

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：台灣常用根管充填劑對人類淋巴球基因毒性研究

The evaluation of genotoxicity of different root canal sealers

計畫編號：NSC-88-2314-B-040-040

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：黃翠賢

執行機構：中山醫學院牙醫系

一、中文摘要

AH 26 與 AH plus 為樹脂類之根管充填劑，由 AH26 過去研究發現會釋出 formaldehyde，因而造成生物毒性，改良後之樹脂類充填劑 AH plus 根據廠商指出不會釋出 formaldehyde。本研究目的乃欲了解 AH 26 與 AH plus 根管充填劑之基因毒性。本實驗利用 Single gel electrophoresis assay 簡稱彗星分析 (Comet assay) 來偵測細胞經此二種根管充填劑作用後，細胞中 DNA 單股斷裂之情形。將細胞裂解 (lysis) 後，於玻片上作電泳分析，在 200 倍放大率之螢光顯微鏡下，經轉移至電腦，分別計算測量 50 個細胞的 shape factor 和 migration factor。所得之數據以 Dunnet's test 作統計分析。結果發現如下：於 AH26 組，DNA 傷害呈劑量相關的增加 ($p < 0.05$)。於 AH plus 組，只於 0.5 和 2.5 μM 濃度中存有差異性 ($p < 0.05$)。結語：AH 26 與 AH plus 根管充填劑對於細胞有造成細胞的 DNA 傷害，即對細胞具有基因毒性。

關鍵詞：根管充填劑、基因毒性、彗星分析

Abstract

Alkaline single cell electrophoresis (SCGE), known as the comet assay, is frequently used for detection of single strand breaks of DNA. The advantage of this assay is that it is possible to measure the level of single strand break in individual cells. The purpose of this study was to evaluate the genotoxicity of resin-based root canal sealers, AH26 and AH plus, by comet assay. The root canal sealers were mixed according to the manufacturer's instruction. The dose were prepared as follows: 0.1, 0.5 and 2.5 $\mu\text{g/ml}$. Oral cancer cells (OC2) were suspended in 2 ml of medium containing the test agent at a density of 2×10^5 cells/ml, and were incubated at 37 °C. The comet assay was carried out by a method reported by Singh et al. (1988). After cell were lysed, the slides were left in electrophoresis buffer at 4 °C for 20 minutes and then subjected to electrophoresis. Fifty cells on one slide per treatment group were examined at 200 X magnification using a fluorescence microscope equipped with an excitation filter of 515-560nm and a barrier filter of 590 nm which was connected through the CCD camera to an image analysis system. Shape factor and migration factor were calculated. The results were used the multiple pairwise comparisons (Dunnet's test) for shape factor and migration factor. The results showed as follows: In AH 26 group, the DNA damage was dose-dependently increased. ($p < 0.05$) The AH plus group existed difference only at 0.5 and 2.5

µg/ml. ($p < 0.05$) Conclusion: From this study, AH 26 and AH plus may induce the oral cancer cell DNA lesion.

Keywords: root canal sealers, genotoxicity, comet assay

二、緣由與目的

過去研究指出根管充填劑會釋放出可溶的物質或經解離與侵蝕的物質，經由牙齒根管如 dentinal tubules, accessory and lateral canal 等滲出到牙周組織。(1-3) 根管充填劑有三大類，其中一類為由 epoxy resin 為主成分之根管充填劑，常見的為 AH26 與 AH plus(Dentsply Co.) 根管充填劑。由於 AH 26 根管充填劑會釋放出 formaldehyde 造成細胞毒性，而新改良商品 AH plus 根據廠商指出則不會釋出 formaldehyde 造成細胞毒性。而我們過去研究則發現 AH 26 與 AH plus 均會造成 oral cancer cell (OC2) 細胞株之細胞毒性。此並非如廠商所宣稱不具細胞毒性。因此我們想進一步了解此二材料之基因毒性。Single gel electrophoresis 簡稱 Comet assay 為一簡單又準確性高之基因毒性分析方法。我們利用此方法(Singh et al. 提出)(4,5) 來研究 AH 26 和 AH plus 根管充填劑分別作用於細胞後，其 DNA 斷裂之變化。期望能提供給臨床醫師於治療患者時之參考。

目的：比較 AH 26 與 AH plus 根管充填劑之細胞基因毒性

三、結果

1. 於 AH 26 組，migration factor 乃隨藥物濃度增高而增加。(p<0.05)

Shape factor 亦隨藥物濃度增高而增加。(p<0.05)

2. 於 AH plus 組，migration factor and shape factor 須於濃度大於 $0.5 \mu\text{M}$ 以上時才具有差異性。(p<0.05)

3. Migration factor: AH plus 高於 AH

26 根管充填劑

4. Shape factor: AH plus 高於 AH 26 根管充填劑

四、討論

至目前為止只有少數文獻提及根管充填劑之基因毒性。Schweiki 以 V79/HGPRT 細胞與 AH 26 根管充填劑作用後觀察其致突變性。結果發現於 AH26 混合後 24 小時會對細胞產生致突變性(mutagenicity)。(6) 然而廠商廣告指出 AH plus 不具有基因毒性(genotoxicity)，且此說並未見於任何已發表之文獻中。本研究發現 AH 26 與 AH plus 對 OC2 細胞具有基因毒性，它們有造成細胞 DNA 之傷害。本研究原欲以人類淋巴細胞球作為測驗，但經幾次之試驗發現以初次培養之淋巴細胞與藥物作用後呈不穩定之結果表現，因此延續過去使用之細胞株 OC2 作為觀測。由結果發現二種材料均造成細胞 DNA 之傷害。由於 AH 26 根管充填劑會釋出 formaldehyde 而 AH plus 不會，因此是何種成分造成細胞之傷害則是日後可繼續研究，另外對細胞傷害之突途徑亦是可探討之課題。

五、計畫成果自評

本研究結果證明 AH 26 與 AH plus 根管充填劑對人類口腔上皮細胞株具有 DNA 之傷害，即具基因毒性。临床上這種樹脂類材料用於作根管充填劑是否值得採用，則有賴臨床醫師再參考本材料之其他相關物性作一評估，以決定是否使用。

六、Reference

1. DeDeus (1975) Frequency location and direction of the lateral, secondary and accessory canals. J Endod 1:361-366
2. Dongari A, Lambrianidiss T. (1988)

- Periodontally derived pulpal lesions. Endod Dent Traumatol 4: 49
3. Major IA, Pindborg JJ. (1973) Histology of human tooth Munksgard Copenhagen
 4. Singh NP, Danner DB, Tice RR, Brant L, schneider EL. (1990) DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. Mutation Res 237:123-133
 5. Singh NP MccoyMT Tice RR Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175:184-191
 6. Schweikl H. Schmalz G. Stimmelmayer H. Bey B. (1995) Mutagenicity of AH 26 in an in vitro mammalian cell mutation assay. J Endod 21:407-410.

	Condition	N	Migration factor(Mean/SD)	Shape factor(Mean/SD)
	DMSO	50	44.16/ 1.47	1.0/0.0
	4NQO	50	57.89/ 5.84	2.75/0.19
AH26	0.1	50	58.26/ 4.69	2.62/0.17
	0.5	50	89.13/ 3.21	3.63/0.14
	2.5	50	67.74/ 2.32	3.54/0.12
AH plus	0.1	50	80.20/ 4.90	2.89/0.27
	0.5	50	79.04/ 3.23	3.73/0.14
	2.5	50	110.83/3.3	4.97/0.17
			3	