

# 中山醫學大學口腔醫學研究所

碩士論文

Master Thesis, Institution of Stomatology

Chung Shan Medical University

題目：

金屬製齒列矯正支架釋出物對人類細胞之生物相容性

The biocompatibility of metal bracket elutions  
on human cells



研究生：許挺正 (Ting Cheng Hsu)

指導教授：高嘉澤 (Chia Tze Kao) 教授

中華民國九十二年七月

# 目錄

## 壹、摘要

一、 中文摘要

二、 英文摘要

## 貳、前言介紹

一、 齒列矯正支架材料

二、 齒列矯正支架材料之生物相容性文獻回顧

三、 細胞死亡的形式

1 細胞壞死(necrosis)

2 細胞凋亡(apoptosis)

四、 顯微鏡下細胞的觀察

五、 細胞內的訊息傳導

## 參、研究動機與目的

## 肆、研究材料與方法

一、 細胞培養

一-1 細胞選取及來源

一-2 冷凍細胞活化

二、實驗方法與步驟

二-1 釋出液的備製方法:

二-2 細胞毒性測試

二-3 顯微鏡下的細胞形態觀察

二-4 西方點墨測試(Western Blotting)

4.1 西方點墨測試之樣品細胞蛋白質的製備

4.2 溶解所培養的細胞 (lysis of cultured cells)及蛋白質萃取

4.3 蛋白質定量 (Brodford total protein assay)

4.4 蛋白質電泳分析(SDS-PAGE)

4.5 SDS-PAGE 的配製

4.6 SDS-PAGE 實驗操作過程

4.7 將 SDS-PAGE 轉移至 PVDF membrane 上

4.8 西方點墨分析 Western Blotting

二-5、DNA fragmentation(Apoptotic DNA fragment analysis)

伍、結果 (result)

陸、討論 (discussion)

柒、結論 (conclusion)

捌、Reference

玖、圖表與資料照片

## 壹 摘要

### 壹-一

### 中文摘要

臨床上金屬齒列矯正支架須有一段時間使用於口內，由於不銹鋼金屬會有腐蝕之現象，因此，材料的穩定性及生物相容性則非常重要。對細胞而言，外來刺激造成細胞毒性的結果可能造成細胞死亡，死亡路徑有兩種：一、細胞壞死(necrosis)；二、細胞凋零(apoptosis)。由於，金屬齒列矯正支架的釋出物於生物學上的反應或變化的研究報告甚少，過去的研究結果顯示，金屬齒列矯正支架會釋出金屬離子，因此，本研究的目的以體外測試模型，探討鍍鈦與無鍍鈦金屬齒列矯正支架釋出物對細胞株之反應及細胞內的機轉。本研究以人類骨肉瘤細胞株(U2OS)和牙齦纖維細胞株(HGF)作為觀察之細胞，選擇四種品牌(Dentuarm、Tomy、Unitek、Ormco)的齒列矯正支架，表面以氮化鈦處理後，浸泡在 PH 值不同(PH4 以及 PH7)的人工唾液中兩年的時間,抽取它的釋出液來做測試。以 MTT assay 測定細胞存活率，以西方墨點分析法分析細胞內蛋白質之變化，以 DNA fragment 分析判斷 DNA 是否受損。結果發現本研究中不論有無鍍氮化鈦之金屬齒列矯正支架釋出液對於 U2OS 及 HGF 細

胞株不具細胞毒性，於顯微鏡下觀察細胞型態無變化，不同組別的細胞並沒有發現細胞凋零體(apoptosis body)出現。以西方點墨法分析發現 ERK 蛋白質增加，p53、bax 蛋白質沒增加。於 DNA fragmentation 分析結果發現，DNA 沒有基因毒性的現象。結論：金屬齒列矯正支架不論有無 TiN 處理，經過長時間的浸泡，其釋出液並不會對培養中 U2OS 和 HGF 細胞造成傷害。於臨床使用鍍鈦或無鍍鈦之齒列矯正支架，其結果是，雖然和口腔長期接觸，但是卻不會造成細胞毒性，可以提供臨床醫師參考。

## ABSTRACT

壹-二

The aim of this study was to deliberate the metal bracket cytotoxicity , genotoxic effect , and its possible signaling pathway in cell. Four brands of upper central incisor brackets (Dentaurum, Tomy, Unitek, and Ormco) are chosen in the experiment. They are divided into two groups: the TiN-coated and the non-TiN coated bracket. The TiN-coated and the non-coated brackets are immersed in pH4, and pH 7 artificial saliva solution and stored at 37° C in the incubator. The dissolving solution are used in this experiment. The MTT assay was employed to quantify differences in cell activity and viability. DNA fragmentation assay was to evaluate the DNA damage. The MAPKs Kinase expression were detected by using the western immunoblotting techniques. Patterns of change in expression were scanned and analyzed using the NIH image 1.56 software. The morphological of cells were no change after adding dissolving solution. The cell viability showed no statistical difference in the experimental groups. The p53 , bax protein showed the decreased content. The DNA ladder were not found on DNA fragmentation.

Conclusion:

The immersed solution of TiN coated and non TiN coated brackets is not toxic to the U2OS and HGF cell line in vitro.



## 貳 前言介紹

在齒顎矯正治療的過程中，使用到很多金屬材料，由於矯正治療的時間相當長，所以這些金屬材料存在於口腔環境也相當的長，口腔是一個多變複雜的環境，原本口內的酸鹼值是接近中性的環境，但因飲用酸性的飲料、食物或食物被微生物分解等都會產生酸，而使口腔變為酸性的環境，加上冷熱飲食，造成溫差的變化以及潮濕的環境，很容易造成金屬的腐蝕與變性，因此這些金屬材料都必須有相當優良的抗腐蝕性和生物相容性才行。假如這些金屬材料抗腐蝕性不佳，就很容易從這些腐蝕金屬表面釋放一些金屬元素，雖然微量金屬元素在人體體內是必需(例如：Fe、Cu 等)，但額外的金屬元素存在體內是否對人體健康有害也是值得關注的。

矯正材料，其發展已由早期貴金屬的應用到現今鎳鉻合金、鈷鉻合金、鎳鈦合金等材料都有。有些製作支架的材料並已跳脫金屬的範疇，有陶瓷、塑膠等托架，然而因金屬材料機械性質好、成型容易、價格便宜、不易斷裂等特性使得在托架的應用上雖然沒有陶瓷的高硬度、好的外觀但仍是市場上使用最多的支架。金屬存在溶液中產生腐蝕是一種自然現象，而金屬齒列矯正支架不管它是再利用的或是全新

的，只要存在口腔或人工唾液中一段時間也都會有腐蝕的現象出現，只是各種狀況下腐蝕的量不同。所以，理想的金屬齒列矯正材料都應該具下列特性：

- 1.對牙齒周圍組織無毒性、
- 2.具有穩定的機械性質、
- 3.不被組織吸收、
- 4.不會被溼氣所影響、
- 5.不會腐蝕、
- 6.具高硬度、
- 7.低磨擦係數、
- 8.高熔點、
- 9.具低電化學活性、
- 10.具優良的生物相容性。

## 貳-一 矯正支架材料

金屬齒列矯正支架中以不銹鋼的材質製做是最普遍。不銹鋼是以鐵為基本材料再添加其他合金元素，而合成的合金鋼，其中，添加 C、Mo、Ti、Al、Cu、N 可以增加強度；添加 Cr、Ni、Mo 可以增加耐蝕性；添加 Ni 可增加韌性和成型性能；添加 S、P、Se 可增加切削性；添加 C、Mn 可增加硬度。鉻通常是最主要的合金元素，含量至少 11% 才能稱為不銹鋼，鎳為第二主要合金元素。如果需要更大或特殊的抗腐蝕性能，則必需添加鉻或添加其它合金如鉬、銅、鈦等。至於，金屬表面之防腐蝕處理，可以使用 TiN 或 CrN 的鍍膜原理，過去本研究室，曾經探討有無 TiN 鍍膜之齒列矯正支架，其金屬離子釋出量的變化，但對釋出之金屬離子溶液於細胞的反應，則尚未研究。

## 貳-二 齒列矯正支架細胞毒性方面之文獻回顧

口腔是一個複雜的環境，會隨著食物的分解而改變酸鹼值和食用食物的溫度變化而改變口腔溫度，所以很容易造成金屬的腐蝕和物理性質的變化。在 1986 年 Maijer 與 Smith，就發現在一個口腔衛生不佳的病人易使不銹鋼托架底部形成間隙腐蝕，使得琺瑯質受到染色 (stain)，且在染色沈澱中也發現有 Cr、Ni 元素存在。在 1991 年 Wataha J.C.將牙科 casting 合金分別放在含有蛋白質和不含蛋白質的萃取液，結果發現含蛋白質的萃取液釋放出較多的離子，這證明了口腔中的唾液會幫助金屬的腐蝕。學者 Eliades T.等人也曾於 2002 年的研究中提到 orthodontic stainless steel 和 nickel-titanium 合金長期放在口腔環境中會造成腐蝕，有以下的幾種腐蝕型態，均勻腐蝕 (uniform corrosion)、孔穴腐蝕 (pitting corrosion)、間隙腐蝕 (crevice corrosion)、伽凡尼腐蝕或二種金屬間的腐蝕 (galvanic corrosion or two-metal corrosion)、晶界腐蝕 (intergranular corrosion)、沖磨腐蝕或磨損 (Erosion-corrosion and fretting)、微生物誘導腐蝕 (Microbiologically induced corrosion)、應力腐蝕破(stress corrosion cracking , SCC)、疲勞腐蝕破裂(corrosion fatigue cracking) 等等，他經過一些實驗證明他發現口內環境會造成腐蝕的幾個因子，有以下幾種: saliva、環境因子例如口呼吸或是特殊的飲食習慣、口腔中特殊的微生物聚落。所以說，口腔環境會造成金屬的腐蝕，

而且會隨著不同的金屬合金，而產生不同的金屬離子。我們知道，人體內需要一些微量的金屬，幫助身體的細胞和組織的運作，但是由環境中攝入多餘的金屬或金屬離子，是否對細胞或甚至於人體產生傷害，學者們有著不同的論點。有一派學者認為影響不大，例如:1986年 Warner G.L.,指出金屬離子  $Pb^{+2}$ 、 $Ni^{+2}$ 、and  $Zn^{+2}$  會造成 murine T cell 的增生。在 1991 年 Michel R.曾經對牙科種植體造成的系統影響做過研究，他把金屬合金釋放出的十六種元素做分析，發現增加的金屬離子都不會造成身體系統的傷害。1999 年 Jia W. 的實驗證明矯正弓線所釋放出的鎳離子量大約低於造成人體毒性的七百分之一。1999 年 Trepanier C.曾經把 Shape Memory NiTi Stent(鎳鈦記憶金屬模版)作表面處理分成三組 PA(passivated stents)、AA(air aged samples)、HT(heat treated stent) ，然後做體外的細胞增殖測驗，結果發現這三組材料跟細胞接觸，相容性非常好,所產生的生物相容性也很不錯。在 2001 年 Agaoglu G.曾經把固定式矯正裝置放到口中之後，評估它們在口腔與血清中的含量,結果發現，Nickel and Chromium 在唾液和血清中都有增加，但是沒有達到造成毒性的程度。2002 年 Kapanen A.的研究發現，osteoblastic type ROS-17 cells 對 NiTi 金屬合金的生物相容性很好。但是也有不少的學者採取相反的觀點，例如:1990 年 Bravo I.研究指出不同的八種金屬離子( $Fe^{3+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Mo^{2+}$ 、 $V^{5+}$ 、 $Cr^{6+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ti^{3+}$ )會對淋巴細胞的

分化造成影響。1998 年 Griem P.發現 T cell 會對重金屬產生 cross-reactivity。2001 年 Wataha J.C.的研究指出，Nickel 會因腐蝕而釋放出 Ni 離子造成組織的發炎。2001 年 Hallab N.J.研究報告指出，金屬和蛋白質的複合體會促進淋巴細胞的分化。2002 年 Doyle D.曾經使用  $MnCl_2$  來做細胞毒性的測試,結果發現,1 和 10Mml 的  $MnCl_2$  都會明顯造成細胞存活率的降低。由於導致細胞或人體發生反應的因素，最主要都是因為金屬腐蝕，造成金屬離子的釋出，因此有一些學者就開始研究，如何降低金屬產生繡化的現象，以及這些金屬和生物相容性的關係，例如:1999 年 Grill V.使用 extracellular matrix 去評估細胞和金屬之間的相容性，結果發現，含 Ag 和 Cu 的成份越多相容性越好。如 1997 年 Platt JA.等學者在 0.9% 的 NaCl 金屬長期溶液的研究就發現 316L stainless steel 的抗腐蝕能力比 2205stainless steel 弱。1998 年 Matasa CG，以 PH17-4 和 316L 不銹鋼來做研究結果發現，316L 的硬度沒有 PH17-4 高，但在抗腐蝕能力方面 316L 就比 PH17-4 的材質為佳，因此認為要兼俱有好的強度與化學抗力在現今的材料是少見的。2002 年 Kuroda K. 曾經把 calcium phosphate 利用燒附的方法把他鍍到鈦金屬表面,結果發現,在不同的 PH 值下，會影響燒附的量，而且燒附的量和平均度都會影響到金屬的性質，一般而言，做金屬表面燒附會增加金屬的抗腐蝕性。2000 年 Locci P.曾經做過矯正金屬的生物相容性的測

試，他使用人類的牙齦細胞作測試，以及 304、316 的 stainless steel 分別燒附上鉛、銅、銀等金屬來作實驗，他發現純粹沒有燒附金屬的 304、316 的 stainless steel 比燒附過的有較好的生物相容性而且鉛和銀的毒性比其他金屬大，所以，要兼具有好的強度與生物相容性，在現今的材料學中是很重要的。

透過細胞間的訊息傳導可了解，金屬離子和生物相容性的關係。例如:Schedle A.在 1998 年的研究中，指出在 14 種金屬離子中，以  $\text{Ag}^+$  和  $\text{Hg}^{2+}$ ， $\text{Au}^{3+}$  最會造成血液中的 basophils，KU-812，mast cells 和 HMC-1 釋放 histamine， $\text{Pt}^{4+}$ 則會造成細胞的凋零。Messer R.L.W. 在 2000 年使用 nickel-chromium alloys 的浸泡液來作實驗，結果發現，這些金屬鹽離子所組成的浸泡液，會改變細胞的功能，例如 DNA,RNA, 和蛋白質的合成，細胞內的 ATP levels,G6PT 去氫酶的活性等等，但是不同的金屬離子溶液對細胞功能的影響不一樣，所以他認為，這可能和金屬離子的離子化學，或離子價，或是 dose-time 的依賴性有關。2001 年 Lovschall H.曾經使用三種測試細胞毒性的方法 MTT、Neutral red、BrdU，對同樣的細胞做測試，結果發現不同細胞對不同方法反應不一樣，有些甚至沒有反應。2002 年 Yua L.H.等人研究發現 bax 和細胞的 apoptosis 有關，他發現 bax 的抑制劑會抑制細胞透過 bax 的路徑死亡，但是不會完全阻斷，他會干擾細胞透過 caspase 路徑的 apoptosis。於

2002 年 Pioletti D. P.的研究中發現,implant particles 會導致未成熟的 osteoblasts 走向 caspase-dependent 凋零的路徑。2002 年 Malagutia C.利用 yessotinxin 來誘發 Hela cell 的 apoptosis，結果發現，這種毒性物質，會造成細胞遺失掉 PARP(poly{ADP-ribose}polymerase)，並透過 caspase 路徑，造成細胞凋零。



### 貳-三、細胞死亡途徑

細胞因藥物的過量刺激後可能會造成細胞的死亡，而細胞死亡通常經由以下兩種路徑：壞死、凋零。

#### 貳-三-1 壞死(necrosis)

細胞壞死(necrosis)通常發生在細胞遭受到過大的傷害，通常是由過量的細胞毒性物質所引起，(Studzinski GP, 1994)。當細胞膜遭受傷害，細胞爲了維持體內平衡，一些細胞內的胞器，例如:粒線體以及整個細胞都會有膨脹及溶解的現象(SchwartzmanR.A., 1993;VermeesI, 1994)，因爲細胞膜被溶解了，一些細胞內容物，包括溶解酵素會釋放到細胞外液(extracellular fluid)，造成劇烈發炎反應，於是產生壞死細胞(necrotic cell)，(Van Furth R et al, 1998)。

#### 貳-三-2 凋零(apoptosis)

apoptosis 發生於兩種不同的生理狀態下，一種是，細胞遭受到機械性的傷害或是暴露到有毒性的化學物質，另一種情形是細胞積極(active)的進行自殺(cellular suicide)。細胞在發生 apoptosis 現象時，會有細胞收縮、細胞核與細胞質會聚合、粒腺體破裂釋放出 cytochrome C，在細胞核內的 chromatin 會降解掉、DNA 退化分解或斷裂、然後細胞分裂爲數個由細胞膜包含的小體(apoptotic bodies)。

會造成這個現象,有兩個理由:

- 1.細胞 mitosis 所造成的自然現象
- 2.細胞自行摧毀自己,對抗外來的入侵和傷害例如:細胞遭受到病毒感染、細胞因爲自體免疫的反應、細胞的 DNA 受到傷害或者是細胞本身是 Cancer cells 。

造成細胞 Apoptosis 的路徑可分成兩種

1. 內部訊息所引發的凋零:經由內生性或是粒腺體的路徑(Apoptosis triggered by internal signals: the intrinsic or mitochondrial pathway):

在健康的細胞的粒腺體上有 Bcl-2 蛋白質, Bcl-2 蛋白質上連結 Apaf-1 蛋白質當細胞遭到 Internal damage, 就會促使 Bcl-2 蛋白質釋放 Apaf-1, Apaf-1 會導致粒腺體釋放 cytochrome c, cytochrome c、Apaf-1、caspase 9 會形成複合體 就叫 apoptosome, 接著就造成 DNA 的裂解,產生 Apoptosis 的現象。

2. 外部訊息所引發的凋零:經由外生性或是死亡接受器的路徑 (Apoptosis triggered by external signals: the extrinsic or death receptor pathway):

細胞表面有 Fas 和 TNF receptor, 它們可以連結 death activator, 進一步活化 caspase 8 (類似 caspase 9), 產生 apoptosis 的現象。

## 貳-四 顯微鏡下細胞的觀察

當細胞進行壞死(necrosis)的過程，顯微鏡下會出現以下的外觀

- a.粒腺體產生變化，不斷的膨脹，進一步產生溶解的現象
- b. 核染質沒有巨大的變化
- c.細胞膜產生破裂的現象

當細胞進行凋零(apoptosis)的過程，顯微鏡下會出現以下的外觀

(morphological)及生化(biochemical)特徵變化(Cohen 等人，1993)：

- a.核染質的聚集(chromatin 的 aggregation)
- b.細胞核與細胞質的濃縮(nuclear and cytoplasmic condensation)
- c.apoptotic bodies 的產生
- d.在生物體內(in vitro)，這些 apoptotic bodies 很快的被 macrophage 或是 adjacent epithelial cells 辨識出(recognized)及吞噬(phagocytized)。(Savill J etc.al，1989)
- e 在生物體外(in vitro)，這些 apoptotic bodies 與細胞斷片(cell fragments)會膨脹(swell)，最後被溶解。

## 貳-五、細胞內的訊息傳導

細胞的生存跟許多因子有關，這些因子包括細胞與細胞之間的訊息傳遞・細胞外間質(extracellular matrix)訊息傳遞及細胞漿液(Serum)裡的生長因子等(Chinnaiyan A.M，1996)。細胞的反應會隨著生長環境的改變而有所變化，環境的改變包括養份的含量、生長因子、滲透壓，氧化還原反應、pH 值等，而這些改變因素也和細胞的遷移(migration)、增殖(proliferation)、分化(differentiation)、死亡等息息相關，在目前的研究報告中指出 mitogen-activated protein kinases(MAPKs)家族 caspas 家族以及 bcl-2 家族在凋零的訊息傳遞過程中扮演重要的角色。

### 貳-五-1 MAPK 家族所調控的細胞訊息傳導:

Growth factor  $\uparrow$  → Ras  $\uparrow$  → MAPK/ERK  $\uparrow$  → Cell proliferation  $\uparrow$

MAPK 家族包含四種次成員,包括 ERK,JNK,P38MAPK 以及 ERK5/BMK1 他們的反應路徑都相似，

接受刺激→MAPKKK→MAPKK→MAPK→細胞產生反應。不同之處在於 MAPK/ERK 的訊息傳導能被多種的生長因子、細胞因子所活化,它主要在促進細胞增殖和分化。Ras 路徑、PKC 路徑、G-protein 以及磷脂酸都可以激活 MAPK 路徑，所以說 MAPK 是一個很複雜的路徑。

貳-五-2 caspases 家族的分類、功能與激活:

1. DNA damage → p53 ↑ → bax ↑ → bcl-2 ↓ → Apaf-1 ↑ → caspase9 ↑ →  
caspase3 ↑ → apoptosis

2. Death factors ↑ → FAS ↑ → caspase8 ↑ → apoptosis

caspase 家族總共有 10 個 caspase-1~caspase-10，根據 caspase 一級結構和其 N 端的傳導蛋白質-蛋白質相互作用的原結構域(prodomain)情況，還可將 caspase 分為兩大類:

1. 啟動者(initiator): 如 caspase8, 9 和 10，他們具有長的 N 端原結構區，caspase8 和 10 的原結構區內含兩個串連的死亡效應區(death effector domain, DED)，兩個 DED 與其 C 端的催化區結合，使後這處於活化狀態。Caspase9 的原結構區中含有一個 caspase 募集功能區(caspase recruitment domain, CARD)，CARD 的結合類似 DED，用來傳導這類的 caspase 與上游死亡信號傳導通路中的分子。

2. 效應者(effector): 主要執行細胞凋零的作用，如 caspase-3、6、7，所以只要發現這幾個蛋白質，就可以確定細胞在進行 apoptosis 的過程。

貳-五-3 透過 p53 基因觸發的凋亡的訊息傳導:

DNA damage → p53 ↑ ↗ p21 ↑ → cell arrest

↘ caspase3 ↑ → apoptosis

p53 參與病毒感染、細胞癌基因異常表達與腫瘤抑制基因產物的缺乏或是毒物誘發的凋零。p53 蛋白可以親自參與細胞凋亡,也可以透過激發一些蛋白質或基因來造成凋零,最常見的有 WAF1、mdm2、gadd45、cyclinG、bax 及 Igf-bp3。在正常的情況下, p53 蛋白質的表現很低,但是一旦發生 DNA 傷害時會活化 p53,它不單是增加 p53 的量,並且會使得 p53 活化,去當一個轉錄因子,去活化下游一些目標元素上具有 p53 反應促進子的基因。p53 下游可以調控細胞走兩個路徑:細胞周期停止路徑或是或是細胞凋零路徑。在 cell cycle arrest 方面, p53 可藉由調控 p21, p16 cyclin D1, cdk4 及 Rb 來導致 cell cycle arrest。在細胞凋零調空方面, bax 及 IGF-bp3 基因的表達的激活可以影響細胞進入凋亡的決策過程。p53 可以使 bax 表達增加,增多的 bax 可促進細胞凋亡的發生。

貳-五-4 bcl-2 家族所調控的細胞訊息傳導:

DNA damage → p53 ↑ → bax ↑ → bcl-2 ↓ → Apaf-1 ↑ → caspase9 ↑ →  
caspase3 ↑ → apoptosis

在哺乳細胞中已鑑定了至少 15 種的 bcl-2 家族成員,按功能又可分為抑制凋零或促進凋零兩個亞家族。

1.抑制凋零的 bcl-2 家族:包括 bcl-2、bcl-xL、bcl-w 及 Mcl-1 等。他們過量表達可阻斷因細胞存活因子短缺、輻射、抗腫瘤藥物、c-Myc 等不同刺激誘發細胞凋亡。它們主要存在粒線体的外膜上,bcl-2 抑制凋亡的機制是細胞色素 C,他可以直接或間接地阻止細胞色素 C 自粒線體的釋出,而且後者可與 ATP 一起改變 apaf-1 構造而使 caspase-9 活化。bcl-2 及 bcl-xL 在體內外還可抑制 FAS 傳導的凋亡。

2.促進凋零的 bax 亞族:包括 bax、bak、bad、bik、bid、bim、bok 及 bcl-xs,他們過度表現可以誘發細胞凋亡,實驗證明該亞族成員的 BH3 區域為他們促進凋亡所必須。

### 叁 研究動機與目的

在過去的研究中，發現不論有無 TiN 鍍膜，金屬齒列矯正支架會隨著口腔的環境變化而釋放出金屬離子，此釋出離子，對於生物學上的變化值得探討。因此本研究目的為：探討有無鍍膜之金屬齒列矯正支架，經長時間浸泡釋出之溶液，對於 U2OS 及 HGF 細胞之生物學上的效應，以及細胞內之蛋白質變化。



## 肆 研究材料與方法

### 肆-一、細胞培養

#### 肆-一-1 細胞選取及來源

食品工業發展研究所菌種保存中心-國家衛生研究院細胞庫

新竹市食品路 331 號

#### 細胞株資料表一

菌種中心編號		CCRC60187	
細胞株名稱		U2OS	
細胞株來源		ATCC HTB-96	
組織來源		Human Osteogenic sarcoma	
冷凍管容量	1ml	濃度	$2.1 \times 10^6$
冷凍日期	june.21.2001	繼代數	Unknown+4atCCRC
培養基		Mccoy' s 5A medium with 1.5mM L-glutamine, 90% FBS10%	
培養條件		37°C, 5% CO <sub>2</sub>	

冷凍培養基	93% culture medium+7% DMSO
培養基更換	一星期 2 到 3 次
繼代培養	<p>移去培養基，用 PBS 洗滌二次後除 trypsin-EDTA 溶液，使其能 rinse 所有細胞後，移去 trypsin-EDTA，放入培養箱 37°C 作用 2-3 分鐘後，輕拍培養皿使細胞脫離並加入新鮮培養基，均勻混合後轉移至新的培養皿中。</p>
繼代稀釋比例	1 : 3 至 1 : 6
污染測試	negative bacteria fungi and hycoplasma

細胞株資料表二

菌種中心編號		CCRC60181	
細胞株名稱		HGF	
組織來源		Human gingiva fibroblast	
冷凍管容量	1ml	濃度	$2.1 \times 10^6$
冷凍日期	june.21.2001	繼代數	Unknown+4atCCRC
培養基		DMEM medium with 1.5mM L-glutamine, 90% FBS10%	
培養條件		37°C, 5% CO2	
冷凍培養基		93% culture medium+7% DMSO	
培養基更換		一星期 2 到 3 次	
繼代培養		移去培養基，用 PBS 洗滌二次後 除 trypsin-EDTA 溶液，使其能 rinse 所有細胞後，移去 trypsin-EDTA， 放入培養箱 37°C 作用 2-3 分鐘 後，輕拍培養皿使細胞脫離並加	

	入新鮮培養基，均勻混合後轉移至新的培養皿中。
繼代稀釋比例	1 : 3 至 1 : 6
污染測試	negative bacteria fungi and hycoplasma

肆-一-2 冷凍細胞活化(資料來源：食品工業發展研究所菌種中心-國家衛生研究所細胞庫)

冷凍細胞解凍程序：

1. 將冷藏的培養液置於 37°C 水槽中回溫，回溫後以 70% 酒精擦拭瓶口並移到無菌操作檯內。自液態氮或-80°C 冰箱取出冷凍管，立即放入 37°C 水浴槽中快速解凍，水浴高度不可接近或高過冷凍管之蓋沿，否則容易發生污染。輕搖冷凍管使其在 1-3 分鐘內全部融化，以 70% 乙醇(ethonal)擦拭外部，移入無菌操作台內。
2. 依照細胞種類和濃度，在無菌操作台內取適量培養基加至培養皿中，取出已解凍的細胞懸浮液緩慢加入，混合均勻後放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱培養。

3.對大多數細胞而言，1% 以下的冷凍保護劑(DMSO)不會對細胞的貼附或活化有不良的影響，不須要立即由解凍溶液中去除，等第二天確定細胞生長或貼附良好在去除即可。惟對極少數因對 DMSO 敏感或造成細胞分化之細胞，須立即除去 DMSO 者，則可將解凍細胞懸浮液放入 5-10ml 培養液中，離心大約 1000rpm3 分鐘之後將上清液去除，加入新鮮培養液將細胞混合轉移到培養皿中，放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱培養。

## 肆-二 實驗方法與步驟

### 肆-二-1 釋出液的備製方法:

本實驗所用金屬的齒列矯正支架是取用目前市面上較常用四種廠牌，分別為 Dentaurm 簡稱 D 組，Tomy 簡稱 T 組，Unitek 簡稱 U 組，Ormco 簡稱 O 組，的上顎正中門牙支架。先分別將其放置超音波清洗，再用吹風機吹乾後，D、T、U、O 四組內分別再分為二大組，一組鍍氮化鈦，一組不鍍氮化鈦。二大組最後放入裝有 25 cc PH7 和泡製的 PH4 人工唾液的試管中兩年。當開始要作實驗時，取出其萃取液 10 cc，使用細胞培養液加以稀釋，分別稀釋成 1 $\mu$ l/ml、10<sup>-1</sup> $\mu$ l/ml、10<sup>-2</sup> $\mu$ l/ml.

## 肆-二-2 實驗一 細胞毒性測試

tetrazolium, 3-(4,5-dimethylthiazol-z-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium  
bromide(MTT)

### 細胞存活率

tetrazolium 的反應廣泛的被應用在評估細胞粒線體中 succinic dehydrogenase 的活性。Tetrazolium 並不會與 succinic dehydrogenase 一起反應，而是與其反應物 NADH 和 NADPH 反應。黃色水溶液的 MTT 會被轉變成不可溶的紫色 formazan 鹽類，而此紫色結晶物可以溶在異丙醇(DMSO)中可由吸光值所測得的數據(OD 值)可知存活細胞數目多寡。(Mossman T. ,1983, Pumb J.A,1989)

### 實驗參考 Pumb J.A 1989 的方法

- 1.取  $2 \times 10^4$  U2OS 細胞，培養在 96well microplate 並加入  $100 \mu\text{l}$  McCoy' s 5A medium，在放置於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱培養。
- 2.經過 24hr 培養後，換新鮮的培養液後分別加入不同的釋出液濃度，分別為  $1 \mu\text{l}/\text{ml}$ 、 $10^{-1} \mu\text{l}/\text{ml}$ 、 $10^{-2} \mu\text{l}/\text{ml}$  的材料萃取液
- 3.於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱培養 24hr 後，吸除培養液加入  $20 \mu\text{l}$  的  $5 \text{mg}/\text{ml}$  MTT 溶液

4.經 MTT solution 和活細胞的粒線體作用 4hr，加入 100  $\mu$ l 的 DMSO(Dimethylsulfoxide)溶解 formazan，於 570nm 的光波下測量各組實驗試劑的吸光值(OD 值)

細胞存活率計算:

$$\text{存活率\% (survival rate\%)} = \frac{\text{實驗組 OD 值}}{\text{控制組 OD 值}}$$

統計方法:pair t test，並以 excel 的統計軟體分析。

### 肆-二-3 顯微鏡下的細胞形態觀察

1. 取  $1 \times 10^6$  的 U2OS(HGF)細胞培養於直徑 10 cm的培養皿中，並加入 10 cc包含 10% FBS 及 5% 抗生素的 Mccoy's 5A(or CDMEM) 培養液，放置於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱培養。
2. 培養 24hr 後更換新鮮培養液，分別加入濃度為  $1\mu\text{l/ml}$ 、 $10^{-1}\mu\text{l/ml}$ 、 $10^{-2}\mu\text{l/ml}$  的材料釋出液試劑，對照組為不添加任何藥物。
3. 在 24hr 之後於顯微鏡下以 200x 觀察細胞外觀的形態變化並拍照。



## 肆-二-4 西方點墨測試(western blot)

### 肆-二-4.1 西方點墨測試之樣品細胞蛋白質的製備

1. 取  $1 \times 10^6$  的 U2OS(HGF)細胞培養於直徑 10 cm的培養皿中，並加入 10 cc包含 10% FBS 及 5% 抗生素的 Mccoy's 5A 培養液，放置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱培養。
2. 培養 24hr 後更換新鮮培養液，分別加入濃度為 1 $\mu$ l/ml、10<sup>-1</sup> $\mu$ l/ml、10<sup>-2</sup> $\mu$ l/ml 的材料釋出液試劑，對照組則添加人工唾液。
3. 作用 24hr 之後取出培養液，並將蛋白質萃出
4. 控制組則不加任何藥物

#### 肆-二-4.2 溶解所培養的細胞 (lysis of cultured cells)及蛋白質萃取

1. 以 PBS 將培養的細胞沖洗二次
2. 把所刮取(scrape)下來的細胞加在含 1.5ml PBS 的離心管中
3. 放入離心機以 1000 rpm 離心 5 分鐘
4. 將上清液去除並加入 100-200  $\mu$ l 的萃取液(lysis buffer)

(a) 加入 100  $\mu$ l 的 TNF lysis buffer

50mM Tris-Hcl

150mM Nacl

0.1% SDS

1% NP-40

0.5% sodium deoxycholate

(b) 加入 10  $\mu$ l 的 10mM PMSF

(c) 加入 1  $\mu$ l 的 10mg/ml aprotinin

5. 放在冰上作用 30 分
6. 於高速離心機離心 15 分轉速 15000rpm，將懸浮物吸到另一個 tube 中，保存在-20°C 或-80°C 的環境

#### 肆-二-4.3 蛋白質定量 (Brodford total protein assay)

實驗步驟與方式是參考由公司所提供的 Brodford protein assay

(Ausubel et.1976)。實驗原理市利用 Standard protein 與染劑

(coomassie Brilliant Blue R250)結合之後，經由吸光值可以測出

Standard protein 的濃度並可以做出一條標準曲線(Standard curve)，

再由標準曲線推算出樣品蛋白質濃度。

##### (1)染料試劑的配製造(preparation of dye reagent)

- a. 將 100g 的染劑 Coomassie Blue R250 加入到 50ml 的  
    甲醇(methanol)中
- b. 等染劑 Coomassie Blue G 完全溶解後，再加入 100ml  
    的 85%磷酸溶液(phosphate solution)
- c. 加入二次 1k(d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O)直到 1000ml

(2)BSA 的標準曲線(Standard curve of BSA)的決定

STANDAR D	BLANK	2	4	6	8
BSA(mg)	0	8	16	24	32
d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O(mg)	800	792	784	776	768
PBS(mg)	100	100	100	100	100
DYE	200	200	200	200	200
濃度 (mg/ml)	0	3.2	6.4	9.6	12.8

(3)量測樣品的濃度

- a. 取樣品 100ml
- b. 二次水(d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O)700ml
- c. 配製好的染劑 200ml

再將以上 3 項混合均勻置放 30 分鐘於 595nm 的光波長下測吸光  
值(OD Value)

#### 肆-二-4.4 蛋白質電泳分析(SDS-PAGE)

蛋白質電泳分析是以 SDS-PAGE(Sodium Dodetyl Sulfate polacrylamide Gel Electroresis)方式進行，其原理是蛋白質經過變(denature)之後，以 Sodium Dodetyl Sulfate (SDS)作用使蛋白質帶負電荷，電泳槽中的 acrylamide 單體(monomers)經由聚合之後形成半固體(Semisolid matrix) 狀態及網狀結構的 polacrylamide gel，通過電流的引導帶負電荷的蛋白質會往正極移動(migrate)，經過電泳之後應 polacrylamide gel 上會出現環帶(bands)，代表不同大小的蛋白質所移動的距離。蛋白質在 gel 中所移動的距離會受電流 gel 的網狀孔徑大小(pore size)，蛋白質的分子量而影響，以這個原理可以用來評估蛋白質分子量的大小(Robert A 1995；Hooton et.al 2002)

## 肆-二-4.5 SDS-PAGE 的配製

### 一、配製分離凝膠(Separating gel)之比例

濃度	60%	7.5%	10%	12.5%
蒸餾水(distilled water)(ml)	9.3	8.7	7.7	6.7
40%acrylamine/Bis(ml)	2.4	3	4	5
10%SDS(ml)	160	160	160	160
1.5M Tris,PH=8(ml)	4	4	4	4
150mg/ml aminonium persulfate	160	160	160	160
TEMED(ml)	16	160	16	16

## 二、配製 Stacking gel 比例

濃度	4.5%
蒸餾水	3.65ml
40% acrylamine/Bis	562.5ml
10%SDS	50ml
0.5M Tris,PH=6.8	1.25ml
150mg/ml aminonium persulfate	100ml
TEMED	10ml

#### 肆-二-4.6 SDS-PAGE 實驗操作過程

1. 將 12.5%的分離凝膠(Separating gel)注入電泳槽中，並預留 0.5cm 的 sample 以便加入 stacking gel。
2. 分離凝膠(Separating gel)聚合後，加入 Stacking gel，等到 Stacking 完全聚合之後再以去離子水(deionized water)或 electrophoresis buffer 將未完全聚合的 acrylamide 清除。
3. 在 Tank 中 electrophoresis buffer 之後，將 MW Marker 及定量後的實驗樣品 30ml 小心的加入 well 中，以 100 伏特的電壓進行 3hr 電泳。
4. 蛋白質經電泳後，將不同分子量的蛋白質分離，並將凝膠轉印到 PVDF membrane 上。



#### 肆-二-4.7 將 SDS-PAGE 轉移至 PVDF membrane 上

##### 1. 配製 transfer buffer

Trb base      3.03g

Glycine      14.4g

加入 H<sub>2</sub>O 到 800ml

加入甲醇(methanol)200ml 共 1000ml

##### 2. 將 PDVF membrane 浸泡於 100%的甲醇(methanol)中 3 分鐘

##### 3. 將 transfer 的裝置設置好之後，倒入 transfer buffer，對 SDS-PAGE 進行 3hr 的 membrane transfer。

## 肆-二-4.8 西方點墨分析 Westers Blotting

西方點墨可用來辨試經 SDS-PAGE 轉移至 PVDF membrane 上的特定 antigen band 會顯像而其他 protein band 不會出現，其步驟如下

1. 以 TBS 將 membrane 清洗 2 次，每次各 10 分鐘

TBS:20ml Tris PH=7.5

100ml NaCl

2. 將 membrane 浸泡在脫脂奶粉的 TBS 溶液中 1 小時。

3. 再以 TTBS 沖洗 membrane 10 分鐘

TTBS:TBS 加上 0.1%Tween-20。

4. membrane 加入 primary antibody 之後放入 4°C 環境中。

5. 隔夜之後以 TTBS 清洗 2 次，每次各洗 10 分鐘。

6. 加入 secondary antibody 作用 2 小時。

7. 以 TTBS 清洗 3 次各 10 分鐘。

8. membrane 加入顯影劑之後轉印於 X 光片上。

## 肆-二-5 DNA fragmentation(Apoptotic DNA fragment analysis)分析

Apoptotic DNA fragment 分析法，由1994年Herrmann等人，所發展出來的。簡單來說，先把細胞刮下來，然後使用離心機離心，加入lysis buffer(1%NP-40，20mM EDTA，in 50mM Tris-HCl Ph7.5)10秒鐘後，取上清液加入1% SDS 以及RNA酵素A(Rnase A final concentration at 5 $\mu$ g/ $\mu$ l，sigma) 在56 $^{\circ}$ C處理2hr，接著在室溫37 $^{\circ}$ C加入蛋白酵素k(protein k)至最終濃度(final concentration at 2.5 $\mu$ g/ $\mu$ l， sigma)，2hr後配製2% agarose gel跑電泳。

## 伍、結果

### 一.MTT test 的結果

由圖一至圖五的圖，可以發現，不同廠牌、在不同的 PH 值下，有無 coating TiN 薄膜，所浸泡出來的金屬萃取液，並不會明顯的造成細胞存活率的降低。由圖二至圖五，可以發現 HGF cell line 和 U2OS cell line，對金屬釋出液，並無明顯的差別，都不會明顯的造成細胞存活率的降低，所以，總結 MTT 的分析結果發現，矯正支架釋出液液並沒有明顯的毒性。

### 二.顯微鏡下觀察的結果:

我們觀察細胞的形態、數目、和細胞核的變化，我們發現，HGF cell line 和 U2OS cell line，並沒有 necrosis 和 apoptosis 的細胞形態的發生

### 三.Western blot 分析結果:

由圖六和圖七，我們發現 PH7 這組，不論是否 TiN 鍍膜的釋出液，U2OS cell line 的 ERK 的表現都會比控制組高，但是 PH4 這組加入 TiN 鍍膜釋出液的組別，其 ERK 蛋白活性則有比 saliva 這組增加，而加非鍍膜釋出液的組別，其 ERK 蛋白活性沒有明顯比 saliva 這組增加，PD(pd98059)、 T1+PD 這兩組其 ERK 蛋白活性則比 saliva 這組降低。由圖八和圖九，顯示 PH7 這組 caspase3 蛋白活性分析的結果，不論加

入的是非鍍膜 TiN 或鍍膜釋出液，都會使 caspase3 蛋白比 saliva 這組降低。PH4 這組，加入非鍍膜釋出液的組別，其 caspase3 蛋白活性則比 saliva 這組沒有明顯增加，而加入 TiN 鍍膜釋出液的組別，其 caspase 蛋白活性也沒有明顯比 saliva 這組降低，而 PD、 T1+PD 這兩組其 caspase3 蛋白活性則比 saliva 這組降低。

由圖十和十一，顯示 bax 這個蛋白質，在 PH7 這組不論加入的是非鍍膜 TiN 或鍍膜釋出液，都會使 bax 蛋白比 saliva 這組降低，在 PH4 這組加入非鍍膜釋出液的組別，其 bax 蛋白活性則和 saliva 這組沒有明顯差異，而加入 TiN 釋出液的組別，其 bax 蛋白活性比 saliva 這組降低，而 PD、 T1+PD 這兩組其 Bax 蛋白活性則比 saliva 這組降低。由圖十二和圖十三，顯示  $\beta$ -actin 這個蛋白質不論加入的是 PH7、PH4 或非鍍膜、TiN 鍍膜釋出液，不會使  $\beta$ -actin 蛋白比 saliva 這組有明顯變化。由圖十四，顯示 ERK 的發生時間在三小時的時候最激烈，但是在之後，就會慢慢的降下。

由圖十五可以看到 HGF cell line 加入品牌為 Unitex 在 PH 為 4 情況下的釋出液，ERK 都是明顯的增加，圖十六則是同樣的品牌但是有 coating 薄膜，同樣的情況下，加入金屬釋出液，ERK 也是明顯的增加。圖十七，顯示 HGF cell line 加入品牌為 Unitex 在 PH 為 4 情況下的金屬釋出液，P53 在濃度 0.01 的時候有明顯下降。圖十八則是同樣的品

牌但是有 coating 薄膜，同樣的情況下，加入金屬釋出液，P53 蛋白也有降低的趨勢。圖由圖十九，顯示 HGF cell line 加入品牌為 Unitex 在 PH 為 4 情況下的金屬釋出液，caspase 都是有降低的情形，圖二十七則是同樣的品牌但是有 coating 薄膜，同樣的情況下，加入金屬釋出液，caspase 也是有降低的情形。由圖二十至二十四則是顯示，HGF cell line 加入品牌為 Unitex 在 PH 為 4 情況下的金屬釋出液，並不會造成 bax 和  $\beta$ -actin 蛋白質的增加。

#### 四.DNA fragmentation 的實驗結果

品牌為 Unitex 在 PH 為 4 情況下的金屬釋出液，加入細胞，並不會造成 DNA fragmentation 的現象。

## 陸、討論

根據 2002 年 Kao 等人的研究可以發現，金屬齒列矯正支架浸泡在人工唾液裡，隨著時間的增加會釋放出金屬離子，而且在酸性的環境中，釋放出的離子數目比中性環境多。人體口腔是一個開放的空間，金屬齒列矯正支架所釋放的金屬離子，持續的被人體所吸收代謝，所以，本篇實驗就是要探討，這些金屬齒列矯正支架，沒經過表面處理和經過 TiN 表面處理過後，兩者生物相容性的研究。2002 年，Kao 等人的研究發現，齒列矯正支架在 TiN 鍍膜處理後，並不能有效的降低金屬離子濃度，在人工唾液的釋出量，但是會不會影響生物相容性，也是我們有興趣的。首先，我們做 U2OS cell line 以及 HGF cell line 的 MTT 細胞毒性測試，結果發現，各組的金屬離子釋出液，並沒有明顯的細胞毒性。從顯微鏡觀察，也沒發現到 U2OS 以及 HGF 細胞的形態有明顯的變化。根據 1995 年 Bumgardner J.D. 等人的研究發現 nickel-based dental casting 合金的金屬離子的釋出液會影響到細胞的增殖、glucose-6-phosphate-dehydrogenase 的活性，以及細胞間 ATP 的程度，但是不會影響到細胞的形態和大小。由此可以知道，由於巨觀的細胞毒性測試以及顯微鏡觀察，並沒辦法證明這些金屬離子釋出液是否會造成細胞毒性和 apoptosis，所以，我們使用生化試驗的 western blot(西方點墨蛋白質測試分析法)，來做更進一步的檢測。根據 2002

年 Kao 等學者的研究報告:Dentaurm、Unitek、Tomy、Ormco 四種品牌的矯正器，無論是否經過 TiN 表面處理過，四種品牌浸泡於人工唾液的釋出液，做細胞毒性測試(MTT) ，結果各組間沒有顯著差異，也沒有明顯的細胞毒性。再根據 2001 年 Huang 等人的研究，金屬齒列矯正支架浸泡在人工唾液裡，在酸性的環境中，釋放出的離子數目比中性環境多。因此，本研究是選用 PH 為 4 的四種品牌之一的 Unitek 的金屬離子釋出液，來做生化及細胞學的的檢測。

當細胞受到外來的刺激，會有不同的反應，例如 ERK、bax、p53、caspase3 等等的蛋白質的表現。由許多的學者研究得知，ERK 的活化與細胞的生長、增殖有關，而 bax、p53、caspase 可能會促使細胞凋零。例如:1995 年 Roger J.等學者以老鼠的 PC-12 pheochromocytoma 細胞，將其生長因子拿除，結果發現，只要誘發其 ERK 增加，就會促進細胞生長。2000 年 Yang 等人的研究發現使用 ERK 的抑制劑 PD98059，會使得 ERK 活性下降，也會使 stratoxin 的毒性增加。在本實驗中發現，牙齒矯正支架金屬離子的釋出液有促進 ERK 蛋白增加的反應，把 ERK 的抑制劑加入，雖然會使 ERK 的反應降低，但是 MTT assay 的結果卻沒有顯著的差異，沒有造成細胞明顯的大量死亡，由此可知，牙齒矯正支架的金屬離子的釋出液，並沒有明顯的毒性。除此之外，U2OS 細胞的 ERK 蛋白質在 time course 不是大量表達的時間，仍



舊有增加的趨勢，所以可以證明這些金屬離子溶液，並不會造成細胞 apoptosis。1995 年 Bumgardner J.D.等學者發現，把人類的 HGF cell line 與 orthopedic appliances 放在一起會影響 HGF 的增殖和 glucose-6-phosphate-dehydrogenase 的活性。由 Bumgardner J.D.的研究發現，金屬離子會對 HGF cell line 有影響，因此本研究亦取 HGF，做測試，但結果發現加入不論有、無 TiN 鍍膜牙齒矯正支架的金屬離子的釋出液，ERK 蛋白質同樣的增加，ERK 蛋白質增加，表示細胞增殖和分化，由此可知，牙齒矯正支架的金屬離子的釋出液，對 HGF cell line 也沒有明顯的毒性。

學者對於 p53 蛋白和它的下游調控機轉發現，p53 是一個很重要的抑癌蛋白，可以調控細胞的凋零，和細胞的凋零死亡有很大的相關性。1998 年 Shiao Y.H.等人發現高量的二價鎳可以造成中國蒼鼠卵巢細胞中的 p53 蛋白大量增加，造成凋零死亡。2000 年 Chen N. 等學者以 UV 照射在老鼠的上皮細胞(JB CI 41 cell)後，p38 會在 p53 的 serine15 磷酸化 p53，使細胞生長抑制和凋零死亡。2000 年 Patrice L.以 Balb/C 3TC fibroblast 研究的結果發現，Rho 家族的 small GTPase 與 p53 及 ERK 三者間的交互作用調控細胞凋零死亡。在本實驗中，U<sub>2</sub>OS 無法表現，HGF cell line 在加入矯正支架的金屬離子釋出液後，不論是否有無 TiN 鍍膜，p53 蛋白都比 control 組低，因此可以知道齒列矯正支架的

金屬離子釋出液，並不會造成細胞傷害。

以前的研究指出，bax 蛋白質和 p53 有密切關係。1997 年 Hugh J.M.Brady 指出，bax 蛋白質是一種 pro-apoptotic 蛋白質，是 bcl-2 家族的一個成員，當組織接受到凋零刺激，由 p53 直接調控，刺激 bax 產生，進一步產生凋零反應，他的實驗中也發現只要是 -/-bax 老鼠它們的淋巴細胞都會比較多，而且神經原細胞雖然沒有生長因子，一樣存活的很好。在 1999 年 Ho Y.S.等人的研究指出人類野生型的 p53 癌症細胞(COCL 205 和 Hep G2)可以經由化療藥物，誘發產生 bax 蛋白質，接著產生凋零的現象。在本實驗中，U2OS、HGF cell line 在加入齒列矯正支架的金屬離子釋出液後，不論是否有無 TiN 鍍膜，bax 蛋白都跟 saliva 這組沒有明顯差異或是有下降的趨勢，可以知道齒列矯正支架的金屬離子釋出液，不會誘發 bax 蛋白的增加，所以並不會造成細胞傷害。

至於 caspase3 蛋白質，是一種凋零蛋白，1999 年 Gao C.等學者的實驗指出，p53 誘發的凋零反應，是一種抑癌機轉，會產生 caspase3 蛋白，在他的實驗中使用 J138V5C cell line,這種細胞是一種帶有溫度敏感的 mutant p53 基因，在發生凋零反應的時候，會產生大量的 caspase3 蛋白質。2002 年 Malaguti C.發現，把 yessotoxin 加入 HeLa 細胞內，會活化 caspase 而造成細胞凋零。雖然本實驗結果發現，在 U2OS

細胞並 P53 蛋白的表現，但是經由下游的蛋白質 bax 和 caspase3 的表現發現，caspase3 和 ERK band 的表現是相反的，而且 bax 蛋白質沒有增加，所以，可以確認細胞並沒有走向 apoptosis 的凋零路徑。我們再透過做 U2OS 細胞 DNA 的 fragmentation 的實驗驗證了細胞並沒有走向 apoptosis 的路徑。至於 HGF cell line 的研究，p53 有下降的趨勢，p53 下游蛋白質 caspase3 和 ERK band 的表現是相反的，而且 bax 蛋白質沒有增加，所以，細胞並沒有走向 apoptosis 的凋零路徑。由以上的實驗結果，我們可以知道，不論是否有做金屬牙齒矯正支架表面處理，在酸性或中性的環境中，金屬離子溶液都不會造成細胞毒性。可能的原因，根據 2001 年 Rana 等人的研究指出，U2OS 是一種活化 osteocytes，對於牙齒的移動有很大的幫助，所以，可能是因為，活化的 osteocytes，代謝率高，所以，對金屬離子的忍受性高。2000 年的 Messer R.L.W. 也提到，在他的實驗中，雖然顯示細胞功能有改變，但是卻隨著金屬釋放出的離子不同而有所改變，而且，金屬釋放出離子，是一個複雜的過程，牽涉到離子化學(ion chemistry)、離子原子價(ion valence)和劑量-時間的相互關係(dose-time dependence)，所以，金屬離子釋出液，很難評估金屬的毒性。除此之外，根據 1998 年的 Shiao 等學者的研究指出 Nicke( $\text{Ni}^{+2}$ )的化合物要造成 p53 蛋白的大量表達，進一步造成細胞凋零(apoptosis)，須要暴露在高量的濃度下，否則不會造成凋零死

亡。2000 年的 Iryo Y.等學者發現，Cadmium Chloride( $\text{CdCl}_2$ )會造成 MAPKs 的增加，進一步造成細胞凋零(apoptosis)，但是不同的劑量對 ERK、JNK、p38 的誘發的情形是不同的。在我們這個體外測試模型中，所測試出來的結果，金屬離子釋出液並沒有毒性也不會造成凋零的反應，根據上面的推論，我們在往後的實驗，可以備製一些致癌的重金屬鹽離子，做為對照，或者是取更長的作用時間、更大的釋出液濃度，做更進一步的探討。

## 柒、結論

- 1.不論有無鍍膜的金屬齒列矯正支架的金屬釋出液，並不會造成細胞毒性和基因毒性，也沒有造成 apoptosis 的現象。
- 2.由本實驗可知，TiN 的金屬表面鍍膜處理，對於齒列矯正支架的生物相容性的提升並沒有幫助。

## 捌、參考文獻

鐘國雄.牙科材料學.合記圖書出版社 p3-4,1996.

王繼敏.不銹鋼與金屬腐蝕.科技圖書股份有限公司,1997

Agaoglu G.,Arun T.,Izgu B, Yarat A., :Nickel and Chromium Levels in the Saliva and Serum of Patients With Fixed Orthodontic Appliances. Angle Orthod ;71:375-379,2001.

Agarwal M.L., Taylor W.R., Chemov M.V., Chemova O.B., Stark GR.: The p53 network. [Review] [74 refs] J. Biol.:Chem. 273: 1-4,1998.

Aggeli I.K., Gaitanaki C, Lazou A., Bens I: Activation of multiple MAPK pathways ( ERKs, JNKs, p38-MAPK ) diverse stimuli in the amphibian heat; Mol. & Cell. Biochem. 221: 63-69,2001.

Alessi D R.,Cuenda A.,Cohen P.,Dudly D T.,and Saltiel A R.:PD 098059 Is a Specific Inhibitor of the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase in Vitro and in Vivo.The Journal Biological Chemistry Vol 270,No 46,Issue of November 17,PP.27489-27494,1995.

Ammerer G.:Sex, stress and integrity: The importance of MAP kinases in yeast Curr. Opin. Genet. ;4: 90-95,1994

Arvidson K. Wroblewski R. :Migration of metallic ions from

screwposts into dentin and surrounding tissues. Scandinavian Journal of Dental Research. 86(3):200-5,1978.

Bennett A.M., Tonics N.K.: Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases Science 278:1288-1291,1997.

Biggs W.H.I.: Primary structure, expression, and signal-dependent tyrosine phosphorylation of a Drosophila homolog of extracellular signal-regulated kinase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6295-6299,1994

Boehringer M.: Apoptosis and Cell Proliferation 2<sup>nd</sup> Edition, p14:1998

Bowen R.L.: Compatibility of various materials with oral tissues I: The components in composite restorations J. Dent. Res. 58: 1493-1503,1979.

Bravo I., Carvalho G.S., Barbosa M.A., and Maria de Sousa.: Differential effects of eight metal ions on lymphocyte differentiation antigens in vitro. JBMR, Vol.24, 1059-1068,1990.

Brge G., Friedrich C., Broszeit E., Cremer M., Chrome Nitride: Coatings for Applications in Plastics Processing. International polymer processing :Vol 14, Iss 2, p 122-127,1999.

- Bumgardner J.D., Doeller J., Lucas LC. :Effect of nickel-based dental casing alloys on fibroblast metabolism and ultrastructural organization. *Journal of Biomedical Materials Research*. 29(5):611-7,1995.
- Bunz F.,Hwang P M.,Torrance C., Waldmala T.,Zhang Y.,Dillehay L., Williams SJ.Lengauer C.,Kinzler K W.,and Vogelstein B.:Disruptlon of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutlc agents *J.Clin.Invest*.104:263-269,1999.
- Campbell L.E., Campbell D.G., Meek D.W.:p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by an ultraviolet radiation-induced protein kinase characteristic of the c-Jun kinase JNK1 *J. Bio. Chem.* 270: 5511-5518,1995.
- Chen N.,Dong Z.:ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in Response to UV radiation *J. Bio. Chem.* 275: 20444-20449,2000.
- Chinnaiyan A.M., Dixit V.M.:The cell-death machine *Curt. Biol.* 6; 555-562,1996.
- Choudhuria T., Pala S., Agwarwalb M.L., Dasa T., Sa G.:Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax



- induction. FEBS Letters 512,334-340,2002.
- Cisse O., Savadogo O., Wu M., Yahia L'H.:Effect of surface treatment of NiTi alloy on its corrosion behavior in Hanks' solution. J. Biomed Mater Res 61:339-345,2002.
- Cohen J.J.:Apoptosis (Review) Immunol Today 14:126-130,1993.
- Coleman MP.: Cancer risk from orthopedic prostheses. Annals of Clinical& Laboratory Science. 26(2):139-46,1996 .
- Cowley S., Paterson H., Kemp P.:Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NH 3T3 cells Cell 77: 841-853,1994.
- Diane L., Eugenia M., Jill C: Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to Cisplatin J. Bio. Chem. 275 35778-35785,2000.
- Doyle D.,Kapron C.M.:Inhibition of cell differentiation by manganese chloride in micromass cultures of mouse embryonic limb bud cells,Toxicology in Vitro 16,101-106,2002.
- Eliades T., Gthanasios E. Gthanasiou:In Vivo Aging of Orthodontic Alloys: Implications for Corrosion Potential, Nickel Release, and Biocompatibility.Angle Orthod 2002;72:222-237.

- French H.G. Cook S.D. Haddad R.J. :Correlation of tissue reaction to corrosion in osteosynthetic devices.Journal of Biomedical Materials Research. 18(7):817-28,1984.
- Fukasawa K.,Wiener F., Vande Woude GF., Mai S.:Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient you~mice Oncogene 15: 129541302, 1997.
- Gao C. ,suchlda N T.:Activation of Caspases in p53-induced Transactivation-independent Apoptosis.Jpn J.Cancer Res.90,180-187,February 1999.
- Geis-Gerstorfer J.,Weber H. :In vitro corrosion behavior of four Ni-Cr dental alloys in lactic acid and sodium chloride solutions. Dent Mater 3 : 289-295,1987
- Grandjean P. :Human exposure to nickel. IARC Scientific Publications (Lyon). (53):469-85, 1984.
- Griem P.,Veltee C.V.,Panthel K.,Best S.L.,Sadler P.J.,and Shaw C.F.:T cell cross-reactivity to heavy metals:identical cryptic peptides may be presented from protein exposed to different metals,Eur. J. Immunol,28:1941-1947,1998.

Grill V., Sandrucci M.A., Lenarda R.D., Cadenaro M., Narducci

P.: Biocompatibility evaluation of dental metal alloys in vitro: Expression of extracellular matrix molecules and its relationship to cell proliferation rates; *J Biomed Mater Res*, 52:479-487, 2000.

Grimsdottir MR. Gjerdet NR. Hendten-Pettersen A.: Composition and in vitro corrosion of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofac orthop.* 101(6):525-32, 1992.

Goillot E., Raingeaud J., Ranger A., Tepper R.I., Davis R.J.: Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3302-3307, 1997

Gudermann T.: Multiple pathway of ERK activation by G protein-coupled receptors, *Novartis Foundation Symposium*, 239: 68-79; discussion 80-4, 150-159, 2001.

Gutkind S.J.: *Signaling Networks and Cell Cycle Control*, Humana Press p.153-164, 2000.

Hallab N.J., Mikecz K., Vermes C., Skispor A., Jacobs J.J.: Differential lymphocyte reactivity to serum-derived metal-protein complexes produced from cobalt-based and titanium-based implant alloy degradation, *J Biomed Mater Res* 56:427-436, 2001.

Han J., Lee J.D., Bibbs L., Ulevitch R.J.: A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells *Science* 265: 808-811, 1994

Haynes DR., Rogers SD., Howie DW., Pearch MJ., Vernon Roberts B.: Drug inhibition of the macrophage response to metal

wear particles in vitro. *Clinical Orthopaedics & Related Research*.

(323):316-26, 1996.

Helmreich E T M.: *The Biochemistry of Cell Signaling*, 1<sup>st</sup> Edition OXFORD press p58-75, 2001

Herrmann M., Lorenz HM., Voll R., Grunke M., Woith W and Kalden JR.: A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res*; 22:5506-7, 1994.

Ho Y.S., Lee H.M., Chang C.R. and Lin J.K.: Induction of Bax Protein and Degradation of Lamin A during p53-Dependent Apoptosis Induced by Chemotherapeutic Agents in Human Cancer Cell Lines. *Biochem Pharmacol* 57;2:143-154, 1999.

Hodges S.J., Spencer R.J., Watkins S.J.: Unusual indelible enamel staining following fixed appliance Treatment *J. Orthod.*, 27: 303-306, 2000.

Hollstein M., Shomer B., Greanblatt M., Soussi T.:

- Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation *Nucleic Acids Res.* 24: 141-146,1996.
- Hunt JA, Remes A, Williams DF. :Stimulation of neutrophil movement by metal ions. *J. of Biomed. Mater. Res.*26(6):819-28,1992.
- Hugh J. M. Brady, Gabriel Gil-Gomez.:Molecules in focus Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax.The *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30,647-650,1998.
- Ichijo H:From receptor to stress-activated MAP kinases ( Review )  
*Oncogene* 18: 6087-6093,1999.
- Inamura N, Enokido Y., Hatanaka H.:Involvement of c-Jun N-terminal kinase and caspase 3-like protease in DNA damage-induced, p53-mediated apoptosis of cultured mouse cerebellar granule neurons.*Brain Research* 904,270-278,2001.
- Iryo Y.,Matsuoka M.,Wispriyono B.,Sugiura T. and Igisu H.,:Involvement of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase(ERK)Pathway in the Induction of Apoptosis by Cadmium Chloride in CCRF-CEM Cells.*Biochemical Pharmacology*,Vol.60,pp.1875-1882,2000.
- Jia W.,Beatty M.W.,Reinhardt R.A.,Petro T.M., Cohen D.M.,Maze C.R., Strom E. A.,Hoffmans M.:Nickel Release from Orthodontic Arch Wires

and Cellular Immune Response to Various Nickel Concentrations. J

Biomater Res(Appl Biomater)48:488-495,1999.

Kaneda K.,Kashii S.,Kurosawa T.,Kaneko S.,Akaike A.,Honda Y. ,Minarmi

M., Satoh M.:Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax

induced by transient ischemia of the rat retina. Brain Research

815,1999,11-20,1999.

Kao C.T.,Ding S.J.,Chen Y.C., Huang T.H.:The Anticorrosion Ability of

Titanium Nitride (TiN) Plating on an Orthodontic Metal Bracket and Its

Biocompatibility. J Biomed Mater Res(Appl Biomater)63:786-792,2002.

Kapanena A., Ilvesarova J., Danilova D., RyhSnenc J.:Behaviour of Nitinol in

osteoblast-like ROS-17 cell cultures. Biomaterials 23:645-650,2002.

Kedici PS.Memikoglu MM.Kansu G.Isimdr A.Gunhan O.Case

report:ionization tendency of a base metal alloy in the oral environment.

European Journal of Prosthodontics & Restorative Dentistry.3(5):231-

4,1995.

Kerosuo H., Moe G.,Kloven E.:In vitro release of

nickel and Chromium from different types of simulated orthodontic

appliances. Angle orthod ; 65(2)111-116,1995.

Kuroda K., Ichino R., Okido M., Takai O.: Effects of ion concentration and PH on hydroxyapatite deposition from aqueous solution onto titanium by the thermal substrate method. *J Biomed Mater Res* 61:354-359, 2002.

Kim H. Johnson JW. : Corrosion of stainless steel, nickel-titanium, coated nickel-titanium, and titanium orthodontic wires. *Angle Orthod* 69(1):39-44, 1999.

Leland H., Michael B.: Cell cycle control and cancer *Science* 266:1821-1827, 1994

Locci P., Marinucci L., Lilli C., Belcastro S., Staffolani N., Bellocchio S., Damiani F., Becchetti S.: Biocompatibility of alloys used in orthodontics evaluated by cell culture tests. *J Biomed Mater Res*, 51, 561-568, 2000.

Lopes U.G., Erhardt P., Yao R., and Cooper G.M.: p53-dependent Induction of Apoptosis by Proteasome Inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 272, No. 20, Issue of May 16, pp. 12893-12896, 1997.

Lovschall H., Eiskjaer M., Arenholt-Bindslev D., Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays, *Toxicology in Vitro* 16, 63-69, 2002.

Majjer R. Smith DC.: Biodegradation of the orthodontic bracket system

. Am J Orthod Dentofac Orthop.90(3) : 195-8,1986 Sep.

Majer R.Smith DC.:Corrosion of orthodontic bracket bases.Am J

Orthod.81(1):43-8,1982 .

Malagutia C., Ciminiello P., Fattorusso E., Rossini G.P.:Caspase

activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells.Toxicology in

Vitro 16,357-363,2002.

Masour S.J., Natten W.T., Hermarm A.S., Candia J.M.:

Transformation of mammalian cells by constitutively active

active MAP kinase kinase Science 265: 966-970,1994

Matasa CG. :Attachment corrosion and its testing. Journal of Clinical

Orthodontics. 29(1):16-23 , 1995 .

Merritt K.,Brown SA. Sharkey NA.: Blood distribution of nickel,

cobalt,and chromium following intramuscular injection into hamsters.

Journal of Biomedical Materials Research. 18(9):991-1004,1984.

Milne D.M., David O., Barry Caudwell:

Phosphorylation of the tumor suppressor protein p53 by mitogen-

activated protein kinases J. Bio. Chem. 269: 9253-9260,1994

McLaughlin J.O., Coulter W.A, Coffry A., Burden D.J.:



- The incident of bacteremia after orthodontic banding  
Am. J. Orthod. & Dento. Orthoped. 109: 639-644,1996.
- Messer R.L.W., Lucas L.C.:Cytotoxicity of nickel-chromium alloys: bulk alloys compared to multiple ion salt solutions.Dental Materials 16,207-212,2000.
- Michel R.,Nolte M.,Reich M.,and Loer f.:systemic effects of implanted prostheses made of cobalt-chromium alloys:Arch Orthop Trauma Surg,110:61-74,1991.
- Mossman T.:Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays;J. Immunol. Methods. 65: 55-63,1983
- Mulders C. , Darwish M. ,Holze R. :The influence of alloy composition and casting procedure upon the corrosion behaviour of dental alloys: an in vitro study. Journal of Oral Rehabilitation. 23(12):825-31,1996 .
- Nagata Y.,Todokoro K.:Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress induced erythroid differentiation and apoptosis and inhibition of ERK for apoptosis Blood 94: 853-863,1999

Norman J.Kennedy,Kataoka T.,Tschopp J.,and Budd R.C.: Caspase  
Activation is Required for T Cell Proliferation.J.Exp.Med.Vol  
190,Number 12, 1891-1895,1999.

Park S.A.,Park H.J., Lee B. I, Atm Y.H.:  
Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis by suppression of  
ERK:mediated p53 accumulation in B 104 cells Mol. Brain Res. 93:  
18-26,2001.

Patrice L.:Extinction of Rac1 and Cdc42Hs signaling defines a novel p53-  
dependent apoptotic pathway Oncogene 19: 2237-2385,2000.

Pereira MC.,Pereira ML., Sousa JP.:Adsorptive stripping measurements  
of iron accumulation in mice kidney using microelectrodes and hist-  
ological features.Journal of Trace Elements in Medicine & Biology.  
12 (1):50-5,1998.

Pioletti D P., Leoni L.,Genini D., Takei H.,Du P.,Corbeil J.:Gene expression  
analysis osteoblastic cells contacted by orthopedic implant particles.2002  
Wiley Periodicals,Inc.J Biomed Mater Res 61:408-420,2002

Platt JA.,Guzman A., Zuccari A.,Thornburg DW.Rhodes BF.Oshida  
Y.Moore BK.:Corrosion behavior of 2205 duplex stainless steel.Am J

Orthod Dentofac Orthop.112(1) : 69-79,1997.

Prives C.,Hall P.A.:The p53 pathway. [Review] [156 refs]J.Path. 187:  
112-126,1999.

Pumb J.A,Mikoy R., Kaye S.B.:Effect of the ph dependence of  
3-( 4,5-dimethylthiazol-z-yl )-2,5-diphenyl-tetrazolinm bromide  
formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel  
tetrazolinm-based assay; Cancer Research 49: 4435-4440,1989.

Rana MW,Pothisiri V,Lillinary DM,Xu,Xm.:Detection of apoptosisi during  
orthodontic tooth movement in rats.Am J Orthod Dentofa  
Orthop ;119:516-521,2001.

Rao J.R.,Gayatri R.,Rajaram R.,Nair B.U.,Ramasami T.:Chromium(III)  
hydrolytic oligomer:their relevance to protein binding,Biochimica et  
Biophysica Acta 1472;595-602,1999.

Reuling N.,Wisser W. ,Jung A. ,Denschlag HO. :Release and detection of  
dental corrosion products in vivo:development of an  
experimental model in rabbits. Journal of Biomedical Materials  
Research. 24(8):979-91,1990 .

Robert A.:Methods for Protein Analysis: A Practical Guide to

Laboratory Protocols, International Thomson Publishing

p.59-61,1994.

Robert A.:Michael E., Martin Dickens:

Opposing effects of ERK and 3NK-p38 MAP kinases on apoptosis

Science 270: 1326-1331,1995.

Rossomando A. J, Payne D.M., Weber M.J., Sturgill TW.:

Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target Protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase, Proc Natl Acad Sci, 86: 6940-43,1989.

Roger J.,Michael E.,Martin Dickens:Opposing effects of ERK and JUK-p38

MAP kinases on apoptosis Science 270:1326-1331,1995.

Ryhanen J.,Niemi E.,Serlo W. ,Niemela E. ,Sandvik P.,Pernu H.,Salo T.:

Biocompatibility of nickel-titanium shape memory metal and its corrosion behavior in human cell cultures.Journal of Biomedical Materials Research. 35(4):451-7,1997 .

Saeed Sheikh M., Albert J.:Role of p53 family members in apoptosis

J. Cell. Physio. 182: 171-181,2000.

Savill J.S.,Wyllie A.H.,HensonJ.e.,Walport M.J.:Macrophage phagocytosis of

aging neutrophils in inflammation Programmed cell death in the

neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest*  
83:865-75,1989.

Seidman R., Gitelman I., Sagi O., Horwitz S. B., and Wolfson M.: The Role of  
ERK 1/2 and p38 MAP-Kinase Pathways in Taxol-Induced Apoptosis in  
Human Ovarian Carcinoma Cells. *Experimental Cell Research*  
268,84-92,2001.

Schedle A., Samorapoompichit P.: Metal ion-induced toxic histamine release  
from human basophils and mast cells. *J Biomed Mater*  
*Res*,39,560-567,1998.

Schwartzman R.A., Cidlowski J.A.: Apoptosis: The biochemistry and  
molecular biology of programmed cell death; *Endocrine Rev.* 14:  
133-151,1993.

Seidman R., Inna Gitelman, Susan Band Horwitz:  
The role of ERK 1/2 and p38 MAP-kinase pathway in taxol-Induced  
apoptosis in human ovarian carcinoma cell  
*Experi. Cell Res.* 268: 84-92,2001

Shiao Y.S., Lee Y.M and Kasprzak K.S.: Cell cycle arrest, apoptosis and p53  
expression in nickel(II)acetate-treated Chinese hamster ovary  
cells. *Carcinogenesis* vol.19 no.7 pp.1203-1207,1998.

- Sjogren F., Anderson C.:The spectrum of inflammatory cell response to dimethylsulfoxide Contact Dermatitis 42: 216-221,2000
- Stanley H.R, Bowen R.L., Folio J.:  
Compatibility of various materials with oral tissue II  
response to composite ingredient J. Dent. Res.58: 1507-1517, 1979
- Stein G. S.:The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control  
wiley-liss press p250-253,1998
- Strum I,Papadopoulos S.,Hillebrand T.:Impaired bax protein expression in breast cancer: Mutational analysis of the bax and the p53 gene.Int.J.Cancer:87,517-521,2000.
- Templeton D M., Wang Z., Mirallem T.:Cadmium and calcium-dependent c-fos expression in mesangial cells.Toxicology Letters 95,1-8,1998.
- Tillery T.J., Hembree JH Jr. Weber F.N.:Preventing enamel decalcification during orthodontic treatment Am. J. Orthod., 70: 435-439,1976.
- Timothy G, Cross, Dagmer S.T., Nick V.:  
Minireview Serine / Threonine protein kinases and apoptosis  
Exper. Cell. Res. 256: 3441,2000.
- Terhune W.F., Sydiskis R.J., Davidson W.M.:In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding materials; Am. J. Orthod 83: 501-506,1983.

- Trepanier C., Leung T.K., Tabrizian M., Yahia L.H.: Preliminary investigation of the effects of surface treatments on biological response to shape memory Nitinol stent: *J Biomed Mater Res*, 48:165-171, 1999.
- Van Furth R.: Immunocytochemical detection of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation in individual cells; *J Immunol Methods* 108;45-53, 1998.
- Vermes I., Haanen C.: Apoptosis and programmed cell death in health and disease *Adv. Clin. Chem* 31:177-246, 1994.
- Wang X.Z., Ron D.: Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP by the p38 MAP kinase *Science* 272: 1347-1349, 1996.
- Wang JY., Tsukayama DT., Wicklund BH., Gustilo RB.: Inhibition of T and B cell proliferation by titanium, cobalt, and chromium: role of IL-2 and IL-6. *Journal of Biomedical Materials Research*. 32(4): 665-671, 1996.
- Warner G.L. and Lawrence D.A.: Cell surface and cell cycle analysis of metal-induced murine T cell proliferation.: *Eur. J. Immunol.* 16:1337-1342, 1986.
- Wataha J.C., Craig R.G., and Hanks C.T.: The Release of Elements of Dental

Casting Alloys into Cell-culture Medium. *J Dent Res* 70

(6):1014-1018, June, 1991.

Widmann C., Gibson S., Jarpe MB., Johnson GL.: Mitogen-activated protein kinase: Cokinase module from yeast to human *Physiol. Rev.* 79: 143-180, 1999.

Whitmarsh A.J., Davis R.J.: Transcription factor AP-1 regulation by mitogen protein kinase signal transduction pathways *J. Mol. Med.* 74: 589-607, 1996.

Whitmarsh A.J., Davis R.J.: Signal transduction by MAP Kinases: regulation by phosphorylation dependent switches; *Signal Transduction Knowledge Environment* 1999(1) PE1, 1999

Wu J.: Suppression of activated Let-60 Ras protein defines a role of *Caenorhabditis elegans* Sur-1 MAP kinase in vulval Differentiation, *Genes Dev*, 8: 147-159, 1994.

Yang D., Tournier C., Wisk M., Lu H.T, Xu J., Flavell R.A.: Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3004-3009, 1997.



Yang G.H.,Jarvis B.B.,Chung Y.J,and Pestka J.J.:Apoptosis induction by  
Satratoxins:Relationship to ERK,p38 MAPK and SAPK/JNK  
Activation,Toxicology and Applied Pharmacology 164,149-160,2000.

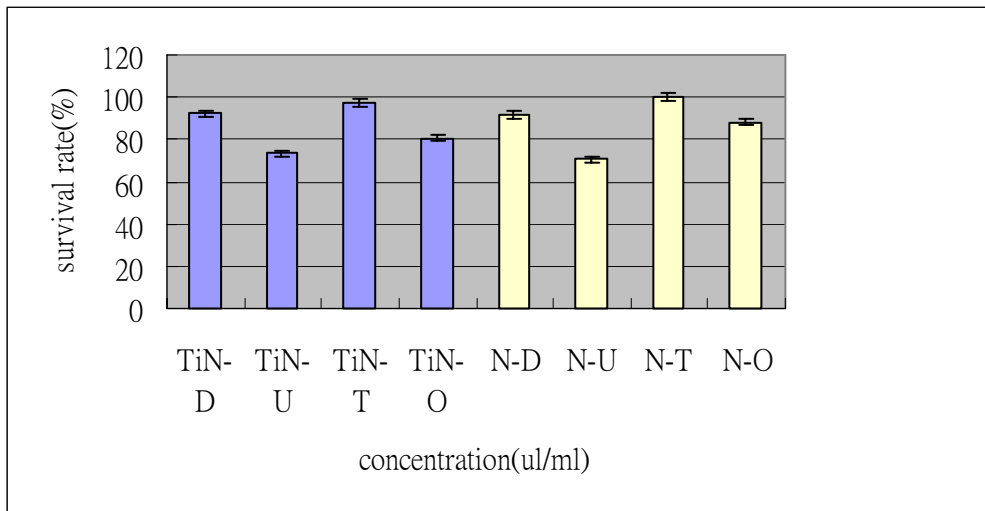
Yua L. H.,Yamadaa M. K.,Naitoa M., Watanabea K., Reedb J H, Uchiraiya  
H.:Induction of mammalian cell death by a plant Bax inhibitor.FEBS  
Letters 512(2002)308-312.

## 玖、圖表與資料照片

## MTT cytotoxic assay

圖一

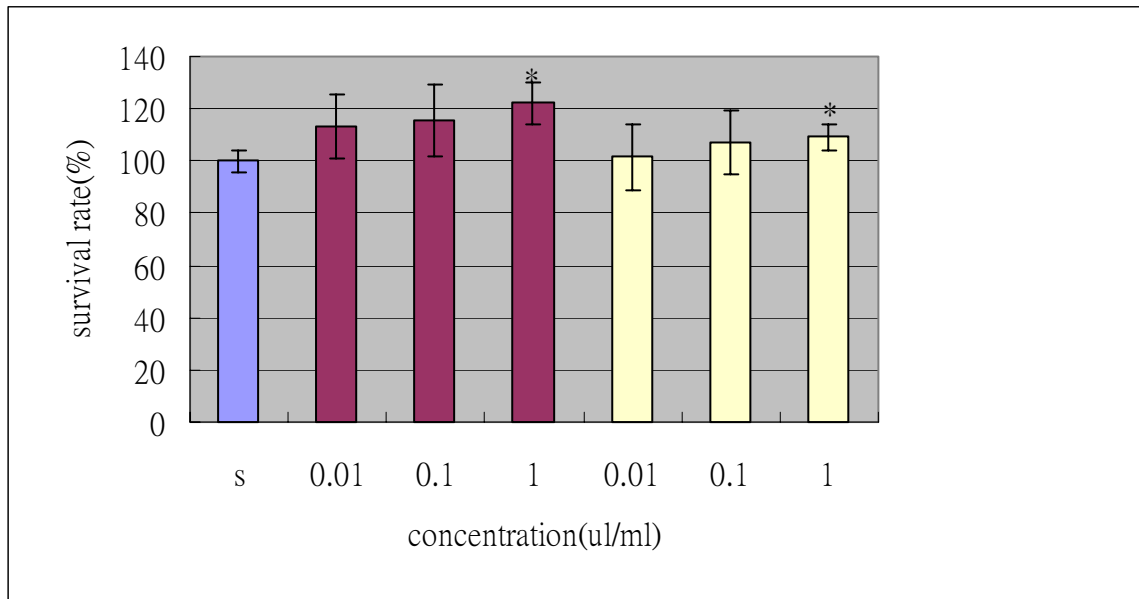
於 PH4 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜及無 TiN 鍍膜之四種品牌矯正  
支架，對 U2OS 細胞作用 24 小時之存活率



說明:取四種齒列矯正支架分別為 Dentaurm 簡稱 D, Tomy 簡稱 T, Unitek 簡稱 U, Ormco 簡稱 O, 分成兩組一組鍍上 TiN 鍍膜(TiN-D、TiN-U、TiN-T、TiN-O), 另一組不鍍膜(N-D、N-U、N-T、N-O), 結果顯示有無 TiN 鍍膜對細胞存活率沒有影響。

圖二

於 PH7 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜及無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 U2OS 細胞作用 24 小時之存活率

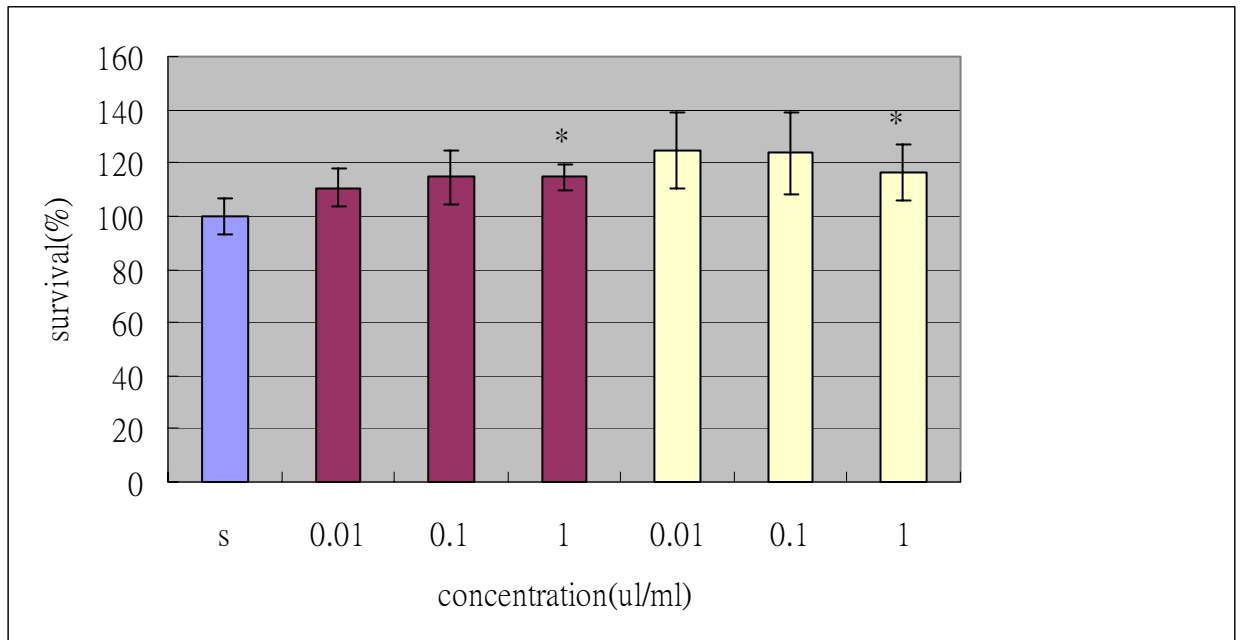


- PH =7 的情況下,Unitek 非鍍膜這組,只加入 Saliva
- PH=7 的情況下,Unitek 非鍍膜這組,金屬粹取液
- PH=7 的情況下, Unitek 鍍膜這組,金屬粹取液
- \* p<0.05(與 saliva 這組有顯著差異)

說明:PH 為 7 的情況下，取七種釋出液，分別是 s(saliva)、非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01ul/ml、非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1ul/ml、非鍍膜金屬釋出液的濃度 1ul/ml、鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01ul/ml、鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1ul/ml、鍍膜金屬釋出液的濃度 1ul/m 加入 U2OS cell line 24 小時後，做 MTT 毒性測試，加入非鍍膜或鍍膜金屬釋出液，隨著濃度的增加，細胞存活率有增加的趨勢。

圖三

於 PH4 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜及無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 U2OS 細胞作用 24 小時之存活率

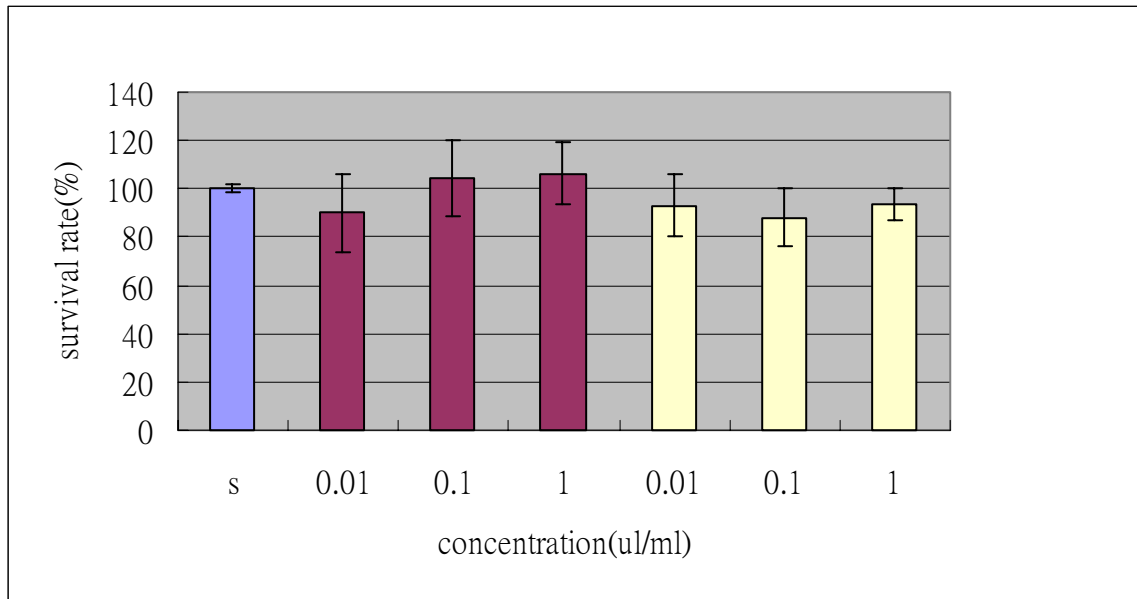


- PH =4 的情況下,Unitek 非鍍膜這組,只加入 Saliva
- PH=4 的情況下,Unitek 非鍍膜這組,金屬粹取液
- PH=4 的情況下, Unitek 鍍膜這組,金屬粹取液
- \*  $p < 0.05$ (與 saliva 這組有顯著差異)

說明:PH 為 4 的情況下，取七種釋出液，分別是 s(saliva)、非鍍膜金屬釋出液的濃度  $0.01\mu\text{l/ml}$ 、非鍍膜金屬釋出液的濃度  $0.1\mu\text{l/ml}$ 、非鍍膜金屬釋出液的濃度  $1\mu\text{l/ml}$ 、鍍膜金屬釋出液的濃度  $0.01\mu\text{l/ml}$ 、鍍膜金屬釋出液的濃度  $0.1\mu\text{l/ml}$ 、鍍膜金屬釋出液的濃度  $1\mu\text{l/m}$  加入 U2OS cell line 24 小時後，做 MTT 毒性測試，加入非鍍膜或鍍膜金屬釋出液，隨著濃度的增加，細胞存活率有增加的趨勢。

圖四

於 PH7 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜及無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 HGF 細胞作用 24 小時之存活率

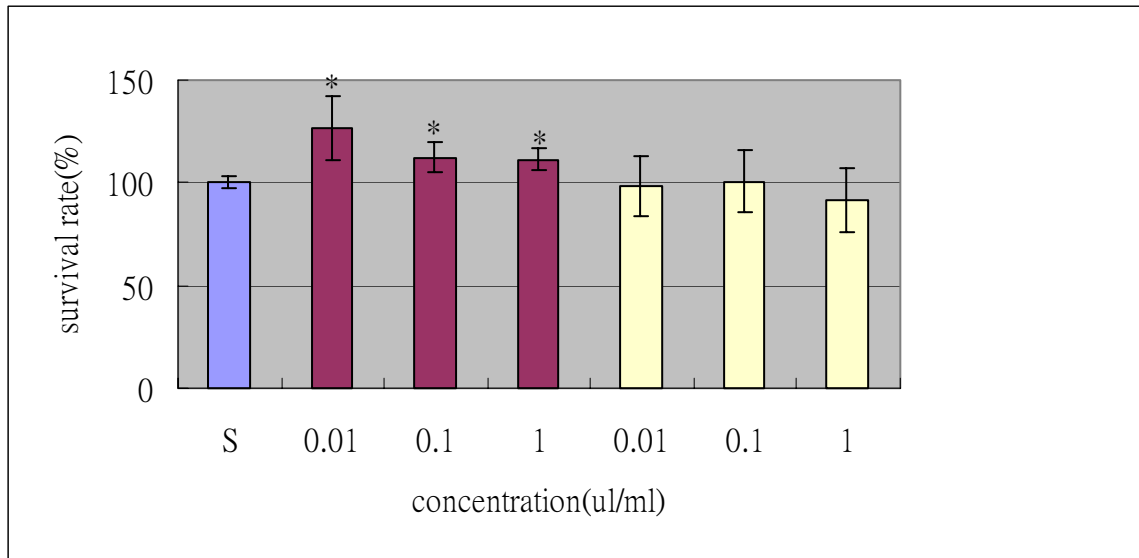


- PH =7 的情況下,Unitek 非鍍膜這組,只加入 Saliva
- PH=7 的情況下,Unitek 非鍍膜這組,金屬粹取液
- PH=7 的情況下, Unitek 鍍膜這組,金屬粹取液
- \* p<0.05(與 saliva 這組有顯著差異)

說明:PH 為 7 的情況下，取七種釋出液，分別是 s(saliva)、非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml、非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml、非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml、鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml、鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml、鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/m 加入 HGF cell line 24 小時後，做 MTT 毒性測試，加入非鍍膜或鍍膜金屬釋出液，隨著濃度的增加，細胞存活率有增加的趨勢。

圖五

於 PH4 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜及無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 HGF 細胞作用 24 小時之存活率



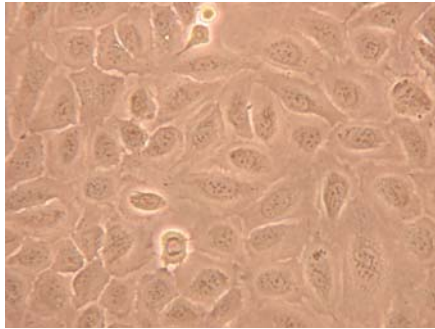
- PH=4 的情況下,Unitek 非鍍膜這組,只加入 Saliva
- PH=4 的情況下,Unitek 非鍍膜這組,金屬粹取液
- PH=4 的情況下, Unitek 鍍膜這組,金屬粹取液
- \* p<0.05(與 saliva 這組有顯著差異)

說明:PH 為 4 的情況下，取七種釋出液，分別是 s(saliva)、非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml、非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml、非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml、鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml、鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml、鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/m 加入 HGF cell line 24 小時後，做 MTT 毒性測試，加入非鍍膜或鍍膜金屬釋出液，隨著濃度的增加，細胞存活率有增加的趨勢。

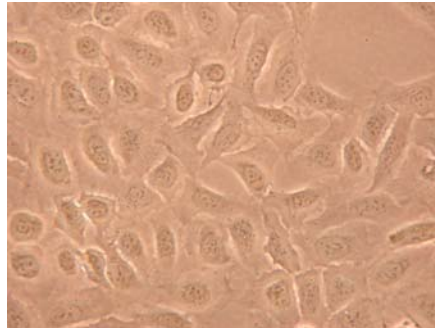
## 顯微鏡觀查

U2OS cell line

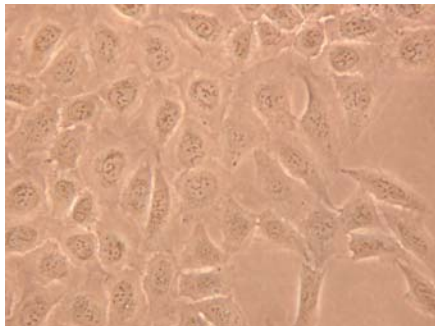
照片一



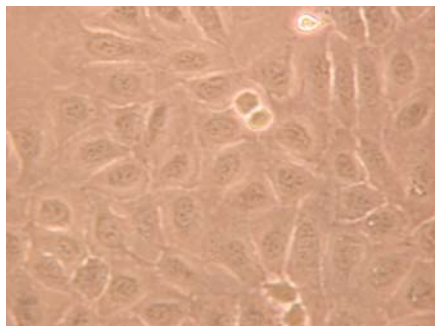
照片二



照片三



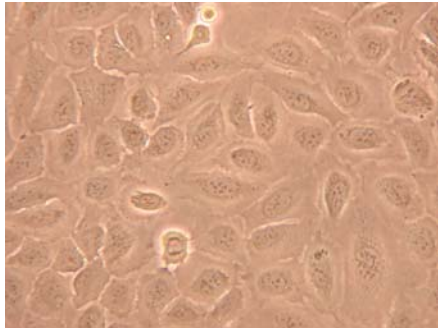
照片四



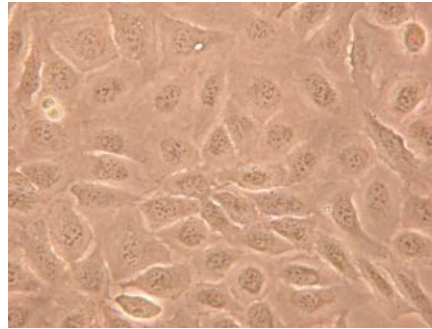
說明:PH 為 4 的情況下，取四種釋出液，分別是照片一(saliva)、照片二(非鍍膜金屬釋出液的濃度  $1\mu\text{l}/\text{ml}$ )、照片三(非鍍膜金屬釋出液的濃度  $0.1\mu\text{l}/\text{ml}$ )、照片四非鍍膜金屬釋出液的濃度  $0.01\mu\text{l}/\text{ml}$ )，加入 U2OS cell line 24 小時後，在顯微鏡下觀察，加入 saliva 後，細胞的數目和型態沒有明顯的變化，沒有細胞膜的水泡化，也沒有失去細胞膜型態的完整性。加入金屬釋出液濃度為  $1\sim 10^2(\mu\text{L}/\text{ml})$ ，細胞的數目和型態也沒有明顯的變化，沒有細胞收縮、細胞核與細胞質會聚合、或粒腺體破裂釋放出 cytochrome c，在細胞核內的 chromatin 沒有降解掉、細胞分裂產生數個由細胞膜包含的小體(apoptotic bodies)。



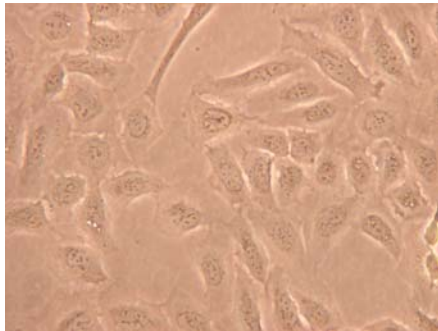
照片五



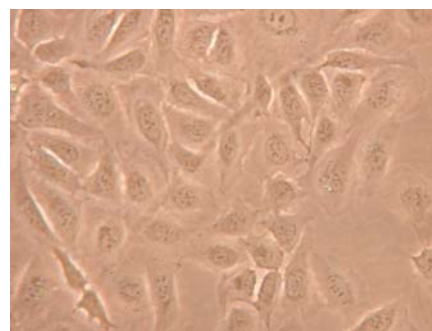
照片六



照片七



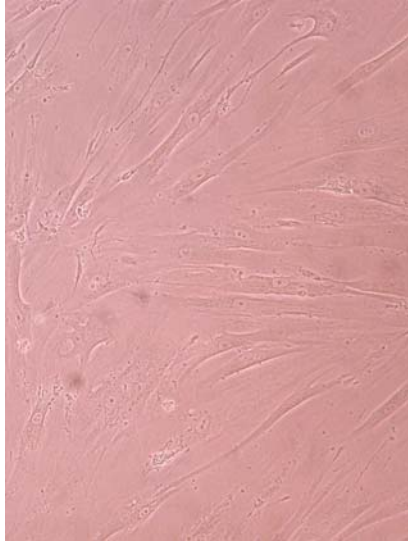
照片八



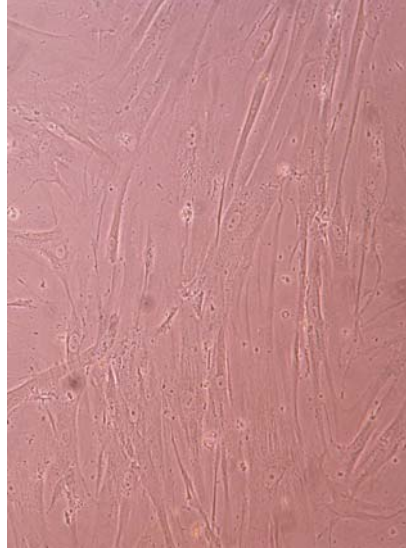
說明: PH 為 4 的情況下，取四種釋出液，分別是照片五(saliva)、照片六(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、照片七(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、照片八(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 U2OS cell line 24 小時後，在顯微鏡下觀察，加入 saliva 後，細胞的數目和型態沒有明顯的變化，沒有細胞膜的水泡化，也沒有失去細胞膜型態的完整性。加入金屬釋出液濃度為 1~10<sup>-2</sup>( $\mu$  L/ml)，細胞的數目和型態沒有明顯的變化，也沒有出現細胞質與粒腺體膨脹細胞沒被溶解，沒有小氣泡(vesicle)的形成以及胞器膨脹以及產生 apoptosis body。

HGF cell line

照片九



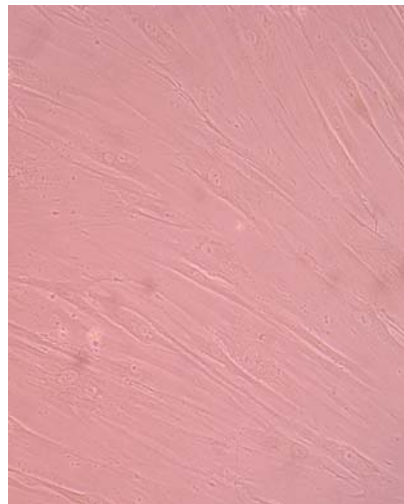
照片十



照片十一

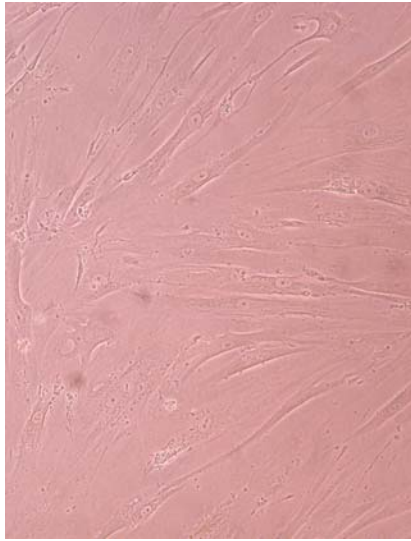


照片十二



說明: PH 為 4 的情況下,取四種釋出液,分別是照片九(saliva)、照片十(非鍍膜金屬釋出液的濃度  $1\mu\text{l/ml}$ )、照片十一(非鍍膜金屬釋出液的濃度  $0.1\mu\text{l/ml}$ )、照片十二(非鍍膜金屬釋出液的濃度  $0.01\mu\text{l/ml}$ ),加入 HGF cell line 24 小時後,在顯微鏡下觀察,加入 saliva 後,細胞的數目和型態沒有明顯的變化,沒有細胞膜的水泡化,也沒有失去細胞膜型態的完整性。加入金屬釋出液濃度為  $1\sim 10^2(\mu\text{L/ml})$ ,細胞的數目和型態也沒有明顯的變化,也沒有出現細胞質與粒腺體膨脹,細胞沒被溶解,沒有小氣泡(vesicle)的形成以及胞器膨脹。

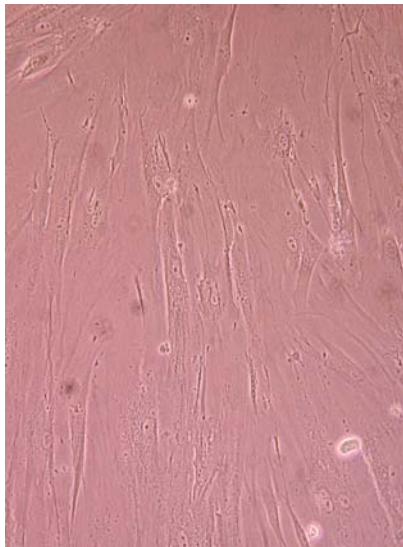
照片十三



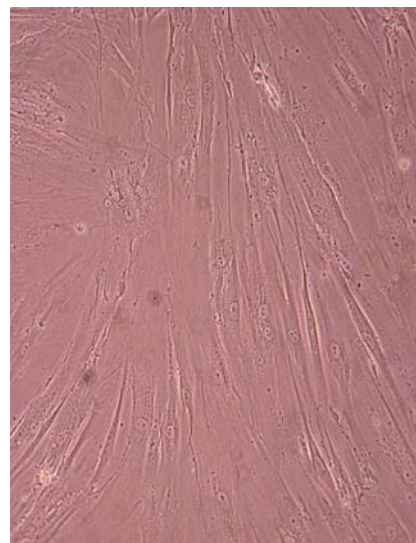
照片十四



照片十五



照片十六



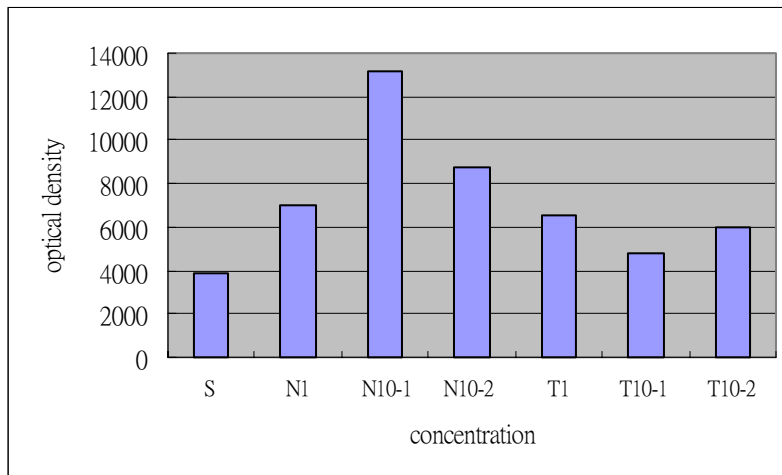
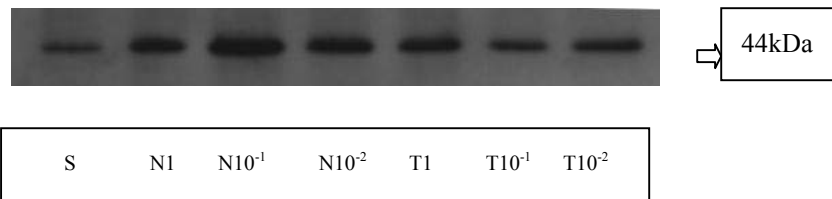
說明: PH 爲 4 的情況下，取四種釋出液，分別是照片十三(saliva)、照片十四(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度  $1\mu\text{l/ml}$ )、照片十五(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度  $0.1\mu\text{l/ml}$ )、照片十六(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度  $0.01\mu\text{l/ml}$ )，加入 HGF cell line 24 小時後，在顯微鏡下觀察，加入 saliva 後，細胞的數目和型態沒有明顯的變化，沒有細胞膜的水泡化，也沒有失去細胞膜型態的完整性。加入金屬釋出液濃度爲  $1\sim 10^{-2}(\mu\text{L/ml})$ ，細胞的數目和型態沒有明顯的變化，也沒有出現細胞質與粒腺體膨脹細胞沒被溶解，沒有小氣泡(vesicle)的形成以及胞器膨脹以及產生 apoptosis body。

## Western blot

圖六

於 PH7 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜及無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 U2OS 細胞作用 24 小時後，ERK 蛋白活性分析結果

ERK 蛋白:

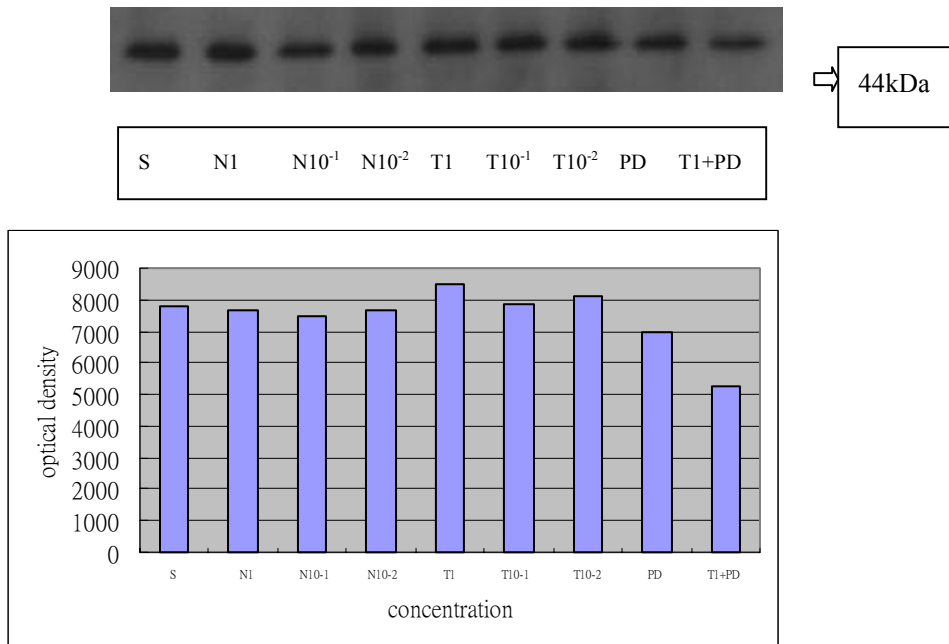


說明:取七種釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 U2OS cell line 24 小時後，ERK 蛋白活性分析的結果，不論加入的是非 TiN 鍍膜或鍍膜矯正金屬支架的金屬離子釋出液，都會使 ERK 蛋白比 saliva 這組增加。

圖七

於 PH4 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜及無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 U2OS 細胞作用 24 小時後，ERK 蛋白活性分析結果

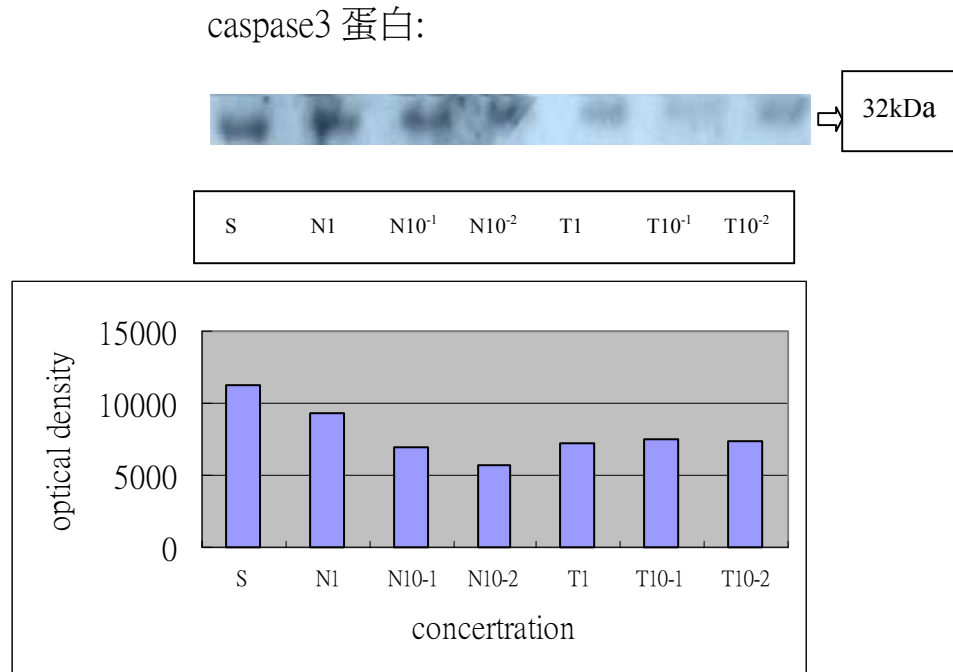
ERK 蛋白:



說明:取九種釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)、PD(ERK 蛋白的抑制劑 pd98059, 100 $\lambda$ )、T1+PD(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml 加 ERK 蛋白的抑制劑 pd98059, 100 $\lambda$ )加入 U2OS cell line 24 小時後，ERK 蛋白活性分析的結果，加入 TiN 鍍膜矯正金屬支架金屬離子釋出液的組別，其 ERK 蛋白活性則有比 saliva 這組增加，而加非鍍膜矯正金屬支架金屬離子釋出液的組別，其 ERK 蛋白活性沒有明顯比 saliva 這組增加，而 PD、T1+PD 這兩組其 ERK 蛋白活性則比 saliva 這組降低。

圖八

於 PH7 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜及無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 U2OS 細胞作用 24 小時後，caspase3 蛋白活性分析結果

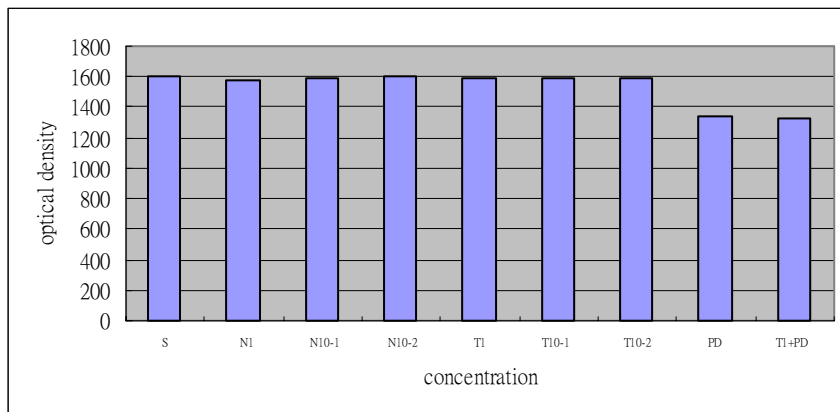
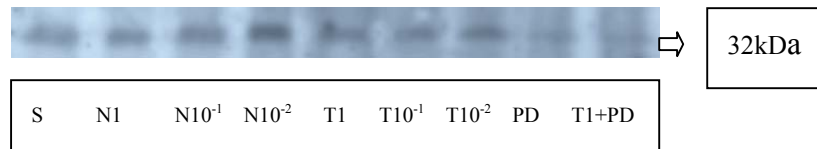


說明:取七種釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 U2OS cell line 24 小時後，caspase3 蛋白活性分析的結果，不論加入的是非鍍膜 TiN 或鍍膜矯正金屬支架的金屬離子釋出液，都會使 caspase3 蛋白比 saliva 這組降低。

圖九

於 PH4 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜及無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 U2OS 細胞作用 24 小時後，caspase3 蛋白活性分析結果

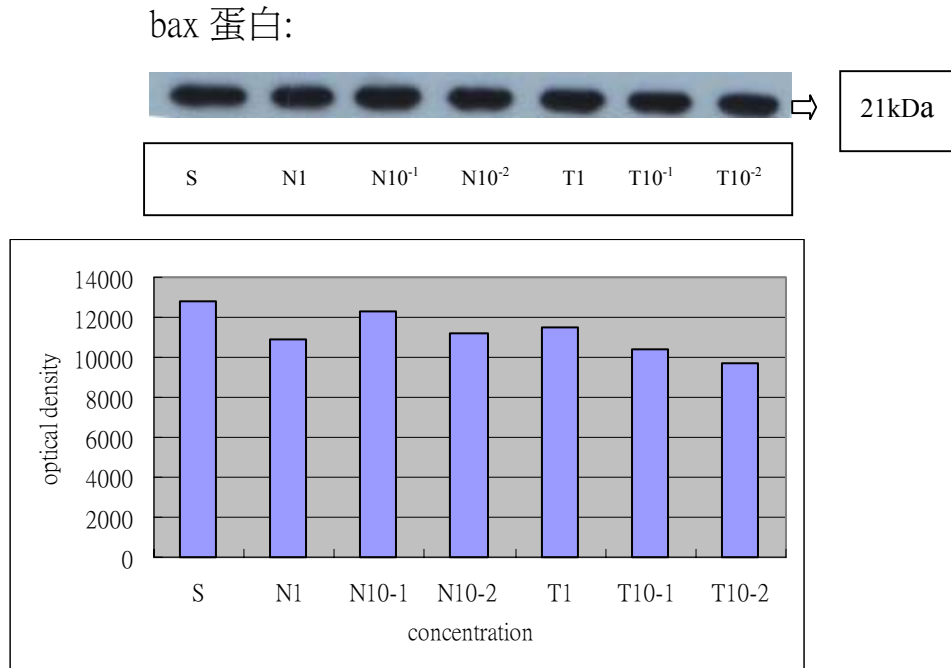
caspase3 蛋白:



說明:取九種釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)、PD(ERK 蛋白的抑制劑 pd98059, 100 $\lambda$ )、T1+PD(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml 加 ERK 蛋白的抑制劑 pd98059, 100 $\lambda$ )加入 U2OS cell line 24 小時後，caspase3 蛋白活性分析的結果，加入非鍍膜矯正金屬支架金屬離子釋出液的組別，其 caspase3 蛋白活性則比 saliva 這組沒有明顯增加，而加入 TiN 鍍膜矯正金屬支架金屬離子釋出液的組別，其 caspase 蛋白活性沒有明顯比 saliva 這組降低，而 PD、T1+PD 這兩組其 caspase3 蛋白活性則比 saliva 這組降低。

圖十

於 PH7 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜及無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 U2OS 細胞作用 24 小時後， bax 蛋白活性分析結果



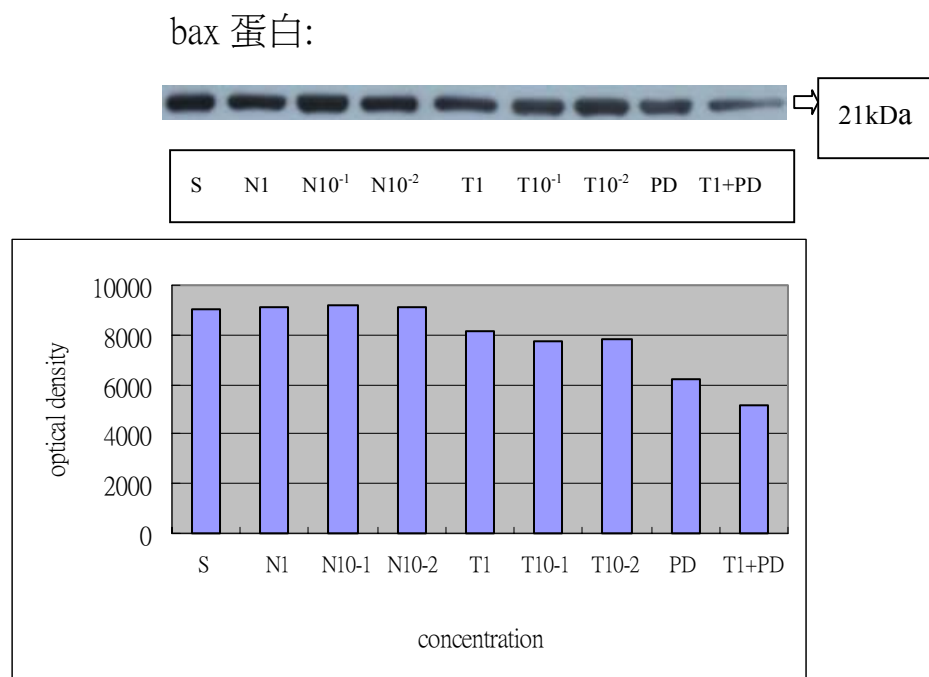
說明:取七種釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 U2OS cell line 24 小時後，bax 蛋白活性分析的結果，不論加入的是非鍍膜 TiN 或鍍膜矯正金屬支架的金屬離子釋出液，都會使 Bax 蛋白比 saliva 這組降低。



圖十一

於 PH4 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜及無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯

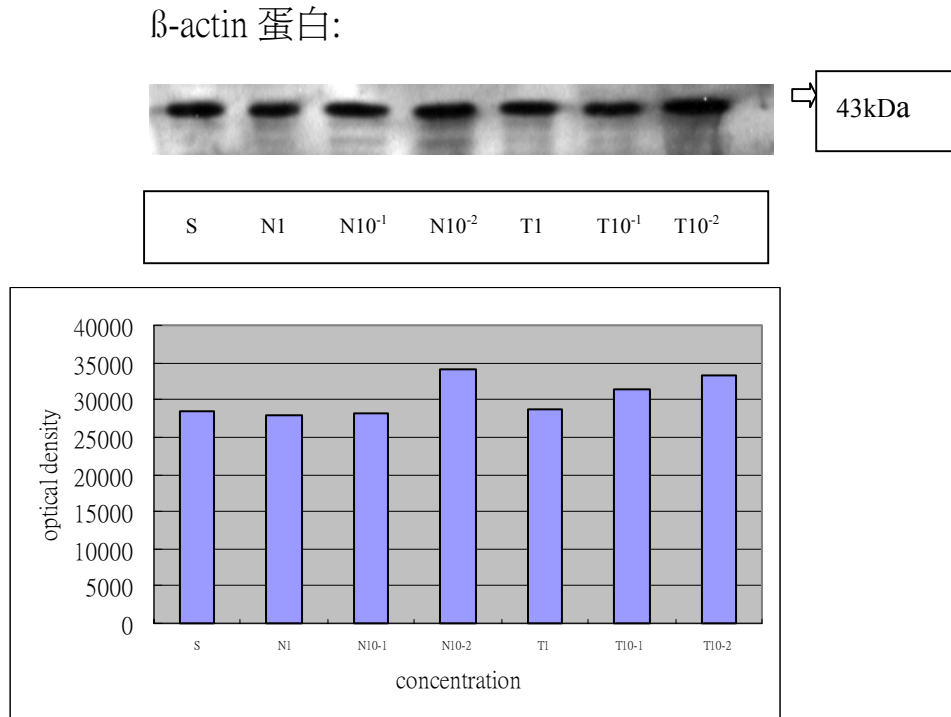
正支架，對 U2OS 細胞作用 24 小時後， Bax 蛋白活性分析結果



說明:取九種釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)、PD(ERK 蛋白的抑制劑 pd98059, 100 $\lambda$ )、T1+PD(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml 加 ERK 蛋白的抑制劑 pd98059, 100 $\lambda$ )加入 U2OS cell line 24 小時後，Bax 蛋白活性分析的結果，加入非鍍膜矯正金屬支架金屬離子釋出液的組別，其 Bax 蛋白活性則比 saliva 這組沒有明顯差異，而加入 TiN 鍍膜矯正金屬支架金屬離子釋出液的組別，其 Bax 蛋白活性比 saliva 這組降低，而 PD、T1+PD 這兩組其 Bax 蛋白活性則比 saliva 這組降低。

圖十二

於 PH7 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜及無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 U2OS 細胞作用 24 小時後， $\beta$ -actin 蛋白活性分析結果

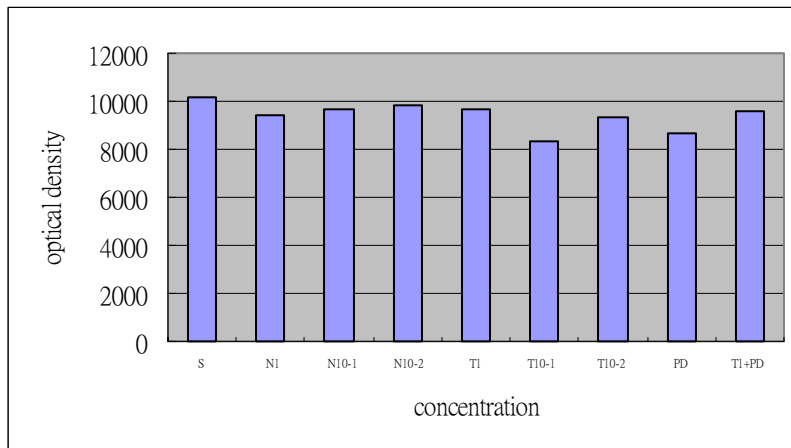
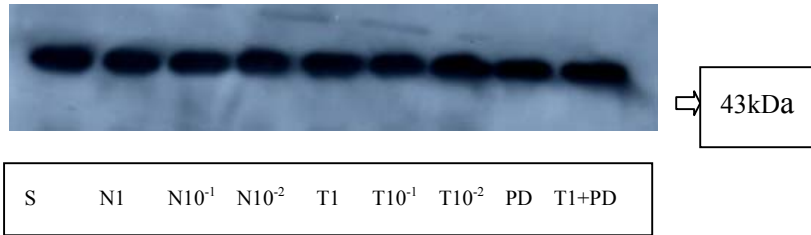


說明:取七種釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 U2OS cell line 24 小時後， $\beta$ -actin 蛋白活性分析的結果，不論加入的是非鍍膜 TiN 或鍍膜矯正金屬支架的金屬離子釋出液，都會使  $\beta$ -actin 蛋白比 saliva 這組沒有明顯變化。

圖十三

於 PH4 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜及無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 U2OS 細胞作用 24 小時後， $\beta$ -actin 蛋白活性分析結果

$\beta$ -actin 蛋白:

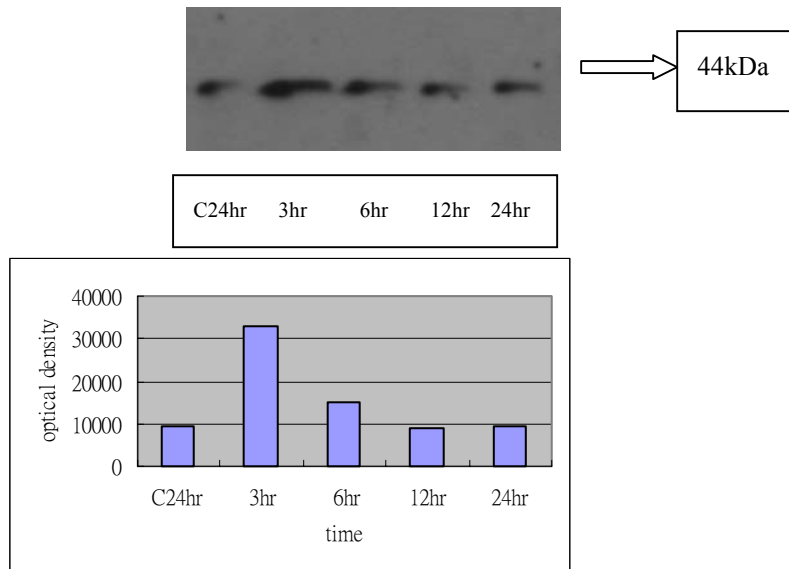


說明:取九種釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)、PD(ERK 蛋白的抑制劑 pd98059, 100 $\lambda$ )、T1+PD(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml 加 ERK 蛋白的抑制劑 pd98059, 100 $\lambda$ )加入 U2OS cell line 24 小時後， $\beta$ -actin 蛋白活性分析的結果，加入非鍍膜矯正金屬支架金屬離子釋出液的組別，其  $\beta$ -actin 蛋白活性則比 saliva 這組沒有明顯變化，而加入 TiN 鍍膜矯正金屬支架金屬離子釋出液的組別，其  $\beta$ -actin 蛋白活性比 saliva 這組沒有明顯變化，而 PD、T1+PD 這兩組其  $\beta$ -actin 蛋白活性這組沒有明顯變化。

圖十四

PH 爲 7，Unitek 品牌之 TiN 鍍膜與非鍍膜矯正支架，作用在 U2OS cell

line 3、6、12、24 小時後，ERK 蛋白活性分析結果



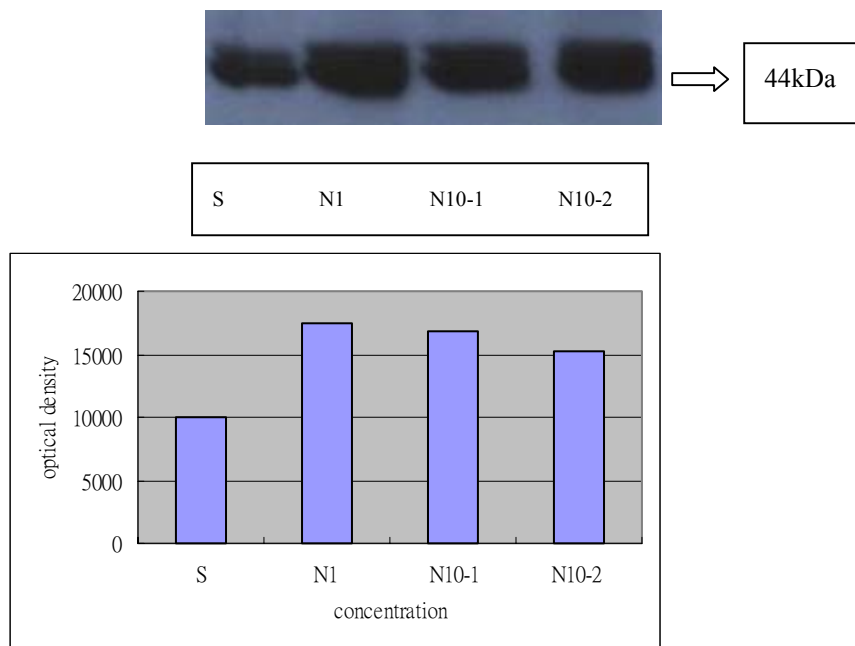
說明: 取 T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)加入 U2OS cell line 3、6、12、24 小時後分別偵測其 ERK 蛋白的活性，結果發現在 3 小時的時候 ERK 蛋白的活性最大。

HGF

圖十五

於 PH4 之浸泡液下，表面無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 HGF 細胞作用 24 小時後， ERK 蛋白活性分析結果

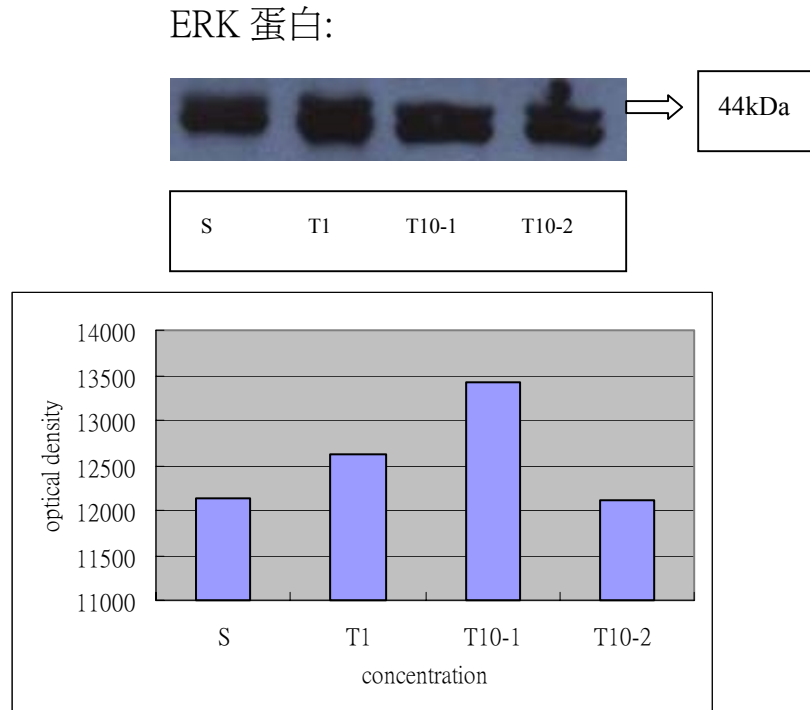
ERK 蛋白:



說明:取四種釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 HGF cell line 24 小時後，ERK 蛋白活性分析的結果，加入非 TiN 鍍膜的金屬離子釋出液，會使 ERK 蛋白比 saliva 這組增加。

圖十六

於 PH4 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 HGF 細胞作用 24 小時後，ERK 蛋白活性分析結果

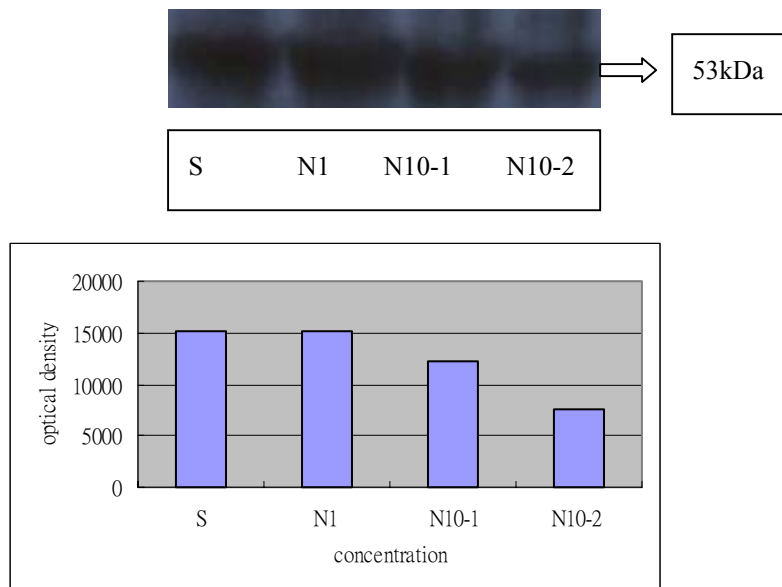


說明:取四種釋出液，分別是 S(saliva)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 HGF cell line 24 小時後，ERK 蛋白活性分析的結果，加入鍍膜矯正金屬支架的金屬離子釋出液，會使 ERK 蛋白比 saliva 這組增加。

圖十七

於 PH4 之浸泡液下，表面無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 HGF 細胞作用 24 小時後，p53 蛋白活性分析結果

p53 蛋白:

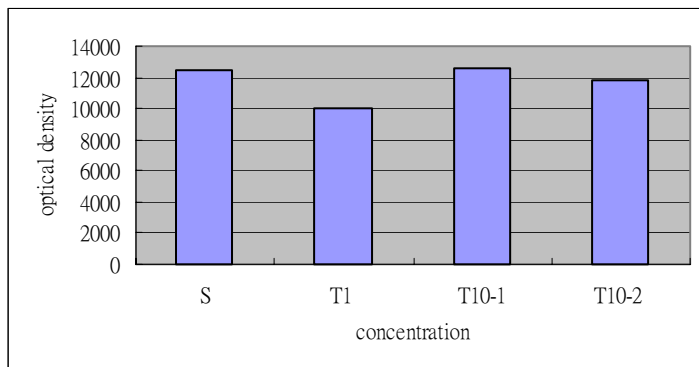


說明:取四種金屬矯正支架的釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 HGF cell line 24 小時後，p53 蛋白活性分析的結果，加入非 TiN 鍍膜的金屬離子釋出液，會使 p53 蛋白比 saliva 這組降低。

圖十八

於 PH4 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 HGF 細胞作用 24 小時後，p53 蛋白活性分析結果

p53 蛋白:

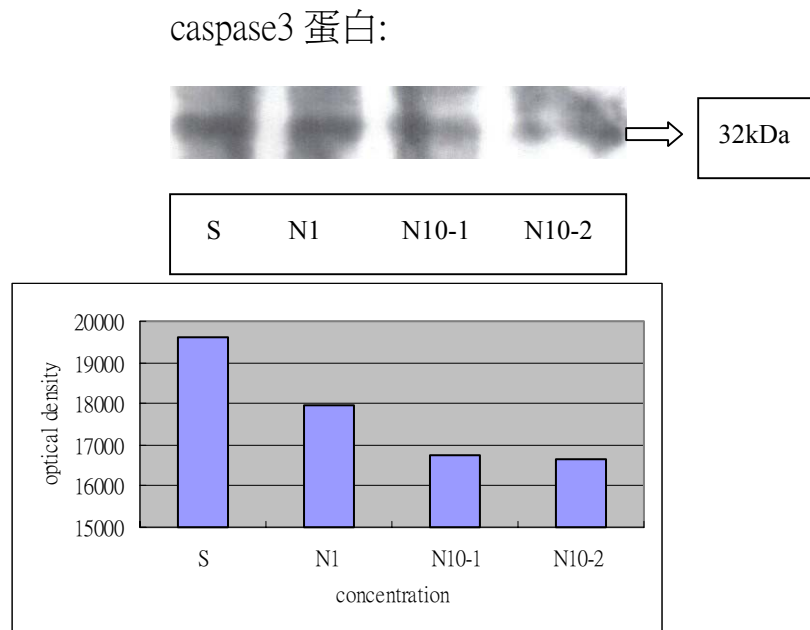


說明:取四種釋出液，分別是 S(saliva)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 HGF cell line 24 小時後，p53 蛋白活性分析的結果，加入鍍膜矯正金屬支架的金屬離子釋出液，會使 p53 蛋白比 saliva 這組降低。



圖十九

於 PH4 之浸泡液下，表面無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 HGF 細胞作用 24 小時後，caspase3 蛋白活性分析結果



說明:取四種釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 HGF cell line 24 小時後，caspase3 蛋白活性分析的結果，加入非 TiN 鍍膜的金屬離子釋出液，會使 caspase3 蛋白比 saliva 這組降低。

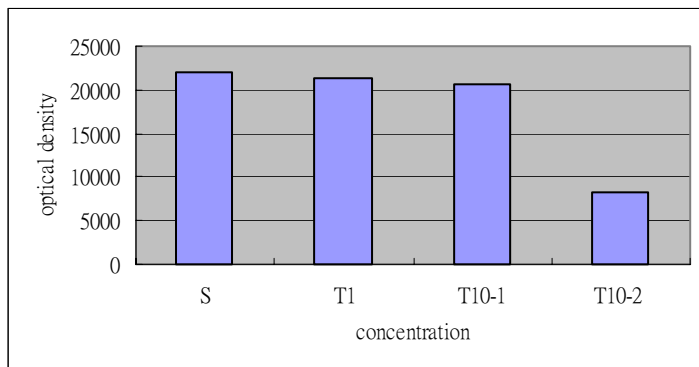
圖二十

於 PH4 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 HGF 細胞作用 24 小時後，caspase3 蛋白活性分析結果

caspase3 蛋白:



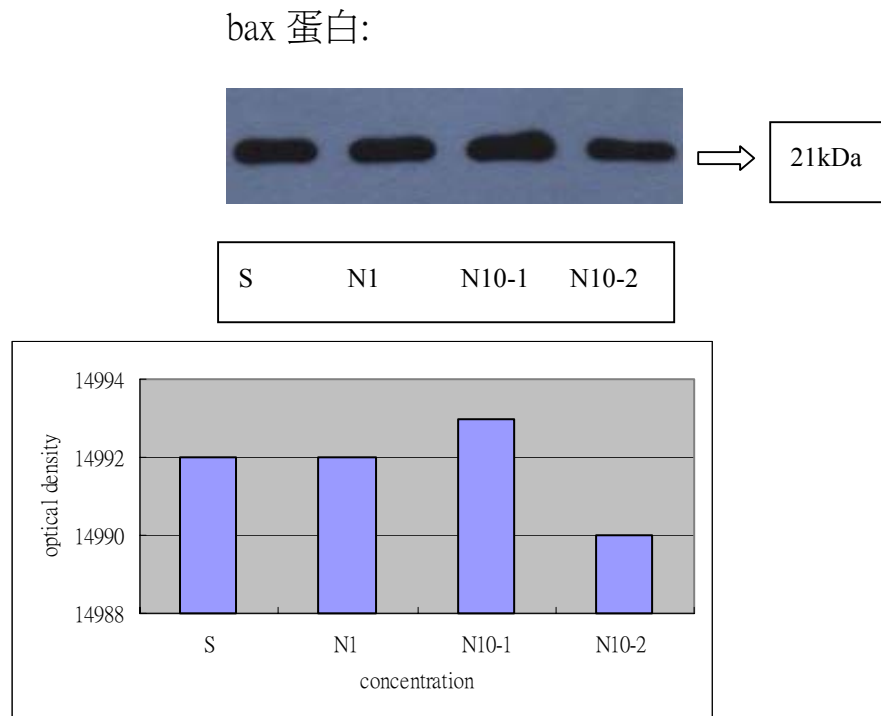
S      T1      T10-1      T10-2



說明:取四種釋出液，分別是 S(saliva)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 HGF cell line 24 小時後，caspase3 蛋白活性分析的結果，加入鍍膜矯正金屬支架的金屬離子釋出液，會使 caspase3 蛋白比 saliva 這組降低。

圖二十一

於 PH4 之浸泡液下，表面無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 HGF 細胞作用 24 小時後，bax 蛋白活性分析結果

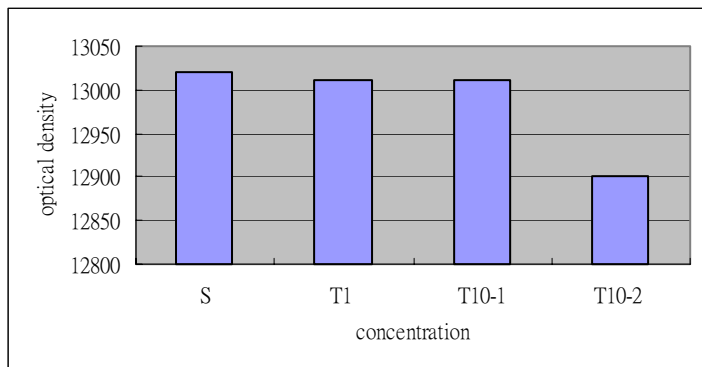
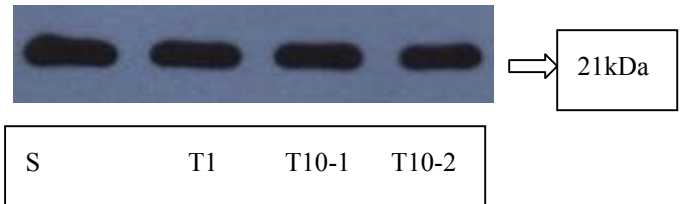


說明:取四種釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 HGF cell line 24 小時後，Bax 蛋白活性分析的結果，加入非 TiN 鍍膜的金屬離子釋出液，會使 Bax 蛋白比 saliva 這組沒有明顯差異。

圖二十二

於 PH4 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 HGF 細胞作用 24 小時後， bax 蛋白活性分析結果

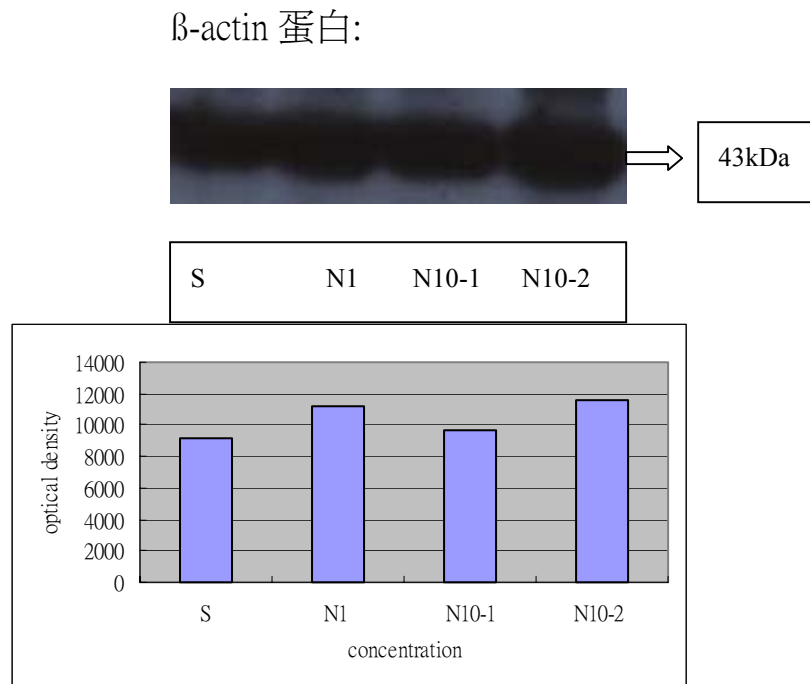
bax 蛋白:



說明:取四種釋出液，分別是 S(saliva)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 HGF cell line 24 小時後，Bax 蛋白活性分析的結果，加入鍍膜矯正金屬支架的金屬離子釋出液，會使 Bax 蛋白比 saliva 這組降低。

圖二十三

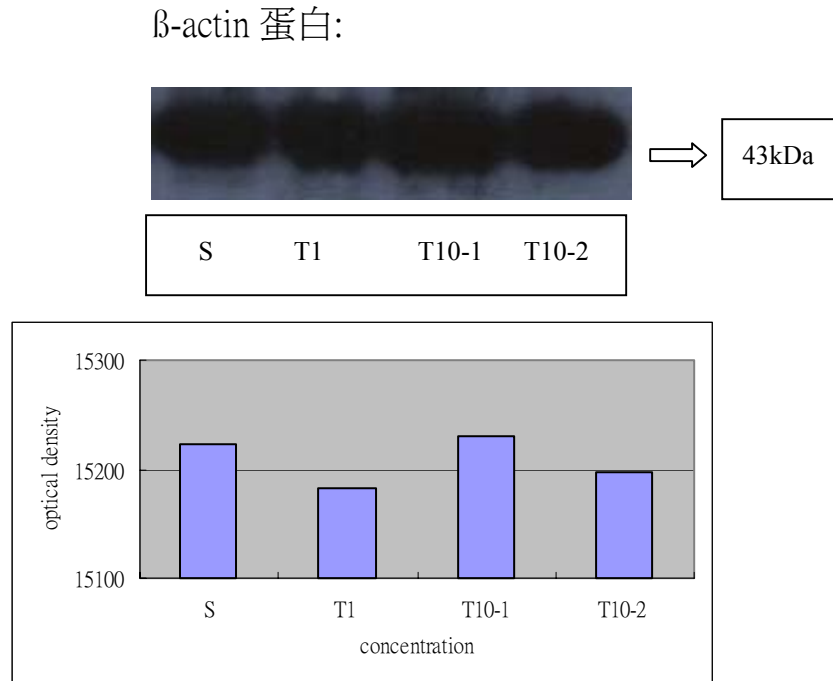
於 PH4 之浸泡液下，表面無 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 HGF 細胞作用 24 小時後， $\beta$ -actin 蛋白活性分析結果



說明:取四種釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 HGF cell line 24 小時後， $\beta$ -actin 蛋白活性分析的結果，加入非 TiN 鍍膜的金屬離子釋出液，並不會使  $\beta$ -actin 蛋白與 saliva 這組有明顯差異。

圖二十四

於 PH4 之浸泡液下，表面有 TiN 鍍膜之 Unitek 品牌矯正支架，對 HGF 細胞作用 24 小時後， $\beta$ -actin 蛋白活性分析結果

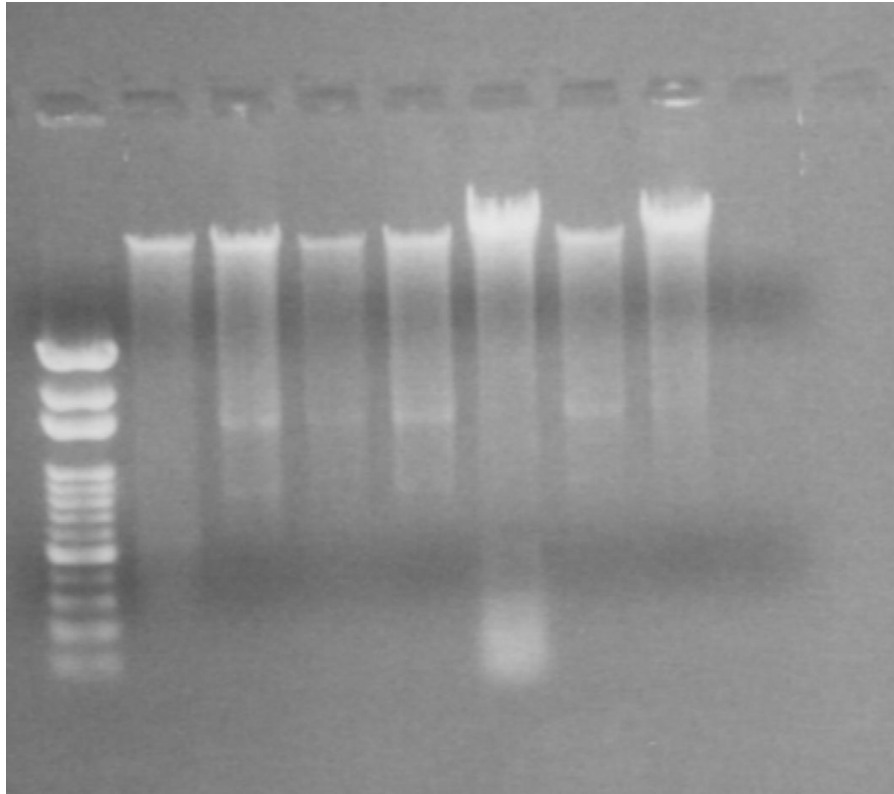


說明:取四種釋出液，分別是 S(saliva)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 HGF cell line 24 小時後， $\beta$ -actin 蛋白活性分析的結果，加入鍍膜矯正金屬支架的金屬離子釋出液，並不會使  $\beta$ -actin 蛋白與 saliva 這組有明顯差異。

## DNA fragmentation assay

DNA fragmentation(圖二十五)

U2OS cell line



S	N1	N10 <sup>-1</sup>	N10 <sup>-2</sup>	T1	T10 <sup>-1</sup>	T10 <sup>-2</sup>
---	----	-------------------	-------------------	----	-------------------	-------------------

說明:取七種釋出液，分別是 S(saliva)、N1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、N10-1(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、N10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)、T1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 1 $\mu$ l/ml)、T10-1(TiN 鍍膜金屬釋出液的濃度 0.1 $\mu$ l/ml)、T10-2(非鍍膜金屬釋出液的濃度 0.01 $\mu$ l/ml)，加入 U2OS cell line 24 小時後，DNA fragmentation 分析的結果，並沒有發現明顯的 DNA ladder 的現象。