

[文章编号] 1000-1182(2008)01-0031-05

无机抗菌剂对自酸蚀处理剂全身毒性和细胞毒性影响的研究

方明^{1,2}, 陈吉华¹, 柴枫², 贾敏³, HILDEBRAND Hartmut F²

(1.第四军医大学口腔医院 修复科, 陕西 西安 710032;

2.Groupe de Recherche sur les Biomatériaux, Laboratoire de Biophysique UPRES EA 1049,

Faculté de Médecine, Université de Lille 2, F-59045 Lille Cedex, France;

3.第四军医大学药理学系 药理教研室, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 测试无机抗菌剂的添加对新型实验自酸蚀处理剂(ESP)全身毒性和细胞毒性的影响。方法 将6种无机抗菌剂分别加入ESP中,进行经口途径大鼠短期全身毒性实验。并采用受试材料与NIH3T3细胞直接接触培养的方法,观测其对细胞增殖、活力和形态的影响。结果 抗菌剂添加比为5.0%时,为期2周的大鼠全身毒性实验中未发现临床毒性体征,各组间大鼠体重相对增长率无显著差异。经含质量浓度为0.5%不同抗菌剂的处理剂处理固化后的各实验组细胞活力比率和细胞增殖率与ESP空白对照组相比无显著差异。仅样本覆盖区及样本边缘邻近区域细胞可观察到毒性表现,远离样本覆盖区的细胞密度未受明显影响。结论 以适当的质量浓度添加受试的无机抗菌剂对受试ESP的全身毒性和细胞毒性无显著影响。

[关键词] 无机抗菌剂; 自酸蚀处理剂; 全身毒性; 细胞毒性

[中图分类号] R783.1 [文献标识码] A

Influence of inorganic antibacterial agents on the systemic toxicity and cytotoxicity of a self-etching primer
FANG Ming^{1,2}, CHEN Ji-hua¹, CHAI Feng², JIA Min³, HILDEBRAND Hartmut F². (1. Dept. of Prosthodontics, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China; 2. Groupe de Recherche sur les Biomatériaux, Laboratoire de Biophysique UPRES EA 1049, Faculté de Médecine, Université de Lille 2, F-59045 Lille Cedex, France; 3. Dept. of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China)

[Abstract] Objective To evaluate the influence of incorporating inorganic antibacterial agents on the systemic toxicity and cytotoxicity of an experimental self-etching primer(ESP). Methods Six kinds of inorganic agents were incorporated respectively into the primer. Systemic toxicity in vivo tests in rats and direct contact in vitro cytotoxicity tests with NIH fibroblasts were conducted. Results Systemic toxicity tests revealed neither toxic manifestations nor significant differences in body weight gain between control and other groups. There were no significant differences between experimental groups and empty control on cell vitality and cell proliferation rates. Toxicity was only observed in areas beneath the specimens and/or in the direct vicinity of the specimen edge. There was no influence on the cell density over the limit of specimens. Conclusion The incorporation of tested inorganic antibacterial agents with a proper concentration had no significant influence on the systemic toxicity and cytotoxicity of the tested self-etching primer.

[Key words] inorganic antibacterial agent; self-etching primer; systemic toxicity; cytotoxicity

本课题组前期的工作证实6种不同种类的无机抗菌剂对几种常见的口腔致病菌具有明显的抗菌活

性^[1],将它们加入到一种自行研制的实验自酸蚀处理剂(experimental self-etching primer, ESP)中,在固化前后均具有良好的抗菌活性^[2]。以质量浓度为0.5%的比例在ESP中添加抗菌剂对粘接系统的粘接性能及颜色稳定性也无显著影响^[3]。对于自酸蚀处

[收稿日期] 2007-02-26; [修回日期] 2007-05-24

[作者简介] 方明(1978-),女,江苏人,主治医师,博士

[通讯作者] 陈吉华, Tel: 029-84776329

理剂而言,它通常与牙体组织和牙科粘接剂发生作用,并且被树脂修复材料覆盖。所以一般不会直接接触唾液,除非修复体边缘封闭不良而存在微渗漏。因此,这种材料在体内最可能发生的毒性作用应该是对成牙本质细胞或牙髓细胞的损伤。而临床应用前材料的体外生物相容性测试对于评估和推断材料对人体潜在的毒性作用十分必要。本研究旨在通过经口途径大鼠短期全身毒性实验和细胞毒性实验评价添加抗菌剂的ESP的生物相容性。

1 材料和方法

1.1 材料

Thermanox盖片(Nunc公司,美国)直径为13 mm,

表 1 受试的无机抗菌剂的品名及其主要成分

Tab 1 Tested inorganic antibacterial agents and their main components

代码	无机抗菌剂品名	主要成分	生产厂家
ABA1	碱式次氯酸镁	MgClO(OH) ₃ ·H ₂ O	湖南化工研究院功能材料所
ABA2	龙贝无机抗菌粉体	沸石为载体,载Cu, Zn	江苏常泰纳米材料有限公司
ABA3	安迪美-AMS2	硅酸盐为载体,载Zn, Ag, Cu	北京崇高纳米科技有限公司
ABA4	IONPURE-H	可溶性玻璃为载体,载Ag, Cu	日本石塚硝子株式会社
ABA5	氧化锌晶须(Zinc Oxide Whisker, ZnOw)复合抗菌剂AT-83	四针状ZnOw为载体,载Ag, Cu	成都交大晶宇科技有限公司
ABA6	ZnOw AT-88	ZnOw为载体,载Cu	成都交大晶宇科技有限公司

1.3 经口途径大鼠短期全身毒性实验

选用80只6-8周龄的Sprague-Dawley大鼠,体重为130-150 g,按照性别随机分为8组(n=10),每组雌雄各半,分别为阴性对照组、ESP空白对照组和6个实验组。以2%淀粉溶液为分散介质制备含材料的混悬液,含有或不含质量浓度为5.0%抗菌剂的ESP以20%的质量浓度添加至淀粉溶液中,分别用于实验组和ESP空白对照组,纯淀粉溶液为阴性对照组。大鼠每日灌胃1次,给药剂量为每千克体重每天5 mL含材料的淀粉溶液。给药持续1周,停药后继续观察1周。每天记录大鼠体重,应用方差分析和LSD法来比较实验组与对照组间的差异。观察动物临床毒性体征,记录毒性级别。实验结束后处死大鼠并尸解,必要时常规组织病理切片进一步检查。

1.4 细胞生物相容性实验

1.4.1 样本制备 应用灭菌的Thermanox盖片替代树脂作为粘接剂和ESP的载体。该材料为聚对苯二甲酸乙二醇酯,具有良好的生物相容性,常用于细胞培养^[5]。将5 μL Adapter™ Singlebond 2均匀涂布于Thermanox盖片表面一薄层,光固化20 s,涂布5 μL不含或含有0.5%抗菌剂的ESP,光固化40 s。将样本浸于灭菌蒸馏水中,室温下在摇床上轻微振摇1 h以去除未固化的成分,然后在无菌环境下自然干燥。

厚度为0.2 mm, Adapter™ Singlebond 2(3M ESPE公司,美国), DMEM培养基(Gibco公司,美国), UptiBlue(Interchim公司,法国), 6孔板(Corning公司,美国), 96孔板(Nunc公司,丹麦), Coulter Z1细胞计数器(Coulter Electronics公司,英国), 培养皿(Nunc公司,丹麦)直径为60 mm, 新生小牛血清(Gibco公司,新西兰)。

1.2 无机抗菌剂和实验自酸蚀处理剂

受试抗菌剂的品名、主要成分以及生产厂家见表1。本实验中受试的自酸蚀处理剂是一种自行研制的产品,其主要成分是马来酸、甲基丙烯酸羟乙酯和丙酮^[4]。

样本共分为10组,其中包括6个实验组和4个对照组。未行任何处理的培养孔底部作为阴性对照组,未行任何处理的盖片作为载体对照组,仅涂布粘接剂的盖片作为粘接剂对照组,经粘接剂和不含抗菌剂的ESP处理的盖片作为ESP空白对照组。

1.4.2 细胞培养 根据国际标准ISO10993-5,选用已建系的NIH3T3小鼠结缔组织成纤维细胞株ATCC CRL1658,应用添加了10%热灭活新生小牛血清的DMEM培养基,在37℃、100%相对湿度、体积分数为5%CO₂的孵箱内培养。将5 mL含90 000个细胞的培养基接种至6孔板中。孵育48 h后细胞达到亚融合状态。弃除培养基,小心的放入样本,加入2 mL新鲜培养基。每组3个样本,培养24 h后取出样本,进行细胞增殖和细胞活力测试。实验重复5次。

1.4.3 细胞活力测试 细胞活力测试采用一种无毒的Alamar blue活细胞计数试剂UptiBlue,可在细胞增殖测试的同时进行,Alamar blue内含氧化还原指示剂,可根据细胞生长引起培养基的还原反应发生荧光和颜色的改变^[6]。细胞活力越旺盛,荧光光密度值越高,含Alamar blue的培养基的颜色也由蓝变为粉红。细胞在含10%Alamar blue的培养基中孵育3 h后,取出培养液分注至96孔板中,每孔0.2 mL,每样本可注3孔。进行荧光测试。将实验组荧光光

密度值除以阴性对照组荧光光密度值得到相对细胞活力比率。实验数据进行方差分析和Scheffe组间两两检验。

1.4.4 细胞增殖测试 消化培养孔中的细胞，用Coulter Z1细胞计数器计算细胞数目^[7]。每孔计数3次，将实验组细胞数除以阴性对照组细胞数得到相对细胞增殖率。实验数据进行方差分析和Scheffe组间两两检验。

1.4.5 细胞形态学观察 将含270 000个细胞的培养液6 mL接种至培养皿中孵育48 h达到亚融合状态。每个培养皿中放入一个样本，细胞继续培养24 h后

取出样本，培养皿用2%结晶紫染色后观察，并且照相。另外在24孔培养板中接种密度相同的细胞，同法培养，不取出样本，直接在倒置显微镜下观察，并且照相。

2 结果

2.1 经口途径大鼠短期全身毒性实验结果

无论性别如何，实验组大鼠与对照组相比体重增长率无明显差异($P>0.05$) (表2)。实验期内无大鼠死亡，所有动物均无明显的毒性表现，病理解剖也未观察到明显异常。

表2 雌性和雄性大鼠的体重变化(g, n=10, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Body weights of female rats and male rats (g, n=10, $\bar{x} \pm s$)

分组	雌性大鼠					雄性大鼠				
	第1天	第8天	第15天	第1周的体重增长	第2周的体重增长	第1天	第8天	第15天	第1周的体重增长	第2周的体重增长
阴性对照组	141.2±2.8	175.0±3.3	206.8±2.2	33.8±2.4	31.8±4.9	140.8±5.8	182.4±6.1	227.0±6.7	41.6±1.1	44.6±3.2
ESP空白对照组	140.6±3.8	175.2±3.3	206.8±2.6	34.6±2.3	31.6±2.9	142.2±4.7	183.2±6.1	227.8±9.8	41.0±5.1	44.6±3.5
ESP+ABA1组	142.0±4.9	176.0±3.7	207.2±2.6	34.0±1.2	31.2±2.3	142.8±5.0	184.0±5.5	228.2±6.0	41.2±2.6	44.2±4.4
ESP+ABA2组	141.4±5.1	175.2±4.5	206.8±4.4	33.8±1.1	31.6±4.5	141.8±5.1	184.0±1.4	228.8±3.4	42.2±4.1	44.8±3.3
ESP+ABA3组	141.6±2.2	175.8±4.3	207.2±4.5	34.2±2.2	31.4±3.2	142.6±3.3	184.4±4.6	228.4±4.4	41.8±1.6	44.0±2.4
ESP+ABA4组	141.6±3.1	175.6±2.5	207.6±1.1	34.0±2.5	32.0±1.6	140.6±4.4	182.6±5.1	226.4±4.2	42.0±2.0	43.8±3.1
ESP+ABA5组	141.4±5.4	175.4±5.7	207.2±3.3	34.0±1.4	31.8±2.9	142.6±2.9	184.4±4.4	228.6±4.9	41.8±2.9	44.2±3.4
ESP+ABA6组	138.2±5.4	171.8±6.0	204.2±4.6	33.6±2.2	32.4±3.0	142.8±6.7	184.2±3.7	228.2±5.7	41.4±3.8	44.0±3.5

2.2 细胞相容性测试结果

各实验组样本的相对细胞活力比率和相对细胞增殖率的测试结果见图1。

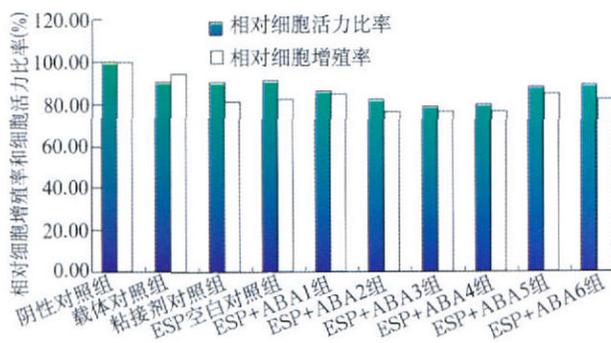


图1 与粘接样本接触24 h后NIH3T3细胞的相对增殖率和活力比率

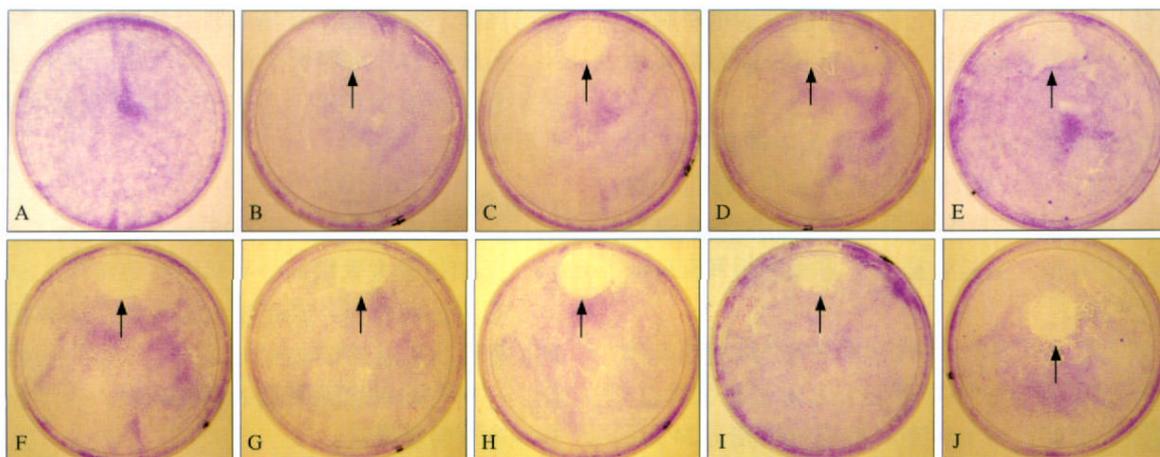
Fig 1 Vitality and proliferation of NIH3T3 fibroblasts after 24 h exposure of cured specimens

由图1可见，各实验组样本的相对细胞活力比率与载体对照组相似或稍低，二者均低于阴性对照组。各组相对细胞活力比率为78%~100%。统计分析9个处理组间及两两比较，其差异均无统计学意义($P>0.05$)。与细胞活力实验相似，各实验组样本相对细胞增殖率比载体对照组稍低，且二者均低于

阴性对照组。各组相对细胞活力比率为76%~100%。统计分析9个处理组间无显著差异($P>0.05$)。组间两两比较发现，ESP+ABA2、ESP+ABA3、ESP+ABA4组较阴性对照组结果显著降低($P<0.05$)。载体对照组与其他任意一组间均无显著差异($P>0.05$)。

载体对照组样本覆盖下有活细胞存留，虽然细胞密度较阴性对照组略低，各实验组样本覆盖区内则少有活细胞幸存，覆盖区外的细胞密度未受明显影响(图2)。高倍镜下可观察到载体对照组样本覆盖区边缘细胞密度明显升高(图3)。

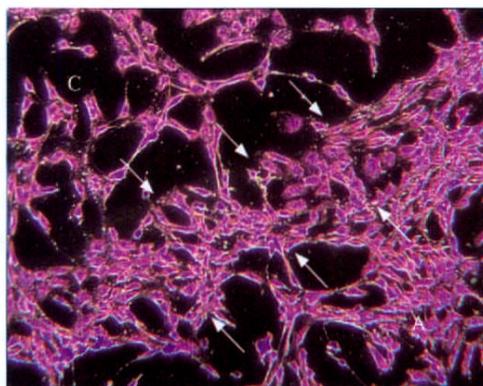
因为Thermanox样本是透明的，可直接观察样本覆盖区边缘的细胞形态。ESP空白对照组样本覆盖区较覆盖区外细胞密度低，但细胞形态正常。ESP+ABA1组样本覆盖区内仍存留相当数量的活细胞，仅经过粘接剂处理的样本覆盖下活细胞存留较少，而ESP+ABA2组的样本覆盖区内几乎无活细胞存留，样本覆盖区外靠近样本边缘的区域中细胞的密度也有所降低。NIH3T3细胞的典型形态为长纺锤形，伸展良好。而样本覆盖区内部分细胞回缩，呈圆形，正常的组织结构消失(图4)。



A: 阴性对照组; B: 载体对照组; C: 粘接剂对照组; D: ESP空白对照组; E: ESP+ABA1组; F: ESP+ABA2组; G: ESP+ABA3组; H: ESP+ABA4组; I: ESP+ABA5组; J: ESP+ABA6组

图2 NIH3T3细胞与粘接样本接触24h后经结晶紫染色的照片, 黑色箭头所指区域为样本覆盖区

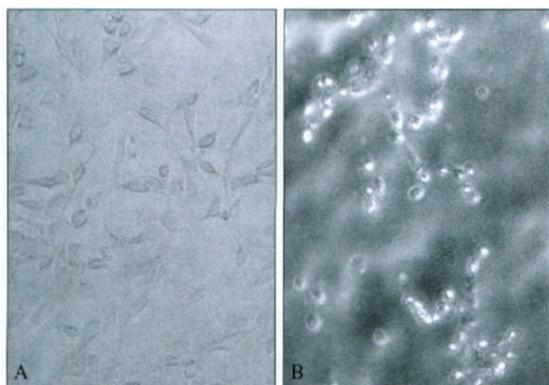
Fig 2 Photos of NIH3T3 fibroblasts stained by crystal violet after 24 h direct exposure of cured specimens, black arrows pointed out the area exposed to the Thermanox specimens



A: 样本覆盖区外; C: 样本覆盖区

图3 未行任何处理的Thermanox样本边缘细胞的显微照片, 箭头所指为样本边缘细胞的密集带 结晶紫染色 ×100

Fig 3 Micrograph of cells in the vicinity of the edge of Thermanox specimens without treatment, cells accumulated densely at the edge of the specimen pointed by arrows crystal violet staining ×100



A: 细胞正常形态; B: 凋亡细胞形态

图4 样本覆盖下的NIH3T3细胞 倒置显微镜 ×200

Fig 4 NIH3T3 cells beneath the specimens inverted microscope ×200

牙科粘接剂发生作用, 并且被树脂修复材料覆盖。所以一般不会直接接触唾液, 除非修复体边缘封闭不良而存在微渗漏。因此, 这种材料在体内最可能发生的毒性作用应该是对成牙本质细胞或牙髓细胞的损伤。本研究采用细胞毒性实验以评价材料固化后是否存在这种损伤的可能性。此外, 也开展了大鼠经口途径短期全身毒性实验以检测实验材料在未固化状态下是否存在全身毒性作用的可能性。

动物实验结果证实, 当抗菌剂添加比为5.0%时, 即便模拟极端状态给大鼠连续灌胃液态的处理剂1周, 在2周观察期内无大鼠死亡, 也未观察到可疑的毒性体征。实验组与对照组相比, 体重增长无显著差异($P>0.05$), 病理解剖也未发现明显异常。

细胞相容性实验根据细胞与实验材料接触方式的不同可分为直接接触、间接接触以及浸提液接触。对于细胞类型的选择, 国际标准ISO 10993-5推荐选用已建立成系的细胞株, 利于取得良好的重复性。近来牙片器官培养被用于齿科材料的细胞毒性检测^[8-9], 它可保持组织结构的完整性以及细胞之间的交互作用, 比其他细胞培养模型能更真实的模拟体内情况。然而牙齿病理学的差异以及个体病史的不同也将影响细胞与受试材料之间的反应, 令重复实验条件的难度增大, 而使实验结果的可信性和可重复性大打折扣^[8-9]。最近一项研究比较了牙片器官培养及建系细胞株培养用于齿科材料细胞毒性检测的差异, 证实应用建系的细胞株或牙片直接接触法测试细胞毒性更为可信, 结果也较为稳定^[9]。因而本实验选择NIH3T3细胞株, 采用直接接触法测试材料的细胞相容性。

细胞活力及细胞增殖实验结果均反映出载体对照组的细胞相容性劣于阴性对照组。究其原因, 有

3 讨论

对于自酸蚀处理剂而言, 它通常与牙体组织和

两种可能的解释:1)形态学观察发现样本覆盖区外缘的细胞密度增大,因为细胞的伸展受到样本的阻碍,而无论操作如何精细,这一密集区中的一部分细胞也难免在样本取出过程中受损。2)载体对照组样本覆盖前及覆盖后24h,样本覆盖下的细胞密度无明显变化,这一区域的细胞似乎停止了增殖,保持在样本覆盖前原有的状态,而细胞形态未发生改变。因此推测是样本重力作用的结果。

临床状态下牙科粘接材料潜在的细胞毒性存在两种可能的表现形式:1)由于直接接触或固化前的扩散作用而诱发牙髓反应;2)固化后由于某些成分的释出而损伤邻近的组织,例如牙周膜及口腔黏膜。大量体外实验报道树脂粘接材料在固化前直接与细胞接触,即便浓度很低也会引发明显的细胞毒性^[10-11]。这可能是pH低和/或材料化学组成引起的。因而,这类材料并不被推荐用于直接盖髓。一些体内实验也证实粘接材料直接覆盖在穿髓点会引起牙髓的退行性变^[12-13]。在多数临床条件下,未固化的处理剂不会直接接触牙髓,也不会被有意涂布到牙周膜或是口腔黏膜上。Hanks等^[14]研究表明剩余牙本质层厚度为0.5mm就足以保护牙髓组织免受毒性物质扩散的影响。由此看来,测试牙科粘接材料固化后的细胞毒性更为重要。

细胞增殖和细胞活力实验结果发现,实验组与ESP空白对照组间无显著差异($P>0.05$)。提示含有或不含抗菌剂的ESP都可能被用于临床粘接操作,但是应严格避免用于直接盖髓,因为它们即使在固化后,对直接接触区域也仍表现出轻微的细胞毒性。综合细胞毒性实验的结果,含ABA1、ABA5或ABA6的ESP固化后的细胞毒性最低。

细胞相容性实验发现,经含质量浓度为0.5%不同抗菌剂的ESP处理固化后的各实验组细胞活力比率和细胞增殖率与空白对照组相比无显著差异。仅样本覆盖区及样本边缘邻近区域细胞可观察到毒性表现,远离样本覆盖区的细胞密度未受明显影响。

致谢:衷心感谢日本SR商事株式会社北京事务所、北京崇高纳米科技有限公司、成都交大晶宇科技有限公司和湖南化工研究院功能材料所陈建文老师无偿提供抗菌剂样品。

[参考文献]

[1] 方明,陈吉华,徐修礼,等.不同种类无机抗菌剂对口腔致病菌抗菌性的比较及其检测方法探讨[J].口腔医学研究,2006,22(1):12-14.
FANG Ming, CHEN Ji-hua, XU Xiu-li, et al. Evaluation the ability of inorganic antibacterial agents against oral pathogenic

bacteria: A method comparison[J]. J Oral Sci Res, 2006, 22(1): 12-14.

[2] 方明, Neut C, 陈吉华, 等. 利用无机抗菌剂研制抗菌自酸蚀处理剂的初步研究[J]. 北京口腔医学, 2007, 15(1): 5-8.
FANG Ming, Neut C, CHEN Ji-hua, et al. Preliminary study of development of antibacterial self-etching primer by incorporating inorganic antibacterial agent[J]. Beijing J Stomatol, 2007, 15(1): 5-8.

[3] 方明, 陈吉华, 沈丽娟, 等. 无机抗菌剂的添加对新型自酸蚀处理剂黏结性能和颜色稳定性的影响[J]. 中国美容医学, 2006, 15(8): 888-892.
FANG Ming, CHEN Ji-hua, SHEN Li-juan, et al. Influence of incorporation of inorganic antibacterial agents on bonding characteristics and color stability of an experimental self-etching primer[J]. Chin J Aesthetic Med, 2006, 15(8): 888-892.

[4] 张凌. 新型自酸蚀偶联剂的相关性能研究[D]. 西安: 第四军医大学口腔医学院, 2003: 29.
ZHANG Ling. The study on experimental self-etching primers and their corresponding capabilities[D]. Xi'an: College of Stomatology of The Fourth Military Medical University, 2003: 29.

[5] Kim HW, Georgiou G, Knowles JC, et al. Calcium phosphates and glass composite coatings on zirconia for enhanced biocompatibility[J]. Biomaterials, 2004, 25(18): 4203-4213.

[6] O'Brien J, Wilson I, Orton T, et al. Investigation of the Alamar Blue(resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(17): 5421-5426.

[7] Linez-Bataillon P, Monchau F, Bigerelle M, et al. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates[J]. Biomol Eng, 2002, 19(2/6): 133-141.

[8] Murray PE, Lumley PJ, Ross HF, et al. Tooth slice organ culture for cytotoxicity assessment of dental materials[J]. Biomaterials, 2000, 21(16): 1711-1721.

[9] Saw TY, Cao T, Yap AU, et al. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials[J]. Toxicol In Vitro, 2005, 19(1): 145-154.

[10] Chen RS, Liu CC, Tseng WY, et al. Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells[J]. J Dent, 2003, 31(3): 223-229.

[11] Becher R, Kopperud HM, Al RH, et al. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two comonomer extracts[J]. Dent Mater, 2006, 22(7): 630-640.

[12] Horsted-Bindslev P, Vilkinis V, Sdlauskas A. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2003, 96(5): 591-600.

[13] Accorinte ML, Loguerico AD, Reis A, et al. Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with the different components from a total-etch, three-step adhesive system[J]. Dent Mater, 2005, 21(7): 599-607.

[14] Hanks CT, Craig RG, Diehl ML, et al. Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device[J]. J Oral Pathol, 1988, 17(8): 396-403.