

[文章编号 1000-1182(2004)02-0162-03

Comfort 义齿粘附剂的体外细胞毒性评价

赵克¹,程祥荣²,高燕¹,韩光丽²

(1. 中山大学光华口腔医学院附属口腔医院 修复科,广东 广州 510055;

2. 武汉大学口腔医学院 修复科,湖北 武汉 430079)

[摘要] 目的 评价作者自行研制的新型 Comfort 义齿粘附剂(Comfort-DA)的体外细胞毒性。方法 Comfort-DA 置于细胞培养液 72 h 制备出材料的浸提液,用同一培养液再稀释为 50%、75% 浓度后分别加入含人口腔成纤维细胞悬浮液的培养板中,其中空白对照组仅加入新鲜培养液。3 块培养板分别继续在 5% CO₂、37 °C 培养箱内开放培养 2 d、3 d 和 4 d 后,四唑盐比色法观察细胞的活性以研究细胞增殖率,用分光光度计以 490 nm 波长测光密度值(OD),组间方差分析并评定该材料的毒性级。结果 空白对照组、Comfort-DA 的 50% 和 75% 浓度组间 OD 值的差别有显著性意义($P < 0.05$);各组浓度 Comfort-DA 的毒性程度为“0~2”级。结论 作者所研制的新型 Comfort-DA 仅有较轻微的细胞毒性。

[关键词] 义齿粘附剂; 人口腔成纤维细胞; 细胞毒性; 四唑盐比色法

[中图分类号] R 783.1 [文献标识码] A

In vitro Cytotoxicity Evaluation of Comfort Denture Adhesive ZHAO Ke¹, CHENG Xiang-rong², GAO Yan¹, HAN Guang-li². (1. Dept. of Prosthodontics, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510055, China; 2. Dept. of Prosthodontics, College of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of novel Comfort denture adhesive (Comfort-DA), which was developed by the authors, to human oral fibroblasts (HOFs). **Methods** A sample of Comfort-DA was prepared and extracted in culturing medium to prepare the eluate. Then the eluate was diluted by culturing medium to 50% and 75% concentration for the assessment of cytotoxicity by tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. Wells containing fresh medium alone were served as control. Cell viability was recorded by optical density after culturing in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37 °C for 2, 3 and 4 days, respectively. The viability of HOF cells was evaluated by MTT assay to investigate cell proliferation. Optical density (OD) was measured by a spectrophotometer at 490 nm. Then evaluating the cytotoxicity grade in test groups according to the means of cell proliferation. ANOVA was used to test the statistical significance. **Results** The statistical analysis of the results of MTT cytological assay indicated significant difference ($P < 0.05$) in OD (indicate cell viability) between all concentrations of Comfort-DA and the control at all incubation times. The results of cell proliferation percentage also showed that the cytotoxicity grade of tested material only displayed “0~2”. **Conclusion** The generally favorable *in vitro* cytotoxicity of the Comfort-DA formulations indicates that this product may be an efficacious denture adhesive.

[Key words] denture adhesive; human oral fibroblast cell; cytotoxicity; tetrazolium bromide colorimetric assay

目前临床常采用种植式固定全口义齿、种植式覆盖全口义齿和使用义齿粘附剂(denture adhesive, DA)等方法改善全口义齿的固位和稳定,提高无牙颌患者的咀嚼功能。DA 是一种由粘合材料制成的非处方类牙科制剂,涂布于义齿基托组织面后可在基托与承托区粘膜间产生粘附力,暂时性提高全口义齿的固位和稳定,具有便利、实用和易于推广等特点^{1,2}。目前,DA 已被国外多数牙科医生和患者接受,但仍有部分牙医将它视为不良义齿或失败修复体的一种补救措

施,且对能否提高患者的咀嚼效能仍存有疑问¹。DA 国内鲜见使用,仅有关于明胶类和高分子聚合物类粘附剂的报道³,因实际使用效果不理想未能普及。笔者参考国外文献^{1,2,4}并优选配方,研制出一种黄色膏状的高分子合成树脂类义齿粘附剂:Comfort-DA,主要成分是聚醋酸乙烯酯、羧甲基纤维素钠、纤维素醚和乙醇等^{5,6}。

四唑盐比色法(tetrazolium bromide colorimetric assay, MTT assay)被称为“细胞毒性检测的标准方法”,是一种能快速评定细胞增殖和细胞毒性的比色分析法。目前,该实验方法已被广泛应用于免疫学、肿瘤学研究和医用材料的生物相容性评价⁷。本实验目的在于以 MTT 法评价 Comfort-DA 的细胞毒性,为后

[收稿日期 2003-04-30; 修回日期 2003-11-11]

[作者简介] 赵克(1970-),男,河南人,副教授,博士

[通讯作者] 赵克, Tel: 020-83802805

续的临床研究提供执行依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

四唑盐 (tetrazolium bromide, MTT) (Gibco, 美国), 试验前用磷酸盐缓冲盐 (phosphate-buffered saline, PBS) 溶液新鲜配制, 过滤除菌; Dulbecco's Modified Eagle's Medium 培养基 (DMEM) (加入 10% 小牛血清、青霉素 G 每毫升 100 单位, 链霉素 100 μg/ml) (Sigma, 美国); 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma, 美国)。

1.2 主要仪器

Microplate Reader (Bio-Tek Instruments Inc, USA)

1.3 样品制备⁵⁻⁷

称取 4 g Comfort-DA, 紫外线照射 24 h 消毒试样表面。置于无菌试管, 加入 DMEM 培养液 20 ml, 于 37℃ 下静置浸渍 72 h, 后得到该材料的浸提液。用 DMEM 将浸提液分别稀释成浓度为 50%、75% 的溶液备用。

1.4 人口腔成纤维细胞 (human oral fibroblasts, HOFs) 的培养

取 13 岁男孩因正畸治疗拔除的右上颌第一前磨牙, 随即在无菌条件下用 DMEM 培养液冲洗 2 次, 刮取根中 1/3 部位的牙周组织, 切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小后置于含抗生素的预冷 DMEM 中, 贴于培养瓶底, 翻转, 于 CO₂ 培养箱进行原代培养。在 37℃、5% CO₂ 和饱和湿度条件下培养 2 h 后再翻转, 继续培养。当从组织块中游出的细胞铺满培养瓶底约 80% 时进行首次传代, 取第 3 代细胞用于实验。

1.5 四唑盐比色法⁷

用微量移液器以 50 微升/孔将细胞悬液置于 3 块 96 孔培养板中, 在含 5% CO₂、95% 空气、37℃ 培养箱内开放培养 24 h, 使细胞贴壁并使其浓度至 6.25 × 10⁴ 个/孔。每孔舍弃原培养液, 实验组分别用 50%、75% 浓度浸提液进行交换, 50 微升/孔, 每组 5 孔 (50% 组设为 A 组, 75% 浓度组设为 B 组)。空白对照组 (C 组) 仅用新鲜培养液交换。3 块培养板继续在 5% CO₂、95% 空气、37℃ 培养箱内分别开放培养 2 d、3 d、4 d。每一时间段后取出 1 块培养板, 加入 0.5% MTT 溶液 100 微升/孔, 继续培养 5 h。吸除每孔内溶液并用双蒸水冲洗 3 遍, 加入 DMSO 100 微升/孔以溶解细胞核内蓝色结晶, 摇震 10 min。

用分光光度计以 490 nm 波长测光密度值 (optical density, OD), DMSO 为空白对照。吸光度值 OD 均以其平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。再按下式计算出细胞的增殖率 (proliferation percentage, P%) :

$$P\% = \frac{\text{实验组吸光度值}}{\text{对照组吸光度值}} \times 100\%$$

以实验组 OD 值占对照组 OD 值的百分比评价细胞毒性 (100% 表示细胞毒性为零, 百分比越低其细胞毒性越大), 最后根据细胞增殖率的均值按表 1 所示评分标准评定该材料的毒性程度。

表 1 细胞增殖率 (%) 与细胞毒性级的对应关系

Tab 1 Grades of cytotoxicity corresponding to cell proliferation percentage (%)

细胞增殖率	细胞毒性级
80 ~ 100	0
60 ~ 80	1
40 ~ 60	2
20 ~ 40	3
0 ~ 20	4

1.6 统计学分析处理

OD 值以统计分析软件 SPSS 10.0 进行方差分析 (analysis of variance, ANOVA) 及 *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞生长观察

牙周膜原代细胞在第 8 天从组织块游出, 呈放射状排列生长。细胞呈长梭形, 胞体丰满, 胞浆均匀。传代后细胞生长旺盛, 性状稳定。

2.2 四唑盐比色法检测

采用四唑盐比色法所测对照组及不同浓度 Comfort-DA 的 OD 值见表 2。对表 2 数据进行方差分析, $F = 5.637, P = 0.042, P < 0.05$, 说明 A 组、B 组和 C 组间 OD 值的差别有显著性意义, 再进一步作两两比较, 其比较结果见表 3。

表 2 对照组及不同浓度 Comfort-DA 的 OD 值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 MTT cytotoxicity assay: Optical density of controls and all groups of concentrations of Comfort-DA ($\bar{x} \pm s$)

分组	2 d	3 d	4 d
A 组	0.529 ± 0.109	0.609 ± 0.158	0.599 ± 0.151
B 组	0.376 ± 0.077	0.605 ± 0.153	0.499 ± 0.149
C 组	0.336 ± 0.078	0.323 ± 0.102	0.297 ± 0.158

由表 3 见, 培养至第 4 天时 C 组的 OD 值较对照组呈明显下降, 其差别具有非常显著性意义 ($P < 0.01$); B 组的 OD 值明显低于 A 组, 其差别具有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。第 2 天时, A 组与 B 组的 OD 值均明显低于 C 组, 二者间的差别具有显著性意义 ($P < 0.05$)。仅在第 3 天时, A、B 组之间 OD 值的差别无显著性意义 ($P > 0.05$)。Comfort-DA 的细胞增殖率及细胞毒性见表 4。

表 3 组、组与组间两两比较的方差分析结果

Tab 3 Results of ANOVA for comparison of the control (), 50 % () and 75 % () group

P 值	2 d			3 d	4 d		
	()与()	()与()	()与()		()与()	()与()	()与()
	0.046 *	0.019 *	0.529	0.082	0.097	0.001 **	0.007 **

注: * 表示 $P < 0.05$ ** 表示 $P < 0.01$

表 4 Comfort-DA 的细胞增殖率(%)及细胞毒性级

Tab 4 Cell proliferation percentage (%) and cytotoxicity grade of Comfort-DA

分组	2 d		3 d		4 d	
	细胞增殖率	毒性级	细胞增殖率	毒性级	细胞增殖率	毒性级
组	100.0	0	100.0	0	100.0	0
组	71.1	1	99.3	0	83.3	0
组	63.5	1	53.1	2	49.6	2

由表 4 可知,以 组为基准, 组样品在分别培养 3 d、4 d 后细胞相对增长率在 40%~60%以上,毒性程度为 2 级;而该浓度在第 2 天的细胞增殖率为 60%以上,毒性程度 1 级。 组浸提液在第 2 天的细胞增殖率大于 60%,毒性程度 1 级;而在 3 d、4 d 的细胞增殖率均大于 80%,毒性程度为 0 级。依据国际牙医联盟(FDI)牙科制品委员会制定的 ISO7406 技术报告⁹,所研制的 Comfort-DA 材料仅显示出较轻微的细胞毒性。

3 讨论

生物材料应用于人体之前必须经过严格的检验,不仅应具有临床要求的物理、化学性能,还必须具有良好的生物安全性。依据 ISO7406 技术报告⁸,DA 为修补和衬垫材料,应进行急性毒性试验、溶血试验、细胞毒性试验、致敏试验、口腔粘膜刺激试验等生物学检测,评价 Comfort-DA 的生物安全性。体外细胞毒性实验是其中的一个重要环节,其结果可能与体内试验没有较大的相关性,但是可以认为,如果一种牙科材料在体外细胞培养中显示了较强的毒性,它很可能对活体组织也具有一定的毒性。

MTT 法是基于对细胞线粒体脱氢酶的测定而间接地判定细胞的生活状况,测定的是细胞代谢活性和细胞数量的变化。因为维持细胞本身生存的代谢过程,或是细胞的分裂增殖过程都需要能量,所需的 95%来自线粒体,而线粒体产生能量的过程有赖于其呼吸链上的各种酶,脱氢酶就是其中之一⁷。MTT 法也有不足之处。MTT 结晶物被溶解后培养板内颜色会很快消失,实验结果不易存留,但仍可以通过照像来弥补;另一缺点是必须使用材料的浸提液,而非该剂型本身。这一点也许非常重要,因为将原本粘稠的

DA 溶解稀释可能会影响细胞毒性评定的准确性。

MTT 法中 OD 值的变化反映了活细胞数量和细胞的活性(cell viability),细胞相对增殖率和材料毒性评级也是多数学者采用的一种评定材料细胞毒性的参数。本实验中 Comfort-DA 的 75%浓度浸提液在培养至第 3、4 天时细胞相对增长率均在 40%~60%,毒性程度为 2 级,这可能是由于在浸渍液浓度较大、培养时间较长时,该材料会显示轻微的细胞毒性。但从整个试验看,试验材料组毒性级别仅为“0~2”,据 ISO7406 技术报告⁹的标准可以认为该材料仅有较轻微的细胞毒性。

为进一步评价所研制的 Comfort 义齿粘附剂,笔者在完成理化性能和其它生物安全性试验的基础上,将其初步用于临床,对患者使用粘附剂前后全口义齿最大咬合力及患者的咀嚼效能进行测定。结果表明,Comfort-DA 可显著提高旧义齿的最大咬合力,但对新义齿效果不显著;患者的咀嚼效能也得到了明显改善⁹。

[参考文献]

- 1] Slaughter A, Katz RV, Grasso JE. Professional attitudes toward denture adhesives: A delphi technique survey of academic prosthodontists J. J Prosthet Dent, 1999, 82(1): 80-89.
- 2] Grasso JE. Denture adhesive: changing attitudes J. J Am Dent Assoc, 1996, 127(1): 90-96.
- 3] 杨志刚,陈彬华,曹光瑞,等.新型义齿粘附剂的研制和临床评价 J. 中华口腔医学杂志,1988,23(1): 20-22.
- 4] Devengencie J, Ng MC, Ford P, et al. In vitro evaluation of denture adhesives: possible efficacy of complex carbohydrates J. Int J Prosthodont, 1997, 10(1): 61-72.
- 5] 赵克,程祥荣,李志安,等.新型高分子合成树脂类 Comfort-DA 义齿粘附剂的制备与性能测试 J. 中华口腔医学杂志, 2002, 37(2): 150-152.
- 6] 程祥荣,赵克,李志安,等.新型高分子合成树脂类义齿粘附剂的研制 J. 口腔医学纵横, 2001, 17(4): 247-249.
- 7] 吕晓迎, Kappert HF. 牙科材料细胞毒性评定的新方法 J. 中华口腔医学杂志, 1995, 30(6): 377-379.
- 8] ISO7405-1997. Biological evaluation of dental materials evaluation. FDI & COMIET
- 9] 赵克,程祥荣,陈群,等. Comfort 义齿粘附剂对全口义齿咀嚼效能影响的临床评价 J. 上海口腔医学, 2001, 10(3): 207-209.

(本文编辑 王 晴)