

## 柚皮素干预人牙周膜干细胞的成骨分化能力

<https://doi.org/10.12307/2022.143>罗小玲<sup>1</sup>, 张丽<sup>1</sup>, 杨茂桦<sup>1</sup>, 徐洁<sup>2</sup>, 徐晓梅<sup>2</sup>

投稿日期: 2020-10-22

送审日期: 2020-10-24

采用日期: 2020-11-21

在线日期: 2021-04-16

中图分类号:

R459.9; R394.2; R781.4

文章编号:

2095-4344(2022)07-01051-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

细胞培养:  
组织块法分离培养人牙周膜干细胞。

## 干预:

(1) 细胞毒性实验: 用含 10, 100 nmol/L、1, 10, 100 μmol/L 和 1 mmol/L 柚皮素的 α-MEM 培养基培养;  
(2) 成骨诱导分化: 用含 1, 10, 100 μmol/L 柚皮素的成骨诱导培养液培养。

## 主要观察指标:

(1) CCK-8 法检测细胞活性;  
(2) 碱性磷酸酶染色及活性检测;  
(3) 茜素红染色及定量分析;  
(4) RT-PCR 检测成骨相关因子的表达。

## 文章特点—

△ 高浓度的柚皮素 (1 mmol/L) 具有细胞毒性, 适宜浓度范围的柚皮素能显著促进人牙周膜干细胞的成骨分化, 且浓度为 100 μmol/L 时促成骨分化能力最强;  
△ 实验从细胞及基因水平揭示柚皮素具有促进人牙周膜干细胞成骨分化的作用, 为柚皮素用于牙周组织修复工程提供实验依据。

## 文题释义:

柚皮素: 是广泛存在于芸香科植物中的一种二氢黄酮类化合物, 能促进成骨细胞的增殖和分化, 抑制破骨细胞的活性和生成。

牙周膜干细胞: 是存在于牙周膜中的一种未分化的间充质细胞, 具有高增殖能力和多能性, 能定向分化为成骨细胞, 其成骨分化能力受细胞因子、激素、药物等诸多因素的调节。

## 摘要

背景: 柚皮素具有抗菌、抗炎、抗纤维化、抗氧化等多种生理活性, 被广泛应用于医药和食品领域。近来有研究证明, 柚皮素能有效促进间充质干细胞成骨分化, 但柚皮素是否有调节牙周膜干细胞的成骨分化能力尚不清楚。

目的: 探究不同浓度柚皮素对人牙周膜干细胞成骨分化能力的影响。

方法: 原代分离培养人牙周膜干细胞, 分别用含浓度为 10, 100 nmol/L、1, 10, 100 μmol/L 和 1 mmol/L 柚皮素的 α-MEM 培养基处理 72 h 后, CCK-8 法检测柚皮素对人牙周膜干细胞的细胞毒性。取第 3 代人牙周膜干细胞, 分别用含 0, 1, 10, 100 μmol/L 柚皮素的成骨诱导液培养, 诱导 3, 5, 7 d 后分别进行碱性磷酸酶染色和碱性磷酸酶活性检测, 诱导 7 d 后 Real-time PCR 检测成骨相关因子 RUNX2、骨桥蛋白和骨钙素的表达, 诱导 14 d 后进行茜素红染色和矿化结节的定量分析。

结果与结论: 10 nmol/L-100 μmol/L 柚皮素对人牙周膜干细胞没有细胞毒性, 1 mmol/L 柚皮素对人牙周膜干细胞有明显的细胞毒性; 1-100 μmol/L 柚皮素显著促进碱性磷酸酶活性和矿物质沉积, 上调 RUNX2、骨桥蛋白和骨钙素的基因表达。结果表明, 柚皮素能显著促进人牙周膜干细胞的成骨分化, 100 μmol/L 时促成骨分化能力最强。

关键词: 干细胞; 人牙周膜干细胞; 柚皮素; 细胞毒性; 成骨; 分化; 因子

## Effect of naringenin on osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells

Luo Xiaoling<sup>1</sup>, Zhang Li<sup>1</sup>, Yang Maohua<sup>1</sup>, Xu Jie<sup>2</sup>, Xu Xiaomei<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Oral & Maxillofacial Reconstruction and Regeneration Laboratory, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; <sup>2</sup>Department of Orthodontics, Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China  
Luo Xiaoling, Master candidate, Oral & Maxillofacial Reconstruction and Regeneration Laboratory, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Xu Xiaomei, MD, Chief physician, Associate professor, Department of Orthodontics, Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Naringenin has various physiological activities such as anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-fibrosis, and anti-oxidation, and is widely used in the fields of medicine and food. Recent studies have shown that naringenin can effectively promote the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, but it is unclear whether naringenin regulates the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of naringenin with different concentrations on the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells.

<sup>1</sup>西南医科大学颌面修复重建和再生实验室, 四川省泸州市 646000; <sup>2</sup>西南医科大学附属口腔医院正畸科, 四川省泸州市 646000

第一作者: 罗小玲, 女, 1994 年生, 四川省资中县人, 汉族, 西南医科大学在读硕士, 主要从事口腔正畸学的研究。

通讯作者: 徐晓梅, 博士, 主任医师, 副教授, 西南医科大学附属口腔医院正畸科, 四川省泸州市 646000

<https://orcid.org/0000-0003-1935-5824> (罗小玲); <https://orcid.org/0000-0003-2211-655X> (徐晓梅)

基金资助: 四川省大学生创新创业训练计划项目 (S202010632063), 项目负责人: 杨茂桦, 泸州市市-校联合项目 (2020LZXNYDZ06),

项目负责人: 徐晓梅

引用本文: 罗小玲, 张丽, 杨茂桦, 徐洁, 徐晓梅. 柚皮素干预人牙周膜干细胞的成骨分化能力 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(7):1051-1056.



**METHODS:** The primary human periodontal ligament stem cells were isolated and cultured. After treatment with naringenin at concentrations of 10, 100 nmol/L, 1, 10, 100  $\mu$ mol/L and 1 mmol/L for 72 hours, the cytotoxicity of naringenin on periodontal ligament stem cells was measured via CCK-8 assays. The third generation of human periodontal ligament stem cells was cultured with osteogenic medium containing 0, 1, 10 and 100  $\mu$ mol/L naringenin respectively. Alkaline phosphatase staining and activity detection were performed after 3, 5, and 7 days. Real-time PCR was used to detect the expression of osteogenic factors including Runx2, osteopontin and osteocalcin in human periodontal ligament stem cells after induction for 7 days. Alizarin red staining and quantitative determination of mineralized nodule were performed after induction for 14 days.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Naringenin at a concentration of 10 nmol/L–100  $\mu$ mol/L has no cytotoxicity to human periodontal ligament stem cells, and naringenin at a concentration of 1 mmol/L has obvious cytotoxicity to human periodontal ligament stem cells. An appropriate concentration of naringenin (1–100  $\mu$ mol/L) significantly promotes the increase of alkaline phosphatase activity and mineral deposition and upregulates the gene expression of Runx2, osteopontin and osteocalcin. The results showed that naringenin can significantly promote the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells, and the ability to promote osteogenic differentiation is strongest at 100  $\mu$ mol/L.

**Key words:** stem cells; human periodontal ligament stem cells; naringenin; cytotoxicity; osteogenesis; differentiation; factor

**Funding:** the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students in Sichuan Province, No. S202010632063 (to YMH); the Luzhou City-School Joint Project, No. 2020LZXNYDZ06 (to XXM)

**How to cite this article:** LUO XL, ZHANG L, YANG MH, XU J, XU XM. Effect of naringenin on osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2022;26(7):1051-1056.

## 0 引言 Introduction

牙周炎是菌斑生物膜引起的慢性炎症性疾病,其特征是炎症对牙周组织的破坏(附着丧失、牙周袋形成、牙槽骨吸收),不及时治疗将导致牙齿松动脱落<sup>[1]</sup>,影响生活质量。牙周炎的最佳治疗方法是改善炎症微环境,实现牙周组织的再生<sup>[2]</sup>。实现骨再生有3个基本条件:种子细胞、细胞支架和成骨诱导因子<sup>[3]</sup>,具有成骨分化能力的牙周膜干细胞作为成体干细胞较其他来源干细胞在牙周组织再生方面具有更多的优势,是最具应用前景的种子细胞。

干细胞的成骨分化能力受细胞因子、激素、小分子药物等诸多因素的调节<sup>[4-6]</sup>,近年来越来越多的中药被发现能够在体内外促进间充质干细胞成骨分化,且对动物骨质疏松有一定的治疗作用<sup>[7-9]</sup>。柚皮素是中药骨碎补的主要活性成分,广泛存在于桃叶、化橘红等天然植物中<sup>[9]</sup>,来源丰富。柚皮素可通过酸水解法、酶解水法、超临界CO<sub>2</sub>萃取法提取获得<sup>[10]</sup>,具有抗菌、抗炎、抗纤维化、抗氧化等多种生理活性,被广泛应用于医药和食品领域<sup>[11]</sup>。近来有研究证明,柚皮素具有类似雌激素的作用,能有效促进间充质干细胞的成骨分化<sup>[12-13]</sup>,张同凯<sup>[14]</sup>实验发现柚皮素可促进人牙龈成纤维细胞的成骨分化,但柚皮素是否具有调节牙周膜干细胞的成骨分化能力尚不清楚。该研究在体外分离培养牙周膜干细胞,探究柚皮素对牙周膜干细胞成骨分化的影响,为柚皮素用于牙周炎临床治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年12月至2020年8月在西南医科大学口腔颌面修复重建和再生实验室完成。

1.3 材料  $\alpha$ -MEM培养基(Gibco,美国);胎牛血清(四季青,中国);0.25%胰酶细胞消化液(Hyclone,美国);青/链霉素双抗(Hyclone,美国);维生素C(Sigma,美国);地塞米松(Sigma,美国); $\beta$ -甘油磷酸钠(Sigma,美国);柚皮素(Sigma,美国);油红O染液(索莱宝,中国);CCK-8细胞活性检测试剂盒(Dojindo,日本);碱性磷酸酶检测试剂盒(碧云天,中国);BCA蛋白定量试剂盒(碧云天,中国);碱性磷酸酶活性检测试剂盒(南京建成,中国);茜素红染色及定量检测试剂盒(上海生工,中国);RNA提取试剂盒、反

转录试剂盒、SYBR qPCR Mix 试剂盒(Takara,日本);Primer引物(上海生工,中国);RT-PCR仪(Bio-rad,美国);倒置相差显微镜(Olympus,日本);酶标仪(Eppendorf,德国);流式细胞仪(Beckman-Coulter,美国)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 成骨诱导液、成脂诱导液和柚皮素溶液的配制 ①成骨诱导液的配制:精确称量216 mg  $\beta$ -甘油磷酸钠和5 mg 维生素C于1 mL双蒸水中溶解,加入20  $\mu$ L质量浓度为0.2 g/L地塞米松母液,0.22  $\mu$ m滤器过滤后加入100 mL完全培养基( $\alpha$ -MEM培养基+体积分数为10%胎牛血清+1%青/链霉素双抗)中配制成骨诱导液,4  $^{\circ}$ C避光保存。②成脂诱导液的配制:100 mL完全培养基+10  $\mu$ mol/L胰岛素+0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基(IBMx)+0.5  $\mu$ mol/L地塞米松,0.22  $\mu$ m滤器过滤后4  $^{\circ}$ C保存。③柚皮素溶液的配制:称取272.26 mg柚皮素溶解于1 mL二甲基亚砜中,配制成1 mol/L母液,0.22  $\mu$ m滤器过滤后分装,-20  $^{\circ}$ C保存。用完全培养基将柚皮素浓度稀释成10, 100 nmol/L, 1, 10, 100  $\mu$ mol/L和1 mmol/L;用成骨诱导液将柚皮素浓度稀释成1, 10, 100  $\mu$ mol/L,现配现用。

1.4.2 人牙周膜干细胞体外分离培养及鉴定 西南医科大学附属口腔医院颌面外科收集因正畸需要而拔除的12-18岁青少年患者的前磨牙,要求牙齿无龋坏、裂纹、修复体,牙髓活力正常,牙周组织完整。牙拔除后立即保存于含3%青/链霉素双抗的 $\alpha$ -MEM培养基,放置于冰盒中并尽快带回实验室,在超净工作台转移至无菌培养皿,用含5%青/链霉素双抗的PBS反复冲洗至表面无血迹,无菌手术刀片轻轻刮取牙根中1/3牙周膜组织置于不含青/链霉素双抗的PBS中,离心后将组织块均匀平铺在25 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶底部,倒置培养瓶后加入3 mL完全培养基( $\alpha$ -MEM培养基+体积分数为10%胎牛血清+1%青/链霉素双抗),放入饱和湿度的培养箱中培养(37  $^{\circ}$ C,体积分数为5%CO<sub>2</sub>),待三四小时后组织块完全贴壁翻转培养瓶,使组织块浸没在培养基中,常规培养7-14 d,每4-6 d更换1次培养基,显微镜下观察到细胞从组织块边缘爬出后每2 d更换1次完全培养基,待细胞生长融合至80%-90%消化传代,在倒置相差显微镜下观察细胞形态,用于该实验研究的细胞均为第3代。

流式细胞仪检测细胞表面标志物的表达:取第3代生长

状态良好的细胞, 0.25% 胰酶消化后 PBS 洗涤 3 次, 然后用 PBS 重悬制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ , 每个流式管中加入  $5 \mu\text{L}$  细胞悬液, 再分别向管中加入  $50 \mu\text{L}$  PE 标记的 CD44 和 FITC 标记的 CD45、CD90、CD105 单克隆抗体以及阴性对照, 轻轻摇晃混匀,  $4^\circ\text{C}$  避光孵育 30 min; PBS 洗涤 3 次后用 PBS 重悬, 流式细胞仪上机检测。

**多向分化潜能鉴定:** 取第 3 代生长状态良好的细胞, 以每孔  $2 \times 10^3$  个的细胞密度接种于  $3.5 \text{ cm}^2$  细胞培养皿中, 待细胞融合至 50% 时, 换为成骨和成脂诱导培养液, 每 3 d 更换 1 次诱导液, 成骨诱导培养液诱导 14 d 及成脂诱导培养液诱导 21 d 后弃去培养液, PBS 冲洗 3 次,  $40 \text{ g/L}$  多聚甲醛固定 30 min, 采用茜素红染色和油红 O 染色鉴定培养细胞的成骨和成脂向分化结果。

#### 人牙周膜干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	因正畸需要拔除的 12-18 岁青少年患者的前磨牙
原代培养方法:	组织块贴壁法培养
基础培养基:	$\alpha$ -MEM 培养基
添加材料:	体积分数为 10% 胎牛血清及 1% 青 / 链霉素双抗
原代培养时间:	原代细胞培养 5 d 后开始换液; 细胞爬出后 3 d 换液 1 次, 培养 10-14 d 开始传代
细胞传代:	细胞融合至 80% 时用 0.25% 胰酶消化, 按 1 : 2 比例传至下 1 代, 4-6 d 传 1 代, 共传 3 代
细胞鉴定:	成骨诱导分化、成脂诱导分化和流式鉴定
伦理学批准:	该实验经西南医科大学附属医院伦理委员会批准

**1.4.3 柚皮素的细胞毒性实验** 取生长状态良好的第 3 代牙周膜干细胞, 以每孔  $2 \times 10^3$  个的细胞密度接种于 96 孔板, 细胞贴壁后分别加入含浓度为 10, 100 nmol/L、1, 10, 100  $\mu\text{mol/L}$  和 1 mmol/L 柚皮素的  $\alpha$ -MEM 培养基培养, 以  $\alpha$ -MEM 培养基作为对照组, 每组设置 4 个副孔, 72 h 后弃培养基, 每孔加入  $90 \mu\text{L}$  标准培养基 (不含血清的  $\alpha$ -MEM 培养基) +  $10 \mu\text{L}$  CCK-8, 将 96 孔板置于  $37^\circ\text{C}$  培养箱中孵育 2 h, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值。

**1.4.4 碱性磷酸酶染色** 选取生长状态良好的第 3 代牙周膜干细胞, 以每孔  $5 \times 10^4$  个的细胞密度接种于 6 孔板, 24 h 后更换培养基, 对照组加入不含柚皮素的成骨诱导培养液, 实验组分别加入含 1, 10, 100  $\mu\text{mol/L}$  柚皮素的成骨诱导培养液培养, 随后每 3 d 更换 1 次培养基。培养第 3, 5, 7 天, 6 孔板中的细胞用  $40 \text{ g/L}$  多聚甲醛固定 30 min, 弃固定液, PBS 洗涤 2 次, 每次 3 min, 每孔加入  $0.5 \text{ mL}$  One-Step<sup>TM</sup> NBT/BCIP 溶液完全覆盖培养皿底部, 在室温下避光孵育 1 h, 双蒸水洗去多余染液, 于倒置显微镜下观察并拍照。

**1.4.5 碱性磷酸酶活性检测** 选取生长状态良好的第 3 代牙周膜干细胞, 以每孔  $5 \times 10^4$  个的细胞密度接种于 24 孔板, 每组设置 3 个副孔, 24 h 后更换培养基, 分别加入含 0, 1, 10, 100  $\mu\text{mol/L}$  柚皮素的成骨诱导培养液培养, 每 3 d 更换 1 次培养基, 培养后的第 3, 5, 7 天, 弃去培养基,  $0.1\%$  TritonX-100 细胞裂解液裂解细胞, 根据碱性磷酸酶活性测定试剂盒说明书进行操作, 检测各组细胞裂解液中的碱性磷酸酶活性, 并

用 BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度进行校准, 求得各组牙周膜干细胞中碱性磷酸酶活性。

**1.4.6 茜素红染色及矿化结节的定量分析** 取生长状态良好的第 3 代牙周膜干细胞, 以每孔  $5 \times 10^4$  个的细胞密度接种于 6 孔板, 24 h 后对照组加入不含柚皮素的成骨诱导培养液, 实验组加入含 1, 10, 100  $\mu\text{mol/L}$  柚皮素的成骨诱导培养液培养, 每 3 d 更换 1 次培养基, 于培养后的第 14 天, 每孔加入  $40 \text{ g/L}$  多聚甲醛  $1 \text{ mL}$  固定 30 min, 吸弃固定液后 PBS 洗涤 2 次, 每次 3 min, 每孔加入 2% 茜素红染液  $1 \text{ mL}$ , 室温避光染色 30 min, 双蒸水反复洗去多余的染液, 于倒置显微镜下观察矿化结节并拍照, 然后每孔加入 10% 氯化十六烷基吡啶  $1 \text{ mL}$  处理 15 min, 吹打混匀后吸取适量液体加入 96 孔板中, 每组设置 4 个副孔, 酶标仪检测 562 nm 处的吸光度值。

**1.4.7 Real-time PCR 检测成骨相关基因的表达** 取生长状态良好的第 3 代牙周膜干细胞, 以每孔  $5 \times 10^4$  个的细胞密度接种于 6 孔板, 24 h 后弃去原培养基, 对照组加入不含柚皮素的成骨诱导培养液, 实验组加入含 1, 10, 100  $\mu\text{mol/L}$  柚皮素的成骨诱导培养液培养, 培养 7 d 后, PBS 冲洗 1 次, 每孔加  $1 \text{ mL}$  RZ 裂解液, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 检测基因浓度和完整性, 使用 PrimeScript<sup>®</sup> RTase 试剂盒合成 cDNA。

所用引物均由上海生工生物合成, 以 GAPDH 为内参基因, 扩增片段长度 142 bp, 上游引物 5'-CAA TGA CCC CTT CAT TGA CC-3', 下游引物 5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3'; 成骨转录因子 RUNX2 的扩增片段长度为 105 bp, 上游引物 5'-GAA CCC AGA AGG CAC AGA CA-3', 下游引物 5'-GGC TCA GGT AGG AGG GGT AA-3'; 骨桥蛋白 (OPN) 的扩增片段长度为 180 bp, 上游引物 5'-CAC CGA GAC ACC ATG AGA GC-3', 下游引物 5'-CTG CTT GGA CAC AAA GGC TGC-3'; 骨钙素 (OCN) 的扩增片段长度为 113 bp, 上游引物 5'-AGG GCA GCG AGG TAG TGA AGA-3', 下游引物 5'-AAC TCG TCA CAG TCC GGA TTG-3'。根据 SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix 检测试剂盒说明配置  $20 \mu\text{L}$  反应体系: SYBR Green PCR Master Mix  $10 \mu\text{L}$ , 上游引物  $0.8 \mu\text{L}$ , 下游引物  $0.8 \mu\text{L}$ , cDNA  $2 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $6.4 \mu\text{L}$ , 加入定量 PCR 反应专用八联管中, 按如下条件进行 Real-time PCR 反应:  $95^\circ\text{C}$  变性 1 min,  $95^\circ\text{C}$  15 s,  $60^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  1 min, 共 39 个循环, 同时做  $65-95^\circ\text{C}$  范围内的熔解曲线。重复 3 次并用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法统计分析各组间内参基因 GAPDH 和成骨相关因子 Runx2、OPN 和 OCN 的表达水平。

**1.5 主要观察指标** ①不同浓度柚皮素处理后牙周膜干细胞的活性; ②不同浓度柚皮素处理后碱性磷酸酶染色及活性分析, 茜素红染色及定量分析; ③不同浓度柚皮素处理后成骨相关因子的 mRNA 表达。

**1.6 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件对所有数据进行单因素方差分析, 数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 牙周膜干细胞的原代培养和鉴定结果** 组织块法分离培养原代细胞, 在培养 7 d 左右可观察到原代细胞从组织块周围贴壁爬出, 倒置显微镜下观察细胞呈星形或长梭形, 如图

1A 所示。待细胞增殖融合至 90% 时可进行传代培养, 传代后 24 h 细胞基本全部贴壁生长, 生长状态良好, 呈典型的漩涡状生长, 如图 1B 所示。

流式细胞仪检测发现, 培养细胞高表达间充质表面标志物 CD44(99.99%)、CD90(99.81%)、CD105(98.95%), 低表达造血干细胞表面标志物 CD45(0.04%), 证实培养细胞为间充质来源, 具有干细胞特性, 如图 2 所示。

细胞经成骨诱导培养 14 d 后, 茜素红染色可观察到大量矿化结节形成, 如图 3A 所示, 证实了其成骨分化的潜能。成脂诱导培养 21 d 后, 油红 O 染色可观察到明显的红色脂滴, 如图 3B 所示, 证实了培养细胞具有成脂分化的能力。

2.2 不同浓度柚皮素对牙周膜干细胞的细胞毒性 如图 4 所示: 10, 100 nmol/L 及 1, 10, 100 μmol/L 柚皮素对牙周膜干细胞没有细胞毒性, 与对照组间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); 高浓度的柚皮素 (1 mmol/L) 具有明显的细胞毒性, 与对照组间差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

2.3 不同浓度柚皮素对人牙周膜干细胞成骨分化的影响

2.3.1 碱性磷酸酶染色和碱性磷酸酶活性检测结果 培养 3, 5, 7 d 后, 柚皮素对牙周膜干细胞碱性磷酸酶染色和活性的影响如图 5 和图 6 所示。诱导培养第 3 天, 1 μmol/L 柚皮素组与对照组碱性磷酸酶活性相比无明显差异, 10, 100 μmol/L 柚皮素组碱性磷酸酶活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 诱导第 5 天, 1, 10, 100 μmol/L 柚皮素组碱性磷酸酶活性均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 且随着柚皮素浓度增高, 牙周膜干细胞的碱性磷酸酶活性越强, 呈剂量效应关系; 诱导第 7 天, 所有组碱性磷酸酶活性均显著增强, 1, 10, 100 μmol/L 柚皮素组碱性磷酸酶活性与对照组相比, 差异无显著性意义, 仅 100 μmol/L 柚皮素组显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。碱性磷酸酶染色结果与活性测定结果一致。

2.3.2 茜素红染色及矿化结节定量分析结果 诱导 14 d 后, 茜素红染色结果显示, 与对照组相比, 1, 10, 100 μmol/L 柚皮素组具有更多的矿化结节 ( $P <$

0.05), 如图 7 所示。用酶标仪法对矿化结节进行定量分析, 统计结果显示, 随着柚皮素浓度增高, 牙周膜干细胞形成的矿化结节数量越多, 呈剂量效应关系, 说明柚皮素能够促进牙周膜干细胞形成矿化结节的能力, 且各浓度间差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

2.3.3 Real-time PCR 结果 以含不同浓度柚皮素 (0, 1, 10, 100 μmol/L) 的成骨诱导培养基培养牙周膜干细胞 7 d 后, Real-time PCR 检测成骨相关因子 RUNX2、OPN 和 OCN 的表达, 结果显示: 与对照组相比, 所有柚皮素组 RUNX2 的表达均增强, 1 μmol/L 柚皮素组 RUNX2 的表达升高了 (1.251±0.005) 倍 ( $P < 0.05$ ), 10 μmol/L 柚皮素 RUNX2 的表达升高了 (1.424±0.197) 倍 ( $P < 0.05$ ), 100 μmol/L 柚皮素组 RUNX2 的表达升高了 (1.511±0.105) 倍 ( $P < 0.05$ ), 随柚

皮素浓度的上升, RUNX2 的表达量增高, 呈剂量效应关系, 3 个不同浓度组间差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ); 与对照组相比, 低浓度 (1 μmol/L) 柚皮素对成骨分化早期基因 OPN 的表达没有明显的促进作用, 仅浓度在 10, 100 μmol/L 时可显著上调 OPN 的表达 ( $P < 0.05$ ), 两组之间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 柚皮素对牙周膜干细胞成骨基因 OPN 表达的促进作用不具有浓度依赖性; 与对照组相比, 不同浓度柚皮素均能上调成骨相关因子 OCN 的表达, 但 3 个浓度间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 这一作用也没有浓度依赖性, 见图 8。

2.4 生物相容性 10, 100 nmol/L 及 1, 10, 100 μmol/L 柚皮素对人牙周膜干细胞没有细胞毒性, 与对照组间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 具有良好的细胞相容性。

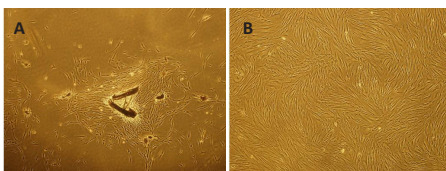


图 1 | 人牙周膜干细胞的形态 (×40)  
Figure 1 | Morphology of human periodontal ligament stem cells (×40)

图注: 图中 A 为原代培养 7 d 左右可观察到原代细胞从组织块周围贴壁爬出, 倒置显微镜下观察细胞呈星形或长梭形; B 为第 3 代细胞, 呈典型的漩涡状生长

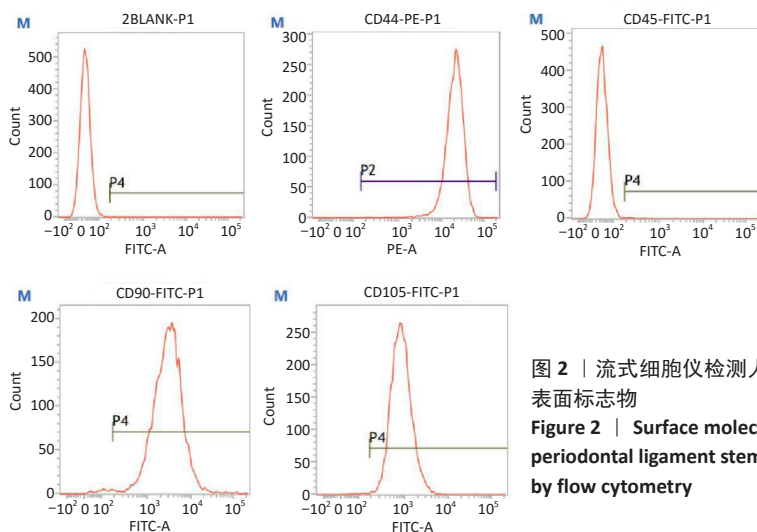


图 2 | 流式细胞仪检测人牙周膜干细胞表面标志物  
Figure 2 | Surface molecules of human periodontal ligament stem cells measured by flow cytometry

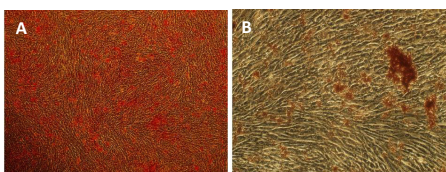
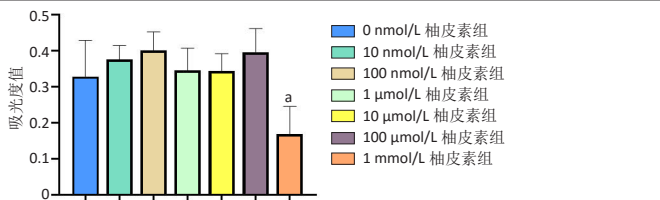
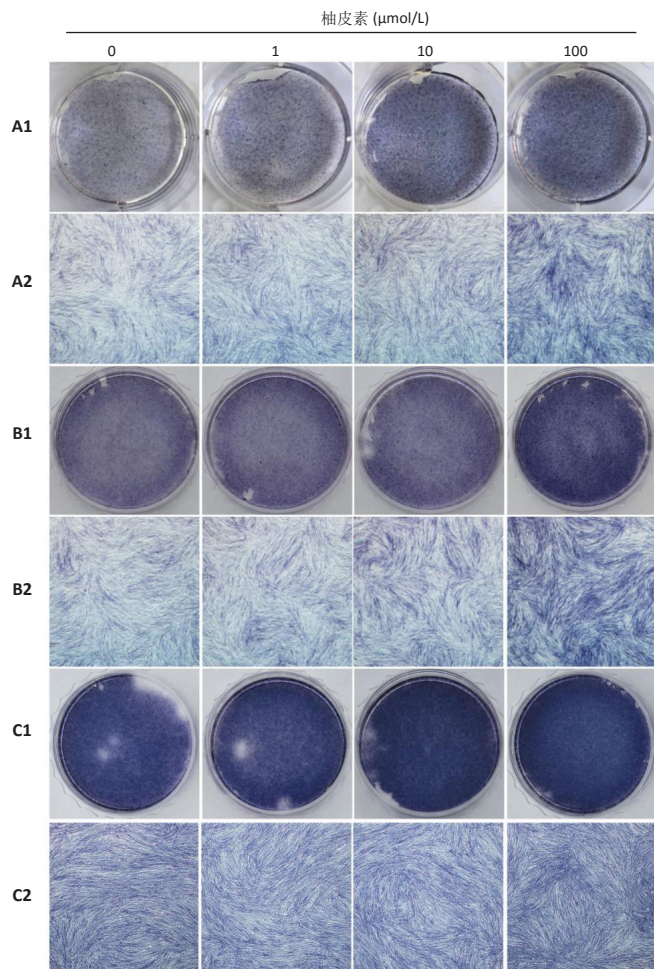


图 3 | 人牙周膜干细胞成骨、成脂诱导分化能力  
Figure 3 | Osteogenic and adipogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells

图注: 图中 A 为成骨诱导 14 d 后, 茜素红染色可观察到大量矿化结节形成 (×100); B 为成脂诱导 21 d 后, 油红 O 染色可观察到明显的红色脂滴 (×200)



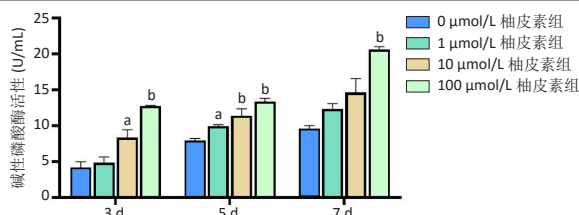
图注: 与 0 nmol/L 柚皮素组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$   
**图 4 | 不同浓度柚皮素处理 72 h 后人牙周膜干细胞的细胞活性**  
**Figure 4 | Cell viability of human periodontal ligament stem cells treated with different concentrations of naringenin for 72 hours**



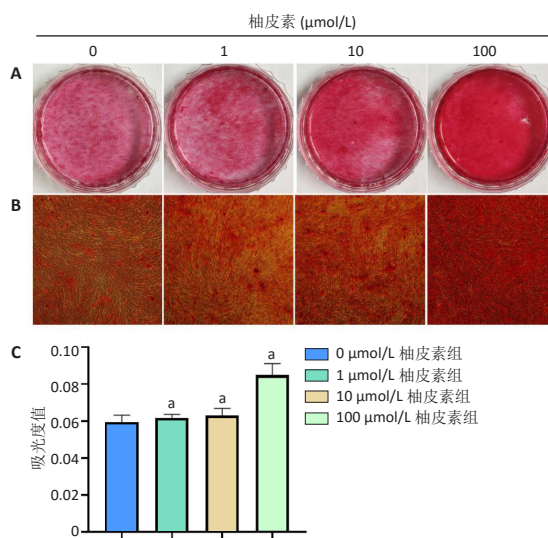
图注: A1, B1, C1 为人牙周膜干细胞成骨诱导培养 3, 5, 7 d 时的大体观; A2, B2, C2 为人牙周膜干细胞成骨诱导培养 3, 5, 7 d 时的镜下观 (×40)  
**图 5 | 柚皮素对人牙周膜干细胞碱性磷酸酶染色的影响**  
**Figure 5 | Effect of naringenin on alkaline phosphatase staining of human periodontal ligament stem cells**

### 3 讨论 Discussion

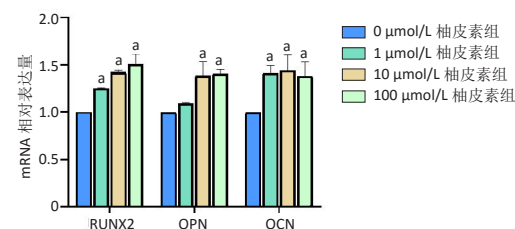
牙周炎是导致牙齿松动脱落的最主要原因, 治疗牙周炎的最佳方法是实现牙周组织的再生。常规治疗依靠填充缺损并替代缺失组织的合成材料, 这些方法不能替代真正的组织再生, 干细胞的使用解决了这个难题<sup>[15]</sup>。牙周膜干细胞是一种间充质来源的干细胞, 具有自我更新和多向分化潜能, 在一定的刺激条件下, 可以分化为成骨细胞、成软骨细胞等, 在牙周膜、牙槽骨、牙骨质等牙周组织的修复和再生中发挥着重要作用<sup>[16]</sup>, 其成骨分化是骨组织修复和再生的重要基础。该实验通过流式鉴定和多向分化能力鉴定证实了所培养细胞



图注: 与 0 μmol/L 柚皮素组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$   
**图 6 | 不同浓度柚皮素对人牙周膜干细胞碱性磷酸酶活性的影响**  
**Figure 6 | Effect of naringenin at different concentrations on alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament stem cells**



图注: 图中 A 为茜素红染色大体观; B 为茜素红染色镜下观 (×40); C 为矿化结节定量检测, 与 0 μmol/L 柚皮素组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$   
**图 7 | 不同浓度柚皮素对人牙周膜干细胞矿化结节形成的影响**  
**Figure 7 | Effects of naringenin at different concentrations on the formation of mineralized nodules in human periodontal ligament stem cells**



图注: 与 0 μmol/L 柚皮素组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$   
**图 8 | 不同浓度柚皮素对人牙周膜干细胞成骨相关基因表达的影响**  
**Figure 8 | Effects of naringenin at different concentrations on the expression of osteogenic related genes in human periodontal ligament stem cells**

为间充质来源, 具备成骨分化的潜能。

干细胞成骨分化受许多因素的调控, 中药也在其中发挥着重要作用。YU 等<sup>[17]</sup>发现不同浓度柚皮苷能促进骨髓间充质干细胞的增殖和成骨分化, 且这种作用在实验浓度内呈剂量相关性。柚皮素是柚皮苷的苷元, 是广泛存在于芸香科植物中的一种二氢黄酮类化合物<sup>[18]</sup>, 因其具有高效低毒和诱导成骨的特性, 近年来将柚皮素作为成骨诱导剂也是一个研究热点。

YUE 等<sup>[19]</sup>研究发现柚皮素浓度高于 200 μmol/L 时具有明显的细胞毒性。此次实验发现 10 nmol/L–100 μmol/L 柚皮

素对牙周膜干细胞没有细胞毒性，高浓度柚皮素 (1 mmol/L) 对牙周膜干细胞有明显细胞毒性，与 YUE 等的研究结果一致。WANG 等<sup>[20]</sup>发现柚皮素能够促进成骨细胞标志蛋白的表达，促进成骨细胞的增殖分化，抑制破骨细胞的活性和生成，抑制骨溶解。基于此研究背景，该实验设置对照组 (不加柚皮素) 和实验组 (加入不同浓度柚皮素)，研究柚皮素对牙周膜干细胞成骨分化的作用。前期预实验发现浓度低于 100 nmol/L 的柚皮素无明显的促成骨分化作用，浓度在 1–100 μmol/L 才具有促成骨分化作用，后续实验旨在该浓度范围内从不同层面探究柚皮素对牙周膜干细胞成骨分化能力的影响。

碱性磷酸酶是成骨样细胞分化成熟的重要标志，其活性高低能够反映细胞的矿化能力和成骨分化的趋势<sup>[21]</sup>。RUNX2 作为 RUNX 家族转录因子成员，其表达水平与一些编码骨基质蛋白的重要基因呈正相关<sup>[22]</sup>；OPN 和 OCN 主要存在于骨组织中，能够直接参与骨改建、吸收、矿化<sup>[23]</sup>。RUNX2、OPN、OCN 是能够代表骨新陈代谢变化过程的标志性物质<sup>[24]</sup>。该研究发现不同浓度柚皮素作用 7 d 后，Real-time PCR 检测结果显示柚皮素作用于牙周膜干细胞后能上调成骨相关基因 RUNX2、OPN、OCN 的表达，且这一作用呈现浓度依赖性，以 100 μmol/L 浓度最佳。同时，实验发现牙周膜干细胞内碱性磷酸酶活性随柚皮素浓度的增高和作用时间的增加而显著增强，呈浓度和时间依赖性，茜素红染色及定量检测结果进一步证实了柚皮素对牙周膜干细胞矿化能力的促进作用。

综上所述，适宜浓度的柚皮素能够促进人牙周膜干细胞的成骨分化作用，使其用于牙周支持组织的修复和重建成为可能，这为柚皮素用于牙周炎的临床治疗提供了实验依据。然而柚皮素调控牙周膜干细胞成骨分化的机制以及柚皮素对炎性牙周膜干细胞的调控作用尚不清楚，在后续实验中将进一步研究，为柚皮素在临床的应用提供更多依据。

**作者贡献：**资料收集、实验设计为罗小玲和张丽；实验实施为罗小玲、张丽、徐浩、杨茂桦；论文写作和修改为罗小玲和徐晓梅。

**经费支持：**该文章接受了“四川省大学生创新创业训练计划项目 (S202010632063)”及“泸州市市-校联合项目 (2020LZXNYDZ06)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突：**文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题：**该研究的实施符合西南医科大学附属口腔医院的相关伦理要求 (批准号为 20180414001)。

**知情同意问题：**实验所用标本来源于因正畸需要而拔除的 12–18 岁青少年患者的前磨牙，患者及监护人对治疗完全知情同意，并签署了知情同意书。

**写作指南：**该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重：**文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审：**文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明：**文章统计学方法已经通过西南医科大学生物统计学专家审核

**文章版权：**文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明：**这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] 孟焕新. 牙周病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012:168-171.
- [2] QIU W, WU BL, FANG FC. Overview of noncoding RNAs involved in the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells. *World J Stem Cells*. 2020;12(4):251-265.
- [3] JIN YZ, LEE JH. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Bone Regeneration. *Clin Orthop Surg*. 2018;10(3):271-278.
- [4] LUI PP, WONG OT, LEE YW. Transplantation of tendon-derived stem cells pre-treated with connective tissue growth factor and ascorbic acid in vitro promoted better tendon repair in a patellar tendon window injury rat model. *Cytotherapy*. 2016;18(1):99-112.
- [5] KOVATS S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell Immunol*. 2015;294(2):63-69.
- [6] DHALIWAL A, PELKA S, GRAY DS, et al. Engineering Lineage Potency and Plasticity of Stem Cells using Epigenetic Molecules. *Sci Rep*. 2018; 8(1):16289.
- [7] YANG Y, CHIN A, ZHANG L, et al. The role of traditional Chinese medicines in osteogenesis and angiogenesis. *Phytother Res*. 2014; 28(1):1-8.
- [8] 张骞予, 杨鹤祥, 楼家晖. 补肾中药诱导骨髓间充质干细胞增殖分化防治骨质疏松的究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2020,38(3):193-195.
- [9] CHEN R, QI QL, WANG MT, et al. Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharm Biol*. 2016;54(12):3203-3210.
- [10] 唐镜, 谭若兰, 吕中建, 等. 柚皮素的提取及其抗癌作用研究进展 [J]. *绿色科技*, 2019(8):240-244.
- [11] ZENG W, JIN L, ZHANG F, et al. Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics. *Pharmacol Res*. 2018;135:122-126.
- [12] SWARNKAR G, SHARAN K, SIDDIQUI JA, et al. A naturally occurring naringenin derivative exerts potent bone anabolic effects by mimicking oestrogen action on osteoblasts. *Br J Pharmacol*. 2012;165(5):1526-1542.
- [13] MING LG, GE BF, WANG MG, et al. Comparison between 8-prenylnaringenin and naringenin concerning their activities on promotion of rat bone marrow stromal cells' osteogenic differentiation in vitro. *Cell Prolif*. 2012;45(6):508-515.
- [14] 张同凯. 柚皮素对牙龈成纤维细胞的增殖和成骨分化的影响 [J]. *医学临床研究*, 2019,36(3):527-529.
- [15] HERNÁNDEZ-MONJARAZ B, SANTIAGO-OSORIO E, MONROY-GARCÍA A, et al. Mesenchymal Stem Cells of Dental Origin for Inducing Tissue Regeneration in Periodontitis: A Mini-Review. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4): 944.
- [16] TRUBIANI O, PIZZICANNELLA J, CAPUTI S, et al. Periodontal Ligament Stem Cells: Current Knowledge and Future Perspectives. *Stem Cells Dev*. 2019;28(15):995-1003.
- [17] YU GY, ZHENG GZ, CHANG B, et al. Naringin Stimulates Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells via Activation of the Notch Signaling Pathway. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7130653.
- [18] ALAM MA, SUBHAN N, RAHMAN MM, et al. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Adv Nutr*. 2014;5(4):404-417.
- [19] YUE J, YANG H, LIU S, et al. Influence of naringenin on the biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *J Dent*. 2018;76:24-31.
- [20] WANG W, WU C, TIAN B, et al. The inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis through the suppression of p38 signaling pathway by naringenin and attenuation of titanium-particle-induced osteolysis. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12):21913-21934.
- [21] YU Z, GAUTHIER P, TRAN QT, et al. Differential Properties of Human ALP+ Periodontal Ligament Stem Cells vs Their ALP- Counterparts. *J Stem Cell Res Ther*. 2015;5(7):292.
- [22] KAWANE T, QIN X, JIANG Q, et al. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Sci Rep*. 2018;8(1):13551.
- [23] KUSUYAMA J, AMIR MS, ALBERTSON BG, et al. JNK inactivation suppresses osteogenic differentiation, but robustly induces osteopontin expression in osteoblasts through the induction of inhibitor of DNA binding 4 (Id4). *FASEB J*. 2019;33(6):7331-7347.
- [24] ARIFFIN SH, MANOGARAN T, ABIDIN IZ, et al. A Perspective on Stem Cells as Biological Systems that Produce Differentiated Osteoblasts and Odontoblasts. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017;12(3):247-259.

(责任编辑: MZH, ZN, JY)