

[文章编号] 1000-1182(2009)02-0202-04

排龈药物对体外培养人牙龈成纤维细胞的毒性比较

刘健¹ 张晓明¹ 郝鹏杰² 惠敏¹ 于焕英¹

(1.滨州医学院 口腔学院, 山东 滨州 256603; 2.烟台市口腔医院 口腔修复科, 山东 烟台 264001)

[摘要] 目的 评价6种常用的排龈药物对人牙龈成纤维细胞(HGF)毒性作用的大小, 以指导临床选择最佳排龈药物。方法 将6种不同体积分数的排龈药物(20%硫酸铝、5%硫酸铝、15.5%硫酸铁、13.3%硫酸铁、0.1%盐酸肾上腺素、0.01%盐酸肾上腺素)分别作用于体外培养的HGF, MTT比色法测定细胞的损伤与增殖, 透射电镜观察细胞超微结构的变化。结果 所有实验药物均能引起细胞的直接损伤与增殖抑制, 细胞毒性由小到大分别是0.01%盐酸肾上腺素、0.1%盐酸肾上腺素、5%硫酸铝、20%硫酸铝、硫酸铁, 2种体积分数的硫酸铁毒性比较差异无统计学意义($P>0.01$)。透射电镜显示2种体积分数的盐酸肾上腺素及5%硫酸铝可引起细胞器数量减少, 线粒体及内质网肿胀; 20%硫酸铝造成细胞水肿明显, 细胞核和染色质分布不均匀; 硫酸铁可导致细胞变性。结论 0.01%盐酸肾上腺素细胞毒性作用最小, 硫酸铁毒性最大。

[关键词] 排龈药物; 细胞毒性; 人牙龈成纤维细胞

[中图分类号] R780.2 **[文献标识码]** A

Comparison of cytotoxicity between chemical retraction agents on human gingival fibroblasts *in vitro* LIU Jian¹, ZHANG Xiao-ming¹, HAO Peng-jie², HUI Min¹, YU Huan-ying¹. (1. College of Stomatology, Binzhou Medical University, Binzhou 256603, China; 2. Dept. of Prosthodontics, Yantai Stomatological Hospital, Yantai 264001, China)

[Abstract] **Objective** To choose the best retraction agent for the clinic by evaluating cytotoxic effects of six chemical retraction agents on human gingival fibroblasts(HGF) *in vitro*. **Methods** HGF were treated with six chemical retraction agents which included 20% $Al_2(SO_4)_3$, 5% $Al_2(SO_4)_3$, 15.5% $Fe_2(SO_4)_3$, 13.3% $Fe_2(SO_4)_3$, 0.1% HCl-epinephrine and 0.01% HCl-epinephrine. The damage of direct contact and proliferation inhibit were observed by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) colorimetric assay, the ultra structure was observed under transmission electron microscope(TEM). **Results** All of chemical retraction agents caused cell damage and proliferation inhibit. The ability of cytotoxic effect increased in an order of 0.01% HCl-epinephrine<0.1% HCl-epinephrine<5% $Al_2(SO_4)_3$ <20% $Al_2(SO_4)_3$ < $Fe_2(SO_4)_3$. There was no statistically significant difference between 13.3% $Fe_2(SO_4)_3$ group and 15.5% $Fe_2(SO_4)_3$ group. At HCl-epinephrine group and 5% $Al_2(SO_4)_3$ group, the number of organelles were decreased, mitochondria and endoplasmic reticulum were swollen. At 20% $Al_2(SO_4)_3$ group, organelles swelling and decreased number of organelles became more severe, the nuclear chromatin was unevenly distributed. Cell degeneration could be made by $Fe_2(SO_4)_3$. **Conclusion** 0.01% HCl-epinephrine was the least toxic gingival retraction agents, 13.3% $Fe_2(SO_4)_3$ and 15.5% $Fe_2(SO_4)_3$ are found to have the strongest cytotoxic effect on cell cultures.

[Key words] chemical retraction agent; cytotoxicity; human gingival fibroblasts

在现代口腔固定义齿修复过程中, 排龈已成为获取准确印模的必要条件, 排龈药物的使用控制了牙龈出血和组织液渗出, 使印模更加准确, 减少了修复体不良边缘的发生, 有利于固定义齿修复的成功。但临床上常用的排龈药物会对牙龈局部甚至全身产生潜在的危害^[1]。本实验在体外培养人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblasts, HGF)的基础

上, 检测6种不同体积分数的排龈药物(20%硫酸铝、5%硫酸铝、15.5%硫酸铁、13.3%硫酸铁、0.1%盐酸肾上腺素、0.01%盐酸肾上腺素)对HGF损伤及增殖的影响, 对药物进行毒性比较, 以指导临床选择合适的排龈药物。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

高糖DMEM(Gibco公司, 美国), 胰蛋白酶(Amresco公司, 美国), 胎牛血清(杭州四季青生物

[收稿日期] 2008-08-26; [修回日期] 2008-11-04

[作者简介] 刘健(1981-), 男, 山东人, 硕士

[通讯作者] 张晓明, Tel: 13954399668

工程材料研究所), 噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(Sigma公司, 美国), 二甲基亚砷(Solarbio公司, 美国), 0.1%盐酸肾上腺素(天津金耀氨基酸有限公司), 超净工作台(苏州安康空气技术有限公司), CO₂培养箱(日本三洋电器株式会社), JEM-1400透射电镜(日本电子株式会社)。

1.2 人牙龈成纤维细胞的培养

取临床上13~19岁正畸患者的因正畸减数拔除的无龋病、无牙龈炎的前磨牙, 采集其牙龈组织。采用组织块培养法^[2]将收集的牙龈组织块用含15%胎牛血清的DMEM培养液在37℃、5%CO₂饱和湿度条件下进行原代培养, 采用酶消化法和反复贴壁法纯化HGF, 利用免疫组化SP法进行波形丝蛋白和细胞角蛋白单克隆抗体染色。若波形丝蛋白染色阳性而角蛋白染色阴性, 证明此细胞为HGF。取4~7代HGF进行实验。

1.3 MTT比色法检测排龈药物对HGF数量的影响

取4代HGF进行消化, 调整细胞密度为每毫升 2×10^4 个, 接种于2块96孔板上, 每孔100 μ L。将96孔板放入5%CO₂孵育箱37℃培养24 h, 镜下见孔内细胞大量贴壁后弃去孔内10%胎牛血清的DMEM和未附着的细胞, 并用无血清DMEM冲洗3次, 加入6种排龈药物(20%硫酸铝、5%硫酸铝、15.5%硫酸铁、13.3%硫酸铁、0.1%盐酸肾上腺素、0.01%盐酸肾上腺素), 每种药物为一组, 每组为8孔, 每孔100 μ L。对照组加10%胎牛血清的DMEM, 每孔100 μ L。作用细胞10 min后吸弃药物, 使用无血清DMEM冲洗4次, 重新加入10%胎牛血清的DMEM。将其中一块药物作用后的96孔板进行直接损伤实验, 即刻加入5 mg/mL MTT 20 μ L, 37℃、5%CO₂条件下继续培养4 h, 吸弃孔内液体, 每孔加入150 μ L二甲基亚砷振荡10 min使结晶充分溶解, 使用全自动多功能酶标仪选择490 nm波长下测量各孔光密度值。将另一块药物作用后的96孔板进行增殖抑制实验, 将其在37℃、5%CO₂条件下培养5 d, 使用相同方法测量各孔光密度值。

1.4 透射电镜下观察细胞超微结构

HGF经排龈药物作用10 min后用无血清DMEM漂洗3次, 加10%胎牛血清的DMEM, 用细胞刮刮取成纤维细胞倒入尖底离心管, 4℃固定, 常规梯度脱水、包埋、制备超薄切片、染色, 透射电镜观察细胞超微结构。

1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件包进行分析, 对各组排龈药物和对照组的MTT检测结果进行方差分析, 采用 q 检验进行两两比较。

2 结果

2.1 不同排龈药物对细胞的直接损伤作用

20%硫酸铝组、5%硫酸铝组、15.5%硫酸铁组、13.3%硫酸铁组、0.1%盐酸肾上腺素组、0.01%盐酸肾上腺素组、对照组MTT检测结果分别为 0.313 ± 0.003 、 0.320 ± 0.004 、 0.328 ± 0.005 、 0.336 ± 0.006 、 0.358 ± 0.004 、 0.357 ± 0.007 、 0.411 ± 0.011 。统计学分析表明, 方差齐性检验显示 $P=0.005$, 方差不齐, 校正后分析, 所有实验药物均会对HGF产生直接损伤作用, 6种排龈药物与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。盐酸肾上腺素的直接损伤作用最小($P<0.01$), 硫酸铝与硫酸铁比较差异无统计学意义($P>0.01$), 同种药物2种浓度之间比较差异均无统计学意义($P>0.01$)。

2.2 不同排龈药物对细胞增殖的影响

20%硫酸铝组、5%硫酸铝组、15.5%硫酸铁组、13.3%硫酸铁组、0.1%盐酸肾上腺素组、0.01%盐酸肾上腺素组、对照组MTT检测结果分别为 0.264 ± 0.109 、 0.406 ± 0.172 、 0.191 ± 0.058 、 0.180 ± 0.003 、 0.549 ± 0.088 、 0.632 ± 0.132 、 0.758 ± 0.080 。方差齐性检验显示 $P=0.016$, 方差齐, 所有实验药物均会对HGF产生增殖抑制作用, 6种排龈药物与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。抑制增殖能力由小到大分别是0.01%盐酸肾上腺素、0.1%盐酸肾上腺素、5%硫酸铝、20%硫酸铝、硫酸铁, 除13.3%硫酸铁与15.5%硫酸铁之间比较差异无统计学意义外, 其余各组比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 透射电镜观察结果

透射电镜下观察可见, 对照组细胞呈梭型, 表面有细胞突起, 核膜清晰有切迹, 细胞核内常染色质均匀分布, 异染色质边集于核膜下, 细胞内可见较多的粗面内质网和游离核糖体及线粒体(图1)。

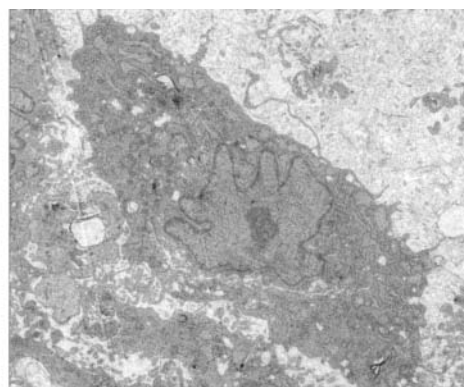


图1 对照组HGF的超微结构 透射电镜 $\times 6000$
Fig 1 The ultra structure of HGF in control group TEM $\times 6000$

0.1%盐酸肾上腺素组与0.01%盐酸肾上腺素组

细胞超微结构相似，细胞形态正常，细胞核和染色质均匀分布，细胞质内可见大小不等的空泡，内质网稍有扩张，细胞器减少(图2)。

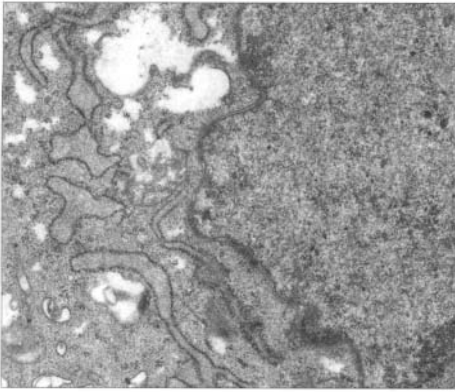


图 2 盐酸肾上腺素作用HGF 10 min后的细胞超微结构 透射电镜 × 25 000

Fig 2 The ultra structure of HGF which was treated by HCl-epinephrine for 10 min TEM × 25 000

5%硫酸铝组细胞内细胞器明显减少，粗面内质网显著减少，部分线粒体呈空泡状(图3)。

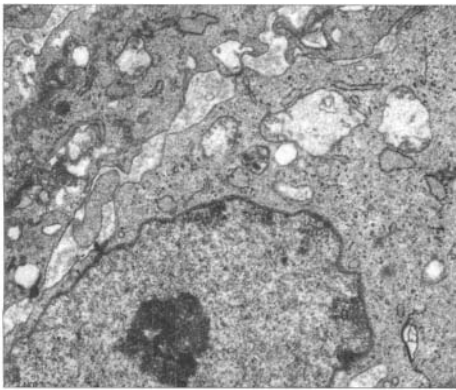


图 3 5%硫酸铝作用HGF 10 min后的细胞超微结构 透射电镜 × 15 000

Fig 3 The ultra structure of HGF which was treated by 5% Al₂(SO₄)₃ for 10 min TEM × 15 000

20%硫酸铝组细胞出现肿胀，细胞核内异染色质聚集成斑块状分布于常染色质中，核膜增宽，细胞器显著减少，内质网扩张呈池状(图4)。

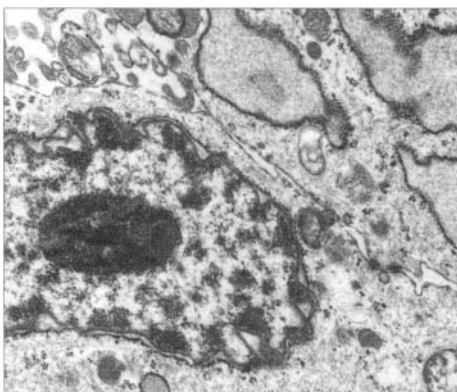


图 4 20%硫酸铝作用HGF 10 min后的细胞超微结构 透射电镜 × 30 000

Fig 4 The ultra structure of HGF which was treated by 20% Al₂(SO₄)₃ for 10 min TEM × 30 000

13.3%硫酸铁组与15.5%硫酸铁组细胞超微结构相似，部分细胞肿胀变性坏死，细胞膜破裂，细胞器肿胀破坏，细胞核染色质稀疏成网状(图5)。

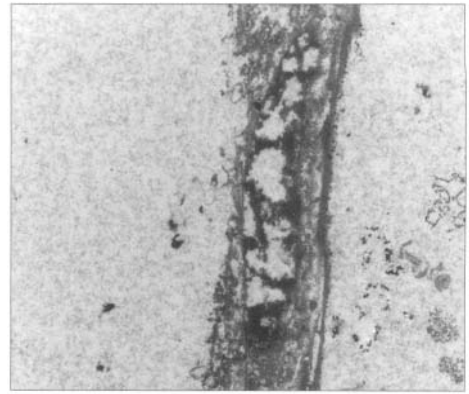


图 5 硫酸铁作用HGF 10 min后的细胞超微结构 透射电镜 × 10 000

Fig 5 The ultra structure of HGF which was treated by Fe₂(SO₄)₃ for 10 min TEM × 10 000

3 讨论

3.1 实验方法的选择

体外细胞培养是评价口腔材料及其他医用材料生物安全性的一种主要方法，具有简单、可重复性等特点^[3]。与体内实验相比，本方法可以更好的进行定量分析，并且不受体内其他因素的干扰^[4]。

HGF参与调节牙周组织的新陈代谢，通过细胞增殖与分泌胶原纤维来维持组织形态和修复损伤，因此本研究选用HGF作为研究对象。在实验过程中，模仿临床排龈过程，排龈药物作用于HGF 10 min，充分冲洗药物后进行实验，使体外毒性研究对机体内环境的模拟更趋真实，结果更为准确与客观，更具临床指导和实用价值。

3.2 排龈药物的临床选择

近年来研究显示，临床常用的排龈药物常造成牙龈萎缩、附着丧失、牙龈变色等^[1]。本实验也证实实验药物对HGF产生直接损伤与抑制增殖作用。因此选择毒性小的排龈药物有利于固定修复。

本研究结果显示，盐酸肾上腺素的细胞毒性作用最小，透射电镜显示细胞形态正常，细胞器仅有轻度肿胀，细胞核与染色质正常。但许多研究表明盐酸肾上腺素对机体存在着一定的系统性副作用，可以引起机体血压升高、心率加快、心律失常、流汗、焦虑等症状，特别是患有高血压等心血管疾病的患者更应该谨慎使用。对0.001%、0.01%、0.1%盐酸肾上腺素研究表明，含0.01%盐酸肾上腺素的排龈线排龈效果最好，并且不会引起系统性损害^[5]。Polat等^[6]也认为如果患者牙龈组织健康、血压正常，在排龈的过程中为了避免牙周组织的损伤，那么使

用含肾上腺素溶液的排龈线排龈是安全的。对于健康患者可使用毒性较小的0.01%盐酸肾上腺素进行排龈。

近年来硫酸铁因其止血速度快,分离牙龈组织维持时间长而应用越来越多。其止血原理为在酸性环境下,血液同硫酸铁的铁离子和硫酸根离子反应使血液蛋白凝聚,形成重金属蛋白凝聚物,该物质作为栓子堵塞毛细血管口而止血,与传统血管收缩剂的作用机制不同。本实验显示硫酸铁细胞毒性最大,而且2种体积分数之间比较差异无统计学意义。在直接损伤实验中硫酸铁组排龈药物细胞毒性大于硫酸铝组,但分析后发现是铁离子所致,铁离子在与DMEM接触后会产生褐色物质,使光密度值增大。透射电镜证实硫酸铁组可导致细胞变性,其细胞毒性作用大于硫酸铝组。硫酸铁不仅抑制细胞的增殖,而且对细胞有持续损伤作用。最近的研究也表明使用含15.5%硫酸铁溶液的排龈线排龈会引起牙龈组织的明显炎症^[7-8]。降低体积分数是否会减小细胞毒性并能保持排龈效果有待于进一步研究。本实验显示硫酸铝的细胞毒性作用小于硫酸铁,而且5%硫酸铝效果较好,电镜显示细胞形态稍有肿胀,细胞核正常,细胞器减少伴水肿。当患者患有心血管系统疾病无法使用盐酸肾上腺素时建议使用5%硫酸铝进行排龈。

[参考文献]

[1] Kopac I, Cvetko E, Pavlica Z, et al. Gingival tissue inflammatory

response following treatment with chemical retraction agents in Beagle dogs[J]. Pflugers Arch, 2001, 442(6 Suppl 1) R145-R146.

- [2] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版社, 1996 69-71. SITU Zhen-qiang. Cell culture[M]. Xi'an: World Publishing Company, 1996 69-71.
- [3] 吕小迎, 薛淼, 徐淑卿. 一种评价牙科和生物材料细胞毒性的有效方法^{125I-UdR}-释放法[J]. 口腔材料器械杂志, 1997, 6(1) 5-7. LÜ Xiao-ying, XUE Miao, XU Shu-qing. An effective method of evaluating the cytotoxin of dental materials and biomaterials: ^{125I-UdR}-releasing method[J]. Chin J Dent Materials Devices, 1997, 6(1) 5-7.
- [4] Tipton DA, Braxton SD, Dabbous MK. Effects of a bleaching agent on human gingival fibroblasts[J]. J Periodontol, 1995, 66(1) 7-13.
- [5] Csillag M, Nyiri G, Vag J, et al. Dose-related effects of epinephrine on human gingival blood flow and crevicular fluid production used as a soaking solution for chemo-mechanical tissue retraction[J]. J Prosthet Dent, 2007, 97(1) 6-11.
- [6] Polat NT, Ozdemir AK, Turgut M. Effects of gingival retraction materials on gingival blood flow[J]. Int J Prosthodont, 2007, 20(1) 57-62.
- [7] Akca EA, Yildirim E, Dalkiz M, et al. Effects of different retraction medicaments on gingival tissue[J]. Quintessence Int, 2006, 37(1) 53-59.
- [8] 孙学武, 孙桂兰, 肖丽静. 含不同药物排龈线引起牙龈炎症的比较研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2008, 26(1) 53-55. SUN Xue-wu, SUN Gui-lan, XIAO Li-jing. Evaluation of gingival inflammation related to different retraction agents[J]. West China J Stomatol, 2008, 26(1) 53-55.

(本文编辑 王晴)

(上接第201页)

(8) 361-364.

[5] 赵云凤. 口腔生物力学[M]. 北京:北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1996 33.

ZHAO Yun-feng. Dental biomechanics[M]. Beijing: Peking Union Medical College and Beijing Medical University Joint Press, 1996 33.

[6] 郑玉峰, 李超, 黄陈, 等. Smart镍钛根管器械的扭转性能与旋转疲劳断裂行为研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2005, 21(2): 217-220.

ZHENG Yu-feng, LI Chao, HUANG Chen, et al. Torsional property and rotary fatigue fracture of Smart nickel-titanium endodontic instruments[J]. J Pract Stomatol, 2005, 21(2) 217-220.

[7] 王尊一, 卫彦, 邓旭亮, 等. 高温高压消毒对五种桩挠曲强度与弹性模量的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2006, 27(1): 90-92.

WANG Zun-yi, WEI Yan, DENG Xu-liang, et al. The influence

of autoclave sterilization on elastic module and flexural strength of five types of posts[J]. J Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences), 2006, 27(1) 90-92.

[8] Gallegos AG, Bertolotti RL. Effect of sodium hypochlorite on the strength of carbon steel endodontic instruments[J]. J Endod, 1981, 7(9) 423-425.

[9] Pernier C, Grosgeat B, Ponsonnet L, et al. Influence of autoclave sterilization on the surface parameters and mechanical properties of six orthodontic wires[J]. Eur J Orthod, 2005, 27(1) 72-81.

[10] 化工百科全书编辑委员会. 化工百科全书[M]. 北京:化学工业出版社, 1994:1083-1085.

Chemical Encyclopedia Editing Committee. Chemical encyclopedia [M]. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 1994:1083-1085.

(本文编辑 汤亚玲)