

四种口腔修复材料对细胞的毒性分析*

姚寒曦[△] 徐汉文 李华珍

(上海中医药大学附属曙光医院口腔科 上海 200021)

摘要 目的:研究纯钛、钛合金、钴铬合金和镍铬合金四种非贵金属口腔修复材料对 L-929 成纤维细胞的毒性作用。**方法:**应用口腔修复材料制备材料浸提液处理培养 L-929 细胞,采用 AnnexinV-FITC 试剂盒比较细胞凋亡水平改变,采用 Western blot 检测细胞凋亡相关基因的表达。**结果:**纯钛与钛合金诱导 L-929 细胞凋亡的水平与对照组没有统计学差异 ($P > 0.05$) 钴铬合金和镍铬合金材料浸提液可引起 L-929 细胞凋亡增加 ($P < 0.05$)。**结论:**纯钛与钛合金材料对口腔黏膜细胞的毒性作用相较钴铬合金和镍铬合金材料低,更具安全性。

关键词 非贵金属材料 毒性 口腔上皮细胞

中图分类号 R783.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 23-4473-03

Toxicity Analysis of Four Non-noble Metal Oral Cavity Repair Materials on Oral Epithelium Cell*

YAO Han-yi[△], XU Han-wen, LI Hua-zhen

(Affiliated Shuguang Hospital, Shanghai University of Tcm, Shanghai, 200021)

ABSTRACT Objective: To compare the toxicity on oral epithelium cell among four non-noble oral repair materials including pure Ti, Ti alloy, Co-Cr alloy and Ni-Cr alloy materials. **Methods:** We used cell culture, AnnexinV-FITC kit and Western blot to evaluate the cell apoptotic levels induced by different materials. **Results:** Ti and Ti alloy material could not induce detectable apoptosis in oral epithelium cell line L-929 ($P < 0.05$), while Co-Cr alloy and Ni-Cr alloy could cause increased cell apoptosis compared with controls ($P < 0.05$). **Conclusions:** Ti and Ti alloy materials cause less toxicity on oral epithelium cells than Co-Cr alloy and Ni-Cr alloy materials, which proved to be safer in clinical use.

Key words: Non-noble Metal Materials; Toxicity; Oral Epithelium Cell

Chinese Library Classification: R783.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)23-4473-03

前言

常用的口腔修复材料可以分为金属、牙科用复合树脂、陶瓷材料三大类。每一类包括多种材料,如金属材料里常用的有镍铬合金、钴铬合金、钛合金、纯钛、金合金等^[1-4]。其中,非贵金属价格相对低、强度高、结实,临床使用时间长、工艺简单。但金属缺点也很多,如不美观、有腐蚀性、影响磁共振成像、有的人对其过敏等^[5,6]。在临床使用非金属材料进行口腔修复治疗时,临近修复材料的牙龈位置常出现异常的增生、肿痛、龈沟处分泌增等现象^[7,8]。修复后牙周组织损伤有多种原因,其机制尚未完全明了,可能与口腔修复材料的毒性有关,也可能与组织免疫的异常有关,目前尚无明确论断。

口腔上皮存在多种细胞,口腔修复材料固定在口腔后其毒性使细胞的凋亡水平发生改变。在收集的病例中检测不同的口腔非金属材料对机体细胞凋亡水平的影响,可以有效地评价口腔修复材料的生物相容性,从而判断这些材料的安全性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

纯钛(上海有色金属研究所)、钛合金(无锡市赛思博钛材)、钴铬合金(德国)、镍铬合金(德国)、NE-PER 蛋白抽提试剂盒、胎牛血清(FBS, Hyclone)、RPMI 1640 培养基(Invitrogen)、胰蛋白酶(Sigma, 日本)、AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒(Sigma)、流式细胞仪 FACSCalibur(BD)、超净工作台(苏州净化设备厂)、CO₂ 细胞培养箱(Thermo)、倒置相差显微镜(Olympus)。

1.2 试样及浸提液制备

将各种非金属材料制备成半径 4 mm,厚 1.5 mm 的小圆片。打磨并抛光金属片,用无水 ethanol 浸泡清洗脱脂,超声波清洗 15 min,ddH₂O 冲洗 3 遍,热风烘干,然后在 121℃ 下高压蒸汽灭菌 20 min 备用。牙科金属材料生物相容性评价的浸提标准参照 ISO 10993-5(0.5~6.0cm²/mL),将各材料金属片静置于玻璃培养瓶中,加入 serum-free 的 RPMI 1640 培养液,在 37℃、5% CO₂ 的条件下浸提 7d。用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,所得的培养液即为相应的不同金属材料浸提液。

1.3 细胞凋亡水平的测定

* 基金项目:上海中医药大学专项科研基金

作者简介 姚寒曦(1979),女,硕士,主治医师,口腔科

[△]通讯作者 姚寒曦, Tel: 18801919058, E-mail: yaohanxi79@hotmail.com

(收稿日期 2012-02-23 接受日期 2012-03-20)

L-929 细胞生长至 90%后,PBS 洗涤,置于不含胎牛血清的材料浸提液中培养,37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 2~3d。将培养瓶中的培养液移入离心管,加 1mL 胰酶于培养瓶中,消化细胞约 1~2 min。加 5 mL PBS 于培养瓶,并用吸管轻轻吹打使细胞脱壁。将细胞悬液转移到 1.5mL 离心管,1500 rpm 离心 3min。弃上清后加 4ml PBS 重悬,用 70%冰乙醇固定,4℃ 冰箱保存过夜。细胞悬液经 1500 rpm 离心 3 min,弃上清,按照 AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒的使用说明对细胞进行染色,避光孵育 20 min 后上流式细胞仪检测,设置不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养液为对照。

1.4 Western blot 检测

细胞经材料浸提液培养 5 天后。收集上述各组浸提液浸泡过的细胞,按照 NE-PER 蛋白抽提试剂盒说明提取细胞的总蛋白,按每泳道加 30 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后电转移至硝酸纤维素滤膜上,室温封闭 2 h 后,加入相应的鼠抗人 Caspase3、BCL-2 和 PARP 单克隆抗体,4℃ 孵育过夜,洗膜

3 次,加入相应的辣根过氧化物酶标记的鼠二抗(1:3000),ECL 增强化学发光显色系统显色。每组重复 3 次,运用扫描仪以及 Adobe Photoshop7.0 图像分析系统进行蛋白条带分析处理。

1.5 统计方法

所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS11.5 软件对结果进行统计学分析。采用方差分析进行统计学分析。

2 结果

2.1 细胞凋亡水平比较

L-929 细胞经不同的无血清培养基浸提液处理 48h 后,按照 AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒说明书对细胞进行 AnnexinV-FITC PI 双染,再经流式细胞仪检测。结果如图 1 所示,纯钛和钛合金浸提液组凋亡水平与对照组(纯无血清培养基组)比较没有统计学差异,而钴铬合金和镍铬合金浸提液组处理细胞后,细胞凋亡水平较对照组有明显升高($P < 0.01$)。

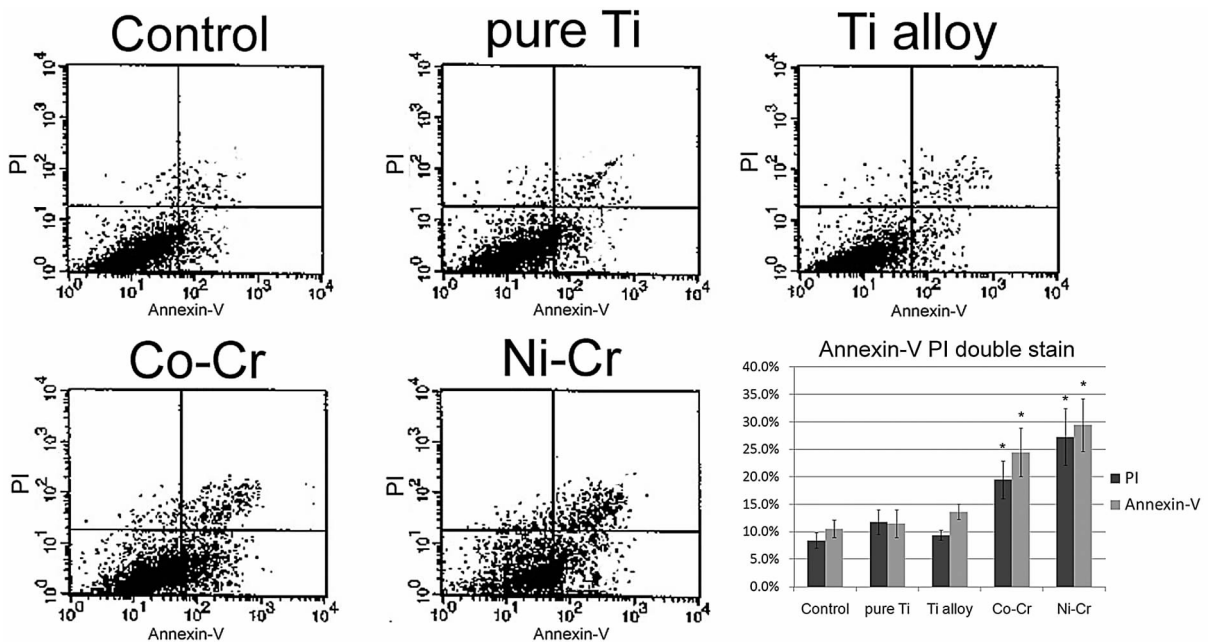


图 1 各组 L-929 细胞经血清饥饿后使用 AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒进行凋亡水平测定

Fig. 1 Apoptosis analysis using AnnexinV-FITC apoptosis kit after serum starvation treatment of L-929 cells

2.2 Western Blot 检测

L-929 细胞经不同的无血清培养基浸提液处理 48h 后,提取细胞总蛋白后行 Western blot 检测凋亡相关蛋白。如图 2 所示,纯钛组合钛合金浸提液组与对照组(无血清培养基组)相比没有明显差异;钴铬合金和镍铬合金浸提液组处理细胞后,Bcl-2、Caspase-9 裂解片段和 Caspase-3 裂解片段的表达水平有所增加,而 Bax 蛋白的水平则有所下降。这些结果表明了钴铬合金和镍铬合金浸提液对细胞毒性较其他两者材料高,更容易引起 L-929 细胞的凋亡。

3 讨论

金属类型口腔修复材料在口腔内引起的各类副作用大多

因为材料中金属离子的释放引起。本研究所使用方法是通过将各金属合金浸泡于细胞培养液中一定时间(一周),使金属离子充分释放,并用该浸提液用于细胞培养,从而模拟金属材料对机体组织的影响。这是目前比较公认的实验方法。本实验浸提条件符合 ISO 10993-5 的标准,所得的实验结果表明钴铬合金和镍铬合金材料所释放的金属离子对 L-929 细胞的毒性作用要略大于纯钛和钛合金材料,为口腔材料的选用提供了新的实验依据。

本研究通过 AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒与凋亡相关蛋白的检测鉴定不同金属浸提液对 L-929 细胞凋亡水平的影响。AnnexinV-FITC PI 双染法是目前广泛使用的同时检测细胞早期凋亡和晚期凋亡的方法^[9,10],其中 AnnexinV 染色主要检测

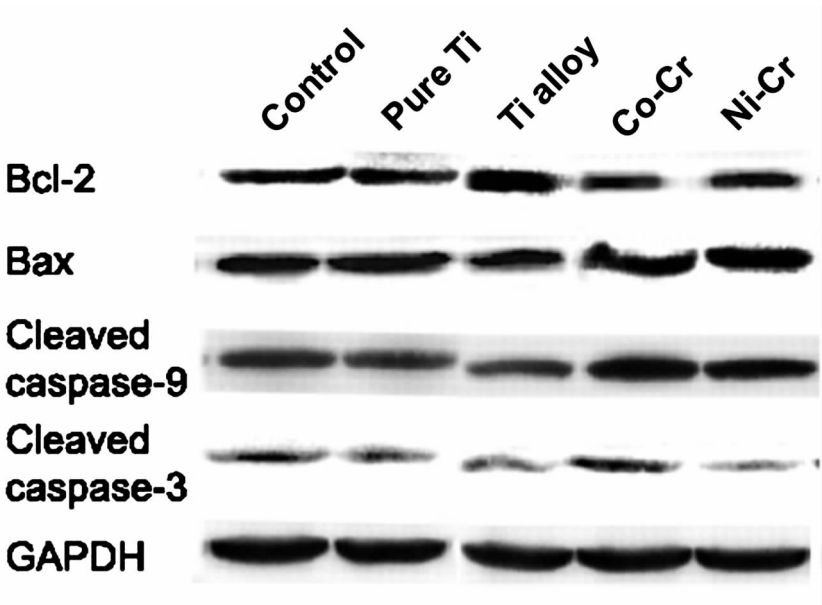


图 2 各组 L-929 细胞经血清饥饿后使用 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达水平
Fig. 2 Western blot analysis of apoptosis-related proteins after serum starvation treatment of L-929 cells

细胞的早期凋亡^[11]。细胞凋亡早期改变的一个重要特点就是细胞膜表面的异常，其中改变之一是磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 从细胞膜内面翻转到细胞膜表面。PS 是一种带负电荷的磷脂^[12-14],Annexin V 是一种 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白,易于结合 PS 等磷脂类分子,对 PS 有亲和性高。因此,该蛋白可以充当探针检测暴露在细胞膜表面的 PS,而且该反应十分灵敏,从而反映细胞早期凋亡的水平^[15,16]。PI 则可以进入死亡细胞的细胞核与染色体结合染色,反映细胞的晚期凋亡水平。本研究中结果显示,血清饥饿与金属离子诱导细胞早期凋亡和晚期凋亡的水平没有明显差异。

在凋亡相关蛋白的检测中,Bcl-2 和 Bax 是凋亡诱导因子作用细胞后调节细胞凋亡水平的重要调控基因,前者抑制细胞凋亡,后者促进细胞凋亡,Bcl-2 与 Bax 表达的比值 (Bcl-2/Bax) 增高时促进细胞存活,反之则诱导细胞凋亡^[17,18]。本研究中钴铬合金和镍铬合金浸提液作用 L-929 细胞后,细胞蛋白中 Bcl-2/Bax 的比值明显降低,提示这两种材料相较其他材料更易于产生毒性而使细胞趋于凋亡。半胱氨酸蛋白酶 (Caspase),也称 ICE 样蛋白酶,被认为是细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶,它直接水解激活与胱氨酸断裂等凋亡特征性改变密切相关的蛋白,又称为死亡蛋白酶。在正常情况下 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白是以活性很低的酶原形式合成,通过蛋白酶水解去除氨基酸的一段序列而被激活。活化的 Caspase-9 激活 Caspase-3 裂解,通过破坏、激活某些酶,或破坏细胞骨架蛋白等方式,最终导致特征性 DNA 断裂,也是鉴别细胞凋亡与坏死的主要依据之一^[19-22]。本研究中钴铬合金和镍铬合金无血清浸提液作用 L-929 细胞后,细胞蛋白中的 Caspase-3 和 Caspase-9 的水解活性片段较对照组和钛组有所增加,同样提示了其细胞的毒性作用高于纯钛材料和钛合金材料。

综上所述,在本研究所采用几种非贵金属口腔修复材料中,纯钛和钛合金材料对机体细胞的毒性要低于钴铬合金和镍

铬合金,具有更高的安全性。

参考文献(References)

[1] Chaturvedi TP, Upadhyay SN. An overview of orthodontic material degradation in oral cavity[J]. Indian J Dent Res,2010,21(2):275-284
[2] Goldstein JA. The use of bioresorbable material in craniofacial surgery [J]. Clin Plast Surg,2001,28 (4):653-659
[3] Richter G, Geier J. Dental materials-problem substances in allergologic diagnosis? I: Analysis of test results in patients with mouth muco-sa/dental material problems[J]. Hautarzt,1996,47 (11):839-843
[4] Steinemann SG. Titanium--the material of choice? [J]. Periodontol 2000,1998,17:7-21
[5] Larsen RM, Patten JR, Wayman BE. Endodontic endosseous implants: case reports and update of material[J]. J Endod,1989,15 (10):496-500
[6] Richter G. Dental materials--problem substances in allergologic diagnosis? II: Patch test diagnosis and relevance evaluation of selected dental material groups[J]. Hautarzt,1996,47(11):844-849
[7] Lansdown AB, Mirastschijski U, Stubbs N, et al. Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects [J]. Wound Repair Regen,2007,15 (1):2-16
[8] Osano E, Kishi J, Takahashi Y. Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF-alpha-resistant mouse sarcoma L929 cells[J]. Toxicol In Vitro,2003,17(1):41-47
[9] Niu G, Chen X. Apoptosis imaging: beyond annexin V[J]. J Nucl Med, 2010,51 (11):1659-1662
[10] van Heerde WL, Robert-Offerman S, Dumont E, Hofstra L, Doevendans PA, Smits JF, Daemen MJ, Reutelingsperger CP. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V [J]. Cardiovasc Res,2000,45 (3):549-559
[11] Reutelingsperger CP, van Heerde WL. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis[J]. Cell Mol Life Sci,1997,53 (6):527-532

(下转第 4469 页)

表 3 模拟海拔 5000m 的环境下 T₁、T₂ 组受试者供氧后 SpO₂ 与 HR 以及 t₁、t₂ 的对比 (n=40)

Table 3 After the supplement of oxygen, the comparison of SpO₂, HR and t₁, t₂ at the simulated altitude of 5000m (n=40)

	SpO ₂ (%)	HR(次 /min)	时间(s)
T ₁ group	96± 2.32	82± 1.69	604± 19.27(t ₁)
T ₂ group	97± 1.92	80± 3.69	813± 21.90(t ₂)*

注 :t₁ 与 t₂ 比较,*P<0.05。

Note: t₁ compared with t₂, *P<0.05.

器官对氧的需求,机体代偿性的增加心率,使心脏负荷加重,导致心肌肥大,心脏功能异常。这些都是引起高原适应不全的最主要原因,也是高原病的主要病因^[10]。

高原医学工作者经过长期的研究发现,在海拔 3000m 以上的高原环境中,氧气浓度每上升 1%,相当于海拔高度下降 300m^[11]。因此,为初入高原的人群进行氧疗,是缓解机体不适和预防高原病的主要方法。我们研制成功的负离子化学制氧机,为机体供给带有负离子的氧气,使氧气分子与负离子结合,形成带有负电荷的氧气分子,在电荷的驱动作用下,能够更快的与血红蛋白相结合,快速随血液输送至机体的各组织器官,缓解机体缺氧症状。从本次实验的结果来看,负离子化学制氧机抗缺氧效率高,效果好,能快速改善机体的缺氧状态,是一种可靠的高原抗缺氧设备。相信随着对负离子进一步更深入的研究,它必将为解决更多的高原医学问题做出新的贡献。

参 考 文 献(References)

[1] Cudaback D.M. Four-km altitude effects on performance and health [J]. Publ. Astron. Soc. Pacific,1984,96 463-477

[2] West J.B. Prediction of barometric pressures at high altitudes with the use of model atmospheres [J]. Appl. Physiol,1996,81:1850-1854

[3] Takeshi Yamauchi. Effect of blood pH on plasma ammonia and lactate concentration during incremental exercise in men [J]. Advances in Exercise and Sports Physiology,1997,2(1):79-82

[4] Stanley WC. Myocardial lactate metabolism during exercise [J]. Med Sci Sports Exerc,1991,23(8):920-924

[5] Terman.M , Terman JS. Treatment of seasonal affective disorder with a high-output negative ionizer [J]. Journal of altercomplement Med, 1995,1(1):87-92

[6] Watanabe I , Noro H , Ohtsuka Y, et al. Physical effects of negative airions in a wet sauna[J]. Biometeorol,1997,40(2) :107-112

[7] 衣钢, 钮式如. 自然环境和一般室内空气负离子状况调查测定[J]. 环境与健康,1986,3(4):6-8

Nong Gang, Niu Shi-ru. The natural environment and the general survey of indoor air ions measurement [J]. Environment and Health, 1986,3(4):6-8

[8] 王伟,朱永安,张芳,等. 富氧室在高原对人体 PWC170 时心率及血氧饱和度的影响[J]. 高原医学杂志. 2002, 12(1): 5-7

Wang Wei, Zhu Yong-an, Zhang Fang, et al. oxygen-enriched room at high altitude on the human body PWC170 heart rate and oxygen saturation of [J]. Highland Medical Journal,2002,12 (1):5-7

[9] Lahiri S.. Dynamic aspects of regulation of ventilation in man during acclimatization to high altitude[J]. Respir. Physiol,1972,16:245-258

[10] 高钰琪,罗德成,牛文忠,等. 高原习服的评价标准与方法研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(12):1453-1454

Gao Yu-qi, Luo De-cheng, Niu Wen-zhong, et al. high altitude acclimatization evaluation criteria and method [J]. Journal of the Third Military Medical University,2001,23(12):1453-1454

[11] West J.B.. Oxygen enrichment of room air to relieve the hypoxia of high altitude[J]. Respir. Physiol,1995,99:225-232

(上接第 4475 页)

[12] Emoto K, Umeda M. Apoptosis by phosphatidylserine in mammalian cells[J]. Subcell Biochem,2002,36:61-77

[13] Fadok VA, Henson PM. Apoptosis: giving phosphatidylserine recognition an assist--with a twist[J]. Curr Biol,2003,13 (16):R655-657

[14] Schlegel RA, Williamson P. Phosphatidylserine, a death knell[J]. Cell Death Differ,2001,8 (6):551-563

[15] Nusbaum P, Laine C, Seveau S, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-regulation and phosphatidylserine externalization[J]. Biochem Soc Trans, 2004,32 (Pt3):477-479

[16] van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure[J]. Cytometry

1998,31 (1):1-9

[17] Vogel MW. Cell death, Bcl-2, Bax, and the cerebellum [J]. Cerebellum,2002,1(4):277-287

[18] Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, et al. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death [J]. Semin Cancer Biol,1993,4 (6):327-332

[19] Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. Biomarkers of apoptosis: release of cytochrome c, activation of caspase-3, induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, increased 3-nitrotyrosine, and alteration of p53 gene[J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev,2001,4 (3):313-332

[20] Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death Differ,1999,6 (2):99-104

[21] Johnson CR, Jarvis WD. Caspase-9 regulation: an update [J]. Apoptosis,2004,9 (4):423-427

[22] Kuida K. Caspase-9[J]. Int J Biochem Cell Biol,2000,32 (2):121-124