

即配型微酸性电解水对根管中粪肠球菌的抗菌效果

栾梦圆 高秀芝 律娜

安徽医科大学第一附属医院口腔科,合肥 230032

通信作者:律娜,Email:lvna@ahmu.edu.cn

【摘要】 目的 评估即配型微酸性电解水(SAEW)对根管治疗中常见且顽固的病原菌粪肠球菌(*E. faecalis*)的体外抗菌效果,初步探讨其作用机制。**方法** 即配型SAEW经现场电解制备后测定其对浮游菌的最低抑菌浓度(MIC)与最低杀菌浓度(MBC)。建立离体单根管牙感染模型,感染牙采用随机数字表法分为4组,分别使用0.9%氯化钠溶液(A组)、低浓度SAEW(MIC)(B组)、高浓度SAEW(2×MIC)(C组)及5.25%次氯酸钠(NaClO)溶液(D组)进行根管冲洗。通过冲洗前后的细菌取样与菌落计数,评估即刻抗菌效果。使用扫描电镜(SEM)观察处理后的细菌超微结构,利用激光共聚焦显微镜结合SYTO 9/PI荧光染色,定量分析SAEW对细菌细胞膜完整性的影响。通过细胞计数(CCK-8)法检测SAEW在人牙龈成纤维细胞(HGFC)中的毒性。所有数据采用SPSS 26.0软件分析,以双侧 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。**结果** 即配型SAEW对浮游及根管内的*E. faecalis*表现出明确的浓度依赖性抗菌活性,MIC与MBC值分别为6.25和12.50 mg/L。4组根管内*E. faecalis*菌落减少率组间差异具有统计学意义($F=306.46, P<0.001$),A、B、C、D组细菌减少率分别为 $(25.69 \pm 7.41)\%$ 、 $(73.38 \pm 1.69)\%$ 、 $(85.89 \pm 2.09)\%$ 、 $(96.60 \pm 1.33)\%$ 。B、C、D组细菌减少率均显著高于A组,C组高于B组但低于D组(均 $P<0.001$),提示SAEW杀菌效果呈浓度依赖性,其即刻杀菌效力弱于5.25% NaClO溶液。SEM显示各组细菌均出现不同程度结构破坏;激光共聚焦定量结果显示,A、B、C和D组细菌细胞膜损伤率分别为0.84%、74.39%、87.38%和92.62%,差异有统计学意义($F=2\ 056.72, P<0.001$),提示SAEW可通过破坏细菌细胞膜完整性发挥抗菌作用。有效抗菌浓度的SAEW处理后HGFC存活率均高于90%,而NaClO溶液组细胞存活率不足10%。**结论** SAEW可有效抑制杀灭*E. faecalis*,虽体外即时杀菌速率不及高浓度NaClO溶液,但凭借良好抗菌效能与生物相容性,有望作为传统根管冲洗剂的补充或替代方案,后续仍需在复杂生物膜及体内模型中开展进一步验证。

【关键词】 根管感染; 微酸性电解水; 粪肠球菌; 抑菌效果

基金项目:安徽省高校科研项目计划(2024AH04011)

引用著录格式:栾梦圆,高秀芝,律娜. 即配型微酸性电解水对根管中粪肠球菌的抗菌效果[J/OL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2026,20(5):363-371.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2026.05.003

Efficacy of on-site prepared slightly acidic electrolyzed water against *Enterococcus faecalis* root canal infections

Luan Mengyuan, Gao Xiuzhi, Lü Na

Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Corresponding author: Lü Na, Email:lvna@ahmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the in vitro antibacterial effect of freshly-prepared slightly acidic electrolyzed water (SAEW) against *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), a common and persistent pathogen in root-canal therapy, and to preliminarily explore its underlying mechanism. **Methods** Freshly-prepared SAEW was produced by on-site electrolysis. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of SAEW against planktonic *E. faecalis* were determined. An *ex-vivo* infected single-rooted tooth model was established. Infected teeth were assigned into four groups by simple randomization, and root canals were irrigated with 0.9% sodium chloride solution, low-concentration SAEW(MIC), high-concentration SAEW(2×MIC), and 5.25% sodium hypochlorite solution, respectively.

Immediate antibacterial efficacy was assessed by bacterial sampling and colony counting before and after irrigation. Root-canal irrigants were collected. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe bacterial ultrastructural alterations. Confocal laser scanning microscopy combined with SYTO 9/PI fluorescent staining was performed to quantitatively analyze the effect of SAEW on bacterial membrane integrity. The cytotoxicity of SAEW toward human gingival fibroblast cells (HGFCs) was detected using the CCK-8 assay. Statistical analyses were conducted with SPSS 26.0. Normality and homogeneity-of-variance tests were performed for quantitative data. Normally distributed data with homogeneous variances were presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by the least-significant-difference (LSD) post-hoc test was applied for multi-group comparisons. A two-sided $P < 0.05$ was considered statistically significant. **Results** Freshly - prepared SAEW exhibited distinct concentration-dependent antibacterial activity against both planktonic and intracanal *E. faecalis*. The MIC and MBC values of SAEW for planktonic *E. faecalis* were 6.25 and 12.50 mg/L, respectively. The overall difference in the colony reduction rates of *Enterococcus faecalis* among the four groups was statistically significant ($F = 306.46, P < 0.001$). The colony reduction rates of groups A, B, C, and D were $(25.69 \pm 7.41)\%$, $(73.38 \pm 1.69)\%$, $(85.89 \pm 2.09)\%$, and $(96.60 \pm 1.33)\%$, respectively. Compared with group A, groups B, C, and D exhibited significantly higher colony reduction rates. Moreover, group C showed a significantly higher antibacterial effect than group B but a lower bactericidal efficacy than group D (all $P < 0.001$). These results indicated that SAEW exerts a concentration-dependent antibacterial effect, while its immediate bactericidal potency is inferior to 5.25% sodium hypochlorite. Scanning electron microscopy revealed varying degrees of bacterial ultrastructural damage in each group. Quantitative confocal laser scanning microscopy with SYTO 9/PI staining showed bacterial membrane-damage rates of 0.84% for the 0.9% sodium-chloride group, 74.39% for the low-concentration-SAEW group, 87.38% for the high-concentration-SAEW group, and 92.62% for the 5.25% sodium-hypochlorite group, with significant inter-group differences ($F = 2\ 056.72, P < 0.001$). These findings indicated that SAEW exerted antibacterial effects by disrupting bacterial membrane integrity in a concentration-dependent manner. At effective antibacterial concentrations, the viability of HGFCs remained above 90% in SAEW-treated groups, whereas cell viability was below 10% in the sodium-hypochlorite-treated group. **Conclusions** This study demonstrated that SAEW could effectively inhibit and kill *E. faecalis*. Although its immediate *in vitro* bactericidal potency may be lower than that of high-concentration sodium hypochlorite, SAEW showed promising potential as a supplementary or alternative root-canal irrigant owing to its favorable antibacterial performance and biocompatibility. Further validation using complex biofilm and *in vivo* models is required.

【Key words】 Root canal infection; Slightly acidic electrolyzed water; *Enterococcus faecalis*; Antibacterial efficacy

Fund program: Scientific Research Project of Higher Education Institutions in Anhui Province (2024AH04011)

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2026.05.003

根管治疗是控制根管系统感染、促进根尖周组织愈合的有效方法,其核心在于彻底清除根管内的微生物并严密封闭根管系统,以防止再感染^[1]。然而,临床实践表明,单纯的化学机械预备难以完全消除根管内的所有微生物^[2]。这些残留的微生物,尤其是特定病原菌,与术后疼痛及治疗失败后发生的持续性根尖周炎密切相关^[3-4]。其中,粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*)因其强大的组织定植能力和环境适应性,能在根管预备后持续存在于根尖区复杂的解剖环境中,成为根尖周疾病,特别

是难治性病例中的关键致病菌。流行病学研究显示,在持续性根尖周炎的根管中,该菌的检出率可高达99.6%^[5]。治疗后残留的*E. faecalis*可导致根尖周组织处于长期慢性炎症状态,并与临床症状(如疼痛)显著相关^[6-7],这进一步证实了其在根管治疗失败中的关键病原学作用。作为一种革兰阳性兼性厌氧球菌,*E. faecalis*广泛分布于人体多个部位^[8-9]。其在牙本质小管内的独立生存能力、生物膜形成特性及固有的耐药性,是导致传统根管消毒方法效果有限的主要原因^[10]。

理想的根管冲洗剂应兼具强效的抗菌杀菌能力、优异的生物安全性及对宿主组织的低刺激性,以避免在清创过程中损伤根尖周组织^[11-12]。目前,次氯酸钠(NaClO)溶液凭借其广谱的杀菌作用和出色的组织溶解能力,已成为临床应用最广泛的根管冲洗剂^[11,13]。然而,该药剂在临床使用中也存在一定风险。若操作技术不当、根管解剖复杂或药剂浓度控制不佳,可能导致一系列并发症,例如引发化学性根尖周炎、造成牙本质过度脱矿(增加牙体折裂风险),或在未有效隔湿情况下对口腔黏膜造成化学性烧伤,这些都可能损害口腔硬软组织健康^[14-15]。

次氯酸(HClO)是微酸性电解水(slightly acidic electrolyzed water, SAEW)的主要抗菌成分,它不仅是一种高效的体外消毒剂,也是人体先天免疫系统的重要组成部分,由活化的中性粒细胞和巨噬细胞在呼吸爆发过程中产生,用以杀灭入侵的病原体^[16]。其抗菌机制主要依赖于强大的氧化能力,能够非特异性氧化破坏微生物的蛋白质、核酸和膜脂质等关键生物大分子,并干扰能量代谢,从而有效杀灭细菌并瓦解生物膜^[17]。越来越多的研究证据支持其在管理急慢性感染性伤口方面的治疗潜力^[18-19],这为其临床转化应用提供了重要依据。

与NaClO相比,HClO分子本身具有独特的理化优势。HClO相对分子质量小,有利于向牙本质小管和生物膜深层渗透;且其为电中性分子,可避免与带负电荷的细菌细胞表面产生静电排斥,这一特性可能使其对某些病原体的作用更为直接^[20]。这些特性构成了以HClO分子为主要抗菌成分的SAEW作为一种潜在根管冲洗剂的理论基础。基于此,如何将HClO有效地应用于临床成为研究热点。

为应对口腔微生物耐药性挑战,科研人员正探索稳定型HClO溶液作为口腔辅助药物的可能性^[21]。然而,该策略虽通过添加稳定剂延长了保存期限,但仍存在稳定剂引入额外毒性风险、有效氯随时间衰减导致效能不确定,以及成本与工艺复杂等固有缺陷,制约其临床转化。相比之下,即配型SAEW(现场制备、即时使用)从机制上避免了上述问题,展现出更直接的转化潜力。目前关于SAEW在牙髓病治疗领域,特别是针对复杂根管感染中关键病原菌的抗菌效能研究仍存在明显不足,其作为根管冲洗剂的有效性与适用性亟待系统评估。本研究旨在通过体外实验,系统比较即配型SAEW与临床常用浓度NaClO溶液对*E. faecalis*的抗菌效果,以

期为开发更安全、稳定和有效的根管消毒策略提供实验依据。

材料与方法

一、实验仪器

电热恒温培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司);超纯水系统(Labconco,美国);涡旋振荡器(Scientific Industries,美国);高速低温离心机(Eppendorf,德国);生物安全柜(山东新华医疗器械股份有限公司);酶标仪(Tecan,瑞士);光学显微镜(Olympus,日本);激光共聚焦扫描显微镜(Zeiss,德国);扫描电镜(scanning electron microscope, SEM; Hitachi,日本);细胞培养箱(Thermo Fisher,美国);SAEW发生器(合肥巧士健康科技有限责任公司)。

二、试剂

脑心浸出液琼脂与脑心浸液肉汤(brain heart infusion agar/broth, BHI;青岛海博生物技术有限公司);SYTO 9(Invitrogen,美国);碘化丙啶(propidium iodide, PI)、2.5%戊二醛溶液(北京索莱宝科技有限公司);细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8;上海碧云天生物技术股份有限公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM培养基[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司];0.25%胰酶消化液(苏州新赛美生物科技有限公司);无水乙醇(上海国药集团化学试剂有限公司)。

三、细菌的培养及菌液制备

本研究采用*E. faecalis*标准质控菌株ATCC 29212(安徽医科大学第一附属医院传染病实验室保存)进行实验。其复苏、培养及菌悬液流程均遵循严格的无菌操作与标准化原则。复苏后的细菌接种于脑心浸出液(brain heart infusion, BHI)平板,经鉴定后选取状态良好的菌落转移至BHI液体培养基,并置于5% CO₂、37℃条件下培养孵育24 h,经离心收集后以无菌1×磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)调整菌液浓度至1×10⁷ CFU/mL供后续实验。

四、即配型微酸性电解水的制备

本研究使用即配型SAEW,其通过电解氯化盐溶液现场制备。具体方法为精确称取0.1 g电解质,溶于300 mL超纯水中,经磁力搅拌至完全溶解后将配制好的溶液移至SAEW发生装置的反应槽内,在(25±1)℃、相对湿度45%~65%的环境中,避光电解60 s。反应结束后,即获得澄清透明、有效氯

浓度(available chlorine concentration, ACC)为(25 ± 0.4) mg/L, pH值为 6.5 ± 0.1 的SAEW原液。所有实验用SAEW溶液均为每次实验前新鲜配制,整个制备过程独立重复3次,以确保一致性。

五、即配型微酸性电解水对浮游态粪肠球菌活性的影响

本实验采用96孔板微量稀释法测定即配型SAEW对*E. faecalis*的抗菌活性,并以5.25% NaClO溶液作为阳性对照,所有药物浓度均以ACC表示。分别将SAEW原液[ACC=(25 ± 0.4) mg/L]及NaClO原液(ACC=50 100 mg/L,由5.25%的NaClO溶液换算得出)用无菌PBS进行2倍梯度稀释,共制备8个浓度梯度。SAEW的测试浓度梯度为25.00 mg/L至0.76 mg/L ACC;NaClO的测试浓度梯度为12 525.00 mg/L至约391.41 mg/L ACC(即原液依次稀释4、8、16、32、64和128倍)。每孔加入50 μ L稀释液后,加入50 μ L *E. faecalis*菌悬液(最终浓度约 5×10^5 CFU/mL),混匀后避光静置5 min,继而每孔补加100 μ L BHI液体培养基。实验同时设立阴性对照[0.9%无菌氯化钠(NaCl)溶液]组及空白对照组,每孔终体积为200 μ L,每组设5个重复孔。将96孔板置于5% CO₂、37 °C条件下培养24 h,以肉眼观察培养基澄清与否判断细菌生长情况,以完全抑制细菌生长的最低药物ACC,确定为最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。为测定最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC),将上述培养后的96孔板中各孔液体混匀,分别吸取5 μ L均匀涂布于BHI琼脂平板表面,再次于相同条件下培养24 h。以平板上无菌落生长的最低药物有效氯浓度,判定为MBC。所有MIC与MBC测定实验均独立重复3次。

六、离体牙预备

本研究选取安徽医科大学第一附属医院口腔科门诊于2024年1—12月期间因治疗需要拔除的单根管恒牙20颗作为实验样本。样本的排除标准包括存在根管弯曲、严重钙化或已发生内/外吸收的牙齿。在感染根管模型的建立后对20颗符合纳入标准的单根管离体恒牙采用随机数字表法生成随机分配序列,依据序列将样本随机分为4组,每组5颗。所有样本均顺利完成全部实验流程,无中途剔除,20颗牙齿的数据全部纳入最终统计分析。

所有入选牙体样本均经过标准化预处理。首先去除部分冠方牙体组织,统一将牙根工作长度制

备为15 mm。根管预备采用机械化学方法:先使用ProTaper手用镍钛锉进行初步成形,随后采用ProTaper机用镍钛锉系统按标准流程最终预备25#, 06锥度。在预备过程中及完成后,依次使用5.25% NaClO溶液、17% 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)溶液与0.9% 无菌NaCl溶液交替冲洗根管各1 min,以清除玷污层及预备残屑。

为隔绝实验过程中外源性微生物的污染,在根管口以下的牙体样本外表面均匀涂布2层指甲油进行密封。最后,将所有样本置于高压蒸汽灭菌器内,在121 °C、0.1 MPa条件下灭菌15 min,以备后续实验使用。

七、感染根管模型的建立

使用BHI液体培养基调整菌液至 1×10^8 CFU/mL,将预备好的离体牙样本完全浸没于3 mL菌悬液中,置于37 °C恒温摇床内持续孵育14 d。为维持细菌代谢活性及稳定感染状态,每48 h在无菌条件下更换1次菌悬液。培养期间,每周随机抽取样本进行涂板培养,以监测并确保体系中无杂菌污染。

八、微生物取样

培养结束后,采用完全随机分组法,将20颗牙齿采用随机数字表法随机分为4组,每组5颗进行第1次根管内微生物取样,具体操作为使用无菌1×PBS溶液浸没根管,然后使用2502型号的H锉插入根管14 mm,在根管内沿管壁切削15 s,使用消毒后的纸尖在根管内浸泡60 s,将纸尖转移到含有1.0 mL PBS的试管中。

第1次取样后,分别使用4种不同冲洗液对根管进行60 s的化学冲洗,冲洗液的浓度设定基于前述MIC/MBC测定结果:A组使用0.9% 无菌NaCl溶液;B组使用低浓度SAEW溶液(MIC),此浓度为体外测定中完全抑制浮游*E. faecalis*生长的最低浓度,用于评估其抑菌效应阈值在复杂根管环境中的有效性;C组使用高浓度SAEW溶液(2×MIC),浓度即为体外测定中对浮游*E. faecalis*的最低杀菌浓度,用于评估其完全杀菌效力在根管内的实现情况;D组,使用5.25% NaClO溶液。

为模拟临床实际并控制变量,所有冲洗操作均在无菌条件下完成,采用5 mL注射器配合侧方开口冲洗针头,以约10 mL/min的恒定流速进行。冲洗结束后,按照与第1次取样完全相同的方法,再次采集根管内微生物样本。样本经系列稀释后接种于BHI琼脂平板。将冲洗前、后的平板置于37 °C恒温

培养箱中孵育 24 h,通过菌落计数分别计算两次样品的菌落浓度(CFU/mL),并以两者的差值评估各冲洗液的即刻抗菌效果。

九、细菌形态学观察

为评估即配型 SAEW 对根管内 *E. faecalis* 表面结构的影响,本研究使用 SEM 对根管冲洗液中的细菌进行形态学观察。具体操作如下:收集各组根管冲洗后各组冲洗液,离心收集细菌沉淀。菌体沉淀经电镜固定液固定、锇酸后固定,并经乙醇梯度脱水后,采用临界点干燥仪进行干燥。样品经离子溅射仪喷金处理后,于 SEM 下观察细菌形态结构。

十、激光共聚焦显微镜分析

为评估即配型 SAEW 的杀菌效果,本研究采用基于细胞膜完整性的 SYTO 9/PI 荧光染色,并结合激光共聚焦显微镜进行观测。具体操作为收集经 SAEW 及对照处理后的菌液,离心获得细菌沉淀。用 PBS 轻柔清洗菌体 2 次,以彻底去除残留处理液;随后,将细菌沉淀与 SYTO 9/PI 荧光染色工作液按比例混合,室温避光孵育 15 min。染色完成后,取 10 μ L 菌液制片,立即在激光共聚焦显微镜下观察;通过绿色荧光与红色荧光的分布与强度,区分膜完整的活菌与膜受损的细菌,从而评估不同处理组的抗菌效果。活/死染色样品的激光共聚焦图像使用 Zeiss LSM 900 采集。每组样品采用系统随机抽样法选取 5 个非重叠视野(200 $\times$)进行拍摄,并保持所有图像采集参数相同,以确保数据可比性。荧光信号的量化分析采用 ImageJ 软件进行,对每个视野,按以下公式计算膜受损细菌比例

$$\text{膜受损细菌比例}(\%) = \frac{\text{膜受损细菌数}}{\text{总细菌数}} \times 100\%。$$

所有定量数据均基于每组 5 个视野($n=5$)的测量值进行计算,最终结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

十一、即配型微酸性电解水对人牙龈成纤维细胞毒性的影响

本实验室从新鲜组织中提取人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblast cell, HGFC)并传代培养。取处于对数生长期、状态良好的 HGFC,经 0.25% 胰蛋白酶消化后,用含血清的完全培养基终止消化,离心收集细胞。用完全培养基重悬并计数,将细胞密度调整至 5×10^4 /mL,以每孔 100 μ L 的体积(约 5×10^3 /孔)接种至 96 孔板的内圈 60 个孔中,外围一圈孔加入 100 μ L PBS 以减少边缘蒸发效应。将

培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养 24 h,使细胞充分贴壁。待细胞贴壁后,吸弃培养基,用 PBS 轻柔清洗细胞 2 次。随后,更换为 100 μ L 不含血清的基础培养基,预孵育 1 h。

为系统评估即配型 SAEW 在其有效抗菌浓度范围内的生物安全性,本实验依据其体外抗菌活性(MIC 与 MBC)设定关键测试浓度。具体而言,选择 MIC 用于评价其在抗菌作用起点的细胞相容性;选择已达到最低杀菌浓度的 $2 \times \text{MIC}$ 用于评估实现完全杀菌效应时的细胞毒性,此为临床应用的关键安全性参考点;选择 $4 \times \text{MIC}$ 用于考察其毒性的浓度依赖性并探索其安全窗口。

吸弃原有培养基,分别向各孔加入 100 μ L 对应处理液,分为 A、B、C、D、E 共 5 组。其中,A 组加入 0.9% 无菌 NaCl 溶液;B 组加入低浓度 SAEW 溶液(MIC),该浓度为体外可完全抑制浮游粪肠球菌生长的最低浓度,用于探究 SAEW 最低抑菌阈值在实验环境下的作用效果;C 组加入高浓度 SAEW 溶液($2 \times \text{MIC}$),对应体外杀灭浮游粪肠球菌的最低杀菌浓度,用于评估 SAEW 的有效杀菌效能;D 组加入 $4 \times \text{MIC}$ 浓度的 SAEW 溶液,用于观察高剂量 SAEW 的细胞作用特征;E 组加入 5.25% NaClO 溶液。避光处理 5 min 后,吸弃处理液。立即向每孔加入 110 μ L 预先按体积比 10:1 混合的完全培养基与 CCK-8 试剂混合液。同时设置 3 个仅含 110 μ L 该混合液但不接种细胞的孔作为空白对照。将 96 孔板放回培养箱,避光继续培养 2 h。培养结束后,用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的吸光度(A)值。细胞相对存活率按以下公式计算

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{实验组 } A_{450} - \text{空白组 } A_{450}}{\text{阴性对照组 } A_{450} - \text{空白组 } A_{450}} \times 100\%。$$

各实验均独立重复 3 次,每次实验各处理组设 5 个平行孔。

十二、统计学处理方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。本研究所有实验均独立重复 3 次($n=3$),每次实验中的每个处理组均设 3 个平行组。计量资料经 Shapiro Wilk 检验验证数据的正态性,经 Levene 检验验证方差齐性。符合正态分布且方差齐的资料以 $\bar{x} \pm s$ (SD)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较选用 LSD 检验,以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

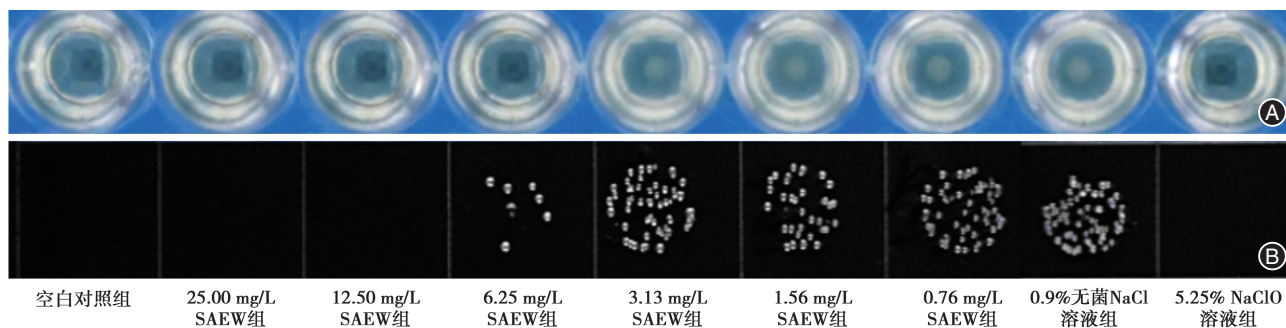


图1 即配型微酸性电解水(SAEW)对粪肠球菌(*E. faecalis*)的抗菌活性 A:最小抑菌浓度(MIC)检测;B:最小杀菌浓度(MBC)检测;MIC与MBC分别为6.25与12.50 mg/L。

结 果

一、即配型微酸性电解水对浮游态粪肠球菌活性具有抑制作用

SAEW及5.25% NaClO溶液对*E. faecalis*的抗菌活性通过MIC与MBC值进行评估,SAEW对*E. faecalis*表现出有效的抑制作用。微量稀释法结果显示,当SAEW浓度达到6.25 mg/L时,所有重复孔的BHI培养基在24 h培养后均保持澄清,而低于此浓度的孔则出现明显浑浊(图1A)。在相同实验条件下,5.25% NaClO溶液的MIC为782.81 mg/L(有效氯浓度)。0.9% 无菌NaCl溶液组显示正常细菌生长,空白对照组无污染,证实实验系统可靠。据此确定SAEW与NaClO对浮游态*E. faecalis*的MIC分别为6.25与782.81 mg/L。

为测定MBC,将上述培养后无菌生长的孔内液体涂布于BHI琼脂平板。结果显示,SAEW浓度为12.50 mg/L时平板上无菌落形成(图1B),而NaClO溶液在浓度为3 131.25 mg/L(有效氯浓度)时达到完全杀菌效果。因此,SAEW与NaClO溶液对浮游态*E. faecalis*的MBC分别确定为12.50与3 131.25 mg/L。

二、不同冲洗剂对根管内粪肠球菌的抗菌效果比较

在相同的冲洗时间内,4组根管内粪肠球菌菌落减少率总体比较差异具有统计学意义($F=306.46$, $P<0.001$)。A组(0.9% 无菌NaCl溶液)菌落减少率为 $(25.69 \pm 7.41)\%$;与A组相比,B组(低浓度SAEW)、C组(高浓度SAEW)、D组(5.25% NaClO溶液)细菌减少率分别为 $(73.38 \pm 1.69)\%$ 、 $(85.89 \pm 2.09)\%$ 、 $(96.60 \pm 1.33)\%$,均显著升高($t_{B组}=18.875$, $P_{B组}<0.001$; $t_{C组}=23.827$, $P_{C组}<0.001$; $t_{D组}=28.063$, $P_{D组}<0.001$)。C组菌落减少率显著高于B组($t=4.951$, $P<0.001$),但显著低于D组($t=4.237$, $P<0.001$),提示SAEW的抑

菌效果呈浓度依赖性,且即刻杀菌效力弱于5.25% NaClO溶液(图2)。

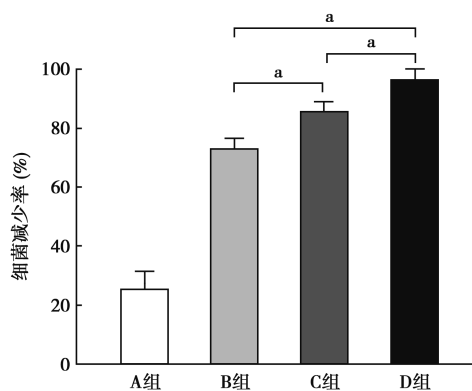


图2 不同冲洗剂处理后的根管内粪肠球菌(*E. faecalis*)的抑菌率的统计柱图 A组使用0.9% 无菌NaCl溶液;B组使用低浓度的SAEW溶液(MIC);C组使用高浓度SAEW溶液($2 \times \text{MIC}$);D组使用5.25% NaClO溶液;组间比较差异有统计学意义, $^aP<0.001$ 。

三、微酸性电解水对粪肠球菌表面的损伤效果

SEM观察结果显示,不同冲洗剂处理对根管内*E. faecalis*的表面结构产生了显著差异(图3)。0.9% 无菌NaCl溶液组的细菌形态完整,表面光滑,细胞饱满,未见明显损伤。经即配型SAEW处理的细菌则呈现出明确的形态学改变:细胞壁出现皱缩、塌陷,部分细菌表面可见不规则凹陷及内容物渗漏。相比之下,5.25% NaClO溶液组细菌的损伤最为严重和彻底,细胞壁皱缩极为明显。这些形态学证据直观地证实,SAEW能有效破坏*E. faecalis*的细胞结构完整性,其作用机制与细胞膜损伤密切相关,但作用强度弱于传统的NaClO冲洗剂。

四、微酸性电解水对粪肠球菌细胞膜完整性的破坏作用

激光共聚焦显微镜结合SYTO 9/PI荧光染色的定量分析表明,SAEW处理可显著增加*E. faecalis*中膜受损的细菌数量。

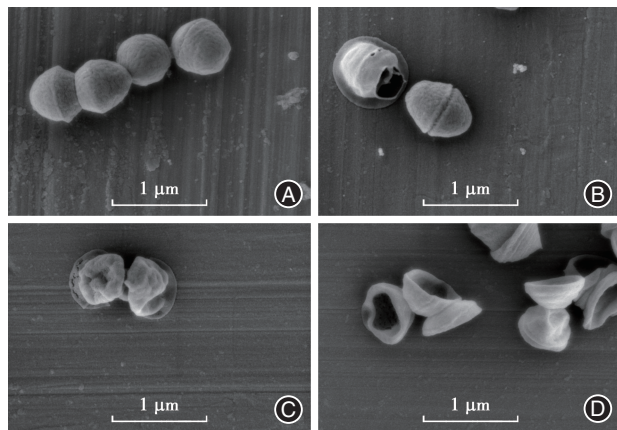


图3 扫描电镜(SEM)下观察不同冲洗剂处理后粪肠球菌(*E. faecalis*)的形态学变化 A:A组使用0.9% 无菌NaCl溶液,细菌形态完整,表面光滑,结构正常;B:B组使用低浓度的SAEW溶液(MIC),细菌细胞壁出现破损、内容物泄漏;C:C组使用高浓度SAEW溶液($2\times$ MIC),细胞壁皱缩、不规则凹陷及内容物渗漏;D:D组使用5.25% NaClO溶液,细菌结构皱缩崩解。

通过ImageJ软件对SYTO 9/PI荧光信号进行定量分析(图4~5),结果显示4组*E. faecalis*活细菌占比总体比较差异具有统计学意义($F=2\ 056.8, P<0.001$)。A组完整活细菌占比为(99.16 ± 0.33)%,细胞膜受损细菌占比仅为(0.80 ± 0.30)%。与A组相比,B组完整活细菌占比显著下降至(25.61 ± 3.79)% ($t=86.39, P<0.001$)。升高SAEW浓度后(C组),完整活细菌占比进一步降至(12.62 ± 1.08)% ($t=101.65, P<0.001$),提示SAEW破坏细菌细胞膜的效应呈浓度依赖性。D组完整活细菌占比最低,为(7.38 ± 1.44)%,与B相比活细菌占比显著降低($t=21.42, P<0.001$),与C组相比差异同样具有统计学意义($t=6.16, P<0.001$)。该结果从细胞膜完整性角度,为SAEW的抗菌作用提供直接定量证据。

五、即配型微酸性电解水对人牙龈成纤维细胞的毒性作用

为评估即配型SAEW在有效抗菌浓度下的生物安全性,采用CCK-8法检测了SAEW对HGFC的细胞毒性。结果显示,在模拟临床抗菌作用时间(5 min)内,SAEW表现出浓度依赖性的细胞毒性。

HGFC相对存活率5组总体比较差异具有统计学意义($F=578.84, P<0.001$)。B组(MIC-SAEW)、C组($2\times$ MIC-SAEW)HGFC相对存活率分别为(93.91 ± 2.96)%和(91.41 ± 2.18)%;与A组(0.9% 无菌NaCl溶液组)(100.00 ± 1.25)%相比,B组细胞存活率下降,差异具有统计学意义($t=2.763, P=0.02$),但生物学差异较小,细胞活性维持在90%以上;B组与C组

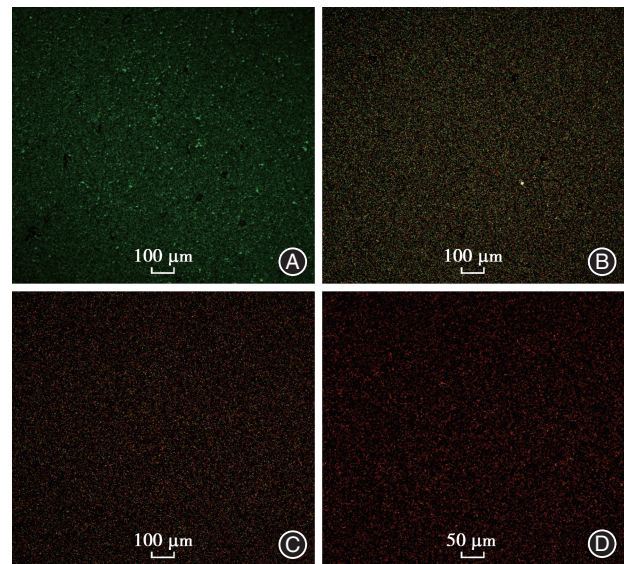


图4 激光共聚焦显微镜观察不同冲洗剂处理后的粪肠球菌(*E. faecalis*)经SYTO 9/PI染色结果 A:0.9% 无菌NaCl溶液对照组,细菌呈现强烈的绿色荧光,表明细胞膜完整;B:低浓度微酸性电解水(SAEW)处理组,视野中同时出现大量红色荧光与绿色荧光,表明细胞膜损伤细菌比例显著增加;C:高浓度SAEW处理组,膜受损细菌进一步增加;D:5.25% NaClO溶液组,细菌呈现强烈的红色荧光,膜受损细菌比例显著高于各SAEW组。

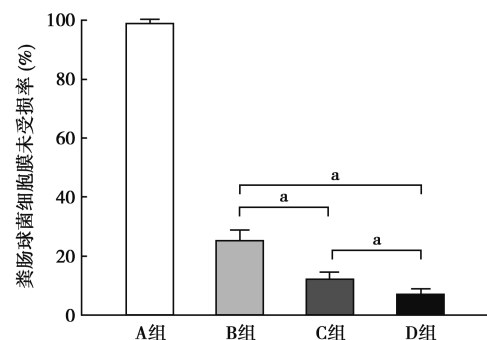


图5 经不同冲洗剂处理后的粪肠球菌(*E. faecalis*)细胞膜未受损率 A组使用0.9% 无菌NaCl溶液;B组使用低浓度的SAEW溶液(MIC);C组使用高浓度SAEW溶液($2\times$ MIC);D组使用5.25% NaClO溶液。组间比较差异有统计学意义,* $P<0.001$ 。

细胞存活率差异无统计学意义($t=1.134, P=0.283$)。D组($4\times$ MIC-SAEW)细胞相对存活率显著下降至(81.50 ± 4.61)%,差异有统计学意义($t=8.394, P<0.001$);D组存活率显著高于E组(5.25% NaClO溶液组)(6.73 ± 1.50)%,差异也有统计学意义($t=33.92, P<0.001$),提示SAEW相比传统NaClO具备更优的细胞生物相容性(图6)。

讨论

*E. faecalis*是根管治疗失败后再感染病例中检出率最高的致病菌之一,尤其在慢性顽固性根尖周

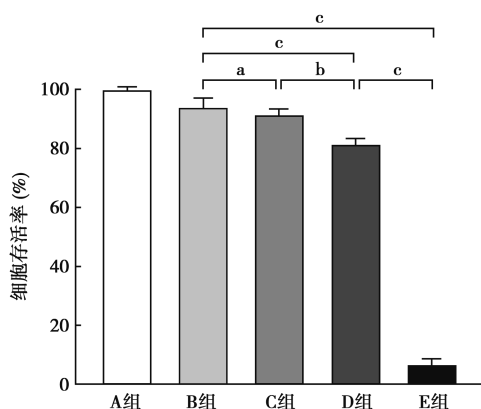


图6 微酸性电解水(SAEW)与次氯酸钠(NaClO)对人牙龈成纤维细胞(HGFC)的体外毒性比较 采用细胞计数(CCK-8)法检测各组HGFC经不同试剂处理5 min后的细胞相对存活率。A组:0.9%无菌NaCl溶液组;B组:低浓度SAEW组(MIC,最低抑菌浓度);C组:中高浓度SAEW组(2×MIC,最低杀菌浓度);D组:超高浓度SAEW组(4×MIC);E组:5.25% NaClO溶液组。图中数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示($n=3$); $^a P>0.05$, $^b P<0.05$, $^c P<0.001$ 。

炎中占据主导地位^[22]。该菌株具备天然耐药性、卓越的生物膜形成能力以及对营养匮乏、高碱等极端根管微环境的强适应性,恰好对应了根管清创中药物失效、生物膜难除和隐匿菌残留三大核心临床难题^[23-25]。因此,以其作为实验对象,能有效评估新型冲洗剂与消毒剂的真实突破能力。

SAEW自20世纪90年代由日本研制以来,其主要活性成分HClO已被证实对细菌、病毒、真菌及芽孢均有明确消杀作用,且其分解产物相对安全,对环境与组织更友好^[26]。当前,以NaClO为代表的传统冲洗剂虽凭借其广谱抗菌与组织溶解能力被广泛应用,但其对根尖周组织的潜在毒性及临床意外风险不容忽视^[27]。而其他常用试剂如EDTA,虽能有效去除玷污层,但缺乏可靠的抗菌活性。因此,探索兼具高效抗菌与良好生物相容性的新型冲洗剂,是根管治疗学持续发展的需求之一。

本研究结果表明,5.25% NaClO溶液对*E. faecalis*的即刻抗菌效能最为显著,而即配型SAEW同样对*E. faecalis*表现出优异的抗菌活性,其MBC值显著低于NaClO。值得注意的是,SAEW极低的MBC值(12.50 mg/L ACC)及其与MIC接近,结合其主要活性成分HClO所具备的高膜渗透性与快速氧化特性^[28],提示SAEW可能具备快速杀菌的动力学特征。若此特性在后续的杀菌动力学研究中得到证实,将意味着SAEW在达到有效浓度后,可在极短接触时间内实现完全杀灭。这为其在口腔冲洗、创面清创

等要求快速起效的临床场景中的应用提供了令人期待的前景。

此外,尽管在体外直接抗菌效力上SAEW略逊于高浓度NaClO溶液,但本研究中观察到的SAEW低细胞毒性,与近年多项研究报道的、其细胞相容性显著优于传统冲洗剂的结论相互印证^[29-30]。这表明SAEW在有效抗菌与组织安全之间可能提供了一个更优的平衡点。但本研究为一项体外初步探索,样本量较小,虽然结果显示了明确的趋势和统计学差异,但未来确证性研究需在实验前基于本研究的效应量进行正式的样本量估算,并纳入更多的生物样本,以提高结论的统计效力和外推性。

综上所述,SAEW对*E. faecalis*展现出了可靠的抗菌活性。虽然其在杀菌强度上未超越高浓度NaClO溶液,但其优异的生物安全性特征使其具备了成为传统冲洗剂补充或替代方案的潜力,尤其适用于对安全性要求更高的临床场景。本研究结果为其进一步应用提供了体外实验依据。未来研究应深入探讨SAEW在复杂生物膜模型中的渗透与清除能力、与其他制剂(如EDTA)的协同作用,探究SAEW破坏细菌细胞膜完整性的具体分子机制并通过动物实验验证其在体内复杂环境下的真实疗效与安全性,以推动其向临床实践转化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 栾梦圆:实验设计、文章撰写、数据统计分析、作图;高秀芝:资料整理;律娜:研究指导、论文审阅、经费支持

参 考 文 献

- [1] Mominkhan D, Brito L C N, Yakubu A R, et al. Exploring relationships within the microbiome of root canal infections and the influence of associated clinical parameters [J]. Int Endod J, 2025, 58(11):1751-1763. DOI:10.1111/iej.70011.
- [2] Wu S, Liu Y, Zhang H, et al. Nano-graphene oxide with antisense walR RNA inhibits the pathogenicity of *Enterococcus faecalis* in periapical periodontitis [J]. J Dent Sci, 2020, 15(1):65-74. DOI: 10.1016/j.jds.2019.09.006.
- [3] Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada L M, et al. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment [J]. Clin Oral Investig, 2021, 25(4):2017-2027. DOI: 10.1007/s00784-020-03510-2.
- [4] Azad A, Rostamifar S, Modaresi F, et al. Assessment of the antibacterial effects of bismuth nanoparticles against *Enterococcus faecalis* [J]. Biomed Res Int, 2020(2020):5465439. DOI: 10.1155/2020/5465439.
- [5] Siqueira J F, Antunes H S, Pérez A R, et al. The apical root canal

- system of teeth with posttreatment apical periodontitis: Correlating microbiologic, tomographic, and histopathologic findings [J]. J Endod, 2020, 46 (9) : 1195 - 1203. DOI: 10.1016/j.joen.2020.05.020.
- [6] Polak D, Yaya A, Levy D H, et al. *Enterococcus faecalis* sustained infection induces macrophage pro-resolution polarization [J]. Int Endod J, 2021, 54(10): 1840-1849. DOI: 10.1111/iej.13574.
- [7] Siqueira J F, Antunes H S, Rôças I N, et al. Microbiome in the apical root canal system of teeth with post - treatment apical periodontitis [J]. PLoS One, 2016, 11 (9) : e0162887. DOI: 10.1371/journal.pone.0162887.
- [8] Ding L, Yang Y, Zheng C, et al. Activities of eravacycline, tedizolid, norvancomycin, nemonoxacin, ceftaroline, and comparators against 1, 871 staphylococcus and 1, 068 enterococcus species isolates from China: Updated report of the CHINET study 2019 [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10 (6) : e0171522. DOI: 10.1128/spectrum.01715-22.
- [9] 余擎, 相豆豆, 程小刚, 等. 根管再次感染中粪肠球菌作用的再认识 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2024, 29(1): 4-11. DOI: 10.15956/j.cnki.chin.j.conserv.dent.2024.01.002.
- [10] 谢媛, 程兴群, 李雨庆, 等. 粪肠球菌牙本质黏附及其影响因素的研究进展 [J]. 口腔疾病防治, 2024, 32(8): 632-639. DOI: 10.12016/j.issn.2096-1456.2024.08.009.
- [11] Boutsioukis C, Arias - Moliz M T. Present status and future directions - irrigants and irrigation methods [J]. Int Endod J, 2022, 55(Suppl 3): 588-612. DOI: 10.1111/iej.13739.
- [12] Gomes B P F A, Aveiro E, Kishen A. Irrigants and irrigation activation systems in Endodontics [J]. Braz Dent J, 2023, 34(4): 1-33. DOI: 10.1590/0103-6440202305577.
- [13] Ghazizadeh M, Davoodabadi A, Kazemi S, et al. Evaluation of the antibacterial activity of mentha longifolia essential oil against *Enterococcus faecalis* and its chemical composition [J]. J Dent (Shiraz), 2025, 26(3): 266-273. DOI: 10.30476/dentjods. 2025. 101488.2304.
- [14] Şenel K, Uzun I, Alqawasmi R. An *in vitro* evaluation of biofilm removal from simulated root canals using sodium hypochlorite irrigation solution at various temperature settings [J]. PLoS One, 2025, 20(6): e0325431. DOI: 10.1371/journal.pone.0325431.
- [15] Cai C, Chen X, Li Y, Jiang Q. Advances in the role of sodium hypochlorite irrigant in chemical preparation of root canal treatment [J]. Biomed Res Int, 2023 (2023) : 8858283. DOI: 10.1155/2023/8858283.
- [16] Hampton M B, Dickerhof N. Inside the phagosome: A bacterial perspective [J]. Immunol Rev, 2023, 314(1): 197-209. DOI: 10.1111/imr.13182.
- [17] da Cruz Nizer W S, Inkovskiy V, Overhage J. Surviving reactive chlorine stress: Responses of gram-negative bacteria to hypochlorous acid [J]. Microorganisms, 2020, 8(8): 1220. DOI: 10.3390/microorganisms8081220.
- [18] Herruzo R, Herruzo I. Antimicrobial efficacy of a very stable hyperchlorous acid formula compared with other antiseptics used in treating wounds: *In vitro* study on micro - organisms with or without biofilm [J]. J Hosp Infect, 2020, 105(2): 289-294. DOI: 10.1016/j.jhin.2020.01.013.
- [19] Burian E A, Sabah L, Kirketerp-Møller K, et al. The safety and antimicrobial properties of stabilized hypochlorous acid in acetic acid buffer for the treatment of acute wounds: A human pilot study and *in vitro* data [J]. Int J Low Extrem Wounds, 2023, 22 (2): 369-377. DOI: 10.1177/15347346211015656.
- [20] Lafaurie G I, Zaror C, Diaz - Báez D, et al. Evaluation of substantivity of hypochlorous acid as an antiplaque agent: A randomized controlled trial [J]. Int J Dent Hygiene, 2018, 16(4): 527-534. DOI: 10.1111/idh.12342.
- [21] Castillo D M, Castillo Y, Delgadillo N A, et al. Viability and effects on bacterial proteins by oral rinses with hypochlorous acid as active ingredient [J]. Braz Dent J, 2015, 26 (5) : 519 - 524. DOI: 10.1590/0103-6440201300388.
- [22] Lv S, Fan W, Fan B. Enhanced *in vitro* antibacterial effect against *Enterococcus faecalis* by using both low - dose cetylpyridinium chloride and silver ions [J]. BMC Oral Health, 2023, 23(1): 299. DOI: 10.1186/s12903-023-02972-6.
- [23] Basak Erol H, Kaskatepe B, Gocmen D, et al. The treatment of *Enterococcus faecalis* related root canal biofilms with phage therapy [J]. Microb Pathog, 2024(197): 107081. DOI: 10.1016/j.micpath.2024.107081.
- [24] Wu B, Zhou Z, Hong X, et al. Novel approaches on root canal disinfection methods against *E. faecalis* [J]. J Oral Microbiol, 2025, 17(1): 2475947. DOI: 10.1080/20002297.2025.2475947.
- [25] Nasiri K, Wrbas K T, Doychinova M. Eradicating *Enterococcus faecalis* in root canal system: An update [J]. J Dent Sci, 2024, 19 (4): 2433-2434. DOI: 10.1016/j.jds.2024.07.020.
- [26] 段弘扬, 王佳奇, 沈瑾, 等. 微酸性电解水实验室微生物杀灭效果研究 [J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(3): 261-264. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20215724.
- [27] 蒋迁, 孙宇, 霍丽珺, 等. 微酸性电解水对根管内粪肠球菌生物膜抗菌作用的体外研究 [J]. 昆明医科大学学报, 2021, 42(3): 5-9. DOI: 10.12259/j.issn.2095-610X.S20210303.
- [28] Li J, Wang Y, Zheng W, et al. Comprehensive evaluation of treating drinking water for laying hens using slightly acidic electrolyzed water [J]. Poult Sci, 2024, 103(1): 103176. DOI: 10.1016/j.psj.2023.103176.
- [29] Kazuhiro G, Tomohiko M, Shinichi S, et al. Microbicidal and cytotoxic effects of functional water *in vitro* [J]. Quintessence Int, 2010, 41(9): e166-e172.
- [30] Goda B, Ruta Z, Saulius D, et al. Cytotoxicity and efficacy in debris and smear layer removal of hocl-based irrigating solution: An *in vitro* study [J]. J Funct Biomater, 2022, 13(3): 95. DOI: 10.3390/jfb13030095.

(收稿日期: 2026-03-01)

(本文编辑: 王嫚)