

奥硝唑药物对牙髓再生根管内血管化的潜在影响

黎梓楷, 张程程, 熊嘉颖, 杨曦瑞, 阳 晶, 石海山

<https://doi.org/10.12307/2025.605>

投稿日期: 2024-04-30

采用日期: 2024-07-06

修回日期: 2024-07-19

在线日期: 2024-08-

中图分类号:

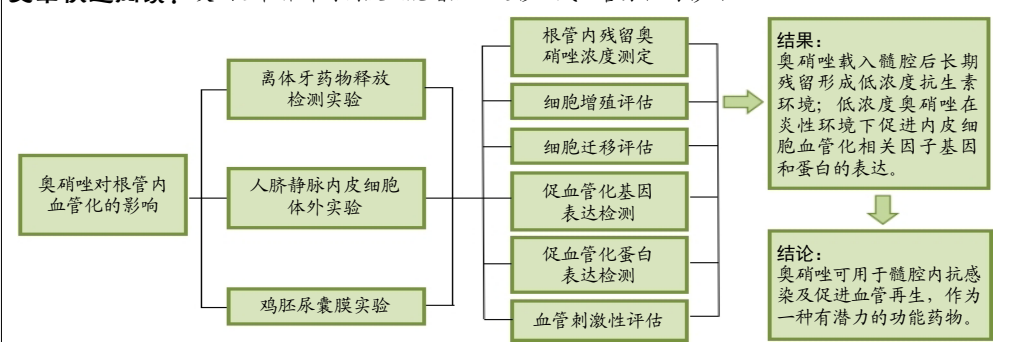
R459.9; R34; R781.3

文章编号:

2095-4344(2025)00-00000-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 奥硝唑在体外对内皮细胞增殖、迁移及成血管分化的影响



文题释义:

奥硝唑: 新一代硝基咪唑类药物, 具有生物相容性良好、抗菌谱广且对治疗厌氧菌感染效果明显的特点, 在临床感染控制和组织再生支架中得到有效应用。

血管化: 血管内的血液可以为组织提供营养及运送代谢废物, 血管化指损伤的根尖组织在修复过程中生成新的血管, 牙髓组织的修复和根尖的进一步发育有赖于损伤组织的血管化。

摘要

背景: 在牙髓治疗中, 组织的再生修复和根尖的进一步发育依赖于血运重建及细菌感染的有效控制。有研究报道, 将奥硝唑载于盖髓材料或血管化支架材料中可控制牙髓感染, 但其血管化影响有待研究。

目的: 探究奥硝唑在根管内的残留浓度规律, 评价奥硝唑对内皮细胞增殖、迁移、分化的影响以及对血管的刺激性。

方法: ①将奥硝唑封装于离体牙髓腔后浸泡于Hanks缓冲液中, 7 d后去除髓腔内的奥硝唑并重新封装无菌水, 再次浸泡于Hanks缓冲液中, 采用比色法定期检测髓腔液中奥硝唑质量浓度。②将人脐静脉内皮细胞接种于孔板内, 观察细胞贴壁后加入脂多糖刺激24 h, 然后分别加入0, 1, 2, 5, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑共培养, 检测细胞活性与迁移能力。将人脐静脉内皮细胞接种于孔板内, 分别加入不同质量浓度(0, 1, 2, 5, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$)奥硝唑共培养, 或者经脂多糖刺激24 h后分别加入不同质量浓度(0, 1, 2, 5, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$)奥硝唑共培养, 检测血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子的基因表达与血管内皮生长因子的蛋白表达。③采用鸡胚绒毛膜实验评估2, 10 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑对血管的刺激性。

结果与结论: ①离体牙中残留的奥硝唑在最初6 d内迅速释放, 随后释放速度减慢, 8 d以后根尖奥硝唑质量浓度约为2 $\mu\text{g/mL}$ 。②在脂多糖诱导的炎症条件下, CCK-8与细胞活死荧光染色显示奥硝唑(1–10 $\mu\text{g/mL}$)对人脐静脉内皮细胞的活性无明显影响, 细胞划痕实验显示奥硝唑(1–10 $\mu\text{g/mL}$)对人脐静脉内皮细胞的迁移能力无明显影响。RT-qPCR检测显示, 与单独的奥硝唑共培养后, 人脐静脉内皮细胞中血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子mRNA表达整体呈下降趋势; 在脂多糖诱导的炎症条件下与奥硝唑共培养后, 人脐静脉内皮细胞中两种因子的mRNA表达呈上升趋势。Western blot检测显示, 在脂多糖诱导的炎症条件下与奥硝唑共培养后, 人脐静脉内皮细胞中血管内皮生长因子蛋白表达呈升高趋势。③鸡胚绒毛膜实验显示2, 10 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑无血管刺激性。④结果表明1–10 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑无细胞毒性及血管刺激性, 可促进炎症内皮细胞中血管生成相关基因及蛋白的表达, 作为一种潜在的治疗药物用于髓腔感染控制。

关键词: 奥硝唑; 内皮细胞; 血管再生; 药物残留; 牙髓感染; 根管内血管化

Potential effects of ornidazole on intracanal vascularization in endodontic regeneration

Li Zikai, Zhang Chengcheng, Xiong Jiaying, Yang Xirui, Yang Jing, Shi Haishan

School of Stomatology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Li Zikai, School of Stomatology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Corresponding author: Shi Haishan, PhD, Associate professor, Master's supervisor, School of Stomatology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: In endodontics, revascularization and effective control of bacterial infection are prerequisite for regenerative repair of tissues and further development of the root apex. Ornidazole, carried in pulp-capping materials or vascularized scaffolding materials may control pulpal infections, but its effect on

暨南大学口腔医学院, 广东省广州市 510632

第一作者: 黎梓楷, 男, 2002年生, 汉族, 主要从事牙髓再生研究。

通讯作者: 石海山, 博士, 副教授, 硕士生导师, 暨南大学口腔医学院, 广东省广州市 510632

<https://orcid.org/0009-0002-6212-9275> (黎梓楷); <https://orcid.org/0000-0003-3831-6898> (石海山)

基金资助: 广州市科技计划项目基础与应用基础研究项目(202102021127), 项目负责人: 石海山

引用本文: 黎梓楷, 张程程, 熊嘉颖, 杨曦瑞, 阳晶, 石海山. 奥硝唑药物对牙髓再生根管内血管化的潜在影响[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(00):000-000.



vascularization need to be investigated.

OBJECTIVE: To investigate the residual concentration pattern of ornidazole in root canals and to evaluate the effects of ornidazole on endothelial cell proliferation, migration, and differentiation, as well as on vascular irritation.

METHODS: (1) Ornidazole was encapsulated in the isolated pulp cavity and then immersed in Hank's balanced salt solution for 7 days. Ornidazole was then removed from the pulp cavity, reencapsulated in sterile water, and again immersed in Hank's balanced salt solution. The mass concentration of ornidazole in the pulp cavity fluid was measured periodically by colorimetric method. (2) Human umbilical vein endothelial cells were inoculated into well plates. Adherent cells were stimulated by the addition of lipopolysaccharide for 24 hours, and then co-cultured by the addition of 0, 1, 2, 5, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$ ornidazole, to detect the cellular activity and migratory ability. Human umbilical vein endothelial cells were inoculated in well plates and co-cultured with different mass concentrations (0, 1, 2, 5, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$) of ornidazole or stimulated by lipopolysaccharide for 24 hours followed by the addition of different mass concentrations (0, 1, 2, 5, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$) of ornidazole. The gene expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor as well as the protein expression of vascular endothelial growth factor was detected. (3) The chorioallantoic membrane assay was employed to assess the vascular irritation of 2 and 10 $\mu\text{g/mL}$ ornidazole.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Residual ornidazole in exfoliated teeth was rapidly released within the initial 6 days, with a subsequent decrease in release rate, maintaining a concentration of approximately 2 $\mu\text{g/mL}$ at the root apex after 8 days. (2) Under lipopolysaccharide-induced inflammatory conditions, cell counting kit-8 and cell live-dead fluorescence staining showed that ornidazole (1–10 $\mu\text{g/mL}$) had no significant effect on the activity of human umbilical vein endothelial cells, and the cell scratch assay showed that ornidazole (1–10 $\mu\text{g/mL}$) had no obvious effect on the migratory ability of human umbilical vein endothelial cells. RT-qPCR assay showed that, after co-cultivation with ornidazole alone, the mRNA expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in human umbilical vein endothelial cells showed an overall decreasing trend. After co-culturing with ornidazole under lipopolysaccharide-induced inflammation, the mRNA expression of the two factors showed a rising trend in human umbilical vein endothelial cells. Western blot assay showed that vascular endothelial growth factor protein expression had an elevating trend in human umbilical vein endothelial cells after co-culture with ornidazole under lipopolysaccharide-induced inflammatory conditions. (3) The chorioallantoic membrane assay showed that 2 and 10 $\mu\text{g/mL}$ ornidazole were non-vascular irritating. To conclude, 1–10 $\mu\text{g/mL}$ ornidazole is non-cytotoxic and non-vascular irritating, promotes the expression of angiogenesis-related genes and proteins in inflammatory endothelial cells, and serves as a potential therapeutic agent for pulpal infection control.

Key words: ornidazole; endothelial cell; angiogenesis; drug residue; pulp infection; intracanal vascularization

Funding: Basic and Applied Basic Research Project of Guangzhou Science and Technology Program, No. 202102021127 (to SHS)

How to cite this article: LI ZK, ZHANG CC, XIONG JY, YANG XR, YANG J, SHI HS. Potential effects of ornidazole on intracanal vascularization in endodontic regeneration. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(00):0000-0000.

0 引言 Introduction

牙髓是高度血管化的组织, 含有包括成牙本质细胞、成纤维细胞、干细胞、免疫细胞及内皮细胞在内的多种细胞, 主要负责牙齿的营养、发育和修复^[1-2]。临床上未成熟恒牙牙髓坏死的治疗具有挑战性, 传统的根管治疗至今仍是牙髓根尖周病的主要治疗方法, 但这种完全不可逆的方式会使牙齿丧失血供和神经, 无法让牙根进一步发育, 还增加了继发性创伤或再次感染时牙齿脱落的风险^[3-5]。血运重建是恢复牙髓活性或再生牙髓组织的前提条件, 血管生成和血液循环能为牙髓再生和根尖发育提供营养和各种生长因子以及代谢支持^[6-7]。目前, 根管内快速血管化被认为是极具潜力的再生性牙髓治疗策略^[8-10]。已有研究证实, 诱导产生根尖血凝块后能在根管中观察到牙髓样新生组织的形成^[11]。还有研究发现, 在根管内植入含因子、药物及功能干细胞的组织工程支架能诱导牙髓再生及新血管形成^[12-15]。尽管如此, 再生性牙髓治疗距离替代传统根管治疗还需更多的证据支持, 尤其是通过药物或材料诱导根尖残余内皮细胞或募集内皮细胞介导根管内血管化的机制尚待阐明。

细菌是牙髓和根尖周围病变的关键始动因素^[16-17]。牙髓失活通常由需氧菌引起, 而其发展产生病变则主要归因于厌氧或兼性厌氧菌感染^[18]。大多数到达牙髓并引起根尖周疾病的微生物也是厌氧菌^[16, 19]。许多学者在盖髓材料或牙髓血运重建术中应用抗生素药物来控制厌氧菌感染^[20]。使用三联抗生素糊剂(甲硝唑、米诺环素及环

丙沙星的混合物)是目前常见且有效控制根尖感染的药物策略, 但也存在使牙体变色及细胞毒性等问题^[21]。作为最新的硝基咪唑类抗生素之一, 奥硝唑具有优异的抗菌、抗炎及抗感染能力, 常被用于治疗厌氧菌感染^[22-23]。近期研究将奥硝唑药物载于盖髓材料或血管化支架材料中, 发现其可控制牙髓感染^[20, 24]。然而, 目前根管常用的许多抗生素如米诺环素被报道具有血管毒性, 会抑制血管生成, 即抗生素在抗感染的同时可能会对牙髓再生造成负面影响^[22]。临床上进行血运重建术等操作前通常会在根管感染得到控制后再将抗生素去除, 但最新研究发现抗生素会在放射状排列的牙本质小管内大量残留, 持续影响后期血管化牙髓再生过程^[13, 25-26]。不管是材料载药抗感染还是抗生素残留问题, 这些药物本身对根管内血管化的影响都不容忽视, 也是探讨药物作用机制并评价其潜在价值的重要依据。相较于目前常用抗生素糊剂中的甲硝唑, 奥硝唑具有更高的抗厌氧菌活性, 并且不良反应更小^[27]。尽管如此, 将奥硝唑用于再生性牙髓治疗中仍需更多的证据, 仍须探明其介导根管内血管化和调控内皮细胞行为的具体机制。髓腔感染及发生根尖周疾病时根尖常处于炎症微环境, 这意味着血管的再生常常在炎症环境下发生^[28-29]。此次实验通过离体牙模型探讨奥硝唑药物在根管内的残留情况与释放规律, 探索不同质量浓度奥硝唑在体外对内皮细胞增殖、迁移及成血管分化的影响及机制, 为奥硝唑药物在再生性牙髓治疗中的潜在应用提供科学依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 离体牙药物释放检测实验、细胞学体外实验和鸡胚尿囊膜实验,采用单因素方差分析进行组间比较。

1.2 时间及地点 实验于2023年3–12月在暨南大学口腔医学院和基础医学院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 牙齿标本 在暨南大学口腔医学院收集拔除的废弃牙齿15颗。该实验已申请获得供者知情同意豁免权。实验方案已通过暨南大学医学伦理审查委员会批准(批准号:JNUKY-2022-070)。

入选标准:磨牙,牙根发育完全,无明显龋齿,牙冠完整,无根管治疗,牙根无隐裂、纵裂。

排除标准:牙根未发育完全,有明显龋坏或已穿髓,已行根管治疗,牙冠严重缺损。

1.3.2 主要细胞、材料 人脐静脉内皮细胞(美国Lonza公司);SBF级9 d龄鸡胚18个(新兴大华农禽蛋有限公司);奥硝唑(上海麦克林生化科技有限公司);胎牛血清(以色列Biological Industries公司);高糖DMEM培养基(美国GIBCO公司);牙龈卟啉单胞菌来源脂多糖[百盈利创生物科技(北京)有限公司];三抗(青霉素、链霉素和两性霉素B,南京生航生物技术有限公司);血管内皮生长因子抗体、GAPDH抗体、活死染色试剂盒、Calcein AM、碘化丙啶(碧云天生物有限公司);超敏ECL化学发光试剂盒(碧云天生物有限公司);Trizol试剂盒、反转录试剂盒(艾科瑞生物科技有限公司);Ceivitron暂封膏(台湾东权国际有限公司);玻璃离子水门汀[而至齿科(苏州)有限公司];CCK-8(美仑生物科技有限公司);Hanks缓冲液(自配,每升超纯水中依次溶入160 g NaCl、2 g $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、8 g KCl、2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、2.8 g CaCl_2 、3.4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 及1.2 g KH_2PO_4);微量核酸分光光度计(Nanodrop 1000,美国Thermo Fisher公司);酶标仪(EPOCH2,美国BioTek公司);倒置荧光显微镜(TCS SP8,德国Leica公司);荧光定量PCR仪(CFX Connect,美国Bio-Rad公司);体式显微镜(SOPTOP SZN71变焦电视显微镜)。

1.4 实验方法

1.4.1 离体牙根管内奥硝唑药物残留与释放实验 如图1所示,使用牙科高速涡轮手机打开牙髓腔,建立直线通道,使用拔髓针拔除牙髓,使用20 mL 2.5%次氯酸钠溶液、20 mL超纯水结合超声振荡冲洗髓腔并进行根管预备,使用三用枪及棉球干燥髓腔,采用Ceivitron暂封膏和玻璃离子水门汀将100 μL 奥硝唑溶液(33 $\mu\text{g}/\text{mL}$)封于髓腔中。将每颗离体牙浸泡于15 mL Hanks缓冲液中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中孵育,隔天更换浸泡液。7 d后再次打开髓腔,去除充填物及药物,先后使用20 mL 2.5%次氯酸钠溶液和

20 mL超纯水超声振荡冲洗髓腔并封入无菌水,再次使用暂封膏和玻璃离子水门汀封闭髓腔,重新放回摇床中,隔天更换浸泡液,定期使用1 mL注射器收集髓腔液体样品用于后续奥硝唑质量浓度检测。使用Hanks缓冲液配制奥硝唑的标准溶液,质量浓度分别为0.25, 0.5, 2, 2.5, 5, 10, 20, 25及50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,使用微量核酸分光光度计检测在322 nm处吸光度(A)值,绘制标准曲线,采用比色法检测样品中奥硝唑质量浓度。

1.4.2 不同质量浓度奥硝唑对人脐静脉内皮细胞的影响

细胞活性检测:将人脐静脉内皮细胞接种于96孔板中,细胞密度为 $3 \times 10^3/\text{孔}$,待细胞贴壁后加入1 mg/L脂多糖刺激24 h,去除高糖DMEM细胞完全培养基(含体积分数10%胎牛血清、1%青霉素–链霉素),更换为含不同质量浓度[0(对照), 1, 2, 5, 8及10 $\mu\text{g}/\text{mL}$]奥硝唑的高糖DMEM细胞完全培养基共培养^[30]。共培养1, 3 d后,采用CCK-8试剂盒定量检测细胞活性,使用酶标仪测量450 nm处的吸光度值;用Calcein AM/PI染色试剂盒进行活死细胞荧光染色,置于倒置荧光显微镜观察并拍照。

细胞划痕实验:将人脐静脉内皮细胞接种于6孔板中,细胞密度为 $1.6 \times 10^5/\text{孔}$,细胞贴壁后加入1 mg/L脂多糖刺激24 h,去除培养基,用200 μL 移液枪尖在细胞膜层均匀划痕。用PBS冲洗细胞,分别加入含不同质量浓度(0, 1, 2, 5, 8及10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)奥硝唑的培养基,使用倒置荧光显微镜分别在0, 12, 24及48 h对细胞进行观察和拍照,使用Image J 1.53t软件(美国国立卫生研究院)处理数据,计算细胞迁移率。

RT-PCR检测成血管相关基因的表达:将人脐静脉内皮细胞接种于6孔板中,细胞密度为 $1.6 \times 10^5/\text{孔}$,分别与不同质量浓度(0, 1, 2, 5, 8及10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)奥硝唑直接共培养,或者加入1 mg/L脂多糖刺激24 h后分别与不同质量浓度(0, 1, 2, 5, 8及10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)奥硝唑共培养。共培养1, 3 d后,使用Trizol试剂盒提取细胞总RNA,使用反转录试剂盒将其反转录为cDNA,进行实时定量PCR反应:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 保温3–10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 保温10–30 s,共循环40次。通过荧光定量PCR仪检测成血管相关标志物血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的mRNA表达,以GAPDH为内参基因。引物序列见表1。

表1 | RT-PCR检测引物序列

Table 1 | Validated prime sequences for real-time PCR

基因	正向引物(5'–3')	反向引物(5'–3')	产物长度(bp)
血管内皮生长因子	TGC GGA TCA AAC CTC ACC A	CAG GGA TTT TTC TTG TCT TGCT 19	
碱性成纤维细胞生长因子	CAA TTC CCA TGT GCT GT GAC ACC TTG ACC TCT CAG CCT CA		20
GAPDH	GAT TTG GTC GTA TTG GGC G	CTG GAA GAT GGT GAT GG	19

Western blot 检测血管内皮生长因子蛋白表达: 将人脐静脉内皮细胞接种于 6 孔板中, 细胞密度为 1.6×10^5 /孔, 加入 1 mg/L 脂多糖刺激 24 h 后分别与不同质量浓度 (0, 1, 2, 5, 8 及 10 $\mu\text{g/mL}$) 奥硝唑共培养。共培养 1, 3 d 后, 用 RIPA 溶液裂解细胞后收集裂解液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 进行归一化后加入上样缓冲液, 置入水浴锅中 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热。使用 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白后转膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭膜孔, 分别与血管内皮生长因子、GAPDH 溶液 (均为 1 : 1 000 稀释比) 于摇床中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 与对应的二抗溶液 (1 : 2 000 稀释比) 在室温下孵育 2 h, 用 ECL 化学发光试剂盒孵育, 使用凝胶成像仪曝光条带, 通过 Image J 1.53t 软件分析条带灰度值。

1.4.3 鸡胚绒毛尿囊膜实验评估奥硝唑的血管刺激性 将 SBF 级 9 d 龄鸡胚随机分成 3 组, 每组 6 个。用牙科弯镊去除气室的部分蛋壳及蛋壳膜, 保证暴露的尿囊膜完整不受损伤; 在尿囊膜上放置尼龙环, 实验组尼龙环内分别加入 2, 10 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑溶液 (生理盐水配制) 200 μL , 对照组尼龙环内加入 200 μL 生理盐水; 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、60% 湿度下孵育 1 h 后, 用体式显微镜观察不同质量浓度奥硝唑对鸡胚血管变化的影响。

1.5 主要观察指标 奥硝唑在牙根管内的残留质量浓度, 不同质量浓度奥硝唑对人脐静脉内皮细胞活性、迁移及分化的影响, 以及不同质量浓度奥硝唑对血管的刺激性。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 9.0 软件 (美国 GraphPad Software 公司) 对实验数据进行处理并作图, 两组数据之间比较采用 *t* 检验, 多组间数据比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。该文统计学方法已经暨南大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 牙根管内奥硝唑的残留与释放 图 2 给出了牙根管内中奥硝唑的释放质量浓度。在清理、封药后, 从牙根管内游离出来的残留奥硝唑质量浓度达到 $(19.5 \pm 5.7) \mu\text{g/mL}$, 随着时间的推移, 残留奥硝唑的释放质量浓度逐渐降低, 6 d 后明显降至 $(5.5 \pm 1.3) \mu\text{g/mL}$, 在后期则维持接近 2 $\mu\text{g/mL}$ 的释放水平。这表明即使在根管清理后仍能检测到奥硝唑的明显残留, 并且这些奥硝唑会不断地释放出来持续影响后续生物学事件。

2.2 不同质量浓度奥硝唑对人脐静脉内皮细胞活性与迁移能力的影响 参考奥硝唑药物在离体牙模型中的释放水平, 探讨不同质量浓度 (1–10 $\mu\text{g/mL}$) 奥硝唑对人脐静脉内皮细胞行为的影响。在脂多糖诱导的炎症条件下与不同质量浓度奥硝唑共培养后, 人脐静脉内皮细胞随着时间推移逐渐生长。CCK-8 检测结果显示, 共培养 1, 3 d 后, 与

对照组相比, 1–10 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑对人脐静脉内皮细胞的增殖无明显影响 ($P > 0.05$), 见图 3A; 活死细胞荧光染色显示各组细胞均具有良好的生长形态, 细胞存活率较高, 见图 3B, 表明 1–10 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑具有良好的细胞相容性。细胞划痕实验结果显示, 不同质量浓度奥硝唑 (尤其是 10 $\mu\text{g/mL}$) 会在一定程度上抑制人脐静脉内皮细胞在共培养初期 (12 h) 的迁移活动, 而后期 (24–72 h) 的这种抑制作用基本消除, 见图 3C, D。

综合实验结果, 整体上, 1–10 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑对人脐静脉内皮细胞的增殖活性和迁移能力无明显负面影响。

2.3 不同质量浓度奥硝唑对人脐静脉内皮细胞成血管相关基因和蛋白表达的影响 RT-qPCR 检测结果显示, 整体上, 与不同质量浓度奥硝唑直接共培养后, 人脐静脉内皮细胞中血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长的 mRNA 表达下调 (图 4A, B)。直接共培养 1 d, 与对照组比较, 1 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑组血管内皮生长因子 mRNA 表达升高 ($P < 0.000 1$), 2, 8 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑组血管内皮生长因子 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$); 1, 8 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑组碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 直接共培养 3 d, 与对照组比较, 1 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑组血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 表达升高 ($P < 0.000 1$), 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑组血管内皮生长因子 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.000 1$), 2, 8 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑组碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)。

在脂多糖诱导的炎症条件下, 整体上, 与不同质量浓度奥硝唑直接共培养后, 人脐静脉内皮细胞中血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长的 mRNA 表达上调 (图 4C, D)。共培养 1 d, 与对照组比较, 1–8 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑组血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.000 1$); 共培养 3 d, 与对照组比较, 5, 8 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑组血管内皮生长因子 mRNA 表达升高 ($P < 0.000 1$), 2–10 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑组碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 表达均升高 ($P < 0.000 1$)。

Western blot 检测结果显示, 在脂多糖诱导的炎症条件下, 与对照组比较, 2, 5 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑组共培养 1 d、10 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑组共培养 3 d 血管内皮生长因子蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 见图 4E, F。

2.4 不同质量浓度奥硝唑对血管的刺激性评估 3 组受试尿囊膜均未观察到出血、凝血、血管融解或蛋白质变性等现象, 见图 5, 表明适量质量浓度的奥硝唑对血管无毒性效应, 即对组织血管化无明显负面影响。

3 讨论 Discussion

在牙髓治疗中, 组织的再生修复和根尖的进一步发

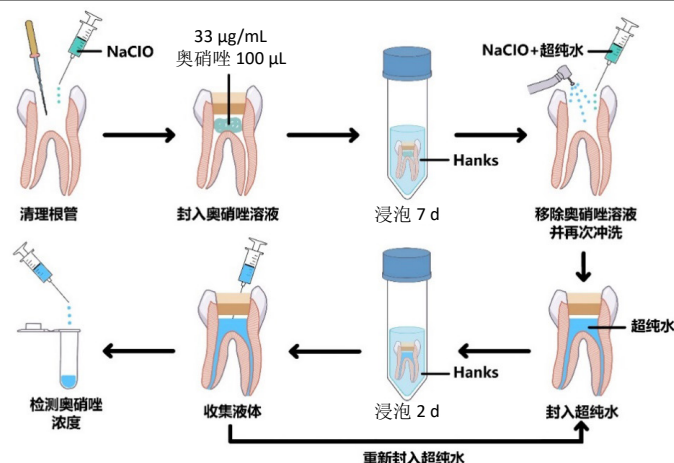
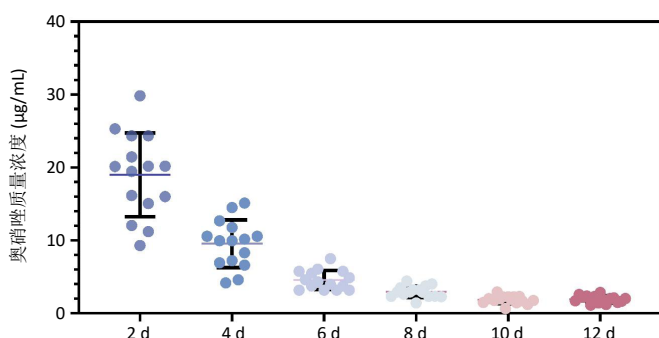


图 1 | 基于离体牙模型的奥硝唑药物残留与释放实验流程

Figure 1 | Experimental procedures of ornidazole residue and release based on an isolated tooth model



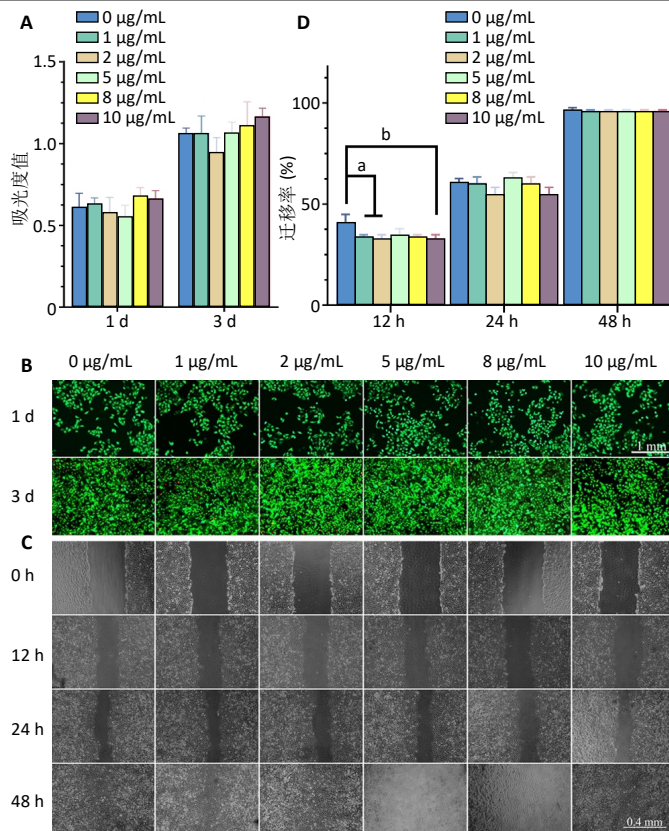
图注：牙根管中残留的奥硝唑在最初 6 d 内迅速释放，随后释放速度减慢，8 d 以后根尖奥硝唑质量浓度约为 2 µg/mL。

图 2 | 离体牙根管内残留奥硝唑的释放质量浓度

Figure 2 | Concentrations of ornidazole released from the root canals of extracted teeth

育依赖于血运重建以及细菌感染的有效控制^[31]。临床常用抗生素控制根管感染。据报道，抗生素用于髓腔治疗后会在髓腔内长期留存，除了起到潜在的控制感染和减轻炎症作用外，还可能会干扰髓腔内微环境和组织再生，尤其是影响愈合初期的血管生成^[21, 32-33]。已有研究报道，残留高浓度的抗生素会对牙髓细胞产生毒性，不利于内皮细胞参与血管再生与组织的修复^[22]。此次实验通过离体牙模型证实了抗生素药物（奥硝唑）在根管中的残留，并探究了髓腔清理后残留药物的释放行为，发现经过初期的大量释放（接近 20 µg/mL）后，奥硝唑仍在根管内长期维持近 2 µg/mL 的释放水平。即使应用临床标准的根管冲洗方法进行清理操作，起控制感染作用的抗生素仍会长期残留在根管系统内并逐步溶出，形成低浓度的抗生素微环境。这一方面提示了临床根管冲洗的重要性与局限性，另一方面也提醒研究者对抗生素或其他治疗药物残留问题的关注。

作为新一代硝唑类药物，奥硝唑具有优异的抗厌氧

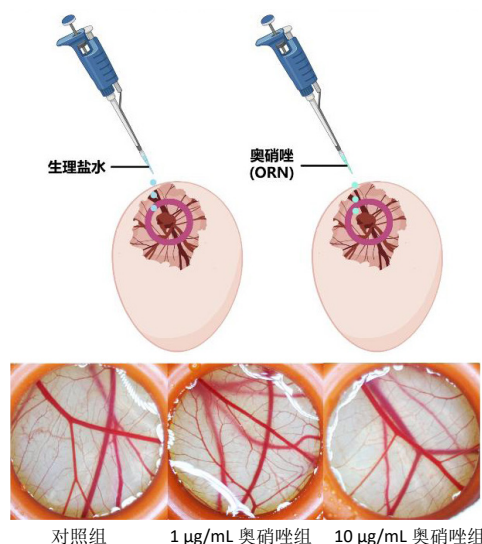
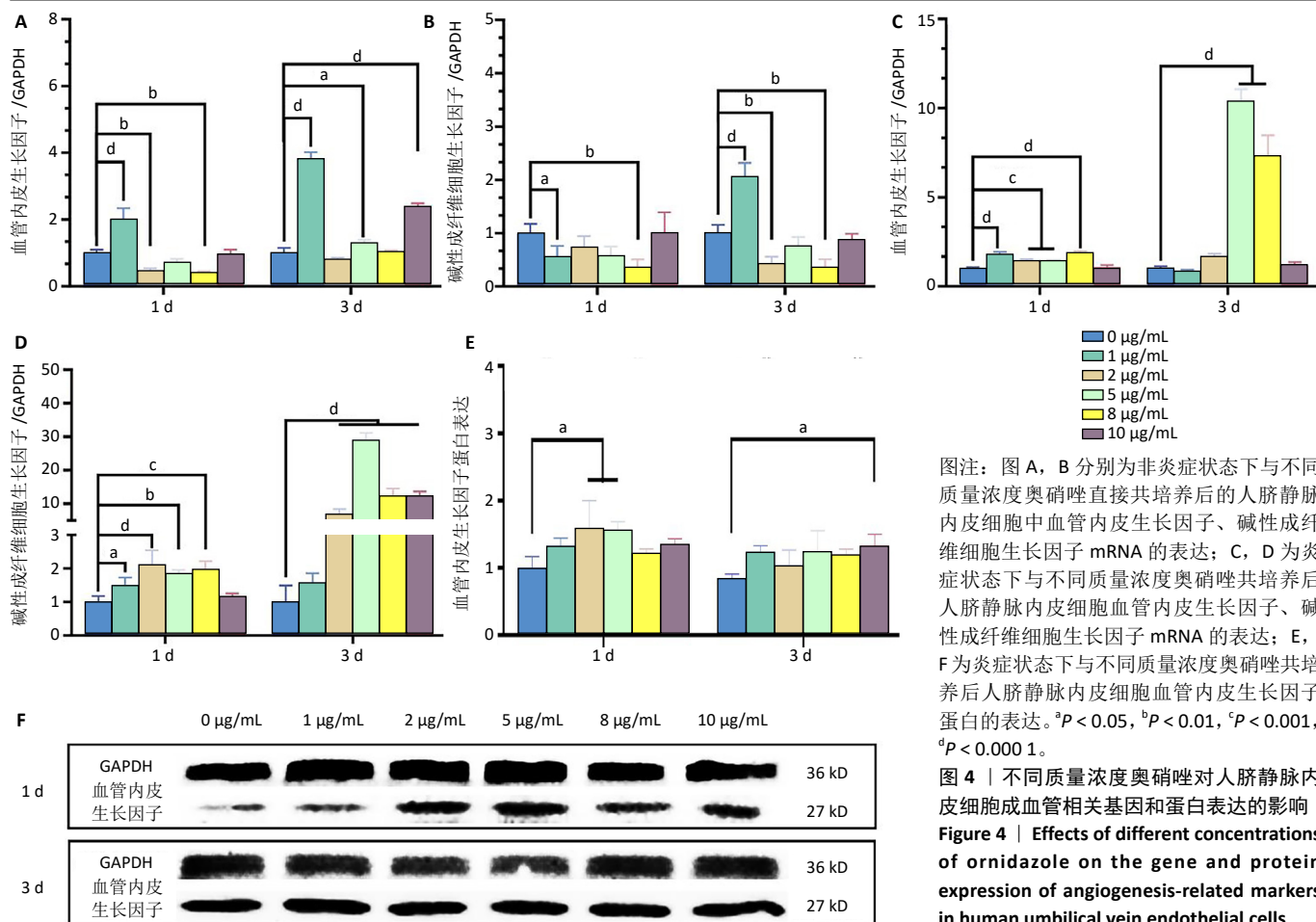


图注：图 A 为脂多糖诱导炎症后与不同质量浓度奥硝唑共培养的人脐静脉内皮细胞增殖活性，不同质量浓度奥硝唑对细胞增殖活性无影响；B 为脂多糖诱导炎症后与不同质量浓度奥硝唑共培养的人脐静脉内皮细胞活/死细胞荧光染色图像，不同质量浓度奥硝唑对细胞形态与生长无影响；C 为脂多糖诱导炎症后与不同质量浓度奥硝唑共培养的人脐静脉内皮细胞迁移光学图像；D 为人脐静脉内皮细胞迁移能力的定量分析，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.001$ 。

图 3 | 炎症状态下不同质量浓度奥硝唑对人脐静脉内皮细胞增殖活性和迁移能力的影响

Figure 3 | Effects of different concentrations of ornidazole on the proliferation and migration capabilities of human umbilical vein endothelial cells in the inflammatory state

菌活性，非常适用于根管的感染控制，尤其是牙髓失活发展病变过程中的厌氧菌控制。有研究报道，奥硝唑用于牙髓病及冠周炎治疗时有良好的效果^[34-35]。最新研究表明，根尖血管的形成及组织修复与炎症控制呈负相关，但使用药物控制炎症时仍有抑制血管形成的报道^[22, 31, 34-35]。尽管如此，考虑到根管内药物残留的问题，奥硝唑用作再生性牙髓治疗潜在药物仍须考虑其对根管内血管化的影响，例如对内皮细胞的增殖、迁移及成血管效应的影响，即药物的应用策略应当考虑对内皮细胞活性的保护^[36]。研究显示，在炎症微环境下，1–10 µg/mL（在药物溶出量级）奥硝唑对人脐静脉内皮细胞的增殖和迁移无显著抑制。鸡胚绒毛尿囊膜实验是临床评估药物对血管刺激性的重要指标^[37-38]。经奥硝唑刺激后，尿囊膜中未见出血、凝血、血管溶解或蛋白质变性等现象，这表明奥硝唑在溶出质量浓度范围内无细胞毒性及血管刺激性，即其对组织损伤处的内皮细胞募集和存活以及血管再生无潜在毒性。



作为血管再生的标志物之一，血管内皮生长因子是胎儿和成人血管生成的重要媒介，在调节血运重建和人脐静脉内皮细胞血管化方面发挥关键作用^[39-40]。血管内皮生长因子的高表达可促进体内骨髓干细胞的成血管分化，增加根尖组织新生血管的量^[41]。另外，碱性成纤维细胞生长因子也有促进人脐静脉内皮细胞向受损组织迁移及血管化的功能，载碱性成纤维细胞生长因子和奥硝唑的静电纺丝膜可在体内起到良好的抗炎和促血管生成作用^[20]。

此实验显示，在奥硝唑直接刺激下，人脐静脉内皮细胞中血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的 mRNA 表达整体上呈下调趋势；而在由脂多糖诱导的炎症微环境中，奥硝唑反而促进了血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的 mRNA 表达。推测即使在较低质量浓度（1–10 $\mu\text{g/mL}$ ）下，奥硝唑依然对人脐静脉内皮细胞成血管活性具有一定的抑制作用；而在炎症微环境中，奥硝唑本身优异的抗炎作用减轻了人脐静脉内皮细胞的炎症反应及其他不利影响，相比之下反而促进人脐静脉内皮细胞成血管再生相关标志物的表达，并且并不影响细胞的增殖和迁移。因此，尽管在根管内应用奥硝唑后会存在药物长期残留及释放问题，但奥硝唑会在潜在的炎症微环境中发挥抗厌氧菌功能并促进内皮细胞成血管因子的表达，具体分子机制有待后续探究。

综上所述，髓腔载入奥硝唑后会在根管系统中长期残留并持续低质量浓度溶出（ $< 20 \mu\text{g/mL}$ ）。1–10 $\mu\text{g/mL}$ 奥硝唑无细胞毒性及血管刺激性，可促进炎症性内皮细胞中促血管生成相关基因及蛋白的表达，奥硝唑可作为一种潜在的治疗药物用于髓腔感染控制并促进根管内血管化。进一步研究将负载该药物于植入材料中或直接用在体内根管系统中，阐明其促进再生性牙髓再生的作用机制。

作者贡献: 黎梓楷和熊嘉颖进行实验设计, 实验实施为黎梓楷和张程程, 实验评估为杨曦瑞, 资料收集为阳晶, 黎梓楷和熊嘉颖成文, 张程程审核。

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

- GALLER K M, WEBER M, KORKMAZ Y, et al. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1480.
- TATULLO M, MARRELLI M, SHAKESHEFF KM, et al. Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(11):1205-1216.
- LEÓN-LÓPEZ M, CABANILLAS-BALSERA D, MARTÍN-GONZÁLEZ J, et al. Prevalence of root canal treatment worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2022;55(11): 1105-1127.
- LU JM, LI ZH, WU X, et al. iRoot BP Plus promotes osteo/odontogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via MAPK pathways and autophagy. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10: 1-14.
- SIQUEIRA JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*. 2001;34(1):1-10.
- RODRIGUES M, KOSARIC N, BONHAM CA, et al. Wound healing: a cellular perspective. *Physiol Rev*. 2019;99(1):665-706.
- HERBERT SP, STAINIER DYR. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(9): 551-564.
- KOTTOOR J, VELMURUGAN N. Revascularization for a necrotic immature permanent lateral incisor: a case report and literature review. *Int J Paediatr Dent*. 2013;23(4):310-316.
- MEHRVARZ FAR P, ABBOTT PV, AKHAVAN H, et al. Modified Revascularization in Human Teeth Using an Intracanal Formation of Treated Dentin Matrix: A Report of Two Cases. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2017;7(4):218-221.
- ZHANG S, ZHANG W, LI Y, et al. Cotransplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells and endothelial cells for angiogenesis and pulp regeneration in vivo. *Life Sci*. 2020;255:117763.
- HUANG X, LI Z, LIU A, et al. Microenvironment Influences Odontogenic Mesenchymal Stem Cells Mediated Dental Pulp Regeneration. *Front Physiol*. 2021;12:656588.
- XIA K, CHEN Z, CHEN J, et al. RGD- and VEGF-Mimetic Peptide Epitope-Functionalized Self-Assembling Peptide Hydrogels Promote Dentin-Pulp Complex Regeneration. *Int J Nanomed*. 2020;15:6631-6647.
- MILTADIOUS ME, FLORATOS SG. Regenerative Endodontic Treatment as a Retreatment Option for a Tooth with Open Apex- A Case Report. *Braz Dent J*. 2015;26(5):552-556.
- HILKENS P, BRONCKAERS A, RATAJCZAK J, et al. The Angiogenic Potential of DPSCs and SCAPs in an *In Vivo* Model of Dental Pulp Regeneration. *Stem Cells Int*. 2017;2017(1): 2582080.
- DOS SANTOS LRK, PELEGRINE AA, BUENO CED, et al. Pulp-Dentin Complex Regeneration with Cell Transplantation Technique Using Stem Cells Derived from Human Deciduous Teeth: Histological and Immunohistochemical Study in Immunosuppressed Rats. *Bioengineering (Basel)*. 2023;10(5):610.
- DIOGUARDI M, DI GIOIA G, ILLUZZI G, et al. Inspection of the Microbiota in Endodontic Lesions. *Dent J (Basel)*. 2019;7(2):47.
- LACEVIC A, BILALOVIC N, KAPIC A. Bacterial aggregation in infected root canal. *Bosn J Basic Med Sci*. 2005;5(4):35-39.
- ZHANG C, YANG Z, HOU B. Diverse bacterial profile in extraradicular biofilms and periradicular lesions associated with persistent apical periodontitis. *Int Endod J*. 2021; 54(9):1425-1433.
- KIRYU T, HOSHINO E, IWAKU M. Bacteria invading periapical cementum. *J Endod*. 1994;20(4): 169-172.
- ZHANG W, WANG QQ, WANG KR, et al. Construction of an ornidazole/bFGF-loaded electrospun composite membrane with a core-shell structure for guided tissue regeneration. *Mater Des*. 2022;221:110960.
- SABRAH AHA, YASSEN GH, SPOLNIK KJ, et al. Evaluation of residual antibacterial effect of human radicular dentin treated with triple and double antibiotic pastes. *J Endod*. 2015; 41(7):1081-1084.
- DUBEY N, XU J, ZHANG Z, et al. Comparative Evaluation of the Cytotoxic and Angiogenic Effects of Minocycline and Clindamycin: An In Vitro Study. *J Endod*. 2019;45(7):882-889.
- ZHAO Y, CHEN Z, HUANG P, et al. Analysis of Ornidazole injection in clinical use at post-marketing stage by centralized hospital monitoring system. *Curr Med Sci*. 2019;39: 836-842.
- TORT H, OKTAY EA, TORT S, et al. Evaluation of ornidazole-loaded nanofibers as an alternative material for direct pulp capping. *J Drug Delivery Sci Technol*. 2017;41: 317-324.
- TASANARONG P, AYUDHYA TDN, TECHANITISWAD T, et al. Reduction of viable bacteria in dentinal tubules treated with a novel medicament (Z-Mix). *J Dent Sci*. 2016;11(4):419-426.
- ZHANG SY, THIEBES AL, KREIMENDAHL F, et al. Extracellular Vesicles-Loaded Fibrin Gel Supports Rapid Neovascularization for Dental Pulp Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(12):4226.
- 王玉娟, 褚美芬, 罗冬娇, 等. 不同 5'-硝基咪唑类药物治疗厌氧菌性及滴虫性阴道炎临床疗效比较 [J]. *上海医学*, 2006,29(6):375-378.
- GIRAUD T, JEANNEAU C, ROMBOUTS C, et al. Pulp capping materials modulate the balance between inflammation and regeneration. *Dent Mater*. 2019;35(1):24-35.
- GOLDBERG M, NJEH A, UZUNOGLU E. Is pulp inflammation a prerequisite for pulp healing and regeneration? *Mediators Inflammation*. 2015;2015(1):347649.
- BINDAL P, RAMASAMY TS, KASIM NHA, et al. Immune responses of human dental pulp stem cells in lipopolysaccharide-induced microenvironment. *Cell Biol Int*. 2018;42(7):832-840.
- IOHARA K, TOMINAGA M, WATANABE H, et al. Periapical bacterial disinfection is critical for dental pulp regenerative cell therapy in apical periodontitis in dogs. *Stem Cell Res Ther*. 2024;15(1):17.
- AMINOSHARIAE A, KULILD JC. Evidence-based recommendations for antibiotic usage to treat endodontic infections and pain: A systematic review of randomized controlled trials. *J Am Dent Assoc*. 2016;147(3):186-191.
- JAVAN NKN, BARADARAN LM, AZIMI S. SEM study of root canal walls cleanliness after Ni-Ti rotary and hand instrumentation. *Iran Endod J*. 2007;2(1):5.
- SUN NN, WANG NN, QU LN. Clinical Symptoms and Quality of Life Improvement Value of Ornidazole Mixture in Auxiliary Filling Treatment of Patients with Endodontic Disease. *Contrast Media Mol Imaging*. 2022;2022:7181258.
- DU RB, BA K, YANG YX, et al. Efficacy of ornidazole for pericoronitis: a meta-analysis and systematic review. *Arch Med Sci*. 2024;20(1):189-195.
- CARMELIET P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438(7070):932-936.
- LUEPKE NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem Toxicol*. 1985;23(2):287-291.
- FENTEM JH. Book Review: *Methods in Molecular Biology Volume 43: In Vitro Toxicity Testing Protocols*. SAGE Publications Sage UK: London, England, 1995.
- FERRARA N. From the discovery of vascular endothelial growth factor to the introduction of avastin in clinical trials-an interview with Napoleone Ferrara by Domenico Ribatti. *Int J Dev Biol*. 2011;55(4-5):383-388.
- BREIER G, ALBRECHT U, STERRER S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*. 1992; 114(2):521-532.
- SAKAI VT, ZHANG Z, DONG Z, et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res*. 2010;89(8):791-796.

(责任编辑: GW, ZN, WL, ZJP)