

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.06.004

· 基础研究 ·

# 微酸性电解水对口腔单层角化上皮细胞的细胞毒性

徐静<sup>1</sup>, 熊纪敏<sup>1</sup>, 辛鹏举<sup>2</sup>, 苏静<sup>2</sup>

1.首都医科大学附属北京口腔医院牙周科,北京(100050); 2.首都医科大学附属北京口腔医院疾病预防控制处及医院感染管理科,北京(100050)

**【摘要】** 目的 研究微酸性电解水对口腔单层角化上皮细胞的细胞毒性。方法 使用含氧的微酸性电解水原液及经过牛血清白蛋白预处理后的微酸性电解水作用于TR146细胞,分为BSA 0 mg/mL(即微酸性电解水原液)组、BSA 0.5 mg/mL组、BSA 1 mg/mL组、BSA 2 mg/mL组。通过CCK-8实验计算细胞相对增殖率(作用时间1 min、5 min、15 min、30 min、1 h),通过台盼蓝排除实验计算细胞存活率(作用时间1 h)。结果 CCK-8实验结果显示微酸性电解水原液作用于TR146细胞不同时间段OD值与阴性对照组比较,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),细胞相对增殖率随有效氯浓度的增加、作用时间的延长而降低,显示为轻至重度细胞毒性;而经牛血清白蛋白预处理后的微酸性电解水在不同有效氯浓度及作用时间下OD值与阴性对照组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),细胞相对增殖率均接近100%,评级为无细胞毒性。台盼蓝排除实验显示微酸性电解水原液在各有效氯浓度下作用于TR146细胞,1 h细胞存活率与阴性对照比较,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),细胞存活率随有效氯浓度的增加而降低,显示为轻至重度细胞毒性;而经牛血清白蛋白预处理后的微酸性电解水在不同有效氯浓度下细胞存活率与阴性对照组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),细胞存活率均接近100%,显示为无细胞毒性。结论 在模拟唾液内蛋白质浓度水平的牛血清白蛋白的作用下,微酸性电解水对口腔单层角化上皮细胞未显示细胞毒性。

**【关键词】** 口腔综合治疗台水路; 微酸性电解水; 细胞毒性; CCK-8法; TR146细胞系

**【中图分类号】** R78 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)06-0360-05

**【引用著录格式】** 徐静,熊纪敏,辛鹏举,等.微酸性电解水对口腔单层角化上皮细胞的细胞毒性[J].口腔疾病防治,2018,26(6):360-364.

**Slightly acidic electrolyzed water cytotoxicity to oral keratinocyte monolayers** XU Jing<sup>1</sup>, XIONG Jimin<sup>1</sup>, XIN Pengju<sup>2</sup>, SU Jing<sup>2</sup>. 1. Department of Periodontics, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. Department of Disease Control, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Corresponding author:SU Jing, Email: sujing327@126.com, Tel: 0086-10-57099060

**【Abstract】 Objective** To investigate the cytotoxicity of slightly acidic electrolyzed water (SAEW) on oral keratinocyte monolayers. **Methods** TR146 human keratinocyte monolayers were exposed to SAEW pretreated with bovine serum albumin (BSA). It was divided into 4 groups, BSA 0 mg/mL (SAEW stock solution), BSA 0.5 mg/mL, BSA 1 mg/mL and BSA 2 mg/mL. The relative growth rate (RGR) was measured using a CCK-8 assay at 1 min, 5 min, 15 min, 30 min and 1 h, and the survival rate was measured using a Trypan Blue exclusion assay at 1 h. **Results** The CCK-8 assay showed significantly different OD values in the SAEW and negative control groups at different times and FAC concentrations ( $P < 0.05$ ). With increasing FAC concentrations and observation times, the RGR in the SAEW group decreased,

**【收稿日期】** 2017-12-03; **【修回日期】** 2018-01-21

**【基金项目】** 国家自然科学基金青年科学基金项目(81300892);北京市医院管理局“青苗”人才培养计划项目(QML20151404);北京市卫计委卫生科技成果与适宜技术推广资助项目(TG-2015-009)

**【作者简介】** 徐静,医师,硕士, Email: 47038066@qq.com

**【通信作者】** 苏静,副主任医师,博士, Email: sujing327@126.com

and the SAEW showed moderate to severe cytotoxic effects. The OD values in the BSA (0.5 ~ 2 mg/mL)-pretreated SAEW and negative control groups were not significantly different at different times or FAC concentrations ( $P > 0.05$ ); the RGRs of the BSA-pretreated SAEW group all approached 100%, and no cytotoxic effects were observed in the BSA-pretreated SAEW group. The Trypan Blue exclusion assay showed significantly different survival rates in the SAEW and negative control groups at different FAC concentrations ( $P < 0.05$ ). As the FAC concentration increased, the survival rate in the SAEW group decreased, and SAEW showed moderate to severe cytotoxic effects. The survival rates in the BSA-pretreated SAEW and negative control groups were not significantly different at different FAC concentrations ( $P > 0.05$ ); the survival rates in the BSA-pretreated SAEW group all approached 100%, and no cytotoxic effects were observed. **Conclusion** SAEW showed no adverse effects on the viability of dental oral keratinocyte monolayers in vitro in the presence of BSA at concentrations equivalent to that of protein in saliva.

**【Key words】** Dental unit waterlines; Slightly acidic electrolyzed water; Cytotoxicity; CCK-8 assay; TR146 cell line

近年来人们日益关注口腔综合治疗台水路(dental unit waterlines, DUWLs)的细菌污染问题,国内外多项研究表明,DUWLs的污染问题普遍存在,已成为导致口腔感染的潜在因素<sup>[1-2]</sup>。微酸性电解水(slightly acidic electrolyzed water, SAEW)是在有或无隔膜的电解槽中,将加入了低浓度盐酸和(或)氯化钠的软化水进行电解而生成的pH 5.0~6.5的酸性水溶液,其主要杀菌成分为次氯酸(HClO)。其pH接近中性,杀菌性能优异,近年来受到广泛关注和研究<sup>[3-4]</sup>。SAEW对DUWLs消毒的良好效果已经有多个研究证实<sup>[5]</sup>,但其在口腔诊疗使用过程中对患者口腔内组织的影响研究较少。本实验的目的是研究SAEW对TR146细胞的细胞毒性作用,从而为SAEW对DUWLs持续性消毒的应用提供安全依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 微酸性电解水的制取及有效氯浓度的测定

SAEW由SAEW生成机(上海富强旺卫生用品有限公司,中国)制成,pH为5.0~6.5,有效氯浓度为10~80 mg/L。通过有效氯快速测定仪(上海富强旺卫生用品有限公司,中国)测定游离有效氯浓度(free available chlorine, FAC),使用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)进行稀释,制成FAC分别为10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L的SAEW原液。

### 1.2 实验分组

按牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)终浓度来进行分组,以PBS溶液为阴性对照。BSA 0 mg/mL(即SAEW原液)组:FAC分别为10

mg/L、20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L的SAEW原液;BSA 0.5 mg/mL组:向SAEW原液中加入BSA,使BSA终浓度为0.5 mg/mL;BSA 1 mg/mL组:向SAEW原液中加入BSA,使BSA终浓度为1 mg/mL;BSA 2 mg/mL组:向SAEW原液中加入BSA,使BSA终浓度为2 mg/mL。

### 1.3 TR146细胞培养

TR146细胞(赛齐(上海)生物工程有限公司,中国)来源于人类粘膜鳞癌活检细胞,是一种单层角化上皮细胞。将装有TR146细胞的冻存管从液氮中取出,立即置于37℃水浴锅中迅速摇晃至完全融化。将已融化的细胞悬液吸于离心管中,加入DMEM培养液并混匀,1 100 r/min离心6 min。弃上清,加入培养液重悬,吹打混匀,接种于培养皿中,并置于孵箱中,37℃、5%体积分数的CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下培养。隔天换液时,弃去旧培养液,PBS漂洗2遍,加入新培养液,继续培养,镜下观察铺满培养瓶底70%~90%时即可传代。

### 1.4 CCK-8增殖实验

铺板:TR146细胞以10<sup>4</sup>个/孔接种于96孔板中,37℃下,5%体积分数的CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下培养24 h,镜下见细胞长满板底70%~90%。

干预:弃去培养基,每孔各加100 μL PBS冲洗去除残留培养基。实验组每孔加入100 μL各浓度的SAEW及SAEW与BSA的混合液,阴性对照组加PBS 100 μL,每组设4个平行复孔,分别作用1 min、5 min、15 min、30 min、1 h。

测定:作用结束后吸取SAEW及SAEW与BSA的混合液,PBS冲洗去除残留液体,再向每孔加入DMEM高糖培养基(含10%质量分数的胎牛血清)

100  $\mu\text{L}$  继续培养 24 h, 向各孔中加入 CCK-8 10  $\mu\text{L}$ , 于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% 体积分数的  $\text{CO}_2$  及饱和湿度条件下孵育 2 h, 酶标仪 450 nm 波长下检测, 测定每孔吸光度 OD 值。

### 1.5 细胞毒性评级

计算细胞相对增殖率 (relative growth rate, RGR)<sup>[6]</sup>,  $\text{RGR} = \text{OD}(\text{实验组})/\text{OD}(\text{阴性对照组}) \times 100\%$ 。按 RGR 数值将细胞毒性进行分级 (见表 1)。

表 1 细胞毒性评级标准

Table 1 Cytotoxicity evaluation criteria

细胞毒性评级	细胞相对增殖率 (%)	评价
0 级	$\geq 100$	无细胞毒性
1 级	75 ~ 99	无细胞毒性
2 级	50 ~ 74	轻度细胞毒性
3 级	25 ~ 49	中度细胞毒性
4 级	1 ~ 24	中度细胞毒性
5 级	0	重度细胞毒性

### 1.6 台盼蓝排除实验

铺板: TR146 细胞以细胞浓度为  $10^6$  个/孔接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% 体积分数的  $\text{CO}_2$  及饱和湿度条件下培养 24 h, 镜下见细胞长满板底 70% ~ 90%。

干预: 弃去培养基, 每孔各加 2 mL PBS 冲洗去除残留培养基。实验组每孔加入 1 mL 不同浓度的 SAEW 及 SAEW 与 BSA 的混合液, 阴性对照组加 PBS 1 mL, 空白对照组加培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% 体积分数的  $\text{CO}_2$  条件下作用 1 h, 每组设置 3 个平行复孔。

终止: 作用结束后每孔加 1 mL DMEM 高糖培养基 (含 10% 质量分数的胎牛血清) 终止反应, 吸取各孔内液体至离心管中。

计数: 各孔细胞制成单细胞悬液, 0.4% 台盼蓝染色, 血细胞计数板镜下计数, 计算细胞存活率,  $\text{细胞存活率}(\%) = \text{活细胞数}/\text{细胞总数} \times 100\%$ 。

### 1.7 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件进行数据处理, 4 个 BSA 浓度分组不同作用时间 OD 值及细胞存活率使用多因素方差分析, 组间多重比较使用 Dunnett T3 检验方法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CCK-8 增殖实验

CCK-8 显示不同 BSA 浓度分组在不同作用时间下 OD 值差异具有统计学意义 (处理因素

$F = 1126.12, P < 0.05$ , 时间因素  $F = 431.33, P < 0.05$ , 交互效应  $F = 14.01, P < 0.05$ )。BSA 浓度 0 mg/mL 组即 SAEW 原液各 FAC 条件下 OD 值与阴性对照组比较差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); BSA 浓度为 0.5 mg/mL、1 mg/mL 及 2 mg/mL 组在各 FAC 条件下 OD 值与阴性对照组比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。BSA 0 mg/mL 组在较低浓度下 (FAC: 10 mg/L), 作用时间较短时 (1 min) 即可显示轻度细胞毒性 (RGR: 71.23%), 随着 FAC 增大, 作用时间延长则 RGR 降低, 显示为中至重度细胞毒性。而 BSA 浓度为 0.5 mg/mL、1 mg/mL 及 2 mg/mL 时, 作用 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h 后均显示 RGR 接近 100%, 细胞毒性评级为无细胞毒性 (图 1)。

### 2.2 台盼蓝排除实验

台盼蓝排除实验显示不同 BSA 浓度及 FAC 下细胞存活率差异具有统计学意义 (BSA 因素  $F = 5863.70, P < 0.05$ , FAC 因素  $F = 181.23, P < 0.05$ , 交互效应  $F = 178.55, P < 0.05$ )。BSA 浓度为 0 mg/mL 组在 4 种 FAC (10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L) 下, 作用 1 h 后细胞存活率 (分别为: 66.06%, 22.48%, 5.00%, 1.10%) 与阴性对照组 (98.19%) 及空白对照组 (97.97%) 比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 细胞毒性评级为轻至重度细胞毒性。BSA 浓度为 0.5 mg/mL, 1 mg/mL 及 2 mg/mL 组在 4 种 FAC 条件下细胞存活率均接近 100%, 评级为无细胞毒性, 与阴性对照组比较细胞存活率差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 2)。

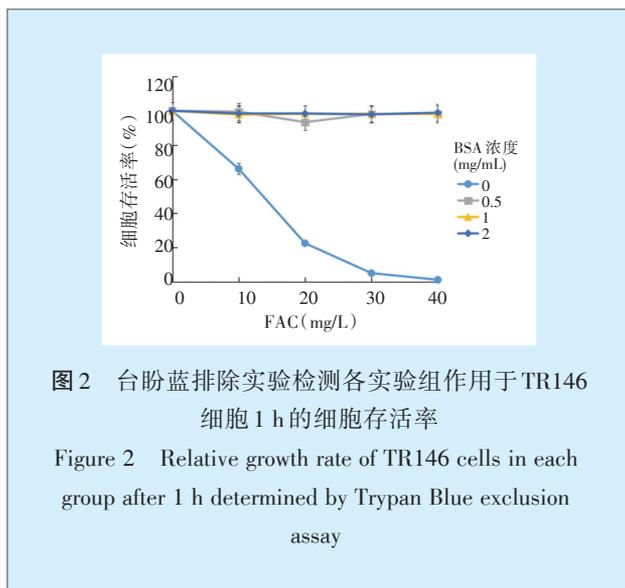
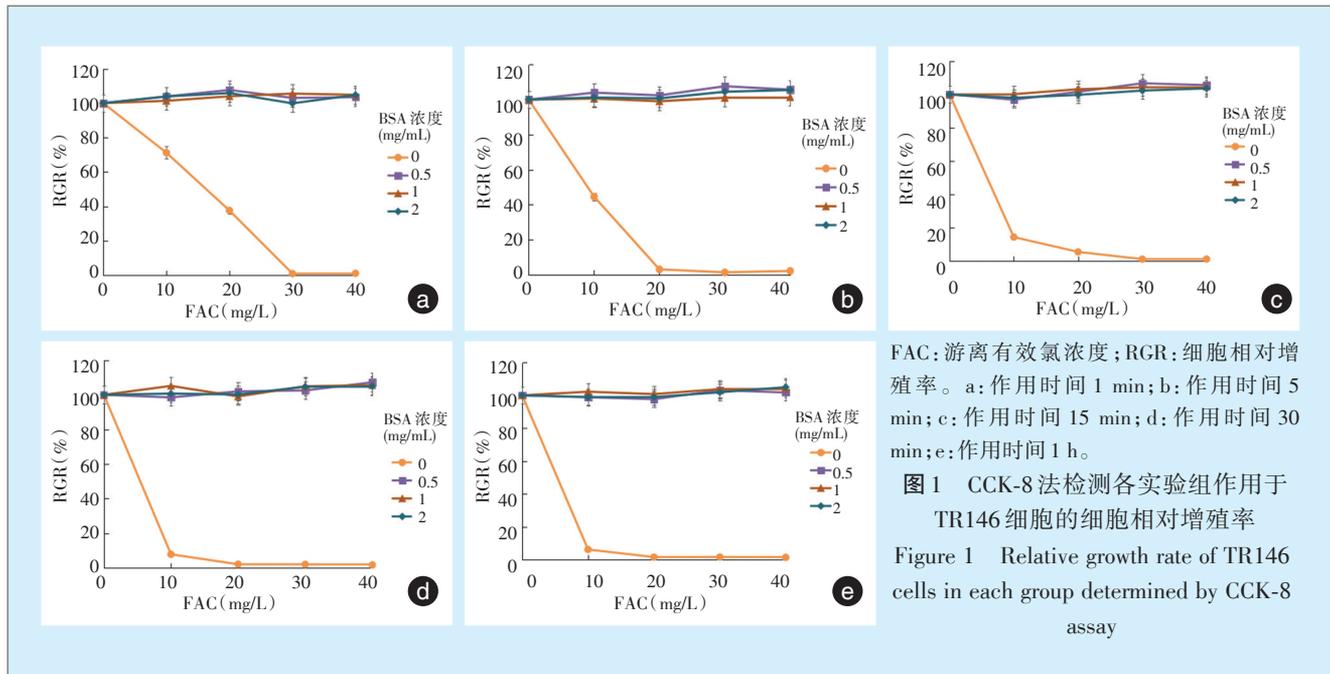
## 3 讨论

### 3.1 细胞系的选择

本实验使用的 TR146 细胞来源于人类粘膜鳞癌活检细胞, 是一种单层角化上皮细胞。有研究表明 TR146 细胞系共享正常人口腔黏膜的形态和功能特性, 对 TR146 细胞中可检测到的 K4, K10, K13, K19 角蛋白, 外皮蛋白和表皮生长因子受体等特异性分化标志物及氨肽酶、羧肽酶、酯酶等的研究显示出其与口腔黏膜上皮细胞具有相似性<sup>[7-8]</sup>。因此, TR146 细胞系不仅可作为颊部体外上皮模型来研究药物的渗透性、吸收性; 也可应用于各种药物对口腔上皮细胞细胞毒性研究<sup>[9]</sup>。TR146 细胞其成活率高, 具有可重复性<sup>[10]</sup>, 因此选用 TR146 细胞来模拟口腔上皮细胞。

### 3.2 有机物对 SAEW 作用

Oomori 等<sup>[11]</sup>研究发现, 不同有机物对酸性电



解水中FAC含量存在不同影响,在蛋白质、维生素C等有机物影响下,游离有效氯可转变成结合有效氯从而使杀菌效果下降。而口腔中具有丰富的有机物,因此我们假设在唾液环境下SAEW细胞毒性会受影响。唾液中的蛋白质含量约为1~2 mg/mL<sup>[12]</sup>,考虑到SAEW在口腔内不断流动时的唾液稀释作用,我们采用浓度为0.5~2 mg/mL的BSA来模拟口内唾液蛋白质水平。BSA过去常常作为唾液中蛋白质的替代物而应用于多项研究中<sup>[13]</sup>,BSA对SAEW预处理的方法是将BSA与SAEW的混合液于37℃下水浴30 min<sup>[10]</sup>。CCK-8实验发现SAEW原液对TR146细胞的增殖具有抑制作用,这可能

是由于SAEW的主要杀菌成分HClO所产生的细胞内活性氧,它可穿透细胞膜导致细胞死亡<sup>[14]</sup>。但加入了BSA后,这种抑制作用会消失,这可能是因为BSA有机物影响下,SAEW中的游离有效氯转变成结合有效氯,而pH5.0~6.5的SAEW中的游离有效氯中HClO所占比例最高,因此对细胞的影响大大减小。经BSA预处理后的SAEW再作用于TR146细胞,在5个作用时间段,4种FAC下均显示无细胞毒性。在此基础上通过台盼蓝排除实验观察SAEW在最长作用时间(1h)下对细胞的影响,得到与CCK-8实验一致的结果。即表明在口腔内唾液的有机物环境下,SAEW对TR146细胞的增殖无显著影响。提示FAC 10~40 mg/L的SAEW是在口腔诊疗过程中使用较为安全。

### 3.3 影响SAEW浓度和成分的因素

SAEW的制取方式有多种,Zheng等<sup>[15]</sup>对SAEW的4种常用生成方式进行对比,发现使用稀盐酸作为电解液,利用无隔膜电解槽进行电解的方式,在相同条件下产生的HClO最多,生成的SAEW杀菌能力最强。本实验使用的SAEW即为此种生成方式制成。为了去除渗透压差异的影响,本研究采用制取高浓度SAEW,使用PBS进行逐步稀释至实验所需浓度,经预实验证实,PBS对SAEW中有效氯含量无消耗。实验中将SAEW与BSA混合液在37℃下水浴30 min作为预处理,为了排除预处理过程中37℃水浴对SAEW成分影响,我们增加了一组将4种浓度SAEW原液进行

37 ℃水浴 30 min 的对照组, CCK-8、台盼蓝排除实验均显示在相同 FAC、相同作用时间下与 SAEW 原液相比较差异无统计学意义, 即存在不同程度的细胞毒性, 说明水浴对 SAEW 的细胞毒性无显著影响。

### 3.4 本研究的特点与局限

Boyle 等<sup>[10]</sup>研究了电解稀氯化钠溶液产生的 SAEW (Ecasol) 对 TR146 细胞及重组人口腔上皮组织的细胞毒性, 通过 Alamar Blue 增殖实验及台盼蓝排除实验发现 SAEW 在 2.5 mg/L 浓度下对细胞增殖无显著影响, 浓度为 5 mg/L 以上时可观察到对细胞增殖的影响差异具有显著性, 但这种影响可被 1~2 mg/mL 的 BSA 所中和。Fujita 等<sup>[16]</sup>用 CCK-8 比较了 SAEW (P-water, FAC: 20 mg/L) 与市政供水对 HGF 及 KB 细胞增殖的影响, 发现作用 5 min 时, SAEW 虽显示抑制细胞的增殖, 但与市政供水相比差异无统计学意义。

以上两者 SAEW 电解液均为稀氯化钠溶液, 而本实验中的研究对象为电解稀盐酸产生的 SAEW。本实验中 SAEW 的 FAC 为 10~40 mg/L, 黄凝等<sup>[17]</sup>使用 3 种不同浓度 SAEW (40 mg/L, 20 mg/L, 10 mg/L) 分别对 DUWLs 进行消毒, 消毒后水样的平均合格率分别为 99.25%、98.00%、98.33%, 证明在该浓度范围内消毒有效。且本实验的作用时间为 1 min、5 min、15 min、30 min、1 h 5 个时间点, 可更久地监测 SAEW 对 TR146 细胞的抑制作用。但是细胞毒性实验不能完全代替临床应用的实际情况, 还需配合体内实验才能更全面的研究 SAEW 的对口腔组织的影响。

通过 CCK-8 实验和台盼蓝排除实验发现 4 种浓度的 SAEW 原液, 在不同的作用时间下均显示不同的细胞毒性作用, 但是这种细胞毒性作用会随着有机物的添加而消失, 当对 SAEW 原液使用可代替唾液中蛋白质水平的 BSA 进行预处理后再作用于 TR146 细胞, 结果显示与对照组 OD 值及细胞存活率差异无统计学意义, 细胞毒性等级均为无细胞毒性。因此, 本研究提示 SAEW 在口腔唾液的环境下对口腔上皮细胞无细胞毒性作用。

### 参考文献

- [1] Watanabe A, Tamaki N, Yokota K, et al. Monitoring of bacterial contamination of dental unit water lines using adenosine triphosphate bioluminescence[J]. *J Hosp Infect*, 2016, 94(4): 393-396.
- [2] Szymańska J, Sitkowska J. Bacterial contamination of dental unit waterlines[J]. *Environ Monit Assess*, 2013, 185(5): 3603-3611.
- [3] Ding T, Xuan XT, Li J, et al. Disinfection efficacy and mechanism of slightly acidic electrolyzed water on staphylococcus aureus in pure culture[J]. *Food Control*, 2016, 60: 505-510.
- [4] You HS, Fadriqela A, Sajo MEJ, et al. Wound healing effect of slightly acidic electrolyzed water on cutaneous wounds in hairless mice via immune-redox modulation[J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(9): 1423-1431.
- [5] 小澤寿子, 中野雅子, 池野正典, 等. 微酸性電解水を使用した歯科用ユニット水回路の汚染対策[J]. *日本環境感染学会誌*. 2015. 30(6):379-384.
- [6] 汪莉, 尹仕海, 邹玲, 等. 金瓶含漱液对牙周膜成纤维细胞毒性的实验研究[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2007, 17(10): 576-578.
- [7] Jacobsen J, Nielsen EB, Brøndum-Nielsen K, et al. Filter-grown TR146 cells as an in vitro model of human buccal epithelial permeability[J]. *Eur J Oral Sci*, 1999, 107(2): 138-146.
- [8] Mørck Nielsen H, Rømer Rassing M. TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: V. Enzyme activity of the TR146 cell culture model, human buccal epithelium and porcine buccal epithelium, and permeability of leu-enkephalin[J]. *Int J Pharm*, 2000, 200(2): 261-270.
- [9] Eirheim HU, Bundgaard C, Nielsen HM. Evaluation of different toxicity assays applied to proliferating cells and to stratified epithelium in relation to permeability enhancement with glycocholate [J]. *Toxicol In Vitro*, 2004, 18(5): 649-657.
- [10] Boyle MA, O'donnell MJ, Russell RJ, et al. Lack of cytotoxicity by trustwater ecasol™ used to maintain good quality dental unit water-line output water in keratinocyte monolayer and reconstituted human oral epithelial tissue models[J]. *J Dent*, 2010, 38(11): 930-940.
- [11] Oomori T, Oka T, Inuta T, et al. The efficiency of disinfection of acidic electrolyzed water in the presence of organic materials[J]. *Anal Sci*, 2000, 16(4): 365-369.
- [12] Sanjay PR, Hallikeri K, Shivashankara AR. Evaluation of salivary sialic acid, total protein, and total sugar in oral cancer: a preliminary report[J]. *Indian J Dent Res*, 2008, 19(4): 288-291.
- [13] 刘跃进, 张丽, 王桂玲. 有机干扰物对酸性氧化电位水杀菌效果的影响[J]. *中国预防医学杂志*, 2008, 9(12): 1083-1085.
- [14] Mokudai T, Kanno T, Niwano Y. Involvement of reactive oxygen species in the cytotoxic effect of acid-electrolyzed water[J]. *J Toxicol Sci*, 2015, 40(1): 13-19.
- [15] Zheng WC, Cao W, Li BM, et al. Bactericidal activity of slightly acidic electrolyzed water produced by different methods analyzed with ultraviolet spectrophotometric[J]. *Int J Food Eng*, 2012, 8(3): 1039-1058.
- [16] Fujita M, Mashima I, Nakazawa F. Monitoring the decontamination efficacy of the novel poseidon-s disinfectant system in dental unit water lines[J]. *J Microbiol Immunol*, 2017, 50(3): 270-276.
- [17] 黄凝, 韩冰, 沈瑾, 等. 微酸性电解水用于口腔综合治疗台水路消毒的效果观察[J]. *中华现代护理杂志*, 2016, 22(24): 3534-3537.

(编辑 罗燕鸿, 张兆强)