

三种排龈线对体外培养人牙龈成纤维细胞毒性的比较**

倪莹¹, 张晓明², 惠敏¹, 刘健³

Comparison of cytotoxicity among three gingival retraction cords on human gingival fibroblasts *in vitro*

Ni Ying¹, Zhang Xiao-ming², Hui Min¹, Liu Jian³

¹College of Stomatology, Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China; ²Department of Prosthodontics, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China; ³Department of Orthodontics, Rizhao Hospital of Traditional Chinese Medicine, Rizhao 276800, Shandong Province, China

Ni Ying★, Studying for master's degree, College of Stomatology, Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China
niying860711@163.com

Corresponding author: Zhang Xiao-ming, Master, Associate professor, Department of Prosthodontics, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China

Supported by: Project of Education Commission of Shandong Province, No.31208*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.29.016

Received: 2011-12-29
Accepted: 2012-01-20

文章亮点:

3种排龈线对牙龈成纤维细胞都有一定的毒性, 肾上腺素排龈线毒性最大, 硫酸铝排龈线毒性次之, 不含药排龈线毒性最小。

Abstract

BACKGROUND: In recent years, the gingival retraction effect of gingival retraction drugs is a hot topic for domestic and foreign scholars, while the biocompatibility of the commercial gingival retraction cord is less involved.

OBJECTIVE: To evaluate the cytotoxicity effect of three kinds of gingival retraction cords on human gingival fibroblasts, and to provide theoretical basis for choosing proper gingival retraction cords in clinic.

METHODS: Three kinds of gingival retraction cords (epinephrine-impregnated cord, aluminium sulphate-impregnated cord and non-drug-impregnated cord) were incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum for 24 hours, according to 1:1 and 1:4 dilution, and then the cords acted on gingival fibroblasts cultured *in vitro*. Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum was used as negative control group.

RESULTS AND CONCLUSION: The results of MTT assay demonstrated that the three kinds of gingival retraction cords all could inhibit human gingival fibroblasts growth and proliferation. The cytotoxicity of the three kinds of gingival retraction cords in the leaching liquor with 1:1 dilution was significantly higher than that of 1:4 dilution and control groups ($P < 0.05$). The cytotoxicity of epinephrine-impregnated cord in the leaching liquor with 1:4 dilution was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The results of transmission electron microscope showed that some cells in the epinephrine-impregnated cord group were found apoptosis. These findings suggest that the three kinds of gingival retraction cords all have certain cytotoxicity to gingival fibroblasts. The cytotoxicity of epinephrine-impregnated cord is the biggest, followed by aluminium sulphate-impregnated cord, and the cytotoxicity of the non-drug-impregnated cord is the smallest.

Ni Y, Zhang XM, Hui M, Liu J. Comparison of cytotoxicity among three gingival retraction cords on human gingival fibroblasts *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(29): 5396-5400. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 近年来, 国内外学者研究热点主要集中在排龈药物的排龈效果, 而对商品化排龈线的生物相容性研究较少。

目的: 评价 3 种排龈线对人牙龈成纤维细胞的毒性作用, 为指导临床选择理想的排龈线提供理论依据。

方法: 3 种排龈线(含肾上腺素排龈线、含硫酸铝排龈线、不含药排龈线)浸透在含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 中 24 h, 再按 1:1 和 1:4 浓度稀释, 分别作用于体外培养的牙龈成纤维细胞, 阴性对照组为含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM。

结果与结论: MTT 比色法结果显示, 3 种排龈线均可抑制人牙龈成纤维细胞生长及增殖, 3 种排龈线浸提液 1:1 稀释后的毒性明显大于 1:4 稀释组和对照组($P < 0.05$), 肾上腺素排龈线浸提液 1:4 稀释后的毒性也明显大于对照组($P < 0.05$)。透射电镜观察显示肾上腺素组部分细胞出现凋亡。结果可见 3 种排龈线对牙龈成纤维细胞都有一定的毒性, 肾上腺素排龈线毒性最大, 硫酸铝排龈线毒性次之, 不含药排龈线毒性最小。

关键词: 排龈线; 牙龈成纤维细胞; 细胞毒性; 肾上腺素; 硫酸铝

倪莹, 张晓明, 惠敏, 刘健. 三种排龈线对体外培养人牙龈成纤维细胞毒性的比较[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(29):5396-5400. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

冠边缘适合性直接影响到修复体的美观、固位及牙周组织健康,不良修复体修复一段时间后出现牙龈红肿、易出血、龈退缩及牙槽嵴顶吸收等症状,其中,与其密切相关的因素包括:牙体预备和排龈。排龈术通过游离龈短暂退缩,暴露龈下冠边缘终止线,以减少对龈沟上皮的损伤,目前最常用的排龈方法为机械化学法^[1],不合理的排龈会造成牙龈永久性退缩及结合上皮向根方迁延,使修复体冠边缘外露,继而导致微渗漏及继发龋的发生,影响修复效果^[2],理想的排龈线应具备良好的生物相容性,并且排龈效果良好。近年来,国内外学者研究热点主要集中在排龈药物的排龈效果^[3-6],而对排龈线的生物相容性研究较少。

本实验在体外培养人牙龈成纤维细胞的基础上,检测3种排龈线对人牙龈成纤维细胞增殖活性及超微结构的影响,为临床选择理想的排龈线提供理论依据。

1 材料和方法

设计: 随机分组,对比观察实验。

时间及地点: 实验于2011-02/08在滨州医学院临床医学实验中心完成。

材料:

试剂和仪器	来源
高糖 DMEM、胎牛血清	Hyclone, 美国
胰蛋白酶	Amresco, 美国
噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)	Sigma, 美国
二甲基亚砷	Solarbio, 美国
含肾上腺素排龈线、含硫酸铝排龈线、不含药排龈线	ULTRAPAK 公司, 美国
RT-6000 酶标分析仪	Kayto
JEM-1400 透射电镜	日本电子株式会社

实验方法:

实验分组: 实验组为含肾上腺素排龈线浸提液1:1组、1:4组、含硫酸铝排龈线1:1组、1:4组、不含药排龈线1:1组、1:4组,阴性对照组为含体积分数为10%胎牛血清的DMEM。

排龈线浸提液制备: 将上述3种排龈线(#00)各

10英寸分别放入盛有10 mL完全培养基(含体积分数为10%胎牛血清的DMEM)的无菌小瓶中^[7],按照GB/T 16886.12/ISO 10993-12浸提条件^[8],24 h后取出排龈线,用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM按1:1和1:4浓度稀释。

人牙龈成纤维细胞培养: 选取滨州医学院附属医院就诊需正畸减数拔牙的12~20岁无牙周疾病患者的牙龈组织进行原代培养。取材后即刻放入含有3倍双抗(300 U/mL青霉素, 300 mg/L链霉素)的D-Hank's液中,立即送回实验室,采用组织块培养法^[9],在超净台内,尽量减去上层,剪成1 mm³的组织小块,均匀分布于培养皿底部,置入37℃,体积分数为5%CO₂的培养箱中,贴壁1 h,之后加入含有体积分数为20%胎牛血清的DMEM,3 d换液1次,每天倒置显微镜下观察,细胞爬满瓶底70%~80%,胰酶消化、分离纯化,第3~6代细胞用于实验。

细胞组织来源鉴定: 取第4代人牙龈成纤维细胞,以5×10⁷ L⁻¹浓度接种到6孔培养板中的玻片上,每孔500 μL,24 h后PBS冲洗2遍,体积分数为95%乙醇固定30 h,吹干按常规SP法操作,进行波形蛋白和细胞角蛋白染色,光镜下观察细胞染色情况。

MTT检测细胞增殖: 取第4代生长良好的人牙龈成纤维细胞,调整细胞浓度至5×10⁷ L⁻¹,每孔100 μL接种到96孔板上,共7组,每组9个副孔,放入37℃、体积分数为5%CO₂培养箱中培养24 h,弃孔内液体,PBS冲洗2遍清除不贴壁的细胞,实验组加入6种不同浓度排龈线浸提液,对照组加入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM,将96孔培养板放入37℃、体积分数为5%CO₂培养箱继续培养3 d,酶联免疫检测仪在490 nm波长下检测吸光度值(A值)。

透射电镜观察排龈线对人牙龈成纤维细胞的损伤: 取第5代生长良好的人牙龈成纤维细胞,均以10⁸ L⁻¹的浓度分别接种于7个10 cm培养皿中,待细胞贴壁后加入不同浓度的浸提液,对照组加含体积分数为10%胎牛血清DMEM培养液,放入37℃、体积分数为5%CO₂培养箱中培养3 d,用PBS冲洗2遍,重新加入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM,用细胞刮收集细胞,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 滨州医学院口腔学院, 山东省滨州市 256603; ² 滨州医学院附属医院口腔修复科, 山东省滨州市 256603; ³ 日照市中医院正畸科, 山东省日照市 276800

倪莹★, 女, 1986年生, 山东省潍坊市临朐县人, 汉族, 滨州医学院在读硕士, 主要从事排龈药物毒性研究。
niying860711@163.com

通讯作者: 张晓明, 硕士, 副教授, 滨州医学院附属医院口腔修复科, 山东省滨州市 256603

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2012)29-05396-05

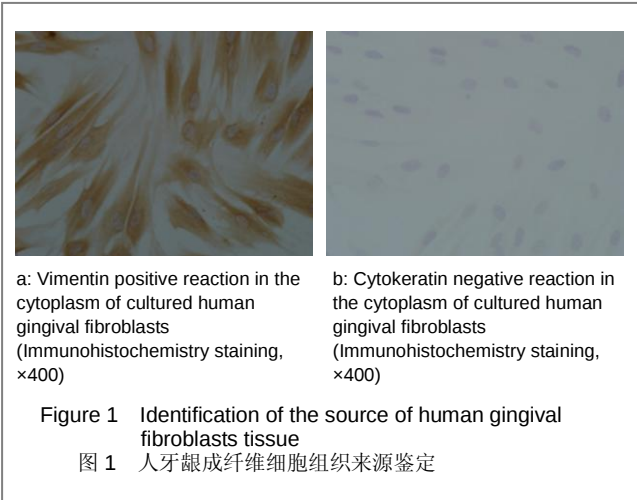
收稿日期: 2011-12-29
修回日期: 2012-01-20
(20111029018/M·T)

统计学分析: 实验数据由第一作者采用SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 对各组数据进行正态分布及方差齐性检验, 不同浓度的排龈线浸提液和对照组的MTT检测结果进行单因素方差分析, 采用q检验进行两两比较。

2 结果

2.1 原代培养人牙龈成纤维细胞形态 培养7~10 d可见有细胞从组织块周围游出, 以组织块为中心呈放射状排列, 倒置显微镜下观察细胞呈梭形或纺锤形, 有多个较长的细胞突起(2~4个), 胞浆丰满、均匀, 核卵圆形或圆形, 有1~3个核仁。

2.2 人牙龈成纤维细胞组织来源鉴定 免疫组化SP法单克隆抗体鉴定细胞来源, 波形蛋白阳性, 细胞胞浆棕黄色染色, 胞核蓝染, 见图1a; 角蛋白阴性, 细胞胞浆不着色, 细胞核蓝染, 见图1b, 符合中胚层来源的成纤维样细胞特征。



2.3 不同浓度的排龈药物对人牙龈成纤维细胞增殖的影响 见表1。

表1 不同浓度的3种排龈线对人牙龈成纤维细胞增殖的影响

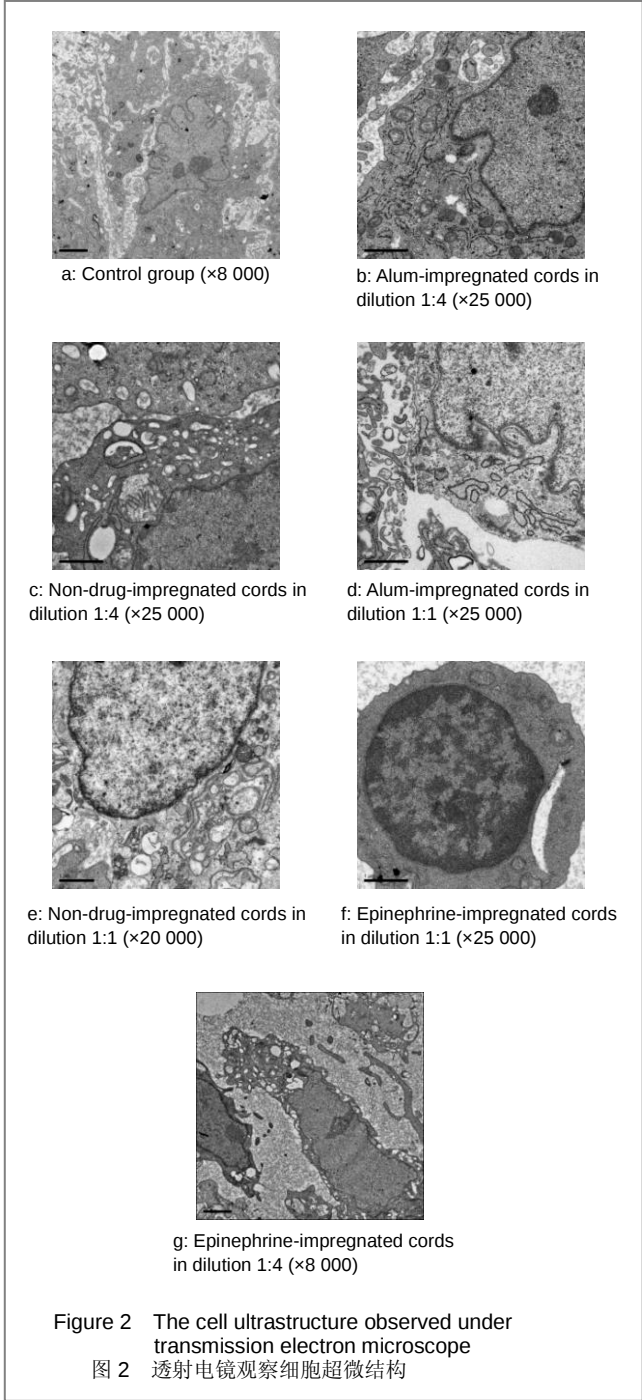
Table 1 Effect of the three kinds of gingival retraction cords in different concentration dilutions on the proliferation of human gingival fibroblasts (x±s, n=9)

Group	A
Epinephrine-impregnated cord	
1:1	0.020±0.006 ^{ab}
1:4	0.252±0.033 ^b
Aluminium sulphate-impregnated cord	
1:1	0.155±0.025 ^{ab}
1:4	0.304±0.027
Non-drug-impregnated cord	
1:1	0.220±0.028 ^{ab}
1:4	0.317±0.030
Control	0.320±0.048

^aP < 0.05, vs. 1:4 concentration group; ^bP < 0.05, vs. control group

经正态性检验 $P > 0.05$, 方差齐性检验 $P=0.013(P < 0.05)$, 方差不齐, 应用单因素方差分析近似法, $P=0.000$, 说明组间均数差异有显著性意义, 两两比较结果显示, 3组排龈线浸提液1:1稀释与1:4稀释后比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 肾上腺素排龈线浸提液1:4稀释组与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.4 透射电镜观察结果 见图2。



正常牙龈成纤维细胞呈梭形或不规则形, 有多个较长的突起, 无基膜, 核形不规则, 核仁清晰可见, 核内染色质分布均匀, 有较多粗面内质网, 可见线粒体、高

尔基复合体、核糖体等细胞器,见图2a。

含硫酸铝排龈线浸提液1:4和不含药排龈线浸提液1:4稀释后,人牙龈成纤维细胞超微结构相似,细胞形态正常,核内染色质分布均匀,线粒体肿胀、部分线粒体嵴模糊不清,粗面内质网有轻微肿胀和脱颗粒,见图2b, c。

含硫酸铝排龈线浸提液1:1和不含药排龈线1:1稀释后,人牙龈成纤维细胞超微结构相似,细胞器形态改变明显,染色质分布不均匀,核周池轻微扩展。粗面内质网肿胀,网池呈中度扩张,核糖体脱颗粒显著增加,线粒体形态不规则,肿胀显著,所有的线粒体嵴均消失,线粒体基质呈絮状,部分呈空泡状,见图2d, e。

含肾上腺素的排龈线浸提液1:1稀释后,人牙龈成纤维细胞超微结构显示:大部分细胞凋亡,细胞膜表面平滑,微绒毛消失,整个细胞浓缩,电子密度增大,细胞器明显减少,细胞核异染色质增加,呈斑块状分布,若进一步发展,导致核膜和细胞外膜皱折,核裂解,细胞膜包绕其裂解碎片脱落后形成凋亡小体,见图2f。

含肾上腺素的排龈线浸提液1:4稀释后,人牙龈成纤维细胞超微结构显示:染色质分布不均,细胞器明显减少,线粒体肿胀,形态不规则,见图2g。

3 讨论

3.1 细胞培养与实验方法的选择 实验用人牙龈成纤维细胞是通过人牙龈组织原代培养获得,常用的原代培养方法有组织块法和酶消化法^[10],其中组织块培养法具有操作简单、对组织损伤小、污染率低等优点,故本实验选用原代组织块法培养。排龈材料在牙龈沟内与上皮细胞接触,在牙龈沟底部与上皮细胞的连接区(结缔组织)接触^[11],或者当牙龈组织退缩,上皮溃疡形成之后,排龈线与牙龈成纤维细胞直接接触^[10],本实验选用人牙龈成纤维细胞更具临床指导和实用价值。

细胞毒性检测法是体外评价材料生物相容性方法之一,体外方法简单、可重复性、高效,适合评价牙科材料基本的生物学特性,该方法可以更好地进行定量分析,而不受机体其他因素的影响。

3.2 排龈线的选择 市场上可供选择的排龈线有多种类型及型号,如:编织状排龈线,双股捻搓排龈线及棉线等,选用最基本的要求是排龈线应具备一定的柔韧性,使用专用的排龈器械较容易置入牙龈沟,取出时不易粘着器械、分叉、松散,编织状排龈线因具备更好的止血,扩张及干燥龈沟,易从牙龈沟内取出而不易变形

等特点而被广泛应用,而且编织状排龈线比双股捻搓排龈线效果好^[12],临床上较常使用00号排龈线作为双线排龈的底线,本实验3种排龈线(不含药排龈线;含硫酸铝排龈线;含肾上腺素排龈线)均选用编织状及00号排龈线更符合临床排龈。

3.3 排龈线浸提液对人牙龈成纤维细胞增殖活性的影响 人牙龈成纤维细胞是人牙龈固有层的主要细胞,能够分泌白细胞介素1、白细胞介素6、白细胞介素8、前列腺素E2和单核细胞趋化蛋白1,参与牙周炎的免疫破坏过程,近年来通过体外培养人牙龈成纤维细胞来研究牙周病的发病机制和治疗^[13-14]。本实验MTT结果显示,3种排龈线浸提液1:1稀释后的毒性明显大于对照组,3种排龈线均可抑制人牙龈成纤维细胞生长及增殖,这说明排龈材料进入龈沟内发挥临床效应的同时,也会产生一定的局部不良反应。

各组排龈线经不同浓度稀释后细胞增殖活性明显提高,各组排龈线浸提液经1:1稀释的毒性明显大于1:4,肾上腺素排龈线1:1稀释后透射电镜结果显示,大部分细胞出现了凋亡现象,细胞核变化较为明显,核染色质边集,而1:4稀释后毒性也大于其他组。近年来对使用肾上腺素的研究尚存在争议,因肾上腺素属于拟交感血管收缩剂,对机体产生一定的系统性不良反应,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,因此在使用时受到一定的限制。Polat等^[15]等研究发现,肾上腺素排龈线能安全用于牙龈健康的患者,如果患者紧张或牙龈损伤应尽量避免使用含肾上腺素的排龈药物。而Csillag等^[16]对0.1%, 0.01%, 0.001%肾上腺素进行研究发现,0.01%肾上腺素既可预防移出排龈线后导致的充血反应,又不影响血管变化。本实验使用的排龈线中每英寸排龈线含(0.3±0.2) mg肾上腺素,有研究表明健康成年人使用肾上腺素的量为0.2 mg,心血管疾病患者的最大剂量为0.04 mg,1英寸长的排龈线放入牙龈沟内5~15 min,肾上腺素被吸收71 μg^[17],约为有心血管疾病患者推荐剂量0.04 mg的2倍,所以建议伴有心血管疾病、高血压等患者避免使用含肾上腺素排龈线。

含硫酸铝排龈线经1:1与1:4稀释后,MTT及透射电镜检测毒性较小,与肾上腺素比较,不会产生系统性不良反应,其主要通过凝固蛋白、抑制血浆蛋白质从毛细血管中游出而发挥血管收缩作用,从而产生止血及减少龈沟液渗出等效果,提示临床应用较安全。

本实验显示不含药排龈线出现一定的细胞毒性反应,可以归于某些细胞毒性成分的析出,这一现象难以

确定,因为商品化排龈材料成分描述不充分,考虑可能此类排龈线中存在止血剂成分,止血剂的应用可以减少对软组织损伤和出血,防止龈沟液和其他渗出液对术区的污染。

综上所述,以上3种排龈线均可对牙龈成纤维细胞产生一定的细胞毒性作用,长时间残余在牙龈沟内的排龈药物阻碍牙周组织的愈合及再生,可以导致牙龈萎缩、附着丧失等。肾上腺素排龈线毒性最大,硫酸铝排龈线次之,不含药排龈线也出现了一定的细胞毒性,稀释后毒性明显减小,建议排龈后用大量清水冲洗以便移除残留在牙龈沟内的药物,减少牙龈组织的损伤,从而提高固定修复体修复成功率。

4 参考文献

- [1] Kopac I, Batista U, Cvetko E, et al. Viability of fibroblasts in cell culture after treatment with different chemical retraction agents. J Oral Rehabil. 2002;29(1):98-104.
- [2] Kopac I, Cvetko E, Pavlica Z, et al. Gingival tissue inflammatory response following treatment with chemical retraction agents in Beagle dogs. Pflugers Arch. 2001;442(6 Suppl 1):R145-146.
- [3] Kumbuloglu O, User A, Toksavul S, et al. Clinical evaluation of different gingival retraction cords. Quintessence Int. 2007;38(2):e92-98.
- [4] Feng YZ, Zeng XH. Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi. 2011;29(1):53-56.
冯云枝,曾晓华.不同排龈药物的排龈效果观察[J].华西口腔医学杂志,2011,29(1):53-56.
- [5] Sun XW, Sun GL, Xiao LJ. Kouqiang Hemian Xiufuxue Zazhi. 2007;8(4):273-275.
孙学武,孙桂兰,肖丽静.含不同排龈药物排龈线排龈效果的比较研究[J].口腔颌面修复学杂志,2007,8(4):273-275.
- [6] Zhang JJ, Liu YH, Lv PJ, et al. Beijing Daxue Xuebao. 2011;43(1):73-76.
张津京,刘玉华,吕培军,等.三维模型分析法评价不同排龈时间下的龈沟宽度[J].北京大学学报,2011,43(1):73-76.
- [7] Liu CM, Huang FM, Yang LC, et al. Cytotoxic effects of gingival retraction cords on human gingival fibroblasts in vitro. J Oral Rehabil. 2004;31(4):368-372.
- [8] 医疗器械生物学评价第5部分:体外细胞毒性试验GB/T16886.5-2003/ISO 10993-5,1999.
- [9] Situ ZQ, Wu JZ. Xi'an: Xi'an World Publishing Corporation. 2004.
司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版西安公司,2004.
- [10] Nowakowska D, Saczko J, Kulbacka J, et al. Dynamic oxidoreductive potential of astringent retraction agents. Folia Biol (Praha). 2010;56(6):263-268.
- [11] Ruel J, Schuessler PJ, Malament K, et al. Effect of retraction procedures on the periodontium in humans. J Prosthet Dent. 1980;44(5):508-515.
- [12] Jokstad A. Clinical trial of gingival retraction cords. J Prosthet Dent. 1999;81(3):258-261.
- [13] Mostafa NZ, Uludağ H, Varkey M, et al. In vitro osteogenic induction of human gingival fibroblasts for bone regeneration. Open Dent J. 2011;5:139-145.
- [14] Ono M, Kanto K, Ueki J, et al. Quest for anti-inflammatory substances using IL-1 β -stimulated gingival fibroblasts. In Vivo. 2011;25(5):763-768.
- [15] Polat NT, Ozdemir AK, Turgut M. Effects of gingival retraction materials on gingival blood flow. Int J Prosthodont. 2007;20(1):57-62.
- [16] 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 Prosthet Dent. 2007;97(1):6-11.
- [17] Kellam SA, Smith JR, Scheffel SJ. Epinephrine absorption from commercial gingival retraction cords in clinical patients. J Prosthet Dent. 1992;68(5):761-765.

来自本文课题的更多信息一

基金声明: 山东省教委课题(3120)。

作者贡献: 实验设计及实施为第一作者,评估为第二作者,资料收集为其他作者。第一作者成文,第二作者审校,第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 经患者知情同意,牙龈组织取材符合伦理学标准。

研究的不足之处: ①本课题设计为体外模拟实验,无法对临床排龈过程中相关的其他因素进行综合考虑。②排龈线进入牙龈沟后,龈沟中的龈沟液、血清等影响材料析出,可减小排龈材料的细胞毒性。