

合成氫氧磷灰石對V79細胞毒性研究

張育超 張豐城 黃明發
廖保鑫 周林世珍 周明勇

氫氧磷灰石 (Hydroxyapatite, 簡稱HA) 具有生物相容性且能和齒槽骨產生化學性結合, 並且能被吸收轉變成新生骨質, 常被使用在口腔外科與牙周病科做為骨質缺損處之填充物。本研究就中山醫學院牙醫學系自行合成之HA, 利用組織培養方法, 探討其細胞毒性作用, 評估臨床使用之可行性。本實驗所採用之細胞株為中國倉鼠肺纖維母細胞 (V79 cells), 在60mm培養皿中植入 1×10^5 個細胞培養24小時後, 加入HA 20顆共同培養四天, 並以不加HA者為對照組, 分別計算細胞生長數目, 以trypan blue染料染色法計算細胞存活率, 另在位相差顯微鏡及掃描式電子顯微鏡下觀察細胞形態、生長情形。結果顯示, 實驗組與對照組在細胞生長數目、存活率上並無顯著差異 ($p > 0.05$), 且在位相差顯微鏡下可觀察到V79細胞可在HA顆粒底部附著, 再以電子顯微鏡進一步觀察證實V79細胞確可附著在HA上。綜合本實驗結果, 本系合成之HA對V79細胞並不具有細胞毒性。

關鍵語：氫氧磷灰石，組織培養，細胞毒性

前 言

骨移植可以用來治療牙周病或是齒槽骨缺損, 依照供給者與接受者血緣關係^{1,2}, 可分為自體骨移植 (autogenous bone graft)、同種移植 (allograft)、異種移植 (xenograft) 及異質移植 (alloplast) 等方法來填補骨質缺損處。自體骨移植雖無抗原性 (antigenicity) 的問題, 但是需要另一個手術開口來取得所需的骨質, 而且常在量的供給上有所限制。在異種移植中因為不同生物族群間之移植, 常有抗原性的問題產生, 臨床上多不考慮使用。

而可作為異質移植之骨填充材料有磷酸鈣鹽 (calcium phosphate)^{3,4,5}、熟石膏 (plaster of

Pairs)^{4,6,7}等, 都是生物相容性高的人工合成移植體, 且可大量製備, 其中以磷酸鈣鹽對牙周組織癒合有較明顯的幫助²。磷酸鈣鹽移植體最早係使用於整形外科上⁸, 而在1981年時Rabalais開始將其用於牙周病之治療, 作為牙周骨壁缺損處之填充材料⁹。且其可分為不可吸收的氫氧磷灰石 (hydroxyapatite) 與可緩慢吸收的磷酸三鈣 (beta tricalcium phosphate) 兩大類。不可吸收的氫氧磷灰石其構造式為 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 依製備方法不同可分為非孔狀 (nonporous) 及孔狀 (porous) 氫氧磷灰石; 而後著又可分成閉孔式 (dead end porous) 與開孔式 (interpore porous)^{10,11}。使用氫氧磷灰石移植傷口癒合時, 常發現其外皆有結締組織被膜 (capsule) 圍住, 且是長連接上皮附連 (long junctional epithelium at-

1.中山醫學院牙醫學系

2.中山附設醫院牙科部

tachment) 而非結締組織附連 (connective tissue attachment)^{12,13}。其傷口癒合過程中少有發炎反應發生¹³，可說是生物相容性 (biocompatibility) 相當高的物質。Yukna 等人¹⁴研究結果認為HA移植術與單純牙周骨膜翻開術比較，植入HA有較多的牙周囊袋減少及骨充填量，且齒槽脊吸收量較少。目前廣泛使用於牙周病、口腔外科與口腔植體上作為骨質缺損處之填充材¹⁰。

本研究就中山醫學院牙醫學系自行合成之HA¹⁵，依張育超等人¹⁶之方法利用組織培養法，測定細胞生長曲線、細胞存活率並在位相差顯微鏡及掃描式電子顯微鏡下觀察，來探討其細胞毒性作用，評估臨床使用之可行性。

材料與方法

一、實驗材料

(一)細胞培養

本研究所用之細胞為V79培養細胞，係來自中國倉鼠 (Chinese hamster) 肺纖維母細胞，由中山醫學院牙醫系口腔生物實驗室所提供。且每三天做一次細胞之繼代培養 (passage culture)¹⁷。細胞之培養液為MEM (minimum essential medium, GIBCO; U.S.A.) 中加入1% PSN (penicillin, streptomycin, neomycin, GIBCO; U.S.A.)，B.E.S.(N-N-Bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethane sulfonic acid, Sigma; U.S.A.) 及NaHCO₃，調整pH值為7.2；及10%胎牛血清 (fetal bovine serum, GIBCO; U.S.A.) 等後使用。使用之器具有60mm之塑膠培養皿 (plastic petri dish, Nunc; Denmark) 及培養面積25cm²之塑膠培養瓶 (plastic flask, Nunc; Denmark)。

(二)HA之合成

本研究所用之HA係由中山醫學院牙醫系材料實驗室所提供。其合成方法如下¹⁵：以硝酸鈣 (Ca(NO₃)₂) (和光化學) 和磷酸 (H₃PO₄) (和光化學) 以1200°C鍛燒1小時後合成最大相對密度96.92%之HA，提供本實驗作為細胞毒性之測試。

二、實驗方法

本實驗所採用之細胞株為中國倉鼠肺纖維母細胞 (V79 cells)，在60mm培養皿中植入1×10⁵個細胞培養24小時後，加入HA 20顆共同培養四天，並以不加HA者為對照組，分別以下列各方法探討其細胞毒性作用，而每組實驗共重覆三次。

(一)細胞生長曲線 (cell growth curve)

1×10⁵個細胞植入60mm培養皿中 (每組共三個培養皿) 培養24小時後，置入20顆HA共同培養四天，每天分別取出培養皿，以PBS液(-) (GIBCO; U.S.A.) 洗滌後，加入0.25% trypsin (GIBCO; U.S.A.) 將細胞剝離後，以血球計數盤計算細胞生長數目，並加以記錄之。

(二)細胞存活率 (cell viability)

於置入20顆HA共同培養四天後，分別將對照組與試驗組培養皿取出以PBS液(-)洗滌後，加入0.25% trypsin將細胞剝離後，加入0.4% trypan blue (GIBCO; U.S.A.) 染料，以血球計數盤計算細胞數目，細胞存活率之計算是以全部細胞數減去染色的死細胞數除以全部細胞數而得，並加以記錄之。

(三)位相差顯微鏡觀察 (phase contrast microscopy)

於置入20顆HA共同培養後，每天於位相差顯微鏡 (Nikon ELWD 0.3, Japan) 下觀察對照組與試驗組細胞形態、生長之情形，並照相記錄之。

(四)掃描式電子顯微鏡觀察 (scanning electron microscopy)

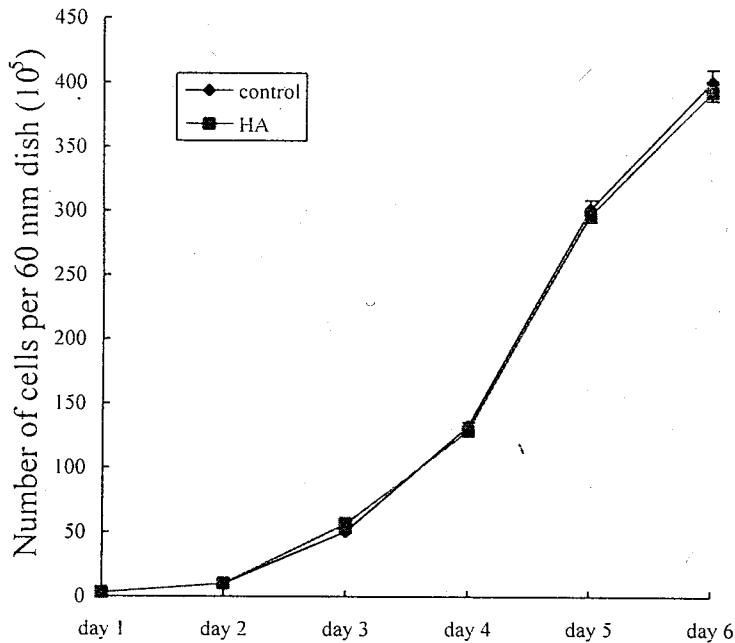
於置入20顆HA共同培養四天後，將對照組與試驗組分別加入1%四氧化錳 (OsO₄) 固定液，再以酒精做一連串的脫水，最後經臨界點乾燥 (critical point drying) 及金屬鍍膜 (metallic coating) 後¹⁸，於掃描式電子顯微鏡 (Jeol JSM-T300, Japan) 下觀察，並照相記錄之。

結 果

於第一天將1×10⁵個細胞種入60mm之培養皿，培養24小時後 (即第二天) 加入HA繼續培養，每天分別取出培養皿計算細胞數目，發現對照組與試驗組細胞生長數目相近，於培養終了 (即第六天) 對照組為401.7×10⁵±7.93×10⁵個細胞，試驗組為393.5×10⁵±4.97×10⁵個細胞。將對照組與試驗組做比較，並以Student t-test加以分析，可發現細胞生長並無顯著之差異 (p>0.05) (圖一)。

由圖二所示，於置入20顆HA共同培養四天後，對照組之細胞存活率為92±2.16%，試驗組之細胞存活率為90.67±1.70%，以Student t-test加以分析，得知細胞存活率並無顯著之差異 (p>0.05)。

每天於位相差顯微鏡觀察中，發現對照組

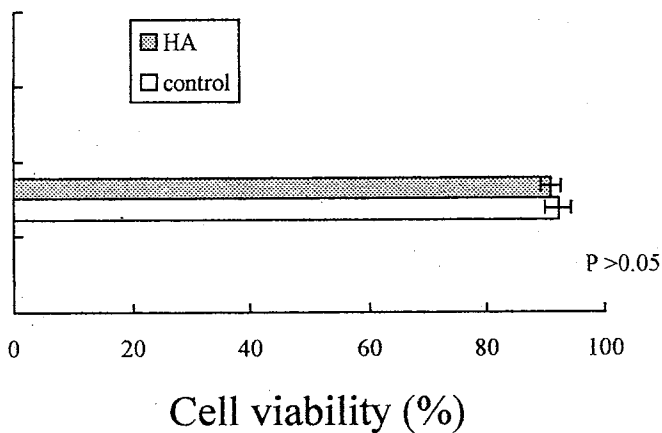


圖一：細胞生長曲線

Figure 1: Cell Growth Curve

註：將對照組與試驗組做比較，並以t-test加以分析，可發現細胞生長並無顯著之差異 ($p>0.05$)。

ps : No differences in cell number between control and TCP groups were found using t-test ($p>0.05$).

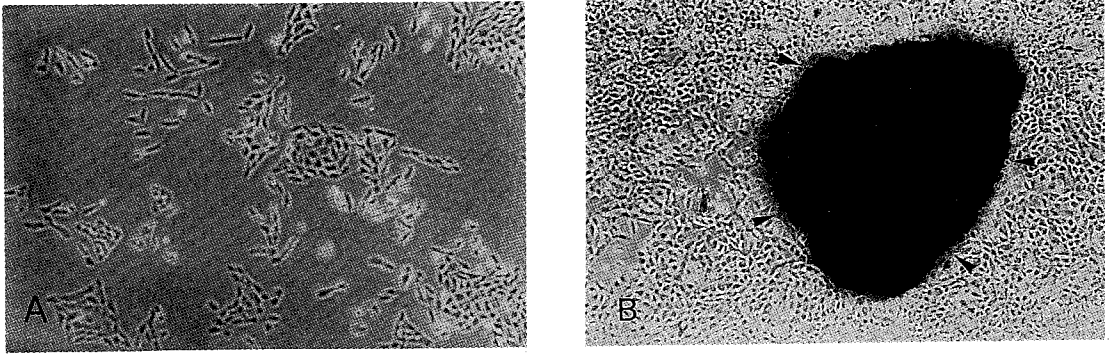


圖二：細胞存活率

Figure 2: Cell Viability

註：將對照組與試驗組做比較，並以 t-test 加以分析，可發現細胞存活率並無顯著之差異 ($p>0.05$)。

ps : No differences in cell ivability between control and TCP groups were found by t-test ($p>0.05$).



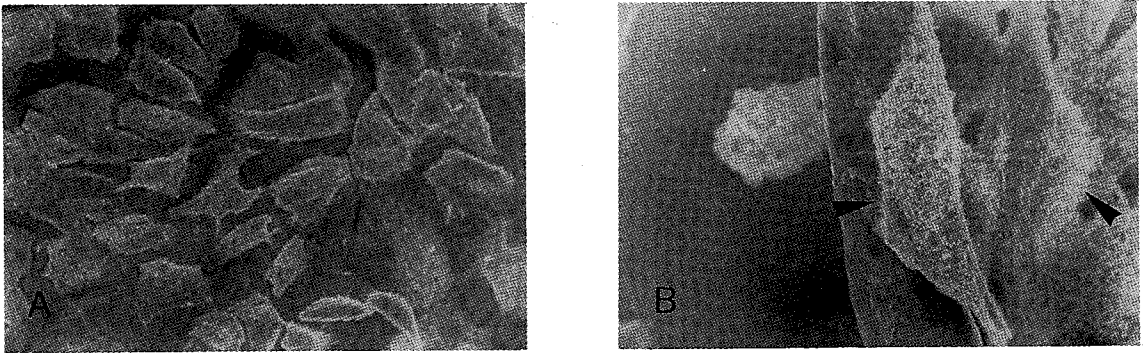
圖三：位相差顯微鏡照相圖

Figure 3: Micrograph of phase contrast microscopy

(A) V79 細胞 (10 x) Micrograph of V79 cells

(B) V79 細胞可在 HA 顆粒底部附著 (10 x)

The arrows show V79 cells could attach to the bottom of HA.



圖四：掃描式電子顯微鏡照相圖

Figure 4: Micrograph of scanning electron electron microscopy

(A) V79 細胞 (750 x) Micrograph of V79 cells

(B) V79 細胞確可附著在 HA 顆粒上 (2000 x)

The arrows show V79 cells attached to the surface of the HA.

V79細胞生長形態良好，在實驗組細胞生長形態與對照組類似，並不受加入HA而有影響，且可觀察到細胞可在HA顆粒底部附著（圖三），再以電子顯微鏡進一步觀察證實細胞可附著在HA表面上，並且能在表面擴展開來（圖四）。綜合實驗結果顯示HA之生物相容性良好，對V79細胞並不具有細胞毒性之作用。

討 論

牙科材料在開發後，上市臨床使用前必須經過許多測試，除其本身物理化學性質合乎規格外，亦需測試其是否具有生物相容性，以確保對組織無害，且可安全使用在臨床上⁹。所以，本研究即循此一原則就本院牙醫學系自行合成之HA¹⁵，利用組織培養方法，來探討其細胞毒性作用，評估臨床使用之可行性。

在生物測試方面，美國國家標準局／美國牙醫學學會 (American National Standards Institute/American Dental Association, 簡稱ANSI/ADA) 與國際牙醫聯盟 (Federation Dentaire International, 簡稱FDI) 將其分為下列三個不同的層次^{21,21}，初期測試 (initial test) 主要是在測試材料是否具有毒性，常以細胞毒性試驗 (cytotoxicity test)、溶血試驗 (hemolysis test)、系統毒性試驗 (systemic toxicity test)、致畸性試驗 (teratogenicity) 與致癌性試驗 (carcinogenicity) 等方法來評估毒性作用；繼發性測試 (secondary test) 其角色是介於初期測試與使用性測試 (usage test) 之間，主要測試方法有口腔黏膜刺激性試驗 (oral mucous membrane test)、植入試驗 (implant study)、刺激感受性試驗 (sensitization test)、皮膚毒性試驗 (dermal toxicity test) 等方法；使用性測試包含有口腔黏膜刺激性試驗、覆髓試驗 (pulp capping test)、斷髓試驗 (pulpotomy) 與骨下植入試驗 (bone implant test) 等方法，其主要是強調臨床使用上的安全性。

本研究屬於牙科器材生物測試之初期測試，所採用的方法為測定HA之細胞毒性部份。而細胞毒性試驗主要可由細胞生長測定、細胞通透性之變化、新陳代謝的變化與細胞病理變化等方法來評估²²，而本研究採用V79細胞株以細胞生長測定法來評估材料是否具有細胞毒性，並輔以顯微鏡觀察，進一步來探討細胞與材料附著間的關係^{16,23,24,25}。

一般在評估醫用材料是否具有毒性時，所採用之細胞株多推薦使用中國倉鼠纖維母細胞，其理由如下：細胞生長快速²⁶。而本研究所採用之V79細胞係來自雄性中國倉鼠肺臟纖維母細胞，細胞生長快速容易繁殖培養，並已廣泛運用在細胞學之研究上^{27,28}。

Iwata K²⁴與Toriyama M等人²³曾以細胞生長曲線、細胞存活率、位相差顯微鏡及掃描式電子顯微鏡觀察等方法來評估HA是否具有細胞毒性，結果與本研究類似皆顯示HA並不具有細胞毒性作用，不過其另有探討材料對細胞初期附著率 (initial attachment rate) 間之關係，值得本研究再做進一步的探討，因為牙周組織在傷口癒合時纖維母細胞的附著扮演著重要的角色^{29,30}，如何開發出不同成份而能使牙周韌帶細胞或骨細胞有較好的初期附著，並能有較佳的組織再生，將是我們要再研究的主题。

綜合本研究結果顯示，本系自行合成HA之對V79細胞並不具有細胞毒性作用，但由於僅為牙科器材生物測試之初期測試，仍需進一步研究探討，諸如動物實驗等，而本系許明德等人³¹在植入台灣月兔股骨之動物實驗上已有初步結果，由組織切片中發現其可為周圍組織所接受，顯示HA在活體中 (in vivo) 狀況下生物相容性良好，不過仍有待長期追蹤觀察，最後亦須牙科器材生物測試之使用測試證實，以為臨床使用上安全無虞。

謝 誌

感謝電子顯微鏡室廖克剛主任、廖孟琴小姐與詹惠真、陳燕玲同學在研究工作上協助，使此項研究得以順利完成，特此致謝。

參考文獻

1. Bernard GH. Healing and repair of osseous defect. *Dent Clin N Am* 1991;35:469-477.
2. Hancock EB. Regeneration procedure. In: *Proceedings of the world workshop in clinical periodontics*. Princeton, New Jersey, 1989;pp VI 1-26.
3. Bissada NF and Hangorsky U. Alveolar bone induction: Alloplasts. *Dent Clin N Am* 1980;35:739-749.
4. Legeros RZ. Calcium phosphate materials in

- restorative dentistry: a review. *Adv Dent Res* 1988;2:164-180.
5. Viveksand Thomas JH. Alloplastic materials in reconstructive periodontal surgery. *Dent Clin N Am* 1991;35:521-530.
 6. Boyne PJ and O'Leary TJ. Hydroxyapatite, beta calcium phosphate and allogenic bone for filling periodontal defects, alveolar ridge augmentation, and pulp capping. *J Am Dent Assoc* 1984;108:822-831.
 7. Stanford JW. Bone inducing materials: their place in dentistry. *Int Dent J* 1987;37:162-168.
 8. Hulbert SF, Young FA and Msthews RS. Potential ceramic material as permanently implantable skeletal prosthesis. *J Biomed Mater Res* 1970;4:433.
 9. Rabalais ML, Yukna RA and Mayer ET. Evaluation of durapatite ceramic as an alloplastic implant in periodontal osseous defects. I. Initial six months results. *J Periodontol* 1981;53:680-689.
 10. Jarcho M. Biomaterial aspects of calcium phosphate properties and application. *Dent Clin N Am* 1986;30:25-47.
 11. Eugene W and Edwin CS. Biomaterial aspects of intercore-200 porous hydroxyapatite. *Dent Clin N Am* 1986;30:49-67.
 12. Moskow BS and Lubarr A. Histological assessment of human periodontal defect after durapatite ceramic implant: Report of a case. *J Periodontol* 1983;54:455-462.
 13. Carranza FA et al. Histologic study of healing of human periodontal defects after placement of porous hydroxyapatite implants. *J Periodontol* 1987;58:682-688.
 14. Yukna RA et al. Evaluation of perigraft (R) (Durapatite Ceramic) as an alloplastic implant in periodontal osseous defect, II Twelve-month reentry results. *J Periodontol* 1985;56:540-547.
 15. 張豐城、黃明發、呂毓修等人：氫氧磷灰石的合成及燒結性，中華牙醫學會雜誌 1995;14:74(P09)。
 16. 張育超、張豐城、廖保鑫等人：合成磷酸三鈣對V79細胞之毒性研究，中華牙醫學會雜誌 1996;15:265-272。
 17. 日本組織培養學會。“細胞之繼代法”於組織培養之技術，第一版，朝倉書店，東京，1982:23-24。
 18. Brunk U, Collins VP, Arro E. The fixation, dehydration, drying and coating of cultured cells for SEM. *J Microsc* 1980;123:121-131.
 19. Mjor IA. Dental Material: Biological properties and clinical evaluation. CRC press Inc. 1985:5-20.
 20. ANSI/ADA, American National Standards Institute/American Dental Association specification No.41 for biological evaluation of dental materials. 1979.
 21. FDI, Federation Dentaire International, Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials, 1980; *Int Dent J* 30:140, 1980.
 22. Mjor IA. Dental Material: Biological properties and clinical evaluation. CRC press Inc. 1985:28.
 23. Toriyama Mea al. Estimation of biocompatibility of high strength *B*-tricalcium phosphate ceramic by a tissue culture method. *J Jpn Ceram Soc* 98:404-407, 1990.
 24. Iwata K. Effect of chemical composition, surface shape and solubility behavior of hydroxyapatite (HAP) on the osteoconductivity and biocompatibility: evaluation in vivo and in vitro study. *J Jpn Stomatol Soc* 1990;39:1039-1069.
 25. Okada Y et al. Evaluation of in vitro biocompatibility of bioceramics: selection cultured cells on biocompatibility test. *J Jpn Stomatol Soc* 1995;44:14-20.
 26. Motoi Ishidate Jr. A proposed battery of tests for the initial evaluation of the mutagenic potential of medicinal and industrial chemicals. *Mutation Res* 1988;205:397-407.
 27. Hsu TC, Zenzes MT. Mammalian chromosomes in vitro, XVII. Idiogram of the Chinese hamster. *J Nat Cancer Inst* 1964;32:857-869.
 28. 黑木登志夫。V79細胞，組織培養。1981;7:14-19。
 29. Somerman MJ, Forster RA, Imm GM. Pe-

- riodontal ligament cells and gingival fibroblasts response differently to attachment factors in vitro. *J Periodontol* 1989;20:3-13.
30. Wikesjo Ulf ME, Nilvens RE and Selvig KA. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. *J Periodontol* 1992;63:158-165.
31. 許明德、朱裕華、張育超等人：氫氧磷灰石及磷酸三鈣骨組織中的組織反應-台灣月兔股骨中填入實驗，中華牙醫學會雜誌 1996;15:18(R002)。

Cytotoxicity of Synthetic Hydroxyapatite on V79 Cells

**Yu-Chao Chang, Feng-Cheng Jang, Ming-Fa Huang,
Pao-Hsin Liao, Lin Shin-Shen Chou, and Ming-Yung Chou**

Hydroxyapatite (HA) is biologically compatible and has been used in the treatment of periodontal osseous defects and in ridge augmentation. The purpose of this study was to investigate the cytotoxic effect of synthetic HA synthesized by School of Dentistry, Chung Shan Medical & Dental College. The cytotoxicity was tested using a tissue culture method with a cell line derived from Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cells). About 1×10^5 V79 cells were plated on each 60mm petri dish. After 24 hours, 20 pieces of HA were added to the petri dishes and co-cultured for a further 4

days. The cytotoxicity of HA was analyzed using the cell growth curve, cell viability, phase contrast microscopy (PCM) and scanning electron microscopy (SEM). The results showed that there was no difference in the viability or cell growth curve untreated V79 cells and V79 cells co-cultured with HA ($p > 0.05$). PCM revealed that V79 cells could attach to the bottom of HA. Further observation with SEM showed that V79 cells really attached to the surface of HA. In conclusion, synthetic HA is biocompatible with V79 cells.

Key words: hydroxyapatite, tissue culture, cytotoxicity