

## 聚乳酸可吸收根管桩膜生物相容性实验

赵哲珊 黄华 邱荣敏 韦克珍 李丽娟

广西医科大学附属口腔医院儿童牙病科, 南宁 530021

**[摘要]** **目的** 检测通过溶剂挥发成膜法制备的聚乳酸可吸收根管桩膜的生物相容性。**方法** 采用溶剂挥发成膜法制备聚乳酸根管桩膜, 进而制备聚乳酸桩膜浸提液, 检测聚乳酸桩膜的生物相容性。体外培养人牙龈成纤维细胞(HGF), 用聚乳酸桩膜浸提液培养HGF, 采用形态学观察法、四甲基偶氮唑盐(MTT)法、流式细胞术检测HGF的形态学变化、细胞毒性反应及活细胞率。将HGF接种于聚乳酸桩膜上, 通过4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色观察HGF在聚乳酸桩膜上的生长情况。将聚乳酸桩膜植入到SD大鼠皮下, 于第1、4、8、12周从动物背部取出植入材料及周围皮下组织, 观察切口大体表现, 并对组织行苏木精-伊红染色, 通过观测炎症细胞浸润程度检验材料对局部组织炎症和异物反应的情况。**结果** 聚乳酸桩膜浸提液对HGF的增殖无明显影响, 无明显细胞毒性; HGF可在聚乳酸桩膜上黏附和生长。皮下植入实验: 实验组标本的大体观察和苏木精-伊红染色观察结果均与对照组相似, 符合生物安全性要求。**结论** 通过溶剂挥发成膜法制备的聚乳酸可吸收根管桩膜具有良好的生物相容性, 可用于进一步临床研究。

**[关键词]** 溶剂挥发法; 聚乳酸; 根管桩; 乳牙; 生物相容性

**[中图分类号]** R 788 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2016.05.006

**Biocompatibility of polylactic acid-absorbable root post film** Zhao Zheshan, Huang Hua, Qiu Rongmin, Wei Kezhen, Li Limei. (Dept. of Pediatric Dentistry, Hospital of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Supported by: Clinical Research Funds Project for Oral Health Promotion and Oral Medicine Development in Western of China Hold by Chinese Stomatological Association (CSA-W2012-01). Correspondence: Huang Hua, E-mail: huanghua58430@126.com.

**[Abstract]** **Objective** To study the biocompatibility of the polylactic acid (PLA)-absorbable root post film prepared by solvent evaporation film. **Methods** The PLA post film-leaching liquor was prepared by the solvent evaporation of PLA root post films, and its biocompatibility was measured. Sources of human gingival fibroblasts (HGF) were cultivated *in vitro* and identified initially by the immunohistochemistry method. The toxicity reaction, survival rate, and morphological change of HGF incubated in PLA post film-leaching liquor were observed and tested by morphological observation, 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, and flow cytometry. The HGF were implanted on the PLA post film and observed by 4',6-diamidino-2-phenylindole staining. After implanting the PLA post film, the surrounding subcutaneous tissue of SD rats and the implants were removed from the back of the rats in the 1st, 4th, 8th, and 12th weeks to observe the general condition of the incisions. The organization was given the hematoxylin-eosin (HE) stain to find the organization condition of local tissue inflammation and foreign body reaction through the infiltration degree of inflammatory fibroblasts. **Results** The effects of the PLA post film-leaching liquor on the proliferation of HGF and fibroblast toxicity were insignificant. The living fibroblast rate was similar to the normal control group. The HGF were able to grow on the PLA film. The results of the organization general observation and HE staining of the rats were similar to the results for the control group, which met all the demands made by biological safety. **Conclusion** The PLA-absorbable root post film prepared by the solvent evaporation film has good biocompatibility and can be used for further clinical research.

**[收稿日期]** 2016-04-05; **[修回日期]** 2016-07-02

**[基金项目]** 中华口腔医学会口腔健康促进与口腔医学发展西部行临床科研基金(CSA-W2012-01)

**[作者简介]** 赵哲珊, 硕士, E-mail: zhaozheshan@126.com

**[通信作者]** 黄华, 主任医师, 硕士, E-mail: huanghua58430@126.com

**[Key words]** solvent evaporation method; polylactic acid; root post; deciduous teeth; biocompatibility

随着生物可吸收材料的发展, 聚乳酸(polylactic

acid, PLA)类材料已广泛应用于临床,最常见的是用于骨科内固定<sup>[1-2]</sup>。基于乳恒牙替换的生理现象,乳牙残根残冠的治疗也逐渐向可吸收根管桩修复方向发展,并取得了良好的效果<sup>[3]</sup>。目前的主要问题在于没有相应的可吸收黏结剂,多使用玻璃离子黏结剂粘接修复乳牙残根残冠,但玻璃离子黏结剂是不可吸收性材料,对乳恒牙替换存在隐患。采用溶剂挥发成膜法制备成与PLA螺纹桩材质相同的PLA桩膜,可作为PLA可吸收螺纹桩的辅助固位与封闭材料。由于在桩膜制备过程中使用了有机溶剂氯仿,因此本研究的目的在于观察PLA根管桩膜的生物相容性,为临床应用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

DMEM培养基(Hyclone公司,美国),胰蛋白酶(Sigma公司,美国),胎牛血清(维森特公司,加拿大),二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(上海生工生物工程有限公司),四甲基偶氮唑盐[3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT](Sigma公司,美国),鼠抗人波形丝蛋白抗体、鼠抗人细胞角蛋白抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)。Inion OTPS®医用PLA可吸收接骨螺纹桩、细胞凋亡试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)。4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)溶液(北京索莱宝科技有限公司),苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色剂(福州迈新生物技术开发有限公司)。ELX-800型酶标仪(Bio-Rad公司,美国),超净工作台(苏州净化设备厂),CO<sub>2</sub>培养箱(Forma scientific公司,美国),倒置显微镜(Olympus公司,日本)。AO-820型组织切片机(美国光学AO公司),OLYMPUS-BX41型光学显微镜(Olympus公司,日本)。SD大鼠(广西医科大学动物实验中心)。

本研究于口腔颌面修复与重建研究实验室(广西壮族自治区重点实验室)、颌面外科疾病诊治研究实验室(广西高校重点实验室)中完成。

### 1.2 方法

1.2.1 PLA桩膜及PLA桩膜浸提液的制备 将Inion OTPS®医用PLA可吸收接骨螺纹桩0.4 g和氯仿20 mL置于棕色瓶中,密闭保存,让其充分溶解呈油状;将0.2 mL溶解液涂布在7 mm×20 mm的医用载玻片上,置于37℃干燥箱中干燥48 h后,得到宽7 mm、长20 mm的薄膜<sup>[4]</sup>。

将PLA桩膜经环氧乙烷灭菌处理后,按照中华人

民共和国医疗器械生物学评价标准的规定,将无菌试样放入无菌试管,加入含10%胎牛血清的DMEM培养基,置于37℃培养箱中培养72 h获取浸提液。要求试样浸提液量与试样表面积比率为6 cm<sup>2</sup>·mL<sup>-1</sup>,制备出PLA桩膜浸提液备用。阴性对照组为含10%胎牛血清的DMEM培养基,阳性对照组为含0.64%苯酚的10%胎牛血清DMEM培养基。

1.2.2 人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblasts, HGF)的培养及初步鉴定 牙龈组织取材于广西医科大学口腔医院口腔颌面外科门诊因正畸拔牙且无牙龈炎症的患者(牙龈组织为正畸牙牙颈部粘连的部分牙龈组织,取材均经患者知情同意后进行)。患者年龄12~18岁。获取的牙龈组织用含青霉素和链霉素的PBS溶液和无血清培养液各反复冲洗3遍,去除血液,手术剪剪碎,要求组织块大小<1 mm<sup>3</sup>。将小块组织均匀铺开,接种于50 mL细胞培养瓶中,加入少量含胎牛血清的DMEM培养液,在饱和湿度、37℃并含5%CO<sub>2</sub>标准环境下培养。倒置显微镜下观察细胞生长状况,当铺满培养板面积的80%时,用0.25%的胰蛋白酶消化传代,培养基更换为含胎牛血清的DMEM。

取生长状态良好的第4代HGF,制备细胞爬片,用SABC法进行波形丝蛋白和角蛋白染色,进行细胞来源鉴定,光镜观察。

取生长状态良好的第4代HGF,待细胞爬满瓶底50%后,实验组更换为PLA可吸收根管桩膜浸提液培养,阴性对照组仍使用10%胎牛血清的DMEM培养液培养,阳性对照组更换为含0.64%苯酚的10%胎牛血清DMEM培养液培养,待阴性对照组细胞爬满瓶底80%时,倒置显微镜观察细胞生长情况。

1.2.3 细胞毒性试验(MTT法) 取第4代生长良好的人HGF接种于96孔板,每块孔板随机分为阴性对照组(每孔加200 μL含10%胎牛血清的DMEM培养液),实验组(每孔加200 μL PLA可吸收根管桩膜浸提液),阳性对照组(每孔加200 μL含0.64%苯酚的10%胎牛血清DMEM培养液)。在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养,分别于诱导培养后1、3、5、7 d,向每孔加MTT液20 μL,每时间点各8孔。37℃孵育4 h后加DMSO(每孔150 μL),600 r·min<sup>-1</sup>振荡10 min,用酶标仪在490 nm处测定吸光度A值,求均值并记录结果,得到各组的细胞生长曲线,重复实验3次。按以下公式计算细胞相对增殖率(relative growth rate, RGR)。RGR=实验组A值/空白对照组A值×100%。根据细胞毒性分级标准(RGR≥100%,毒性分级为0级;RGR为75%~99%、50%~74%、25%~49%、1%~24%、0%时,毒性分级分别为1、2、3、4、5级),

将各组RGR值转化为0~5级材料毒性评级。

1.2.4 细胞凋亡检测 取第4代HGF置于75 cm<sup>2</sup>培养瓶中,加含10%胎牛血清的DMEM,在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养,待细胞长至50%时,实验组更换PLA可吸收根管桩膜浸提液为培养基,对照组为含10%胎牛血清的DMEM培养基,继续培养,待细胞汇合至80%时,用流式细胞仪检测细胞的存活率。

1.2.5 DAPI染色 取第4代HGF,接种于PLA可吸收桩膜上,培养48 h后除去细胞培养液,4%多聚甲醛固定30 min, PBS洗去固定液。加入DAPI染色液,常温下避光染色10 min。PBS洗涤3次,每次5 min。置于荧光显微镜下观察拍照。

1.2.6 PLA可吸收桩膜皮下植入实验 将Inion OTPS®医用PLA可吸收接骨螺纹桩截为3.5 mm长, PLA桩膜裁剪为3.5 mm×20 mm大小。将PLA桩膜以逆时针方向缠绕在PLA可吸收螺纹桩上,每截可吸收螺纹桩缠绕3片薄膜为实验组。对照组为不缠绕桩膜的PLA可吸收螺纹桩。

选择24只180~220 g的雌性SD大鼠进行实验。大鼠经1%戊巴比妥钠(30 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉后,俯卧位固定于实验台上,背部去毛,消毒后铺无菌巾,沿脊柱两侧纵行做两个长5 mm左右的切口,相互间距大于10 mm。用钝器在皮下制备皮囊,使囊的末端距切口大于10 mm,且能轻松放入实验材料。按随机法分组,一个皮囊内植入实验组材料,另一个皮囊内植入对照组材料,缝合手术切口,聚维酮碘消毒切口。所有动物手术后继续饲养。于第1、4、8、12周4个时间点从动物背部取出植入材料及周围皮下组织,观察切口的大体表现。标本用4%甲醛溶液固定,石蜡包埋,制备组织切片,HE染色,通过观察炎症细胞的浸润程度检测各组材料的局部组织炎症和异物反应情况。

1.2.7 统计学处理 采用SPSS 16.0统计软件对数据进行单因素方差分析,检验水准为双侧 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

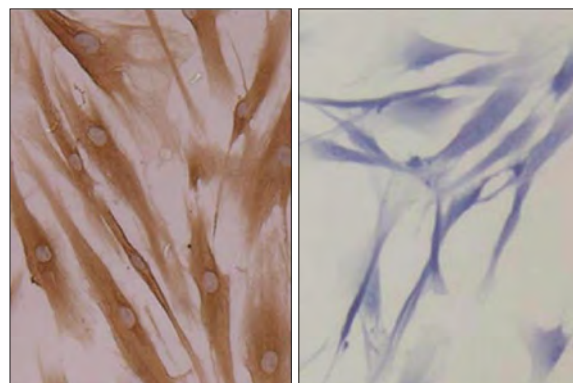
### 2.1 细胞来源鉴定及形态学观察结果

倒置显微镜下观察可见,约7 d左右,HGF从组织块游出,生长状态良好,为成纤维样细胞,传代后细胞生长旺盛,性状稳定。第4代细胞呈长梭形,胞体丰满,细胞质均匀,细胞核呈圆形或卵圆形,核仁清晰。免疫细胞化学结果显示:HGF抗波形丝蛋白染色阳性,抗角蛋白染色阴性(图1),提示培养的细胞为间充质来源细胞。PLA浸提液诱导培养后,实验组与阴性对照组比较,细胞形态无明显

差异;阳性对照组细胞形态改变,细胞凋亡增多。

### 2.2 细胞毒性检测

实验组、阴性对照组和阳性对照组的细胞生长曲线见图2:阴性对照组和实验组HGF在4个时间点的增殖能力差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),但均高于阳性对照组( $P<0.05$ )。随着培养时间的延长,阴性对照组和实验组A值相应增加,换算成细胞毒性级别如下:实验组在第1天细胞毒性分级为1级,第3、5、7天均为0级,阳性对照组均为4级。该结果提示,PLA根管桩膜无明显的细胞毒性。



左:抗波形丝蛋白染色阳性;右:抗角蛋白染色阴性。

图1 HGF来源鉴定 光学显微镜 ×200

Fig 1 HGF sources identification optical microscope ×200

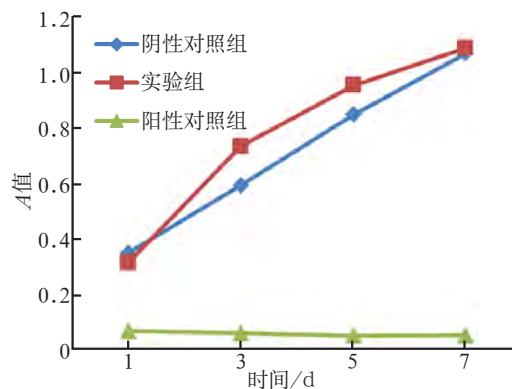


图2 各组HGF的细胞生长曲线

Fig 2 Cell growth curves of HGF in each group

### 2.3 细胞凋亡检测

流式细胞分析结果显示,对照组活细胞百分率为92.5%,实验组活细胞百分率为88.8%,均在正常范围内,表明PLA根管桩膜浸提液对HGF的生长无明显影响。

### 2.4 DAPI染色

DAPI染色结果见图3:细胞核呈典型蓝色荧光,提示PLA可吸收根管桩膜表面有成纤维细胞黏附和生长。

### 2.5 PLA可吸收桩膜皮下植入实验

2.5.1 手术后大体标本观察结果 1) 术后1周,实验



组可见背部皮肤切口愈合良好,切口无脓肿、感染。肉眼观察大体标本可见植入材料与周围组织接触良好,未见明显移位,材料周围有大量的炎症肉芽组织增生。对照组标本所见与实验组基本相同。2)术后4周,实验组可见大鼠背部切口完全愈合,局部无红肿和积液;材料未见移位,周围被致密纤维组织包裹,囊壁较厚。对照组标本所见与实验组基本相同。3)术后8周,实验组材料未移位,可见纤维结缔组织包裹,组织与材料结合紧密。对照组标本所见与实验组基本相同。4)术后12周,实验组材料未移位,可见大量纤维结缔组织包裹,与材料接触紧密,分离困难。对照组标本所见与实验组基本相同。

**2.5.2 HE染色** 两组的HE染色结果见图4。1)术后1周,实验组材料周围组织可见较多的炎症细胞浸润,以中性粒细胞及淋巴细胞为主,无组织坏死;对照组材料周围也有类似反应。2)术后4周,实验组可见淋巴细胞、成纤维细胞、浆细胞和单核细胞

浸润;对照组也有类似反应。3)术后8周,实验组以纤维结缔组织增生为主,炎症细胞数目明显减少,纤维细胞的数目和比例均增大;对照组也有类似反应。4)术后12周,实验组炎症反应不明显,可见大量的成纤维细胞和较少量的炎症细胞;与对照组没有明显区别。

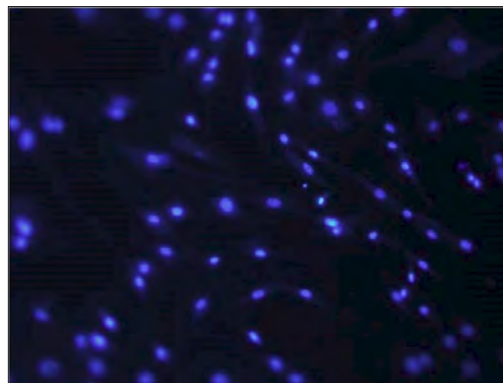
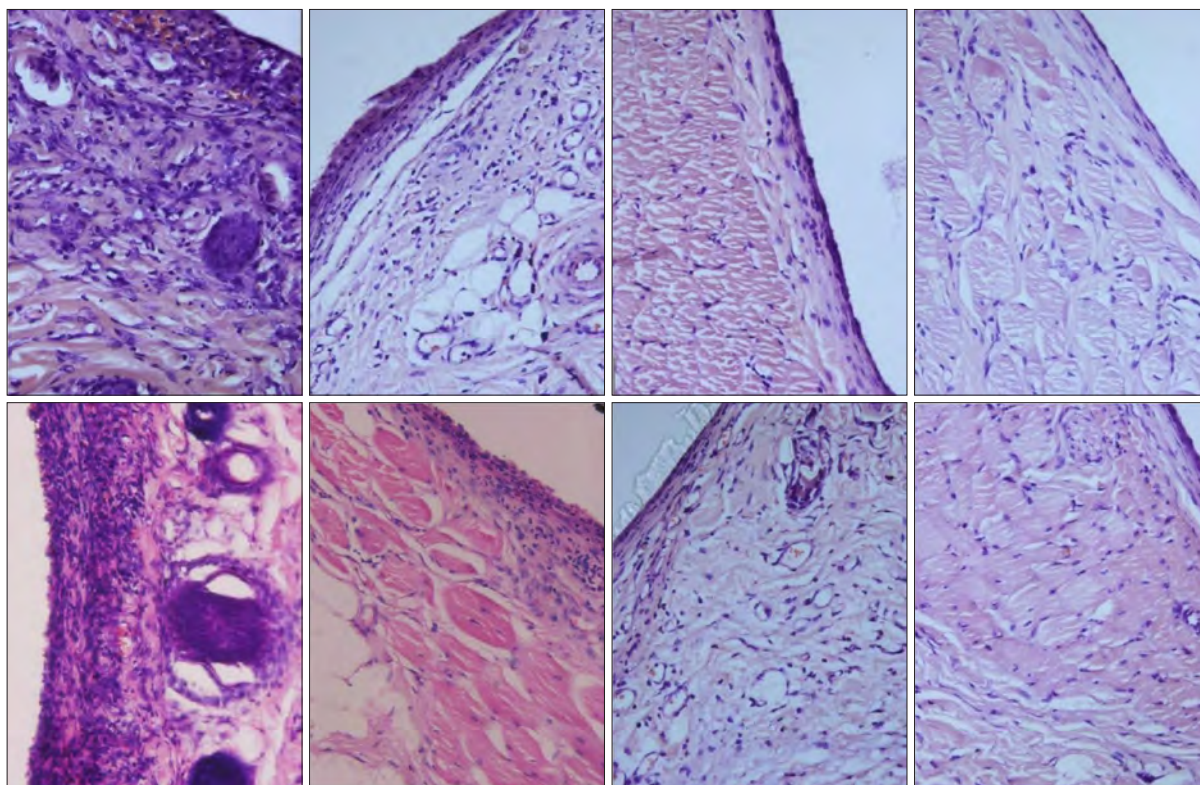


图3 DAPI染色 荧光显微镜 ×100

Fig 3 DAPI staining fluorescence microscope ×100



上:对照组;下:实验组;从左至右依次为1、4、8、12周。

图4 实验组和对照组的组织学检测 HE ×200

Fig 4 Histology detection of experimental group and control group HE ×200

### 3 讨论

乳牙残冠残根常因无可吸收修复材料而拔除,乳牙早失不仅会影响患儿的美观和发音,还会影响

乳恒牙替换与颌骨发育<sup>[5-6]</sup>。随着生物材料学的发展,越来越多的可吸收材料应用于临床。目前常用的可吸收材料主要为聚乳酸类,例如PLA、聚乙醇酸、乳酸-乙醇酸共聚物等制品。因为这些材料具有良好的力学性能、生物降解性能和生物学性能,所

以得到越来越多的关注<sup>[7]</sup>。

目前尚无与乳牙可吸收桩配套的可吸收粘接系统。借鉴水暖安装工程<sup>[8]</sup>中以高分子材料聚四氟乙烯生料带封闭螺纹连接管道,使管内物质不向外泄露的方法,采用溶剂挥发成膜法制备与PLA可吸收桩材质相同的PLA可吸收桩膜,可以作为桩的固位与封闭材料,为PLA可吸收桩提供了可以同步吸收的粘接系统。研究<sup>[9-10]</sup>表明,PLA可吸收桩膜的封闭性能与玻璃离子粘接剂相似,对根管封闭性能良好,且可吸收根管桩缠绕桩膜修复残根后的抗折力能满足临床需求,可用于乳牙残根残冠的修复。

因为在可吸收桩膜制备过程使用了有机溶剂氯仿,故需进行生物相容性实验,以便检测其安全性。生物学评价包括细胞毒性试验、动物实验和临床前试验<sup>[11]</sup>。体外细胞毒性试验对口腔材料的初级筛选起到了非常重要的作用,节约了大量的资源 and 时间。此外,细胞实验还可直接观察细胞与材料的复合生长情况,操作相对简单,可控性强<sup>[12]</sup>。动物实验较细胞实验结果更接近人体实际,弥补了体外实验难以模拟的综合反应。由于没有一种实验能够完全反映出材料的生物相容性,故细胞毒性试验和动物实验均是口腔材料生物相容性评价不可或缺的环节。

本实验结果表明:PLA可吸收根管桩膜对HGF生长无明显影响,毒性评级为0~1级,无毒;HGF可在桩膜上生长;加入浸提液培养后,活细胞百分率与对照组无明显差别;大鼠组织大体观察和HE染色观察结果与对照组相似,符合生物安全性要求。由此可以推测,PLA根管桩膜的出现可以推进PLA根管桩在临床上的使用,为乳牙残根残冠修复提供了新的手段。

#### [参考文献]

[1] Moure C, Qassemayr Q, Dunaud O, et al. Skeletal stability and morbidity with self-reinforced P(l/dL)LA resorbable osteosynthesis in bimaxillary orthognathic surgery[J]. J Craniomaxillofac Surg, 2012, 40(1):55-60.

[2] Choi JY, Kim JW, Yoo CK, et al. Evaluation of post-surgical relapse in maxillary surgery using resorbable plate[J]. J Craniomaxillofac Surg, 2011, 39(8):578-582.

[3] 邹艳萍. 聚乳酸乳牙根管桩的生物相容性及临床应用的实验研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2010.

Zou YP. The experimental research of the clinical application and biocompatibility of polylactic-aciddeciduous teeth root canal dowel[D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2010.

[4] 黄华, 陈爱华, 周永明. 用于增强乳牙可吸收根管桩密闭的可吸收聚乳酸薄膜[P]. 中国: CN103349797A, 2015-04-01.

Huang H, Chen AH, Zhou YM. The absorbable polylactic-acid film using for strengthening the tightness of the deciduous teeth absorbable root canal dowel[P]. China: CN103-349797A, 2015-04-01.

[5] Lin YT, Chang LC. Space changes after premature loss of the mandibular primary first molar: a longitudinal study[J]. J Clin Pediatr Dent, 1998, 22(4):311-316.

[6] Tunison W, Flores-Mir C, ElBadrawy H, et al. Dental arch space changes following premature loss of primary first molars: a systematic review[J]. Pediatr Dent, 2008, 30(4):297-302.

[7] Pihlajamäki H, Böstman O, Tynnenen O, et al. Long-term tissue response to bioabsorbable poly-L-lactide and metallic screws: an experimental study[J]. Bone, 2006, 39(4):932-937.

[8] 徐峰. 水暖工入门[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2007: 73.

Xu F. Plumber introduction[M]. Hefei: Anhui Science & Technology Publishing House, 2007:73.

[9] 侯玉妹, 黄华, 周永明. 聚乳酸可吸收薄膜对可吸收螺纹桩封闭性能的微渗漏研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2015, 25(10):610-614.

Hou YM, Huang H, Zhou YM. Microleakage of endodontically treated teeth restored with polylactic acid absorbable screw post and membrane[J]. Chin J Conserv Dent, 2015, 25(10):610-614.

[10] 陈爱华, 黄华. 聚乳酸可吸收根管桩修复残根后的抗折力研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2014, 24(10):592-595.

Chen AH, Huang H. Experiment study on fracture resistance of endodontically treated residual root by polylactic acid absorbable intracanal post[J]. Chin J Conserv Dent, 2014, 24(10):592-595.

[11] 聂蕾. 口腔贱金属合金修复体的生物相容性试验[J]. 国际口腔医学杂志, 2015, 42(1):79-83.

Nie L. Biocompatibility evaluation of oral base metal alloy prosthesis[J]. Int J Stomatol, 2015, 42(1):79-83.

[12] 王彦梅, 何家才, 李全利, 等. 海藻酸钙-纳米羟磷灰石骨修复材料的制备及部分生物相容性测定[J]. 华西口腔医学杂志, 2014, 32(1):27-31.

Wang YM, He JC, Li QL, et al. Preparation of sodium alginate-nanohydroxyapatite composite material for bone repair and its biocompatibility[J]. West Chin J Stomatol, 2014, 32(1): 27-31.

( 本文编辑 吴爱华 )