

可储存介孔氧化锆-磷酸钙根管充填糊剂的实验研究

许超, 迟小娟, 孙婧婧, 宋玉兴, 冯祖德

摘要:目的 制备可储存介孔氧化锆-磷酸钙根管充填糊剂(简称糊剂), 并对其显影效果、理化性能、可储存性能及生物相容性进行评价。方法 制备具有有序六方孔结构的钛稳定介孔氧化锆, 并将其(质量分数 5%、10%、15%、20%)与自固化磷酸钙骨水泥粉末混合制得介孔氧化锆-磷酸钙根管充填糊剂。通过 X 射线拍摄评价糊剂的显影效果; 通过测试收缩率、薄膜厚度、流动性和溶解性评价糊剂的理化性能; 通过测试不同储存时间糊剂的流动性能评价其可储存性; 通过细胞毒性实验、口腔致敏动物实验、皮下组织埋植动物实验对糊剂进行生物安全性评价。结果 ①含有质量分数 15% 介孔氧化锆-磷酸钙根管充填糊剂显影效果满足临床需要; ②所制糊剂的各项理化性能均符合 ISO 6876 中关于根管充填糊剂理化性能的评价标准; ③所制糊剂可在 4℃、50% 相对湿度环境下长期密封保存; ④所制糊剂材料对 L-929 细胞无毒性, 无口腔黏膜刺激反应, 不会对皮下组织产生毒害作用。结论 可储存介孔氧化锆-磷酸钙根管充填糊剂具有良好的显影性能、理化性能、可储存性能及生物安全性, 对根管充填的临床应用具有积极意义。

关键词:介孔氧化锆; 磷酸钙; 根管充填糊剂; 显影性能; 可储存性能; 生物相容性

中图分类号: R78

文献标识码: A

文章编号: 1009-7090(2012)06-0527-03

Experimental research of storable mesoporous zirconia-doped calcium phosphate cement for root canal sealer XU

Chao, CHI Xiao-juan, SUN Jing-jing, SONG Yu-xing, FENG Zu-de (College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Corresponding author: FENG Zu-de. E-mail: zdfeng@xmu.edu.cn

Abstract: Objective To prepare a storable mesoporous zirconia-doped calcium phosphate cement (CPC) for root canal sealer, and evaluate its performances of radiopacity, physicochemical properties, storability and biocompatibility. **Methods** Titanium-stabilized mesoporous zirconia(5%, 10%, 15%, 20%) with hexagonally ordered pore array was prepared and mixed with bone CPC powders, thus the mesoporous zirconia-doped CPC for root canal sealer was completely prepared. The radiopacity of the paste were evaluated using X-ray film. The physicochemical properties of the paste were evaluated by contractibility, film thickness, fluidity and dissolubility. The storability of the paste was evaluated by flow property of samples with different storage time. The biocompatibilities were evaluated by MTT, animal oral sensitizations and animal subcutaneous tissue implantations experiments. **Results** ①The paste included 15% mesoporous zirconia showed improved development effects. ②The paste could be stored in the condition of 4℃, 50% relative humidity for long term, the phase composition and particle morphology showed stability. ③The various physical and chemical properties of the paste were in accordance with the evaluation criterion of ISO 6876. ④The paste had no cytotoxicity to the L-929 cells as well as oral mucosa and subcutaneous tissue. **Conclusion** The storable mesoporous zirconia-doped CPC for root canal sealer showed well radiopacity, physicochemical properties, storability and biosafety which are promising for the clinical applications of root canal filling.

Key words: mesoporous zirconia; calcium phosphate; root canal sealer; radiopacity; storability; biocompatibility

磷酸钙类根管充填糊剂是目前被认为最有发展前途的一种生物活性骨水泥, 但其临床应用存在以下问题: ①糊剂需即用即制, 短时间内难以充分均匀混合, 增加了临床操作时间; ②其使用的显影剂碘仿具

有一定的细胞毒性。笔者制备一种可在一定条件下长期保存、显影效果良好的介孔氧化锆-磷酸钙根管充填糊剂, 并根据 ISO 6876^[1]和中华人民共和国医药行业 YY/T 0268-2008^[2]对其理化性能和生物相容性进行评价, 从而为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

主要材料:自固化磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC; 笔者所在实验室自行合成); C₁₆TMABr、Zr(SO₄)₂·4H₂O、Ti(SO₄)₂、(NH₄)₂SO₄等(国药集团化学

作者单位: 厦门大学材料学院, 福建 厦门 361005

收稿日期: 2012-05-12; 修回日期: 2012-07-30

作者简介: 许超(1984-), 男, 福建漳州市人, 博士研究生, 主要从事生物材料及微化工过程研究。

基金项目: 福建省科技重大专项(2005HZ01-3); 福建省发改委项目。

通讯作者: 冯祖德(1951-), 男, 上海市人, 博士, 教授, 博导, 主要从事生物材料与仿生材料、功能薄膜材料方面的研究。电话: 0592-2181538。E-mail: zdfeng@xmu.edu.cn。

版权©保护, 不得翻录。

试剂有限公司);其他试剂均为市售分析纯试剂。

主要仪器:高温节能立式管式炉(KSS-1700,洛阳市永泰试验电炉厂)、光学显微镜(Olympus,日本)。

1.2 方法

1.2.1 介孔氧化锆-磷酸钙根管充填糊剂的制备

配制摩尔比 $C_{16}TMABr : Zr(SO_4)_2 \cdot 4H_2O : Ti(SO_4)_2 : (NH_4)_2SO_4 = 0.3 : 1 : 0.1 : 120$ 的水溶液,经搅拌、水热、过滤、干燥后,在浓度 0.25 mol/L 的 H_3PO_4 溶液中处理 2.5 h ,在 $500 \text{ }^\circ\text{C}$ 下煅烧 6 h 得到钛稳定介孔氧化锆材料^[3]。将介孔氧化锆粉末按质量分数 5% 、 10% 、 15% 的比例与实验室自制 CPC^[4] 混合,得到介孔氧化锆-磷酸钙根管充填糊剂(简称糊剂)。

1.2.2 显影效果测试

将糊剂分别充填于 3 组离体牙齿中,拍摄 X 射线片(Trophy, 70 kV , 30 mA),评价糊剂的显影效果。

1.2.3 理化性能测试

对糊剂进行收缩率、薄膜厚度、流动性及溶解性测试。ISO 6876^[1]中规定的相关评价标准为:①收缩率,体积变化率应处于 $0.1\% \sim 1.0\%$;②成膜厚度 $< 50 \mu\text{m}$;③流动性,薄膜所形成的“盘”直径 $\geq 20 \text{ mm}$;④溶解度 $< 3\%$ 。

1.2.4 可储存性能测试

分别取在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、相对湿度(relative humidity, RH) 50% 环境下密封保存 0 、 90 、 180 、 270 d 的少量糊剂样品,测试其流动性能并进行对比分析。

1.2.5 体外细胞毒性实验

收集对数期细胞,分于 96 孔培养板,每孔 $100 \mu\text{L}$, $3000 \sim 10000$ 个/孔。于体积分数 $5\% \text{ CO}_2$ 、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育,至细胞单层铺满孔底。用 0.25% 胰蛋白酶消化汇合的单层细胞,调节细胞悬浮液浓度。将细胞悬浮液分于 96 孔培养板中并分别添加 $100 \mu\text{L}$ 糊剂样品浸提液、空白组溶液、阴性对照组溶液、阳性对照组溶液,继续培养 24 h 及 72 h 。根据四甲基偶氮唑盐(methyl thiazoly tetrazolium salt, MTT) 各实验组所得吸光度(optical density, OD) 计算出成纤维细胞(L-929) 相对增殖度(relative growth rate, RGR) 均值并进行分级评价。

1.2.6 口腔致敏动物实验

选取体质量 $> 100 \text{ g}$ 的雄性金黄地鼠 10 只[上海松联实验动物场,动物许可证号 SYXK(沪)2007-0011],随机分成 2 组,每组 5 只。用直径约为 10 mm 的棉球浸湿糊剂样品并接触动物的一侧颊囊,另一侧不接触样品作为对照。每隔 10 min 接触 1 次,共接触 10 次。末次接触 24 h 后取颊囊具有代表性部位的组

织样品进行切片,苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色,利用光学显微镜观察实验组颊囊黏膜组织反应,与空白组比较并进行评定记录。

1.2.7 皮下组织埋植动物实验

选取体质量 $> 3 \text{ kg}$ 新西兰兔 12 只[上海松联实验动物场,动物许可证号 SYXK(沪)2007-2011],随机分成 4 组,每组 3 只。以脊柱为准,无菌条件下两侧皮肤作 6 个切口,大小以能将糊剂样品植入皮囊为准。每个囊内植入一个人体医用硅胶管,埋植体间相距至少 10 mm 以上,每个埋植体两端开口处与皮下软组织相接触,每组每期均有 6 个埋植体。所有实验动物随机分 7 、 28 、 56 、 84 d 观察期,切取埋植体及周围组织进行固定、脱水、石蜡包埋,沿埋植体长轴切片,HE 染色,用光学显微镜观察植入区组织反应并行生物学反应评价。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件,利用 t 检验对不同储存时间的糊剂薄膜“盘”直径与 0 d 糊剂的薄膜“盘”直径进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 显影效果分析

图 1 为糊剂填充入离体牙齿的 X 射线显影照片。由图可见,含质量分数 5% 氧化锆的糊剂显影效果较差,充填糊剂的轮廓不明显;当显影剂含质量分数 10% 时,显影效果有较大改善;氧化锆质量分数为 15% 的糊剂显影性最好。

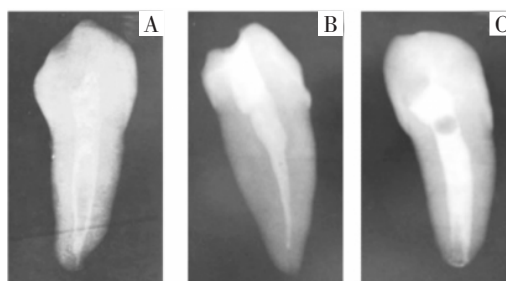


图 1 不同氧化锆含量根充糊剂的 X 射线显影照片(A. 质量分数 5% ; B. 质量分数 10% ; C. 质量分数 15%)

Figure 1 The X-ray images of root canal sealer with various ZrO_2 mass fractions(A. 5% ; B. 10% ; C. 15%)

2.2 理化性能分析

表 1 为糊剂的各项理化性能测试结果,其各项理化性能均符合 ISO 6876^[1]中关于根管充填糊剂理化性能的评价标准。

2.3 可储存性分析

表 2 为取不同储存时间的糊剂进行流动性能测试的结果。各组实验材料成膜后所形成“盘”的最大直

表 1 糊剂各项理化性能测试结果

Table 1 Physical and chemical properties of root canal sealer

收缩率/%	薄膜厚度/mm	流动性能 ("盘"直径)/mm	溶解率/%
0.182 ± 0.036	0.052 1 ± 0.002 0	25.800 ± 0.480	0.170 ± 0.002

径、最小直径及其平均值均符合 ISO 6876^[1]中关于根管充填糊剂流动性能的评价标准。

表 2 不同储存时间糊剂的流动性能比较

Table 2 Fluidity comparison of root canal sealer with different storage time

储存时间	"盘"最大直径/mm	"盘"最小直径/mm	平均值/mm	P
0 d	27.90 ± 0.32	27.20 ± 0.42	27.55 ± 0.28	> 0.05 ^b
90 d	27.30 ± 0.48	26.40 ± 0.52	26.85 ± 0.47	
180 d	26.80 ± 0.42	26.20 ± 0.42	26.50 ± 0.33	
270 d	26.30 ± 0.48	25.50 ± 0.53	26.00 ± 0.47	

b: P 为不同储存时间的糊剂薄膜 "盘" 直径与 0 d 糊剂的薄膜 "盘" 直径进行显著性差异分析值。

2.4 细胞毒性分析

实验组 A、B 及阴性对照组在培养 24、72 h 后的细胞 RGR 均略低于空白组, 而阳性对照组的细胞 RGR 远低于空白组。根据 ISO 10993-5:2009^[5]中的相关标准, 实验组细胞毒性为 1 级, 表明实验材料对 L-929 细胞无毒性。

2.5 口腔黏膜刺激性组织分析

实验组与空白组的颊黏膜组织情况近似, 黏膜上皮完整, 细胞层次清楚、排列均匀, 无过度角化及上皮细胞增生等异常变化, 结缔组织中无炎性细胞浸润, 无血管充血、水肿等 (封三插图图 2)。根据 GB/T 16886.10-2005^[6]中的相关标准, 黏膜组织病理反应评分为 0 分, 病理反应等级为无等级。

2.6 皮下埋植组织分析

术后 7 d 实验材料管端周围组织无变性及坏死, 可见大量炎性细胞浸润; 术后 28 d 植入物管端周围炎性细胞减少, 开始形成疏松的纤维膜, 与周围组织分界不清; 术后 56 d 炎性细胞明显减少, 管端周围组织与皮下肌肉相结合; 术后 84 d 仅见少量炎性细胞, 表明组织反应已趋于正常 (封三插图图 3)。根据 GB/T 16886.6-1997^[7]中相关标准, 实验材料不会对皮下组织产生毒害作用。

3 讨论

氧化锆作为一种生物惰性材料, 不与生物组织和口腔分泌物发生反应, 在口腔内能稳定存在, 不释放有害杂质、不降解, 具有良好的生物相容性; 此外, 其密度较高, 能很好地显影根管, 弥补了碘仿作为显影剂的不足。笔者使用介孔氧化锆作为根管充填糊剂的

显影剂, 在其添加质量分数为 10% 时已显示良好的显影效果。但考虑到人体口腔环境中可能有其他减弱显影效果的因素存在, 故添加质量分数 15% 介孔氧化锆作为显影剂更有利于临床观察。

可储存性能对糊剂的临床应用具有重要意义。实验表明, 糊剂可在 4℃、50% RH 环境下长期密封保存, 其物相组成稳定, 颗粒分散性强, 具有良好的可储存性。良好的流动性使糊剂在注射时可顺利地到达根管系统各分支; 较小的成膜厚度使其具有良好的黏结性, 增强根管系统封闭性; 适宜的收缩率使糊剂与根管壁间黏结牢固, 避免渗漏发生, 并防止细菌进入, 减少根尖周病再发生; 低溶解度则使糊剂颗粒在长期储存时质量损失较小。

作为永久性植入的口腔根管充填材料, 不仅要求其机体组织无毒害作用, 而且还应与根尖周局部组织有良好的组织相容性。细胞毒性实验、口腔致敏动物实验及皮下组织埋植动物实验的结果表明, 实验材料对 L-929 细胞无毒性, 黏膜组织病理反应为无等级, 并且可与组织体有机结合, 不会对皮下组织产生毒害作用, 具有良好的生物相容性。

4 结论

笔者对介孔氧化锆-磷酸钙根管充填糊剂的研究克服了临床医用糊剂须现场调配的不足, 具有预先制备、在注射器中长期稳定储存、在生理环境中快速固化的特点, 对根管充填的临床应用具有积极的意义; 对介孔氧化锆-磷酸钙根管充填糊剂的生物安全性评价为其临床应用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] ISO 6876: 2001, Dental root canal sealing materials[S].
- [2] YY/T 0268-2008, Dentistics: oral biological evaluation of medical devices—Part : evaluation and testing[S]. [YY/T 0268-2008 牙科学 口腔医疗器械生物学评价 第 1 单元: 评价与试验[S].]
- [3] FENG Zu-de, SUN Jing-jing. A root canal sterilization agent and its preparation menth: China, 200810070918.8[P]. 2008-09-10.[冯祖德, 孙婧婧. 一种根管消炎显影剂及其制备方法: 中国, 200810070918.8[P]. 2008-09-10.]
- [4] Song YX, Feng ZD, Wang T. *In situ* study on the curing process of calcium phosphate bone cement[J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2007; 18(6): 1185-1193.
- [5] ISO 10993-5:2009 I, Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity[S].
- [6] GB/T 16886.10-2005, Biological evaluation of medical devices—Part 10: Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity [S].[GB/T 16886.10-2005, 医疗器械生物学评价 第 10 部分: 刺激与迟发型超敏反应试验[S].]
- [7] GB/T 16886.6-1997, Biological evaluation of medical devices—Part 6: Tests for local effects after implantation [S]. [GB/T 16886.6-1997, 医疗器械生物学评价 第 6 部分: 植入后局部反应试验[S].]

可储存介孔氧化锆-磷酸钙根管充填糊剂的实验研究(正文第 529 页插图)

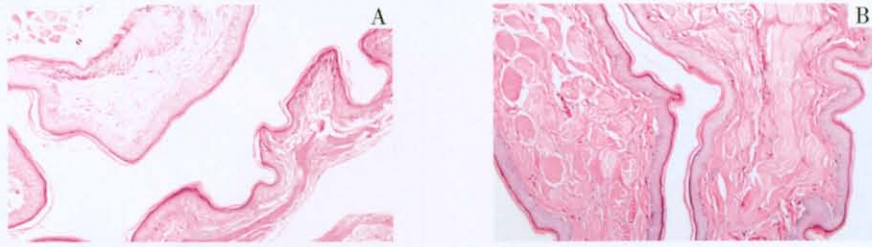


图2 金黄地鼠口腔黏膜组织学切片图(A.实验组;B.空白组;HE,×100)

Figure 2 Histological section image of golden hamsters oral mucosa(A. experimental group; B. blank group; HE, × 100)

T 细胞运载金纳米粒子活体成像的初步实验
(正文第 532 页插图)

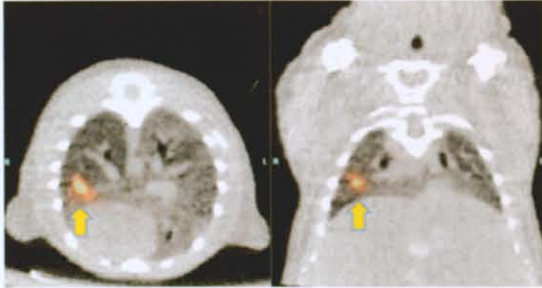


图3 含有 ¹¹¹In 标记的 AuNPs T 细胞直接注射入裸鼠 1 的肺内, micro-SPECT/CT 成像显示肺内高摄取。
Figure 3 micro-SPECT/CT images showed the area of high uptake in lung following direct injection of T cells containing ¹¹¹In-labeled AuNPs into right lung of nude mouse 1st.

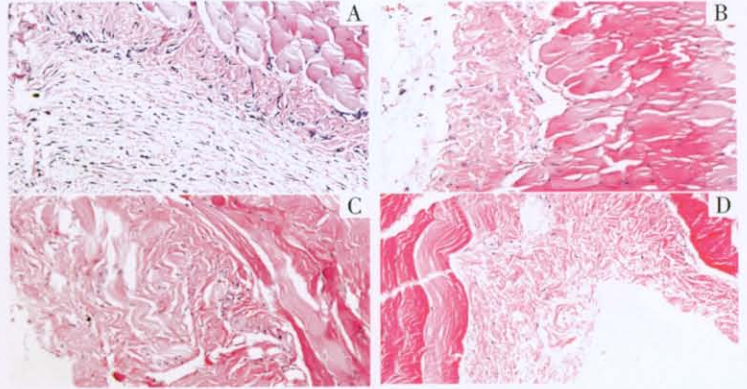


图3 新西兰兔皮下埋植组织学切片图 (A.7 d;B.28 d;C.56 d;D.84 d;HE,×200)
Figure 3 Histological section image of New Zealand rabbits subcutaneous implantations (A.7-day; B.28-day; C.56-day; D.84-day; HE, × 200)

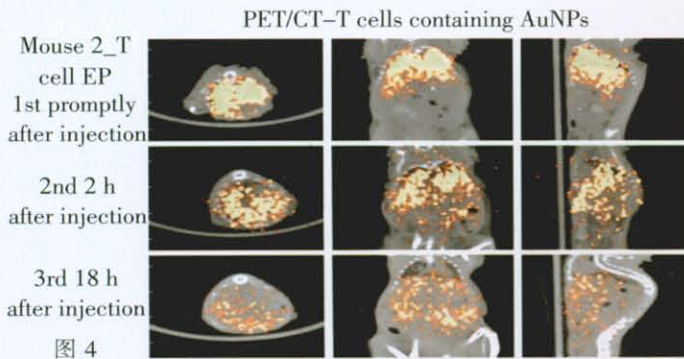


图4

图4 裸鼠 2, micro-PET/CT 动态成像含有 ⁶⁴Cu 标记的 AuNPs T 细胞, 示踪运载 AuNPs T 细胞的生物学分布。

Figure 4 Nude mouse 2nd, micro-PET/CT images showed dynamic bio-distribution of T cells carrying ⁶⁴Cu-labeled AuNPs.

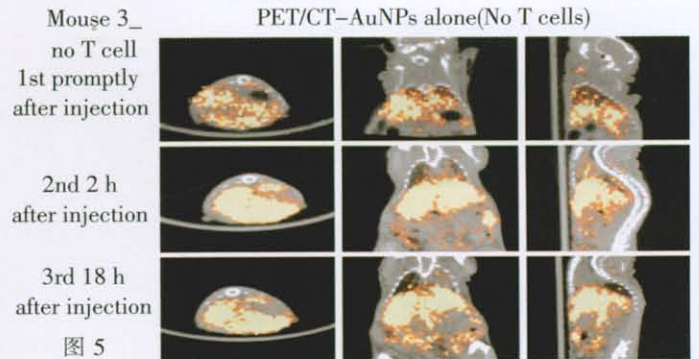


图5

图5 裸鼠 3, micro-PET/CT 动态成像 ⁶⁴Cu 标记的 AuNPs, 示踪 AuNPs 本身的生物学分布。

Figure 5 Nude mouse 3rd, micro-PET/CT images showed dynamic bio-distribution of ⁶⁴Cu-labeled AuNPs.

胃癌中细胞核因子-κB、环氧合酶-2 与血管内皮生长因子的表达及与血管生成的关系(正文第 597 页插图)

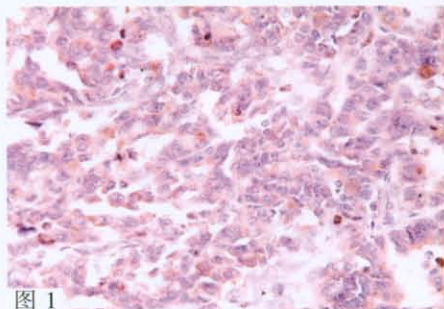


图1

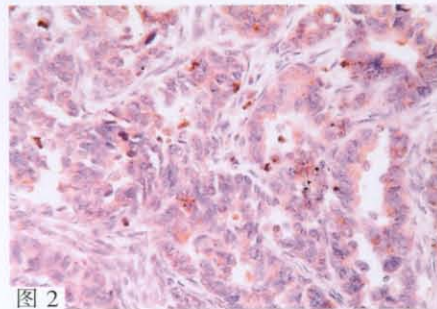


图2

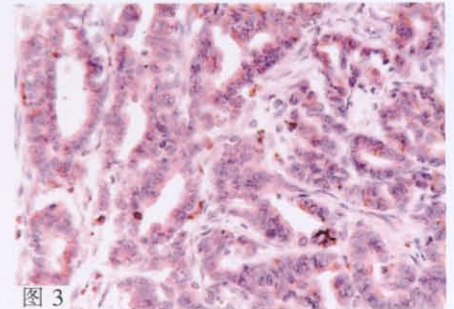


图3

图1 NF-κB 在胃癌组织中的表达, 胞质呈棕黄色(SP,×400)。图2 COX-2 在胃癌组织中的表达, 胞质呈棕黄色(SP,×400)。图3 VEGF 在胃癌组织中的表达, 胞质呈棕黄色(SP,×400)。

Figure 1 NF-κB expression in gastric carcinoma tissues, cytoplasmic showed brown(SP, × 400). Figure 2 COX-2 expression in gastric carcinoma tissues, cytoplasmic showed brown(SP, × 400). Figure 3 VEGF expression in gastric carcinoma tissues, cytoplasmic showed brown (SP, × 400)