

采用流式细胞仪评价 Adper Prompt 自酸蚀粘结剂对人牙龈成纤维细胞的细胞毒性

何乙君¹,雷 港¹,杨小军²,张光东^{1*}

(¹南京医科大学口腔医学研究所,南京医科大学附属口腔医院牙体牙髓黏膜科,江苏 南京 210029;²南京市红十字医院口腔科,江苏 南京 210001)

[摘要] 目的:采用流式细胞仪(flow cytometry,FCM)法观察 Adper Prompt (AP)自酸蚀粘结剂对人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblasts,HGFs)的细胞毒性。方法:HGFs 在不同浓度 AP 稀释液(1.00、0.50、0.25 $\mu\text{L/L}$)中培养 HGFs 至 4 d 及 7 d 后,采用流式细胞仪测定其不同增殖周期时相的 DNA 百分含量和凋亡率,计算细胞增殖指数(CPI)。结果:加入 AP 稀释液后 1.00 $\mu\text{L/L}$ 组中二倍体细胞 4 d 和 7 d 后的凋亡峰较明显,其余各实验组凋亡率极低。4 d 后 1.00 $\mu\text{L/L}$ 组流式细胞仪结果可见非整倍体细胞增殖峰。4 d 和 7 d 后,和对照组相比,0.25 $\mu\text{L/L}$ 组和 0.50 $\mu\text{L/L}$ 组的 G2/M 期的 DNA 百分含量明显增高($P < 0.05$);4 d 后 1.00 $\mu\text{L/L}$ 组 S 期的 DNA 百分含量明显增高($P < 0.05$)。同一浓度组 7 d 后的 CPI 低于 4 d 后的。结论:AP 自酸蚀粘结剂在体外对人牙龈成纤维细胞有一定程度的细胞毒性,提示在临床应注意保护牙龈等软组织。

[关键词] 自酸蚀粘结剂;人牙龈成纤维细胞;细胞毒性;流式细胞仪

[中图分类号] R781

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)06-875-05

Evaluation of the cytotoxicity of Adper Prompt self-etch system of dental bonding agent on human gingival fibroblasts by flow cytometry

HE Yi-jun¹,LEI Gang¹,YANG Xiao-jun²,ZHANG Guang-dong^{1*}

(¹Research Institute of Stomatology,Department of Endodontics,the Affiliated Stomatology Hospital of NJMU,Nanjing 210029;²Department of Stomatolog,Nanjing Red Cross Hospital,Nanjing 210001,China)

[Abstract] **Objective:**To evaluate the cytotoxicity of Adper Prompt self-etch system of bonding agents on human gingival fibroblasts by flow cytometry. **Methods:**Human gingival fibroblasts (HGFs) of passage 5 were cultured when cells covered 85% of the flask bottom. Different concentration (1.00 $\mu\text{L/L}$,0.50 $\mu\text{L/L}$,0.25 $\mu\text{L/L}$) of Adper Prompt were added into medium respectively,and no Adper Prompt in medium as the negative control group. Cells were collected after 4 d and 7 d with 0.25% trypsin,fixed with 75% ethanol. The percentages of DNA content and apoptosis in different cycle phase were measured using flow cytometry,and the cell proliferation indexes (CPI) of different groups were calculated. **Results:**The peak of apoptosis rate was obvious in 1.00 $\mu\text{L/L}$ group,and the peak of aneuploidy cell proliferation appeared in the cells treated with 1.00 $\mu\text{L/L}$ Adper Prompt for 4 d. As compared with the control group,the DNA percentage of G2/M phase in 0.50 $\mu\text{L/L}$ and 0.25 $\mu\text{L/L}$ group increased significantly ($P < 0.05$) for both 4 d and 7 d,and while for 4 d,the DNA percentage of S phase in 1.00 $\mu\text{L/L}$ group increased significantly ($P < 0.05$). The CPI of 7d is lower than that of 4d in the same concentration group. **Conclusion:**The cytotoxicity of Adper Prompt on human gingival fibroblasts *in vitro* is obvious,and it must be used very carefully in the clinic and kept away from gingives.

[Key words] self-etch bonding agents;HGFs;cytotoxicity;flow cytometry

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 875-878,881]

随着牙色材料在牙科领域的应用范围越来越广,粘结技术日益受到牙科工作者的关注。在临床

上选择粘结剂时,除要考虑细菌渗透、粘结力和微渗漏外,还要考虑其对口腔各组织的刺激性。粘结剂的牙髓刺激性^[1-2]在国内外报道中意见不一,但大多研究表明全酸蚀系统比自酸蚀系统毒性大^[3]。自酸蚀粘结剂以其操作简便、粘结性能强、牙髓刺激

[基金项目] 江苏省高校优势学科建设工程资助项目

*通讯作者,E-mail:egd_zhang@yahoo.com.cn

性小而日益受到牙科医生的喜爱。近来笔者发现在修复接近龈缘的缺损时,Adper Prompt(AP)自酸蚀粘结剂和牙龈接触部位出现牙龈发白甚至剥脱的现象。曾有研究表明牙本质粘结剂使用后会使得口腔黏膜产生炎症反应^[4],也有研究表明牙齿上的残余粘结剂是正畸患者牙龈炎症反应的重要原因而不能总归咎于患者的不良口腔卫生状况^[5]。因此,本文拟采用流式细胞仪法在体外分析 AP 自酸蚀粘结剂对牙龈成纤维细胞的细胞毒性。

1 材料和方法

1.1 材料

Adper Prompt(AP)自酸蚀粘结剂(3M公司,美国)其主要成份A液:异丁烯酸磷酸酯、Bis-GMA、樟脑醌引发体系、稳定剂;B液:水、HEMA、聚链烯酸、稳定剂。DMEM培养基(Gibco公司,美国),小牛血清(calf serum,CS,Gibco公司,美国),胰蛋白酶(Gibco公司,美国),I型胶原酶(Amresco公司,美国),碘化丙啶(PI Sigma公司,美国)。超净工作台(Baker公司,美国),细胞培养箱(Heraeus公司,德国),相差显微镜(Olympus公司,日本),流式细胞仪(Flow Cytometry,FCM,FASSCalibur,BD公司,美国)。

用含10%小牛血清的DMEM新鲜培养液将AP按3种浓度(1.00、0.50和0.25 $\mu\text{L/L}$)稀释。分组:实验组①1.00 $\mu\text{L/L}$ 浓度组:添加1.00 $\mu\text{L/L}$ 的AP;②0.50 $\mu\text{L/L}$ 浓度组:添加0.50 $\mu\text{L/L}$ 的AP;③0.25 $\mu\text{L/L}$ 浓度组:添加0.25 $\mu\text{L/L}$ 的AP。阴性对照组:含10%小牛血清DMEM培养液。

1.2 方法

1.2.1 HGFs 原代培养及传代

采用组织块酶解法进行HGFs的原代培养。南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科门诊收集因正畸需要新鲜拔除的带有牙龈组织的前磨牙(13~20岁),分离牙龈组织,置于事先准备好的DMEM培养液内。在超净台内用眼科剪将牙龈剪成约1 mm^3 大小若干小组织块,用含青霉素、链霉素的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution,PBS)反复冲洗。将组织块置于玻璃皿内,加入5 ml浓度为1 mg/ml的I型胶原酶,37℃摇床中消化20 min。1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入1 ml培养液,轻轻吹打,用滴管吸取转入50 ml培养瓶中,使组织块均匀铺散于瓶底,吸去多余液体,再加入2 ml DMEM培养液。将培养瓶置于培养箱中,3~4 h后翻瓶,注意动

作轻柔。每3~4 d换1次培养液,倒置显微镜下观察细胞生长情况。当细胞生长至85%汇合时,0.25%胰蛋白酶消化后传代培养。

待细胞生长至85%汇合时,进行细胞传代。吸去培养瓶内培养液,PBS清洗2~3次。加入1 ml 0.25%胰酶消化液,轻轻晃动培养瓶,使消化液流遍所有细胞表面。显微镜下观察,发现胞质回缩、细胞间隙增大,即加入等量含血清的培养液终止消化。用吸管吸取瓶内培养液反复吹打瓶壁细胞,注意动作轻柔,不可形成气泡。将培养瓶内液体转入离心管中,1 000 r/min离心5 min。弃上清,加入2 ml新鲜培养液,轻轻吹打使之形成单细胞悬液,1:3接种至无菌培养瓶内。

1.2.2 流式细胞仪法

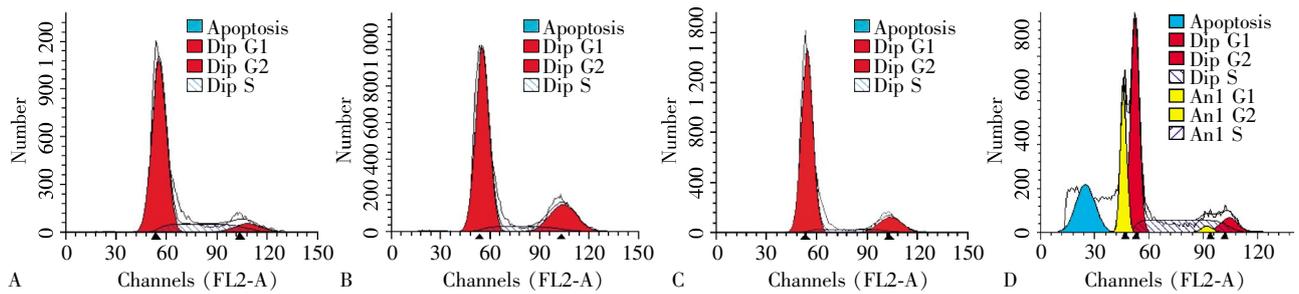
取第5代HGFs于细胞培养箱中培养至85%贴壁;分别用不同浓度(1.00、0.50和0.25 $\mu\text{L/L}$)的AP培养液培养细胞,以普通培养液作为阴性对照,3~4 d换1次液,换液时回收上清中的凋亡细胞,75%冰乙醇固定。0.25%胰酶消化收集4 d及7 d后细胞,与之前收集的凋亡细胞混合,用PBS洗涤2次,75%冰乙醇固定。核糖核酸酶消化,PI室温染色30 min,流式细胞仪检测细胞各增殖周期时相的DNA百分含量和凋亡率,重复3次。计算细胞增殖指数(cell proliferation index,CPI): $\text{CPI} = (\text{S} + \text{G}2/\text{M}) / [\text{G}0\text{G}1 + \text{S} + \text{G}2/\text{M}]$ (G0G1:DNA合成前期;S:DNA合成期;G2:DNA合成后期;M:有丝分裂期)。

1.3 统计学方法

采用SPSS11.5软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用成组 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

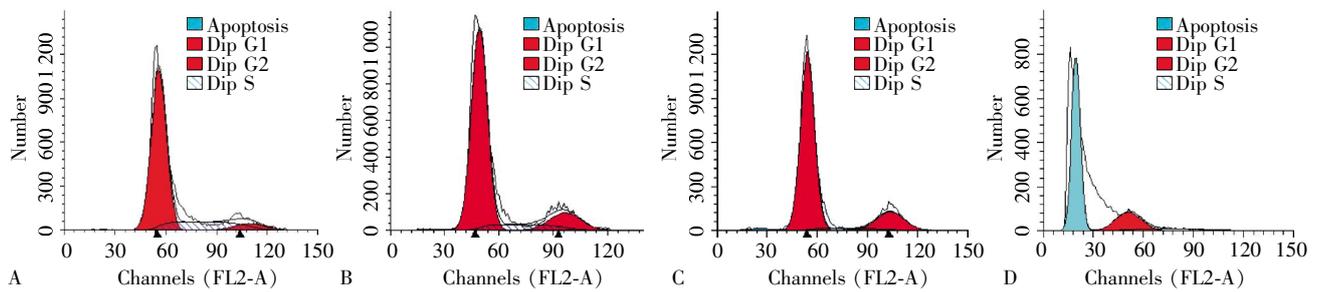
流式细胞仪检测结果显示加入AP稀释液后,1.00 $\mu\text{L/L}$ 组中二倍体细胞4 d和7 d后的凋亡峰较明显,其余各实验组凋亡率极低;同一浓度组7 d后的CPI均值低于4 d后的。4 d后1.00 $\mu\text{L/L}$ 组流式细胞仪检测结果示非整倍体细胞增殖峰(图1,2)。HGFs的各细胞增殖周期DNA百分含量分布发生改变(表1)。和对照组相比,4 d和7 d后0.25 $\mu\text{L/L}$ 组和0.50 $\mu\text{L/L}$ 组的G2/M期的DNA百分含量明显增高,有统计学差异($P < 0.05$);4 d后1 $\mu\text{L/L}$ 组S期的DNA百分含量明显增高,有统计学差异($P < 0.05$,图3,4)。



A: 阴性对照组; B: 0.25 μL/L 组; C: 0.50 μL/L 组; D: 1.00 μL/L 组。

图 1 4 d 后流式细胞仪检测结果

Figure 1 Cell cycle distribution and apoptosis of HGFs after 4 d



A: 阴性对照组; B: 0.25 μL/L 组; C: 0.50 μL/L 组; D: 1.00 μL/L 组。

图 2 7 d 后流式细胞仪检测结果

Figure 2 Cell cycle distribution and apoptosis of HGFs after 7 d

表 1 4 d 和 7 d 后流式细胞仪检测结果

Table 1 The result of flow cytometry after 4 days and 7 days (% , $\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	G0/G1 期		S 期		G2/M 期	
	4 d	7 d	4 d	7 d	4 d	7 d
阴性对照组	78.62 ± 3.48	78.14 ± 2.49	15.70 ± 1.20	17.40 ± 0.93	5.68 ± 1.50	4.47 ± 1.70
0.25 μL/L 组	63.60 ± 5.53*	79.44 ± 2.15	11.29 ± 2.31	8.62 ± 0.79*	25.03 ± 3.92*	11.90 ± 1.40*
0.50 μL/L 组	77.04 ± 1.92	79.66 ± 0.45	7.85 ± 0.72*	3.75 ± 0.32*	15.11 ± 1.46*	16.60 ± 1.51*
1.00 μL/L 组	58.50 ± 2.45*	76.61 ± 1.54	32.7 ± 2.63*	20.59 ± 2.68	8.76 ± 0.95*	2.81 ± 2.64

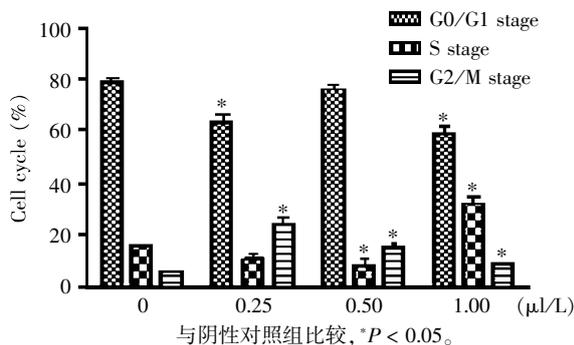


图 3 4 d 后各组细胞各周期 DNA 百分含量分布

Figure 3 Cell cycle distribution of HGFs after exposed to different concentrations of AP for 4 days

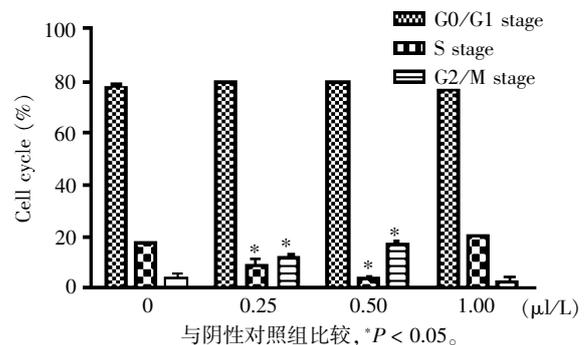


图 4 7 d 后各组细胞各周期 DNA 百分含量分布

Figure 4 Cell cycle distribution of HGFs after exposed to different concentrations of AP for 7 days

3 讨论

尽管粘结剂品种多以及操作者自身差异等因素会使细胞毒性实验结论不同,细胞毒性实验对牙

本质粘结剂的临床应用仍具有一定的指导意义^[6]。而流式细胞仪则是一种能在保持细胞、细胞器或其它微粒结构完整性的状态下从分子水平定量分析评价细胞毒性。

细胞培养技术中采用原代细胞进行细胞毒性实验已被公认为是一种筛选材料的好方法^[7]。本实验未选用建系细胞主要是考虑原代细胞培养的方法能更好地模拟人体内牙龈成纤维细胞对材料的反应,更能体现材料的临床使用情况。分别取 4 d 和 7 d 作为检测点是因为在本实验中发现细胞在培养 48 h 后增殖情况比较稳定,培养 4 d 后处于对数生长期,到达 7 d 以后对照组细胞已铺满瓶底,细胞处于生长限制期。

本实验可初步看出细胞毒性随浓度和时间增加而增大。细胞加入 AP 稀释液后,其各增殖周期细胞分布出现改变。4 d 和 7 d 后 0.25 $\mu\text{l/L}$ 组和 0.50 $\mu\text{l/L}$ 组的细胞生长在 G2/M 期出现延迟。4 d 后 1.00 $\mu\text{l/L}$ 组细胞生长的抑制主要在 S 期。而 4 d 后 1.00 $\mu\text{l/L}$ 组流式细胞仪检测结果出现非整倍体细胞增殖峰(图 1),是否提示该材料会产生基因突变还有待进一步实验。相应的 7 d 时 1.00 $\mu\text{l/L}$ 组未见该峰(图 2),可能是随时间的增加细胞大部分已凋亡。以往研究表明粘结剂细胞毒性的产生可能与其中释放的一些单体成分有关。TEGDMA 和 HEMA 相比其他单体最易析出到唾液中^[8]。HEMA 通过限制细胞生长及导致细胞形态异常而产生细胞毒性^[9]。Noda 等^[10]发现 HEMA 和 TEGDMA 抑制蛋白在单核细胞中的表达。而细胞周期检测点的信号改变可能会引起一些不可逆细胞损伤,如基因突变和染色体损伤^[11-12]。这些单体在临床上会引起牙龈边缘收缩和牙髓改变^[12]。DNA 非整倍体细胞峰的存在可为肿瘤诊断提供有力依据,且非整倍体细胞与细胞异常增生有关。有体内研究通过果蝇细胞突变基因重组实验调查牙本质粘结剂表明,其会使有丝分裂重组而产生基因毒性^[13]。TEGDMA 和 HEMA 等单体会引起染色体损伤及影响 DNA 链的形成,哺乳动物 DNA 的损伤表现在细胞周期的 G1 和 G2/M 期延迟,且损伤程度取决于单体的浓度^[14]。不同的二甲丙烯酸酯的基因毒性有明显区别,虽尚未发现 Bis-GMA、UDMA 和 HEMA 致基因突变^[15],但在 DNA 合成抑制实验中,Bis-GMA 出现阳性结果^[16],而 HEMA 会引起人牙龈及牙髓的成纤维细胞的细胞周期延误^[17]。AP 主要成分有异丁烯酸磷酸酯、Bis-GMA、樟脑醌引发体系、HEMA、聚链烯酸。这些成分可能是 AP 引起细胞毒性的原因。虽然对导致细胞死亡、基因毒性及细胞周期延误机制细节尚未完全了解,可以明确的是单体可能改变细胞功能,且那些远低于引起急性毒性浓度的单体会抑制细

胞动态平衡的调控、牙本质再生及组织修复^[18]。

综上所述,AP 体外细胞毒性较明显,且一定浓度的 AP 可能会引起细胞异常增生。虽然实验结果显示随着 AP 作用时间的延长,二倍体细胞及非整倍体细胞均出现凋亡,但目前还不能排除其长远不良影响。但有研究表明单体在光固化后的粘结剂中几乎检测不到并且达不到抑制细胞活性以及影响细胞增长的浓度^[19]。故本实验提示在临床操作中需使粘结剂固化完全并要特别注意保护周围软组织。总之,虽然自酸蚀粘结剂操作简单,临床应用术后疼痛少,体外实验大多表明其牙髓刺激性小^[20],有较好生物相容性,且发展趋于多功能。但其对牙龈等口腔软组织的细胞毒性和基因毒性不可忽视。目前,对自酸蚀粘结剂的毒性机制以及对口腔组织的长期影响尚未明了。随着研究的不断深入,牙本质粘结剂的性能将会不断改善,具有更好的前景。

[参考文献]

- [1] Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells *in vitro* [J]. *Int Endod J*, 2002, 35(11):905-909
- [2] Vajrabhaya LO, Korsuwannawong S, Bosl C, et al. The cytotoxicity of self-etching primer bonding agents *in vitro* [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009, 107(3):e86-90
- [3] Vajrabhaya L, Passasuk A, Hamirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents [J]. *Oper Dent*, 2003, 28(4):440-444
- [4] Reslich M, Harary D, Shoshan S. Gingival response to a new multipurpose dental adhesive: a histologic study in dogs [J]. *J Prosthet Dent*, 1996, 76(4):379-385
- [5] Huang TH, Liao PH, Li HY, et al. Orthodontic adhesives induce human gingival fibroblast toxicity and inflammation [J]. *Angle Orthod*, 2008, 78(3):510-516
- [6] 代慧珍, 吴补领, 于立君. 三种树脂粘结剂体外细胞毒性研究 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2004, 20(4):228-230
- [7] Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, et al. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components [J]. *Dent Mater*, 2002, 18(4):318-323
- [8] Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials [J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2000, 11(3):333-355
- [9] Chang HH, Guo MK, Kasten FH, et al. Stimulation of glutathione depletion ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(7):745-753
- [10] Noda M, Wataha JC, Kaga M, et al. Components of denti-

防止种植窝制备时种植钻的意外突破上颌窦底的骨壁,深度止动环的运用很有必要。如骨质较疏松,用直径2 mm 先锋钻确定种植方向后,就直接用骨挤压器逐级扩大,把疏松的骨挤压为相对致密的骨,直到比相应的种植直径稍小时,再用骨挤压器轻轻敲击,造成窦底骨质的青枝骨折;③骨引导再生技术结合骨粉加高牙槽嵴有一定的局限,高度不可太大,骨黏膜减张一定要彻底,缝合必须要稳妥和严密。

[参考文献]

- [1] 刘宝林. 口腔种植学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 137-152
- [2] Froum SJ. Dental implant, complications, etiology, prevention and treatment [M]. United Kingdom: Blackwell Publishing, 2010: 624-655
- [3] Nkenke E, Schleibel A, Schultze-Mosgau S, et al. The endoscopically controlled osteotome sinus floor elevation: a preliminary prospective study [J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2002, 17(4): 557-666
- [4] 赖红昌, 张志勇, 张运昕. 单纯上颌窦内提升术同期牙种植的临床应用 [J]. 上海口腔医学, 2008, 17(6): 578-581
- [5] Pommer B, Unger E, Sütö D, et al. Mechanical properties of the Schneiderian membrane *in vitro*. [J]. Clin Oral Implant Res, 2009, 20(6): 633-637
- [6] 蒋 锋, 张双越, 陈 宁. 一期完成两段式种植体手术的临床体会 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2009, 29(9): 1270-1271
- [7] Fugazzotto P. Treatment options following single-rooted tooth removal: a literature review and proposed hierarchy of treatment selection. [J]. J Periodontol, 2005, 76(5): 821-831
- [8] Reiser GM, Rabinowitz Z, Bruno J, et al. Evaluation of the maxillary sinus membrane response following elevation with the crestal osteotome technique in human cadavers. [J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2001, 16(8): 833-840
- [9] 赵 慧, 肖 娟, 林颖洁. 在口腔种植上颌窦提升中植骨材料与影像学 and 器械应用的研究进展 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(29): 5479-5480
- [10] 徐淑兰, 周 磊, 徐世同, 等. 窦底骨高度 3-5 mm 行上颌窦提升术同期植入种植体外科风险的预防对策 [J]. 中国口腔种植学杂志, 2009, 14(2): 21-22
- [11] 邹德荣, 蒋欣泉, 张志愿. 上颌窦提升同期种植的研究现状. [J]. 口腔颌面外科杂志, 2010, 20(1): 49-51
- [12] Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, et al. Genotoxicity of dental materials [J]. Mutat Res, 1996, 368(3-4): 181-194
- [13] Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, et al. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints [J]. Annu Rev Genet, 2002, 36: 617-656
- [14] Bakkenist CJ, Kastan MB. Initiating cellular stress responses [J]. Cell, 2004, 118(1): 9-17
- [15] Arossi GA, Dihl RR, Lehmann M, et al. *In vivo* genotoxicity of dental bonding agents [J]. Mutagenesis, 2009, 24(2): 169-172
- [16] Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers [J]. J Dent Res, 2006, 85(10): 870-877
- [17] Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei *in vitro* by unpolymerized resin monomers [J]. J Dent Res, 2001, 80(7): 1615-1620
- [18] Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, et al. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints [J]. Annu Rev Genet, 2002, 36: 617-656
- [19] Kaga M, Noda M, Ferracane JL, et al. The *in vitro* cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells [J]. Dent Mater, 2001, 17(4): 333-339
- [20] Koulaouzidou EA, Helvatjoqlu-Antoniades M, Palaqhias G, et al. Cytotoxicity of dental adhesives *in vitro* [J]. Eur J Dent, 2009, 3(1): 3-9

[收稿日期] 2012-01-19

[收稿日期] 2011-12-12

(上接第 878 页)

nal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations [J]. J Dent Res, 2002, 81(4): 265-269