

[M]. Monogr Virolog. 1997, vol 20:3-15.

[6] Qu XW, Liu WP, Qi ZY, et al. Phospholipase A2-like activity of human bocavirus VP1 unique region[J]. Biochem Biophys Res

Commun, 2008, 365(1):158.

(收稿日期:2013-06-25)

文章编号:1007-4287(2014)08-1229-02

抗菌性室温固化 PMMA 材料的细胞毒性及致突变性研究

申证暄¹, 张赐童¹, 孙世群², 王玉峰¹, 王晓容^{2*}

(1. 吉林大学口腔医学院, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学口腔医院 修复科, 吉林 长春 130021)

室温固化聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethylmethacrylate, PMMA) 是口腔修复临床应用的主要材料之一, 具有操作简单、固化迅速、价格便宜等优点。但由于其特殊组成、表面多孔性和吸水性, 易造成微生物的定殖难以清除, 从而破坏口腔内微生态平衡, 引起口腔疾病。纳米载银无机抗菌剂兼具纳米无机材料超微性、比表面积大特征和银离子的抗菌广谱、强效等优势而受到了学者的广泛认可^[1]。本课题组已有研究表明^[2]: 添加 2% 纳米载银无机抗菌剂的室温固化 PMMA 材料可以有效改善原材料的抗菌性, 且不会对材料的机械性能产生不良影响。本实验通过细胞毒性试验和微核试验, 检测含 2% 纳米载银无机抗菌剂的室温固化 PMMA 材料的细胞毒性及潜在致突变性, 为评价其生物安全性提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料及仪器 日进义齿基托聚合物 II 型粉剂 (仿生型) 液体 (日进齿科材料有限公司); 纳米载银无机抗菌剂 RHA-1 (上海润河纳米材料科技有限公司); 小鼠成纤维细胞 (中科院上海细胞库); 酶联免疫检测仪 (美国 Thermo 公司); 昆明小鼠 (吉林大学实验动物中心); 吉姆萨染液 (南京建成科技有限公司); 环磷酰胺 (江苏恒瑞医药股份有限公司); 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司)。

1.2 样品制备 按比例将纳米载银无机抗菌剂与室温固化 PMMA 粉剂混合, 置球磨机中研磨 8 h 制

成抗菌母料, 母料中再次加入一定室温固化 PMMA 粉剂, 研磨 24 h 稀释成含 2% 浓度抗菌剂的室温固化 PMMA。按规定粉液比, 在室温 20℃ 左右条件下, 制成试件。将试件按 1 g : 5 ml 的比例, 37℃ 恒温箱中浸提 24 h, 制备浸提液。

1.3 细胞毒性实验方法 选取 L929 细胞, 培养至细胞贴壁生长, 收集细胞并计数, 将细胞接种至 96 孔板, 每组 6 孔, 每孔细胞数为 4×10^3 个, 培养 24 h, 弃原液, PBS 漂洗 2 次, 实验组加入 100 μ l 100% 浸提液, 空白组加入 100 μ l 新鲜培养液, 阳性对照组加入 100 μ l DMSO, 培养 48 h。向培养板中加入浓度为 0.2 mg/ml 的 MTT 继续孵育 4 h, 弃上清, 加入 200 μ l DMS, 在酶标仪上测定其在 490 nm 处 OD 值, 并计算细胞相对增值率。

1.4 微核实验方法 健康昆明小鼠 50 只, 雌雄各半, 随机分 5 组, 每组 10 只 (实验过程中各别昆明小鼠死亡, 补足每组 10 只)。各实验组均以 50 ml/kg 浸提液灌胃毒染, 其中高剂量组浓度为 200 mg/ml, 中剂量组浓度为 40 mg/ml, 低剂量组浓度为 8 mg/ml, 阴性对照组以 50 ml/kg 生理盐水灌胃毒染, 阳性对照组以 40 mg/kg 环磷酰胺腹腔注射毒染。采用 30 h 给受试物法, 末次毒染 6 h 后颈椎脱臼处死。取股骨骨髓制片, 每只小鼠涂片 1 张。在空气中自然晾干后放入甲醇中固定 10-15 min。用 1 份 Giemsa 储备液: 6 份 pH6.8 磷酸盐缓冲液配成 Giemsa 应用液, 染色 15-20 min, 蒸馏水冲洗并晾干。先以低倍镜粗检, 选择细胞分布均匀, 染色良好的区域, 再在 1000 倍镜下观察计数。嗜多染红细胞呈灰蓝色, 成熟红细胞呈橘红色, 微核为紫红色或蓝紫色。每片计数 1000 个嗜多染红细胞, 计算微核率。

基金项目: 吉林省科技厅科技发展计划项目资助课题 (20090462), 长春市科技计划项目 (12SF84)

* 通讯作者

同时考虑 200 个细胞中嗜多染红细胞与成熟红细胞比值,若比值 ≥ 1 为正常,若比值 < 1 可能对骨髓细胞产生毒性。

1.5 统计学分析

实验数据采用卡方检验, $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验组毒性反应均为 0 级,阳性对照组细胞毒性为 4 级,见表 1。

2.2 实验组与阴性对照组比较,小鼠 PCE 微核率无显著差异 ($P > 0.05$),但各实验组的微核率均低于阳性对照组 ($P < 0.05$),见表 2。骨髓细胞涂片中可见微核细胞、单核细胞及双核细胞。

表 1 抗菌性与非抗菌性室温固化 PMMA 组 OD 值比较(平均值 \pm 标准差)

组别	吸光度值	RGR (%)	毒性分级
空白对照组	0.476 \pm 0.038	100.00	0 级
阳性对照组	0.065 \pm 0.071	13.66	4 级
室温固化 PMMA 组	0.567 \pm 0.042	119.12	0 级
抗菌性室温固化 PMMA 组	0.600 \pm 0.046	126.05	0 级

表 2 各实验组微核率比较(平均值 \pm 标准误)

组别	例数 (只)	PCE (个/张)	P/N	微核率 (%)
阴性对照组	10	1000	≥ 1	2.80 \pm 0.55 Δ
阳性对照组	10	1000	< 1	26.30 \pm 2.06
高浓度组(200 mg/ml)	10	1000	≥ 1	2.70 \pm 0.42 Δ
中浓度组(40 mg/ml)	10	1000	≥ 1	3.10 \pm 0.67 Δ
低浓度组(5 mg/ml)	10	1000	≥ 1	3.20 \pm 0.66 Δ

Δ :与阳性对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

生物材料应具有良好的组织相容性^[3,4]、生物安全性及功能性。遗传毒性试验是生物安全性重要检测指标之一,用于评价材料的致畸、致癌、致突变能力,以了解材料对机体的远期作用。微核试验是通过观察细胞中微核的形成来检测遗传毒物,其结果阳性说明受试物是遗传毒物,具有潜在致突变作用。

根据国家标准 YY/T0127.12-2008,实验阴性组微核细胞率应小于 0.5%,本实验阴性对照结果为 0.28%,符合要求。环磷酰胺是国家标准中规定的具有致突变作用的阳性指示剂之一,应用剂量为 40 mg/kg 时微核率范围一般为 2.2%-3.0%^[5],本实验阳性对照结果为 2.63%,符合要求。实验得出的结果表明本次试验操作规范及动物的灵敏度正常。并且,实验阴性对照组与阳性对照组的微核率差异有统计学意义,证明此实验结果可信。

细胞毒性试验是医疗生物学评价体系中重要的检测指标之一,几乎是各种用途的医疗器械和材料临床应用前的必选项目。噻唑蓝比色法被称之为“细胞毒性检测的标准方法”^[6],具有较高灵敏度,检测指标客观^[7]且能定量分析。因此本实验采用该方法进行体外细胞毒性检测。细胞毒性结果显示,在本试验条件下,L-929 细胞在经过受试物浸提液培养 2 d 后,经 MTT 法检测所得细胞毒性为 0 级,受试物对该细胞无毒性作用。倒置显微镜下出现同样结果,各组图片中细胞均未见细胞的细胞膜破坏,细胞核异常。可以认为含 2%浓度纳米载银抗菌剂的室温固化 PMMA 材料无细胞毒性。

参考文献:

[1]赵明哲,汲平. 纳米技术在口腔修复领域的应用前景及进展[J]. 口腔颌面修复学杂志,2008,9(01):76.
 [2]贾春丽,王晓容,张赐童,等. 添加纳米载银无机抗菌剂的室温固化 PMMA 材料体外抗菌效果评价[J]. 吉林大学学报(医学版),2012,38(02):899.
 [3]Sadowsky SJ. An overview of treatment considerations for esthetic restorations: A review of the literature[J]. Prosthet Dent, 2006,96(6):433.
 [4]Hao W, Hu YY, Wei YY, et al. Collagen I gel can facilitate homogenous bone formation of adipose-derived stem cells in PLGA-beta-TCP scaffold[J]. Cells Tissues Organs,2008,187(2):89.
 [5]陆华,孙皎,黄哲伟,等. 微核试验评价强化聚乙烯的潜在致突变性[J]. 口腔材料器械杂志,1999,8(02):68.
 [6]Rossberg S. Standardverfahren for die Zytotoxizitätsprüfung: der MTT-Test[J]. Z Zahnärztl Implantol,1988,4:251.
 [7]Mockers O, Deroze D, Camps J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro[J]. Dent Mater,2002,18(4):3.

(收稿日期:2013-04-16)