

## 牙科粘结剂对人中性粒细胞的影响

翁四维, 吴凤鸣

(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修复科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 研究 3 种固定修复用粘结剂对人中性粒细胞(polymorph nuclear neutrophils, PMNs)相关活性以及致炎性等方面的影响。方法: 在 24 孔板底部铺上玻璃离子水门汀、聚羧酸锌水门汀、光固化树脂水门汀, 采集健康成人志愿者静脉血分离提纯 PMNs, 将 PMNs 与 3 种粘结剂接触培养 4 h 后, 检测细胞的早期凋亡率、坏死率以及存活率的变化, 产生的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)以及分泌白介素(IL)-8 的量。结果: 3 组粘结剂的早期凋亡率、坏死率和存活率两两比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 其中聚羧酸锌水门汀组早期凋亡率、坏死率最高, 存活率最低; 玻璃离子水门汀组早期凋亡率、坏死率最低, 存活率最高。玻璃离子水门汀组的早期凋亡率与存活率与空白对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 而 3 组粘结剂的坏死率均高于空白对照组( $P < 0.05$ )。PMNs 释放 IL-8 的量, 3 组粘结剂均高于空白对照组, 其中聚羧酸锌水门汀组最高, 玻璃离子水门汀组最低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。PMNs 的 ROS 产生强度, 只有玻璃离子水门汀组高于空白对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: 3 种粘结剂对人中性粒细胞的相关活性以及致炎性均有影响, 其中玻璃离子水门汀的致炎性相对较低, 抗菌性能相对较高。

**[关键词]** 粘结剂; 中性粒细胞; 细胞活性; 活性氧簇; 白介素-8

**[中图分类号]** R318.08

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)02-216-04

## Comparison of the effects of three dental cements on polymorph nuclear neutrophils

WENG Si-wei, WU Feng-ming

(Institute of Stomatology, School of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the capacity of of three cements on polymorph nuclear neutrophils. **Methods:** The bottom of 24-well plates were covered by glass ionomer cement, zinc polycarboxylate cement, and light-cured resin cement respectively. Polymorph nuclear neutrophils(PMNs) were isolated from blood collected from healthy volunteer donors. PMNs were co-incubated with or without cement for 4 hours. Flow cytometry was used to detect cell viability and reactive oxygen species (ROS) in PMNs. Concentration of interleukin-8 (IL-8) in supernatant fluid was detected by ELISA. **Results:** The early apoptosis and necrosis rate of the control group is significantly lower, while the survival rate is significantly higher than that of cement groups. For the glass ionomer group has the highest survival rate PMNs is and the lowest rates of the early apoptosis and the necrosis. For the glass iron group, the ROS level of PMNs demonstrates a significantly increase. The concentrations of IL-8 of the cement groups are significantly higher than that of the control group, and the glass ionomer cement group has the highest level, while the zinc polycarboxylate cement group has the lowest. **Conclusion:** The glass ionomer displays characteristics of relative excellent antibacterial activities and lower inflammatory activation.

**[Key words]** cements; polymorph nuclear neutrophils; cell viability; reactive oxygen species; interleukin-8

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(2): 216-219]

中性粒细胞 (polymorph nuclear neutrophils, PMNs) 是机体免疫防御系统的重要组成部分, 是白细胞中功能最活跃、寿命最短的一种, 主要通过凋亡和坏死两种途径死亡; 凋亡的 PMN 失去脱颗粒能力及吞噬能力, 脂膜保持完整被巨噬细胞吞噬, 不释放毒性产物。坏死的 PMNs 膜破裂, 胞内毒性产物释放, 有致炎的作用<sup>[1]</sup>。龈沟液中的中性粒细胞来

自于外周血循环, 是牙周固有免疫的第一道防线。中性粒细胞具有杀菌和释放炎症因子等作用, 某些伴有中性粒细胞数目减少或功能缺陷的全身疾病患者常伴有严重的牙周炎<sup>[2]</sup>。可见 PMNs 的状态影响着牙周组织的健康。近年来固定冠桥修复治疗方法已经普遍, 不密合的冠边缘以及各种原因导致的粘结剂龈沟内残留是导致冠修复后牙龈发炎的主

要原因之一<sup>[3-4]</sup>。已有研究证实 PMNs 与生物材料接触时会发生“受挫性吞噬”(frustrated phagocytosis),“受挫”的 PMNs 活力减弱,细胞膜通透性增高,炎症因子分泌增多<sup>[5-7]</sup>,但对于 PMNs 与牙科粘结材料接触后发生的变化鲜有报道。本实验探讨玻璃离子水门汀、聚羧酸锌水门汀、光固化复合树脂水门汀对离体培养的 PMNs 的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料和仪器

人 PMNs 分离液(TBD 公司,天津),ELISA 试剂盒(四正柏公司,北京),Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒(BD 公司,美国),ROS 试剂盒(南京建成生物工程研究所),玻璃离子水门汀(3M 公司,美国),聚羧酸锌水门汀(松风公司,日本),光固化复合树脂水门汀(Bisco 公司,美国),光固化灯(输出功率 500 MW/cm<sup>2</sup>,Bisco 公司,美国),酶联免疫检测仪(Bio-Tek 公司,美国)、倒置显微镜(Olympus 公司,日本)、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Heraeus 公司,德国)、RPMI1640 培养液(Wisent 公司,美国),胎牛血清(Wisent 公司,美国),24 孔板(Costar 公司,美国),流式细胞仪(BD 公司,美国)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 粘 结 剂 制 备

按说明书操作要求将粘结剂制作成直径 16 mm,厚度 1 mm 的圆片,环氧乙烷消毒,铺于 24 孔板底。

#### 1.2.2 外周血 PMNs 的分离

采集 4 例健康成年志愿者(年龄 25~31 岁) EDTA 抗凝,按 PMNs 分离操作方案(Polymorph-prep<sup>TM</sup> protocol)分离 PMNs:抗凝血,将 5 ml 中性粒细胞分离液加入到 15 ml 离心管中,加 5 ml 血液至分离液的上层。20~25℃,2 800 r/min 离心 35 min。血液分为 6 层:血浆、单核细胞层、分离液、PMNs、其余的分离液、红细胞沉淀层。移去上面的 3 层(血浆、单核细胞和分离液),将 PMNs 层和其下面的分离液层,转移至一个干净的 15 ml 离心管中。加入 10 ml 无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>的 Hank's 平衡盐溶液,上下颠倒数次,悬浮细胞。1 960 r/min,离心 10 min。去上清,加入 2 ml 红细胞裂解液裂解残余的红细胞。1 400 r/min,离心 5 min,去上清。用 RPMI1640 洗细胞 2 次,以含 10%热灭活胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml 的 RPMI1640 培养液悬浮细胞,调整其浓度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml,经台盼蓝排斥法证实其

活力 > 98%,瑞氏染色鉴定其纯度 > 95%。

#### 1.2.3 外周血 PMNs 的培养和分组

共 4 组即空白对照组、玻璃离子水门汀组、聚羧酸锌水门汀组、光固化复合树脂水门汀组,将浓度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml 的 PMNs 悬液置于已铺有材料的 24 孔板(1 ml/孔),置 37℃,5%CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养 4 h。

#### 1.2.4 流式细胞仪对 PMNs 活性的定量检测

采用 Annexin V 和 PI 双标法,取离体培养 4 h 的 PMNs 悬液以 RPMI1640 洗涤 2 次,用 1×binding buffer 重悬细胞,浓度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml,取出 100 μl 加入 Annexin-V-FITC 和 PI 各 5 μl,室温避光孵育 15 min,流式细胞以双通道检测 10 000 个细胞。激发波长 488 nm,发射波长 515、610 nm,Annexin V 阳性为早期凋亡细胞,PI 阳性为坏死细胞,Annexin V 和 PI 双阳性为凋亡晚期/坏死细胞,Annexin V 和 PI 双阴性为存活细胞。

#### 1.2.5 培养上清液白介素(IL-8)浓度测定

采用双抗体夹心 ELISA 法检测培养上清液 IL-8 的浓度。

#### 1.2.6 PMNs 活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)产生强度测定

按照 1:1 000 用 RPMI1640 稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 μmol/L。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中,细胞浓度为 1 × 10<sup>6</sup>~2 × 10<sup>7</sup> 个/ml,37℃细胞培养箱内孵育 20 min。每隔 3~5 min 颠倒混匀 1 次,使探针和细胞充分接触。用 RPMI1640 洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内 DCFH-DA,用流式细胞仪测定 DCFH-DA 的荧光强度。流式细胞仪激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,实时间点检测刺激前后荧光的强弱。结果用平均荧光强度(mean fluorescence intensity,MFI)表示 ROS 的产生强度。

### 1.3 统计学方法

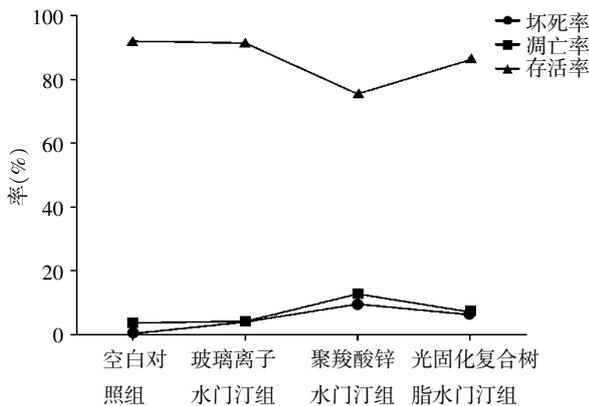
采用 SPSS17.0 软件进行分析,指标间比较均采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著差法。所有统计学检验水准均设定为 0.05, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 流式细胞仪对 PMNs 活性的定量检测结果

PMNs 与 3 种粘结剂接触 4 h 后,死亡率均高于对照组( $P < 0.05$ ),其中玻璃离子水门汀组坏死最低,聚羧酸锌水门汀组最高,4 个实验组间两两

比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );存活率方面,玻璃离子水门汀组与空白对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),其次为光固化复合树脂水门汀组,最低为聚羧酸锌水门汀组,3种粘结剂组间两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );早期凋亡率方面,玻璃离子水门汀组与空白对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),其次为光固化复合树脂水门汀组,最高为聚羧酸锌水门汀组,3组粘结剂组间两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 1。



存活率与凋亡率,3种粘结剂组间两两比较, $P < 0.05$ ;坏死率4个实验组间两两比较, $P < 0.05$ 。

图 1 不同粘结剂组 PMNs 早期凋亡率、坏死率和存活率比较( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Figure 1 Comparisons the early apoptosis rate, necrosis rate and survival rate among different cements( $n = 4$ )

### 2.2 培养上清液 IL-8 浓度测定结果

PMNs 与 3 种粘结剂接触培养 4 h 后,上清液 IL-8 的浓度测定及相关比较结果见图 2。玻璃离子水门汀组与空白对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),其次为光固化复合树脂水门汀组,最高为聚羧酸锌水门汀组,3种粘结剂组间两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

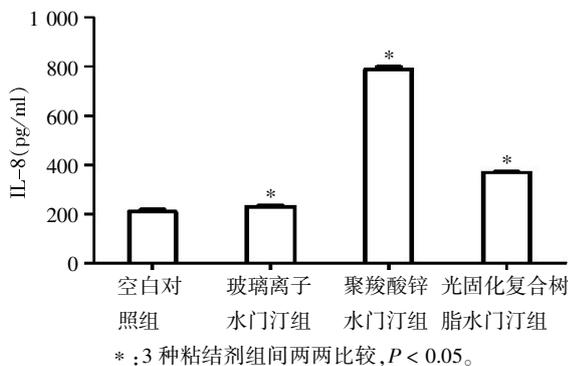


图 2 不同粘结剂组上清液 IL-8 水平的比较( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Figure 2 The comparison of IL-8 in different cements groups ( $n = 4$ )

### 2.3 ROS 产生强度测定结果

PMNs 与 4 个实验组接触培养 4 h 后细胞内 ROS 产生的荧光强度值的测定及相关比较结果见图 3,只有玻璃离子水门汀组的 ROS 产生强度与空白对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其余组间两两比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

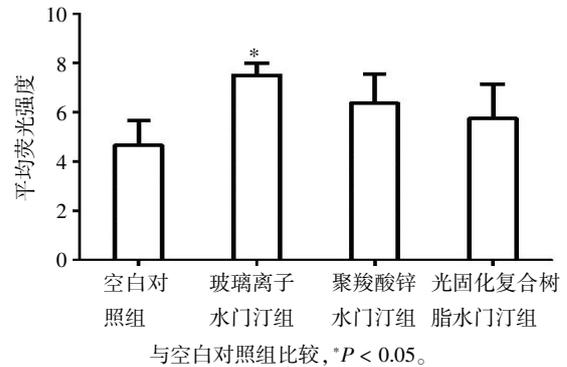


图 3 不同粘结剂组 PMNs 细胞内 ROS 产生强度的比较( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Figure 3 The comparison of ROS in different cements groups ( $n = 4$ )

### 3 讨论

流行病学调查结果显示,固定修复后数年内会出现冠边缘牙龈炎、牙周炎、不密合的冠边缘以及各种原因导致的粘结剂龈沟内残留是导致冠修复后牙龈发炎的主要原因之一。固定修复体粘固完成后,冠边缘存在间隙,美国牙科协会(ADA)规定,冠边缘间隙应 $\leq 40 \mu\text{m}$ ,有学者在电镜下观察,冠边缘间隙由粘结剂占据<sup>[8]</sup>。冠边缘部各种原因导致了粘结剂在龈沟液中暴露,并与龈沟液中的各种成分接触。近年来,关于粘结剂的生物相容性、生物惰性的研究多集中在检测粘结剂的浸提液对相关细胞的毒性影响,检测的细胞多为成纤维细胞、牙髓细胞、牙龈上皮细胞和卵细胞等,对龈沟液中大量存在的免疫第一道防线 PMNs 的研究甚少。不同粘结剂生物相容性和毒性比较也多集中在材料基质相同但添加物不同的粘结剂种类之间的比较,对于基质不同的粘结剂种类之间的比较甚少。直接接触法是指将固体材料与目标细胞放在一起培养,观察对试样所在处细胞的影响,是考察材料组织相容性的重要手段<sup>[9]</sup>。本实验选择 PMNs 作为目标细胞,将细胞与材料基质不同的粘结剂直接接触培养,考察并比较不同基质的粘结剂对 PMNs 的影响,为临床选择提供实验室依据。

Annexin V/PI 双染流式细胞仪分析细胞的凋

亡/坏死率被认为是比较准确、可靠的检测方法<sup>[10]</sup>, Nadzam 等<sup>[5]</sup>曾将 PMNs 与人工心脏瓣膜材料接触培养,发现细胞活性降低,有活力的细胞数目减少,认为这与人工心脏瓣膜植入后植入部位易发生感染有关。本实验结果显示,PMNs 与粘结剂接触后活性均有不同程度的降低,这就提示我们,暴露在龈沟液中的粘结剂与 PMNs 接触后导致其活力下降,数目减少,使得局部防御能力下降,易发生感染导致炎症。

IL-8 是强效的促进炎症反应因子,催化和放大炎症反应,主要由 PMNs 分泌,评价生物材料的致炎作用应检测 PMNs 与材料接触后 IL-8 的分泌情况。Velard 等<sup>[7]</sup>曾将 PMNs 与人工关节材料颗粒直接接触培养,发现 IL-8 分泌量增多。同时,IL-8 与牙周组织疾病的发生有密切的关系<sup>[11-12]</sup>。所以本实验检测 PMNs 接触粘结剂后 IL-8 浓度变化,结果显示粘结剂组的 IL-8 浓度均有升高,说明粘结剂有致炎作用,与粘结剂暴露于龈沟后易引发牙龈炎、牙周炎有关。

龈沟液内的 PMNs 作为牙周免疫的第一道防线,通过吞噬并杀伤病原体的过程发挥防御作用。PMNs 激活后可生成并释放大量 ROS,用以杀灭微生物及外来异物,同时耗氧量显著增加,这一现象称为呼吸爆发,呼吸爆发是 PMNs 杀伤病原微生物的关键环节<sup>[3,13]</sup>。本研究结果显示,与玻璃离子水门汀接触后,PMNs 的 ROS 代谢水平上调,说明 PMNs 接触玻璃离子水门汀后抗菌性能增强。

综上所述,与牙科粘结剂接触后 PMNs 的活性下降,炎症因子释放增多,易引发局部炎症和局部易感染,提示临床操作过程中应尽量避免粘结剂在牙龈沟内的残留以及提高冠边缘密合度以减少粘结剂暴露,3种粘结剂中玻璃离子水门汀的致炎性相对较低,抗菌性能相对较高,为临床选择提供依据。

#### [参考文献]

- [1] Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes [J]. *Immunity*, 2010, 33(5):657-670
- [2] 曹采方. 临床牙周病学 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2006:71-72
- [3] Sozio RB. The marginal aspect of the ceramo-metal restoration; the collarless ceramo-metal restoration [J]. *Dent Clin North Am*, 1977, 21(4):787-801
- [4] Slots J. The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis [J]. *Scand J Dent Res*, 1977, 85(2):114-121
- [5] Nadzam GS, De La Cruz C, Greco RS. Neutrophil Adhesion to Vascular Prosthetic Surfaces Triggers Nonapoptotic Cell Death [J]. *Ann Surg*, 2000, 231(4):587-599
- [6] Edwards FC, Taheri A, Dann SC. Characterization of cytolytic neutrophil activation in vitro by amorphous hydrated calcium phosphate as a model of biomaterial inflammation [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 96(3):552-565
- [7] Velard F, Laurent-Maquin D, Guillaume C. Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction [J]. *Acta Biomater*, 2009, 5(5):1708-1715
- [8] Sorensen JA. A rationale for comparison of plaque-retaining properties of crown systems [J]. *J Prosthet Dent*, 1989, 62(2):264-269
- [9] 贾文英, 史弘道. 细胞毒性试验评价医用装置生物相容性的研究概况 [J]. *实用美容整形外科杂志*, 2001, 12(5):255-257
- [10] 王 珊, 梁学颖, 李 宁, 等. 一种新的检测细胞凋亡的多参数流式细胞分析方法 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2002, 9(3):165-168
- [11] 王宏岩, 潘亚萍. 慢性牙周炎患者 IL-8 和弹性蛋白酶水平的研究 [J]. *口腔医学研究*, 2007, 23(1):1-3
- [12] 谢 昊. IL-8 及其与牙周炎的关系 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 1995, 5(2):121
- [13] Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils [J]. *J Immunol Methods*, 1999, 232(1-2):3-14

[收稿日期] 2011-10-11