

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 自行研發改良三氧礦化物(MTA)之生物學效應研究(第三年) 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 96-2314-B-040-033-  
執行期間：96年08月01日至97年07月31日  
執行單位：中山醫學大學牙醫學系

計畫主持人：黃翠賢  
共同主持人：高嘉澤  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：呂宇顥,  
碩士班研究生-兼任助理人員：洪啟智  
碩士班研究生-兼任助理人員：郭榮慧

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 97年08月13日

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫期中進度報告

(計畫名稱)

自行研發改良三氧礦化物(MTA)之生物學效應研究(3/3)

計畫類別： 個別型計畫       整合型計畫

計畫編號：NSC 95 - 2314 - B - 040 - 033 -

執行期間： 96 年 08 月 01 日至 97 年 07 月 31 日

計畫主持人：黃翠賢

共同主持人：高嘉澤

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告    完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國            九 十 六 年   八   月   十 五   日

## 目錄

中、英文摘要及關鍵詞(keywords)。

中文摘要-----	III
英文摘要-----	IV-
Introduction-----	1.
Materials and Methods-----	2.
Result - & Discussion -----	4.
Figure -----	6.
REFERENCES -----	10.

## 中、英文摘要及關鍵詞(keywords)。

### 中文摘要

三氧礦聚合物(簡稱MTA, Mineral Trioxide Aggregate)常被用於作根尖充填之材料，臨床上由於硬化時間過長與成本上略高的問題，常為使用者抱怨。本研究室過去將此材料做過一探討，並已有能力自行合成，因此本年度之研究主要目的為將先前計劃已配製出之材料進一步作生物學上之相容性測試，以了解本材料之生物相容性。本研究之實驗方法與分析包括以MTT分析細胞之毒性，以DNA 裂解觀察材料對於細胞之基因毒性，以RT-PCR測試發炎蛋白COX-2是否出現，以西方墨點分析細胞內訊息蛋白之反應。結果顯示本材料對於細胞之生長沒有影響，且於西方墨點反應中出現ERK kinase蛋白，證據顯示不具有細胞毒性；於DNA裂解反應中發現沒有DNA破裂出現，顯示未具有基因毒性；而細胞之發炎反應中，雖有見到COX-2 之出現，但我們認為此為正常之細胞反應。結論：本研究室所配製之MTA具有細胞相容性，日後可再進行活體內之試驗和臨床研究。

**關鍵詞：** 三氧礦聚合物、細胞之毒性、基因毒性、發炎蛋白、西方墨點

## 英文摘要

MTA( mineral trioxide aggregate) is a root end filling material. Clinically it existed long setting time and expansive. Our laboratory has developed a novel MTA last year, and its physical and chemical properties has discussed. The purpose of the present study was to evaluate this novel material its biocompatibility in vitro. Material and method: In present study, the MTT assay was to evaluate the L929 and U2OS cell viability. The DNA fragmentation assay was to evaluate the genotoxicity of material contact with cells. The RT-PCR assay was to detect the COX-2 expression and other interleukins. The western blot assay was to detect the MAPK kinase expression. Results: the present result showed that this novel material existed cellular biocompatibility accompanied with the ERK kinase expression. The DNA breakage of treated cells did not exist. The COX-2 expression were shown in all groups. Conclusion : This novel material is biocompatibility with cells. The further study should be focus on the in vivo test and clinical test.

keywords: MTA, cytotoxicity, genotoxicity, inflammatory protein, western blot

## 前言

三氧礦聚合物(簡稱MTA, Mineral Trioxide Aggregate)其主要成分為tricalcium silicate, tricalcium oxide 和silicate oxide. 近年來，常被用於作根尖充填之材料。第一代之成分顏色呈灰色，第二代改良為白色(White mineral trioxide aggregate)。MTA其特性如下：具有良好之封閉效果；MTA混合之initial pH值為10.2，三小時後變為12.5，它具有好的compressive strength。[1] 根據材料廠商之敘述，MTA具有下列之適應症：(1) 可用於作Apexification；(2) 作為根管不小心穿通(perforation)之管壁修復材料；(3)髓腔底部穿通之修復；(4)修復牙根吸收現象；(5)作為根尖逆充填(root end filling)；(6) 牙齒覆髓(pulp capping)。傳統上MTA應用於根管治療上較多，但由下面之研究發現，MTA對骨頭之生成似乎也扮演著某種角色。

### **MTA 生物相容性－細胞影響**

關於MTA 之生物相容性研究常見有許多方式，有觀察細胞之表面與生長，皮下植入或是骨頭內植入研究或是直接與牙周組織接觸等方式。於細胞學之細胞毒性研究方面，大多數學者認為MTA具有細胞相容性，[2-8] 其中之細胞毒性測試方式不盡相同，如Keiser et al.(2000), Huang et al.(2003), Camilleri et al. (2004)[9]等應用methyltetrazolium (MTT) 方法分析細胞之細胞毒性，Torabinejad et al.(1995) 則應用agar overlay 方式與radiochromium 釋放之方法分析細胞毒性。[8] 而Haglund et al(2003) 以SEM觀察分析細胞之存活，則認為MTA對於macrophage 和fibroblast 具有細胞毒性。[10] 但由臨床上之使用，尚未見使用MTA後有任何不適之病例報告出現，因此大多研究認為MTA材料是可以被生物體接受之材料。

### **MTA之發炎效應**

另外MTA有關於細胞素反應之研究，主要以探討白介素(interleukin)之表現居多，用於觀測細胞之分化(differentiation)現象。MTA會誘導骨細胞之

inflammatory cytokine表現，與良好的細胞附著效應。過去本研究室也針對商用MTA做過探討，發表之研究結果(Huang et al. 2005) 顯示MTA會促使骨細胞(U2OS)之IL4和IL10分泌增加，[11] 在Loma Linda大學，Mitchell et al.研究則發現MTA作用細胞後IL-6, IL-8會增加，而IL-1 $\alpha$ 與IL-1 $\beta$ 不會有增加。[12] 相反的，Koh et al.發現IL-6, IL-1 $\alpha$ 與IL-1 $\beta$ 量於MTA材料與細胞接觸後6天後會增加。[7, 13] 即發炎現象會出現。發炎之反應，PGE2為發炎之介質，當組織受到外來之刺激如化學藥物之刺激或是細菌之刺激，宿主体內會有發炎性之反應出現。[14-16] Cyclooxygenase(COX)為prostaglandin endoperoxide synthase，它負責prostaglandin之生物合成。

COX屬於dual enzyme，它可催化二種enzyme的反應：1.藉由cyclooxygenase 將arachidonic acid轉變為PG2。2.藉由peroxidase減少PG2變為PGH2。基本上COX可分為constitute enzyme(COX1)和inducible isoenzyme (COX2)，其中COX2可因Proinflammatory 因子而將之誘導出來。

本研究目的為將自行合成MTA 材料之體外細胞研究(In Vitro)，比較自行合成MTA與商品化MTA 之細胞生物相容性差異。

## 材料與方法

### 一、MTA 粉末製備過程

1. 將CaO、SiO<sub>2</sub>、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 以及Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 等依照適當比例混和均勻。
2. 放入高溫爐中，設定不同溫度與加熱製程條件，如：從室溫加熱至1400 度，再持續加熱兩個小時，再降至室溫。
3. 將燒結後的產物取出，研磨成粉末。
4. 將研磨好的粉末，用孔徑大小為20 $\mu$ m的篩網過篩。
5. 將過篩後的粉末與石膏依照4:1 的比例，並加入所欲加入之配方材料如生長素或生長因子類（對細胞生長有助益之材料）或膠原蛋白（collagenase）與骨

膠 (gelatine) ，均勻混和。

由自行合成之MTA 材料將之製成直徑為3mm 高度2mm 之圓柱體，將之浸泡於細胞培養液中，其中將MTA 調製後分為調製一小時與硬化後二十四小時組，各組分別浸泡二十四小時與七天，之後經離心取其上層液做下面之測試。

Table 1. 各組別成分

	A	B	C	D
CaO	▲	▲	▲	▲
SiO <sub>2</sub>	▲	▲	▲	▲
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	▲	▲	▲	▲
ZnO		▲		
MgO			▲	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>				▲

## 二，生物相容性測試

### 1. 細胞毒性測試—mitochondria hydrogenas activity assay (MTT assay) [14]

本測試部分將先決定出藥物之濃度與測試之時間區間，再進行系列之研究。

本研究所使用之細胞株為U2OS (human osteosarcoma cell line)細胞。

### 2. SEM 觀察 L929 和 U2OS 細胞與 自製之 MTA 的附著情形。

步驟將細胞直接培養於 MTA 材料上，直接於電子顯微鏡下觀察其生長狀況。

### 3. 基因毒性測試[15]

以 DNA 裂解分析材料之基因毒性，將細胞與材料作用後，收取細胞之 DNA ，在作跑膠觀察是否有 DNA 帶狀出現。

### 4. 發炎蛋白檢測[15]

利用 RT-PCR 偵測材料萃取液作用後之細胞，其 COX-2 及 IL2, 6, 8 之表現。



## **5. MAPK kinase – ERK kinase 之出現反應[16]**

利用 western blot assay 分析細胞作用後，胞內訊息蛋白 ERK 之出現。

## **結果與討論**

### **1. 細胞毒性測試—mitochondria hydrogenas activity assay (MTT assay)**

新的 MTA 基本上對於 L929 和 U2OS 細胞不具有毒性。(figure 1-3)由於材料 C 組織反應較佳，接續之試驗皆以此組之配方作為研究。

此結果與傳統商品 MTA 之不具細胞毒性相仿，代表本材料具有細胞相容性。

### **2. SEM 觀察 L929 和 U2OS 細胞與 自製之 MTA 的附著情形。**

當細胞直接培養於 MTA 材料後，直接於電子顯微鏡下觀察發現 L929 和 U2OS 細胞於材料表面均出現尾足狀，貼附效果佳。此結果代表細胞可以於材料表面生長。此與本材料不具細胞毒性相吻合。

### **3.基因毒性測試**

細胞與材料作用後，收取細胞之 DNA ，不論何種濃度與浸泡液之時間下，均無 DNA 帶狀出現。由於此類矽鈣化合物基本上為組織相容之材料，經此分析發現未有 DNA 裂解狀況，代表細胞與此材料作用後未曾受到傷害，因此判定位具有基因毒性反應。

### **4.發炎標記檢測**

利用 RT-PCR 偵測材料萃取液作用後之細胞，觀察其 COX-2，IL2, 6, 8 之表現，結果只於 COX-2 上見到均有帶狀之出現，但與控制組相較則無差異性。其餘之

標記於本試驗中未有結果。由於結果與控制組相仿，最合理之解釋應為外來物質對於細胞均會有相同之防禦反應，因此細胞與本材料接觸後也出現炎性蛋白。

### **5. MAPK kinase – ERK kinase 之出現反應**

western blot assay 分析胞內訊息蛋白 ERK，結果不論何種濃度與浸泡液之時間下，均有 ERK band 之出現。次代表細胞作用後會出現細胞增殖之反應，此結果與前述之細胞毒性試驗結果也吻合，因有些試驗組別甚至其細胞之生長較控制組高，代表細胞與本材料接觸後生長狀況良好。

(六)計畫成果自評部份，

請就研究內容與原計畫相符程度：內容與計劃大致上相符合

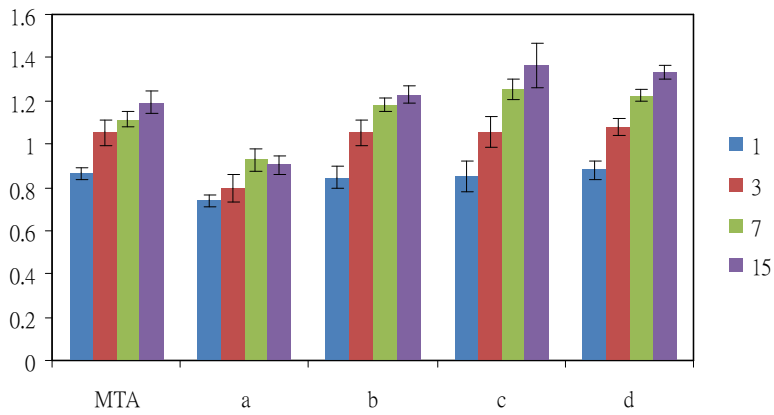
達成預期目標情況：有達到本計畫的研究目的

研究成果之學術或應用價值：已投稿至期刊中，現審查中。

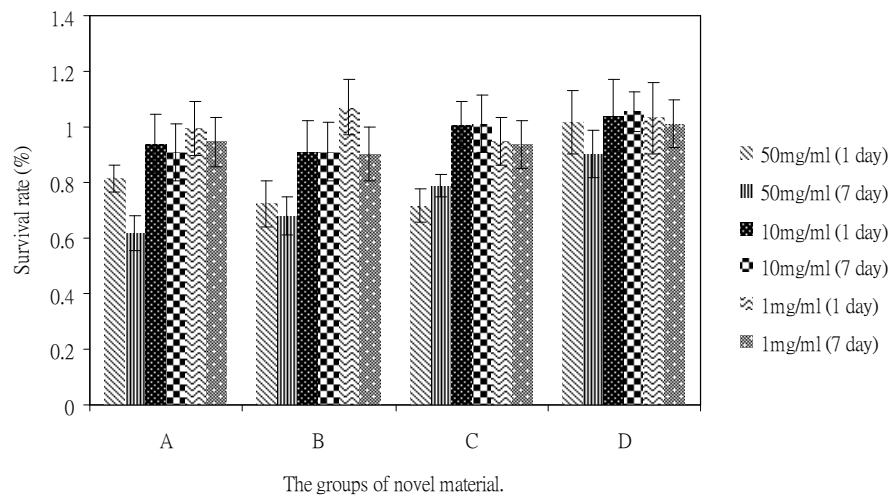
綜合評估：

1. 本計畫為接續前次計劃之內容，探討本材料之生物相容性，因此以細胞毒性、基因毒性、發炎效應和訊息傳遞等分析方法檢測材料之特性。
2. 由本結果幾乎證明本材料具有細胞生物相容性之特徵，但對於組織之活體研究則於本研究中未探討。
3. 本研究室之日後研究方向將朝此材料之活體試驗與材料之改質再做進一步探討，期望將本材料作為以矽鈣為基礎之水門汀經改良後，再應用於臨床上，並觀察此材料與骨之生長狀況。

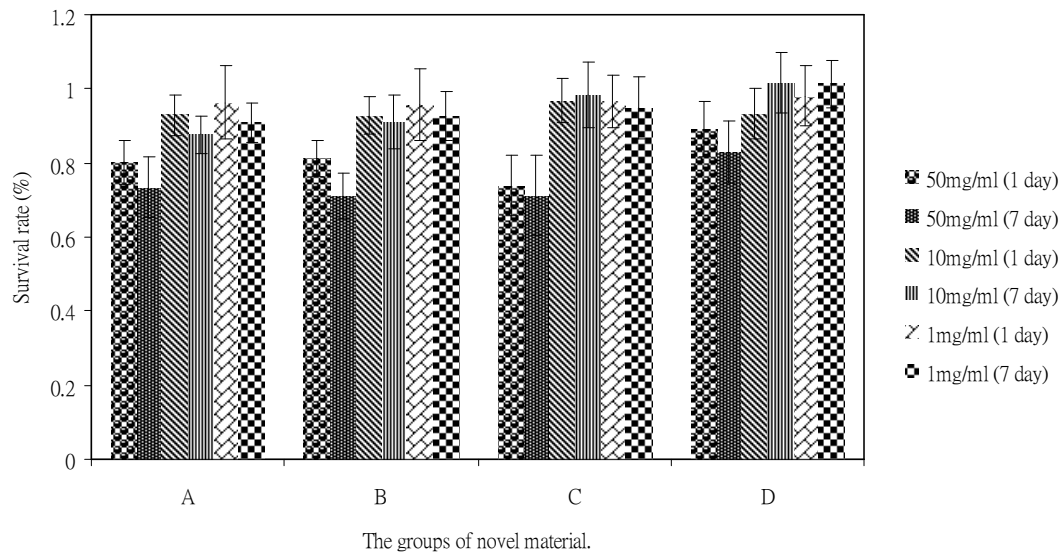
**Figure 1. The novel MTA absorbance ratio measured at different time period.**



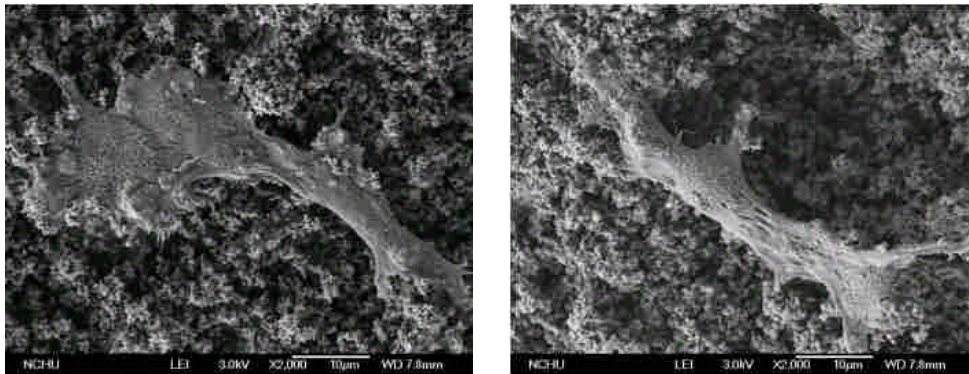
**Figure 2. The novel MTA treated L929 cell's MTT assay.**



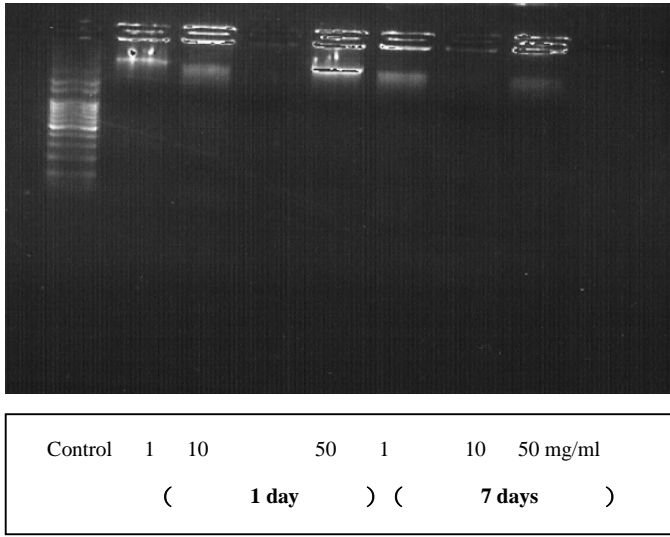
**Figure 3. The novel MTA treated U2OS cell's MTT assay.**



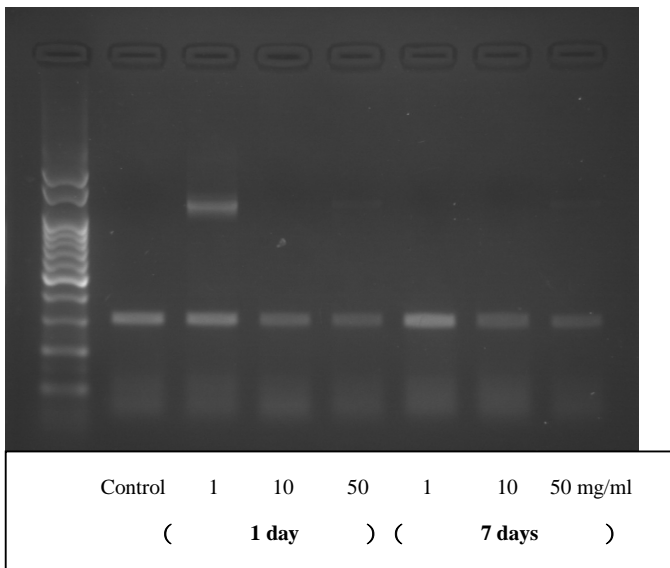
**Figure 4. The SEM of L929 (A) and U2OS (B) attached on novel MTA.**



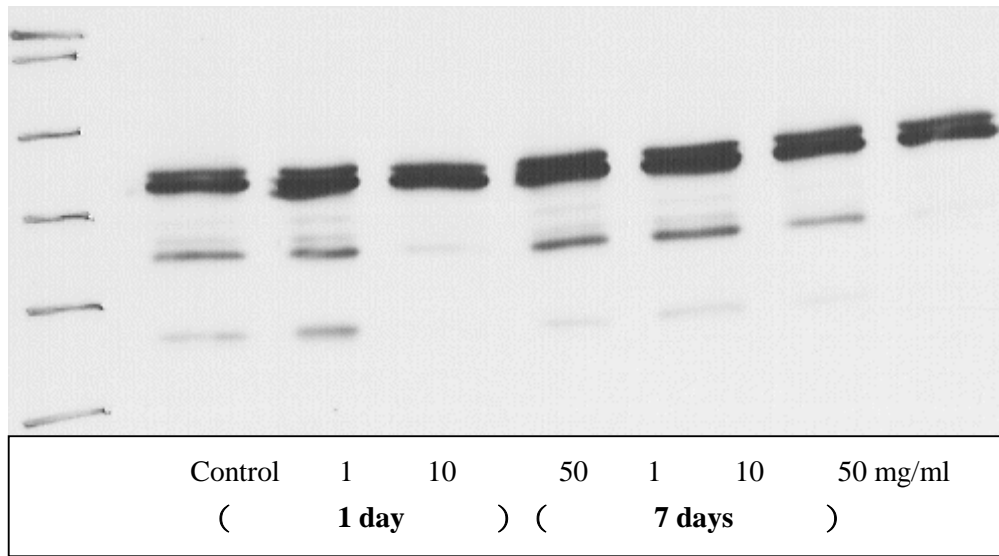
**Figure 5. The DNA fragmentation assay of different concentrations of novel MTA.**



**Figure 6. The COX-2 expression of novel MTA treated on U2OS cell by RT-PCR assay.**



**Figure 7. The ERK kinase expression of U2OS cell by western blot assay.**



## Reference

1. Torabinejad M, Hong Cu, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root end filling material. *J Endodont* 1995;21:349-353
2. Asrari M, Lobner D (2003) In vitro neurotoxic evaluation of root-end-filling materials. *Journal of Endodontics* 29, 743–6.
3. Baek SH, Plenk H, Kim S (2005) Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, Super EBA, and MTA as root-end filling materials. *Journal of Endodontics* 31, 444–9.
4. Balto HA (2004) Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. *Journal of Endodontics* 30, 25–9.
5. Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nor JE (2005) Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. *International Endodontic Journal* 38, 137–43
6. Huang TH, Ding SJ, Hsu TC, Kao CT (2003) Effects of mineral trioxide aggregate (MTA) extracts on mitogen-activated protein kinase activity in human osteosarcoma cell line (U2OS). *Biomaterials* 24, 3909–13.
7. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F (1997) Mineral Trioxide Aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research* 37, 432–9.
8. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD (1995b) Cytotoxicity of four root-end filling materials. *Journal of Endodontics* 21, 489–92.
9. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR (2004) Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal* 37, 699–704.
10. Haglund R, He J, Jarvis J et al. (2003) Effects of root-end filling materials on

fibroblasts and macrophages in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 95, 739–45.

11. Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yeng M, Kao CT, Chou MY (2005) Inflammatory cytokines reaction elicited by root-end filling materials. *Journal of Biomedical Material Research, Part B Applied Biomaterials* 73, 123–8.
12. Mitchell PJC, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F (1999) Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 20, 167–73.
13. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M (1998) Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics* 24, 543–7.
14. A K H Kwok, C-K Yeung, T Y Y Lai, K-P Chan and C P Pang Effects of trypan blue on cell viability and gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *British Journal of Ophthalmology* 2004;88:1590-1594
15. Tsui-Hsien Huang.. Ching-Yi Tsai , Chia-Tze Kao , An evaluation of the cytotoxic effects of orthodontic bonding adhesives upon a primary human oral gingival fibroblast culture and a permanent, human oral cancer -cell line. *J Biomed Mater Res*; 2002, 63:814-821
16. Tsui-Hsien Huang, Chia-Tze Kao. The biocompatibility of the root canal sealer of primary tooth. *Chung Shan Medical Journal* 2003;14:405-412.
17. Fady CM, Gardner A, Jacoby F, Briskin K, Tu Y, Schmid I, Lichtenstein A : Atypical apoptotic death induced in L929 targets by exposure to tumor necrosis factor. *J Interferon Cytol Res.* 1995;15:71-80.