

一种新型瓷嵌体修复用树脂粘接材料生物安全性评价

苗莉¹ 赵文峰^{1△} 马芳² 任晓丽³

(1 北京军区总医院口腔科 北京 100700 2 北京军区联勤部驻北京铁路局军代处 北京 100860 ;

3 空军工程大学门诊部 陕西 西安 713800)

摘要 目的:初步评价一种新型瓷嵌体修复用树脂粘接材料的生物安全性。方法:按照国标 GB16886.5-1997, 医药行业标准 YY/T0268-2001、YY/T0279-1995、以及 YY/T 0244-1996 所规定的方法对本院材料科新研制的复合树脂粘接材料的生物安全性进行评价,内容包括短期急性全身毒性试验、粘膜刺激实验、细胞毒性试验。结果:此种新型瓷嵌体修复用树脂粘接材料无细胞毒性,无短期全身毒性,对口腔黏膜无刺激。结论:此种新型瓷嵌体修复用树脂粘接材料具有良好的生物安全性,可以进行进一步安全性检测。

关键词 嵌体修复 树脂粘接材料 生物安全性 国家标准

中图分类号 R783.1 R318.08 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2011)19-3752-04

Evaluation of Biological Safety of a New Resinous Porcelain Inlay Bonding for Repairing

MIAO Li¹, ZHAO Wen-feng^{1△}, MA Fang², REN Xiao-li³

(1 The Military General Hospital of Beijing PLA, Beijing, 100700; 2 Beijing Military Area Command Located in the Office of Beijing Railway Bureau, Beijing ;100860; 3. Air Force Engineering University, 713800, Shanxi xian)

ABSTRACT Objective: To comment the biological safety of a new resinous porcelain inlay bonding for repairing. **Methods:** According to the samples of the GB16886.5-1997, YY/T0268-2001, YY/T0279-1995, YY/T 0244-1996, 1996 the trial include three parts, a short period acute general toxicity test, a mucous membranes irritation test and a cytotoxicity test. **Results:** The new resinous porcelain inlay bonding has no cytotoxicity, no acute toxicity and no mucous membrane irritation. **Conclusion:** The new resinous porcelain inlay bonding possesses good biological safety.

Key word: Porcelain inlay; Biological safety; Government standard; Resinous porcelain inlay bonding

Chinese Library Classification(CLC): R783.1, R318.08 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)19-3752-04

前言

目前,第四军医大学口腔医学院材料教研室新研制出一种新型的双组分双固化嵌体树脂粘接材料,主要用于粘接瓷嵌体修复。前期体外实验研究证实该材料具有良好的粘结性能和机械性能,能够满足树脂类粘接材料的性能要求,为其临床应用提供了实验基础。作为一种新型的粘接材料,其生物安全性与临床应用密切相关。本文根据 YY/T0268-2001^[1]标准采用短期急性全身毒性试验、粘膜刺激实验、细胞毒性试验对其生物安全性进行检测,评价该材料能否达到同类材料的生物安全性标准。

1 材料和方法

1.1 实验材料的制备

为进行实验检测将该材料光照固化分别制成直径为 5mm 厚 0.5mm 的圆片和 10mm×10mm×1mm 表面处理成镜面。

实验中采用的树脂粘接材料的组分如下:

- 1) 基质树脂 EAM 树脂(顺丁烯二酸酐改性的双酚 A 环氧二甲基丙烯酸酯)(第四军医大学口腔医学院材料教研室研制并提供); 交联单体 EDMA (二甲基丙烯酸乙二酯)(EAM:EDMA=7:3)(苏州化工厂);
- 2) 化学固化引发体系 BPO(过氧化苯甲酰)1.5%;
- 3) DHET(N,N-二羟乙基对甲苯胺)1%(辽宁永丰化工厂);
- 4) 光固化引发体系 CQ(樟脑醌)0.4%;
- 5) EDB(4-二甲氨基甲基氨基苯)1%(UCB,USA);
- 6) 偶联剂 KH-570 处理的 1000 目二氧化硅微粉(浙江湖州硅微粉厂)

1.2 短期急性全身毒性试验(经口途径)

参照 YY/T0244-1996 口腔材料生物实验方法(短期全身毒性试验 经口途径)^[2-4] 将 1mm 厚的片材经液氮冷冻后粉碎成 200 目的细小颗粒状,经 60Co 照射 12h 消毒备用。取 3g 置于 500ml 无菌烧杯中,加入蒸馏水至 300ml,充分摇匀,浸提 48 小时后备用(浓度相当于 10mg/ml),浸提液于 115℃ 灭菌消毒 30 min 后 4℃ 冰箱保存。

选用 6 周龄健康成年 SD 大鼠 20 只(由第四军医大学实验动物中心提供),雌雄各半,体重为 130-150g。将动物随机分为实验组和对照组,每组 10 只(雌、雄各半),每日 12h 照明,室

作者简介 苗莉(1979-),女,主治医师,主要研究方向 树脂粘接材料

△通讯作者 赵文峰 电话:010-66721597,

E-mail: wenfengzhao789@sina.com

(收稿日期 2011-04-30 接受日期 2011-06-16)

温 18-22 °C 相对湿度 50%-70%。参照魏煦^[3]、贾艳^[4]等研究采用的方法,使用成品灌胃针每天 8:00-9:00 给实验组大鼠灌注上述浸提液(5 ml/kg),对照组给同等剂量的生理盐水,每天 1 次,连续给药 1 周。实验期间的观察指标包括 SD 大鼠的临床毒性体征(包括运动机能减退、呼吸困难、腹泻、震颤,甚至死亡),每日称重并记录各组大鼠的进食情况,通过该数据计算出大鼠的食物利用率及体重相对增长率。采用的公式为(1)食物利用率(%)= 体重增长数(g) / 一周内消耗食物总量(g) × 100%; (2) 体重相对增长率 (%)= 体重增长数 (g) / 原始体重 (g) × 100%。

各组大鼠灌注 1 周停止并继续观察 1 周后取材,观察各重要脏器的组织变化。

1.3 口腔黏膜刺激试验

参照 YY/T0279-1995 口腔材料生物实验方法(口腔黏膜刺激实验)^[4,5],将树脂材料制备成直径 5mm 厚 0.5mm 的圆片,每个圆片中间制备 2 个间距为 3mm 的小孔,以便体内缝线固定试样,阴性对照为同等规格的牙胶(南京齿科材料厂生产),每种试件 20 片,表面均经过布轮抛光处理后使用 60Co 照射 12h 灭菌消毒备用。选择 8 周健康雌性金黄仓鼠 10 只(由第四军医大学实验动物中心提供),口腔双侧颊囊和黏膜无明显病损。2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉地鼠后,口腔内外常规消毒。用医用无创伤缝线将试样穿颊黏膜缝合固定到颊囊黏膜上,每侧固定两个试件,实验材料和阴性对照各一个。术后每日 8:00-9:00 观察黏膜组织反应及试样在位情况,主要为试件周围黏膜组织有无充血、肿胀、糜烂、溃疡等。术后 14 d 时使用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后处死动物,切取与材料接触的颊囊部全层及边缘 2mm 组织,进行肉眼观察后使用 5% 福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋切片后,进行 HE 染色观察。根据标准 YY/T0279-1995 中的病理反应评分标准将组织反应分为无、轻、中和重度反应,进行组间比较分析。

1.4 细胞毒性试验(MTT 法)

参照 GB / 16886-5 医疗器材生物学评价技术要求(第五部分:细胞毒性实验)的要求^[7,8]。方法参照任芳^[8]、张文云^[9]等报道,将第四军医大学组织工程中心惠赠的传代 48h 的 L-929 小鼠成纤维细胞,用培养液制备成浓度为 1000 细胞/ml 的细胞悬液,加入 96 孔塑料培养板(每孔 100μl),培养 24h 以使细胞贴壁。24h 后舍弃原培养液,用新鲜培养液为阴性对照组。阳性对照为 0.64% 苯酚。将 10mm × 10mm × 1mm 的试件经无水乙醇超声洗涤 15min,吹干备用,并经 60Co 照射 24h,灭菌后放入无菌试管,加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 °C 培养箱中培养 72h,制备出材料浸提液。试样浸提液量与试样面积的比率为 2.5ml/cm²。试验组分别用 25%、50%、100% 浓度的 DMEM 进行配比,分别与培养板中原培养液等量交换后放入培养箱中继续培养。按 4 个时间点(1、3、5、7 天)共种 4 块板,放入培养箱(37°C、饱和湿度、5% CO₂)中继续培养,每个实验组 6 孔。于培养后 1、3、5、7 天各取 1 块培养板,在倒置相差显微镜下观察活细胞形态并照相,每孔加入 20μl MTT 溶液,继续培养 4h,再置于倒置相差显微镜下观察结晶物密度并照相。吸除孔内液体,每孔加入 150μl 二甲基亚砷(DMSO),室温下振荡器振荡 10min,使结晶物充分溶解,然后在酶联免疫检测

仪(型,南京华东电子仪器厂)上以 490nm 波长测定各孔光吸收值(OD 值)。通过下式计算细胞相对增殖率^[10](relative growth rate, RGR):RGR= 实验组吸光值 / 阴性对照组吸光值 × 100%。按将各浓度组 RGR 转化为 0-5 级材料毒性评级。统计分析采用 t 检验,进行均数间两两比较^[9]。

2 结果

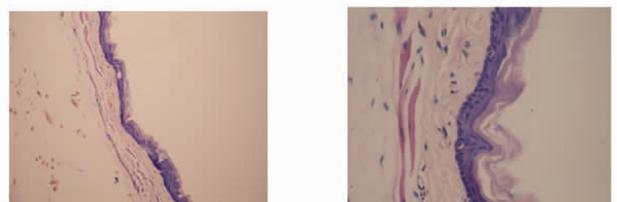
2.1 短期急性全身毒性试验(经口途径)

实验组和对照组共 20 只 SD 大鼠在实验过程中无死亡现象,在观察期内,所有动物无明显异常表现,日常行为活跃,反应迅速,毛色正常,无腹泻现象,进食量无明显变化(第 1 周时实验组食物利用率为 18.7%,对照组食物利用率为 19.0%;第 2 周试验组食物利用率为 19.1%,对照组食物利用率为 18.9%,各时间点使用组间 t 检验比较证实两组动物相比无统计学差异(P>0.05)),体重相对增长率无明显差异(第一周实验组体重相对增长率平均值为 33.8%,对照组体重相对增长率平均值为 34.1%;第二周试验组体重相对增长率平均值为 34.0%,对照组体重相对增长率平均值为 34.3%,各时间点使用组间 t 检验比较证实两组动物相比无统计学差异(P>0.05))。

与正常对照组相比,肉眼观察可见,实验组大鼠的心、肝脏、脾脏、肺脏等各重要器官未出现充血、出血、水肿及其他异常变化。

2.2 口腔黏膜刺激试验

术后 14 天口内检查发现,各组大鼠黏膜上的材料试样均固定良好。肉眼观察:各组大鼠黏膜上固定的试样周围组织无明显的组织充血、糜烂、肿胀等情况,拆线后实验组颊囊黏膜上无红斑,根据 YY/T0279-1995 标准反应评分为正常。组织切片镜下观察:实验组黏膜上皮完整,无钉突伸向固有层,颊囊上皮细胞形态正常,无过度角化及异常增生现象,黏膜下结缔组织无明显充血、水肿等异常变化,仅有少量炎症细胞浸润。根据 YY/T0279-1995 标准对各切片的上皮、白细胞、血管、水肿情况进行评分(图 1),实验组的总评分均 ≤ 4,肉眼和镜下结果可以证实,实验材料对口腔黏膜无刺激作用。



(镜视野 × 10)

(Microscopic view x10)

(镜视野 × 40)

(Microscopic view x40)

图 1 实验组大鼠黏膜的组织学观察

Fig.1 Histological observation of mucosa in experimental groups

2.3 细胞毒性试验

不同浓度的实验组和空白对照组的吸光值随着细胞培养时间的延长而增加,阳性对照组无明显变化;不同浓度实验组间的吸光值相比无统计学差异(P>0.05),实验组与空白对照组相比无统计学差异(P>0.05)。根据(表 1)所列数值计算不同浓

度实验组细胞的 RGR 及毒性级别,结果显示 25%、50%、100% 浓度实验组的 RGR 值均大于 97%,表明实验材料的毒性分级

为 0-1 级,阳性对照组分级为 4-5 级,按照细胞毒性评级标准,可以认为该材料无细胞毒性。

表 1 不同浓度实验组与对照组的吸光度值($\bar{X} \pm S$)

分组	材料浸提液浓度	1d	3d	5d	7d
实验组	100%	0.60± 0.03	0.73± 0.02	0.86± 0.03	1.04± 0.03
	50%	0.61± 0.02	0.75± 0.02	0.85± 0.04	1.05± 0.02
	25%	0.60± 0.04	0.74± 0.03	0.87± 0.06	1.06± 0.07
空白组		0.61± 0.03	0.75± 0.04	0.87± 0.03	1.06± 0.05
阳性组		0.09± 0.03	0.08± 0.01	0.08± 0.03	0.09± 0.02

Table 1 Absorbency value of the experimental group and control group ($\bar{X} \pm S$)

Grouping	Material leaching carry liquid concentration	1d	3d	5d	7d
Resin material	100%	0.59± 0.02	0.70± 0.03	0.85± 0.05	1.00± 0.02
	50%	0.62± 0.04	0.72± 0.05	0.88± 0.06	1.03± 0.05
	25%	0.63± 0.04	0.75± 0.04	0.89± 0.03	1.09± 0.03
Negative control		0.60± 0.03	0.72± 0.06	0.86± 0.05	1.01± 0.07
Positive control		0.03± 0.02	0.03± 0.01	0.02± 0.01	0.02± 0.01

3 讨论

理想的口腔用树脂类粘接材料,不仅要有粘接力强、物理机械性能良好,操作方便等优点还应该具有良好的生物学性能,对人体无毒性和刺激性。目前关于口腔应用材料的生物安全性评价的方法较多,国际标准化组织公布的器械生物评价试验指南(iso-1997)中基本评价的生物学试验包括细胞毒性、致敏、刺激或皮内反应、全身急性毒性、亚慢性亚急性毒性、遗传毒性、植入、血液相容性等^[10-12]。本实验选择了较为常见的 3 种方法:短期急性全身毒性试验、口腔黏膜刺激实验和细胞毒性试验这 3 种较为常见的生物学方法,这些方法操作简单,结果也准确可靠,希望通过本实验对新型瓷嵌体粘接材料的生物安全性方面进行初步评价。

短期急性全身毒性实验是根据 YY/T 0244-1996^[2]规定,目的在于评价药物和生物材料短期口服后的毒性效果,以往的测定方法是应用 ADA 等标准进行经口半数致死试验(LD50 法),此种方法需应用大鼠 5-6 组(10 只/组),以半数动物死亡组的药物量为半数致死剂量,这种方法对于药物的毒性是必须的,但不适用于口腔生物材料安全性检测,因此在 YY/T0244-1996^[2]规定中进行了改进,本研究参照任芳^[8]、刘丽^[13]等报道的方法,采用胃内针直接给药,既保证了给药剂量又可准确有效评价材料经短期口服后的毒性。实验过程中,各组大鼠无明显异常表现,日常行为活跃,反应迅速,毛色正常,无腹泻现象,进食量无明显变化,体重相对增长率无明显差异。与正常对照组相比,肉眼观察可见,实验组大鼠的心、肝脏、脾脏、肺脏等各重要器官未出现充血、出血、水肿及其他异常变化。这些结果均证实新型瓷嵌体粘接材料无短期急性全身毒性反应。

试制新型瓷嵌体粘接材料在口腔内操作不可避免地与口

腔粘膜接触,口腔黏膜刺激实验不仅是模拟临床使用的动物试验,也是一种适用于评价新型口腔材料对局部接触黏膜是否产生的刺激作用的研究方法,已经在 1995 年被 ISO 列为口腔修复材料必须进行的临床前安全性检测试验^[9]。本实验研究结果显示,术后 14 天口内肉眼观察发现,各组大鼠黏膜上的材料试样均固定良好,各组大鼠黏膜上固定的试样周围组织无明显的组织充血、糜烂、肿胀等情况,拆线后实验组颊囊黏膜上无红斑,根据 YY/T0279-1995 标准反应评分为正常。组织切片镜下,实验组黏膜与对照组无明显差异,上皮完整,上皮细胞形态正常,黏膜下结缔组织无明显充血、水肿等异常变化,肉眼和镜下结果可以证实,实验材料对口腔黏膜无刺激作用。

树脂粘接材料的组成及其固化方式对细胞毒性均有不同程度的影响,固化过程中析出的少量单体会对细胞造成一定的毒害。而细胞毒性实验是一种目前较为灵敏简便快捷的检测材料析出或扩散成分毒性的方法^[14],包括 MTT 法和琼脂法两种,其中 MTT 法是 1983 年发现的一种新的检测方法,具有过程简便、自动化程度高、结果客观准确的特点,已经被 GB / 16886-1 收录标准^[15-17]。本实验细胞毒性实验中设计了 3 种浸提液浓度,能够较为全面评价材料毒性。实验结果显示,25%、50%、100% 浓度实验组组间差别不明显,无统计学差异($P>0.05$);各实验组的 RGR 值均大于 97%,表明实验材料的毒性分级为 0-1 级,阳性对照组分级为 4-5 级,按照细胞毒性评级标准,可以认为该材料无细胞毒性。

上述 3 种实验研究结果显示,此种新型瓷嵌体修复用树脂粘接材料无急性全身毒性反应、无粘膜刺激反应、无细胞毒性反应,因此,可以认为此种材料能够作为一种新型的树脂粘接材料应用于口腔,是一种具有良好生物安全性的高分子粘接材料,本研究结果可为其临床应用提供实验依据,其长期应用的

生物学情况还需进一步实验研究。

参考文献(References)

- [1] YY/T0268-2001. 中华人民共和国国家标准.牙科学:用于口腔的医疗器械生物相容性临床前评价, 2001
YY/T0268-2001. National standards of The People's Republic of China. Dentistry: used for Oral medical apparatus and instruments biocompatibility before clinical evaluation, 2001
- [2] YY/T0244-1996. 中华人民共和国国家标准.《口腔材料生物试验方法:短期全身毒性试验:经口途径》, 1996
YY/T0244-1996. National standards of The People's Republic of China. <Biological Test method for Oral materials :Short-term systemic toxicity tests via mouth>, 1996
- [3] 魏煦,李彦,吴建青等.国产金属烤瓷材料生物安全性的初步评价[J].口腔材料器械杂志, 2009,18(04): 179-181
Wei Xu, Li Yan, Wu Jianqin, et al. Initial evaluation of biocompatibility of domestic dental porcelain fused to metal [J]. Chinese Journal of Dental Materials and Devices, 2009, 18(04): 179-181
- [4] 贾艳,高勃.激光立体成形镍铬烤瓷合金的生物安全性评价[J].第三军医大学学报, 2009,31(08):668-671
Jia Yan, Gao Bo. Biological safety of Ni-Cr alloy fabricated by laser solid forming technology [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2009,31(08):668-671
- [5] YY/T 0279-1995. 中华人民共和国医药行业标准.《口腔材料生物试验方法 :口腔粘膜刺激试验》, 1995
YY/T 0279-1995. National standards of The People's Republic of China for Pharmaceutical industry. <Oral material biological experiment method: Oral mucosa stimulation test >, 1995
- [6] Aoki H. Science and Medical Applications of Hydroxyapatite [M]. Tokyo: Takayama Press System Center Co. Inc, 1991:165-177
- [7] GB / 16886-5. 医疗器械生物学评价技术要求.《第五部分 : 细胞毒性实验》,2003
GB / 16886-5. The technical requirements for the evaluation of medical equipment biology. < Part V: Cell toxicity experiment >, 2003
- [8] 任芳.试制纤维桩粘 / 核成型树脂材料性能的初步研究[D].第四军医大学硕士论文 2008
Ren Fang. The Preliminary Study of Experimental Dual-cured Resin Cement for Luting Fiber Post and Core Shaping [D]. Master thesis of the fourth military medical university, 2008
- [9] 张文云,沈毅,李南等.牙科纤维 / 树脂复合材料的生物安全性研究[J].解放军医学杂志 2004,29(4):345-347
Zhang Wenyun, Shen Yi, Li Nan, et al. Evaluation of biocompatibility of fiber-reinforced dental composites [J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2004, 29(4): 345- 347
- [10] 孙皎.生物材料和医疗器械的生物学评价[J].中国医疗器械杂志, 2003, 27(1): 1-4
Sun Jiao. Biological Evaluation of Biomaterials and Medical Devices [J]. Chinese Journal of Medical Instrumentation, 2003, 27(1): 1-4
- [11] 奚廷斐.医疗器械生物学评价[J].中国医疗器械信息,1995,5(3):4-9
Xi Tingfei. Biological Evaluation of Medical Devices[J]. China Medical Devices Information, 1995, 5(3):4-9
- [12] 刘玉红,何惠明,郑亚萍等.自制光固化型可塑性纤维桩材料生物安全性的初步评价[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2008,18(6):316-319
Liu Yu-hong; HE Hui-ming; ZHENG Ya-ping, et al. Primary evaluation of biological safety of light-curable plastic fiber reinforced composite for dental post [J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry, 2008,18(6):316-319
- [13] 刘丽,高燕,张烈焚.碳纤维增强型树脂基复合材料的生物安全性评价[J].科技通报,2005,21(6):693-696
Liu Li, Gao Yan, Zhang Lie-fen. Evaluation of Biological Safety of Carbon-Fibre Reinforced Resin Compound [J]. Bulletin of Science and Technology, 2005, 21(6):693-696
- [14] 张彩霞,孙皎.紫外分光光度仪测定不同含铜量银汞合金细胞毒性的新方法[J].中华口腔医学杂志,1990,25(4):216-219
Zhang Caixia, Sun Jiao. New methods for the cytotoxicity different contained copper silver amalgam of measured by ultraviolet spectrophotometry instrument [J]. Chinese Journal of Stomatology, 1990,25(4):216-219
- [15] GB/16886-1. 生物材料和医疗器材生物学评价技术要求,1997
GB/16886-1. Biology evaluation technical requirements for biological materials and medical equipment, 1997
- [16] 范立红.复合树脂水门汀粘接系统在修复体粘接中的应用[J].口腔医学,2010,30(02) :117-120
Fan Lihong. The restoration adhesive application of the Cement composite resin adhesive system[J]. Stomatology, 2010, 30(02): 117-120
- [17] 张飏,李勇,刘明文.K₂O-Al₂O₃-SiO₂系统牙科玻璃陶瓷与牙本质粘结强度的实验研究[J].临床口腔医学杂志,2009,25(7):403-405
Zhang Biao, LI Yong, LIU Mingwen, et al. Study on bond strength of K₂O-Al₂O₃-SiO₂ system dental glass ceramics cemented with Variolink- luting system to dentin [J]. Journal of Clinical Stomatology, 2009, 25(7): 403-405