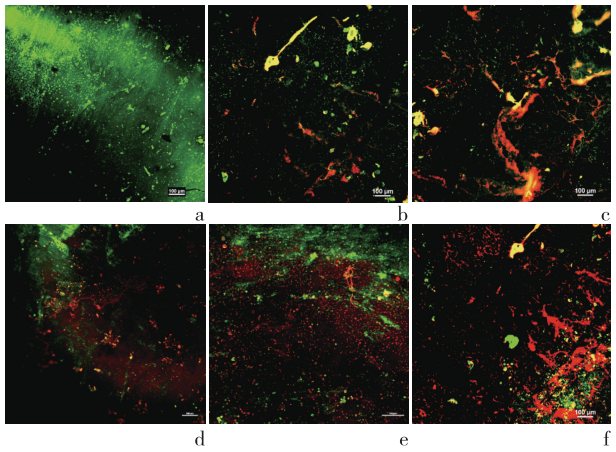


图 2 实验组生成的纳米银颗粒粒径分布图

2.3 唾液生物膜染色结果 试件表面唾液生物膜染色结果显示, 0% Ag CSB 组试件表面呈大面积绿色

荧光, 说明试件表面覆盖大量活菌; 0% Ag CSO 组试件表面绿色荧光中有部分散在红色点状荧光, 说明有部分活菌覆盖的同时也有部分死菌覆盖; CSB 和 CSO 的 0.1% Ag 和 0.2% Ag 组试件表面呈现红、橙或黄色荧光, 说明试件表面覆盖大量死菌。见图 3。



a-c 分别为: 0%、0.1%、0.2% Ag CSB 组; d-f 分别为: 0%、0.1%、0.2% Ag CSO 组

图 3 各组树脂粘接剂试件表面唾液生物膜的激光共聚焦分析图像 ($\times 100$)

3 讨 论

在树脂粘接修复体的长期使用过程中, 口腔内的菌斑生物膜极易侵入牙体组织与树脂间的粘接界面, 当口腔微生态环境处于不平衡状态时, 附着在粘接界面的致龋菌会利用食物代谢产酸, 从而促使牙本质基底部脱矿, 产生继发龋^[11], 最终导致修复失败。因此, 赋予树脂粘接剂一定的抗菌性是十分必要的。

尽管纳米银的抗菌作用机制尚不明确, 但研究已经证实纳米银可通过释放银离子或自身溶出来发挥抗菌效果, 并且纳米银具有广谱抗菌性及良好的生物相容性^[12]。但使纳米银在聚合物中得到均匀分散是其材料设计的关键。而原位合成法利用树脂的聚合反应来生成纳米银, 使其得到均匀分散, 已经被很多研究所证实^[6]。Cheng 等^[13] 将 0.08 g 2-乙基己酸银盐溶解于 0.92 g 仲胺中制成 8% 质量分数的银盐溶液, 然后将 8% 质量分数的银盐溶液按一定比例添加到含无定型磷酸钙的复合树脂中, 聚合后的树脂中原位合成了纳米银, 粒径为 (2.7 \pm 0.6) nm, 并使材料具有了一定的抗菌性。

而在本研究中, 纳米银原位合成法进一步应用

到酸性更强的一步法自酸蚀树脂粘接剂中。实验结果显示即使在较高酸性条件下,该方法也能够原位生成分散均匀的纳米银颗粒。值得注意的是,含银 CSB 组所生成纳米银的平均粒径比含银 CSO 组纳米银平均粒径小,推测这是由于两步法自酸蚀树脂粘接剂 CSB 的 bond 部分 pH 值较高,接近生理 pH 值,而一步法自酸蚀树脂粘接剂 CSO 的 pH 值较低 (pH=2.3),研究表明纳米银颗粒的粒径大小会受到反应液的 pH 值的影响,pH 值越小,所生成纳米银颗粒粒径越大^[14]。

树脂粘接剂经光照固化后,未聚合的残余单体会对细胞产生一定的毒性^[15]。粘接剂中的未聚合单体在 24 h 内可洗脱 90% 以上,1 周后可降至无法检测的水平^[16],因此本实验将试件在无菌水中浸泡 1 周,以排除粘接剂中残余未聚合单体的不利影响。本实验采用体外唾液生物膜模型检测含纳米银试件的抗菌性能。生物膜模型一般可分为 3 种,分别为特定混合菌种、单一菌种以及全菌种模型^[17]。本实验采用全菌种模型,通过收集不同志愿者的唾液以模拟口腔内环境的复杂性和异质性。在前期研究中,0.1%Ag 组试件对标准变异链球菌株的抗菌率超过 95%^[9];而本研究中 0.1%Ag 组试件的抗菌率却只有 60% 左右,这提示本研究采用的唾液生物膜因为是由各类细胞、基质、空隙及管道系统组成,具有复杂三维立体结构的生态系统^[18],其高度的结构特异性会阻碍 Ag⁺ 发挥抗菌效能,从而使抗菌效率降低。但是针对唾液生物膜复杂的生态结构,本研究显示银源浓度提高到 0.2% 时,能够显著改善 CSB 和 CSO 的抗菌效果。

作为系列研究,本研究将原位合成法应用到酸性更高的一步法自酸蚀粘接剂中,仍然合成了均匀分散的纳米银颗粒,尽管其生成粒径受到其酸性影响,但其仍对唾液生物膜有一定的抗菌性能。本实验仅研究了含纳米银自酸蚀树脂粘接剂的短期抗菌性能,其生物相容性/机械性能以及对唾液生物膜的长期抗菌性能尚待进一步研究。

【参考文献】

- [1] 兰俊,毛钊,赵俊,等.2 种黏结剂用于后牙 II 类洞边缘微渗漏的对比研究[J]. 医学研究生学报,2010,23(9): 928-930.
- [2] Betancourt DE, Baldion PA, Castellanos JE. Resin-Dentin Bonding Interface: Mechanisms of Degradation and Strategies for Stabilization of the Hybrid Layer[J]. Int J Biomater, 2019. doi: 10.1155/2019/5268342.
- [3] Waldman GL, Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. Microleakage and Resin-to-Dentin Interface Morphology of Pre-Etching versus Self-Etching Adhesive Systems[J]. Open Dent J, 2008, 2: 120-125.
- [4] Rizzello L, Pompa PP. Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines[J]. Chem Soc Rev, 2014, 43(5):1501-1518.
- [5] Metin-Gürsoy G, Taner L, Akca G. Nanosilver coated orthodontic brackets: in vivo antibacterial properties and ion release[J]. Eur J Orthod, 2017, 39(1):9-16.
- [6] Kumar A, Vemula PK, Ajayan PM, et al. Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil[J]. Nat Mater, 2008, 7(3):236-241.
- [7] Fan C, Chu L, Rawls HR, et al. Development of an antimicrobial resin—A pilot study[J]. Dent Mater, 2011, 27(4):322-328.
- [8] Pan Y, Wang J, Yang Y, et al. Study on Preparation of Antibacterial Dental Resin Materials[J]. J Biomater Tissue Eng, 2018, 8(11):1580-1587.
- [9] 范玥,孟翔峰.原位法合成纳米银对树脂粘剂抗菌改性的应用研究[J]. 口腔医学研究, 2018, 34(2):161-164.
- [10] Ren L, Pan Y, Liang Q, et al. In Situ Synthesis of Dental Resin Matrix Containing Silver Nanoparticles[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2019, 19(9):5774-5782.
- [11] Gou YP, Meghil MM, Pucci CR, et al. Optimizing resin-dentin bond stability using a bioactive adhesive with concomitant antibacterial properties and anti-proteolytic activities[J]. Acta Biomater, 2018, 75:171-182.
- [12] Prema P, Thangapandian S, Immanuel G. CMC stabilized nano silver synthesis, characterization and its antibacterial and synergistic effect with broad spectrum antibiotics[J]. Carbohydr Polym, 2017, 158:141-148.
- [13] Cheng L, Weir MD, Xu HH, et al. Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles[J]. Dent Mater, 2012, 28(5):561-572.
- [14] 魏欣欣,李明春,马守栋.纳米银溶液的稳定性研究[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(16):1355-1358.
- [15] Trumpaite-Vanagiene R, Bukelskiene V, Aleksejuniene J, et al. Cytotoxicity of commonly used luting cements -An in vitro study[J]. Dent Mater J, 2015, 34(3):294-301.
- [16] Miletic V, Santini A, Trkulja I. Quantification of monomer elution and carbon-carbon double bonds in dental adhesive systems using HPLC and micro-Raman spectroscopy[J]. J Dent, 2009, 37(3):177-184.
- [17] Brown JL, Johnston W, Delaney C, et al. Polymicrobial oral biofilm models: simplifying the complex[J]. J Med Microbiol, 2019, 68(11):1573-1584.
- [18] Bowen WH, Burne RA, Wu H, et al. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(3):229-242.

(收稿日期:2020-03-11; 修回日期:2020-04-14)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)