

# 蟾酥與氫氧化鈣混合劑的生物 相容性初步評估

中國醫藥學院附設醫院牙科

黃尚志

## 一、前言

牙痛之存在自古迄今，其病因甚多，除齲齒外，尚有急性牙髓炎、急性根尖周圍炎、牙周炎、牙冠周炎、牙本質過敏。但多數乃因細菌性炎症引起。而中國傳統醫學在牙疾之消炎止痛方面已有數千年的臨床試驗載於中醫典籍（1、2）。

蟾酥為中國民間應用於治療牙痛的常用藥物（3）。該藥在明李時珍（1）的本草綱目曾詳載治一切牙痛、疳蝕齲齒癰腫。並可治療齒縫出血腫痛等疾患。此療效並散見於多量中醫典籍中，用於牙科局部麻醉止痛及口腔疔瘡之治療。

蟾酥具有上述良好的牙齒止痛消腫療效，但該藥對牙齒根尖組織，特別是根尖組織生物親和性的研究，則尚未有任何文獻報告，不若西藥在此方面的研究論文已有上千篇之譜。本計劃之目的乃欲將此中藥應用在牙科根管治療學上，並同時溝通中西醫學對本藥的觀點，並期使中國醫學在牙髓病上嘉惠更多的患者。

本計畫之主要目的乃同時以定性及定量法來比較蟾酥-氫氧化鈣混合劑與常用牙根管充填材氫氧化鈣製劑對組織之刺激性，同時為減少充填材料大量和動物組織接觸，將充填材料放入導管內，再植入動物體內，以模擬實際牙根尖組織（4）。

## 二. 材料與方法

<A> 動物的準備 (1) 蟻酥的取得，採至本院中藥局所提供的川酥。(2) 將 Wistar rats 28 隻，每隻重約 150 ~ 200 g，以 7 % chloral hydrate (0.4 ~ 0.45 ml / 100 g.B.w) 行腹腔注射麻醉，剃除毛髮，碘酒消毒後，將背部分為四個區域，各做 1.5cm 長、深及皮下組織之皮膚切開，分別植入 1cm 長頭皮針導管，其中第一支導管內不放任何充填材料，以作為對照組，另一導管放置依照說明書所建議之方法所調配之純氫氧化鈣糊劑，第三導管則放入 (1) 法所採之蟻酥與氫氧化鈣以 1 : 100 的重量比調以蒸餾水，使成混合劑，裝入導管內，第四組為純蟻酥，以蒸餾水調勻，裝入內，再將導管植入皮下組織內後，以絲線將導管固定，並將皮膚縫合，手術後，經 2 天、四天、一周、二周、四周、六周、八周後，各犧牲二隻白鼠。

<B> 組織的取得 (1) 以過量的 7 % Chloral hydrate 行腹腔注射，將老鼠犧牲 (1) 胸腔打開後，以含 1ml, 1 % Sodium citrate 和 1ml, 1 % Sodium Nitrite 的 Ringer's solution 50 ml 注入左心室，同時將右心房剪破，用 Bouin's solution 灌流固定，30 分鐘後再將背部植有各個導管的部位切下 (內含導管) 並做記號 (3) 切下之標本以 Bouin's solution (Bouin's solution : 飽和 Picric acid 75 ml, formalin 25ml, 冰醋酸 5ml) 固定 48 小時後，取出，並在導管的開口處縱切，在導管開口的遠心端做記號，然後放入包埋匣內。(4) 經自動脫水機脫水，以石臘包埋成塊。

<C> 切片的取得：在包埋時注意組織標本之記號，將無標示區的一面朝下包埋，如此石臘包埋成塊的正面為當初導管之開口處所接觸的組織，包埋後之標本，以切片機切取 5~7 $\mu$  之薄片，每一石臘切取 10 片，每組充填材料共有 40 個切片。

<D> 染色：經切取後之薄切片，以塗有甘油、蛋白之載玻片撈起，經脫臘後，以蘇木紫和伊紅染色。

<E> 鏡檢：經蘇木紫伊紅染色後的切片，以蓋玻片封蓋，在顯微鏡下觀察並計算組織中，嗜中性球、巨噬細胞、漿細胞、淋巴球及纖維母細胞的數目及變化情形，並且記錄各種充填材料在不同時間所引起之組織變化。

<F> 各種細胞數目之計算：在Olympus 的顯微鏡下，以10.x40. 倍數觀察各種細胞之數目及變化情形，而在十倍的目鏡上放10.x10.gride scale ( Olympus 190 CM 10 / 10 SQ ) 以作為計算細胞數的基準，計算在100 格子內各種細胞之數目，每片切片，分別各計算五次，在同一時間內，每一種充填材料共有400 個樣本，經兩位檢察者在顯微鏡下觀察，是否有明顯差異，所有切片之細胞數目，經統計求得平均值及標準差，在t - test  $\alpha = 0.05$ 下，比較各種充填材料和對照組之間，及各種充填材料之間，其細胞數目差異是否於統計學上有意義。

### 三. 結果：

組織在不同之充填材料引起發炎現象在顯微鏡下之觀察，可分定性和定量：

A . 定性：一般而言在各組中對組織之刺激性以蠟酥的刺激性最大，Ca(OH)<sub>2</sub> 和蠟酥之混和物次之，Ca(OH)<sub>2</sub> 最小。Fig : (1). (2). (3). (4).

(1). 在蠟酥這組的組織中，二天有大量的淋巴球存在，而四天後漸漸減少，其他發炎細胞漸漸增加至四週後各種細胞漸漸減少。但纖維母細胞則從二天後漸漸增加，到六週之後各種細胞均漸漸減少。( Fig.1 ).

(2). 在蠟酥和氫氧化鈣的混合物中，對組織之刺激性，所表現的沒有比單獨使用的蠟酥來得強烈，而同樣隨時間之變化而發炎細胞的減少。( Fig.2 ).

(3). 在氫氧化鈣組和對照組中，對組織之刺激性大致上和本人於先前的實驗結果類似，組織發炎之程度，隨時間之增加而減少。( Fig.3.4. )

#### B . 定量：

在低倍顯微鏡下先檢視細胞之分佈再換成10.x40. 倍於10.x10. gride scale 下來計算細胞的數目，計算出所有細胞數目，求得平均值，在T - test ,  $P < 0.05$  下比較各組間細胞數目是否有明顯的差異。

# Group I

## Cells

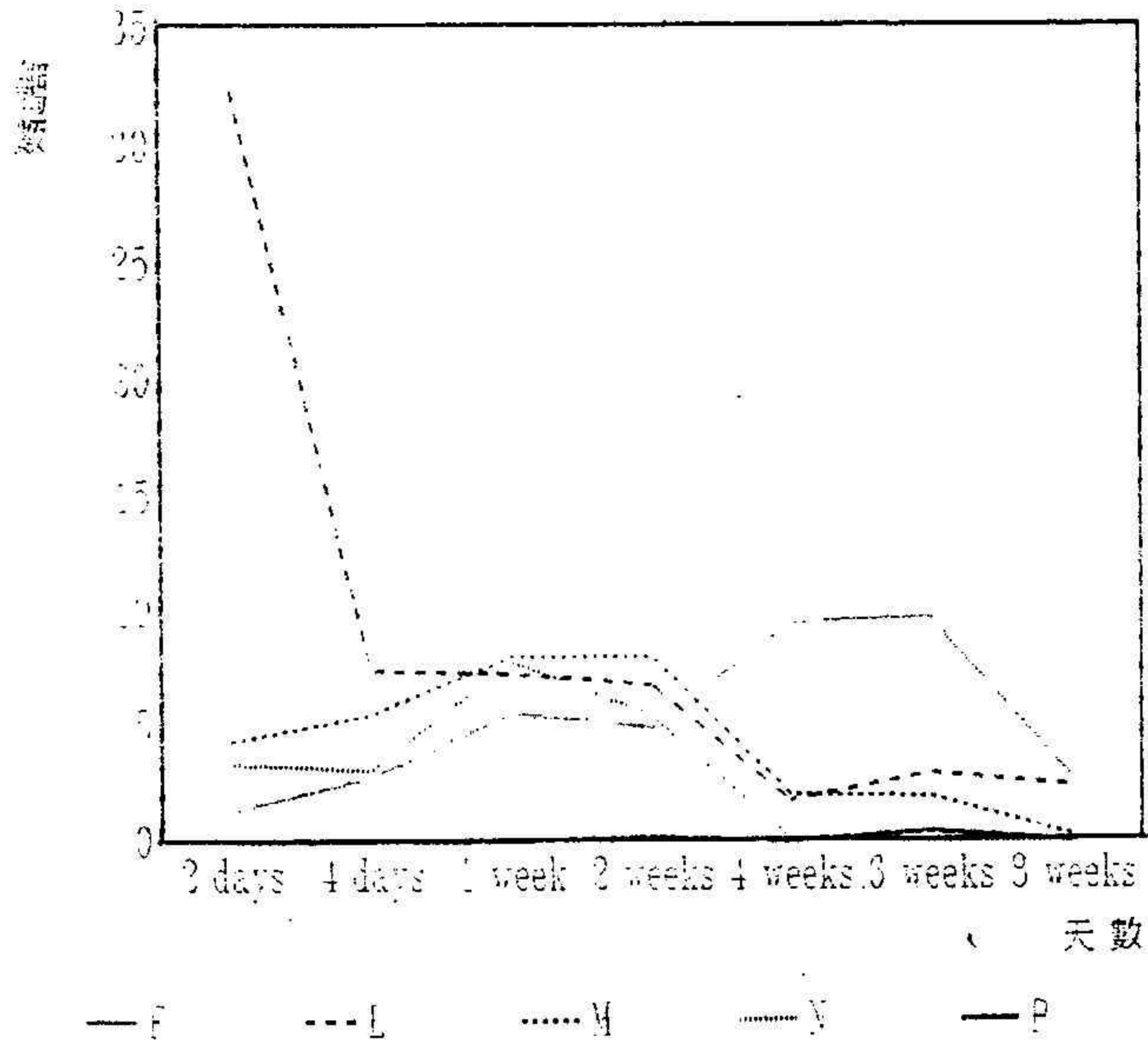


Fig:1 在不同實驗時間下，蟻群組中各種細胞之分佈圖

# Group IV Cells

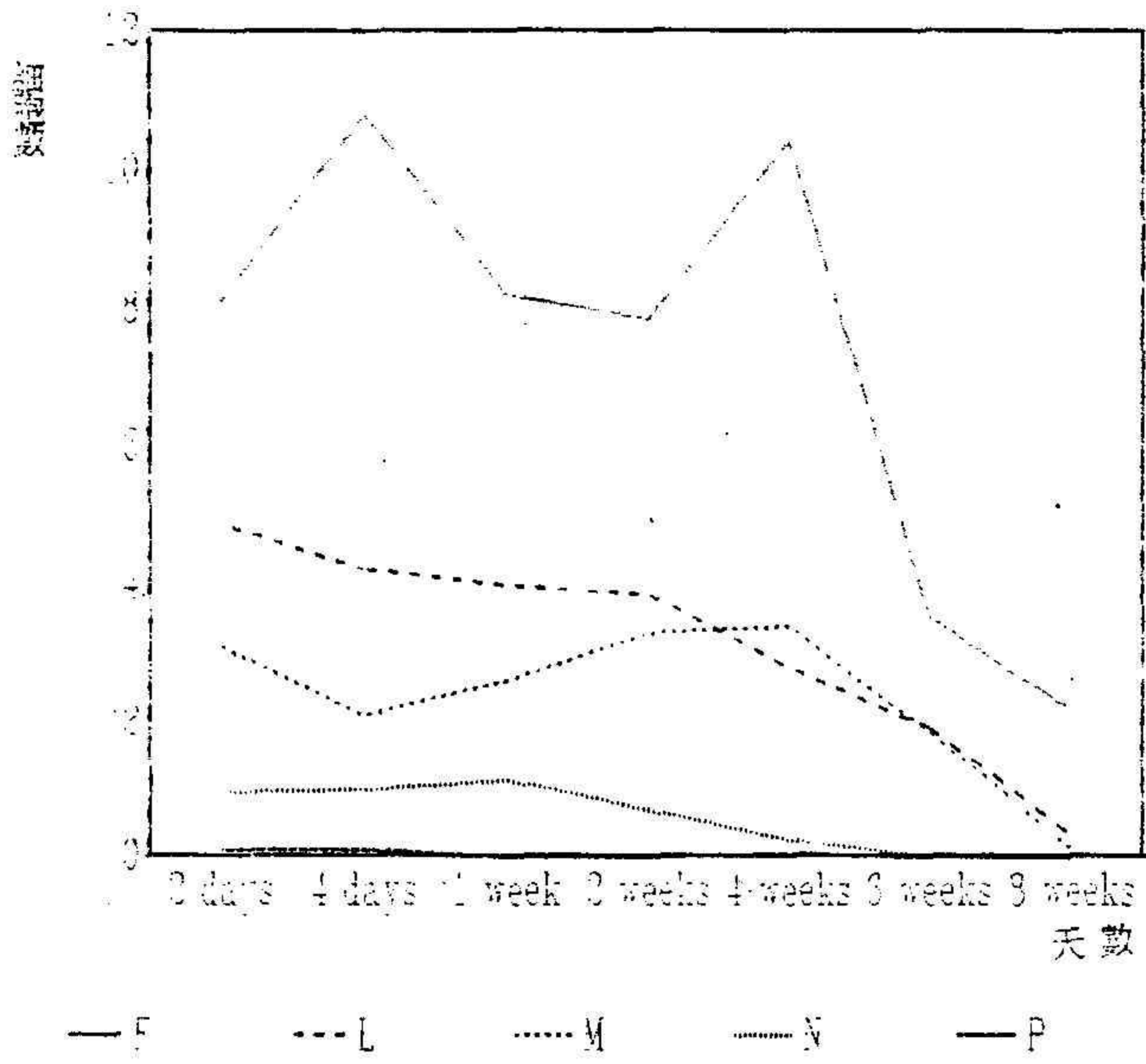


Fig:2 在不同實驗時間下，氫氧化鈣-增脛組中各種細胞之分佈圖

# Group III

Cells

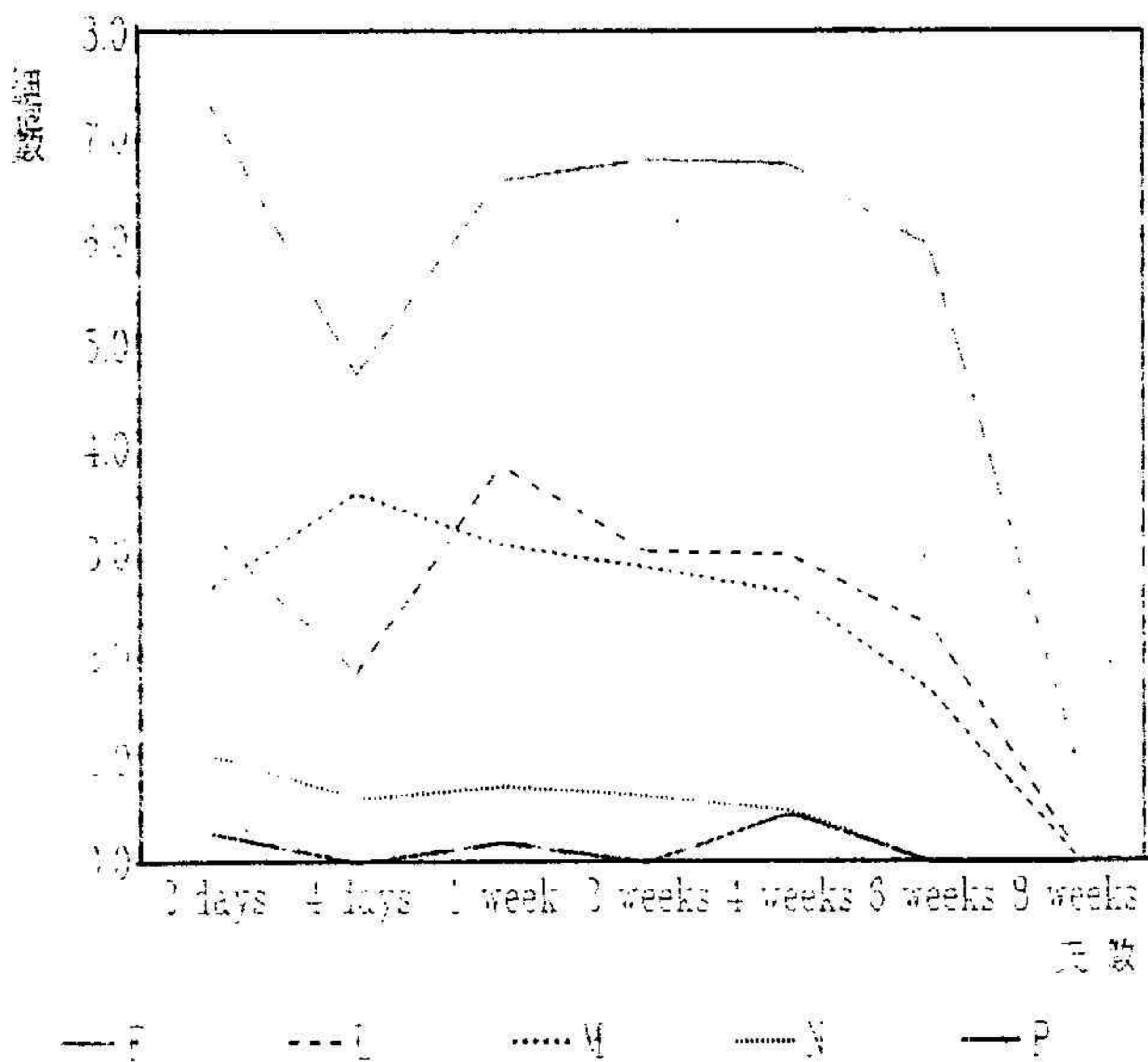


Fig: 3 在下列實驗時間內，圖表在時間中收縮細胞之分佈圖

# Group II

Cells

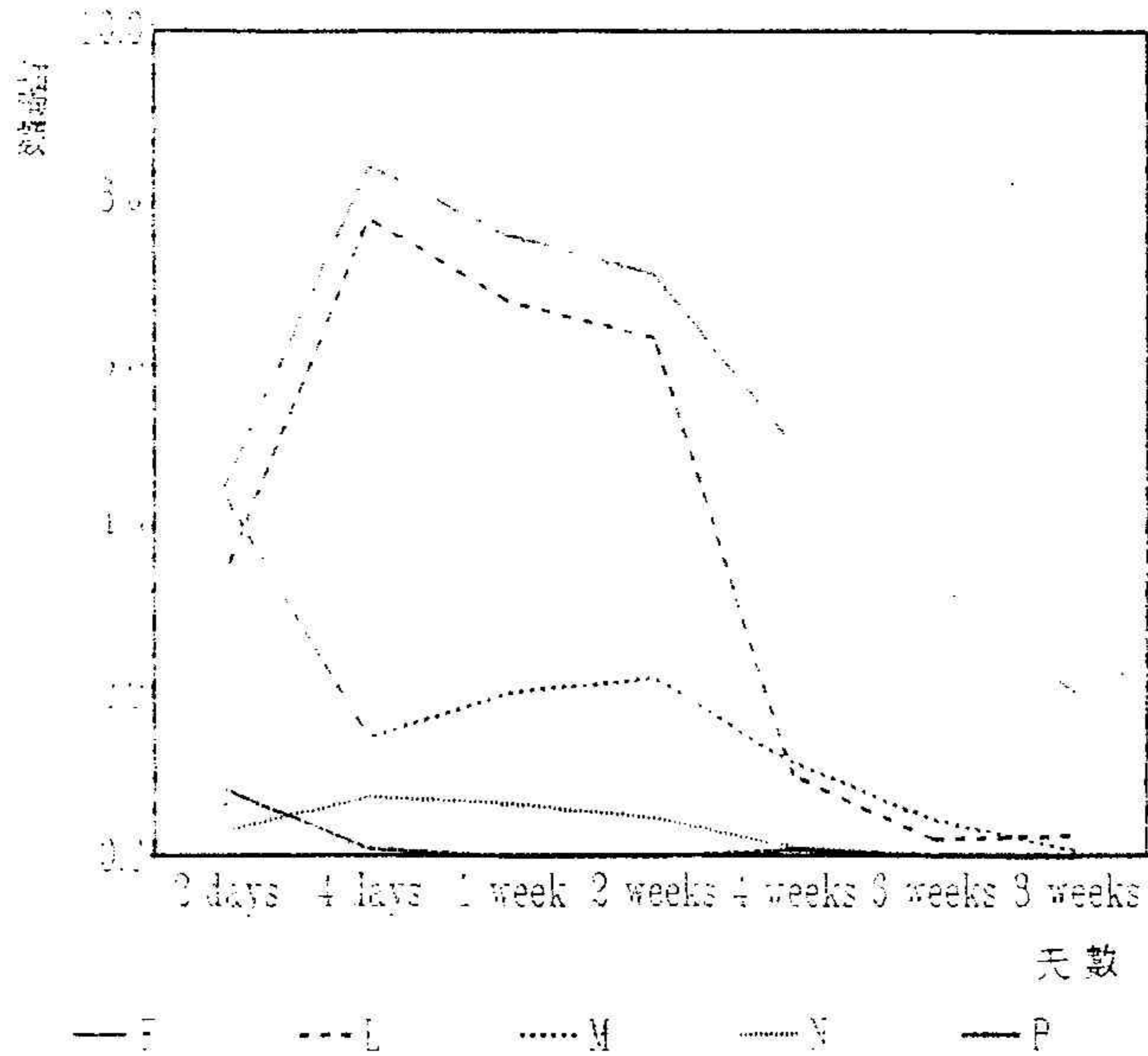


Fig:4 在不同實驗時間下，對照組中各種細胞之分佈圖

Table 1.

蟻群組中各種發炎細胞數目的平均值：

種類\天數	二天	四天	一週	二週	四週	六週	八週
纖維母細胞	1.36	2.78	5.54	4.9	9.45	9.68	2.72
淋巴球	32.62	7.43	7.23	6.76	1.76	2.96	2.38
巨噬細胞	4.34	5.50	8.01	8.03	2.04	1.92	0.24
嗜中性球	3.42	3.04	7.83	5.42	0.01	0.02	0
漿細胞	0	0	0	0.18	0	0.42	0

Table 2.

對照組中各種發炎細胞數目的平均值：

種類\天數	二天	四天	一週	二週	四週	六週	八週
纖維母細胞	4.52	8.38	7.53	7.07	5.01	3.40	2.01
淋巴球	3.46	7.76	6.73	6.32	0.98	0.21	0.26
巨噬細胞	4.40	1.49	2.02	2.21	1.14	0.46	0.07
嗜中性球	0.32	0.74	0.66	0.47	0.12	0	0
漿細胞	0.82	0.10	0	0	0.08	0.01	0



Table 3.

氫氧化鈣組中各種發炎細胞數目的平均值：

種類\天數	二天	四天	一週	二週	四週	六週	八週
纖維母細胞	7.29	4.70	6.56	6.76	6.72	5.92	1.05
淋巴球	3.19	1.83	3.84	3.01	2.98	2.29	0.12
巨噬細胞	2.67	3.55	3.08	2.85	2.63	1.65	0.06
嗜中性球	1.03	0.62	0.74	0.64	0.51	0	0
漿細胞	0.28	0	0.20	0	0.47	0	0

Table 4.

氫氧化鈣和糖酥之混合物組中各種發炎細胞數目的平均值：

種類\天數	二天	四天	一週	二週	四週	六週	八週
纖維母細胞	8.10	10.8	8.18	7.83	10.41	3.53	2.19
淋巴球	4.87	4.23	4.00	3.85	2.82	1.92	0.31
巨噬細胞	3.11	2.11	2.62	3.03	3.39	1.86	0.11
嗜中性球	0.94	0.96	1.10	0.70	0.26	0	0
漿細胞	0.09	0.09	0	0	0.03	0	0

Table 5.

各組中細胞數目的平均值及標準差：

組類\數目	樣本數目	平均值	標準差
糖酥	70	4.17	5.88
對照組	70	2.25	2.73
氫氧化鈣	70	2.21	2.37
糖酥加氫氧化鈣	70	2.68	3.10

Table 6.

各種發炎細胞中各組細胞數的平均值及標準差：

組類\數目	樣本數目	平均值	標準差
纖維母細胞	56	5.87	2.94
淋巴球	56	4.43	5.99
巨噬細胞	56	2.67	2.11
嗜中性球	56	1.06	1.81
漿細胞	56	0.10	0.21

Table 7.

各種天數中各組細胞數的平均值及標準差：

天數\種類	樣本數目	平均值	標準差
二天	40	4.34	6.97
四天	40	3.31	3.18
一週	40	3.79	3.19
二週	40	3.52	3.02
四週	40	2.55	3.16
六週	40	1.81	2.50
八週	40	0.48	0.94

Table 8.

各組中各種細胞數目的平均值及標準差：

組別	發炎細胞	樣本數目	平均值	標準差
增 詳 組	纖維母細胞	14	5.21	3.32
	淋巴球	14	8.45	10.66
	巨噬細胞	14	4.30	3.02
	嗜中性球	14	2.83	2.98
	漿細胞	14	0.09	0.19
對 照 組	纖維母細胞	14	5.42	2.28
	淋巴球	14	3.67	3.19
	巨噬細胞	14	1.68	1.42
	嗜中性球	14	0.33	0.30
	漿細胞	14	0.15	0.30
氫 氧 化 鈣 組	纖維母細胞	14	5.57	2.48
	淋巴球	14	2.47	1.28
	巨噬細胞	14	2.36	1.32
	嗜中性球	14	0.51	0.40
	漿細胞	14	0.14	0.21
氫 氧 化 鈣 加 增 詳 組	纖維母細胞	14	7.29	3.34
	淋巴球	14	3.14	1.54
	巨噬細胞	14	2.36	1.33
	嗜中性球	14	0.57	0.46
	漿細胞	14	0.03	0.05

Table 9.

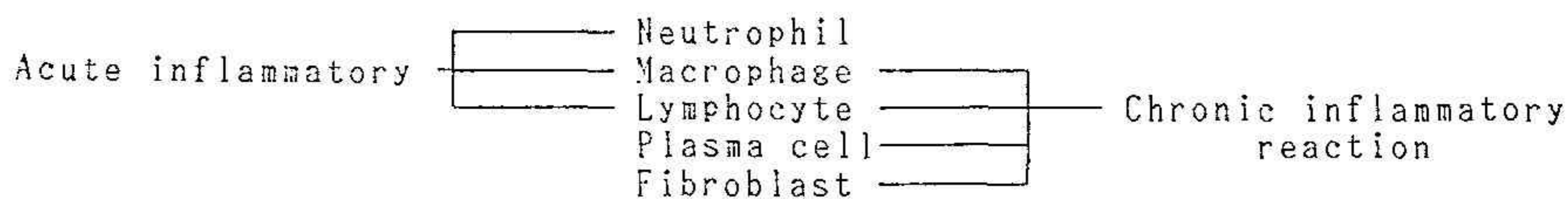
不分細胞的種類在T - test 下，各組是否有統計上差異：

Group Comparison	Lower Confidence Limit	Difference Between Means	Upper Confidence Limit	
1 - 4	0.522	1.496	2.471	***
1 - 2	0.949	1.924	2.898	***
1 - 3	0.992	1.967	2.941	***
4 - 1	-2.471	-1.496	-0.522	***
4 - 2	-0.547	0.427	1.402	
4 - 3	-0.504	0.470	1.445	
2 - 1	-2.898	-1.924	-0.949	***
2 - 4	-1.402	-0.427	0.547	
2 - 3	-0.932	0.043	1.018	
3 - 1	-2.941	-1.967	-0.992	***
3 - 4	-1.445	-0.470	0.504	
3 - 2	-1.018	-0.043	0.932	

註

- 1: 糖 餅
- 2: 對 照 組
- 3: 氫 氧 化 鈣
- 4: 氫 氧 化 鈣 糖 餅 混 合 物
- \*\*\*: 有 顯 著 差 異 性。

Table 10.



#### 四. 討論:

1983年McComb證實氫氧化鈣糊劑在靠近牙髓組織時，會造成鹼性環境，此環境會促成牙本質再礦質化 ( remineralization ) (5). 1955年Mitchell和Shankwalker 將氫氧化鈣植入老鼠的皮下組織，證明氫氧化鈣糊劑會引起鈣化現象。

發炎反應可分為急性和慢性發炎兩種。急性反應又可分為非免疫性反應及免疫性反應；在非免疫性反應中有較多的嗜中性球、巨噬細胞和淋巴球，而嗜中性球出現的週期較短，但在急性反應中佔有一重要角色。在免疫性反應中則有大量的巨噬細胞和淋巴球。在急性反應後，經數天或數週，炎症反應漸漸減輕，而成為慢性。在慢性發炎的組織中，有巨噬細胞，淋巴球和漿細胞及纖維母細胞。漿細胞一般較靠近血管之周圍 ( 6, 7, 8 )。總而言之，在發炎的組織，含有嗜中性球、巨噬細胞、淋巴球、漿細胞及許多巨噬細胞融合成之多核巨細胞 ( Table 10 )。在整個實驗過程中，於組織中植入無充填材料的導管為對照組 ( Fig. 4 )，觀察二天至八週組織變化之情形，反應出對照組為一典型的物理性傷害所造成的發炎現象 (9)。Deemer et al. 在以過度充填之 polyethylene tubes 植入大鼠骨內之研究中，發現組織切片的顯微鏡下觀察，最少必須在手術後四天，以區別是植入材料所引起的發炎現象，或是手術造成的物理性傷害 (9)。在手術後八週左右，所有發炎程度都已經減到最低 (9)。在整個實驗的過程中，由圖形， ( Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4 ) 所顯示出，瓊酥對組織的刺激性，無論是急性或慢性均為各組中最嚴重，而氫氧化鈣加瓊酥混合物對組織的刺激性次之，氫氧化鈣再次之。而在對照組和氫氧化鈣組所顯示之圖形和本人先前所做實驗類似。(10)。

在急性發炎組織中，嗜中性球佔一很重要的角色，我們在整個研究的過程中發現，無論是對照組或實驗組，從二天至四週均有較多的嗜中性球而瓊酥這組所造成急性發炎的程度比各組來的嚴重，而對照組最少，而瓊酥加氫氧化鈣組介於中間。

由 (Table 9). 可得知在 T - test 下 蟾酥和各組之間有顯著的差異性存在，而蟾酥加氫氧化鈣混合物對組織的刺激性有明顯的下降比蟾酥這一組；但統計學上沒有顯著的差異性，而比純氫氧化鈣組對組織的刺激性來的高，但統計學上也沒有顯著的差異存在。因此氫氧化鈣粉末，是否可降低蟾酥對組織的刺激性則有待更進一步的探討，但依照中醫藥典蟾酥有抑制組織發炎的效果在本實驗上則造成嚴重的發炎，是否濃度上的問題則有待再進一步的探討，而在本實驗所採用蟾酥從本院中藥局所提供的蟾酥其成份未標示，因此成份上較難控制，期望能找到較純化的蟾酥來研究濃度對組織的影響。

#### 五. 結論：

蟾酥在傳統中醫上常被用於治療牙科疾病，尤其有止痛消腫之作用，同時具有局部麻醉之效果，但牙痛之存在其病因甚多，大多數乃因細菌引起的炎症反應。蟾酥具有上述之療效，但對牙齒根尖組織生物親和性的研究，尚未有任何文獻報告。本計劃之目的乃將蟾酥應用於牙科齒髓病學上，以牙髓病的觀點深入探討對根管組織的作用，同時以定性、定量來比較蟾酥、氫氧化鈣兩種混合物與常用的根管充填材料氫氧化鈣對生物體組織之刺激性。將各種材料放入 Silicon tube 內分別植入 14 隻 Wistar rats 的皮下組織，經過二天、四天、一週、二週、四週、六週、八週各犧牲二隻白鼠，在顯微鏡下檢視 Lymphocyte、Macrophage、Plasma cell、Fibroblast、Neutrophil 其數量及變化情形，並加以統計分析，結果發現蟾酥對組織之刺激性最大，氫氧化鈣與蟾酥之混合劑次之，各充填材料隨時間之增加而發炎現象漸減，但其中蟾酥對組織之刺激性持續較久。今不分發炎細胞之種類，以 T - test 統計其細胞平均值中：蟾酥與控制組、氫氧化鈣組、氫氧化鈣 - 蟾酥混合組比較，皆有顯著性差異；氫氧化鈣 - 蟾酥混合組和蟾酥組比較，在統計學上無顯著性差異；而氫氧化鈣組和蟾酥組比較，在統計學上也無顯著性差異。

#### 六. 誌謝：

在此特別感謝行政院衛生署中醫藥委員會的鼓勵與支持，也感謝長官與工作同仁的關心，更感謝宋小娟小姐及盧育政的抄寫整理與協助，使得本研究計劃能得以順利的完成。

七. 參考資料：

- (1) 明, 李時珍: 本草綱目 ( 1963 重刊 ) P 1318-1320 , 文友書局。
- (2) 宋, 唐慎微等纂: 經史證類, 大觀本草 ( 中國醫藥研究所, 1971 重刊 ) 卷 22 , 頁2 P 492-493 。
- (3) 謝觀: 中國醫藥大辭典 ( 商務印書館, 1970 重刊 ) P 4481-4484
- (4) Friend LA, Browne RM. Tissue reactions to some root filling materials. Br Dent J, 125:291-298, 1968.
- (5) McComb D. Comparison of physical propertise of commercial calcium hydroxide lining cements. J Am Dent Assoc. 107:610-613, 1983.
- (6) Sergio A, Guimaraes C, Percinoto C. Effect of some endodontic materials on the influx of Macrophages and Multinucleated Giant cell development in experimental granulomas. J Endodont, 10:101-104, 1984.
- (7) Stanley L, Robbins MD. Pathologic Basis of Disease. W.B. Saunders Company, pp.55-105, 1974.
- (8) Trowbridge HO. Immunological aspects of chronic inflammation and repair. J Endodont, 16:54-61, 1990.
- (9) Deemer JP, Tasknis PJ. The effects of overfilled polyethylene tube intraosseous implants in rats . Oral Surg, 48:358-373, 1979.
- (10) 黃尚志: 根管充填材料的生物相容性及其評估, 1990.

Secretio Bufonis is often used to treat dental disease in traditional chinese medicine, especially in the analgetic and anti-swelling effects, in addition to the local anesthetic effect. No matter how many factors can lead to toothache, the major reason is due to the inflammatory response caused by bacteria. Although Secretio Bufonis has the above-stated properties, no previous study has been reported about the biocompatibility of Secretio Bufonis to the periapical tissue of the tooth. The purpose of this project was to investigate the changes in the periapical tissue when applied Secretio Bufonis endodontically, as well as to compare the irritating response caused by Secretio Bufonis,  $\text{Ca(OH)}_2$ , and their mixture qualitatively and quantitatively. Study was performed to put these test materials in the silicone tubes into the subcutaneous layers of 14 Wistar rats separately. After 2 days, 4 days, one week, 2 weeks, 4 weeks, 6 weeks, and 8 weeks, we sacrificed 2 rats on each particular day, examined and calculated the number changes of the lymphocytes, plasma cells, fibroblasts, neutrophils, and macrophages. Microscopic findings revealed that Secretio Bufonis has the most irritating response, followed by the mixture of  $\text{Ca(OH)}_2$  and Secretio Bufonis. We also found as time prolonged, the inflammatory response of each test material decreased; however, Secretio Bufonis can last longer.