

# 牙科用金屬材料對人類口腔細胞毒性之評估

林常申 涂明君<sup>1</sup> 陳振陽<sup>2</sup> 陳三餘<sup>1</sup>

高雄醫學大學 醫學院 醫學研究所

中國醫藥大學 牙醫學系<sup>1</sup>

國家衛生研究院 癌症研究所<sup>2</sup>

**目的** 因牙科用金屬材料長期使用於口腔之溼潤環境下，故本研究欲探討其在液體中之溶出物，對人類口腔上皮細胞之生物親和性與生物效應之影響。

**方法** 將金合金、鈦合金、鈮合金、鎳合金及銀粉五種牙科臨床上最常用之材料製作成直徑15 mm 厚2 mm 之圓板，經高溫滅菌處理之後，放入內含5 mL 細胞培養液之塑膠管內於37°C，5% CO<sub>2</sub>之培養箱內放置24小時，再以其培養液放入內含大約 $5 \times 10^4$  個細胞之24孔培養皿中於37°C，5% CO<sub>2</sub>之條件下培養24小時後，用位相差顯微鏡觀察其形態變化，並進行MTT 試驗來測定細胞存率以評估細胞毒性。其中細胞毒性較大之銀粉再利用流式細胞儀來作細胞周期與細胞凋亡的觀察，並輔以分析培養液中lactate dehydrogenase (LDH)的活性來測試細胞壞死情形，並進一步分析細胞之p53及NF-kB活性，以及利用BrdU-incorporation 測其對DNA 複製的影響。

**結果** 細胞形態學之觀察及MTT 測試顯示4種鑄造用合金未見對細胞有明顯之影響而銀粉則呈現明顯之毒性刺激反應。針對銀粉材料作更進一步的調查顯示銀粉材料未引起細胞凋亡，而LDH 測試證明與細胞壞死有關係。p53及NF-kB 活性測試顯示經銀粉處理的細胞會產生發炎與逆境反應，BrdU-incorporation 測試發現銀粉處理會抑制DNA 的複製。

**結論** 根據本次實驗之結果得知使用鑄造合金比銀粉合金更安全。(中台灣醫誌 2006;11:236-42)

## 關鍵詞

細胞毒性，牙科用金屬，人類口腔上皮細胞

## 前言

金屬材料被應用於牙科之修復工作已有相當久之歷史，至目前為止其硬度、韌性等各種物理性質仍未見有能取代者。近年來因環保意識高漲，對有害廢棄物之處理極為重視，尤以各種牙科用金屬材料中之銀粉材料所含汞金屬成份也是極令人深感困惱的廢棄物之一[1,2]。根據1990年Kaaber所發表的論文用於牙科的各種材料中鈷、汞、金、鎳均被列入會引起皮膚過敏的元素[3]，除此之外用於牙冠牙橋的製作之鎳金屬亦被Bumgardner等人報告會影響細胞之活性[4]。雖然如此，銀粉、鎳合金、鈦合金及金合金目前仍為牙科用金屬之主要種類，且長年被廣泛使用。

1995年Schedle等人研究包括金、鉑等貴金屬在內之13種金屬元素之離子對細胞生長的抑制作用，發現即使是金元素也有毒性[5]。金屬材料用於口腔之內，由於物性的要求之故很少單種純金屬被使用。是否合金材料之單獨元素具有細胞毒性，但製成合金且經鑄造過程後，其刺激性即會變小或消失，乃為本實驗所欲究明的問題。

有關金屬對身體的安全性之測試主要仍以動物實驗及細胞實驗法為主[6,7]，而其中有關細胞實驗法似乎是較易操作且客觀。此類方式又分成讓細胞直接與金屬固體或粉末接觸及測量金屬所溶解出來的離子對細胞之影響兩等方法[2,8,9]。而所選用之細胞種類中又來自鼠科動物的纖維母細胞如L929-fibroblast，Balb/c 3T3 fibroblasts或人類牙齦纖維母細胞(human gingival fibroblast)較常見[5,10]，其他如人類組織肥大細胞(human tissue mast cell)，白血球細胞等也有，可說是種類繁多[11]。

聯絡作者：陳三餘

地 址：404 台中市北區學士路91號

中國醫藥大學 牙醫學系

收文日期：2006年6月26日 修改日期：2006年9月15日

接受日期：2006年9月22日

根據1993年Wataha等人的報告認為Balb/c 3T3並無產生腫瘤之傾向或接觸性抑制，而1995年Schedle等人的報告也認為L929-fibroblast細胞的反應與人類牙齦纖維母細胞相類似，似乎鼠科動物的細胞更適合於作毒性測試[5,10]，但本次實驗為了符合口腔內實際之情況，將金屬鑄造塑形後，再用其溶出液與口腔上皮細胞反應以觀察其對細胞的刺激性。另外由於先前的研究報告多僅止於觀察金屬材料對細胞的生長或存活率的影響，本次實驗更進一步研究金屬材料對細胞造成的毒性是否透過引起細胞程式凋亡(apoptosis)，或是單純造成細胞的壞死(necrosis)，同時也測試其對DNA複製的影響。由於細胞對外來刺激的反應在分子層次上多會透過p53及NF- $\kappa$ B，所以本次實驗也探討金屬材料對p53及NF- $\kappa$ B活性的影響。希望利用此方法能獲得較客觀的結果。

## 材料與方法

### 細胞培養

本實驗所使用之細胞為人類口腔上皮細胞(KB)及牙齦纖維母細胞(HGF-1)(取自食品工業發展研究所菌種中心/國家衛生研究院細胞庫，新竹，台灣)。細胞所使用之培養液為Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM，HyClone，Logan，UT)，內含4 mM L-glutamine，1.5 g/L sodium bicarbonate，4.5 g/L glucose，及10%胎牛血清(Biological Industries，Kibbutz Beit Haemek，Israel)。細胞培養於37°C並含有5% CO<sub>2</sub>之培養箱內。每天觀察細胞生長情形，並每隔三天換一次培養液，待細胞長滿後即實施分盤之工作。其步驟為：首先吸出培養液再用PBS液體沖洗培養皿。加上1 mL之Trypsin然後放入CO<sub>2</sub>培養箱內作用3分鐘使細胞剝離培養皿，自培養箱取出，再以10 mL之培養液將細胞沖散後再平均分配到3個新的培養皿中，利用此種方法增殖細胞以備毒性測試時使用。

### 金屬標本

本次實驗擬選用之材料包括五種合金：1)銀粉合金材料(Dsperalloy，美國Johnson & Johnson公司產品)，2)金合金材料(DegudentG，美國Degussa公司產品)，3)鎳合金材料(西口齒科鑄造用鎳鉻合金，日本西口齒科材料公司產品)，4)鈦合金材料(Tilite，美國Talladium公司產品)，5)鈮合金材料(Aurecast2，瑞士Aurex公司產品)。以上各種金屬材料之組成詳列於表。依廠商指示之條件將各種合金鑄造成直徑15 mm厚2 mm之圓板，表面磨光以符合臨床實際之情況，再經高壓滅菌後備用；銀粉材料則利用電動混汞機作20秒之混合後，填入內徑15 mm高2 mm之塑膠製空腔模型中，待24小時後自模型中取出，同法做表面磨光及滅菌以備用。

### 細胞處理及細胞毒性測試(MTT assay)

每種合金之5個金屬圓板浸泡在5 mL之細胞培養液中，經24小時後取出圓板，再以此培養液培養細胞24小時後，利用位相差顯位鏡做細胞形態之觀察與紀錄，並以MTT assay測試金屬圓板溶出物對細胞存活率的影響。將 $2 \times 10^4$ 個細胞/well培養在24-well之細胞培養盤，24小時後換以浸泡過金屬之培養液，並以未浸泡過金屬之培養液作為對照組，培養24小時後，加入終濃度為0.125 mg/mL之MTT (Sigma-Aldrich，St. Louis，MO)於培養液中反應2小時，吸掉培養液，再加入200  $\mu$ L之DMSO，室溫下震盪10分鐘後，取出100  $\mu$ L置於96孔盤中以SpectraMax 250 ELISA測定儀(Molecular Devices，Sunnyvale，CA)測OD<sub>540</sub>之吸光值。

### 細胞週期分析

利用流式細胞儀(flow cytometry)來分析各種金屬材料對細胞週期(cell cycle)的影響，並觀察是否有細胞程式凋亡(apoptosis)的現象。細胞經銀粉溶出液培養24小時後，以70%酒精，於-20°C固定30分鐘以上，並經20  $\mu$ g/mL之propidine iodide (Sigma-Aldrich)染色後以流式細

表 實驗用金屬材料

| 種類              | 商品名及廠商                                 | 主要成份   |
|-----------------|--|--|
| Amalgam alloy   | Dispersalloy，Johnson & Johnson Co. USA | Ag 69.3%，Sn 1 7.9%，Cu 11.85%，Zn 1%，Mercury ratio 50% |
| Gold Alloy      | DegudentG，Degussa Co. USA              | Gold 2%，Pd 35%                                       |
| Nickel alloy    | Nishikugi Co. Japan                    | Ni 84%，Cr 8%，others 8%                               |
| Palladium alloy | Aurecast2，Aurest Co. UK                | Au 1.9%，Ag 52.9%，Pd 25.6%，other Ir，Cu，Sn，Zn          |
| Titanium alloy  | Tilite，Taliadium Co. USA               | 4% to 6% Ti  |

胞儀(FACS Calibur, BD)及 Cell Quest 軟體分析之。

#### Lactate dehydrogenase (LDH)釋放測試

藉 Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)偵測細胞死亡時因細胞膜破壞所釋出的 lactate dehydrogenase 活性，來測試細胞的死亡率。以浸泡過金屬之培養液培養細胞 24 小時後，吸取每一 well 之上層培養液 100  $\mu$ L 轉置於另一測試用 96-well 培養皿，加入 100  $\mu$ L LDH 的受質於室溫下避光作用 30 分鐘，隨後以 SpectraMax 250 ELISA 測定儀(Molecular Devices)測其 OD<sub>490</sub> 之吸光值。

#### DNA 合成的測試(BrdU-incorporation)

利用 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kit (Roche Applied Science) 及 BrdU-incorporation 的原理來評估金屬材料對 DNA 合成的影響。細胞經銀粉溶出液培養 24 小時後，加入 BrdU (終濃度為 10  $\mu$ M)繼續培養 1 小時後固定細胞，並以 DNase I 處理細胞使其產生單股 DNA，以暴露出 DNA 中之 BrdU，再用 biotin 標誌之 anti-BrdU 抗體偵測在 DNA 中的 BrdU，並以 SpectraMax 250 ELISA 測定儀(Molecular Devices)定量之，藉以得知 DNA 的複製情形。

#### 冷光測試(Luciferase assay)：p53 及 NF- $\kappa$ B 活性的調控

先將帶有 p53-[12]或 NF- $\kappa$ B-binding sites (Clontech, Palo Alto, CA)的 luciferase reporter plasmids 以 lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)轉染(transfect)到細胞中，經過 24 小時之後，再以銀粉溶出液培養細胞 24 小時，收取細胞萃取物並分析其中 luciferase 及  $\beta$ -galactosidase (internal control)的活性[12]，以得知銀粉溶出物對 p53 及 NF- $\kappa$ B 活性的影響。

## 結果

本研究分析了五種臨床上所使用之牙科金屬材料對人類口腔上皮細胞(KB)與牙齦纖維母細胞(HGF-1)的影響。這些金屬材料依原生產廠商所指示的方法鑄造成合金，再以細胞培養液在 37  $^{\circ}$ C 萃取 24 小時後，以此培養液培養細胞並觀察細胞之變化。經 MTT 分析法的測試結果發現：金、鎳、鈦、鈮等合金材料對 KB 及 HGF-1 細胞的生長與存活率皆無明顯的影響，但用萃取銀粉合金之細胞培養液培養的細胞卻出現明顯的細胞毒性(圖一 A, B)。和未處理的細胞比較起來，這些經銀粉合金溶出物處理的細胞在顯微鏡下即可觀察到明顯的細胞剝離與死亡現象(圖一 C, D)，而且死亡程度和萃取銀粉合金之培養液

的稀釋倍數成反比(圖一 E)，顯示銀粉合金的溶出物對 KB 及 HGF-1 細胞的毒性是有劑量關係。

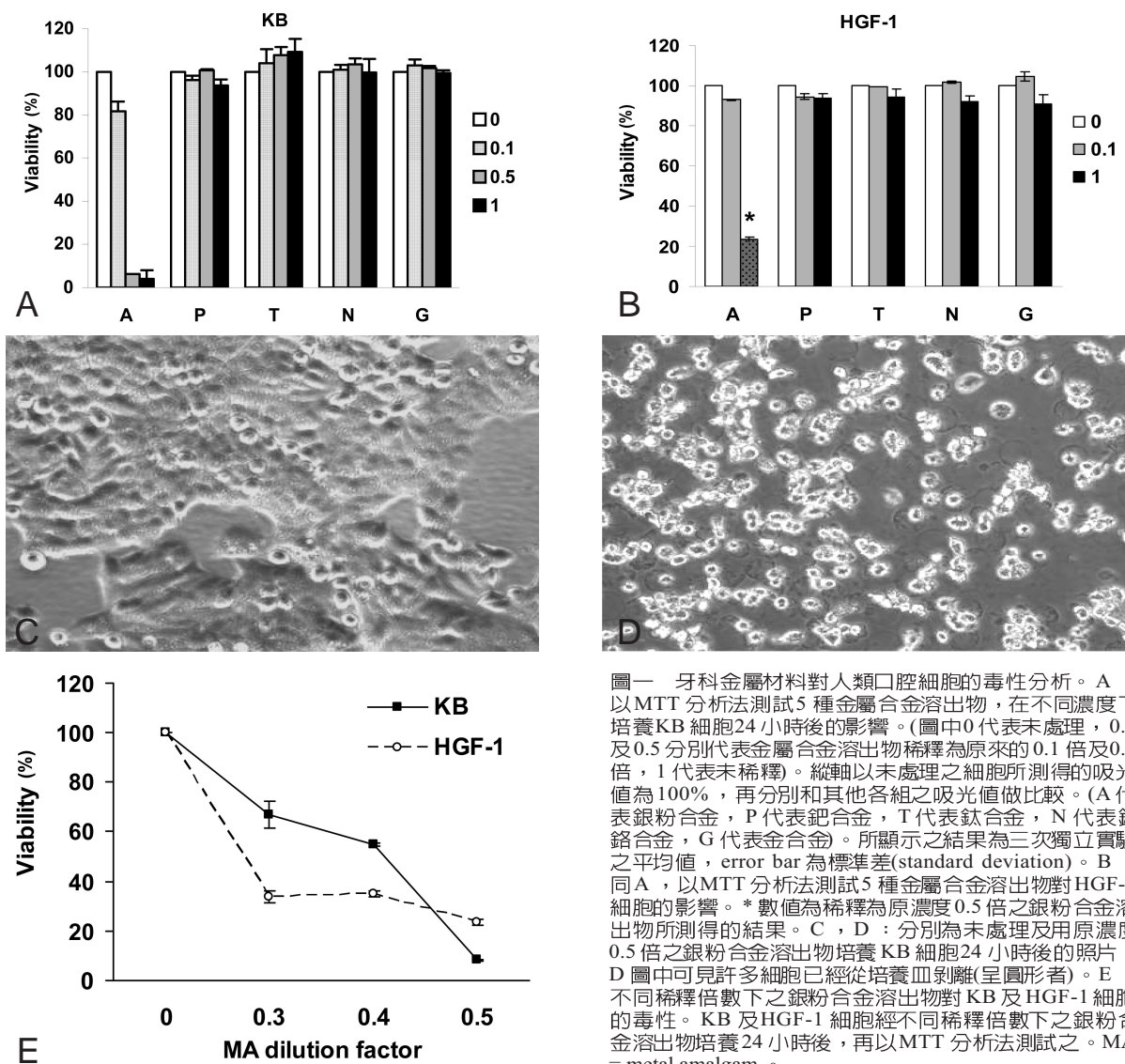
為進一步瞭解銀粉合金造成 KB 細胞的死亡是否透過細胞凋亡反應(apoptosis)，我們用流式細胞儀來分析細胞的 DNA 是否有次 G1 細胞週期的波峰出現(sub-G1 peak)。結果發現在不同稀釋倍數的銀粉合金培養液處理下，都沒有觀察到次 G1 細胞週期的波峰(圖二)。因此銀粉合金可能不會引發細胞的凋亡反應。如果不是透過細胞凋亡，那麼細胞的死亡便可能是壞死(necrosis)的方式。和細胞凋亡不同的是：細胞在壞死的過程中，細胞膜會先被破壞，因而釋放出細胞質中的酵素。我們便利用這個特性，偵測經銀粉合金培養液處理的細胞是否釋放 lactate dehydrogenase (LDH)到培養液中。結果發現銀粉合金確實會造成細胞培養液中 LDH 活性的上升，並且和劑量成正比(圖三)。

因為銀粉合金會造成細胞的死亡並釋放大量的 LDH (圖一、圖三)，因此推測銀粉合金也會引發細胞的發炎反應，並活化細胞內一些和逆境反應相關的基因表現，如 p53。因此我們進一步利用帶有 p53 或 NF- $\kappa$ B 結合序列(binding sequence)的報告質體(reporter plasmid)，將之轉染(transfection)送入 KB 細胞中，再以銀粉合金培養液處理細胞 24 小時後，測定細胞中 p53 及 NF- $\kappa$ B 活性受到銀粉合金溶出物的影響。結果顯示稀釋為原濃度 30% 及 40% 的銀粉合金培養液確實能活化 NF- $\kappa$ B 的活性，並且在 40% 濃度下的活性高於 30% 濃度，顯示 NF- $\kappa$ B 的活化和銀粉合金溶出物的劑量成正比(圖四)；但在原濃度 50% 的處理下，NF- $\kappa$ B 的活性則下降至與對照組相當(圖四)。而 p53 的活性則在原濃度 40% 的銀粉合金培養液作用下可被活化，在原濃度 30% 及 50% 的處理下則和對照組的活性差不多(圖四)。

由於觀察到銀粉合金溶出物對細胞有明顯的毒性(圖一)，並且會增加 p53 的活性(圖四)，因此推測細胞內 DNA 的合成可能也會受到影響。為驗證銀粉合金溶出物是否對 DNA 合成造成影響，我們利用 BrdU 嵌入法(BrdU-incorporation)來測試銀粉合金的作用。結果發現在大於原濃度 30% 的銀粉合金培養液即會抑制 DNA 的合成，在原濃度 50% 的狀況下則 DNA 的合成幾乎完全被抑制(圖五)。這些結果顯示細胞暴露在銀粉合金下可能對細胞的複製再生有不利的影響。

## 討論

金屬材料之應用於牙科修復歷史久遠，至目前為止仍為最主要的材料項目之一，尤以用於牙

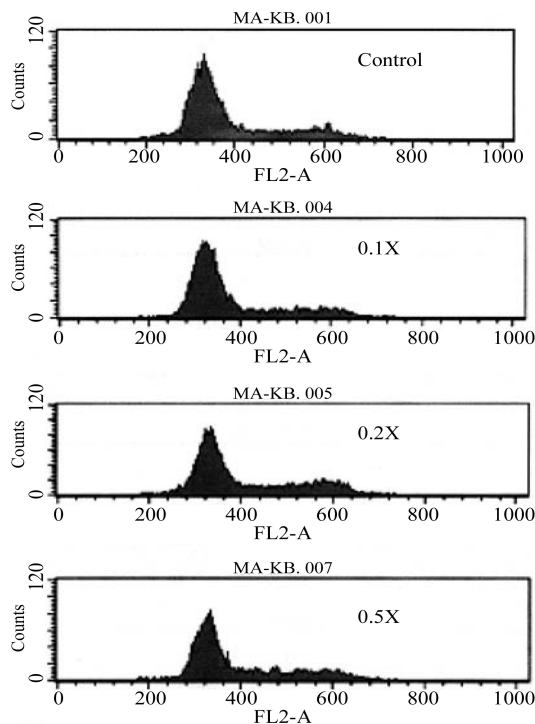


圖一 牙科金屬材料對人類口腔細胞的毒性分析。A：以MTT分析法測試5種金屬合金溶出物，在不同濃度下培養KB細胞24小時後的影響。(圖中0代表未處理，0.1及0.5分別代表金屬合金溶出物稀釋為原來的0.1倍及0.5倍，1代表未稀釋)。縱軸以未處理之細胞所測得的吸光值為100%，再分別和其他各組之吸光值做比較。(A代表銀粉合金，P代表鈮合金，T代表鈦合金，N代表鎳鉻合金，G代表金合金)。所顯示之結果為三次獨立實驗之平均值，error bar為標準差(standard deviation)。B：同A，以MTT分析法測試5種金屬合金溶出物對HGF-1細胞的影響。\*數值為稀釋為原濃度0.5倍之銀粉合金溶出物所測得的結果。C，D：分別為未處理及用原濃度0.5倍之銀粉合金溶出物培養KB細胞24小時後的照片。D圖中可見許多細胞已經從培養皿剝離(呈圓形者)。E：不同稀釋倍數下之銀粉合金溶出物對KB及HGF-1細胞的毒性。KB及HGF-1細胞經不同稀釋倍數下之銀粉合金溶出物培養24小時後，再以MTT分析法測試之。MA = metal amalgam。

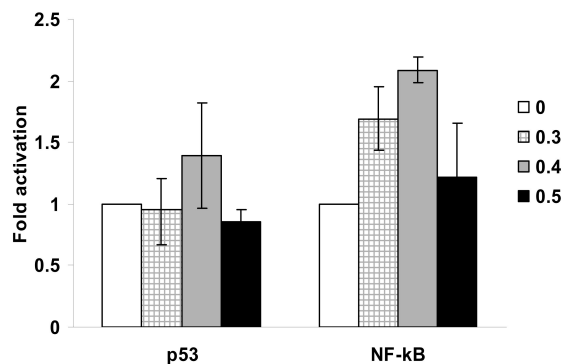
齒缺損區之替代品製作，如牙冠牙橋或嵌體之鑄造仍以各種合金為主要材料，至於單顆牙齒的部份缺損則銀粉合金仍被沿用。多年來有關金屬材料對細胞的刺激性雖曾被討論，但多限於細胞存活率之比較。其對細胞及DNA複製之影響，發炎或致死亡機轉等因素則缺乏較深入之探討。尤以銀粉含有大量汞之成份，其安全性實足令人耽心，但長遠時間以來，銀粉合金仍不斷被使用，且有報告表示使用無害，此與科學常理實不相符[13]。

牙科用金屬合金易釋出各種成份於溶液中，多見於其他相關研究，如1986年Brune提出銀粉、鈷、金、鎳、鐵、或鈦等系列牙科用合金，在自然或合成的唾液中可見有金、銀、銅、鈷、

鉻、銅、汞、鉬、鈦、鎳等元素之釋出[14]。1998年Schmalz等人報告合金溶於細胞培養液之金、銀、鎳、鋅等元素對鼠類纖維母細胞(L929 cells)不具毒性，但若使用配製的這些金屬之氯化鹽類則其濃度明顯與細胞毒性有相關性，其推論為合金在細胞培養液之溶出量較少，因此無法測試出其細胞毒性[15]。1995年Bumgardner曾對鎳鉻牙科用合金之溶出物是否會對細胞影響做調查，發現所用合金之溶出物並未造成人類牙齦纖維母細胞之形態學變化或存活率之改變[16]。2000年Wataha也提出有關鑄造用合金是否會引起全身性毒性之論點仍缺乏明顯證據之看法[17]。在本次實驗中4種鑄造用金屬合金均未見明顯細胞毒性，其結果與前述論文一致。而選用

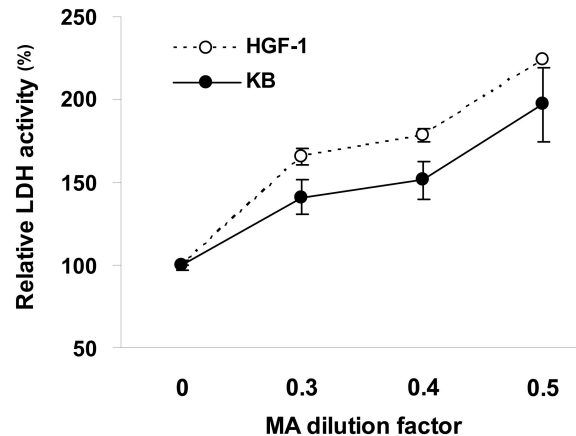


圖二 細胞週期分析。以不同稀釋倍數之銀粉合金溶出物培養KB細胞24小時後，再利用流式細胞儀分析。結果細胞週期並沒有明顯變化，也沒有觀察到sub-G1細胞。



圖四 p53及NF-kB活性分析。將帶有p53及NF-kB結合序列的報告質體(reporter plasmids)轉染送入KB細胞中，經24小時後再以含有銀粉合金溶出物之培養液培養一天，收取細胞萃取物做冷光活性測試。由圖中可見在0.4倍之稀釋濃度下p53及NF-kB有最高的活性，但在0.5倍之稀釋濃度下則其活性又下降。縱軸分別以未處理之細胞所測得的p53及NF-kB冷光活性為1。所顯示之結果為三次獨立實驗之平均值，error bar為標準差(standard deviation)。

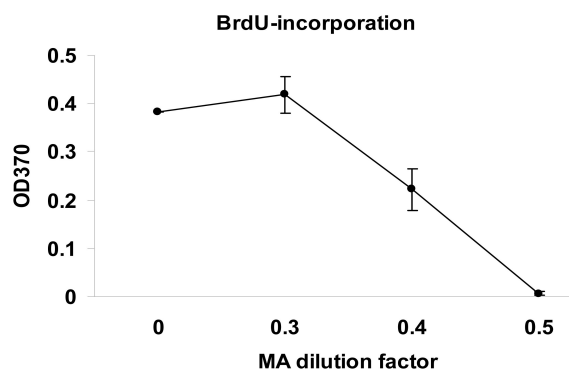
的銀粉合金材料在本次實驗中卻呈現明顯的細胞毒性反應。1994年Wataha等人曾比較含汞或含鎳類銀粉材料之毒性，結果表現出強烈細胞毒性的銀粉材料正好與本次實驗所用者相同[18]。鑄



圖三 lactate dehydrogenase (LDH)釋放分析。以不同稀釋倍數之銀粉合金溶出物培養KB及HGF-1細胞24小時後，吸取培養液做LDH活性分析。由圖中可以見到：隨著濃度的增高，釋放到培養液中的LDH活性也隨之增加。縱軸以未處理之細胞所測得的LDH活性為100%。所顯示之結果為三次獨立實驗之平均值，error bar為標準差(standard deviation)。MA = metal amalgam。

造合金毒性小而銀粉合金毒性大，考其原因或因銀粉合金的配製方法乃是將純汞液體與銀、銅、錫、鋅等金屬粉末定量包裝成膠囊狀，使用時再利用電動混汞機，以左右震動方式加以混合，此法與其他鑄造合金之經高溫熔融鑄造成形大不相同，其未完成反應之成份元素大量殘留自可預期。有關銀粉填補材料之細胞毒性早為大眾討論，有報告認為相當安全[19]，也曾有關於銀粉材料會引起過敏反應的調查報告顯示其發生機率甚微[20,21]。然另一方面，有關銀粉成份毒性調查也不少，其中所含之汞與銀兩成份之毒性均被強調，其他如銅與鋅之毒性也被指出，曾被認為是無毒的唯有純錫而已[22,23]。

於本次實驗中銀粉材料之細胞毒性最為明顯，針對其對細胞之毒理作用的研究發現：銀粉材料不只是影響細胞存活率(圖一)，其對DNA複製(圖五)、引起細胞之炎性及逆境等反應(圖四)均有影響。根據MTT測試、LDH釋放測試、DNA合成測試、及NF-kB活性測試的結果均發現：銀粉材料對細胞的毒性和其濃度成正比(圖一，三，四，五)。尤其在原濃度50%時，DNA的合成幾乎完全被抑制(圖五)，而原本在30%及40%濃度下可被活化的NF-kB與p53，在50%濃度時的活性又都下降(圖四)，顯示在這濃度下細胞的生理反應已經完全被抑制，沒有機會復原或複製細胞。這對口腔上皮細胞及牙齦細胞的健康及再生有不利的影響。即使在較低銀粉合金溶出物濃度下，因為NF-kB的活化及部分的細胞死亡，還是



圖五 DNA 複製合成分析。以不同稀釋倍數之銀粉合金溶出物培養 KB 細胞 24 小時後，再利用 BrdU-incorporation 分析 DNA 複製的情形。本實驗用 Roche 出品的利用 Cell Proliferation ELISA，BrdU (colorimetric) 套組作分析，嵌入 DNA 中之 BrdU 的量最後以 ELISA 測定儀定量之。由圖中可見隨著銀粉溶出物濃度的增高，BrdU 嵌入 DNA 的量則隨之下降。所顯示之結果為三次獨立實驗之平均值，error bar 為標準差 (standard deviation)。MA = metal amalgam。

可能引起細胞發炎，因而對口腔細胞造成危害。因此，根據本次實驗的結果可知：由高溫鑄造所製成之金屬合金，其安全性比利用混合調拌方式所製成的銀粉合金高。就臨床觀點而言，本次實驗結果對於銀粉材料之選用，提供一些更需慎重思考的依據，對臨床工作者應是極有參考價值的資料。

### 參考文獻

- Musajo F, Trevisan A, Passi P, et al. The toxicity of amalgam: a preliminary report. *Quintessence Int* 1988; 19:833-9.
- Kaga M, Seale NS, Hanawa T, et al. Cytotoxicity of amalgam, alloys, and their elements and phases. *Dent Mater* 1991;7:68-72.
- Kaaber S. Allergy to dental materials with special reference to the use of amalgam and polymethylmethacrylate. *Int Dent J* 1990;40:359-65.
- Bumgardner JD, Lucas LC. Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys. *J Dent Res* 1995;74:1521-7.
- Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan XH, et al. Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. *J Dent Res* 1995;74:1513-20.
- Federation Dentaire International, Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* 1980;30:140-88.
- Craig RG, Hanks CT. Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests. *J Dent Res* 1990;69:1539-42.
- Imai Y, Watanabe A, Hamanaka H, et al. Biocompatibility evaluation of biomedical metals using a cell culture test. *Tokyo Ika Shika Daigaku Iyo Kizai Kenkyusho Hokoku* 1984;18:11-6. (In Japanese; English abstract)
- Schmalz G, Langer H, Schweikl H. Cytotoxicity of dental alloy extracts and corresponding metal salt solutions. *J Dent Res* 1998;77:1772-8.
- Wataha JC, Hanks CT, Craig RG. The effect of cell monolayer density on the cytotoxicity of metal ions which are released from dental alloy. *Dent Mater* 1993;9:172-6.
- Bumgardner JD, Lucas LC, Alverson MW Jr, et al. Effects of copper-based dental casting alloys on two lymphocyte cell line and the secretion of interleukin 2 and IgG. *Dent Mater* 1993;9:85-90.
- Lin CS, Kuo HH, Chen JY, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 retards cell growth, induces p21<sup>WAF1</sup> expression, and modulates p53 activity post-translationally. *J Mol Biol* 2000;303:7-23.
- Chung KH, Berry TG. Review of biocompatibility of dental amalgam. *Chin Dent J* 1999;18:237-48.
- Brune D. Metal release from dental biomaterials. [Review] *Biomaterials* 1986;7:163-75.
- Schmalz G, Schuster U, Schweikl H. Influence of metals on IL-6 release in vitro. *Biomaterials* 1998;19:1689-94.
- Bumgardner JD, Lucas LC. Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys. *J Dent Res* 1995;74:1521-7.
- Wataha JC. Biocompatibility of dental casting alloys: a review. [Review] *J Prosthet Dent* 2000;83:223-34.
- Wataha JC, Nakajima H, Hanks CT, et al. Correlation of cytotoxicity with element release from mercury- and gallium-based dental alloys in vitro. *Dent Mater* 1994;10:298-303.
- Bauer JG, First HA. The toxicity of mercury in dental amalgam. *CDA J* 1982;10:47-61.
- Finne K, Goransson K, Winckler L. Oral lichen planus and contact allergy to mercury. *Int J Oral Surg* 1982;11:236-9.
- Fregert S, Hjorth N. Increasing incidence of mercury sensitivity. The possible role of organic mercury compounds. *Contact Dermat News* 1967;5:88.
- Musajo F, Trevisan A, Passi P, et al. The toxicity of amalgam: a Preliminary report. *Quintessence Int* 1988; 19:833-9.
- Kaga M, Seale NS, Hanawa T, et al. Cytotoxicity of amalgams, alloys, and their elements and phases. *Dent Mater* 1991; 7: 68-72.

# Evaluation of the Cytotoxicity of Metallic Dental Materials on Human Oral Epithelial Cells and Gingival Fibroblasts

Chang-Shen Lin, Ming-Gen Tu<sup>1</sup>, Jen-Yang Chen<sup>2</sup>, San-Yue Chen<sup>1</sup>

Graduate Institute of Medicine, College of Medicine, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung; <sup>1</sup>School of Dentistry, China Medical University, Taichung; <sup>2</sup>Cancer Research Center, National Health Research Institute, Taipei, Taiwan.

**Purpose.** We examined the cytotoxicity of metallic dental material eluates on human oral epithelium cells and gingival fibroblasts.

**Methods.** A total of five common metallic alloys, including Amalgam, Gold, Nickel, Titanium, and Platinum were tested. Five discs of each alloy were prepared, and each disc was 15 mm diameter and 2 mm thick. After being autoclaved, these alloy discs were incubated with 5 ml of culture medium at 37°C, with 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours. The medium was then used to grow KB and HGF-1 cells. MTT assay examined the cytotoxicity of alloy eluates after 24-hour incubation. The effects of toxic alloy on cell cycle, necrosis, p53 and NF-kB activity, and DNA synthesis were further examined by flow cytometry, lactate dehydrogenase releasing assay, luciferase assay, and BrdU-incorporation, respectively.

**Results.** Morphologic observation and the MTT test revealed that only the amalgam alloy was cytotoxic. Although flow cytometry showed no apoptotic cells after amalgam alloy treatment, high lactate dehydrogenase activity was found in culture medium. These results suggested that amalgam alloy induced breakdown of the cell membrane, a characteristic of necrosis. In addition, elevated p53 and NF-kB activity after amalgam alloy treatment supported that this alloy could cause inflammatory and stress responses. Finally, BrdU incorporation showed that amalgam alloy inhibited DNA synthesis.

**Conclusions.** Based on the results of this experiment, casting metal alloys are safer than amalgam alloy. ( *Mid Taiwan J Med* 2006;11:236-42 )

## Key words

cytotoxicity, dental alloys, human oral epithelial cells