

Elucidating the Osteogenic Potential of Naringin and Naringin-Cu(II) Complex: A Comprehensive *In Vitro* and *In Vivo* Study

Hailing CUI, Peihui ZHOU & Dongqiang XU *

Department of Clinical Laboratory, Weihai Central Hospital
Weihai, Shandong Province, 264000, China.

SUMMARY: This study investigates the molecular impact of Naringin and Naringin-Cu(II) complex on osteoblast differentiation using human osteoblastic cells and *in vivo* zebrafish models. Biocompatibility of the Naringin-Cu(II) complex was assessed through MTT and chick embryotoxicity assays. Osteogenic roles were evaluated at the cellular level using ALP measurements and Alizarin red staining, and the mRNA expression profile of osteoblast markers (Runx2, type 1 col, OC, and ON) was investigated at the molecular level. Negative regulator of osteoblast development, HDAC7 was also studied through real-time RT-PCR analysis. The involvement of miR-143-3p was explored using bioinformatics analysis. *In vivo* studies utilised the zebrafish scale model and examined the expression profiling of osteoblast markers. Results indicated that Naringin and Naringin-Cu(II) complex were non-toxic up to 10 μ M and upregulated the osteoblast marker genes, leading to increased mineralization in both *in vitro* and *in vivo* models. The osteogenic property of Naringin-Cu(II) in osteoblasts was found to be mediated by miR-143-3p, which suppressed HDAC7 and enhanced Runx2 expression. This study highlights the potential of Naringin-Cu(II) as a promising agent, either alone or in combination with other bone scaffolding systems/materials, for applications in bone tissue engineering.

RESUMEN: Este estudio investiga el impacto molecular de la naringina y el complejo naringina-Cu (II) en la diferenciación de osteoblastos utilizando células osteoblásticas humanas y modelos de pez cebra *in vivo*. La biocompatibilidad del complejo Naringina-Cu(II) se evaluó mediante ensayos de MTT y de embriotoxicidad de pollo. Las funciones osteogénicas se evaluaron a nivel celular mediante mediciones de ALP y tinción con rojo de alizarina, y se investigó el perfil de expresión de ARNm de marcadores de osteoblastos (Runx2, tipo 1 col, OC y ON) a nivel molecular. HDAC7, regulador negativo del desarrollo de osteoblastos, también se estudió mediante análisis RT-PCR en tiempo real. La participación de miR-143-3p se exploró mediante análisis bioinformático. Los estudios *in vivo* utilizaron el modelo de escala del pez cebra y examinaron el perfil de expresión de los marcadores de osteoblastos. Los resultados indicaron que la naringina y el complejo naringina-Cu(II) no eran tóxicos hasta 10 μ M y regulaban positivamente los genes marcadores de osteoblastos, lo que llevaba a una mayor mineralización en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Se descubrió que la propiedad osteogénica de la naringina-Cu (II) en los osteoblastos estaba mediada por miR-143-3p, que suprimió HDAC7 y mejoró la expresión de Runx2. Este estudio destaca el potencial de la naringina-Cu (II) como un agente prometedor, solo o en combinación con otros sistemas/materiales de armazón óseo, para aplicaciones en ingeniería de tejido óseo.

KEY WORDS: bone, copper, naringin, naringin-Cu(II) complex, tissue engineering.

* Author to whom correspondence should be addressed. *E-mail:* xudongqiang40@sina.com