

两种牙科金属材料细胞毒性及对 L929 细胞 Bax 和 Bcl-2 表达的比较

孟 贺¹, 孙 萌², 张文茹³, 徐 强⁴

(¹河北联合大学口腔医学院修复教研室, 河北 唐山 063000; ²河北联合大学附属医院超声科, 河北 唐山 063000; ³唐山市协和医院口腔科, 河北 唐山 063000; ⁴唐山市妇幼保健医院口腔科, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的:通过检测牙科常用金合金及镍铬合金的细胞毒性及两种金属材料浸提液对小鼠成纤维细胞 L929 凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达的影响,来研究金属离子与 L929 细胞凋亡的关系,探讨在分子水平上评价材料生物相容性的方法。方法:应用金合金(A组)及镍铬合金(B组)的浸提液培养小鼠成纤维细胞 L929,以含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基做为阴性对照(C组),采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)评价 2 种金属材料的细胞毒性,采用免疫组化法及 ELISA 法(酶联免疫吸附实验)检测 2 种金属材料对 L929 细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响。结果:2 种材料的细胞毒性均为 0 级;镍铬合金组 Bax / Bcl-2 表达的比值高于阴性对照组及金合金组,差异有统计学意义。结论:镍铬合金浸提液可引起小鼠成纤维细胞 L929 凋亡相关蛋白 Bax 表达及 Bax / Bcl-2 比值增高,这一结果可能为将来在分子水平上建立评价生物材料生物相容性的方法提供新的思路。

[关键词] Bcl-2; Bax; 免疫组织化学; 牙科金属

[中图分类号] R783.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)02-254-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20150228

Cytotoxicity and effects of two alloys on Bax and Bcl-2 expression of mouse fibroblast cells L929

Meng He¹, Sun Meng², Zhang Wenru³, Xu Qiang⁴

(¹Department of Prosthodontics School of Stomatology, Hebei United University, Tangshan 063000; ²Department of Ultrasounds, Affiliated Hospital, Hebei United University, Tangshan 063000; ³Department of Stomatology, Union Hospital of Tangshan, Tangshan 063000; ⁴Department of Stomatology, Tangshan City maternal and Child Health Hospital, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the biocompatibility of two dental alloys (Au alloy and Ni-Cr alloy) and to investigate effects of two alloys expression of Bax and Bcl-2 of mouse fibroblast cells L929, try to find a new experimental method to evaluate the biocompatibility of dental materials at molecular level. **Methods:** The fibroblast L929 cells were treated with leaching liquids of Au alloy (group A) and Ni-Cr alloy (group B), the RPMI 1640 cell medium containing 10% fetal calf serum was served as a negative control (group C). The cytotoxicities of two alloys was evaluated by MTT and their effects on the expression of Bax and Bcl-2 were examined by immunohistochemistry and ELISA method. **Results:** The cytotoxicity of two alloys was in Grade 0, the ratio of Bax/Bcl-2 was higher in Ni-Cr alloy group than that of other groups, and the differences were significant. **Conclusion:** The results suggested that the leaching liquids of Ni-Cr alloy may induce Bax protein expression and Bax/Bcl-2 ratio increase; the results may provide new ideas for the future evaluation of biotic materials for compatibility at the molecular level.

[Key words] Bcl-2; Bax; immunohistochemistry; dental alloy;

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(02): 254-257]

[基金项目] 唐山市科技计划指令性项目基金(12140209A-39)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: menghe10.2@163.com

本文选用临床上牙科修复常用金合金及镍铬合金材料作为研究对象,检测金属离子对小鼠成纤维细胞 L929 凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达的影

响,探讨在分子水平上寻找评价材料生物相容性的可能方法。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠成纤维细胞 L929,由天津塞尔生物技术有限公司细胞所提供。牙科金属材料见表 1。

精密铸造规格为直径 10 mm、厚 1 mm 的金合金及镍铬合金试件各 8 个,打磨抛光后,超声清洗 15 min。去离子水冲洗数遍后置于玻璃小瓶中,将金属片于 121℃高压灭菌后置于 24 孔板中。每孔加 2 ml 含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液作为浸提

介质,在 37℃、5%CO₂ 条件下连续浸提 7 d,制备浸提液待用^[1],以含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基做为阴性对照(C 组)。

RPMI1640 培养基(Gibco 公司,美国),胎牛血清(TBD 公司,天津),细胞培养箱(HERA Cell 150, Heraeu 公司,德国),倒置相差显微镜(Olympus 公司,日本),胰蛋白酶(Gibco 公司,美国),兔抗鼠 Bcl-2 多克隆抗体、兔抗鼠 Bax 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(博奥森公司,北京)、免疫组化试剂盒(PV6001,天津)、小鼠 Bcl-2 ELISA 试剂盒(E-EL-M0175,上海)、小鼠 Bax ELISA 试剂盒(E-EL-M0178,上海)、细胞裂解液(Signosis 公司,美国)。

表 1 牙科金属材料的成分及表型

Table 1 Dental cast alloys used in the experiment

分组	合金	成分及其质量浓度	生产厂家	产地
A	金合金	86.2% Au、11.5% Pt、1.5% Zn、0.4% Ru、0.3% Ta、0.1% Mn	Heraeus	德国
B	镍铬合金	(60~64)% Ni、(19~23)% Cr、(9~11)% Mo	Stellite	上海

1.2 方法

1.2.1 L929 细胞的生长代谢曲线

用 0.25%胰蛋白酶消化对数生长期的 L929 细胞,分别以(1~10)×10⁷ 个/L 的细胞浓度接种于 96 孔板,每个浓度接种 8 个孔,然后将培养板置于孵箱中,在 37℃、5%CO₂、95%湿度的培养箱中,孵育 72 h。加入 5 g/L 四甲基偶氮唑盐(MTT)溶液(每孔 20 μl)继续培养 4 h,倒掉原液,PBS 清洗后加入二甲亚砷(每孔 150 μl)室温下振荡 20 min。在 490 nm 波长下用酶联检测仪检测吸光度。实验重复 3 次。

1.2.2 MTT 实验检测两种牙科金属材料细胞毒性

根据细胞生长代谢曲线确定 L929 细胞浓度,接种于 96 孔板,每组 8 个孔。培养 24 h,待细胞贴壁后,倒掉原培养液分别加入金合金、镍铬合金及阴性对照组的浸提液。培养 48 h 后,用酶联检测仪在波长 490 nm 条件下测各组吸光度(A)值,计算细胞相对增殖率(relative growth rate,RGR),公式:RGR=(实验组 A 值均值/阴性对照组 A 值均值)×100%。根据毒性分级法评分:0 级:细胞增殖率为 80%~100%;1 级:60%~80%;2 级:40%~60%;3 级:20%~40%;4 级:0%~20%^[2]。

1.2.3 免疫组化反应检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达

将对数生长期的 L929 小鼠成纤维细胞以 6×10⁷ 个/L 的浓度接种于放有盖玻片的 6 孔板中,加入含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养 24 h。待细胞贴壁后弃去原培养基,分别加入金合金、镍铬合金及阴性对照组的浸提液培养 48 h。弃去上清

液,以 0.1 mol/ml PBS 清洗 3 次,各 5 min;95%乙醇室温固定 10 min,以 0.1 mol/ml PBS 清洗 3 次,各 5 min;将细胞爬片取出后晾干,用中性树胶粘于载玻片上,PBS 冲洗细胞爬片,3%双氧水室温静止 10 min 以阻断内源性过氧化物酶的活性,0.1 mol/ml PBS 清洗 3 次,各 5 min;加入 0.3% Triton-100,室温 30 min,增加细胞的通透性,0.1 mol/ml PBS 清洗 3 次,各 5 min;加 50 μl 一抗(1:200),阴性对照用 PBS 代替一抗,置于湿盒中 4℃过夜,0.1 mol/ml PBS 清洗 3 次,各 5 min;加 50 μl 的二抗,室温孵育 40 min,0.1 mol/ml PBS 清洗 3 次,各 5 min;加 DAB 溶液,于 37℃显色 3 min 后自来水冲洗,苏木素复染 3 min,盐酸酒精分化,自来水冲洗 10 min;梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片,镜下观察并拍摄照片。每张切片随机选取 3 个视野,Bax 及 Bcl-2 在细胞质中呈棕黄色染色为阳性表达,以细胞未着色为阴性。在高倍镜(×400)下拍摄照片,并采用 Image pro plus 6.0 医学图像分析系统对 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达强度进行半定量分析。Bax、Bcl-2 阳性反应为胞浆染成黄到棕黄颗粒和弥漫成片,阴性反应为细胞胞浆未着色。

1.2.4 ELISA 检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达

将对数生长期的 L929 小鼠成纤维细胞以 6×10⁷ 个/L 的浓度接种于 6 孔板中,加入含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养 24 h。待细胞贴壁后弃去原培养基,分别加入金合金、镍铬合金及阴性对照组的浸提液培养 48 h。弃去细胞培养上清液,0.25%胰

蛋白酶消化,收集细胞,800 r/min 离心 10 min,弃上清。冷 PBS 重悬后离心,弃上清,加入 1 mmol/L 细胞裂解液 150 μl。混匀裂解,14 000 r/min 离心 10 min,取上清,严格按照 Elisa 试剂盒说明书进行操作,于酶标仪 450 nm 处测吸光度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行处理,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对金合金、镍铬合金组与阴性对照组的 Bax、Bcl-2 蛋白的表达及 Bax/Bcl-2 的比值分别进行单因素方差分析及最小显著差异(LSD-*t*)检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 L929 细胞的生长曲线

对 3 次细胞生长曲线的实验结果进行相关性分析发现,在 L929 细胞的接种浓度为 $(1\sim7)\times 10^7$ 个/L 时,细胞的增值率与浓度呈正的直线相关($t = 35.49, P < 0.05$),根据生长曲线的实验结果,在 MTT 实验中选取细胞的接种浓度为 6×10^7 个/L,接种于 96 孔板。

2.2 MTT 实验结果

在 MTT 实验中发现 A、B 两组的细胞毒性均为 0 级(表 2)。

2.3 免疫组化实验结果

采用 Image pro plus 6.0 医学图像分析系统对 Bax 和 Bcl-2 表达强度进行半定量分析。A、B、C 3 组的 Bax、Bcl-2 表达情况及 Bax/ Bcl-2 光密度比值见表 3,图 1。B 组 Bax 的表达高于 A 组及 C 组,B 组 Bax 平均光密度值及 Bax / Bcl-2 平均光密度值比值高于其他

两组,统计学差异显著, F 值分别为 6.968 及 20.082($P < 0.05$),而 A 组与 C 组间无统计学差异。各组 Bcl-2 平均光密度值无统计学差异 ($F = 0.977, P > 0.05$)。

表 2 MTT 实验中各组吸光度值

Table 2 OD value of each group in the MTT test ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	吸光度值	增殖率(%)	毒性分级
A	8	1.401 ± 0.062	98.65	0
B	8	1.425 ± 0.078	97.86	0
C	8	1.392 ± 0.084	100.00	0

表 3 Bax 及 Bcl-2 的光密度值及 Bax/Bcl-2 比值

Table 3 The OD value of Bax and Bcl-2 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bax	Bcl-2	Bax / Bcl-2
A	0.139 ± 0.035	0.119 ± 0.016	1.171 ± 0.221
B	0.189 ± 0.063*	0.106 ± 0.028	1.764 ± 0.208*
C	0.128 ± 0.027	0.115 ± 0.015	1.133 ± 0.308

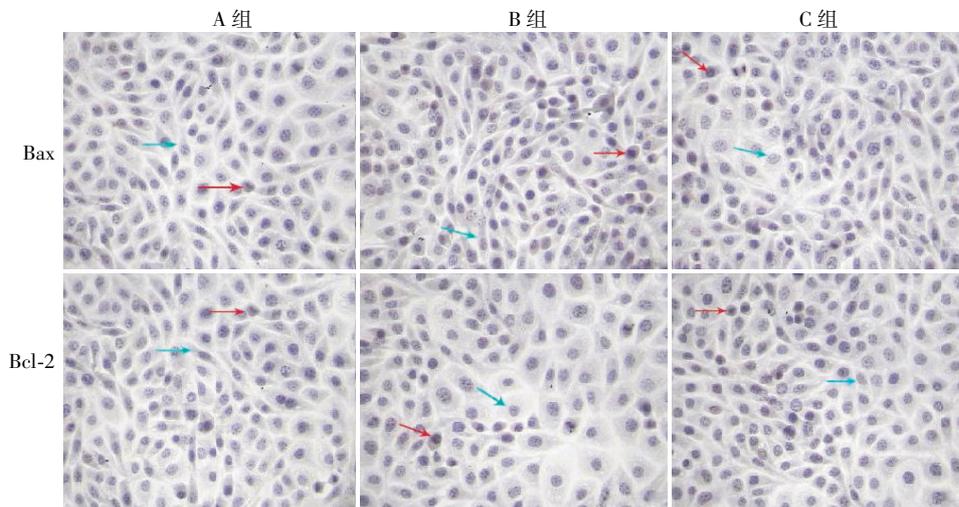
与 A 组、C 组比较,* $P < 0.05$ 。

2.4 Bax 及 Bcl-2 蛋白的 ELISA 实验结果

采用 ELISA 对 Bax 和 Bcl-2 表达进行定量分析。A、B、C 3 组的 Bax、Bcl-2 表达情况及 Bax/ Bcl-2 比值见图 2。B 组 Bax 的表达高于 A 组及 C 组,统计学差异显著 ($F = 7.65, P < 0.05$),B 组 Bax/Bcl-2 的比值也高于其他两组,统计学差异显著($F = 22.79, P < 0.05$),A 组与 C 组 Bax /Bcl-2 的比值表达无统计学差异。各组 Bcl-2 的表达量无统计学差异($F = 0.168, P > 0.05$)。

3 讨论

目前,关于生物材料生物相容性的评价方法主要包括体内实验和体外实验。最常见的是通过 MTT 法检测材料对细胞增殖的影响而在细胞水平上评



↑:阳性表达细胞;↓:阴性表达细胞。

图 1 各组 Bax 及 Bcl-2 蛋白的表达情况

Figure1 The expression of Bax and Bcl-2 in each group

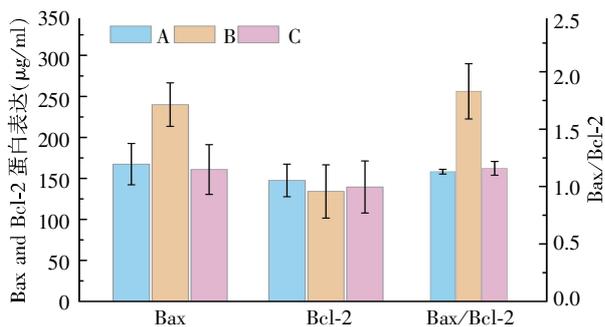


图 2 各组 Bax 及 Bcl-2 蛋白的 ELISA 定量表达情况

Figure 2 The quantitative expression of Bax and Bcl-2 in each group by ELISA

价材料的生物相容性。本研究采用 MTT 实验的方法,发现金合金及镍铬合金对 L929 细胞的增殖无明显影响,两种金属材料的细胞毒性均为 0 级,具有良好的生物相容性。戴建国等^[3]研究发现,细胞周期检测可为生物材料的生物相容性评价提供新的思路和方法,并有望成为生物材料生物相容性评价研究的重要指标之一;洪岩松等^[4]研究发现在时间梯度辅助下用 caspase-3 活化度评价 4 种齿科合金生物相容性,其结果与 MTT 法一致,可作为评价生物相容性的指标之一。从分子水平评价医用生物材料的安全性及有效性将成为未来生物材料领域的研究重点和前沿课题^[5]。

随着对细胞凋亡研究的深入,发现线粒体凋亡通路和死亡受体凋亡通路是细胞凋亡中两条主要的信号转导通路^[6]。Bcl-2 蛋白能够阻遏细胞凋亡,延长细胞的生命,参与调控细胞增殖与凋亡的动态平衡,同细胞分化、成熟、组织器官的发育及肿瘤的发生有着密切的关系。Bax 与 Bcl-2 相反,能促进线粒体促凋亡因子的释放,诱导细胞凋亡。Bax 与 Bcl-2 的比值可能是调节细胞凋亡与增殖的关键。研究发现,牙科金属材料腐蚀析出的金属离子及其衍生物可引起机体组织的毒性反应,并可引起细胞凋亡^[7]。本研究分别应用免疫组化及酶联免疫吸附试验检测 L929 细胞 Bax 与 Bcl-2 的表达。结果显示,与阴性对照组和金合金组相比,镍铬合金浸提液组培养的小鼠成纤维细胞 L929 凋亡相关蛋白 Bax 表达增高,Bax/Bcl-2 表达的比值增高,镍铬合金诱导小鼠成纤维细胞 L929 凋亡相关蛋白 Bax 表达增加,有诱导细胞凋亡增加的趋势。

本研究首先通过 MTT 实验发现金合金及镍铬合金的细胞毒性均为 0 级,在细胞水平上并未发现

金合金与镍铬合金的细胞毒性有差别,两者均具有良好的生物相容性。然后,在分子水平上通过免疫组化实验及酶联免疫吸附试验检测发现金合金组凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达及 Bax/Bcl-2 的比值与阴性对照组无显著差异,可能是因为贵金属材料化学性能稳定,耐腐蚀性能好,在唾液和龈沟液中的离子析出较少,具有较好的生物相容性^[8]。在镍铬合金组 Bax 的表达及 Bax/Bcl-2 的比值高于金合金组与阴性对照组,可能是因为镍铬合金较易腐蚀,释放较高比例成分的镍元素,镍离子可以抑制 DNA 的合成与复制,使 DNA 结构改变,降低蛋白质的合成及影响碱性磷酸酶的活性,增加 L929 细胞的凋亡^[9]。

[参考文献]

- [1] Wataha JC, Nelson SK, Lockwood PE. Elemental release from dental casting alloys into biological media with and without protein[J]. Dent Mater, 2001, 17(5):409-414
- [2] 赵西成,兰新哲,尚再燕,等. 2 种牙科贵金属铸造合金的细胞毒性研究[J]. 稀有金属材料与工程, 2003, 32(10):822-824
- [3] 戴建国,黄培林,郭英,等. 细胞周期检测作为生物相容性评价指标的研究[J]. 东南大学学报:医学版, 2005, 35(2):271-274
- [4] 洪岩松,李秀梅,孟贺,等. 几种齿科合金生物相容性的比较[J]. 材料研究学报, 2012, 26(2):211-217
- [5] 李瑞,王青山. 生物材料生物相容性的评价方法和发展趋势[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(29):5471-5474
- [6] 贺艳杰,李玉华,卢会芳,等. 线粒体通路和死亡受体通路在中华眼镜蛇毒组分诱导 KG1a 细胞凋亡中的作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(3):356-360
- [7] Lion E, Smits EL, Berneman ZN, et al. Acute myeloid leukemic cell lines loaded with synthetic dsRNA trigger IFN-gamma secretion by human NK cells[J]. Leuk Res, 2009, 33(4):539-546
- [8] Sreekanth KM, Sivakumar N, Jukka PM. Biocompatibility of various dental materials in contemporary dentistry: a narrative insight[J]. Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 2013, 4(1):9-19
- [9] Ljubisa R, Dragana V, Ljubica R, et al. Corrosive and cytotoxic properties of compact specimens and microparticles of Ni-Cr dental alloy[J]. Prosthodontics, 2013, 23(5):1-6

[收稿日期] 2014-04-13