基础研究

芹黄素对拔牙创早期骨愈合影响的实验研究

汝 璐[1,2] 张 君[2,3] 王雅琦[2] 陈治宇[1] 徐文惠[1] 王晗溪[1] 王旭霞[1,2,3]

DOI:10.12337/zgkqjxjyzz.2021.06.011

摘 要

目的：芹黄素是一种广泛分布的植物类黄酮，本研究通过动物实验，探讨芹黄素对于拔牙创早期骨愈合的影响。**方法**：选取 24 只 8 周 Wistar 雄性大鼠，将其随机分为低剂量组、高剂量组、对照组 3 组，拔除右上颌第一磨牙，腹腔注射芹黄素溶液（10mg/kg、50mg/kg、0mg/kg），每两天注射一次。在拔牙后 28 天处死全部大鼠，分离右上颌骨，进行 Micro CT 扫描及制作石蜡切片。切片行 HE 染色和 OPG、RANKL 免疫组织化学染色。采用 Prism 7.0 软件包对数据进行统计学分析。**结果**：HE 染色及 Micro CT 扫描显示加药组拔牙创愈合程度优于对照组。芹黄素可以促进 OPG 的表达（$P < 0.05$），同时降低 RANKL 的表达（$P < 0.05$）。**结论**：芹黄素对于大鼠拔牙创早期的骨愈合具有促进作用。

关键词 芹黄素；拔牙创；早期；骨愈合

1 引言

临床上，慢性病患者、老年患者等常常体现出拔牙后创口愈合缓慢，牙槽骨愈合不良等情况，而拔牙创的愈合水平将直接影响后期修复方式的选择和修复的效果。因此，我们需要寻找一种安全有效

作者单位 [1] 山东大学齐鲁医学院口腔医学院（口腔医院）口腔颌面外科
[2] 山东省口腔组织再生重点实验室
[3] 山东省口腔生物材料与组织再生工程实验室
通讯作者 王旭霞 口腔颌面外科临床与基础研究
联系方式 13906410670
电子邮箱 wxx@sdu.edu.cn
通讯地址 山东济南文化西路 44-1 号，250012
基 金 山东省自然科学基金项目（ZR2019MH113）
山东省研究生教育质量提升计划项目（syal1705）

的方式促进拔牙创的愈合。

芹黄素又称芹菜素，是一种天然存在的多酚类化合物，具有良好的生物安全性，药用价值较高[1]。以往的研究表明，芹黄素可以通过抑制破骨细胞生成及促进其凋亡，促进成骨细胞分化从而调节骨代谢[2,3]。但该药物对于拔牙创愈合的影响鲜有报道。本研究建立大鼠拔牙创愈合模型，通过探究芹黄素对大鼠拔牙创早期愈合程度、骨代谢相关因子（OPG、RANKL）表达表达的影响，探讨芹黄素对大鼠拔牙创早期愈合的影响，为芹黄素在牙槽外科的临床应用提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验动物

选取 8 周龄、SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 24 只（购于北京斯贝福生物技术有限公司），体重为（180±15)g。按随机数表法将大鼠随机分为低剂量组、高剂量组和对照组 3 组，每组 8 只。低剂量组、高剂量组大鼠拔牙后，分别腹腔注射 10mg/kg、50mg/kg 的芹黄素溶液，对照组大鼠则注射等量生理盐水[3,4,5]。所有大鼠饲养于山东省口腔组织再生重点实验室实验动物平台，采用标准的 12h 昼夜节律，室内噪音控制在 60db，环境温度保持在 25℃左右，每天更换饲料、饮用水和垫料（均由山东省口腔组织再生重点实验室实验动物平台提供）。

2.1.2 芹黄素溶液的制备

纯度 >98% 的芹黄素粉剂加入温热的无水乙醇中助溶后，置于超声震荡机中 37℃震荡 5min 至完全溶解后，加入适量的 0.9% 生理盐水配成注射液。

2.2 实验方法

2.2.1 大鼠拔牙创愈合模型的建立

3 组大鼠称重后，按 0.3mL/100g 的剂量用 10% 水合氯醛对大鼠进行腹腔注射麻醉，仰卧固定于手术台上。用自制开口器撑开大鼠口腔，术区消毒后，以金属探针挺松右上颌第一磨牙后将其拔除（图 1）。

图 1 大鼠右上颌第一磨牙拔牙创模型

2.2.2 给药方法

从拔牙当天开始腹腔注射给药，低剂量组大鼠腹腔注射芹黄素溶液 10mg/kg，高剂量组大鼠腹腔注射芹黄素溶液 50mg/kg，对照组大鼠注射等量生理盐水，注射频率为每两天一次[3]。

2.3 实验结果的获取

将三组大鼠每组随机分为两个亚组，均在拔牙后第 28 天通过心脏灌注的方法获取大鼠右侧上颌骨，并于 4℃下在 4% 多聚甲醛中浸泡 24h。然后亚组 1 用流动水冲洗，将标本于 4℃下在 10%EDTA（pH=7.4）中脱钙，每 3d 更换一次脱钙液，共 3 个月。取出标本后，流动水冲洗，脱水，浸蜡，包埋，沿着颌骨长轴方向，将包埋后的标本切开制成 4μm 厚的切片。对切片行 HE 染色，在光学显微镜下观察牙周组织的变化。行 OPG、RANKL 免疫组织化学染色，比较 3 组的平均光密度（Mean optical density，MOD），分析芹黄素对 OPG、RANKL 在拔牙创早期愈合组织表达的影响。亚组 2 用于 Micro CT 观察，拍摄 Micro CT 前，将颌骨晾干，同一方向放在置物架上，固定，防止拍摄过程中颌骨移位。利用 Micro CT 扫描仪（SCANCO Medical AG，瑞士），选择参数 90V，88μA，18μm 层距，高分辨率进行扫描。

2.4 统计学分析

采用 Prism 7.0 软件包进行数据分析处理，组间比较采用单因素方差分析，以及多个样本均数间的两两比较，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

在实验过程中，大鼠体重未见明显下降，体重均呈上升趋势。注射过程比较顺利。

3.1 HE 染色结果

拔牙创愈合模型的三组大鼠，牙槽骨愈合基本完成。对照组的骨髓腔宽大，而低剂量组和高剂量组的骨髓腔较对照组窄，骨小梁相互连接，排列紧密（图 2）。

3.2 免疫组化染色结果

三组中 OPG、RANKL 均有表达，对照组 OPG 的表达明显低于低剂量组和高剂量组（$P < 0.05$），低剂量组与高剂量组的表达差异无统计学意义。RANKL 在对照组的表达明显低于低剂量组（$P < 0.01$），对照组低于高剂量组（$P < 0.05$），低剂量组低于高剂量组的表达差异无统计学意义（图 3A）。RANKL/OPG 结果显示，对照组明显低于加药组（$P < 0.05$），而低剂量组与高剂量组无明显统计学差异（图 3B）。

3.3 Micro CT 结果

Micro CT 扫描重建显示：拔牙后 28 天三组大鼠拔牙创的愈合已基本完成，骨小梁相互连接，其中低剂量组及高剂量组的骨小梁较对照组致密（图 4）。

4 讨论

随着生活质量的提升和口腔医学知识的普及，人们对于牙齿缺失后修复的需求日益增长。大量的动物及临床研究发现，当拔牙创自然愈合时，牙槽骨延期愈合及骨改建会导致牙槽嵴宽度及高度的显著改变，这为后期的修复工作带来了困难[6,7]。

芹黄素作为一种天然的类黄酮化合物，广泛存在于芹菜、大蒜、西兰花、洋葱、苹果、橙子等各类食物及马鞭草科、瑞香科、卷柏科等植物中，其中以芹菜中含量最高[8,9]。近年来，芹黄素具抗炎[9,10]、抗心血管病[11]、抗癌[12]、抗神经系统变性疾病[13]、抗内分泌疾病[11]、预防龋病[14]等多种生物学效应，逐渐成为众学者的研究热点。此外，芹黄素是一种植物类雌激素，可以促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化[15,16]。

通过 HE 染色发现，三组骨小梁排列紊乱，但是高剂量组的骨小梁更加致密有序。Micro CT 扫描重建结果显示，低剂量组的愈合程度高于高剂量组，高剂量组优于对照组。

免疫组织化学染色显示，芹黄素能够显著提高

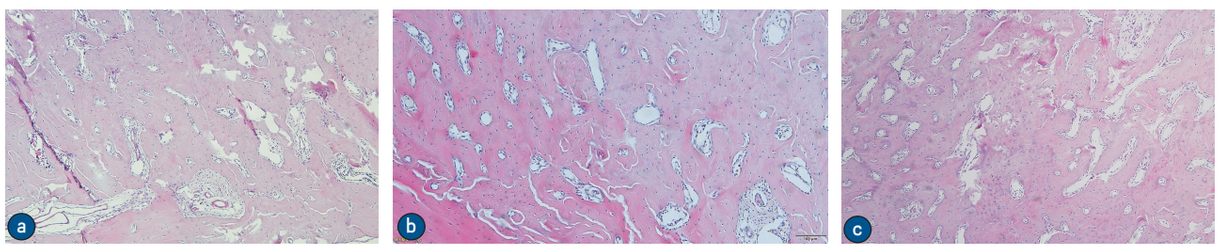

图 2 大鼠右上颌第一磨牙拔牙创 HE 染色（100X）。a. 对照组；b. 低剂量组；c. 高剂量组

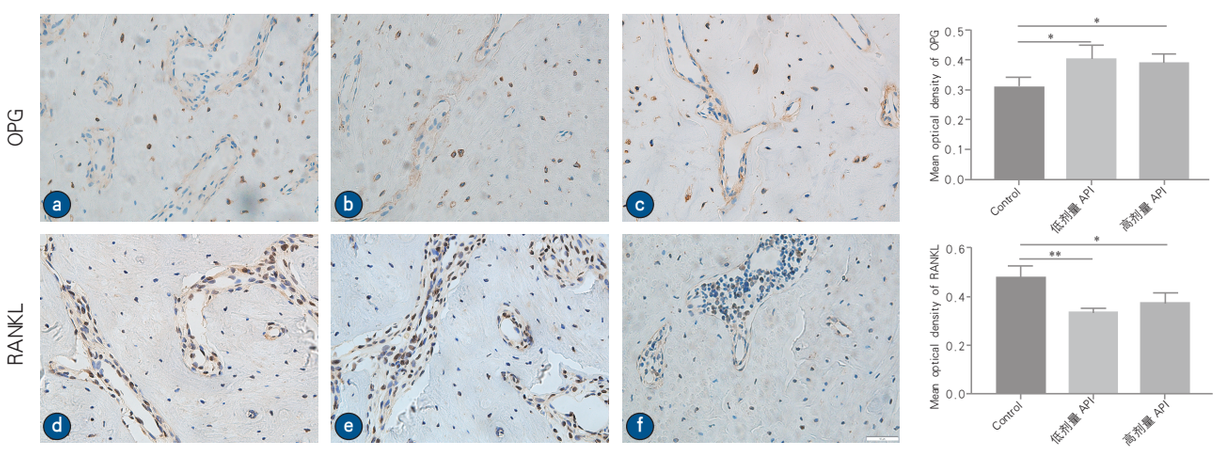

图 3A 大鼠右上颌第一磨牙拔牙创 IHC 染色（400X）。a,d. 对照组；b,e. 低剂量组；c,f. 高剂量组

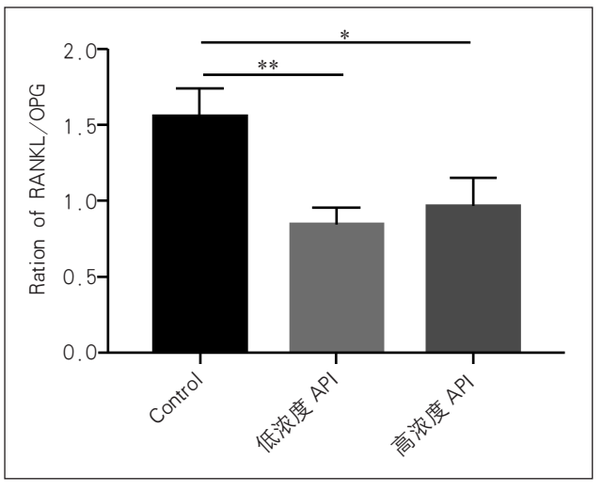

图 3B RANKL/OPG。*P < 0.05，**P < 0.01，未标示组表示两组之间无统计学差异

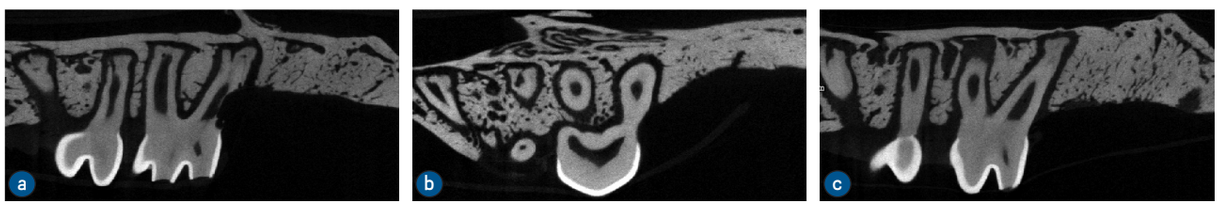

图 4 大鼠右上颌第一磨牙拔牙创内骨愈合情况 (Micro-CT 扫描)。a. 对照组；b. 低剂量组；c. 高剂量组

OPG 的表达，同时抑制 RANKL 的表达。RANKL 是肿瘤坏死因子配体超家族成员，被认为是细胞膜结合因子，参与破骨细胞分化和骨吸收 [17,18]。OPG 又被称作骨保护素，是 RANKL 的诱饵受体，能够阻止 RANKL 与细胞表面信号受体 RANK 结合，抑制破骨细胞分化，从而阻断骨吸收过程 [19]。RANK-RANKL-OPG 系统是参与骨细胞 - 细胞通讯的重要信号通路，对骨重塑有重要影响 [20]。研究表明，RANKL/OPG 的比值可以作为骨重建的指标，比值越小，骨吸收程度越低 [21,22]。因此结合本次实验结果，芹黄素具有抑制骨吸收的作用。

综上所述，芹黄素对于大鼠拔牙创的愈合具有促进作用，其作用机制可能是通过芹黄素促进 OPG 的表达同时抑制破骨相关因子 RANKL 的表达实现的。但是本实验在后期研究中需进一步探究芹黄素发挥促进拔牙创愈合作用的相关信号通路。此外，本研究通过腹腔注射的方式体内给药，药物对全身骨骼系统的作用尚不明确，因此需要更加详尽的实验为其临床应用提供更多的理论依据。

参考文献

[1] Ding T, Chen K, Huang L, et al. Pharmacokinetic properties and drug interactions of apigenin, a natural flavone[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2017, 13(3):1-8.

[2] Jung, Woon-Won. Protective effect of apigenin against oxidative stress-induced damage in osteoblastic cells[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2014, 33(5):1327-34.

[3] Bandyopadhyay S, Lion J M, Mentaverri R, et al. Attenuation of osteoclastogenesis and osteoclast function by apigenin[J]. Biochemical Pharmacology, 2006, 72(2):184-197.

[4] Goto T,Hagiwara K,Shirai N,et al.Apigenin inhibits osteoblastogenesis and osteoclastogenesis and prevents bone loss in ovariectomized mice[J].Cytotechnology,2015, 67(2):357-65.

[5] Lu B, Wu X, Shi J, et al. Toxicology and safety of antioxidant of bamboo leaves. Part 2: developmental toxicity test in rats with antioxidant of bamboo leaves. [J]. Food & Chemical Toxicology, 2006, 44(10):1739-1743.

[6] 赖丽金 , 莫浩轩 . 芹菜素治疗去卵巢骨质疏松模型大鼠的作用与剂量 [J]. 中国组织工程研究 , 2020, 24(2):171-175.

[7] Hämmerle CH, Araújo MG, Simion M, et al. Evidence-based knowledge on the biology and treatment of extraction sockets[J]. Clinical Oral Implants Research, 2012, 23(Supplement s5):80-82.

[8] Mauricio G. Araújo,Jan Lindhe. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog[J]. Journal of Clinical Periodontology,2005,32(2):212-8.

[9] Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). [J]. International Journal of Oncology, 2007, 30(1):233-245.

[10] Kumar K S, Sabu V, Sindhu G, et al. Isolation, identification and characterization of apigenin from Justicia gendarussa and its anti-inflammatory activity[J]. International immunopharmacology, 2018, 59(June):157-167.

[11] Park C H, Min S Y, Yu H W, et al. Effects of Apigenin on RBL-2H3, RAW264.7, and HaCaT Cells: Anti-Allergic, Anti-Inflammatory, and Skin-Protective Activities[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(13):4620.

[12] Suh K S, Oh S, Woo J T, et al. Apigenin attenuates 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative cell damage in HIT-T15 pancreatic β-cells[J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(1):121-126.

[13] Sun Q, Lu N N, Feng L. Apigetrin inhibits gastric cancer progression through inducing apoptosis and regulating ROS-modulated STAT3/JAK2 pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 498(1): 164-170.

[14] Siddique Y H, Jyoti S. Alteration in biochemical parameters in the brain of transgenic Drosophila melanogaster model of Parkinson’s disease exposed to apigenin[J]. Integrative Medicine Research, 2017, 6(3):245-253.

[15] Liu Y, Han L, Yang H, et al. Effect of apigenin on surface-associated characteristics and adherence of Streptococcus mutans[J]. Dental Materials Journal, 2020, 39(6):933-940.

[16] Park J A, Sang K H, Tong H K, et al. Protective effect of apigenin on ovariectomy-induced bone loss in rats[J]. Life Sciences, 2008, 82(25-26):1217-1223.

[17] Liu, Yuyu, Li, et al. Apigenin promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through JNK and p38 MAPK pathways[J]. Molecular and Cellular Biochemistry: An International Journal for Chemical Biology, 2015,407(1-2):41-50.

[18] Ono T, Nakashima T. Recent advances in osteoclast biology[J]. Histochemistry & Cell Biology, 2018,149(4):325-341.

[19] Nelson C, Warren J, Wang M H, et al. RANKL Employs Distinct Binding Modes to Engage RANK and the Osteoprotegerin Decoy Receptor[J]. Structure, 2012, 20(11):1971-1982.

[20] Pivonka P, Zimak J, Smith D W, et al. Theoretical investigation of the role of the RANK-RANKL-OPG system in bone remodeling[J]. Journal of Theoretical Biology, 2010, 262(2):306-316.

[21] Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/ osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis[J]. American Journal of Pathology, 2003, 163(5):2021-2031.

[22] Canciani E, Dellavia C, Marazzi M G, et al. RNA isolation from alveolar bone and gene expression analysis of RANK, RANKL and OPG: A new tool to monitor bone remodeling and healing in different bone substitutes used for prosthetic rehabilitation[J]. Archives of Oral Biology, 2017, 80(August):56-61.