

pH 值与三种不同根管冲洗液细胞毒性的相关性

严 军

(中国人民解放军驻香港部队医院, 广东 深圳 518048)

[摘要] **目的** 研究应用 MTT 测定法评估对 MTAD、17% EDTA 和 2.6% NaOCl 不同时间点的 pH 值对人牙周膜成纤维细胞的细胞毒性的影响. **方法** 将人类牙周膜成纤维细胞浸泡于冲洗液中, 1、6 和 12 h 后测定细胞活性, 培养基的 pH 值及使用酶标仪测定每种培养基的光吸收值. **结果** 2.6% NaOCl 的细胞毒性显著低于 17% EDTA 和 MTAD, 同时所有的冲洗液的细胞毒性先上升后下降, 且在 12 h 细胞毒性最低, pH 与细胞毒性均存在显著相关. **结论** 冲洗液细胞毒性与 pH 值的变化趋势一致, pH 值的变化可能会导致冲洗液细胞毒性的改变.

[关键词] pH; MTAD; EDTA; NaOCl; 细胞毒性

[中图分类号] R781.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 07 - 0122 - 04

The Correlation of pH Value with Cytotoxic Effects of Three Different Root Canal Irrigants

YAN Jun

(PLA HK Garrison Hospital, Shenzhen Guangdong 518048, China)

[Abstract] **Objectives** To assess the possible impact of pH on cytotoxic effects of MTAD, 17% EDTA, and 2.6% NaOCl on the human periodontal ligament fibroblast cells using MTT assay. **Methods** Human periodontal ligament fibroblast cells were exposed to the irrigants and their viability was assessed after 1, 6, and 12 h. The pH of the medium was measured in each interval. Light absorption values were measured for each culture medium using Elisa Reader device. **Results** 2.6% NaOCl had significantly less cytotoxicity than 17% EDTA and MTAD. Also irrigants cytotoxicity decreased at 1, 6, and 12 h, respectively. **Conclusion** It seems that variation of the pH results in variation in the cytotoxicity of solutions; i.e., it follows the pattern of the pH variation.

[Key words] pH; MTAD; EDTA; NaOCl; Cytotoxicity

理想的冲洗液应该具有广谱抗菌效应, 对生物膜中的厌氧菌和兼性厌氧菌具有高效抗菌性, 能溶解残留的坏死牙髓组织, 灭活内毒素且能去除玷污层^[1]. 因为冲洗液要直接接触根周组织, 所以要求其具有高度生物相容性^[2]. 根管冲洗液可能有毒, 且会诱导炎症反应^[3,4].

次氯酸钠的抗菌效果, 组织溶解能力及毒性与其浓度相关^[5]. 次氯酸钠的 pH 值决定了有效氯的浓度. pH 值超过 7.6, 主要存在形式是次氯酸盐, 而低于 7.6, 则是次氯酸. 两种形式都是极强的活性氧化物. 次氯酸的抗菌性比次氯酸盐强, 因此, 随着 pH 值的降低, 次氯酸盐的效果随之增强. 较

其他类似的非缓冲液, 它对重要组织的毒性较小. 较 pH 值和渗透性, 有效氯对次氯酸盐溶液的腐蚀性的影响较大^[6]. NaOCl 组织溶解力取决于浓度、时间及 pH. NaOCl 的浓度越高, 作用时间越长, pH 值越高将导致更强的组织溶解性^[7]. MTAD 报道有不同的 pH 值 (MTAD 是强力霉素、柠檬酸和作为清洁剂的聚山梨醇酯 -80 组成的混合物)^[8]. 有研究显示, MTAD 相对于普通冲洗液对牙周膜细胞有更小的细胞毒性^[9]. 同样有报道称 EDTA 的细胞毒性与其浓度相关^[10]. 浓度为 17% 或者 15% 的 EDTA 盐在体外是有毒性的, 然而浓度越低, 其毒性越低. 严格来说, 报道称 17% 和 15% 的 EDTA

和 2.25% 的 NaOCl 有明显的细胞毒性,但是在浓度为 0.1% 时,其细胞毒性较温和^[1]。

因此,溶液的性能受很多因素影响,例如浓度、体积、作用时间、温度、pH、机械搅动和组织表面范围等。本研究旨在运用 MTT 分析法评估 MTAD、17% EDTA 和 2.6% NaOCl 3 种根管冲洗液对人牙周膜成纤维细胞的细胞毒性的影响,并探讨不同时间点 pH 值与细胞毒性之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 方法

本研究的体外实验使用的人牙周膜成纤维细胞是收集 12~18 岁正畸患者因正畸需要而拔除的前磨牙,刮取牙根中 1/3 处的牙周膜,剪成 0.5 mm² 小块,均匀置于培养瓶底,各组织间隔 3 mm,置于 37 °C、5%CO₂、100%湿度的恒温孵育箱培养,隔天换液。待细胞爬满瓶底 75%~80% 时,加入 2% 胰酶 2 mL 消化,按 1:3 的比例传代。取第 4~6 代细胞用于实验。人牙周膜成纤维细胞培养在改良的 eagle 培养基 (Life Technologies Inc., Gaithersburg, Md) 中,其中添加了 1% 的非必需氨基酸和 10% 的炭焦处理过的胎牛血清 (Gemini Bio-Products, Calabasas, CA)。运用沙氏葡萄糖 (SAB) 琼脂糖培养基平板 (Oxoid Ltd., Basingstoke, England)。用以下 2 种方法检测细胞的生长情况:在培养基中加入微量的胰蛋白胍大豆肉汤 (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md),将培养基至于 Bactec 9120 机 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 中,荧光下观测细胞大体生长情况。使用 Beckman 1190-90 玻璃电极 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, California, USA),运用 Beckman Model G pH 计 (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, California, USA) 测定冲洗液的 pH 值。2.6% NaOCl (天津瑞福鑫化工有限公司,天津,中国),17% EDTA (MD cleanser, Meta Biomed co, Chong Ju City, Korea) 和 MTAD (BioPure MTAD, Dentsply, Tulsa, OK) 的初始 pH 值分别为 5.29, 6.71 和 1.62。

在细胞生长的过程中对细胞进行计数,从第 3 天开始,每天记录。在悬浮成纤维细胞中加入胰蛋白酶,取出部分溶液加入测试管中。4 λ 及 800~1 000 rpm 下离心 10 min。在 10 λ 下对沉淀物再次离心后,将最后溶液滴在硫酸钡混悬液处理过的载玻片上,使用 Nikon 显微镜 (model

E400; Nikon Inc., Melville, New York, USA) 进行细胞计数。当检测到培养基表面上每 ml 有 1 个细胞时,开始用 hank's 平衡盐溶液 (HBSS, Grand Island Biological Co., Grand Island, NY) 冲洗,并加入胰蛋白酶使其悬浮 (0.05% 溶液 / 0.5 mM EDTA)。最终溶液分装到 96 孔板中 (Nunc, Roskilde, Denmark)。总共孔板数为 117, 3 不同时间点 \times 3 个检测组 \times 每个 13 孔。将孔板放入 37 °C 和 5% CO₂ 环境中培养 24 h。在孵育 1、6 和 12 h 后,使用 MTT 比色,测定检测冲洗液的细胞毒性。本检测是检测细胞的活性,原理是活细胞中的线粒体脱氢酶可以将可溶解的四唑盐 MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐] 转化为蓝色甲瓚终产物。每 100 μ L 中加入 10 μ L MTT (Merck, Darmstadt, Germany),再次孵育 3 h。在含有 20% N-二甲基甲酰胺十二烷硫酸钠的停止混合液 (Visible Genetics, Inc., Toronto, Ontario, Canada) 中加入培养基 (每孔中加入 0.1 mL 50% 溶液),继续孵育 1 h。确定蓝色甲瓚的存在。最后用分光光度计 (Bio-Rad Benchmark Microplate Reader, Hercules, CA) 检测 570 nm 的光吸收 (light absorption, LA) 值,LA 值越高反映甲瓚存在越多,活细胞数量也越多。

用酶标仪 (Argus 400 micro plate reader, Packard, Meriden, USA) 检测 1、6、12 h 的成纤维细胞的活性。最后,在酶标仪一定的波长中每个培养皿都有一个相应的 LA 值。这个数值反应了活细胞产生该有色物质的水平。同时,测定 1、6 和 12 h 时培养基的 pH 值。

1.2 统计学处理

采用方差分析 (one-way ANOVA) 比较同一时间不同的冲洗液的 LA 值,采用重复测量方法 (General Linear Model) 比较同一冲洗液不同的时间的 LA 值,采用 Pearson 相关性检验 pH 和 LA 值之间的相关系数。数据应用 SPSS 进行分类处理。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

从 3 种根管冲洗液的 pH 值和 LA 值的变化趋势来看,两者的变化趋势一致,都先降低然后升高,3 种根管冲洗液在 12 h 的 LA 值最高,提示在此时间点细胞毒性最低,见图 1。

在所有研究周期中,NaOCl 较其他冲洗液细胞毒性明显较小,同时 6h 时的 MTAD 细胞毒性最大。从 1 h、6 h 到 12 h,所有冲洗液的细胞毒性

先升高再降低 (见表 1)。统计结果显示同一时间的不同冲洗液和同一冲洗液的不同时间之间的 LA 值均具有显著差异 ($P < 0.05$)。

从三种根管冲洗液的 pH 值与 LA 值的相关性来看, 两者在不同时间点的均有显著相关性 ($P < 0.05$), 见表 2。

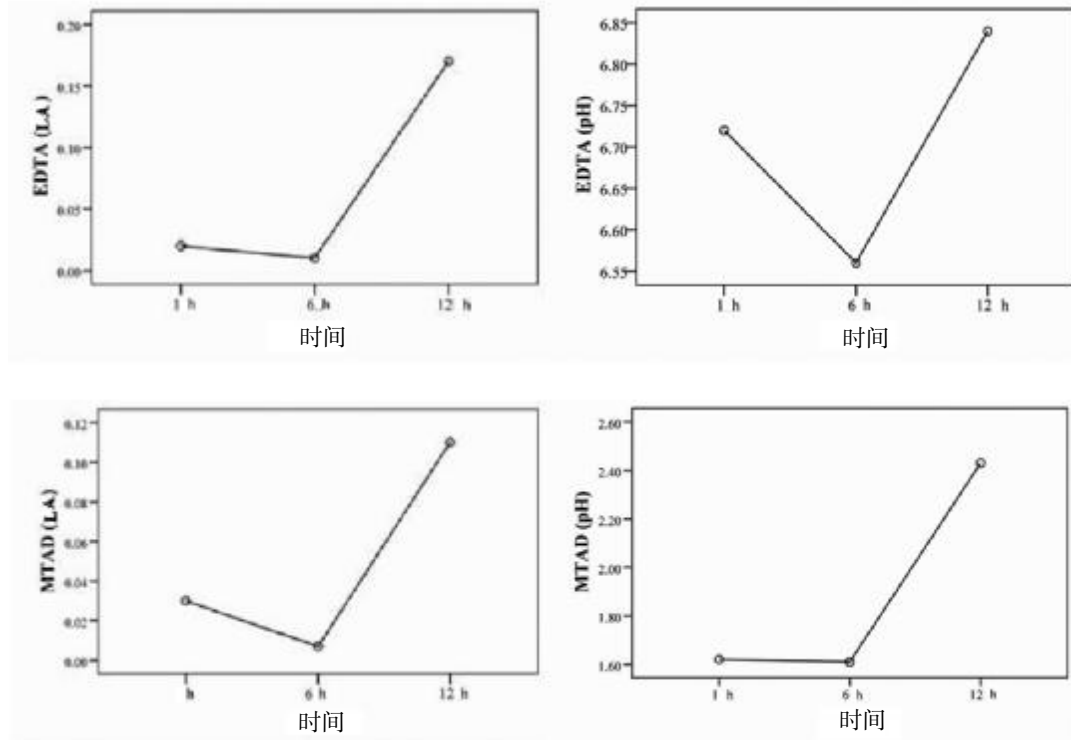


图 1 3 种根管冲洗液在不同时间点的 pH 值和 LA 值变化趋势

Fig. 1 The changing trends of the pH and LA values of three different root canal irrigants at different time points

表 1 不同周期不同冲洗液的 570 nm 的 LA 值和 pH 值的变化

Tab. 1 The changes of the pH and LA values of three different root canal irrigants at 570 nm in different cycle

项 目	1 h		6 h		12 h	
	LA	pH	LA	pH	LA	pH
EDTA	0.02	6.72	0.01	6.56	0.17	6.84
MTAD	0.03	1.62	0.007	1.61	0.11	2.43
NaOCl	0.05	5.29	0.03	5.16	0.27	6.51

表 2 3 种根管冲洗液在不同时间点的 pH 值与 LA 值之间的相关性

Fig. 2 The correlation of the pH and LA values of three different root canal irrigants at different time points

项 目	1 h		6 h		12 h	
	r	P	r	P	r	P
EDTA	0.246	0.011	0.237	0.013	0.335	0.003
MTAD	0.316	0.005	0.361	0.001	0.412	0.000
NaOCl	0.297	0.007	0.277	0.009	0.474	0.000

3 讨论

次氯酸钠的抗菌效果和细胞毒性都是基于其高的 pH 值 (羟基活性)。次氯酸钠的高 pH 值将影响胞膜的完整性, 在细胞代谢过程中不可逆的抑制酶的活性及物质合成过程, 并在脂质过氧化反应中破坏磷脂, 并在细胞代谢过程中影响氨基酸转化为氯胺反应。

以往的研究主要是比较不同浓度的不同的根管冲洗液的细胞毒性。Zhang 等^[12]使用 MTT 分析法发现对于 L929 细胞而言, 低于 2.63%NaOCl 细胞毒性较低, 随后就是 MTAD, REDTA, 氯己定, 5.25%NaOCl, Ca(OH)₂ 糊剂, 3% H₂O₂ 和丁香酚。笔者对 pH 值对根管冲洗液的影响进行研究, 有趣的是结果和 Zhang 等的发现是一致的, 2.6%NaOCl 细胞毒性最小。目前的研究显示, 在培养基中加入 NaOCl 后的 pH 值接近中性需要的时间较其他冲洗液更少, 这个可能是取决于 NaOCl 在水媒介中的扩散能力。根管冲洗液 (如次氯酸钠) pH 值越低, 效果越好, 对重要的宿主组织毒性越低, 抗菌能力越强等等^[7]。大量研究显示低浓度 NaOCl (2.6% 或者更低) 细胞毒性更低, 这与笔者的结果一致。

表面张力降低导致冲洗液在培养基中扩散更快^[13]。冲洗液的湿润性与它们的表面张力相关。湿润性增加将提高冲洗液的抗菌效果。在根管冲洗液中加入清洁剂将增加湿润性和抗菌效果。目前的研究显示 EDTA 的细胞毒性随着其 pH 值增加而增加。它不包含有表面活性剂, 如聚山梨醇酯 80, 该物质可导致较 MTAD 更小的细胞毒性。除了 6 h 时, MTAD 和 EDTA 的细胞毒性是类似的。MTAD 在 6 h 时显示最高的细胞毒性可能是因为它 pH 指呈现酸性且在成分中含有表面活性剂 (聚山梨醇酯 80) 导致其在培养基中 pH 值接近中性的时间延长。这可以帮助解释为什么 MTAD 较其他冲洗液有更高的细胞毒性。

笔者使用 MTT 分析法是基于其在评估牙体材料细胞毒性方面的敏感性。这种方法具有简单, 迅速, 可重复, 同时不需要放射性同位素等等优点。

目前的研究显示从 1 h 到 6 h, 基于培养基中细胞死亡的情况, 细胞毒性渐强。从 6 h 到 12 h, LA 值水平显著升高, 这就意味着细胞毒性降低。培养基中细胞的活性与几个因素相关, 如营养状况, 不同物质的细胞毒性, 在环境中冲洗液的扩散能力, 细胞对环境的适应能力等。在 12 h 时可观测到活细胞数量急剧增多, 这可能是因为细胞适应

了培养基环境 (细胞更新能力) 且 pH 值接近中性^[14], 这与 Mohammad 等的研究结果一致^[15]。

笔者仅评估了 pH 值对一些根管冲洗液细胞毒性的影响。接下来的研究需集中在除了 pH 值以外的其他因素。总之, 2.6%NaOCl 较其他根管冲洗液对牙周膜成纤维细胞的细胞毒性最小。pH 值的改变导致冲洗液的细胞毒性的改变, 也就说它随着 pH 值的变化而变化。此外, 为避免对宿主不良影响, 在牙髓治疗过程建议使用中性的高扩散能力的根管冲洗液。

[参考文献]

- [1] ZEHNDER M. Root canal irrigants [J]. *J Endod*, 2006, 32(5):389-398.
- [2] BOCCI V. Oxygen-ozone therapy: a critical evaluation [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002:47.
- [3] SPANGBERG L, ENGSTROM B AND LANGELAND K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1973, 36(6):856-871.
- [4] TANOMARU FILHO M, LEONARDO M R, SILVA L A, et al. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions [J]. *Int Endod J*, 2002, 35(9):735-739.
- [5] MOHAMMADI Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review [J]. *Int Dent J*, 2008, 58(6):329-341.
- [6] ZEHNDER M, KOSICKI D, LUDER H, et al. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2002, 94(6):756-762.
- [7] CHRISTENSEN C E, MCNEAL S F, ELEAZER P. Effect of lowering the pH of sodium hypochlorite on dissolving tissue in vitro [J]. *J Endod*, 2008, 34(4):449-452.
- [8] TAY F R, PASHLEY D H, LOUSHINE R J, et al. Ultrastructure of smear layer-covered intraradicular dentin after irrigation with BioPure MTAD [J]. *J Endod*, 2006, 32(5):473-477.
- [9] YASUDA Y, TATEMATSU Y, FUJII S, et al. Effect of MTAD on the differentiation of osteoblast-like cells [J]. *J Endod*, 2010, 36(2):260-263.
- [10] KELEA, KOSEOGLU M. Dissolution of root canal sealers in EDTA and NaOCl solutions [J]. *J Am Dent Assoc*, 2009, 140(1):74-79.
- [11] SEN B H, ERTURK O, PISKIN B. The effect of different concentrations of EDTA on instrumented root canal walls [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009, 108(4):622-627.
- [12] ZHANG W, TORABINEJAD M, LI Y. Evaluation of cyto-

(下转第 131 页)

经皮微创防旋股骨近端髓内钉治疗老年股骨转子间骨折

陈 德, 徐富明, 曾祥炳, 王 伟
(自贡市第二人民医院骨科, 四川 自贡 643000)

[摘要] **目的** 探讨经皮微创股骨近端防旋髓内钉 (PFNA-II) 治疗老年股骨转子间骨折的临床疗效。 **方法** 采用 PFNA-II 治疗老年股骨转子间骨折 36 例。 **结果** 本组随访 11~24 个月, 平均 18 个月, 全部骨折均愈合。依据 Harris 评分: 优 28 例, 良 8 例。 **结论** PFNA-II 治疗老年股骨转子间骨折具有操作简便、创伤小、固定可靠、可早期功能锻炼和并发症少等优点。

[关键词] 股骨转子间骨折; 老年; PFNA-II; 内固定

[中图分类号] R683.42 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 07-0126-03

Percutaneous Proximal Femoral Nail Antirotation (PFNA-II) in Treatment of Femoral Intertrochanteric Fracture in Elderly Patients

CHEN De, XU Fu-ming, ZENG Xiang-bing, WANG Wei
(The Second People's Hospital of Zigong, Zigong Sichuan 643000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the curative effect of minimally invasive percutaneous proximal femoral nail antirotation (PFNA-II) on femoral intertrochanteric fracture in elderly patients. **Method** Minimally invasive percutaneous proximal femoral nail (PFNA-II) was used in treatment of 36 elderly patients with femoral intertrochanteric fracture. **Results** All patients were followed up for 11 to 24 months, an average of 18 months, all the fractures were healed. According to Harris score: excellent was in 28 cases, good in 8 cases. **Conclusion** Minimally invasive percutaneous proximal femoral nail (PFNA-II) in treatment of femoral intertrochanteric fracture in elderly patients has the advantages of simple operation, less trauma, reliable fixation, and early functional exercise and less complications.

[Key words] Femoral intertrochanteric fracture; Elderly; PFNA-II; Internal fixation

股骨转子间骨折是老年人常见的骨折, 具有并发症多, 死亡率高, 且常合并内科疾病, 早期内固定已达成共识, 使患者早期功能锻炼, 便于护理, 减少并发症, 降低死亡率, 提高生活质量。笔者自 2010 年 2 月至 2011 年 4 月, 采用经皮微创置入防旋股骨近端髓内钉 (proximal femoral nail antirotation-II, PFNA-II) 治疗老年股骨转子间骨折 36 例, 疗效满意。现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

本组 36 例, 其中男 15 例, 女 21 例; 年龄 62~93 岁, 平均 75.2 岁。受伤原因: 跌伤 22 例, 车祸 14 例; 右侧 21 例, 左侧 15 例; 骨折按 AO 分型^[1]: 31A1 型 9 例, 31A2 型 21 例, 31A3 型 6 例; 均采用闭合复位, 合并高血压 7 例, 糖尿病 9 例, 心脏疾病 13 例 (含 4 例右心衰), 脑梗塞后遗症 4 例, COPD 15 例, 2 型呼吸衰 2 例。手术时间为伤后 2~13 天, 平均为 4.6 d。患者入院后均先行胫骨结节牵引, 积极完善各项术前检查和治疗内科疾病, 排除绝对手术禁忌症。

1.2 手术方法

19 例采用全麻, 17 例采用持续硬膜外麻醉,

[作者简介] 陈德 (1973~), 男, 四川自贡市人, 医学本科, 主治医师, 主要从事骨科临床工作。