

[文章编号 1000-1182(2005)05-0427-04]

新型纳米羟基磷灰石根充糊剂的细胞毒性研究

李平¹, 肖丽英², 李伟², 谭红¹, 廖运茂², 袁明龙³

(1. 四川大学华西口腔医院 牙体牙髓病科; 2. 口腔生物医学工程教育部重点实验室;

3. 四川琢新生物材料研究有限公司, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 体外研究新型纳米羟基磷灰石(n-HA)根充糊剂的细胞毒性。方法 体外培养成骨细胞,采用碱性磷酸酶(ALP)和 型胶原免疫组化染色鉴定成骨细胞;采用MTT比色法,以F12培养基为对照,选用3种不同浓度的新型n-HA根充糊剂浸提液,分别检测浸提液与成骨细胞接触1、3、5、7 d的细胞相对增殖率(RGR),以评价其细胞毒性。结果 与对照组相比,新型n-HA根充糊剂表现出较高的细胞相对增殖率,随着浸提液浓度的降低和培养时间的延长,细胞毒性趋于0级;相同时间点不同浓度的新型n-HA根充糊剂浸提液的吸光度值无显著性差异($P > 0.05$)。结论 新型纳米羟基磷灰石根充材料无细胞毒性。

[关键词] 纳米羟基磷灰石; 根管充填糊剂; 细胞毒性

[中图分类号] R 783.1 **[文献标识码]** A

Evaluation on Cytotoxicity of a New Nano-hydroxyapatite as Root Canal Filling Sealer LI Ping¹, XIAO Li-ying², LI Wei², TAN Hong¹, LIAO Yun-mao², YUAN Ming-long³. (1. Dept. of Endodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Zhuoxin Biomaterial Company Limited, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To evaluated the cytotoxicity of a new nano-hydroxyapatite (n-HA) root canal sealer. **Methods** In this study, the cytotoxicity was evaluated by the method of MTT assay *in vitro*, and culture medium F12 as control, three concentrations of the soaking material cultured with mouse osteoblast separately, to test the cell relative growth rate(RGR) of every group.

Results The toxicity graduation of the n-HA root canal sealer tends to 0 with the culture time increasing. The cell survival rate of n-HA root canal sealer showed high relatively. The OD value of cell was similar for the negative control and the extracts ($P > 0.05$). **Conclusion** The result indicated that n-HA root canal sealer was compatible with the testcells.

[Key words] nano-hydroxyapatite; root canal sealer; cytotoxicity

细胞毒性实验属于医用材料生物安全性评价中第一阶段的筛选实验¹。标准化的离体实验是评价牙科材料生物相容性的重要方法,应用细胞培养技术对细胞进行细胞毒性实验已被公认为是鉴别筛选具有良好生物相容性材料的一种方法。在动物实验和临床研究之前,需要对根管充填材料进行生物安全性评价。由Mosmann²于1983年首次提出的MTT法是一种能快速评定细胞增殖和细胞毒性的比色分析方法,本实验采用这种方法检测纳米羟基磷灰石(nano-hydroxyapatite, n-HA)浸提液培养SD大鼠成骨细胞1、

3、5、7 d的吸光度值,以此评价n-HA根充糊剂的细胞毒性。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料

n-HA根充糊剂(口腔生物医学工程教育部重点实验室与琢新生物材料研究有限公司共同研制),主要成分为n-HA(纳米级别约20 nm)、碘仿、硅油等。

1.2 主要试剂与仪器

F12培养基(GIBCO公司,美国),0.25%胰蛋白酶(GIBCO公司,美国),新生小牛血清(成都哈里生物材料有限公司),二甲基亚砷(DMSO, GIBCO公司,美国),溴化-3-(4,5-2 甲基噻唑基-2)-2,5-二苯基四唑(MTT, GIBCO公司,美国),倒置显微镜及照像系统(OLYMPUS公司,日本),超净工作台VS-1 300-U(苏州安泰空气技术有限公司)。

[收稿日期 2005-03-14; 修回日期 2005-06-01]

[基金项目] 教育部留学回国人员科研启动资金资助项目(0040305 402005)

[作者简介] 李平(1978-),女,上海人,住院医师,硕士,现在北京中日友好医院口腔科工作

[通讯作者] 肖丽英, Tel: 028-81802617

1.3 成骨细胞培养与鉴定

1.3.1 成骨细胞原代及传代培养 无菌条件下取SD大鼠乳鼠(鼠龄3~5 d,由四川大学华西医学中心实验动物中心提供)颅骨,彻底去净附属组织,以组织块法在37℃、5%CO₂ 孵箱内培养细胞。待成骨细胞增殖贴壁融合至80%后传代,加入0.25%胰酶消化,传代至第4代。

1.3.2 成骨细胞的鉴定 倒置显微镜动态观察。运用倒置显微镜连续动态观察细胞形态变化及生长状况并进行拍照。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)免疫组化染色。采用5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐/氯化硝基四氮唑蓝显色检测。染色原理:两者存在时,在碱性磷酸酶作用下,后者被还原成显微镜下可见的蓝色或紫色沉淀。I型胶原免疫组化染色。将细胞爬片固定,采用双抗体法染色检测。

1.3.3 细胞悬液的配制 取生长稳定的第4代SD大鼠乳鼠颅骨成骨细胞,经0.25%胰蛋白酶消化3 min后,加含10%小牛血清的F12培养基终止消化,巴氏吸管吹打使贴壁细胞脱落,用血细胞计数板进行细胞计数,按需要用F12培养基配成相应浓度的细胞悬液。

1.4 材料浸提液的配制及分组

采用含10%小牛血清的F12细胞培养基配制n-HA根充糊剂浸提液。分别称取n-HA 1 g、0.5 g、0.25 g,经高压灭菌后加入含10%小牛血清F12细胞培养基10 ml。振荡混匀后在5%CO₂ 细胞培养箱中37℃放置3 d,3 000 r/min离心5 min后取上清液,经滤器滤过除菌。按配制浸提液的浓度分为3个实验组:A组(浓度为100 g/L n-HA浸提液),B组(浓度为50 g/L n-HA浸提液),C组(浓度为25 g/L n-HA浸提液);阴性对照组:加入F12细胞培养基(含10%小牛血清、青霉素100 U/ml、链霉素100 μg/ml)。

1.5 细胞生长曲线测定

采用细胞计数法绘制生长曲线。将细胞悬液按每毫升 5×10^4 个接种于48孔细胞培养板中,每孔1 ml,置于37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,24 h后弃去孔内的原培养液和未贴壁细胞,按分组加入材料浸提液1 ml,以后每天每组各取3孔,吸去上清液,加入0.25%胰蛋白酶100 μl消化2~3 min,镜下观察细胞收缩变圆,再加入900 μl F12培养基终止消化,充分吹打形成单细胞悬液,倒置显微镜下用血细胞计数板进行细胞计数,计算均值,绘制细胞生长曲线。

1.6 细胞毒性(MTT法)测定

将细胞悬液按每毫升 5×10^4 个接种于96孔培养板,每孔250 μl,置于37℃、5%CO₂ 培养箱中培养

24 h,待细胞贴壁后弃去孔内的原培养液和未贴壁细胞,分组情况同前,加入n-HA浸提液250 μl,继续培养,每组设3个复孔。分别在加药后的第1、3、5、7天,吸弃原培养液,更换新鲜培养液,最后同时在每孔中加入MTT(5 mg/L)20 μl,继续培养4 h后,弃除余液,每孔加入二甲基亚砜200 μl,微振荡10 min,于酶联免疫仪上测波长为540 nm时的吸光度值(OD),以上实验结果作双因素方差分析。

评价方法:以阴性对照组的OD值作为100%的细胞增殖率,则细胞的相对增殖率(relative growth rate, RGR) = (实验组OD均值/阴性对照组OD均值) × 100%。按RGR范围分为5级³,RGR 100%为0级,75% ≤ RGR < 99%为1级,50% ≤ RGR < 74%为2级,25% ≤ RGR < 49%为3级,1% ≤ RGR < 24%为4级,RGR % = 0为5级,以RGR越高检测材料的细胞毒性越小。

2 结果

2.1 成骨细胞形态观察

倒置显微镜观察可见,接种的细胞经24 h培养可贴壁,细胞呈三角形、纺锤形和多角形等多种形态,胞浆向外伸展,并伸出突起;5 d后见梭形细胞游出,细胞数量增加,体积增大;10 d后细胞增殖贴壁融合;30 d后,细胞长满瓶底,细胞密集处可见矿化结节形成(图1)。

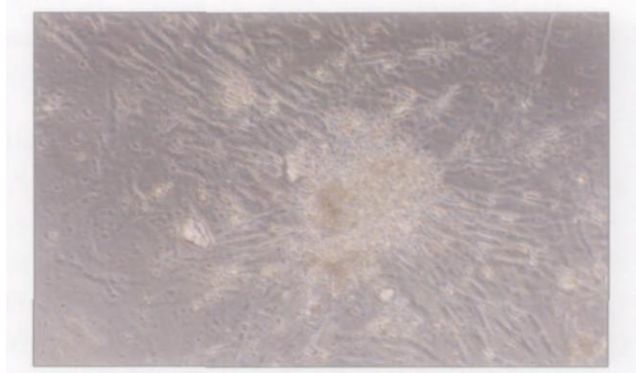


图1 成骨细胞矿化结节 倒置显微镜 ×100

Fig 1 Mineralize tuber of osteoblast inverted microscope ×100

2.2 成骨细胞鉴定

ALP免疫组化染色:大多数细胞出现阳性反应,可见细胞膜及胞浆内颗粒均呈阳性反应,染色呈蓝色颗粒(图2)。I型胶原免疫组化染色:可见胞浆中充满大量棕黄色颗粒,核膜周围染色较深,为阳性反应(图3)。

2.3 成骨细胞生长曲线

成骨细胞的生长曲线见图4。由图4可见体外

培养成骨细胞前3 d 细胞增殖最快,第4天基本稳定,第5天增殖达到高峰,之后下降。

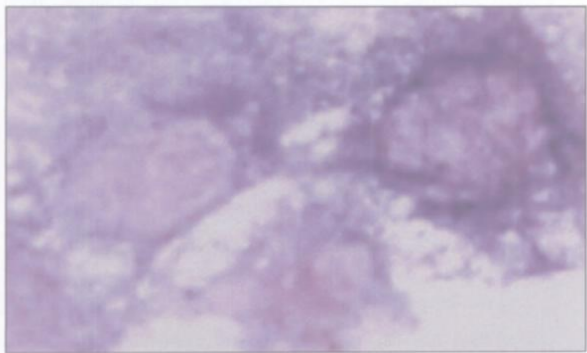


图2 成骨细胞碱性磷酸酶阳性表达 免疫组化 ×100

Fig 2 Positive expression of alkaline phosphatase in osteoblast IHC ×100



图3 成骨细胞中 型胶原阳性表达 免疫组化 ×100

Fig 3 Positive expression of collagen in osteoblast IHC ×100

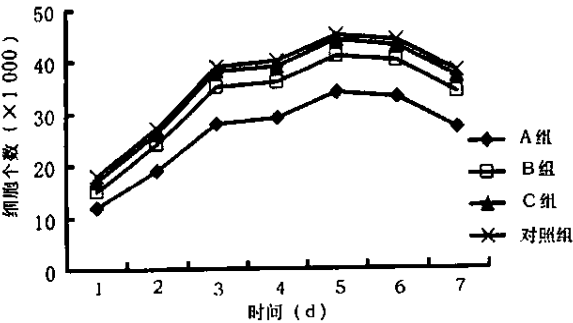


图4 成骨细胞的生长曲线

Fig 4 The growth line of osteoblast cells

2.4 MTT 比色法检测

采用 MTT 比色法所测对照组及不同浓度 n-HA 根充糊剂浸提液 OD 值见表 1。对表 1 数据进行双因素方差分析,A 组、B 组、C 组和对照组间 OD 值的差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。对照组及不同浓度 n-HA 根充糊剂浸提液的细胞相对增殖率见表 2,由表 2 可知,以对照组为 100%,A 组、B 组、C 组在分别培养 1、3、5、7 d 后毒性程度为 1 级。随着材料浸提液浓度的降低和培养时间的延长,细胞毒性趋于 0 级。

表 1 对照组及不同浓度 n-HA 根充糊剂浸提液 OD 值 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 OD value of osteoblast cells in control group and different concentrateion n-HA groups ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

分组	时间(d)			
	1	3	5	7
A 组	0.24 ±0.02	0.35 ±0.02	0.43 ±0.02	0.46 ±0.01
B 组	0.27 ±0.01	0.37 ±0.02	0.48 ±0.01	0.52 ±0.01
C 组	0.28 ±0.01	0.39 ±0.02	0.50 ±0.01	0.53 ±0.02
对照组	0.29 ±0.01	0.40 ±0.04	0.51 ±0.01	0.54 ±0.02

表 2 对照组及不同浓度 n-HA 根充糊剂浸提液的细胞相对增殖率(RGR) ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Cell relative growth rate(RGR) of osteoblast cells in control group and different concentrateion n-HA groups($n = 3, \bar{x} \pm s$)

分组	时间(d)			
	1	3	5	7
A 组	81.68	84.52	85.49	87.68
B 组	91.89	92.56	95.18	95.93
C 组	94.28	96.84	98.10	98.31
对照组	100.00	100.00	100.00	100.00

3 讨论

作为长期存留于口腔内的根充材料,其生物相容性的好坏直接影响根充的质量及根尖周组织的修复反应。目前细胞毒性实验已成为评价口腔新型材料临床应用前生物相容性研究一个不可缺少的部分。用于评价材料细胞毒性的常用实验方法有增殖度法、琼脂覆盖法、分子滤过法、MTT 比色法等。自 1983 年美国的 Mosmann 首次报道以来,MTT 比色法已广泛应用于肿瘤学、免疫学研究及医用材料的生物相容性评价,可以准确、快速、灵敏地反映细胞增殖程度和细胞毒性程度^{4,5}。

纳米材料是指结构单位在三维尺寸上至少有一维在 1 ~ 100 nm 间的材料,本实验材料 HA 粒子大小在 20 nm 左右,材料并非单一组分,除主要成分 HA 外,还复合加入碘仿等其他成分。糊剂设计为注射型根充糊剂,操作简单,使用方便,有别于以往的纳米根充糊剂。

由于本实验检测的 n-HA 根充糊剂,根管充填后可通过根尖孔与根尖周组织接触,修复根尖周骨质破坏,其接触环境存在大量的成骨细胞,从而合成和分泌有机类骨质⁶⁻⁸,参与调节骨质矿化。本实验采用 MTT 法对材料细胞毒性进行综合评价,选用植入

部位细胞检测材料浸提液与成骨细胞相互作用,反映细胞对材料可能存在的毒性物质的反应,充分体现材料可能的毒性。由于培养细胞的形状不能作为鉴别细胞类型的主要特征标志,因此又采用免疫组化方法对细胞系进行了进一步鉴定,结果显示细胞系 ALP 染色及 I 型胶原检测均为阳性反应,证实所培养的细胞确实为成骨细胞。根据有关文献⁹,培养孔中细胞数量过多,培养 72 h 后会形成细胞融合,导致细胞总代谢率不变;当细胞数目过少时,测试结果不稳定。每孔所选用的细胞数量原则上应避免引起细胞融合为宜^{10,11},据预实验结果表明,选用细胞浓度每毫升 5×10^4 个为佳。

本实验采用不同浓度的材料浸提液作为实验组研究对象,阴性对照组为 F12 细胞培养基。结果显示,在其他条件相同的情况下,实验组与对照组分别培养 1、3、5、7 d,成骨细胞在镜下观察形态无差异,呈梭形的成骨细胞均牢固地贴附于培养孔底,未见死亡的圆形细胞漂浮,细胞胞浆中没有气泡,也无细胞核皱缩等病变情况。MTT 染色后吸光度值比较,实验组稍低于对照组。实验组的 OD 值和细胞 RGR 均略低于对照组。经统计分析表明,实验组和对照组的 OD 值在相同时间点无显著性差异 ($P > 0.05$),说明材料对成骨细胞的生长无抑制作用,实验 n-HA 根充糊剂未表现出细胞毒性,而表现出较高的细胞增殖率,实验组细胞毒性分级为 1 级,即无细胞毒性作用,且随着材料浸提液浓度的降低和培养时间的延长,细胞毒性趋于 0 级。因此,本实验证明 n-HA 与活细胞的直接接触,并未见细胞毒性作用。

材料与细胞接触时间的长短也是影响细胞毒性实验结果的一个因素。通常情况下,随时间的延长,材料的细胞毒性增大。在本实验中,虽然实验组的细胞增殖率略低于对照组,但 3 个浓度的实验组材料测定的相对细胞增殖率值并未随观察时间延长而降低,说明实验组可能有一些细胞受损,但是存活的细胞仍具有较高的增殖能力。

由于体外实验本身的局限性,在将新材料应用于临床前应进行系统性的实验研究,而不能根据某方面或某个水平的结果就得出生物相容性的结论。细胞毒性评价作为一种体外实验,不能准确模拟体内实际环境,测试结果与体内实验往往有较大差异,但其具有省力省经费的优点,通常是将其作为初筛实验。本实验是系列实验的一部分,对 n-HA 的细胞毒性研究,将为进一步研究其生物学性能提供一定的实验数

据和基础。本实验结果表明 n-HA 根充糊剂符合生物体应用的基本要求,可以进行活体组织的后续实验,对该材料的客观评价也将有赖于从细胞到动物实验结果的综合评价。

至今为止,尚没有一种根管充填材料能完全符合理想的标准,所以对根管充填材料的研究仍处于不断的探索中,希望理想的根管充填材料及理想的生物性能评价方法能尽早出现。

[参考文献]

- 1] Gomes ME, Reis RL, Cunha AM, et al. Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymers: Effect of several additives and processing conditions J. *Biomaterials*, 2001, 22(13): 377-382.
- 2] Mosmann T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays J. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1-2): 55-63.
- 3] Willershausen B, Marroquin BB, Schafer D, et al. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines J. *J Endod*, 2000, 26(12): 703-711.
- 4] Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, et al. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components J. *Dent Mater*, 2002, 18(4): 318-323.
- 5] Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, et al. Cytotoxic interactive effect of dentin bonding components on mouse fibroblasts J. *J Dent Res*, 1995, 74(9): 1602-1607.
- 6] Ramirez P, Cosentino F, Milella E, et al. *In vitro* response of primary rat osteoblasts to titanium/hydroxyapatite coatings compared with transformed human osteoblast-like cells J. *Mater Sci*, 2002, 13(8): 798-801.
- 7] Denissen H, van Beek E, van den Bos T, et al. Hydroxyapatite and fluor-hydroxyapatite layered film on titanium processed by a sol-gel route for hard-tissue implants J. *J Biomed Mater Res*, 2004, 71B(1): 66-76.
- 8] Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, et al. Differentiation of osteoblasts and *in vitro* bone formation from murine embryonic stem cell J. *Tissue Eng*, 2001, 7(1): 89-99.
- 9] Tampieri A, Celotti G, Sprio S, et al. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone J. *Biomaterials*, 2001, 22(11): 1365-1370.
- 10] Rupprecht RD, Horning CM, Towle HJ. A clinical evaluation of hydroxyapatite cement in the treatment of Class furcation defects J. *J Periodontol*, 2001, 72(10): 1443-1450.
- 11] Ersev H, Schmalz G, Bayirli G, et al. Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cells *in vitro* J. *J Endod*, 1999, 25(5): 359-363.

(本文编辑 汤亚玲)