

# 四种正畸矫治弓丝的细胞毒性研究

李秋菊 高静 曹宝成

**【摘要】** 目的 评价四种临床常用正畸矫治弓丝经人工唾液浸泡腐蚀后的细胞毒性。方法 选择正畸常用两种超弹性镍钛矫治弓丝和两种不锈钢矫治弓丝(A组:速航国产超弹性镍钛矫治弓丝; B组:Smart国产超弹性镍钛矫治弓丝; C组:PLASDENT国产不锈钢矫治弓丝; D组:ORMAER国产不锈钢矫治弓丝),在弱酸性(pH=6.0)人工唾液中浸泡4周后,取出试件制备浓度为20%、50%、100%的浸提液。使用不同浓度浸提液培养L-929细胞24 h、48 h后,分别使用SEM及MTT实验,初步评价四种矫治弓丝的细胞毒性。结果 相同培养时间下,随浸提液浓度的增加,细胞相对增殖率减小,细胞毒性相对增加( $P<0.05$ );相同浸提液浓度下,随培养时间的延长,细胞相对增殖率减小,细胞毒性相对增加( $P<0.05$ )。100%浸提液浓度培养24 h后,四组浸提液均未对L-929细胞产生细胞毒性,培养48 h后,A、B、D三组浸提液对L-929细胞产生了轻微的细胞毒性,细胞毒性为1级,C组浸提液未对L-929细胞产生细胞毒性。结论 经唾液浸泡腐蚀后的矫治弓丝,可能会引起轻微的细胞毒性,其结果应引起临床医生的重视。

**【关键词】** 正畸学; 镍钛合金弓丝; 不锈钢弓丝; 细胞毒性

**Study of cytotoxicity of four kinds of orthodontic arch wires** Li Qiuju, Gao Jing, Cao Baocheng. Orthodontics Department, Stomatological Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China  
Corresponding author: Cao Baocheng, Email: caobch@lzu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To evaluate the cytotoxicity of four kinds of orthodontic alloy wires after corrosion in artificial saliva. **Methods** Choose two kinds of superelastic nickel-titanium arch wires and two kinds of stainless steel arch wires and immerse them separately in acidic artificial saliva (pH=6.0) for four weeks, then take them out to make extract liquid of 20%, 50%, 100% concentration. Cultivate L-929 cells in the extract and observe the growth of the cells after 24 h and 48 h. Finally through the MTT assay and the cell relative growth rate(RGR), value the cytotoxicity of the four kinds of arch wires. **Results** With the cultivation time extending, the cell RGR decreased, the cytotoxicity relatively increased ( $P<0.05$ ); With the extract concentration increasing, the cell RGR decreased, the cytotoxicity relatively increased ( $P<0.05$ ). In extract of 100% concentration, after 24 h cultivating, the four kinds of extract didn't generate cytotoxicity to L-929 cells; after 48 h cultivating, A, B, D groups generate slight cytotoxicity to L-929 cells, for 1 class of cytotoxicity, while C group didn't generate cytotoxicity to L-929 cells. **Conclusion** The arch wires after corrosion might generate slight cytotoxicity, that should cause the attention of clinicians.

**【Key words】** Orthodontics; Nickel-Titanium arch wire; Stainless steel arch wire; Cytotoxicity

超弹性镍钛合金丝和不锈钢矫治弓丝是正畸治疗最常用的矫治弓丝,因其性能不同而应用于正畸治疗的不同阶段。临床前实验显示镍钛合金弓丝和不锈钢弓丝具有一定的耐腐蚀性和生物相容性<sup>[1]</sup>,但在口腔内适宜温度及唾液电解质的作用下,矫治弓丝会不可避免地受到多种形式的腐蚀作用,其结果不仅引起矫治弓丝力学性能和机械性能的变化,

还可以导致多种金属离子的释放,尤其是镍离子的释放<sup>[2]</sup>。镍在口腔中可致牙龈红肿疼痛、扁平苔藓等,镍及其化合物可能对人体产生致癌、致突变等严重影响<sup>[3]</sup>。Idelsohn等<sup>[4]</sup>研究表明镍钛合金在正畸治疗过程中发生侵蚀改变而导致镍离子的释放,同时有临床研究表明正畸装置戴入口腔约10周内会引起口腔唾液中镍含量的升高<sup>[5]</sup>。因此正畸矫治装置的生物安全性越来越引起临床医生的重视,了解经腐蚀后的矫治弓丝的生物安全性对临床工作也有一定的指导意义。本实验特意设置弱酸性人工唾

液环境 (pH=6.0) 对常用矫治弓丝进行浸泡腐蚀, 通过体外细胞培养检测经唾液腐蚀后的两种超弹性矫治弓丝和两种不锈钢矫治弓丝的细胞毒性。

## 材料和方法

### 一、材料及仪器

1. 弓丝: 速航国产超弹性镍钛弓丝; Smart 国产超弹性镍钛弓丝; PLASDENT 国产不锈钢矫治弓丝; ORMAER 国产不锈钢矫治弓丝; 规格均为 0.018 × 0.025 英寸。

2. 细胞及主要试剂: L-929 细胞 (由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供); 含 10% 胎牛血清 (杭州四季青生物公司) 的 RPMI-1640 培养液 (Gibco 公司), 并加入 100 U/ml 青霉素, 100 U/ml 链霉素, 1% 的谷氨酰胺 (Sigma 公司); 胰蛋白酶 (Sigma 公司); 噻唑蓝 (MTT) (Sigma 公司); 10% SDS 溶液。

3. 主要仪器: CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱 (Heraeus, 德国); YJ2875 型超净工作台 (苏州净化设备厂, 中国); IMZ 倒置显微镜 (Olympus, 日本); 自动酶标分析仪 (Bio-Tek, 美国); 96 孔培养板 (Costar, 美国)。

### 二、实验方法

1. 浸泡腐蚀及浸提液制备: 按照 ISO/TR10271 标准, 配制人工唾液 1 000 ml, 用 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 为 6.0, 37 °C 恒温条件下, 将四种矫治弓丝试件分别浸泡于弱酸性唾液中 4 周。取出各试件, 去离子水冲洗, 干燥, 高压蒸汽灭菌。按合金丝表面积与培养液比为 3 cm<sup>2</sup>/ml, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱内浸提, 72 h 后提取各组浸提液, 制备成 20%、50%、100% 的浓度梯度。

2. 实验分组: A 组: 速航国产超弹性镍钛弓丝浸提液; B 组: Smart 国产超弹性镍钛弓丝浸提液; C 组: PLASDENT 国产不锈钢矫治弓丝浸提液; D 组: ORMAER 国产不锈钢矫治弓丝浸提液; E 组: 阳性对照组 (6.4% 苯酚培养液); F 组: 空白对照组 (RPMI-1640 培养液)。各组设置平行试验进行重复检测。

3. 观察细胞形态及 MTT 实验: 接种浓度为  $8 \times 10^4$ /ml 的细胞悬液于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ l, 每组 6 个复孔。培养 24 h 后, 吸去原培养液, PBS 溶液清洗, 分别加入各组的浸提液和试剂, 每孔 100  $\mu$ l。置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养箱中进行培养, 分别

于 24 h、48 h 后取出培养板在倒置相差显微镜下观察细胞形态, 且每孔避光加入 20  $\mu$ l MTT 溶液, 继续培养 4 h。然后每孔加入 100  $\mu$ l SDS 溶液, 充分振荡溶解后, 用酶标仪在 570 nm 波长下测定各孔吸光度值 OD 值。计算细胞相对增殖率 (RGR) = (实验组吸光度值/阴性对照组吸光度值) × 100%, 根据细胞毒性分级标准<sup>[6]</sup>进行评价。根据细胞毒性评价标准将材料的毒性分为 5 级: 80% ≤ RGR ≤ 100%, 细胞毒性为 0 级; 60% ≤ RGR < 80%, 细胞毒性为 1 级; 40% ≤ RGR < 60%, 细胞毒性为 2 级; 20% ≤ RGR < 40%, 细胞毒性为 3 级; 0% ≤ RGR < 20%, 细胞毒性为 4 级。

### 三、统计学分析

数据计量资料用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析和 *q* 检验, 检验水准为 0.05, *P* < 0.05 有统计学意义。

## 结 果

1. 细胞形态学观察: 培养 24 h 后, 各组细胞形态呈现长梭形或多角形, 贴壁生长良好; 培养 48 h 后, 细胞数目增多, 细胞形态多呈现长梭形或多角形, 但有少数细胞呈现圆形, 出现核皱缩、核裂解的现象 (图 1)。

2. MTT 实验结果: 随着培养时间的延长, 细胞不断增殖, 每组 48 h 的吸光度值均大于 24 h 的吸光度值; 随着浸提液浓度的增加, 细胞增殖越少, 各组吸光度值逐渐减小。100% 浸提液浓度时: 培养 24 h 后, A、B、C、D 各组之间的吸光度差异没有统计学意义 (*P* > 0.05, *F* = 0.63), 且均大于阳性对照组吸光度值, 小于阴性吸光度值, 有统计学意义 (*P* < 0.05, *F* = 386.57); 培养 48 h 后, A、B、D 三组吸光度差异没有统计学意义 (*P* > 0.05, *F* = 0.02), 与 C 组之间存在差异, 且有统计学意义 (*P* < 0.05, *F* = 5.45), A、B、C、D 四组吸光度值均大于阳性对照组, 小于阴性对照组, 且有统计学意义 (*P* < 0.05, *F* = 676.51) (表 1)。

3. 细胞相对增殖率及毒性分级: 经培养 24 h 后, 四组矫治弓丝浸泡液均未对 L-929 细胞产生细胞毒性, 细胞毒性为 0 级。培养 48 h 后, 浸提液浓度为 20% 和 50% 时, 四组矫治弓丝浸泡液未产生细胞毒性, 细胞毒性为 0 级; 浸提液浓度为 100% 时, A、B、D 三组浸泡液对 L-929 细胞产生了轻微的细胞毒性, 细胞毒性为 1 级, C 组浸泡液未产生细胞

表1 六组 MTT 结果 OD 值 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	24 h			48 h		
	20%	50%	100%	20%	50%	100%
A 组	0.575±0.041	0.517±0.108	0.481±0.048	0.754±0.051	0.660±0.105	0.596±0.023
B 组	0.575±0.075	0.508±0.038	0.488±0.037	0.745±0.047	0.689±0.096	0.610±0.016
C 组	0.601±0.171	0.522±0.043	0.491±0.035	0.760±0.047	0.669±0.014	0.646±0.009
D 组	0.577±0.035	0.515±0.146	0.489±0.023	0.729±0.105	0.646±0.035	0.607±0.018
E 组			0.231±0.048			0.268±0.037
F 组			0.594±0.051			0.790±0.026

毒性 (表 2)。

表2 不同浓度时培养24 h、48 h后各组细胞相对增殖率 (%)

组别	24 h			48 h		
	20%	50%	100%	20%	50%	100%
A 组	97	87	81	95	84	75
B 组	97	85	82	94	87	77
C 组	101	88	83	96	85	82
D 组	97	87	82	92	82	77
E 组			39			34
F 组			100			100

### 讨 论

口腔唾液中存在的氯离子、氢氧根离子、氟离子、酶、蛋白质及菌斑等构成了一个复杂的电解质液环境,正畸矫治弓丝在这样复杂的环境中不可避免地发生腐蚀反应<sup>[7]</sup>。并且粘结有托槽的牙齿不易清洁、菌斑滞留,其中链球菌、乳酸菌等细菌发酵产生大量的乳酸、乙酸和丁酸,尤以乳酸的酸性最强,导致牙齿表面环境pH值下降。研究表明,戴用固定矫治器后,患者托槽周围菌斑pH值下降到5.85~5.98,上颌前牙唇侧pH下降幅度明显大于下颌前牙唇侧,脱矿患者牙面周围pH明显低于未脱矿患者,且提示pH下降到6.0以下时为釉质脱矿的早期指征<sup>[8-9]</sup>。因此为了更好地模拟口腔环境,本实验特意将四种矫治弓丝放置在pH=6.0的酸性人工唾液中进行浸泡。

MTT体外细胞培养方法是评价口腔应用材料生物学性能的重要方法之一,因其具有可定量、可重复、灵敏度高、易于控制实验条件、可迅速有效地评价材料的生物学性能、缩短试验周期等优点<sup>[10]</sup>,而被国内外学者所采用。其原理为<sup>[11]</sup>: MTT又称四唑盐,是检测活细胞反应的理想物质,其以活细胞线粒体为生物学终点。把淡黄色、水溶性的MTT加入培养液中后,活细胞中的线粒体脱氢酶能将其还原为蓝紫色、不溶于水的MTT甲瓩颗粒,然后其甲瓩结晶可以被有机溶剂SDS溶液或DMSO溶液所溶

解,用酶标仪测定显色浓度可得到吸光度值,从而反映细胞的活性和数目,因而吸光度的大小即可反映材料的毒性大小。本研究根据GB/T 16886.12-2005标准,选用L-929细胞进行MTT实验,拟对四种临床常用矫治弓丝引起的细胞毒性进行定量分析。

应用于人体的金属材料应具有良好的耐腐蚀性和生物安全性,超弹性镍钛丝主要通过其表面产生的致密度高、附着力强、惰性大的TiO<sub>2</sub>膜对抗唾液的腐蚀作用,不锈钢丝则通过内部添加的Cr、Si等耐腐蚀元素,提高其电极电位以抵抗化学腐蚀<sup>[12]</sup>。但由于口腔中存在着复杂的介质成分,并且在一定的温度和矫治力等因素作用下,正畸用金属弓丝不可避免的被腐蚀,其结果导致金属离子析出,从而对人体健康产生潜在的威胁<sup>[13]</sup>。近年来,有病例报道显示含镍托槽会使个别正畸患者出现变态反应,而佩戴无镍托槽的患者的变态反应发生率相对较低<sup>[15]</sup>。Rondelli等<sup>[16]</sup>通过实验表明镍钛合金中金属离子的析出会降低家兔骨髓干细胞噬银蛋白的含量,进一步影响细胞的增殖。Amini, Petoumenou等<sup>[17-18]</sup>学者研究发现正畸患者唾液中镍离子浓度明显增加且大于未接受正畸治疗的患者。Fors等<sup>[2]</sup>研究表明在正畸患者带环与托槽周围的牙菌斑中镍离子的含量明显高于牙釉质菌斑中镍的含量。Lü等<sup>[19]</sup>系列研究表明,当镍离子浓度达到200 μmol/L时,影响基因表达,导致不可逆的DNA损伤。本实验通过体外细胞研究表明:100%浓度浸提液培养时,各实验组吸光度值均小于F组阴性对照组,且有统计学意义,则表明腐蚀后的正畸矫治弓丝释放的金属离子对细胞增殖有一定的抑制作用,且随着培养时间的延长和浸提液浓度的增加,对细胞的抑制作用相对增加,其结果与邢春旺等<sup>[20]</sup>应用一段时间后的镍钛合金丝有着轻微的细胞毒性的实验结果相一致。24 h培养后,本实验四组浸提液均未表现出细胞毒性;培养48 h后,A、B、D三组浸提液



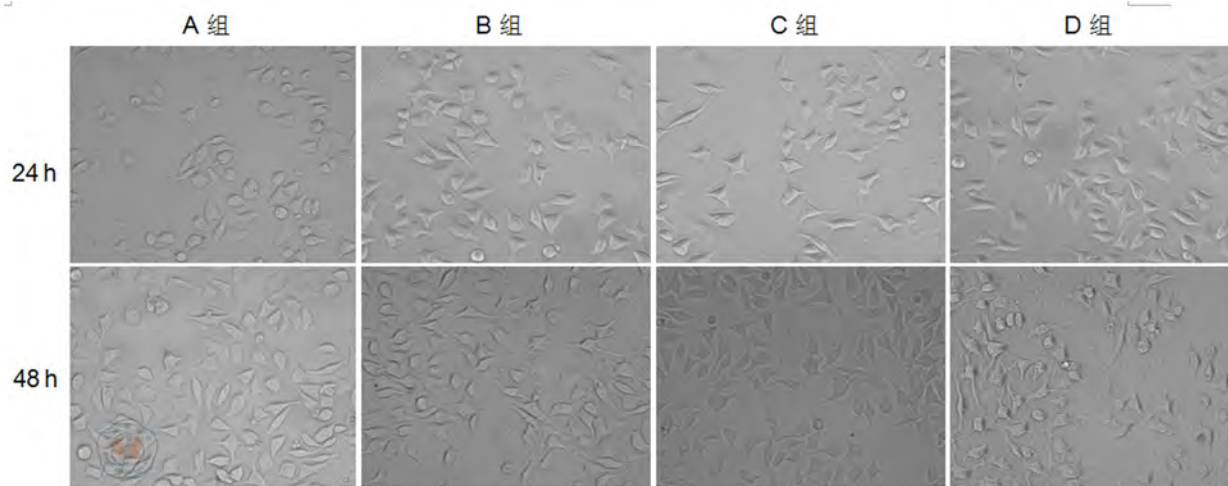


图1 各组浸提液浓度为100%，培养24 h、48 h后的细胞形态学观察（×20）

均表现出轻微的细胞毒性，细胞毒性为1级，C组浸提液未表现出细胞毒性；则表明经腐蚀后的矫治弓丝会产生轻微的细胞毒性，尽管本实验未涉及离子析出实验，但细胞学结果说明矫治弓丝在唾液作用下可能会产生轻微的毒性作用，应引起临床医生的重视，同时也说明正畸矫治弓丝存在着进一步改进的空间。

#### 参 考 文 献

- [1] Oh KT, Kim YS, Park YS, et al. Properties of super stainless steels for orthodontic applications[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2004, 69(2): 183-194.
- [2] Fors R, Persson M. Nickel in dental plaque and saliva in patients with and without orthodontic appliances[J]. *Eur J Orthod*, 2006, 28(3): 292-297.
- [3] Chaturvedi TP, Upadhayay SN. An overview of orthodontic material degradation in oral cavity[J]. *Indian J Dent Res*, 2010, 21(2): 275-284.
- [4] Idelsohn S, Pena J, Lacroix D, et al. Continuous mandibular distraction osteogenesis using superelastic shape memory alloy(SMA) [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2004, 15(4): 541-546.
- [5] Matos de Souza R, Macedo de Menezes L. Nickel, chromium and iron levels in the saliva of patients with simulated fixed orthodontic appliances[J]. *J Angle Orthod*, 2008, 78(2): 345-350.
- [6] 张贺佳, 张扬, 孙晓菊, 等. 3种正畸用镍钛形状记忆合金弓丝细胞毒性评价[J]. *中国实用口腔科志*, 2010(8): 35-38.
- [7] Shim HM, Oh KT, Woo JY, et al. Corrosion resistance of titanium-silver alloys in an artificial saliva containing fluoride ions[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2005, 73(2): 252-259.
- [8] 侯夏沛. 固定矫治中牙面 pH 变化与釉质脱矿的相关性研究[J]. *中国美容医学*, 2013, 22(1): 174-176.
- [9] 张丁, 潘一春, 傅民魁. 托槽及结扎材料对周围牙面菌斑产酸能力变化的影响[J]. *现代口腔医学志*, 2005(6): 48-51.
- [10] Nelson SK, Wataha JC, Neme AM, et al. Cytotoxicity of dental casting alloys pretreated with biologic solutions[J]. *J Prosthet Dent*, 1999, 81(5): 591-596.
- [11] 杨杨, 季娟娟, 彭蓓, 等. MTT 法评价 4 种铸造合金的细胞毒性研究[J]. *临床口腔医学杂志*, 2008, 24(11): 649-651.
- [12] 李兴, 杨凯, 张颖, 等. Beta-钛与镍钛、不锈钢正畸弓丝合金成分、表面形貌以及力学性能的对比研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2012, 28(1): 5-8.
- [13] Benatti OF, Miranda WG Jr, Muench A. *In vitro* and *in vivo* corrosion evaluation of nickel-chromium-and copper-aluminum -based alloys[J]. *J Prosthet Dent*, 2000, 84(3): 360-363.
- [14] 任伊宾, 杨柯, 梁勇. 医用金属材料中的镍危害[J]. *生物医学工程学杂志*, 2005, 22( 5): 1067-1069.
- [15] Pazzini CA, Pereira LJ, Marques LS, et al. Allergy to nickel in orthodontic patients: Clinical and histopathologic evaluation[J]. *J Gen Dent*, 2010, 58(1): 58-61.
- [16] Rondelli G, Vicentini B. Evaluation by electrochemical tests of the passive film stability of equiatomic Ni-Ti alloy also in presence of stress-induced martensite[J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51(1): 47-54.
- [17] Amini F, Borzabadi Farahani A, et al. *In vivo* study of metal content of oral mucosa cells in patients with and without fixed orthodontic appliances[J]. *J Orthod Craniofac Res*, 2008, 11(1): 51-56.
- [18] Petoumenou E, Arndt M, Keilig L, et al. Nickel concentration in the saliva of patients with nickel-titanium orthodontic appliances[J]. *Am J Dentofacial Orthod*, 2009, 135(1): 59-65.
- [19] Lü X, Bao X, Huang Y, Qu Y, et al. Mechanisms of cytotoxicity of nickel ions based on gene expression profiles[J]. *J Biomaterials*, 2009, 30(2): 141-148.
- [20] 邢春旺, 李晓眠. 正畸镍钛丝临床使用前生物相容性研究[J]. *天津医药*, 2005, 33(1): 25-26.

(收稿日期: 2014-05-07)

(本文编辑: 梁雷)