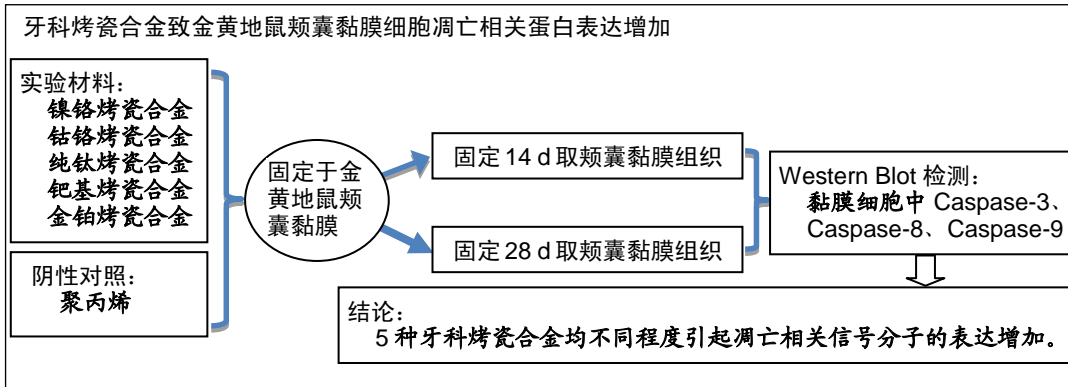


牙科烤瓷合金对金黄地鼠颊囊黏膜中凋亡相关蛋白表达的影响

陈润^{1,2}, 邱冰妍³, 江磊^{1,2}, 潘宇^{1,4}, 王颖卉^{1,2}, 程辉^{1,2,4} (1福建医科大学附属口腔医院修复科, 福建省福州市 350002; 2福建医科大学口腔医学研究院, 福建省福州市 350002; 3福建省级机关医院口腔科, 福建省福州市 350001; 4福建医科大学口腔医学美学与生物力学研究中心, 福建省福州市 350002)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1537 ORCID: 0000-0002-2601-1205(陈润)

文章快速阅读:



陈润, 男, 1979 年生, 福建省闽侯县人, 汉族, 2008 年福建医科大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事口腔修复学和口腔材料学研究。

通讯作者: 程辉, 教授, 主任医师, 福建医科大学附属口腔医院口腔修复科, 福建省福州市 350002

文献标识码:A

稿件接受: 2018-09-01



文题释义:

牙科烤瓷合金: 用于制作金属烤瓷修复体的合金材料, 以金属合金作为基底, 将牙科陶瓷材料在高温下熔附于金属表面。这些合金材料包括镍铬合金、钴铬合金、纯钛烤瓷合金、钽基合金、金铂合金等。

Caspase 家族: 是凋亡信号通路上一组重要的信号分子, 大致可分为 3 类: 第一类为凋亡启动因子, 是凋亡信号通路中的上游信号分子, 包括 Caspase-2、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-10 等, 它们能在特定情况下活化, 还能够识别和激活信号通路中位于其下游的信号分子; 第二类为凋亡执行因子, 在凋亡信号转导通路的下游, 包括 Caspase-3、Caspase-6 和 Caspase-7 等, 它们能够作用于一些特异性的底物, 最终导致细胞凋亡; 第三类为炎症介导因子, 包括 Caspase-1、Caspase-4、Caspase-5 和 Caspase-11 等, 这些分子能够介导炎症反应并在诱导细胞凋亡时起辅助作用。

摘要

背景: 有研究证实, 牙科烤瓷合金具有不同程度的细胞毒性, 可导致细胞凋亡, 但以往关于牙科烤瓷合金引起细胞凋亡的研究多采用体外实验, 无法很好地模拟口腔环境。

目的: 观察牙科烤瓷合金对金黄地鼠颊囊黏膜中凋亡相关蛋白表达的影响。

方法: 取 60-70 d 龄雄性金黄地鼠 36 只(北京维通利华实验动物技术有限公司提供), 随机分 6 组, 分别在颊囊黏膜表面缝合固定镍铬烤瓷合金、钴铬烤瓷合金、纯钛烤瓷合金、钽基烤瓷合金、金铂烤瓷合金及聚丙烯(阴性对照)。固定 14, 28 d, 切取与试件接触的颊囊黏膜, Western Blot 检测黏膜细胞中 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白表达情况。

结果与结论: ①固定 14, 28 d 时, 金铂烤瓷合金组 Caspase-3 蛋白表达量与阴性对照组比较无明显差异($P > 0.05$), 其余 4 种烤瓷合金组 Caspase-3 蛋白表达量高于阴性对照组($P < 0.05$); ②固定 14 d 时, 各烤瓷合金组 Caspase-8 蛋白表达量均高于阴性对照组($P < 0.05$); 固定 28 d 时, 镍铬烤瓷合金组、钽基烤瓷合金组 Caspase-8 蛋白表达量高于阴性对照组($P < 0.05$), 其余烤瓷合金组 Caspase-3 蛋白表达量与阴性对照组比较无明显差异($P > 0.05$); ③固定 14 d 时, 各烤瓷合金组 Caspase-9 蛋白表达量均高于阴性对照组($P < 0.05$); 固定 28 d 时, 钴铬合金组 Caspase-9 蛋白表达量与阴性对照组比较无明显差异($P > 0.05$), 其余烤瓷合金组 Caspase-9 蛋白表达量均高于阴性对照组($P < 0.05$); ④结果表明, 5 种牙科烤瓷合金均不同程度引起凋亡相关信号分子的表达增加。

关键词:

口腔材料; 牙科烤瓷合金; 细胞凋亡; 金黄地鼠; 颊囊黏膜; 凋亡相关蛋白

主题词:

金属烤瓷合金; 细胞凋亡; 颊囊鼠属; 组织工程

中图分类号: R459.9; R318.19

基金资助:

国家自然科学基金(81641158), 项目负责人: 程辉; 福建省自然科学基金(2016J01354), 项目负责人: 程辉

缩略语:

半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶: cysteinyl aspartate specific proteinase, Caspase

Chen Run, Master, Associate chief physician, Department of Prosthodontics, Hospital of Stomatology, Fujian Medical University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China; Institute of Stomatology, Fujian Medical University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

Corresponding author: Cheng Hui, Professor, Chief physician, Institute of Stomatology, Center for Stomatology Aesthetics and Biomechanics, Fujian Medical University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

Effect of dental ceramic alloys on the expression of apoptosis-related signal proteins in the oral buccal mucosa of golden hamsters

Chen Run^{1,2}, Qiu Bingyan³, Jiang Lei^{1,2}, Pan Yu^{1,4}, Wang Yinghui^{1,2}, Cheng Hui^{1,2,4} (¹Department of Prosthodontics, Hospital of Stomatology, Fujian Medical University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China; ³Department of Stomatology, Fujian Provincial Governmental Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China; ²Institute of Stomatology, ⁴Center for Stomatology Aesthetics and Biomechanics, Fujian Medical University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Dental porcelain alloys hold different levels of cytotoxicity, which can lead to cell apoptosis. However, the *in vitro* researches on dental ceramic alloy causing apoptosis are mainly conducted, in which the oral environment cannot be simulated well.

OBJECTIVE: To investigate the effects of dental ceramic alloys on apoptotic protein expression in the oral buccal mucosa of golden hamsters.

METHODS: Thirty-six 60–70-day-old male golden hamsters provided by Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. were randomly divided into six groups. Five kinds of dental ceramic alloys (nickel-chromium, cobalt chromium, CPTi, palladium based and gold-platinum alloys) and polypropylene (negative control) were fixed on the oral mucosa of golden hamsters in corresponding groups. The mucosae contacting with the specimens were removed at 14 and 28 days, respectively. The protein expression levels of Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9 in the buccal mucosa were detected by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) At 14 and 28 days of fixation, there was no significant difference in the Caspase-3 protein level between gold-platinum alloy group and negative control groups ($P > 0.05$), and the level of Caspase-3 protein in the remaining four groups was significantly higher than that in the negative control group ($P < 0.05$). (2) At 14 days, the Caspase-8 protein level in each group was significantly higher than that in the negative control group ($P < 0.05$). After 28 days of fixation, the protein level of Caspase-8 in the nickel-chromium and palladium group was higher than that in the negative control group ($P < 0.05$), while the protein level of Caspase-8 in the other groups was not significantly different from that in the negative control group ($P > 0.05$). (3) At 14 days, the Caspase-9 protein level in each group was higher than that in the negative control group ($P < 0.05$). At 28 days, there was no significant difference in the Caspase-9 protein level between cobalt-chromium and negative control groups ($P > 0.05$), while the Caspase-9 protein level in the remaining groups was higher than that in the negative control group ($P < 0.05$). These results indicate that the use of five dental alloys can upregulate the levels of apoptosis-related signal molecules to different degrees.

Subject headings: Metal Ceramic Alloys; Apoptosis; Dipodomys; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81641158 (to CH); the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. 2016J01354 (to CH)

0 引言 Introduction

在目前的口腔修复临床工作中, 牙科烤瓷合金仍然被广泛应用。然而有研究证实, 牙科烤瓷合金具有不同程度的细胞毒性, 会导致细胞凋亡^[1-5]。但以往关于牙科烤瓷合金引起细胞凋亡的研究多采用体外实验, 体外实验虽较容易控制, 但无法充分地模拟口腔环境。相反, 体内实验则能够更好地模拟牙科合金在患者口腔环境中与宿主机体互相作用的情况。

鉴于细胞发生凋亡时, Caspase家族, 全称为半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(cysteinyl aspartate specific proteinase, Caspase)是凋亡信号通路上一组重要的信号分子^[6]。因此该研究采用Western blot方法检测当牙科烤瓷合金作用于金黄色地鼠颊囊黏膜上皮细胞时, 凋亡相关分子Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9的蛋白表达情况, 在分子水平上探究牙科烤瓷合金与细胞凋亡的关系。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年6月至2017年6月在福建医科大学口腔医学院完成。

1.3 材料

实验动物: 60–70 d龄雄性金黄色地鼠36只, SPF级, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

实验主要材料: 镍铬烤瓷合金(美国AalbaDent公司); 钴铬烤瓷合金(德国Bego公司); 纯钛烤瓷合金(德国

Dentaurum公司); 钯基烤瓷合金(德国HeraeusKulzer公司); 金铂烤瓷合金(瑞典AllDental公司); 聚丙烯(福建联合石油化工有限公司)。

实验主要试剂和仪器: BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液(中国碧云天生物技术研究); PVDF膜(美国MILLIPORE公司); β -actin小鼠单克隆抗体、Caspase-3兔抗小鼠多克隆抗体、Caspase-8兔抗小鼠多克隆抗体、Caspase-9兔抗小鼠多克隆抗体(美国Abcam公司); HRP标记山羊抗鼠抗体、HRP标记山羊抗兔抗(美国Thermo Scientific公司); 高速冷冻离心机(日本日立工机有限公司); 滤光片型酶标仪、凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司); 蛋白电泳-电转系统(中国凯元公司);

1.4 实验方法

1.4.1 试件的制备 用铸造蜡制作直径为5.1 mm、厚度为1.2 mm的带柄圆片状蜡型, 并在每个蜡型的直径3等份处穿2个直径 < 1 mm的小孔。将前述5种合金按照烤瓷合金铸造要求铸造。将铸造完成的试件表面喷砂, 然后经碳化硅砂纸逐号抛光, 以柱状金刚砂磨头打磨外周及边缘, 硅胶磨头将边缘抛光圆钝, 布轮抛光, 得到直径5 mm、厚度0.5 mm的试件^[7]。选用聚丙烯材料作为阴性对照材料, 将其制作成直径5.0 mm、厚度0.5 mm圆片状试件^[8], 见图1, 2, 用金刚砂车针在其直径3等份处打2个小孔, 再对试件表面进行抛光, 使之表面光滑且边缘圆钝。将所有实验所需试件用体积分数95%乙醇和超纯水分别超声清洗30 min, 烘干后将所有实验组烤瓷合金试件于121.3 °C高压蒸汽灭

菌20 min。阴性对照组试件用碘伏浸渍后，紫外线照射消毒2 h后备用。



图1 六种实验试件
Figure 1 Six experimental specimens



图2 试件直径
Figure 2 Diameter of the specimens

1.4.2 实验分组及动物模型构建

实验分组: 按照随机数字表将36只金黄地鼠分为6组，每组6只。1-5组为实验组，对应镍铬烤瓷合金、钴铬烤瓷合金、纯钛烤瓷合金、钯基烤瓷合金、金铂烤瓷合金，分别编号为Ni、Co、Ti、Pd、Au；第6组用于阴性对照，编号为NC。实验前1周使动物适应环境。术前禁食8 h，以避免进行手术操作时金黄地鼠颊囊内贮存大量食物。

模型制作: 对金黄地鼠用置有异氟醚棉球的密闭容器进行吸入诱导麻醉，再用3%戊巴比妥钠生理盐水溶液按照60 mg/kg剂量对金黄地鼠腹腔注射麻醉。用碘伏将金黄地鼠口腔由外而内进行消毒后，常规铺巾，然后将其颊囊牵出，对欲进行实验的颊囊黏膜表面用体积分数75%医用乙醇消毒，用医用5-0缝合丝线将烤瓷合金试件及阴性对照组试件进行缝合固定，使试件固定在黏膜表面，缝合力量以使试件紧密贴合黏膜表面且黏膜表面不受压迫、无卷曲折叠为宜，见图3。

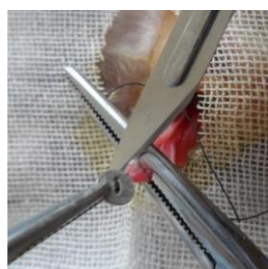


图3 将试件缝合于金黄地鼠颊囊
Figure 3 Suture of the specimens with the cheek pouch of golden hamsters

术后处理: 术后清醒之前，将金黄地鼠平放于饲养笼中，仔细观察其呼吸、心脏搏动情况，待其麻醉完全清醒禁食4 h，而后给予正常饮食。

标本获取: 试件缝合固定14, 28 d后，对实验动物口外碘伏消毒，将其颊囊牵出，暴露试件，将试件接触组织及周围的黏膜用体积分数75%医用乙醇棉球清洁消毒，牵起试件，切取固定试件的颊囊黏膜及其周围黏膜组织且拆除试件，见图4。将组织置于-80 °C冰箱保存。



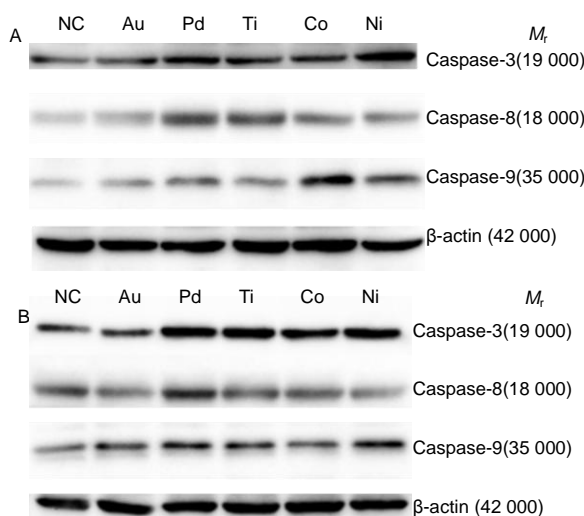
图4 切取与试件接触的颊囊黏膜
Figure 4 Removal of the buccal mucosa contacting with the specimens

1.5 主要观察指标 将组织在液氮保护下研磨成粉末状，加入适量RIPA裂解液，按照Western Blot常规实验步骤进行总蛋白提取、蛋白浓度测定、电泳、转膜、蛋白封闭、一抗孵育、二抗标记、显影曝光成像。用Image J灰度值测量软件测量上述实验步骤后得到的各组蛋白条带灰度值，并计算各组细胞中Caspase-3、Caspase-8与Caspase-9蛋白相对于内参β-actin的相对表达量。相对表达量=目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

1.6 统计学分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析。结果采用重复测量方差分析及最小显著差异(least significant difference, LSD-t)检验。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 Results

各实验组内参β-actin及Caspase-3、Caspase-8及Caspase-9的Western blot结果条带，见图5所示。



图注: 图中A为固定14 d凋亡信号分子蛋白表达, B为固定28 d凋亡信号分子蛋白表达。NC: 聚丙烯, Au: 金铂烤瓷合金, Pd: 钯基烤瓷合金, Ti: 纯钛烤瓷合金, Co: 钴铬烤瓷合金, Ni: 镍铬烤瓷合金。

图5 各组试件缝合固定14, 28时的颊囊黏膜凋亡信号分子蛋白表达条带

Figure 5 Expression of apoptotic signal molecules in the buccal mucosa at 14 and 28 days after fixation of the specimens

Caspase-3蛋白的相对表达量，见表1所示。经过重复测量方差分析发现，合金因素和时间因素存在交互作用，分别于2个时间点对5个实验组和阴性对照组进行两两对比发现：固定14, 28 d时，金铂烤瓷合金组与阴性对照组Caspase-3蛋白表达量均比较无明显差异($P > 0.05$)，其余实验组Caspase-3蛋白表达量均高于阴性对照组($P < 0.05$)。

表1 牙科烤瓷合金组与阴性对照组Caspase-3蛋白相对表达量的比较 (x±s)

Table 1 Relative expression level of Caspase-3 in the dental ceramic alloys and negative control groups

组别	固定 14 d	固定 28 d
镍铬烤瓷合金组	0.916±0.030 ^a	0.974±0.030 ^a
钴铬烤瓷合金组	0.468±0.020 ^a	0.864±0.025 ^a
纯钛烤瓷合金组	0.380±0.028 ^a	0.892±0.021 ^a
钯基烤瓷合金组	0.716±0.024 ^a	0.960±0.030 ^a
金铂烤瓷合金组	0.260±0.022	0.362±0.030
阴性对照组	0.254±0.034	0.369±0.026

表注: 相同时间点与阴性对照组比较, ^a*P* < 0.05。

Caspase-8蛋白相对表达量, 见表2所示。经过重复测量方差分析发现, 合金因素和时间因素存在交互作用, 分别于2个时间点对5个实验组和阴性对照组进行两两对比发现: 固定14 d时, 各实验组Caspase-8蛋白表达量均高于阴性对照组(*P* < 0.05); 固定28 d时, 镍铬烤瓷合金组、钯基烤瓷合金组Caspase-8蛋白表达量高于阴性对照组(*P* < 0.05), 其余实验组Caspase-8蛋白相对表达量与阴性对照组比较无明显差异(*P* > 0.05)。

表2 牙科烤瓷合金组与阴性对照组Caspase-8蛋白相对表达量的比较 (x±s)

Table 2 Relative expression level of Caspase-8 in the dental ceramic alloys and negative control groups

组别	固定 14 d	固定 28 d
镍铬烤瓷合金组	0.186±0.012 ^a	0.184±0.017 ^a
钴铬烤瓷合金组	0.231±0.022 ^a	0.155±0.024
纯钛烤瓷合金组	0.300±0.016 ^a	0.156±0.010
钯基烤瓷合金组	0.360±0.023 ^a	0.357±0.020 ^a
金铂烤瓷合金组	0.207±0.023 ^a	0.157±0.011
阴性对照组	0.124±0.029	0.158±0.010

表注: 相同时间点与阴性对照组比较, ^a*P* < 0.05。

Caspase-9蛋白相对表达量, 见表3所示。经过重复测量方差分析发现, 合金因素和时间因素存在交互作用, 分别于2个时间点对5个实验组和阴性对照组进行两两对比发现: 固定14 d时, 各实验组Caspase-9蛋白表达量均高于阴性对照组(*P* < 0.05); 固定28 d时, 钴铬烤瓷合金组Caspase-9蛋白表达量与阴性对照组比较无明显差异(*P* > 0.05), 其余各实验组Caspase-9蛋白表达量均高于阴性对照组(*P* < 0.05)。

表3 牙科烤瓷合金组与阴性对照组Caspase-9蛋白相对表达量的比较 (x±s)

Table 3 Relative expression level of Caspase-9 in the dental ceramic alloys and negative control groups

组别	固定 14 d	固定 28 d
镍铬烤瓷合金组	0.390±0.027 ^a	0.475±0.030 ^a
钴铬烤瓷合金组	0.489±0.015 ^a	0.291±0.010
纯钛烤瓷合金组	0.230±0.017 ^a	0.369±0.012 ^a
钯基烤瓷合金组	0.300±0.013 ^a	0.408±0.013 ^a
金铂烤瓷合金组	0.200±0.028 ^a	0.361±0.023 ^a
阴性对照组	0.104±0.013	0.305±0.024

表注: 相同时间点与阴性对照组比较, ^a*P* < 0.05。

3 讨论 Discussion

Caspase家族是凋亡信号通路上一组重要的信号分子。Caspase分子大致可分为3类^[6]: 第一类为凋亡启动因子, 是凋亡信号通路中的上游信号分子, 包括Caspase-2、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-10等, 它们能在特定情况下活化, 还能够识别和激活信号通路中位于其下游的信号分子; 第二类为凋亡执行因子, 在凋亡信号转导通路的下游, 包括Caspase-3、Caspase-6和Caspase-7等, 它们能够作用于一些特异性的底物, 最终导致细胞的凋亡; 第三类为炎症介导因子, 包括Caspase-1、Caspase-4、Caspase-5和Caspase-11等, 这些分子能够介导炎症反应并在诱导细胞凋亡时起辅助作用^[9]。研究选取的Caspase-3、Caspase-8及Caspase-9均为重要的凋亡信号分子, 并且Caspase-8是死亡受体途径即外源性途径中的重要分子, 而Caspase-9为线粒体途径即内源性途径中的重要分子, 这也是此次研究选用Caspase-3、Caspase-8及Caspase-9作为检测目标的原因。

研究采用 Western blot 技术检测经5种常用烤瓷合金持续刺激后, 颊囊黏膜中Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9蛋白表达强度, 结果发现: 除金铂烤瓷合金外, 其余金属在2个时间点均可引起Caspase-3蛋白的表达增高。该结果提示镍铬等4种烤瓷合金均可能引起与之接触金黄地鼠颊囊黏膜发生细胞凋亡。孟贺等^[10-11]在研究中发现, 镍铬、钯基烤瓷合金均能引起Caspase-3蛋白表达量增高, 金铂烤瓷合金不会引起其表达增高, 这与此次研究结果一致; 该研究结果显示, 金合金、钴铬、纯钛烤瓷合金并不会引起Caspase-3蛋白的高表达, 这与此次研究结果不同。推测可能原因是: ①该学者采用的是体外细胞模型, 而此次研究采用的是体内动物模型, 动物是活体, 具有新陈代谢的功能, 体内目的蛋白表达量相对较多变; ②该学者采用免疫组织化学来检测目的蛋白的表达量, 而此次研究采用的是Western blot来进行相对定量检测, 检测手段不同, 计量方式也不同, 故有可能造成结果不同。

此外, 镍铬、钴铬烤瓷合金腐蚀析出的主要离子中含有铬离子。谢颖^[12]的研究表明Cr⁶⁺能使肝细胞Caspase-3活性增加, 诱导肝细胞凋亡率增加, 并且能够诱导肝细胞线粒体膜电位降低, 减少线粒体外膜上镶嵌蛋白的表达, 导致线粒体功能紊乱。另外该学者还发现, 线粒体损伤拮抗剂有利于肝细胞线粒体功能的维持, 抑制Caspase-3活性的增高, 减少肝细胞凋亡率。由此可以推测6价铬进入细胞后, 可能通过攻击线粒体最终导致肝细胞凋亡。6价铬是铬离子对人体造成损伤的主要价态, 可推测其引起的细胞凋亡主要是通过线粒体途径。李秀梅等^[13]在合金诱导的Caspase-3表达强度研究中发现, 钴铬烤瓷合金和钯基烤瓷合金均有Caspase-3的显著活化。郭毅^[14]的研究发现, 纳米级钛合金颗粒可诱导大鼠海马细胞Caspase-3蛋白表达量增高, 这一发现与此次研究结果相吻合。孟贺等^[10]研究认为纯钛浸提液对小鼠L929细胞凋亡相关基因及蛋白表达无显著诱导作用。万书健等^[15]的研究认为, 纯钛全冠对外周静脉血淋巴细胞凋亡没有影响。此次研究中, 纯钛

作用于小鼠颊囊黏膜上皮细胞,而孟贺等的研究作用于小鼠L929细胞,万书健等的研究作用于外周静脉血淋巴细胞,是否作用组织细胞不同造成实验结果的不同有待于进一步的研究证实。此次研究中,纯钛烤瓷合金引起了凋亡相关分子的蛋白表达,尤其是Caspase-3,提示其有可能引起了细胞凋亡。

通常认为有3条细胞凋亡的信号转导通路:线粒体途径(内源性途径)、死亡受体途径(外源性途径)、内质网途径,其中线粒体途径是3者中最为经典的一条,但这3者又并非相互独立、互不干扰的。研究表明,这3条通路在某些情况下是相互影响和联系的^[16-19]。例如通过Bak和Bax可使得内质网途径和线粒体途径相互联系,另外,Caspase-8也可通过将位于胞浆的Bid切割成截断的Bid(tBid),进而使得线粒体释放更多的CytC,然后作用于Caspase-9/3,从而与线粒体途径发生沟通。而研究发现生物材料引起的细胞凋亡主要与其中的内源性、外源性途径有关^[20]。

此次研究选取凋亡信号通路中的Caspase-8、Caspase-9信号分子,意在初步探查烤瓷合金引起细胞凋亡的可能信号通路。Caspase-8蛋白的检测结果显示:固定14 d时,5种烤瓷合金均可引起Caspase-8蛋白表达增高,固定28 d时仅发现镍铬、钯基烤瓷合金组的Caspase-8蛋白表达增高。Caspase-9蛋白检测结果显示:钴铬烤瓷合金仅在固定14 d时引发Caspase-9蛋白表达增高,其余4种合金在2个时间点均发现Caspase-9蛋白表达增高。孟贺等^[10-11]的研究结果发现,镍铬、钴铬、纯钛、钯基、金合金均未引起Caspase-8蛋白表达量的增高,且仅镍铬、钯基烤瓷合金能引起Caspase-9的蛋白表达量增高,而金合金、钴铬、纯钛烤瓷合金并不会引起其高表达,故该学者认为合金引起细胞凋亡的途径为线粒体途径。陈书宝等^[21]的研究发现,金合金、镍铬合金和铜合金对L929成纤维细胞的增殖、凋亡均有一定的影响,其中金合金组的影响最小。作者认为不同齿科合金引起成纤维细胞凋亡的机制可能与调控Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3蛋白表达有关。此次研究是基于体内实验,细胞生存环境相对更复杂,推测细胞凋亡的调控机制有可能不是简单通过一条信号通路来实现,可能存在多条信号通路同时进行凋亡调控。故牙科合金引起金黄地鼠颊囊黏膜细胞凋亡的通路,有待进一步对通路上的多个信号分子表达进行多点监测。

此次实验结果提示,5种牙科烤瓷合金均不同程度影响凋亡信号分子的表达,其中以金合金的影响相对较小,因此从细胞凋亡角度选择牙科烤瓷合金应优先考虑金合金。此外也提示临床医生,选择牙科修复材料时可以考虑全瓷修复材料。

作者贡献: 程辉进行实验设计,实验实施为邱冰妍、陈润,实验评估为江磊,资料收集为王颖卉、潘宇,陈润成文,程辉审核。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81641158)、福建省自然科学基金(2016J01354)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经福建医科大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 张长源,程辉,王希,等.反复熔铸Ni-Cr烤瓷合金体外细胞毒性实验(MTT法)[J].实用口腔医学杂志,2010,26(3):306-309.
- [2] 林泓磊,江磊,张长源,等.反复熔铸对钴铬烤瓷合金细胞相容性的影响[J].上海口腔医学,2017,26(3):246-250.
- [3] Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, et al. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2003;124(6):687-694.
- [4] Cortizo MC, DeMele MF, et al. Metallic dental material biocompatibility in osteoblast like cells: correlation with metal in release. *Bio Trace Elem Res*. 2004;100(2):151-168.
- [5] Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan XH, et al. Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. *J Dent Res*. 1995;74(8):1513-1520.
- [6] Y-T 0127.13-2009,中华人民共和国医药行业标准,口腔医疗器械生物学评价:试验方法:口腔黏膜刺激试验[S].北京:中国标准出版社,2009.
- [7] ISO 10993-12-2007. Biological evaluation of medical devices—Part 12: Sample preparation and reference materials, 2007.
- [8] Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem*. 1999;274(29):20049-20052.
- [9] Joseph EK, Levine JD. Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Eur J Neurosci*. 2004;20(11):2896-2902.
- [10] 孟贺,李秀梅,徐艳丽,等.3种牙科金属材料对L929细胞的毒性及对凋亡相关基因与蛋白表达的影响[J].上海口腔医学,2013,22(1):30-34.
- [11] 孟贺,丁洁,李任,等.4种牙科金属材料对成纤维细胞L929凋亡相关基因及蛋白表达的影响[J].华西口腔医学杂志,2013,31(3):242-246.
- [12] 谢颖.线粒体损伤拮抗剂在Cr(VI)所致肝细胞凋亡中的保护作用[D].长沙:中南大学,2014.
- [13] 李秀梅,德松.Caspase-3表达强度评价牙科合金生物相容性的实验研究[J].中国医学工程,2011,19(7):70-73.
- [14] 郭毅.纳米级氧化锆与钛合金颗粒诱导大鼠海马凋亡的对比性研究[D].徐州:徐州医学院,2013.
- [15] 万书健,苏俭生.3种铸造金属全冠戴用后对外周静脉血淋巴细胞凋亡的影响[J].口腔医学,2009,29(2):73-76.
- [16] 焦俊霞,高维娟.细胞凋亡的信号转导机制研究进展[J].中国老年学,2010,30(6):853-856.
- [17] Nutt LK, Pataer A, Pahler J, et al. Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores. *J Biol Chem*. 2002;277(11):9219-9225.
- [18] Brenner C, Kroemer G. Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators. *Science*. 2000;289(5482):1150-1151.
- [19] Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*. 2000;103(6):839-842.
- [20] 吴科达,王远亮,潘君.生物材料诱导细胞凋亡的研究进展[J].生物医学工程杂志,2005,22(2):413-419.
- [21] 陈书宝,张睿,李锐.不同齿科合金对成纤维细胞增殖凋亡的影响及机制研究[J].医学研究杂志,2018,47(1):103-107.