

网络出版时间: 2021-8-19 16:09 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210819.1122.008.html>

## 芹菜素对人牙髓间充质细胞增殖和成骨分化的影响

汪芹芹<sup>1</sup>, 徐燕<sup>1</sup>, 胡韶光<sup>1</sup>, 刘珂珂<sup>1</sup>, 桂双英<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨芹菜素对人牙髓间充质细胞(hDPSCs)增殖与成骨分化的影响。方法 CCK-8法检测不同浓度芹菜素对hDPSCs增殖的影响;碱性磷酸酶活性检测及碱性磷酸酶染色(ALP)和茜素红染色观察芹菜素对hDPSCs矿化能力的影响;Real-time PCR检测芹菜素影响下hDPSCs成骨向分化相关基因表达情况。构建兔颅骨缺损模型(4个直径8mm圆形缺损),分四组:空白组、骨粉组、普通培养的hDPSCs复合骨粉组、含5 μmol/L芹菜素培养的hDPSCs复合骨粉组。术后4、8周取标本行Micro-CT测量骨体积分数。结果 CCK-8检测显示5 μmol/L芹菜素对hDPSCs增殖影响最优;茜素红染色结果显示5 μmol/L芹菜素组钙结节的数量明显增多,碱性磷酸酶活性显著提高( $P < 0.001$ );PCR结

果显示5 μmol/L芹菜素组RUNX2和OCN表达上调。Micro-CT显示在4、8周含5 μmol/L芹菜素培养的hDPSCs复合骨粉组的新骨形成较普通培养的hDPSCs复合骨粉组多,空白组与骨粉组成骨效果不明显。结论 芹菜素能促进hDPSCs的增殖和成骨分化,为临床治疗牙周骨缺损提供新思路。

**关键词** 芹菜素;人牙髓间充质细胞;骨再生;牙周炎  
中图分类号 R 285.5; R 780.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1549-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.008

2021-06-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81873019); 安徽高校自然科学研究项目(编号: KJ2017ZD17)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学口腔医学院, 安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

<sup>2</sup> 安徽中医药大学药学院, 合肥 230013

作者简介: 汪芹芹, 女, 硕士研究生;

徐燕, 女, 教授, 硕士生导师, 主任医师, 责任作者, E-mail: 173236344@qq.com

牙周炎是导致牙周组织缺损的重要因素之一, 随着再生医学和牙周组织工程的发展, 以自体来源的种子细胞复合生物材料植入牙周病损部位, 修复牙周缺损受到越来越多学者的关注<sup>[1-2]</sup>。但是, 如何获取大量种子细胞仍是一个难题。芹菜素(4', 5', 7-三羟基黄酮)是一种黄酮类化合物, 无毒且无致突变性, 还有抗炎、抗氧化、抗病毒活性及抗肿瘤等药理作用<sup>[3]</sup>。许周媚等<sup>[4]</sup>证实了芹菜素可显著促进MC3T3-E1细胞成骨分化和矿化。人牙髓间充质

translation initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), activating transcription factor 4 (ATF4), C/EBP-homologous protein (CHOP), tribbles homolog 3 (TRIB3), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), spliced X-box binding protein1-S (XBP1-S), non-spliced X-box binding protein 1-U (XBP1-U) and activating transcription factor 6 (ATF6); Annexin V-PE/7-AAD double staining was used to detect the apoptosis rate of cells in each group; The changes in the cell proliferation ability were determined by the cell counting kit-8 assay; The relative contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (AKP), total bilirubin (TBIL) and indirect bilirubin (IBIL) in the supernatant of cell culture were detected by kits. **Results** At the protein level, RFP induced the protein expression of MANF, GRP78, p-eIF2 $\alpha$ , ATF4 and ATF6; at the gene level, RFP induced the gene expression of MANF and UPR-related genes GRP78, PERK, eIF2 $\alpha$ , ATF4, CHOP and TRIB3 in HepG2 cells. After MANF knockdown, the protein expression levels of GRP78, p-PERK, p-eIF2 $\alpha$ , ATF4, ATF6 and the genes expression levels of UPR-related genes mentioned above were further up-regulated ( $P < 0.05$ ). Moreover, it was also found that after MANF knockdown, the rate of apoptosis increased ( $P < 0.01$ ), the cell proliferation ability decreased ( $P < 0.01$ ), and the levels of cell injury markers ALT, AST, AKP, TBIL and IBIL in the supernatant of cell culture increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** RFP activates the UPR, which is further enhanced by MANF knockdown, and cell injury is aggravated, indicating that MANF may play a protective role in RFP-induced HepG2 cell injury by regulating the UPR.

**Key words** mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor; rifampicin; endoplasmic reticulum stress; cell injury; mechanism

细胞 (human dental pulp mesenchymal stromal cells, hDPSCs) 来源丰富、取材方便、免疫排斥小<sup>[5]</sup>。该研究通过观察黄酮类化合物芹菜素对 hDPSCs 增殖及骨向分化的影响,探讨芹菜素用于辅助治疗牙周病等骨缺损疾病的可能性。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与仪器** 芹菜素(美国 MCE 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司);DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);Countstar 细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司);细胞培养箱、JIT-900 超净台(美国 Thermo 公司);荧光倒置显微镜(DMI3000B,德国 Leica 公司);Elx808U 酶标仪、BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);茜素红染液(美国 Sigma 公司);Bio-oss 骨粉(瑞士 Geistlich 公司);扫描电镜(Hitachi S-4800,日本日立公司)。

**1.2 实验药物** 将适量芹菜素粉末溶于 100  $\mu$ l DMSO 中获得 10 mmol/L 芹菜素溶液,0.22  $\mu$ m 过滤除菌,-20  $^{\circ}$ C 保存。使用时用培养基稀释成实验所需浓度。

**1.3 实验动物** 普通级新西兰兔 10 只,雌雄不限,2.25~2.75 kg,日龄 90~120 d。由安徽医科大学动物中心提供并饲养。经安徽医科大学实验动物伦理委员会批准(编号:LLSC20190122)。

**1.4 hDPSCs 分离培养与传代** 从安徽省口腔医院口腔颌面外科收集健康的离体第 3 磨牙,患者年龄 18~35(23.4 $\pm$ 5.10) 周岁。在超净工作台中用无菌 PBS 冲洗离体牙后劈开牙冠,取出牙髓组织,剪碎成 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 0.5 mm 大小组织块移入 6 孔板中,每孔 3~5 小块组织。盖玻片盖于组织块上,轻轻加压固定,防止气泡产生影响细胞的爬出。于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下进行原代培养,当细胞从组织块周围爬出并达孔底面积 60% 左右时,0.25% 胰蛋白酶消化后进行传代培养。

**1.5 hDPSCs 的鉴定** 倒置显微镜下观察细胞形态。取第 2 代细胞,5 个流式管,每管 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞。4  $^{\circ}$ C 下 1 000 r/min 离心 5 min 后去上清液,无菌 PBS 溶液洗涤 1 次。每管用 100  $\mu$ l PBS 重悬细胞沉淀,按照抗体说明书分别加入 CD34、CD45、CD44、CD73 抗体,设置 1 个空白对照管,混匀后在 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。PBS 溶液洗涤 2 次后重悬,上流式细胞仪检测。

**1.6 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖情况** 取第 3 代

细胞,接种于 3 个 96 孔板,细胞密度为 3 $\times$ 10<sup>3</sup>/孔。分无芹菜素组及含不同浓度芹菜素(0.1、1、5、10、50  $\mu$ mol/L)的实验组,每组设 5 个复孔。于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱内培养,24 h 后换液。分别在第 1、2、3 天按照 CCK-8 试剂盒说明书操作,用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值(optical density, OD)。使用 GraphPad Prism 6 作图。

## 1.7 细胞成骨诱导及成骨能力检测

**1.7.1 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 活性的测定** 成骨诱导液配置:10  $\mu$ mol/L 地塞米松,50 mg/L 维生素 C,10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠。取第 3 代细胞,以 5 $\times$ 10<sup>3</sup>/孔的密度接种于 3 个 96 孔板,每组设 5 个复孔,分为无芹菜素组,成骨诱导液组(OIM)及含不同浓度芹菜素(0.1、1、5、10、50  $\mu$ mol/L)的成骨诱导液组,24 h 后换液,后每 3 d 换液,分别在培养的第 1、4、7 天按照碱性磷酸酯酶试剂盒具体流程进行检测。

**1.7.2 ALP 染色** 根据上述结果,选择浓度为 5  $\mu$ mol/L 的芹菜素进行后续实验。实验分为 3 组:对照组为 DMEM 液组;矿化组为成骨诱导液组;实验组为 5  $\mu$ mol/L 芹菜素成骨诱导液组。取生长状态良好的第 3 代细胞,以 5 $\times$ 10<sup>3</sup>/孔的密度接种于 6 孔板,每组设 2 个复孔,24 h 后换成以上 3 组培养液,后每 3 d 换液,培养至 14 d。按照 ALP 显色试剂盒说明书进行染色。

**1.7.3 茜素红染色** 实验分为 3 组:同 ALP 染色。将细胞接种于 6 孔板,5 $\times$ 10<sup>3</sup>/孔,每组设 2 个复孔,24 h 换成以上 3 组培养液,后每 3 d 换液,培养至 21 d;用 4% 的多聚甲醛溶液固定 30 min;弃固定液,PBS 清洗后,加入茜素红染液,染色 30 min。

**1.8 Real-time PCR** 取第 3 代细胞在 6 孔板中培养,5 $\times$ 10<sup>3</sup>/孔,每组设 2 个复孔,7 d 后使用 TRIzol 裂解细胞,收集并检测 RNA 浓度,浓度合适后使用 Prime-Script<sup>TM</sup> RT Master Mix 系统逆转录合成 cDNA。以 cDNA 作为模板, $\beta$ -actin 为内参,上 PCR 仪检测,全程严格按照试剂说明书操作。引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物及其序列

基因	引物序列(5'-3')
OCN	F: CCAGGCGCTACCTGTATCAATGG R: GCCGATGTGGTCAGCCAACTC
RUNX2	F: CGCCACCACTCACTACCACAC R: TGGATTAAATAGCGTCTGCC
$\beta$ -actin	F: CTCCATCCTGGCCTCGCTGT R: GCTGTACCTTCACCGTTCC

## 1.9 动物实验

**1.9.1 骨粉与 hDPSCs 复合物的制备** 选用第 3 代 hDPSCs 以  $1 \times 10^6$  /ml 细胞高浓度接种于骨粉支架上,放在 50 ml 离心管,低速震荡,孵育 2 h 后转移到 24 孔板,分别加入普通 DMEM 培养基和含  $5 \mu\text{mol/L}$  芹菜素的培养基,置于恒温培养箱培养,培养 3 d 后扫描电镜观察复合物情况。

**1.9.2 显微镜观察复合物** 用 PBS 洗涤 2 次, 2.5% 戊二醛溶液固定 2 h 后弃固定液,再用 PBS 洗涤 3 次,每次 20 min; 后续依次加入 50% 乙醇溶液、60% 乙醇溶液、70% 乙醇溶液、80% 乙醇溶液、90% 乙醇溶液,每个浓度各洗 20 min; 然后加入 100% 乙醇溶液,洗 2 次,每次 20 min。使用临界点干燥仪干燥样本,送样进行表面喷金,扫描电镜下观察。

**1.9.3 动物模型的制备** 实验兔称重后用 3% 戊巴比妥钠行耳缘静脉麻醉 ( $1 \text{ ml/kg}$ ) 将兔子俯卧位固定在手术台,术前头部剃毛,消毒,铺巾,在颅顶正中部位切开至骨膜,剥离骨膜,显露骨面。剥离范围向前至鼻根点处,向后方至枕骨结节。沿冠状缝、矢状缝将颅骨分成四个区域,每个区域造直径 8 mm 的圆形全层骨缺损; 随机分成 4 组: 空白组、骨粉组、普通培养的 hDPSCs 复合骨粉组、 $5 \mu\text{mol/L}$  芹菜素培养的 hDPSCs 复合骨粉组。全程用灭菌生理盐水降温。术后肌注抗生素 3 d,伤口涂抹红霉素软膏预防感染。

**1.9.4 Micro-CT 分析** 术后 4、8 周处死实验兔,方法为麻醉后空气栓塞处死,取出颅骨缺损处组织,范围在缺损外 2 mm 处,进行 Micro-CT 扫描。扫描电流 500 mA,电压 80 kv,扫描完成后将数据直接导入系统中,进行骨体积分数分析,计算得出缺损区 BV/TV 值,并使用 GraphPad Prism 6 作图。

**1.10 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用  $t$  检验  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 hDPSCs 的培养与鉴定** 原代细胞 5 d 左右开始爬出,12 d 左右达到孔底的 60% 左右。贴壁的 hDPSCs 大部分为长梭形,与成纤维细胞类似(图 1)。流式细胞仪对 hDPSCs 进行表面抗原的检测,结果显示阳性表达 CD44(93.98%)、CD73(97.47%); 阴性表达 CD34(0.01%)、CD45(0.00%)。符合间充质来源的特征(图 2)。

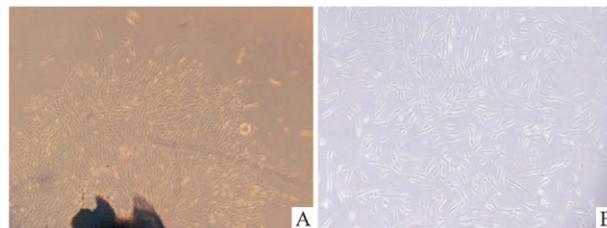


图 1 显微镜下原代培养及传代培养的细胞  
A: 原代细胞  $\times 40$  B: 传代后细胞  $\times 100$

**2.2 芹菜素对 hDPSCs 增殖的影响** CCK-8 结果显示  $0.1 \sim 10 \mu\text{mol/L}$  芹菜素对 hDPSCs 无明显的毒性作用,48 h 时,与其他对照组比较  $5 \mu\text{mol/L}$  芹菜素对 hDPSCs 增殖有显著促进作用,差异有统计学意义 ( $F = 14.640, P < 0.001$ ),72 h 时促进作用更明显,差异有统计学意义 ( $F = 33.843, P < 0.001$ )。当剂量达到  $50 \mu\text{mol/L}$  时,芹菜素具有抑制 hDPSCs 增殖的趋势(图 3)。

### 2.3 成骨诱导后成骨能力检测结果

**2.3.1 ALP 活性表达情况** 用 ALP 试剂盒检测培养 1、4、7 d 后的 ALP 活性水平。4 d 时,与对照组比较  $5 \mu\text{mol/L}$  芹菜素组细胞内 ALP 活性显著增高 ( $F = 310.121, P < 0.001$ ); 7 d 时,OD 值明显增高,差异有统计学意义 ( $F = 404.063, P < 0.001$ ) (图 4)。

**2.3.2 茜素红染色** 经过 21 d 的体外成骨诱导

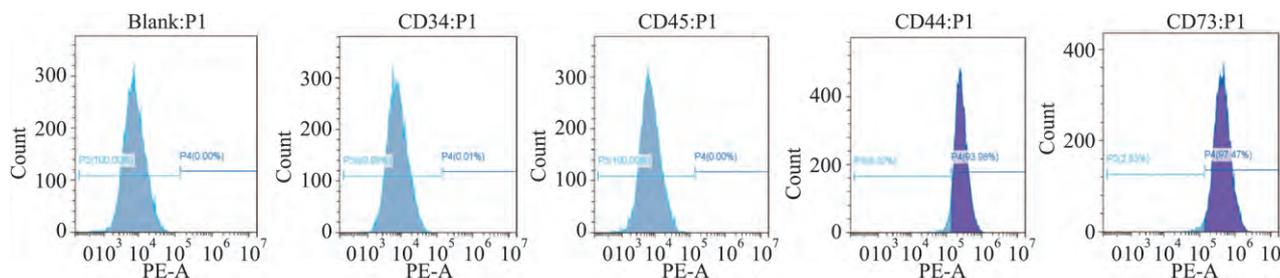


图 2 流式细胞仪检测结果

后,茜素红染色可见 5 μmol/L 芹菜素成骨诱导液组形成的钙结节数量较矿化组多,对照组未见明显的矿化结节形成(图 5)。

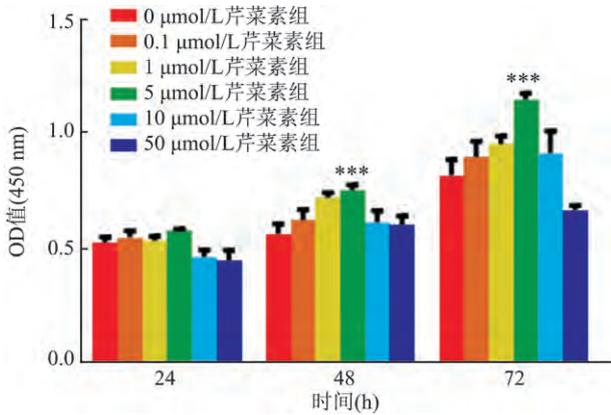


图 3 CCK-8 法检测细胞增殖情况  
与 0 μmol/L 芹菜素组比较: \*\*\* P < 0.001

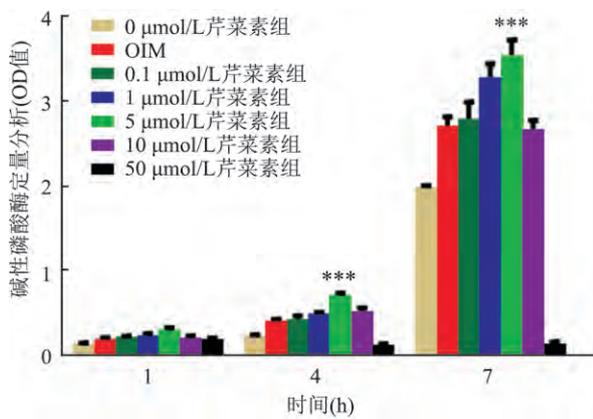


图 4 ALP 定量分析  
与 0 μmol/L 芹菜素组比较: \*\*\* P < 0.001

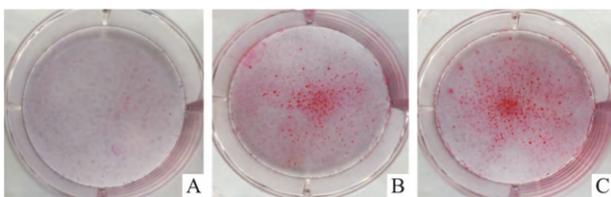


图 5 茜素红染色  
A: 对照组; B: 矿化组; C: 实验组

2.3.3 ALP 染色 经过 14 d 的体外成骨诱导后,镜下可见 5 μmol/L 芹菜素组与矿化组较对照组均有蓝紫色形成,且 5 μmol/L 芹菜素组颜色更深,范围更大(图 6)。

2.4 Real-time PCR 结果 7 d 成骨诱导后,5 μmol/L 芹菜素组 hDPSCs 成骨相关基因 OCN 的

mRNA 相对表达量较对照组均增加,差异有统计学意义( $F = 25.747, P = 0.005$ ); RUNX2 mRNA 相对表达量较对照组增加,差异有统计学意义( $F = 46.791, P = 0.002$ )(图 7)。

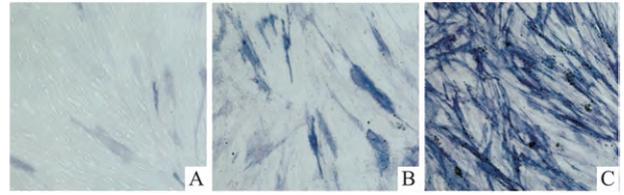


图 6 ALP 染色 ×100  
A: 对照组; B: 矿化组; C: 实验组

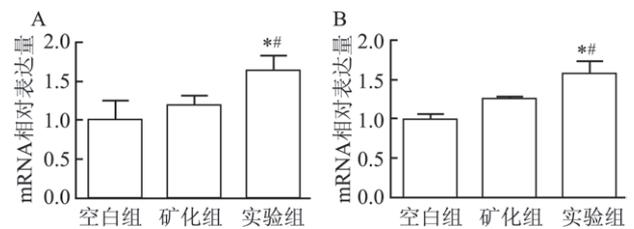


图 7 芹菜素对 hDPSCs 成骨向分化相关基因 mRNA 表达的影响  
A: Runx2; B: OCN; 与空白组比较: \* P < 0.05; 与矿化组比较: # P < 0.05

2.5 细胞骨粉复合物扫描电镜观察 扫描电镜观察到 hDPSCs 与骨粉复合培养 3 d,细胞可黏附于骨粉存活并且伸出伪足(图 8)。

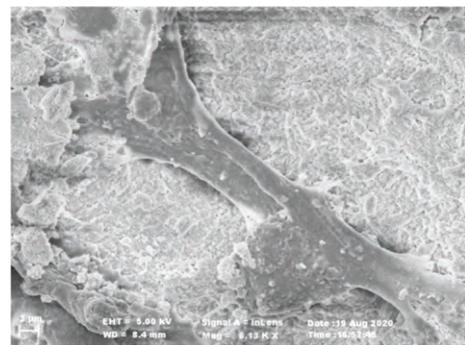


图 8 扫描电子显微镜下观察 hDPSCs/Bio-oss 复合物 ×6 130

2.6 兔颅骨造模 4 个区域按照 8 mm 直径造 4 个圆形全层骨缺损,用有刻度的探针测量直径,依次放好移植骨后缝合(图 9)。

2.7 Micro-CT 结果 术后 4 周骨体积分数检测显示,与普通培养的 hDPSCs 复合骨粉组比较,5 μmol/L 芹菜素培养的 hDPSCs 复合骨粉组骨体积分数较大,空白组及骨粉组无明显新骨形成,差异有统计学意义( $F = 94.389, P < 0.01$ ); 术后 8 周骨体积分数

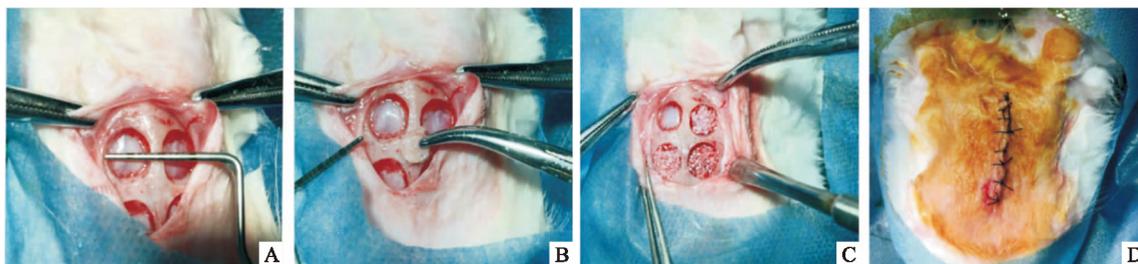


图9 术区大体观

A: 颅骨缺损造模; B: 完整取出骨组织块; C: 放置细胞支架复合物; D: 缝合

检测显示  $5 \mu\text{mol/L}$  芹菜素培养的 hDPSCs 复合骨粉组新骨形成较普通培养的 hDPSCs 复合骨粉组多, 差异有统计学意义 ( $F = 38.139, P < 0.01$ ), 空白组及骨粉组形成少量新骨 (图 10)。

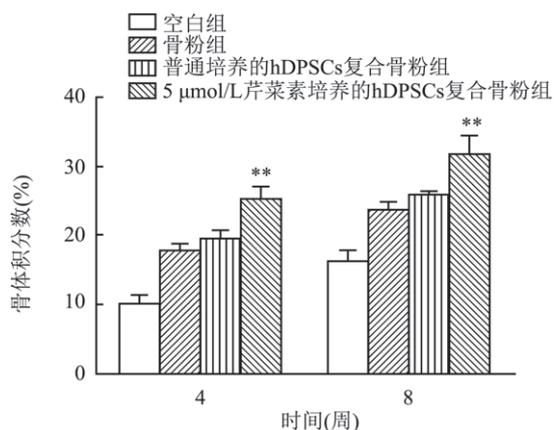


图10 兔颅骨缺损区骨体积分数 (BV/TV) 与普通培养的 hDPSCs 复合骨粉组比较: \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

组织工程的原理是在体外培养种子细胞,使种子细胞具有强大的增殖和分化能力,然后将它们与生物材料复合植入病变区域,以恢复缺损组织的形态和功能<sup>[6]</sup>。牙周再生组织工程同样如此,由于牙周炎,牙周缺损暴露于口腔中复杂的微生物环境中,不利于机体自身产生大量的种子细胞。因此体外刺激细胞增殖和分化是必要的<sup>[7]</sup>。来源于牙髓的细胞具有无创伤、易于分离、增殖率高等优势,可以从第三恒磨牙、正畸牙或其他原因拔除的健康牙的牙髓组织中分离培养获得,而不受伦理问题的影响<sup>[8]</sup>。选用 hDPSCs,不仅有来源广泛、取材简便、体外易培养等优点,且细胞来源于患者自身,更减少了免疫排斥反应。有研究<sup>[9-10]</sup>显示芹菜素可以通过产生膜孔诱导真菌凋亡发挥显著的抗真菌活性。也

有研究<sup>[11]</sup>表明芹菜素可通过减少氧化应激抑制过度活跃的自噬和凋亡来缓解与年龄相关的骨骼肌的萎缩。以上研究证明了芹菜素的抗菌抗氧化的药理作用,对于牙周炎患者来说,抗菌抗炎治疗也是必不可少的,因此,芹菜素的这些药理作用更能保障牙周再生过程的顺利进行。

本实验探讨黄酮类化合物芹菜素对 hDPSCs 增殖和成骨分化的影响。通过改良组织块法体外培养人的健康牙髓组织,获得 hDPSCs。流式细胞仪检测细胞表面抗原 CD34、CD45、CD44、CD73,证明培养的细胞属于间充质来源。利用 CCK-8 法检测不同浓度芹菜素 (0.1、1、5、10、50  $\mu\text{mol/L}$ ) 对 hDPSCs 增殖的影响,结果显示  $5 \mu\text{mol/L}$  的芹菜素对 hDPSCs 增殖影响最优,且与对照组差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ); ALP 活性水平是成骨细胞分化成熟的早期标志之一,ALP 活性测定结果显示  $5 \mu\text{mol/L}$  芹菜素作用后活性显著提高 ( $P < 0.001$ ); 茜素红染色结果显示  $5 \mu\text{mol/L}$  芹菜素组钙结节的数量明显增多,ALP 染色镜下见  $5 \mu\text{mol/L}$  芹菜素组颜色明显加深。Real-time PCR 结果显示  $5 \mu\text{mol/L}$  芹菜素组 RUNX2 和 OCN 的 mRNA 表达明显上调。

以上实验室结果均证明  $5 \mu\text{mol/L}$  芹菜素可以促进 hDPSCs 的增殖和成骨向分化,为了进一步证明,将含有  $5 \mu\text{mol/L}$  芹菜素培养的 hDPSCs 与 Bio-oss 骨粉复合,置于兔颅骨缺损区。4、8 周后取出缺损区标本,测量骨体积分数,含  $5 \mu\text{mol/L}$  芹菜素培养的 hDPSCs 复合骨粉组形成的新骨较其他对照组更多。本实验选择 Bio-oss 骨粉复合细胞,是希望骨粉能在新骨形成过程中起到支架的作用,为成骨过程提供空间结构,能更好的促进成骨。

综上所述,芹菜素能促进 hDPSCs 的增殖和成骨向分化,  $5 \mu\text{mol/L}$  芹菜素培养的 hDPSCs 复合骨粉能促进新西兰兔颅骨缺损的修复。但分子调控机制有待进一步研究。此外,本研究可以为后续治疗

牙周骨缺损等疾病及制备原位液晶缓释递药系统提供思路。

参考文献

[1] Chen F M , Gao L N , Tian B M , et al. Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: a randomized clinical trial [J]. *Stem Cell Res Ther* ,2016 ,7: 33.

[2] 谢贤哲 ,徐 燕 ,何家林 ,等. 人血小板裂解液在人牙髓间充质细胞体外增殖与分化中的应用 [J]. *安徽医科大学学报* , 2019 ,54( 10) : 1551 - 6.

[3] Salehi B , Venditti A , Sharifi-Rad M , et al. The therapeutic potential of apigenin [J]. *Int J Mol Sci* ,2019 ,20( 6) : 1305.

[4] 许周媚 ,张 雪 ,查 旋 ,等. 芹菜素对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖、分化和矿化的影响 [J]. *广东医学院学报* ,2016 ,34( 2) : 109 - 12.

[5] Collart-Dutilleul P Y , Secret E , Panayotov I , et al. Adhesion and proliferation of human mesenchymal stem cells from dental pulp on porous silicon scaffolds [J]. *ACS Appl Mater Interfaces* ,2014 ,6 ( 3) : 1719 - 28.

[6] Castillo-Cardiel G , Lopez-Echaury A C , Saucedo-Ortiz J A , et al.

Bone regeneration in mandibular fractures after the application of autologous mesenchymal stem cells , a randomized clinical trial [J]. *Dent Traumatol* ,2017 ,33( 1) : 38 - 44.

[7] Bartold P M , Gronthos S , Ivanovski S , et al. Tissue engineered periodontal products [J]. *J Periodontol Res* ,2016 ,51( 1) : 1 - 15.

[8] 吴文婧 ,丁如愿 ,张 菁 ,等. 牙髓干细胞与血管周细胞性能比较研究 [J]. *安徽医科大学学报* ,2020 ,55( 10) : 1545 - 9.

[9] Lee W , Woo E R , Lee D G. Effect of apigenin isolated from *Aster yomena* against *Candida albicans*: apigenin-triggered apoptotic pathway regulated by mitochondrial calcium signaling [J]. *J Ethnopharmacol* ,2019 ,231: 19 - 28.

[10] Lee H , Woo E R , Lee D G. Apigenin induces cell shrinkage in *Candida albicans* by membrane perturbation [J]. *FEMS Yeast Res* ,2018 ,doi: 10.1093/femsyr/foy003.

[11] Wang D , Yang Y , Zou X , et al. Antioxidant apigenin relieves age-related muscle atrophy by inhibiting oxidative stress and hyperactive mitophagy and apoptosis in skeletal muscle of mice [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* ,2020 ,75( 11) : 2081 - 8.

### The effect of apigenin on the proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp mesenchymal stromal cells

Wang Qinqin , Xu Yan , Hu Shaoguang , et al

( Dept of Periodontology , Stomatological College of Anhui Medical University , Key Lab of Oral Disease Research of Anhui Province , Hefei 230032)

**Abstract Objective** To explore the effect of apigenin on the proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp mesenchymal stromal cells ( hDPSCs) . **Methods** CCK-8 method was used to detect the effect of different concentrations of apigenin on the proliferation of hDPSCs; Alkaline phosphatase activity detection , alkaline phosphatase staining ( ALP) and alizarin red staining were used to observe the effect of apigenin on the mineralization ability of hDPSCs; Real-time PCR was used to detect the expression of genes related to osteogenic differentiation of hDPSCs under the influence of apigenin. A rabbit skull defect model ( 4 round defects with a diameter of 8 mm) was constructed and divided into four groups: blank group , bone meal group , normal cultured hDPSCs composite bone meal group , and 5 μmol/L apigenin cultured hDPSCs composite bone meal group. The specimens were taken 4 and 8 weeks after the operation , and the bone volume fraction was measured by Micro-CT. **Results** CCK-8 showed that 5 μmol/L apigenin had the best effect on the proliferation of hDPSCs; In the 5 μmol/L apigenin group , the results of alizarin red staining showed a significant increase in the number of calcium nodules and a significant increase in alkaline phosphatase activity ( *P* < 0. 001 ) ; PCR results showed that the expression of RUNX2 and OCN was up-regulated in the 5 μmol/L apigenin group. Micro-CT showed that the hDPSCs compound bone meal group cultured with 5 μmol/L apigenin had more new bone formation than the normal cultured hDPSCs compound bone meal group at 4 and 8 weeks , the effect of the blank group and bone meal to form bone was not obvious. **Conclusion** Apigenin can promote the proliferation and osteogenic differentiation of hDPSCs , providing new ideas for the clinical treatment of periodontal bone defects.

**Key words** apigenin; human dental pulp mesenchymal stromal cells; bone regeneration; periodontitis