

梯度玻璃分级超透氧化锆的体外生物相容性

张其娅¹, 童伊翔¹, 杨世姣¹, 张宇梦¹, 邓凌¹, 吴玮², 解瑶³, 廖健¹, 毛岭¹<https://doi.org/10.12307/2025.494>

投稿日期: 2024-07-20

采用日期: 2024-09-07

修回日期: 2024-10-17

在线日期: 2024-11-12

中图分类号:

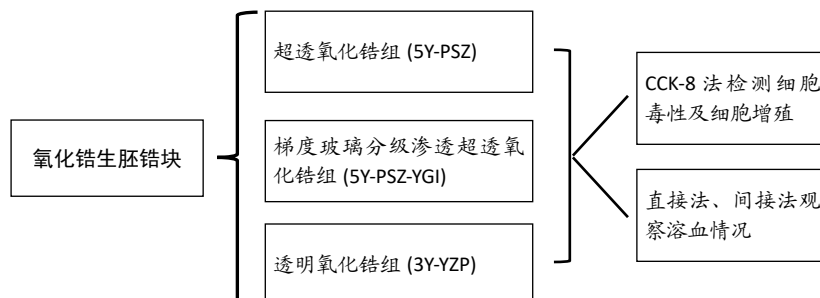
R459.9; R318.08; R783.1

文章编号:

2095-4344(2026)02-00443-08

文献标识码: B

文章快速阅读: 梯度玻璃分级超透氧化锆具有良好的体外生物相容性



文题释义:

梯度玻璃分级超透氧化锆: 使用内部研发的玻璃材料, 运用玻璃渗透技术对5Y-PSZ超透氧化锆进行性能改进, 在保持5Y-PSZ良好半透明性的优势同时提高超透明氧化锆5Y-PSZ抗弯强度后的材料。

生物相容性: 指生物材料在宿主特定的环境和部位与宿主直接或间接接触时所产生的相互反应的能力。生物相容性包括血液相容性和组织相容性。

摘要

背景: 前期研究通过2次烧结法将玻璃材料渗透入5Y-PSZ超透氧化锆中, 制备了能保持高透明性且抗弯强度较高的5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆材料。

目的: 评估5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆材料的体外生物相容性。

方法: ①通过2次烧结将玻璃材料渗透入5Y-PSZ超透氧化锆中, 制备5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级氧化锆。将5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆(或5Y-PSZ超透氧化锆、3Y-TZP透明氧化锆)置入含体积分数10%胎牛血清DMEM培养基中12, 24, 72 h, 培养基与试样表面积比为3 mL/cm², 得到12, 24, 72 h材料浸提液。②将小鼠成纤维细胞L929培养24 h后弃原培养基, 分7组培养: 对照组更换为含体积分数10%胎牛血清DMEM培养基, 其余6组分别更换为3Y-TZP透明氧化锆24 h浸提液、5Y-PSZ超透氧化锆24 h浸提液、5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆24 h浸提液、3Y-TZP透明氧化锆72 h浸提液、5Y-PSZ超透氧化锆72 h浸提液、5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆72 h浸提液。培养1, 3, 5 d后, 显微镜下观察细胞生长, 通过CCK-8检测得到细胞增殖率, 判定细胞毒性。③将人抗凝血分别与5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆、5Y-PSZ超透氧化锆、3Y-TZP透明氧化锆混合, 0.5 h后检测溶血率。将人抗凝血分别与3Y-TZP透明氧化锆12 h浸提液、5Y-PSZ超透氧化锆12 h浸提液、5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆12 h浸提液混合, 0.5 h后检测溶血率。

结果与结论: ①显微镜下可见, 随着培养时间的延长, 各组细胞数量增加, 并且各实验组细胞形态与对照组基本一致。3Y-TZP透明氧化锆24 h浸提液组培养第1天的细胞毒性分级0级, 其余实验组在各个时间段的细胞毒性分级均为1级。②无论是材料还是材料浸提液均未引起明显的溶血反应, 溶血率均低于5%。③结果表明, 5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆对小鼠成纤维细胞L929生长增殖无明显影响, 并且不会与人血发生溶血反应, 具有良好的体外生物相容性。

关键词: 梯度玻璃分级超透氧化锆; 生物相容性; 超透氧化锆; 透明氧化锆; 细胞毒性; 溶血率; 生物材料; 工程化口腔材料

In vitro biocompatibility of graded glass infiltrated ultra-translucent zirconiaZhang Qiya¹, Tong Yixiang¹, Yang Shijiao¹, Zhang Yumeng¹, Deng Ling¹, Wu Wei², Xie Yao³, Liao Jian¹, Mao Ling¹

¹School/Hospital of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; ²Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China; ³Pingba District People's Hospital, Anshun 561199, Guizhou Province, China

Zhang Qiya, Master candidate, School/Hospital of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Corresponding author: Mao Ling, Associate professor, School/Hospital of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Abstract

BACKGROUND: In previous studies, glass materials were infiltrated into 5Y-PSZ ultra-translucent zirconia by a double sintering method to prepare 5Y-PSZ-YGI graded glass infiltrated ultra-translucent zirconia materials that can maintain high transparency and high flexural strength.

¹贵州医科大学口腔医学院/附属口腔医院, 贵州省贵阳市 550004; ²贵州省人民医院, 贵州省贵阳市 550002; ³平坝区人民医院, 贵州省安顺市 561199

第一作者: 张其娅, 女, 1999年生, 贵州省安龙县人, 汉族, 在读专业型硕士, 主要从事口腔种植修复的基础与临床研究。

通讯作者: 毛岭, 副教授, 贵州医科大学口腔医学院/附属口腔医院, 贵州省贵阳市 550004

<https://orcid.org/0009-0000-3327-919X> (张其娅)

基金资助: 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwmkj2021-1-342), 项目负责人: 毛岭; 贵州医科大学博士启动资金(校博合J字[2020]11号), 项目负责人: 毛岭

引用本文: 张其娅, 童伊翔, 杨世姣, 张宇梦, 邓凌, 吴玮, 解瑶, 廖健, 毛岭. 梯度玻璃分级超透氧化锆的体外生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2026, 30(2):443-450.



OBJECTIVE: To evaluate the *in vitro* biocompatibility of 5Y-PSZ-YGI graded glass infiltrated ultra-translucent zirconia materials.

METHODS: (1) Glass materials were infiltrated into 5Y-PSZ ultra-translucent zirconia by double sintering to prepare 5Y-PSZ-YGI graded glass infiltrated ultra-translucent zirconia. 5Y-PSZ-YGI graded glass infiltrated ultra-translucent zirconia (or 5Y-PSZ ultra-translucent zirconia, 3Y-TZP transparent zirconia) was placed in DMEM culture medium containing 10% fetal bovine serum for 12, 24 and 72 hours, and the surface area ratio of culture medium to sample was 3 mL/cm², and the 12-, 24- and 72-hour material extracts were obtained. (2) After culturing mouse fibroblast L929 for 24 hours, the original culture medium was discarded and divided into 7 groups for culture: the control group was replaced with DMEM culture medium containing 10% fetal bovine serum by volume, and the other 6 groups were replaced with 24-hour extract of 3Y-TZP transparent zirconia, 24-hour extract of 5Y-PSZ ultra-translucent zirconia, 24-hour extract of 5Y-PSZ-YGI graded glass infiltrated ultra-translucent zirconia, 72-hour extract of 3Y-TZP transparent zirconia, 72-hour extract of 5Y-PSZ ultra-translucent zirconia, and 72-hour extract of 5Y-PSZ-YGI graded glass infiltrated ultra-translucent zirconia. After 1, 3, and 5 days of culture, cell growth was observed under a microscope, and the cell proliferation rate was obtained by CCK-8 assay to determine cytotoxicity. (3) Human anticoagulated blood was mixed with 5Y-PSZ-YGI graded glass infiltrated ultra-translucent zirconia, 5Y-PSZ ultra-translucent zirconia, and 3Y-TZP transparent zirconia, and the hemolysis rate was detected after 0.5 hours. Human anticoagulated blood was mixed with 12-hour extract of 3Y-TZP transparent zirconia, 12-hour extract of 5Y-PSZ ultra-translucent zirconia, and 12-hour extract of 5Y-PSZ-YGI graded glass infiltrated ultra-translucent zirconia, and the hemolysis rate was detected after 0.5 hours.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Under the microscope, it could be seen that the number of cells in each group increased with the extension of culture time, and the cell morphology of each experimental group was basically the same as that of the control group. The cytotoxicity grade of the 24-hour extract of 3Y-TZP transparent zirconia group on the first day of culture was grade 0, and the cytotoxicity grade of the other experimental groups at each time period was grade 1. (2) Neither the material nor the material extract caused obvious hemolytic reaction, and the hemolytic rate was less than 5%. (3) The results showed that 5Y-PSZ-YGI graded glass infiltrated ultra-translucent zirconia had no significant effect on the growth and proliferation of mouse fibroblasts L929, and did not cause hemolytic reaction with human blood, and had good *in vitro* biocompatibility.

Key words: graded glass infiltrated ultra-translucent zirconia; biocompatibility; ultra-translucent zirconia; transparent zirconia; cytotoxicity; hemolysis rate; biomaterial; engineered oral material

Funding: Science and Technology Fund Project of Guizhou Provincial Health Commission, No. gzwjkj2021-1-342 (to ML); Doctoral Start-up Fund of Guizhou Medical University, No. XBJHZ [2020]11 (to ML)

How to cite this article: ZHANG QY, TONG YX, YANG SJ, ZHANG YM, DENG L, WU W, XIE Y, LIAO J, MAO L. *In vitro* biocompatibility of graded glass infiltrated ultra-translucent zirconia. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2026;30(2):443-450.

0 引言 Introduction

3%(摩尔百分比)氧化钇稳定的四方多晶氧化锆(3Y-TZP)因能承受较大的咀嚼力、良好的机械性能和组织生物相容性,在国内外多作为全瓷冠修复材料^[1-3]。3Y-TZP氧化锆是生物惰性陶瓷,无细胞毒性、无诱变、无致畸及致癌作用^[4-9],甚至经过特殊表面处理后还能促进成纤维细胞的生长,显示了良好的生物相容性^[10-12]。用于牙冠修复的3Y-TZP氧化锆半透明度低,在制作成双层结构时需要磨除更多正常牙体组织,并在口腔中行使咀嚼功能受时常发生崩裂^[13]。5%(摩尔百分比)氧化钇稳定的超透氧化锆(5Y-PSZ)一体瓷具有较高的半透明度,常用于受力较小的前牙区域或单冠后牙^[14-16]。为将5Y-PSZ超透氧化锆运用于受力较大的后牙桥体,课题组前期研究通过2次烧结法将玻璃材料渗透入5Y-PSZ超透氧化锆中,制备出了高透明性且抗弯强度也有提高的5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆^[17]。

口腔固定修复材料的生物相容性往往被牙医们忽略^[18],而口腔的生理环境十分复杂,有学者在37℃人工唾液中检测到了锆离子和钇离子的释放^[19]。5Y-PSZ超透氧化锆中的主要化学稳定剂Y₂O₃增加,其他的成分含量与3Y-TZP氧化锆也不同^[20-22],并且5Y-PSZ超透氧化锆经过玻璃渗透后的成分也会改变,因此在实际临床运用之前,应仔细考虑修复体材料是否会对牙龈纤维组织细胞、牙龈软组织等产生毒性作用或炎症反应。此次实验主要评估5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆对小鼠成纤维细胞L929的细胞毒性与入血的溶血反应。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料学体外实验,组间比较采用单因素方差(ANOVA)分析和多重比较Tukey检验。

1.2 时间及地点 实验于2022年1-12月在贵州医科大学附属医院临床研究中心完成。

1.3 材料 小鼠成纤维细胞L929[中科院上海细胞库(细胞目录号GNC28)];5Y-PSZ(Zpex Smile)超透氧化锆生胚、3Y-TZP(Zpex)透明氧化锆生胚(HEANY INDUSTRIES公司);THERMO高温箱式烤瓷炉、CO₂细胞培养箱(THERMO公司);EP5000低温烤瓷炉(IVOCAR VIVADENT公司);BUEHLER低速切割机(BUEHLER公司);倒置显微镜(LEICA公司);DMEM培养基(GIBCO公司);胎牛血清(杭州四季青);CCK-8试剂盒(东仁化学科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 试样的制备 使用低速金刚石切割机在超纯水浸润下将5Y-PSZ超透氧化锆生胚、3Y-TZP透明氧化锆生胚切割成瓷片,将切割完的所有样品表面用320目(32-36 μm)碳化硅砂纸研磨,产生类似于计算机辅助设计与制造技术处理后的样品表面,室温下置于干燥器中干燥1周。烧结在箱式烤瓷炉中进行,以8℃/min的加热速率从室温加热至1000℃,以2℃/min的加热速率从1000℃加热至1530℃,在1530℃下烧结2h,自然冷却回室温,制成5Y-PSZ超透氧化锆和3Y-TZP透明氧化锆试件。

将5Y-PSZ超透氧化锆放入箱式烤瓷炉中,8℃/min的速度从室温加热到1000℃,室温冷却后取出,采用标准上

釉技术涂抹内部研发的玻璃浆料在样品表面,再次放入箱式烤瓷炉中,以 $14^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的加热速率从室温加热至 1450°C ,在 1450°C 下烧结2 h,使玻璃熔化渗透入5Y-PSZ超透氧化锆中样品致密化,室温冷却,得到5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆。

将上述所制样品分别制备成尺寸为 $12\text{ mm}\times 12\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 。

1.4.2 筛选合适的L929细胞铺板密度 复苏L929细胞并传代,当细胞融合达85%左右时进行细胞计数。制备 0.5×10^7 , 1×10^7 , 2×10^7 , 4×10^7 , $8\times 10^7\text{ L}^{-1}$ 梯度倍数浓度的细胞悬液,分别接种于96孔细胞培养板中,100 μL /孔,每个浓度为一组,使各组每孔最终的细胞数量分别为 0.5×10^3 , 1×10^3 , 2×10^3 , 4×10^3 , 8×10^3 ,每组5个复孔。置于细胞培养箱中培养1, 3, 5 d后,每孔加入10 μL CCK-8试剂继续孵育0.5, 1.0, 1.5 h,使用酶联免疫酶标仪在490 nm波长处测吸光度值,制作细胞增殖标准浓度曲线和标准时间曲线。筛选最佳的细胞接种密度与CCK-8试剂所用时间。

1.4.3 试样细胞毒性实验

制备试样浸提液:根据ISO10993标准来制备标准复合材料浸提液^[23],按培养基与试样 $3\text{ mL}/\text{cm}^2$ 的浸提比例,将各组试样分别放入含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于 37°C 、95%湿度及体积分数5% CO_2 培养箱中浸提12, 24, 72 h,得到12, 24, 72 h浸提液,均用0.22 μm 的过滤器过滤及标记,放入 4°C 冰箱保存备用。

细胞增殖检测:将 $2\times 10^7\text{ L}^{-1}$ 的L929细胞悬液接种于96孔细胞培养板中,100 μL /孔,培养24 h弃原培养基,后分7组培养:对照组更换为含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基,其余6组分别更换为3Y-TZP透明氧化锆24 h浸提液、5Y-PSZ超透氧化锆24 h浸提液、5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆24 h浸提液、3Y-TZP透明氧化锆72 h浸提液、5Y-PSZ超透氧化锆72 h浸提液、5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆72 h浸提液,100 μL /孔,每组5个复孔。培养1, 3, 5 d后,每孔加入10 μL CCK-8试剂继续培养1 h,使用酶联免疫酶标仪在490 nm波长处测吸光度值,计算细胞增殖率。细胞增殖率=实验组吸光度值/对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。

细胞毒性判定标准:参考GB/T16175-2008评分标准,当细胞增殖率 $>75\%$ 时,细胞毒性为0或1级,材料为基本合格;细胞增殖率在50%–75%时,细胞毒性为2级,需结合细胞形态来综合分析评价;细胞增殖率 $<50\%$ 时,细胞毒性为3–5级,材料视为不合格。

1.4.4 试样溶血实验 溶血实验用于评估试样的血液相容性。新鲜血液来自10例健康志愿者(无糖尿病、血液感

染性疾病),供者对实验知情同意。实验已通过贵州医科大学附属口腔医院医学伦理委员会伦理审查[2022伦审第(68)号]。将2%草酸钾生理盐水溶液0.25 mL加入到5 mL新鲜采集的人血中制备成新鲜抗凝血,再将2 mL抗凝血稀释至2.5 mL生理盐水中备用。

直接法:将5Y-PSZ超透氧化锆、5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆、3Y-TZP透明氧化锆分别加入10 mL生理盐水中,试样表面积与生理盐水的比例为 $3\text{ cm}^2/\text{mL}$,在 37°C 水浴中预热0.5 h,分别缓慢加入0.2 mL抗凝血混合,置于 37°C 水浴孵育1 h;阴性对照组将10 mL生理盐水在 37°C 水浴中预热0.5 h,然后加入0.2 mL抗凝血混合,置于 37°C 水浴孵育1 h;阳性对照组将10 mL蒸馏水在 37°C 水浴中预热0.5 h,然后加入0.2 mL抗凝血混合,置于 37°C 水浴孵育1 h。取出各组试管,1500 r/min离心5 min,取上清液置于比色皿内,置于分光光度计上在波长545 nm处读取各组吸光度值,计算溶血率。溶血率=(试样吸光度值-阴性对照组吸光度值)/(阳性对照组吸光度值-阴性对照组吸光度值) $\times 100\%$ 。当溶血率大于5%时视为材料发生溶血反应,材料不合格。

间接法:分别取10 mL的5Y-PSZ超透氧化锆12 h浸提液、5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆12 h浸提液、3Y-TZP透明氧化锆12 h浸提液在 37°C 水浴中预热0.5 h,分别加入0.2 mL抗凝血混合,置于 37°C 水浴孵育1 h。取出各组试管,1500 r/min离心5 min,取上清液置于比色皿内,置于分光光度计上在波长545 nm处读取各组吸光度值,计算溶血率。

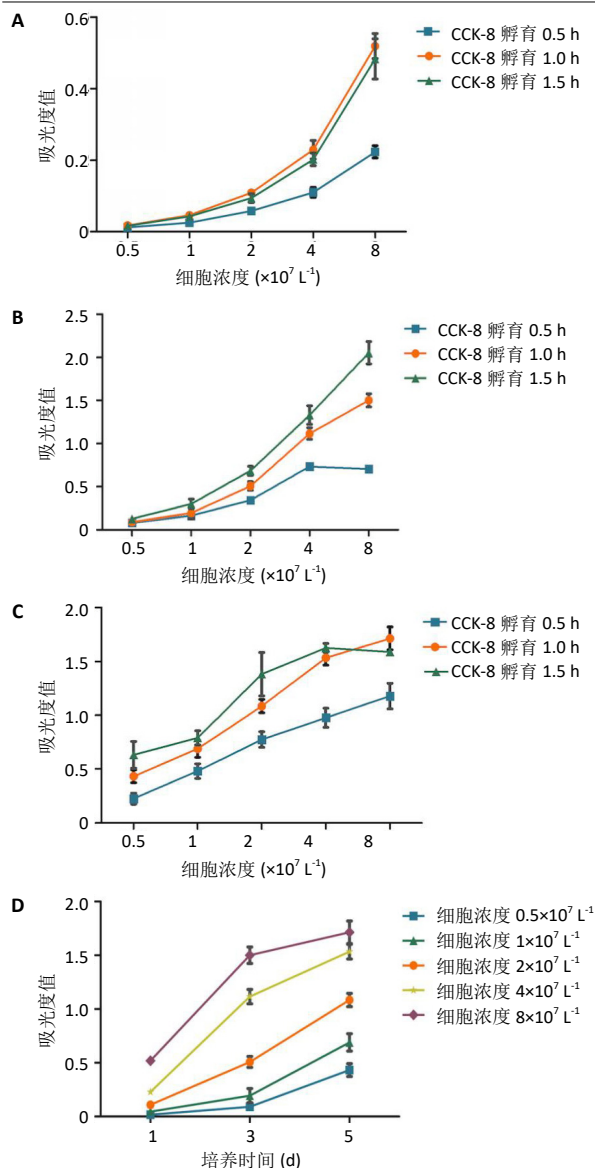
1.5 主要观察指标 各组试样的细胞毒性与溶血率。

1.6 统计学分析 应用SPSS 19.0分析软件进行统计学处理,结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,每组实验至少重复5次。组间均数差异的比较采用单因素方差(ANOVA)分析和多重比较Tukey检验, $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。该文统计学方法已经贵州医科大学公共卫生与健康学院蔡毅媛副教授审核。

2 结果 Results

2.1 建立L929细胞生长标准曲线 从图1A–C各组细胞增殖标准浓度曲线可以看出,培养第1, 3, 5天后再加入CCK-8试剂孵育0.5, 1.0, 1.5 h的吸光度值与细胞浓度大致呈正相关趋势,说明在 0.5×10^7 – $4\times 10^7\text{ L}^{-1}$ 浓度区间细胞培养5 d能保证与吸光度值存在良好的相关性,在这一区间选择板数是相对可靠的。

图1D所示为L929细胞生长标准时间曲线,浓度 0.5×10^7 , $1\times 10^7\text{ L}^{-1}$ 组细胞在培养第1–5天的吸光度值曲线呈逐渐上升趋势,但比较平缓,浓度 $2\times 10^7\text{ L}^{-1}$ 组细胞在培养第1–5天的吸光度值曲线呈上升趋势比较明显,浓度为 4×10^7 , $8\times 10^7\text{ L}^{-1}$



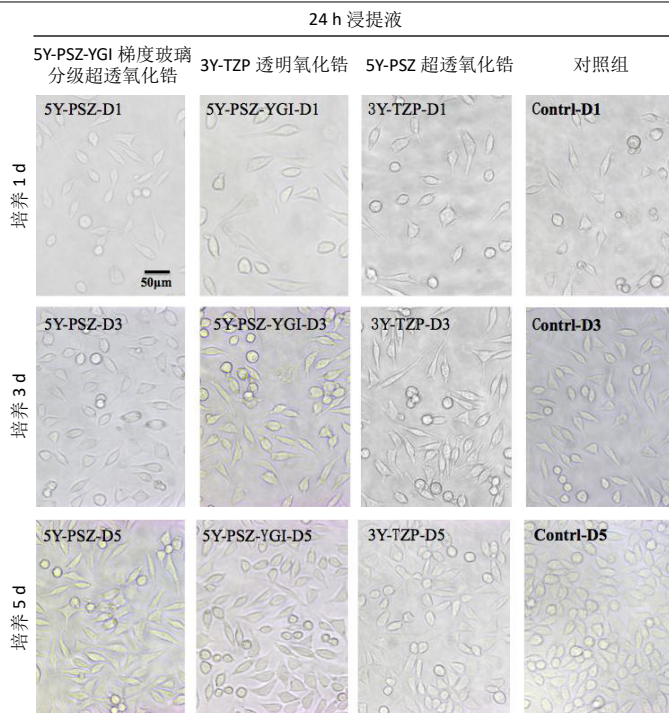
图注：图 A 为不同浓度细胞培养第 1 天的生长曲线；B 为不同浓度细胞培养第 3 天的生长曲线；C 不同浓度细胞培养第 5 天的生长曲线；D 为不同浓度细胞培养 1, 3, 5 d 的生长曲线。培养第 1, 3, 5 天后再加入 CCK-8 试剂孵育 1.0 h 的吸光度值与细胞浓度大致呈正相关趋势，因此，选择细胞浓度为 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 来铺板、加入 CCK-8 后孵育 1 h 观察较合适。

图 1 | 各组 L929 细胞生长曲线

Figure 1 | Growth curves of L929 cells in each group

组细胞在培养第 1–3 天的吸光度值曲线上升趋势较快，第 3–5 天后吸光度值曲线上升趋势随细胞浓度增加而减弱，因此， $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 是最佳的铺板细胞浓度。实验设计总共观察 5 d，根据所画的细胞生长标准曲线，选择 5 d 后吸光度值在 1 附近的细胞种板数较为理想，因此，选择细胞浓度为 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 来铺板、加入 CCK-8 后孵育 1 h 观察较合适。

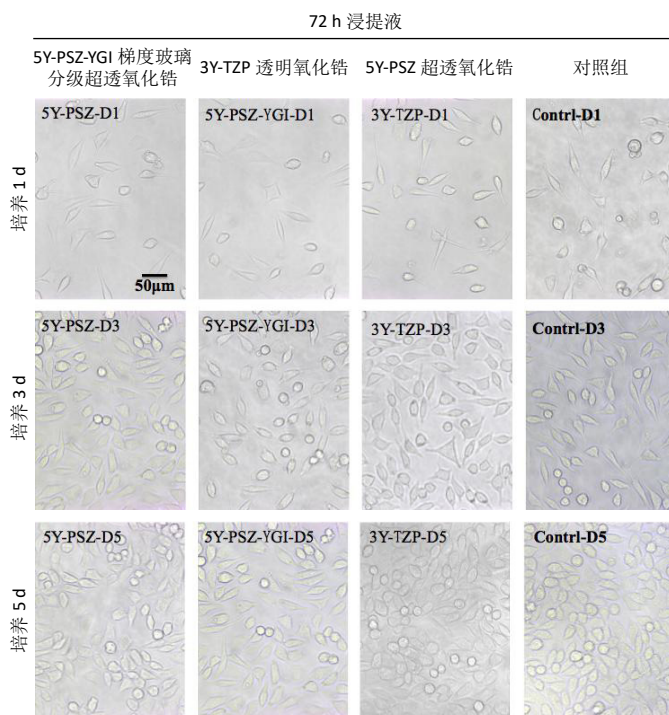
2.2 不同培养时间各组细胞形态变化 倒置显微镜下观察不同培养时间的各组细胞形态，见图 2, 3。由图可见，随着培养时间的延长，各组细胞数量增加，各实验组细胞贴壁伸展呈长梭形，并可见圆形分裂状态细胞，与对照组细胞形态一致。



图注：随着培养时间的延长，各组细胞数量增加，各实验组细胞贴壁伸展呈长梭形，并可见圆形分裂状态细胞，与对照组细胞形态一致。

图 2 | L929 细胞与各组试样 24 h 浸提液共培养后的生长形态 (倒置相差显微镜)

Figure 2 | Growth morphology of L929 cells after co-culture with the extracts of each group of samples for 24 hours (inverted phase contrast microscope)



图注：随着培养时间的延长，各组细胞数量增加，各实验组细胞贴壁伸展呈长梭形，并可见圆形分裂状态细胞，与对照组细胞形态一致。

图 3 | L929 细胞与各组试样 72 h 浸提液共培养后的生长形态 (倒置相差显微镜)

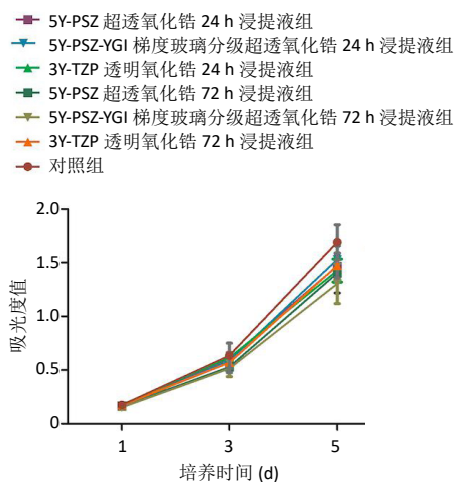
Figure 3 | Growth morphology of L929 cells after co-culture with the extracts of each group of samples for 72 hours (inverted phase contrast microscope)

2.3 各组细胞增殖检测结果 培养不同时间的各组细胞吸光度值检测结果, 见表 1, 图 4。培养不同时间的各组增殖率与细胞毒性级别, 见表 2。吸光度值越高说明细胞增殖速率越快, 细胞数量越多, 反映材料对细胞的增殖影响越小, 即对细胞的毒性相对就越小。随着培养时间的延长, 各组细胞

表 1 | 培养不同时间后各组 L929 细胞吸光度值检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Table 1 | Absorbance test results of L929 cells in each group after culture for different time periods

组别	培养 1 d	培养 3 d	培养 5 d
对照组	0.176±0.016	0.635±0.116	1.691±0.163
5Y-PSZ 超透氧化锆 24 h 浸提液组	0.167±0.009	0.605±0.026	1.469±0.021
5Y-PSZ-YGI 梯度玻璃分级超透氧化锆 24 h 浸提液组	0.159±0.006	0.585±0.064	1.530±0.126
3Y-TZP 透明氧化锆 24 h 浸提液组	0.179±0.015	0.616±0.037	1.521±0.067
5Y-PSZ 超透氧化锆 72 h 浸提液组	0.164±0.021	0.529±0.020	1.402±0.184 ^a
5Y-PSZ-YGI 梯度玻璃分级超透氧化锆 72 h 浸提液组	0.153±0.010	0.514±0.075	1.404±0.185 ^a
3Y-TZP 透明氧化锆 72 h 浸提液组	0.172±0.035	0.570±0.094	1.473±0.117

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。



图注: 随着培养时间的延长, 各组细胞吸光度值增加。

图 4 | L929 细胞与各组材料浸提液培养不同时间后的生长曲线

Figure 4 | Growth curves of L929 cells after being cultured with extracts of various materials for different time periods

表 2 | 培养不同时间后各组 L929 细胞增殖率与毒性级别
Table 2 | Proliferation rate and toxicity level of L929 cells of each group after culture for different time periods

组别	1 d		3 d		5 d	
	细胞增殖率 (%)	细胞毒性级别	细胞增殖率 (%)	细胞毒性级别	细胞增殖率 (%)	细胞毒性级别
对照组	100	0	100	0	100	0
5Y-PSZ 超透氧化锆 24 h 浸提液组	95	1	95	1	87	1
5Y-PSZ-YGI 梯度玻璃分级超透氧化锆 24 h 浸提液组	91	1	92	1	90	1
3Y-TZP 透明氧化锆 24 h 浸提液组	102	0	97	1	89	1
5Y-PSZ 超透氧化锆 72 h 浸提液组	93	1	83	1	83	1
5Y-PSZ-YGI 梯度玻璃分级超透氧化锆 72 h 浸提液组	87	1	81	1	83	1
3Y-TZP 透明氧化锆 72 h 浸提液组	98	1	90	1	87	1

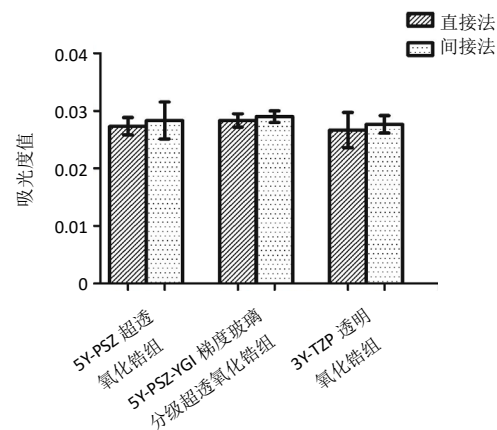
吸光度值增加, 5Y-PSZ 超透氧化锆 72 h 浸提液组、5Y-PSZ-YGI 梯度玻璃分级超透氧化锆 72 h 浸提液组培养第 5 天的吸光度值均低于对照组 ($P < 0.05$), 其余组培养不同时间的吸光度值与对照组比较差异均无显著性意义 ($P > 0.05$)。3Y-TZP 透明氧化锆 24 h 浸提液组培养第 1 天的细胞增殖率为 102%, 细胞毒性分级 0 级, 其余各组在各个时间段的细胞毒性分级均为 1 级。

2.4 试样溶血性实验结果 各组试样直接法测得的吸光度值与溶血率见表 3, 图 5, 间接法测得的吸光度值与溶血率见表 4, 图 5。各组试样直接与间接法测得的溶血率均小于 5%, 未引起溶血反应。

表 3 | 各组试样与人抗凝血直接接触后的吸光度值及溶血率检测结果 ($n=3$)
Table 3 | Absorbance values and hemolysis rate test results of each group of samples after direct contact with human anticoagulated blood

组别	吸光度值			平均吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)	溶血率 (%)
	样本 1	样本 2	样本 3		
5Y-PSZ 超透氧化锆组	0.026	0.032	0.027	0.028±0.003	1.4
5Y-PSZ-YGI 梯度玻璃分级超透氧化锆组	0.029	0.028	0.030	0.029±0.001	1.4
3Y-TZP 透明氧化锆组	0.026	0.028	0.029	0.028±0.002	1.3
阴性对照组	0.014	0.025	0.016	0.018±0.006	0
阳性对照组	0.712	0.738	0.816	0.755±0.054	100

表注: 阴性对照组为生理盐水与人抗凝血混合, 阳性对照组为蒸馏水与人抗凝血混合。



图注: 直接法是将各试样与人抗凝血直接接触, 间接法是将各试样 24 h 浸提液与与人抗凝血混合。

图 5 | 各试样直接或以浸提液形式与人抗凝血混合后的吸光度检测结果
Figure 5 | Absorbance test results of each sample after mixing with human anticoagulated blood directly or in the form of an extract

3 讨论 Discussion

生物相容性是材料存在于适当宿主反应情况下在特定应用中起作用的能力^[24-26]。由于大多数牙科材料的主要预期作用不是通过药理学、免疫学或代谢物实现的, 而是通过其物理/机械性质实现的^[27]。在材料大多数存在的生命系统表达

表 4 | 各组试样 12 h 浸提液与人抗凝血混合后的吸光度值及溶血率检测结果 (n=3)
Table 4 | Absorbance values and hemolysis rate test results of 12-hour extracts of each group of samples mixed with human anticoagulated blood

组别	吸光度值			平均吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)	溶血率 (%)
	样本 1	样本 2	样本 3		
5Y-PSZ 超透氧化锆组	0.027	0.026	0.029	0.027±0.002	1.2
5Y-PSZ-YGI 梯度玻璃分级超透氧化锆组	0.027	0.029	0.029	0.028±0.001	1.4
3Y-TZP 透明氧化锆组	0.024	0.026	0.030	0.027±0.003	1.1
阴性对照组	0.014	0.025	0.016	0.018±0.006	0
阳性对照组	0.712	0.738	0.816	0.755±0.054	100

表注：阴性对照组为生理盐水与人抗凝血混合，阳性对照组为蒸馏水与人抗凝血混合。

“适当的宿主反应”意味着没有 (或可容忍的) 不良反应，不良反应可能是由于牙科材料的毒性或其他因素造成的^[28]，例如细菌在导致炎症的材料上或下面的积累^[29]。因此，对生物相容性材料的需求意味着毒性测试是必要的。

超透氧化锆牙科陶瓷材料属于冠桥修复材料类，它与皮肤、口腔黏膜及牙齿硬组织外表面都会有相应的接触^[30]，因此，当这种全瓷修复材料与口腔中的牙龈组织、黏膜组织长期接触时其生物安全性也是值得关注的。关于可能引起牙龈及牙周组织炎症的全瓷材料相关分子机制尚不明确^[31-32]。一般来说，细胞对材料的反应是基于材料中释放生物相关分子的交互作用^[30]。

影响全瓷材料元素析出的因素有很多，比如材料的组成、腐蚀介质的化学特质、暴露时间和环境温度^[33]。金属材料元素毒性从高到低排序为：Cu > Al > Ag > V > Mn > Cr > Zr > Nb > Mo > Cp-Ti^[34]。有研究发现，计算机辅助设计与制造技术全瓷材料在模拟人唾液溶液中和酸性环境中 (4% 醋酸) 都有 Al 和 K 元素的析出^[35]。3Y-TZP 透明氧化锆和传统的长石质陶瓷常被作为研究陶瓷修复材料生物相容性的基础，而新的陶瓷材料进入临床运用时其生物相容性往往被忽视。ELSHAHAWY 等^[18]的研究结果发现，临床上常用全瓷材料的生物学反应各不相同，这与认为全瓷材料是惰性的、完全生物相容的传统观点相悖^[36-38]。细胞毒性实验是新型生物材料临床应用的主要考虑因素^[39]，是检测生物材料中毒性成分渗出最敏感有效的实验之一，超透氧化锆对细胞是否具有潜在性损伤可通过此实验进行评价，从而对新的氧化锆材料的生物安全性进行评价。

在牙科修复材料生物相容性测试中通常会用到小鼠成纤维细胞 L929^[40-42]，这种细胞系通常在实验中可以获得明确定义，细胞生长活性已经严格进行测定且对周围环境反应敏感，当它们在培养皿中密度增高时具有接触抑制，并且没有肿瘤

生成能力，能够较好地反映牙科材料的毒性^[18]。小鼠成纤维细胞 L929 为成品的细胞系，几乎相同的克隆背景可以同时比较不同材料的差异，更能说明问题。

此次实验通过制取 5Y-PSZ 超透氧化锆、5Y-PSZ-YGI 梯度玻璃分级超透氧化锆、3Y-TZP 透明氧化锆各组 24 h 和 72 h 浸提液，分别与 L929 细胞共培养，结果显示：3Y-TZP 透明氧化锆 24 h 浸提液组培养第 1 天的吸光度值略高于对照组，细胞毒性分级为 0 级，说明培养初期 3Y-TZP 透明氧化锆 24 h 浸提液对细胞增殖无影响，说明材料相容性良好；培养第 3 天的细胞增殖率由高到低的顺序为：3Y-TZP 透明氧化锆 24 h 浸提液 > 5Y-PSZ 超透氧化锆 24 h 浸提液 > 5Y-PSZ-YGI 梯度玻璃分级超透氧化锆 24 h 浸提液，说明 3Y-TZP 透明氧化锆对细胞增殖率的影响最小，而 5Y-PSZ-YGI 梯度玻璃分级超透氧化锆对细胞增殖的影响相对要大些。各组试样 72 h 浸提液的细胞增殖率均低于同组 24 h 浸提液，说明各组随着材料浸提液时间的延长，对细胞增殖率会有轻度抑制，各组的细胞毒性分级均为 1 级。5Y-PSZ 超透氧化锆 72 h 浸提液组、5Y-PSZ-YGI 梯度玻璃分级超透氧化锆 72 h 浸提液组培养第 5 天的细胞吸光度值均低于对照组，提示随着 5Y-PSZ 超透氧化锆和 5Y-PSZ-YGI 梯度超透氧化锆材料较长时间的浸提，浸提液中析出的离子成分对细胞增殖有略微抑制。但是在显微镜下观察发现实验组与阴性对照组细胞形态无明显差别，证明 5Y-PSZ-YGI 梯度玻璃分级超透氧化锆材料毒性较低，不影响后期运用于临床。

生物材料的溶血现象通常由于材料表面的机械性损伤或内部残留分子物质的化学作用所导致^[43-44]。溶血实验要求当上清液在波长为 545 nm 处测试下阳性对照组吸光度值范围应为 0.8±0.5，阴性对照组吸光度值应小于 0.03，否则实验应重做^[45]。直接接触法溶血实验因能较直接模拟材料的最终应用状态而常常被大多数实验所采用，然而，口腔陶瓷材料的某些化学成分溶出是需要一个缓慢的过程，该直接接触法中超透氧化锆材料与血液的接触时间只有 60 min，并不能完全反映陶瓷材料中可溶出的化学成分在血液中的作用。不同测试材料表面物理性状不同，有的材料表面物理性状会与红细胞相互反应发生溶血，因此未能区别出是物理因素还是化学因素和导致的溶血^[46]；而浸提液接触法不仅能避免材料表面物理形状引起的溶血，还可根据材料的不同特性延长浸提时间，所以此次实验采用两种方法相互补充并同时评价各组氧化锆试样的血液相容性。ISO/TI 405 推荐的溶血实验使用新鲜兔血，此次实验因考虑到不同物种之间会存在一些差异，生物陶瓷材料是用于人体，检验材料的安全性用人血来做溶血测试会使溶血实验结果更具有说服力。

此次实验通过直接法和间接法对各组氧化锆材料进行溶血活性测试,阴性对照组生理盐水的溶血率为0%,而阳性对照组中蒸馏水的溶血率为100%,在间接法测试中,5Y-PSZ超透氧化锆12 h浸提液组溶血率为1.2%,5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆12 h浸提液组溶血率为1.4%,3Y-TZP透明氧化锆12 h浸提液组溶血率为1.1%,各组溶血率均小于5%;在直接法测试中,5Y-PSZ超透氧化锆组和5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆组溶血率为1.4%,3Y-TZP透明氧化锆组溶血率为1.3%,各组溶血率均小于5%,两种测试法都说明5Y-PSZ超透氧化锆、5Y-PSZ-YGI梯度玻璃分级超透氧化锆、3Y-TZP透明氧化锆均无溶血活性,进一步补充说明了3组材料的生物安全性。生物材料与血细胞发生作用,当溶血率 $\geq 5\%$ 时通常认为该材料发生溶血反应, $< 5\%$ 时则认为该材料不发生溶血反应。此次实验的阳性和阴性对照结果符合实验要求。

综上所述,梯度玻璃分级渗透后的超透氧化锆对小鼠成纤维细胞L929生长增殖无明显影响,并且不会与人血发生溶血反应,具有良好的体外生物相容性,为进一步研究提供了理论依据。但研究局限于体外实验,后期需动物实验进一步证明该材料的生物相容性。

作者贡献: 实验设计为张其姪、廖健、毛岭,实验实施为张其姪、童伊翔、杨世姣、张宇梦,指标测定为张其姪,资料收集为邓凌、解瑶、吴玮,张其姪成文,实验评估为毛岭。

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。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守了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。

4 参考文献 References

- [1] SAHOO N, CARVALHO O, ÖZCAN M, et al. Ultrashort pulse laser patterning of zirconia (3Y-TZP) for enhanced adhesion to resin-matrix cements used in dentistry: An integrative review. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2023;143:105943.
- [2] DE AZEVEDO-SILVA LJ, FERRAIRO BM, MINIM PR, et al. Bovine hydroxyapatite/3Y-TZP bioceramic: Aligning 3Y-TZP content with sintering parameters. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2024;156:106569.
- [3] BALTAZAR J, RODRIGUES PAIS ALVES MF, MARTINS MA, et al. Flexural strength of 3Y-TZP bioceramics obtained by direct write assembly as function of residual connected-porosity. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2022;126:105035.
- [4] RUTKUNAS V, BORUSEVICIUS R, BALCIUNAS E, et al. The Effect of UV Treatment on Surface Contact Angle, Fibroblast Cytotoxicity, and Proliferation with Two Types of Zirconia-Based Ceramics. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(17):11113.
- [5] RODRÍGUEZ-LOZANO FJ, LÓPEZ-GARCÍA S, SÁNCHEZ-BAUTISTA S, et al. Effect of milled and lithography-based additively manufactured zirconia (3Y-TZP) on the biological properties of human osteoblasts. *J Prosthet Dent.* 2023;130(6):889-896.
- [6] SURANA P, SINGH DHULL K, ARYA A, et al. Bio-ceramics application in Dentistry. *Bioinformation.* 2024;20(2):136-139.
- [7] OH JW, SONG KY, AHN SG, et al. Effects of core characters and veneering technique on biaxial flexural strength in porcelain fused to metal and porcelain veneered zirconia. *J Adv Prosthodont.* 2015;7(5):349-357.
- [8] ZHU DB, LIANG JP, QU YX, et al. Functionalized bio-artifact fabricated via selective slurry extrusion. Part 2: Fabrication of ceramic dental crown. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014;14(5):3703-3706.
- [9] SAILER I, STRASDING M, VALENTE NA, et al. A systematic review of the survival and complication rates of zirconia-ceramic and metal-ceramic multiple-unit fixed dental prostheses. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29 Suppl 16:184-198.
- [10] AKASHI Y, SHIMOO Y, HASHIGUCHI H, et al. Effects of Excimer Laser Treatment of Zirconia Disks on the Adhesion of L929 Fibroblasts. *Materials (Basel).* 2022;16(1):115.
- [11] HU J, QIE Y, LUO Y, et al. Effect of Porous Zirconia Coating on Human Gingival Fibroblasts and Its Mechanism. *J Biomed Nanotechnol.* 2022;18(4):1164-1171.
- [12] YANG Z, LIU M, YANG Y, et al. Biofunctionalization of zirconia with cell-adhesion peptides via polydopamine crosslinking for soft tissue engineering: effects on the biological behaviors of human gingival fibroblasts and oral bacteria. *RSC Adv.* 2020;10(11):6200-6212.
- [13] JERMAN E, LÜMKEMANN N, EICHBERGER M, et al. Evaluation of translucency, Marten's hardness, biaxial flexural strength and fracture toughness of 3Y-TZP, 4Y-TZP and 5Y-TZP materials. *Dent Mater.* 2021;37(2):212-222.
- [14] KIM JW, VO TV, SATPATHY M, et al. Improving Fracture Resistance of 5Y-PSZ-based Three-unit Bridge Prosthesis. *Int J Prosthodont.* 2023. doi: 10.11607/ijp.8643.
- [15] INOKOSHI M, SHIMIZU H, NOZAKI K, et al. Crystallographic and morphological analysis of sandblasted highly translucent dental zirconia. *Dent Mater.* 2018;34(3):508-518.
- [16] DE ARAÚJO-JÚNIOR ENS, BERGAMO ETP, BASTOS TMC, et al. Ultra-translucent zirconia processing and aging effect on microstructural, optical, and mechanical properties. *Dent Mater.* 2022;38(4):587-600.
- [17] MAO L, KAIZER MR, ZHAO M, et al. Graded Ultra-Translucent Zirconia (5Y-PSZ) for Strength and Functionalities. *J Dent Res.* 2018;97(11):1222-1228.
- [18] ELSHAHAWY WM, WATANABE I, KRAMER P. In vitro cytotoxicity evaluation of elemental ions released from different prosthodontic materials. *Dent Mater.* 2009;25(12):1551-1555.

- [19] YANG R, AROLA D, HAN Z, et al. A comparison of the fracture resistance of three machinable ceramics after thermal and mechanical fatigue. *J Prosthet Dent*. 2014;112(4):878-885.
- [20] ARCILA LVC, RAMOS NC, CAMPOS TMB, et al. Mechanical behavior and microstructural characterization of different zirconia polycrystals in different thicknesses. *J Adv Prosthodont*. 2021;13(6):385-395.
- [21] COKIC SM, VLEUGELS J, VAN MEERBEEK B, et al. Mechanical properties, aging stability and translucency of speed-sintered zirconia for chairside restorations. *Dent Mater*. 2020;36(7): 959-972.
- [22] MIURA S, SHINYA A, KOIZUMI H, et al. Effect of speed sintering of monolithic zirconia with different yttria contents on color and crystal phase. *Eur J Oral Sci*. 2022;130(6):e12898.
- [23] MÜLLER B P, ENSSLEN S, DOTT W, et al. Improved sample preparation of biomaterials for in vitro genotoxicity testing using reference materials. *J Biomed Mater Res*. 2002;61(1):83-90.
- [24] LEMONS JE. Ceramics: past, present, and future. *Bone*. 1996;19(1 Suppl): 121s-128s.
- [25] CRAWFORD L, WYATT M, BRYERS J, et al. Biocompatibility Evolves: Phenomenology to Toxicology to Regeneration. *Adv Healthc Mater*. 2021;10(11):e2002153.
- [26] JURAK M, WIĄCEK AE, ŁADNIAK A, et al. What affects the biocompatibility of polymers? *Adv Colloid Interface Sci*. 2021;294: 102451.
- [27] HAO Y, HUANG X, ZHOU X, et al. Influence of Dental Prosthesis and Restorative Materials Interface on Oral Biofilms. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(10):3157.
- [28] MITTERMÜLLER P, HILLER KA, SCHMALZ G, et al. Five hundred patients reporting on adverse effects from dental materials: Frequencies, complaints, symptoms, allergies. *Dent Mater*. 2018; 34(12):1756-1768.
- [29] WELLER J, VASUDEVAN P, KREIKEMEYER B, et al. The role of bacterial corrosion on recolonization of titanium implant surfaces: An in vitro study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2022;24(5):664-675.
- [30] 殷隽雅. 新型齿科可切削复合树脂陶瓷的细胞生物相容性初探 [D]. 北京: 首都医科大学, 2017.
- [31] SRIMANEEPONG V, HEOYAN A, ZAFAR MS, et al. Fixed Prosthetic Restorations and Periodontal Health: A Narrative Review. *J Funct Biomater*. 2022;13(1):15.
- [32] RINGEISEN H, PÖSCHKE A, KRÄHLING B, et al. Influence of dental materials on cells of the equine periodontium. *Equine Vet J*. 2018; 50(3):363-369.
- [33] ELSHAHAWY W, WATANABE I, KOIKE M. Elemental ion release from four different fixed prosthodontic materials. *Dent Mater*. 2009;25(8): 976-981.
- [34] PARK YJ, SONG YH, AN JH, et al. Cytocompatibility of pure metals and experimental binary titanium alloys for implant materials. *J Dent*. 2013;41(12):1251-1258.
- [35] MILLEDING P, HARALDSSON C, KARLSSON S. Ion leaching from dental ceramics during static in vitro corrosion testing. *J Biomed Mater Res*. 2002;61(4):541-550.
- [36] LEINFELDER KF. Ask the expert. Will ceramic restorations be challenged in the future? *J Am Dent Assoc*. 2001;132(1):46-47.
- [37] GALANTE R, FIGUEIREDO-PINA CG, SERRO AP. Additive manufacturing of ceramics for dental applications: A review. *Dent Mater*. 2019;35(6): 825-846.
- [38] MALOO LM, PATEL A, TOSHNIWAL SH, et al. Smart Materials Leading to Restorative Dentistry: An Overview. *Cureus*. 2022; 14(10):e30789.
- [39] LI K, YAO C, SUN Y, et al. Enhancing resin-dentin bond durability using a novel mussel-inspired monomer. *Mater Today Bio*. 2021; 12:100174.
- [40] ATAY A, GÜRDAL I, BOZOK ÇETİNTAS V, et al. Effects of New Generation All-Ceramic and Provisional Materials on Fibroblast Cells. *J Prosthodont*. 2019;28(1):e383-e394.
- [41] GUESS WL, ROSENBLUTH SA, SCHMIDT B, et al. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *J Pharm Sci*. 1965;54(10):1545-1547.
- [42] DUZYOL M, BAYRAM P, DUZYOL E, et al. Assessing the impact of dental restorative materials on fibroblast cells: an immunohistochemical and ELISA analysis. *Sci Rep*. 2024;14(1):4725.
- [43] QU Y, KANG M, DONG R, et al. Evaluation of a new Mg-Zn-Ca-Y alloy for biomedical application. *J Mater Sci Mater Med*. 2015; 26(1):5342.
- [44] MALABANAN JWT, ALCANTARA KP, JANTARATANA P, et al. Enhancing Physicochemical Properties and Biocompatibility of Hollow Porous Iron Oxide Nanoparticles through Polymer-Based Surface Modifications. *ACS Appl Bio Mater*. 2023;6(12):5426-5441.
- [45] 翟建才, 赵南明. 生物材料与血液界面作用机制及相容性评价的研究技术 [J]. 国外医学生物医学工程分册, 1995, 18(1):6-12.
- [46] BRAUNE S, LATOUR RA, REINTHALER M, et al. In Vitro Thrombogenicity Testing of Biomaterials. *Adv Healthc Mater*. 2019;8(21):e1900527.

(责任编辑: 关伟, 邱杨, 张楠)