

锌和氮改性二氧化钛纳米粒子/介孔三氧化二铝复合树脂的制备及其性能评价

韩蓉^{1,2}, 张志民¹, 赵远航^{1,2}, 王佳一^{1,2}, 汤文君^{1,2}, 张红¹

(1. 吉林大学口腔医院牙体牙髓病科, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学口腔医院 吉林省口腔生物医学国际联合研究中心, 吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:** 以锌(Zn)和氮(N)改性的二氧化钛(TiO_2)纳米粒子(NPs)及介孔三氧化二铝(Al_2O_3)(γ 相, 20 nm)作为增强填料, 制备新型牙科复合树脂, 系统评价其抗菌活性、机械强度、基础性能和生物安全性, 获得兼具优异抗菌活性与良好机械强度的牙科复合树脂。**方法:** 将Zn-N- TiO_2 NPs和介孔 Al_2O_3 NPs按不同质量比添加至树脂基质中, 制备出5种复合树脂, 分别为对照组(无增强填料)、0组(Zn-N- TiO_2 : Al_2O_3 为1:0)、1组(Zn-N- TiO_2 : Al_2O_3 为1:1)、2组(Zn-N- TiO_2 : Al_2O_3 为1:2)和3组(Zn-N- TiO_2 : Al_2O_3 为1:3)。采用平板菌落计数法检测各组复合树脂表面黏附菌的数量并计算抗菌率, 扫描电子显微镜(SEM)观察各组复合树脂表面黏附菌形态表现, 万能试验机测量各组复合树脂的挠曲强度(FS)和弹性模量(EM), SEM观察各组复合树脂断裂面形态表现, 显微硬度仪测定各组复合树脂维氏显微硬度, 检测傅里叶红外吸收光谱并计算光固化20 s的双键转化率(DC)及各组复合树脂的固化深度, 水滴角测量仪测定水接触角(WCA), 测量各组复合树脂的吸水值(WSP)和溶解值(WSL), 细胞计数试剂盒8(CCK-8)法评估各组复合树脂浸提液培养小鼠成纤维L-929细胞第1、3和5天时的相对增殖率(RGR)并确定其体外细胞毒性等级。**结果:** 平板菌落计数法, 与对照组比较, 其他组琼脂板上的菌落数量明显减少, 其中1组菌落数最少。SEM图像, 对照组中可见密集且形态良好的变异链球菌; 0组和3组的细菌呈小面积聚集, 细胞膜表面出现凹陷; 1组和2组的细菌分布稀疏, 细胞膜出现明显皱缩, 伴随细胞内容物泄漏。1组与2组的菌落计数比较差异无统计学意义($P>0.05$), 但均低于其他组($P<0.05$)。所有实验组复合树脂的抗菌率均超过85%, 其中1组和2组复合树脂的抗菌率达到99%以上, 表现出优异的抗菌活性。0组FS最低。随着介孔 Al_2O_3 的加入, 1组和2组复合树脂FS升高, 其中2组的FS最高, 高于对照组和0组($P<0.05$)。3组复合树脂FS较2组降低, 但仍高于其余组别($P<0.05$)。SEM图像, 对照组中二氧化硅(SiO_2)颗粒表面光滑, 与树脂基质间的断裂界面清晰, 常见多于1/2球体颗粒裸露的现象; 0组与对照组相似, 且可以观察到较大的Zn-N- TiO_2 NP团块断面, 纳米粒子与树脂基质间的结合较为紧密, 未发生断裂; 1、2和3组中, 树脂基质不同程度地黏附于 SiO_2 颗粒表面, 多于1/2球体颗粒裸露的现象较少, 树脂断裂面凹凸不平; 2组可以观察到断裂的 SiO_2 球体; 1和2组填料分布较为均匀, 3组中偶见纳米粒子团聚现象。对照组复合树脂EM最低。随着增强填料的加入, 各组复合树脂的EM升高, 3组最高, 2组次之。0组复合树脂维氏显微硬度最低, 与其他组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。随着介孔 Al_2O_3 含量增加, 复合树脂维氏显微硬度逐渐增加, 2组和3组复合树脂维氏显微硬度均超过45 HV, 分别较对照组复合树脂提高了29.73%和33.82%, 较0组复合树脂提高了51.34%和56.28%。各组复合树脂的DC比较差异无统计学意义($P>0.05$)。各组复合树脂固化深度 >4 mm, 组间比较差异无统计

[收稿日期] 2024-12-24 [录用日期] 2025-02-17

[基金项目] 吉林省科技厅自然科学基金项目(YDZJ202201ZYTS124); 吉林省财政厅科技项目(JCSZ2021893-10)

[作者简介] 韩蓉(1995—), 女, 山西省大同市人, 在读硕士研究生, 主要从事口腔抗菌材料方面的研究。

[通信作者] 张红, 副教授(E-mail: zhanghong1983@jlu.edu.cn)

学意义 ($P>0.05$)。0组复合树脂 WCA 最小, 随着介孔 Al_2O_3 含量增加, 复合树脂的疏水性提高, 但 WCA 值均保持在 80° 以下。3组复合树脂 WCA 最大, 但与 2组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。增强填料的加入降低了复合树脂的吸水/溶解性。CCK-8法, 各组 L929 细胞的 RGR 均大于 75%, 符合体外安全标准。1组、2组和 3组 L929 细胞的 RGR 高于其他组, 展现出良好的生物相容性。**结论:** 增强填料的引入赋予复合树脂优异的抗菌活性和良好的机械性能。本实验条件下, 2组复合树脂抑菌性和机械性能综合最佳, 是一种具有良好临床应用潜力的牙科修复材料。

[关键词] 复合树脂; 二氧化钛; 介孔氧化铝; 抗菌性能; 机械强度

[中图分类号] R783.1 **[文献标志码]** A

Preparation of zinc and nitrogen modified titanium dioxide nanoparticles/mesoporous alumina composite resin and its performance evaluation

HAN Rong^{1,2}, ZHANG Zhimin¹, ZHAO Yuanhang^{1,2}, WANG Jiayi^{1,2}, TANG Wenjun^{1,2}, ZHANG Hong¹
(1. Department of Endodontics, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Jilin Provincial International Cooperation Base of Oral Biomedicine, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To prepare novel dental composite resins using zinc (Zn) - and nitrogen (N) - modified titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles (NPs) and mesoporous alumina (Al_2O_3 , r type, 20 nm) NPs as reinforcing fillers, systematically evaluating their antibacterial activity, mechanical strength, basic performance, and biosafety to obtain the dental composite resins with excellent antibacterial activity and mechanical strength. **Methods:** Zn-N- TiO_2 NPs and mesoporous Al_2O_3 NPs were added into a resin matrix at varying mass ratios to prepare five composite resins: control group (no filler), group 0 (Zn-N- TiO_2 : Al_2O_3 = 1:0), group 1 (Zn-N- TiO_2 : Al_2O_3 = 1:1), group 2 (Zn-N- TiO_2 : Al_2O_3 = 1:2), and group 3 (Zn-N- TiO_2 : Al_2O_3 = 1:3). Plate colony counting method was used to detect the number of adhered bacteria on composite resin surfaces in various groups and calculate the antibacterial rate; scanning electron microscope (SEM) was used to observe the morphology of adhered bacteria in various groups; universal testing machine was used to measure flexural strength (FS) and elastic modulus (EM) of composite resins in various groups; SEM was used to observe fracture surface morphology of composite resins in various groups; microhardness tester was used to determine Vickers microhardness of the composite resins in various groups; Fourier transform infrared spectroscopy was used to detect double bond conversion rate (DC) after 20 s photocuring and calculate curing depth; water contact angle meter was used to measure water contact angle (WCA), water sorption property (WSP), and water solubility level (WSL) of composite resins in various groups; cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to evaluate relative growth rate (RGR) of the mouse fibroblast L-929 cells cultured in composite resin extracts on days 1, 3, and 5 and determine *in vitro* cytotoxicity grade. **Results:** The plate colony counting results showed that compared with control group, the colony counts on agar plates in the other groups were significantly reduced, with group 1 showing the lowest count. The SEM images results showed densely distributed and morphologically intact *Streptococcus mutans* in control group; small clusters of bacteria with depressed cell membranes in group 0 and group 3; sparsely distributed bacteria with obvious membrane shrinkage and cytoplasmic leakage in group 1 and group 2. No statistically significant difference in colony counts was found between group 1 and group 2 ($P>0.05$), but both were lower than the other groups ($P<0.05$). All the composite resins in experimental groups exhibited $>85\%$ antibacterial rates, with group 1 and group 2

exceeding 99%. The composite resins in group 0 showed the lowest FS. With addition of mesoporous Al_2O_3 , the FS of the composite resin in group 1 and group 2 were significantly increased, with the composite resin in group 2 showing the highest FS among all groups. Although the FS of the composite resin in group 3 was lower than that in group 2, but it remained higher than other groups ($P < 0.05$). The SEM images results showed that in control group, the smooth-surfaced silicon dioxide (SiO_2) particles exhibited clear fracture interfaces with resin matrix, with $>50\%$ particle exposure; the composite resin in group 0 showed similar morphology and large Zn-N- TiO_2 agglomerates with tight filler-matrix bonding; the composite resin in group 1, 2, and 3 showed resin adhesion to SiO_2 surfaces ($<50\%$ particle exposure) and uneven fracture surfaces. Fractured SiO_2 spheres were observed in group 2. Filler distribution was uniform in group 1 and group 2, while the minor NP agglomeration occurred in group 3. The composite resin in control group showed the lowest EM. The EM was significantly improved in experimental groups, with group 3 having the highest value. Group 0 exhibited the lowest Vickers microhardness, showing statistically significant differences among other groups ($P < 0.05$). The Vickers microhardness of the composite resin was gradually increased with the rising of Al_2O_3 content. The resins in group 2 and group 3 achieved >45 HV hardness, representing increases of 29.73% and 33.82% compared with control group, and 51.34% and 56.28% compared with group 0. No significant differences in DC of the composite resin were found among groups ($P > 0.05$). The depth of cure for all composite resin groups exceeded 4 mm, with no significance differences observed between various groups ($P > 0.05$). The composite resin in group 0 showed the smallest WCA. The hydrophobicity of the composite resin was increased with the rising of Al_2O_3 content, but all the WCA values remained $<80^\circ$. The composite resin in group 3 had the largest WCA without statistical significance compared with group 2 ($P > 0.05$). Filler incorporation reduced the water sorption/solubility. The composite resin in the CCK-8 assay results showed the composite resins in all groups had $\text{RGR} > 75\%$, meeting *in vitro* safety standards. **Conclusion:** Reinforcing fillers impart superior antibacterial activity and mechanical properties to composite resins. Under experimental conditions, group 2 composite resin achieves optimal comprehensive performance in antibacterial efficacy and mechanical strength, demonstrating promising clinical application potential.

KEYWORDS Composite resin; Titanium dioxide; Mesoporous alumina; Antibacterial property; Mechanical strength

牙科复合树脂广泛应用于牙齿缺损修复中,但普遍缺乏抗菌活性。继发性龋齿是造成修复失败的主要原因^[1]。在复合树脂中添加具有抗菌活性的成分以抑制继发龋的发生成为近年来的研究热点^[2]。但抗菌成分的添加可能会削弱复合树脂的机械强度,从而影响修复体的使用寿命。因此,开发具备抗菌活性且兼有良好机械强度的复合树脂尤为重要。二氧化钛(titanium dioxide, TiO_2)具有良好的生物安全性、化学稳定性、较低的成本和强大的光催化氧化活性,作为抗菌剂被广泛应用于牙科领域^[3]。为克服 TiO_2 因宽带隙而受限于紫外光激发,研究者^[4]通过多种方法对 TiO_2 晶格进行化学修饰,以拓展其对可见光的利用率。其中,利用过渡金属和非金属元素之间的协同效应,同时对 TiO_2 进行改性能有效提升其对可见光利用率和光催化活性^[5]。

介孔材料是一类具有介孔通道和孔几何形状的物质,拥有较大的深宽比和比表面积^[6],其特殊的三维结构使其可以更均匀地嵌入树脂基质中,并在固化过程中形成微机械互锁结构,该结构可通过消散应力下两相之间的位移和传递两者之间的应力,从而提高复合树脂的综合性能^[7]。其中, γ -氧化铝(aluminium oxide, Al_2O_3)因其三维的介孔结构,良好的耐磨性、耐腐蚀性、热稳定性和高机械强度而备受关注^[8-9]。

目前尚无关于将具备优良机械强度的 Al_2O_3 纳米颗粒(nanoparticles, NPs)与具有卓越抗菌活性的 Zn-N- TiO_2 NPs 同时掺入树脂基质的研究。本文作者将上述 2 种材料作为增强填料,按照不同比例加入到复合树脂中,系统评估其抗菌性能、机械性能、基础性能和体外细胞毒性,以确定其临床应用潜力。

1 材料与方法

1.1 菌株、主要试剂和仪器

变异链球菌 (UV159, 吉林大学口腔医院生物学实验室保存), 小鼠成纤维细胞 (L-929 细胞, 吉林大学口腔医院细胞实验室保存)。二氧化硅 (silicon dioxide, SiO₂, 5 μm)、溴化钾和 Al₂O₃ (γ相, 20 nm) 购自上海 Aladdin 公司, 双酚 A-丙三醇双甲基丙烯酸酯 (bisphenol a-glycidyl methacrylate, Bis-GMA)、樟脑醌 (camphorquinone, CQ)、甲基丙烯酸二甲氨基乙酯 [2-(dimethylamino) ethyl methacrylate, DMAEMA] 和双甲基丙烯酸二缩三乙二醇酯 (triethylene glycol dimethacrylate, TEGDMA) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 锌 (Zn)-氮 (N)-TiO₂ 为吉林大学超分子化学实验室保存, BHI 培养基和琼脂购自德国 BioFroxx 公司, DMEM 培养基、双抗、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 购自海克隆生物化学制品 (北京) 有限公司, 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自苏州新赛美生物技术有限公司。磁力搅拌器购自河南省巩义市予华仪器有限责任公司, Speed mixer 高速混合机购自美国 Hauschild 公司, 牙科 LED 光固化灯购自桂林啄木鸟医疗器械有限公司, CO₂ 恒温细胞培养箱购自日本 SANYO 公司, 超声仪购自江苏省昆山市超声仪器有限公司, 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 购自日本日立公司, 多功能酶标仪购自美国 BioTek 仪器公司, LAMBDA25 型可见光分光光度计购自美国 PerkinElmer 公司, 万能试验机和维氏硬度仪购自日本 Shimadzu 公司, 数显千分尺购自桂林测量刀具有限公司, 傅里叶变换红外光谱仪购自德国 Bruker 公司。

1.2 新型复合树脂的制备

树脂基质由 Bis-GMA、稀释剂 TEGDMA、光引发剂 CQ 和助引发剂 DMAEMA 按照 49:49:1:1 的比例组成, 采用磁力搅拌机充分混合均匀后避光储存备用。树脂基质占总质量的 40%, 填料占 60%。填料组成: 增强填料 (Zn-N-TiO₂, Al₂O₃) 和常规填料 (SiO₂) 按照质量比 1:9 组成。根据复合树脂中 2 种增强填料比例的不同分为对照组和实验组 (0、1、2 和 3 组), 具体分组情况见表 1。使用 Speed mixer 高速混合机使填料均匀分散于树脂基质中, 制成新型复合树脂。

表 1 复合树脂的分组和组成

Tab. 1 Groupings and compositions of composite resins

(η/%)

Group	Mass ratio			
	Zn-N-TiO ₂	Al ₂ O ₃	SiO ₂	Resin matrix
Control	0	0	60	40
Group 0	6.0	0	54	40
Group 1	3.0	3.0	54	40
Group 2	2.0	4.0	54	40
Group 3	1.5	4.5	54	40

1.3 复合树脂抑制变异链球菌黏附生长的能力检测

1.3.1 平板菌落计数法检测复合树脂表面黏附菌的数量和抗菌率 制作圆片状树脂试件, d=6 mm, h=2 mm, n=3, 其中 d 为直径, h 为高度, 与 1.5 mL 浓度为 1×10⁷ CFU·mL⁻¹ 的变异链球菌液 (BHI 培养基) 共置于 24 孔细胞培养板中, 在 5% CO₂、37 °C 培养箱中共培养 24 h。采用 1 mL PBS 缓冲液轻柔地冲洗去除试件表面非黏附菌, 将其转移至含 1 mL BHI 的 2.5 mL EP 管中, 涡旋、超声得到黏附菌的菌液。将其连续梯度稀释 1×10⁵ 倍, 取 100 μL 涂于 BHI 琼脂板上, 48 h 后进行菌落计数并依照公式计算抗菌率。抗菌率=(Ac-Ae)/Ac×100%。Ac 为对照组的平均菌落数, Ae 为实验组的平均菌落数。

1.3.2 SEM 观察复合树脂表面变异链球菌形态表现 按照“1.3.1”步骤得到去除非黏附菌的试件并转移至新的 24 孔细胞培养板。采用 4% 多聚甲醛 4 °C 下固定 10 h, 乙醇梯度脱水, 干燥, 喷金后采用 SEM 观察。

1.4 复合树脂的机械强度检测

1.4.1 万能试验机测量各组复合树脂挠曲强度 (flexural strength, FS) 和弹性模量 (elastic modulus, EM) 制作 2 mm×2 mm×25 mm 的长方体试件 (ISO 4049 标准), 于 37 °C 去离子水中浸泡 24 h。采用万能力学实验机测试, 跨距为 20 mm, 加载速度为 1 mm·min⁻¹, 记录最大载荷 (F), 单位为 N。FS 和 EM 按照公式计算, FS=3FL/2bh², EM=FL³/4bdh³ 其中, L (mm) 为支撑间距, b (mm) 为试件宽度, h (mm) 为试件厚度, d 为与载荷 F (N) 相对应的 FS。

1.4.2 SEM 观察各组复合树脂的断面形态表现 通过 SEM 观察试件经三点弯曲试验后的断裂面形态表现。

1.4.3 维氏显微硬度检测 制作直径 6 mm、高度 4 mm 的圆柱形试件，于 37 ℃蒸馏水中避光保存 24 h 后，采用显微硬度计测量表面硬度（加载力 980 mN，加载时间 10 s），单位为 HV。

1.5 复合树脂的基础性能检测

1.5.1 双键转化率(degree of conversion,DC)检测 采用傅里叶红外光谱仪测量各组复合树脂光固化前后（20 s）双键吸收强度（1 637 cm⁻¹），苯环吸收强度（1 608 cm⁻¹）作为内标，根据公式计算 DC：

$$DC=\left[1-\frac{A(1\,637)_t/A(1\,608)_t}{A(1\,637)_0/A(1\,608)_0}\right]\times 100\%,$$

其中，A（1 637）₀和 A（1 637）_t为光固化前后 Bis-GMA 单体中 C=C 双键（1 637 cm⁻¹）的吸收强度。

1.5.2 固化深度检测 按照 ISO 4049 标准，采用刮擦法测量各组复合树脂的固化深度。使用光固化灯从充满待测复合树脂的圆柱形模具（直径=4 mm，高度=10 mm）的一侧照射 20 s 后，刮除未固化的部分，采用千分尺测量剩余长度（精确至 0.01 mm），即固化深度，单位为 mm。每组复合树脂重复测量 5 次。

1.5.3 水接触角(water contact angle,WCA)检测 在试件（直径=15 mm，高度=1 mm）表面滴加 3 μL 去离子水，采用接触角测量仪测量各组复合树脂的 WCA。

1.5.4 吸水值(water sorption property,WSP)和溶解值(water solubility level,WSL)检测 试件制备同“1.5.3”步骤。将试件干燥至质量变化不超过 0.1 mg（M₁），测量体积（V）。在去离子水中浸泡 7 d，记录浸泡后质量（M₂）和再次干燥后的质量（M₃）。根据公式计算 WSP 和 WSL，单位均为 μg·mm⁻³：WSP=（M₂-M₃）/V，WSL=（M₁-M₃）/V。

1.6 复合树脂的生物安全性检测

按照 ISO-10993-5 标准，将各组复合树脂试件（直径 15 mm，高度 1 mm）与 DMEM 培养基（含 10% FBS 和 1% 双抗）按 1.25 cm²：1 mL 比例浸提 24 h，过滤后得浸提液。将处于对数生长期的 L-929 细胞以每孔 2 000 个的密度接种于 96 孔细胞培养板中，培养 24 h 后采用对应组浸提液替换培养基，设空白对照组。于第 1、3 和 5 天加入 CCK-8 溶液，采用酶标仪测量 450 nm 吸光度（A）值，根据公式计算各组复合树脂的相对增殖率

（relative growth rate, RGR），RGR=实验组 A 值/对照组 A 值×100%，细胞毒性分级和安全性评价见表 2。

表 2 细胞毒性分级和安全性评价
Tab. 2 Cytotoxicity gradings and safety evaluation

Toxicity grading	RGR	Safety evaluation
Grade 1	≥100%	Safe
Grade 2	75%—99%	Safe
Grade 3	50%—74%	Unsafe
Grade 4	25%—49%	Unsafe
Grade 5	1%—24%	Unsafe
Grade 6	<1%	Unsafe

1.7 统计学分析

采用 SPSS 27.0 统计软件进行统计学分析。各组菌落计数，复合树脂的 FS、EM、维氏显微硬度、DC、固化深度、WCA、WSP、WSL 和 RGR 均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

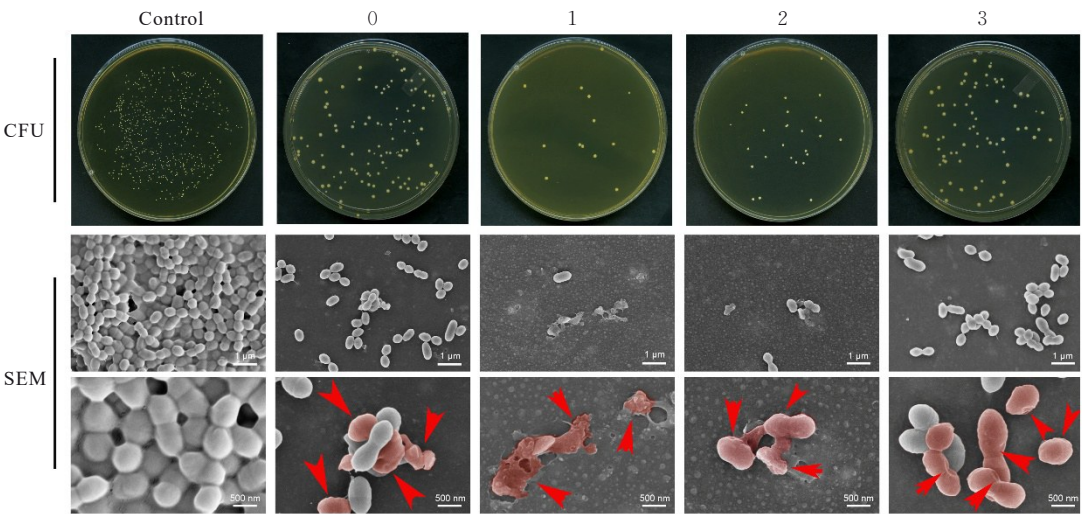
2 结 果

2.1 各组复合树脂的抗菌活性

与对照组比较，实验组琼脂板上的菌落数量明显减少，其中 1 组菌落数最少。SEM 图像显示：对照组中可见密集且形态良好的变异链球菌；0 组和 3 组的细菌呈小面积聚集，细胞膜表面出现凹陷；1 组和 2 组的细菌分布稀疏，细胞膜出现明显皱缩，伴随细胞内容物泄漏。1 组与 2 组琼脂板上的菌落计数比较差异无统计学意义（*P*>0.05），但均低于其他组（*P*<0.05）。实验组复合树脂的抗菌率均超过 85%，其中 1 组和 2 组复合树脂的抗菌率达到 99% 以上，表现出优异的抗菌活性。见图 1 和表 3。

2.2 各组复合树脂的机械强度

0 组复合树脂 FS 最低。随着介孔 Al₂O₃ 的加入，与 0 组比较，1 组和 2 组复合树脂 FS 升高（*P*<0.05），其中 2 组的 FS 最高。3 组复合树脂 FS 较 2 组降低，但仍高于对照组和 0 组（*P*<0.05）。对照组复合树脂 EM 最低。随着增强填料的加入，各实验组复合树脂的 EM 升高，3 组最高，2 组次之。0 组复合树脂维氏显微硬度最低，与其他组比较差异有统计学意义（*P*<0.05）。随着介孔 Al₂O₃ 含量增



Red bacteria indicated cells with significant damage and deformation.

图1 各组复合树脂和变异链球菌共培养后细菌菌落的形态表现和SEM图像

Fig. 1 Photographs and SEM images of bacterial colonies in various groups after co-cultured with composite resins and *S. mutans*

表3 黏附菌菌落计数和抗菌率

Tab. 3 Colony counts and antimicrobial rates of adherent bacteria (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Group	Colony count ($\times 10^6$ CFU $\cdot$ mL $^{-1}$)	Antimicrobial rate ($\eta/\%$)
Control	83.83 $\pm$ 5.38	—
Group 0	10.77 $\pm$ 1.04*	87.16 $\pm$ 1.24
Group 1	1.20 $\pm$ 0.36* Δ	98.57 $\pm$ 0.43 Δ
Group 2	3.03 $\pm$ 0.85* Δ	96.38 $\pm$ 1.01 Δ
Group 3	8.30 $\pm$ 1.15*	90.10 $\pm$ 1.37 Δ

“—”: No data. *P<0.05 compared with control group; Δ P<0.05 compared with group 0.

加, 维氏显微硬度逐渐增加, 2组和3组复合树脂维氏显微硬度均超过45 HV, 分别较对照组复合树脂提高了29.73%和33.82%, 较0组复合树脂提高了51.34%和56.28%。见表4。

对照组中SiO₂颗粒表面光滑, 与树脂基质间的断裂界面清晰, 常见多于1/2球体颗粒裸露的现象; 0组与对照组相似, 且可以观察到较大的Zn-N-TiO₂NP团块断面, 纳米粒子与树脂基质间的结合较为紧密, 未发生断裂; 1、2和3组中, 树脂基质不同程度地黏附于SiO₂颗粒表面, 多于1/2球体颗粒裸露的现象较少, 树脂断裂面凹凸不平; 2组可以观察到断裂的SiO₂球体; 1和2组填料分布较为均匀, 3组中偶见纳米粒子团聚现象。各组复合树脂断裂面的SEM图像见图2。

表4 各组复合树脂的FS、EM和维氏显微硬度

Tab. 4 FS, EM, and Vickers microhardness of composite resins in various groups (n=5, $\bar{x}\pm s$)

Group	FS (P/MPa)	EM(P/GPa)	Vickers micro-hardness (HV)
Control	93.07 $\pm$ 4.01	2.24 $\pm$ 0.14	35.28 $\pm$ 1.81
Group 0	80.89 $\pm$ 8.03*	2.80 $\pm$ 0.11*	30.21 $\pm$ 1.29*
Group 1	112.26 $\pm$ 5.08* Δ	3.27 $\pm$ 0.11* Δ	39.41 $\pm$ 1.28* Δ
Group 2	129.84 $\pm$ 4.52* Δ	3.57 $\pm$ 0.13* Δ	45.77 $\pm$ 0.57* Δ
Group 3	123.83 $\pm$ 7.37* Δ	3.72 $\pm$ 0.11* Δ	47.21 $\pm$ 0.98* Δ

*P<0.05 compared with control group; Δ P<0.05 compared with group 0.

2.3 各组复合树脂的基础性能

各组复合树脂的固化深度比较差异无统计学意义 (P>0.05)。各组复合树脂的固化深度比较差异无统计学意义 (P>0.05)。其中, 对照组复合树脂的固化深度最大, 实验组复合树脂的固化深度有所下降, 但均大于4 mm, 各实验组复合树脂的固化深度比较差异无统计学意义 (P>0.05)。0组复合树脂WCA最小, 随着介孔Al₂O₃含量增加, 复合树脂的疏水性提高, 但WCA值均保持在80°以下。3组复合树脂WCA最大, 但与2组比较差异无统计学意义 (P>0.05)。增强填料的加入降低了复合树脂的吸水/溶解性, 2组复合树脂WSP和WSL均优于其他组 (P<0.05)。1组和3组复合树脂WSP和WSL相近, 组间比较差异无统计学意义 (P>0.05)。见表5。

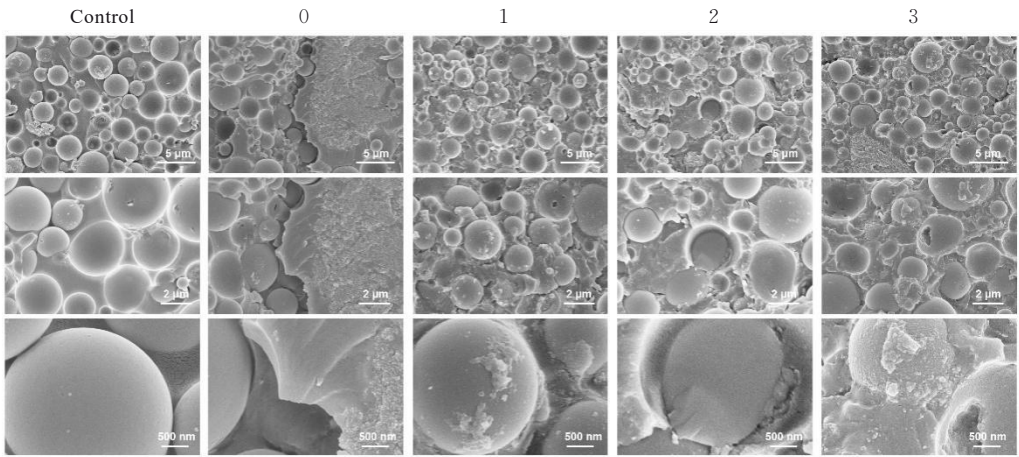


图2 各组复合树脂三点弯曲实验后断裂面的SEM图像
Fig. 2 SEM images of fracture surfaces of composite resins in various groups after three-point bending test

表5 各组复合树脂的DC、固化深度、WCA、WSP和WSL

Tab. 5 DC, curing depth, WCA, WSP, and WSL of composite resins in various groups (n=5, $\bar{x}\pm s$)

Group	DC($\eta/\%$)	Curing depth(l/mm)	WCA($\theta/^\circ$)	WSP($\mu g\cdot mm^{-3}$)	WSL($\mu g\cdot mm^{-3}$)
Control	48.66 $\pm$ 1.02	4.98 $\pm$ 0.14	66.73 $\pm$ 1.41	30.30 $\pm$ 0.78	0.68 $\pm$ 0.09
Group 0	47.52 $\pm$ 1.14	4.30 $\pm$ 0.23*	65.06 $\pm$ 1.28*	25.22 $\pm$ 0.88*	0.70 $\pm$ 0.06
Group 1	49.66 $\pm$ 0.73	4.41 $\pm$ 0.03*	70.51 $\pm$ 1.55* Δ	17.31 $\pm$ 0.74* Δ	0.28 $\pm$ 0.06* Δ
Group 2	48.89 $\pm$ 0.89	4.51 $\pm$ 0.18*	75.34 $\pm$ 1.80* Δ	15.03 $\pm$ 0.48* Δ	0.16 $\pm$ 0.04* Δ
Group 3	48.62 $\pm$ 1.12	4.54 $\pm$ 0.09*	75.81 $\pm$ 1.30* Δ	17.09 $\pm$ 0.82* Δ	0.29 $\pm$ 0.05* Δ

* $P<0.05$ compared with control group; $\Delta P<0.05$ compared with group 0.

2.4 各组复合树脂的生物安全性

CCK-8法测定结果显示：实验组L929细胞的RGR均大于75%，符合体外安全标准。1组、2组和3组L929细胞的RGR高于对照组和0组，展现出良好的生物相容性。见表6。

表6 第1、3和5天时各组L929细胞的RGR和安全性评价
Tab. 6 RGR and safety evaluation of cells in various groups on 1 st, 3 rd, and 5 th days (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Group	RGR ($\eta/\%$)			Safety evaluation		
	(t/d) 1	3	5	1	3	5
Control	88.57 $\pm$ 1.91	89.44 $\pm$ 4.94	88.64 $\pm$ 4.94	Safe	Safe	Safe
Group 0	81.75 $\pm$ 1.47	86.32 $\pm$ 2.40	82.19 $\pm$ 3.87	Safe	Safe	Safe
Group 1	90.35 $\pm$ 1.90	95.64 $\pm$ 4.72	92.46 $\pm$ 5.95	Safe	Safe	Safe
Group 2	93.98 $\pm$ 1.77	97.94 $\pm$ 4.21	95.44 $\pm$ 4.67	Safe	Safe	Safe
Group 3	94.00 $\pm$ 2.14	98.03 $\pm$ 1.89	96.39 $\pm$ 6.95	Safe	Safe	Safe

3 讨论

3.1 抗菌活性

本研究结果显示：与对照组比较，实验组复合

树脂能有效抑制变异链球菌的黏附生长。其中，尽管0组含有最多的具有抗菌活性的Zn-N-TiO₂ NPs，但抗菌率在各实验组中最低。可能是由于Zn-N-TiO₂ NPs发生团聚，导致大量光催化位点被包裹，抗菌活性下降。1组复合树脂抗菌活性最强，2组和3组复合树脂随着Zn-N-TiO₂ NPs含量减少，抗菌活性有所下降。

SEM观察结果显示：实验组复合树脂表面的变异链球菌细胞膜均有不同程度损伤。这是由于Zn-N-TiO₂ NPs产生的ROS与细菌直接接触，引起细胞膜蛋白变性和电子介质释放，导致细胞膜凹陷、变形，甚至细胞质外渗，最终细菌死亡^[10]。本研究中1和2组复合树脂表现出优异的抗变异链球菌能力。然而，其抗菌特性的持续时间仍需进一步研究。

3.2 机械性能

良好的机械性能是防止复合树脂断裂、保证修复体功能恢复及延长使用寿命的重要因素。本研究中，0组复合树脂FS最低，主要原因是Zn-N-TiO₂ NPs的团聚趋势使填料分布不均，导致应力集

中;3组较2组复合树脂的FS低也由类似现象引起;1、2和3组复合树脂较对照组表现出较高的FS,原因在于介孔 Al_2O_3 与树脂基质间形成的微机械互锁结构,该物理结构增强了界面结合,使应力通过“钩子”等结构有效传递和消散,从而提高抗断裂性能^[11]。研究^[12]显示:适当浓度的 TiO_2 NPs也具有增强机械强度的作用。适当的Zn-N- TiO_2 与 Al_2O_3 配比(如2组和3组)优化了填料间的相互作用和分布均匀性,进一步提升了复合树脂的FS。增强填料的加入使实验组复合树脂的FS高于对照组。 TiO_2 和 Al_2O_3 的FS均高于 SiO_2 ,填料种类的优化直接提升了复合树脂的FM。

填料与树脂界面的结合强度直接影响复合树脂的机械性能^[7, 13]。本研究SEM图像中,对照组和0组复合树脂的断裂面多发生于 SiO_2 填料与复合树脂的结合界面且光滑平整,表明 SiO_2 填料与树脂基质结合较为松散。0组复合树脂还观察到断裂面多发生在Zn-N- TiO_2 NP团聚块的内部,说明团块内部结合不紧密,加以应力集中,是造成0组复合树脂FS最低的主要原因。然而,Zn-N- TiO_2 NP团块与树脂基质间的断裂面较为少见,表明两者结合较为紧密,Zn-N- TiO_2 NP的引入在一定程度上增强了填料与树脂界面的附着能力。1、2和3组树脂基质的断裂面粗糙起伏,表明填料与树脂基质间结合较紧密。本研究结果表明:分散在基质中的增强填料改善了树脂基质强度及应力传导性能,从而使其表现出良好的机械性能。

复合树脂的硬度是评估修复体在口腔环境中的耐磨性和长期稳定性的重要指标,主要受填料种类、含量和分布的影响^[14]。单位体积内填料越多、分布越均匀,复合树脂硬度越高。本研究中,0组复合树脂硬度较低,可能由以下因素所致:一是 TiO_2 的密度高于 SiO_2 ,导致单位体积中填料体积占比下降;二是Zn-N- TiO_2 NP团聚造成填料分布不均。介孔 Al_2O_3 对硬度的提升贡献较大:一方面, Al_2O_3 硬度高于 SiO_2 和Zn-N- TiO_2 ;另一方面,其介孔结构可将硬度较低的树脂基质包覆于硬壳中,同时提升填料密度。 Al_2O_3 还促进Zn-N- TiO_2 NP均匀分散,对提高1、2和3组复合树脂的维氏显微硬度起重要作用。

吸水性主要受填料-基质界面空隙的影响,致密且均匀的填料分布以及填料与基质间紧密的结合可有效降低吸水性^[15]。本研究中,含有介孔 Al_2O_3 的

1、2和3组复合树脂吸水值低于其他组。一方面, Al_2O_3 和低浓度Zn-N- TiO_2 NP的引入改善了填料在基质中的分布;另一方面, Al_2O_3 与基质形成的微机械互锁结构有效减少了水分子扩散进入材料的通道,从而降低WSP。

复合树脂的水溶解性主要由未固化残留单体和降解产物的浸出引起^[16-17]。由于本研究中填料具有高化学稳定性和低溶解性,因此主要关注残留单体的影响。0组复合树脂的溶解性略高于对照组,可能是由于填料团聚导致局部固化不足,使游离单体增多。含 Al_2O_3 的1、2和3组复合树脂溶解性降低,这归因于微机械互锁结构限制了未固化单体的游离析出。

3.3 基础性能

DC反映单体转化为聚合物的能力,DC越高,材料的机械性能越优越^[18]。 TiO_2 的光催化作用可产生电子-空穴对,不仅可引发单体聚合,还能促进CQ等光引发剂的电子转移,从而提高DC^[19]。然而,高浓度纳米填料发生团聚导致分散不均,造成局部聚合不足的问题,从而降低DC。介孔 Al_2O_3 的加入可减少Zn-N- TiO_2 NP团聚现象的发生,进而提高DC。整体而言,本实验条件下增强填料对DC影响较小。

所有组别的固化深度均超过4 mm,远高于ISO-4049规定的1.5 mm的标准,满足临床需求。复合树脂材料中存在的具有光吸收和光散射的填料会造成光强度沿辐射路径衰减,通常会限制复合树脂的固化深度^[20]。本研究中,在保持总填料量不变的情况下,微米级 SiO_2 的减少,纳米级增强填料加入,固化深度呈现出先降低后升高的趋势,但实验组复合树脂的固化深度始终低于对照组。可能是由于介孔 Al_2O_3 对于紫外光的吸收和散射低于 TiO_2 ,但仍高于 SiO_2 。纳米级填料具有相对较高的体表面积比,使得填料与树脂基质之间的界面面积增加,光散射效应增强,激活光引发剂的光量减少,也是实验组复合树脂固化深度低于对照组的原因。0组复合树脂的固化深度最小,可能是由于 TiO_2 形成的光屏蔽效应所造成,阻碍了深层复合树脂的有效固化^[21]。

WSA小于65°的表面为亲水性,大于65°的表面疏水性^[22]。研究^[23-24]显示:具有较高疏水性的修复材料多具有较长的使用寿命,低湿润性的材料可减缓细菌生物膜的形成,并可有效降低材料的水

解和降解^[25-26]。本研究中,1、2和3组复合树脂表现出良好的疏水性,0组复合树脂较其他实验组显示出相对亲水的特性,可能是由于锐钛矿相的TiO₂的较强的亲水特性所造成,这有利于ROS和离子释放到接触界面中,增强抗菌活性^[27]。

3.4 生物安全性

复合树脂中未反应单体在水环境中的释放是细胞毒性的来源之一^[28]。本研究中,含有介孔Al₂O₃的1、2和3组复合树脂表现出较其他组更好的细胞相容性,是由于有机成分被锁在孔中,更难洗脱,从而降低了游离单体的释放量。Zn-N-TiO₂ NPs和介孔Al₂O₃ NPs的低溶解及低降解特性,也是复合树脂在口腔潮湿环境中保持良好生物安全性的基础。研究^[29]显示:ROS可能诱导机体细胞产生氧化应激。但在口腔环境中,组织表面持续的唾液冲刷,可避免因局部高浓度ROS而导致的细胞毒性。

综上所述,包含2% Zn-N-TiO₂ NPs和4%介孔Al₂O₃的2组复合树脂表现出优异的抗菌活性及机械性能,抑制变异链球菌生长效果显著,机械强度满足临床需求,且具有良好的生物安全性,显示出较高的临床应用潜力。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

韩蓉和张志民参与研究的整体设计及论文撰写,赵远航和王佳一参与实验实施,汤文君和张红参与数据的统计学分析及论文审阅。

[参考文献]

- [1] OPDAM N M, VAN DE SANDE F H, BRONKHORST E, et al. Longevity of posterior composite restorations: a systematic review and meta-analysis[J]. J Dent Res, 2014, 93(10): 943-949.
- [2] MELO M S, GARCIA I M, MOKEEM L, et al. Developing bioactive dental resins for restorative dentistry[J]. J Dent Res, 2023, 102(11): 1180-1190.
- [3] MANSOOR A, KHURSHID Z, KHAN M T, et al. Medical and dental applications of titania nanoparticles: an overview[J]. Nanomaterials (Basel), 2022, 12(20): 3670.
- [4] RASHID R, SHAFIQ I, GILANI M R H S, et al. Advancements in TiO₂-based photocatalysis for environmental remediation: strategies for enhancing visible-light-driven activity [J]. Chemosphere, 2024, 349: 140703.
- [5] ZHAO Y H, ZHANG H, HONG L H, et al. A multifunctional dental resin composite with Sr-N-doped TiO₂ and n-HA fillers for antibacterial and mineralization effects[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2): 1274.
- [6] SUIB S L. A review of recent developments of mesoporous materials[J]. Chem Rec, 2017, 17(12): 1169-1183.
- [7] ZHANG S N, WANG X, YANG J W, et al. Micromechanical interlocking structure at the filler/resin interface for dental composites: a review[J]. Int J Oral Sci, 2023, 15(1): 21.
- [8] KUEMMEL M, GROSSO D, BOISSIÈRE C, et al. Thermally stable nanocrystalline gamma-alumina layers with highly ordered 3D mesoporosity[J]. Angew Chem Int Ed, 2005, 44(29): 4589-4592.
- [9] YUAN Q, YIN A X, LUO C, et al. Facile synthesis for ordered mesoporous gamma-aluminas with high thermal stability[J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(11): 3465-3472.
- [10] ZIENTAL D, CZARCZYNSKA-GOSLINSKA B, MLYNARCZYK D T, et al. Titanium dioxide nanoparticles: prospects and applications in medicine[J]. Nanomaterials (Basel), 2020, 10(2): 387.
- [11] ESTRIN Y, KRISHNAMURTHY V R, AKLEMAN E. Design of architected materials based on topological and geometrical interlocking[J]. J Mater Res Technol, 2021, 15: 1165-1178.
- [12] JENIMA J, PRIYA DHARSHINI M, AJIN M L, et al. A comprehensive review of titanium dioxide nanoparticles in cementitious composites [J]. Heliyon, 2024, 10(20): e39238.
- [13] CHEN H Y, WANG R L, QIAN L, et al. Dental restorative resin composites: modification technologies for the matrix/filler interface [J]. Macro Materials & Eng, 2018, 303(10): 1800264.
- [14] RASTELLI A N S, JACOMASSI D P, FALONI A P S, et al. The filler content of the dental composite resins and their influence on different properties [J]. Microsc Res Tech, 2012, 75(6): 758-765.
- [15] FERRACANE J L. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks[J]. Dent Mater, 2006, 22(3): 211-222.
- [16] ALSHALIR Z, SALIM N A, SATTERTHWAITE J D, et al. Long-term sorption and solubility of bulk-fill and conventional resin-composites in water and artificial saliva[J]. J Dent, 2015, 43(12): 1511-1518.

- [17] FINER Y, SANTERRE J P. The influence of resin chemistry on a dental composite's biodegradation[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2004, 69(2): 233-246.
- [18] SUN J R, PETERSEN E J, WATSON S S, et al. Biophysical characterization of functionalized titania nanoparticles and their application in dental adhesives[J]. *Acta Biomater*, 2017, 53: 585-597.
- [19] DONG C, NI X Y. The photopolymerization and characterization of methyl methacrylate initiated by nanosized titanium dioxide [J]. *J Macromol Sci-Pure App Chem*, 2004, A41(5): 547-63.
- [20] VOUVUDI E C. Overviews on the progress of flowable dental polymeric composites: their composition, polymerization process, flowability and radiopacity aspects[J]. *Polymers*, 2022, 14(19).
- [21] DONG C, NI X Y. The photopolymerization and characterization of methyl methacrylate initiated by nanosized titanium dioxide[J]. *J Macromol Sci Part A*, 2004, 41(5): 547-563.
- [22] YIN X, LUO Y J. The optical shielding performances and mechanisms of green flame-retardant two-component matte films under various application conditions[J]. *RSC Adv*, 2021, 11(21): 12696-12702.
- [23] VOGLER E A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 1998, 74: 69-117.
- [24] TOPCU F T, SAHINKESEN G, YAMANEL K, et al. Influence of different drinks on the colour stability of dental resin composites[J]. *Eur J Dent*, 2009, 3(1): 50-56.
- [25] JAFFER F, FINER Y, SANTERRE J P. Interactions between resin monomers and commercial composite resins with human saliva derived esterases [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(7): 1707-1719.
- [26] TEUGHELS W, VAN ASSCHE N, SLIEPEN I, et al. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2006, 17(Suppl 2): 68-81.
- [27] SPENCER P, YE Q, PARK J, et al. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration[J]. *Ann Biomed Eng*, 2010, 38(6): 1989-2003.
- [28] SON Y, LEE M K, PARK Y C. Contact angle relaxation on amorphous, mixed-phase (anatase+rutile), and anatase TiO₂ films and its mechanism[J]. *Langmuir*, 2021, 37(5): 1850-1860.
- [29] VAN LANDUYT K L, NAWROT T, GEEBELEN B, et al. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach[J]. *Dent Mater*, 2011, 27(8): 723-747.
- [30] YANG S S, LIAN G J. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 467(1/2): 1-12.