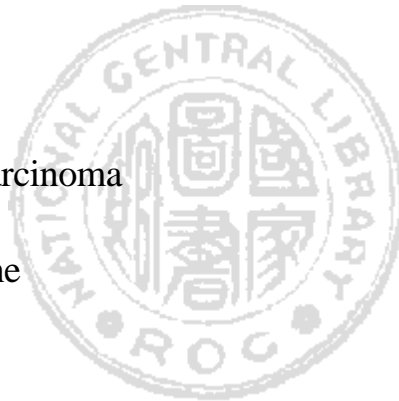


ABBREVIATIONS

Dimethylsulfoxide	DMSO
Dose of 50% inhibition	ID50
Ethylene diaminetetraacetic acid	EDTA
Fetal bovine serum	FBS
2-hydroxyethylmeth-acrylate	HEMA
3-(4,5-dimethylthiazol-z-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	MTT
Optical Density	OD
Oral squamous cell carcinoma	OC2
Phosphate buffer saline	PBS
RPMI Medium 1640	RPMI-1640
Trypsin and EDTA	T/E



目錄

中文摘要.....	5
英文摘要.....	7
壹、文獻綜論.....	8
一、緒言.....	8
二、根管充填劑之生物相容性文獻回顧.....	9
三、細胞凋零 (Apoptosis).....	11
四、細胞模式實驗.....	12
貳、研究動機與目的:.....	14
參、研究材料與方法.....	15
一、材料與化學藥品.....	15
二、實驗試劑的成份.....	15
三、實驗試劑製備.....	16
四. 細胞培養.....	17
五. 解凍與保存.....	17
六. 細胞毒性試驗.....	18
1、作用濃度改變對毒性的影響 (Dose-dependent relationship)	18
2、作用時間改變對毒性的影響 (Time-dependent relationship)	

.....	19
3、統計分析.....	20
七. DNA fragmentation test (Apoptosis) :.....	21
肆、結果.....	23
一、初步實驗.....	23
二、根管充填劑對口腔鱗狀細胞癌細胞株的細胞毒性.....	23
1、Canals	23
2、Canals-N.....	24
3、Tubi-seal.....	24
4、Sealapex.....	24
5、Vitapex.....	25
6、AH26.....	25
7、AH plus.....	25
三、Canals、Canals-N、Tubi-seal、Sealapex、Vitapex、AH26 和 AH plus 對口腔鱗狀細胞癌細胞株的細胞毒性，與作用時間之間的關係.....	26
四、Apoptosis 的觀察.....	26
五、顯微鏡下的觀察.....	27
伍、討論.....	28
陸、結論.....	34

柒、參考文獻.....	35
捌、表.....	39
玖、圖.....	56

中文摘要

根管充填劑依材料組成的不同，可分為(1)氧化鋅丁香油酚基底 (ZOE based)，(2)氫氧化鈣基底 (Ca(OH)₂-based)，(3)樹脂基底 (Resin-based)三種充填劑。其本身之生物相容性可說是根管治療成功的關鍵之一，因為毒性物質可能會延誤根尖周圍組織之癒合，或甚至引發發炎反應。回顧文獻也發現諸多探討根管充填劑毒性之研究，但其結果並不盡相同，為能更加掌握根管治療療程的進行，實在有必要對根管充填劑做進一步的瞭解；另外，近年來的牙科材料雖然經過許多改良，且其細胞毒性也因而減少，但是因為所產生的抗菌物質，而導致組織細胞發生細胞凋零(Apoptosis)的現象，也引起我們對於根管充填劑是否會引起細胞凋零(Apoptosis)的問題產生興趣。因此本研究之目的即藉著細胞培養的方法，以 MTT assay 來評估各類型之根管充填劑(ZOE based; Calcium hydroxide based; and Resin based sealers)，了解其對細胞之生物相容性，以做為臨床治療上選擇的參考依據。並且利用 DNA 碎片(DNA fragment)在電泳膠上形成的梯形條紋(ladder)來觀察細胞凋零(Apoptosis)的現象。結果發現 AH26 和 AH plus 具有較強的細胞毒性；而 Canals-N 則具有較佳之生物相容性。但是所有充填劑的毒性，都隨著劑量和時間的增加

而增加($p < 0.05$)。這些根管充填劑毒性所導致的細胞死亡可能可經由細胞凋零(Apoptosis)產生的。

所以在臨床根管治療時，無論使用何種根管充填劑，都要注意根尖狹窄（apical constriction）的維持，儘量減少根管充填劑和根尖周圍組織的接觸，以降低細胞毒性反應的影響。

英文摘要

There are three types of endodontic sealers as follows: (1)ZOE-based, (2)Calcium-hydroxide-based, and (3)Resin-based sealers. The biocompatibility of root canal sealers contributes in an important role to the clinical success of endodontic therapy. The toxic materials may delay the healing of periapical tissues or even cause an inflammatory tissue reaction.

The purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity of individual components, each mixed sealers, and each mixture of 24 hours after mixing of Canals, Canals-N, Tubi-seal, Sealapex, Vitapex, AH26, and AH plus that treated on human oral cancer cell line (OC2), and whether did these sealers induce apoptosis.

The result of MTT assay showed that the higher concentration and longer duration of treated materials were and the higher cytotoxicity detected ($p < 0.05$).

Individual mixture of 24 hours after mixing has various degrees of cytotoxicity to OC2 from the others. Mixtures of AH26 and AH plus were the most cytotoxic sealers, and mixture of Canals-N was the least cytotoxic sealer.

The result of the technique for the isolation of apoptotic DNA fragments showed that treated materials might induce apoptosis.

To prevent the root canal sealer leaked out to periapical tissue is very important for successful endodontic treayments. The better choice of endodontic sealers is the calcium hydroxide-based sealer.

壹、文獻綜論

一、緒言

根管充填材料 (Root canal filling materials) 一般可分為：鑄心材料 (Solid core materials) 根管充填劑 (Root canal sealers) 根管用
水門酞 (Cements, pastes, and plastics)等三類。

其中根管充填劑依其成份可分為 Zinc oxide-eugenol based, Calcium hydroxide based 及 Resin based 等三種充填劑。Gartner⁽¹⁾ 提出理想根管充填材料的性質：

The properties of ideal root filling materials (Gartner et al., 1992):

1. 可在三度空間中封閉與黏著根管系統 (To adhere and seal the root canal system in three dimensions)
2. 對根尖周圍組織無毒性 (Nontoxicity and well tolerated by periradicular tissues)
3. 具有穩定的體積 (Dimension stability)
4. 不被組織吸收 (Nonabsorbability)
5. 不會被濕氣所影響 (Not affected by the presence of moisture)
6. 不會腐蝕 (Should not corrode)
7. 具電化學活性 (Be electrochemically active)

8. 容易操作 (Easy to manipulate)
9. 在 X 光下不具通透性 (Be radiopaque)

二、根管充填劑之生物相容性文獻回顧

Keresztesi and Kellner⁽²⁾在 1966 年即開始研究根管充填劑之細胞毒性，採用之細胞株為 HeLa 3T3 or L929 細胞。細胞毒性主要以 growth inhibition 和 LD50 來確定。

1. 氧化鋅丁香油酚基底 (ZOE based) root canal sealer :

Munaco et al., 1978⁽³⁾; Kettering et al., 1984⁽⁴⁾; Yesilsoy et al., 1985⁽⁵⁾. 利用細胞培養方法研究，指出 ZOE-based sealers 具有強烈的細胞毒性。其原因認為是由於 eugenol 的釋出，導致細胞呼吸受抑制⁽⁶⁾，或細胞膜被溶解⁽⁷⁾，而具有毒性。然而，根管充填劑中所釋出的 Eugenol，也具有抗微生物的作用，有助於消滅殘存的細菌⁽⁸⁾。

Kouji et al., 1993⁽⁹⁾利用 Radiochromium release 的方法，來研究 Canals(liquid 中含 eugenol)和 Canals-N(liquid 以 fatty acid 取代 eugenol)，發現根管充填劑的細胞毒性，可經由 fatty acid 取代 eugenol 的方式來降低。

而 Kouji et al., 1994⁽¹⁰⁾更指出剛調好 Canals 毒性甚強，凝固經過

24 小時後，則未測出毒性反應；至於 Canals-N 在其研究中，則不具細胞毒性。

2. 氫氧化鈣基底 (Ca(OH)₂-based) root canal sealer :

一般而言，大多數的 Ca(OH)₂-based sealer 被認為具有極佳的生物相容性⁽¹¹⁾；Safavi et al., 1993⁽¹²⁾, 1985⁽¹³⁾, Sjögren et al., 1991⁽¹⁴⁾, Byström et al., 1985⁽¹⁵⁾. 等人則指出 Calcium hydroxide 於根管中具有很好的殺菌作用；Martin et al., 1977⁽¹⁶⁾，指出 Calcium hydroxide 在根尖周圍病灶具有促進骨再生的功能。

3. 樹脂基底 (Resin-based) root canal sealer :

Epoxy resin-based sealer 由於具有許多優異特點⁽¹⁷⁾，例如(1)與牙齒結構可黏著(adhesion to tooth structure), (2)較長的工作時間(long working time), (3)容易調拌(ease of mixing), 和(4)好的封閉效果(good sealing ability)等，因此被引進臨床根管治療。其中最常被使用的就是 Schroder⁽¹⁸⁾於 1954 年引進之根管充填材料--AH26 (Dentsply 公司)。

然而，已有許多研究提出報告(Tagger et al., 1989⁽¹⁹⁾; Rappaport et al., 1964⁽²⁰⁾)：AH26 由於 formaldehyde 的釋出而產生細胞毒性 (Cytotoxicity)。在 AH26 的成份表示中，無論 Powder 或 Resin 都沒

有明列含有 formaldehyde 這項成份。但是，在 Powder 中所含的 Hexamethylenetetramine (HMT)是由 formaldehyde 和 ammonia 所合成；而且 HMT 在酸性環境或水溶液中仍會分解成為 formaldehyde 和 ammonia⁽²¹⁾。AH26 剛調拌好時毒性極高，且可持續一週，而後才逐漸降低其細胞毒性⁽²²⁾。而釋出 formaldehyde 的量在一週後也變得較不顯著⁽²³⁾⁽²⁴⁾。

AH plus 也是屬於一種 Epoxy resin-based sealer。根據製造廠商表示，AH plus 的臨床使用效果優於 AH26；同時，毒性反應也較 AH26 為小。但是根據研究報告指出：AH plus 剛調拌好後 4 小時內毒性極高，而後明顯下降。其短暫的細胞毒性產生的原因，可能與其含有少量 formaldehyde 有關⁽²²⁾。

4. 至於在各類根管充填劑間細胞毒性的比較方面，結果並不儘相同。例如，Osorio et al. 於 1998 年提出的研究報告⁽²⁴⁾認為氧化鋅丁香油酚基底和樹脂基底充填劑的毒性相近，且都大於氫氧化鈣基底充填劑；但 Leonardo et al., 2000 的研究⁽²⁵⁾卻認為氫氧化鈣基底充填劑的毒性大於氧化鋅丁香油酚基底充填劑。

三、細胞凋零 (Apoptosis)

Apoptosis 最早於 1972 年被描述⁽²⁶⁾，指的是一種生理的細胞死亡

進展過程。在許多基礎生物反應中，例如：由荷爾蒙引起的組織重塑(Hormone-induced tissue remodeling)、胚胎形態的發生(Embryonic morphogenesis)等，都扮演重要角色。

有許多因素可以引發 Apoptosis 包括 Biological agents(例如 TGFβ-like protein 等)和 Nonphysiological agents(例如 radiation, toxic substances or drugs)⁽²⁷⁾。

Apoptosis 與 Necrosis 最明顯的區別⁽²⁷⁾，在於 Apoptosis 具有 energy stores 以維持細胞的完整；以及完整的代謝(metabolic integrity)來合成分子以便進行整個過程。

Apoptotic cells 可同時見到細胞質的壓縮；以及核中核染色質的壓縮和斷裂⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾。而且也可以看到長度約 180-200 base pairs 的 DNA fragments 形成⁽²⁷⁾，而這些 fragments 可在 electrophoretic DNA gels 形成清楚的 ladder。

四、細胞模式實驗

雖然有學者認為體外實驗的方法沒有辦法充分模擬體內環境，所以認為試管內(in vitro)與體內實驗方法之間並沒有理想的關連性。然而體內實驗亦存有許多不易克服的因難，因此體外實驗的操作方法仍被採用著⁽³¹⁾。Dahl Blet 1975⁽³²⁾的細胞培養(體外實驗)及猴子牙齒

(體內實驗)來研究 silicophosphate cement 和 zinc phosphate cement 的生物相容性；另外也以細胞培養(體外實驗)及猴子牙齒(體內實驗)來研究 glass ionomer 的生物相容性⁽³³⁾。結果發現在體外及體內實驗有相似的反應。所以吾人認為採用細胞培養來作為細胞毒性之測試，對臨床研究有參考的價值。

貳、研究動機與目的:

根管充填劑 (Root canal sealers) 乃牙科根管治療廣泛使用之物，其本身之生物相容性更是根管治療成功的關鍵之一，因為毒性物質可能會延誤根尖周圍組織之癒合，或甚而引發發炎反應。面對幾乎每天都要處理的根管治療病患，實在有必要對根管充填劑做進一步的瞭解，以便更能掌握療程的進行。因此本研究之目的即藉著細胞培養的方法，來評估各類型之根管充填劑(ZOE based; Calcium hydroxide based; and Resin based sealers), 了解其對細胞之生物相容性，以做為臨床治療上選擇的參考依據。

根據 Goldberg 於 1994 年提出的報告⁽³⁴⁾指出，近年來的牙科材料雖然經過改良，使其細胞毒性減少；但是所產生的抗菌物質，卻可能反而導致組織細胞發生細胞凋零(Apoptosis) 的現象。這也引起我們對於根管充填劑是否會引起細胞凋零(Apoptosis) 的問題產生興趣，所以也將細胞凋零(Apoptosis) 一併列入探討的範圍。

參、研究材料與方法

一、材料與化學藥品

1. RPMI-1640, Fetal bovine serum (FBS), Penicillin, Streptomycine, Trypsin, 購自美國 Life Technology 公司
2. 細胞培養皿購自丹麥 Nunc 公司
3. Dimethyl sulfoxide 購自德國 E. Merck 化學公司
4. Canals 及 Canals-N 購自日本昭和藥品株式會社
5. Tubi-Seal 及 Sealapex 購自美國 KERR 公司
6. AH 26 及 AH plus 購自美國 DENTSPLY 公司
7. Vitapex 購自日本 J. Morita 公司

二、實驗試劑的成份

Root canal sealers:

1. Zinc oxide-eugenol based
 - Canals
 - Canals-N
 - Tubi-seal
2. Calcium hydroxide based
 - Sealapex (Kurr)

Vitapex

3. Resin based
 - AH26
 - AH plus

各藥物組成如 Table 1-3 所示

三、實驗試劑製備

所有試劑除 Vitapex 分為 Immediately mixed 及 24 hr after mixing 兩組外), 均分為 group 1 (Component A), group 2 (Component B), group 3 (Mixed), group 4 (24 hr after mixing), 等四組。Component A 方面 : 在 Canals, Canals-N, 及 AH26 為 powder ; Tubi-seal 及 Sealapex 為 base; AH plus 為 paste A。Component B 方面 : 在 Canals 及 Canals-N 為 liquid; Tubi-seal 為 accelerator; Sealapex 為 catalyst; AH26 為 resin(paste); AH plus 為 paste B。group 3 混合方式依照廠商提供的混合比例方法。至於 group 4 則為混合後置於 37°C, 100% 濕度之培養箱中 24 小時後取出。總共 26 組試劑, 而後所有材料浸泡於 DMSO (Dimethyl sulfoxide) (20 mg/100µl) 1 小時, 取上澄液並稀釋成 0.02; 0.1; 0.5; 2.5; 12.5 mg/100µl 等五種濃度儲存於-20°C 冰箱中備用。本研究 DMSO 之最終濃度均小於 1% 以下, 如此才不會造成細胞的傷害。

四. 細胞培養

口腔鱗狀細胞癌細胞株

細胞株 OC2, 源於人類口腔鱗狀細胞癌, 由臺中榮總口腔顎面外科所提供, 依 Wong et al⁽³⁵⁾, 之方法培養於 RPMI-1640 medium (GIBCO, life Technologist Inc, Grand Island, NY) 中, 含有 10% fetal bovine serum, penicillin (100 unit per ml of RPMI-1640 medium) – streptomycine (100 unit per ml of RPMI-1640 medium) – Fungizone and 1% L-glutamine 37°C, 5%CO₂, 100% humidity, 恆溫之培養箱。

五. 解凍與保存

口腔鱗狀細胞癌細胞株(Oral squamous cell carcinoma cell line – OC2)

由液態氮筒中取出之細胞, 迅速放入 37°C 水浴中, 使其快速解凍, 將解凍之細胞移至含有 37°C RPMI-1640 培養液之離心管中, 以 1000rpm, 離心 10 分鐘, 除去上清液後, 以含 10% FBS 之 RPMI-1640 培養液培養之, 培養方法如前節所述。

如欲冷凍保存細胞, 則用胰蛋白酶 (Trypsine/EDTA) 處理, 以分離細胞, 以 1000rpm, 離心 10 分鐘, 除去上清液後, 再加入含有 10% FBS 及 10% DMSO 之 RPMI-1640 培養液, 再取部分完全均勻的細胞懸浮液, 以計數器計算細胞數目為每管 1×10^6 個細胞放入 Cryotube 中, 放入 -20°C 冰箱中 4-5 小時後, 移至 -80°C 冰箱

8-10 小時，最後移至液態氮中儲存。

六. 細胞毒性試驗

MTT (Tetrazolium dye,

3-(4,5-dimethylthiazol-z-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay 實

驗步驟

試驗方法參考 Plumb et al. 1989⁽³⁶⁾ 之方式。此研究得知活細胞的粒腺體會將 MTT 代謝而產生藍紫色結晶，此藍紫色結晶可溶於異丙醇 (DMSO) 中，故測其吸光值大小可得知活細胞數目的多寡，可藉此判斷藥物對細胞的毒性。

口腔鱗狀細胞癌細胞株與根管充填劑作用後的 MTT 分析

I、作用濃度改變對毒性的影響 (Dose-dependent relationship)

將所培養之細胞 OC2 取出 4×10^4 個細胞/well，種於 24 孔 microtiter plate 並加入 1ml RPMI-1640 培養液，於 37 ° C, 5% CO₂ 的培養箱中 48 小時後，吸棄培養液後，加入新的培養液，並加入 10 μl 試驗藥物，於 37 ° C, 5% CO₂ 的培養箱中 1 小時後，吸棄培養液後，並用 PBS 洗一次，取 1ml 的 MTT(5 mg/ml in PBS) 與 medium 混合液(MTT : medium = 1:7)，加入每個 well 中，以錫箔紙將之包裹好，再繼續培養 4 小時之後，將 well 內之液體吸棄，加入 1ml DMSO

溶解 formazen ，並加入 Sorensens glycine buffer 125 μ l ，以分光光度計在波長為 570nm 下檢測各種濃度之吸光值(O.D.)，所有試劑及各濃度均重複做 6 次求其平均值。

細胞毒性之計算公式如下(以 DMSO 組 Survival rate 為 100%):

$$\% \text{ Survival rate} = [(\text{OD of test group} - \text{OD of Blank}) / (\text{OD of DMSO control group} - \text{OD of Blank})] \times 100\%$$

其中, Test 各組分別加入 10 μ l 前述(見參、三、試驗試劑製備)所調製的 26 組試劑; Control 組加入 10 μ l DMSO; Blank 組為純 Medium 組, 不加入任何細胞及試劑。

由以上公式得知 : % of Survival rate 值愈小,則試驗藥物的細胞毒性愈大。所有試劑及各濃度均重複做 6 次求其平均值。以內插法由濃度反應曲線 , 算出其造成 50%細胞致死的濃度 (LD50) 。

2、作用時間改變對毒性的影響 (Time-dependent relationship)

將所培養之細胞 OC2 取出 4×10^4 個細胞/well , 種於 24 孔 microtiter plate 並加入 1ml RPMI-1640 培養液, 於 37 ° C, 5% CO₂ 的培養箱中 48 小時後, 吸棄培養液後, 加入新的培養液, 並加入 10 μ l 濃度為 1/5LD50 的試驗藥物, 於 37 ° C, 5% CO₂ 的培養箱中分別培養 1, 6, 12, 24 及 48 小時後, 吸棄培養液後, 並用 PBS 洗一次, 取

1ml 的 MTT(5 mg/ml in PBS)與 medium 混合液(MTT : medium = 1:7), 加入每個 well 中 , 以錫箔紙將之包裹好 , 再繼續培養 4 小時之後 , 將 well 內之液體吸棄 , 加入 1ml DMSO 溶解 formazen , 並加入 Sorensens glycine buffer 125 μ l , 以分光光度計在波長為 570nm 下檢測各種濃度之吸光值(O.D.)。所有試劑及各濃度均重複做 6 次求其平均值。

細胞毒性之計算公式如下(以 DMSO 組 Survival rate 為 100%):

$$\% \text{ Survival rate} = [(\text{OD of test group} - \text{OD of Blank}) / (\text{OD of DMSO control group} - \text{OD of Blank})] \times 100\%$$

其中, Test 各組分別加入 10 μ l 前述(見參、三、試驗試劑製備)所調製的 7 組混合物試劑; Control 組加入 10 μ l DMSO; Blank 組為純 Medium 組, 不加入任何細胞及試劑。

觀察不同時間對毒性的影響。

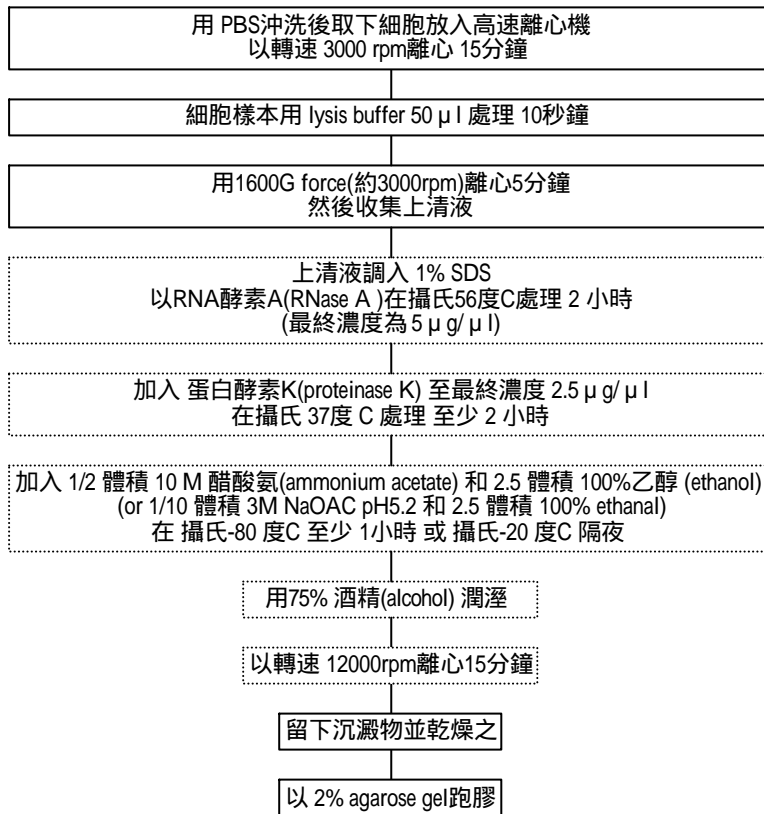
3、統計分析

實驗結果用二因子變異數分析法(Two-way ANOVA)進行統計分析 ,p 值 <0.05 表示顯著 ; Tukey' s HSD 事後比較(post-hoctest)來決定各組之間的差異顯著 (p<0.05) 。

七. DNA fragmentation test (Apoptosis) :

試驗方法乃參考 M. Herrmann et al., 1994⁽³⁷⁾ 之方法。此研究得知 Apoptosis 會引起細胞 DNA 鍵結產生斷裂, 因而產生 DNA 碎片。而這些 DNA 碎片 (fragments) 可在 electrophoretic DNA gels 形成清楚的 ladder。故觀察 gels 上 DNA 碎片產生的 ladder, 可瞭解試劑是否會引發 Apoptosis 現象。

取 4×10^5 細胞培養於 10 cm dish 中並加入 10 ml RPMI-1640 培養液, 於 37°C , 5% CO_2 的培養箱中 48 小時後, 吸棄培養液後, 加入新的培養液, 由於濃度為 LD50 的試驗藥物毒性太強, 一小時即可使 50% 細胞致死, 不適合做長時間觀察, 所以加入 $100 \mu\text{l}$ 濃度稀釋為 $1/5\text{LD}_{50}$ 的試驗藥物, 於 37°C , 5% CO_2 的培養箱中分別培養 1, 6, 12, 24 及 48 小時; 以及濃度稀釋為 $1/10\text{LD}_{50}$ 的試驗藥物, 於 37°C , 5% CO_2 的培養箱中分別培養 6 及 48 小時後, 吸棄培養液後, 並用 PBS 洗一次, 進行以下流程圖中之步驟:



以 100bp DNA ladder 為 referenced ladder，最後結果於螢光下照相觀察。

肆、結果

一、初步實驗

1、 口腔鱗狀細胞癌細胞株：

為了找到最適當之細胞數和處理時間，以 OC2 細胞進行 MTT 方法分析細胞毒性。首先以不同細胞數 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 8×10^4 、 1×10^5 以作用兩天、四天，測其吸光值，希望吸光值 > 2 ；結果發現無論處理幾天，其吸光值均隨細胞數增加而增高，處理結果以 $4 \times 10^4/\text{ml}$ 細胞數兩天能得到 1.545 ± 0.067 之吸光值，且細胞與吸光值有線性關係之存在；由此結果決定以處理兩天細胞 $4 \times 10^4/\text{ml}$ 作為實驗試劑對細胞毒性研究的條件(Table 4)。

二、根管充填劑對口腔鱗狀細胞癌細胞株的細胞毒性

本實驗以 0.02、0.1、0.5、2.5、12.5 mg/100 μl 五種濃度分別以前述細胞數和處理時間分析

I、Canals

Canals 的各成份和混合物對口腔鱗狀細胞癌細胞株，會造成濃度效應(Dose-dependent)的細胞毒性；以內插法由此濃度反應曲線算

出其 powder 成份、liquid 成份、混合物、24 小時後混合物的 50% 細胞致死濃度(LD50) ，分別為 0.11、0.25、0.04 和 0.65 mg/100 μ l (Table 5 , Figure 1)。

2、Canals-N

Canals-N 的各成份和混合物對口腔鱗狀細胞癌細胞株，會造成濃度效應的細胞毒性；以內插法由此濃度反應曲線算出其 powder 成份、liquid 成份、混合物、24 小時後混合物的 50% 細胞致死濃度 (LD50) ，分別為 0.14、0.41、0.06 和 2.95 mg/100 μ l (Table 6 , Figure 2)。

3、Tubi-seal

Tubi-seal 的各成份和混合物對口腔鱗狀細胞癌細胞株，會造成濃度效應的細胞毒性；以內插法由此濃度反應曲線算出其 accelerator 成份、混合物、24 小時後混合物的 50% 細胞致死濃度(LD50) ，分別為 0.22、0.24 和 0.84 mg/100 μ l (Table 7 , Figure 3)。

4、Sealapex

Sealapex 的各成份和混合物對口腔鱗狀細胞癌細胞株，會造成濃

度效應的細胞毒性；以內插法由此濃度反應曲線算出其 base 成份、catalyst 成份、混合物 24 小時後混合物的 50% 細胞致死濃度(LD50) ，分別為 1.61、3.04、0.07 和 1.96 mg/100 μ l (Table 8 , Figure 4)。

5、Vitapex

Vitapex 的各成份和混合物對口腔鱗狀細胞癌細胞株，會造成濃度效應的細胞毒性；以內插法由此濃度反應曲線算出其充填物、24 小時後之充填物的 50% 細胞致死濃度(LD50) ，分別為 0.40 和 1.00 mg/100 μ l (Table 9 , Figure 5)。

6、AH26

AH26 的各成份和混合物對口腔鱗狀細胞癌細胞株，會造成濃度效應的細胞毒性；以內插法由此濃度反應曲線算出其 resin 成份、混合物、24 小時後混合物的 50% 細胞致死濃度(LD50) ，分別為 3.58、0.03 和 0.36 mg/100 μ l (Table 10 , Figure 6)。

7、AH plus

AH plus 的各成份和混合物對口腔鱗狀細胞癌細胞株，會造成濃度效應的細胞毒性；以內插法由此濃度反應曲線算出其 paste A 成

份、paste B 成份、混合物、24 小時後混合物的 50% 細胞致死濃度 (LD50) ，分別為 3.60、0.30、0.39 和 0.55 mg/100 μ l (Table 11 , Figure 7)。

各種測試藥物之 LD50 ，結果如 Table 12 表示。

三、Canals、Canals-N、Tubi-seal、Sealapex、Vitapex、AH26 和

AH plus 對口腔鱗狀細胞癌細胞株的細胞毒性，與作用時間之間的關係

Canals、Canals-N、Tubi-seal、Sealapex、Vitapex、AH26 和 AH plus 的 1/5 LD50 濃度混合物對口腔鱗狀細胞癌細胞株，均會造成時間效應的細胞毒性。其中以 AH plus 在 6 至 12 小時的變化較為明顯(Survival % 由 99.68% 降至 54.79%) (Table 13, Figure8)。

四、Apoptosis 的觀察

Canals、Canals-N、Tubi-seal、Sealapex、Vitapex、AH26 和 AH plus 等七種藥物，與口腔鱗狀細胞癌細胞株作用 1、6、12、24、48 小時後，每一種材料在膠上都沒有使細胞產生 DNA 碎片的帶狀反應 (見照片 7, 8, 9, 10) 但若以上述七種藥物，用較低的濃度(1/10 LD50)

與口腔鱗狀細胞癌細胞株作用 6 及 24 小時後，每一種材料在膠上均可使細胞產生 DNA 碎片的帶狀反應(見照片 11)。所以，由以上的證據顯示這七種藥物可能會破壞口腔鱗狀細胞癌細胞之 DNA 鍵結，引起 Apoptosis 現象。

五、顯微鏡下的觀察

照片 1-1 為口腔鱗狀細胞癌細胞顯微鏡下的觀察照片，而照片 1-2 為加入 DMSO 後培養 1 小時之照片。照片 2, 3, 4, 5 是 Canals 之 Powder, Liquid, Mixed, 24hr after mixed, 濃度由低至高作用於口腔鱗狀細胞癌細胞(OC2)後培養 1 小時之照片。其他試劑作用後於顯微鏡下觀察呈現類似 Canals 之景象表現。

而其中有些試劑作用後於顯微鏡下呈現類似 Apoptosis 景象表現(細胞濃縮，細胞膜完整，核內有濃縮顆粒)。例如口腔鱗狀細胞癌細胞株(OC2) 經試劑萃取物 Mixed of Sealapex, 2.5mg/100 μ l 或 Paste of Vitapex, 2.5mg/100 μ l 處理後，培養 1 小時產生類似 Apoptosis 景象(見照片 6-1 及 6-2)。

伍、討論

牙科根管治療所用之充填劑的材料，大致可分為氧化鋅丁香油酚基底 (ZOE-base)、氫氧化鈣基底 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ -base)和樹脂基底 (Resin-base)，且各有其優缺點;本實驗乃研究其細胞毒性(Cytotoxicity)及是否產生 Apoptosis 現象。

本實驗研究使用 DMSO 為溶劑是因其為常用之溶劑，其最終濃度均小於 1% 以下如此才不會造成細胞之傷害。

此研究使用 MTT 分析法之理由，有許多化學敏感分析可用於體外之試驗，美國 National cancer Institute 以 tetrazolium dye-based assay，用於篩檢藥物之方法，此種分析方法之細胞必須是活的，當實驗試劑與細胞作用後，存活下來的活細胞的粒線體可將此種水溶性黃色染料 MTT 經由粒腺體還原酵素作用還原下來，使其變成不溶於水之紫色 MTT-formazan 產物，我們將 MTT-formazan 溶於 DMSO，測其吸光值⁽³⁸⁾; Pumb⁽³⁶⁾認為 MTT-formazan 的吸收光譜值會受到細胞數與 PH 值的影響, Pumb⁽³⁶⁾認為在細胞密度低時或是高的 PH 值時，吸收的最大值是在波長為 560-570nm；在細胞密度高時或是低的 PH 值時，吸收的最大值是在波長 510nm 和 570nm 上。本

試驗採用 570nm 波長來測試。

對於 MTT 分析法的評價有 Bean TA . et al. 1995⁽⁴⁰⁾ 和 Schweikl H. et al.1995⁽⁴¹⁾認為，MTT 分析法在細胞毒性研究上較 colorimetric proliferation assay 和 Cr⁵¹ release assay 準確。也有學者指出 MTT 還原酵素作用甚至可在細胞膜 Lysis 前即測出⁽⁴⁴⁾。

Fuji et al⁽³⁹⁾ 指出，MTT 分析可因細胞種類之不同，培養時間之差異或其他條件不同，而影響其結果，在我們的實驗中我們也分別以不同濃度之細胞數與 DMSO 藥物作用作測試，結果發現不同之細胞數與 DMSO 藥物作用間有線性關係。由 Table 4 得知以口腔鱗狀細胞癌細胞：其細胞數為 4×10^4 培養兩天後，DMSO 作用 1 小時之吸光值 1.545 ± 0.067 ，且細胞與吸光值有線性關係之存在；以此條件作為口腔鱗狀細胞癌細胞株研究之參考。

本實驗的吾人採用的材料分別是：(1)氧化鋅丁香油酚基底充填劑 (ZOE-base) 的 Canals、Canals-N 和 Tubi-seal，(2)氫氧化鈣基底充填劑 (Ca(OH)₂-base) 的 Sealapex，(3)樹脂基底充填劑 (Resin-base) 的 AH26 和 AH plus 的組成 A、組成 B、組成 A 和組成 B 的混合物、組成 A 和組成 B 的 24 小時後混合物，以及氫氧化鈣基底充填劑 (Ca(OH)₂-base) 的 Vitapex 的組成 A 和組成 B 的混合物、組成 A 和組成 B 的 24 小時後混合物共二十六項。由結果發現這二十六項試劑

由低濃度到高濃度的測試物，吸光值隨濃度增加而遞減 (Figure 1-7)，結果顯示 survive rate 由高往下降，顯示高濃度樣品對細胞具有較高的毒性。

這二十六項中 Tubi-seal 的 Base 和 AH26 的 Powder (LD50 均大於 12.5 mg/100 μ l)，對口腔鱗狀細胞癌細胞，含較低的細胞毒性 (Table4-9)。

比較 LD50 發現，各組成 A 和組成 B 的混合物，細胞毒性大小依次為 AH26 > Canals > Canals-N > Sealapex > Tubi-seal > AH plus > Vitapex；而在組成 A 和組成 B 的 24 小時後混合物中，其細胞毒性大小依次為 AH26 > AH plus > Canals > Tubi-seal > Vitapex > Sealapex > Canals-N。除 Vitapex 外，本次實驗所有混合試劑的凝固時間，依照廠商說明都在 24 小時以內，由以上這些結果顯示：即使經過足夠時間的凝固反應，AH26 和 AH plus 等樹脂基底充填劑的毒性反應仍然比較高，這點可能值得我們在臨床使用樹脂基底充填劑時多加考量。

另外，所有混合物之毒性均較 24 小時後混合物為大，顯示剛調拌好的混合試劑可能產生某些毒性較強的物質，才造成細胞毒性的增加，經過凝固後這些毒性物質才消失，而細胞毒性反應也隨之降低。不僅是樹脂基底充填劑，連氧化鋅丁香油酚基底充填劑和氫氧

化鈣基底充填劑也都有同樣的情況發生。然而當我們進行根管治療使用根管充填劑的時候，都是將剛調拌好的混合充填劑直接放入根管內，所以上述結果提醒我們：無論使用何種根管充填劑，都要注意在根管擴大與充填時，根尖狹窄（apical constriction）的維持，儘量減少根管充填劑和根尖周圍組織的接觸，以降低細胞毒性反應的影響。

在 Canals 和 Canals-N 方面，兩種藥劑的不同僅在於 Liquid 的組成為 Eugenol 或是 Fatty acid。由 LD50 來看，無論是 Liquid、Mixed 或 24hr after mixed 的細胞毒性，Canals-N 均較 Canals 為小，尤其是比較 24hr after mixed 的細胞毒性更是明顯。這結果和 Kouji Araki⁽⁹⁾ 所言除去 Eugenol 以降低根管充填劑細胞毒性的結論相同。而且比較 24hr after mixed 的細胞毒性，Canals-N (LD50 = 2.95 mg/100 μ l) 甚至較氫氧化鈣基底充填劑 Sealapex (LD50 = 2.95 mg/100 μ l) 的細胞毒性為小。從以上結果看來，Canals-N 顯然比其他根管充填劑擁有較佳的生物相容性。

Canals、Canals-N、Tubi-seal、Sealapex、Vitapex、AH26 和 AH plus 的 1/5 LD50 濃度混合物對口腔鱗狀細胞癌細胞株，均會造成時間效應的細胞毒性；亦即作用時間越久 (Table 13, Figure 8)，其 survival rate 越由高往下降。其中以 AH plus 在 6 至 12 小時的變化

較為明顯(Survival %由 99.68% 降至 54.79%)。Allan et al., 2001⁽⁴²⁾ 提出的研究指出在根管內(Root canal)根管充填劑凝固較試管內(In vitro)為慢。由以上結果顯示：這些未完全凝固的根管充填劑與根尖周圍組織作用越長的時間，組織所受到的毒性刺激越大，越可能會延誤根尖周圍組織之癒合，或甚而引發發炎反應，所以應該要減少根管充填劑與根尖周圍組織之接觸。換言之，前面所提到在根管擴大與充填時，根尖狹窄（apical constriction）的維持就顯得更為重要了。

Adams et al., 1995 的研究⁽⁴³⁾指出：某些次致死量(sublethal)或進行性的損傷(progressive injury)所導致的壞死(Necrosis)，在觀察超微構造改變時，可能也會發現胞體漿凝縮(cytoplasmic condensation)、大空泡(blebbing) 等現象，但這些現象只能說是類似細胞凋零(Apoptosis)的收縮壞死(Shrinkage necrosis)，作者認為細胞凋零(Apoptosis)特有的印記(hallmark) -- 明顯界限的核染色質分隔 (well demarcated chromatin segregation)，才是判定 Apoptosis 或 Necrosis 的關鍵。在本實驗中使用 Canals、Canals-N、Tubi-seal、Sealapex、Vitapex、AH26 和 AH plus 等七種藥物，以 1/5 LD50 濃度與口腔鱗狀細胞癌細胞株作用 1、6、12、24、48 小時後，每一種材料在膠上都沒有使細胞產生 DNA 碎片的帶狀反應；但若以上述七種藥物，用較低的

濃度(1/10 LD50)與口腔鱗狀細胞癌細胞株作用 6 及 24 小時後，每一種材料在膠上均可使細胞產生 DNA 碎片的帶狀反應。所以由以上的證據顯示這七種藥物可能會破壞 DNA 鍵結，引起 Apoptosis 現象，故其毒性反應引起細胞死亡可能可經由 Apoptosis 所產生。

陸、結論

由本實驗操作下可獲得以下的結論

1. 樹脂基底充填劑 (Resin-base) 的 AH26 和 AH plus , 對於口腔鱗狀細胞癌細胞株具有較強的細胞毒性。
2. 氧化鋅丁香油酚基底充填劑(ZOE-base)的 Canals-N , 對於口腔鱗狀細胞癌細胞株具有較佳的生物相容性。
3. 細胞毒性會隨實驗試劑劑量的增加而增加。
4. 細胞毒性會隨作用時間的增加而增加。
5. 無論使用何種根管充填劑 , 都要注意在根管擴大與充填時 , 根尖狹窄 (apical constriction) 的維持 , 儘量減少根管充填劑和根尖周圍組織的接觸 , 以降低細胞毒性反應的影響。
6. Canals、Canals-N、Tubi-seal、Sealapex、Vitapex、AH26 和 AH plus 等七種藥物 , 其毒性反應引起細胞死亡可能可經由 Apoptosis 所產生。

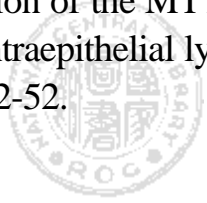
柒、參考文獻

1. Gartner A, Dorn S. Advances in endodontic surgery. *Dent Clin North Am* 1992;36:357-78.
2. Keresztesi K, Lellner G L. The biological effect of root filling material. *Int Dent J*. 1966;16:222-231
3. Munaco F, Miller W, Mona E. A study of long-term toxicity of endodontic materials with use of an in vitro model. *J Endodon* 1978;4:151-7.
4. Kettering JD, Torabinejad M. Cytotoxicity of root canal sealers: a study using HeLa cells and fibroblasts. *Int Endod J* 1984;17:60-6.
5. Yesilsoy C, Feigal RJ. Effect of endodontic materials on cell viability across standard pore size filter. *J Endodon* 1985;11:401-7.
6. Hume WR. Effect of eugenol of respiration and division in human pulp, mouse fibroblasts, and liver cells in vitro. *J Dent Res* 1984;63:1262-5.
7. Lindqvist L, Otteskog P. Eugenol: liberation from dental materials and effect on human diploid fibroblast cells. *Scand J Dent Res* 1981;89:552-6
8. Pumarola J, Berastegui E, Canalda C, Jimenez de Anta T. Antimicrobial activity of seven root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;74:216-20.
9. Kouji Araki, Hideaki Suda, Sergio V. Barbosa, and Larz S. W. Spångberg. Reduced cytotoxicity of a root canal sealer through eugenol substitution. *J Endodon* 1993;19(11):554-7.
10. Kouji Araki, Hideaki Suda, Larz S. W. Spångberg. Indirect longitudinal cytotoxicity of root canal sealers on L929 cells and periodontal ligament fibroblasts. *J Endodon* 1994;20(2):67-70.
11. Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal filling materials—hitocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clinical Oral Investigations*. 1997;1(1):5-11.
12. Safavi KE, Frank C. Nichols, Effect of calaium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endodon*. 1993;19(2):76-78.

13. Safavi KE, Dowden WE, Introcaso JH, Langeland K. A comparison of antimicrobial effects of calcium hydroxide and iodine-potassium iodide. *J Endodon* 1985;11:454-6
14. Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991;24:119-25.
15. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antimicrobial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985;1:170-5.
16. Martin DM, Crabb HSM. Calcium hydroxide in root canal therapy. A review. *Br Dent J* 1977;142:277-83.
17. Limkangwalmongkol S, Abbott PV, Sandler AB. Apical dye penetration with four root canal sealers and gutta-percha using longitudinal sectioning. *J Endodon* 1992;18:535.
18. Schroeder A. Mitteilungen über die Abschlussdichtigkeit von Wurzelfüllmaterialien und erster Hinweis auf ein neuartiges Wurzelfüllmittel. *Schweiz Monatschr Zahnärztl* 1954;64:921.
19. Tagger M, Tagger E. Periapical reactions to calcium hydroxide containing sealers and AH26 in monkeys *Endod Dent Traumatol*. 1989;5:139-146.
20. Rappaport HM, Lilliy GE, Kapsimalis P. Toxicity of endodontic materials. *J Oral Surg*, 1964;18:758-802.
21. Larz S.W. Spångberg, Sérgio V. Barbosa, and Gary D. Lavigne, AS AH26 releases formaldehyde. *J Endodon* 1993;19(12):596-8.
22. Nasim Gheshlaghi Azar, Mahnaz Heidari, Zahra Samadi Bahrami, and Fazel Shokri. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J Endodon* 2000;26(8):462-5.
23. Vajrabhaya LO, Sithisarn P, Wilairat P. Comparison between sulphorhodamine-B dye staining and ⁵¹Cr-release method in cytotoxicity assay of endodontic sealers. *J Endodon* 1997;23:355-7
24. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endodon* 1998;24:91-6.
25. Renato de Toledo Leonardo, Alberto Consolaro, Iracilda Zeppone Carlos, and Mario Roberto Leonardo. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J Endodon* 2000;26(6):328-330.
26. Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie, A.R. Currie. Apoptosis : a basic

- biological phenomenon with wide range implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972;26:239-257.
27. Laszlo Fesus, Peter J. A. Davies, Mauro Piacentini. Apoptosis : a molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol* 1991; 56:170-177.
 28. Arends, M. J. , R. G. Morris, A. H. Wyllie. Apoptosis : The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 1990;136:593-608.
 29. Umansky, S. R., B. A Korol, P. Nelipovich. In vivo DNA degradation in thymocytes of r-irradiated or hydrocortison-treated rats. *Bichim. Biophys. Acta.* 1981;655:9-17.
 30. Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-556.
 31. Browne. RM., and Tyas, MJ.: Biological testing of dental restorative materials in vitro - A review, *J Oral Rehabil* 1979;6:3 65-74.
 32. Dahl BL. Tronstad L. Spanberg L. Biological tests of a silicophosphate cement. *J Oral Rehabil* 1975;2(3):249-57.
 33. Dahl BL. Tronstad L. Biological tests on an experimental glass ionomer (silicopolyacrylate)cement. *J Oral Rehabil* 1976;3(1):19-24.
 34. M. Goldberg, J. J. Lasfargues and J. M. Legrand. Canal testing of dental materials – histological considerations. *J. Dent. Suppl.* 2, 1994; 22 S25-S28
 35. Wong DY.,Chang KW., Chen CF.,Chang RC. Characterization of two new cell line derived from oral cavity human Squamous cell carcinomas -OCI and OC2. *J Oral Maxillofac Surg* 1990;48:385-90.
 36. Pumb JA. Milroy R. Kaye SE. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 -diphenyl-tetrazolium Bromide -Formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Research* 1989;49: 4435-40.
 37. M. Herrmann, H. M. Lorenz, R. Voll, M. Grönke, W. Woith and J. R. Kalden. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Research* 1994;22(24):5506-5507.

38. Alley MC. Scudiero DA. Monks A. Hursey ML. Czenvinski MJ. Fine DL. Abbott BJ. Mayo JG. Shoemaker RH. Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 1988;48:589-601.
39. Takeru Fuji, Hun HA, Hideakira Y. Hidetoshi H. Soo HY. Hitoshi H. Applications of MTT assey to primary cultured rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull* 1995;18(10)1446-9.
40. Bean TA. Zhuang WC. Tong Py, Eick JD, Chappelow CC. Youryee DM. Comparison of tetrazolium colorimetric and ⁵¹Cr release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. *Dent Mater* 1995;11:327-31.
41. Schweikl H. Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci* 1996;104(3):292-9.
42. Neal A. Allan, Richard E. Walton, and Michelle Schaffer. Setting times for endodontic sealers under clinical usage and in vitro conditions. *J Endodon* 2001;27(6):421-423.
43. A. M. Adams, J. V. Soames, and R. F. Searle. Ultrastructural change in cultured human periodontal ligment cells exposed to dental materials. *J. of Biomedical Materials Research* 1995;29:999-1004.
44. Ni J, Hollander D. Application of the MTT assay to functional studies of mouse intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Clin Lab Analys* 1996;10:42-52.



捌、表

Table 1.根管充填劑之組成 (1)--ZOE-Base

Canals and Canals-N (Showa Yakuhin Kako Co., Ltd., Tokyo, Japan)

		Liquid		Powder	
Canals	Clove oil	80%		Zinc oxide	40%
	Others	20%		Rosin	30%
Canals-N				Bismuth Subcarbonate	15%
	Higher fatty acid	50%		Barium sulfate	15%
	Glycol	50%			

Clove oil includes eugenol in more than 80%

續 Table 1.根管充填劑之組成 (1)--ZOE-Base

Tubi-seal (KERR Corporation, Romulus,
Michigan, USA)

Zinc oxide	58.00%
Barium sulfate	4.00%
Oleo resin	14.00%
Oils/Modifier	21.50%
Thymol Iodide	2.50%

Active ingredients : Zinc oxide, Eugeonol

Table 2.根管充填劑之組成 (2)--Calcium hydroxide-Base

Sealapex (KERR Corporation, Romulus, Michigan, USA)

Calcium oxide	24%
Barium sulfate	20%
Zinc oxide	6%
Sub-Microm Silica	4%
Titanium Dioxide	2%
Zinc Stearate	1%
Blend	42%

Ethy toluene sulfonamide, poly (methylene methyl salicylate) resin, isobutyl salicylate and a pigment.

Calcium oxide and poly (methylene methyl salicylate) resin are active ingredient

續 Table 2.根管充填劑之組成 (2)--Calcium hydroxide-Base

Vitapex (Neo Dental Chemical
Products Co., Ltd., Japan)

Calcium hydroxide

Iodoform

Others

Table 3.根管充填劑之組成 (3)--Resin Base

AH26 (Dentsply Ltd., Weybridge,UK)

Powder

Bismuth(III)oxide	60%
Methenamine	25%
Silver	10%
Titanium dioxide	5%

resin

Bisphenol-A-diglycidylether	100%
-----------------------------	------

續 Table 3.根管充填劑之組成 (3)--Resin Base

AH plus (Dentsply Ltd.,
Weybridge,UK)

Paste A	Paste B
Epoxy resin	Adamantane amine
Calcium tungstate	N, N'-Dibenzyl-5-oxanonane-diamine-1,9
Zirconium oxide	TCD-Diamine
Aerosil	Calcium tungstate
Iron Oxide	Zirconium oxide
	Aerosil
	Silicone oil

Table 4. 以MTT assay觀察不同細胞數目之口腔上皮鱗狀癌細胞株的OD值變化

Cell number	O.D. (48 hrs)
3×10^4	0.371 ± 0.040
4×10^4	1.545 ± 0.067
5×10^4	1.760 ± 0.136
6×10^4	1.948 ± 0.348
8×10^4	2.265 ± 0.054
1×10^5	2.554 ± 0.107

The final DMSO concentration is 1% in medium (10μ l/ml)

Table 5. 以MTT assay評估Canals對口腔上皮鱗狀癌細胞株(OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)

Canals (mg/100 μ l)	Survival %	LD50 (mg/100 μ l)
Powder		
0.02	89.79 \pm 3.53	
0.1	41.71 \pm 0.67	
0.5	12.06 \pm 1.81	
2.5	4.75 \pm 1.78	
12.5	1.12 \pm 0.71	
		0.11039
Liquid		
0.02	88 \pm 2.42	
0.1	63.26 \pm 0.29	
0.5	38.49 \pm 0.03	
2.5	17.29 \pm 0.2	
12.5	3.24 \pm 0.15	
		0.24623
Mixed		
0.02	79.45 \pm 0.67	
0.1	19.58 \pm 0.55	
0.5	6.63 \pm 0.25	
2.5	5.94 \pm 0.14	
12.5	3.62 \pm 0.6	
		0.03624
24hr after mixed		
0.02	82.82 \pm 0.68	
0.1	63.96 \pm 1.14	
0.5	57.92 \pm 0.98	
2.5	50.49 \pm 0.49	
12.5	8.16 \pm 1.15	
		0.65105

The final DMSO concentration is 1% in medium (10 μ l/ml).

Survival % = [(The absorbance of treatment of sample - the absorbance of medium) / (The absorbance of DMSO control group - the absorbance of medium)] x 100%

Table 6. 以MTT assay評估Canals-N對口腔上皮鱗狀癌細胞株(OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)

Canals-N (mg/100 μ l)	Survival %	LD50 (mg/100 μ l)
Powder		
0.02	93.55 \pm 1.09	
0.1	44.87 \pm 0.35	
0.5	15.79 \pm 0.44	
2.5	7.8 \pm 1.78	
12.5	4.78 \pm 0.4	
		0.14352
Liquid		
0.02	95.44 \pm 0.23	
0.1	64.15 \pm 0.92	
0.5	44.44 \pm 0.53	
2.5	27.66 \pm 0.45	
12.5	4.34 \pm 0.09	
		0.40708
Mixed		
0.02	73.91 \pm 1.04	
0.1	41.64 \pm 0.32	
0.5	12.09 \pm 0.56	
2.5	9.32 \pm 0.43	
12.5	6.76 \pm 0.31	
		0.06417
24hr after mixed		
0.02	85.67 \pm 0.24	
0.1	76.79 \pm 0.35	
0.5	70.11 \pm 0.84	
2.5	54.84 \pm 0.17	
12.5	32.9 \pm 0.24	
		2.95059

The final DMSO concentration is 1% in medium (10 μ l/ml).

Survival % = [(The absorbance of treatment of sample - the absorbance of medium) / (The absorbance of DMSO control group - the absorbance of medium)] x 100%

Table 7. 以MTT assay評估Tubi-seal對口腔上皮鱗狀癌細胞株(OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)

Tubi-seal (mg/100 μ l)	Survival %	LD50 (mg/100 μ l)
Base		
0.02	95.01 \pm 0.32	
0.1	92.69 \pm 0.28	
0.5	85.85 \pm 1.11	
2.5	83.42 \pm 0.11	
12.5	79.82 \pm 0.09	
		>12.5
Accelerator		
0.02	106.5 \pm 3.51	
0.1	57.01 \pm 0.2	
0.5	9.58 \pm 0.12	
2.5	5.55 \pm 0.14	
12.5	4.36 \pm 0.2	
		0.21515
Mixed		
0.02	74.07 \pm 0.35	
0.1	61.42 \pm 0.12	
0.5	47.62 \pm 0.73	
2.5	21.12 \pm 0.92	
12.5	4.6 \pm 0.14	
		0.23873
24hr after mixed		
0.02	89.88 \pm 1.06	
0.1	79.82 \pm 0.53	
0.5	66.96 \pm 1.19	
2.5	32.72 \pm 0.37	
12.5	12.73 \pm 0.53	
		0.8353

The final DMSO concentration is 1% in medium (10 μ l/ml).

Survival % = [(The absorbance of treatment of sample - the absorbance of medium) / (The absorbance of DMSO control group - the absorbance of medium)] x 100%

Table 8.以MTT assay評估Sealapex對口腔上皮鱗狀癌細胞株(OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)

Sealapex (mg/100 μ l)	Survival %	LD50 (mg/100 μ l)
Base		
0.02	99.95 \pm 1.34	
0.1	85.96 \pm 0.54	
0.5	74.47 \pm 0.33	
2.5	57.53 \pm 0.41	
12.5	8.72 \pm 1.05	
		1.61036
Catalyst		
0.02	102.18 \pm 0.29	
0.1	79.96 \pm 1.68	
0.5	56.36 \pm 0.52	
2.5	49.34 \pm 0.49	
12.5	44.24 \pm 0.13	
		3.0354
Mixed		
0.02	64.71 \pm 0.42	
0.1	41.72 \pm 0.51	
0.5	33.37 \pm 0.61	
2.5	28.69 \pm 0.21	
12.5	20.68 \pm 0.19	
		0.07207
24hr after mixed		
0.02	82.66 \pm 1.63	
0.1	71.24 \pm 1.37	
0.5	63.67 \pm 1.24	
2.5	49.58 \pm 0.34	
12.5	33.62 \pm 0.83	
		1.95746

The final DMSO concentration is 1% in medium (10 μ l/ml).

Survival % = [(The absorbance of treatment of sample - the absorbance of medium) / (The absorbance of DMSO control group - the absorbance of medium)] x 100%

Table 9. 以MTT assay評估Vitapex對口腔上皮鱗狀癌細胞株(OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)

Vitapex (mg/100 μ l)	Survival %	LD50 (mg/100 μ l)
Fresh		
0.02	105.66±0.72	
0.1	74.28±0.7	
0.5	40.4±0.67	
2.5	9.18±0.39	
12.5	2.23±0.53	
		0.40286
24hr after exposure		
0.02	91.33±0.82	
0.1	55.61±0.5	
0.5	38.85±0.35	
2.5	33.03±0.4	
12.5	28.35±0.86	
		0.99999

The final DMSO concentration is 1% in medium (10 μ l/ml).

Survival % = [(The absorbance of treatment of sample - the absorbance of medium) / (The absorbance of DMSO control group - the absorbance of medium)] x 100%

Table 10. 以MTT assay評估AH26對口腔上皮鱗狀癌細胞株(OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)

AH26 (mg/100 μ l)	Survival %	LD50 (mg/100 μ l)
Powder		
0.02	92.51±0.45	
0.1	82.67±1.09	
0.5	76.51±0.25	
2.5	73.92±0.84	
12.5	59.01±3.88	
		>12.5
Resin (paste)		
0.02	96.91±2.31	
0.1	84.52±0.37	
0.5	70.74±0.2	
2.5	57.16±0.18	
12.5	34.15±0.28	
		3.57899
Mixed		
0.02	55.68±0.44	
0.1	41.08±0.51	
0.5	28.66±0.79	
2.5	20.33±0.33	
12.5	17.3±0.33	
		0.02834
24hr after mixed		
0.02	87.67±0.75	
0.1	56.24±0.13	
0.5	33.26±0.24	
2.5	30.9±0.29	
12.5	26.86±0.63	
		0.35944

The final DMSO concentration is 1% in medium (10 μ l/ml).

Survival % = [(The absorbance of treatment of sample - the absorbance of medium) / (The absorbance of DMSO control group - the absorbance of medium)] x 100%

Table 11. 以MTT assay評估AH plus對口腔上皮鱗狀癌細胞株(OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)

AH plus (mg/100 μ l)	Survival %	LD50 (mg/100 μ l)
Paste A		
0.02	75.96 \pm 1.01	
0.1	69.77 \pm 0.5	
0.5	54.45 \pm 0.09	
2.5	48.97 \pm 0.32	
12.5	47.95 \pm 0.45	
		3.59847
Paste B		
0.02	103.28 \pm 1.77	
0.1	49.36 \pm 0.5	
0.5	38.84 \pm 0.4	
2.5	14.18 \pm 0.11	
12.5	8.64 \pm 0.2	
		0.29965
Mixed		
0.02	93.6 \pm 0.73	
0.1	63.22 \pm 0.58	
0.5	31.2 \pm 0.76	
2.5	26.51 \pm 0.44	
12.5	22.31 \pm 0.81	
		0.39477
24hr after mixed		
0.02	98.44 \pm 1.05	
0.1	69.03 \pm 0.8	
0.5	34.02 \pm 0.2	
2.5	31.96 \pm 0.34	
12.5	21.77 \pm 0.46	
		0.54611

The final DMSO concentration is 1% in medium (10 μ l/ml).

Survival % = [(The absorbance of treatment of sample - the absorbance of medium) / (The absorbance of DMSO control group - the absorbance of medium)] x 100%

Table 12. 以MTT assay評估試劑對口腔上皮鱗狀癌細胞株(OC2)的50%致死劑量(LD50)

Material	LD50 (mg/100 μ l)
Canals	
Powder	0.11039
Liquid	0.24623
Mixed	0.03624
24hr after mixed	0.65105
Canals-N	
Powder	0.14352
Liquid	0.40708
Mixed	0.06417
24hr after mixed	2.95059
Tubi-seal	
Base	>12.5
Accelerator	0.21515
Mixed	0.23873
24hr after mixed	0.8353
Sealapex	
Base	1.61036
Catalyst	3.0354
Mixed	0.07207
24hr after mixed	1.95746
Vitapex	
Mixed	0.40286
24hr after mixed	0.99999
AH26	
Powder	>12.5
Resin (paste)	3.57899
Mixed	0.02834
24hr after mixed	0.35944
AH plus	
Paste A	3.59847
Paste B	0.29965
Mixed	0.39477
24hr after mixed	0.54611

Table 13. 利用口腔上皮鱗狀癌細胞株(OC2), 以 MTT assay 評估作用時間與細胞毒性(cytotoxicity)間的關係

Time (hr)	Survival %
Canals	
1	102.153±0.24906
6	96.92±0.50478
12	90.8767±0.14434
24	60.6033±0.63256
48	26.58±0.22113
Canals-N	
1	103.757±1.20139
6	96.47±0.19925
12	90.9567±0.24502
24	60.9433±0.47258
48	37.4267±0.47721
Tubi-seal	
1	106.957±0.47057
6	98.5333±0.13429
12	96.47±0.50478
24	66.6367±0.63375
48	44.2533±0.77797
Sealapex	
1	106.827±1.56516
6	97.31±0.46119
12	92.5033±0.43662
24	80.69±0.59925
48	73.4467±0.6531

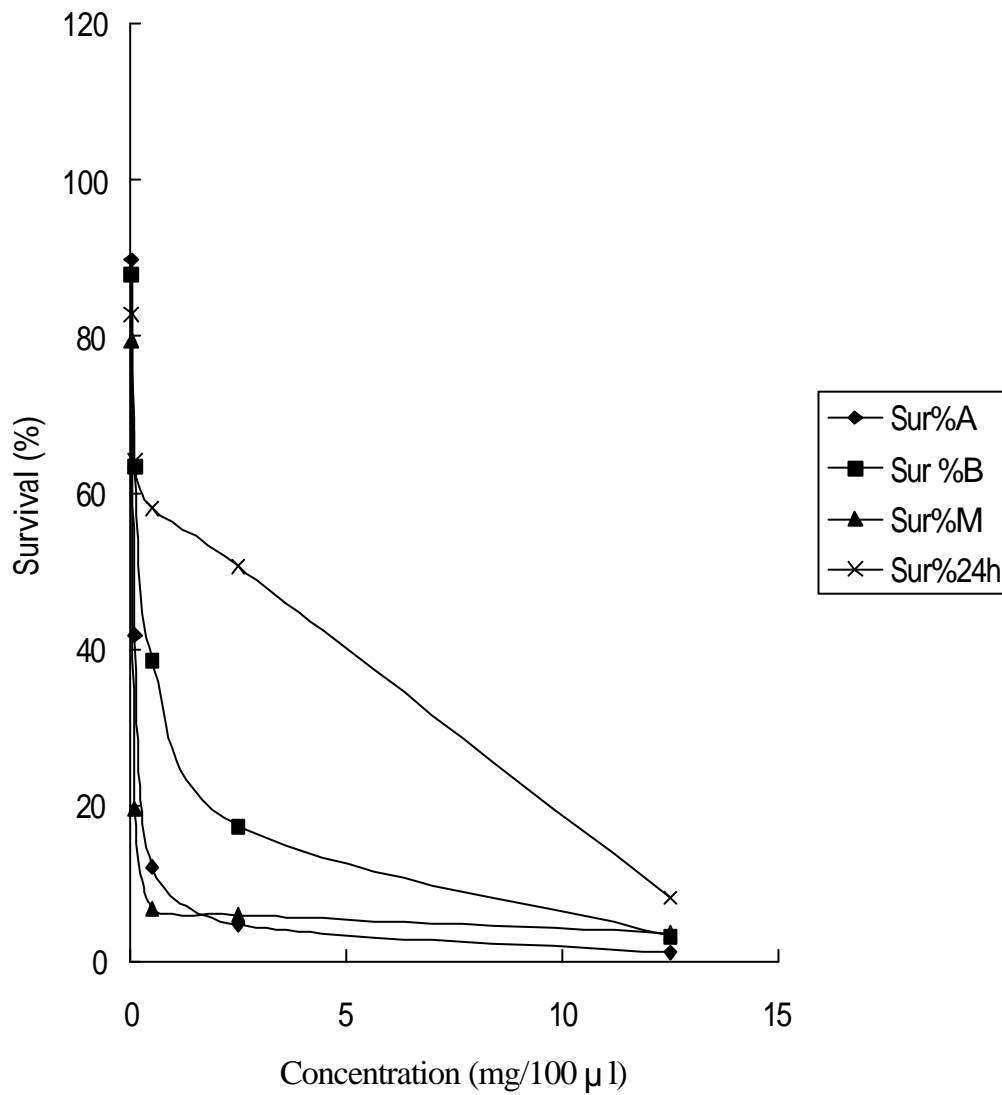
Table.13 (Continued).

Vitapex	
1	96.0967±0.90423
6	84.44±0.51884
12	78.0233±0.35726
24	60.2067±0.17388
48	34.1±0.61798
AH26	
1	90.7±0.25239
6	76.5433±0.14154
12	60.91±0.58643
24	53.2033±0.82124
48	38.00967±0.48645
AH plus	
1	104.847±0.19858
6	99.68±0.14177
12	54.79±0.49112
24	49.9333±0.65248
48	38±0.58617

Survival % = [(The absorbance of treatment of sample - the absorbance of medium) / (The absorbance of DMSO control group - the absorbance of medium)] x 100%

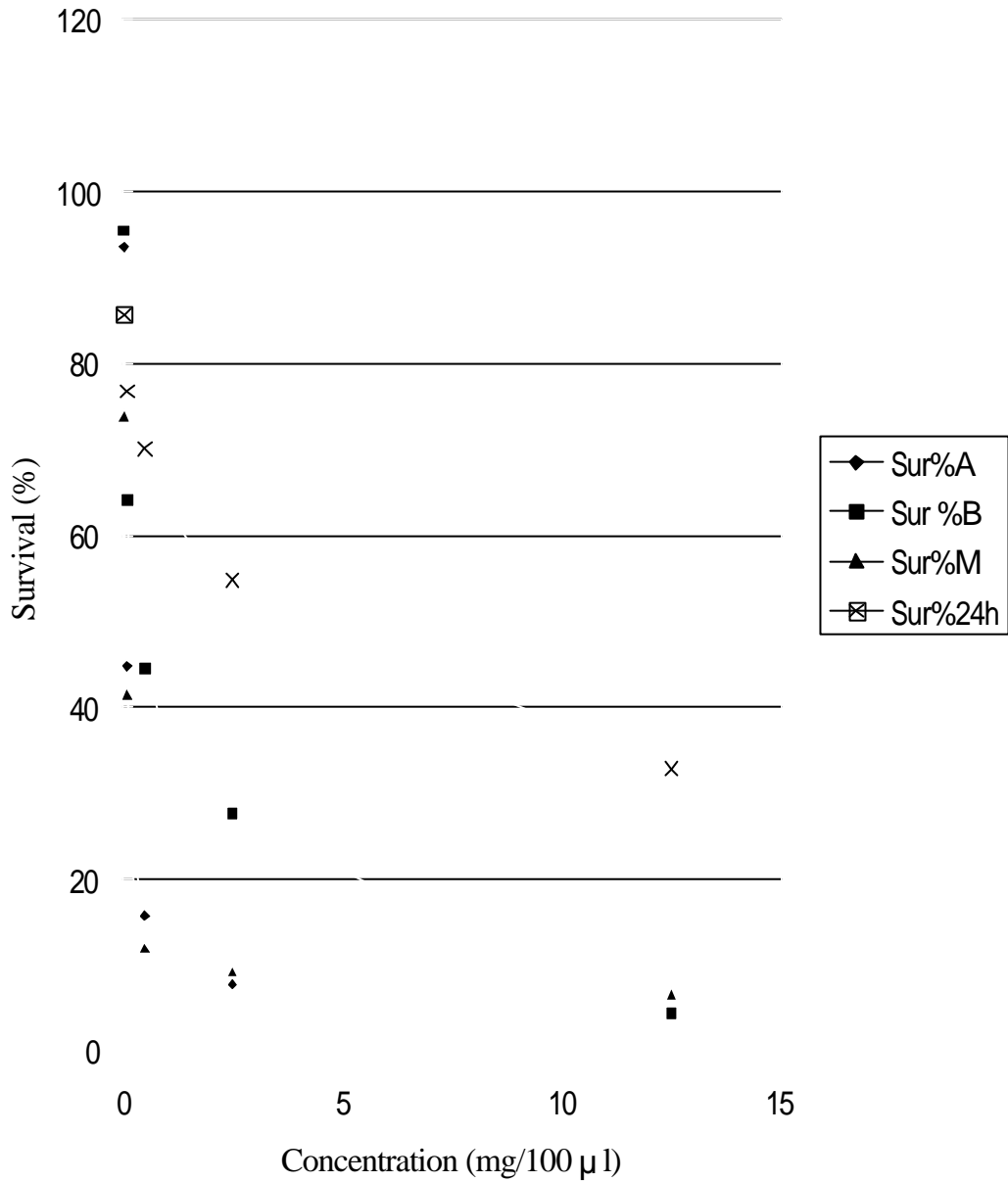
玖、圖

Fig.1. 以MTT assay評估Canals對口腔鱗狀細胞癌細胞株(OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)



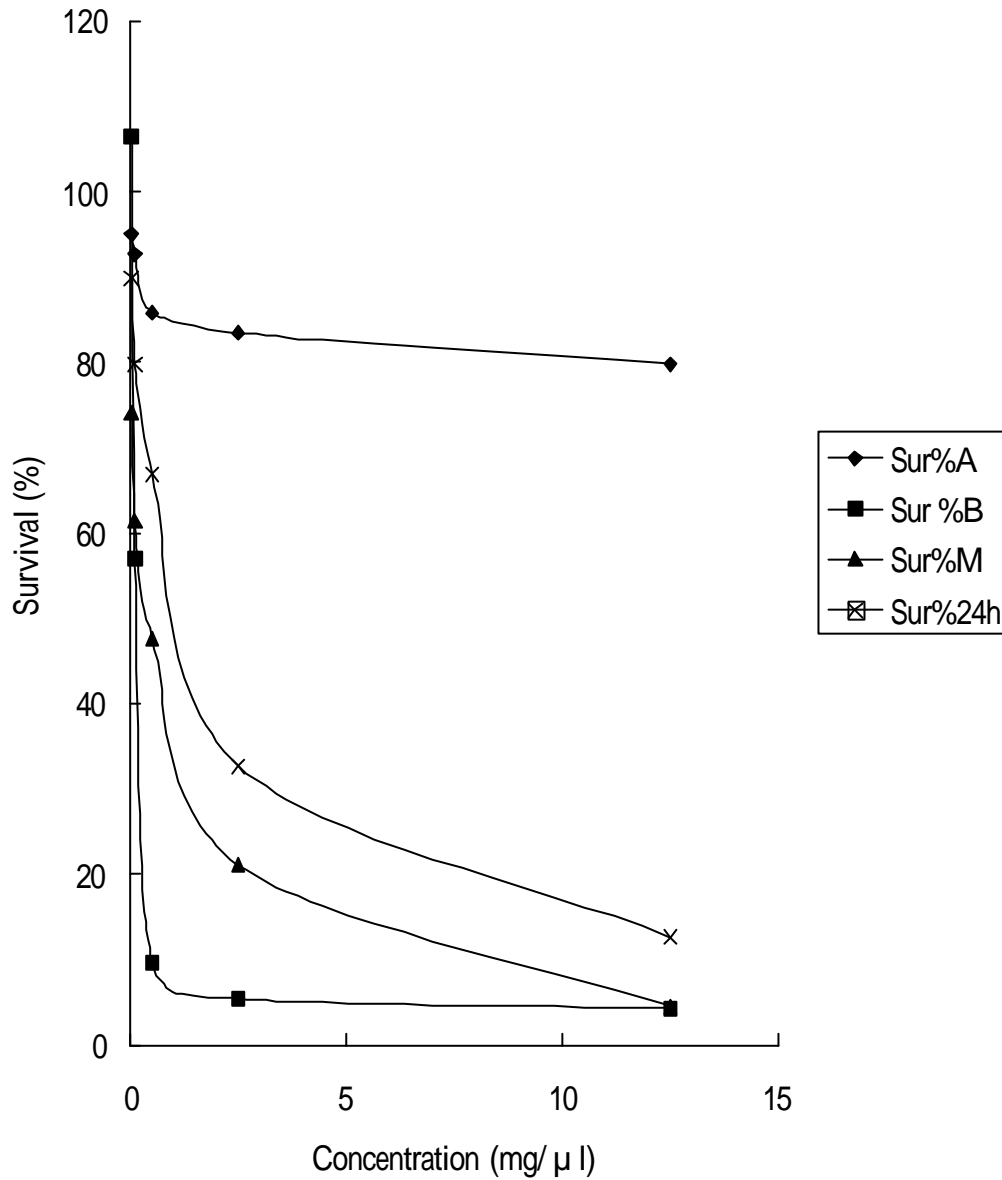
$$\% \text{ Survival rate} = \left[\frac{(\text{The absorbance of treatment of sample} - \text{the absorbance of medium})}{(\text{The absorbance of DMSO control group} - \text{the absorbance of medium})} \right] \times 100\%$$

Fig.2. 以MTT assay評估Canals-N對口腔鱗狀細胞癌細胞株 (OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)



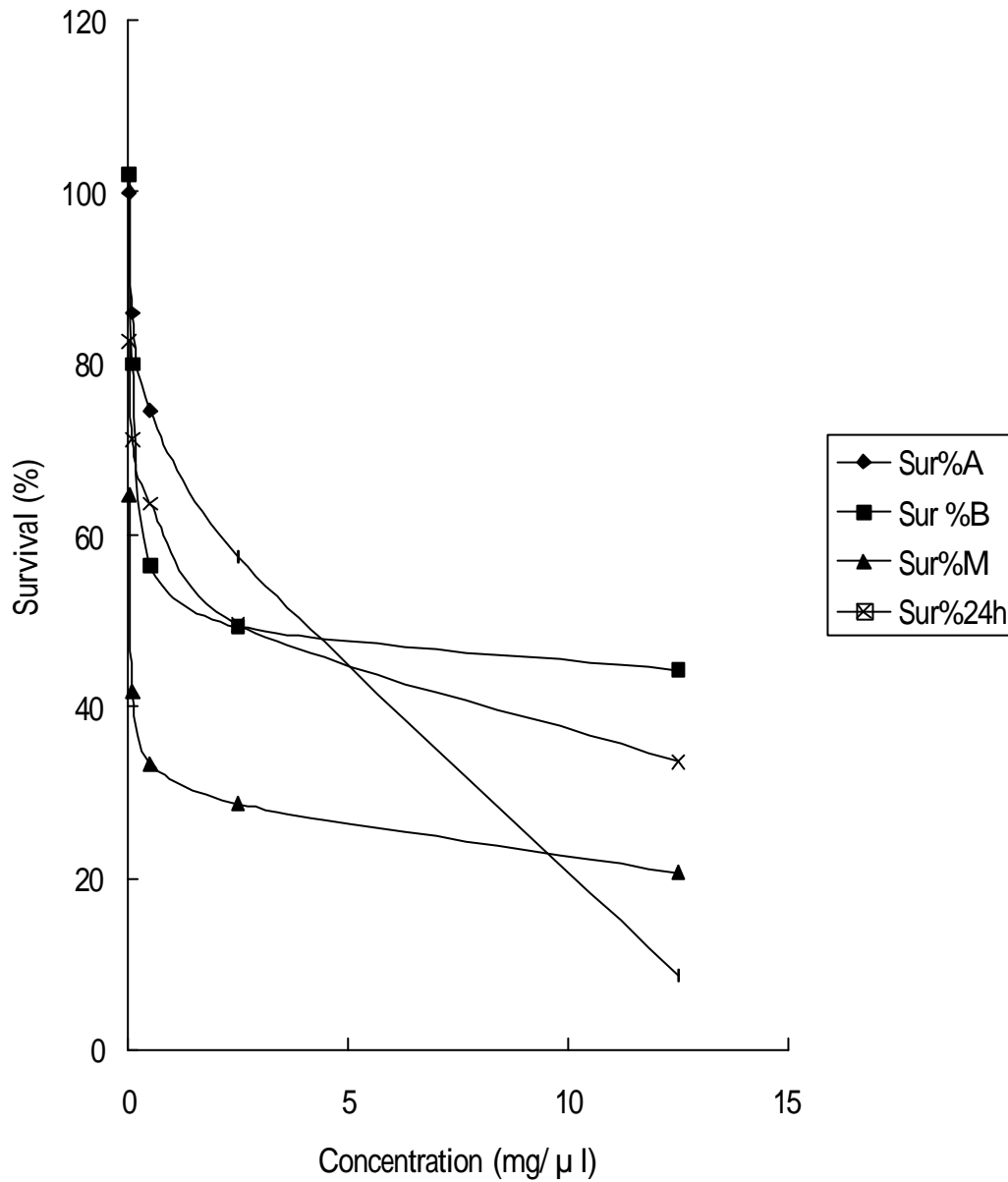
$$\% \text{ Survival rate} = \left[\frac{(\text{The absorbance of treatment of sample} - \text{the absorbance of medium})}{(\text{The absorbance of DMSO control group} - \text{the absorbance of medium})} \right] \times 100\%$$

Fig.3. 以MTT assay評估Tubi-seal對口腔鱗狀細胞癌細胞株 (OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)



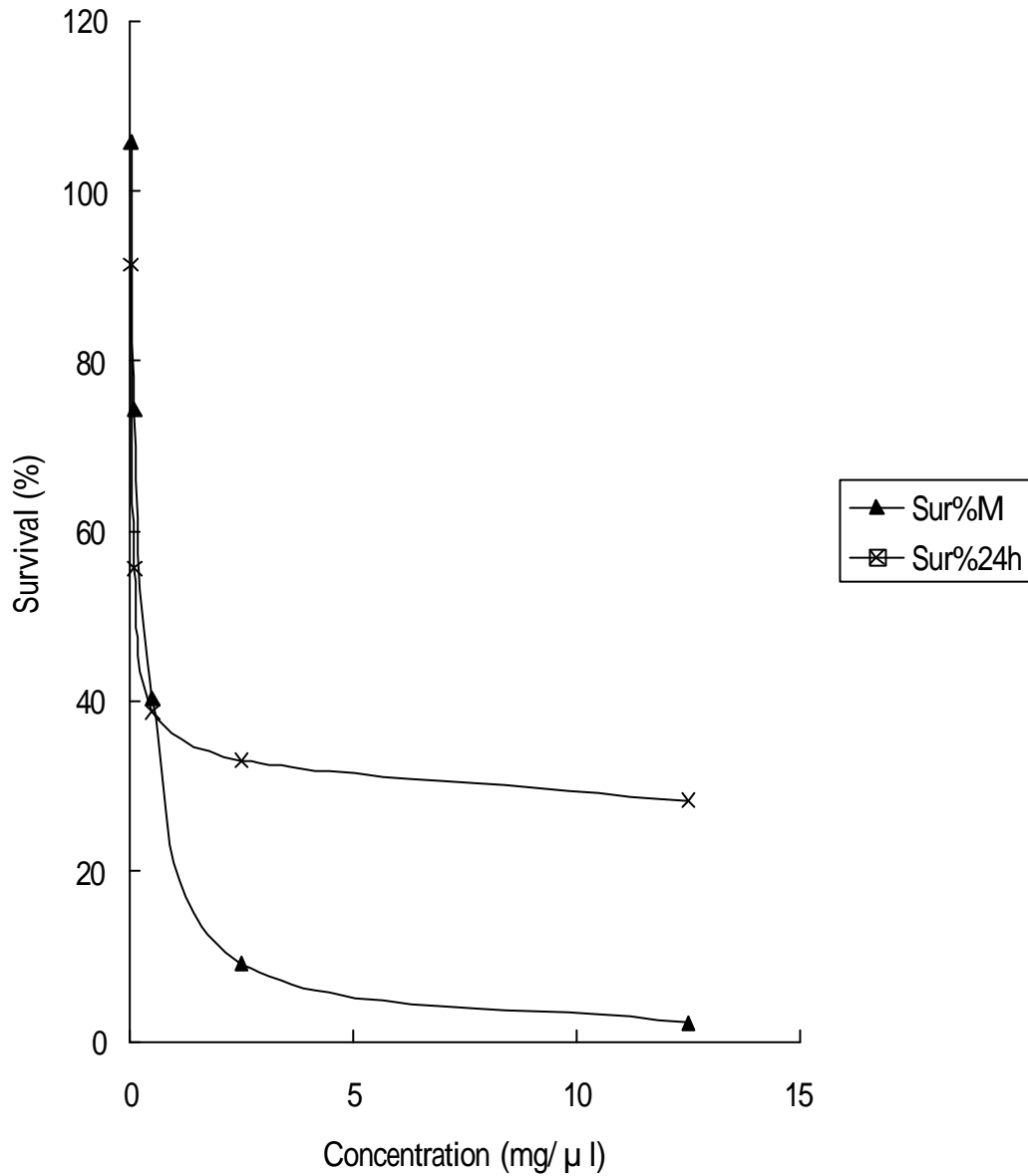
$$\% \text{ Survival rate} = \left[\frac{(\text{The absorbance of treatment of sample} - \text{the absorbance of medium})}{(\text{The absorbance of DMSO control group} - \text{the absorbance of medium})} \right] \times 100\%$$

Fig.4. 以MTT assay評估 Sealapex對口腔鱗狀細胞癌細胞株 (OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)



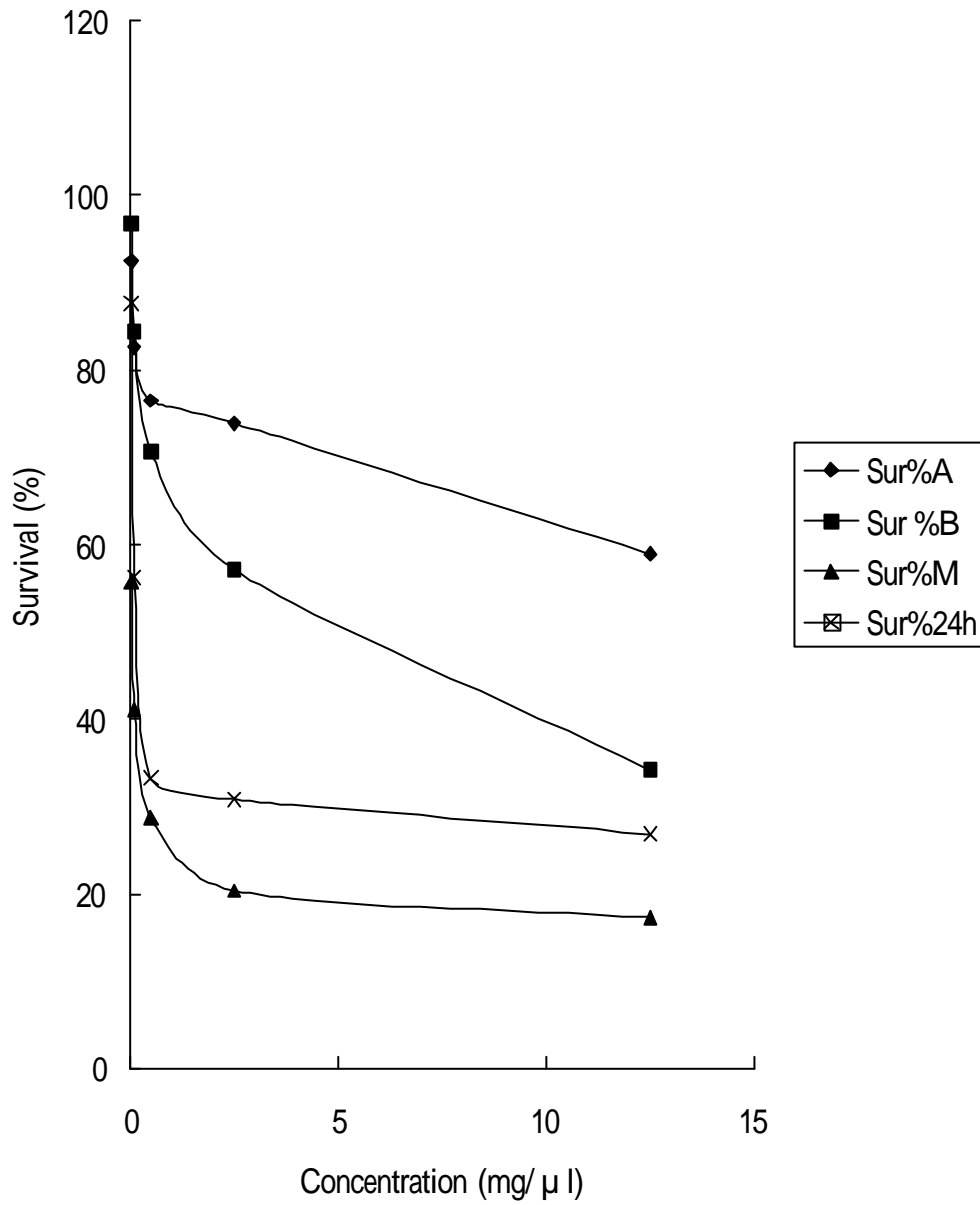
$$\% \text{ Survival rate} = \left[\frac{\text{The absorbance of treatment of sample} - \text{the absorbance of medium}}{\text{The absorbance of DMSO control group} - \text{the absorbance of medium}} \right] \times 100\%$$

Fig.5. 以MTT assay評估Vitapex 對口腔鱗狀細胞癌細胞株 (OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)



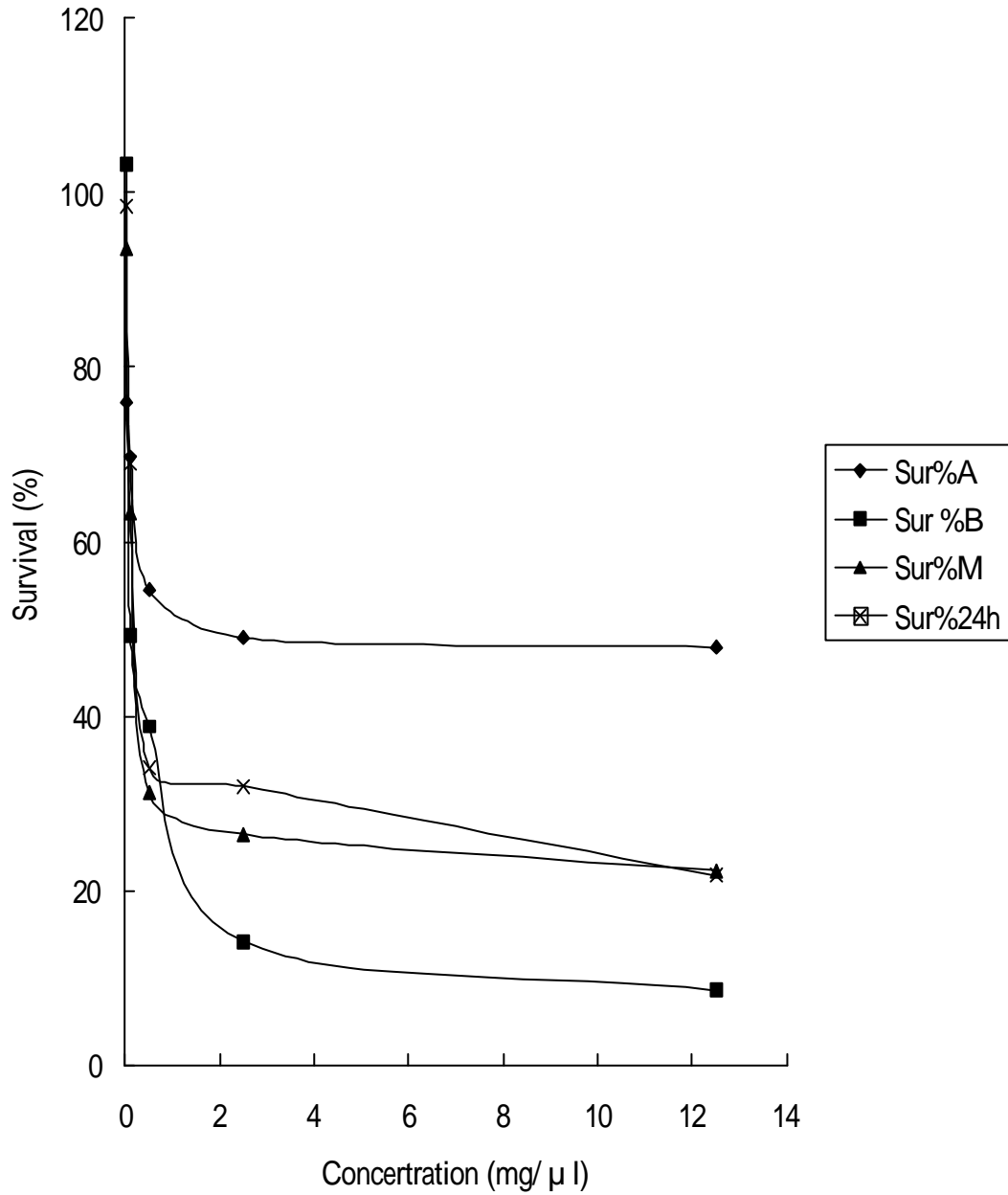
$$\% \text{ Survival rate} = \left[\frac{\text{The absorbance of treatment of sample} - \text{the absorbance of medium}}{\text{The absorbance of DMSO control group} - \text{the absorbance of medium}} \right] \times 100\%$$

Fig.6. 以MTT assay評估AH26對口腔鱗狀細胞癌細胞株 (OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)



$$\% \text{ Survival rate} = \left[\frac{(\text{The absorbance of treatment of sample} - \text{the absorbance of medium})}{(\text{The absorbance of DMSO control group} - \text{the absorbance of medium})} \right] \times 100\%$$

Fig.7. 以MTT assay評估AH plus對口腔鱗狀細胞癌細胞株(OC2)的細胞毒性(Cytotoxicity)



$$\% \text{ Survival rate} = \left[\frac{(\text{The absorbance of treatment of sample} - \text{the absorbance of medium})}{(\text{The absorbance of DMSO control group} - \text{the absorbance of medium})} \right] \times 100\%$$

Fig.8. 利用口腔鱗狀細胞癌細胞株(OC2), 以 MTT assay 評估作用時間與細胞毒性(cytotoxicity)間的關係

